

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA**

LILLIAN AMÉLIA SOARES

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE
INCLUSÃO DO 4-NEROLIDILCATECOL DE *Pothomorphe
umbellata (Piperaceae)* EM 2-HIDROXIPROPIL- β -
CICLODEXTRINA.**

Goiânia

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

LILLIAN AMÉLIA SOARES

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE
INCLUSÃO DO 4-NEROLIDILCATECOL DE *Pothomorphe
umbellata* (*Piperaceae*) EM 2-HIDROXIPROPIL- β -
CICLODEXTRINA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos

Orientadora: Profa. Dra. Kênnia Rocha Rezende.

Goiânia

2007

*A meus pais, Cloves e Nivalda,
pelo amor, carinho e dedicação.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida.

À orientadora profa Dra Kênnia Rocha Rezende pela oportunidade e confiança,

Aos meus pais, Cloves e Nivalda, pelo carinho, amor, dedicação, apoio e confiança.

Ao meu namorado Marcus, pelo amor incondicional, carinho, compreensão, dedicação, respeito e incentivo. E a sua família pelo carinho e acolhida.

Aos meus irmãos Inês e Marcelo, pelo carinho, força e amizade.

Aos meus sobrinhos, Ricardo, Gabriel e Milleny, pelos momentos de alegria nos fins de semana.

Ao professor Massuo Jorge Kato pelas raízes de *Pothomorphe umbellata*.

Ao professor Dr. Leonardo Fernandes Fraceto pela atenção e pelas inúmeras dúvidas esclarecidas.

À professora Dra Inês Sabioni Resck e aos professores Dr. Luiz Carlos Roque e Dr. Massayoshi Yoshida pela ressonância magnética nuclear.

Ao professor Dr. Aparecido Ribeiro de Souza pela análise térmica.

Ao professor Dr. Eric de Souza Gil pela ajuda na espectrofotometria de infravermelho e análise térmica.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e da UFG que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos os colegas do NEPET pelas horas de convívio e descontração.

À aluna Ana Flávia Vasconcelos Borges Leal, por toda ajuda e amizade.

A todos os colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelo companheirismo, amizade e incentivo.

Às amigas, Ana Paula, Helen, Sandra, Cláudia, Nívia e Soraya e aos amigos Dudu, Homero e Hudson pela preciosa amizade, pela torcida, pelos momentos de descontração e pela força nos momentos difíceis.

Aos colegas da Farmácia Universitária do UNIPAM e do Hospital de Urgências de Goiânia pelo sorriso de cada dia, pelo incentivo e amizade.

A todos os amigos e familiares por me incentivarem e compreenderem a minha ausência.

À coordenadora do Curso de Farmácia, profa Adriana Álvares e ao diretor da Faculdade de Ciências da Saúde do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM) prof. Dirceu Deocleciano Mundim, pelo apoio e confiança.

Aos meus alunos pelo carinho e compreensão.

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho!

RESUMO

O 4-nerolidilcatecol (4-NRC) é o principal constituinte das raízes de *Pothomorphe umbellata* L. Miq. (Piperaceae). Este possui comprovada ação antioxidante, antiinflamatória e quimioprotetora, com expressiva ação fotoprotetora. No entanto, a viabilidade de formulações terapêuticas ou mesmo a avaliação da biodisponibilidade do 4-NRC é dificultada devido à sua baixa estabilidade e solubilidade em água. As ciclodextrinas, oligossacarídeos cíclicos de cavidade central com caráter lipofílico, são alternativas tecnológicas para elevar a solubilidade de substâncias, pois, em soluções aquosas, formam complexos com moléculas apolares, capturando grupamentos apolares no interior de sua cavidade. O objetivo deste trabalho foi preparar e caracterizar um complexo de inclusão entre o 4-NRC e hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD), além de validar a metodologia analítica de quantificação do 4-NRC por cromatografia líquida da alta eficiência acoplada a detector UV (CLAE-UV). A metodologia de quantificação do 4-NRC em CLