

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**"JULIO DE MESQUITA FILHO"**  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Campus de Araraquara  
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

**Avaliação de complexos de inclusão e  
micropartículas poliméricas como alternativas de  
estabilização do composto antiprotozoário,  
antibacteriano e antifúngico 2-(2-nitrovinil) furano  
(G-0)**

**Autor: Vivian Ruz Sanjuan**

**Orientador: Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira**

**Araraquara-SP**

**2019**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**"JULIO DE MESQUITA FILHO"**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Campus de Araraquara  
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



**Avaliação de complexos de inclusão e micropartículas poliméricas como alternativas de estabilização do composto antiprotozoário, antibacteriano e antifúngico 2-(2-nitrovinil) furano (G-0)**

**Autor: Vivian Ruz Sanjuan**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármaco e Medicamentos, para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira

**Araraquara-SP**  
**2019**

### **Ficha Catalográfica**

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

**R987a**

Ruz Sanjuan, Vivian.

Avaliação de complexos de inclusão e micropartículas poliméricas como alternativas de estabilização do composto antiprotozoário, antibacteriano e antifúngico 2-(2-nitrovinil) furano (G-0) / Vivian Ruz Sanjuan. – Araraquara, 2019. 264 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Anselmo Gomes de Oliveira.

1. 2-(2-nitrovinil) furano. 2. Estabilização de fármacos. 3. Ciclodextrinas. 4. Complexos de inclusão. 5. Micropartículas. 6. Etilcelulose. I. Oliveira, Anselmo Gomes de, orient. II. Título.

**CAPES: 33004030078P6**

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO DA TESE:** Avaliação de complexos de inclusão e micropartículas poliméricas como alternativas de estabilização do composto antiprotozoário, antibacteriano e antifúngico 2-(2-nitrovinil) furano (G-0).

**AUTORA:** VIVIAN RUZ SANJUAN

**ORIENTADOR:** ANSELMO GOMES DE OLIVEIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de conhecimento: Sem Área de Conhecimento pela Comissão Examinadora:



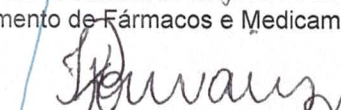
Prof. Dr. ANSELMO GOMES DE OLIVEIRA

Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara



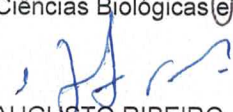
Profa. Dra. ROSEMEIRE CRISTINA LINHARI RODRIGUES PIETRO

Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara



Profa. Dra. THALITA PEDRONI FORMARIZ PILON

Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde / Universidade de Araraquara - UNIARA



Prof. Dr. CLOVIS AUGUSTO RIBEIRO

Departamento de Química Analítica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. FRANCISCO BENEDITO TEIXEIRA PESSINE

Departamento de Físico Química / Universidade Estadual de Campinas

Araraquara, 19 de fevereiro de 2019

## **Dedicatória**

A mis queridas hijas, Adriana y Laurita, que fueron y son mi motor impulsor en este largo y difícil viaje, por enfrentar con valentía mi ausencia, por ser nobles e comprender, a pesar de su corta edad.

A mi madre, mi brazo derecho...

A mi esposo Enoel, por todo...

## **Agradecimentos**

Inicialmente gostaria de agradecer à Associação Universitária Ibero-americana de Pós-graduação (AUIP) em conjunto com o Programa de Apoio a Estudantes de Doutorado do Exterior (PAEDEX) da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP) por ter-me outorgado a bolsa de doutorado e, assim, contribuir com a superação de profissionais em países subdesenvolvidos como Cuba.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Apoio ao Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) - Código de financiamento 001 e do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) – Processo [304617/2017-2](#).

À meu orientador, o professor Dr. Anselmo Gomes de Oliveira, à professora Dra. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro, coordenadora do Programa de Ciências Farmacêuticas e à minha Universidade Central "Marta Abreu" de Las Villas, em Cuba (UCLV), por ter confiado em mim para levar ao término este doutorado.

À Universidade Católica de Leuven, Bélgica (KULEUVEN) porque foi lá a origem desta investigação, muito em especial ao professor Dr. Guy Van den Mooter, pelo incentivo no trabalho com ciclodextrinas e pelo aprendizado no seu laboratório.

Aos professores e técnicos do PPG em Ciências Farmacêuticas em geral, pela contribuição à minha formação, em especial aos professores Dr. André Gonzaga dos Santos, Dra. Taís María Bauab e Dra. Iracilda Zeppone Carlos, pela disponibilização de recursos, experiência e tempo em função dos experimentos.

Aos professores Dr. Antônio Gilberto Ferreira, da UFSCar, pelo grande apoio no desenvolvimento dos experimentos com Ressonância Magnética Nuclear, Dr. Clóvis Augusto Ribeiro do Instituto de Química, pelo apoio nos experimentos com

Análise térmica e aos professores do laboratório da Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica Dra. María Palmira Daflon Gremião, Dr. Marlus Chorilli e Dra. Beatriz Stringhetti Ferreira pelo apoio material e experiência transmitida nos ensaios de liberação/permeação, assim como também aos técnicos Caio Humberto Perego e Marissa Polessi pela ajuda nos procedimentos de *Clean-up* e ensaios de citotoxicidade, respectivamente.

Aos meus queridos colegas e amigos do laboratório de Farmacotécnica, muito em especial à Camila Fernanda Roderó, Natália Noronha, Roberta Rigón, Jéssica Bernegossi, Andressa Pironi e Fernanda Isadora Boni, assim como o doutorando Matheus Aparecido Ramos do laboratório de Microbiologia e os mestrandos Jovan Duran do Instituto de Química e Angel Gustavo Tolaba de Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos, os quais de alguma forma ajudaram no desenvolvimento dos experimentos.

Também meu agradecimento ao CEMPEQC do Instituto de Química, pelo desenvolvimento da análise por CG-HeadSpace, especificamente ao seu gerente técnico Dr. Marcos Roberto Monteiro e ao doutorando Antonio Tercini.

Finalmente aos cubanos que me acompanharam nesta etapa, muito em especial ao Dr. Jorge Enrique Rodríguez Chanfrau, Celia Magaly Casado, Michael Pérez Rodríguez, Daylin Gamiotea e Alexander Valerino.

*"Um cientista deve acima de tudo, ser como uma criança. Se ele vê algo, deve dizer o que está vendo, independente daquilo ser o que ele imaginava ver. Ver primeiro, testar depois. Mas sempre ver primeiro. Senão você só vai ver o que espera ver"*

*-Do livro de Douglas Adams: - Até mais, e obrigado pelos peixes! -*

## Resumo

2-(2-nitrovinil)furano (G-0) apresenta atividade antiprotozoária, antibacteriana e antifúngica frente a elevado número de patógenos porém, a capacidade de sublimação, baixa velocidade de dissolução em meio aquoso, problemas de compatibilidade com excipientes e fotodegradação, tem limitado sua incorporação em formas farmacêuticas para uso humano e/ou veterinário. O propósito do presente trabalho foi avaliar duas alternativas para a estabilização do candidato a fármaco, através da formação de complexos de inclusão liofilizados (FD) com hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina e sulfobutiléter- $\beta$ -ciclodextrina sódica e utilizando a microencapsulação com etilcelulose pelo método de emulsificação/evaporação do solvente. Uma vez formados e previamente caracterizados, os complexos foram submetidos ao ensaio de estabilidade acelerada a 40°C/75 %HR e ensaios de fotoestabilidade acelerada. A câmara de fotoestabilidade também foi utilizada para confirmar o perfil de degradação dos complexos. Os fotoprodutos foram isolados em coluna analítica e o maioritário foi caracterizado por espectroscopia de RMN. Foi avaliada também a volatilidade do G-0 na forma de complexos comparado com misturas físicas equivalentes através de TGA e CG-HS-FID, complementando assim um estudo desenvolvido anteriormente no modo isotérmico. As propriedades biofarmacêuticas da substância livre e na forma complexada foram estudadas em relação ao comportamento de dissolução em Fluido Vaginal Simulado e a permeação/retenção em mucosa vaginal bovina. Finalmente foi avaliada a influência dos complexos na atividade antifúngica *in vitro* frente a *Candida spp.* assim como na citotoxicidade frente às linhagens celulares de fibroblastos e queratinócitos pelo método do MTT. Por outro lado, as micropartículas poliméricas foram obtidas com a ajuda de um planejamento fatorial 2<sup>4</sup>. A caracterização dos sistemas selecionados foi desenvolvida usando DSC, DRX, MEV, FTIR-ATR e RMN <sup>1</sup>H. Posteriormente as amostras foram submetidas aos ensaios de estabilidade acelerada a 40°C/75 %HR, ensaio de fotoestabilidade acelerada, análise da volatilidade do G-0 usando TGA/DTA e ensaio de liberação em solução tampão acetato, pH 4,2. Como resultados principais da avaliação, determinou-se que os complexos de inclusão com HP- $\beta$ -CD e SBE- $\beta$ -CD apresentaram-se como a melhor alternativa de estabilização porque garantiram ótima estabilidade química de G-0 em condições aceleradas de temperatura e umidade durante os seis meses de estudo porém, ambos os complexos são fotossensíveis. Também diminuíram as perdas por volatilização da substância em comparação com misturas físicas e aumentaram a velocidade de dissolução em fluido vaginal. Não foi quantificado G-0 no compartimento receptor durante o ensaio de permeação em nenhuma das amostras estudadas porém, verificou-se retenção do fármaco na mucosa vaginal bovina, sem influência significativa da formação de complexos. O teste "*in vitro*" de atividade antifúngica mostrou que o complexo FD G-0/HP- $\beta$ -CD manteve a atividade da substância encapsulada frente a *C. albicans* (padrão e isolado clínico) e melhorou a atividade frente à cepa isolado clínico azol resistente de *C. krusei* (CIM=12,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) comparado com o G-0 (CIM=25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e anfotericina B (CIM=20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). O complexo FD G-0/SBE- $\beta$ -CD melhorou a atividade em todos os casos, atingindo CIM=8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  frente a *C. albicans* e CIM=10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  frente a *C. krusei*. A viabilidade celular de fibroblastos e queratinócitos seguiu a ordem FD G-0/SBE- $\beta$ -CD > FD G-0/HP- $\beta$ -CD > G-0, mostrando maior susceptibilidade para os queratinócitos. As micropartículas poliméricas selecionadas apresentaram forma esférica, com diminuição da cristalinidade do G-0, principalmente no sistema com

maior proporção do polímero, e ausência de interações químicas do G-0 e a etilcelulose. Ainda quando as micropartículas melhoraram a fotoestabilidade do G-0 em condições aceleradas comparado com o fármaco livre, só o sistema G-0/EC 1:1,5 m/m conseguiu diminuir as perdas atribuídas à volatilização porém, também foi o sistema que liberou menor quantidade de G-0 (72,7 % em 12 h). Contrariamente, o sistema que apresentou maior estabilidade química em condições aceleradas foi o G-0/EC 1:1 m/m ( $102,7 \pm 2,4$  %), não sendo assim para o sistema com maior proporção polimérica ( $74,1 \pm 4,2$  %) durante os três meses de estudo.

**Palavras-chave:** 2-(2-nitrovinil) furano, estabilização de fármacos; ciclodextrinas; complexos de inclusão; micropartículas; etilcelulose.

## Abstract

2-(2-nitrovinyl)furan (G-0) has antiprotozoal, antibacterial and antifungal activity against a large number of pathogens, although the sublimation, low dissolution rate in aqueous medium, low compatibility with excipients and photodegradation, have hindered the incorporation in pharmaceutical dosage forms, to use in human and/or veterinary medicine. The aim of this work was to evaluate two alternatives for the stabilization of the drug candidate through freeze-drying inclusion complex formation (FD) with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin and sulfobutylether- $\beta$ -cyclodextrin sodium salt and through microencapsulation with ethylcellulose by mean of emulsion/solvent evaporation method. Once the complexes were prepared and fully characterized previously, they were subjected to an accelerated stability study at 40°C/75 %RH, and a photostability assay under forced irradiation conditions. A photostability chamber was also used in order to confirm the degradation profile for the complexes. Photoproducts were isolated in analytical column and the main degradation product was characterized aided by NMR. Drug volatility was also evaluated when G-0 was complexed, and compared with equivalent physical mixtures through TGA and GC-HS-FID. Biopharmaceutical properties of free drug and in the complexes were studied in terms of dissolution rate in Simulated Vaginal Fluid and permeation/retention in bovine vaginal mucosa. Finally, the influence of both complexes on the "*in vitro*" antifungal activity against *Candida spp.* and the cytotoxicity on fibroblast and keratinocyte cell lines were evaluated using the MTT method. Polymeric microparticles were obtained with the aid of a 2<sup>4</sup> factorial experimental design. Characterization for the selected systems was performed using DSC, XRD, SEM, FTIR-ATR and <sup>1</sup>H NMR. Further, they were subjected to an accelerated stability study at 40°C/75 %RH, a forced photostability assay, TGA/DTA experiments to assess the drug volatility and drug release assay in acetate buffer medium, pH 4,2. As a main result, inclusion complexes with HP- $\beta$ -CD and SBE- $\beta$ -CD were the best stabilization alternative as they ensure optimum chemical stability of G-0 even under accelerated conditions of humidity and temperature for six months, however both were photosensitive. The formation of inclusion complexes reduced the volatilization of the drug compared with physical mixtures and increased the dissolution rate in vaginal fluid. During the permeability assay G-0 was not quantified in the receptor compartment for any of the samples applied, nevertheless retention in bovine vaginal mucosa was verified for all of them, without significant influence of the complexes formation. "*In vitro*" antifungal activity assay showed that FD G-0/HP- $\beta$ -CD complex maintained the activity for the encapsulated drug against *C. albicans* (standard and clinical isolated strains) and improved the activity against a clinical isolated azole resistant strain of *C.krusei* (MIC=12,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), compared with free drug (MIC=25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) and amphotericin B (MIC=20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). FD G-0/SBE- $\beta$ -CD complex improved the activity in all cases, with MIC= 8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  against *C.albicans* and MIC=10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  against *C.krusei*. Cellular viability of fibroblasts and keratinocytes followed the ranking order FD G-0/SBE- $\beta$ -CD > FD G-0/HP- $\beta$ -CD > G-0, showing higher susceptibility for keratinocytes. Polymeric microparticles selected resulted spherical in shape, with decreased crystallinity for the encapsulated substance (mainly for the system with higher polymer content) and lack of G-0-ethylcellulose chemical interactions. Even when microparticles improved the drug photostability under forced conditions compared with free drug, only G-0/EC 1:1,5 w/w system was able to decrease the weight loss attributed to drug volatilization, however it showed the lower amount of G-0 released (72,7 % in 12 h).

In contrast, the system with better chemical stability was G-0/EC 1:1, w/w ( $102,7 \pm 2,4$  %), not having the same behavior the system with higher polymer content ( $74,1 \pm 4,2$  %), during three months under accelerated conditions.

**Keywords:** 2-(2-nitrovinyl) furan; drug stabilization, cyclodextrins, inclusion complexes, microparticles, ethylcellulose.

## Lista de Figuras

|                                                                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Estrutura química do 2-(2-nitrovinil) furano.....                                                                                                      | 6  |
| <b>Figura 2.</b> Reação de obtenção de 2-(2-nitrovinil) furano.....                                                                                                     | 7  |
| <b>Figura 3.</b> Estrutura química das ciclodextrinas naturais $\alpha$ -, $\beta$ - e $\gamma$ -CD com 6, 7 e 8 unidades de $\alpha$ -D-glicose respectivamente.....   | 17 |
| <b>Figura 4.</b> Representação esquemática da estrutura química da 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina.....                                                         | 22 |
| <b>Figura 5.</b> Representação esquemática da estrutura química da molécula de sulfobutil éter7- $\beta$ -CD.....                                                       | 24 |
| <b>Figura 6.</b> Representação esquemática do incremento na estabilidade química da dihidroprostaglandina E1 por inclusão em ciclodextrinas.....                        | 32 |
| <b>Figura 7.</b> Estrutura química da associação ciclodextrina-folato para vectorização de fármacos.....                                                                | 40 |
| <b>Figura 8.</b> Esquema da metodologia de preparação de lipossomas contendo complexos de inclusão de fármaco em ciclodextrinas pelo método de hidratação de filme..... | 41 |
| <b>Figura 9.</b> Estruturas típicas das micropartículas.....                                                                                                            | 45 |
| <b>Figura 10.</b> Estrutura química da etilcelulose.....                                                                                                                | 54 |
| <b>Figura 11.</b> Comparação da porcentagem de G-0 nos complexos aos 6 meses armazenados em geladeira e câmara de estabilidade.....                                     | 90 |
| <b>Figura 12.</b> Fotodegradação do G-0 em complexos de inclusão liofilizados e misturas físicas com HP- $\beta$ -CD.....                                               | 93 |
| <b>Figura 13.</b> Fotodegradação do G-0 em complexos de inclusão liofilizados e misturas físicas com SBE- $\beta$ -CD.....                                              | 94 |

|                                                                                                                                                                                                             |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 14.</b> Espectro UV-Vis do 2-(2-nitrovinil) furano em ACN:Água (80:20, v/v), $\lambda_{\text{máx.}} = 351 \text{ nm}$ .....                                                                       | 96  |
| <b>Figura 15.</b> Cromatogramas da amostra de complexo FD G-0/HP- $\beta$ -CD, com 48 horas de exposição à luz UV, obtidos nos comprimentos de onda 351 nm (superior) e 248 nm (inferior).....              | 97  |
| <b>Figura 16.</b> Cromatogramas da amostra de complexo FD G-0/SBE- $\beta$ -CD, com 48 horas de exposição a luz UV, obtidos nos comprimentos de onda 351 nm (superior) e 248 nm (inferior).....             | 98  |
| <b>Figura 17.</b> Cromatograma da amostra de complexo FD G-0/SBE- $\beta$ -CD, irradiada na câmara climática de fotoestabilidade (2 ciclos).....                                                            | 98  |
| <b>Figura 18.</b> Cromatograma de ions totais (acima) e espectro de massas do pico referente ao tempo de retenção 5,46 min, em amostra de complexo antes da degradação, dissolvida em acetato de etila..... | 99  |
| <b>Figura 19.</b> Espectro RMN $^1\text{H}$ referente a: G-0 (vermelho); G-0 em complexo com HP- $\beta$ -CD (azul).....                                                                                    | 100 |
| <b>Figura 20.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da amostra 1 em $\text{CD}_3\text{CN}$ .....                                                                                                              | 101 |
| <b>Figura 21.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da amostra 1 em $\text{CD}_3\text{CN}$ (expansão 1).....                                                                                                  | 102 |
| <b>Figura 22.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da amostra 1 em $\text{CD}_3\text{CN}$ (expansão 2).....                                                                                                  | 102 |
| <b>Figura 23.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da amostra 1 em $\text{CD}_3\text{CN}$ (expansão 3).....                                                                                                  | 103 |
| <b>Figura 24.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da amostra 1 em $\text{CD}_3\text{CN}$ (expansão 4).....                                                                                                  | 103 |
| <b>Figura 25.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da amostra 1 em $\text{CD}_3\text{CN}$ (expansão 5).....                                                                                                  | 104 |
| <b>Figura 26.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da amostra 1 em $\text{CD}_3\text{CN}$ (expansão 6).....                                                                                                  | 104 |

|                                                                                                                                                                                                                                 |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 27.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da amostra 1 em $\text{CD}_3\text{CN}$ (expansão 7).....                                                                                                                      | 105 |
| <b>Figura 28.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da amostra 1 em $\text{CD}_3\text{CN}$ (expansão 8).....                                                                                                                      | 105 |
| <b>Figura 29.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ da amostra 1 em $\text{CD}_3\text{CN}$ .....                                                                                                                 | 106 |
| <b>Figura 30.</b> Mapa de contorno COSY da amostra 1 em $\text{CD}_3\text{CN}$ .....                                                                                                                                            | 108 |
| <b>Figura 31.</b> Mapa de contorno HSQC da amostra 1 em $\text{CD}_3\text{CN}$ .....                                                                                                                                            | 109 |
| <b>Figura 32.</b> Mapa de contorno HSQC da amostra 1 em $\text{CD}_3\text{CN}$ (expansão 1).....                                                                                                                                | 109 |
| <b>Figura 33.</b> Mapa de contorno HMBC da amostra 1 em $\text{CD}_3\text{CN}$ .....                                                                                                                                            | 110 |
| <b>Figura 34.</b> Mapa de contorno HMBC da amostra 1 em $\text{CD}_3\text{CN}$ (expansão 1).....                                                                                                                                | 110 |
| <b>Figura 35.</b> Mapa de contorno HMBC da amostra 1 em $\text{CD}_3\text{CN}$ (expansão 2).....                                                                                                                                | 111 |
| <b>Figura 36.</b> Representação esquemática da proposta de estruturas presentes na amostra 1 (PD1) determinadas por RMN, como resultado da fotodegradação do G-0 em complexos com as ciclodextrinas no estado sólido.....       | 113 |
| <b>Figura 37.</b> Curvas de análise termogravimétrica: a) TG, b) DTG do 2-(2-nitrovinil) furano registradas para três razões de aquecimento.....                                                                                | 116 |
| <b>Figura 38.</b> Curvas TG-DTG/DSC obtidas com razão de aquecimento $2,5\text{ }^\circ\text{C}.\text{min}^{-1}$ com cadinho aberto para o 2-(2-nitrovinil) furano sob atmosfera de nitrogênio.....                             | 117 |
| <b>Figura 39.</b> Curvas TG/DTG para G-0, HP- $\beta$ -CD, mistura física G-0/HP- $\beta$ -CD e complexo de inclusão FD G-0/HP- $\beta$ -CD, obtidas com razão de aquecimento $2,5\text{ }^\circ\text{C}.\text{min}^{-1}$ ..... | 117 |

|                                                                                                                                                                                                                                                      |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 40.</b> Curvas TG/DTG para SBE- $\beta$ -CD, mistura física G-0/SBE- $\beta$ -CD e complexo de inclusão FD G-0/SBE- $\beta$ -CD, obtidas com razão de aquecimento 2,5 °C.min <sup>-1</sup> .....                                           | 118 |
| <b>Figura 41.</b> Cromatogramas (CG-HS-FID) referentes a G-0 sublimado a 50 °C nas formas livre (linha preta), mistura física com HP- $\beta$ -CD (linha cinza escura) e complexo liofilizado com HP- $\beta$ -CD (linha cinza clara).....           | 120 |
| <b>Figura 42.</b> Curva de calibração de G-0 para ensaio de liberação e permeação (n=3).....                                                                                                                                                         | 127 |
| <b>Figura 43.</b> Perfil de dissolução em Fluido vaginal simulado (SVF) de: G-0, FD G-0/SBE- $\beta$ -CD e FD G-0/HP- $\beta$ -CD.....                                                                                                               | 128 |
| <b>Figura 44.</b> Estabilidade das soluções de concentração aproximada de 50 $\mu$ g.mL <sup>-1</sup> : G-0; FD G-0/HP- $\beta$ -CD e FD G-0/SBE- $\beta$ -CD em SVF a 37,0 $\pm$ 0,5 °C.....                                                        | 130 |
| <b>Figura 45.</b> Cromatogramas de uma amostra de G-0 com 8 h de incubação no SVF a 37,0 $\pm$ 0,5 °C, nos comprimentos de onda de detecção de 351 e 248 nm...                                                                                       | 130 |
| <b>Figura 46.</b> Cromatogramas de uma amostra de FD G-0/SBE- $\beta$ -CD com 8 h de incubação no SVF a 37,0 $\pm$ 0,5 °C, nos comprimentos de onda de detecção de 351 e 248 nm.....                                                                 | 131 |
| <b>Figura 47.</b> Estabilidade das soluções de concentração aproximada de 10 $\mu$ g.mL <sup>-1</sup> para o G-0; FD G-0/HP- $\beta$ -CD e FD G-0/SBE- $\beta$ -CD em PBS a 37,0 $\pm$ 0,5 °C.....                                                   | 132 |
| <b>Figura 48.</b> Perfil de liberação " <i>in vitro</i> " de amostras contendo G-0 dissolvido no fluido vaginal simulado com mucina através de membrana de acetato de celulose: G-0 livre, FD G-0/HP- $\beta$ -CD e FD G-0/SBE- $\beta$ -CD.....     | 135 |
| <b>Figura 49.</b> Perfil de liberação " <i>in vitro</i> " através de membrana de acetato de celulose de amostras contendo FD G-0/SBE- $\beta$ -CD dissolvido no fluido vaginal simulado: Com mucina (Circulo preto), sem mucina (círculo cinza)..... | 137 |

|                                                                                                                                                                                                                                                       |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 50.</b> Cromatogramas com detecção de analito, referentes a: G-0 (célula # 2 - 3 h), G-0/SBE- $\beta$ -CD (célula # 1 – 4 h) e G-0/HP- $\beta$ -CD (célula # 6 - 15 min).....                                                               | 142 |
| <b>Figura 51.</b> Porcentagem de G-0 recuperado de mucosa vaginal bovina após 4 h de experimento na célula de Franz, a partir de: Solução de G-0 no SVF, solução de FD G-0/SBE- $\beta$ -CD, solução de FD G-0/HP- $\beta$ -CD.....                   | 143 |
| <b>Figura 52.</b> Efeito do G-0 e FD G-0/HP- $\beta$ -CD (acima) e FD G-0/SBE- $\beta$ -CD (abaixo) na viabilidade celular da cultura celular de fibroblastos de camundongo L929 (expressa como média e desvio padrão de três ensaios, (n=3)).....    | 151 |
| <b>Figura 53.</b> Efeito do G-0 e FD G-0/HP- $\beta$ -CD (acima) e FD G-0/SBE- $\beta$ -CD (abaixo) na viabilidade celular da cultura de queratinócitos humanos imortalizados HaCaT, expressa como média e desvio padrão de três ensaios, (n=3))..... | 152 |
| <b>Figura 54.</b> Cromatograma obtido para a mistura física G-0/EC (1:1, m/m) armazenada por 4 semanas a 40 °C/75% HR.....                                                                                                                            | 157 |
| <b>Figura 55.</b> Influência e significância dos diferentes fatores e interações na variável resposta Recuperação (%).....                                                                                                                            | 160 |
| <b>Figura 56.</b> Superfície de resposta para a influência da concentração de PVA e velocidade de agitação na Recuperação.....                                                                                                                        | 161 |
| <b>Figura 57.</b> Superfície de resposta para a influência da concentração do PVA e conteúdo de EC na Eficiência de encapsulação (%).....                                                                                                             | 164 |
| <b>Figura 58.</b> Superfície de resposta para a influência da concentração de PVA e conteúdo de EC no tamanho médio de partícula ( $\mu$ m).....                                                                                                      | 165 |
| <b>Figura 59.</b> Influência e significância dos fatores e interações na Circularidade.....                                                                                                                                                           | 166 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 60.</b> Superfície de resposta para a influência da concentração de PVA e conteúdo de EC na Circularidade.....                                                                                                                                                                                                                                                                    | 167 |
| <b>Figura 61.</b> Desejabilidade ótima aplicando a função geral de otimização, para cada variável resposta e para respostas múltiplas.....                                                                                                                                                                                                                                                  | 169 |
| <b>Figura 62.</b> Desejabilidade para cada variável resposta e desejabilidade global, usando pontos centrais para concentração de PVA e EC.....                                                                                                                                                                                                                                             | 170 |
| <b>Figura 63.</b> Curvas de DSC obtidas com razão de aquecimento $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ para: a) G-0, b) MF G-0:EC (1:1 m/m), c) MF G-0:EC (1:1,5 m/m), d) ME G-0:EC (1:1 m/m), e) ME G-0:EC (1:1,5 m/m), f) Micropartículas sem fármaco, g) Etilcelulose.....                                                                                                                | 171 |
| <b>Figura 64.</b> Difratoimetria de raios X para: a) 2-(2-nitrovinil) furano (G-0); b) Etilcelulose (EC); c) MF G-0/ EC (1:1 m/m), d) MF G-0/EC (1:1,5 m/m), e) ME G-0:EC (1:1 m/m), f) ME G-0:EC (1:1,5 m/m).....                                                                                                                                                                          | 173 |
| <b>Figura 65.</b> Espectros FTIR para: a) 2-(2-nitrovinil) furano (G-0); b) Etilcelulose (EC); c) MF G-0/ EC (1:1 m/m), d) MF G-0/ EC (1:1,5 m/m), e) ME G-0/EC (1:1 m/m), f) ME G-0/EC (1:1,5 m/m).....                                                                                                                                                                                    | 176 |
| <b>Figura 66.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ do G-0 incorporado nas micropartículas de etilcelulose (1:1,5 m/m) usando como solvente o clorofórmio deuterado.....                                                                                                                                                                                                                         | 177 |
| <b>Figura 67.</b> Fotomicrografias tomadas com microscópio eletrônico de varredura-emissão de campo de: A) Micropartículas preparadas na proporção G-0/EC 1:1 m/m: A1- Externa, A2- Interna, A3- Superfície da parede interna. B) Micropartículas preparadas na proporção G-0/EC 1:1,5 m/m: B1- Externa, B2- Interna, B3- Partículas esféricas no interior das micropartículas maiores..... | 179 |
| <b>Figura 68.</b> TG/DTA de G-0 em atmosfera de ar (acima) e nitrogênio (abaixo).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 180 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 69.</b> TG/DTA de Micropartículas sem G-0 (azul), ME G-0/EC (1:1,5 m/m) (pink), ME G-0/EC (1:1 m/m) (vermelho), MF G-0:EC (1:1,5 m/m) (verde) e MF G-0/EC (1:1 m/m) (preto).....                                                                                     | 181 |
| <b>Figura 70.</b> Perfil de liberação de G-0 a partir de micropartículas em meio tamponado (pH=4,2): G-0 sólido (círculo preto), ME G-0/EC (1:1 m/m) (círculo cinza) e ME G-0/EC (1:1,5 m/m) (círculo branco).....                                                             | 182 |
| <b>Figura 71.</b> Cromatogramas das micropartículas expostas (ME) à luz UV durante 72 h, em dois comprimentos de onda de detecção: a) ME G-0/EC (1:1,5 m/m) em 351 nm; b) ME G-0/EC (1:1,5 m/m) em 248 nm; c) ME G-0/EC 1:1 m/m em 351 nm; d) ME G-0/EC 1:1 m/m em 248 nm..... | 187 |
| <b>Figura 72.</b> Espectro de absorção UV em Acetonitrila: água (80:20, v/v) para o possível produto de fotodegradação que elui com tempo de retenção de 6,9 min.....                                                                                                          | 188 |
| <b>Figura 73.</b> Cromatogramas das micropartículas ME G-0/EC (1:1,5 m/m), com dois meses de ensaio em câmara de estabilidade, com monitoramento nos comprimentos de onda 248 nm (acima) e 271 nm (abaixo).....                                                                | 193 |

## Lista de Tabelas

|                                                                                                                                                                                                                                                 |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tabela 1.</b> Dados de estabilidade acelerada do complexo FD G-0/HP- $\beta$ -CD em estudo (sem reposição).....                                                                                                                              | 88  |
| <b>Tabela 2.</b> Dados de estabilidade do complexo FD G-0/SBE- $\beta$ -CD em estudo (sem reposição).....                                                                                                                                       | 89  |
| <b>Tabela 3.</b> Resultados de estabilidade da solução reconstituída (protegida da luz) dos complexos após 4 horas à temperatura ambiente.....                                                                                                  | 91  |
| <b>Tabela 4.</b> Conteúdo de G-0 nas amostras controles escuros de complexos e misturas físicas com as duas ciclodextrinas.....                                                                                                                 | 92  |
| <b>Tabela 5.</b> Dados cinéticos da fotodegradação dos complexos de inclusão (FD) e misturas físicas (MF) do G-0 com HP- $\beta$ -CD e SBE- $\beta$ -CD.....                                                                                    | 95  |
| <b>Tabela 6.</b> Diferença nos deslocamentos químicos ( $\delta$ ) entre G-0 livre e na forma de complexo com HP- $\beta$ -CD.....                                                                                                              | 99  |
| <b>Tabela 7.</b> Deslocamentos químicos $\delta$ (ppm) e constantes de acoplamento $J$ (Hz) para o composto maioritário presente na amostra 1 (PD1) em CD <sub>3</sub> CN...                                                                    | 112 |
| <b>Tabela 8.</b> Deslocamentos químicos $\delta$ (ppm) e constantes de acoplamento $J$ (Hz) para o composto minoritário presente na amostra 1 (PD1) em CD <sub>3</sub> CN...                                                                    | 112 |
| <b>Tabela 9.</b> Determinação do G-0 sublimado a 50 °C por CG-HS-FID.....                                                                                                                                                                       | 119 |
| <b>Tabela 10.</b> Concentração inibitória mínima (CIM) de 2-(2-nitrovinil) furano (G-0) na forma livre e em complexos de inclusão liofilizados (FD) com HP- $\beta$ -CD e SBE- $\beta$ -CD frente a duas cepas de <i>Candida albicans</i> ..... | 122 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tabela 11.</b> Concentração inibitória mínima (CIM) de 2-(2-nitrovinil) furano (G-0) na forma livre e em complexos de inclusão liofilizados (FD) com HP- $\beta$ -CD e SBE- $\beta$ -CD frente a duas cepas de <i>Candida krusei</i> .....                                                                                                                                                                               | 123 |
| <b>Tabela 12.</b> Concentração inibitória mínima (CIM) de G-0 na forma livre e em complexos de inclusão liofilizados (FD) do fármaco com HP- $\beta$ -CD e SBE- $\beta$ -CD (na faixa de concentrações de 13 a 6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), frente a duas cepas de <i>Candida albicans</i> .....                                                                                                                              | 123 |
| <b>Tabela 13.</b> Concentração inibitória mínima (CIM) de G-0 na forma livre (na faixa de concentração de 13 a 6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ frente a ATCC 6258 e na faixa de 26 a 12 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ frente a CKV3) e complexos de inclusão liofilizados (FD) de G-0 com HP- $\beta$ -CD e SBE- $\beta$ -CD (na faixa de concentração de 13 a 6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) frente a duas cepas de <i>Cândida krusei</i> ..... | 124 |
| <b>Tabela 14.</b> Porcentagem de G-0 dissolvido (% DP) e eficiência da dissolução (% DE) em SVF calculada aos 15 e 60 min do ensaio.....                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 128 |
| <b>Tabela 15.</b> Fator de similaridade $f_2$ dos perfis de dissolução do fármaco livre e os complexos de inclusão.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 128 |
| <b>Tabela 16.</b> Valores de $\text{CC}_{50}$ obtidos através da regressão não linear das curvas da sigmóide Emax da viabilidade celular em função da concentração de G-0 livre e nos complexos nas linhagens celulares avaliadas.....                                                                                                                                                                                      | 149 |
| <b>Tabela 17.</b> Matriz geral do planejamento fatorial com 4 fatores experimentais em dois níveis e variáveis resposta.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 159 |
| <b>Tabela 18.</b> Resultados obtidos para o ensaio proposto usando a função desejabilidade.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 168 |
| <b>Tabela 19.</b> Parâmetros térmicos obtidos a partir das curvas do DSC para G-0, misturas físicas (MF) e micropartículas (ME).....                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 172 |

|                                                                                                                                                                                                                  |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tabela 20.</b> Parâmetros determinados a partir dos difratogramas de raios X para o cálculo do tamanho do cristalito para o fármaco, misturas físicas e micropartículas.....                                  | 174 |
| <b>Tabela 21.</b> Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) no RMN $^1\text{H}$ para 2-(2-nitrovinil) furano livre e incorporado nas micropartículas de etilcelulose.....                                              | 177 |
| <b>Tabela 22.</b> Parâmetros obtidos a partir do ajuste das curvas de liberação do G-0 incorporado nas micropartículas nos diferentes modelos cinéticos.....                                                     | 183 |
| <b>Tabela 23.</b> Parâmetros cinéticos obtidos a partir das curvas de fotodegradação do G-0 incorporado em micropartículas de EC e G-0 livre, irradiados por 72 h com luz UV ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ )..... | 185 |
| <b>Tabela 24.</b> Resultados da análise estatístico de Normalidade, Independência da variável e homogeneidade da variância para o conteúdo de fármaco nas micropartículas.....                                   | 190 |
| <b>Tabela 25.</b> Estabilidade das micropartículas de G-0/EC preparadas na relação 1:1 (m/m), em diferentes condições.....                                                                                       | 191 |
| <b>Tabela 26.</b> Estabilidade das micropartículas de G-0/EC preparadas na relação 1:1,5 (m/m), em diferentes condições.....                                                                                     | 191 |
| <b>Tabela 27.</b> Teste de Tukey ( <i>post hoc</i> ) para o conteúdo de G-0 do sistema ME G-0/EC (1:1.5 m/m) armazenado na câmara de estabilidade nos 4 tempos de amostragem.....                                | 192 |

## Lista de Quadros

|                                                                                                                                          |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Quadro 1.</b> Principais eventos na área das ciclodextrinas .....                                                                     | 19  |
| <b>Quadro 2.</b> Métodos de obtenção de complexos de inclusão com ciclodextrinas.....                                                    | 28  |
| <b>Quadro 3.</b> Métodos de microencapsulação.....                                                                                       | 50  |
| <b>Quadro 4.</b> Condições cromatográficas estabelecidas para a detecção de G-0 volátil usando CG-HS-FID.....                            | 67  |
| <b>Quadro 5.</b> Efeitos estimados para a variável resposta Recuperação (%).....                                                         | 160 |
| <b>Quadro 6.</b> Ajuste da regressão previa eliminação de efeitos e interações não significativas para a Recuperação.....                | 161 |
| <b>Quadro 7.</b> Ajuste da regressão previa eliminação de efeitos e interações não significativas para a Eficiência de encapsulação..... | 162 |
| <b>Quadro 8.</b> Efeitos estimados para a variável resposta tamanho médio de partícula (µm).....                                         | 164 |
| <b>Quadro 9.</b> Análise da variância (ANOVA) para todos os efeitos e interações no tamanho médio de partícula (µm).....                 | 165 |
| <b>Quadro 10.</b> Ajuste da regressão previa eliminação de efeitos e interações não significativas na Circularidade.....                 | 167 |

## Lista de Abreviaturas e Siglas

**ANOVA** – Análise de variância

**ATR** – Refletância Total Atenuada

**Avicel PH102** – Celulose microcristalina

**CAS** – Chemical Abstract Service

**CC<sub>50</sub>** – Concentração citotóxica 50

**CCD** – Cromatografia em camada delgada

**CD** – Ciclodextrina

**CECMED** – Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos, Cuba.

**CG** – Cromatografia a gás

**CG-HS-FID** – Cromatografia a gás com amostrador de HeadSpace e detector de ionização por chama.

**CGTase** – Enzima cicloglicosiltransferase

**CIM** – Concentração inibitória mínima

**Circ** – Circularidade

**CLAE** – Cromatografía Líquida de Alta Eficiência

**DAD** – Detector de arranjo de diodos.

**DE** – Eficiência da dissolução

**DI-CAFOS** – Fosfato dicálcico de compressão direta

**DL<sub>0</sub>** – Dose máxima não mortal

**DL<sub>50</sub>** – Dose letal 50

**DMEM** – Meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's

**DMT** – Dose máxima tolerada

**DM-β-CD** – Dimetil-β-ciclodextrina

**DP** – Porcentagem de fármaco liberado

**DSC** – Calorimetria diferencial exploratória

**DTG** – Termogravimetria derivada

**EC** – Etilcelulose

**EE** – Eficiência de encapsulação

**ESI** – Ionização por electrospray

**f<sub>2</sub>** – Fator de similaridade

**FD** – Freeze-dried

**FDA** – Food and Drug Administration (USA)

**FTIR** – Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

**G-0** – 2-(2-nitrovinil) furano ou 2-(2-nitroetenil) furano

**G-1** – 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil) furano

**GC-MS** – Cromatografia a gás com detector de massas

**HaCaT** – Linhagem celular de queratinócitos humanos imortalizados

**HPMC** – Hidroxipropil metil celulose

**HP- $\beta$ -CD** – 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina

**HP- $\gamma$ -CD** – Hidroxipropil- $\gamma$ -ciclodextrina

**ICH** – International Conference Harmonization

**iv** – Intravenoso

**L929** – Linhagem celular de fibroblastos de camundongo

**LC-MS** – Cromatografia de líquidos com detector de massas

**Log P** – Coeficiente de partição n-octanol/água

**MEV** – Microscopia eletrônica de varredura

**MNPCE** – Eritrócitos micronucleados policromáticos

**MOPs** – ácido (3-[N-morfolino] propanosulfônico

**MTT** – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio

**mUA** – Miliunidades de absorbância

**MWCO** – Molecular weight cut off

**NOE** – Nuclear Overhauser Effect

**ODS** – Octadecilsilano

**PBS** – Tampão fosfato salino

**PDI** – Polidispersidade

**PD1** – Produto de fotodegradação do pico 1.

**PEG** – Polietilenoglicol

**PTFE** – Politetrafluoretileno

**PVA** – Álcool polivinílico

**PVP** – Polivinil pirrolidona

**PVP-VA** – Polivinil pirrolidona vinil acetato

**QSAR** – Estudos quantitativos de relação estrutura-atividade

**RC** – Celulose regenerada

**RMN** – Ressonância Magnética Nuclear

**RM- $\beta$ -CD** –  $\beta$ -ciclodextrina randomicamente metilada

**ROESY** – Rotational Frame Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

**rpm** – rotações por minuto

**RPMI** – Caldo Roswell Park Memorial Institute.

**SBA-15** – Silica mesoporosa ordenada (Santa Bárbara)

**SBE- $\beta$ -CD** – Sulfobutil éter- $\beta$ -ciclodextrina sódica

**SBE- $\gamma$ -CD** – Sulfobutil éter- $\gamma$ -ciclodextrina

**SDB** – Caldo Sabouraud-Dextrose

**SVF** – Fluido vaginal simulado

**T<sub>g</sub>** – Temperatura de transição vítrea

**TGA** – Análise termogravimétrica

**TM- $\beta$ -CD** – 2,3,6-tri-O-metil- $\beta$ -ciclodextrina

**tp** – Tamanho de partícula

**t<sub>1/2</sub>** – Tempo de meia-vida

**t<sub>90%</sub>** – Tempo em que o fármaco degrada até 90 % da concentração inicial

**UV-Vis** – Ultravioleta-Visível

**VoIFI** – Volume de fase interna

## Sumário

|                                                                                                                 |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. Introdução.....</b>                                                                                       | <b>1</b>  |
| <b>2. Revisão da literatura.....</b>                                                                            | <b>6</b>  |
| 2.1. 2-(2-nitrovinil) furano (G-0).....                                                                         | 6         |
| 2.1.1. Obtenção.....                                                                                            | 6         |
| 2.1.2. Aspectos estruturais e propriedades físico-químicas.....                                                 | 7         |
| 2.1.3. Atividade Biológica.....                                                                                 | 10        |
| 2.1.4. Toxicidade.....                                                                                          | 12        |
| 2.2. Ciclodextrinas.....                                                                                        | 15        |
| 2.2.1. Estrutura e propriedades.....                                                                            | 15        |
| 2.2.2. História.....                                                                                            | 17        |
| 2.2.3. Derivados das CDs.....                                                                                   | 20        |
| 2.2.4. Formação de complexos de inclusão.....                                                                   | 24        |
| 2.2.5. Métodos de preparação de complexos.....                                                                  | 27        |
| 2.2.6. Aplicações farmacêuticas.....                                                                            | 30        |
| 2.3. Micropartículas.....                                                                                       | 44        |
| 2.3.1. Definição e características gerais.....                                                                  | 44        |
| 2.3.2. Principais aplicações.....                                                                               | 46        |
| 2.3.3. Métodos de obtenção.....                                                                                 | 47        |
| 2.3.4. Etilcelulose.....                                                                                        | 53        |
| <b>3. Objetivos.....</b>                                                                                        | <b>56</b> |
| <b>4. Material e Métodos.....</b>                                                                               | <b>58</b> |
| 4.1. Complexos de inclusão com ciclodextrinas.....                                                              | 58        |
| 4.1.1. Preparação dos complexos por liofilização.....                                                           | 58        |
| 4.1.2. Quantificação do teor de G-0 nos complexos mediante Cromatografia Líquida de alta eficiência (CLAE)..... | 58        |
| 4.1.3. Fotoestabilidade.....                                                                                    | 59        |
| 4.1.3.1. Condições de Irradiação das amostras.....                                                              | 59        |
| 4.1.3.2. Preparação das amostras irradiadas para análise por CLAE...                                            | 60        |

|                                                                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.1.3.3. Isolamento e caracterização de produto de degradação.....                                                                                                    | 61 |
| 4.1.4. Estabilidade acelerada dos complexos.....                                                                                                                      | 65 |
| 4.1.5. Avaliação da influência da formação de complexos com ciclodextrinas na volatilização do G-0 mediante Análise termogravimétrica (TGA).....                      | 66 |
| 4.1.6. Avaliação biológica "in vitro" dos complexos de inclusão liofilizados de G-0 com ciclodextrinas frente a <i>Candida albicans</i> e <i>Candida krusei</i> ..... | 68 |
| 4.1.6.1. Cepas de leveduras.....                                                                                                                                      | 68 |
| 4.1.6.2. Armazenagem e conservação das cepas de leveduras.....                                                                                                        | 68 |
| 4.1.6.3. Padronização das cepas de <i>Candida spp.</i> .....                                                                                                          | 69 |
| 4.1.6.4. Preparação das soluções de ensaio.....                                                                                                                       | 69 |
| 4.1.6.5. Teste de susceptibilidade a antifúngicos .....                                                                                                               | 70 |
| 4.1.7. Perfil de dissolução dos complexos com ciclodextrinas.....                                                                                                     | 71 |
| 4.1.8. Ensaio de liberação "in vitro" do G-0 em complexos através de membrana sintética usando célula de Franz.....                                                   | 72 |
| 4.1.9. Ensaio de permeação e retenção em mucosa vaginal bovina.....                                                                                                   | 74 |
| 4.1.10. Ensaio de citotoxicidade dos complexos de inclusão liofilizados do G-0 com ciclodextrinas.....                                                                | 75 |
| 4.1.10.1. Culturas celulares.....                                                                                                                                     | 75 |
| 4.1.10.2. Inoculação dos compostos.....                                                                                                                               | 76 |
| 4.1.10.3. Ensaio do MTT.....                                                                                                                                          | 76 |
| 4.2. Micropartículas de etilcelulose com G-0 incorporado.....                                                                                                         | 78 |
| 4.2.1. Compatibilidade de G-0 com etilcelulose em mistura física (1:1)....                                                                                            | 78 |
| 4.2.2. Obtenção das micropartículas pelo método de emulsificação-evaporação do solvente.....                                                                          | 79 |
| 4.2.3. Caracterização das micropartículas.....                                                                                                                        | 81 |
| 4.2.3.1. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....                                                                                                             | 81 |
| 4.2.3.2. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflectância Total Atenuada (ATR-FTIR) .....                                                 | 82 |
| 4.2.3.3. Difração de raios X (DRX).....                                                                                                                               | 82 |

|                                                                                                                                                                       |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.2.3.4. Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV).....                                                                                          | 83        |
| 4.2.3.5. Análise termogravimétrica (TG) e análise térmica diferencial (DTA).....                                                                                      | 83        |
| 4.2.3.6. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.....                                                                                                         | 84        |
| 4.2.4. Ensaio de liberação do G-0 das micropartículas.....                                                                                                            | 84        |
| 4.2.5. Fotoestabilidade das micropartículas em condições forçadas.....                                                                                                | 85        |
| 4.2.6. Estabilidade acelerada das micropartículas.....                                                                                                                | 86        |
| <b>5. Resultados e discussão.....</b>                                                                                                                                 | <b>88</b> |
| 5.1. Avaliação dos complexos de G-0 com ciclodextrinas.....                                                                                                           | 88        |
| 5.1.1. Estabilidade acelerada dos complexos.....                                                                                                                      | 88        |
| 5.1.2. Influência das ciclodextrinas na fotoestabilidade do G-0.....                                                                                                  | 92        |
| 5.1.3. Efeito das ciclodextrinas na volatilização do G-0.....                                                                                                         | 114       |
| 5.1.4. Avaliação biológica “in vitro” dos complexos de inclusão liofilizados de G-0 com ciclodextrinas frente a <i>Cândida albicans</i> e <i>Cândida krusei</i> . ... | 121       |
| 5.1.5. Perfil de dissolução dos complexos de inclusão liofilizados de G-0 com ciclodextrinas .....                                                                    | 126       |
| 5.1.6. Influência das ciclodextrinas na liberação e permeação do G-0 na forma de complexos de inclusão liofilizados usando a célula de Franz.....                     | 129       |
| 5.1.7. Influência das ciclodextrinas na citotoxicidade “in vitro” do G-0 na forma de complexos de inclusão liofilizados.....                                          | 146       |
| 5.2. Avaliação das micropartículas de G-0 e etilcelulose como alternativa de estabilização.....                                                                       | 156       |
| 5.2.1. Compatibilidade com polímero usando CLAE.....                                                                                                                  | 156       |
| 5.2.2. Desenvolvimento das micropartículas.....                                                                                                                       | 157       |
| 5.2.3. Caracterização das micropartículas de G-0 e etilcelulose.....                                                                                                  | 169       |
| 5.2.4. Avaliação da volatilidade do G-0 incorporado nas micropartículas.....                                                                                          | 179       |
| 5.2.5. Liberação do G-0 incorporado nas micropartículas.....                                                                                                          | 182       |

|                                                                                                        |            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 5.2.6. Fotoestabilidade do G-0 incorporado nas micropartículas em condições de irradiação forçada..... | 185        |
| 5.2.7. Estabilidade acelerada do G-0 incorporado nas micropartículas.....                              | 189        |
| <b>6. Conclusões.....</b>                                                                              | <b>195</b> |
| <b>7. Referências bibliográficas.....</b>                                                              | <b>197</b> |
| <b>8. Anexos.....</b>                                                                                  | <b>233</b> |

## 1. Introdução

O 2-(2-nitrovinil) furano (G-0) pertence à família química dos derivados 2-furiletilênicos. Estas substâncias exibem amplo espectro antibacteriano, antiparasitário e antifúngico, aplicáveis nas clínicas médicas humana e veterinária. Especificamente G-0, apresenta uma potente atividade antiprotozoária frente à *Eimeria tenella*, causadora da coccidiose aviária, e pode ser utilizado no tratamento e profilaxia da doença (OLAZÁBAL-MANSO et al., 2002).

Adicionalmente, os derivados 2-furiletilênicos, incluindo G-0, mostraram importante atividade farmacológica frente à *Leishmania spp.* (*L. mexicana amazonensis*, *L. donovani infantum* e *L. braziliensis braziliensis*) e *Tripanosoma cruzi* (SIFONTES-RODRÍGUEZ et al., 2015; SIFONTES-RODRÍGUEZ, 2017). Leishmaniose é uma doença causada por inoculação de promastigotes do protozoário do gênero *Leishmania*, durante a picada de um flebótomo fêmea infectado. Cerca de 12 milhões de pessoas padecem de alguma forma de leishmaniose. A forma visceral causa entre 20 e 40 mil mortes anuais, assim como perdas devido à incapacidade. No caso das formas cutâneas e mucocutâneas, por não serem potencialmente letais, tem sido esquecida, localizando-se no final de qualquer lista de prioridade na saúde pública de muitos países porém, o efeito incapacitante e o estigma social que impõe, principalmente nas mulheres, é brutal (ALVAR et al., 2012; SILVA-JARDIM; THIEMANN; ANIBAL, 2014). Entre 70-75 % dos casos relatados estão concentrados em Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã, Paquistão, Perú, Arábia Saudita, Republica Árabe Síria e Tunísia (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015). Os derivados pentavalentes de antimônio tem sido as melhores opções para o tratamento desta doença. Embora não sejam efetivos contra todas as espécies, o desenvolvimento de resistência microbiana tem

aumentado a cada ano (NEVES et al., 2011), pois os efeitos colaterais produzidos são causa frequente de interrupção do tratamento. A Anfotericina B e a pentaminidina, tem sido reservadas para os casos de resistência microbiana aos derivados de antimônio, devido à sua elevada toxicidade. Estudos recentes mostraram efeito inibidor do G-0 no crescimento de promastigotes da *Leishmania* e um efeito letal em baixas concentrações. O estudo revelou que G-0 foi menos ativo que a Anfotericina B e foi mais ativo que o Glucantime<sup>®</sup> (Antimoniato de meglumina). Por sua parte, o protozoário flagelado *Tripanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas e é considerado um problema de saúde na América Latina. A doença é transmitida através da picada de insetos hematófagos e produz aproximadamente 12-20 mil mortes por ano (MAYA et al., 2010; SILVA-JARDIM; THIEMANN; ANIBAL, 2014; URIBARREN, 2015). A doença ocorre nas áreas endêmicas de 21 países latino-americanos incluindo Argentina, Belize, Bolívia, Brasil, Chile, Colômbia, Costa Rica, Honduras, Equador, El Salvador, Guiana, Guiana Francesa, Guatemala, México, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Perú, Suriname, Uruguai e Venezuela (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). Atualmente esta é a principal causa de cardiomiopatia não-isquêmica na América Latina (BENZIGER; RIBEIRO; NARULA, 2015). Existe somente um fármaco disponível para seu tratamento no mercado desde 1975: Benznidazol (SILVA-JARDIM; THIEMANN; ANIBAL, 2014). Estudos “*in vitro*” utilizando *T. cruzi* cultivado em cultura celular de mioblastos de ratos mostraram que G-0 apresentou efeito parasiticida superior ao benznidazol (CASTAÑEDO-CANCIO et al., 2009; SIFONTES-RODRÍGUEZ, 2017).

Estes compostos também apresentam atividade antibacteriana e antifúngica. Especificamente G-0, mostrou atividade inibitória no crescimento de

várias espécies de bactérias, fungos filamentosos e leveduras, entre elas *Candida albicans* (ALABI; HASSAN, 2014), considerada o mais importante patógeno fúngico oportunista, causadora de micoses superficiais (pele e mucosas) e invasivas. A resistência fúngica frente aos principais grupos de compostos usados na clínica como por exemplo, os derivados azólicos, é um fato e os mecanismos de resistência são conhecidos. Este fenômeno, associado à menor susceptibilidade de espécies não-albicans e à toxicidade de alguns dos fármacos disponíveis, mostram necessidade do desenvolvimento de estratégias, que incluem agregação de tecnologias a fármacos já existentes e a obtenção de novos fármacos naturais e sintéticos (SPAMPINATO; LEONARDI, 2013).

O derivado 2-(2-nitrovinil) furano tem sido obtido através de um método de síntese química relativamente simples, a partir do furfural, derivado da cana de açúcar, e é utilizado como matéria prima na obtenção de outros derivados quimicamente mais estáveis (CECMED, 2015): G-0 possui baixa estabilidade em água, devido a uma reação de adição à dupla ligação da cadeia lateral alifática do composto; pode formar dímeros à temperatura ambiente, por exposição à luz (DE ROJAS PÉREZ, 2006) e a compatibilidade com excipientes sólidos (RUZ et al., 2012; ORFE-SARDIÑAS, 2014), alguns polímeros (GONZÁLEZ-BEDIA et al., 2008) e componentes da ração animal é considerada de moderada à baixa (DE ROJAS PÉREZ, 2006; RUZ, 2006). Adicionalmente G-0 sublima a temperaturas relativamente baixas o que pode comprometer a dose quando é incorporado em formas farmacêuticas sólidas (RUZ et al., 2015).

Porém, existem alternativas tecnológicas na área farmacêutica que podem ser avaliadas visando melhorar as propriedades físico-químicas da substância e que podem permitir o desenvolvimento de formas farmacêuticas estáveis e efetivas.

Ciclodextrinas (CDs) constituem um grupo de oligossacarídeos cíclicos que contêm como mínimo 6 D-(+) unidades de glicopirranose e que devido à sua organização molecular têm sido utilizado como agentes complexantes de substâncias lipofílicas para melhorar a estabilidade, biodisponibilidade, reduzir a irritação, eliminar aromas ou sabores desagradáveis e para diminuir interações fármaco/excipiente (POLYAKOV et al., 2004). G-0 é capaz de formar complexos de inclusão com derivados de ciclodextrinas, em especial com a HP- $\beta$ -CD e SBE- $\beta$ -CD (RUZ et al., 2012). Porém, ainda é necessário avaliar o efeito da formação de complexos de inclusão sólidos na estabilidade química e física do G-0, assim como da possível influência nas propriedades biológicas e biofarmacêuticas desta substância.

Nesse contexto, outra alternativa para minimizar os problemas de estabilidade da substância seria avaliar a incorporação do G-0 em micropartículas poliméricas, como estruturas intermediárias para posterior inclusão em formas farmacêuticas sólidas para garantir a estabilidade da substância ativa. Esta alternativa serviu de base para melhorar a estabilidade de outros fármacos, como por exemplo pantoprazol (DHURKE; KUSHWAHA; DESAI, 2013), avobenzona (CABRERA et al., 2014), azida de amônia (HOSSEINI; ESLAMI, 2016) e curcumina (PECORA et al., 2016), entre outros.

A existência de micropartículas, baseia-se fundamentalmente nos sistemas reservatórios, nos quais o fármaco encontra-se separado do meio dispersante por uma camada de polímero, gerando microcápsulas, e nos sistemas matriciais, nos quais o fármaco encontra-se distribuído na matriz polimérica, gerando as microesferas poliméricas. A literatura relata vários métodos que permitem obter este tipo de sistema, os quais geralmente são selecionados considerando-se as

características físico-químicas da substância ativa, do polímero e das condições experimentais. Aqui resulta de vital importância avaliar a compatibilidade do polímero com a substância ativa e com a via de administração recomendada para o fármaco. Evidentemente a obtenção do medicamento final deve ser precedida pelos estudos de pré-formulação, com objetivo de otimizar todos os parâmetros tecnológicos de modo que a formulação final tenha características de estabilidade física e química e perfil biofarmacêutico compatível com a via de administração do fármaco.

## 2. Revisão de Literatura

### 2.1. 2-(2-nitrovinil) furano (G-0)

Os derivados 2-furiletilênicos são substâncias biologicamente ativas que exibem amplo espectro antibacteriano, antiparasitário e antifúngico, aplicáveis na clínica médica humana e veterinária. O derivado 2-(2-nitroetenil) furano, CAS 699-18-3, ou 2-(2-nitrovinil) furano (Figura 1), possui o grupo nitro como substituinte na posição  $\beta$ - da dupla ligação exocíclica, o qual é característico de compostos ativos com potente atividade antiprotozoária e antifúngica (JULLIAN et al., 2008).

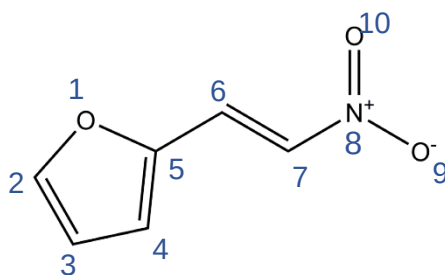


**Figura 1.** Estrutura química do 2-(2-nitrovinil) furano (Autora).

#### 2.1.1. Obtenção

Os primeiros relatos sobre a síntese química descrevem sua obtenção a partir de ácido furilacrílico e  $N_2O_4$  com cerca de 20 % de rendimento (SITKIN; KLIMENKO, 1979). A partir de 1984 a substância começa ser sintetizada utilizando como reagentes o furfural e o nitrometano, com rendimento superior de 61 % e em 1996 atinge o valor de 90 % (BANDGAR; ZIRANGE; WADGAONKAR, 1996). Uma metodologia de síntese baseada nos reagentes anteriores, mas utilizando a isobutilamina como catalizador (OLAZÁBAL-MANSO et al., 2002) (Figura 2) e

posterior purificação com carvão ativado e etanol, com pureza superior ao 99%, foi desenvolvida no Centro de Bioativos Químicos da Universidade Central de Las Villas, em Cuba (RODRÍGUEZ-NEGRÍN, 2003). O furfural utilizado na reação pode ser obtido por hidrólise ácida a partir dos resíduos da cana de açúcar (MOYA; GÓMEZ, 2000).

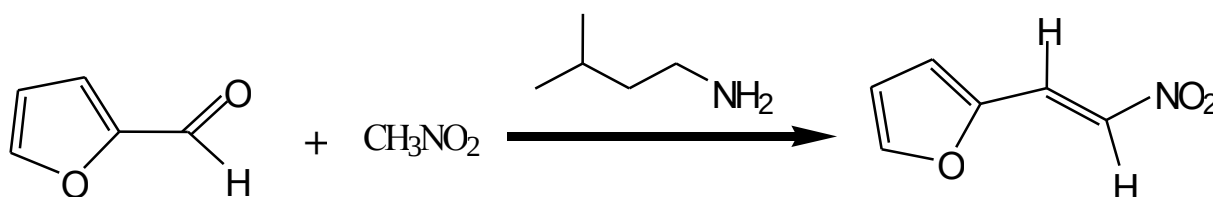


**Figura 2.** Reação de obtenção de 2-(2-nitrovinil) furano (Autora).

#### 2.1.2. Aspectos estruturais e propriedades físico-químicas.

Foi determinado que o confôrmero mais estável em solução é o *s-trans*, baseado na combinação de cálculos semi-empíricos e de RMN (GIULIANI et al., 2003).

No estado puro é um sólido cristalino de cor amarela, que funde entre 73 e 75 °C e apresenta massa molar de 139,05 g/mol. Muito solúvel em dimetilformamida e dimetilsulfóxido, clorofórmio e benzeno, solúvel em tetracloreto de carbono e PEG 400, pouco solúvel em etanol absoluto e metanol e muito pouco solúvel em água (MORALES et al., 1993). Metodologias analíticas validadas por espectrofotometria UV-Vis (RODRÍGUEZ, 1996), cromatografia a gás (CG) (BRAVO, 1998) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (RUZ, 2006) estão

disponíveis para controle de qualidade e estabilidade da matéria prima, assim como metodologia para controle microbiológico (MACHADO; SILVEIRA, 1994).

O coeficiente de partição n-octanol/água ( $\log P$ ) foi determinado experimentalmente utilizando CLAE como técnica de quantificação e o resultado foi comparado com o teórico gerado a partir de um modelo matemático baseado no software TOSS MODE o qual permite prever as propriedades físico-químicas, utilizando o cálculo dos momentos espectrais de uma matriz. O coeficiente obtido pelo método clássico, de  $1,56 \pm 0,02$  e o modelo *in silico* obtido mostrou uma correlação de 0,984 para a classificação das previsões do  $\log P$  (CABRERA et al., 2001).

É conhecido que nitro compostos apresentam tendência de sublimação (VEREVKIN, 1997). Durante os estudos de pré-formulação G-0 mostrou sinais de ocorrência do processo, evidenciado pelas perdas de massa detectadas quando era armazenado em recipientes sem tampa, em temperatura ambiente ou quando eram usadas tampas plásticas brancas para cobrir a substância. O processo foi acelerado a 55 °C e os cristais do fármaco coletados em tampas de vidro e posteriormente caracterizados (RUZ, 2006).

G-0 pode degradar em diferentes condições experimentais. Entre os fatores identificados como altamente indutores da degradação estão a luz, o meio oxidante e meios básico e fortemente ácido. O impacto da luz foi estudado em solução aquosa e no estado sólido, sendo que em ambos os casos conduz à formação de dímeros. Os produtos de degradação foram isolados e caracterizados (DE ROJAS PÉREZ, 2006). O efeito da temperatura na degradação só foi evidenciado acima de 60 °C e utilizando vácuo para evitar a possível influência do oxigênio. O experimento evidenciou mudanças na cor do G-0, de amarelo a marrom, tendo sido

detectada pequena diminuição do pico cromatográfico (CLAE-DAD), mas não foram detectados produtos adicionais. O resíduo foi analisado também por análise elementar e microscopia eletrônica, evidenciando possível carbonização (DE ROJAS PÉREZ, 2006).

O perfil pH-estabilidade, desenvolvido a  $41 \pm 1$  °C, no intervalo de pH entre 3,2-8,2, utilizando CLAE como metodologia quantitativa, mostrou aumento da velocidade de degradação da substância com aumento do pH (RUZ, 2006). Este estudo também foi corroborado utilizando a faixa de pH entre 1-12, tendo sido determinado o pH de máxima estabilidade o pH=3. O produto principal de degradação no meio aquoso foi o furfural e a reação ocorre através de um mecanismo de adição à dupla ligação da cadeia lateral alifática (DE ROJAS PÉREZ, 2006).

Trabalhos avaliaram a compatibilidade do G-0 com excipientes. Um deles avaliou a compatibilidade com vários componentes da ração animal em condições suaves de armazenamento, utilizando espectrofotometria UV-Vis para quantificação (RUZ, 2006). Outro trabalho avaliou a compatibilidade do candidato a fármaco nas misturas físicas, rotoevaporadas e amassadas com vários polímeros e ciclodextrinas, através de análise qualitativa por CCD, DSC e análise organoléptica das amostras armazenadas à temperatura ambiente por três meses, demonstrando boa compatibilidade com duas das ciclodextrinas avaliadas (HP- $\beta$ -CD e SBE- $\beta$ -CD). Nas amostras referentes aos outros excipientes foi detectado algum tipo de degradação (GONZÁLEZ-BEDIA et al., 2008). O último relato foi um ensaio quantitativo e qualitativo utilizando CLAE, DSC e FTIR realizado em condições de estresse durante um mês, de misturas físicas com excipientes comuns de formas farmacêuticas sólidas e ciclodextrinas, no qual foi detectada

forte incompatibilidade com SBA-15 e, em menor grau, com DI-CAFOS e Avicel<sup>®</sup> PH102. Corroborar-se, novamente, a boa compatibilidade do G-0 com os derivados da  $\beta$ -CD anteriormente avaliados (ORFE-SARDIÑAS, 2014).

### 2.1.3. Atividade Biológica

#### - Antiprotozoária

G-0 exibe potente atividade antiprotozoária “*in vitro*” e “*in vivo*” frente à *Eimeria tenella*, agente causador da coccidiose, podendo ser utilizado no tratamento e na profilaxia desta doença. O protozoário pode infectar aves domésticas, principalmente galinhas, também coelhos, ovelhas e alguns animais domésticos, causando mazonen, perda de peso e mortalidade variável, gerando perdas econômicas mazonenses, avaliadas em várias centenas de milhões de dólares anualmente para a indústria agrícola (QUIROZ-CASTAÑEDA; DANTÁN-GONZÁLEZ, 2015). Uma solução de G-0 preparada em concentração de  $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$  resultou superior ao amprolium ( $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e à sulfametazina (0,15 %), considerando ganho de peso, número de lesões anatomopatológicas, mortalidade e excreção de oocistos em galinhas *Leghorn* (LÓPEZ, 2004). Resultados similares foram obtidos em coelhos infectados com quatro espécies de *Eimeria*, com redução média de 97% do número de oocistos fecais (OLAZÁBAL-MANSO et al., 2002). As pré-misturas anticoccidianas utilizadas em Cuba para o tratamento e profilaxia da coccidiose aviária são importadas, não existindo nenhuma produzida pela indústria nacional.

Adicionalmente, a família dos 2-nitrovinilfuranos, a qual inclui o G-0, mostrou importante atividade farmacológica contra *Leishmania* spp. (*L. mexicana mazonenses*, *L. donovani infantum* e *L. braziliensis braziliensis*) e *Tripanosoma*

*cruzi* (CASTAÑEDO-CANCIO et al., 2009; SIFONTES-RODRÍGUEZ et al., 2015). *Leishmania* inclui cerca de 20 espécies, das quais 17 são patogênicas ao homem e aos animais. Encontram-se distribuídos em 88 países. Anualmente, 1,5-2 milhões de novos casos e 350 milhões de pessoas apresentam risco de contrair a infecção cada ano. 90 % dos casos com leishmaniose cutânea se reportam no Afeganistão, Arábia Saudita, Argélia, Irã, Iraque, Síria, Sudão e Brasil, enquanto que 90% dos casos de leishmaniose visceral se apresentam em Sudão, Índia, Bangladesh, Nepal e Brasil (SIFONTES-RODRÍGUEZ, 2017). Os derivados de antimônio pentavalentes foram as melhores opções para tratamento da doença porém, não são efetivos contra todas as espécies, sendo que o desenvolvimento de resistência microbiana aumenta a cada ano. Os efeitos secundários produzidos são causa frequente de interrupção do tratamento. Anfotericina B e pentamidina, reservam-se para casos de resistência microbiana aos derivados de antimônio, devido à sua elevada toxicidade. Em estudos desenvolvidos recentemente, G-0 mostrou efeito inibidor no crescimento de promastigotes da *Leishmania* e efeito letal em baixas concentrações. O estudo revelou que G-0 foi menos ativo que anfotericina B e mais que o Glucantime<sup>®</sup> (antimoniato de meglumina).

*Tripanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas e é considerado um problema de saúde na América Latina. Transmite-se mediante a picada de insetos hematófagos e produz perto de 50.000 mortes por ano. Somente existe um fármaco disponível para seu tratamento no mercado desde 1975: o benznidazol. Estudos “*in vitro*” empregando *T. cruzi* cultivado em cultura celular de mioblastos de ratos mostraram que o G-0 apresentou efeito parasiticida superior ao do benznidazol (CASTAÑEDO-CANCIO et al., 2009; SIFONTES-RODRÍGUEZ, 2017).

#### - Antifúngica e antibacteriana

A maioria dos nitrocompostos com ação antineoplásica, antiparasitária e antibacteriana apresentam biorredução enzimática do grupo nitro como provável mecanismo de ação o que coloca este requisito como sendo imprescindível para desempenho da atividade biológica destes compostos (PAULAI; SERRANO; TAVARES, 2009). O grupo nitro ligado ao carbono insaturado é mais facilmente redutível e os produtos de reação mais estáveis (DANN; MÖLLER, 1949). Uma série de trabalhos não publicados mostraram atividade antifúngica “*in vitro*” frente a fungos como *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* e *Helminthosporium stenospilum*, detectando-se interferência na formação dos conídios e atividade antibacteriana frente à *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. A atividade antifúngica de 2-(2-nitrovinil) furano frente à *Candida albicans*, *Geotrichum albidum*, *Pyricularia oryzae*, *Drechslera oryzae* e *Fusarium solani* foi reportada utilizando o método de difusão em ágar. No próprio trabalho também foi avaliada a atividade antibacteriana frente à *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Xanthomonas manihotis* e *Pseudomonas syringae* (ALABI; HASSAN, 2014).

#### 2.1.4. Toxicidade

Estudos de toxicidade aguda em ratos Sprague Dowley mostraram DL<sub>50</sub> de 171,91 mg/Kg. Em estudos desenvolvidos a fim de avaliar a atividade anticoccidiana, o qual também foi determinado a DL<sub>50</sub> em aves Leghorn, reportam valor de 1,02 g/Kg (OLAZÁBAL-MANSO et al., 2002), classificando-se como moderadamente tóxico por ingestão. No trabalho encaminhado à determinação da atividade leishmanicida da família química dos furiletlenos, foi avaliada a toxicidade

das soluções das substâncias preparadas em óleo de girassol, em modelo animal de camundongo albino fêmea Balb/c, pela via intraperitoneal, determinadas  $DL_{50}$ ,  $DL_0$  e DMT por administração durante 14 dias, com intervalos de 12 ou 24 h. Os resultados ( $DL_{50}$ = 68 mg/Kg e  $DL_0$  = 50 mg/Kg) foram superiores aos obtidos para o controle Anfotericina B ( $DL_{50}$ = 22 mg/Kg e  $DL_0$ = 15 mg/Kg) (CASTAÑEDO-CANCIO et al., 2009).

É bem conhecido que nitrofuranos como nitrofurazona, nitrofurantoina e nitrofurazolidona que tem sido utilizados na clínica durante anos como antibacterianos, foram removidos do mercado em vários países devido a seu potencial mutagênico (SNYDER; GREEN, 2001). Contrariamente, estudos toxicológicos conduzidos com os nitrovinilfuranos não conseguiram mostrar este potencial genotóxico. Um deles, avaliou a genotoxicidade utilizando o ensaio "*in vitro*" de micronúcleos com bloqueio da citogênese, com e sem ativação metabólica. A substância não induz aumento na frequência de micronúcleos nem em presença nem em ausência da ativação em culturas de linfócitos humanos. Também foi desenvolvido o ensaio de intercâmbio entre cromátides irmãs em culturas de linfócitos, em ausência da fração S9, diminuindo o intercâmbio até valores não significativos quando o ensaio é realizado em presença de ativação metabólica. Outros ensaios realizados sob indução do SOS em *Escherichia coli* e o teste de Ames em *Salmonella typhimurium* resultaram negativos para o derivado furânico, pelo qual a substância é classificada como não genotóxica (GONZÁLEZ BORROTO; CREUS; MARCOS, 2001; GONZÁLEZ BORROTO et al., 2005). Também foi desenvolvido um ensaio para determinar a habilidade para induzir efeitos clastogênicos ou aneugênicos *in vivo*, através da indução de MNPCE em medula óssea de camundongos, o qual a substância foi administrada pela via

intraperitoneal (5-20 mg/Kg) dissolvida previamente em óleo de milho. Não foram observadas diferenças significativas no incremento de MNPCE com relação ao controle negativo, mas foram observadas em todos os animais tratados com ciclofosfamida (controle positivo), demonstrando a sensibilidade do método. Como resultado final reporta-se que G-0 não é clastogênico nem aneugênico nos eritrócitos da medula óssea dos camundongos tratados, porém foram observados alguns sintomas clínicos de toxicidade na concentração máxima avaliada (GONZALEZ BORROTO et al., 2003).

Existem várias alternativas tecnológicas disponíveis para estabilização de substâncias lábeis, que incluem desde a modificação química da molécula, utilização de proteções físicas para favorecer a proteção frente aos indutores da degradação, a escolha de formulações sólidas, até alternativas tecnológicas de proteção interna, como por exemplo inclusão em sistemas micelares para reduzir reações hidrolíticas, complexos de inclusão em ciclodextrinas e procedimentos de encapsulação (micro e nanoencapsulação) tem sido usados com sucesso neste sentido (FARH, 2018).

G-0 é atualmente utilizado como matéria prima na síntese do derivado bromado 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil) furano (G-1), produto mais estável, que é produzido na indústria farmacêutica cubana na forma de pomada para aplicação como antifúngico (Dermofural®) (URQUIJO, 2017) e também na indústria biotecnológica na forma de dispersão sólida (Vitrofural®), devido a seu amplo espectro antifúngico e antibacteriano (CECMED, 2015) porém, em vista do simples método de síntese e propriedades farmacológicas do primeiro, parece interessante explorar algumas destas alternativas de estabilização.

## 2.2. Ciclodextrinas

### 2.2.1. Estrutura e propriedades

A degradação do amido pela enzima amilase, conhecida como cicloglicosiltransferase (CGTase), provoca divisão das cadeias poliméricas e reordenamento intramolecular, gerando um grupo de compostos oligoméricos cíclicos que são conhecidos como CDs (CHALLA et al., 2005). Muitos micro-organismos produzem glicosil transferases, mas poucos produzem CGTase (SAENGER, 1980), entre eles o *Bacillus macerans* e linhagens do gênero *Micrococcus* e *Klebsiella*. Na época atual, o desenvolvimento da engenharia genética permitiu a obtenção de diferentes tipos de CGTases, ainda mais ativas e específicas para produção de CDs naturais com elevada pureza (SICARD; SANIEZ, 1987).

Estes esteroides ídeos cíclicos estão constituídos estruturalmente por unidades de D-glicopirranose unidas através de ligações  $\alpha$ -1,4 (FREUDENBERG; CRAMER; PLIENINGER, 1951). As unidades de glicose estão na conformação de cadeira clássica e as ligações glicosídicas não tem livre rotação, pelo qual as moléculas das CDs apresentam uma estrutura rígida de cone truncado (SZEJTLI, 1998). As CDs naturais mais comuns contêm de 6-8 unidades de glicopirranose e podem ser topologicamente representadas como toroides, com uma abertura maior e outra menor, expondo os grupos hidroxila primários e secundários ao solvente. Os grupos hidroxila secundários dos átomos de carbonos C-2 e C-3 das unidades de glicose estão localizados na abertura maior, enquanto os grupos hidroxila primários do C-6 estão na abertura menor. Devido a este arranjo, a cavidade interna é substancialmente menos polar que o entorno aquoso, resultando um

hospedeiro aceitável para moléculas hidrofóbicas. A natureza essencialmente hidrofílica do exterior das CDs contribui para sua solubilidade aquosa.

As CDs de origem natural são classificadas como  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -CDs com seis, sete e oito unidades de glicopirranose, respectivamente (Figura 3). Também tem sido reportadas as de nove, dez, onze, doze e treze unidades (designadas como  $\delta$ -,  $\epsilon$ -,  $\zeta$ -,  $\eta$ - e  $\theta$ -CDs) mas suas habilidades de complexação são insignificantes (FREUDENBERG; CRAMER; PLIENINGER, 1951; LOFTSSON; BREWSTER, 1996). B-CD apresenta menor solubilidade em água (1,85 % m/v) comparada com  $\alpha$ -CD (14,5 % m/v) e  $\gamma$ -CD (23,2 % m/v), devido à formação de ligações de hidrogênio intramoleculares entre os grupos hidroxila secundários das unidades de glicose adjacentes no toroide da primeira. Estas ligações incrementam a rigidez molecular, resultando mais susceptível à cristalização (SZEJTLI, 1994), a qual previne a hidratação da molécula de CD, resultando em baixa solubilidade em água. Na  $\alpha$ -CD, a maior curvatura do toroide incrementa a distância entre as ligações de hidrogênio e conseqüentemente as debilita. Como resultado, esta CD é flexível em solução e mais facilmente hidratada (CABRAL-MARQUES, 1994<sup>a</sup>). A  $\gamma$ -CD apresenta uma estrutura não coplanar, flexível e é a mais solúvel das três (BEKERS et al., 1991).

A cavidade da CD está alinhada por dois anéis de grupos C-H (H-3 e H-5) e o anel de átomos de oxigênio tipo éter glicosídicos. O par de elétrons não ligados das pontes de oxigênio glicosídicas estão dirigidas para o interior da cavidade, gerando alta densidade eletrônica e um caráter de base de Lewis. Os grupos C-H que compreendem H-1, H-2 e H-4 e os grupos hidroxila polares do açúcar estão localizados na parte externa da molécula (JONES et al., 1984; BEKERS et al., 1991; MYLES et al., 1994).

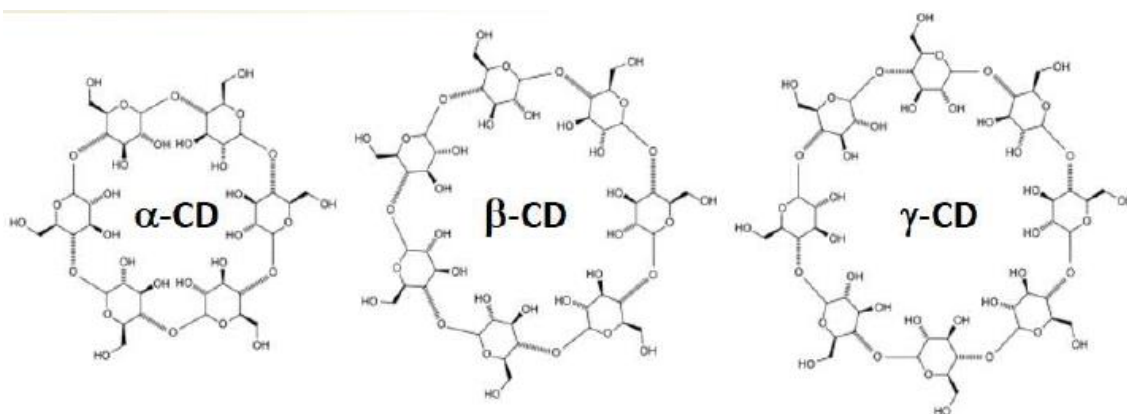


**Figura 3.** Estrutura química das ciclodextrinas naturais α-, β- e γ-CD com 6, 7 e 8 unidades de α-D-glicose respectivamente (PUSKÁS; MALANGA, 2017).

Devido a este caráter anfifílico, CDs podem formar complexos de inclusão solúveis e reversíveis com compostos pouco solúveis em água. O tamanho da cavidade é um dos fatores que determina qual CD deverá ser usada para complexação de uma molécula em particular. Assim, α-CD pode incorporar geralmente moléculas de baixa massa molar ou cadeias alifáticas secundárias e γ-CD, devido a sua maior cavidade, incorpora moléculas maiores, como moléculas macrocíclicas ou esteroides. Já o diâmetro da cavidade da β-CD permite incorporar boa parte dos fármacos, incluindo substâncias aromáticas e heterocíclicas. Por isso esta é a CD mais comumente usada como agente de complexação em formulações farmacêuticas (TIWARI; TIWARI; RAI, 2010).

### 2.2.2. História

O primeiro relato das CDs descrevia o isolamento de aproximadamente 3 g da substância cristalina a partir da digestão de 1000 g de amido, o que o autor chamou de cellulosine (VILLIERS, 1891). Nos anos seguintes o microbiologista Franz Schardinger, que trabalhava em um instituto de investigações de alimentos,

estudou o processo de degradação do amido usando várias bactérias e isolou dois compostos que chamou de A e B ou "cellulosinas de Villiers" e considerou mais adequado nomeá-las como dextrinas cristalinas, que pouco depois chamou de  $\alpha$ -dextrina e  $\beta$ -dextrina. No entanto muitas das propriedades físico químicas não se tornaram conhecidas até 1911, quando o cientista publicou seu último trabalho, pelo qual é considerado o fundador da química das ciclodextrinas e durante algum tempo estes compostos foram chamados de dextrinas de Schardinger (LOFTSSON; DUCHENE, 2007).

O quadro 1 mostra em ordem cronológica o desenvolvimento na química das ciclodextrinas, a partir dos descobrimentos anteriormente relatados.

É importante destacar que na etapa de utilização, especificamente na década dos 70 do século passado,  $\beta$ -CD só estava disponível como um produto raro e especial e seu preço alcançava os US\$ 2000/Kg. Aproximadamente 40 anos depois, a produção anual de  $\beta$ -CD estava cerca das 10.000 toneladas e o preço baixou até aproximadamente US\$ 5/Kg (LOFTSSON; DUCHENE, 2007).

**Quadro 1.** Principais eventos na área das ciclodextrinas

| Ano       | Evento                                                                                                                                                                         |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1920-1930 | O grupo inglês de investigações dos carboidratos dirigido por Norman Haworth, demonstrou o tamanho dos anéis destes carboidratos, primariamente de seis unidades de piranose.  |
| 1924      | Descrita pela primeira vez a metilação das ciclodextrinas, depois obtidas por Freudenberg and Meyer-Delius (1938) com diferentes graus de metilação.                           |
| 1928-1932 | Descoberta da habilidade das CDs de formar complexos com vários compostos orgânicos                                                                                            |
| 1935      | Freudenberg e Jacobi descobrem a $\gamma$ -CD                                                                                                                                  |
| 1938-1952 | Estrutura química da $\alpha$ -, $\beta$ - e $\gamma$ -CD elucidada por Freudenberg, Cramer, Borchert, French e Rundle.                                                        |
| 1948-1951 | Formação e estrutura de complexos de inclusão com CDs                                                                                                                          |
| 1953      | Primeira patente relativa a um método de preparação de complexos de inclusão com substâncias orgânicas fisiologicamente ativas (Freudenberg, Cramer e Plieninger) na Alemanha. |
| 1954      | Primeiro livro publicado sobre complexos de inclusão com CDs (Cramer)                                                                                                          |
| 1957-1965 | French descreve a existência de ciclodextrinas naturais maiores, de até 12 unidades de glicose.                                                                                |
| 1965      | Higuchi e Connors publicam o primeiro artigo da classificação dos complexos baseada no perfil de solubilidade.                                                                 |
| 1976      | - Aprovadas oficialmente em Japão $\alpha$ - e $\beta$ -CD como aditivos em alimentos.                                                                                         |

|           |                                                                                                                                                                                                                                                              |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|           | - O primeiro produto farmacêutico baseado na tecnologia de formação de complexo de inclusão com CD, prostaglandina E <sub>2</sub> /β-CD (Prostarmon E <sup>TM</sup> comprimidos sublinguais) foi comercializado no Japão pela empresa Ono Pharmaceutical Co. |
| 1981      | Primeiro Simpósio Internacional em Ciclodextrinas foi organizado em Budapest, Hungria, por Szejtli.                                                                                                                                                          |
| 1983-1985 | Brauns e Muller (Europa) e Pitha (Estados Unidos de América) inscrevem patente de 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina.                                                                                                                                           |
| 1988      | Os comprimidos de Piroxicam/β-ciclodextrina (Brexin®) foram comercializados pela empresa Chiesi Farmaceutici (Italia).                                                                                                                                       |
| 1990      | Stella e Rajewski inscrevem a patente para sulfobutil éter β-ciclodextrina.                                                                                                                                                                                  |

### 2.2.3. Derivados das CDs

Estudos demonstraram que a substituição de qualquer dos grupos hidroxila, por grupos metila, resulta em incremento da solubilidade aquosa, devido à não formação de ligações de hidrogênio intramoleculares, com forte impacto na solubilidade aquosa da β-CD. Sua baixa solubilidade, tendência à cristalização em solução aquosa e efeitos tóxicos quando administrada pela via endovenosa, limitam o uso desta CD em formulações farmacêuticas (UEKAMA, 1985). Devido a isto, tem sido sintetizados um grupo de derivados que apresentam propriedades físico químicas melhoradas e redução da toxicidade parenteral. A permetilação da β-CD também incrementa a altura do toroide, reduz o diâmetro da cavidade da parte primária e amplia a cavidade central. Assim, quando dois terços dos grupos

hidroxilas estão metilados seletivamente, como no caso da DM- $\beta$ -CD, a solubilidade à 25 °C incrementa até 57 % m/v. Já a completa alquilação que resulta em TM- $\beta$ -CD apresenta menor solubilidade aquosa de 31 % m/v (SZEJTLI, 1983; UEKAMA, 1985). A solubilidade dos derivados metilados diminui com aumento da temperatura (LOFTSSON; BREWSTER, 1996).

Outra causa do aumento da solubilidade dos derivados alquílicos em geral, em comparação com as CDs naturais, é que a manipulação química de derivatização gera misturas de isômeros, que incrementa o caráter amorfo da CD (LOFTSSON; BREWSTER, 1996).

As CDs hidrossolúveis comercialmente disponíveis na indústria farmacêutica incluem:

- Derivados metilados da  $\beta$ -CD (RM- $\beta$ -CD, DM- $\beta$ -CD).
- Derivados 2-hidroxipropilados de  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD (HP- $\beta$ -CD, HP- $\gamma$ -CD).
- Sulfoalquil derivados de  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD (SBE- $\beta$ -CD, SBE- $\gamma$ -CD)
- Glicosil e maltosil  $\beta$ -CD.
- Acetil derivados de  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD.
- Derivados sulfatados de CDs (DAVIS; BREWSTER, 2004).

Pela relação com este trabalho, serão comentadas apenas os derivados hidroxialquílicos e sulfoalquílicos da  $\beta$ -CD.

#### *- Hidroxi alquil derivados*

A condensação de  $\beta$ -CD com óxido de propileno em solução alcalina produz o derivado altamente solúvel HP- $\beta$ -CD apresentado na figura 4, com solubilidade em água que excede 60 % m/v (PITHA; PITHA, 1985), mostrando também um perfil toxicológico favorável (UEKAMA; HIRAYAMA; IRIE, 1998; GOULD; SCOTT, 2005).

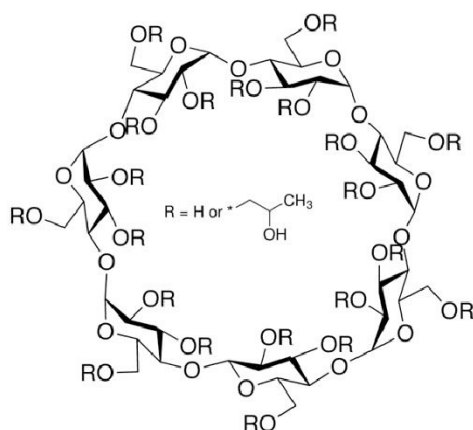


**Figura 4.** Representação esquemática da estrutura química da 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (Yergey et al., 2017).

O número de derivados de HP- $\beta$ -CD gerados, assumindo substituição aleatória, ronda os 130.000 e considerando que os grupos 2-hidroxipropila introduzem centros opticamente ativos, o total de isômeros geométricos e ópticos é ainda maior.

Estudos de antigenicidade, mutagênese e irritabilidade tópica demonstraram que HP- $\beta$ -CD é um material seguro que pode ser utilizado em produtos de uso cotidiano, como em perfumaria e cosmética. É incorporada como excipiente em produtos parenterais com dose máxima diária de até 16 g, como por exemplo o traconazol. Um relato de duas crianças com 5 anos tratados por doença de Niemann-Pick tipo C receberam 2500 mg/Kg (iv) de HP- $\beta$ -CD, duas vezes por semana por mais de um ano e foi bem tolerada. Em geral, em tratamento de crianças desde 7 meses até 5 anos com produtos contendo este derivado, não existem relatos de efeitos indesejáveis com a dose de 100 mg/Kg/dia de HP- $\beta$ -CD, administrada em dose única ou dosis múltiplas (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2014).

Os principais fornecedores mundiais de HP- $\beta$ -CD são Janssen Farmacêutica (Bélgica), Wacker Chemie (Alemanha) e Cerestar, atual Ingredion (Estados Unidos de América) (DAVIS; BREWSTER, 2004).

*- Sulfoalquil derivados*

A reação da CD com propano-sulfona em solução alcalina produz sulfopropil-CD e a reação com butano-sulfona, gera a sulfobutil-CD.

O derivado da  $\beta$ -CD, sulfobutil éter- $\beta$ -CD com 7 substituintes (SBE7- $\beta$ -CD), apresentado na Figura 5, foi selecionado para uso comercial, sob a marca Captisol<sup>®</sup> e sua patente pertence a CyDex Pharmaceuticals, Inc. (Estados Unidos de América), considerando questões de segurança, maior sucesso na formação de complexos e maior capacidade solubilizante, comparado com SBE4- $\beta$ -CD e SBE1- $\beta$ -CD (PUSKÁS et al., 2015).

Estudos mediante espectrometria de massas demonstraram que não é possível mais de uma substituição por unidade de glicose e o RMN <sup>1</sup>H indicou que o grupo hidroxila primário era o principal sitio de substituição (PUSKÁS et al., 2015).

É incluída em vários produtos parenterais, por exemplo como excipiente de voriconazol, com dose máxima diária de até 14 g/Kg. Em estudos desenvolvidos com ratos durante 14 dias foi observada alguma alteração reversível dos túbulos renais que começa com incremento do tamanho de vacúolos apicais seguido de surgimento de lisossomos gigantes. Este incremento no tamanho é também observado como resposta orgânica adaptativa à excreção de substâncias osmóticas, como glicose, manitol e dextrana em altas concentrações. Em humanos não foram observados efeitos indesejáveis após administração de 250 mg/Kg/dia

durante 6 meses, pelo qual é considerada segura em crianças maiores de dois anos (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2014).

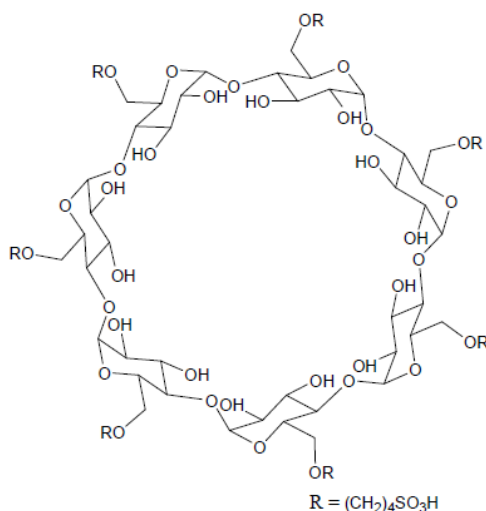


**Figura 5.** Representação esquemática da estrutura química da molécula de sulfobutil éter7-  $\beta$ -CD (SHITYAKOV et al., 2015).

Igual a HP- $\beta$ -CD, estudos farmacocinéticos demonstraram que SBE- $\beta$ -CD é eliminada pela urina de forma inalterada, não ultrapassa barreira hematoencefálica e não existem evidências de retenção em nenhum tecido. Ensaio toxicológicos demonstraram que SBE- $\beta$ -CD não tem efeitos na fertilidade e não é teratogênica. Também não mostrou atividade mutagênica em células bacterianas nem de mamíferos (ensaio “*in vitro*”) ou atividade clastogênica (ensaio “*in vitro*” e “*in vivo*”) (LUKE et al., 2010).

#### 2.2.4. Formação de complexos de inclusão

Requisitos importantes para formação do complexo fármaco-CD estável é que a molécula hóspede deve se encaixar completamente ou pelo menos, parcialmente na cavidade da CD e apresentar baixa polaridade. A formação dos

complexos, no caso de moléculas altamente volumosas é possível, desde que o hospedeiro contenha cadeias laterais ou grupos com suficiente tamanho molecular para permitir a inclusão. Neste caso, geralmente ocorre inclusão parcial (CABRAL-MARQUES, 1994b). A estabilidade do complexo de inclusão também depende da polaridade da molécula hóspede. Em geral, moléculas ou resíduos hidrofóbicos mostram maior afinidade pela cavidade das CD que aquelas hidrofílicas, onde os complexos formados são muito fracos ou não se formam (LI; PURDY, 1992). A formação do complexo constitui um processo reversível que muda as propriedades físico químicas da molécula hóspede e do hospedeiro.

A estrutura do complexo em solução pode diferir da estrutura do mesmo no estado sólido. Em solução, a molécula hóspede encaixa total ou parcialmente na cavidade central da CD e o complexo é rodeado e solvatado por uma cápsula de hidratação (multicamadas). No estado cristalino, no entanto, a molécula hóspede pode encaixar em um espaço vazio ou interstício na estrutura cristalina e não necessariamente na cavidade central do toroide (JONES et al., 1984). Durante a formação do complexo podem-se formar ou romper ligações não covalentes entre o fármaco e a ciclodextrina. Ao dissolver em água, o complexo dissocia-se rapidamente, dando lugar a moléculas de fármaco livre, em equilíbrio dinâmico com moléculas de fármaco ainda ligadas na cavidade da CD (LOFTSSON; BREWSTER, 1996).

A formação do complexo de inclusão com CD em solução aquosa ocorre de acordo com as seguintes etapas (BEKERS et al., 1991; CABRAL-MARQUES, 1994b).

- 1- Aproximação das moléculas do fármaco e da CD.
- 2- A água é liberada do interior da cavidade da CD para a solução ( $+\Delta H$ ).

3- O complexo é formado devido a interações entre a molécula hóspede ou seus grupos substituintes, e grupos do anel ou da cavidade interna vazia da CD (interações de Van der Waals e/ou ligações de hidrogênio).

4- Reidratação da parte exposta da molécula hóspede depois da formação do complexo.

Ainda que a liberação das moléculas de água do interior da cavidade da CD seja provavelmente uma importante força motriz para a formação do complexo, também o estabelecimento de interações relativamente fracas não covalentes podem estar envolvidas. Estas incluem forças de Van der Waals (interações dipolo-dipolo induzido e forças de dispersão de London), interações hidrofóbicas, liberação da energia de tensão dos anéis da CD e variações na tensão superficial do solvente (LI; PURDY, 1992). As CDs tem a habilidade de formar complexo de inclusão “in situ” no meio de dissolução, pelo qual podem melhorar a solubilidade e velocidade de dissolução ainda quando não se formou o complexo previamente no estado sólido (CHALLA et al., 2005).

Porém, os grupos hidroxila da superfície exterior das CDs são capazes de estabelecer ligações de hidrogênio com outras moléculas analogamente a polissacarídeos não cíclicos e formar complexos hidrossolúveis (sem inclusão). Assim, tem sido demonstrado que  $\alpha$ -CD pode formar tanto complexos de inclusão como complexos sem inclusão (LOFTSSON; DUCHENE, 2007). Também um estudo por espectroscopia de RMN da associação de riboflavina com  $\beta$ -CD e HP- $\beta$ -CD mostrou ausência de interações entre os prótons do fármaco com os referentes à cavidade interna das CDs (H3, H5) e finalmente o experimento de dinâmica molecular mostrou a possibilidade de interação fora do anel das CDs,

ainda quando a solubilidade e atividade antitumoral foram incrementadas (DE JESUS et al., 2012).

Em soluções aquosas diluídas é muito frequente que uma molécula do fármaco forme complexo com uma molécula da CD, então a estequiometria do complexo sob estas condições é 1:1.

As constantes de associação (K) reportadas variam entre 0 e 20.000 M<sup>-1</sup>. Alguns estudos demonstraram que ainda para fármacos fortemente ligados a CD, uma diluição de 1:100 reduz a porcentagem de fármaco no complexo de 100% a 30%. Esta diluição pode ser facilmente atingida por injeção do complexo ou por diluição no conteúdo do estômago e intestino. Por este motivo, é importante avaliar o efeito da diluição antes do uso clínico dos produtos que contém complexos fármaco-CD e que poderiam ser administrados por estas vias. Os fármacos que são administrados na forma de complexos de inclusão pela via oftálmica, transmucosa e transdérmica, são mais sensíveis à força de associação, devido a diluição mínima nestes sítios (CHALLA et al., 2005).

#### *2.2.5. Métodos de preparação de complexos*

Existem vários métodos que permitem obter complexos com CDs através de processos relativamente simples e sua escolha dependerá das propriedades da molécula que se deseja complexar e da natureza da ciclodextrina. O quadro 2 apresenta os principais métodos de obtenção.

**Quadro 2.** Métodos de obtenção de complexos de inclusão com ciclodextrinas

| <b>Método</b>                            | <b>Características</b>                                                                                                                                                                   | <b>Necessidades e limitantes</b>                                                                                                                               | <b>Exemplos de fármacos encapsulados</b>                                                                                                                                                                      |
|------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Formação de pasta</i>                 | Formação de uma pasta da CD com pequenos volumes de água e posterior incorporação do fármaco. A pasta é secada para obter o complexo sólido.                                             | Adequado para compostos pouco solúveis em água.<br><br>Dificuldade de preparação em grande escala                                                              | Benznidazol (SOARES-SOBRINHO et al., 2012)<br><br>Carvedilol (SHARMA; JAIN, 2013)<br><br>Timol (TAO et al., 2014)<br><br>Ibuprofeno (PEREVA et al., 2016)                                                     |
| <i>Co-precipitação</i>                   | A substância é dissolvida em solvente orgânico e posteriormente é adicionada a uma solução aquosa da ciclodextrina com agitação. A solução final é esfriada e o complexo deve precipitar | Muito usada para substâncias não solúveis em água.<br><br>Baixo rendimento devido a competição com solventes orgânicos que podem inibir a formação do complexo | Silymarin (GHOSH; BISWAS; GHOSH, 2011)<br><br>Meclizine (GEORGE; VASUDEVAN, 2012)<br><br>2-metoxiestradiol (CAIRA et al., 2015)<br><br>Oxaprozin (MENNINI et al., 2016)<br><br>Tropolon (SUZUKI et al., 2017) |
| <i>Aquecimento em recipiente fechado</i> | Após adsorção de uma quantidade definida de vapor de água, a mistura                                                                                                                     | A técnica pode ser desenvolvida sob atmosfera de nitrogênio e usada para complexar                                                                             | Ácido salicílico e flurbiprofeno (HIGASHI et al., 2011)                                                                                                                                                       |

|                                              |                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                           |
|----------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                              | física do composto e a CD é colocada em recipiente selado e aquecida                                                                                           | substâncias voláteis e termoeestáveis                                                                                                                                                                           | Timol (NIEDDU et al., 2014) $\alpha$ -naftol (FENG et al., 2018)                                                                                                                                                                                          |
| <i>Liofilização (Freeze-drying)</i>          | Proporções requeridas da substância e da CD dissolvem-se em água com agitação. A solução resultante é liofilizada e adicionalmente secada a vácuo.             | Adequado para substâncias termolábeis ou para hóspedes solúveis.<br><br>Geralmente produz bom rendimento e é possível escalonamento.<br><br>É um dos mais utilizados na formação de complexos de inclusão.      | Óleos de cinamomo e cravo (HILL; GOMES; TAYLOR, 2013).<br><br>Estragol (KFOURY et al., 2015)<br><br>Kamebakaurina (RAZA et al., 2017)<br><br>Sevoflurano (SHITYAKOV et al., 2015)<br><br>Acyclovir (IJAZ et al., 2016)<br><br>Dadzeina (LI et al., 2017). |
| <i>Secagem por Atomização (Spray-Drying)</i> | A CD e a substância são encapsular em dissolvidas em água deionizada ou mistura etanol/água e depois a solução resultante é submetida a secagem no Spray-dryer | O aparelho é operado considerando variáveis como temperatura de entrada e velocidade de alimentação. Devido às altas temperaturas usadas, esta técnica é aplicável à complexação de substâncias termoeestáveis. | Albendazol (GARCÍA et al., 2014)<br><br>Glimepride (SHASHIKANT; PATIL, 2016).<br><br>Carvedilol (ALONSO et al., 2016)<br><br>Cital (PHUNPEE et al., 2017).                                                                                                |

|                              |                                                                                                                                                  |                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                    |
|------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Fluídos supercríticos</i> | Utiliza o dióxido de carbono supercrítico como alternativa para solubilização dos compostos a encapsular, evitando o uso de solventes orgânicos. | A principal limitante é a elevada pressão requerida, o alto custo de manutenção e dos requisitos dos acessórios/equipamento auxiliar. | Cetoprofeno (BANCHERO; RONCHETTI; MANNA, 2013).<br><br>Flurbiprofeno (RUDRANGI et al., 2016)<br><br>Dadzeina (PAN et al., 2017)<br><br>Baicalina (LI et al., 2018) |
|------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

#### 2.2.6. Aplicações farmacêuticas

O alto custo envolvido no desenvolvimento de novas substâncias químicas farmacologicamente ativas tem dirigido o foco das companhias farmacêuticas na projeção de formulações mais eficazes com fármacos antigos. A tecnologia das CDs proporciona aos formuladores a valiosa oportunidade de melhorar os aspectos negativos das propriedades físico-químicas de ativos e incrementar potencialmente seu perfil farmacológico, farmacocinético e/ou diminuir os efeitos adversos.

##### - Incremento da solubilidade e velocidade de dissolução de fármacos

A aplicação farmacêutica mais comum das CDs é melhorar a solubilidade aquosa de fármacos pouco solúveis e melhorar sua biodisponibilidade e estabilidade (BEKERS et al., 1991; RAJEWSKI; STELLA, 1996). Também os complexos fármaco-CD podem ser usados na redução da irritabilidade gástrica, na conversão de ativos líquidos em pós microcristalinos ou amorfos e para prevenir

interações entre fármacos ou fármaco-excipiente. A extensão na qual as CDs podem incrementar a solubilidade não pode ser predita exatamente, no entanto, existem três métodos empíricos que podem servir de auxílio:

1- Fármacos com menor solubilidade aquosa tem maior tendência a melhorar significativamente sua solubilidade ao formar complexos com CDs (LACH; COHEN, 1963);

2- A hidrofobicidade da CD usada afetará sua capacidade solubilizante. Por exemplo, um dos derivados mais hidrofóbicos (DM- $\beta$ -CD) mostra o maior potencial de solubilização (SZEJTLI, 1994, YOSHIDA et al., 1988);

3- Os derivados das CDs com baixo grau de substituição são melhores solubilizantes que os mesmos derivados com maior grau de substituição (LOFTSSON; BREWSTER, 1996).

O complexo com CD de um fármaco de baixa solubilidade em água é usualmente mais solúvel que o fármaco livre. O complexo formado em geral também apresenta melhor molhabilidade e dissolve mais rápido. A complexação pode produzir marcante redução no tamanho do cristal ou diminuição da cristalinidade, gerando um sistema de dissolução mais fácil (CABRAL-MARQUES, 1994b). Portanto, um incremento na velocidade de dissolução é geralmente o resultado da combinação dos múltiplos fatores mencionados, facilitando a rápida captação no sistema circulatório e conseqüentemente incrementando a biodisponibilidade (AGATONOVIC-KUSTRIN et al., 2011).

A melhora na biodisponibilidade não está limitada só à administração de complexos pela via oral, também tem sido observada para formulações administradas pelas vias dérmica, retal e parenteral (CABRAL-MARQUES, 1994b).

#### - Estabilidade de fármacos

A formação de complexos de inclusão pode influenciar a estabilidade de fármacos e dependendo da forma em que a molécula hóspede está incluída na CD, a degradação pode ser diminuída (Figura 6), incrementada ou permanecer sem afetações (POPIELEC; LOFTSSON, 2017).

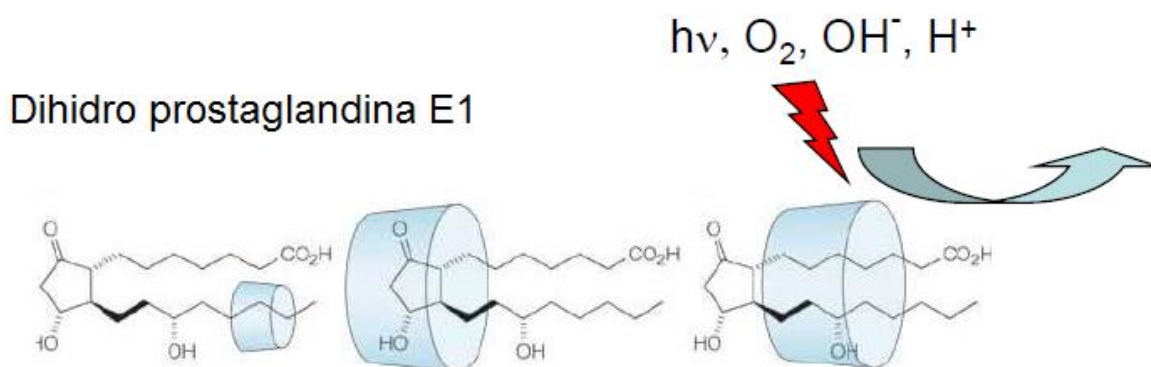


**Figura 6.** Representação esquemática do incremento na estabilidade química da dihidroprostaglandina E1 por inclusão em ciclodextrinas (PUSKÁS; MALANGA, 2017).

Também é importante destacar que a estereoquímica e/ou a estequiometria do complexo podem influenciar os efeitos estabilizantes ou desestabilizantes da complexação. Entre as reações que tem sido observadas incluem hidrólise, oxidação, transformações estereoquímicas, racemização e outras formas de isomerização, polimerização, decomposição térmica, fotodegradação e em alguns

casos, degradação enzimática (BEKERS et al., 1991; CABRAL-MARQUES, 1994b; LOFTSSON; BREWSTER, 1996).

Alguns estudos demonstraram que as CDs protegem o anel  $\beta$ -lactâmico de antibióticos dos grupos das penicilinas e cefalosporinas frente à hidrólise em condições ácidas (HIDAKA et al., 2010; POPIELEC et al., 2016), não tem nenhum efeito ou catalisam a degradação em meio neutro (ALSARRA et al., 2007; POPIELEC et al., 2016) e definitivamente catalisam a degradação em condições básicas (LOFTSSON; BREWSTER, 1996). Este comportamento é associado à ionização/deionização do grupo carboxila do antibiótico em função do pH e da maior afinidade da forma não ionizada pela cavidade da CD. O efeito catalítico é típico de sacarídeos, como por exemplo a glicose, em condições neutras ou básicas (POPIELEC; LOFTSSON, 2017). Também o efeito degradativo foi estudado considerando o tipo de CD, assim a hidrólise catalisada por base da benzilpenicilina, sob determinadas condições, foi inibida por RM- $\beta$ -CD, no entanto, HP- $\beta$ -CD incrementou a velocidade de degradação. Quando os grupos hidroxila foram substituídos por grupos com carga negativa como carboximetila, diminuiu o efeito catalítico (POPIELEC et al., 2016). O efeito catalítico de algumas CDs em solução aquosa deve-se geralmente à deprotonação do grupo hidroxila localizado na saída do anel, comportamento que é similar a outros carboidratos e álcoois polihídricos com grupos hidroxila adjacentes, situação que é principalmente notável em condições básicas (LOFTSSON et al., 2005).

O furoato de diloxanida, fármaco utilizado no tratamento de infecções diarreicas produzidas por ameba, sofre hidrólise catalisada por esterases. Alguns trabalhos mostraram que as CDs podem reduzir a degradação hidrolítica em condições básicas, assim como a degradação enzimática do fármaco, que não foi

só atribuída à formação de complexo de inclusão, se não também à inibição da enzima (MONTEIRO et al., 2003).

CDs também podem estabilizar substâncias frente à oxidação. O cotrimoxazol é susceptível a este tipo de degradação. Em condições de estresse com peróxido de hidrogênio, os complexos com HP- $\beta$ -CD incrementaram a vida média da mistura de fármacos (11 vezes para o sulfametoxazol e 4,2 vezes para o trimetoprim) (POURMOKHTAR; JACOBSON, 2005).

Um estudo comparativo do efeito de várias CDs na oxidação de ziprasidona demonstrou que o comprimento da cadeia lateral e o caráter eletro-doador podem influir na catálise do complexo. Em solução aquosa as cadeias carregadas negativamente e eletro-doadoras catalisam a reação por estabilização de um intermediário oxidativo seguindo a ordem: CE- $\beta$ -CD > SBE- $\beta$ -CD > HP- $\beta$ -CD > RM- $\beta$ -CD >  $\beta$ -CD > sem CD. No estado sólido o efeito das CDs esteve relacionado com a natureza cristalina ou amorfa dos complexos formados, sendo mais estáveis frente à oxidação aqueles que formaram estruturas cristalinas. Os autores sugerem que no estado sólido a oxidação nos complexos é mais influenciada pela alta mobilidade do fármaco nas formas amorfas (HONG; SHAH; MCGONAGLE, 2011).

O Limaprost, derivado da prostaglandina E1, apresenta baixa estabilidade frente a temperatura e umidade relativamente elevadas. O Limaprost alfadex, é um complexo da substância com  $\alpha$ -CD que, na forma de comprimidos, mantém a estabilidade por três anos ou mais quando é embalada em blister com revestimento de alumínio e contendo dessecante. Porém, sem a embalagem degrada rapidamente. Um estudo demonstrou que a liofilização de Limaprost alfadex com  $\beta$ -CD e posterior incorporação desta última como excipiente nos comprimidos contribuiu para melhorar a estabilidade por três meses ou mais em condições de

30°C/75 %HR. O mecanismo de estabilização da  $\beta$ -CD foi discutido desde o ponto de vista da redução da mobilidade das moléculas de água, além do próprio processo de inclusão na CD (INOUE et al., 2014).

#### *- Fotoestabilidade*

CDs tem o potencial para controlar reações químicas e fotoquímicas. Isso é devido à microplanaridade da cavidade do hospedeiro e a limitada mobilidade molecular do fármaco por restrições estéricas. Estudos demonstraram que a complexação pode alterar as propriedades de absorção de luz do complexo. A natureza de estados menos excitados da molécula hóspede, mecanismos de desativação e os produtos da reação podem ser modulados pelo microambiente da CD. Portanto, as mudanças estruturais que ocorrem quando a molécula do fármaco está formando complexo com a CD podem trazer consigo efeitos estabilizantes ou desestabilizantes (SORTINO et al., 2001). A velocidade das reações secundárias também podem ser influenciadas assim como a evolução dos intermediários da reação (BORTOLUS et al., 1993; LOFTSSON et al., 2005). Em geral, estes efeitos dependem do tipo de CD, o fármaco e as condições experimentais, como por exemplo o comprimento de onda e a intensidade de irradiação (LOFTSSON et al., 2005).

Existe relativamente pouca informação relativa à fotoestabilidade de complexos fármaco-CD em estado sólido, visto que o principal motivo de uso das CDs é incrementar a solubilidade aquosa, por isso a maioria dos estudos está focada à fotoestabilidade dos complexos em solução (HIDAKA et al., 2010). Independentemente de se o fármaco esteja em solução ou em estado sólido, a melhora na fotoestabilidade quando ele está na forma de complexo com CD

depende da CD em particular. Por exemplo, a fotoestabilidade do diclofenaco em formulações tópicas tipo gel, foi melhorada por inclusão com  $\beta$ -CD, apresentando o maior valor de constante de associação ( $K_{1:1}$ ) comparado com ME- $\beta$ -CD,  $\alpha$ -CD e  $\gamma$ -CD (IOELE et al., 2014).

A cinética e o mecanismo de fotodegradação da molécula de fármaco é diferente dentro da cavidade da CD, porque o interior constitui um ambiente isolado, com propriedades físico-químicas diferentes das propriedades do meio externo, as quais as espécies incluídas frequentemente apresentam-se como uma única molécula. A fotoquímica é, portanto, restrita a eventos intramoleculares, exceto em casos em que mais de uma molécula esteja presente dentro do toroide (JONES et al., 1984).

A degradação do ácido oxolínico (quinolona) em solução aquosa segue uma cinética de primeira ordem, e a velocidade da reação aumenta com aumento da concentração inicial de ácido oxolínico. Este fenómeno se deve à formação de dímeros ou agregados de alta ordem. A formação de complexo de inclusão com HP- $\beta$ -CD previne essa reação e retarda a degradação (ORFANOU et al., 2009).

A sofalcona (2'-carboxilmetoxi-4,4''-bis (3-metil-2-buteniloxi) chalcona) (CBC) sofre fotoisomerização (E) - (Z), resultando em perda de sua atividade biológica. Quando as moléculas formaram complexo de estequiometria 1:1 com  $\alpha$ -CD, a inclusão da CBC na pequena cavidade dificultou significativamente a rotação da dupla ligação do grupo cinamoil, resultando em diminuição da velocidade de isomerização. Porém, quando forma complexo 1:2 com  $\gamma$ -CD, a velocidade da reação é significativamente superior (TADANOBU et al., 1993).

A velocidade de fotodegradação do clofibrato diminuiu pela formação de complexo molecular sólido 1:1 com  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD (UEKAMA et al., 1983)

Numerosos estudos tentaram melhorar a fotoestabilidade da nifedipina em estado sólido utilizando a complexação com CDs (TESHIMA et al., 1989; MIELCAREK; SADAJ, 1994). Num deles observou-se melhora na fotoestabilidade em 5 vezes comparado com fármaco livre, quando formou complexo preparado por formação de pasta 1:1 com  $\beta$ -CD (MIELCAREK; SADAJ, 1994) e outros autores notaram só uma ligeira melhora nos complexos de inclusão com  $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD, DM- $\beta$ -CD, TM- $\beta$ -CD e polímero  $\beta$ -CD (TOMONO et al., 1988). Outro trabalho comparou a fotoestabilidade dos complexos preparados por formação de pasta com  $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD, RM- $\beta$ -CD, DM- $\beta$ -CD e HP- $\beta$ -CD. Como resultado, a vida média do fármaco foi menor que 60 min, independentemente da relação molar usada e do método de preparo. Observou-se melhora na fotoestabilidade dos complexos com  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD na relação molar 1:1, porém o complexo com HP- $\beta$ -CD apresentou um pequeno efeito desestabilizante com relação ao controle (média vida de 43,6 minutos na mistura física e 34,7 minutos no preparado por formação de pasta) e não foi detectado nenhum efeito quando foram usadas RM- $\beta$ -CD e DM- $\beta$ -CD na relação molar 1:1. Também foi investigado o efeito da proporção fármaco:CD para  $\gamma$ -CD demonstrando que o incremento na proporção desta CD aumentou o efeito estabilizante (1:2 > 1:1 > 2:1). No caso da RM- $\beta$ -CD não foi detectado efeito estabilizante adicional nas relações molares 1:2 ou 2:1. Os autores concluem que a fotoestabilização observada quando foram usadas  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD para formar os complexos preparados por formação de pasta poderia estar relacionada com mudanças na opacidade durante a exposição, o qual poderia reduzir a transmissão de luz dentro do material e diminuir a velocidade de fotodegradação (GLASS et al., 2001).

Outro trabalho, o qual obtiveram os complexos usando secagem por atomização com  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD, determinou que a extensão da fotodegradação foi comparável com a mistura física nifedipina: HP- $\beta$ -CD (1:1), sugerindo mínima fotoproteção proporcionada por essas CDs (THOMA, 1996).

Estudos QSAR indicaram que a força motriz para a complexação da nifedipina, além da concentração da CD, são a hidrofobicidade e interações de Van der Waals (parâmetros de solubilidade 3D, área superficial hidrofílica e índice de conectividade diferencial) (AGATONOVIC-KUSTRIN et al., 2011).

No estado sólido, a furosemida degrada menos do 2 % em 2 horas de exposição à luz na presença de DM- $\beta$ -CD e TM- $\beta$ -CD, mas este valor aumenta aproximadamente até 12 % e 20 % na presença da  $\beta$ -CD e polímero  $\beta$ -CD, respectivamente.

A velocidade de fotodegradação e a natureza e distribuição dos produtos da reação podem ser alterados devido à complexação com CDs (BORTOLUS et al., 1993; TADANOBU et al., 1993; MIELCAREK, 1997). Um estudo desenvolvido utilizando RM- $\beta$ -CD para melhorar a solubilidade do midazolam, demonstrou um mecanismo de fotoreação em sequência altamente seletiva, devido ao controle conformacional sobre os reagentes (RAO; TURRO; RAMAMURTHY, 1986; REDDY; RAMAMURTHY, 1987). O "efeito caixa" da inclusão das moléculas na cavidade da CD gera um par de radicais que sofrem reação de condensação com outra molécula antes de ser capaz de difundir ao meio externo. Isto ocorre em menor medida na solução fora da cavidade devido à difusão mais rápida (REDDY et al., 1986).

#### - Volatilização

Vários estudos mostraram que as CDs podem incrementar a estabilidade física de diferentes tipos de compostos (fragrâncias) (BUSCHMANN; SCHOLLMEYER, 2002; CHEIRSILP; RAKMAI, 2017), pesticidas (SZENTE; SZEJTLI, 1981; SZENTE, 1998; BERGAMASCO; ZANIN; MORAES, 2005), poluentes orgânicos (FOURMENTIN et al., 2001; YEQIANG et al., 2016) e fármacos como a nitroglicerina (CENTKOWSKA; SZNITOWSKA, 2008), diminuindo significativamente sua volatilização seja por vaporização (linalol, alcanfor, mentol, timol) (CABRAL-MARQUES, 2010; CIOBANU et al., 2012; CIOBANU et al., 2013; NIEDDU et al., 2014) e/ou sublimação (naproxeno e ibuprofeno) (MAXWELL; CHICKOS, 2012), através da formação de complexos de inclusão.

#### - Liberação modificada de fármacos

Em épocas mais recentes as CDs também tem sido utilizadas tanto na liberação controlada como no "*targeting*". Assim estudos demonstraram que CDs podem associar-se com folato ou subunidades (Figura 7), mantendo a capacidade de formar complexo de inclusão, o qual possibilita o direcionamento do fármaco a tecido/órgão alvo (CEBORSKA, 2017; CEBORSKA et al., 2018), por exemplo no estudo da formação do complexo doxorubicina- ácido fólico-c2- $\beta$ -CD, utilizando como espaçador duas moléculas de ácido capróico entre o agente de *targeting* e a CD. A alternativa contribuiu para incrementar a atividade antitumoral "*in vitro*" e "*in vivo*" utilizando um método de preparação relativamente simples (OKAMATSU et al., 2013; MIZUSAKO et al., 2015).

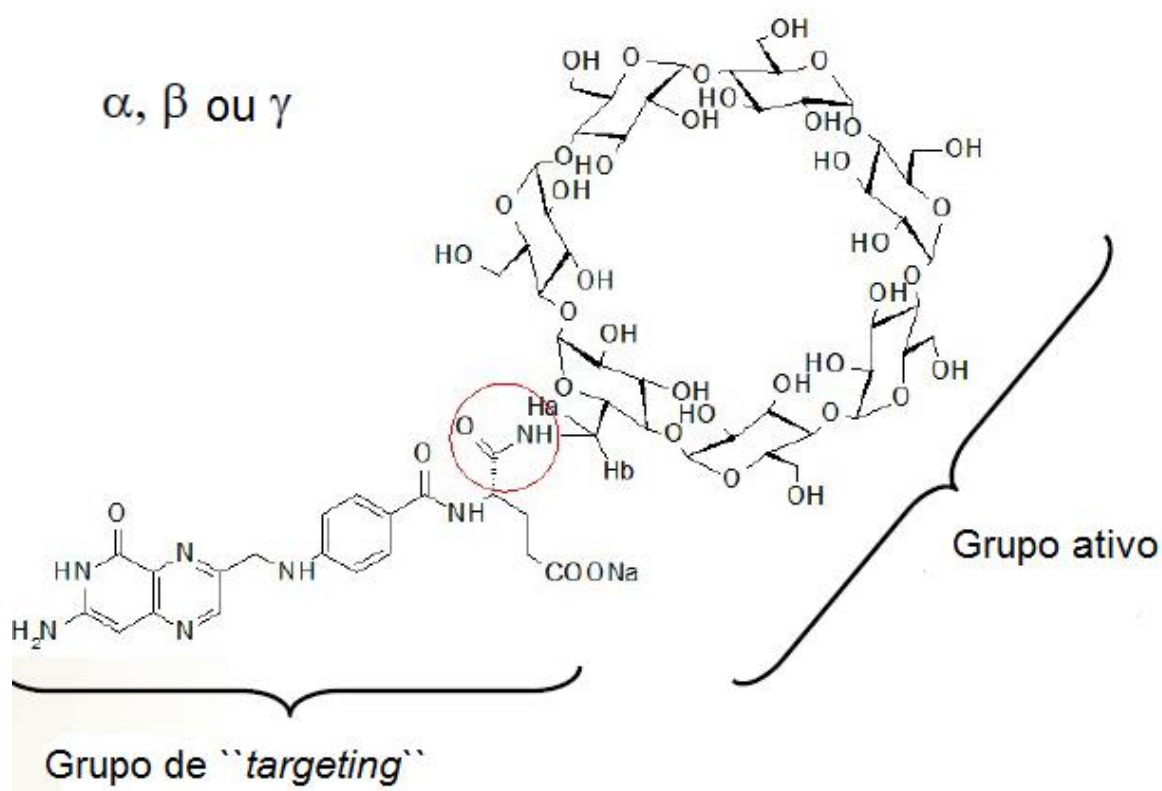


**Figura 7.** Estrutura química da associação ciclodextrina-folato para vectorização de fármacos (PUSKÁS; MALANGA, 2017).

Também a formação dos sistemas fármaco-em-CD-em-lipossomas tem sido uma alternativa útil na liberação de fármacos lipofílicos, considerando que quando estes últimos são incorporados na forma livre no lipossoma, se depositam maioritariamente na bicamada lipídica lipossomal, sendo liberados de forma rápida, limitando assim a efetividade na liberação prolongada. Já a incorporação do complexo de inclusão do fármaco no compartimento aquoso do lipossoma constitui uma alternativa para solucionar essa limitação (GHARIB et al., 2015). Um estudo utilizando flurbiprofeno formando complexo de inclusão com  $\beta$ -CD, HP- $\beta$ -CD e SBE- $\beta$ -CD e incorporados posteriormente em lipossomas melhorou a

biodisponibilidade do fármaco pouco solúvel, com os melhores resultados para o complexo flurbiprofeno/HP- $\beta$ -CD (ZHANG et al., 2015).

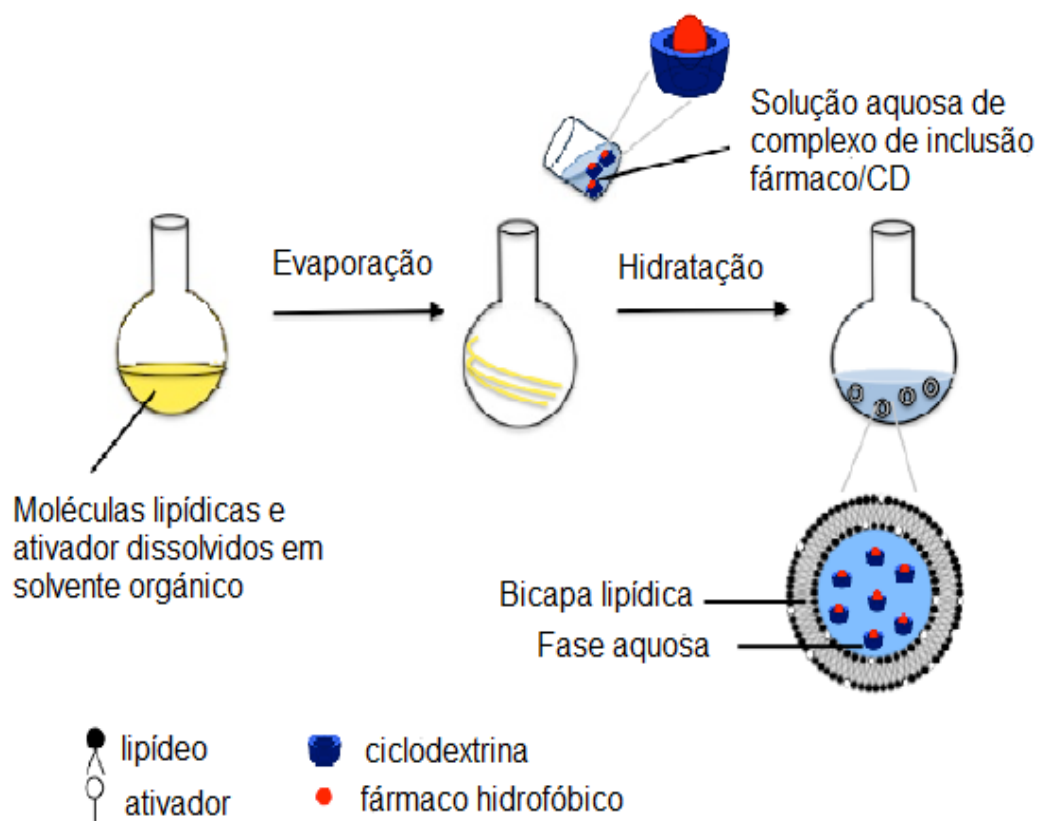


**Figura 8.** Esquema da metodologia de preparação de lipossomas contendo complexos de inclusão de fármaco em ciclodextrinas pelo método de hidratação de filme (GHARIB et al., 2015).

Este tipo de sistema também foi utilizado com sucesso no incremento da encapsulação, estabilidade, fotoproteção e retenção da substância volátil anetol em complexo de inclusão com HP- $\beta$ -CD (GHARIB et al., 2017).

Um polipseudorotaxano utilizando  $\gamma$ -CD e lipossomas pegilados foi avaliado com sucesso na liberação prolongada de doxorubicina (HAYASHIDA et al., 2014).

Outro tipo de sistema avaliado tem resultado da combinação de complexos de inclusão com cristais líquidos. Um estudo demonstrou que a liberação da diosgenina, sua biodisponibilidade e distribuição na pele, melhorou quando seu complexo com  $\beta$ -CD foi incorporado ao cristal líquido constituído por uma dispersão de mono-oleato de glicerila e fitantriol, em água (OKAWARA et al., 2014).

Materiais poliméricos biodegradáveis de associação espontânea que mimetizam os proteoglicanos são sintetizados por um método simples de uma etapa e escalonável, a partir de complexos de inclusão de tensoativos catiônicos com  $\gamma$ -CD e o polímero natural polianiónico ácido hialurônico. Estas matrizes supramoleculares foram carregadas com substâncias hidrofílicas (albumina bovina sérica) e lipofílicas (curcumina, cetotifeno) para avaliar sua liberação em condições fisiológicas. Os sistemas foram totalmente biodegradados e os fármacos liberados de forma prolongada, pelo qual são considerados alternativa viável em formulações tópicas, implantes ou injeções depot (SZENTE et al., 2014). Outro estudo, baseado na formação da associação supramolecular biocompatível entre o ácido hialurônico (aniônico), o polímero catiônico poli-L-lisina e o oligossacarídeo aniônico SBE- $\beta$ -CD contendo os fármacos inibidores da transcriptasa reversa zidovudina e lamivudina, mostrou atividade antirretroviral potente e permitiu a liberação sustentada dos fármacos, o qual facilitaria a adesão ao tratamento antirretroviral por parte dos indivíduos que padecem de infecção por HIV (SONG et al., 2016).

#### *2.2.7. Efeitos sobre a segurança de fármacos*

O incremento na efetividade das CDs na maioria dos casos deve-se à diminuição da dose terapêutica de fármacos como consequência do incremento na solubilidade e biodisponibilidade. Por outra parte, a formação de complexo a nível

molecular previne o contato direto do fármaco com as estruturas biológicas, contribuindo com a redução de efeitos indesejáveis. Numerosos fármacos melhoraram seu perfil toxicológico por inclusão em CDs (HANUMEGOWDA; WU; ADAMS, 2014). A inclusão de 2-etil-hexil-p-dimetilaminobenzoato diminuiu a irritabilidade da substância por redução do contato com a pele (SCALIA; VILLANI; CASOLARI, 1999). B-CD melhorou a atividade antiviral do ganciclovir em linhagens celulares de citomegalovírus e o resultante incremento da potência do fármaco reduziu a toxicidade (NICOLAZZI et al., 2002). Também a SBE- $\beta$ -CD inibiu a citotoxicidade do composto DY-9760e em células endoteliais das veias de cordão umbilical e suprimiu o dano vascular induzido pelo fármaco em coelhos (NAGASE et al., 2003). Um estudo de toxicidade aguda do líquido iônico imiscível 1-dodecil-3-metilimidazolio tetrafluorborato (DMIM-BF<sub>4</sub>) em complexo com  $\beta$ -CD em modelo animal de *Danio rerio* mostrou incremento do valor de DL<sub>50</sub> (redução da toxicidade), ampliando sua potencialidade de aplicação (HODYNA et al., 2016).

HP- $\beta$ -CD teve influência significativa na viabilidade celular da linhagem SH-SY5Y (neuroblastoma humano) quando o complexo de inclusão com A $\beta$  (proteína  $\beta$ -amiloide com defeito no enovelamento, marca patológica da doença de Alzheimer) foi avaliado no ensaio de MTT. O estudo mostrou viabilidade celular de quase 99 % nos controles com HP- $\beta$ -CD, A $\beta$  altamente citotóxica, e as misturas A $\beta$ - HP- $\beta$ -CD 1:1, 1:2 e 1:5 com 74%, 93% e 82 % de viabilidade durante as 24 h de incubação. Nas maiores relações molares 1:5 e 1:10, a HP- $\beta$ -CD tem tendência à agregação espontânea, o qual pode bloquear os sítios ativos de interação com A $\beta$  (REN et al., 2016).

A toxicidade ocular “*in vitro*” e “*in vivo*” de diclofenaco de sódio foi reduzida por formação de complexos com HP- $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD, sendo os complexos com  $\alpha$ - e

$\beta$ -CD menos efetivos na redução da toxicidade, resultantes de sua habilidade para extrair colesterol e outros componentes lipídicos das membranas da córnea (ABDELKADER et al., 2018<sup>a</sup>).

Descobertas em 1891, caracterizadas na primeira metade do passado século e disponibilizadas como compostos altamente puros nos últimos 40 anos, as CDs tem resultado em importante alternativa na melhora da biodisponibilidade e estabilidade de numerosos fármacos devido a sua capacidade de formação de complexos de inclusão, porém, é conhecido atualmente a possibilidade de outros tipos de associações intermoleculares. Ainda quando algumas CDs tem restrições quanto à via de administração, estes excipientes oferecem novas alternativas como a formação de agregados em combinação com outros excipientes e inclusão em sistemas dispersos coloidais sintonizáveis de liberação de fármacos e sínteses de novos derivados para vetorização a sitio específico.

Há mais de 100 anos após o descobrimento, as CDs são ainda consideradas como excipientes noveles com possibilidades ainda inexploradas.

## **2.3. Micropartículas**

### *2.3.1. Definição e características gerais.*

Micropartículas são partículas de diâmetro maior que 1  $\mu\text{m}$ . O termo microcápsula é referido a aquelas micropartículas em que o material de cobertura rodeia o material encapsulado, conformando uma parede ou cápsula. As micropartículas em que o material a encapsular está disperso aleatória ou

homogeneamente dentro de uma matriz, com alta tendência a esfericidade, são conhecidas como microesferas (LU; PARK, 2012).

Alguns autores classificam como macrocápsulas aquelas partículas com diâmetros maiores de 1000  $\mu\text{m}$ . Uma ampla variedade de substâncias pode ser encapsulada, incluindo agroquímicos, enzimas, fragrâncias, células, tintas e ativos farmacêuticos. A maioria dos materiais de cobertura são polímeros orgânicos, mas também lipídeos e ceras podem ser usadas (LU; PARK, 2012).

As micropartículas podem apresentar diversas estruturas. Algumas são esféricas com uma região contínua do material de cobertura. Outras apresentam geometria irregular e contém um número determinado de gotículas ou partículas de material encapsulado no interior (Figura 9).

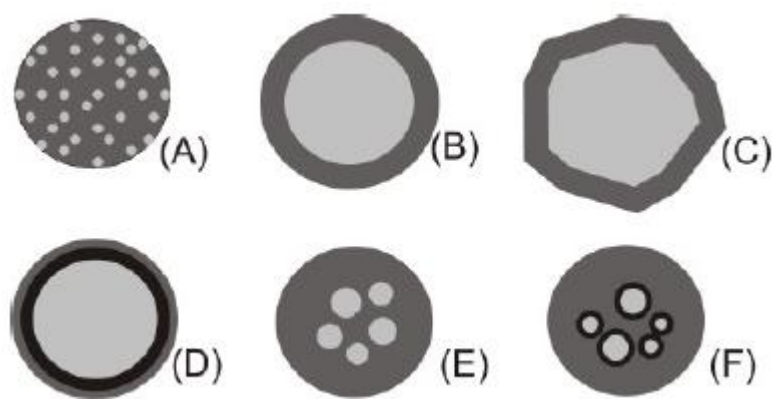


**Figura 9.** Estruturas típicas das micropartículas: (A): Sistema matricial (microesfera); (B) Microcápsula esférica com núcleo simples; (C): Microcápsula irregular; (D): Microcápsula de dupla parede; (E): Microcápsula multinucleada; (F): Microcápsulas encapsuladas. (AZEREDO, 2008).

### 2.3.2. Principais aplicações

A microencapsulação constitui uma estratégia útil para resolver problemas de estabilidade de fármacos, tanto “*in vitro*” quanto “*in vivo*”, ou para prevenir interações fármaco/excipientes não desejadas na formulação. Dependendo das propriedades do polímero e das condições de microencapsulação, estes sistemas podem estender a vida útil de vários ativos devido à proteção frente a condições ambientais como umidade, oxigênio, luz e temperatura durante o processamento e estocagem (ABBAS et al., 2012). Assim, a fotoestabilidade de amlodipina (RAGNO et al., 2003), nifedipina (DINARVAND et al., 2006), etilhexilmetoxicinamato (GOGNA et al., 2007), ubiquinona-10 (BULE; SINGHAL; KENNEDY, 2010), pantoprazol sódico (DHURKE; KUSHWAHA; DESAI, 2013), ranitidina HCl (PRAKASH et al., 2013), avobenzona (CABRERA et al., 2014) e curcumina (PECORA et al., 2016) foi incrementada por formação de micropartículas. Também podem proteger substâncias altamente sensíveis como peptídeos, proteínas e células frente à degradação enzimática e resposta imune após administração (HERNÁNDEZ et al., 2010; SERRA et al., 2011).

A volatilização de várias substâncias como norfluorazon e alaclor (SOPEÑA et al., 2007), salicilato de metila (BANSODE et al., 2010), óleo de menta (ZHU et al., 2010) foi diminuída e a estabilidade térmica do aldeído cinâmico incrementada (SONG et al., 2018), utilizando microencapsulação.

Redução da toxicidade e irritabilidade gástrica do sulfato ferroso e cloreto de potássio foi verificada quando estes foram microencapsulados (BANSODE et al., 2010).

Adicionalmente, a microencapsulação apresenta uma solução na manipulação de substâncias higroscópicas, materiais que liberam grandes quantidades de pó e para pós com baixa fluidez (DESAI; JIN PARK, 2005).

Outra das aplicações das micropartículas é no mascaramento do sabor desagradável de alguns fármacos, usualmente incorporadas em suspensões ou comprimidos como forma final de administração (MALIK; ARORA; SINGH, 2011; KHOR et al., 2017). A microencapsulação de líquidos aderentes ou viscosos em sólidos, permite melhorar a incorporação destes nos processos de preenchimento, mistura e compressão (BURGESS; HICKEY, 2007).

Uma das principais razões da microencapsulação é conseguir liberação modificada, em muitos casos sustentada, de fármacos, visando reduzir a frequência de administração, especialmente conveniente para fármacos de meia-vida plasmática curta, ou reduzir oscilação nas concentrações plasmáticas, minimizando efeitos colaterais (KRAJIŠNIK; ČALIJA; CEKIĆ, 2017).

### *2.3.3. Métodos de obtenção*

Existem vários métodos que se utilizam na produção de micropartículas. Pela importância que teve no presente trabalho, o método de microencapsulação por formação de emulsão/evaporação do solvente será mais amplamente comentado. Os restantes métodos são apresentados no quadro 3.

#### *- Formação de emulsão/evaporação do solvente*

É um método muito comum na produção de micropartículas, onde dois ou mais líquidos imiscíveis são dispersos, um no interior do outro, na forma de gotículas. Entre os mais usados estão solventes orgânicos voláteis como

componentes da fase dispersa e água contendo um tensoativo apropriado como fase contínua. No caso de fármacos hidrofóbicos, estes podem ser dissolvidos junto com o polímero de cobertura em solvente orgânico comum, como cloreto de metileno ou diclorometano, e emulsificados em uma solução aquosa de tensoativo polimérico, como álcool polivinílico, para produzir uma emulsão óleo em água (O/A) (AKASH et al., 2013). O procedimento também pode ser adaptado para encapsular fármacos hidrofílicos, o qual deve ser dissolvido em água (fase dispersa) e emulsificada com uma fase orgânica contínua que contém o polímero formador da cobertura, produzindo uma emulsão primária tipo água em óleo (A/O). Esta é posteriormente emulsificada com uma fase externa aquosa, dando lugar a uma emulsão do tipo água-óleo- água (A/O/A) (LIU et al., 2016). Outros tipos de emulsões podem ser obtidas: óleo em óleo (O/O) e múltiplas como A/O/O, O/A/O, entre outras. Estas últimas tem como objetivo proteger fármacos altamente idrossolúveis da partição na interfase O/A, causando perdas de fármaco e baixos valores de eficiência de encapsulação. Para todos os tipos de emulsões, o procedimento de emulsificação é seguido da eliminação do solvente, dando lugar ao sistema sólido. Dependendo do método de solidificação, o método poderá ser classificado como evaporação do solvente, extração do solvente ou reticulação (YE; KIM; PARK, 2010).

Na evaporação do solvente, este é eliminado em duas etapas: primeiro o solvente difunde através da fase dispersa até a fase contínua e segundo, o solvente é eliminado na interfase (fase contínua-ar). Para facilitar esta última etapa, pode-se aquecer o sistema. Teoricamente, se o solvente é totalmente extraído das micropartículas para a fase contínua, então a etapa de evaporação não é necessária. Na prática, utilizando uma relação de volume suficientemente grande

entre fase contínua e fase dispersa ou utilizando um cosolvente apropriado de elevada afinidade pela fase contínua, o solvente orgânico pode ser extraído das micropartículas completamente (LU; PARK, 2012).

O terceiro tipo de método de emulsificação requer o processo de reticulação, que é usado para favorecer a solidificação quando polímeros hidrofílicos são usados (gelatina, albumina, dextrana, quitosana, entre outros). A reticulação pode ser promovida por calor, adição de contraíons ou agentes reticulantes específicos (LU; PARK, 2012).

Vários trabalhos tem estudado a influência de diferentes parâmetros nas emulsões e no produto final: as micropartículas. Entre eles, alguns parâmetros físicos como: configuração do aparelho, velocidade de agitação, relação volumétrica entre fase contínua e fase dispersa e relação de massas entre material a encapsular e material de cobertura. Parâmetros físico-químicos como: tensão interfacial, viscosidade e densidade das fases dispersa e contínua, parâmetros químicos como: tipo de polímero, propriedades do fármaco, tensoativo e solvente. A otimização destes parâmetros é específica do material, por exemplo para diferentes sistemas fármaco-polímero os valores dos parâmetros podem diferir (FREITAS; MERKLE; GANDER, 2005; MATEOVIĆ-ROJNIK et al., 2005; JYOTHI et al., 2010).

### Quadro 3. Métodos de microencapsulação

| Método                                              | Características                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Referencias                                                                                                       |
|-----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><i>Coacervação – Separação de Fases.</i></p>     | <p>Envolve de-solvatação parcial do polímero da solução polimérica.</p> <p>Pode ser simples (um polímero) ou complexa (dois polímeros).</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | <p>(SHIMOKAWA et al., 2013).</p> <p>(BUTSTRAEN; SALAÜN, 2014).</p>                                                |
| <p><i>Secagem por atomização (Spray Drying)</i></p> | <p>O material a encapsular é disperso na solução concentrada do material de cobertura. A mistura é atomizada na câmara de secagem quente que contém um gás que contribui a eliminar o solvente rapidamente para produzir as micropartículas.</p>                                                                                                                                                                                                                                                             | <p>(FATNASSI et al., 2014)</p> <p>(JYOTHI et al., 2010)</p> <p>(ZHANG et al., 2014)</p>                           |
| <p><i>Fluidos supercríticos</i></p>                 | <p>A capacidade de solvatação destes fluidos pode ser alterada com a temperatura e a pressão.</p> <p>A obtenção do produto microencapsulado pode-se efetuar em uma etapa que consta de dois processos principais: (1) solvatação do ingrediente ativo pelo fluido na rápida expansão da solução supercrítica e (2) precipitação do composto pelo fluido supercrítico no processo de cristalização supercrítica anti-solvente</p>                                                                             | <p>(COCERO et al., 2009).</p> <p>(GIROTRA; SINGH; NAGPAL, 2013)</p>                                               |
| <p><i>Electrospraying</i></p>                       | <p>Baseado na habilidade do campo elétrico para deformar a interfase de uma gota de líquido. A carga elétrica gera uma força eletrostática dentro da gota (força de Coulomb) que compete com a força coesiva intrínseca da gota e quando esta última é superada pela primeira, faz quebrar a gota em pequenas gotículas na escala micro ou nano.</p> <p>Vários parâmetros podem influir no produto final: Viscosidade, voltagem, calibre da agulha, distância do coletor, velocidade de fluxo, solvente,</p> | <p>(ALMERÍA et al., 2010).</p> <p>(BOCK et al., 2011).</p> <p>(ZHOU et al., 2016).</p> <p>(BARRON; HE, 2017).</p> |

|                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                            |
|----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                          | surfactantes, tipo de polímero, etc., pelo qual a otimização do processo resulta altamente complexa.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                            |
| <i>Gelificação ionotrópica</i>                           | Baseado na capacidade de polieletrólitos de reticular na presença de íons de carga contrária para formar hidrogéis. Os grânulos de hidrogel são produzidos por gotejamento de uma solução polimérica contendo fármaco em uma solução aquosa de cátions polivalentes. Os cátions difundem nas gotas, formando uma rede tridimensional reticulada.                                                                                | (PATEL; PATEL; PATEL, 2010).<br><br>(PATIL et al., 2010).<br><br>(UPPALA et al., 2013).<br><br>(PREZOTTI; CURY; EVANGELISTA, 2014).<br><br>(GIRI, 2016).<br><br>(ABDELKADER et al., 2018). |
| <i>Revestimento por atomização (Em tambor)</i>           | As partículas ficam em movimento dentro de um sistema com desenho específico enquanto a solução de revestimento é atomizada na superfície das partículas. As micropartículas formadas são secas por evaporação do solvente da solução de revestimento ou por esfriamento.                                                                                                                                                       | (JAMEKHORSHID; SADRAMELI; FARID, 2014).                                                                                                                                                    |
| <i>Revestimento por atomização (Em leito fluidizado)</i> | O sistema mantém as partículas sólidas suspensas numa corrente de ar. A posição do atomizador no aparelho pode variar (superior, tangencial ou inferior). Podem ser desenvolvidos vários ciclos de atomização-secagem até conseguir a espessura do revestimento desejada.<br><br>Vários fatores relacionados com o aparelho (fluxo de gás, distância do atomizador ao leito, número de atomizadores, velocidade de atomização e | (DEASY, 1991).<br>(GUIGNON; DUQUENOY; DUMOULIN, 2002).<br><br>(SEMYONOV et al., 2012).                                                                                                     |

|                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                  |
|-------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
|                                           | temperatura) assim como parâmetros físico químicos como a viscosidade da solução de revestimento e densidade do material podem influir na qualidade do revestimento.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                  |
| <i>Extrusão centrífuga</i>                | Dois líquidos imiscíveis são bombeados dentro de um eixo atomizador para dois fluidos. O líquido a encapsular é alimentado ao canal central enquanto o líquido de revestimento é colocado no canal de alimentação lateral. Quando a coluna com os dois líquidos emerge do atomizador, esta espontaneamente se quebra produzindo uma corrente de pequenas gotículas contendo material líquido a encapsular no interior, rodeadas de material de revestimento. Este último solidifica por resfriamento rápido quando as gotículas saem do atomizador ou alternativamente, por resfriamento em banho gelado. | (LU; PARK, 2012).<br><br>(JAMEKHORSHID; SADRAMELI; FARID, 2014). |
| <i>Separação por suspensão rotacional</i> | O material a encapsular é disperso em uma formulação líquida de revestimento e a dispersão é transportada até um disco rotatório. As micropartículas individuais resultantes são expulsadas do disco rotatório e resfriadas rapidamente para favorecer a solidificação da cobertura.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | (LU; PARK, 2012).<br>(TOMARO-DUCHESNEAU et al., 2013).           |
| <i>Polimerização interfacial</i>          | A cápsula é formada devido a uma reação de polimerização de monômeros que reagem na interface entre o material de revestimento e o material a encapsular. Pode ser usada para encapsular substâncias miscíveis ou imiscíveis com água.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | (BERCHANE; JEBRAIL; ANDREWS, 2010)<br>(PERIGNON et al., 2015).   |
| <i>Polimerização in situ</i>              | Não são incorporados reagentes de polimerização na fase que contém o material a encapsular. A reação ocorre exclusivamente na parte da interface da fase contínua. Quando o polímero começa a                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | (JYOTHI et al., 2010)                                            |

formar, este vái depositando na superfície do material a encapsular, onde a reação de reticulação tem lugar, formando uma cápsula sólida.

#### 2.3.4. Etilcelulose (EC)

É um polissacarídeo linear derivado semi-sintético da celulose, com amplo uso em alimentos, cosméticos e indústria farmacêutica. Nesta última, é particularmente usada devido a suas propriedades de baixa toxicidade (sendo um dos poucos polímeros organossolúvel/insolúvel em água que conta com aprovação da FDA para uso interno), bom formador de filme, com favorável resistência mecânica, termoplasticidade e relativamente baixo custo. É utilizado como excipiente em comprimidos obtidos por compressão direta (YU et al., 2007; GUERRA-PONCE et al., 2016), na obtenção de dispersões utilizando a técnica de extrusão/ fusão à quente (REPKA et al., 2008; FENG et al., 2016) e na formação de micropartículas para estabilização de fármacos frente a interações, hidrólise e oxidação (PRASERTMANAKIT et al., 2009; WALKER, 2012) e para conseguir liberação controlada em micro (ARICI et al., 2014; PARIDA et al., 2016; WAGH; MUJUMDAR; NAIK, 2018) e nanopartículas (LOKHANDE et al., 2013).

A obtenção da EC ocorre por dissolução alcalina da celulose, com objetivo de quebrar sua estrutura supramolecular, com posterior adição de cloroetano (ATALLA; ISOGAI, 2005), para substituir os grupos hidroxila por grupos etila terminais. A estrutura química da EC consiste em cadeias de unidades de anidroglicose unidas por pontes de oxigênio (Figura 10). Nos materiais mais comuns, o grau de substituição dos grupos etóxi varia entre 43 e 50 %. As

propriedades físicas da EC são influenciadas pelo grau de polimerização da cadeia principal assim como pelas propriedades da cadeia lateral, incluindo o grau de substituição e a distribuição dos substituintes na cadeia polimérica e entre as posições dos carbonos C(2), C(3) e C(6) das unidades de anidroglicose. O alongamento, a flexibilidade e em menor medida, a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), diminuem drasticamente com incremento da etoxilação e a dureza e absorção de umidade diminuem quando o conteúdo de etóxi incrementa acima de 43-51% (DAVIDOVICH-PINHAS; BARBUT; MARANGONI, 2014).

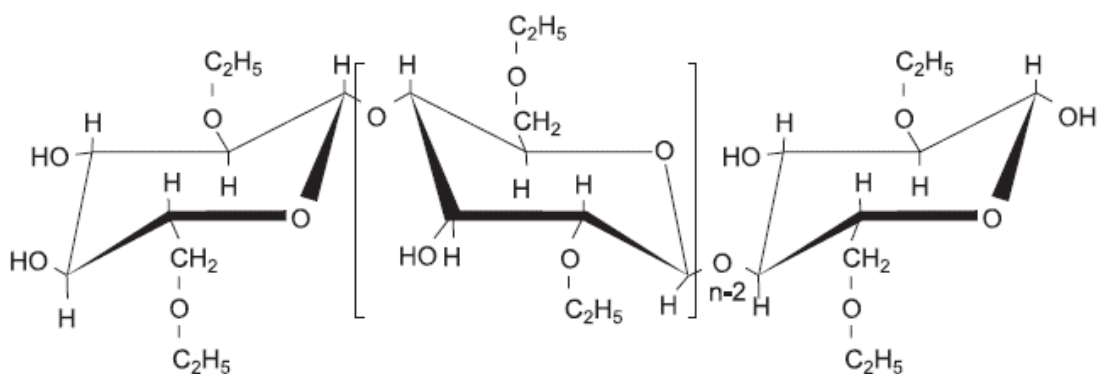


**Figura 10.** Estrutura química da etilcelulose. (MURTAZA, 2012).

EC é um material altamente amorfo, porém apresenta reconhecidas propriedades de líquidos cristalinos liotrópicos. Este polímero é um forte formador de cristal, pelo qual a variação da capacidade calorífica na  $T_g$  é relativamente sutil, resultando difícil sua detecção (HYPPÖLÄ; HUSSON; SUNDHOLM, 1996), mas existe consenso geral que está em torno de 130 °C dependendo da massa molar e do grau de substituição. Alguns trabalhos que estudaram a influência da razão de aquecimento (2, 5 e 10 °C/min) mostraram que há influência mínima sobre o valor

da  $T_g$  (LAI; PITT; CRAIG, 2010). A mobilidade molecular incrementa a partir dos 60-70 °C, com máxima energia de dissipação em 131,5 °C. Também é conhecido que existe uma transição complexa do material acima dos 180 °C que pode-se manifestar como uma combinação de respostas endo e exotérmicas, que alguns autores associam à oxidação do polímero (DUBERNET; ROULAND; BENOIT, 1990). Trabalhos posteriores demonstraram o impacto da razão de aquecimento na temperatura de início da transição assim como da presença de oxigênio proveniente do ar comprimido quando usado como gás transportador usando TGA como técnica de análise. Os autores sugerem a formação de peróxido nos grupos éter como reação primária e logo depois sua decomposição com remoção dos correspondentes aldeídos, álcoois, alquil hidroperóxidos e outros produtos derivados da decomposição (reações secundárias) (LAI; PITT; CRAIG, 2010).

Levando em conta as amplas possibilidades que oferece a microencapsulação na melhora da estabilidade química e física de numerosas substâncias e ausência de estudos anteriores relativos à utilização de etilcelulose na proteção do derivado furânico, consideramos esta metodologia de interesse para ser avaliada no presente trabalho.

### 3. Objetivos

#### Objetivo geral

Avaliar os complexos de inclusão com ciclodextrinas e micropartículas poliméricas como alternativas tecnológicas que contribuam para a estabilização do 2-(2-nitrovinil) furano e que permitam sua incorporação em formas farmacêuticas estáveis e adequadas para uso humano e/ou veterinário.

#### Objetivos específicos

1. Desenvolver estudos de estabilidade acelerada dos complexos de inclusão liofilizados de G-0 com HP- $\beta$ -CD e SBE- $\beta$ -CD.
2. Avaliar a fotoestabilidade do G-0 na forma de complexos de inclusão com HP- $\beta$ -CD e SBE- $\beta$ -CD no estado sólido, através de métodos de irradiação forçada e em câmara climática.
3. Avaliar a volatilização do fármaco na forma de complexos de inclusão utilizando métodos de análise térmica e cromatográfica.
4. Desenvolver estudos de liberação *in vitro* e de permeabilidade em mucosa vaginal.
5. Avaliar a influência da formação dos complexos de inclusão nas propriedades biológicas do G-0 através do ensaio de susceptibilidade *in vitro* frente à *Candida spp* e da citotoxicidade através do ensaio de viabilidade de queratinócitos e fibroblastos.
6. Desenvolver sistemas de micropartículas poliméricas com G-0 incorporado.

7. Caracterizar os sistemas poliméricos através de métodos de análise térmica e espectroscópica, difratometria de raios X de pó e microscopia eletrônica de varredura.
8. Avaliar a influência da incorporação de G-0 nas micropartículas na fotoestabilidade, volatilização, liberação e estabilidade acelerada da substância ativa.

## 4. Material e métodos

### 4.1. Complexos de inclusão com ciclodextrinas

#### 4.1.1. Preparação dos complexos por liofilização

O método de obtenção dos complexos por liofilização foi desenvolvido anteriormente (RUZ et al., 2012). Preparou-se uma solução saturada da CD, HP- $\beta$ -CD (Trappsol<sup>®</sup>, qualidade farmacêutica, CTD, Inc., Estados Unidos de América) ou SBE- $\beta$ -CD (Captisol<sup>®</sup>, para pesquisa, CyDex Pharmaceuticals Inc., Estados Unidos de América), em 50 mL de água deionizada. Adicionou-se uma quantidade de G-0 (Lote 15-1-6, Centro de Bioativos Químicos, Santa Clara, Cuba) em relação equimolar com a CD na solução anterior e a suspensão resultante colocou-se em agitador horizontal (34 rpm) a  $21 \pm 1$  °C, durante 48 h, até atingir o equilíbrio de solubilidade. Após esse tempo, filtrou-se a vácuo (PES 0,22  $\mu$ m, Millipore<sup>®</sup>) e da solução resultante dispensou-se volumes de 1 mL em vials de vidro. As amostras foram congeladas a -40 °C e liofilizadas (Liofilizadora JJCientifica<sup>®</sup>, SP, Brazil) durante 24 horas a -30 °C sob vácuo a pressão de 150 mmHg.

#### 4.1.2. Quantificação do teor de G-0 nos complexos mediante Cromatografia Líquida de alta eficiência (CLAE).

##### - Preparação das amostras

A cada vial contendo o liofilizado, adicionou-se 1 mL de água deionizada e agitou-se por aproximadamente 1 min até obtenção de uma solução amarela transparente. Uma alíquota de 20  $\mu$ L foi transferida para balão volumétrico âmbar de 10 mL. Completou-se o volume com a fase móvel acetonitrila: água (80:20, v/v) e a solução foi filtrada (PTFE 0,45  $\mu$ m, Chromafil<sup>®</sup>) para injetar no cromatógrafo.

#### *- Condições cromatográficas*

Utilizou-se cromatógrafo Agilent Technologies 1220, equipado com detector DAD 1220 Infinity, injetor automático e bomba de gradiente quaternário. Uma coluna Agilent Zorbax® ODS (250 x 4,6 mm, 5 µm) foi utilizada para separação cromatográfica em fase reversa, e uma pré-coluna Agilent Zorbax® ODS (12,5 x 4,6 mm, 5 µm). A fase móvel foi constituída por acetonitrila: água (80:20, v/v), o fluxo foi de 0,5 mL/min e a separação foi desenvolvida a 25 °C. O volume de injeção foi 20 µL, o comprimento de onda de detecção de 351 nm e o tempo de análise de 15 min. Preparou-se uma curva de calibração com amostra de referência, na faixa de concentrações entre 3 e 15 µg.mL<sup>-1</sup> para desenvolver a quantificação.

#### *4.1.3. Fotoestabilidade*

##### *4.1.3.1. Condições de Irradiação das amostras*

#### *- Câmara UV ( $\lambda$ = 254 nm)*

Para a irradiação dos complexos no estado sólido, o conteúdo de cada vial foi distribuído uniformemente em placa de Petri de vidro transparente, aberto ( $n=3$ ) resultando uma camada de aproximadamente 1 mm de espessura. As amostras foram colocadas sob uma lâmpada UV Modelo SM 808 (Zhejiang, China), que emite radiação a 254 nm, colocada em posição horizontal dentro de uma câmara espelhada e completamente fechada para evitar influência de radiação externa. As amostras foram colocadas a uma distância de 10 cm da fonte de luz. Com objetivo de descartar possíveis efeitos térmicos, também foram monitorados controles escuros. A câmara foi disposta em um local com temperatura controlada de  $20 \pm 1$  °C e colocou-se sílica gel ativada no interior para evitar absorção da umidade ambiente por parte das CDs. As amostras foram diariamente agitadas

manualmente para garantir a irradiação uniforme de luz. A amostragem foi realizada a cada 12-24 h até verificar 50 % de degradação. Misturas físicas equivalentes, preparadas com ambas as CDs, também foram utilizadas com fins comparativos.

- Câmara climática de fotoestabilidade

Com objetivo de comprovar o comportamento dos complexos sob a condição estabelecida pelas normativas ICH Q1B (ICH EXPERT WORKING GROUP, 1996), uma amostra foi colocada sob a influência da radiação luminosa utilizando uma câmara climática Mecalor Modelo EC/0.2/R-F (Mecalor Soluções em Engenharia Térmica Ltda., Brasil), que tem como fonte de luz uma lâmpada fluorescente fria (luz visível) e uma lâmpada UV (luz UVA) (Opção 2). A faixa de comprimento de onda da fonte de luz foi de 320 - 400 nm, com energia de emissão máxima de 350 - 370 nm. A amostra ficou exposta por um tempo não menor que 1,2 milhões de lux.horas integrados a uma energia de ultravioleta próxima de não menos que 200 watt horas/m<sup>2</sup>.e a temperatura da câmara foi controlada e estabelecida em 25 °C. A câmara consta de radiômetro e luxímetro integrados que medem a exposição da amostra a radiação UV (watts hora/m<sup>2</sup>) e visível (lux.hora) respectivamente.

*4.1.3.2. Preparação das amostras irradiadas para análise por CLAE.*

Determinou-se G-0 (em mistura física ou na forma de complexos com ciclodextrinas) e produtos de degradação, cada um em seu comprimento de onda de máxima absorção. Pesaram-se aproximadamente 10 mg de complexo ou de mistura física e dissolveram-se volumetricamente em 25 mL de fase móvel. Completou-se volume e as amostras foram filtradas (PTFE 0,45 µm, Chromafil®) para injeção de 20 µL no cromatógrafo.

Preparou-se uma curva de calibração com G-0 (amostra de referência) na faixa de concentração de 1 a 13  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para quantificação das amostras.

Para a detecção dos produtos de degradação utilizou-se o detector de arranjo de diodos (DAD), com registro de 1 espectro por segundo, resolução 1,2 nm e varredura de 200 a 400 nm.

#### *4.1.3.3. Isolamento e caracterização de produto de degradação*

##### *- Análise espectroscópica dos complexos sem degradar*

Primeiramente foram analisados os complexos íntegros (sem exposição à luz) para comprovar a ausência de produtos de degradação antes do estudo de fotodegradação.

Os complexos foram dissolvidos diretamente em 600  $\mu\text{L}$  de água deuterada, 99,9 % (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., USA) atingindo uma concentração final de 20 mM, colocados em tubos RMN de 5 mm e analisados utilizando um espectrômetro de RMN Ascend III 600 MHz (Bruker, Estados Unidos de América). Os espectros de ressonância de hidrogênio foram gerados no software TopSpin 3.5 e posteriormente integrados no MestReNova 6.0.

Adicionalmente os complexos foram dissolvidos em acetato de etila de qualidade cromatográfica (Panreac AppliChem ITW) com concentração final do composto aproximada de 1  $\text{mg.mL}^{-1}$  e filtradas, para serem analisados por CG-MS em cromatógrafo Agilent 7890B (Estados Unidos de América), equipado com auto injetor PAL RSI 85, forno para coluna e detector de massas Agilent 5977A. Para a separação foi utilizada uma coluna capilar DB-5, 30 m x 0,25 mm, espessura do filme de 0,25  $\mu\text{m}$ . Foi usado hélio como gás de arraste, com vazão de gás de 1  $\text{mL.min}^{-1}$ . Injetou-se 1  $\mu\text{L}$  de amostra no modo Split 1:100. A temperatura do injetor

foi fixada em 250 °C. A sequência de temperatura do forno foi 100 °C durante 3 min, 30 °C/min até 260 °C, espera 3 min. A detecção foi desenvolvida usando detector Quadrupolo Ion-Trap. A temperatura da fonte foi 250 °C e temperatura do quadrupolo 200 °C. A voltagem de ionização foi 70 eV, 2,9 varreduras/s, varredura entre 50-550 Da e resolução 0,1 m/z. Os cromatogramas e espectro de massas foram registrados utilizando o software Mass Hunter Work Station.

*- Análise dos complexos degradados*

*- Procedimento de Clean-up*

Um cartucho C18 Phenomenex (55 µm, 70 Å) foi previamente lavado com 5 mL de acetonitrila (JT Baker, qualidade cromatográfica) e seguidamente ativado com 5 mL de água deionizada (MilliQ). O conteúdo de dois vials expostos à luz foi dissolvido em 2 mL de água e aplicado no cartucho. Posteriormente a ciclodextrina foi eluída com 5 mL de água. Esta fração aquosa foi congelada para posterior análise. Os produtos retidos no cartucho (menos solúveis em água) foram eluídos usando 2 mL da mistura acetonitrila: água (80:20, v/v) e coletados (Fração 1). Adicionalmente, 2 mL da mistura de solventes foram adicionados no cartucho para retirar os resíduos de compostos que poderiam ter ficado retidos. O procedimento de "clean-up" foi desenvolvido sob pressão para agilizar a eluição. As frações foram armazenadas a -40 °C até a separação dos compostos e posterior análise espectroscópica.

*- Separação dos produtos de degradação em coluna analítica por CLAE*

A fração 1 foi filtrada utilizando membrana (PTFE 0,45 µm, Chromafil®) e processada usando um cromatógrafo de líquidos (Shimadzu LC-10AD, Japão), equipado com bomba de gradiente quaternário, interface, injetor automático e detector DAD. Para a separação foi utilizada uma coluna cromatográfica Agilent Technologies com fase estacionária C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) e pré-coluna Agilent Technologies C18 (12,5 mm x 4,6 mm, 5 µm). A fase móvel foi composta por acetonitrila: água (80:20, v/v), fluxo 0.5 mL/min, tempo de corrida 15 min e volume de injeção 50 µL. A análise foi desenvolvida a 25 °C. A coleta dos compostos foi baseada nos tempos de retenção e comprimento de onda de máxima absorção, com "cut-off" de 1000 mUA. Após a coleta em tubos Eppendorf, as amostras foram submetidas à secagem com insuflação de nitrogênio, reconstituídas com pequena quantidade de acetonitrila-d<sub>3</sub>, 99,8 atom %D (Sigma-Aldrich, Alemanha), juntadas as coletas referentes a cada pico para garantir uma massa suficiente que permitisse a detecção e transferidas a tubos de RMN de 5 mm para posterior análise por RMN.

*- Análise do fotoproduto maioritário (PD1) por Ressonância Magnética Nuclear*

Todos os experimentos foram executados em espectrômetro Bruker Avance III HD de 600 MHz (Bruker, Estados Unidos de América) utilizando sonda criogênica de 5 mm, a 298 K. Acetonitrila deuterada (CD<sub>3</sub>CN, 99,8 atom % D, Sigma-Aldrich, Brazil) foi usada como solvente e como referência interna.

Para o experimento de hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H), os parâmetros de aquisição principais foram: Sequência de pulso noesypr1d (denominação Bruker), tempo de aquisição 3 s, tempo de relaxação e também para desacoplar o sinal de água

contida no solvente (d1) 3 s, tempo de pré-saturação do sinal entre os pulsos (d8) de 0,3 s, número de promediações (ns) 8 e número de pontos no domínio temporal (TD) 64K.

Para o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  foram utilizados os parâmetros de aquisição: sequência de pulsos zgpg30 (denominação Bruker), tempo de relaxação (d1) de 0,1 s, número de pontos no domínio temporal (TD) de 32 K, número de promediações (ns) de 69 K e utilizou-se uma função exponencial (lb=3) para apodização do sinal.

Foram também desenvolvidos vários experimentos de análise bidimensional (RMN 2D). Para o experimento de Correlação Espectroscópica Homonuclear ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY) foram utilizados os parâmetros: sequência de pulso cosygpprqf (denominação Bruker), tempo de relaxação (d1) de 1 s, número de promediações (ns) 6, número de experimentos (TDF1) 175, número de pontos no domínio temporal (TDF2) 4 K e não foram usadas funções de apodização para processamento do espectro.

Também foi desenvolvido o análise de Correlação Heteronuclear de Quantum-Simples ( $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  HSQC) que utilizou uma sequência de pulso hsqcetgpprsisp2.2 (denominação Bruker), um tempo de relaxação (d1) de 1 s, número de promediações (ns) 8, número de experimentos (TDF1) de 256, número de pontos no domínio temporal (TDF2) de 4K e utilizadas as funções de apodização QSINE (SSB=3) em ambas as dimensões.

Adicionalmente foi desenvolvido o análise de Correlação Heteronuclear a Múltiplas Ligações ( $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  HMBC) os quais foram usados os parâmetros de aquisição: sequência de pulso hmbcgplpndqf (denominação Bruker), tempo de relaxação (d1) 1 s, número de promediações (ns) 64, número de experimentos

(TDF1) 178, número de pontos no domínio temporal (TDF2) 4 K, constante de longa distância (cnst13) 8 Hz e não foi usada nenhuma função de apodização no processamento do espectro.

Para a aquisição, processamento e visualização dos dados foi utilizado o software TopSpin 3.5 para Windows.

#### *4.1.4. Estabilidade acelerada dos complexos*

As amostras dos produtos liofilizados (em vials fechados) foram colocadas em câmara para estabilidade sob as condições ( $40 \pm 2^{\circ}\text{C}/75 \pm 5\% \text{ HR}$ ) estabelecidas pelas normativas ICH Q1A(R2) vigentes (ICH EXPERT WORKING GROUP, 2003). Para isto foi usada uma câmara climática Modelo CC 500-UR (TERRONI EQUIPAMENTOS CIENTÍFICOS LTDA., SC, Brasil). A amostragem foi realizada uma vez por mês durante 6 meses, sem reposição. Amostras controle armazenadas em geladeira ( $2-8^{\circ}\text{C}$ ), também foram analisadas. A análise foi desenvolvida em triplicata empregando o método CLAE anteriormente descrito.

As variáveis respostas foram: determinação do conteúdo de G-0 e presença de produto de degradação (se houver) através de método validado por CLAE-DAD; tempo de reconstituição e características organolépticas. O tempo de reconstituição foi determinado como parte da etapa inicial do preparo das amostras de complexos, por adição de 1 mL de água deionizada a cada vial, e com ajuda de um cronômetro era medido o tempo que demorava para complexo sólido formar solução transparente e translúcida.

O tratamento estatístico dos dados foi desenvolvido utilizando um análise de variância (ANOVA-One way) para determinar diferenças significativas entre o conteúdo de fármaco aos diferentes tempos e o teste de "t" de Student para

comparar diferenças significativas entre amostras armazenadas em duas condições (geladeira e câmara de estabilidade) com nível de confiança de 95 %, prévia determinação da normalidade e homogeneidade da variância no software Statistica v.10.0 (StatSoft Inc., Estados Unidos de América).

#### *4.1.5. Avaliação da influência da formação de complexos com ciclodextrinas na volatilização do G-0*

##### *- Análise termogravimétrica (TGA)*

O comportamento térmico dos complexos de inclusão com as duas ciclodextrinas foi comparado com as respectivas misturas físicas mediante TGA dinâmica. Primeiramente, foram avaliadas três razões de aquecimento para o G-0 (2,5, 5 e 10 °C.min<sup>-1</sup>), com objetivo de escolher a melhor condição que permitisse detectar todos os eventos térmicos, incluída a sublimação, mediante a análise das curvas TG/DTG.

Uma vez selecionada a condição de aquecimento, uma massa aproximada de 5 mg de cada composto ou mistura física foi pesada em cadinhos de alumina abertos e aquecidos de 20 até 450 °C, sob atmosfera de nitrogênio (100 mL.min<sup>-1</sup>). As curvas de TG foram registradas no instrumento SDT Q600 (TA Instruments, Estados Unidos de América) e depois analisadas no software TA Universal Analysis 2000 para Windows.

##### *- Cromatografia a gás com amostrador de Headspace (CG-HS-FID)*

Massas de aproximadamente 9.6 mg referentes a G-0 cristalino, e quantidades equivalentes nas misturas físicas e nos complexos de inclusão sólidos, foram pesadas em balança analítica e colocadas em frascos de vidro de 20 mL para

Headspace, os quais são selados hermeticamente e dispostos no amostrador. A análise cromatográfica do G-0 volátil foi desenvolvida utilizando um cromatógrafo TRACE™ GC Ultra com amostrador de Headspace TriPlus (Thermo Fisher Scientific, Itália) sob as condições mostradas no Quadro 4. A análise comparativa foi desenvolvida em função das áreas relativas dos picos do G-0 sublimado dos complexos e misturas com relação ao fármaco livre.

**Quadro 4.** Condições cromatográficas estabelecidas para a detecção de G-0 volátil usando CG-HS-FID

| Condições       |                   |                                                                                           |
|-----------------|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| Incubação       | Ciclo de agitação | 5 s - 2 s                                                                                 |
|                 | Tempo             | 30 min                                                                                    |
|                 | Temperatura       | 50 °C                                                                                     |
| Injeção         | Temperatura       | 50 °C                                                                                     |
|                 | Razão de Split    | 1:10                                                                                      |
|                 | Volume de injeção | 2 mL                                                                                      |
| Forno           | Temperatura       | 60 °C                                                                                     |
| Tempo de        |                   | 9 min                                                                                     |
| Coluna          | Tipo              | Capilar DB-5, 30 m x 0,53 mm, espessura do filme 1,5 µm (J&W Scientific, Estados Unidos). |
| Gás de arrastre | Tipo              | Hélio                                                                                     |
|                 | Vazão             | 1 mL.min <sup>-1</sup>                                                                    |
| Detector        | Tipo              | FID                                                                                       |
|                 | Temperatura       | 250 °C                                                                                    |

#### 4.1.6. Avaliação biológica "in vitro" dos complexos de inclusão liofilizados de G-0 com ciclodextrinas frente a *Candida albicans* e *Candida krusei*.

##### 4.1.6.1. Cepas de leveduras

Duas cepas de *Candida albicans*, ATCC 18804 (padrão) e CAV4 (isolado clínico da região vaginal, resistente a fluconazol, itraconazol e cetoconazol) e duas cepas de *Candida krusei*, ATCC 6258 (padrão) e CKV3 (isolado clínico da região vaginal, resistente a fluconazol, itraconazol e cetoconazol) foram usadas para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do 2-(2-nitrovinil) furano e seus complexos de inclusão com HP- $\beta$ -CD e SBE- $\beta$ -CD. As cepas padrão foram obtidas da coleção de cepas micológicas do Laboratório de Fisiologia dos microrganismos, do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Brasil (UNESP/FCFAR). As cepas clínicas foram coletadas de doadoras após consentimento por escrito e as amostras foram doadas ao Laboratório de Micologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) para fins de pesquisa científica. O uso dessas amostras foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP-FAMERP), protocolo número 152/2006.

Todas as cepas clínicas de origem nacional empregadas neste estudo foram cadastradas no Sistema de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado-SisGen, sob os números de registro AF3561F e AAD29ED.

##### 4.1.6.2. Armazenagem e conservação das cepas de leveduras

As cepas foram colocadas em caldo Sabouraud-Dextrose (SDB) acrescido de 20 % de glicerol, e armazenadas a -20 °C até o uso. Para serem usadas, foram transferidas a 2 mL de SDB e depois incubadas a 37 °C por 48 h.

#### *4.1.6.3. Padronização das cepas de Candida spp.*

Após 48 h de incubação, 300 µL das suspensões de cada cepa foram transferidas para tubos de ensaio e padronizadas na fase logarítmica de crescimento por diluição apropriada em caldo RPMI 1640 e SDB. A absorbância das diluições foi monitorada a 530 nm (Pharmacia LKB-Ultrospec III) contra branco constituído por meio de cultura para verificar a escala 0,5 Mc Farland, em que absorbância teoricamente deve-se encontrar na faixa de 0,12 a 0,15. Uma vez ajustadas na escala Mc Farland, 100 µL de cada suspensão foram pipetadas e transferidas para tubos de ensaio contendo 9900 µL de meio de cultura. Finalmente, 1 mL desta dispersão foi transferida para tubos de ensaio contendo caldo RPMI para preparar uma diluição 1:20.

Uma vez padronizadas, os tubos contendo as cepas foram colocados em gelo para deter o crescimento microbiano.

#### *4.1.6.4. Preparação das soluções de ensaio*

Preparou-se uma solução stock de G-0 em DMSO de concentração 5 mg.mL<sup>-1</sup>. A partir dessa solução foram pipetados 200 µL e transferidos para balão volumétrico âmbar de 10 mL. Completou-se o volume com água purificada para atingir uma concentração final de 100 µg.mL<sup>-1</sup>. O conteúdo de DMSO nesta solução foi 2 %.

Os complexos liofilizados de G-0/CDs em vials foram reconstituídos com 1 mL de água purificada e diluídos apropriadamente para atingir concentração equivalente a 100 µg.mL<sup>-1</sup> da substância ativa.

Uma solução aquosa de anfotericina B (99 %, Sigma-Aldrich, Brasil), de concentração 160 µg.mL<sup>-1</sup>, preparada a partir de uma solução stock de 16 mg.mL<sup>-1</sup>

<sup>1</sup> em DMSO, foi usada como controle positivo. Foram preparadas também soluções aquosas controle de ciclodextrinas, na mesma concentração de cada uma delas nas soluções dos complexos (4770  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para G-0/HP- $\beta$ -CD e 4490  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para G-0/SBE- $\beta$ -CD).

#### 4.1.6.5. Teste de susceptibilidade a antifúngicos

A avaliação da atividade antifúngica através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi desenvolvida usando o método de microdiluição em caldo, baseado em protocolo padronizado (CLSI document M27-A3, 2008), com pequenas modificações. A cada poço da microplaca com 96 poços incorporou-se 100  $\mu\text{L}$  de meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Brasil) previamente ajustado a pH 7,0 com tampão MOPs (ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico), (99,5 % para meio de cultura, Sigma-Aldrich, Brasil). Seguidamente 100  $\mu\text{L}$  de cada solução de ensaio são adicionados ao primeiro poço de cada coluna da microplaca para desenvolver a diluição seriada. A faixa de concentração avaliada foi de 50 até 0,39  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para o fármaco e seus complexos, de 80  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  até 0,62  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para anfotericina B, de 2380  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  até 18,6  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para HP- $\beta$ -CD e de 2240  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  até 17,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para SBE- $\beta$ -CD. Em cada microplaca também monitoraram-se controles de meio de cultura e de esterilidade das soluções de ensaio.

Posteriormente, 100  $\mu\text{L}$  de cada suspensão da cepa padronizada foram incorporados a cada poço, exceto nos controles de esterilidade. Finalmente as microplacas foram incubadas a 37 °C, durante 48 h.

Após o período de incubação, as placas com 96 poços foram colocadas em cabine de fluxo laminar (VECO<sup>®</sup>, Campinas, Brasil) para revelação. Com este fim,

20 µL de solução aquosa ao 2 % m/v, do indicador redox cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (PA, Sigma-Aldrich, Brasil) foram adicionados a cada poço com ajuda de uma pipeta multicanal (5-50 µL). As microplacas foram novamente incubadas por mais 2 h. A cor vermelha nos poços é indicativa de crescimento microbiano e a ausência de cor indica que não houve crescimento.

O teste foi desenvolvido em triplicata para cada cepa de *Candida* e usando baixa intensidade de luz para evitar possível degradação dos produtos fotossensíveis.

Após o resultado obtido, desenvolveu-se um segundo teste de microdiluição com o objetivo de obter maior exatidão no valor de CIM para os complexos e o fármaco. Desta vez as amostras a serem avaliadas foram preparadas fora da placa com 96 poços. A faixa de concentração final do fármaco livre e nos complexos na microplaca foi de 13 até 6 µg.mL<sup>-1</sup>, exceto para *Candida krusei* CKV3, cuja faixa de concentração do fármaco livre foi de 26 até 12 µg.mL<sup>-1</sup>. O procedimento restante foi igual ao descrito no primeiro teste.

#### 4.1.7. Perfil de dissolução dos complexos com ciclodextrinas

Para desenvolver o teste, foi utilizado o método II da Farmacopéia Americana (Método das pás), no aparelho Hanson Dissolution Test Station SR8-Plus (Chatsworth, USA). Quantidade aproximada a 3 mg de G-0 (tp < 250 µm) e quantidades equivalentes dos complexos liofilizados (FD) foram pesadas e colocadas nas cubas (n=3) contendo 150 mL de Fluido Vaginal Simulado (SVF), pH 4,5. A temperatura foi mantida a 37 ± 1 °C e agitação em 75 rpm (CEVHER et al., 2014). O dissolutor foi protegido com papel escuro para evitar fotodegradação do

fármaco liberado. Alíquotas de 1,5 mL foram extraídas a intervalos de 5, 15, 30, 45, 60, 120 e 240 min, com reposição de meio na mesma temperatura para manter condição *sink*. Após filtradas com membrana 0,45 µm, 1 mL de cada filtrado foi diluído em 10 mL de fase móvel acetonitrila: água (80:20, v/v) e injetado no cromatógrafo (50 µL). Para quantificação foi preparada uma curva de calibração com amostra de referência na faixa 0,124 - 4 µg.mL<sup>-1</sup> e comprimento de onda de 351 nm. Para avaliar os perfis de dissolução foram comparadas as porcentagens de fármaco liberado (%DP) e a eficiência da dissolução (%DE) aos 15 e 60 min, para o fármaco livre e para os complexos. A %DE foi calculada como a relação entre a área sob a curva (AUC) do perfil de dissolução até o tempo *t* (0-15 min ou 0-60 min) e a área total do retângulo (ASC) definido pelo eixo y, referente ao 100% de dissolução e o eixo x (tempo 15 min ou tempo 60 min, dependendo do caso).

Também foi aplicado o modelo matemático independente para o cálculo do fator de similaridade (*f*<sub>2</sub>) entre os diferentes perfis de dissolução (MOORE; FLANNER, 1996), através da equação 1:

$$f_2 = 50 \times \log \left\{ \left[ 1 + \left( \frac{1}{n} \right) \sum_{i=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\} \quad (1)$$

Em que *n* é o número de tempos de amostragem; *R<sub>t</sub>* é a porcentagem de fármaco dissolvido da referência no tempo *t* e *T<sub>t</sub>* é a porcentagem de fármaco dissolvido da amostra de teste no tempo *t*.

#### 4.1.8. Ensaio de liberação "in vitro" do G-0 em complexos através de membrana sintética usando célula de Franz.

Como a análise prévia aos ensaios de liberação e permeabilidade, foi testada a estabilidade do G-0 em Fluido Vaginal Simulado (SVF) (MARQUES; LOEBENBERG; ALMUKAINZI, 2011) (Composição descrita no Anexo 1) e em

tampão fosfato salino (PBS), pH 7,4, os quais representam os meios doador e receptor, respectivamente.

No primeiro caso foram preparados 50 mL das soluções de G-0 ou complexos em SVF (com mucina) de concentração aproximada de  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , colocadas em erlenmeyers de 100 mL, e mantidas em banho termostatizado (Marconi, Brasil) a  $37^\circ\text{C}$ . Nos tempos de 0, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 360 e 480 min, foram pipetadas alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  e transferidas a balões volumétricos de 10 mL, completando o volume com a fase móvel acetonitrila: água (80:20, v/v) e analisadas por CLAE-DAD. Também foram avaliadas previamente soluções preparadas nas mesmas condições sem fármaco (placebo) para determinar possíveis interferências do meio.

De outro lado, soluções de G-0 ou complexos foram obtidas em concentração aproximada de  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  em PBS (pH 7,4) e avaliadas sob as mesmas condições citadas. Alíquotas de 1 mL foram igualmente diluídas em fase móvel e analisadas imediatamente.

A liberação do fármaco dos complexos foi desenvolvida utilizando uma membrana sintética de acetato de celulose (MWCO 12,000-14,000) e aparelho automático de difusão na célula de Franz (MicroettePlus, Hanson Research, Estados Unidos de América). As membranas foram cortadas e hidratadas em PBS 16 horas antes do ensaio.

Aproximadamente 2 mL de SVF (com e sem mucina), contendo  $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de substância ativa dissolvida, foram colocados no compartimento doador ( $n=3$ ). Uma solução de PBS com pH 7,4 foi utilizada como meio receptor. A temperatura do sistema foi estabelecida em  $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$  e agitação a 300 rpm. A partir das coletas (3,3 mL) realizadas aos 5, 15, 30, 60, 120, 180, 240 e 360 min, 1 mL de

cada uma foi misturado com 2,0 mL de Acetonitrila (Sigma-Aldrich, Brasil), filtradas (nylon 0,45 µm, Sartorius) e analisadas com o método de CLAE-DAD anteriormente utilizado para quantificar o fármaco no ensaio de dissolução. Para cada teste foram calculados os valores médios da quantidade de fármaco liberado acumulado por unidade de área e valores médios da porcentagem de fármaco liberado acumulado e plotadas as correspondentes curvas em função do tempo.

Para determinar as diferenças estatísticas significativas entre as amostras foi desenvolvido um teste de "t" de Student para amostras independentes, com nível de confiança de 95 %, utilizando o software Statistica v. 10.0 (StatSoft Inc., Estados Unidos de América).

#### *4.1.9. Ensaio de permeação e retenção em mucosa vaginal bovina*

##### *- Permeação através da mucosa vaginal*

A membrana vaginal bovina foi obtida a partir de um matadouro da localidade e transportada ao laboratório sob refrigeração. As partes do animal foram lavadas com solução salina fisiológica, cortadas com ajuda de bisturi e tesoura cirúrgica para separar a membrana mucosa do tecido muscular e conectivo e embaladas em parafilme para congelar (MACHADO; DAS NEVES, 2016) até o início dos ensaios. O descongelamento foi desenvolvido usando solução de PBS, pH 7,4 (VAN DER BIJL; VAN EYK; THOMPSON, 1998). Posteriormente as mucosas foram cortadas, a espessura foi medida usando um micrômetro digital (Mitutoyo, Sul Americana Ltda., Brasil) e logo montadas nas células de Franz com a superfície epitelial em direção ao compartimento doador. A área exposta foi 1,77 cm<sup>2</sup>. O procedimento seguido foi igual ao utilizado no ensaio de liberação. A duração total do teste foi 4 h.

#### *- Retenção na mucosa vaginal*

Uma vez finalizado o ensaio de permeação, as células foram desmontadas e as mucosas removidas com ajuda da pinça. Seguidamente foram lavadas com PBS, secadas cuidadosamente com papel toalha, cortadas em pequenos pedaços com tesoura cirúrgica e colocadas em tubos falcon. A cada tubo foram adicionados 2 mL de acetonitrila: água (80:20, v/v), e agitou-se em vórtex (3 min). Posteriormente as mucosas foram homogeneizadas utilizando ultraturrax (IKA Labortechnik) durante 1 min com agitação de 16.000 rpm. Os tubos falcon contendo os homogenatos foram colocados por mais 30 min em banho ultrassônico à 25 °C e em seguida centrifugados a 2202 x g durante 10 min. O sobrenadante foi filtrado usando filtro de celulose regenerada (RC 0,22 µm, Chromafil®) e injetados 50 µL no cromatógrafo. Para quantificar foi construída uma curva de calibração, na fase móvel, na faixa de concentração de 1 - 6 µg.mL<sup>-1</sup>.

#### *4.1.10. Ensaio de citotoxicidade dos complexos de inclusão liofilizados do G-0 com ciclodextrinas.*

##### *4.1.10.1. Culturas celulares*

Células epiteliais imortalizadas humanas não tumorais (HaCaT) e a linhagem celular de fibroblasto de camundongo (L929) foram doadas pela Profa. Christiane Pienna Soares do Laboratório de Citologia e pela Profa. Iracilda Zeppone Carlos do Laboratório de Imunologia (Campus Araraquara, UNESP, Brasil) respectivamente. As duas linhagens foram cultivadas em Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, Brasil) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (Cultilab, Brasil) inativado com calor e 100 UI.mL<sup>-1</sup> de penicilina e 0.1 mg.mL<sup>-1</sup> de estreptomicina (Sigma-Aldrich, Brasil), a 37 °C em atmosfera úmida

com 5 % CO<sub>2</sub> por 24 h em incubadora (Forma Scientific, ThermoFischer Scientific™, Brasil). Todas as culturas celulares foram utilizadas nos experimentos entre 60-80 % da confluência.

#### *4.1.10.2. Inoculação dos compostos*

As células na fase exponencial do crescimento foram semeadas (200 µL da suspensão celular) na densidade de  $5 \times 10^4$  células/poço (HaCaT) e  $1 \times 10^4$  células/poço (L929), em placas de cultura estéreis, de fundo chato de 96 poços (KASVI, China). Depois de 24 h, o meio de cultura foi removido e substituído por 200 µL de meio fresco contendo diferentes concentrações dos compostos a testar (5,6, 11,2, 22,4, 44,9, 89,8, 179,7, 359,4 e 718,9 µM para G-0 e FD G-0/HP-β-CD; sendo 4,5, 8,9, 17,9, 35,9, 71,9, 143,8, 287,6 e 575,1 µM, para FD G-0/SBE-β-CD). HP-β-CD e SBE-β-CD foram avaliadas como controles, em concentrações equivalentes às dos complexos. Foi utilizado também um controle de células para os cálculos da viabilidade celular. Uma vez adicionados os compostos, as células foram incubadas por mais 24 h a 37 °C em atmosfera úmida com 5 % CO<sub>2</sub>.

#### *4.1.10.3. Ensaio do MTT*

A avaliação da viabilidade celular foi desenvolvida usando o ensaio colorimétrico do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (MOSMANN, 1983), baseado na redução do reagente pelo complexo enzimático piruvato desidrogenase mitocondrial das células viáveis. Brevemente, após 24 h, os compostos foram removidos das microplacas e 100 µL da solução do MTT (Sigma-Aldrich) de concentração 1 mg.mL<sup>-1</sup> previamente dissolvido em solução de PBS e DMEM incompleto, foi adicionado a cada poço usando uma pipeta

multicanal. As microplacas foram incubadas a 37 °C durante 3 h. Após o tempo de incubação, a solução de MTT foi descartada dos poços das microplacas e 100 µL de isopropanol foram adicionados a cada poço para solubilizar os cristais azuis de formazan.

Finalmente, a absorbância das soluções nos poços foi medida em leitor de microplacas (EPOCH 2, BioTeK® Instruments, Vermont, Estados Unidos de América) em 540 nm com filtro de 620 nm. A viabilidade celular foi calculada como porcentagem de células sobreviventes tratadas comparadas com os controles sem tratar (Equação 2).

$$\text{Células viáveis (\%)} = \frac{\text{Absorbância das células tratadas (A}_{540} - A_{620})}{\text{Absorbância das células controle não tratadas (A}_{540} - A_{620})} \times 100 \quad (2)$$

A concentração citotóxica 50 (CC<sub>50</sub>) é definida como a concentração de composto (µM) requerida para reduzir a viabilidade celular em 50 %, e é calculada através de um ajuste não linear à curva da sigmóide Emax (SIFONTES-RODRÍGUEZ, 2017). As curvas foram geradas e analisadas no software Statistica v.10.0 (StatSoft Inc., Estados Unidos de América). Foi também desenvolvida uma comparação estatística entre os valores de CC<sub>50</sub> obtidos para cada tratamento com nível de confiança de 95 %, prévia análise da normalidade (teste de Shapiro-Wilks), independência (Gráfico de dispersão dos resíduos segundo a sequência de tempo em que foram coletados os dados) e homocedasticidade (Teste de Levene) da variável resposta CC<sub>50</sub> para cada linhagem celular, de forma independente.

## **4.2. Micropartículas de etilcelulose com G-0 incorporado.**

### **4.2.1. Compatibilidade de G-0 com etilcelulose em mistura física (1:1)**

Considerando estudos anteriores de incompatibilidade com vários polímeros sintéticos hidrofílicos como HPMC, PEG 6000 e 4000, PVP K25, PVP-VA 64, entre outros (GONZÁLEZ et al., 2008), foi desenvolvida uma nova experiência de compatibilidade, esta vez com etilcelulose. Foram preparadas misturas físicas de G-0 (Lote 17-1-8, 99,6 %) e o polímero (1:1, m/m) em tubos de vidro com tampa de rosca, usando vórtex para homogeneizar e depois colocadas dentro de dessecador com solução de cloreto de sódio que proporcionou umidade relativa de 75 % a 40°C, em estufa por 1 mês.

Passado este período, as misturas foram extraídas com 2 mL de acetonitrila: água (80:20, v/v) e transferidas a balão volumétrico de 25 mL. Este procedimento repetiu-se três vezes e finalmente completou-se o volume com a mistura de solventes, seguido de filtração em membrana (RC 0,45 µm, Chromafil®). Uma alíquota da cada solução filtrada (250 µL) foi transferida a balão volumétrico de 10 mL, apropriadamente diluída na mistura de solventes até completar o volume e depois analisada por CLAE.

O sistema de CLAE esteve equipado com um módulo de separação Agilent Technologies 1220, detector de arranjo de diodos 1220 Infinity, injetor automático e bomba de gradiente quaternária. A fase estacionária constituída por ODS Agilent Zorbax® (250 x 4,6 mm, 5 µm) e pré-coluna Agilent Zorbax® ODS (12,5 x 4,6 mm, 5 µm). A fase móvel foi acetonitrila: água (80:20, v/v), com fluxo de 0,5 mL.min<sup>-1</sup>, volume de injeção de 20 µL e tempo de corrida 15 minutos. A separação foi desenvolvida à 25 °C. O G-0 foi detectado usando o comprimento de onda de máxima absorção de 351 nm. Para quantificar o composto, foi preparada uma curva

de calibração com amostra de referência na faixa de concentração de 10 - 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Adicionalmente foi desenvolvida uma varredura de 220 - 400 nm com o propósito de detectar possíveis produtos de interação ou degradação do G-0 nas misturas.

#### *4.2.2. Obtenção das micropartículas pelo método de emulsificação/evaporação do solvente.*

As micropartículas contendo 2-(2-nitrovinil) furano foram preparadas usando como polímero EC, com conteúdo de etóxi 49%, viscosidade 45 cps em solução ao 5 % em tolueno:etanol (4:1) a 25°C (Sigma-Aldrich, GmbH, Alemanha) e álcool polivinílico (PVA), PM 133.000, 99-100% hidrolisado (Mallinckrodt Pharm., Reino Unido) como estabilizante da emulsão. O diclorometano PA (Hexis Científica, Brasil) foi usado como solvente do G-0 e da EC e como fase interna da emulsão.

Uma quantidade apropriada de PVA foi completamente dissolvida em água destilada quente e depois guardada na geladeira a 2 - 8 °C até o uso. EC foi dissolvida em diclorometano. A solução orgânica foi adicionada a um béquer com 250 mg de G-0 com agitação até total dissolução. Em seguida, a solução orgânica foi incorporada por gotejamento em 100 mL da solução aquosa do PVA. Este processo foi desenvolvido sob agitação controlada usando agitador mecânico digital de hélice (IKA® Eurostar 20, Estados Unidos de América) à 25 °C por 3 h para conseguir a evaporação do diclorometano. Finalmente, a suspensão obtida foi filtrada com filtro de papel (Whatman) com auxílio de uma bomba de vácuo e as partículas retidas no filtro foram lavadas com 100 mL de água destilada morna (três vezes). As micropartículas foram secas à 25 °C sob vácuo, em dessecador com

sílica gel por 48 h. Após secagem, as partículas foram colocadas em frascos de vidro âmbar com tampa plástica de rosca até a análise.

Um planejamento fatorial  $2^4$  foi desenvolvido com objetivo de determinar as melhores condições de obtenção das micropartículas. Os fatores ou variáveis independentes avaliados no planejamento foram a concentração de PVA na fase aquosa, conteúdo de EC, volume de fase interna e velocidade de agitação. As variáveis resposta ou dependentes consideradas foram a recuperação (%), eficiência de encapsulação (%), tamanho médio de partícula ( $\mu\text{m}$ ), circularidade e polidispersidade.

O rendimento de produção foi calculado seguindo a equação 3.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Massa das micropartículas}}{\text{Massa total incorporada de G-0 e polímero}} \times 100 \quad (3)$$

Para calcular a eficiência de encapsulação, o conteúdo de G-0 foi determinado usando um sistema de CLAE (Perkin-Elmer Flexar, Estados Unidos de América) e o método usado foi descrito anteriormente. Preparou-se uma curva de calibração com a amostra de referência, na faixa de concentração de 10 - 50  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ . No preparo das amostras, aproximadamente 10 mg de micropartículas foram pesadas em balança analítica em tubos Eppendorf e posteriormente foram dissolvidas em 1 mL de acetonitrila: água (80:20, v/v) com auxílio do vórtex. Uma alíquota desta solução (90  $\mu\text{L}$ ) foi pipetada e transferida a balão volumétrico âmbar de 10 mL. Completou-se o volume com mistura de solventes e homogeneizou-se. As soluções foram filtradas com membrana (PTFE 0,45  $\mu\text{m}$ , Chromafil®) e analisadas por CLAE.

A eficiência de encapsulação (*EE*) foi calculada seguindo a equação 4

$$EE (\%) = \frac{\text{Conteúdo real de G-0 nas micropartículas}}{\text{Conteúdo teórico de G-0}} \times 100 \quad (4)$$

A determinação do tamanho das partículas (em base ao diâmetro) foi desenvolvida usando um microscópio Leica MZ APO® (Spach Optics Inc., Estados Unidos de América) com câmara digital acoplada. O software Motic Images Advance 3.2 foi utilizado na aquisição das imagens. O Image J v.1.46r para Windows (software livre) foi utilizado para análise do tamanho e circularidade. O índice Span (Equação 5) foi calculado adicionalmente para avaliar a polidispersidade dos sistemas obtidos.

$$Span = \frac{(D_{90} - D_{10})}{D_{50}} \quad (5)$$

Em que  $D_{90}$ ,  $D_{10}$  e  $D_{50}$  são o 90, 10 e 50 percentil do diâmetro das partículas ( $\mu\text{m}$ ) respectivamente.

Para a análise estatística do planejamento fatorial foi utilizado o software Statistica v.10.0 (StatSoft Inc., Estados Unidos de América).

#### 4.2.3. Caracterização das micropartículas

##### 4.2.3.1. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).

A avaliação por DSC foi realizada em um aparelho Mettler DSC 1 (Mettler Toledo, Gieben, Suíça). O instrumento foi calibrado previamente com Índio. A análise foi realizada sob atmosfera de nitrogênio (vazão de  $50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ). Um cadinho de alumínio lacrado ( $40 \mu\text{L}$ ) foi usado como porta amostra e como referência. Aproximadamente 5,0 mg de amostra foram usados para as análises.

As curvas DSC foram registradas com razão de aquecimento de 10°C.min<sup>-1</sup>. A faixa de temperatura usada foi de 20°C a 100 °C.

#### *4.2.3.2. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflectância Total Atenuada (ATR-FTIR)*

Os espectros FTIR para os compostos individuais (G-0 e EC), misturas físicas e micropartículas, foram registrados no intervalo de número de onda de 4000 a 400 cm<sup>-1</sup> usando um cristal de diamante em aparelho purgado Vertex 70 FTIR (Bruker Optik GmbH, Alemanha) equipado com detector piroelétrico Lantânio Deuterado  $\alpha$  Alanina Triglicina Sulfato (DL $\alpha$ TGS). Para cada amostra foram feitas 32 varreduras, com resolução espectral de 4 cm<sup>-1</sup>. Os espectros foram coletados utilizando o software OPUS Spectra. Para análise das micropartículas, os espectros foram comparados com os do composto ativo e excipiente, no software OriginPro.8.

#### *4.2.3.3. Difração de raios X (DRX)*

Os difractogramas da substância ativa, polímero, misturas físicas e micropartículas foram obtidos no aparelho automatizado de Difração de raios X D5000-DIFFRAC PLUS XRD Commander (Siemens Instruments, Inc., Alemanha) utilizando radiação monocromática CuK $\alpha$  ( $\lambda$ = 1,54187 Å) a 30 mA e 40 kV, com varredura de raios-X de ângulo aberto 2 $\theta$  entre 2 e 60 ° e velocidade do goniômetro de 0.05 °/s. As amostras foram trituradas na almofariz com pistilo de porcelana e colocadas nos porta amostras de vidro. O excesso de pó foi eliminado e a superfície nivelada com ajuda de uma lâmina de vidro. Os materiais individuais, misturas e micropartículas foram comparados em função da posição dos picos, presença ou

perda de picos e foi calculado o grau de cristalinidade das amostras utilizando a equação de Scherrer (Equação 6).

$$\tau = \frac{K\lambda}{L \cos \theta} \quad (6)$$

Em que:

$\tau$  é o tamanho médio dos domínios ordenados (cristais).

K é o fator de forma (adimensional) com valor próximo à unidade. Apresenta valor típico de 0.9, mas varia com o tamanho real do cristal.

$\lambda$  é o comprimento de onda do raio-X

L é a largura do pico na média altura (FWHM), em radianos.

$\theta$  é o ângulo de Bragg.

#### 4.2.3.4. Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV).

Para análise da morfologia, as micropartículas foram colocadas em porta amostras com adesivo, revestidas com carbono e observadas sob microscópio eletrônico com emissão de campo (JEOL JSM-7500F, Japão) com aceleração da voltagem de 2,00 kV. Para observar a estrutura interna, as micropartículas são colocadas, com ajuda de uma pinça, em almofariz de ágata contendo nitrogênio líquido. Após congelamento, as micropartículas são quebradas com a própria pinça, dispostas no suporte metálico e revestidas com carbono. As partículas foram observadas sob as condições estabelecidas anteriormente.

#### 4.2.3.5. Análise termogravimétrica (TG) e análise térmica diferencial (DTA).

As curvas TG/DTG e DTA foram registradas em aparelho TA SDT 2960 (TA Instruments, Estados Unidos de América) sob atmosfera de ar com vazão de 100 mL.min<sup>-1</sup>. As amostras foram pesadas (3,00 ± 0,50 mg) em cadinhos de alumina

abertos. O aquecimento foi desenvolvido na faixa de 25 até 500 °C com razão de aquecimento de 2,5 °C.min<sup>-1</sup>.

#### *4.2.3.6. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear*

Uma amostra de aproximadamente 2 mg de G-0 foi cuidadosamente dissolvida em 600 µL de clorofórmio deuterado (99,8 atom %D, Sigma-Aldrich, Alemanha), que foi usado como referência interna. Para os espectros unidimensionais RMN <sup>1</sup>H, foram pesados aproximadamente 6 mg de micropartículas, dissolvidas completamente no solvente deuterado. Adicionalmente foram preparadas micropartículas sem G-0 em iguais condições com objetivo de assignar os sinais de hidrogênio dos excipientes. Todas as amostras foram colocadas em tubos de RMN de 5 mm.

Os espectros foram registrados a 296 K em espectrômetro Bruker Avance III HD de 600 MHz (Bruker, Estados Unidos de América) equipado com crio sonda triplo inversa (TCI) para <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e <sup>15</sup>N. Os espectros RMN <sup>1</sup>H foram adquiridos com resolução de 64 K, largura espectral de 25,02 ppm, tempo de aquisição 2,73 s, número de varreduras 64 e pulso de 7 µs. Para aquisição e processamento dos dados foi utilizado o software TopSpin 3.5 para Windows e para visualização dos espectros foi usado o MestReNova 6.0.

#### *4.2.4. Ensaio de liberação do G-0 das micropartículas.*

Para este teste, foi utilizado o método I da Farmacopeia dos Estados Unidos (Método do cesto), no aparelho Hanson Dissolution Test Station SR8-Plus (Chatsworth, Estados Unidos de América). Uma quantidade equivalente a 3 mg de G-0 foi pesada diretamente nos cestos (n=3) para cada formulação de

micropartículas e colocadas nas cubas contendo 150 mL de tampão acetato 25 mM, pH 4,2. A temperatura foi mantida a  $37 \pm 1$  °C e agitação em 50 rpm. Alíquotas de 1,5 mL foram extraídas a intervalos de 15, 30, 60, 120, 180, 240, 360, 480, 720 e 1440 min como máximo, com reposição de igual volume de meio para manter condição *sink*. Após filtração em membrana (RC 0,45 µm, Chromafil®), 1 mL de cada filtrado foi diluído em 10 mL de fase móvel acetonitrila: água (80:20, v/v) e analisado por CLAE. Amostras branco preparadas nas mesmas condições sem fármaco foram avaliadas para determinar possíveis interferências. Para quantificação foi preparada uma curva de calibração com amostra de referência na faixa de concentrações de 0,5 - 30 µg.mL<sup>-1</sup> e comprimento de onda de 351 nm. O dissolutor foi protegido com papel escuro para evitar fotodegradação do fármaco liberado.

A cinética de liberação foi determinada plotando os dados de dissolução e avaliando em diferentes modelos matemáticos (ordem zero, primeira ordem, Higuchi, Weibull e Korsmeyer-Peppas) utilizando o SigmaPlot para Windows 10.0 (Systac Software, Inc., Estados Unidos de América).

#### 4.2.5. Fotoestabilidade das micropartículas em condições forçadas

A fotoestabilidade foi desenvolvida nas mesmas condições de irradiação que os complexos. Aproximadamente 60 mg de micropartículas foram distribuídas em placas de Petri de vidro (n=3) a uma distância de 10 cm da fonte de luz UV. Também foram analisadas amostras de G-0 (matéria prima) em quantidade equivalente, com fins comparativos. A amostragem foi desenvolvida cada 24 h até obter 50 % de degradação da substância ativa. O procedimento de quantificação seguido foi o

mesmo descrito para a eficiência de encapsulação. A análise cinética foi desenvolvida mediante a avaliação das curvas de degradação nos modelos matemáticos de ordem zero, primeira e segunda ordens, considerando o melhor coeficiente de correlação, utilizando o software Statistica v.10.0 (StatSoft, Inc., Estados Unidos de América).

#### *4.2.6. Estabilidade acelerada das micropartículas*

O ensaio foi conduzido nas condições de estabilidade acelerada ( $40 \pm 2^\circ\text{C}/75 \pm 5\% \text{ HR}$ ) seguindo o estabelecido pelas normativas ICH Q1A(R2) (ICH EXPERT WORKING GROUP, 2003). Para isto foi usada uma câmara climática Modelo CC 500-UR (TERRONI EQUIPAMENTOS CIENTÍFICOS LTDA, SC, Brasil). As amostras foram envasadas em frascos de vidro âmbar com capacidade de 3 mL com tampa plástica preta, de rosca. A amostragem foi realizada uma vez por mês durante 3 meses. Amostras control armazenadas em geladeira ( $2-8^\circ\text{C}$ ) também foram analisadas. As variáveis respostas medidas foram: determinação do conteúdo de G-0 e presença de produto de degradação (se houver) através de método validado por CLAE-DAD; análise do tamanho de partículas (microscopia óptica) e porcentagem de G-0 liberado. As micropartículas também foram monitoradas através da análise das características organolépticas (cor e aspecto). A análise estatística foi desenvolvida utilizando um ANOVA-One way para determinar diferenças significativas entre o conteúdo de fármaco aos diferentes tempos (0, 1, 2 e 3 meses), prévia determinação de Normalidade da população de dados (Shapiro-Wilks), Independência das subpopulações (Gráfico de dispersão dos resíduos da variável resposta em função da ordem em que foram adquiridos os

dados), e Homogeneidade da variância (Teste de Levene), todas com um nível de significância de 95 %. Para aqueles resultados em que ANOVA mostrou diferenças significativas foi desenvolvido uma prova de contraste (Teste de Tukey) para confirmar diferenças entre as subpopulações.

O teste de "t" de Student foi desenvolvido para comparar diferenças significativas entre amostras armazenadas em duas condições (geladeira e câmara de estabilidade) e em dois tempos (0 e 3 meses no caso da porcentagem de fármaco liberado) com nível de significância de 95 %, utilizando o software Statistica v. 10.0 (StatSoft Inc., Estados Unidos de América).

## 5. Resultados e discussão

### 5.1. Avaliação dos complexos de G-0 com ciclodextrinas

#### 5.1.1. Estabilidade acelerada dos complexos

Os complexos foram avaliados em função de sua cor e aparência, tempo de reconstituição em água, massa do complexo por vial, análise qualitativa de possíveis impurezas, e conteúdo de fármaco (Tabelas 1 e 2).

**Tabela 1.** Dados de estabilidade acelerada do complexo FD G-0/HP- $\beta$ -CD em estudo (sem reposição).

| Ensaio/Tempo                | 0                 | 1 mês             | 2 meses           | 3 meses           | 4 meses           | 6 meses           |
|-----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Aparência                   | Cake              | Cake              | Cake              | Cake              | Cake              | Cake              |
| Cor                         | Amarelo           | Amarelo           | Amarelo           | Amarelo           | Amarelo           | Amarelo           |
| Tempo de reconstituição (s) | 35,8 $\pm$ 1,3    | -                 | -                 | -                 | -                 | 36,2 $\pm$ 1,9*   |
| Conteúdo de fármaco (%)     | 2,01 $\pm$ 0,10   | 1,99 $\pm$ 0,20   | 2,15 $\pm$ 0,16   | 2,01 $\pm$ 0,11   | 2,03 $\pm$ 0,09   | 2,10 $\pm$ 0,13   |
| Massa (mg)                  | 166,10 $\pm$ 0,75 | 164,22 $\pm$ 3,16 | 168,38 $\pm$ 1,55 | 168,47 $\pm$ 4,95 | 160,19 $\pm$ 6,96 | 169,90 $\pm$ 2,59 |
| Impurezas                   | Não               | Não               | Não               | Não               | Não               | Não               |

Os dados numéricos foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n=3)

\*Não existem diferenças significativas com relação ao valor inicial (T-Student:  $p>0,05$ )

Os resultados da análise de variância (ANOVA-One way) realizada com objetivo de determinar a existência de diferenças significativas ( $p<0,05$ ) entre os vários tempos de análise com relação ao conteúdo de fármaco mostrou um valor de  $p = 0,7113$  e com relação à massa dos complexos um valor de  $p = 0,2446$ ,

demonstrando que não existiram diferenças significativas desde o início até o final do estudo.

**Tabela 2.** Dados de estabilidade do complexo FD G-0/SBE- $\beta$ -CD em estudo (sem reposição).

| Ensaio/Tempo                       | 0                 | 1 mês             | 2 meses           | 3 meses           | 4 meses           | 6 meses           |
|------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| <b>Aparência</b>                   | Cake              | Cake              | Cake              | Cake              | Cake              | Cake              |
| <b>Cor</b>                         | Amarelo intenso   | Amarelo intenso   | Amarelo intenso   | Amarelo intenso   | Amarelo intenso   | Amarelo intenso   |
| <b>Tempo de reconstituição (s)</b> | 26,9 $\pm$ 2,1    | -                 | -                 | -                 | -                 | 27,2 $\pm$ 3,3*   |
| <b>Conteúdo de fármaco (%)</b>     | 2,06 $\pm$ 0,06   | 2,05 $\pm$ 0,13   | 2,16 $\pm$ 0,14   | 2,06 $\pm$ 0,14   | 2,13 $\pm$ 0,11   | 2,14 $\pm$ 0,05   |
| <b>Massa (mg)</b>                  | 240,27 $\pm$ 2,23 | 240,10 $\pm$ 1,56 | 238,42 $\pm$ 3,58 | 239,33 $\pm$ 2,64 | 232,58 $\pm$ 6,79 | 241,05 $\pm$ 2,38 |
| <b>Impurezas</b>                   | Não               | Não               | Não               | Não               | Não               | Não               |

Os dados numéricos foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão ( $n=3$ )

\*Não existem diferenças significativas com relação ao valor inicial (T-student:  $p>0,05$ ).

A mesma análise foi desenvolvida para avaliar a estabilidade do complexo G-0/SBE- $\beta$ -CD. A significância estatística para o conteúdo de fármaco foi de  $p=0,8868$  e para a massa das amostras foi de  $p=0,1111$ , indicando a não existência de diferenças significativas ( $p>0,05$ ) entre os diferentes tempos de análise com relação a estas variáveis. Os valores de porcentagem de G-0 ao final do estudo com relação ao conteúdo inicial (tempo 0) foram calculados resultando em  $104,4 \pm 5,5 \%$  e  $104,1 \pm 3,2 \%$  para os complexos liofilizados G-0/HP- $\beta$ -CD e G-0/SBE- $\beta$ -CD, respectivamente.

Os resultados obtidos aos 6 meses de estudo foram comparados também com amostras controles armazenadas na geladeira (Figura 11). O teste de "t"-Student para amostras independentes mostrou valores de  $p=0,4511$  para a comparação dos complexos FD G-0/HP- $\beta$ -CD e  $p=0,1260$  para os complexos FD G-0/SBE- $\beta$ -CD em ambas as condições, não existindo diferenças estatísticas significativas entre o conteúdo de G-0 das amostras em geladeira e na câmara climática ( $p>0,05$ ).

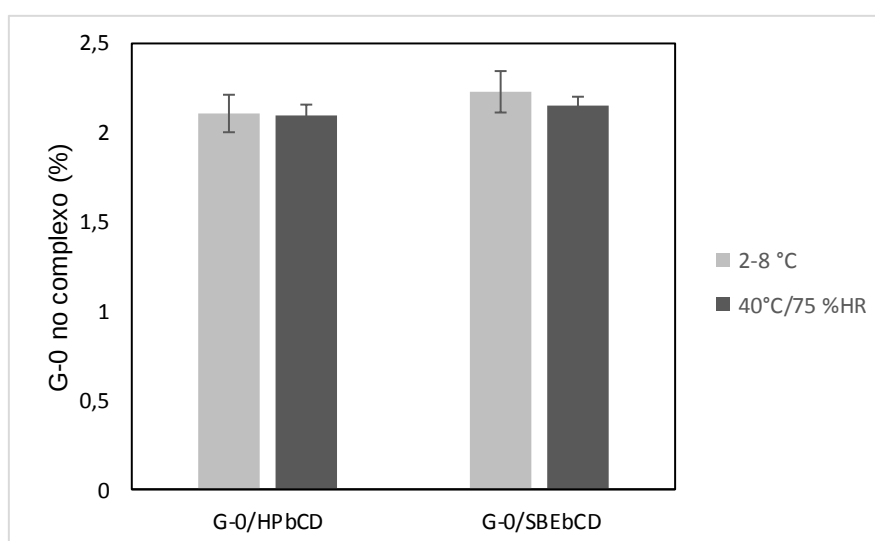


**Figura 11.** Comparação da porcentagem de G-0 nos complexos aos 6 meses armazenados em geladeira e câmara de estabilidade.

Adicionalmente foi determinada a estabilidade da solução reconstituída à 25 °C durante 4 horas na bancada. A porcentagem de G-0 às 4 horas foi expressa com relação ao conteúdo da solução recém reconstituída (Tabela 3).

**Tabela 3.** Resultados de estabilidade da solução reconstituída (protegida da luz) dos complexos após 4 horas à 25 °C.

| Ensaio                     | G-0/HP- $\beta$ -CD | G-0/SBE- $\beta$ -CD |
|----------------------------|---------------------|----------------------|
| <b>Cor</b>                 | Amarelo             | Amarelo              |
| <b>Aspecto</b>             | Transparente        | Transparente         |
| <b>Conteúdo de G-0 (%)</b> | 102,89 $\pm$ 5,83   | 101,56 $\pm$ 4,36    |

*Os dados numéricos foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n=3)*

Os resultados de estabilidade mostrados para o G-0 na forma de complexos indicam que esta é uma alternativa promissora para a incorporação em formas farmacêuticas sólidas, mantendo-se sem alterações da estabilidade química, nem física do fármaco, nas condições aceleradas de temperatura e umidade, com resultados percentuais médios de conteúdo de G-0 entre o 95-105 % (ICH EXPERT WORKING GROUP, 2003) em relação ao conteúdo inicial nos 6 meses de estudo, e não foram detectadas impurezas ou produtos de degradação. Os baixos valores da porcentagem de fármaco obtidos (~2 %, m/m) estão relacionados com a estequiometria dos complexos, como foi sugerido em trabalho publicado previamente, a partir dos diagramas de solubilidade ( $A_L$ ) indicando formação de complexo equimolar (RUZ et al., 2012), e a diferença entre a massa molecular do G-0 e as ciclodextrinas, sendo 11 e 15 vezes superior para HP- $\beta$ -CD e SBE- $\beta$ -CD, respectivamente. Adicionalmente devemos destacar que não todo o fármaco dissolvido no meio aquoso está formando complexo. Uma parte está livre, em equilíbrio com a forma complexada. Este processo pode ser caracterizado pela eficiência da complexação (CE), sendo os valores de CE de 0,102 e 0,174 para os complexos com HP- $\beta$ -CD e SBE- $\beta$ -CD respectivamente (RUZ et al., 2012). Resultados similares de porcentagem de fármaco incorporado nos complexos

foram obtidos para os sistemas voriconazol/SBE- $\beta$ -CD (5,8 %, m/m) (DAVIS; BREWSTER, 2004), miconazol/HP- $\beta$ -CD (2,6 %, m/m) e clotrimazol/HP- $\beta$ -CD (1,17 %, m/m), entre outros (LOFTSSON; DUCHENE, 2007).

#### 5.1.2. *Influência das ciclodextrinas na fotoestabilidade do G-0.*

Durante o desenvolvimento do ensaio cinético de fotodegradação observou-se que os complexos utilizados como control escuro, expostos à luz, não mostraram diferenças significativas na concentração de G-0 desde o começo até o final do ensaio (ANOVA-One way,  $p = 0,15$ ,  $p > 0,05$  para o complexo G-0/HP- $\beta$ -CD e  $p = 0,51$ ,  $p > 0,05$  para o complexo G-0/SBE- $\beta$ -CD), indicando que não ocorreu degradação dos controles à temperatura do ensaio (Tabela 4).

No entanto, as amostras de complexos expostas apresentaram diminuição significativa da concentração de substância ativa de aproximadamente 90 % do valor inicial às 48 horas de exposição à luz para o complexo com HP- $\beta$ -CD (ANOVA-One way  $p=0,000087$ ;  $p<0,05$ ) e de aproximadamente 80 % do valor inicial com SBE- $\beta$ -CD (ANOVA-One way  $p=0,0000135$ ;  $p<0,05$ ) (Figura 12 e 13).

**Tabela 4.** Conteúdo de G-0 nas amostras controles escuros de complexos e misturas físicas com as duas ciclodextrinas.

| Amostra                       | Conteúdo de G-0 (m/m %) |                     |
|-------------------------------|-------------------------|---------------------|
|                               | Tempo 0                 | 48h                 |
| Complexo G-0/HP- $\beta$ -CD  | 2,104 $\pm$ 0,115       | 1,972 $\pm$ 0,062   |
| MF G-0/HP- $\beta$ -CD        | 1,842 $\pm$ 0,086       | 1,447 $\pm$ 0,206 * |
| Complexo G-0/SBE- $\beta$ -CD | 2,203 $\pm$ 0,175       | 2,104 $\pm$ 0,167   |
| MF G-0/SBE- $\beta$ -CD       | 2,535 $\pm$ 0,078       | 2,335 $\pm$ 0,398   |

Os dados numéricos foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão ( $n=3$ )

\* Diferenças estatísticas significativas,  $p<0.05$ .

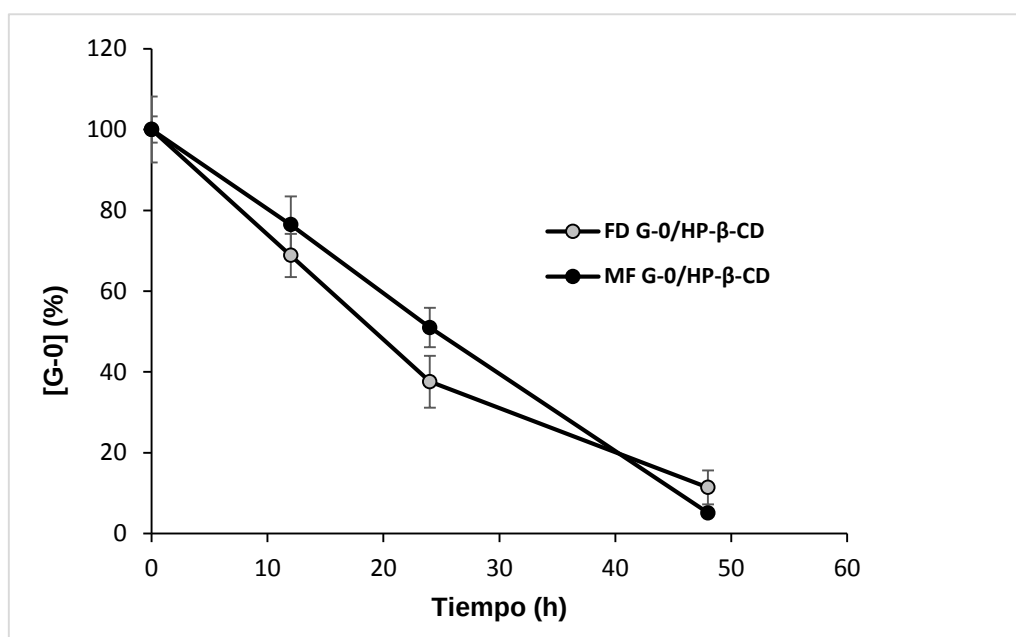


**Figura 12.** Fotodegradação do G-0 em complexos de inclusão liofilizados e misturas físicas com HP-β-CD (Considerando o conteúdo inicial como 100%).

No caso das misturas físicas utilizadas como controles escuros, foram detectadas pequenas diferenças significativas entre as concentrações iniciais e finais para as misturas com HP-β-CD (ANOVA-One way  $p=0,0370$ ;  $p<0,05$ ), o que sugere que pode estar acontecendo sublimação do fármaco ou devido a problemas de homogeneidade da mistura por presença de umidade e/ou segregação, considerando que não foram detectados produtos de degradação nos cromatogramas das misturas protegidas da luz (Tabela 4).

Nas misturas físicas expostas, foram detectadas diferenças muito significativas entre as concentrações iniciais ( $t = 0$ ) e finais ( $t = 48$  h), diminuindo a concentração de substância ativa em mais do 90 % do valor inicial para o caso da mistura com HP-β-CD ( $p=0,00003$ ;  $p<0,05$ ) e em mais do 65 % do valor inicial para o caso da mistura com SBE-β-CD ( $p = 0,0151$ ;  $p<0,05$ ). (Figuras 12 e 13).

A diferença obtida entre os resultados das misturas físicas com as duas ciclodextrinas pode estar relacionada com a diferença de massas das misturas expostas, sendo maior a massa inicial exposta para a mistura com SBE- $\beta$ -CD.

Uma comparação estatística da concentração de fármaco as 48 h de ensaio nas amostras de complexos e as misturas físicas expostas com as duas ciclodextrinas mostrou que não existem diferenças significativas entre elas ( $p = 0,068$ ;  $p > 0,05$  para as amostras com HP- $\beta$ -CD e  $p = 0,221$ ;  $p > 0,05$  para as amostras com SBE- $\beta$ -CD), indicando que a fotodegradação acontece em igual extensão para as formas complexadas e as misturas.

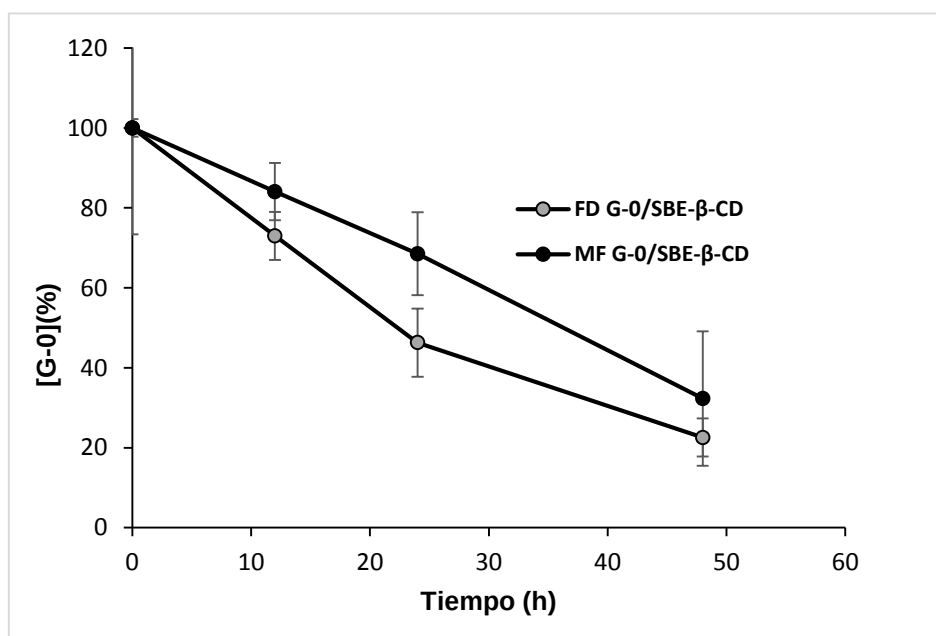


**Figura 13.** Fotodegradação do G-0 em complexos de inclusão liofilizados e misturas físicas com SBE- $\beta$ -CD (Considerando o conteúdo inicial como 100%).

Porém a análise da cinética da degradação do G-0, determinada pelo método integral (DELIANG; PORTER; ZHANG, 2009), mostrou que nos complexos

de inclusão liofilizados (FD), ajustou-se à cinética de fotodegradação de primeira ordem, e as misturas físicas (MF) seguiram cinética de fotodegradação de ordem zero (Tabela 5), o que sugere um mecanismo de fotodegradação diferente.

**Tabela 5.** Dados cinéticos da fotodegradação dos complexos de inclusão (FD) e misturas físicas (MF) do G-0 com HP- $\beta$ -CD e SBE- $\beta$ -CD.

| Parâmetros cinéticos   | G-0/HP- $\beta$ -CD | G-0/HP- $\beta$ -CD | G-0/SBE- $\beta$ -CD | G-0/SBE- $\beta$ -CD |
|------------------------|---------------------|---------------------|----------------------|----------------------|
|                        | FD                  | MF                  | FD                   | MF                   |
|                        | 1ª ordem            | Ordem zero          | 1ª ordem             | Ordem zero           |
| R <sup>2</sup>         | 0,9968              | 0,9996              | 0,9996               | 0,9949               |
| K (h <sup>-1</sup> )   | 0,0452              | -                   | 0,031                | -                    |
| K (% h <sup>-1</sup> ) | -                   | 0,0425              | -                    | 0,029                |
| t <sub>1/2</sub> (h)   | 15,33               | 25,29               | 22,35                | 38,63                |

Nas condições da análise cromatográfica, o 2-(2-nitrovinil) furano eluiu com tempo de retenção de 6,8 min e apresentou máximo de absorção em 351 nm. O espectro UV-Vis é mostrado na Figura 14. O produto de fotodegradação principal, obtido para a matéria prima nas condições de irradiação descritas eluiu com tempo de retenção de 7,5 min e comprimento de onda de máxima absorção em 248 nm, resultado coincidente com publicações anteriores (DE ROJAS PÉREZ, 2006) e também obtido para as misturas físicas com as duas ciclodextrinas durante o ensaio.

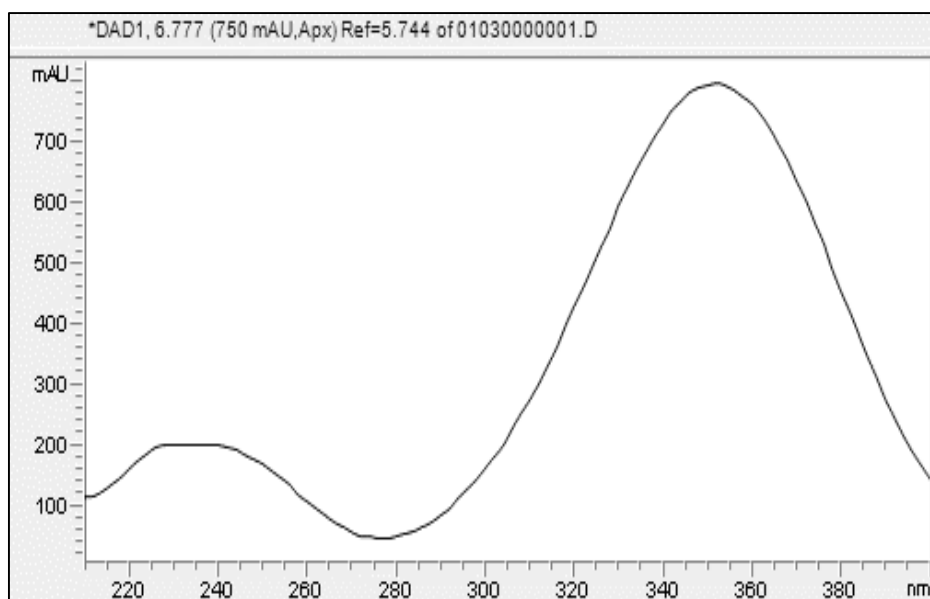


Figura 14. Espectro UV-Vis do 2-(2-nitrovinil) furano em ACN:água (80:20, v/v),  $\lambda_{\text{máx.}} = 351 \text{ nm}$ .

No entanto, durante a fotodegradação do fármaco na forma complexada, este produto praticamente não foi detectado, mas observa-se um produto maioritário que eluiu com tempo de retenção 5,4 min e  $\lambda_{\text{máx.}} = 330 \text{ nm}$  e outros produtos minoritários que eluíram com tempos de retenção 9,0 e 9,9 min, indicando que o mecanismo principal de fotodegradação do 2-(2-nitrovinil) furano na forma de complexos de inclusão no estado sólido transcorre de forma diferente da sua forma livre (Figura 15 e 16).

A análise da amostra de complexo FD G-0/SBE- $\beta$ -CD irradiada em câmara climática de fotoestabilidade (Figura 17), mostrou o mesmo perfil de degradação que o obtido em condições forçadas porém, o produto de degradação com tempo de retenção de 9,9 min só foi possível detectar em injeção de amostra mais concentrada.

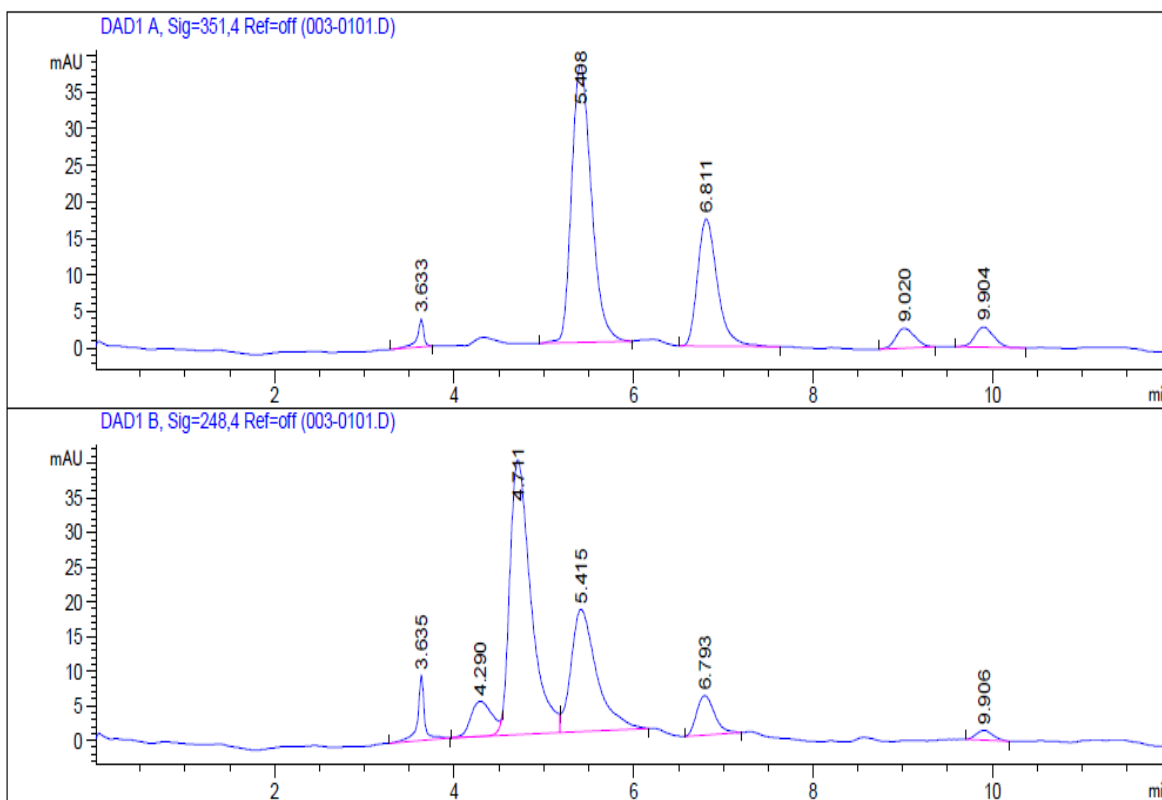


**Figura 15.** Cromatogramas da amostra de complexo FD G-0/HP- $\beta$ -CD, com 48 horas de exposição à luz UV, obtidos nos comprimentos de onda 351 nm (superior) e 248 nm (inferior).

Com o propósito de caracterizar os produtos de degradação, os compostos foram separados e analisados por espectroscopia de RMN. Previamente também foi analisado o complexo sem degradação para descartar impurezas que poderiam estar presentes antes da exposição. O espectro de massas (CG-MS) mostrou o íon radical molecular na relação massa/carga  $m/z$  139,1 que indica a presença da substância em estudo (Figura 18).

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 19) não mostraram presença de outras impurezas na amostra antes da degradação e confirmaram que o 2-(2-nitrovinil) furano está formando complexo de inclusão com as ciclodextrinas (Tabela 6).

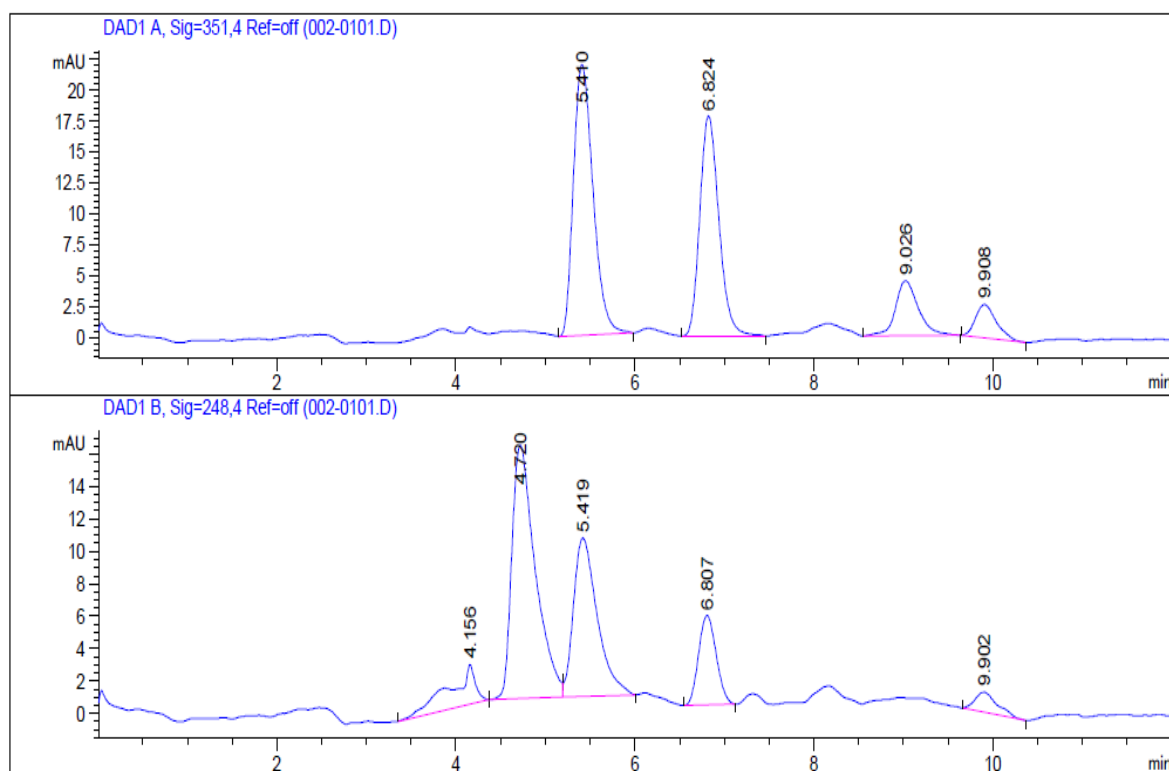


**Figura 16.** Cromatogramas da amostra de complexo FD G-0/SBE- $\beta$ -CD, com 48 horas de exposição à luz UV, obtidos nos comprimentos de onda 351 nm (superior) e 248 nm (inferior).

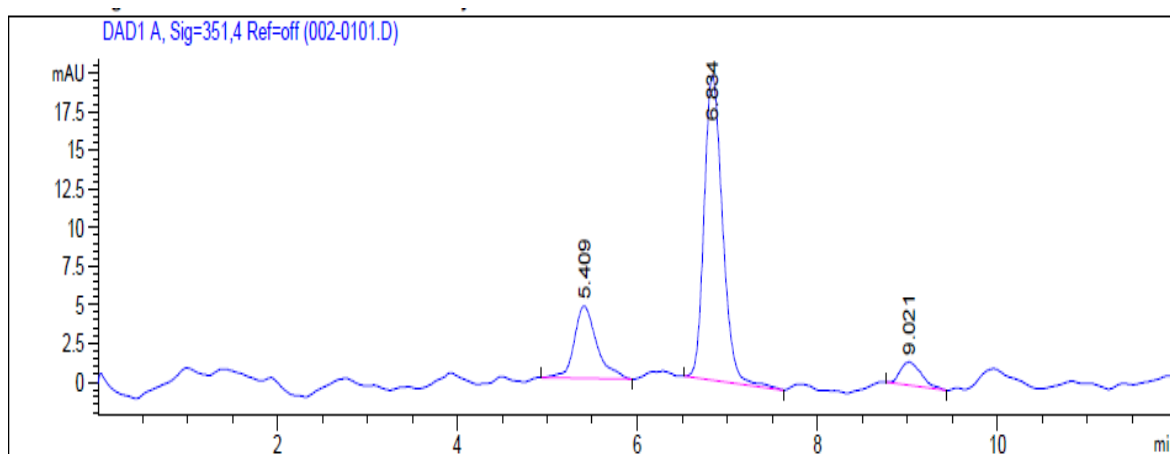


**Figura 17.** Cromatograma da amostra de complexo FD G-0/SBE- $\beta$ -CD, irradiada na câmara climática de fotoestabilidade (2 ciclos).

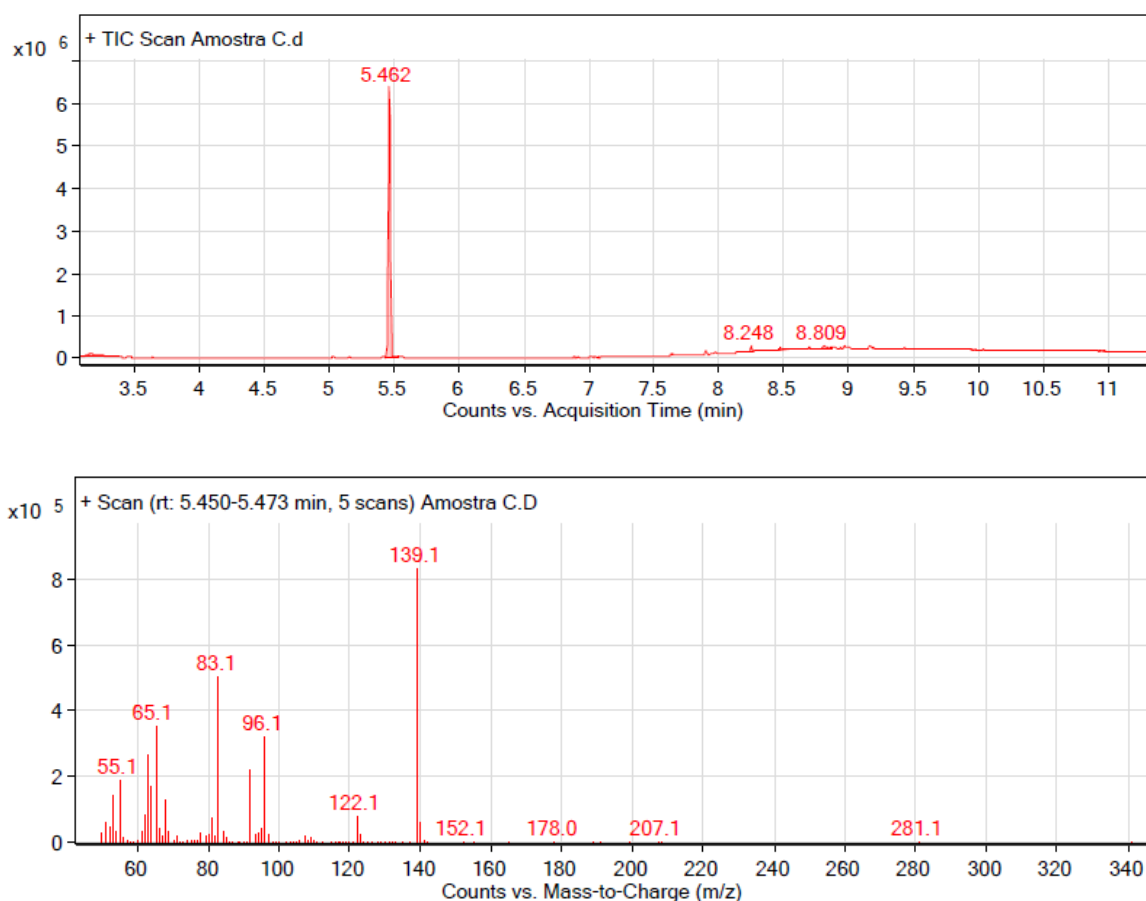


**Figura 18.** Cromatograma de ions totais (acima) e espectro de massas do pico referente ao tempo de retenção 5,46 min, em amostra de complexo antes da degradação, dissolvida em acetato de etila.

**Tabela 6.** Diferença nos deslocamentos químicos ( $\delta$ ) entre G-0 livre e na forma de complexo com HP- $\beta$ -CD.

| Prótons de G-0            | $\delta$ livre (ppm) | $\delta$ complexo (ppm) | $\Delta\delta$ (ppm) |
|---------------------------|----------------------|-------------------------|----------------------|
| H6 (d, J: 13,2 Hz)        | 7,8744               | 7,8436                  | -0,0308              |
| H2 (d, J: 1,5 Hz)         | 7,6423               | 7,7000                  | 0,0597               |
| H7 (d, J 13,2 Hz)         | 7,5935               | 7,5567                  | -0,0368              |
| H4 (d, J: 3,5 Hz)         | 7,0008               | 7,0404                  | 0,0396               |
| H3 (dd, J: 1,5 e 3,5) Hz) | 6,5711               | 6,6148                  | 0,0437               |

$\Delta\delta = \delta_{\text{complexo}} - \delta_{\text{livre}}$ ; d: dubleto; dd: duplo dubleto.

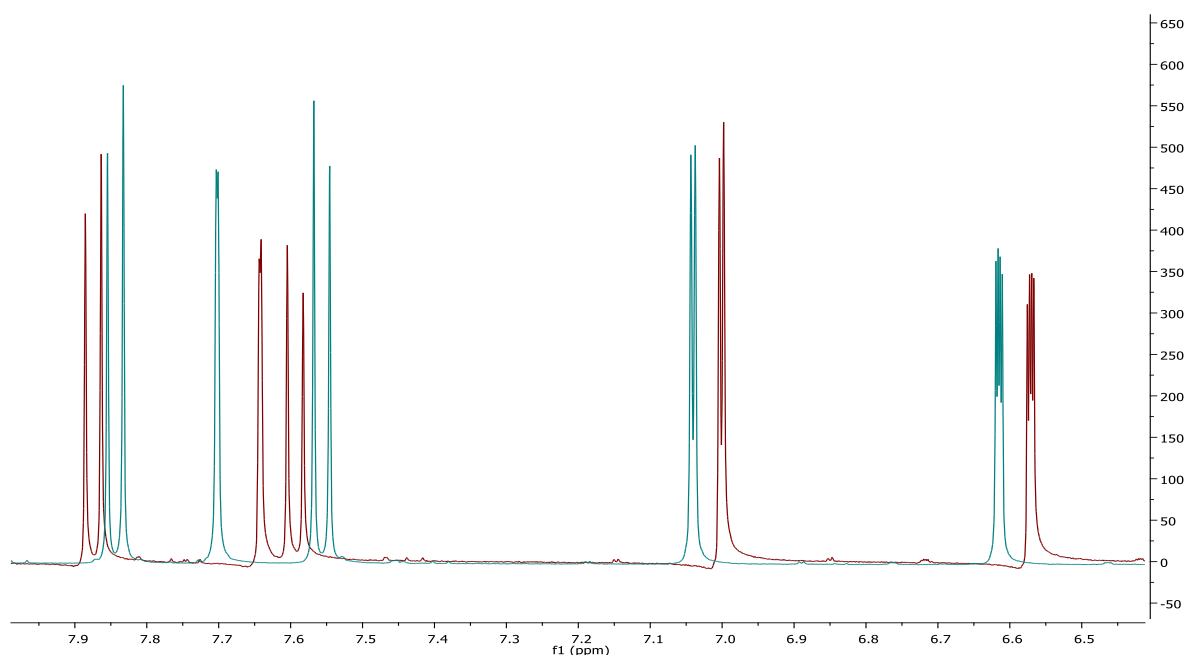


**Figura 19.** Espectro RMN  $^1\text{H}$  referente a: G-0 (vermelho); G-0 em complexo com HP- $\beta$ -CD (azul) em  $\text{D}_2\text{O}$ .

- *Caracterização do produto de fotodegradação 1 (PD1) por espectroscopia de RMN.*

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figuras 20-28) apresenta 8 sinais de hidrogênio na faixa de deslocamento químico entre 6,24 e 8,8 ppm, com multiplicidade (d, dd, ddd) consistente com sistemas altamente conjugados. Outros sinais que aparecem aproximadamente em 0,86 e 1,27 ppm correspondem à graxa proveniente da vidraria e o sinal que aparece em 1,91 ppm corresponde com o grupo metila do solvente residual (acetonitrila) (GOTTLIEB; KOTLYAR; NUDELMAN, 1997). Na integração dos sinais protônicos foi possível evidenciar a presença de dois sistemas de spin que poderiam corresponder a duas substâncias que coexistem na solução em relação aproximada de 1:3. A partir deste ponto, cada sistema é analisado de forma independente, com 4 sinais de hidrogênio para cada sistema que

chamaremos de H2 (H2'), H3 (H3'), H4 (H4') e H5 (H5') devido à similitude entre os sinais das duas moléculas.

A partir da medida das constantes de acoplamento foi possível determinar que o acoplamento dos hidrogênios H2-H3 e H2'-H3' é cis e que os átomos de hidrogênio H2-H4, H2'-H4'; H2-H5, H2'-H5' poderiam apresentar acoplamento a longa distância (alílico) ou com ângulo diedro (ângulo de torção) próximo a 90 °.

A presença de sinais de hidrogênio acima de 8 ppm (uma em cada molécula) é suspeita de presença de grupo retirador de elétrons ligado a carbono sp<sup>2</sup>, os quais afetam significativamente os deslocamentos químicos de prótons vinílicos através de ligações  $\pi$  (ressonância). Especificamente o hidrogênio vinílico do carbono  $\beta$  de um sistema carbonílico  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturado está mais desblindado (maior deslocamento químico) que o próton do carbono  $\alpha$ , devido à ressonância.

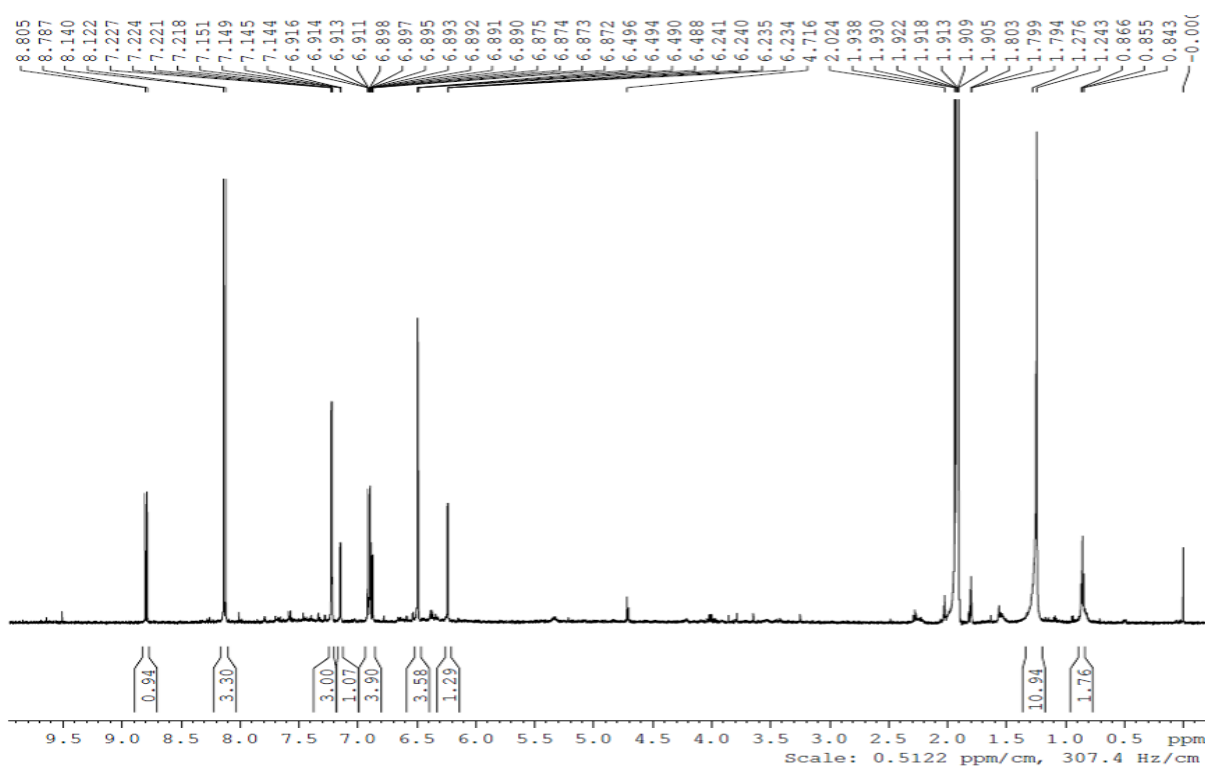


**Figura 20.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da amostra 1 em CD<sub>3</sub>CN

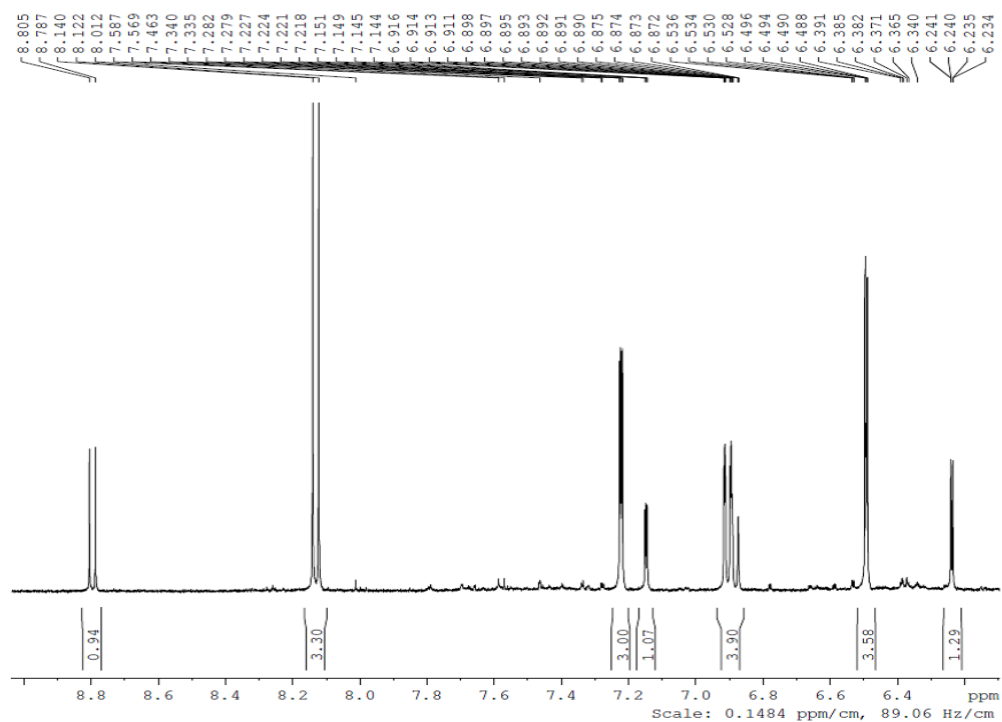


**Figura 21.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da amostra 1 em  $\text{CD}_3\text{CN}$  (expansão 1).

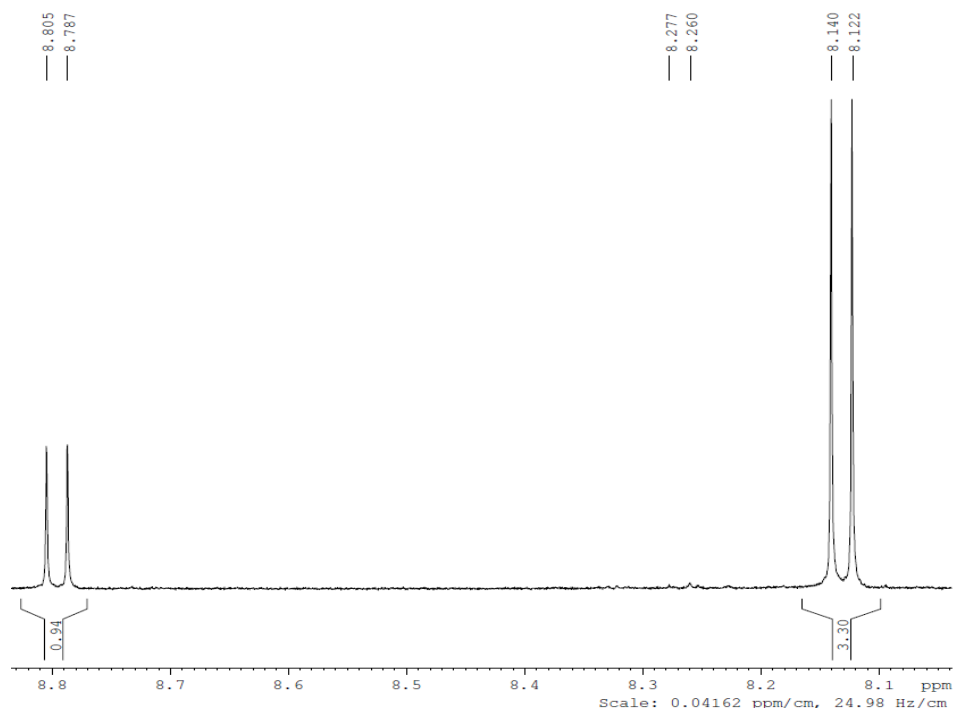


**Figura 22.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da amostra 1 em  $\text{CD}_3\text{CN}$  (expansão 2).

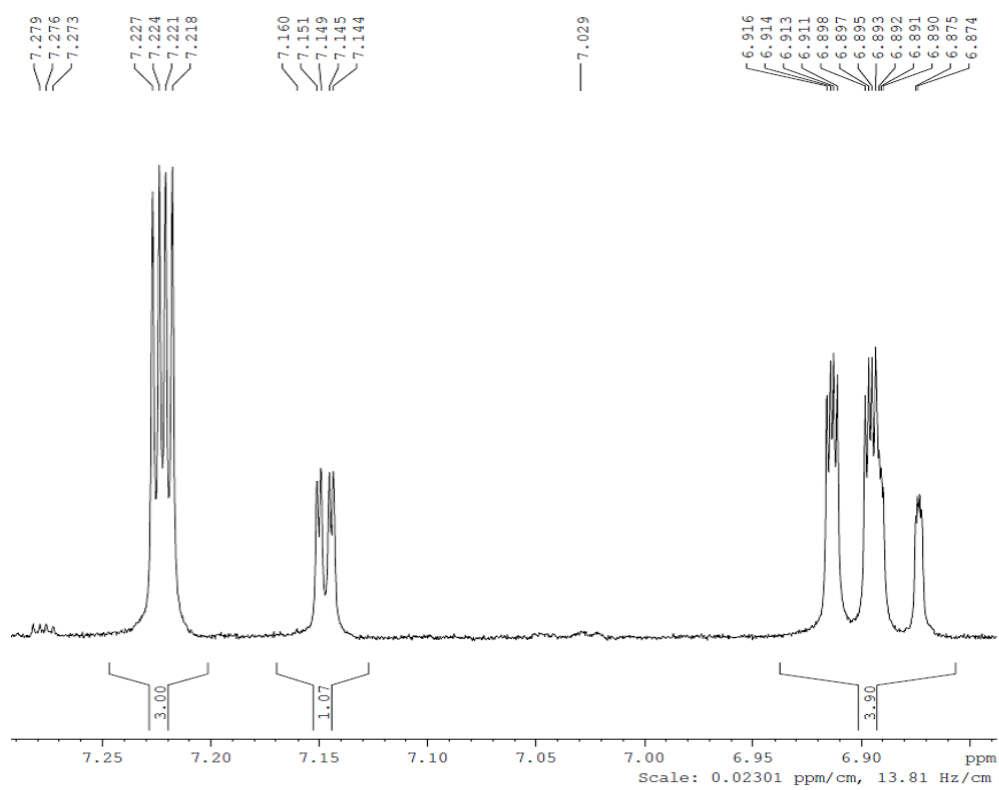


**Figura 23.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da amostra 1 em  $\text{CD}_3\text{CN}$  (expansão 3).

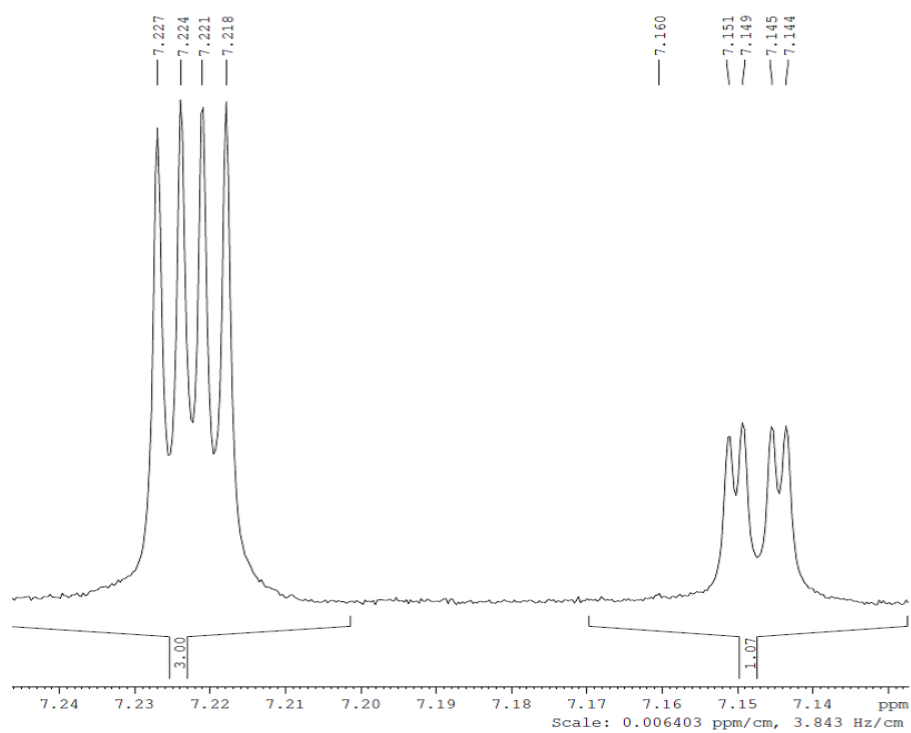


**Figura 24.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da amostra 1 em  $\text{CD}_3\text{CN}$  (expansão 4).

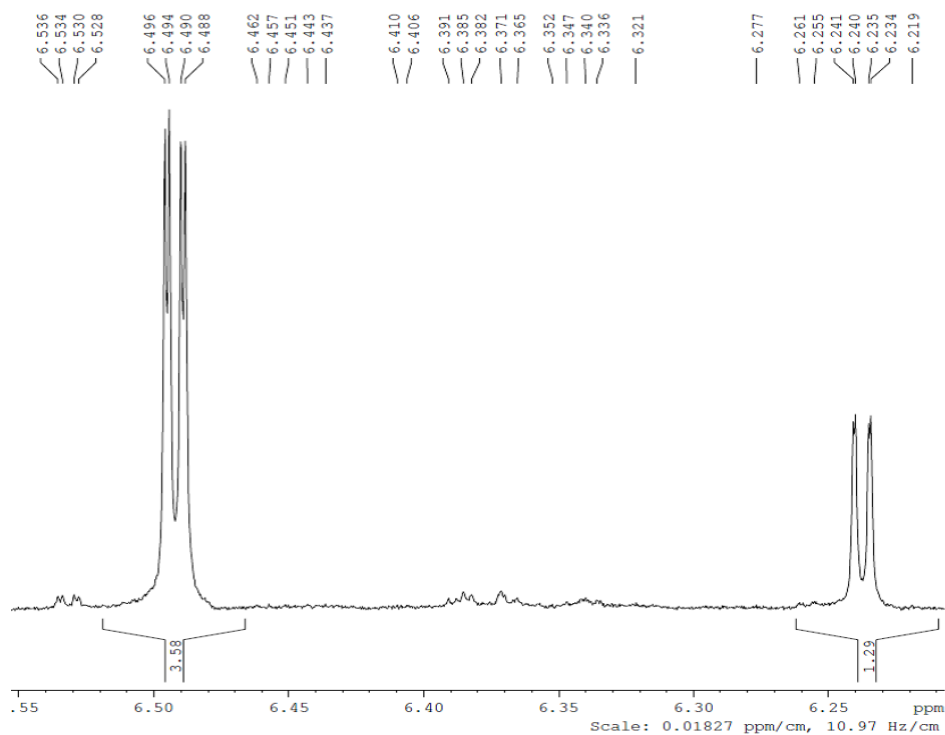


**Figura 25.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da amostra 1 em  $\text{CD}_3\text{CN}$  (expansão 5).

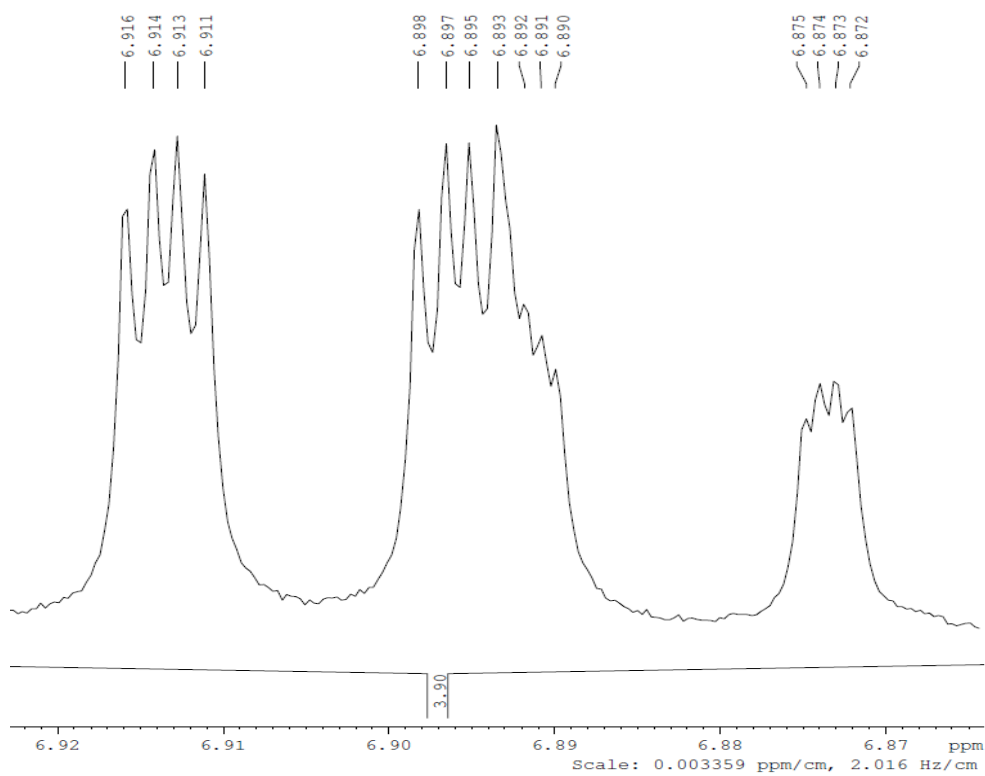


**Figura 26.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da amostra 1 em  $\text{CD}_3\text{CN}$  (expansão 6).

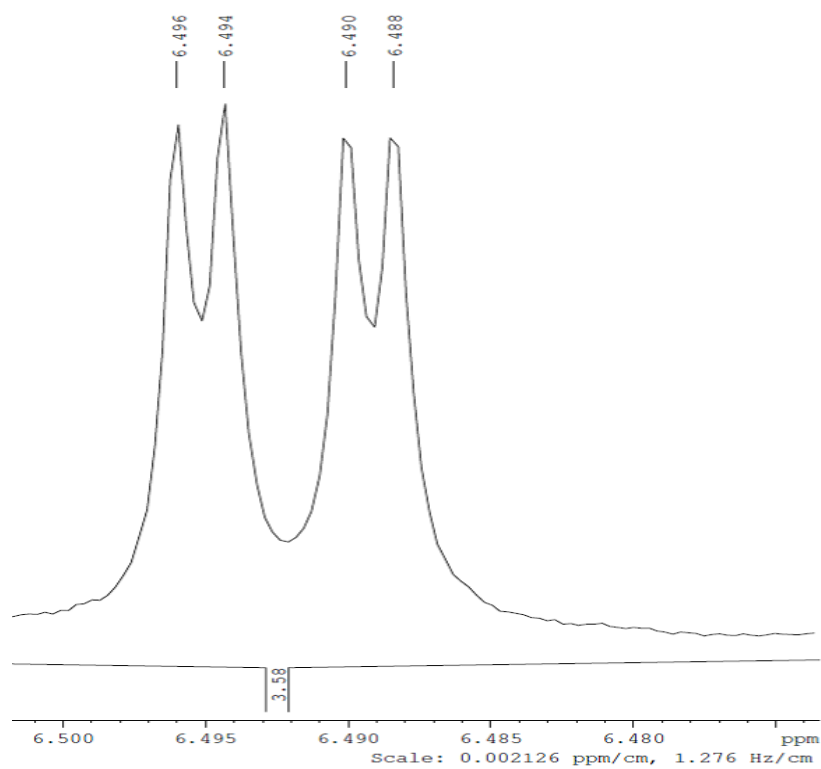


**Figura 27.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da amostra 1 em  $\text{CD}_3\text{CN}$  (expansão 7).

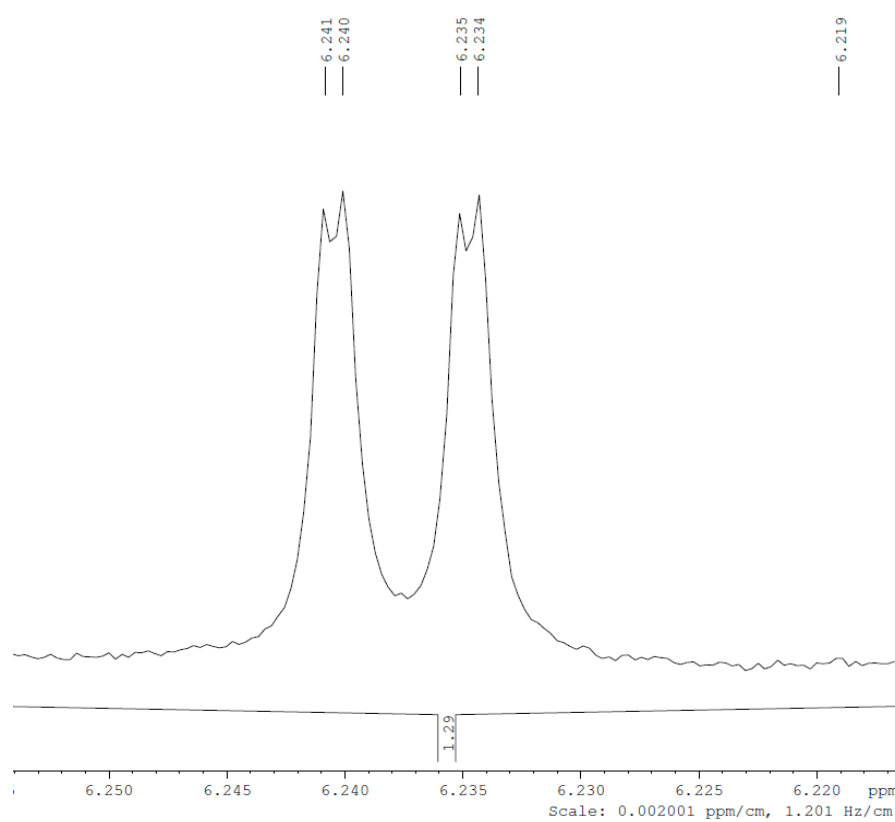


**Figura 28.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da amostra 1 em  $\text{CD}_3\text{CN}$  (expansão 8).

Outro grupo retirador de elétron que pode apresentar as moléculas da mistura é o grupo nitro, presente no fármaco de partida, com efeito de desblindagem sobre os prótons em posição  $\alpha$  com relação a ele.

No espectro RMN de  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  da Figura 29, são visíveis 9 sinais entre os 109 e 168 ppm que correspondem aos compostos sob análise e outros sinais provenientes de impurezas ( $\delta=0.5$  ppm e 29.3 ppm) e do grupo ciano do acetonitrila ( $\delta=117.3$  ppm). Os carbonos com deslocamentos químicos entre 100 e 150 ppm são do tipo  $=\text{C}$ , enquanto o sinal que aparece em 168 ppm pode ser atribuído a agrupamento carboxila ou carboxilato. A ausência do sinal do hidrogênio carboxílico no RMN  $^1\text{H}$  pode estar associada à troca intermolecular, que excede a velocidade de detecção do RMN.

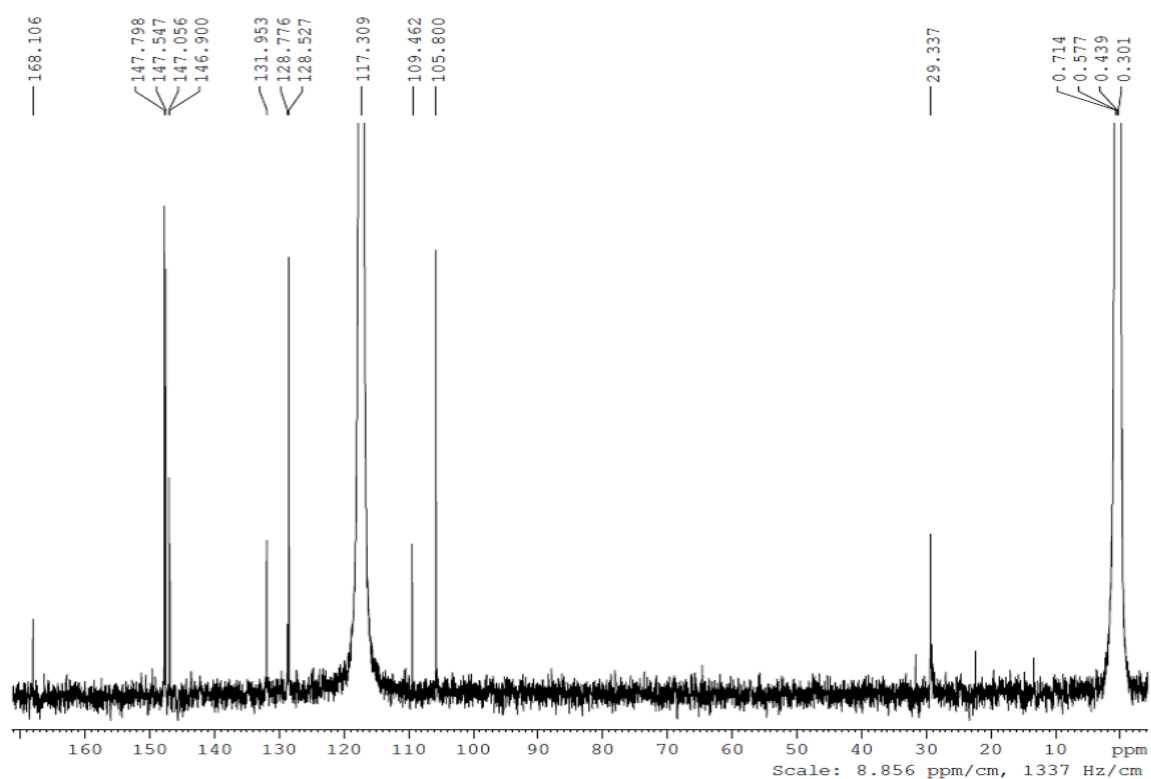


**Figura 29.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  da amostra 1 em  $\text{CD}_3\text{CN}$ .

É preciso destacar que nos espectros RMN de  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  alguns sinais fracos podem-se perder no ruído e que centenas de espectros são tirados, aparecendo só a média, pelo qual a presença de alguns carbonos podem ser inferida pela visualização de outro tipo de espectros como HSQC ou HMBC.

Os métodos de análise espectroscópica bidimensionais (RMN 2D) constituem um conjunto de métodos que oferecem a plotagem dos dados no espaço definido por dois eixos de frequência, proporcionando mais informação acerca da estrutura da molécula em estudo. Entre elas, a espectroscopia de correlação homonuclear (COSY) mostra as frequências para um isótopo, o hidrogênio ( $^1\text{H}$ ), nos dois eixos. Os picos de cruzamento no COSY são indicativos de acoplamento entre um par de núcleos e são o resultado do fenômeno conhecido como transferência de magnetização. Como resultado do espectro COSY mostrado na Figura 30, foi detectado o acoplamento à curta distância entre os hidrogênios H2-H3 (H2'-H3') e H4-H5 (H4'-H5'), para ambas as substâncias (maioritária e minoritária).

Por sua parte, a Espectroscopia de Correlação Heteronuclear oferece sinais baseados no acoplamento de dois tipos de núcleos diferentes, normalmente prótons e outro núcleo (heteronúcleo). No presente estudo, a espectroscopia de Correlação Heteronuclear de Quantum-Simples (HSQC) foi utilizada para detectar correlações entre os núcleos de hidrogênio e carbono separados por uma ligação, que é visualizado no mapa de contorno como um pico de cruzamento (Figuras 31 e 32). O resultado da correlação é mostrado nas Tabelas 7 e 8, verificando a correlação entre cada carbono com só um átomo de hidrogênio (CH) e a não existência de conectividade direta entre os carbonos com deslocamento químico em 168.1 ppm (substância maioritária) e em 166.3 ppm (substância minoritária)

com átomos de hidrogênio, confirmando a proposta do carbono carboxílico ou carboxilato geminal. A ausência de carbono  $\text{CH}_2$  também é verificada no HSQC, pois eles aparecem no espectro editado em fase oposta aos carbonos  $\text{CH}$  e  $\text{CH}_3$  (normalmente cor vermelha para  $\text{CH}_2$ ).

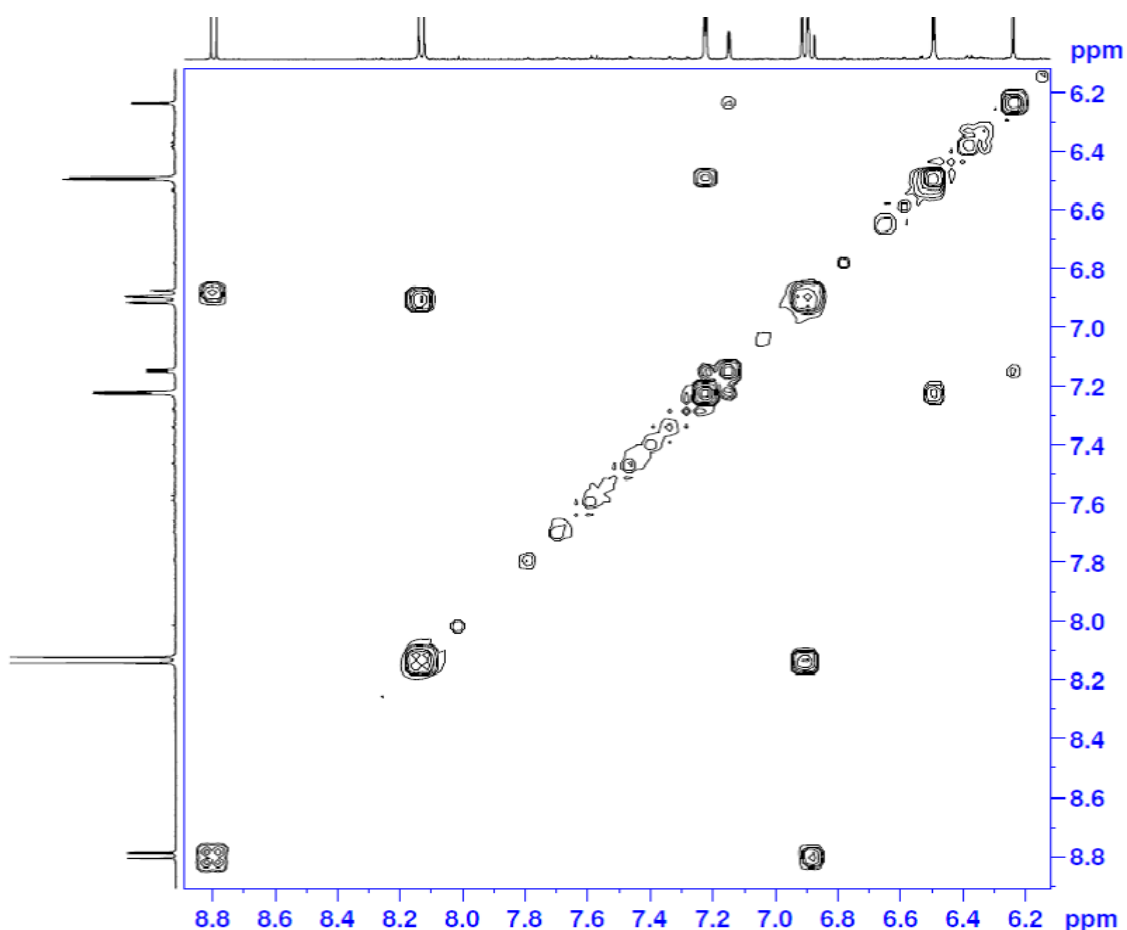


**Figura 30.** Mapa de contorno COSY da amostra 1 em  $\text{CD}_3\text{CN}$ .

A Espectroscopia Heteronuclear a Múltiplas Ligações (HMBC) foi utilizada para detectar correlações entre carbono e hidrogênio acima de 2-4 ligações, suprimindo preferencialmente os sinais de ligação simples (correlação direta). Os espectros são mostrados nas Figuras 33-35 e as correlações descritas nas Tabelas 7 e 8.

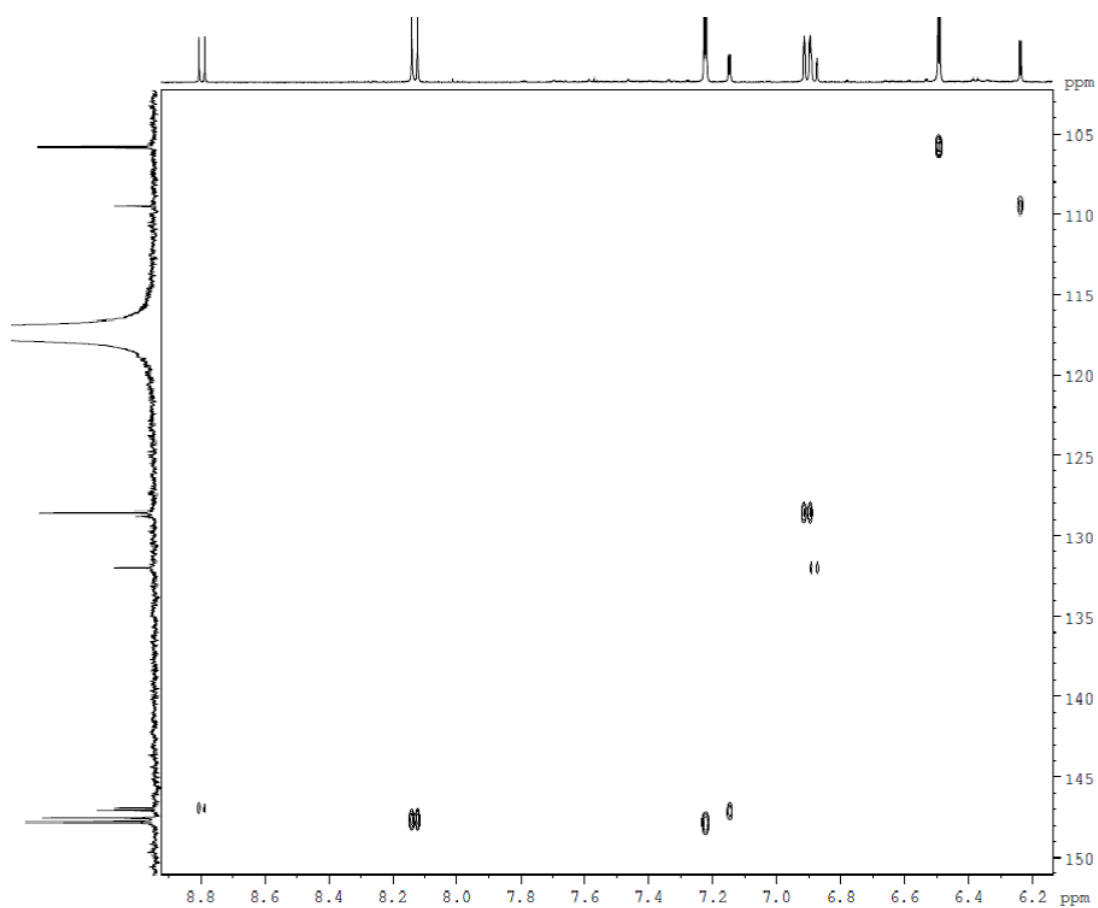


**Figura 31.** Mapa de contorno HSQC da amostra 1 em  $\text{CD}_3\text{CN}$ .

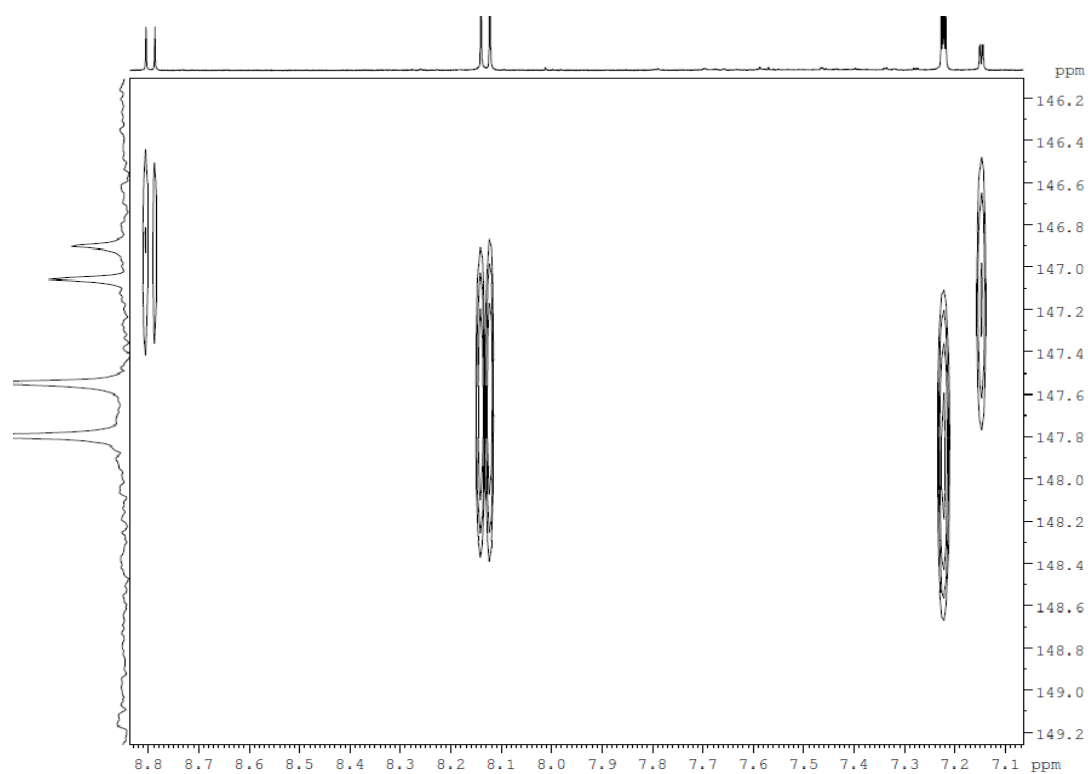


**Figura 32.** Mapa de contorno HSQC da amostra 1 em  $\text{CD}_3\text{CN}$  (expansão 1)

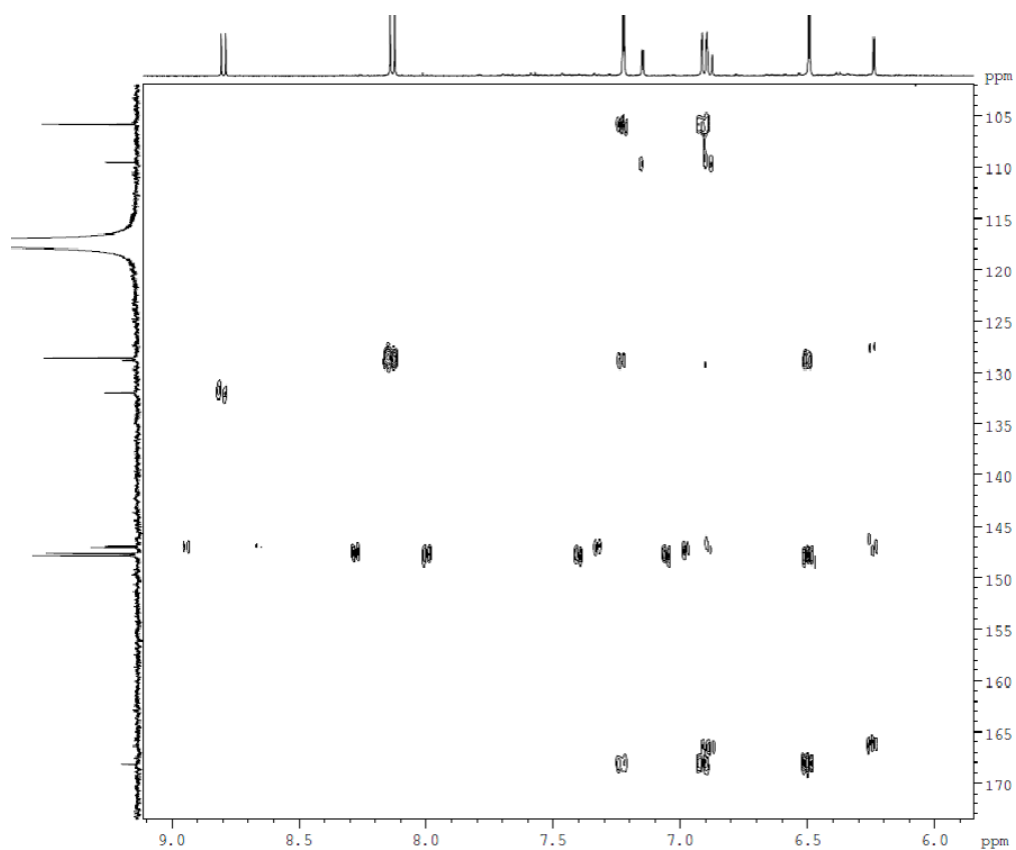


**Figura 33.** Mapa de contorno HMBC da amostra 1 em  $\text{CD}_3\text{CN}$ .

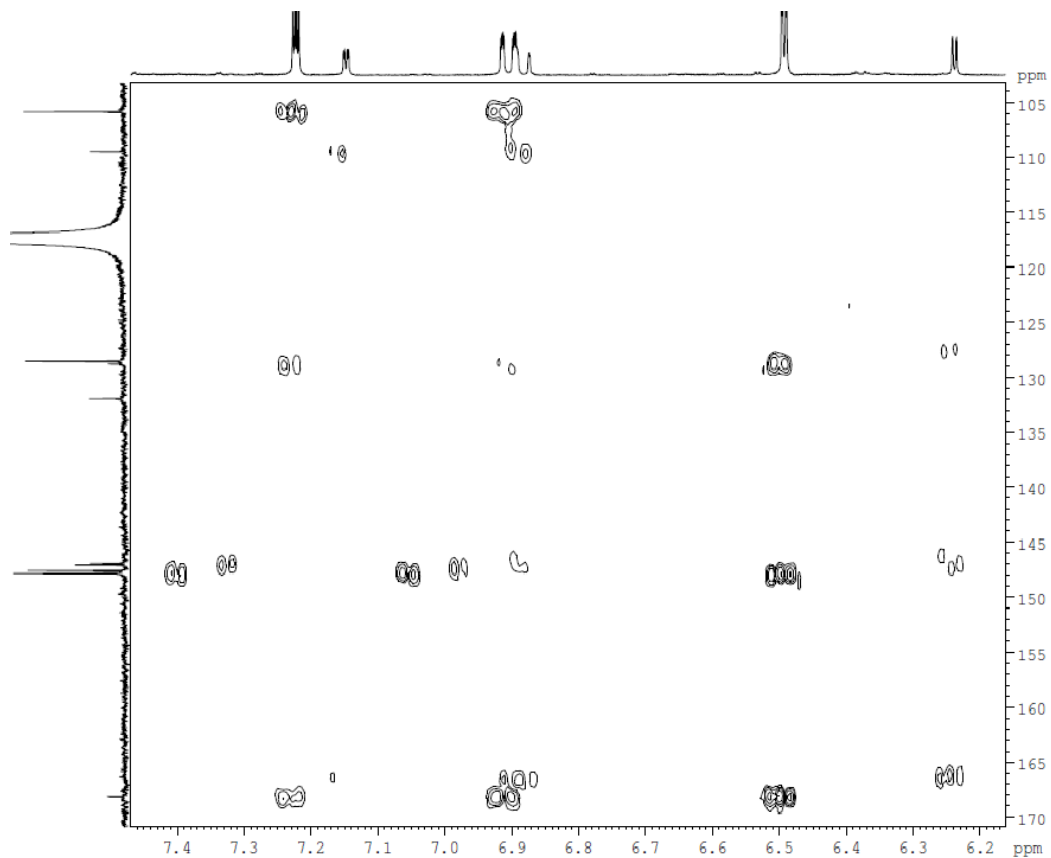


**Figura 34.** Mapa de contorno HMBC da amostra 1 em  $\text{CD}_3\text{CN}$  (expansão 1)

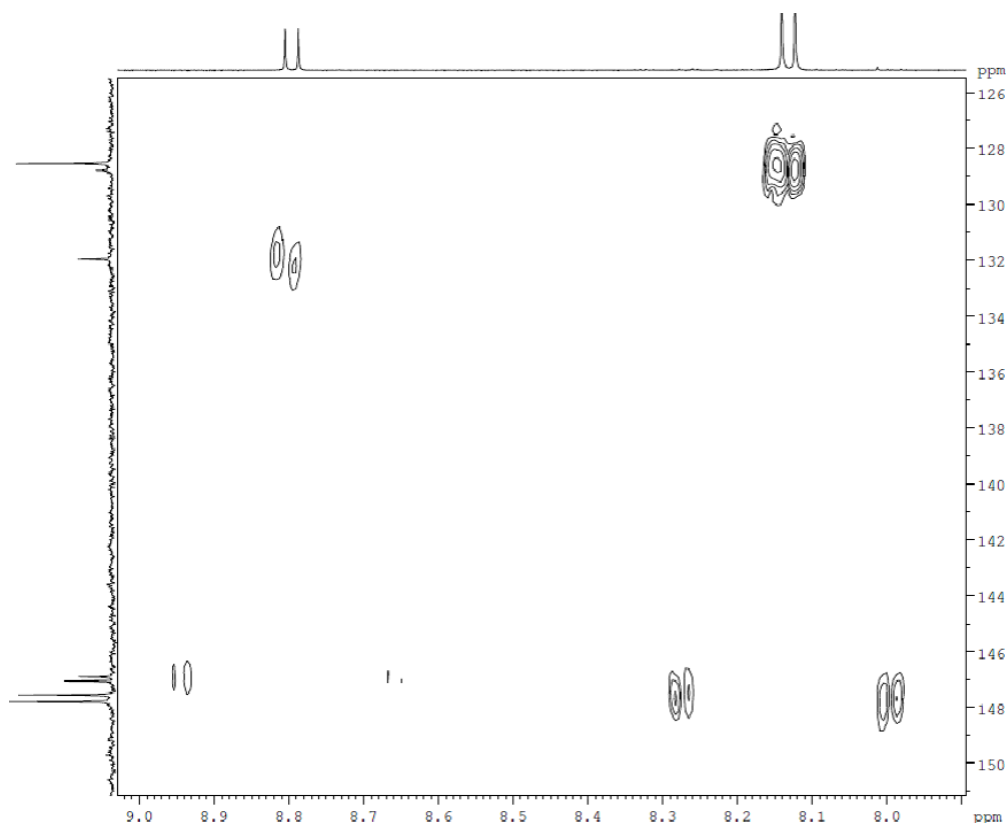


**Figura 35.** Mapa de contorno HMBC da amostra 1 em CD<sub>3</sub>CN (expansão 2).

Alguns sinais de correlação esperados não foram detectados no HMBC, existindo vários parâmetros que podem influir neste resultado, entre eles: o ângulo diedro da ligação, os tipos de orbitais envolvidos, a constante à longa distância escolhida pelo experimentador e o número de varreduras para obter o espectro (BALCI, 2005). Também foram observadas duas ligações diretas (C3-H3, C3'-H3'; C5-H5, C5'-H5') que aparecem no mapa de contorno como dois sinais simétricos do carbono com relação a um hidrogênio particular e que já tinham sido detectadas no HSQC.

As Tabelas 7 e 8 apresentam o resumo das atribuições dos deslocamentos químicos  $\delta$  (ppm) e constantes de acoplamento  $J$  (Hz), baseadas nos valores encontrados nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C} \{^1\text{H}\}$ , e nas correlações encontradas nos mapas de contorno COSY, HSQC e HMBC para as duas moléculas. O

esquema da Figura 36 propõe um equilíbrio entre as estruturas referentes aos dois compostos, minoritários e majoritário, coexistindo na mesma solução.

**Tabela 7.** Deslocamentos químicos  $\delta$  (ppm), constantes de acoplamento  $J$  (Hz) e correlações para o composto majoritário presente na amostra 1 (PD1) em  $CD_3CN$ .

| n | $^1H$                             | $^{13}C$ / Tipo | $^{13}C$ (*) | HMBC                        |
|---|-----------------------------------|-----------------|--------------|-----------------------------|
| 1 | -                                 | 168,1/ C        | 173,9        | -                           |
| 2 | 6,90 (ddd, J: 1,00; 1,95 e 10,60) | 128,5/ -CH      | 132,9        | 105,8 e 168,1               |
| 3 | 8,13 (d, J: 10,60)                | 147,5/ -CH      | 143,1        | 128,5, 147,5                |
| 4 | 6,49 (dd, J: 1,00 e 3,59)         | 105,8/ -CH      | 108,9        | 128,5, 147,5, 147,8 e 168,1 |
| 5 | 7,22 (dd, J: 1,95 e 3,59)         | 147,8/ -CH      | 144,0        | 105,8, 128,5, 147,8 e 168,1 |

(\*) Deslocamentos químicos estimados com base nos cálculos desenvolvidos no software ACD/Lab.

d: dubleto, dd: duplo dubleto, ddd: duplo duplo dubleto.

**Tabela 8.** Deslocamentos químicos  $\delta$  (ppm), constantes de acoplamento  $J$  (Hz) e correlações para o composto minoritário presente na amostra 1(PD1) em  $CD_3CN$ .

| n  | $^1H$                             | $^{13}C$ / Tipo | $^{13}C$ (*) | HMBC                       |
|----|-----------------------------------|-----------------|--------------|----------------------------|
| 1' | -                                 | 166,3/ C        | 168,4        | -                          |
| 2' | 6,88 (ddd, J: 0,55; 1,17 e 10,63) | 132,0/ -CH      | 129,1        | 109,5, 146,9 147,1 e 166,3 |
| 3' | 8,80 (d, J: 10,63)                | 146,9/ -CH      | 147,9        | 132,0                      |
| 4' | 6,24 (dd, J: 0,55 e 3,46)         | 109,5/ -CH      | 107,5        | 146,9, 147,1 e 166,3       |
| 5' | 7,15 (dd, J: 1,17 e 3,46)         | 147,1/ -CH      | 147,8        | 109,5 e 166,3              |

(\*) Deslocamentos químicos estimados com base nos cálculos desenvolvidos no software ACD/Lab.

d: dubleto, dd: duplo dubleto, ddd: duplo duplo dubleto.

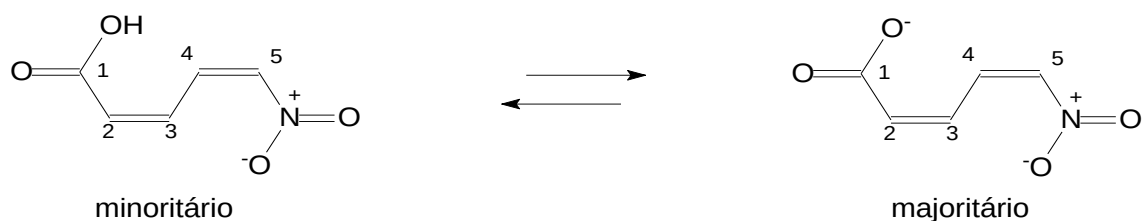


**Figura 36.** Representação esquemática da proposta de estruturas presentes na amostra 1 (PD1) determinadas por espectroscopia de RMN, como resultado da fotodegradação do G-0 em complexos com ciclodextrinas no estado sólido.

O 2-(2-nitrovinil) furano é uma substância fotossensível no estado sólido. O produto de fotodegradação caracterizado foi um dímero, com  $\lambda_{\text{max}} = 248 \text{ nm}$  na mistura metanol/água (80:20, v/v) e relação massa/carga do íon molecular  $m/z$  277 utilizando LC-MS com interfase de Electrospray (ESI) no modo negativo (DE ROJAS, 2006). A formação de produtos maioritários não diméricos proposta no presente estudo, indica que este tipo de reação pode estar impedido devido à forma na que o G-0 está situado na cavidade destas ciclodextrinas, limitando interações intermoleculares do fármaco, porém não limitando a fotodegradação.

As ciclodextrinas apresentam na sua superfície interna um entorno hidrofóbico devido à presença de oxigênios glicosídicos eletronicamente enriquecidos. Como resultado da complexação de moléculas nessa cavidade, ocorrem modificações de diversas propriedades físico-químicas do fármaco, como a solubilidade, propriedades espectrais e reatividade química da substância incluída. As CDs podem influenciar a orientação molecular das substâncias e a velocidade e eficiência na transferência de elétrons, transferência de prótons no estado excitado e velocidade de decomposição de substâncias (CHATTOPADHYAY, 1991; FOX, 1991; SUR; PURKAYASTHA; CHATTOPADHYAY, 2000). Podem ser

impostas restrições físicas e químicas na evolução de intermediários, embora o modo de complexação (estequiometria, geometria) altera o estado fundamental, o qual pode influenciar a distribuição de fotoprodutos estáveis (TONNESEN, 2004). Também é conhecido que diferentes ciclodextrinas podem alterar de forma diferente as características fotofísicas de uma molécula, ou seja, uma substância pode ser estável quando incluída em uma ciclodextrina, embora na presença de outra o composto possa -se tornar fotoreativo. Este comportamento é atribuído à diferença na conformação dos diferentes complexos formados. O efeito fotoestabilizante da formação de complexos de inclusão com ciclodextrinas com diversos compostos tem sido amplamente estudado. No entanto, a formação de complexos nem sempre contribui para melhorar a fotoestabilidade da molécula hóspede (TONNESEN, 2004), como demonstrado para a molsidomina, naproxeno e flutamida (PIEL et al., 1996; JIMÉNEZ; MIRANDA; TORMOS, 1997; SORTINO et al., 2001).

A confirmação da proposta para os compostos (PD1) deverá ser desenvolvida futuramente, utilizando outros métodos espectroscópicos como a espectrometria de massas e a espectroscopia de infravermelho para o análise de grupos funcionais.

#### *5.1.3. Efeito das ciclodextrinas na volatilização do G-0.*

As curvas TG/DTG foram obtidas usando razão de aquecimento de 2,5 °C.min<sup>-1</sup> para detectar o início da sublimação e a fusão, observadas na curva DTG, sendo que nas outras condições de aquecimento só foi possível detectar a perda de massa referente à vaporização do composto após a fusão (Figuras 37 e 38).

Como observado nas figuras, os fenômenos de sublimação-fusão-vaporização ocorrem de forma subsequente.

O comportamento térmico típico da HP- $\beta$ -CD está caracterizado por uma perda de massa em temperaturas próximas aos 100 °C associada à desidratação e posterior perda próxima aos 300 °C associada à decomposição (ZHENG; CHOW, 2009, MONDJINO et al., 2015). No presente trabalho, a perda de massa total foi de 90,52 %, sendo 7,17 % referente à desidratação na primeira etapa e o restante, à decomposição. A mistura física contendo 2% (m/m) do composto furânico mostrou perda de massa total de 100 %, dos quais 10,21 % correspondem à primeira etapa, verificando volatilização do composto ativo posterior aos 100 °C como mostrado na curva de DTG e menor ao observado para o fármaco livre devido a que a mistura apresenta menor pureza e massa de G-0. Entretanto, o complexo de inclusão liofilizado apresentou perda de só 1,7 % na primeira etapa e perdas totais de 90,99 % (Figura 39).

No caso da SBE- $\beta$ -CD, as múltiplas perdas observadas na Figura 40, são associadas à desidratação, processos de extrusão e/ou ruptura (perda de H<sub>2</sub>O, SO<sub>2</sub> e butanosulfona) das modificações da ciclodextrina. A primeira perda calculada até os 227 °C foi de 12,56 %, a segunda de 21,46 % até os 315 °C e a terceira de 23,51 %. O total de perdas calculado foi de 57,18 %. O comportamento da mistura física foi similar, mas as perdas na primeira e segunda etapa foram de 13,24 % e 25,50 %, valores superiores aos obtidos para a ciclodextrina individual, o que poderia indicar a perda da substância ativa que se encontrava misturada com o excipiente. Entanto o complexo já apresentou uma notável redução nas perdas de massa na primeira etapa, com só 2,6 %. As segunda e terceira etapas mostraram perdas de 22,77 % e 22,95 %, similares as da ciclodextrina.

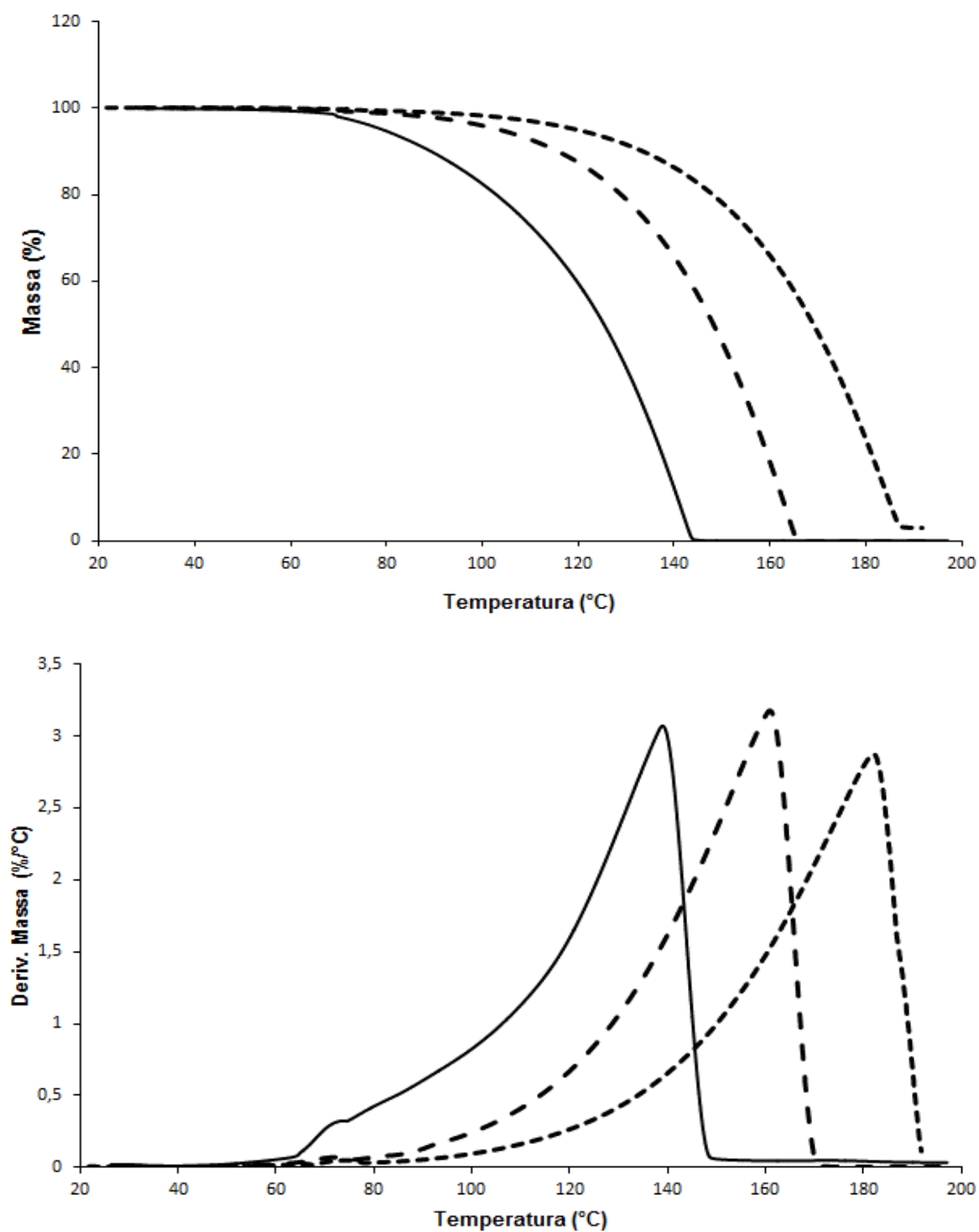


**Figura 37.** Curvas de análise termogravimétrica: a) TG, b) DTG do 2-(2-nitrovinil) furano registradas para três razões de aquecimento (10 °C.min<sup>-1</sup> linha de ponto, 5 °C.min<sup>-1</sup> linha descontínua e 2,5 °C.min<sup>-1</sup> linha sólida).

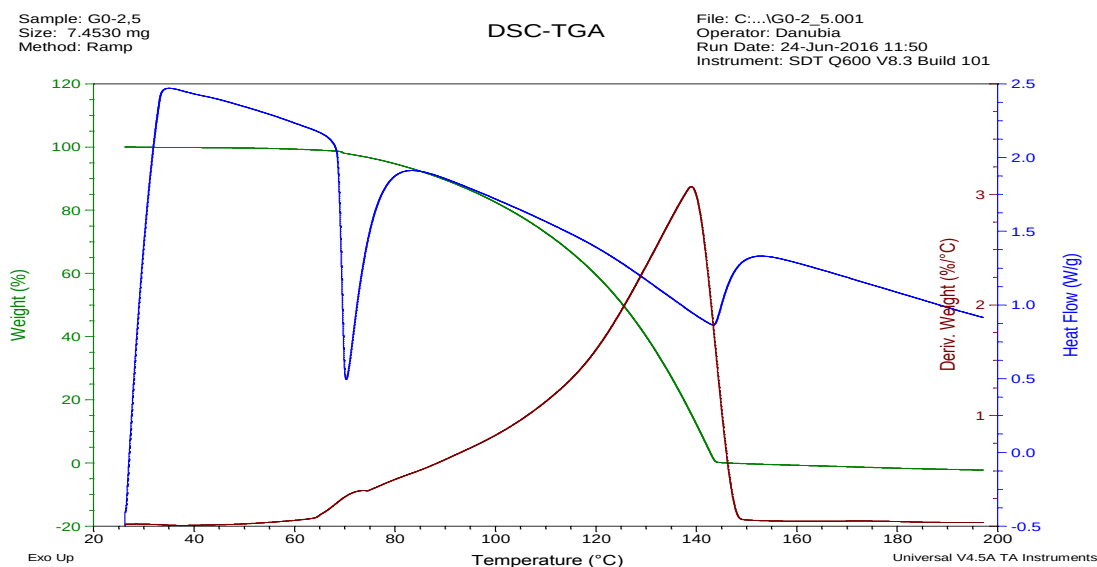


**Figura 38.** Curvas TG-DTG/DSC obtidas com razão de aquecimento  $2,5\text{ }^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$  com cadinho aberto para o 2-(2-nitrovinil) furano sob atmosfera de nitrogênio.

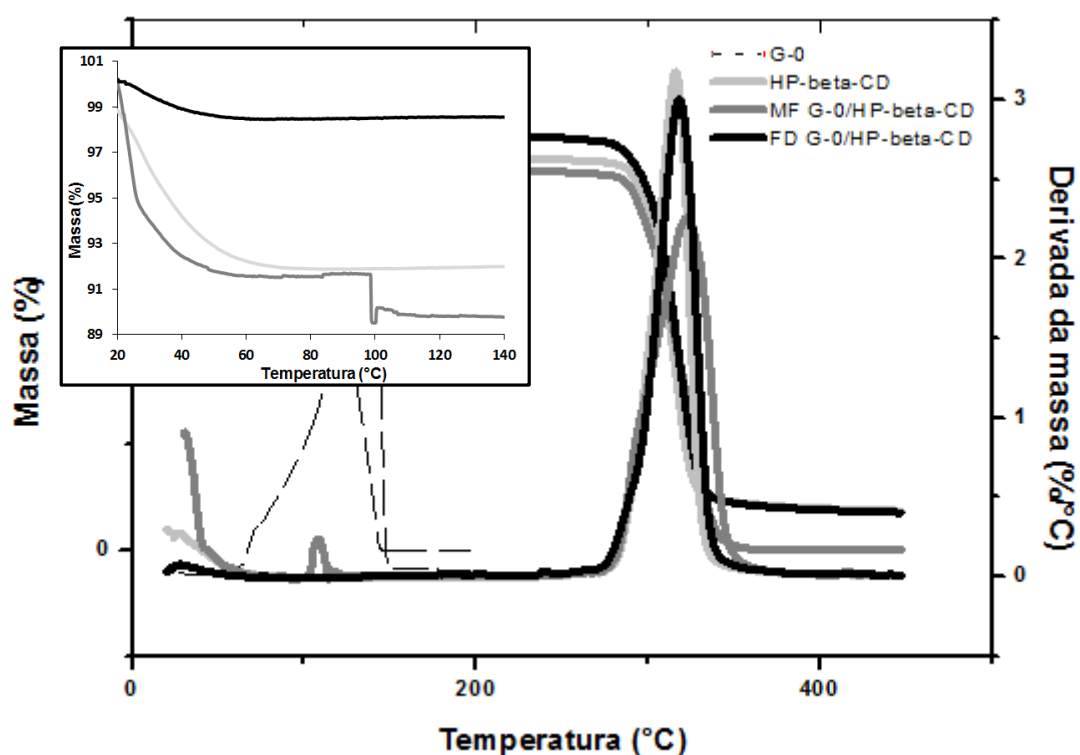


**Figura 39.** Curvas TG/DTG para G-0, HP- $\beta$ -CD, mistura física G-0/HP- $\beta$ -CD e complexo de inclusão FD G-0/HP- $\beta$ -CD, obtidas com razão de aquecimento  $2,5^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ .

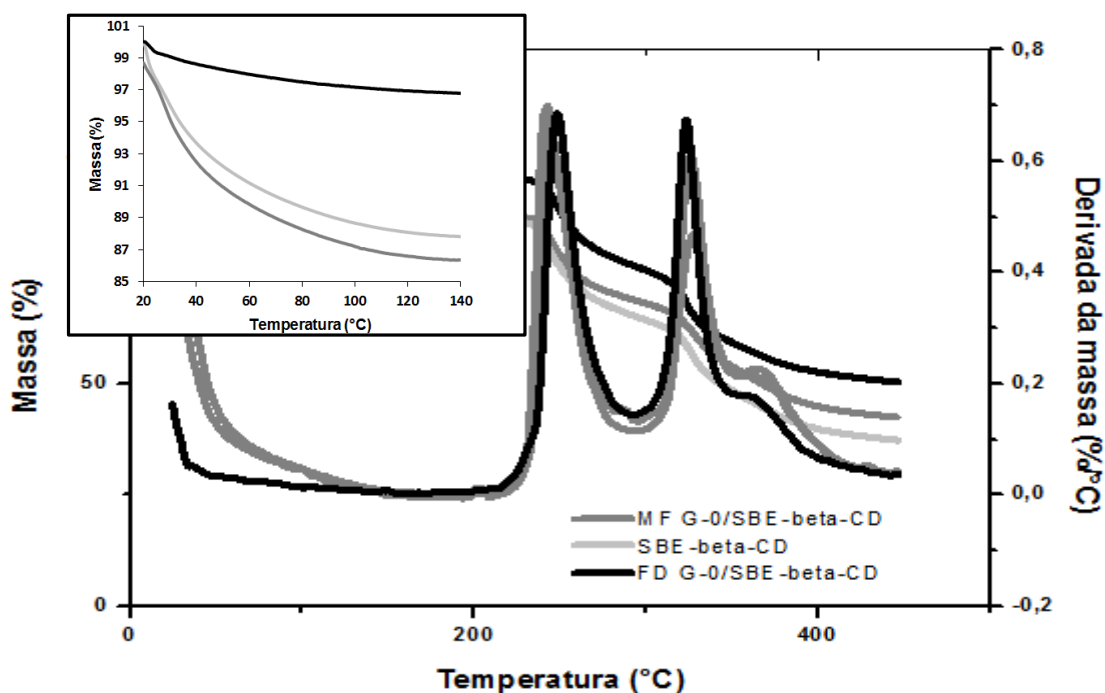


**Figura 40.** Curvas TG/DTG para SBE- $\beta$ -CD, mistura física G-0/SBE- $\beta$ -CD e complexo de inclusão FD G-0/SBE- $\beta$ -CD, obtidas com razão de aquecimento 2,5 °C.min<sup>-1</sup>.

Considerando um estudo prévio desenvolvido por titulação Karl-Fischer (não publicado) o qual determinou que o conteúdo de umidade residual do complexo recém preparado FD G-0/SBE- $\beta$ -CD foi de  $2,39 \pm 0,25$  %, conclui-se que as perdas associadas à volatilização de G-0, determinadas por TGA, foram de 0,21%, o que corresponde a 11,3 % do conteúdo inicial de G-0 no complexo. No caso do complexo FD G-0/HP- $\beta$ -CD o conteúdo de umidade residual foi de  $1,83 \pm 0,22$ %, sendo as perdas detectadas na primeira etapa por TGA menores que este valor, não foram consideradas como perdas devido à volatilização da substância.

Com o propósito de confirmar a possibilidade de proteção frente à sublimação por formação de complexos de inclusão com ciclodextrinas, este fenômeno também foi avaliado utilizando a técnica de CG-Headspace-FID.

O estabelecimento do método de análise esteve baseado na metodologia anteriormente utilizada para a determinação do G-0 por CG-MS, com modificações para Headspace. Para conseguir uma resposta cromatográfica adequada, alguns parâmetros instrumentais foram testados, entre eles o tempo de agitação na etapa de incubação (10 e 30 min), a temperatura de aquecimento da seringa (50 e 100 °C), o volume de injeção (0,5, 1 e 2 mL), a razão de Split (1:100, 1:10) ou modo splitless, e a temperatura do forno. Uma vez estabelecidos os parâmetros, foi desenvolvido o análise das amostras submetidas em condições de sublimação. O G-0 sublimado de cada amostra (mistura física ou complexo liofilizado) incubada a 50 °C, foi estimado por determinação das áreas relativas dos picos que apareciam com tempo de retenção  $4,3 \pm 0,1$  min, referentes ao G-0, com relação à forma livre de massa equivalente. A Tabela 9 ilustra os resultados obtidos.

**Tabela 9.** Determinação do G-0 sublimado a 50 °C por CG-HS-FID

| Amostra                     | Massa* (mg) | Área de pico ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ ) | Área relativa** (%) |
|-----------------------------|-------------|---------------------------------------------|---------------------|
| G-0                         | 9,6         | 15558529                                    | 100                 |
| MF (G-0 + HP- $\beta$ -CD)  | 9,6 + 470   | 6742888                                     | 43,34               |
| FD G-0/HP- $\beta$ -CD      | 479,6       | 152177                                      | 0,97                |
| MF (G-0 + SBE- $\beta$ -CD) | 9,6 + 470   | 4221587.5                                   | 27,28               |
| FD G-0/SBE- $\beta$ -CD     | 479,7       | 694758.5                                    | 4,47                |

\* Massa de amostra pesada no vial de Headspace.

\*\* Área relativa calculada como a relação porcentual entre a área do pico da mistura física ou complexo liofilizado e a área do pico do fármaco livre sublimado.

Como resultado deste estudo foi confirmada a notável diminuição da sublimação do fármaco quando forma complexo de inclusão com as ciclodextrinas (Figura 41). Também nas misturas físicas observou-se menor quantidade de fármaco no estado de vapor que na forma livre, o que poderia estar associado à maior espessura da camada de material sólido que deve recorrer o G-0 quando misturado com o excipiente nestas condições experimentais e/ou algum tipo de interação do G-0 com a ciclodextrina, considerando que o método de aquecimento em recipiente fechado também é utilizado para obtenção de complexos com substâncias voláteis.

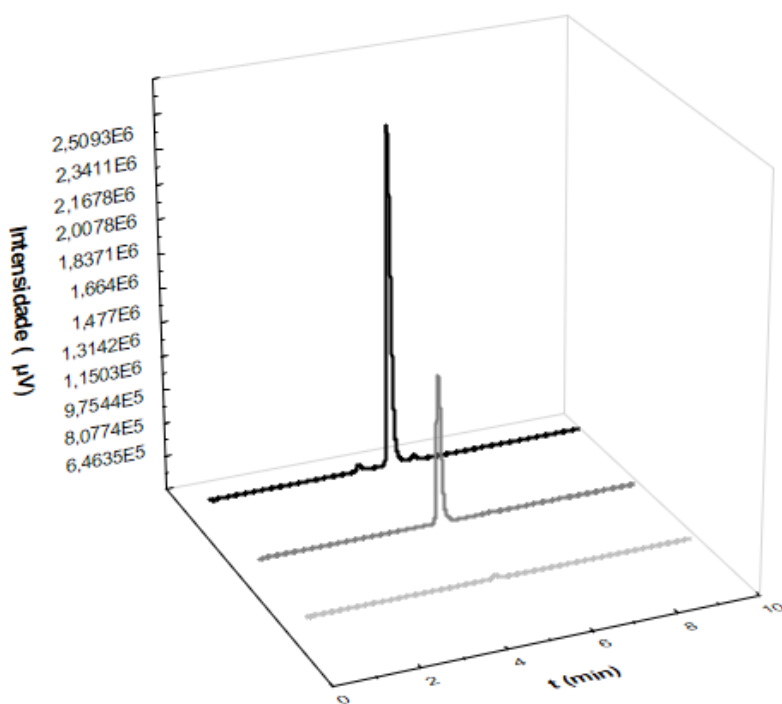


**Figura 41.** Cromatogramas (CG-HS-FID) referentes a G-0 sublimado a 50 °C nas formas livre (linha preta), mistura física com HP-β-CD (linha cinza escura) e complexo liofilizado com HP-β-CD (linha cinza clara).

A análise da volatilização do G-0, com as menores perdas de fármaco do complexo, comparado com as observadas para as misturas físicas e fármaco livre, indica que a inclusão melhora, de forma notável, a estabilidade física do G-0. Resultados similares foram obtidos com o estudo do copolímero de bloco Pluronic® L81 modificado com colesterol, misturado com  $\beta$ -CD e derivados (MONDJINOU et al., 2015). Os resultados obtidos neste trabalho estão em concordância com outro estudo, usando TGA no modo isotérmico, em temperatura menor à de fusão do G-0, o qual também mostrou menor perda de massa dos complexos liofilizados comparados com as respectivas misturas físicas e complexos preparados por formação de pasta, considerando o conteúdo de umidade das amostras determinado por titulação Karl-Fischer (RUZ et al., 2015). A combinação de ambos os estudos com análise termogravimétrica complementados com a análise direta do fármaco sublimado por CG-HS-FID reforça a teoria da proteção frente à volatilização devido à formação dos complexos de inclusão com as duas ciclodextrinas, o qual é muito conveniente para a elaboração de formas farmacêuticas sólidas contendo os complexos liofilizados.

#### *5.1.4. Avaliação biológica "in vitro" dos complexos de inclusão liofilizados de G-0 com ciclodextrinas frente a Candida albicans e Candida krusei.*

A estabilização do fármaco pelas ciclodextrinas evidencia-se como de vital importância, pois isso permitirá o desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas com maior prazo de validade. Entretanto, é bem conhecido que a presença de complexos de inclusão pode influenciar positiva ou negativamente a atividade biológica da molécula encapsulada, desde que a região hidrofóbica do fármaco encontra-se no interior da cavidade hidrofóbica interna da ciclodextrina (CASTRO-

HERMIDA et al., 2004). Por isso, considerou-se como outro aspecto de interesse o desenvolvimento de um estudo “*in vitro*” de susceptibilidade comparativa entre o G-0 livre e os complexos, frente à *Candida albicans*, pois este composto apresenta atividade biológica frente a esse patógeno.

O resultado do primeiro teste de microdiluição em caldo confirmou a atividade antifúngica do composto 2-(2-nitrovinil) furano frente às cepas de *Candida* avaliadas, sendo que a CIM do G-0 é de 12,5 µg.mL<sup>-1</sup> para as duas cepas de *Candida albicans* e que sugeriu inicialmente que o G-0 complexado com as duas ciclodextrinas não alterou este valor (Tabela 10).

**Tabela 10.** Concentração inibitória mínima (CIM) de 2-(2-nitrovinil) furano (G-0) na forma livre e em complexos de inclusão liofilizados (FD) com HP-β-CD e SBE-β-CD frente a duas cepas de *Candida albicans*.

| Amostra                 | CIM (µg.mL <sup>-1</sup> )/ <i>Candida albicans</i> ATCC 18804 | CIM (µg.mL <sup>-1</sup> )/ <i>Candida albicans</i> CAV4* |
|-------------------------|----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| Anfotericina B          | 2,5                                                            | 5,0                                                       |
| 2-(2-nitrovinil) furano | 12,5                                                           | 12,5                                                      |
| FD G-0/HP-β-CD          | 12,5                                                           | 12,5                                                      |
| FD G-0/SBE-β-CD         | 12,5                                                           | 12,5                                                      |

\* Isolado clínico resistente a fluconazol, itraconazol e cetoconazol.

O resultado de CIM obtido a partir de três ensaios independentes.

Anfotericina B foi o controle positivo,

O ensaio com *Candida krusei* mostrou que para a cepa padrão G-0 manteve o mesmo valor de CIM que no caso da *C. albicans* e também os complexos de inclusão, mas a *C. krusei* CKV3 mostrou ter maior resistência tanto ao G-0 livre como ao controle positivo anfotericina B. No entanto, observou-se maior

sensibilidade da cepa para G-0 complexado com as duas ciclodextrinas. (Tabela 11).

**Tabela 11.** Concentração inibitória mínima (CIM) de 2-(2-nitrovinil) furano (G-0) na forma livre e em complexos de inclusão liofilizados (FD) com HP- $\beta$ -CD e SBE- $\beta$ -CD frente a duas cepas de *Candida krusei*.

| Amostra                 | CIM ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )/ <i>Candida krusei</i> ATCC 6258 | CIM ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )/ <i>Candida krusei</i> CKV3* |
|-------------------------|----------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| Anfotericina B          | 10,0                                                           | 20,0                                                       |
| 2-(2-nitrovinil)furano  | 12,5                                                           | 25,0                                                       |
| FD G-0/HP- $\beta$ -CD  | 12,5                                                           | 12,5                                                       |
| FD G-0/SBE- $\beta$ -CD | 12,5                                                           | 12,5                                                       |

\* Isolado clínico resistente a fluconazol, itraconazol e cetoconazol.

O resultado de CIM obtido a partir de três ensaios independentes.

Anfotericina B foi o controle positivo,

Em nenhum dos testes desenvolvidos observou-se inibição do crescimento das cepas para as diluições de HP- $\beta$ -CD e SBE- $\beta$ -CD, indicando ausência de atividade antifúngica dos excipientes nas concentrações avaliadas.

Desenvolveu-se um segundo teste "*in vitro*" usando uma faixa de concentração ainda menor, o qual confirmou os valores de CIM do primeiro teste para o G-0, tanto na forma livre como para o complexo de inclusão FD G-0/HP- $\beta$ -CD. No entanto, permitiu obter valores de CIM menores para os complexos de FD G-0/SBE- $\beta$ -CD para as quatro cepas avaliadas (CIM de 8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para as cepas de *Candida albicans* e 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para as cepas de *Candida krusei*), o que indica pequena melhora na atividade do fármaco frente a estas cepas (Tabelas 12 e 13), superando também a anfotericina B na cepa resistente (CKV3).

**Tabela 12.** Concentração inibitória mínima (CIM) de G-0 na forma livre e em complexos de inclusão liofilizados (FD) com HP- $\beta$ -CD e SBE- $\beta$ -CD (na faixa de concentrações de 13 a 6  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), frente a duas cepas de *Candida albicans*.

| Amostra                 | CIM ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )/ <i>Candida albicans</i> ATCC 18804 | CIM ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )/ <i>Candida albicans</i> CAV4* |
|-------------------------|-------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| Anfotericina B          | 2,5                                                               | 5,0                                                          |
| 2-(2-nitrovinil) furano | 13,0                                                              | 13,0                                                         |
| FD G-0/HP- $\beta$ -CD  | 13,0                                                              | 13,0                                                         |
| FD G-0/SBE- $\beta$ -CD | 8,0                                                               | 8,0                                                          |

\* Isolado clínico resistente a fluconazol, itraconazol e cetoconazol.

O resultado de CIM obtido a partir de três ensaios independentes.

Anfotericina B foi o controle positivo,

**Tabela 13.** Concentração inibitória mínima (CIM) de G-0 na forma livre (na faixa de concentração de 13 a 6  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  frente a ATCC 6258 e de 26 a 12  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  frente a CKV3) e complexos de inclusão liofilizados (FD) com HP- $\beta$ -CD e SBE- $\beta$ -CD (na faixa de concentração de 13 a 6  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) frente a duas cepas de *Candida krusei*.

| Amostra                 | CIM ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )/ <i>Candida krusei</i> ATCC 6258 | CIM ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )/ <i>Candida krusei</i> CKV3* |
|-------------------------|----------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| Anfotericina B          | 10,0                                                           | 20,0                                                       |
| 2-(2-nitrovinil)furano  | 13,0                                                           | 26,0                                                       |
| FD G-0/HP- $\beta$ -CD  | 13,0                                                           | 13,0                                                       |
| FD G-0/SBE- $\beta$ -CD | 10,0                                                           | 10,0                                                       |

\* Isolado clínico resistente a fluconazol, itraconazol e cetoconazol.

O resultado de CIM obtido a partir de três ensaios independentes.

Anfotericina B foi o controle positivo,

Outros autores avaliaram a atividade do G-0 frente a uma cepa de *Cândida albicans* usando o método de difusão em ágar e o resultado da CIM obtido foi de

50  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  (ALABI; HASSAN, 2014). Neste caso, os autores trabalharam em uma faixa de concentração mais ampla (de 500 até 0,005  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ), pelo qual é possível que não tenham atingido um valor mais exato da CIM. Além disso, o composto foi preparado por dissolução de 500 mg em 10 mL de água. Considerando que a solubilidade do fármaco em água é muito inferior a este valor (RUZ et al., 2012), uma parte do fármaco provavelmente encontrava-se em suspensão (não dissolvido), o qual conduz a erros na interpretação da atividade biológica. Neste estudo, o fármaco foi dissolvido previamente em DMSO e logo diluído em água, garantindo sua solubilidade no meio e com baixa concentração final de solvente orgânico (2 %, v/v) na solução de partida.

A atividade antifúngica do G-0 não havia sido estudada anteriormente com cepas de *Candida krusei*, razão pela qual considera-se este resultado mais um aporte ao conhecimento de sua atividade biológica "*in vitro*".

Entre as teorias existentes a respeito de como em alguns casos os complexos de inclusão podem melhorar a atividade antimicrobiana estão a capacidade de algumas ciclodextrinas de solubilizar ergosterol. Assim um estudo comparativo demonstrou que a capacidade das ciclodextrinas para solubilizar o ergosterol da membrana celular de *Candida albicans* seguiu a ordem:  $\alpha$ -CD >  $\beta$ -CD > HP- $\beta$ -CD. No caso dos complexos com a última, o aumento desta capacidade solubilizante foi concentração-dependente (ex.: complexo Fármaco/CD 1:1, 60 % capacidade solubilizante e complexo Fármaco/CD 1:3, > 100% de capacidade solubilizante do ergosterol (TEIXEIRA et al., 2015).

Outra teoria está relacionada com a capacidade estabilizante da ciclodextrina. O meio de cultura foi preparado com pH final ajustado para 7, em que G-0 degrada ( $t_{1/2}$ ) em aproximadamente 25,6 h a 41 °C (DE ROJAS PÉREZ, 2006).

SBE- $\beta$ -CD apresenta maiores potencialidades como estabilizante do G-0 devido ao maior valor de constante de associação ( $K_{1:1}$ ) apresentado (RUZ et al., 2012), maiores diferenças nos deslocamentos químicos entre a substância livre e na forma de complexo com esta CD (RMN  $^1\text{H}$ ) e maiores efeitos Overhauser nuclear (NOEs) observados no ROESY (RMN 2D) (RUZ et al., 2012). Dado que G-0 degrada neste meio, no qual fica em incubação por 48 h, o produto de degradação principal é o furfural (DE ROJAS PÉREZ, 2006), o qual inibe o crescimento da *Candida albicans* por bloqueio da síntese do ergosterol da membrana celular, porém é bem menos ativo que G-0 (Furfural (CIM) =  $500 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ) (RAJPUT; KARUPPAYIL, 2013), então se espera que as soluções menos degradadas tenham maiores valores de CIM, o que acontece com os complexos de inclusão FD G-0/SBE- $\beta$ -CD. O comportamento de estabilidade dos complexos foi também avaliado no trabalho e será comentado posteriormente.

#### 5.1.5. Perfil de dissolução dos complexos de inclusão liofilizados de G-0 com ciclodextrinas

Outro fator a ser considerado no desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas é a velocidade de dissolução do fármaco, que oferece uma estimativa de quanto o sistema será capaz de disponibilizar o fármaco no sítio de ação em função do tempo.

A curva de calibração obtida para quantificação de G-0 durante os ensaios de liberação e permeação mostrou resposta linear na faixa de concentrações de  $0,124 - 4 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  (Figura 42).

Durante este estudo foi evidente o incremento significativo na velocidade de dissolução do G-0 complexado com ambas as ciclodextrinas, considerando que nos

primeiros 5 minutos foi liberado mais de 90 % do fármaco complexado (Figura 43 e Tabela 14) enquanto que para G-0 cristalino não complexado somente cerca de 10% estavam dissolvidos. Foi determinado alto grau de similaridade entre os perfis de dissolução do G-0 complexado com ambas as ciclodextrinas (Tabela 15), considerando que perfis com valor de  $f_2$  entre 100 e 50 são considerados similares e diferentes para valores inferiores a 50, como ocorre ao comparar o perfil de dissolução do G-0 com o dois complexos.

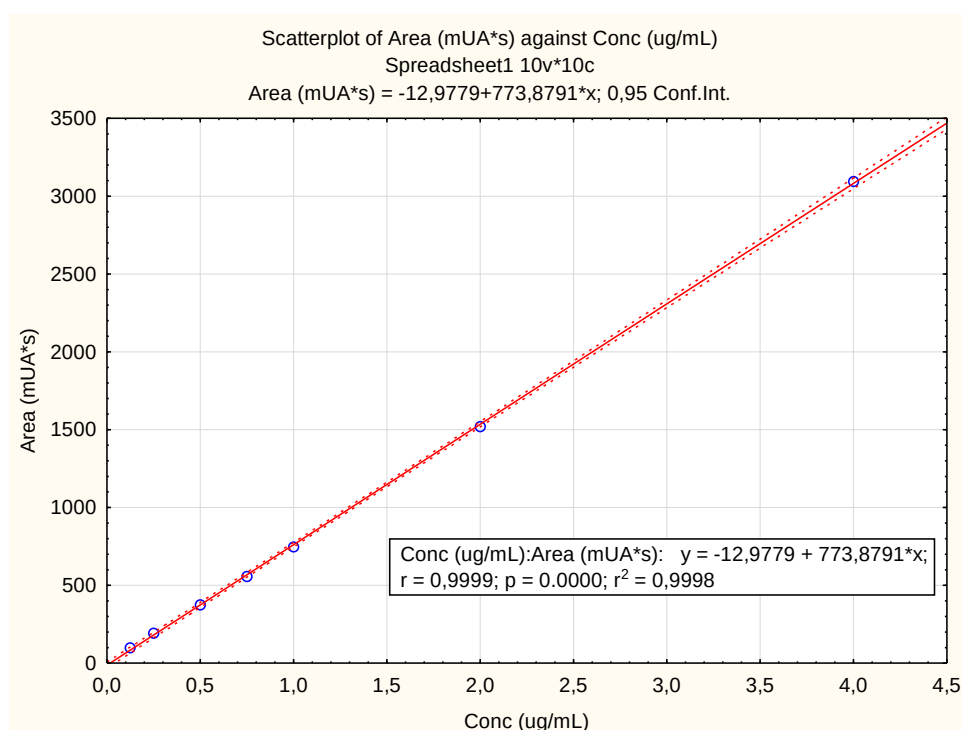


**Figura 42.** Curva de calibração de G-0 para ensaio de liberação e permeação ( $n=3$ ).

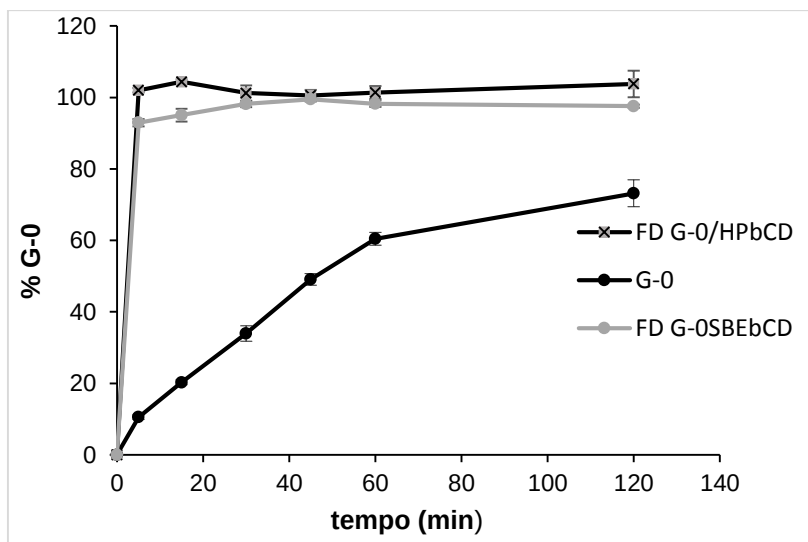


**Figura 43.** Perfil de dissolução em Fluido vaginal simulado (SVF) para o G-0, FD G-0/SBE-β-CD e FD G-0/HP-β-CD. Cada ponto corresponde à média ± SD de triplicatas.

**Tabela 14.** Porcentagem de G-0 dissolvido (% DP) e eficiência da dissolução (% DE) em SVF calculada aos 15 e 60 min do ensaio.

| Resposta              | G-0          | FD G-0/HP-β-CD | FD G-0/SBE- β-CD |
|-----------------------|--------------|----------------|------------------|
| %DP <sub>15 min</sub> | 20,37 ± 0,34 | 103,37 ± 0,69  | 95,74 ± 1,41     |
| %DP <sub>60 min</sub> | 60,45 ± 3,08 | 101,35 ± 1,88  | 99,16 ± 0,28     |
| %DE <sub>15 min</sub> | 12,03 ± 0,25 | 85,95 ± 0,40   | 78,39 ± 0,97     |
| %DE <sub>60 min</sub> | 33,86 ± 1,53 | 97,61 ± 1,01   | 93,51 ± 0,71     |

**Tabela 15.** Fator de similaridade  $f_2$  dos perfis de dissolução do fármaco livre e os complexos de inclusão.

| Comparação                         | $f_2$ |
|------------------------------------|-------|
| G-0 vs. FD G-0/HP-β-CD             | 9,41  |
| G-0 vs. FD G-0/SBE-β-CD            | 11,24 |
| FD G-0/HP-β-CD vs. FD G-0 SBE-β-CD | 61,10 |

Um trabalho anterior não publicado e desenvolvido em meio ácido (pH 1,2) utilizando o aparelho I da Farmacopeia dos Estados Unidos, onde foram testados complexos preparados por formação de pasta e misturas físicas, também mostrou melhores resultados para os complexos liofilizados com relação à eficiência da dissolução (%DE) principalmente nas coletas inferiores aos 30 minutos.

No presente estudo, foi utilizado um meio menos ácido e mais viscoso (SVF, pH 4,5), o qual influencia no processo de dissolução da substância ativa, atingindo cerca de 80 % de dissolução nas 4 h de ensaio, comparado com 1 h no trabalho anterior. No entanto, o ensaio de dissolução aqui desenvolvido confirma o notável aumento da velocidade de dissolução pelos complexos liofilizados. Entre os principais fatores que poderiam estar influenciando neste aspecto estão o caráter amorfo do fármaco disperso nos complexos moleculares liofilizados, o qual foi publicado anteriormente (RUZ et al., 2012), o próprio efeito solubilizante do excipiente e melhor molhabilidade. Algumas diferenças entre os dois complexos foram observadas nos tempos 5 e 15 minutos, o que poderia estar relacionado com a maior força da interação do fármaco com a SBE- $\beta$ -CD (RUZ et al., 2012).

#### *5.1.6. Influência das ciclodextrinas na liberação e permeação do G-0 na forma de complexos de inclusão liofilizados usando célula de Franz.*

##### *- Estabilidade química nos meios doador e receptor*

O ensaio de estabilidade em SVF (pH 4,5) confirmou a estabilidade da substância ativa na forma livre, mantendo as concentrações em 8 h em cerca de 100 % do G-0 incorporado no fluido no início do ensaio (Figura 44) porém, foi detectado apenas um pequeno sinal com tempo de retenção em 6,0 min que absorve na região ultravioleta (em 248 nm e 271 nm). Sinais em 4,07 min e 4,7 min

foram também detectadas no branco, os quais são devidos aos componentes do meio (Figura 45). Um comportamento químico estável e comparável ao do fármaco foi observado também para os complexos durante as primeiras 2 h de ensaio.

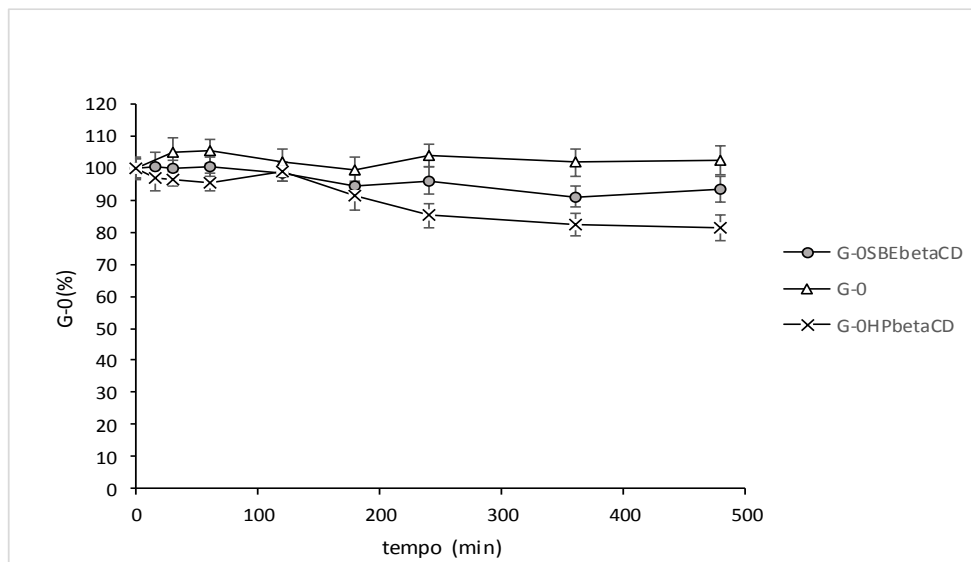


**Figura 44.** Estabilidade das soluções de concentração aproximada de  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para G-0; FD G-0/HP- $\beta$ -CD e FD G-0/SBE- $\beta$ -CD em SVF a  $37,0 \pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Cada ponto corresponde à média  $\pm$  SD de triplicatas.

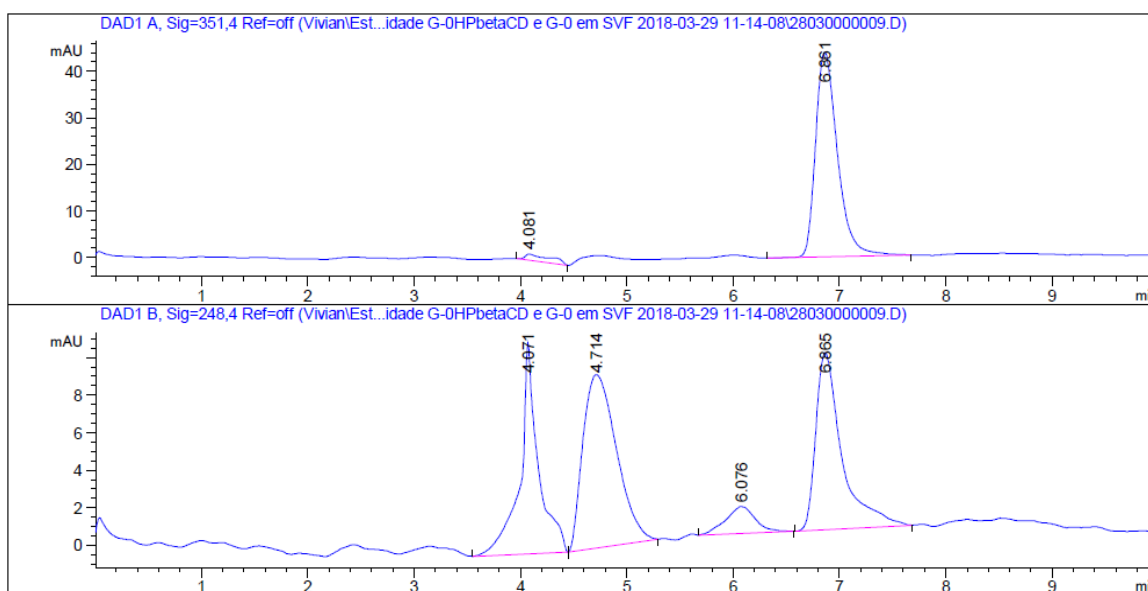


**Figura 45.** Cromatogramas de uma amostra de G-0 com 8 h de incubação no SVF a  $37,0 \pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , nos comprimentos de onda de detecção de 351 e 248 nm.

A partir deste ponto iniciou-se um processo de diminuição sequencial das concentrações de fármaco, as quais foram mais evidentes no complexo FD G-0/HP- $\beta$ -CD e que atingiram valores inferiores ao 90 % da concentração inicial a partir de 4 h de ensaio. Foram detectados sinais de baixa intensidade em 1,3 min e em 5,4 min que não provocaram interferência na quantificação do analito.

O complexo FD G-0/SBE- $\beta$ -CD manteve concentrações percentuais médias acima de 95 % nas primeiras 4 h de ensaio, as quais diminuíram nas 4 h seguintes, mas mantendo-se acima do 90 % da concentração inicial durante as 8 h de ensaio. Não foram detectados produtos de degradação durante a análise para o complexo com SBE- $\beta$ -CD (Figura 46).

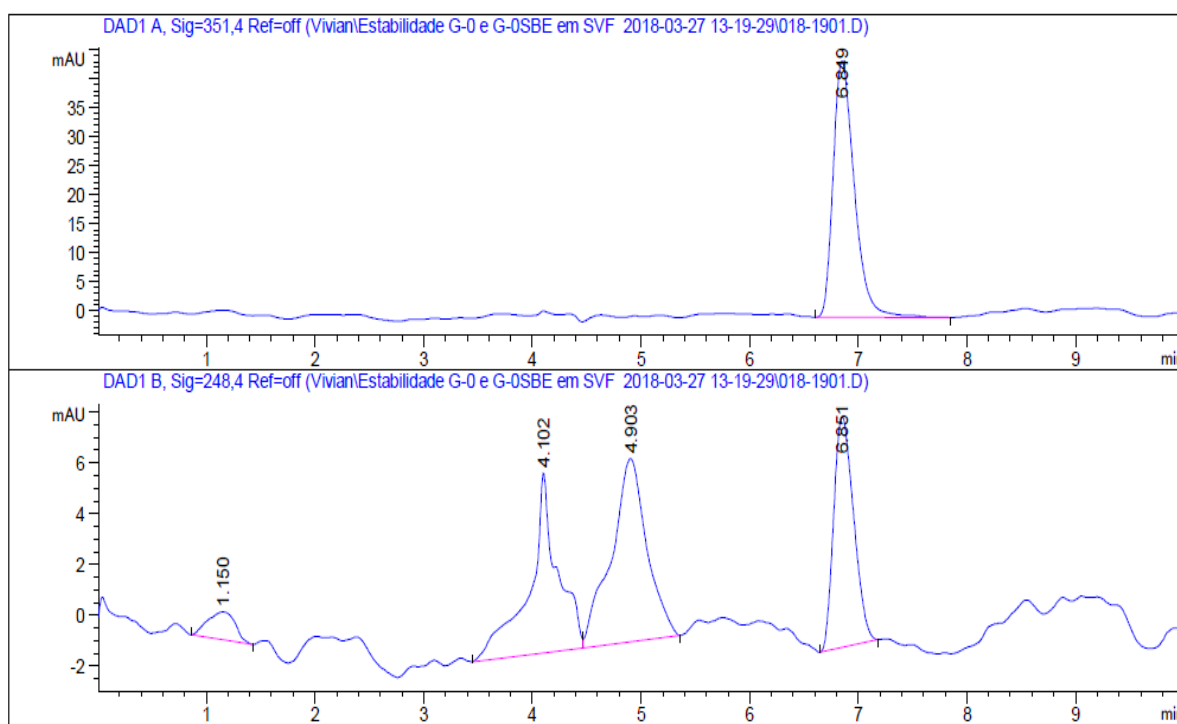


**Figura 46.** Cromatogramas de uma amostra de FD G-0/SBE- $\beta$ -CD com 8 h de incubação no SVF a  $37,0 \pm 0,5$  °C, nos comprimentos de onda de detecção de 351 e 248 nm.

Na análise da estabilidade em PBS, observou-se comportamento um pouco diferente ao estudado no SVF. Aqui o complexo FD G-0/SBE- $\beta$ -CD atingiu a maior estabilidade, mantendo concentrações entre 99 % e 100 % durante as primeiras 4 h, as quais começaram a diminuir a partir das 6 horas, mantendo valores acima de 90 % do valor inicial. Por sua parte, o fármaco livre e o complexo G-0/HP- $\beta$ -CD mantiveram concentrações entre 99 % e 100 % durante a primeira hora, diminuindo a concentração porcentual até 90 % nas 4 h seguintes para o G-0 e nas 5 h seguintes para o complexo FD G-0/HP- $\beta$ -CD (Figura 47).

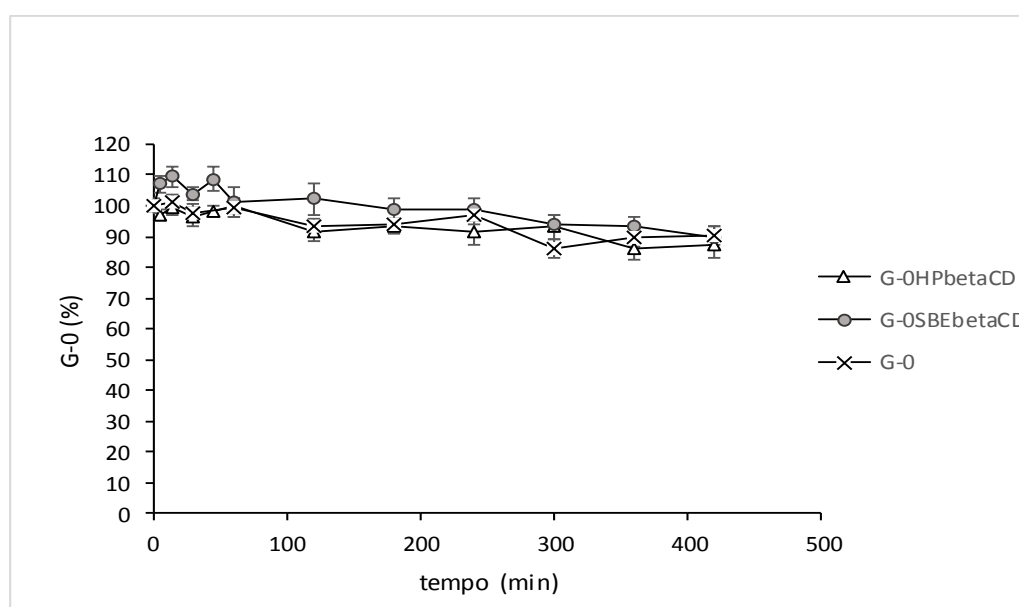


**Figura 47.** Estabilidade das soluções com concentrações aproximadas de  $10 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  para o G-0; FD G-0/HP- $\beta$ -CD e FD G-0/SBE- $\beta$ -CD em PBS a  $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . Cada ponto corresponde à média  $\pm$  SD de triplicatas.

Resumindo, no SVF ( $\text{pH}=4,5$ ), a estabilidade dos compostos testados em ordem decrescente neste estudo foi: G-0 > FD G-0/SBE- $\beta$ -CD > FD G-0/HP- $\beta$ -CD, e no PBS ( $\text{pH}=7.4$ ) a ordem foi: FD G-0/ SBE- $\beta$ -CD > FD G-0/ HP- $\beta$ -CD > G-0.

Para explicar o comportamento da estabilidade química nas soluções que seriam utilizadas depois como doadoras e receptoras na célula de Franz, deve-se destacar como antecedentes que ensaios desenvolvidos a 41 °C demonstraram que G-0 é mais estável no meio ácido e que a medida que o pH aumenta, a reação de adição de água à dupla ligação exocíclica é favorecida. O tempo de 90 % ( $t_{90\%}$ ) calculado, considerando a degradação com cinética de pseudo-primeira ordem em tampão acetato (pH 4,5), é de aproximadamente 30 h (DE ROJAS PÉREZ, 2006; RUZ, 2006). Com relação ao PBS, trabalhos anteriores indicam que o  $t_{90\%}$  em soluções tamponadas com fosfato pH 7,2 e pH 7 calculados foram 2,5 h (RUZ, 2006) e 3,9 h (DE ROJAS PÉREZ, 2006) respectivamente, mas 4°C acima da temperatura aqui avaliada, o qual pode incidir no resultado obtido neste estudo, onde às 4 h de análise as concentrações de G-0 ainda estavam acima do 90 %.

Existem numerosas publicações sobre a estabilização de fármacos por ciclodextrinas frente a reações hidrolíticas, devido a sua capacidade para encapsular substâncias em solução, limitando a possibilidade de interação do hóspede com as moléculas de água do meio. Assim aconteceu com a cefixima, para a qual a velocidade de degradação foi diminuída, principalmente em soluções alcalinas, devido à presença de Captisol®, o qual formou complexo de inclusão 1:1 com o antibiótico em solução, embora apresentasse um valor baixo da constante de associação ( $K_{1:1} = 11,4 \text{ M}^{-1}$ ) (MALLICK; MONDAL; SANNIGRAHI, 2008). Esta proteção depende da intensidade da associação entre a molécula hóspede e a ciclodextrina. Nesta pesquisa, a maior constante de associação aparente em solução aquosa ( $K_{1:1} = 79,2 \text{ M}^{-1}$ ) foi obtida para a SBE- $\beta$ -CD (RUZ et al., 2012), para a qual o maior efeito estabilizante em PBS seria esperado, o qual confirma os resultados obtidos no ensaio de susceptibilidade frente a *Candida spp.*

De outro lado, é importante destacar que os valores experimentais de  $K_{1:1}$  são muito sensíveis a alguns fatores como, por exemplo, a composição e a força iônica do meio utilizado no ensaio. No caso do SVF, este meio é mais complexo que o anterior, constituído por vários compostos ácidos, bases, proteínas, uréia, glicerol, entre outros, alguns dos quais poderiam competir pela ciclodextrina (PIO, 2016), limitando seu poder de proteção, o qual poderia ser uma das causas do menor efeito estabilizante obtido neste meio.

*- Liberação de fármaco usando célula de Franz*

Com relação às condições experimentais do ensaio, a literatura mostra que os compartimentos doador e receptor devem mimetizar os fluidos biológicos, e dessa forma existem variedade de meios e volumes (0,3-12 mL) (MACHADO; DAS NEVES, 2016); assim em um trabalho referente ao ensaio de permeabilidade da dapivirina, foram colocados 300 µL dos compostos dispersados em SVF (DAS NEVES et al., 2013), no caso do fluconazol, usaram volume de 1 mL de fluido vaginal (REIS, 2014) e no estudo de permeabilidade da curcumina usaram 2,5 mL (BERGINC et al., 2012) porém, está reportado que o volume máximo do fluido vaginal está estimado na faixa de 1-2 mL (KATZ; YUAN; GAO, 2015). Considerando todo o anterior decidiu-se trabalhar com volume de 2 mL.

Com relação à escolha da concentração de fármaco avaliada, esta esteve baseada primeiro no uso de valores de concentração superiores à CIM mostrada para G-0 frente a *Candida albicans* (aproximadamente 5 vezes superior) e que permitisse ainda manter a condição *sink* se 100 % de fármaco incorporado passasse no receptor e, segundo, usar uma concentração que permitisse a adequada quantificação do analito, considerando que, em uma experiência previa,

valores de concentração inferiores ao dobro do CIM não foram quantificados no compartimento receptor.

Da análise da liberação através de membrana hidrofóbica sintética de acetato de celulose foi possível confirmar que G-0 foi liberado da ciclodextrina na forma livre antes de atravessar a membrana, pelo menos nas primeiras 4 h de ensaio, devido a que o fármaco livre já estava solubilizado no SVF, diferenciando-se do ensaio de dissolução no qual o fármaco encontrava-se em suspensão.

A quantidade de fármaco que atravessou a membrana sintética ( $52,30 \pm 3,57\%$ ) em 6 h foi menor que a observada no perfil de dissolução, em parte devido provavelmente à influência da própria membrana na difusão.

No caso do G-0 na forma de complexos,  $61,77 \pm 4,36 \%$  do fármaco complexado com SBE- $\beta$ -CD liofilizado foi liberado, e  $65,18 \pm 1,52 \%$  no caso do fármaco complexado com HP- $\beta$ -CD liofilizado (Figura 48), confirmando o efeito de controle da membrana sobre a liberação ao meio receptor.

Não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre a liberação do fármaco dos complexos ( $p = 0,1892$ ), porém existiram diferenças entre eles e G-0 em 6 h de ensaio ( $p = 0,0000$  com FD G-0/HP- $\beta$ -CD e  $p = 0,0031$  com FD G-0/SBE- $\beta$ -CD) o que poderia estar associado à degradação do G-0 no PBS, como foi descrito anteriormente na avaliação da estabilidade neste meio.

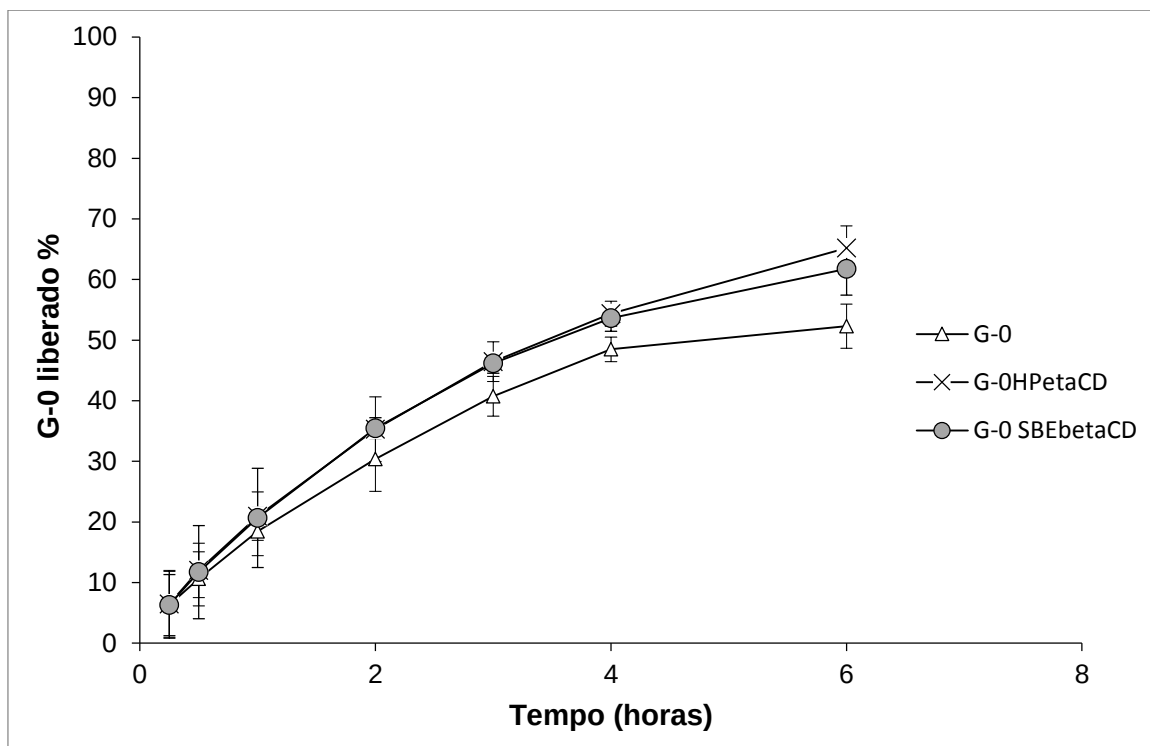


**Figura 48.** Perfil de liberação "*in vitro*" de amostras contendo G-0 dissolvido no fluido vaginal simulado com mucina através de membrana de acetato de celulose: G-0 livre, FD G-0/HP- $\beta$ -CD e FD G-0/SBE- $\beta$ -CD. Em todas as amostras a concentração inicial de fármaco foi de  $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Cada valor plotado corresponde à média  $\pm$  SD de triplicatas.

Também foi testada a influência da glicoproteína na liberação do fármaco, não existindo diferenças estatisticamente significativas na liberação do G-0 dos complexos no meio com ou sem mucina ( $p = 0,4748$  para FD G-0/HP- $\beta$ -CD e  $p = 0,3271$  para FD G-0/SBE- $\beta$ -CD), (Figura 49).

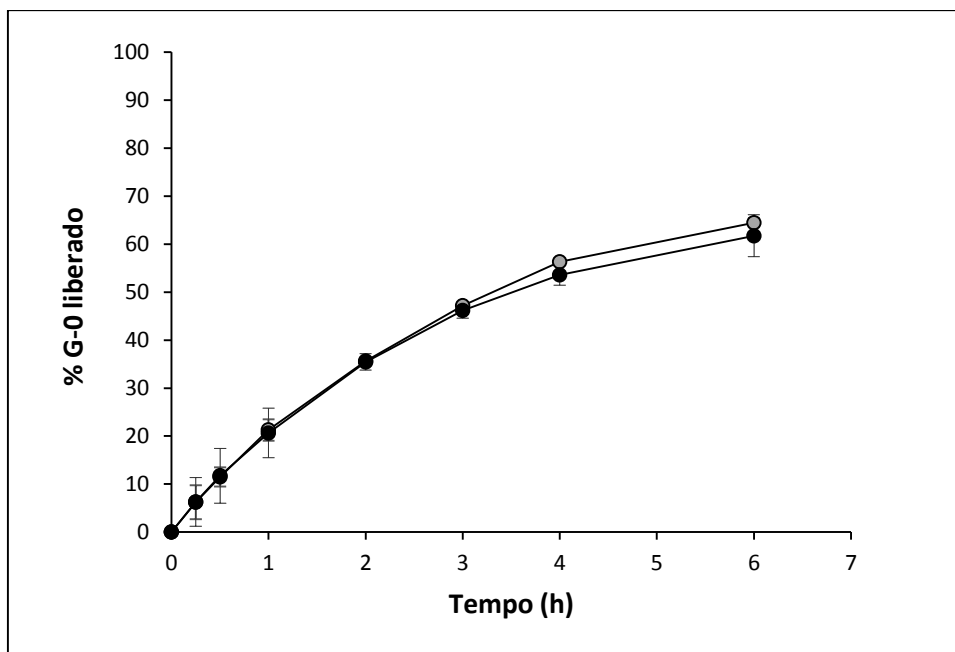
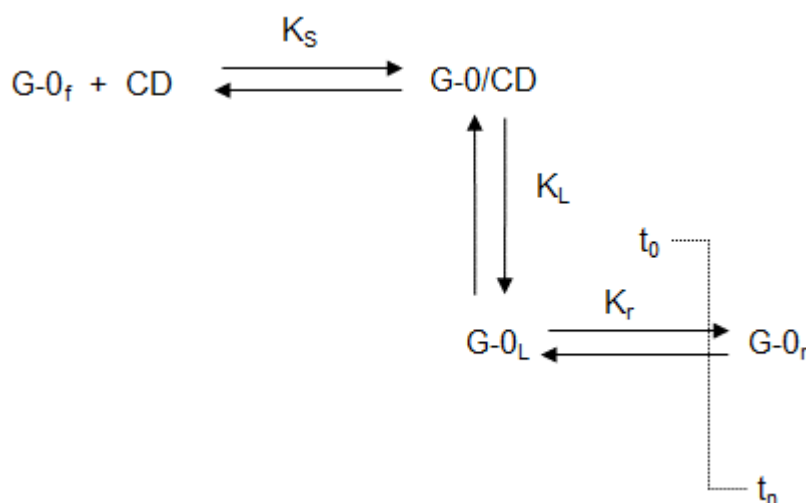


**Figura 49.** Perfil de liberação "*in vitro*" através de membrana de acetato de celulose de amostras contendo FD G-0/SBE- $\beta$ -CD dissolvido no fluido vaginal simulado: Com mucina (círculo preto), sem mucina (círculo cinza). Em todas as amostras a concentração inicial de fármaco foi de  $60 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Cada valor plotado corresponde à média  $\pm$  SD de triplicatas.

O ensaio desenvolvido na célula de Franz teve como propósito avaliar a liberação de G-0 dos complexos no fluido vaginal simulado e correlacionar esta liberação com a permeação através da membrana mucosa vaginal, dado que o ensaio foi realizado em iguais condições, somente com modificação da membrana, que no caso da sintética, deveria teoricamente, deixar passar a totalidade de fármaco liberado, desde que as moléculas de ciclodextrina, altamente hidrofílicas, apresentam baixa permeabilidade na membrana lipofílica, a liberação deve ocorrer em dois passos, incluindo a saída do fármaco do complexo e em seguida a difusão do fármaco liberado através da membrana.

O Esquema I resume todo o processo de formação do complexo molecular a partir do fármaco livre com as ciclodextrinas e o processo liberação *in vitro*.



#### ESQUEMA I (Autora)

Em que,  $K_s$ ,  $K_L$  e  $K_r$  representam as constantes de ligação na formação do complexo  $G-0/CD$ , a constante de liberação do  $G-0_L$  para o meio de dissolução antes de atravessar a membrana e  $K_r$  a constante de difusão do fármaco através da membrana, respectivamente.  $G-0_f$ ,  $G-0/CD$ ,  $G-0_L$  e  $G-0_r$  representam a fração de fármaco livre no sistema antes da formação do complexo molecular, a fração de fármaco ligado no complexo molecular, a fração de fármaco liberado para o meio antes de atravessar a membrana e a fração de fármaco que difunde a membrana, respectivamente.  $CD$  é a fração de ciclodextrina envolvida na formação do complexo molecular.

Parece evidente que todo o processo de liberação *in vitro* depende da magnitude das constantes envolvidas no processo global. Se o fármaco tiver alta constante de ligação com as ciclodextrinas, então sua solubilidade aparente no meio aquoso também será alta. De qualquer forma, deve-se considerar que o fármaco complexado com a  $CD$  deve apresentar baixa difusão através da membrana, de acordo as características das  $CDs$  já mencionadas, e que a difusão do  $G-0_L$  depende do gradiente de concentração do fármaco acumulado na superfície da membrana e do valor do coeficiente de difusão, o qual é uma

propriedade da membrana. Numa racionalização simples, se  $K_s$  for maior do que  $K_L$ , o fármaco estará melhor aprisionado no complexo, então não poderá acumular na superfície da membrana e a difusão será controlada pela velocidade de dissociação do complexo G-0/CD, ocorrendo uma difusão mais lenta. Caso  $K_s$  seja menor que  $K_L$ , então a dissociação do complexo será mais rápida, facilitando o acúmulo de G-0<sub>L</sub> na superfície da membrana e facilitando a difusão do fármaco para o meio de dissolução (FORMARIZ et al., 2007).

- *Permeação e retenção de fármaco na mucosa vaginal bovina usando célula de Franz*

O objetivo principal do ensaio de permeação foi avaliar a capacidade do G-0 em permear a mucosa vaginal na forma livre e de verificar qual seria a influência da formação de complexos hidrossolúveis neste aspecto, considerando ser desejável um efeito local sobre a superfície da mucosa e não um efeito sistêmico, que implicaria no desenvolvimento de estudos adicionais.

A vagina é uma região do organismo que oferece área relativamente grande para absorção, é altamente vascularizada e apresenta uma reduzida expressão de transportadores e enzimas metabólicas fase I e II, o qual pode favorecer a absorção sistêmica de fármacos, porém a liberação e dissolução destes no fluido vaginal e a permeabilidade através da mucosa limitam o uso desta via para atingir efeito sistêmico ou acesso a determinados sítios específicos. Para determinar se o fármaco ou formulação será potencialmente absorvido por esta via ou identificar etapas limitantes da velocidade de absorção durante o desenvolvimento, vários modelos tem sido considerados. Assim os estudos *in vitro* têm utilizado mucosa vaginal fresca e/ou congelada tanto de humanos como de alguns animais (camundongo,

rato, coelho, porco, ovelha, vaca e *macaco rhesus*). Alguns autores sugerem desenvolver estes estudos com mucosa oral devido à similitude em relação à permeabilidade e carência de diversidade devido a ciclos estrogênicos que influenciam a espessura da mucosa, o pH e o volume e composição das secreções (MACHADO; DAS NEVES, 2016).

A mucosa vaginal bovina apresenta similitudes com a humana, com relação a questões anatômicas dos órgãos reprodutivos (se diferencia somente nas dimensões do útero), fisiológicas (ambos os tecidos sofrem ciclos hormonais regulados por estrógenos e progestágenos, que influenciam a espessura da mucosa e a secreção de muco; ambos os epitélios vaginais estão constituídos por camadas de serosa, camadas musculares longitudinais externas e circulares internas e mucosa) e funcionais. Porém, existem algumas diferenças: o epitélio vaginal bovino está constituído por células cilíndricas e o humano, composto por células escamosas estratificadas (ANDERSON; MARATHE; PUDNEY, 2014). Com relação ao muco vaginal, a composição e função é similar (presença de sialomucinas e sulfomucinas como principais glicoproteínas), e o pH do muco vaginal bovino (6-7,5) simula ao da mulher em etapa post-menopáusia (WROBEL et al., 1986). Tomando em consideração estas similitudes e também a maior praticidade na obtenção e manipulação de amostras de grande tamanho, reduzindo assim a variabilidade interindividual quando se trabalha com animais de menor porte, decidiu-se escolher a mucosa vaginal bovina como modelo para estimar a permeabilidade *in vitro* dos compostos antifúngicos em estudo. Outros estudos a usaram para avaliar a permeabilidade de fármacos como cetoconazol, furosemida e curcumina, na forma livre ou lipossomal (BERGINC et al., 2012).

Da avaliação dos dados obtidos com relação à estabilidade nos meios anteriormente citados, dos resultados da liberação com membrana sintética, e considerando também que a maioria dos ensaios de permeabilidade publicados referem-se aos tempos variáveis mas que em geral não superam 6 h (BERGINC et al., 2012; DAS NEVES et al., 2013; REIS, 2014), estabeleceu-se que o presente ensaio de permeabilidade não deveria superar 4 h. Alguns autores referem que ainda quando se estima que a mucosa vaginal deve manter a viabilidade por mínimo 12 h após o sacrifício do animal, espera-se perda da estrutura, particularmente depois de períodos de incubação maiores, por exemplo de 24 h (DAS NEVES et al., 2013; REIS, 2014).

No final do teste de permeação foram analisadas as coletas, não sendo quantificado fármaco em nenhuma delas. Em alguns casos foi detectado fármaco, mas os níveis ficaram abaixo do limite de quantificação do método analítico ( $0,100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (Figura 50).

Já os estudos de retenção mostraram níveis quantificáveis de fármaco na mucosa, porém não existiram diferenças estatísticas significativas entre o fármaco retido nas mucosas em contato com as três amostras (ANOVA-One way,  $p=0,619$ ) (Figura 51). Alguma variabilidade na resposta ( $\text{DPR}>5\%$ ) pode estar associada à variabilidade na espessura das mucosas, as quais tiveram valor mínimo de 1,5 mm e máximo de 2,7 mm.

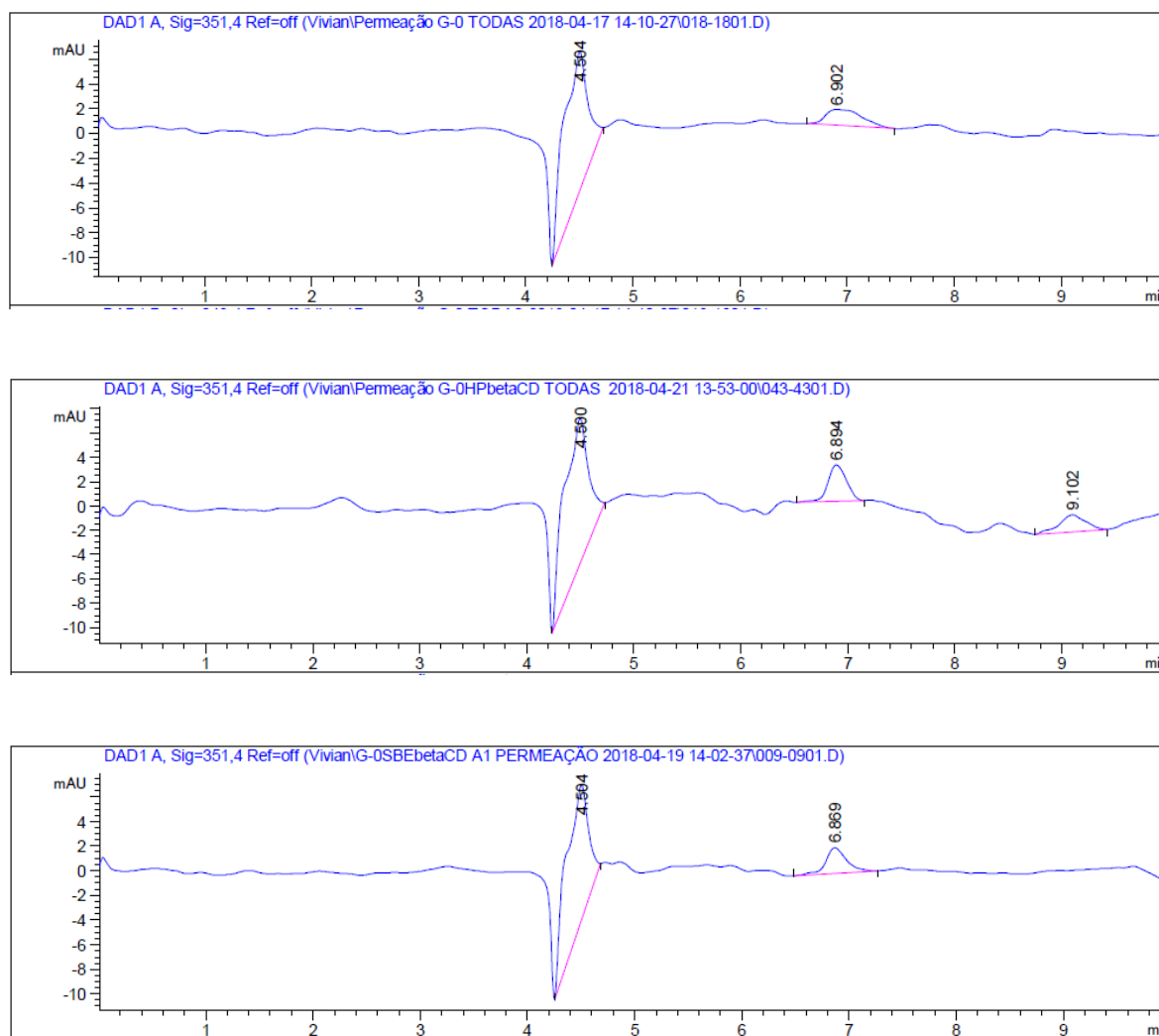


**Figura 50.** Cromatogramas com detecção de analito, referentes a: G-0 (célula # 2 - 3 h), FD G-0/SBE-β-CD (célula # 1 – 4 h) e FD G-0/HP-β-CD (célula # 6 - 15 min).

Devido à sua natureza altamente hidrofílica ( $\log K_{(\text{octanol}/\text{água})}$  entre -6 e -17), considera-se que em geral, ciclodextrinas e seus respectivos complexos não permeiam as membranas biológicas lipofílicas, só o fármaco na forma livre (LOFTSSON; BREWSTER, 2011) porém, existem numerosos estudos relativos ao efeito destes excipientes sobre a biodisponibilidade e liberação de fármaco através das membranas. Em alguns casos, melhorando, em outros sem efeito, e em poucos, reduzindo a permeação de fármacos. No caso da via dérmica e

transdérmica, CDs tem sido capazes de melhorar a absorção a partir de veículos aquosos ou através de camadas de difusão aquosa na superfície externa da pele. Também tem sido detectado que quantidades de CD em excesso para dissolver o fármaco lipofílico em veículo aquoso podem reduzir a permeação através da pele (LOFTSSON; BREWSTER, 2011).

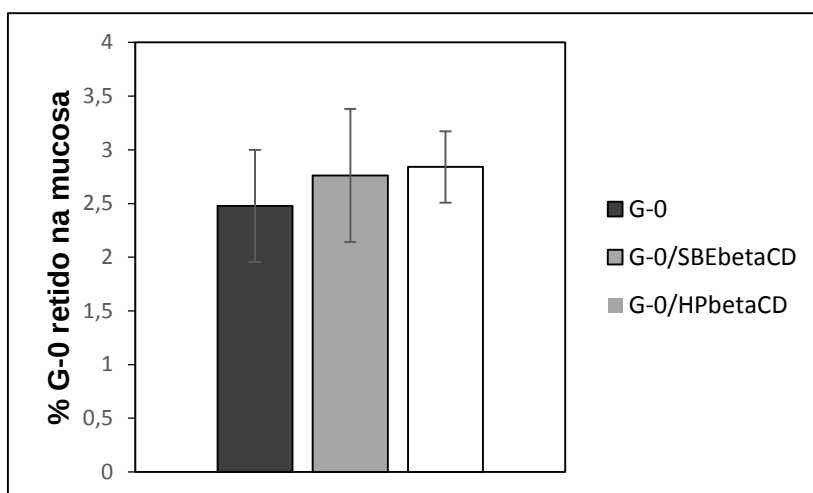


**Figura 51.** Porcentagem de G-0 recuperado de mucosa vaginal bovina após 4 h de experimento na célula de Franz, a partir de: G-0 dissolvido no SVF, solução de FD G-0/SBE- -CD, solução de FD G-0/HP- -CD. Cada ensaio realizado em triplicata.

Na v a transmucosa, alguns dos aumentos da permeabilidade tem sido associados à estabilização de fármacos complexados frente à atividade enzimática no sítio de absorção. Porém, os derivados metilados da  -CD, os quais são menos hidrofílicos, tem atuado aumentando a penetração pela via nasal, diminuindo as propriedades barreira desta mucosa por interação com o colesterol, não sendo este o caso do resto dos derivados mais hidrossolúveis da  -CD. Estes últimos tem mostrado grande sucesso na melhora de dissolução de fármacos lipofílicos e seu transporte através da barreira de difusão aquosa até a superfície do ep t lio.

Parecem interessantes os estudos mostrando que a espessura efetiva da camada de água estática ("unstirred water layer"- UWL) no trato gastrointestinal diminui com aumento da concentração da CD. Esta camada aquosa constitui uma barreira para a difusão de fármacos até a superfície da membrana, reforçando a teoria de que estas CDs não atuam por diminuição da função barreira da membrana das células epiteliais mas através de outros mecanismos. Estudos desenvolvidos utilizando o ensaio de permeação de membrana paralela artificial (PAMPA), demonstraram que em ausência de HP- $\beta$ -CD, a permeabilidade do fármaco estudado aumentou com diminuição da espessura da UWL até um valor mínimo aproximado de 40  $\mu$ m, mas que com adição deste excipiente o fluxo de fármaco aumentou significativamente através da membrana paralela artificial. Este efeito teve uma relação direta com o valor da constante de associação do complexo fármaco/CD (K). Estes resultados sugerem que CD hidrofílicas são capazes de melhorar o fluxo quando a resistência da UWL tem contribuição significativa na resistência total da barreira e também que um excesso da CD pode diminuir a quantidade de fármaco livre na UWL, diminuindo a permeação (LOFTSSON; BREWSTER, 2011).

No presente trabalho, a matriz aquosa formada pela mucina do fluido vaginal forma uma camada estática de água (UWL) mais espessa, criando uma barreira de difusão que pode potencialmente diminuir a permeação do fármaco. Por outro lado, como já foi mencionado, o efeito da CD sobre o fluxo do fármaco através desta barreira de difusão está muito relacionado com a força da interação do fármaco com a CD assim, um estudo que comparou três fármacos com propriedades físico-químicas comparáveis, mas diferente valor da constante de associação com HP- $\beta$ -CD ( $K_{1:1}$ ), mostrou que essa CD não teve influência significativa no fluxo da griseofulvina ( $K_{1:1} = 23 \text{ M}^{-1}$ ) comparado com o aumento notável no fluxo da

hidrocortisona ( $K_{1:1} = 1340 \text{ M}^{-1}$ ) (LOFTSSON; BREWSTER, 2011). No nosso caso, os valores da constante de associação para G-0/HP- $\beta$ -CD ( $K_{1:1} = 48,7 \text{ M}^{-1}$ ) e G-0/SBE- $\beta$ -CD ( $K_{1:1} = 79,2 \text{ M}^{-1}$ ) (RUZ et al., 2012) são considerados baixos ( $K < 100 \text{ M}^{-1}$ ), o qual pode explicar em alguma medida a não influência das CDs estudadas na permeação comparado com G-0 em solução.

Com relação à retenção, a literatura descreve uma faixa bem ampla de espessura das mucosas, entre 0,4 - 4 mm (MACHADO; DAS NEVES, 2016), sendo este um fator de grande impacto na permeação. No estudo da permeação da curcumina, os autores avaliaram a influência da espessura da mucosa no resultado da retenção, obtendo valores significativos acima de 0,5 % (com relação à quantidade inicial de fármaco no compartimento doador/massa de tecido), para espessura da mucosa menor de 0,36 mm. No presente trabalho, a mucosa utilizada apresentou espessura média relativamente inferior à reportada nos ensaios de permeação que usam epitélio vaginal humano que está na faixa de 3,0 - 4,0 mm, o qual indica que dificilmente G-0 livre consiga permear a mucosa humana (MACHADO; DAS NEVES, 2016). O valor de retenção é também dependente das características físico-químicas do fármaco, como por exemplo coeficiente de partição n-octanol/água, constante de ionização, entre outros) (KOKATE; LI; JASTI, 2008). Um resultado similar ao nosso foi obtido para fluconazol em solução ( $\log P = 0,99$ ), o qual foi recuperado das mucosas mas aparentemente não permeou para o fluido receptor (REIS, 2014).

Como conclusões deste estudo pode-se estabelecer que a formação de complexos de inclusão com HP- $\beta$ -CD e SBE- $\beta$ -CD melhora a solubilidade e velocidade de dissolução do G-0 no fluido vaginal, mas não favorece a permeação desta substância ativa através da mucosa vaginal bovina, sendo o passo através

da membrana lipofílica o limitante na absorção. Considerando a vagina como possível via de administração do fármaco e que o efeito que se deseja conseguir é local para o tratamento da candidíase, os complexos resultam uma adequada solução, evitando possíveis efeitos tóxicos associados a absorção sistêmica (AJIBOYE et al., 2015).

#### 5.1.7. *Influência das ciclodextrinas na citotoxicidade "in vitro" de G-0 na forma de complexos de inclusão liofilizados.*

É importante conhecer a influência das ciclodextrinas na atividade biológica da substância encapsulada, mas também avaliar seu possível efeito na citotoxicidade em culturas celulares, como estimativa da toxicidade sobre determinados tecidos. Os sistemas *"in vitro"* são muito utilizados para realizar "screening" ou ordenar compostos para gerar perfis toxicológicos, ou para estudar os efeitos locais de substâncias em tecidos alvo específicos.

A linhagem de células HaCaT (Human adult low Calcium high Temperature) constitui um modelo experimental bem definido para explorar resposta celular sobre diferentes contextos, justificando seu amplo uso em estudos *in vitro* para investigação de respostas a alguns tipos de estresse. São não tumorais e caracterizadas por uma capacidade de diferenciação altamente conservada e alta estabilidade genética (BOUKAMP et al., 1988). Apresentam crescimento aderente, dispostas em camadas planas e são quase completamente preenchidas pelo núcleo, formando uma arquitetura epidérmica quase normal e com alta capacidade de propagação (JAEGER et al., 2012). Também estão caracterizadas por apresentar alta atividade da enzima topoisomerase I (PESSINA et al., 2001). Tem sido utilizadas como modelo para avaliação da citotoxicidade de vários compostos

como alguns inibidores da topoisomerase (ciprofloxacina, camptotecina e doxorubicina), derivados da partricina A e anfotericina B (PESSINA et al., 2001), o extrato bruto de *Celastrus orbiculatus* (ZHOU et al., 2011), o extrato polifenólico obtido dos frutos da variedade Annurca (D'ANGELO et al., 2012), o ácido cafeico (MAGNANI et al., 2014), antissépticos incorporados em filmes de antelocolágeno (LÓPEZ-GARCÍA et al., 2014), entre outros.

Fibroblastos são células amplamente distribuídas em muitos tipos de tecidos, tendões, ligamentos, pele, estroma mucoso, entre outros. A linhagem celular de fibroblasto L929 é usualmente utilizada como ferramenta em muitos protocolos padronizados para avaliação de biocompatibilidade, ensaios de citotoxicidade de fármacos e estudos biológicos celulares (THEERAKITTAYAKORN; BUNPRASERT, 2011). É uma linhagem celular contínua, inespecífica, com crescimento aderente e capacidade de diferenciação (THONEMANN et al., 2002).

As Figuras 52 e 53, mostram o comportamento na viabilidade celular para L929 e HaCaT respectivamente, tratadas com G-0 e seus complexos com ciclodextrinas, em função da concentração aplicada, em que, aparentemente, os complexos apresentam incremento na viabilidade celular com relação ao fármaco livre.

Observou-se também a resposta das células aos controles de ciclodextrinas, ocorrendo na maioria dos casos, incremento na viabilidade celular acima de 100 % (controle de células). Este efeito também foi observado por outros autores no tratamento de fibroblastos e osteoblastos com HP- $\beta$ -CD (TEIXEIRA et al., 2015) o qual sugere que estes excipientes poderiam estimular a proliferação celular e considerando que as células tumorais tem maior capacidade proliferativa que as

não tumorais, esta poderia ser uma das causas da diferença encontrada nas duas linhagens em estudo.

Para melhor análise dos resultados foram determinados os valores de  $CC_{50}$  para cada grupo e comparados estatisticamente.

Os valores de  $CC_{50}$  obtidos para G-0 na linhagem L929 e HaCaT são mostrados na Tabela 16. Um estudo anterior desenvolvido para determinar a citotoxicidade de um grupo de nitrovinilfuranos mostrou valores de  $CC_{50}$  de 49,97  $\mu$ M para a linhagem tumoral P3-X63/A68/653 mieloma murino e 179,11  $\mu$ M para a linhagem não tumoral CHO-K1 epitelial de ovário de hamster, obtidos após 72 h de incubação de G-0 e usando o método de captação do vermelho neutro para avaliar a viabilidade celular (HERNÁNDEZ et al., 2011).

Os menores valores de  $CC_{50}$  obtidos no presente trabalho podem estar relacionados com diferenças nos métodos utilizados (MTT mede atividade metabólica enquanto o ensaio de captação do vermelho neutro estima o número de células viáveis), diferente concentração de DMSO usado como solvente do G-0, que alcançou o maior valor no primeiro poço da microplaca de 0,5 % no presente trabalho, enquanto que os autores do citado estudo trabalharam com um valor máximo de 0,1 %. Entretanto, outros autores mostraram o efeito da curcumina dissolvida em DMSO em concentrações "inferiores" ao 1% para não comprometer a viabilidade celular (CUTRIGNELLI et al., 2014). Outro fator a considerar nas diferenças obtidas é a diferente susceptibilidade celular ao composto e/ou diferenças na atividade enzimática das células.

**Tabela 16.** Valores de CC<sub>50</sub> obtidos através da regressão não linear das curvas da sigmoide E<sub>max</sub> da viabilidade celular em função da concentração de G-0 livre e nos complexos nas linhagens celulares avaliadas.

| Amostra                | CC <sub>50</sub> (μM) |               |
|------------------------|-----------------------|---------------|
|                        | L929                  | HaCaT         |
| <b>G-0</b>             | 32,68 ± 4,26          | 17,08 ± 3,54  |
| <b>FD G-0/HP-β-CD</b>  | 71,70 ± 8,97          | 36,43 ± 12,91 |
| <b>FD G-0/SBE-β-CD</b> | 122,36 ± 38,29        | 53,88 ± 11,16 |

Para desenvolver a análise estatística entre o tratamento com G-0 e os complexos para a linhagem celular L929, foram comprovadas primeiramente a normalidade (Shapiro Wilks:  $p=0,1875$ ,  $p > 0,05$ ) e independência dos dados obtidos (os dados seguem padrão aleatório, sem tendência aparente pela observação do gráfico dos resíduos) porém, a avaliação da homocedasticidade utilizando o teste de Levene mostrou que as variâncias entre os tratamentos não são homogêneas ( $p=0,0095$ ;  $p<0,05$ ), pelo qual foi desenvolvido neste caso uma análise de variância de tipo não paramétrico (Kruskal-Wallis) para comparar as CC<sub>50</sub> dos diferentes tratamentos, com prova post-hoc ou de contraste não planejado. Como resultado, o valor de  $p=0,0036$  ( $p<0,05$ ) indicou a existência de diferenças estatísticas significativas entre os três grupos. O post-hoc mostrou que existem diferenças significativas entre o grupo 1 (G-0) e o grupo 3 (FD G-0/SBE-β-CD), e que não existem diferenças significativas entre o grupo 1 (G-0) e o grupo 2 (FD G-0/HP-β-CD), nem entre este último e o grupo 3.

Para a análise estatística na linhagem celular HaCaT, foi demonstrada a normalidade da variável dependente (Shapiro Wilks:  $p=0,1678$ ,  $p>0,05$ ),

independência dos dados (gráfico dos resíduos com aparência aleatória), e homocedasticidade (Levene:  $p=0,1257$ ,  $p>0,05$ ). Considerando o anterior, então foi possível aplicar o método ANOVA paramétrico para comparar os três grupos de tratamento, sendo este mais rigoroso que o não paramétrico. Como resultado do ANOVA-One way, foi demonstrada a existência de diferenças estatísticas significativas entre os três grupos ( $p=0,0297$ ,  $p<0,05$ ). O post-hoc, neste caso o teste de Tukey, mostrou diferenças entre os grupos 1 e 3, enquanto não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre grupo 1 - grupo 2 e grupo 2 – grupo 3.

Como conclusões, o complexo de inclusão de G-0 com SBE- $\beta$ -CD aumentou significativamente o valor de  $CC_{50}$  com relação ao G-0 livre para ambas as linhagens celulares, seguido do complexo com HP- $\beta$ -CD.

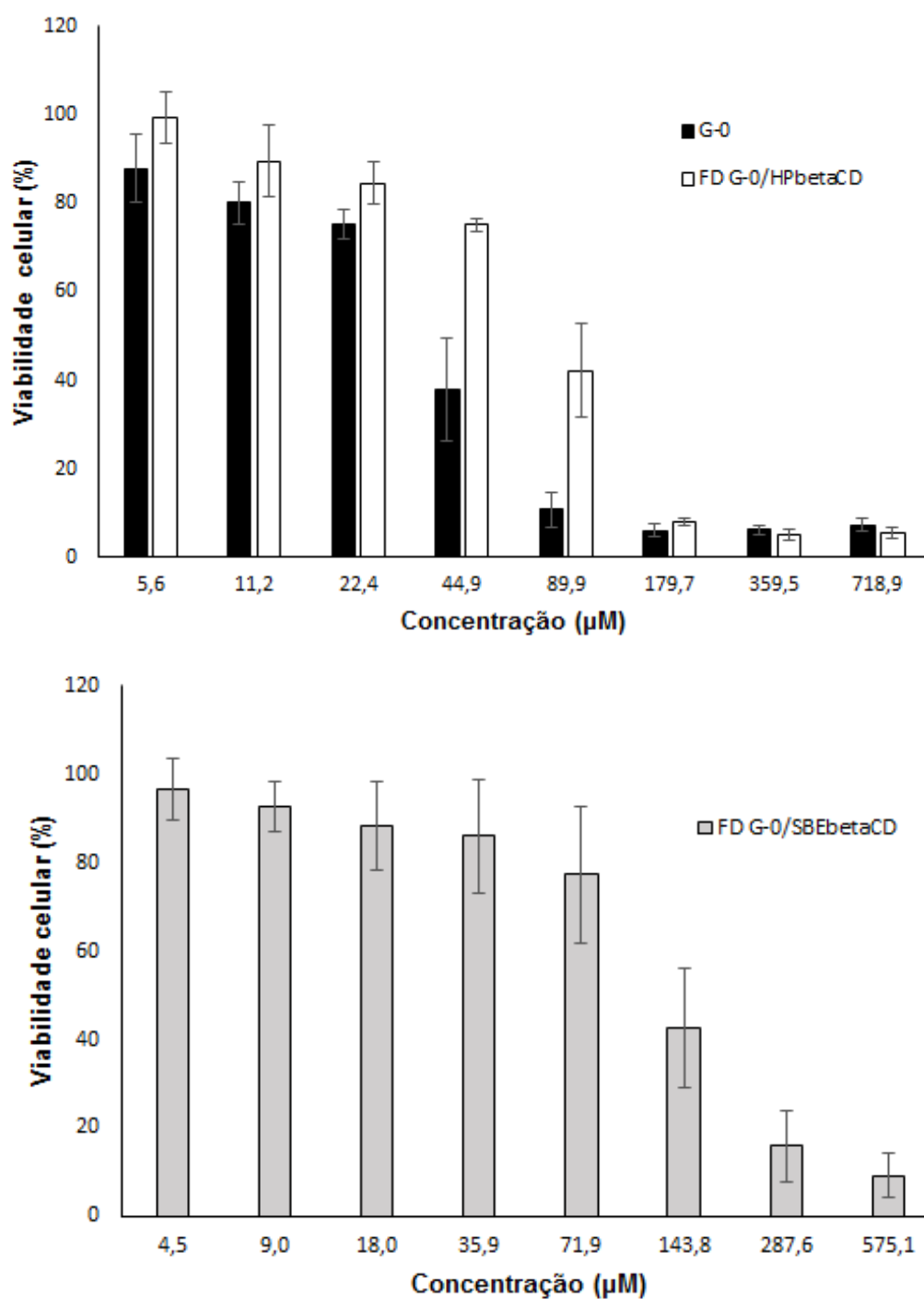


**Figura 52.** Efeito de G-0 e FD G-0/HP-β-CD (acima) e FD G-0/SBE-β-CD (abaixo) na viabilidade da cultura celular de fibroblastos de camundongo L929, expressa como média e desvio padrão de três ensaios ( $n=3$ ).

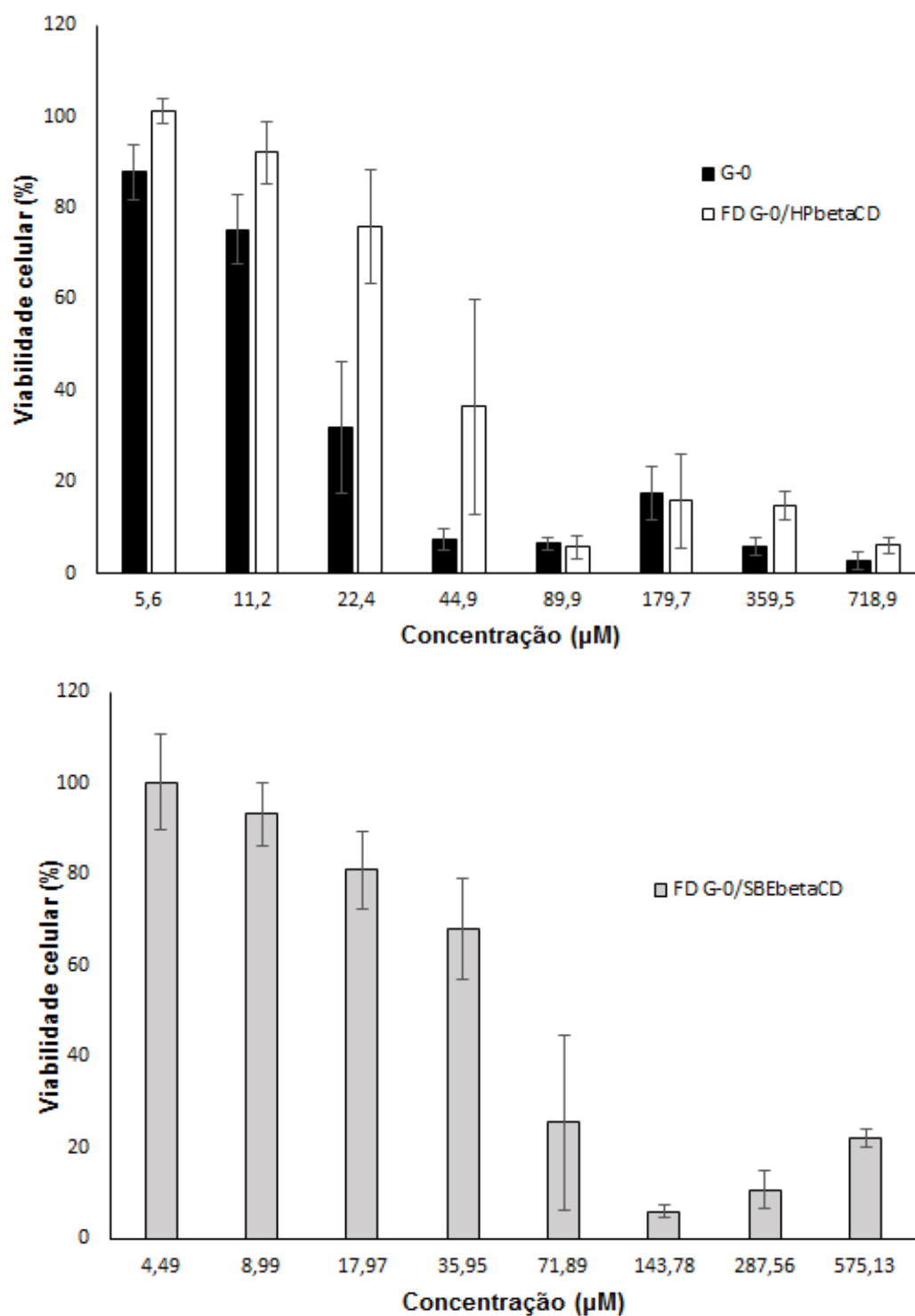


**Figura 53.** Efeito do G-0 e FD G-0/HP-β-CD (acima) e FD G-0/SBE-β-CD (abaixo) na viabilidade celular da cultura de queratinócitos humanos imortalizados HaCaT, expressa como média e desvio padrão de três ensaios ( $n=3$ ).

A concentração inibitória mínima "*in vitro*" encontrada frente a uma cepa clínica de *Candida albicans* foi de 8 µg/mL (57,5 µM) para o complexo FD G-0/SBE-β-CD, valor inferior à CC<sub>50</sub> obtida para fibroblastos, mas muito próximo ao obtido para queratinócitos. No caso do fármaco livre e do complexo FD G-0/HP-β-CD, os valores de CIM obtidos foram superiores aos da CC<sub>50</sub> nas duas linhagens celulares, pelo qual estes últimos podem ser considerados citotóxicos para estas células ao serem usados no tratamento da candidíase, mas podendo ser reservadas no tratamento de outras patologias infecciosas em que as concentrações inibitórias do fármaco são muito inferiores (SIFONTES-RODRÍGUEZ, 2017).

A influência das ciclodextrinas na citotoxicidade de diversos compostos tem sido estudada por vários autores. Um aumento da citotoxicidade do paclitaxel na forma de complexo sobre várias linhagens celulares, foi atribuído a um favorecimento da internalização celular do fármaco por parte das ciclodextrinas (HP-β-CD > ME-β-CD > SBE-β-CD), entanto não foi evidenciada citotoxicidade para nenhuma delas. No caso específico das células PC-3 (adenocarcinoma humano de próstata), não foram observadas diferenças significativas entre os valores de CC<sub>50</sub> para o paclitaxel livre e nos complexos com SBE-β-CD (SHAH et al., 2015).

Um estudo desenvolvido usando duas ciclodextrinas naturais (α- e β-ciclodextrina), explica a diferença no comportamento das ciclodextrinas isoladas frente a diferentes tipos de linhagens celulares, o qual segundo os autores, pode estar relacionado com a diferença na composição das membranas celulares e interação das ciclodextrinas com o colesterol, incrementando a permeabilidade das membranas ao fármaco e, por consequência, incrementando a citotoxicidade do 5-fluoruracil (DI DONATO et al., 2016). Outro estudo avaliou a influência da formação de complexo da curcumina com SBE-β-CD na linhagem celular de carcinoma

hepático HepG-2 e mostrou aumento da citotoxicidade da curcumina. Os autores explicaram o fato, não como efeito sinérgico da ciclodextrina, mas devido ao incremento da solubilidade da curcumina (CUTRIGNELLI et al., 2014). Contrariamente, um trabalho desenvolvido para avaliar a formação de complexos com ciclodextrinas da clorzoxazona, composto com atividade relaxante muscular de ação central e altamente tóxico, exibiu uma melhora na viabilidade celular da linhagem de células hepáticas LO2 quando o composto estava formando complexo com HP- $\beta$ -CD, principalmente em concentrações de fármaco maiores que 12,5  $\mu$ M, mas este resultado não foi discutido (TANG et al., 2015). A formação de complexo de inclusão com HP- $\beta$ -CD também diminuiu a citotoxicidade do ácido difractáico (orcinol isolado da *Usnea sp.*) conseguindo valores de CC<sub>50</sub> de 70,50  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> maiores que os do composto livre de 43,29  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> na linhagem celular de fibroblastos de rins de mono (células Vero) (SILVA et al., 2016). Também o estudo dos complexos de benznidazol com RM- $\beta$ -CD mostrou diminuição da citotoxicidade do fármaco na forma de complexos nas células de macrófagos obtidos do peritônio de camundongos Balb/c. Os autores explicaram o fato, devido à maior hidrofília dos complexos com relação ao benznidazol (mais lipofílico) e a relação entre lipofília e citotoxicidade, tendo as substâncias lipofílicas maior facilidade de atravessar as membranas biológicas (LYRA et al., 2012).

No estudo da citotoxicidade da clorhexidina, desenvolvido usando o método de captação do vermelho neutro, foi demonstrado que ao igual a esse estudo, o comportamento citotóxico depende do tipo de ciclodextrina com a qual o fármaco está formando complexo e também do tipo de célula de mamíferos exposta e em todos os casos os complexos manifestaram menor citotoxicidade quando comparados com o fármaco livre (TEIXEIRA et al., 2015). Um estudo recente,

relativo à citotoxicidade e capacidade de solubilizar o colesterol das membranas plasmáticas, mostrou que a presença de grupos hidroxipropil e sulfobutiléter diminuem a capacidade solubilizante da  $\beta$ -CD, sendo de  $0,75 \pm 0,003 \text{ mg.mL}^{-1}$  e  $0,08 \pm 0,001 \text{ mg.mL}^{-1}$  para HP- $\beta$ -CD e SBE- $\beta$ -CD, respectivamente, à concentração de 50 mM (SZENTE et al., 2018), o qual poderia explicar a diferença na citotoxicidade para ambas as CDs.

Com relação ao método de análise, é importante destacar que ainda quando o ensaio do MTT tem sido considerado o padrão de ouro nos ensaios de citotoxicidade *in vitro*, uma comparação com outros testes alternativos como captação de vermelho neutro, redução da resazurina e ensaio da sulforhodamina B mostrou várias limitações e fatores que podem interferir nos resultados do ensaio do MTT. Entre eles, a variabilidade nos valores de absorbância incrementam na medida que aumenta a densidade celular por poço e menor sensibilidade comparado com os outros testes, sendo muito pouco sensível a densidades celulares menores de  $1 \times 10^3$  células/poço. Também, a conversão do formazan está relacionada com a atividade metabólica celular e com o número de mitocôndrias presentes. Considerando os resultados obtidos por outros autores, recomenda-se o desenvolvimento do teste de sulforhodamina B ou captação do vermelho neutro como opção de ensaio pré-clínico para compostos potenciais terapêuticos que apresentam potencial de oxido-redução (VAN TONDER; JOUBERT; CROMARTY, 2015).

## **5.2. Avaliação das micropartículas de G-0 e etilcelulose como alternativa de estabilização**

### *5.2.1. Compatibilidade com polímero usando CLAE.*

Etilcelulose é um polímero fisiologicamente inerte, compressível, solúvel em vários solventes orgânicos e de alta flexibilidade a baixas temperaturas. Apresenta elevada resistência mecânica e tem capacidade de formar filmes e atuar como excipiente em comprimidos (LAI; PITT; CRAIG, 2010; DAVIDOVICH-PINHAS; BARBUT; MARANGONI, 2014).

Tem sido avaliada em vários estudos para encapsular fármacos fungicidas como tioconazol (MAYUR et al., 2013), fluconazol (ABDELMALAK; ELMENSHAW, 2012), tebuconazol (DE LIMA, 2014) e o que é mais importante neste caso, para estabilizar compostos. Etilcelulose tem resistência à descoloração por luz solar. Foi estudada a formação de micropartículas deste polímero para melhorar a fotoestabilidade de anlodipino (RAGNO et al., 2003) e nifedipina (DINARVAND et al., 2006). Também foi avaliada como alternativa na diminuição da contaminação por biocidas voláteis (DE LIMA, 2014).

A análise quantitativa das misturas físicas sólidas do composto furânico com etilcelulose mostrou que o conteúdo de ativo superou em todos os casos 80 %, e qualitativamente, como resultado da varredura espectral, não foi detectado nenhum produto de degradação (Figura 54).

Também não foram observadas mudanças nas características organolépticas das amostras (cor e aspecto), exceto para uma mistura de G-0 e etilcelulose umectada com acetona, a qual foi observado escurecimento da amostra, possivelmente devido à presença de pequenas proporções de água no solvente. Como resultado desta análise preliminar e considerando as

características de hidrofobicidade do fármaco, maior solubilidade em solventes de média à baixa polaridade e maior estabilidade em estes últimos, foi escolhida a etilcelulose (polímero hidrofóbico) como agente formador de micropartículas.

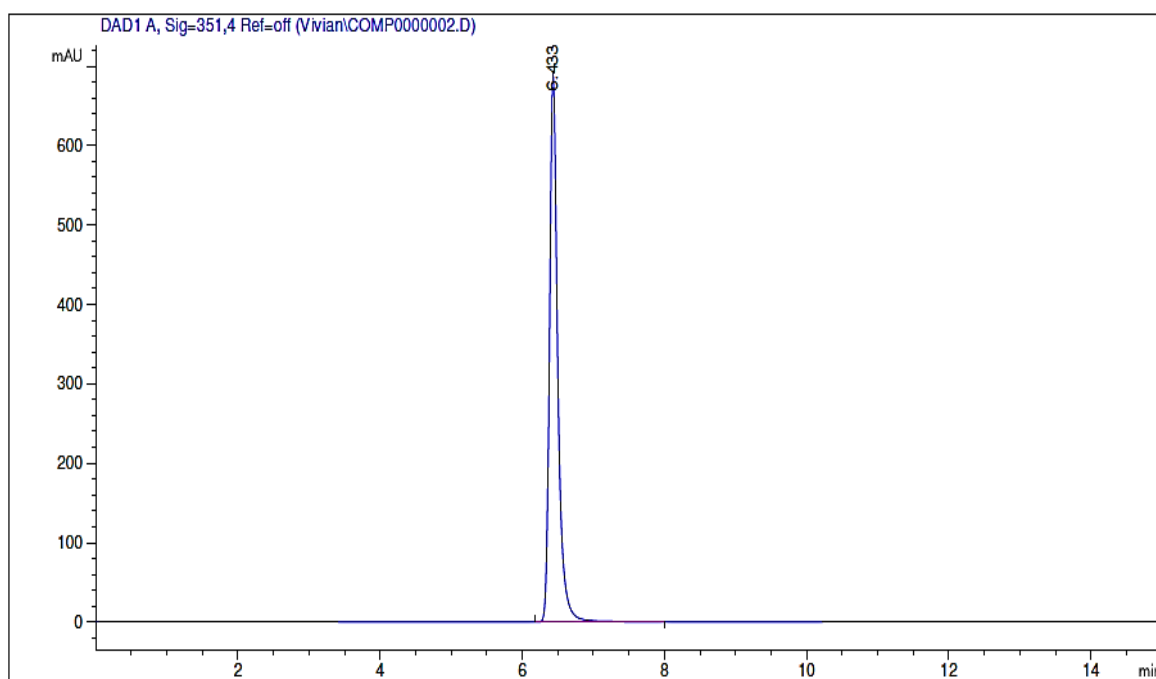


**Figura 54.** Cromatograma obtido para a mistura física G-0/EC (1:1, m/m) armazenada por 4 semanas a 40 °C/75% HR.

#### 5.2.2.. Desenvolvimento das micropartículas

O método escolhido para a formação das micropartículas foi a emulsificação/evaporação do solvente que tem sido muito utilizado devido a sua versatilidade na encapsulação de compostos com polaridade diversa e em consequência, permite o uso de polímeros hidrofóbicos ou hidrofílicos. No caso da encapsulação de substâncias hidrofóbicas, é utilizado um polímero de polaridade semelhante, o qual será dissolvido em geral, em uma baixa quantidade de solvente orgânico (FREITAS; MERKLE; GANDER, 2005). Neste trabalho foi escolhido como solvente orgânico o diclorometano para solubilizar o 2-(2-nitrovinil) furano e ao

polímero, devido à alta solubilidade e estabilidade do ativo, documentada na utilização deste solvente na validação da técnica de análise qualitativa de cromatografia em camada delgada do produto (RODRÍGUEZ, 1996). Além disso, o diclorometano apresenta elevada imiscibilidade com a água e baixa temperatura de ebulição (39.7°C), evaporando rapidamente da emulsão à temperatura ambiente, diminuindo assim o tempo de agitação durante o preparo das micropartículas (KHUDHAIR; AL-KHEDAIRY, 2016).

Como estabilizante da emulsão foi selecionado álcool polivinílico, o qual tem sido utilizado com sucesso em vários trabalhos em que usada a etilcelulose como polímero (RAGNO et al., 2003; DINARVAND et al., 2006; CHOUDHARY et al., 2010; ABDELMALAK; EL-MENSHAWI, 2012; GUPTA et al., 2013; MAYUR et al., 2013; KUMAR; MURALIDHARAN; PARASURAMAN, 2014; PANWAR; TANWAR, 2015). O estabilizante é removido do sistema no momento da formação das micropartículas, através de filtração e enxague com água morna.

Um planejamento fatorial  $2^{(k-p)}$ , foi desenvolvido com propósito de avaliar os fatores que influem na obtenção das micropartículas e otimizar as respostas. A matriz geral está descrita na Tabela 17.

**Tabela 17.** Matriz geral do planejamento fatorial com 4 fatores experimentais em dois níveis, e variáveis resposta.

| Exp | PVA (%) | EC (mg) | VolFI (mL) | Velocidade de agitação (rpm) | Recuperação (%) | EE (%) | tp (um) | Circ. | PDI |
|-----|---------|---------|------------|------------------------------|-----------------|--------|---------|-------|-----|
| 1   | 0,5     | 500     | 10         | 1000                         | 49,80           | 47,9   | 345     | 0,98  | 1,0 |
| 2   | 0,1     | 250     | 10         | 1000                         | 53,80           | 75,5   | 557     | 0,88  | 0,8 |
| 3   | 0,1     | 500     | 10         | 1000                         | 68,90           | 67,8   | 1035    | 0,81  | 1,4 |
| 4   | 0,5     | 500     | 10         | 500                          | 61,90           | 69,6   | 470     | 0,97  | 1,4 |
| 5   | 0,1     | 250     | 10         | 500                          | 71,20           | 64,9   | 750     | 0,74  | 1,3 |
| 6   | 0,1     | 500     | 20         | 1000                         | 63,20           | 60,9   | 455     | 0,74  | 0,9 |
| 7   | 0,5     | 250     | 20         | 1000                         | 55,04           | 61,8   | 405     | 0,79  | 1,0 |
| 8   | 0,5     | 250     | 20         | 500                          | 62,10           | 79,9   | 109     | 0,99  | 0,8 |
| 9   | 0,5     | 500     | 20         | 500                          | 61,90           | 63,1   | 166     | 0,98  | 1,0 |
| 10  | 0,1     | 500     | 10         | 500                          | 70,80           | 66,2   | 1289    | 0,79  | 0,8 |
| 11  | 0,5     | 500     | 20         | 1000                         | 53,70           | 55,5   | 304     | 0,94  | 0,8 |
| 12  | 0,1     | 250     | 20         | 1000                         | 57,70           | 62,5   | 531     | 0,75  | 0,9 |
| 13  | 0,1     | 500     | 20         | 500                          | 69,00           | 72,9   | 632     | 0,75  | 1,8 |
| 14  | 0,1     | 250     | 20         | 500                          | 65,90           | 66,7   | 721     | 0,82  | 1,7 |
| 15  | 0,5     | 250     | 10         | 500                          | 53,70           | 81,5   | 309     | 0,91  | 0,9 |
| 16  | 0,5     | 250     | 10         | 1000                         | 51,00           | 81,9   | 428     | 0,78  | 1,2 |

*VolFI: Volume de fase interna; EE: Eficiência de encapsulação; tp: tamanho médio de partícula; Circ: Circularidade; PDI: Polidispersidade.*

**- Variável resposta: Recuperação**

Os valores de recuperação das micropartículas obtidas ficaram na faixa de 49,8 a 71,20 %. Os fatores que influíram negativamente na variável resposta foram a concentração de PVA e a velocidade de agitação, entanto a quantidade de etilcelulose e a interação entre a concentração de PVA e volume de fase interna favoreceram a recuperação (Quadro 5 e Figura 55).

**Quadro 5.** Efeitos estimados para a variável resposta Recuperação (%)

| Effect Estimates; Var.: Recuperação; R-sqr=.93449; Adj.: 80348 (Design: 2**(4-0) design (Spreadsheet13) in Planejamento fatorial 2 3 microesferas)<br>4 factors at two levels; MS Residual=10,29666<br>DV: Recuperação |          |          |                    |                    |          |                    |                    |                    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|----------|--------------------|--------------------|----------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Factor                                                                                                                                                                                                                 | t(5)     | p        | -95, %<br>Cnf.Limt | +95, %<br>Cnf.Limt | Coeff.   | Std.Err.<br>Coeff. | -95, %<br>Cnf.Limt | +95, %<br>Cnf.Limt |
| Mean/Interc.                                                                                                                                                                                                           | 72,53168 | 0,000000 | 59,1594            | 63,50675           | 61,33306 | 0,845604           | 59,15936           | 63,50675           |
| (1)PVA                                                                                                                                                                                                                 | -6,13828 | 0,001667 | -14,7285           | -6,03372           | -5,19056 | 0,845604           | -7,36425           | -3,01686           |
| (2)EC                                                                                                                                                                                                                  | 2,75650  | 0,040000 | 0,3260             | 9,34094            | 2,41674  | 0,876741           | 0,16300            | 4,67047            |
| (3)VolFI                                                                                                                                                                                                               | -0,31404 | 0,766169 | -4,8785            | 3,81628            | -0,26556 | 0,845604           | -2,43925           | 1,90814            |
| (4)Velocidade                                                                                                                                                                                                          | -5,54699 | 0,002615 | -13,7285           | -5,03372           | -4,69056 | 0,845604           | -6,86425           | -2,51686           |
| 1 by 2                                                                                                                                                                                                                 | -1,97805 | 0,104839 | -7,9759            | 1,03899            | -1,73424 | 0,876741           | -3,98797           | 0,51950            |
| 1 by 3                                                                                                                                                                                                                 | 2,72948  | 0,041306 | 0,2687             | 8,96350            | 2,30806  | 0,845604           | 0,13436            | 4,48175            |
| 1 by 4                                                                                                                                                                                                                 | 1,10342  | 0,320098 | -2,4813            | 6,21350            | 0,93306  | 0,845604           | -1,24064           | 3,10675            |
| 2 by 3                                                                                                                                                                                                                 | -1,74993 | 0,140535 | -7,5759            | 1,43899            | -1,53424 | 0,876741           | -3,78797           | 0,71950            |
| 2 by 4                                                                                                                                                                                                                 | -0,18162 | 0,863012 | -4,8259            | 4,18899            | -0,15924 | 0,876741           | -2,41297           | 2,09450            |
| 3 by 4                                                                                                                                                                                                                 | 1,22168  | 0,276281 | -2,2813            | 6,41350            | 1,03306  | 0,845604           | -1,14064           | 3,20675            |

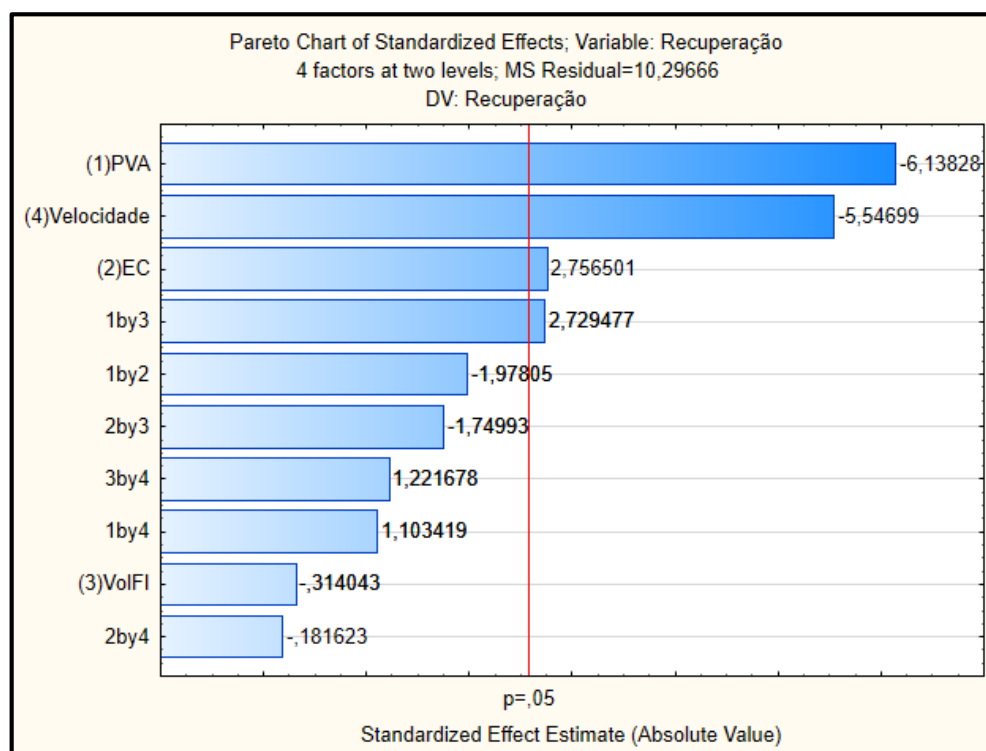


**Figura 55.** Influência e significância dos diferentes fatores e interações na variável resposta Recuperação (%).

Uma vez tiradas as variáveis e efeitos não significativos do modelo inicial e ajustado o modelo matemático (Quadro 6), os fatores que resultaram mais significativos ( $p < 0,05$ ) sobre a variável recuperação foram o PVA e a velocidade de agitação (Figura 56).

**Quadro 6.** Ajuste da regressão com prévia eliminação de efeitos e interações não significativas para a Recuperação.

| Regr. Coefficients; Var.: Recuperação; R-sq=,84419; Adj.: ,76628 (Design: 2**(4-0) design (Spreadsheet13) in Planejamento fatorial 2 3 microesferas)<br>4 factors at two levels; MS Residual=12,24561<br>DV: Recuperação |          |          |          |                    |                    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|----------|----------|--------------------|--------------------|
| Factor                                                                                                                                                                                                                   | Std.Err. | t(10)    | p        | -95, %<br>Cnf.Limt | +95, %<br>Cnf.Limt |
| Mean/Interc.                                                                                                                                                                                                             | 5,77336  | 14,25846 | 0,000000 | 69,4554            | 95,1831            |
| (1)PVA                                                                                                                                                                                                                   | 14,01879 | -3,61027 | 0,004766 | -81,8475           | -19,3758           |
| (2)EC                                                                                                                                                                                                                    | 0,00729  | 2,04098  | 0,068534 | -0,0014            | 0,0311             |
| (3)VolFl                                                                                                                                                                                                                 | 0,32053  | -1,54894 | 0,152439 | -1,2107            | 0,2177             |
| (4)Velocidade                                                                                                                                                                                                            | 0,00353  | -4,75214 | 0,000778 | -0,0246            | -0,0089            |
| 1 by 3                                                                                                                                                                                                                   | 0,88223  | 2,05158  | 0,067330 | -0,1558            | 3,7757             |

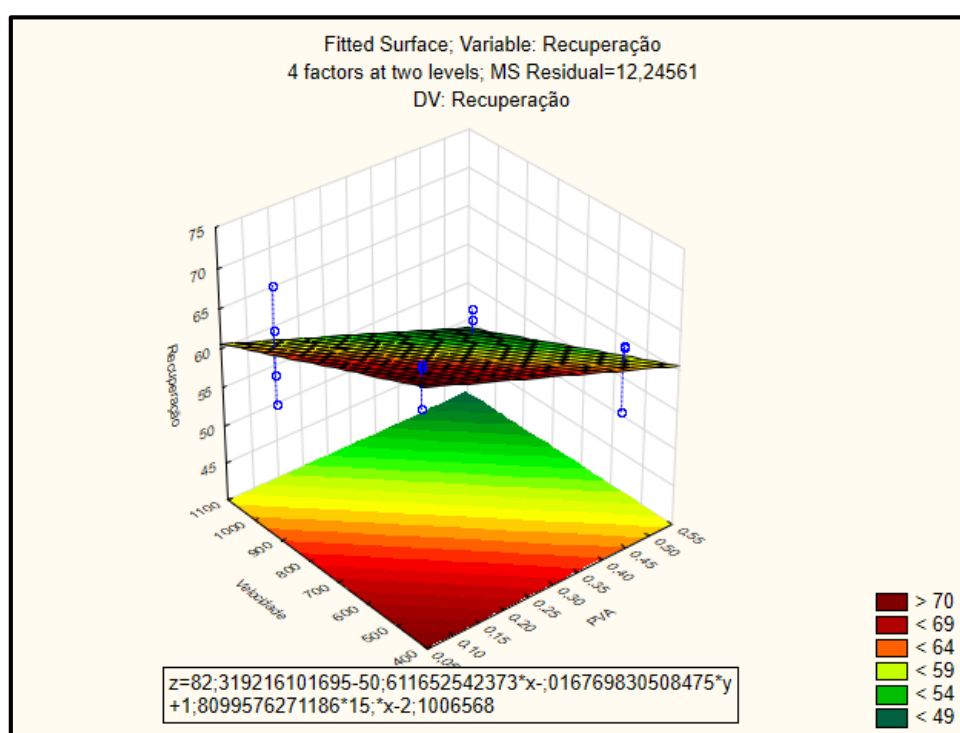


**Figura 56.** Superfície de resposta da influência da concentração de PVA e velocidade de agitação na Recuperação.

Na variável resposta recuperação, a influência da concentração de PVA poderia estar associada à diminuição considerável no tamanho de partícula com o aumento da concentração do estabilizante, pelo qual as partículas menores podem-se perder durante a separação e lavagem. No caso da agitação, foi verificada formação de espuma quando se usou velocidade de 1000 rpm, contribuindo à

formação de menos micropartículas, o que tem como consequência menor recuperação, como mostrado no gráfico de superfície-resposta.

- *Variável resposta: Eficiência de encapsulação*

A eficiência de encapsulação dos sistemas obtidos comportou-se na faixa de 47,90 a 81,90 %. Os fatores que influenciaram de forma mais significativa ( $p < 0,05$ ) no modelo matemático ajustado foram a concentração de PVA e a interação entre este fator com o conteúdo de etilcelulose (Quadro 7 e Figura 57).

**Quadro 7.** Ajuste de regressão com previa eliminação de efeitos e interações não significativas para a Eficiência de encapsulação.

| Regr. Coefficients; Var.:EE; R-sqr=.45453; Adj.:.31816 (Design: 2**(4-0) design (Spreadsheet13) in Planejamento fatorial 2 3 microesferas)<br>4 factors at two levels; MS Residual=59,64236<br>DV: EE |                    |          |          |          |                   |                   |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|----------|----------|----------|-------------------|-------------------|
| Factor                                                                                                                                                                                                | Regressn<br>Coeff. | Std.Err. | t(12)    | p        | -95,%<br>Cnf.Limt | +95,%<br>Cnf.Limt |
| Mean/Interc.                                                                                                                                                                                          | 60,51625           | 10,50125 | 5,76277  | 0,000090 | 37,63599          | 83,3965           |
| (1)PVA                                                                                                                                                                                                | 66,03750           | 29,80642 | 2,21555  | 0,046812 | 1,09489           | 130,9801          |
| (2)EC                                                                                                                                                                                                 | 0,01745            | 0,02872  | 0,60769  | 0,554722 | -0,04513          | 0,0800            |
| 1 by 2                                                                                                                                                                                                | -0,17295           | 0,07851  | -2,20304 | 0,047875 | -0,34400          | -0,0019           |

O aumento da eficiência de encapsulação com aumento do PVA pode estar relacionado com a maior estabilidade da emulsão, mas isto ocorre quando a concentração de EC encontra-se em valores de médios a baixos. Contrariamente ao esperado, um aumento da concentração de EC quando a concentração de PVA é alta, diminui a eficiência de encapsulação do composto, mas quando a concentração de PVA é baixa, o conteúdo de EC não influencia o processo de encapsulação. Este fenômeno pode estar relacionado às características de solubilidade do composto ativo entre as duas fases. O composto 2-(2-nitrovinil) furano apresenta baixa massa molar e coeficiente de partição n-octanol/água de

1,56, considerado como pouco hidrofóbico (CABRERA et al., 2001). Quando a etilcelulose (polímero hidrofóbico e insolúvel em água) está em alta proporção, ela poderia competir na solvatação com o fármaco pelo diclorometano. Se a concentração do PVA é baixa (0,1%), este tem menos capacidade solubilizante do fármaco, mas se pelo contrário, a concentração é alta (0,5 %), a capacidade solubilizante na fase aquosa aumenta, facilitando a extração do composto para a fase externa. Um resultado similar foi obtido para o Aceclofenaco em sistemas microparticulados com concentrações crescentes de etilcelulose e 0,5 % de PVA. Nesse caso, a formulação com a relação Aceclofenaco:EC (1:1) mostrou eficiência de encapsulação de 89 %, entanto as relações 1:2 e 1:3 apresentaram valores inferiores, de 71,53% e 55,87 % respectivamente (GUPTA et al., 2013). Outro trabalho em que foram desenvolvidas micropartículas de cetozonazol em etilcelulose também relatou a maior eficiência de encapsulação com a proporção fármaco/polímero 1:1. Eles sugerem que o aumento na viscosidade gerado pelo aumento da concentração polimérica pode gerar gotas maiores de fase interna, que levarão mais tempo para conformar as micropartículas e, portanto o fármaco teria mais tempo para difundir na fase externa, diminuindo assim a eficiência (KUMAR; MURALIDHARAN; PARASURAMAN, 2014).

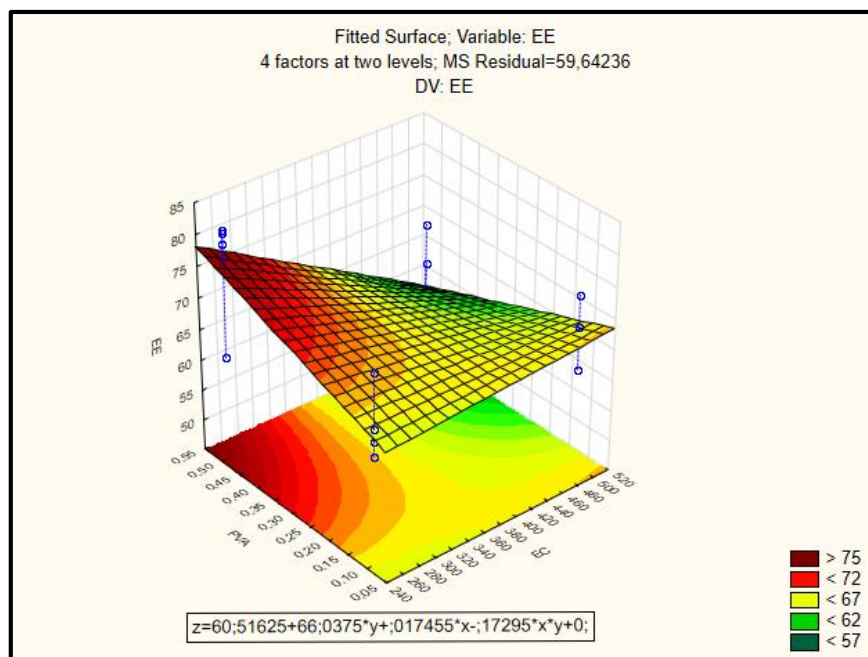


**Figura 57.** Superfície de resposta para a influência da concentração do PVA e conteúdo de EC na Eficiência de encapsulação (%)

- Variável resposta: Tamanho médio de partícula

O tamanho de partículas dos sistemas obtidos manteve-se na faixa de 109 a 1289  $\mu\text{m}$ . O único fator identificado como significativo para a variável resposta tamanho foi a concentração de PVA (Quadros 8 e 9), com uma proporcionalidade inversa entre a concentração do estabilizante e o tamanho de partícula (Figura 58).

**Quadro 8.** Efeitos estimados para a variável resposta tamanho médio de partícula ( $\mu\text{m}$ )

| Effect Estimates; Var.:Tamanho de partícula; R-sqr=.8481; Adj.:54431 (Design: 2**(4-0) design (Spreadsheet13) in Planejamento fatorial 2 4 microsferas)<br>4 factors at two levels; MS Residual=427,1946<br>DV: Tamanho de partícula |          |          |          |          |                    |                    |          |                    |                    |                    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|----------|----------|----------|--------------------|--------------------|----------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Factor                                                                                                                                                                                                                               | Effect   | Std.Err. | t(5)     | p        | -95, %<br>Cnf.Limt | +95, %<br>Cnf.Limt | Coeff.   | Std.Err.<br>Coeff. | -95, %<br>Cnf.Limt | +95, %<br>Cnf.Limt |
| Mean/Interc.                                                                                                                                                                                                                         | 55,2208  | 5,44668  | 10,13844 | 0,000160 | 41,2197            | 69,2220            | 55,2208  | 5,446677           | 41,2197            | 69,22196           |
| (1)PVA                                                                                                                                                                                                                               | -47,0417 | 10,89335 | -4,31838 | 0,007582 | -75,0439           | -19,0394           | -23,5208 | 5,446677           | -37,5220           | -9,51970           |
| (2)EC                                                                                                                                                                                                                                | 8,5021   | 11,29447 | 0,75277  | 0,485501 | -20,5313           | 37,5354            | 4,2510   | 5,647235           | -10,2656           | 18,76772           |
| (3)VolFl                                                                                                                                                                                                                             | -27,3667 | 10,89335 | -2,51224 | 0,053681 | -55,3689           | 0,6356             | -13,6833 | 5,446677           | -27,6845           | 0,31780            |
| (4)Velocidade                                                                                                                                                                                                                        | -8,9417  | 10,89335 | -0,82084 | 0,449090 | -36,9439           | 19,0606            | -4,4708  | 5,446677           | -18,4720           | 9,53030            |
| 1 by 2                                                                                                                                                                                                                               | -7,6521  | 11,29447 | -0,67751 | 0,528160 | -36,6854           | 21,3813            | -3,8260  | 5,647235           | -18,3427           | 10,69064           |
| 1 by 3                                                                                                                                                                                                                               | 13,1667  | 10,89335 | 1,20869  | 0,280819 | -14,8356           | 41,1689            | 6,5833   | 5,446677           | -7,4178            | 20,58446           |
| 1 by 4                                                                                                                                                                                                                               | 19,6417  | 10,89335 | 1,80309  | 0,131235 | -8,3606            | 47,6439            | 9,8208   | 5,446677           | -4,1803            | 23,82196           |
| 2 by 3                                                                                                                                                                                                                               | -13,7271 | 11,29447 | -1,21538 | 0,278473 | -42,7604           | 15,3063            | -6,8635  | 5,647235           | -21,3802           | 7,65314            |
| 2 by 4                                                                                                                                                                                                                               | -3,0521  | 11,29447 | -0,27023 | 0,797784 | -32,0854           | 25,9813            | -1,5260  | 5,647235           | -16,0427           | 12,99064           |
| 3 by 4                                                                                                                                                                                                                               | 10,6167  | 10,89335 | 0,97460  | 0,374519 | -17,3856           | 38,6189            | 5,3083   | 5,446677           | -8,6928            | 19,30946           |

**Quadro 9.** Análise da variância (ANOVA) para todos os efeitos e interações no tamanho de partícula ( $\mu\text{m}$ ).

| ANOVA; Var.:Tamanho de partícula; R-sqr=.52412; Adj.:49013 (Design: 2**(4-0) design (Spreadsheet13) in Planejamento fatorial 2 4 microesferas)<br>4 factors at two levels; MS Residual=477,9925<br>DV: Tamanho de partícula |          |    |          |          |          |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|----|----------|----------|----------|
| Factor                                                                                                                                                                                                                      | SS       | df | MS       | F        | p        |
| (1)PVA                                                                                                                                                                                                                      | 7370,22  | 1  | 7370,223 | 15,41912 | 0,001520 |
| Error                                                                                                                                                                                                                       | 6691,90  | 14 | 477,993  |          |          |
| Total SS                                                                                                                                                                                                                    | 14062,12 | 15 |          |          |          |

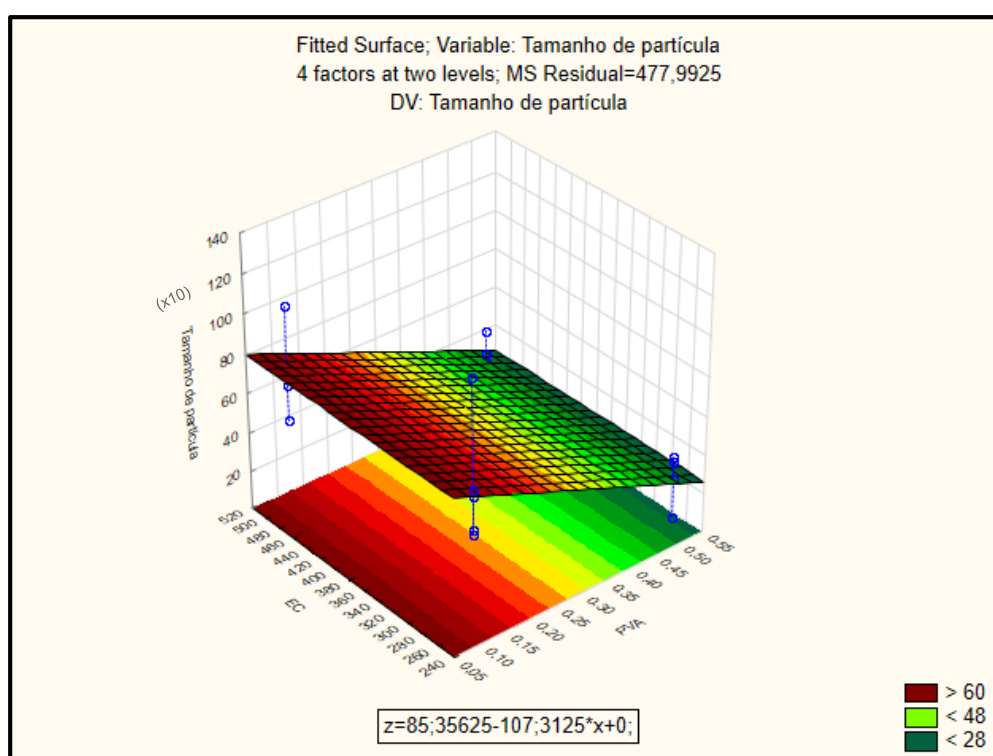


**Figura 58.** Superfície de resposta para a influência da concentração de PVA e conteúdo de EC no tamanho médio de partícula ( $\mu\text{m}$ ).

A influência inversa da concentração de PVA pode ser devida a uma diminuição da tensão interfacial da fase contínua na medida que aumenta a concentração de tensoativo, com a consequente diminuição no tamanho da gotícula da fase interna da emulsão. Resultados similares foram obtidos na preparação de microesferas de fluconazol e lafutidina (ABDELMALAK; EL-MENSHAWE, 2012; KHUDHAIR; AL-KHEDAIRY, 2016).

- Variável resposta: Circularidade

O índice de circularidade das micropartículas formadas manteve-se entre 0,74 a 0,99. Os efeitos identificados inicialmente foram a concentração de PVA e as interações com EC e a velocidade de agitação (Figura 59).

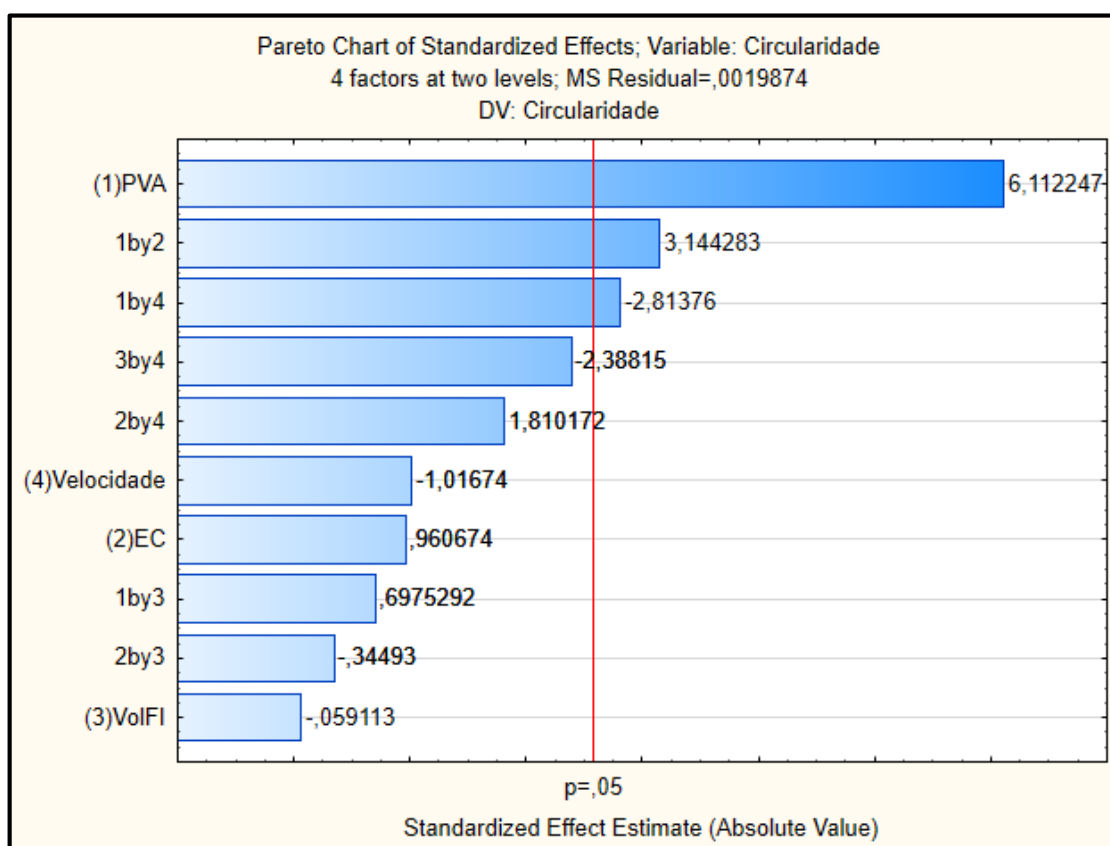


**Figura 59.** Influência e significância dos fatores e interações na Circularidade

Ao eliminar os efeitos e interações não significativas e ajustar os dados no modelo matemático, a interação significativa ( $p < 0,05$ ) entre a concentração de PVA e EC foi evidenciada (Quadro 10) com um efeito positivo na circularidade, ou seja, elevadas concentrações de ambos polímeros aumentam a circularidade do sistema em estudo como apresentado no gráfico de superfície resposta (Figura 60).

**Quadro 10.** Ajuste da regressão com prévia eliminação de efeitos e interações não significativas na Circularidade

| Regr. Coefficients: Var.:Circularidade; R-sqr=,78778; Adj:,68167 (Design: 2**(4-0) design (Spreadsheet13) in Planejamento fatorial 2 3 microesferas)<br>4 factors at two levels; MS Residual=,0029536<br>DV: Circularidade |                    |          |          |          |                   |                   |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|----------|----------|----------|-------------------|-------------------|
| Factor                                                                                                                                                                                                                     | Regressn<br>Coeff. | Std.Err. | t(10)    | p        | -95,%<br>Cnf.Limt | +95,%<br>Cnf.Limt |
| Mean/Interc.                                                                                                                                                                                                               | 0,764554           | 0,094044 | 8,12976  | 0,000010 | 0,555011          | 0,974096          |
| (1)PVA                                                                                                                                                                                                                     | 0,275893           | 0,278326 | 0,99126  | 0,344938 | -0,344256         | 0,896042          |
| (2)EC                                                                                                                                                                                                                      | -0,000286          | 0,000209 | -1,36722 | 0,201502 | -0,000751         | 0,000180          |
| (4)Velocidade                                                                                                                                                                                                              | 0,000118           | 0,000101 | 1,16716  | 0,270223 | -0,000107         | 0,000344          |
| 1 by 2                                                                                                                                                                                                                     | 0,001371           | 0,000563 | 2,43791  | 0,034974 | 0,000118          | 0,002625          |
| 1 by 4                                                                                                                                                                                                                     | -0,000596          | 0,000277 | -2,15672 | 0,056421 | -0,001213         | 0,000020          |

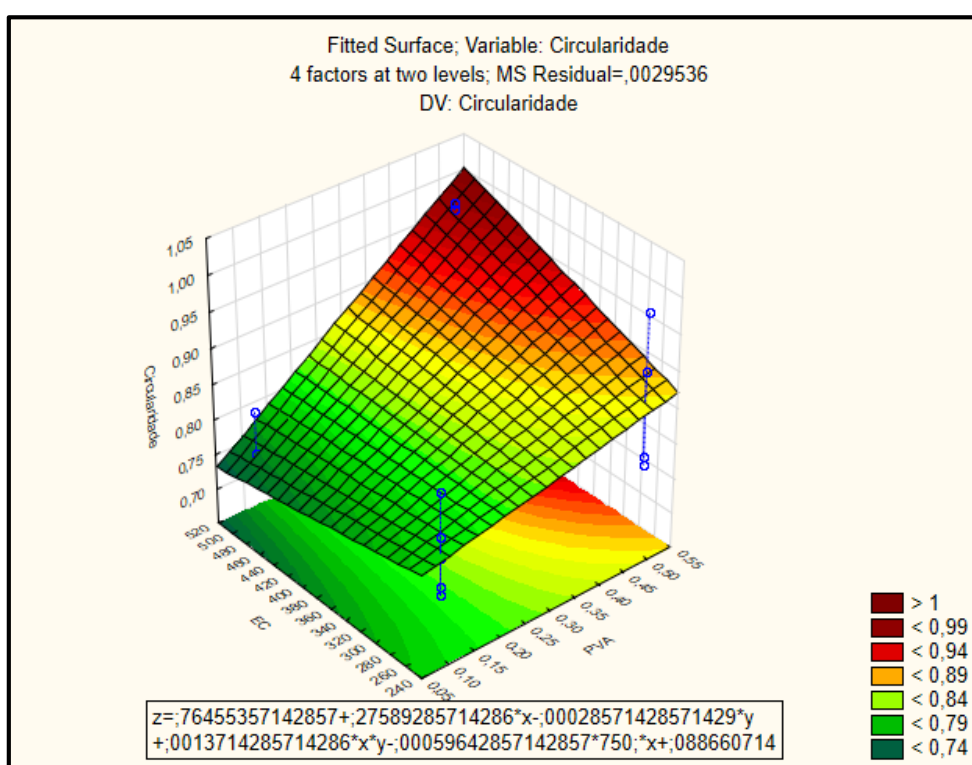


**Figura 60.** Superfície de resposta para a influência da concentração de PVA e conteúdo de EC na Circularidade

A polidispersidade das micropartículas desenvolvidas nos diferentes ensaios também foi avaliada. De modo geral este valor manteve-se em níveis elevados (0,80 - 1,86). Elevado grau de polidispersidade também foi observada nos sistemas microparticulados de tebuconazol (DE LIMA, 2014). Não foi determinado nenhum

dos fatores avaliados como significativo para esta variável resposta, por este motivo não foi incluída no modelo final para otimização do sistema.

#### - Função Desejabilidade

A estratégia da desejabilidade ou "*desirability*" pode ser usada de diversas formas para otimizar um sistema. Uma delas é aplicando a desejabilidade ótima para respostas múltiplas em pontos exatos dos fatores para cada variável resposta, utilizando 4 intervalos para cada ponto e depois, aplicando a função geral de otimização para encontrar a solução final para cada variável resposta. Finalmente, o mesmo procedimento pode ser seguido para todas as respostas juntas (Figura 61).

Neste trabalho foram fixados dois fatores em valores que influenciaram positivamente na maioria das respostas (volume de fase Interna- 20 mL e velocidade de agitação- 500 rpm) e foram incluídos pontos centrais para os fatores que mais influenciaram (concentração de PVA-0,3 % e conteúdo de EC- 375 mg) e foi avaliada a desejabilidade de acordo ao modelo matemático calculado através do software. (Figura 62).

O ensaio desenvolvido segundo a desejabilidade serviu para validar o modelo. Os resultados são mostrados na Tabela 18.

**Tabela 18.** Resultados obtidos para o ensaio proposto usando a função desejabilidade.

| Réplica | Recuperação (%) | EE (%)       | Tamanho médio de partícula (µm) | Circularidade |
|---------|-----------------|--------------|---------------------------------|---------------|
| 1       | 64,60           | 71,37 ± 7,36 | 520                             | 0,86 ± 0,12   |
| 2       | 66,17           | 80,21 ± 4,33 | 420                             | 0,83 ± 0,23   |

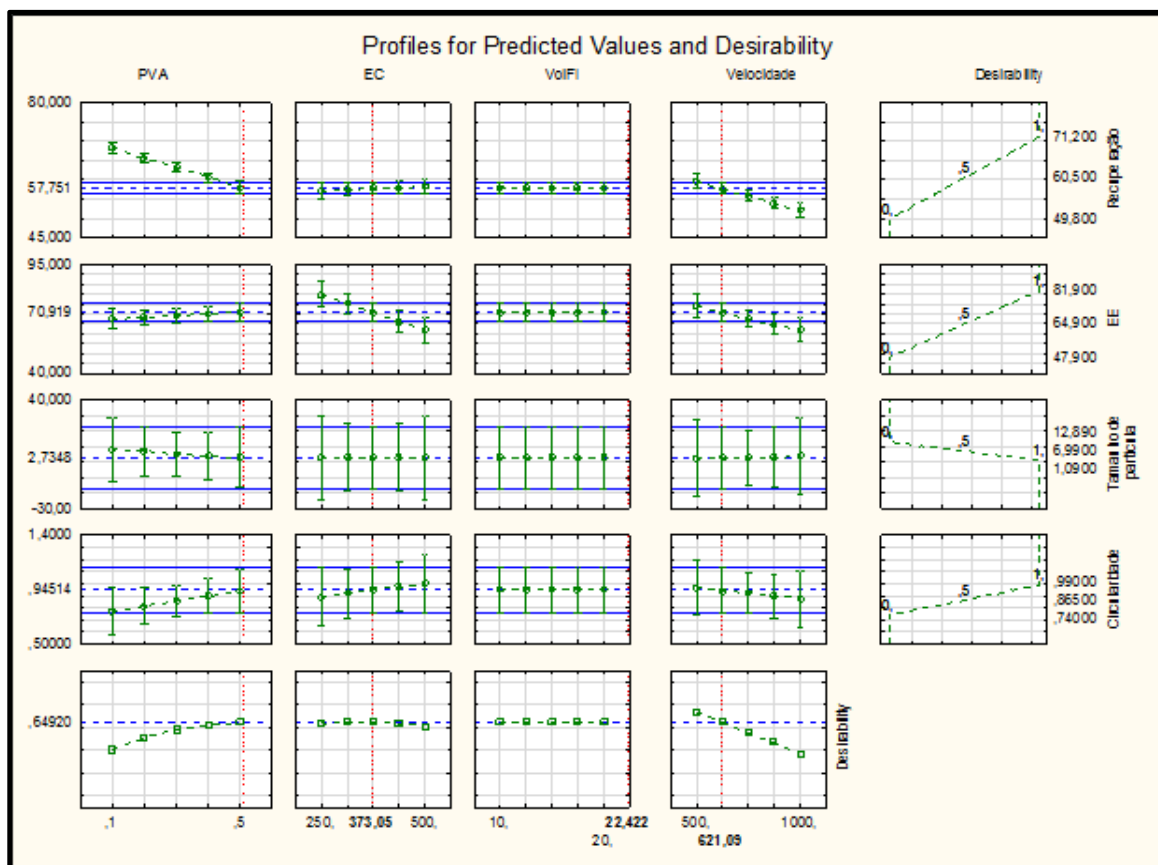


**Figura 61.** Desejabilidade ótima aplicando a função geral de otimização, para cada variável resposta e para respostas múltiplas.

Baseado nos melhores resultados obtidos da eficiência de encapsulação (79,9 %), circularidade (0,99), recuperação (62,1 %), tamanho médio de partícula (109  $\mu\text{m}$ ) e menor PDI (0,80), foram escolhidas as composições das micropartículas do ensaio 8 do planejamento fatorial para posterior caracterização e avaliação, que serão nomeadas como ME G-0/EC (1:1 m/m). Considerando também o alto grau de aglomeração observado para os sistemas preparados com alta concentração de PVA, as micropartículas baseadas na função desejabilidade (PVA -0,3 % m/v e EC-375 mg), também foram preparadas, mantendo constantes a velocidade de agitação em 500 rpm e volume de fase interna 20 mL, para posterior caracterização (ME G-0/EC 1:1,5 m/m).

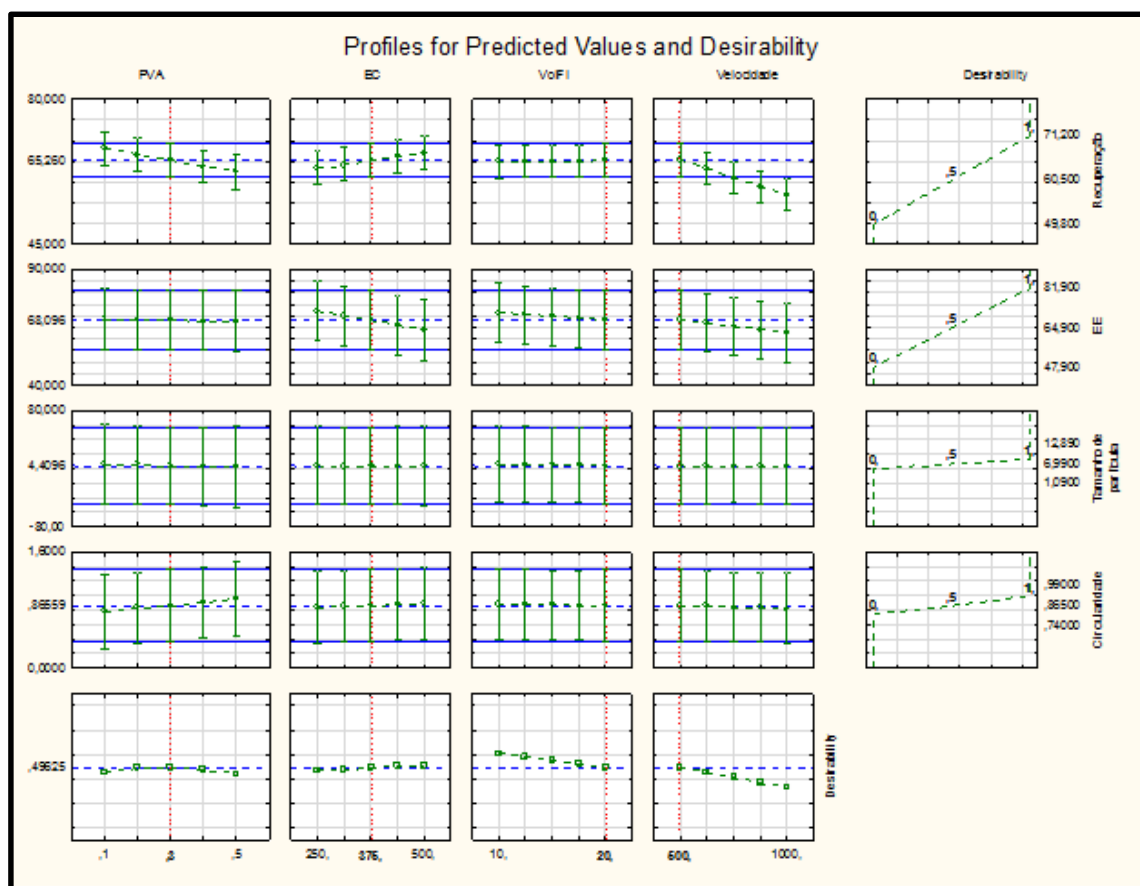


**Figura 62.** Desejabilidade para cada variável resposta e desejabilidade global, usando pontos centrais para concentração de PVA e EC.

### 5.2.3. Caracterização das micropartículas de etilcelulose com G-0 incorporado

#### - Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A curva de DSC de 2-(2-nitrovinil) furano mostrou o pico endotérmico típico associado à natureza cristalina da substância ativa entre 73-75 °C (Figura 63 a), coincidindo com resultados publicados anteriormente (RUZ et al., 2012), com variação da entalpia de fusão ( $\Delta H_f$ ) = 156,7 J.g<sup>-1</sup>. Entretanto, os picos endotérmicos associados à fusão do composto nas micropartículas, apresentaram notável redução (Figura 63 d, e) e os picos mostraram-se mais abertos e suaves com relação aos das misturas físicas, principalmente no sistema G-0/EC (1:1,5 m/m) com redução de  $\Delta H_f$  de 44,59 J.g<sup>-1</sup> (MF) para 25,29 J.g<sup>-1</sup> (ME). Na temperatura de

início do processo ( $T_{inicio}$ ) também mostraram diminuição com relação ao fármaco e às misturas físicas (Tabela 19).

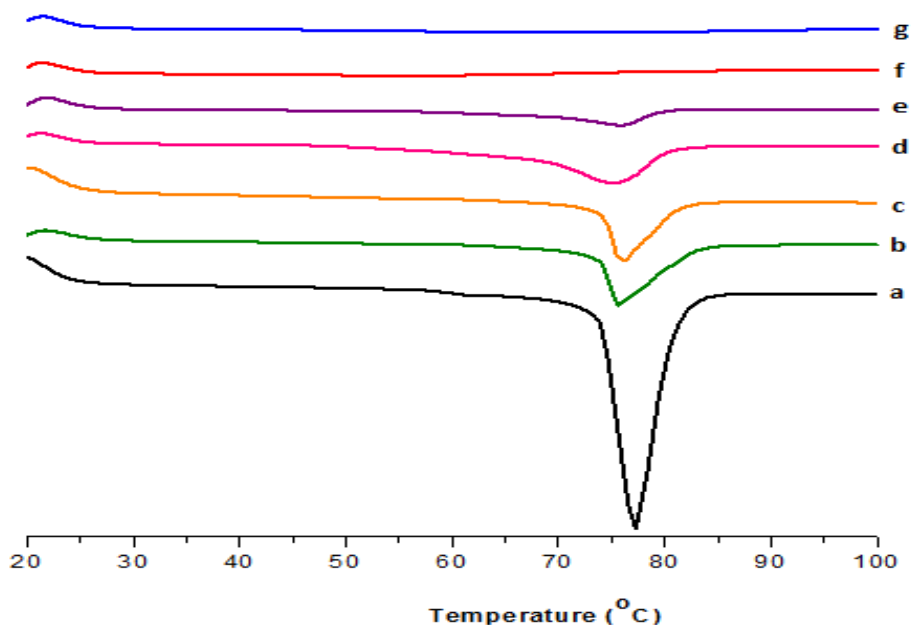


**Figura 63.** Curvas de DSC obtidas com razão de aquecimento  $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$  para: a) G-0, b) MF G-0:EC (1:1 m/m), c) MF G-0:EC (1:1,5 m/m), d) ME G-0/EC (1:1 m/m), e) ME G-0/EC (1:1,5 m/m), f) Micropartículas sem fármaco, g) Etilcelulose.

O DSC do polímero e das micropartículas sem fármaco não mostraram transições térmicas na faixa de temperatura avaliada. O comportamento térmico observado indica que a etilcelulose poderia estar se sobrepondo ou inibindo a fusão do composto furânico (ABDELMALAK; EL-MENSHAWE, 2012; GUPTA et al., 2013), principalmente no sistema que apresenta maior conteúdo de polímero, e/ou que o fármaco poderia estar parcialmente dissolvido no polímero das micropartículas. Para comprovar esta teoria posteriormente foi realizada a análise da cristalinidade por DRX.

**Tabela 19.** Parâmetros térmicos obtidos a partir das curvas do DSC para G-0, misturas físicas (MF) e micropartículas (ME).

| Amostra            | T <sub>inicio</sub> (°C) | T <sub>pico</sub> (°C) | $\Delta H_{f_{esp}}$ (J.g <sup>-1</sup> ) | $\Delta H_{f_{obs}}$ (J.g <sup>-1</sup> ) |
|--------------------|--------------------------|------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|
| G-0                | 73,71                    | 77,12                  | 156,70                                    | 156,70                                    |
| MF G-0:EC (1:1)    | 73,65                    | 75,74                  | 62,68                                     | 57,12                                     |
| MF G-0: EC (1:1.5) | 74.02                    | 76,14                  | 47,01                                     | 44,59                                     |
| ME (1:1)           | 66,02                    | 74,99                  | 62,52                                     | 48,71                                     |
| ME (1:1.5)         | 65,51                    | 75,93                  | 44,73                                     | 25,29                                     |

$\Delta H_{f_{esp}}$ : Entalpia de fusão esperada considerando o conteúdo de G-0 na amostra;  $\Delta H_{f_{obs}}$ : Entalpia de fusão observada.

MF: Mistura Física; ME: Micropartícula.

#### - Difração de Raios X

Os difratogramas das amostras estudadas indicaram que 2-(2-nitrovinil) furano apresenta picos bem definidos, característicos de sua estrutura cristalina (Figura 64 a) e são concordantes com um estudo anterior desenvolvido no modo capilar (RUZ et al., 2015). Etilcelulose não apresenta o arranjo típico das substâncias cristalinas, sendo classificado como polímero não cristalino (Figura 64 b). No caso das micropartículas (Figura 64 e, f), são observados alguns dos picos na região de  $2\theta$  entre 25-30° e em 20°, mas de menor intensidade, principalmente no sistema que tem maior conteúdo do polímero.

Como resultado do cálculo da cristalinidade demonstrou-se diminuição do valor do tamanho do cristalito (B) para as amostras tratadas, sendo mais notável este efeito no caso das micropartículas com relação às misturas físicas, como mostrado na Tabela 20. Nestas últimas observou-se desaparecimento dos picos na região de  $2\theta$  entre 10 e 15°, 25° e 44° o qual sugere que o próprio processo

mecânico de moagem do G-0 com etilcelulose influi na amorfização do fármaco (VADHER et al., 2009).

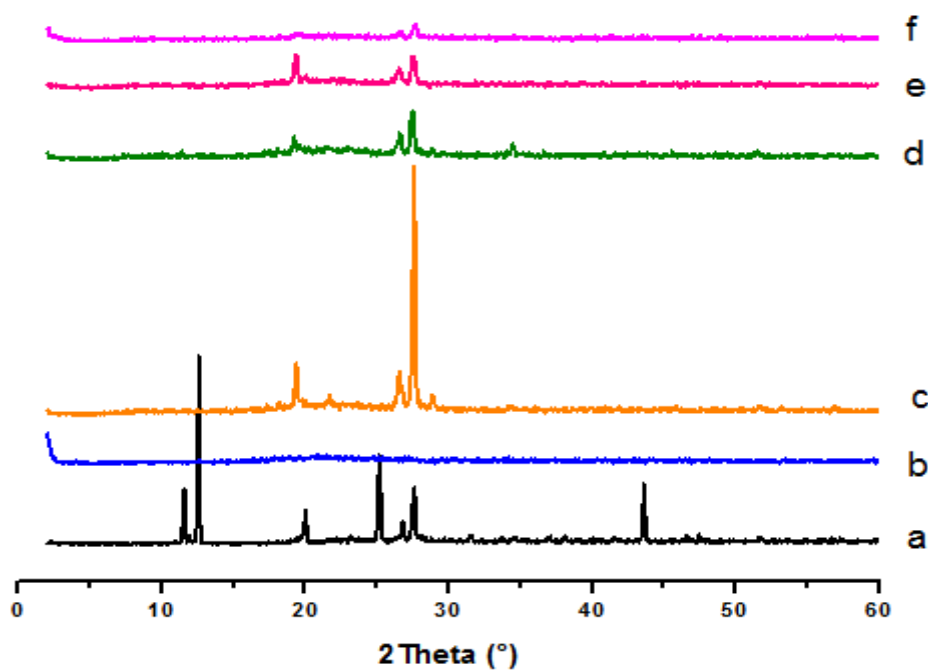


**Figura 64.** Difratometría de raios X para: a) 2-(2-nitrovinil) furano (G-0); b) Etilcelulose (EC); c) MF G-0/ EC (1:1 m/m), d) MF G-0/EC (1:1.5 m/m), e) ME G-0/EC (1:1 m/m), f) ME G-0/EC (1:1.5 m/m).

**Tabela 20.** Parâmetros determinados a partir dos difratogramas de raios X para o cálculo do tamanho médio do cristalito para o fármaco livre e nas misturas físicas e micropartículas.

| Amostra         | 2 $\theta$ (°) | L(rad)   | B (nm) | $\bar{B}$ (nm) |
|-----------------|----------------|----------|--------|----------------|
| G-0             | 19,98          | 0,003852 | 35,48  | 40,98          |
|                 | 26,79          | 0,002541 | 53,12  |                |
|                 | 27,56          | 0,003925 | 34,33  |                |
| MF G-0/EC 1:1   | 19,34          | 0,003169 | 43,17  | 33,58          |
|                 | 26,57          | 0,006666 | 20,28  |                |
|                 | 27,56          | 0,003615 | 37,28  |                |
| MF G-0/EC 1:1.5 | 19,24          | 0,004513 | 30,32  | 26,77          |
|                 | 26,55          | 0,005919 | 22,82  |                |
|                 | 27,44          | 0,004960 | 27,18  |                |
| ME G-0/EC 1:1   | 19,33          | 0,004951 | 27,63  | 23,89          |
|                 | 26,52          | 0,006686 | 20,20  |                |
|                 | 27,52          | 0,005658 | 23,82  |                |
| ME G-0/EC 1:1.5 | 19,40          | 0,008954 | 15,28  | 20,82          |
|                 | 26,61          | 0,006487 | 20,82  |                |
|                 | 27,63          | 0,005112 | 26,36  |                |

- *Espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier com Reflectância Total Atenuada (FTIR-ATR)*

A espectroscopia FTIR foi utilizada somente com propósitos qualitativos, para detectar possíveis interações químicas entre o G-0 e o polímero nas micropartículas. Para sistemas compatíveis, ou seja, carentes de interações, os espectros serão o resultado da simples superposição dos espectros dos compostos individuais.

2-(2-nitrovinil)furano apresenta as bandas características dos grupos funcionais (Figura 65 a):  $3153\text{ cm}^{-1}$ , referente às insaturações conjugadas/aromáticos, banda de estiramento -CH ( $3100\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ );  $1631\text{ cm}^{-1}$ , referente a vibrações de estiramento de aromáticos C=C ( $1695\text{-}1540\text{ cm}^{-1}$ ) ou dienos/polienos ( $1650\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ , forte e larga);  $1556\text{ cm}^{-1}$  referente ao grupo nitro C-NO<sub>2</sub> banda de estiramento ( $1560\text{ cm}^{-1}$ );  $1520\text{ cm}^{-1}$  referente ao grupo nitro NO<sub>2</sub> conjugado, vibração de estiramento;  $1270\text{ cm}^{-1}$  =C-O-C éteres aromáticos e vinílicos, banda de estiramento ( $1270\text{-}1150\text{ cm}^{-1}$  intensa e larga).

No espectro da etilcelulose (Figura 65 b) foram observadas as bandas em  $3485\text{ cm}^{-1}$  referente à vibração de estiramento da hidroxila alcoólica O-H muito fraca, e de alcanos (-CH<sub>3</sub> e -CH<sub>2</sub> alifáticos) em  $2976$  e  $2873\text{ cm}^{-1}$ .

Estas bandas foram observadas nos espectros das misturas físicas e das micropartículas com o G-0 incorporado (Figuras 65 c, d, e, f), com diminuição da intensidade fundamentalmente nos sistemas que apresentavam menor proporção de G-0 ou por superimposição do espectro da etilcelulose, pelo qual não são detectadas interações químicas entre o fármaco e o polímero.

Resultados similares foram obtidos na caracterização das micropartículas de fluconazol, tioconazol e aceclofenaco com etilcelulose (ABDELMALAK; ELMENSHAWE, 2012; GUPTA et al., 2013; MAYUR et al., 2013).

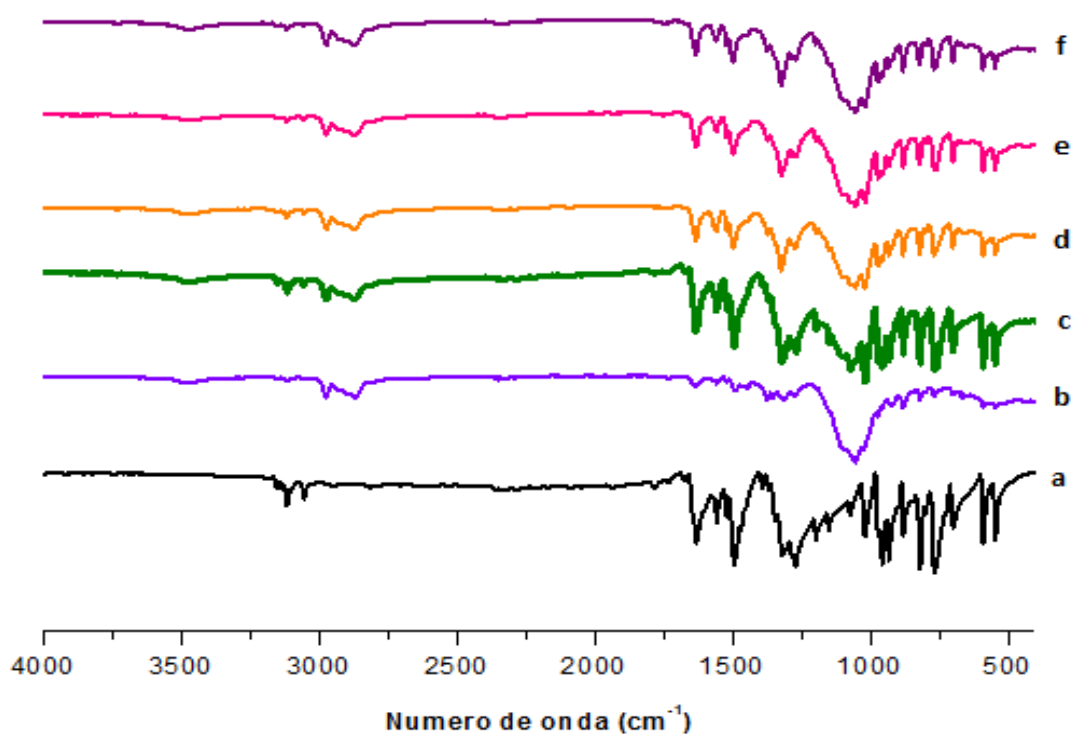


**Figura 65.** Espectros FTIR para: a) 2-(2-nitrovinil) furano (G-0); b) Etilcelulose (EC); c) MF G-0/ EC (1:1 m/m), d) MF G-0/ EC (1:1,5 m/m), e) ME G-0/EC (1:1 m/m), f) ME G-0/EC (1:1,5 m/m).

- *Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ).*

Uma comparação dos espectros RMN  $^1\text{H}$  do G-0 livre e incorporado nas micropartículas (Figura 66) indicaram: 1) a presença dos cinco sinais protônicos atribuíveis ao 2-(2-nitrovinil) furano sem produtos de degradação detectáveis, 2) Não foi observada variação notável nos deslocamentos químicos dos sinais da substância livre e incorporada (Tabela 21), o qual sugere que não há interação

química entre o composto e o polímero no sistema microparticulado e 3) não foram detectados sinais de diclorometano nas micropartículas.

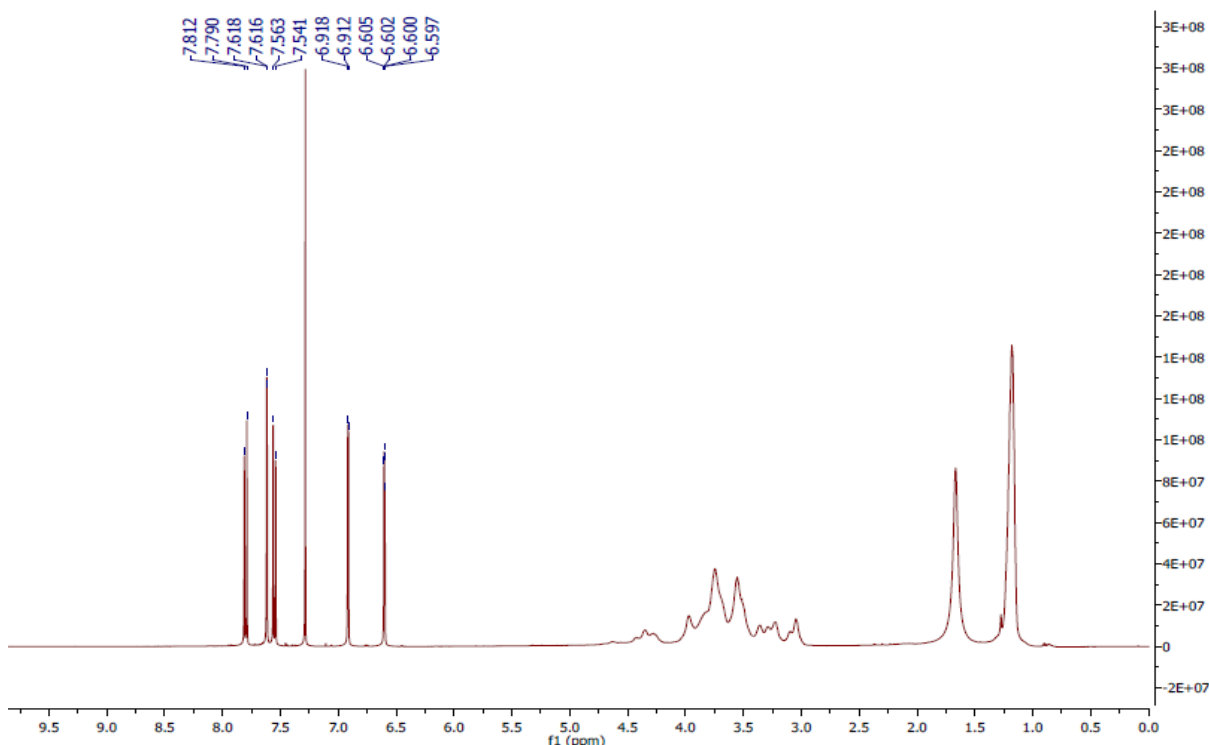


**Figura 66.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do G-0 incorporado nas micropartículas de etilcelulose (1:1,5 m/m) usando como solvente clorofórmio deuterado.

**Tabela 21.** Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) no RMN  $^1\text{H}$  para 2-(2-nitrovinil) furano livre e incorporado nas micropartículas de etilcelulose.

| Prótons do G-0             | $\delta$ livre (ppm) | $\delta$ incorporado (ppm) |
|----------------------------|----------------------|----------------------------|
| H6 (d, J: 13,2 Hz)         | 7,802                | 7,801                      |
| H2 (d, J: 1,5 Hz)          | 7,617                | 7,617                      |
| H7 (d, J: 13,2 Hz)         | 7,553                | 7,552                      |
| H4 (d, J: 3,0 Hz)          | 6,915                | 6,915                      |
| H3 (dd, J: 3,0 Hz, 1,5 Hz) | 6,602                | 6,601                      |

*d: dubleto, dd: duplo dubleto*

O sinal protônico intenso que aparece em  $\delta = 1,178$  ppm, corresponde aos prótons das metilas dos grupos etil da etilcelulose. Os sinais que aparecem em os 3,0-4,0 ppm, correspondem aos prótons do anel pirano e aos prótons metileno dos grupos etóxi. Aqueles sinais que aparecem em 4,3 ppm são atribuídos aos prótons anoméricos do polímero (XU; BRICKHOUSE; WANG, 2003). O sinal que aparece ~ 1,60 ppm pode ser atribuído à presença de alguma umidade no solvente deuterado, considerando que também aparece no espectro do G-0 livre (GOTTLIEB; KOTLYAR; NUDELMAN, 1997).

- *Avaliação da morfologia e estrutura interna das micropartículas através de Microscopia eletrônica de varredura (MEV).*

As fotomicrografias mostraram que ambas formulações de micropartículas apresentam forma esférica, confirmando a análise por microscopia óptica. A superfície das partículas mostrou-se irregular e porosa (Figura 67).

Com relação a estrutura interna, o MEV da micropartícula do sistema ME G-0/EC (1:1 m/m) após crio secção revelou uma estrutura interna oca. Na parte interna da cobertura polimérica observou-se algumas estruturas semelhantes a finas agulhas, que poderiam estar relacionadas com alguma fração de G-0 na forma cristalina. No caso do sistema preparado na relação G-0/EC 1:1,5 m/m, foram observadas pequenas partículas esféricas no interior da micropartícula maior. Este fenômeno sugere a presença de estrutura de microcápsulas encapsulando partículas menores no seu interior.

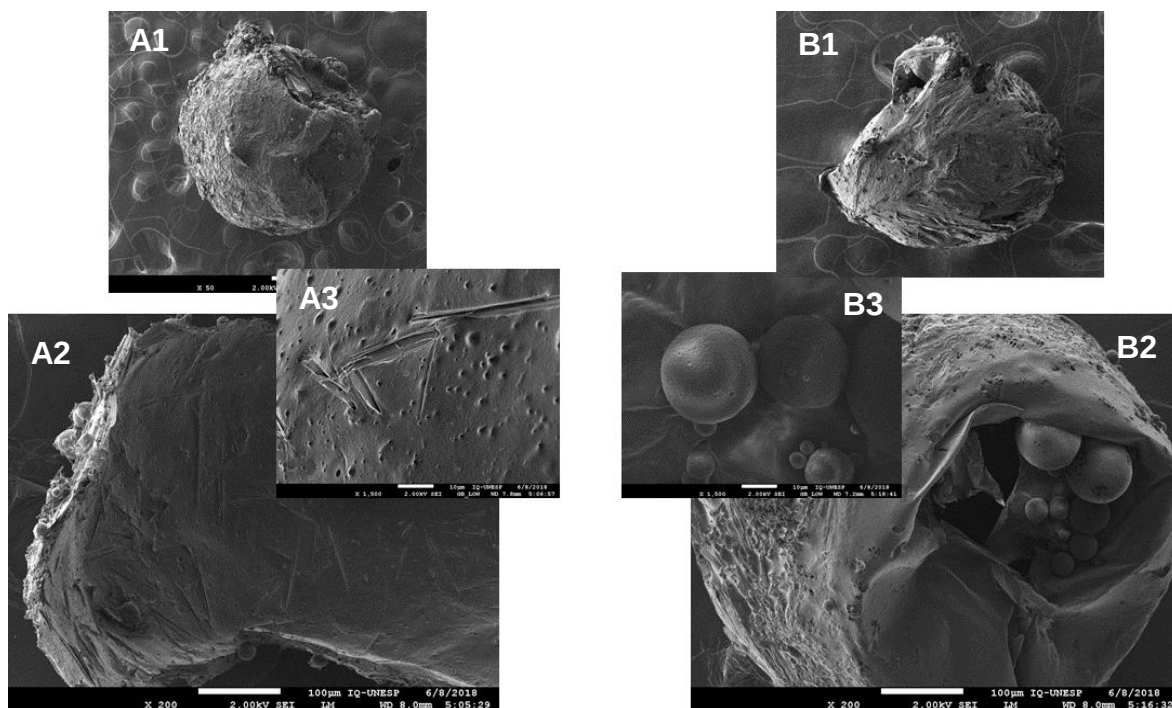


**Figura 67.** Fotomicrografias tomadas com microscópio eletrônico de varredura-emissão de campo de: A) Micropartículas preparadas na proporção G-0/EC 1:1 m/m: A1- Externa, A2- Interna, A3- Superfície da parede interna. B) Micropartículas preparadas na proporção G-0/EC 1:1,5 m/m: B1- Externa, B2- Interna, B3- Partículas esféricas no interior das micropartículas maiores.

#### 5.2.4. Avaliação da volatilidade do G-0 incorporado nas micropartículas

A análise prévia de uma amostra de G-0 (matéria prima) usando TGA-DTA sob atmosfera de nitrogênio e ar, evidenciaram volatilização da substância após a fusão (Figura 68), de modo que as perdas de massa observadas entre 25-200 °C estão associadas a esse fenômeno. As perdas de massa obtidas para as micropartículas preparadas na proporção G-0/EC (1:1, m/m) nesta etapa encontram-se cerca de 36,52 % da massa total. Considerando o conteúdo de G-0

neste sistema (39,9 %), os resultados indicam que praticamente não houve proteção frente à volatilização.

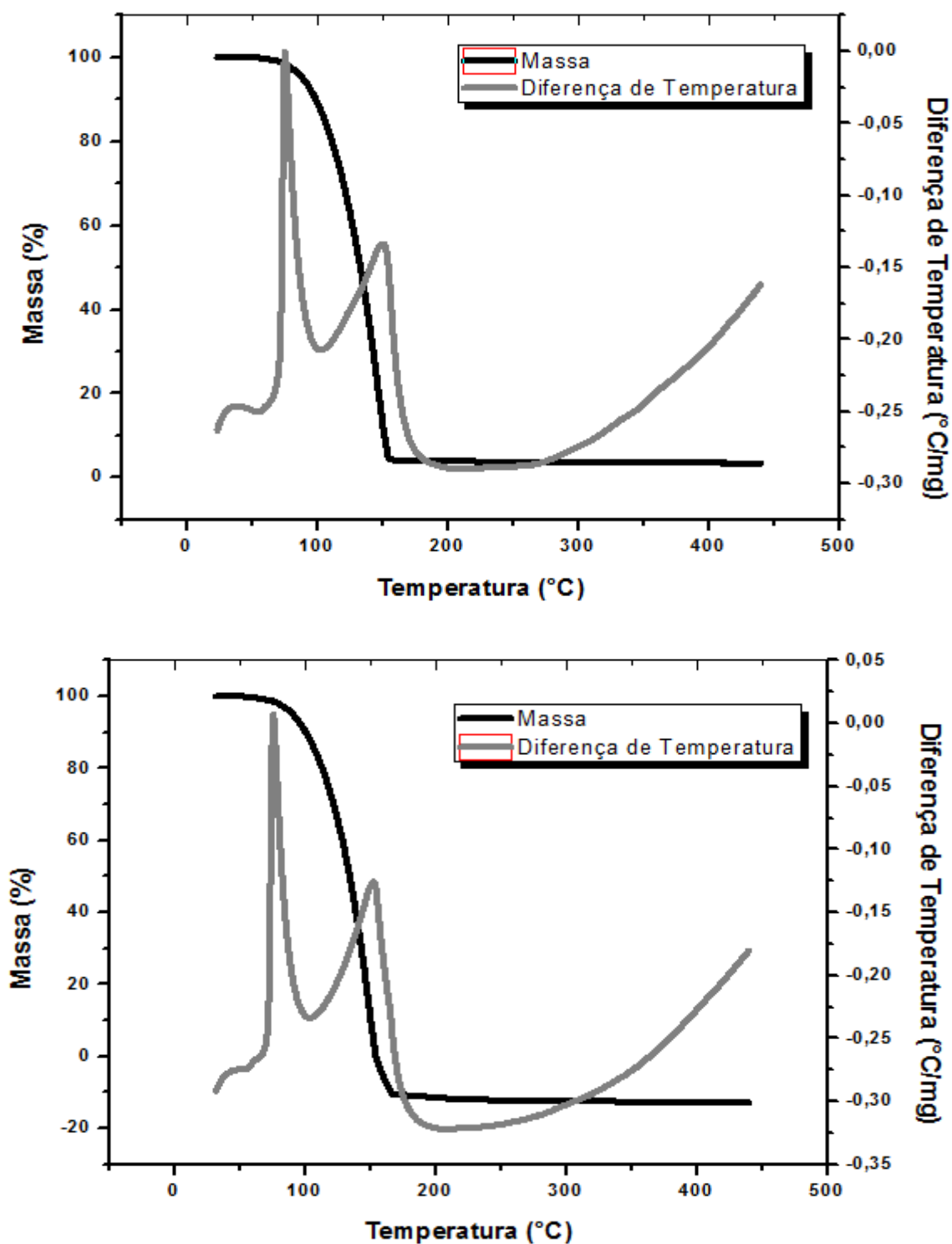


**Figura 68.** TG/DTA de G-0 em atmosfera de ar (acima) e nitrogênio (abaixo). (DTA com picos endotérmicos para acima).

Já o sistema preparado na proporção G-0/EC (1:1.5 m/m) apresentou perda de 13,72%, referentes a 48 % da massa inicial de G-0 na amostra, resultado esse que sugere maior retenção da substância. Uma mistura física na mesma proporção G-0/EC também foi analisada para comparação, evidenciando perdas muito maiores que na micropartícula (Figura 69). O resultado pode dever-se a que maior concentração de etilcelulose inibiu a fusão e volatilização, ambos processos claramente evidentes nas misturas físicas com quantidade equivalente de G-0 e também provavelmente relacionado com a estrutura interna destas micropartículas, em que o fármaco parece estar mais aprisionado por apresentar micropartículas de menor tamanho organizadas no interior de micropartículas maiores. Esse fenômeno pode estar relacionado com a formação de pré-emulsão múltipla durante o processo de formação das micropartículas.

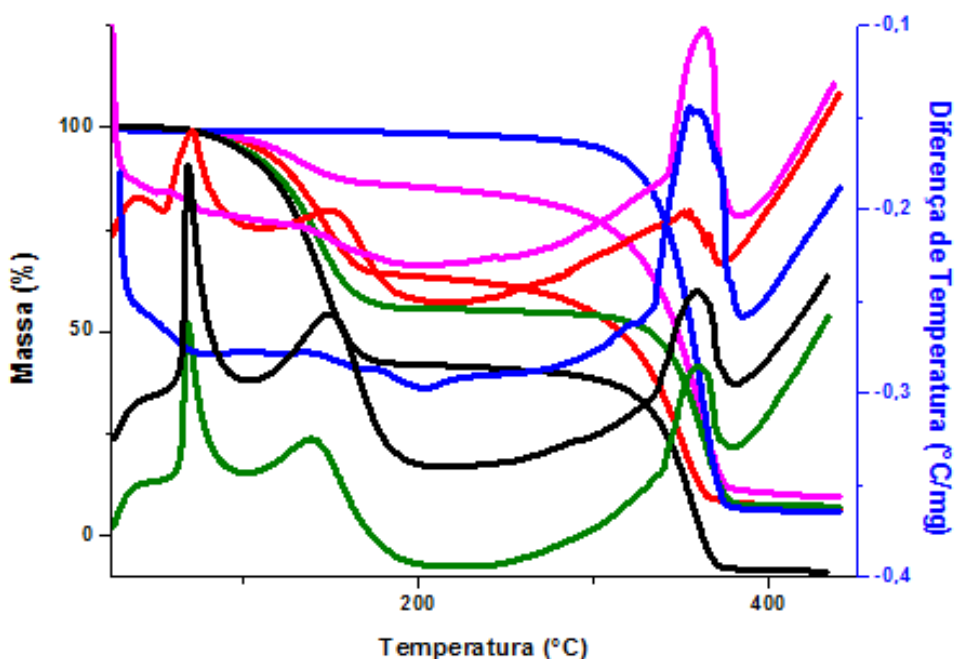


**Figura 69.** TG/DTA de Micropartículas sem G-0 (azul), ME G-0/EC (1:1,5 m/m) (pink), ME G-0/EC (1:1 m/m) (vermelho), MF G-0/EC (1:1,5 m/m) (verde) e MF G-0/EC (1:1 m/m) (preto). (DTA com processos endotérmicos para acima).

### 5.2.5. Liberação do G-0 incorporado nas micropartículas

A influência do sistema na liberação da substância ativa em meio tamponado pouco ácido (pH 4,2), onde o fármaco é relativamente mais estável, foi também avaliada. O perfil de liberação obtido para as micropartículas na relação G-0/EC (1:1,5 m/m), atingiu o patamar a partir das 4 h aproximadamente, com pequena tendência de aumento e com liberação máxima média acumulada de 72,7 % nas 24 h de ensaio, no entanto, o sistema ME G-0/EC (1:1 m/m) liberou no máximo 78,9 % nas primeiras 4 h, com pequena tendência de diminuição nas concentrações a partir desse tempo. Comparando estes resultados com a dissolução do G-0 (sólido cristalino) nas mesmas condições, este atingiu 96,8 % em 8 h (Figura 70).

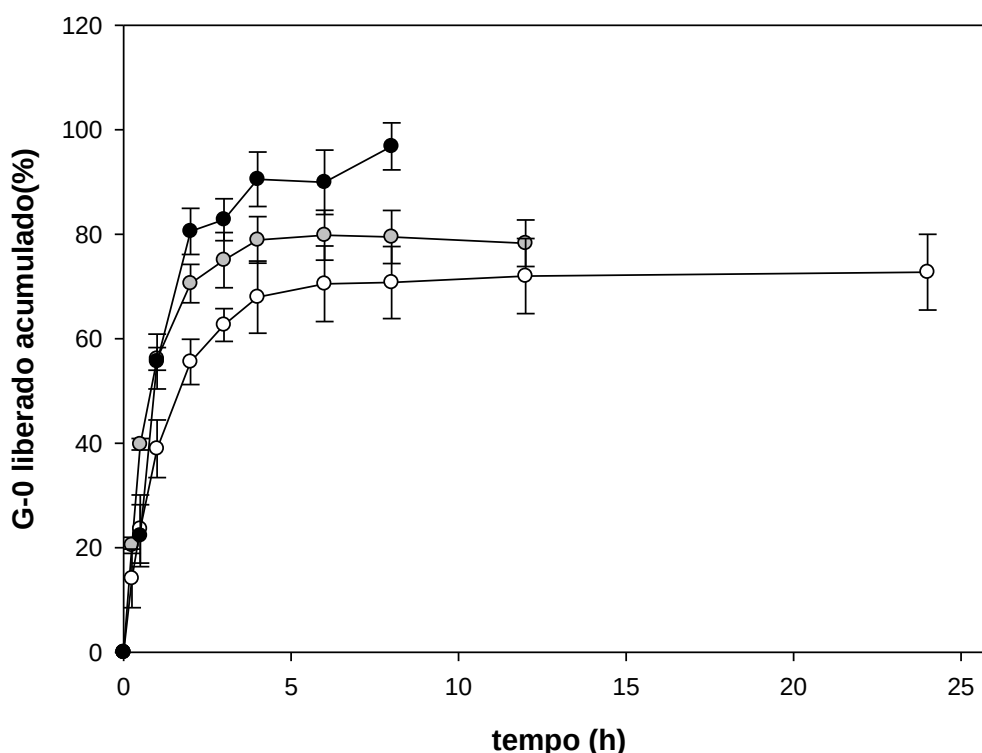


**Figura 70.** Perfil de liberação de G-0 a partir de micropartículas em meio tamponado (pH = 4,2): G-0 sólido (círculo preto), ME G-0/EC (1:1 m/m) (círculo cinza) e ME G-0/EC (1:1,5 m/m) (círculo branco).

Os perfis de liberação de fármaco das micropartículas foram avaliados utilizando cinco modelos cinéticos (Equações no Anexo 2), destacando-se a melhor correlação para o modelo de Korsmeyer-Peppas para ambos os sistemas. Também obteve-se muito boa correlação com o modelo Weibull no sistema com maior conteúdo de polímero (Tabela 22). Considerando os valores obtidos para o coeficiente de difusão ( $0,45 < n < 0,89$ ), o mecanismo de liberação de G-0 a partir das micropartículas sugere difusão anômala ou não fickiana.

**Tabela 22.** Parâmetros obtidos a partir do ajuste das curvas de liberação do G-0 incorporado nas micropartículas nos diferentes modelos cinéticos

| Modelo                  | G-0/EC (1:1) | G-0/EC(1:1,5) |
|-------------------------|--------------|---------------|
| <b>Ordem zero</b>       |              |               |
| k                       | 0,0211       | 0,0355        |
| R <sup>2</sup>          | 0,1295       | 0,3643        |
| <b>Primeira ordem</b>   |              |               |
| k                       | 0,0092       | 0,0044        |
| R <sup>2</sup>          | 0,2707       | 0,5486        |
| <b>Korsmeyer-Peppas</b> |              |               |
| k                       | 3,4998       | 2,9027        |
| n                       | 0,6837       | 0,6151        |
| R <sup>2</sup>          | 0,9923       | 0,9958        |
| <b>Higuchi</b>          |              |               |
| k                       | 2,9395       | 2,8014        |
| R <sup>2</sup>          | 0,0000       | 0,3989        |
| <b>Weibull</b>          |              |               |
| b                       | 2,2301       | 0,9585        |
| R <sup>2</sup>          | 0,8530       | 0,9997        |

A menor quantidade de fármaco liberado acumulado em ambos os sistemas de micropartículas em comparação com a dissolução das partículas de G-0 livre pode estar relacionada em alguma medida com a polidispersidade, devido que as micropartículas de menor tamanho poderiam ficar retidas no filtro e o fármaco incluído nelas não ser quantificado e/ou devido à elevada retenção do fármaco no sistema polimérico, principalmente naquele com maior proporção de etilcelulose. A velocidade de liberação do fármaco neste sistema foi pouco menor devido, em parte, a ter maior tamanho médio de partícula.

Quanto ao mecanismo de liberação de fármacos, a difusão é o mais comum para estes tipos de matrizes (KHAN et al., 2010) porém, a erosão devido a hidrólise do polímero, também foi relatada (MURTAZA, 2012). O modo anômalo também tem sido observado em outros trabalhos, envolvendo a etilcelulose, indicando que existe mais de um mecanismo envolvido na maioria dos casos (AAMIR; AHMAD, 2009; SINGHVI; SINGH, 2011; NAIK; RAVAL, 2012). Murtaza relata grande diversidade de modelos de liberação observados, os quais dependem das propriedades físico-químicas do fármaco e das micropartículas desenvolvidas, por exemplo, a solubilidade do fármaco e a relação fármaco/polímero, entre outras (MURTAZA, 2012). Em muitos sistemas, o processo de liberação resulta complicado, visto que podem apresentar dois processos principais de expulsão do fármaco, o primeiro relacionado com o *burst* inicial do fármaco que está localizado na superfície da partícula e o segundo, usualmente ocorre como uma etapa mais constante com velocidade de liberação que depende da difusão do fármaco (FREIBERG; ZHU, 2004), o qual parece ser o caso das micropartículas aqui estudadas.

5.2.6. Fotoestabilidade do G-0 incorporado nas micropartículas em condições de irradiação forçada.

2-(2-nitrovinil) furano é reconhecidamente instável frente à luz, formando dímeros em estado sólido (DE ROJAS PÉREZ, 2006), tornando interessante avaliar o efeito deste fator nas micropartículas preparadas com duas proporções diferentes de etilcelulose. Os perfis de fotodegradação estiveram caracterizados por uma diminuição no conteúdo de substância ativa, segundo uma cinética aparente de primeira ordem para as micropartículas preparadas na relação G-0/EC (1:1 m/m) e de segunda ordem para as micropartículas preparadas na relação G-0/EC (1:1,5 m/m), (Tabela 23).

**Tabela 23.** Parâmetros cinéticos obtidos a partir das curvas de fotodegradação do G-0 incorporado em micropartículas (ME) de EC e G-0 livre, irradiados por 72 h com luz UV ( $\lambda = 254$  nm).

| Sistema           | Ordem cinético | r      | k                                           | $t_{1/2}$ (h) |
|-------------------|----------------|--------|---------------------------------------------|---------------|
| ME G-0/EC (1:1)   | Primeira ordem | 0,9996 | $9,9 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$         | 70            |
| ME G-0/EC (1:1,5) | Segunda ordem  | 0,9828 | $0,1 \times 10^{-3} \%^{-1} \text{ h}^{-1}$ | 100           |
| G-0               | Primeira ordem | 0,9999 | $27,6 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$        | 25,1          |

Este comportamento foi mantido até aproximadamente 50 % de degradação, mas a partir desse ponto esta redução diminuiu acentuadamente, provavelmente devido ao fato de que degradaram apenas as moléculas de G-0 que estavam localizadas na superfície das micropartículas, sendo que as situadas no interior ficaram protegidas da radiação UV. O teste de "t" de Student para amostras

independentes mostrou diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) com relação à fotodegradação do fármaco incorporado nas micropartículas e o G-0 na forma livre ( $p = 0,033$  com o sistema ME G-0/EC 1:1, e  $p = 0,004$  com o sistema ME G-0/EC 1:1,5), sendo na forma livre a degradação de fármaco ainda maior. Porém não foram encontradas diferenças significativas entre a porcentagem de G-0 fotodegradado em ambas as formulações de micropartículas ( $p = 0,806$ ).

Os cromatogramas típicos do 2-(2-nitrovinil) furano ( $t_R = 6,4$  min) foram obtidos para ambos os sistemas usando dois comprimentos de onda. Com propósito de quantificação foi escolhido 351 nm (Figura 71 a, c) considerando este o comprimento de onda de máxima absorção do G-0, e 248 nm foi utilizado para monitorar possíveis produtos de degradação (Figura 71 b, d). A eluição de um segundo pico ( $t_R = 6,9$  min) foi observada em 24 h, com aumento da área do pico com o tempo de exposição à luz, sendo máximo em 72 h. O fator de resolução ( $R$ ) foi calculado com base no método da altura do vale entre dois picos ( $h_v \%$ ) com relação de tamanho 2/1, o qual mostra-se mais preciso para  $0,8 < R < 1,5$  (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997). Como o valor de  $h_v \%$  foi de 8,57, isso corresponde com resolução entre 1,29 e 1,33, satisfazendo os requerimentos de resolução entre dois picos.

Uma varredura na região UV-Vis permitiu obter o espectro para este produto (Figura 72), o qual parece ser o mesmo produto de degradação obtido na irradiação da substância cristalina em estado sólido (DE ROJAS, 2006).

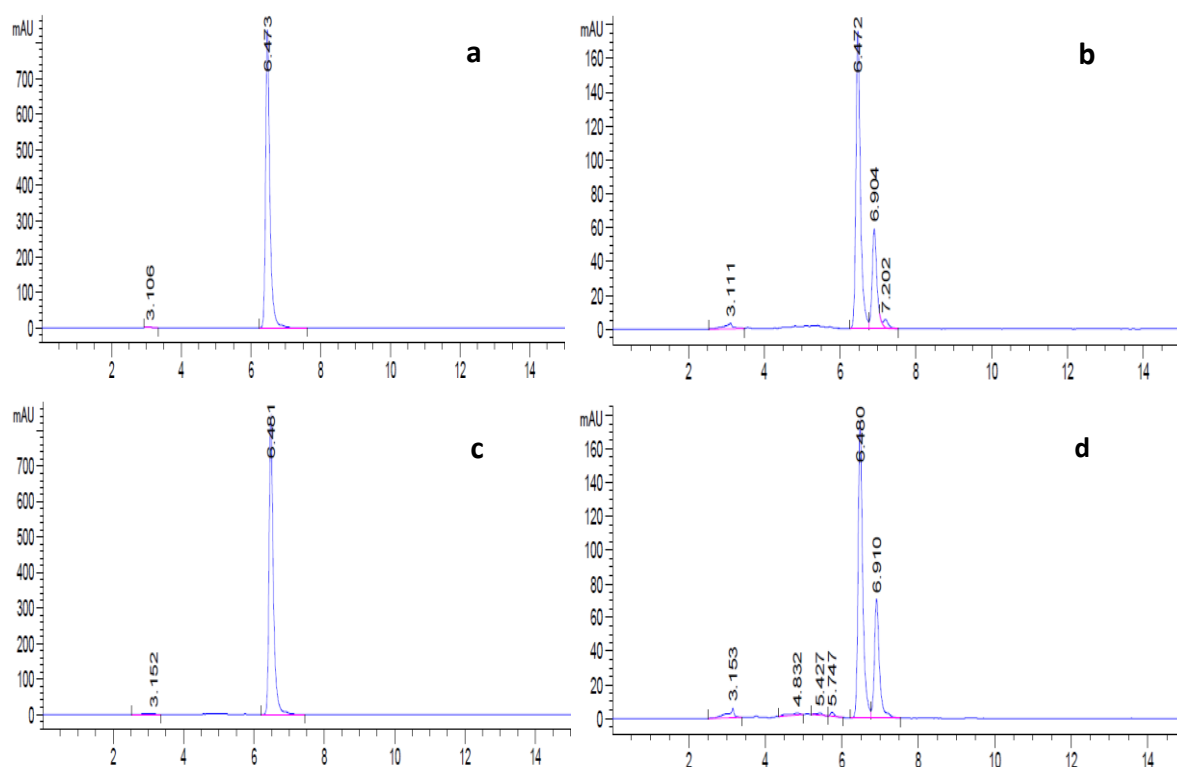


**Figura 71.** Cromatogramas das micropartículas (ME) expostas à luz UV durante 72 h, em dois comprimentos de onda de detecção: a) ME G-0/EC (1:1,5 m/m) em 351 nm; b) ME G-0/EC (1:1,5 m/m) em 248 nm; c) ME G-0/EC 1:1 m/m em 351 nm; d) ME G-0/EC 1:1 m/m em 248 nm.

O uso de microencapsulação como alternativa de fotoproteção tem sido em alguns casos controversa. No estudo da estabilização do amlodipino incorporado em sistemas microparticulados com etilcelulose, lipossomas, complexos com ciclodextrinas entre outras alternativas, resultou em melhora na fotoestabilidade principalmente para os primeiros comparados com fármaco livre. Neste caso os autores trabalharam com uma baixa relação fármaco/polímero e a viscosidade do polímero não foi reportada (RAGNO et al., 2003). O etilhexil metoxicinamato foi protegido com sucesso frente à luz por formação de microesferas de polimetilmetacrilato utilizando o método de emulsificação/evaporação do solvente

(GOGNA et al., 2007). Porém, a tentativa de estabilização da nifedipina através da formação de microesferas de etilcelulose, preparadas com diferentes relações fármaco/polímero não resultou adequada para o fármaco. Neste caso os resultados revelaram que a fotoestabilidade das microesferas foi pior que a fotoestabilidade da nifedipina livre, melhorando só quando foi incorporado um material opaco (dióxido de titânio) na fase interna da emulsão (DINARVAND et al., 2006).

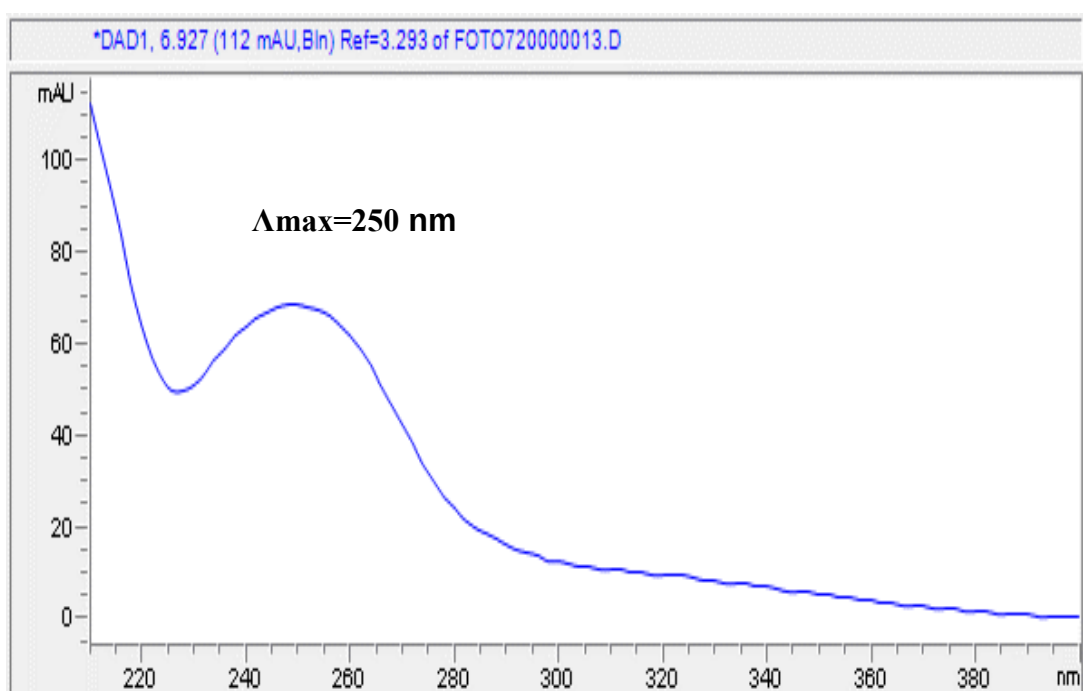


**Figura 72.** Espectro de absorção UV em acetonitrila: água (80:20, v/v) para o possível produto de fotodegradação que elui com tempo de retenção 6,9 min.

Estes estudos demonstram a existência de muitas variáveis envolvidas na fotoestabilização quando se trata deste tipo de sistemas, por exemplo a distribuição do fármaco na matriz (homogênea ou heterogênea), o tipo de estrutura da micropartícula, a forma em que o fármaco está incorporado na matriz (dissolvido, disperso, amorfo, cristalino), a espessura da parede da micropartícula, entre outras.

Os sistemas aqui desenvolvidos são prova disso. A visualização de estruturas em forma de finas agulhas no interior da parede das micropartículas ou as pequenas microesferas observadas no interior do sistema com maior concentração de etilcelulose, indicando que uma parte do fármaco pode estar mais protegido que a parte que ficou distribuída na superfície (possivelmente em estado amorfo, o qual é também responsável do efeito *burst* obtido no perfil de liberação e das perdas por volatilização), podem ser as responsáveis da maior fotoproteção com relação ao fármaco livre, o qual ficou diretamente exposto.

#### *5.2.7. Estabilidade acelerada do G-0 incorporado nas micropartículas.*

Prévia comprovação da normalidade da variável resposta (conteúdo de fármaco) obtendo-se valores de  $p > 0,05$  em todos os casos, as amostras foram classificadas como independentes e as variâncias foram homogêneas (Tabela 24). No análise das micropartículas com relação G-0/EC (1:1 m/m), não foram detectadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) no conteúdo de G-0 analisado nos três meses de estudo (ANOVA-One way;  $p = 0,9186$  micropartículas em geladeira e  $p = 0,8630$  em câmara de estabilidade), nem entre as duas condições de armazenagem (teste de "t" de Student para amostras independentes com  $\alpha = 0,05$ ;  $p = 0,6905$ ).

Porém foi observada pequena tendência ao aumento do tamanho médio de partícula no lote armazenado em geladeira (Tabela 25), possivelmente devido a alguma pequena agregação entre as partículas. Contrariamente o comportamento observado nas amostras armazenadas na câmara de estabilidade, houve pequena tendência de diminuição do tamanho, o qual poderia estar relacionado com perda de solventes residuais. Ainda quando não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas (teste de t de Student  $\alpha = 0,05$ ;  $p = 0,208$ ), o perfil de

liberação de G-0 em micropartículas armazenadas em geladeira teve também pequena tendência de diminuição na porcentagem de fármaco liberado, a qual poderia estar relacionado à agregação.

**Tabela 24.** Resultados da análise estatística de Normalidade, Independência da variável e homogeneidade da variância para o conteúdo de fármaco nas micropartículas.

| Amostra              | Normalidade<br>(S-Wilks) | Independência       | Homogeneidade da<br>variância (Levene) |
|----------------------|--------------------------|---------------------|----------------------------------------|
| ME G-0/EC (1:1) -G   | p = 0,2210               | Dispersão aleatória | p = 0,6783                             |
| ME G-0/EC (1:1) -A   | p = 0,3398               | Dispersão aleatória | p = 0,5574                             |
| ME G-0/EC (1:1,5) -G | p = 0,2120               | Dispersão aleatória | p = 0,8178                             |
| ME G-0/EC (1:1,5) -A | p = 0,1997               | Dispersão aleatória | p = 0,6774                             |

*Shapiro Wilks,  $p > 0,05$ : Os dados pertencem a uma população normal*

*Dispersão aleatória: As subpopulações de conteúdo de fármaco são independentes*

*Teste de Levene.  $p > 0,05$ : Variâncias são homogêneas.*

*A: Estabilidade Acelerada; G: Geladeira.*

No caso do sistema preparado na relação 1:1,5 (m/m) não foram detectadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) no conteúdo de fármaco analisado nos três meses de estudo nas micropartículas armazenadas na geladeira (ANOVA-One way;  $p = 0,5102$ ). No entanto, o sistema armazenado a  $40 \pm 2^\circ\text{C}/75 \pm 5\% \text{HR}$  mostrou diferenças altamente significativas (ANOVA-One way,  $p = 0,0003$ ), acompanhado por mudanças na cor das amostras que passaram de amarelo claro a bege no primeiro mês e que tornaram-se marrom na altura do terceiro mês (Tabela 26). A prova de Tukey confirmou estes resultados (Tabela 27).

**Tabela 25.** Estabilidade das micropartículas de G-0/EC preparadas na relação 1:1 (m/m), em diferentes condições.

| Condição                   | Tempo (meses) | Conteúdo de fármaco (%) | Tamanho médio de partícula (µm) | Liberação em 12 h (%) | Aparência física |
|----------------------------|---------------|-------------------------|---------------------------------|-----------------------|------------------|
| Geladeira<br>(2-8 °C)      | 0             | 38,18 ± 1,57            | 98,4                            | 77,25 ± 4,60          | SM               |
|                            | 1             | 37,23 ± 1,62            | 97,6                            | -                     | SM               |
|                            | 2             | 37,75 ± 1,63            | 100,2                           | -                     | SM               |
|                            | 3             | 38,51 ± 2,43            | 102,3                           | 74,47 ± 3,32          | SM               |
| Acelerada<br>(40°C/75 %HR) | 0             | 38,25 ± 1,59            | 109,0                           | 78,76 ± 2,19          | SM               |
|                            | 1             | 38,23 ± 1,91            | 99,4                            | -                     | SM               |
|                            | 2             | 38,92 ± 1,43            | 96,9                            | -                     | SM               |
|                            | 3             | 39,30 ± 0,93            | 95,9                            | 79,33 ± 3,15          | SM               |

SM: Sem mudanças; PM: Pequenas mudanças; ME: Mudanças evidentes.

**Tabela 26.** Estabilidade das micropartículas de G-0/EC preparadas na relação 1:1,5 (m/m), em diferentes condições.

| Condição                   | Tempo (meses) | Conteúdo de fármaco (%) | Tamanho médio de partícula (µm) | Liberação em 12 h (%) | Aparência física |
|----------------------------|---------------|-------------------------|---------------------------------|-----------------------|------------------|
| Geladeira<br>(2-8 °C)      | 0             | 32,38 ± 1,93            | 420,3                           | 72,76 ± 5,68          | SM               |
|                            | 1             | 31,02 ± 1,71            | 430,2                           | -                     | SM               |
|                            | 2             | 32,03 ± 2,11            | 414,9                           | -                     | SM               |
|                            | 3             | 33,76 ± 1,07            | 425,2                           | 70,42 ± 7,27          | SM               |
| Acelerada<br>(40°C/75 %HR) | 0             | 25,23 ± 1,17            | 451,5                           | 68,74 ± 6,52          | SM               |
|                            | 1             | 22,88 ± 0,81            | 440,9                           | -                     | PM               |
|                            | 2             | 18,71 ± 1,07            | 429,1                           | -                     | PM               |
|                            | 3             | 16,64 ± 1,50            | 438,2                           | -                     | ME               |

SM: Sem mudanças; PM: Pequenas mudanças; ME: Mudanças evidentes.

**Tabela 27.** Teste de Tukey (*post hoc*) para o conteúdo de G-0 do sistema ME G-0/EC (1:1,5 m/m) armazenado na câmara de estabilidade nos 4 tempos de amostragem.

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=3,73975  
 Error: 2,0457 gl: 8

| Tempo (meses) | Medias | n | E.E. |   |
|---------------|--------|---|------|---|
| t3            | 16,64  | 3 | 0,83 | A |
| t2            | 18,71  | 3 | 0,83 | A |
| t1            | 22,90  | 3 | 0,83 | B |
| t0            | 25,23  | 3 | 0,83 | B |

Valores médios com letra comum, não são significativamente diferentes ( $p>0.05$ ).

Em geral, não foram observadas diferenças no tamanho médio de partícula nas duas condições de armazenagem, nem no perfil de dissolução das amostras armazenadas na geladeira quando comparados a porcentagem de fármaco liberado nos tempos 0 e 3 meses (t-test,  $\alpha=0,05$ ;  $p=0,7378$ ). O perfil não foi desenvolvido para as amostras em câmara de estabilidade devido ao elevado avance da degradação observado.

Foram monitorados três comprimentos de onda durante a análise cromatográfica de cada uma das amostras avaliadas, considerando o comprimento de onda de máxima absorção do fármaco ( $\lambda=351$  nm), utilizado para a análise quantitativa e dois adicionais, 271 e 248 nm, os quais correspondem com os máximos de absorção de produtos de degradação devidos à água e luz, respectivamente. No tempo zero, não foi detectado nenhum pico correspondente a impureza ou produto de degradação, o qual foi confirmado durante a análise das micropartículas por RMN  $^1\text{H}$ . No entanto, a partir da análise das micropartículas armazenadas em condições aceleradas, em dois meses foi detectado possível produto de degradação em 3,4 min, o qual absorve em 248 e 271 nm nas

micropartículas preparadas na relação G-0/EC 1:1 (m/m). Este produto também foi detectado nas micropartículas preparadas na relação 1:1,5 (m/m), com intensidade relativamente superior. Adicionalmente nestas últimas também foi detectado outro produto em 4,6 min, de menor intensidade (Figura 73).

Devido à baixa intensidade destes novos picos, não foi possível gerar os espectros UV com qualidade adequada, mas considerando seu comportamento cromatográfico, podemos concluir que são mais polares que o composto de partida e apresentam menor grau de conjugação.

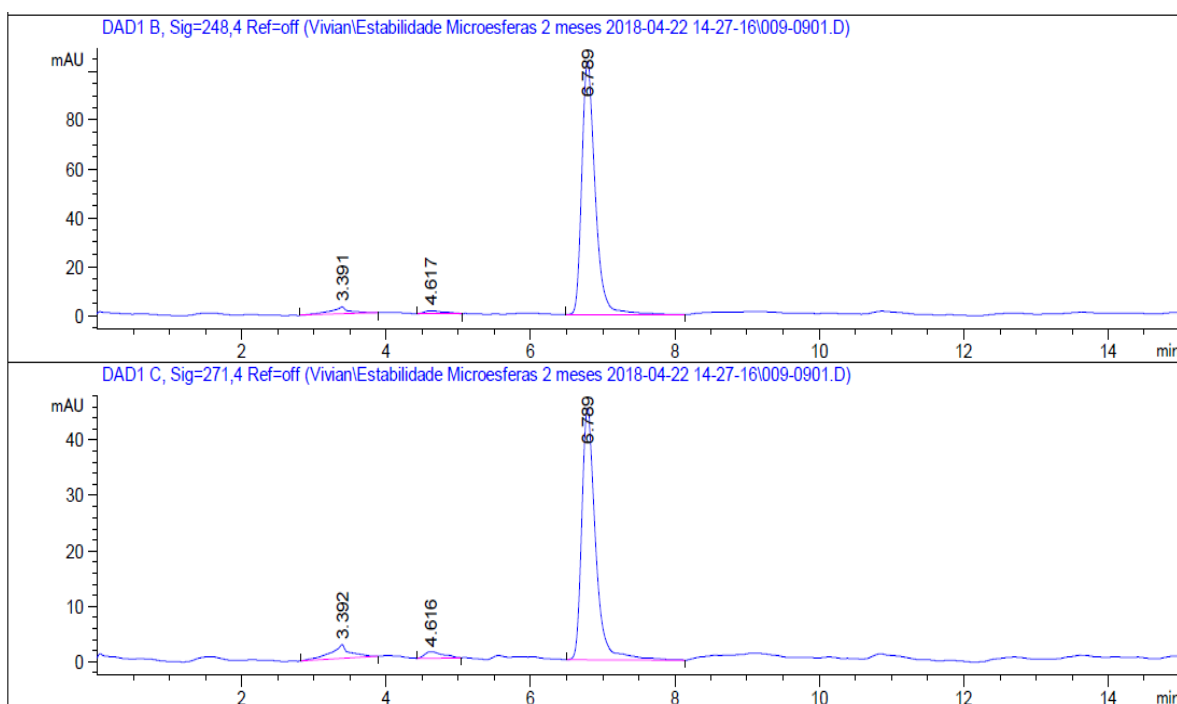


**Figura 73.** Cromatogramas das micropartículas ME G-0/EC (1:1,5 m/m), com dois meses de ensaio em câmara de estabilidade, com monitoramento nos comprimentos de onda 248 nm (acima) e 271 nm (abaixo).

Contrário ao esperado, a estabilidade acelerada do sistema ME G-0/EC (1:1 m/m) foi superior à do sistema ME G-0/EC (1:1,5 m/m). A literatura relata ampla

gama de impurezas que podem estar presentes nos excipientes farmacêuticos na ordem das traços e que potencialmente podem ser fontes de degradação de compostos, entre eles alguns metais pesados, peróxidos, aldeídos, ácidos orgânicos, entre outros. A etilcelulose pode conter níquel, cobre e cromo como impurezas metálicas (LI et al., 2015). Adicionalmente, este excipiente pode sofrer degradação térmica devida à absorção de oxigênio que provoca oxidação dos grupos éter para gerar uma variedade de peróxidos, alguns deles voláteis. A energia de ativação calculada para a reação na faixa de 69-90°C é 25 kcal/mol porém, esta oxidação também ocorre mais lentamente à temperatura ambiente (KOZMINA, 1967). A geração destas espécies que vão se acumulando com o tempo, dão lugar a reações radicalares em cadeia que tem alto impacto em moléculas suscetíveis à oxidação, como é o caso do 2-(2-nitrovinil) furano. Um estudo de estabilidade desenvolvido com comprimidos de ácido ascórbico, sensível à oxidação, utilizando como excipiente a etilcelulose, mostrou efeitos oxidativos no fármaco que foram muito significativos nas condições aceleradas de 40 °C/75 %HR, com mudanças na cor das amostras de branco para marrom escuro, ainda utilizando envases de vidro, só conseguindo proteger as amostras com envases de Alumínio.PE/PE.Alumínio (PAVLOVSKA; TANEVSKA, 2013).

O aumento da proporção de etilcelulose nas micropartículas aqui obtidas (G-0/EC 1:1,5 m/m), implica aumento do número de grupos éter que, em contato com oxigênio, podem iniciar esta reação nas condições aceleradas de armazenagem.

## 6. Conclusões

1. Os complexos de inclusão com HP- $\beta$ -CD e SBE- $\beta$ -CD liofilizados constituem uma excelente alternativa na estabilização química e física do 2-(2-nitrovinil) furano, considerando a manutenção das características organolépticas, a porcentagem de fármaco na faixa de 95-105%, ausência de produtos de degradação detectáveis durante o período de estabilidade acelerada e a diminuição muito significativa das perdas de fármaco por volatilização.
2. Os complexos formados são fotossensíveis. O método de irradiação forçada permitiu detectar três produtos de degradação nos dois complexos, entre eles um principal (PD1) que foi caracterizado através dos métodos espectroscópicos de RMN como uma mistura de duas substâncias em equilíbrio.
3. A formação dos complexos contribuiu para aumentar significativamente a velocidade de dissolução do G-0 no fluido vaginal simulado, embora o fármaco não permeou significativamente ao compartimento receptor da célula de Franz, porém aproximadamente um 2,5 % da massa inicial foi recuperada da mucosa vaginal bovina, sem diferenças estatísticas significativas por incorporação da substância ativa nos complexos.
4. Os complexos de inclusão do 2-(2-nitrovinil) furano com HP- $\beta$ -CD e SBE- $\beta$ -CD mantiveram ou aumentaram pouco a atividade antifúngica em relação ao fármaco livre frente às cepas de *Candida albicans* e *Candida krusei*, sendo que o complexo FD G-0/SBE- $\beta$ -CD mostrou menor citotoxicidade do que o G-0 livre em queratinócitos e fibroblastos.
5. O planejamento fatorial permitiu selecionar com maior precisão dois sistemas com eficiência de encapsulação entre 70-80%, alta circularidade e adequada

recuperação. Os sistemas caracterizados apresentaram superfícies irregulares com alguns poros, diminuição da cristalinidade, principalmente no sistema G-0/EC (1:1,5 m/m) e ausência de interações químicas fármaco-polímero.

6. A formação de micropartículas de etilcelulose nas duas proporções de polímero, contribuiu para melhorar a fotoestabilidade do G-0 em condições forçadas em comparação com o fármaco livre, porém só o sistema de micropartículas ME G-0/EC (1:1,5 m/m) diminuiu de forma considerável as perdas por volatilização em aproximadamente um 50 % do conteúdo de fármaco.
7. A porcentagem de G-0 liberada das micropartículas no meio tamponado pH 4,2 foi menor que a porcentagem de fármaco livre dissolvida, sendo mais notável este efeito para o sistema com maior proporção de etilcelulose. Ambas as curvas de liberação apresentaram elevada correlação quando avaliadas no modelo cinético de Korsmeyer-Peppas, com valores de coeficiente difusional que indicou modo anômalo.
8. A avaliação das características organolépticas, o conteúdo de fármaco e a presença de produto de degradação demonstram que, durante o ensaio de estabilidade acelerada, o sistema de micropartículas G-0/EC (1:1 m/m) apresentou maior estabilidade que o sistema com maior proporção polimérica, mantendo esta última a estabilidade só em condições de refrigeração.

## 7. Referências bibliográficas

AAMIR, M. N.; AHMAD, M. Development of tramadol microparticles by non-solvent addition method and their in vitro characterization. **Iranian Polymer Journal**, v. 18, n. 12, p. 937–946, 2009.

ABBAS, S. et al. Ascorbic acid: Microencapsulation techniques and trends—A review. **Food Reviews International**, v. 28, n. 4, p. 343–374, 2012.

ABDELKADER, H. et al. Cyclodextrin enhances corneal tolerability and reduces ocular toxicity caused by diclofenac. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, p. 1–13, 2018a.

ABDELKADER, H. et al. Review on micro-encapsulation with chitosan for pharmaceuticals applications. **MOJ Current Research & Reviews**, v. 1, n. 2, p. 77–84, 2018b.

ABDELMALAK, N. S.; EL-MENSHAWI, S. F. A new topical fluconazole microsphere loaded hydrogel: Preparation and characterization. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. SUPPL.1, p. 460–469, 2012.

AGATONOVIC-KUSTRIN, S. et al. Modeling the effect of selected cyclodextrins on nifedipine solubility. **Current Drug Discovery Technologies**, v. 8, n. 2, p. 146–154, 2011.

AJIBOYE, T. O. et al. 2-(2-nitrovinyl)furan promotes oxidation of cellular proteins, lipids, and dna of male rat liver and kidney. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 29, n. 3, p. 114–122, 2015.

AKASH, H. M. . et al. Characterization of ethylcellulose and hydroxypropyl methylcellulose microspheres for controlled release of flurbiprofen. **J Pharm Drug Deliv Res**, v. 2, n. 1, p. 1–10, 2013.

- ALABI, K. ; HASSAN, G. Determination of minimum inhibitory concentrations of 2-(2-nitrovinyl ) furan. **Academia Journal of Microbiology Research**, v. 2, n. 2, p. 28–32, 2014.
- ALMERÍA, B. et al. Controlling the morphology of electrospray-generated PLGA microparticles for drug delivery. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 343, n. 1, p. 125–133, 2010.
- ALONSO, E. C. P. et al. Development of carvedilol-cyclodextrin inclusion complexes using fluid-bed granulation: a novel solid-state complexation alternative with technological advantages. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, n. 10, p. 1299–1309, 2016.
- ALSARRA, I. A. et al. Effect of  $\beta$ -cyclodextrin derivatives on the kinetics of degradation of cefotaxime sodium in solution state. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 17, n. 5, p. 353–357, 2007.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, ID. e35671, 2012.
- ANDERSON, D. J.; MARATHE, J.; PUDNEY, J. The Structure of the Human Vaginal *Stratum Corneum* and its Role in Immune Defense. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 71, n. 6, p. 618–623, 2014.
- ANDERSON, N.; STEPHEN, J. Photostability Testing: Design and Interpretation of Test on New Drug Substances and Dosage Forms. In: TONNESEN, H. (Ed.). **Photostability of Drugs and Drugs Formulations**. 2nd. ed. Boca Raton: CRC Press, 2004. p. 137–160.
- ARICI, M. et al. Preparation of naproxen–ethyl cellulose microparticles by spray-drying technique and their application to textile materials. **Journal of Microencapsulation**, v. 31, n. 7, p. 654–666, 2014.

- ATALLA, R.; ISOGAI, A. Recent developments in spectroscopic and chemical characterization of cellulose. In: DUMITRIU, S. (Ed.). **Polysaccharides: Structural diversity and functional versatility**. 2nd. ed. New York: Marcel Dekker, 2005. p. 123–157.
- AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: Aplicação a teoria dos alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 16, n. 1, p. 89–97, 2008.
- BALCI, M. **Basic <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C- NMR Spectroscopy**. Oxford: Elsevier, 2005.
- BANCHERO, M.; RONCHETTI, S.; MANNA, L. Characterization of ketoprofen/methyl- $\beta$ -cyclodextrin complexes prepared using supercritical carbon dioxide. **Journal of Chemistry**, v. 2013, ID. 583952, p. 1–8, 2013.
- BANDGAR, B. ; ZIRANGE, M. ; WADGAONKAR, P. Envirocat EPZG as a new heterogeneous catalyst for the efficient synthesis of conjugated nitroolefins. **Synlett**, v. 2, p. 149–150, 1996, doi: 10.1055/s-1996-5347.
- BANSODE, S. S. et al. Microencapsulation: A review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 1, n. 2, p. 38–43, 2010.
- BARRON, C.; HE, J-Q. Alginate-based microcapsules generated with the coaxial electrospray method for clinical application. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 28, n. 13, p. 1245–1255, 2017.
- BEKERS, O. et al. Cyclodextrins in the pharmaceutical field. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 17, n. 11, p. 1503–1549, 1991.
- BENZIGER, C. P.; RIBEIRO, A. L. P.; NARULA, J. After 100 years, the diagnosis, treatment, and control of chagas disease remains a challenge. **Global Heart**, v. 10, n. 3, p. 137–138, 2015.
- BERCHANE, N. S.; JEBRAIL, F. F.; ANDREWS, M. J. Optimization of PLG microspheres for tailored drug release. **International Journal of Pharmaceutics**,

v. 383, n. 1–2, p. 81–88, 2010.

BERGAMASCO, R. DE C.; ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. DE. Sulfluramid volatility reduction by  $\beta$ -cyclodextrin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 4, p. 1139–1143, 2005.

BERGINC, K. et al. Development and evaluation of an in vitro vaginal model for assessment of drug's biopharmaceutical properties: curcumin. **AAPS PharmSciTech**, v. 13, n. 4, p. 1045–1053, 2012.

BOCK, N. et al. Electrospraying, a reproducible method for production of polymeric microspheres for biomedical applications. **Polymers**, v. 3, n. 1, p. 131–149, 2011.

BORTOLUS, P. et al. Photochemistry of cyclodextrin host-guest complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 125, n. 1–2, p. 261–268, 1993.

BOUKAMP, P. et al. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. **The Journal of Cell Biology**, v. 106, n. 3, p. 761–771, 1988.

BRAVO, L. **Estudio analítico de derivados furánicos mediante cromatografía gaseosa. Aplicaciones farmacéuticas**. 1998. Disertación (Master en Tecnología y Control de medicamentos) Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana, Cuba, 1998.

BULE, M. V.; SINGHAL, R. S.; KENNEDY, J. F. Microencapsulation of ubiquinone-10 in carbohydrate matrices for improved stability. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 4, p. 1290–1296, 2010.

BURGESS, D.; HICKEY, A. Microsphere technology and applications. In: SWARBRICK, J. (Ed.). **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**. 3rd. ed. New York: Informa Healthcare, 2007. p. 2328–2338.

BUSCHMANN, H-J.; SCHOLLMEYER, E. Applications of cyclodextrins in cosmetic

products: A review. **Journal of Cosmetic Sciences**, v. 53, n. 3, p. 185–191, 2002.

BUTSTRAEN, C.; SALAÜN, F. Preparation of microcapsules by complex coacervation of gum arabic and chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, n. 2, p. 608–616, 2014.

CABRAL-MARQUES, H. M. Structure and properties of cyclodextrins: inclusion complex formation. **Revista Portuguesa de Farmácia**, v. 44, n. 2, p. 77–83, 1994a.

CABRAL-MARQUES, H. M. Applications of cyclodextrins. Thermodynamic aspects of cyclodextrin complexes. **Revista Portuguesa de Farmácia**, v. 44, n. 2, p. 85–96, 1994b.

CABRAL-MARQUES, H. M. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, n. 5, p. 313–326, 2010.

CABRERA, C. G. et al. Characterization of encapsulation process of avobenzone in solid lipid microparticle using a factorial design and its effect on photostability. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 4, n. 12, p. 035–043, 2014.

CABRERA, M. et al. Experimental and theoretical determination of physicochemical properties in a novel family of microcycdal compounds. **European Bulletin of Drug Research**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2001.

CAIRA, M. R. et al. Inclusion complexes of 2-methoxyestradiol with dimethylated and permethylated  $\beta$ -cyclodextrins: models for cyclodextrin-steroid interaction. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 11, p. 2616–2630, 2015, doi: 10.3762/bjoc.11.281.

CASTAÑEDO-CANCIO, N. et al. **Pharmaceutical compositions containing nitrovinylfuran derivatives for the treatment of leishmaniosis and trypanosomosis**, 12 fev. 2009. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/US20090042978A1/en>>. Acesso em: 29 nov.

2018

CASTRO- HERMIDA, J. A. et al. Anticryptosporidial activity of furan derivative G1 and its inclusion complex with beta-cyclodextrin. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 93, n. 1, p. 197–206, 2004.

CEBORSKA, M. Folate appended cyclodextrins for drug, DNA, and siRNA delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 120, p. 133–145, 2017.

CEBORSKA, M. et al. Comparative study of molecular recognition of folic acid subunits with cyclodextrins. **Carbohydrate Polymers**, v. 184, p. 47–56, 2018, doi: 10.1016/j.carbpol.2017.12.031.

CECMED. **RESUMEN DE LAS CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO** Nombre del producto: **DERMOFURAL® 0,15 %**. Disponível em: <[https://www.cecmed.cu/sites/default/files/adjuntos/rcp/m07020d01\\_dermodural\\_0.pdf](https://www.cecmed.cu/sites/default/files/adjuntos/rcp/m07020d01_dermodural_0.pdf)>. Acesso em: 29 nov. 2018.

CENTKOWSKA, K.; SZNITOWSKA, M. Comparison of sublingual tablets with nitroglycerin complexed with beta-cyclodextrin or titrated with crosspovidone-- technological approach. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 65, n. 5, p. 585–589, 2008.

CEVHER, E. et al. Bioadhesive tablets containing cyclodextrin complex of itraconazole for the treatment of vaginal candidiasis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 69, p. 124–136, 2014, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.05.033.

CHALLA, R. et al. Cyclodextrins in drug delivery: An updated review. **AAPS PharmSciTech**, v. 6, n. 2, p. E329–E357, 2005.

CHATTOPADHYAY, N. Effect of cyclodextrin complexation on excited state proton

transfer reactions. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 58, n. 1, p. 31–36, 1991.

CHEIRSILP, B.; RAKMAI, J. Inclusion complex formation of cyclodextrin with its guest and their applications. **Biology, Engineering and Medicine**, v. 2, n. 1, p. 1–6, 2017.

CHOUDHARY, H. et al. Evaluation and optimization of preparative variables for controlled-release floating microspheres of levodopa/carbidopa. **Die Pharmazie**, v. 65, n. 3, p. 194–198, 2010.

CIOBANU, A. et al. Inclusion interactions of cyclodextrins and crosslinked cyclodextrin polymers with linalool and camphor in *Lavandula angustifolia* essential oil. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 3, p. 1963–1970, 2012.

CIOBANU, A. et al. Retention of aroma compounds from *Mentha piperita* essential oil by cyclodextrins and crosslinked cyclodextrin polymers. **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p. 291–297, 2013.

COCERO, M. J. et al. Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: fundamentals and applications. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, n. 3, p. 546–555, 2009.

CUTRIGNELLI, A. et al. A new complex of curcumin with sulfobutylether- $\beta$ -cyclodextrin: characterization studies and in vitro evaluation of cytotoxic and antioxidant activity on HepG-2 cells. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, n. 12, p. 3932–3940, 2014.

D'ANGELO, S. et al. Effect of Annurca apple polyphenols on human HaCaT keratinocytes proliferation. **Journal of Medicinal Food**, v. 15, n. 11, p. 1024–1031, 2012.

DANN, O.; MÖLLER, E. F. Über die wachstumshemmenden Eigenschaften von

Nitroverbindungen. **Chemische Berichte**, v. 82, n. 1, p. 76–92, 1949.

DAS NEVES, J. et al. *In vitro* and *ex vivo* evaluation of polymeric nanoparticles for vaginal and rectal delivery of the anti-HIV drug dapivirine. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, n. 7, p. 2793–2807, 2013.

DAVIDOVICH-PINHAS, M.; BARBUT, S.; MARANGONI, A. G. Physical structure and thermal behavior of ethylcellulose. **Cellulose**, v. 21, n. 5, p. 3243–3255, 2014.

DAVIS, M. E.; BREWSTER, M. E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 12, p. 1023–1035, 2004.

DE JESUS, M. B. et al. Non-inclusion complexes between riboflavin and cyclodextrins. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 64, n. 6, p. 832–842, 2012.

DE LIMA, E. **Síntese e caracterização de micropartículas de etilcelulose e seu uso na encapsulação do fungicida tebuconazole**. 2014. Tese (Doutorado em Química) Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2014.

DE ROJAS PÉREZ, M. **Estudio de los productos de degradación del 2-(2-nitrovinil)furano (g-0)**. 2006. Tesis (Doctorado en Química) Universidad de Cádiz, España, 2006.

DEASY, P. B. Microencapsulation of drugs by pan and air suspension techniques. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 8, n. 1, p. 39–89, 1991.

DELIANG, Z.; PORTER, W.; ZHANG, G. Drug stability and stability studies. In: QIU, Y. et al. (Eds.). **Developing Solid Oral Dosage Forms: Pharmaceutical Theory & Practice**. New York: Academic Press, 2009. p. 87–124.

DESAI, K. G. H.; JIN PARK, H. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying Technology**, v. 23, n. 7, p. 1361–1394, 2005.

DHURKE, R.; KUSHWAHA, I.; DESAI, B. G. Improvement in photostability of

pantoprazole sodium by microencapsulation. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 67, n. 1, p. 43–52, 2013.

DI CAGNO, M.P. The potential of cyclodextrins as novel active pharmaceutical ingredients: a short overview. **Molecules**, v. 22, n. 1, p. 1–14, 2016, doi: 10.3390/molecules22010001.

DI DONATO, C. et al. Alpha- and beta-cyclodextrin inclusion complexes with 5-fluorouracil: characterization and cytotoxic activity evaluation. **Molecules**, v. 21, n. 12, p. 2–14, 2016.

DINARVAND, R. et al. Effect of microencapsulation on photo-stability of nifedipine. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 4, p. 239–244, 2006.

DUBERNET, C.; ROULAND, J. C.; BENOIT, J. P. Comparative study of two ethylcellulose forms (raw material and microspheres) carried out through thermal analysis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 64, n. 2–3, p. 99–107, 1990.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **Background review for cyclodextrins used as excipients**. London: European Medicines Agency, 2017. Disponível em: <[www.ema.europa.eu/contact](http://www.ema.europa.eu/contact)>. Acesso em: 30 nov. 2018.

FARH, A. General aspects of dosage forms: stability and stabilization. In: FARH, A. (Ed.). **Voigt's Pharmaceutical Technology**. 12th. ed. New York: John Wiley and Sons, 2018. p. 681–706.

FATNASSI, M. et al. Optimization of spray-dried hyaluronic acid microspheres to formulate drug-loaded bone substitute materials. **Powder Technology**, v. 255, p. 44–51, 2014.

FENG, T. et al. Preparation and structural characterization of different amylose-flavor molecular inclusion complexes. **Starch**, v. 70, n. 1–2, ID. 1700101, 2018.

FENG, X. et al. The effects of polymer carrier, hot melt extrusion process and

downstream processing parameters on the moisture sorption properties of amorphous solid dispersions. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, n. 5, p. 692–704, 2016.

FORMARIZ, T. P. et al. Relationship between structural features and in vitro release of doxorubicin from biocompatible anionic microemulsion. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 60, n. 1, p. 28–35, 2007.

FOURMENTIN, S. et al. Reduction of the volatility of volatile organic compounds with cyclodextrins: application to their capture. **Annales Pharmaceutiques Francaises**, v. 59, n. 6, p. 369–373, 2001.

FOX, M. A. Photoinduced electron transfer in arranged media. In: MATTAY, J. (Ed.). **Photoinduced Electron Transfer III. Topics in Current Chemistry**. Berlin: Springer, Berlin, Heidelberg, v. 159, 1991, doi:10.1007/3-540-53257-9\_2.

FREIBERG, S.; ZHU, X. X. Polymer microspheres for controlled drug release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 282, n. 1–2, p. 1–18, 2004.

FREITAS, S.; MERKLE, H. P.; GANDER, B. Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. **Journal of Controlled Release**, v. 102, n. 2, p. 313–332, 2005.

FREUDENBERG, K.; CRAMER, F.; PLIENINGER, H. A. G. **Verfahren zur Herstellung von Einschlussverbindungen physiologisch wirksamer organischer Verbindungen**. Germany, 26 ago. 1951. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/DE895769C/de>>. Acesso em: 30 nov. 2018

GARCÍA, A. et al. Modified  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex to improve the physicochemical properties of albendazole. Complete *in vitro* evaluation and characterization. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. 3–10, 2014.

GEORGE, S.; VASUDEVAN, D. Studies on the preparation, characterization, and solubility of 2-HP- $\beta$ -cyclodextrin-meclizine HCl inclusion complexes. **Journal of Young Pharmacists**, v. 4, n. 4, p. 220–227, 2012.

GHARIB, R. et al. Liposomes incorporating cyclodextrin–drug inclusion complexes: Current state of knowledge. **Carbohydrate Polymers**, v. 129, p. 175–186, 2015, doi:10.1016/j.carbpol.2015.04.048.

GHARIB, R. et al. Drug-in-cyclodextrin-in-liposomes as a carrier system for volatile essential oil components: application to anethole. **Food Chemistry**, v. 218, p. 365–371, 2017, doi: 10.1016/j.foodchem.2016.09.110.

GHOSH, A.; BISWAS, S.; GHOSH, T. Preparation and evaluation of silymarin  $\beta$ -cyclodextrin molecular inclusion complexes. **Journal of Young Pharmacists**, v. 3, n. 3, p. 205–210, 2011.

GIRI, T. K. Alginate containing nanoarchitectonics for improved cancer therapy. In: HOLBAN, A. M.; GRUMEZESCU, A. (Eds.). **Nanoarchitectonics for Smart Delivery and Drug Targeting**. Oxford: William Andrew Publishing, 2016. p. 565–588.

GIROTRA, P.; SINGH, S. K.; NAGPAL, K. Supercritical fluid technology: a promising approach in pharmaceutical research. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 18, n. 1, p. 22–38, 2013.

GIULIANI, A. et al. Molecular structure and vibrational analysis of 2-vinyl furan. **Chemical Physics Letters**, v. 379, n. 5–6, p. 406–411, 2003.

GLASS, B. D. et al. Influence of cyclodextrins on the photostability of selected drug molecules in solution and the solid-state. **International Journal of Photoenergy**, v. 3, n. 4, p. 205–211, 2001.

GOGNA, D. et al. Microsphere based improved sunscreen formulation of ethylhexyl

methoxycinnamate. **Current Drug Delivery**, v. 4, n. 2, p. 153–159, 2007.

GONZÁLEZ-BEDIA, M. et al. **Estudio de compatibilidad del 2-(2-nitrovinil)furano (G-0) con polímeros y ciclodextrinas**. In: CONGRESO DE LA SOCIEDAD CUBANA DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, 10. **Anais...**La Habana, Cuba, 2008. Resumo. Disponível em: <[https://www.academia.edu/3583739/X\\_CONGRESO\\_DE\\_LA\\_SOCIEDAD\\_CUBANA\\_DE\\_Ciencias\\_Farmacéuticas](https://www.academia.edu/3583739/X_CONGRESO_DE_LA_SOCIEDAD_CUBANA_DE_Ciencias_Farmacéuticas)>. Acesso em: 30 nov. 2018

GONZALEZ BORROTO, J. I. et al. The mutagenic potential of the furylethylene derivative 2-furyl-1-nitroethene in the mouse bone marrow micronucleus test. **Toxicological Sciences**, v. 72, n. 2, p. 359–362, 2003.

GONZÁLEZ BORROTO, J. I. et al. Comparative genotoxic evaluation of 2-furylethylenes and 5-nitrofurans by using the comet assay in TK6 cells. **Mutagenesis**, v. 20, n. 3, p. 193–197, 2005.

GONZÁLEZ BORROTO, J. I.; CREUS, A.; MARCOS, R. Genotoxic evaluation of the furylethylene derivative 2-furyl-1-nitroethene in cultured human lymphocytes. **Mutation Research**, v. 497, n. 1–2, p. 177–184, 2001.

GOTTLIEB, H. E.; KOTLYAR, V.; NUDELMAN, A. NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 62, n. 21, p. 7512–7515, 1997.

GOULD, S.; SCOTT, R. C. 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD): A toxicology review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 10, p. 1451–1459, 2005.

GUERRA-PONCE, W. L. et al. In vitro evaluation of sustained released matrix tablets containing ibuprofen: a model poorly water-soluble drug. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, n. 4, p. 751–759, 2016.

GUIGNON, B.; DUQUENOY, A.; DUMOULIN, E. D. Fluid bed encapsulation of

particles: principles and practice. **Drying Technology**, v. 20, n. 2, p. 419–447, 2002.

GUPTA, J. et al. Emulsion solvent diffusion evaporation technique: formulation design optimization and investigation of aceclofenac loaded ethyl cellulose microspheres. **International Journal of Drug Development and Research**, v. 5, n. 4, p. 336–349, 2013.

HANUMEGOWDA, U.; WU, Y.; ADAMS, S. Potential impact of cyclodextrin-containing formulations in toxicity evaluation of novel compounds in early drug discovery. **Journal of Pharmaceutics & Pharmacology**, v. 2, n. 1, p. 1–5, 2014.

HAYASHIDA, K. et al. Preparation and evaluation of cyclodextrin polypseudorotaxane with pegylated liposome as a sustained release drug carrier. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 10, p. 2756–2764, 2014, doi: 10.3762/bjoc.10.292.

HERNÁNDEZ, O. et al. El número y posición de los átomos de bromo en compuestos derivados del 2-furiletieno afectan la citotoxicidad e inducen resistencia en células de mamíferos. **Electronic Journal of Biomedicine**, v. 3, p. 44–52, 2011.

HERNÁNDEZ, R. M. et al. Microcapsules and microcarriers for *in situ* cell delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 7–8, p. 711–730, 2010.

HIDAKA, S. et al. Effect of beta-cyclodextrin on the degradation rate of amoxicillin in acidic solution. **Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**, v. 130, n. 6, p. 889–893, 2010.

HIGASHI, K. et al. Structural Evaluation of Crystalline Ternary  $\gamma$ -Cyclodextrin Complex. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 1, p. 325–333, 2011.

HILL, L. E.; GOMES, C.; TAYLOR, T. M. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing essential oils (trans-cinnamaldehyde, eugenol,

cinnamon bark, and clove bud extracts) for antimicrobial delivery applications. **LWT - Food Science and Technology**, v. 51, n. 1, p. 86–93, 2013.

HODYNA, D. et al. Efficient antimicrobial activity and reduced toxicity of 1-dodecyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate ionic liquid/ $\beta$ -cyclodextrin complex. **Chemical Engineering Journal**, v. 284, p. 1136–1145, 2016, doi: 10.1016/j.cej.2015.09.041.

HONG, J.; SHAH, J. C.; MCGONAGLE, M. D. Effect of cyclodextrin derivation and amorphous state of complex on accelerated degradation of ziprasidone. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 7, p. 2703–2716, 2011.

HOSSEINI, S. G.; ESLAMI, A. The exploration of the influence of microencapsulation processing parameters on the stabilization of ammonium azide particles. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 126, n. 2, p. 455–466, 2016.

HYPPÖLÄ, R.; HUSSON, I.; SUNDHOLM, F. Evaluation of physical properties of plasticized ethyl cellulose films cast from ethanol solution Part I. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 133, n. 1–2, p. 161–170, 1996.

ICH EXPERT WORKING GROUP. **Guidance for Industry Q1B Photostability Testing of New Drug Substances and Products**. US Department of Health and Human Services. Geneva, Switzerland: ICH, 1996. Disponível em: <<http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>>. Acesso em: 3 dez. 2018

ICH EXPERT WORKING GROUP. **ICH Harmonised Tripartite Guideline. Stability Testing of New Drug Substances and Products Q1A(R2)**. US Department of Health and Human Services. Geneva, Switzerland: ICH, 2003. Disponível em: <[https://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/](https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/)>

Q1A\_R2/Step4/Q1A\_R2\_\_Guideline.pdf>. Acesso em: 3 dez. 2018

IJAZ, M. et al. Thiolated cyclodextrin: development of a mucoadhesive vaginal delivery system for acyclovir. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, n. 5, p. 1714–1720, 2016.

INOUE, Y. et al. Stabilizing effect of  $\beta$ -cyclodextrin on Limaprost, a PGE1 derivative, in Limaprost alfadex tablets (Opalmon®) in highly humid conditions. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 62, n. 8, p. 786–792, 2014.

IOELE, G. et al. The difficulties for a photolabile drug in topical formulations: The case of diclofenac. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 465, n. 1–2, p. 284–290, 2014.

JAEGER, A. et al. Oxidative stress-induced cytotoxic and genotoxic effects of nano-sized titanium dioxide particles in human HaCaT keratinocytes. **Toxicology**, v. 296, n. 1–3, p. 27–36, 2012.

JAMEKHORSHID, A.; SADRAMELI, S. M.; FARID, M. A review of microencapsulation methods of phase change materials (PCMs) as a thermal energy storage (TES) medium. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 31, p. 531–542, 2014, doi: 10.1016/j.rser.2013.12.033.

JIMÉNEZ, M. .; MIRANDA, M. A.; TORMOS, R. Photochemistry of naproxen in the presence of  $\beta$ -cyclodextrin. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 104, n. 1–3, p. 119–121, 1997.

JONES, T. . et al. Cyclodextrins in the pharmaceutical sciences. Part I: Preparation, structure and properties of cyclodextrins and cyclodextrin inclusion compounds. **Acta Pharmaceutica Technologica**, v. 30, n. 3, p. 213–223, 1984.

JULLIAN, C. et al. Characterization, phase-solubility, and molecular modeling of inclusion complex of 5-nitroindazole derivative with cyclodextrins. **Bioorganic and**

**Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 9, p. 5078–5084, 2008.

JYOTHI, N. V. N. et al. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. **Journal of Microencapsulation**, v. 27, n. 3, p. 187–197, 2010.

KATZ, D. F.; YUAN, A.; GAO, Y. Vaginal drug distribution modeling. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 92, p. 2–13, 2015, doi: 10.1016/j.addr.2015.04.017.

KFOURY, M. et al. Complexation of estragole as pure compound and as main component of basil and tarragon essential oils with cyclodextrins. **Carbohydrate Polymers**, v. 118, p. 156–164, 2015, doi: 10.1016/j.carbpol.2014.10.073.

KHAN, S. A. et al. Study of nimesulide release from ethylcellulose microparticles and drug-polymer compatibility analysis. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 29, n. 4, p. 554–561, 2010.

KHOR, C. M. et al. Hot-melt extrusion microencapsulation of quercetin for taste-masking. **Journal of Microencapsulation**, v. 34, n. 1, p. 29–37, 2017.

KHUDHAIR, K. T.; AL-KHEDAIRY, E. B. H. A study on some variables affecting the preparation of ethyl cellulose based floating microspheres of lafutidine. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 41, n. 2, p. 281–289, 2016.

KOKATE, A.; LI, X.; JASTI, B. Effect of drug lipophilicity and ionization on permeability across the buccal mucosa: a technical note. **AAPS PharmSciTech**, v. 9, n. 2, p. 501–504, 2008.

KOZMINA, O. P. On the mechanism of thermo-oxidative degradation of cellulose ethers. **Journal of Polymer Science Part C: Polymer Symposia**, v. 16, n. 7, p. 4225–4240, 1967.

KRAJIŠNIK, D.; ČALIJA, B.; CEKIĆ, N. Polymeric microparticles and inorganic

micro/nanoparticulate drug carriers: an overview and pharmaceutical applications. In: ČALIJA, B. (Ed.). **Microsized and nanosized carriers for nonsteroidal anti-inflammatory drugs: Formulation challenges and potential benefits**. London: Academic Press, 2017. p. 39–42.

KUMAR, J. R.; MURALIDHARAN, S.; PARASURAMAN, S. *In vitro* and *in vivo* evaluation of microspheres loaded topical gel delivery system of ketoconazole in male rats against *Candida glabrata*. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 6, n. 11, p. 376–381, 2014.

LACH, J. L.; COHEN, J. Interaction of pharmaceuticals with Schardinger dextrans II: interaction with selected compounds. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, n. 2, p. 137–142, 1963.

LAI, H. L.; PITT, K.; CRAIG, D. Q. M. Characterisation of the thermal properties of ethylcellulose using differential scanning and quasi-isothermal calorimetric approaches. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 386, n. 1–2, p. 178–184, 2010.

LI, G. et al. Elemental impurities in pharmaceutical excipients. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, n. 12, p. 4197–4206, 2015.

LI, S. et al. Studies on the inclusion complexes of daidzein with  $\beta$ -cyclodextrin and derivatives. **Molecules**, v. 22, n. 12, p. 1–11, 2017.

LI, S.; PURDY, W. C. Cyclodextrins and their applications in analytical chemistry. **Chemical Reviews**, v. 92, n. 6, p. 1457–1470, 1992.

LI, Y. et al. Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin for delivery of baicalin via inclusion complexation by supercritical fluid encapsulation. **Molecules**, v. 23, n. 5, p. 1169–1183, 2018.

LIU, R. et al. Preparation of compound ornidazole/pefloxacin PLGA microspheres

and evaluation of the pharmacological effect on chronic periodontitis. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 9, n. 11, p. 20919–20929, 2016.

LOFTSSON, T. et al. Cyclodextrins in drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 2, n. 2, p. 335–351, 2005.

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

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M. E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: effects on drug permeation through biological membranes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 63, n. 9, p. 1119–1135, 2011.

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

LOKHANDE, A. B. et al. Preparation and characterization of repaglinide loaded ethylcellulose nanoparticles by solvent diffusion technique using high pressure homogenizer. **Journal of Pharmacy Research**, v. 7, n. 5, p. 421–426, 2013.

LÓPEZ-GARCÍA, J. et al. HaCaT keratinocytes response on antimicrobial atelocollagen substrates: extent of cytotoxicity, cell viability and proliferation. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 5, n. 2, p. 43–57, 2014.

LÓPEZ, R. **Evaluación del uso profiláctico y terapéutico del 2-(2-nitrovinil) furano (G-0) en aves White Leghorn en condiciones de producción**. 2004 Disertación (Master en Parasitología) Instituto de Medicina Tropical “PEDRO KOURI”, La Habana, Cuba, 2014.

LU, Y.; PARK, K. Microencapsulation: methods and pharmaceutical applications. In:

SWARBRICK, J (Ed.) . **Encyclopedia of Pharmaceutical Sciences and Technology**. 4<sup>th</sup>. ed. New York: Informa Healthcare, 2012. p. 1-13.

LUKE, D. R. et al. Review of the basic and clinical pharmacology of sulfobutylether- $\beta$ -cyclodextrin (SBECD). **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 8, p. 3291–3301, 2010.

LUTKA, A. Effect of cyclodextrin complexation on the photostability of promazine in aqueous solution. **Die Pharmazie**, v. 54, n. 7, p. 549–550, 1999.

LUTKA, A.; KOZIARA, J. Interaction of trimeprazine with cyclodextrins in aqueous solution. **Acta poloniae pharmaceutica**, v. 57, n. 5, p. 369–374, 2000.

LYRA, M. A. M. et al. Study of benznidazole-cyclodextrin inclusion complexes, cytotoxicity and trypanocidal activity. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 73, n. 1–4, p. 397–404, 2012.

MACHADO, A.; DAS NEVES, J. Tissue-based *in vitro* and *ex-vivo* models for vaginal permeability studies. In: SARMENTO, B. (Ed.). **Concepts and Models for Drug Permeability Studies**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2016. p. 273–308.

MACHADO, M.P.; SILVEIRA, E.A.P. Estandarización del control de la calidad microbiológica de productos vinilfuránicos. **Revista Electrónica de Veterinaria REDVET**, v. VI, n. 10, p. 1-9, 2005.

MAGNANI, C. et al. *In vitro* safety evaluation of caffeic acid. **Athens Journal of Health**, v. 1, n. 3, p. 181–188, 2014.

MALIK, K.; ARORA, G.; SINGH, I. Taste masked microspheres of ofloxacin: formulation and evaluation of orodispersible tablets. **Scientia Pharmaceutica**, v. 79, n. 3, p. 653–672, 2011.

MALLICK, S.; MONDAL, A.; SANNIGRAHI, S. Kinetic measurements of the hydrolytic degradation of cefixime: effect of Captisol complexation and water-soluble

polymers. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 60, n. 7, p. 833–841, 2008.

MARQUES, M. R. C.; LOEBENBERG, R.; ALMUKAINZI, M. Simulated biological fluids with possible application in dissolution testing. **Dissolution Technologies**, v. 18, n. 3, p. 15–28, 2011.

MATEOVIĆ-ROJNIK, T. et al. Effect of preparation temperature in solvent evaporation process on Eudragit RS microsphere properties. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, n. 1, p. 143–146, 2005.

MAXWELL, R.; CHICKOS, J. An examination of the thermodynamics of fusion, vaporization, and sublimation of ibuprofen and naproxen by correlation gas chromatography. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, n. 2, p. 805–814, 2012.

MAYA, J. D. et al. Chagas disease: present status of pathogenic mechanisms and chemotherapy. **Biological Research**, v. 43, n. 3, p. 323–331, 2010.

MAYUR, K. et al. Ethyl cellulose based microsphere delivery system for anti-fungal vaginal gels of tioconazole. **Journal of Drug Delivery & Therapeutics**, v. 3, n. 6, p. 14–20, 2013.

MENNINI, N. et al. Analysis of physicochemical properties of ternary systems of oxaprozin with randomly methylated- $\beta$ -cyclodextrin and L-arginine aimed to improve the drug solubility. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 129, p. 350–358, 2016, doi: 10.1016/j.jpba.2016.07.024.

MIELCAREK, J. Photochemical stability of the inclusion complexes formed by modified 1,4-dihydropyridine derivatives with  $\beta$ -cyclodextrin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 15, n. 6, p. 681–686, 1997.

MIELCAREK, J.; SADAJ, A. Inclusion compounds of nifedipine and other 1,4-dihydropyridine derivatives with  $\beta$ -cyclodextrins II. Photochemical stability of the

inclusion compounds formed by nifedipine with  $\beta$ -cyclodextrins. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 51, p. 21–24, 1994.

MIZUSAKO, H. et al. Active drug targeting of a folate-based cyclodextrin–doxorubicin conjugate and the cytotoxic effect on drug-resistant mammary tumor cells *in vitro*. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, n. 9, p. 2934–2940, 2015.

MONDJINO, Y. A. et al. Impact of mixed  $\beta$ -cyclodextrin ratios on pluronic rotaxation efficiency and product solubility. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 7, n. 43, p. 23831–23836, 2015.

MONTEIRO, J. B. et al. Enzymatic hydrolysis of diloxanide furoate in the presence of beta-cyclodextrin and its methylated derivatives. **International journal of pharmaceutics**, v. 267, n. 1–2, p. 93–100, 2003.

MOORE, J. ; FLANNER, H. H. Mathematical comparison of curves with an emphasis on in vitro dissolution profiles. **Pharmaceutical Technology**, v. 20, n. 6, p. 64–74, 1996.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MOYA, L.; GÓMEZ, L. Filtration method to recovery of the G-0 active principle from sugar cane byproduct. **Centro Azúcar**, v. 29, n. 3, p. 35–40, 2000.

MURTAZA, G. Ethylcellulose microparticles: A review. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 69, n. 1, p. 11–22, 2012.

MYLES, A. M. et al. Analysis and modelling of the structures of beta-cyclodextrin complexes. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1199, n. 1, p. 27–36, 1994.

NAGASE, Y. et al. Inhibitory effect of sulfobutyl ether  $\beta$ -cyclodextrin on DY-9760e-

induced cellular damage: *in vitro* and *in vivo* studies. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 92, n. 12, p. 2466–2474, 2003.

NAIK, D. R.; RAVAL, J. P. A comparative study of acyclovir microencapsulation by novel solvent evaporation-matrix erosion and spray drying techniques. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology**, v. 5, n. 1, p. 1627–1637, 2012.

NEVES, L. O. et al. A randomized clinical trial comparing meglumine antimoniate, pentamidine and amphotericin B for the treatment of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania guyanensis*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 6, p. 1092–1101, 2011.

NICOLAZZI, C. et al. In vitro antiviral efficacy of the ganciclovir complexed with beta-cyclodextrin on human cytomegalovirus clinical strains. **Antiviral Research**, v. 54, n. 2, p. 121–127, 2002.

NIEDDU, M. et al. Improvement of thymol properties by complexation with cyclodextrins: *In vitro* and *in vivo* studies. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, p. 393–399, 2014, doi: 10.1016/j.carbpol.2013.10.084.

OKAMATSU, A. et al. Folate-appended  $\beta$ -cyclodextrin as a promising tumor targeting carrier for antitumor drugs *in vitro* and *in vivo*. **Bioconjugate Chemistry**, v. 24, n. 4, p. 724–733, 2013.

OKAWARA, M. et al. Effect of liquid crystals with cyclodextrin on the bioavailability of a poorly water-soluble compound, diosgenin, after its oral administration to rats. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 472, n. 1–2, p. 257–261, 2014.

OLAZÁBAL-MANSO, E. et al. **Method of obtaining 2-(2-nitrovinyl)-furan and the use thereof as a coccidiostatic**. United States, 24 set. 2002. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/US20050043551A1/en>>. Acesso em: 30 nov.

2018

ORFANO, F. et al. Photostabilization of oxolinic acid in hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrins; implications for the effect of molecular self-assembly phenomena. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 64, n. 3–4, p. 289–297, 2009.

ORFE-SARDIÑAS, Y. **Estudio de compatibilidad G0/excipientes mediante métodos isotérmicos y no isotérmicos**. 2014. Trabajo de Diploma (Licenciado en Ciencias Farmacéuticas), Facultad de Química y Farmacia, Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas, Cuba, 2014.

PAN, H. et al. A superior preparation method for daidzein-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin complexes with improved solubility and dissolution: supercritical fluid process. **Acta Pharmaceutica**, v. 67, n. 1, p. 85–97, 2017.

PANWAR, M. ; TANWAR, Y. Development and characterization of sustain release gastro retentive floating microsphere of diltiazem hydrochloride for the treatment of hypertension. **Asian Journal of Pharmaceutics**, v. 9, n. 2, p. 107–112, 2015.

PARIDA, P. et al. Development and characterization of ethylcellulose based microsphere for sustained release of nifedipine. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 5, p. 341–344, 2016.

PATEL, H.; PATEL, H. R.; PATEL, G. Ionotropic gelation technique for microencapsulation of antihypertensive drug. **WebMed Central Pharmaceutical Sciences**, ID. WMC00922, p. 1–10, 2010, doi: 10.1201/b13336-2.

PATIL, J. S. et al. Ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation: the novel techniques to design hydrogel particulate sustained modulated drug delivery system: a review. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 5, n. 1, p. 241–248, 2010.

PAULAI, F. R.; SERRANO, S. H. P.; TAVARES, L. C. Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1013–1020, 2009.

PAVLOVSKA, G.; TANEVSKA, S. Influence of temperature and humidity on the degradation process of ascorbic acid in vitamin C chewable tablets. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 111, n. 3, p. 1971–1977, 2013.

PECORA, T. M. G. et al. Preparation, characterization and photostability assessment of curcumin microencapsulated within methacrylic copolymers. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 33, p. 88–97, 2016.

PEREVA, S. et al. Efficiency of “cyclodextrin-ibuprofen” inclusion complex formation. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 35, p. 34–39, 2016, doi: 10.1016/j.jddst.2016.04.006.

PERIGNON, C. et al. Microencapsulation by interfacial polymerisation: membrane formation and structure. **Journal of Microencapsulation**, v. 32, n. 1, p. 1–15, 2015.

PESSINA, A. et al. High sensitivity of human epidermal keratinocytes (HaCaT) to topoisomerase inhibitors. **Cell Proliferation**, v. 34, n. 4, p. 243–252, 2001.

PHUNPEE, S. et al. Encapsulation of lemongrass oil with cyclodextrins by spray drying and its controlled release characteristics. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 81, n. 4, p. 718–723, 2017.

PIEL, G. et al. Study of the influence of  $\gamma$ -cyclodextrin on the molsidomine photostability. (J. Szejtli, L. Szente, Eds.). **Proceedings of the Eighth International Symposium on Cyclodextrins**. Budapest: Springer Science & Business Media, 1996, p. 297-300. Disponível em: <[http://link.springer.com/10.1007/978-94-011-5448-2\\_64](http://link.springer.com/10.1007/978-94-011-5448-2_64)>. Acesso em: 5 dez. 2018

PITHA, J.; PITHA, J. Amorphous water-soluble derivatives of cyclodextrins: nontoxic

dissolution enhancing excipients. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 74, n. 9, p. 987–990, 1985.

POLYAKOV, N. E. et al.  $\beta$ -Ionone cyclodextrins inclusion complexes:  $^1\text{H}$  NMR study and photolysis. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 161, n. 2–3, p. 261–267, 2004.

POMPONIO, R. et al. Photostability studies on nicardipine–cyclodextrin complexes by capillary electrophoresis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 35, n. 2, p. 267–275, 2004.

POPIEC, A. et al. Effect of cyclodextrins on the degradation rate of benzylpenicillin. **Die Pharmazie**, v. 71, n. 2, p. 68–75, 2016.

POPIEC, A.; LOFTSSON, T. Effects of cyclodextrins on the chemical stability of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 531, n. 2, p. 532–542, 2017.

POURMOKHTAR, M.; JACOBSON, G. A. Enhanced stability of sulfamethoxazole and trimethoprim against oxidation using hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. **Die Pharmazie**, v. 60, n. 11, p. 837–839, 2005.

PRAKASH, B. et al. Spray-dried floating microparticles of ranitidine HCl by factorial design for oral delivery. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 5, n. 11, p. 240–248, 2013.

PRASERTMANAKIT, S. et al. Ethyl cellulose microcapsules for protecting and controlled release of folic acid. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, n. 4, p. 1104–1112, 2009.

PREZOTTI, F. G.; CURY, B. S. F.; EVANGELISTA, R. C. Mucoadhesive beads of gellan gum/pectin intended to controlled delivery of drugs. **Carbohydrate Polymers**, v. 113, p. 286–295, 2014, doi: 10.1016/j.carbpol.2014.07.021.

PUSKÁS, I. et al. Sulfobutylether-cyclodextrins: Structure, Degree of Substitution

and Functional Performance. In: RAMIREZ, F. (Ed.). **Cyclodextrins: Synthesis, Chemical Applications and Role in Drug Delivery**. New York: Nova Sciences Publishers, 2015. p. 293–320.

PUSKÁS, I.; MALANGA, M. Benefits and Limitations of Using Cyclodextrins in Drug Formulations. BIT'S 7TH ANNUAL SYMPOSIUM OF DRUG DELIVERY SYSTEMS (SDDS-2017). **Anais...Prague**: 2017. Disponível em:

<<https://www.researchgate.net/publication/318529125>>. Acesso em: 5 dez. 2018

QUIROZ-CASTAÑEDA, R. E.; DANTÁN-GONZÁLEZ, E. Control of avian coccidiosis: future and present natural alternatives. **BioMed Research International**, v. 2015, ID. 430610, p. 1–11, 2015, doi: 10.1155/2015/430610.

RAGNO, G. et al. Design and monitoring of photostability systems for amlodipine dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 265, n. 1–2, p. 125–32, 2003.

RAJEWSKI, R. A.; STELLA, V. J. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. *In vivo* drug delivery. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, n. 11, p. 1142–1169, 1996.

RAJPUT, S. B.; KARUPPAYIL, S. M. Small molecules inhibit growth, viability and ergosterol biosynthesis in *Candida albicans*. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 1-6, 2013.

RAO, B. N.; TURRO, N. J.; RAMAMURTHY, V. Modification of chemical reactivity via inclusion complex formation: photochemistry of dibenzyl ketones and benzyl phenylacetates. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 51, n. 4, p. 460–464, 1986.

RAZA, A. et al. Preparation, characterization, and in vitro anti-inflammatory evaluation of novel water soluble kamebakaurin/hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex. **Journal of Molecular Structure**, v. 1130, p. 319–326, 2017, doi: 10.1016/j.molstruc.2016.10.059.

REDDY, G. D. et al. Modification of photochemistry by cyclodextrin complexation. Competitive Norrish type I and type II reactions of benzoin alkyl ethers. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 51, n. 16, p. 3085–3093, 1986.

REDDY, G. D.; RAMAMURTHY, V. Modification of photochemical reactivity by cyclodextrin complexation: alteration of photochemical behavior via restriction of translational and rotational motions. Alkyldeoxybenzoins. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 52, n. 25, p. 5521–5528, 1987.

REIS, T. A. **Desenvolvimento de uma formulação tópica contendo fluconazol nanoencapsulado para o tratamento de candidíase vulvovaginal**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, 2014.

REN, B. et al. HP- $\beta$ -cyclodextrin as an inhibitor of amyloid- $\beta$  aggregation and toxicity. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 18, n. 30, p. 20476–20485, 2016.

REPKA, M. A. et al. Applications of hot-melt extrusion for drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 5, n. 12, p. 1357–1376, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI document M27-A3). **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-Third Edition**. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, USA, 2008. Disponível em: <[www.clsi.org](http://www.clsi.org)>. Acesso em: 30 nov. 2018

RODRÍGUEZ-NEGRÍN, Z. Attainment of a rational and harmonic technology for the production of bio-active compounds from sugar cane residuals. Part II: Optimization of purification process. **Centro Azúcar**, v. 30, n. 1, p. 30–34, 2003.

RODRÍGUEZ, M. **Validación de los métodos de determinación de pureza de**

**los principios activos G-1, G-0 y UC-244.** 1996. Trabajo de Diploma (Licenciado en Ciencias Farmacéuticas), Universidad Central de Las Villas, Cuba, 1996.

RUDRANGI, S. R. S. et al. Solid-state flurbiprofen and methyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes prepared using a single-step, organic solvent-free supercritical fluid process. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 104, p. 164–170, 2016, doi: 10.1016/j.ejpb.2016.04.024.

RUZ, V. **Estudio de preformulación del 2-(2-nitrovinil)furano (G-0) con fines farmacéuticos.** 2006. Disertación (Master en Tecnología y Control de Medicamentos) Universidad de La Habana, Cuba, 2006.

RUZ, V. et al. Characterization and molecular modeling of the inclusion complexes of 2-(2-nitrovinyl) furan (G-0) with cyclodextrines. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 439, n. 1–2, p. 275–285, 2012.

RUZ, V. et al. Characterization of the sublimation and vapor pressure of 2-(2-nitrovinyl) furan (G-0) using thermogravimetric analysis: effects of complexation with cyclodextrins. **Molecules**, v. 20, n. 8, p. 15175–15191, 2015.

SAENGER, W. Cyclodextrin inclusion compounds in research and industry. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 19, n. 5, p. 344–362, 1980.

SCALIA, S.; VILLANI, S.; CASOLARI, A. Inclusion complexation of the sunscreen agent 2-ethylhexyl-p-dimethylaminobenzoate with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin: effect on photostability. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 51, n. 12, p. 1367–1374, 1999.

SEMYONOV, D. et al. Air-suspension fluidized-bed microencapsulation of probiotics. **Drying Technology**, v. 30, n. 16, p. 1918–1930, 2012.

SERRA, M. et al. Microencapsulation technology: a powerful tool for integrating

expansion and cryopreservation of human embryonic stem cells. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, p. e23212, 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0023212.

SHAH, M. et al. Molecular inclusion complexes of  $\beta$ -cyclodextrin derivatives enhance aqueous solubility and cellular internalization of paclitaxel: preformulation and in vitro assessments. **Journal of Pharmaceutics & Pharmacology**, v. 2, n. 2, p. 1-8, 2015.

SHARMA, A.; JAIN, C. Carvedilol- $\beta$ -cyclodextrin system: preparation, characterization and in vitro evaluation. **Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 12, n. 1, p. 51–58, 2013.

SHASHIKANT, D.; PATIL, J. Design, evaluation and characterization of spray dried cyclodextrin inclusion complexes of glimepiride. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 8, p. 1029–1046, 2016.

SHIMOKAWA, K. et al. Physicochemical properties and controlled drug release of microcapsules prepared by simple coacervation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 104, p. 1–4, 2013, doi: 10.1016/j.colsurfb.2012.11.036.

SHITYAKOV, S. et al. Sevoflurane-sulfobutylether- $\beta$ -cyclodextrin complex: preparation, characterization, cellular toxicity, molecular modeling and blood-brain barrier transport studies. **Molecules**, v. 20, n. 6, p. 10264–10279, 2015.

SICARD, P.; SANIEZ, M-H. Biosynthesis of cycloglycosyltransferase and obtention of enzymatic reaction products. In: DUCHÊNE, D. (Ed.). **Cyclodextrins and Their Industrial Uses**. Paris: Editions de Santé, 1987. p. 77–103.

SIFONTES-RODRÍGUEZ, S. et al. The efficacy of 2-nitrovinylfuran derivatives against Leishmania in vitro and in vivo. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 2, p. 166–173, 2015.

SIFONTES-RODRÍGUEZ, S. **Descubrimiento racional de compuestos**

**químicos para el tratamiento de la leishmaniosis y la enfermedad de Chagas.**

2017. Tesis [Doctorado], Departamento de Parasitología, Universidad Complutense de Madrid, España, 2017.

SILVA-JARDIM, I.; THIEMANN, O. H.; ANIBAL, F. F. Leishmaniasis and Chagas Disease Chemotherapy: a Critical Review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 10, p. 1810–1823, 2014.

SILVA, C. V. N. S. et al. Molecular modeling and cytotoxicity of diffractaic acid: HP- $\beta$ -CD inclusion complex encapsulated in microspheres. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 494–503, 2016, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.06.073.

SINGHVI, G.; SINGH, M. Review: *in-vitro* drug release characterization models. **International Journal of Pharmaceutical Studies and Research**, v. II, n. I, p. 77–84, 2011.

SITKIN, A.; KLIMENKO, V. The chemistry and technology of furan compounds. **Izd. Krasnodar, Politech. Inst.**, v. 97, p. 78–92, 1979.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J. **Practical HPLC method development**. 2nd. ed. New York: Wiley-Interscience, 1997.

SNYDER, R. D.; GREEN, J. W. A review of the genotoxicity of marketed pharmaceuticals. **Mutation Research**, v. 488, n. 2, p. 151–169, 2001.

SOARES-SOBRINHO, J. L. et al. Benznidazole drug delivery by binary and multicomponent inclusion complexes using cyclodextrins and polymers. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 2, p. 323–330, 2012.

SONG, A. Y. et al. Development of anti-insect microencapsulated polypropylene films using a large scale film coating system. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 4, p. 1011–1016, 2018.

SONG, B. et al. Hyaluronic acid-based biocompatible supramolecular assembly for sustained release of antiretroviral drug. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, n. 9, p. 2760–2769, 2016.

SOPEÑA, F. et al. Ethylcellulose formulations for controlled release of the herbicide alachlor in a sandy soil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 20, p. 8200–8205, 2007.

SORTINO, S. et al. The photochemistry of flutamide and its inclusion complex with beta-cyclodextrin. Dramatic effect of the microenvironment on the nature and on the efficiency of the photodegradation pathways. **Photochemistry and Photobiology**, v. 73, n. 1, p. 6–13, 2001.

SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. Candida infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. **BioMed Research International**, v. 2013, ID. 204237, 2013, doi: 10.1155/2013/204237.

SUR, D.; PURKAYASTHA, P.; CHATTOPADHYAY, N. Kinetics of the photoconversion of diphenylamine in  $\beta$ -cyclodextrin environments. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 134, n. 1–2, p. 17–21, 2000.

SUZUKI, R. et al. Properties of tropolone/ $\gamma$ -cyclodextrin complexes prepared using different methods. **World Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 9, p. 250–261, 2017.

SZEJTLI, J. Dimethyl- $\beta$ -cyclodextrin as parenteral drug carrier. **Journal of Inclusion Phenomena**, v. 1, n. 2, p. 135–150, 1983.

SZEJTLI, J. Medicinal applications of cyclodextrins. **Medicinal Research Reviews**, v. 14, n. 3, p. 353–386, 1994.

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

SZENTE, L. Stable, controlled-release organophosphorous pesticides entrapped in  $\beta$ -cyclodextrin. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 51, n. 3, p. 957–963, 1998.

SZENTE, L. et al. Supramolecular proteoglycan aggregate mimics: cyclodextrin-assisted biodegradable polymer assemblies for electrostatic-driven drug delivery. **Chemistry - An Asian Journal**, v. 9, n. 5, p. 1365–1372, 2014.

SZENTE, L. et al. Cyclodextrins: assessing the impact of cavity size, occupancy, and substitutions on cytotoxicity and cholesterol homeostasis. **Molecules**, v. 23, n.5, p. 2-15, 2018, doi: 10.3390/molecules23051228.

SZENTE, L.; SZEJTLI, J. Cyclodextrin complex of a volatile insecticide (DDVP). **Acta Chimica Academiae Scientiarum Hungaricae**, v. 107, n. 3, p. 195–202, 1981.

TADANOBU, U. et al. Stoichiometry-dependent changes of solubility and photoreactivity of an antiulcer agent, 2'-carboxymethoxy-4,4'-bis(3-methyl-2-butenyloxy) chalcone, in cyclodextrin inclusion complexes. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 1, n. 2, p. 81–87, 1993.

TANG, P. et al. Inclusion complexes of chlorzoxazone with  $\beta$ - and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin: Characterization, dissolution, and cytotoxicity. **Carbohydrate Polymers**, v. 131, p. 297–305, 2015, doi: 10.1016/j.carbpol.2015.05.055.

TAO, F. et al. Synthesis and characterization of  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes of thymol and thyme oil for antimicrobial delivery applications. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 1, p. 247–255, 2014.

TEIXEIRA, K. I. R. et al. Cyclodextrin modulates the cytotoxic effects of chlorhexidine on microorganisms and cells in vitro. **Drug Delivery**, v. 22, n. 3, p. 444–453, 2015.

TESHIMA, D. et al. Effects of cyclodextrins on degradations of emetine and cephaeline in aqueous solution. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 37, n. 6, p. 1591–1594, 1989.

THEERAKITTAYAKORN, K.; BUNPRASERT, T. Differentiation capacity of mouse L929 fibroblastic cell line compare with human dermal fibroblast. **International Journal of Medical and Health Sciences**, v. 5, n. 2, p. 51–54, 2011.

THOMA, K. Photodecomposition and stabilization of compounds in dosage forms. In: TONESSEN, H. (Ed.). **The Photostability of Drug and Drug Formulations**. London: Taylor & Francis, 1996. p. 111–140.

THONEMANN, B. et al. Responses of L929 mouse fibroblasts, primary and immortalized bovine dental papilla-derived cell lines to dental resin components. **Dental Materials**, v. 18, n. 4, p. 318–323, 2002.

TIWARI, G.; TIWARI, R.; RAI, A. Cyclodextrins in delivery systems: applications. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 2, n. 2, p. 72–79, 2010.

TOMARO-DUCHESNEAU, C. et al. Microencapsulation for the therapeutic delivery of drugs, live mammalian and bacterial cells, and other biopharmaceutics: current status and future directions. **Journal of Pharmaceutics (Cairo)**, v. 2013, ID. 103527, p. 1–19, 2013, doi: 10.1155/2013/103527.

TOMONO, K. et al. Effect of  $\beta$ -cyclodextrin and its derivatives on the photostability of photosensitive drugs. **Yakuzaigaku**, v. 48, n. 4, p. 322–325, 1988.

TONNESEN, H. Formulation approaches for improving solubility and its impact on drug photostability. In: TONNESEN, H. (Ed.). **Photostability of Drugs and Drugs Formulations**. 2nd. ed. Boca Raton: CRC Press, 2004. p. 351–366.

UEKAMA, K. et al. Improvement of some pharmaceutical properties of clofibrate by cyclodextrin complexation. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 58, n. 12, p. 338–

342, 1983.

UEKAMA, K. Pharmaceutical applications of methylated cyclodextrins. **Pharmacy International**, v. 6, p. 61–65, 1985.

UEKAMA, K.; HIRAYAMA, F.; IRIE, T. Cyclodextrin drug carrier systems. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 5, p. 2045–2076, 1998.

UPPALA, P. K. et al. Formulation and development of diltiazem HCl controlled released microcapsules by ionotropic gelation technique. **American Journal of Advanced Drug Delivery**, v. 1, n. 4, p. 394–412, 2013.

URIBARREN, T. **Enfermedad de Chagas**. Universidad Nacional Autónoma de México. Departamento de Microbiología y Parasitología: Recursos em Parasitología. México, MX: UNAM, 2018. Disponível em: <<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/trypanosomosis.html>>. Acesso em: 7 dez. 2018.

URQUIJO, A.G. Dermofural ointment (0,15 %) as antibacterial of local use in a burned patient. **Medicentro Electrónica**, v. 21, n. 3, p. 253-256, 2017.

VADHER, A. H. et al. Preparation and characterization of co-grinded mixtures of aceclofenac and neusilin US2 for dissolution enhancement of aceclofenac. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, n. 2, p. 606–614, 2009.

VAN DER BIJL, P.; VAN EYK, A. D.; THOMPSON, I. O. Permeation of 17beta-estradiol through human vaginal and buccal mucosa. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 85, n. 4, p. 393–398, 1998.

VAN TONDER, A.; JOUBERT, A. M.; CROMARTY, A. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. **BMC Research Notes**, v. 8, n. 47, p. 1–10, 2015.

VEREVKIN, S. P. Thermochemistry of nitro compounds. Experimental standard enthalpies of formation and improved group-additivity values. **Thermochimica Acta**, v. 307, n. 1, p. 17–25, 1997.

VILLIERS, M. A. Sur la fermentation de la fécule par l'action du ferment butyrique. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, v. 112, p. 536–538, 1891.

WAGH, P.; MUJUMDAR, A.; NAIK, J. B. Preparation and characterization of ketorolac tromethamine-loaded ethyl cellulose micro-/nanospheres using different techniques. **Particulate Science and Technology**, p. 1–11, 2018, doi: 10.1080/02726351.2017.1383330.

WALKER, H. M. **A preliminary study of the interaction of acidic and basic drugs using ethyl cellulose microspheres**. 2012. Dissertation (Master in Pharmaceutical Sciences with Industrial Pharmacy option) - University of Toledo, Ohio, USA, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Third WHO report on neglected tropical diseases**. Geneva: WHO, 2015. Disponível em: <www.who.int>. Acesso em: 7 dez. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Geneva: WHO: 2018. Disponível em: <[https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))>. Acesso em: 7 dez. 2018.

WROBEL, K-H. et al. Histologische und ultrastrukturelle Untersuchungen am Vaginalepithel des Rindes. **Anatomia, Histologia, Embryologia: Journal of Veterinary Medicine Series C**, v. 15, n. 4, p. 303–328, 1986.

XU, Q.; BRICKHOUSE, M.; WANG, H. 2D NMR analysis of ethylcellulose. In: CHENG, H.; ENGLISH, A. (Eds.). **NMR Spectroscopy of polymers in solution**

**and in the solid state.** New York: American Chemical Society, 2003. p. 325–335.

YE, M.; KIM, S.; PARK, K. Issues in long-term protein delivery using biodegradable microparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 146, n. 2, p. 241–260, 2010.

YEQIANG, H. et al. Progress in the immobilization of  $\beta$ -cyclodextrin and their application in adsorption of environmental pollutants. **Chinese Journal of Organic Chemistry**, v. 36, n. 2, p. 248–257, 2016.

YOSHIDA, A. et al. Pharmaceutical evaluation of hydroxyalkyl ethers of  $\beta$ -cyclodextrins. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 46, n. 3, p. 217–222, 1988.

YU, D. G. et al. Tablets with material gradients fabricated by three-dimensional printing. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 9, p. 2446–2456, 2007.

ZHANG, C. et al. Direct and real-time quantification of tenofovir release from pH-sensitive microparticles into simulated biological fluids using (1) H nuclear magnetic resonance. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, n. 4, p. 1170–1177, 2014.

ZHANG, L. et al. Drug-in-cyclodextrin-in-liposomes: A novel drug delivery system for flurbiprofen. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 492, n. 1–2, p. 40–45, 2015.

ZHENG, Y.; CHOW, A. H. L. Production and characterization of a spray-dried hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin/quercetin complex. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 35, n. 6, p. 727–734, 2009.

ZHOU, D. . et al. Investigation of the anti-proliferative effect and the underlying mechanism of the crude extract of *Celastrus orbiculatus* on human HaCaT keratinocytes. **Journal of Undergraduate Life Sciences**, v. 5, n. 1, p. 54–58, 2011.

ZHOU, F.-L. et al. Preparation and characterization of polycaprolactone

microspheres by electrospraying. **Aerosol Science and Technology**, v. 50, n. 11, p. 1201–1215, 2016.

ZHU, L. et al. Encapsulation of menthol in beeswax by a supercritical fluid technique. **International Journal of Chemical Engineering**, v. 2010, ID. 608680, p. 1–7, 2010, doi: 10.1155/2010/608680.

## 8. Anexos

### Anexo 1. Composição do Fluido Vaginal Simulado (SVF).

| Composição (em água)   | SVF 1 (g.L <sup>-1</sup> ) | SVF 2 (g.L <sup>-1</sup> ) |
|------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Cloreto de sódio       | 3,51                       | 3,51                       |
| Hidróxido de potássio  | 1,40                       | 1,40                       |
| Hidróxido de cálcio    | 0,222                      | 0,222                      |
| Albumina sérica bovina | 0,018                      | 0,018                      |
| Ácido láctico          | 2,00                       | 2,00                       |
| Ácido acético          | 1,00                       | 1,00                       |
| Glicerol               | 0,16                       | 0,16                       |
| Ureia                  | 0,40                       | 0,40                       |
| Glicose                | 5,00                       | 5,00                       |
| Mucina                 | -                          | 1,5 % (m/v)                |
| <b>Propriedades</b>    |                            |                            |
| pH                     | 4,5                        | 4,5                        |

**Anexo 2.** Equações referentes às cinéticas de liberação de fármaco avaliadas para a liberação de G-0 de micropartículas poliméricas com etilcelulose (SigmaPlot).

**Ordem zero**

$$f = y_0 + a \cdot x$$

**Primeira ordem**

$$f = 100 \cdot (1 - \exp(-k \cdot t))$$

**Korsmeyer-Peppas**

$$f = k \cdot t^n$$

**Higuchi**

$$f = k \cdot \sqrt{t}$$

**Weibull**

$$f = \begin{cases} x \leq x_0 - b \cdot \ln(2)^{1/c}; & y_0; \\ y_0 + a \cdot (1 - \exp(-(\text{abs}(x - x_0 + b \cdot \ln(2)^{1/c})/b)^c)) & \end{cases}$$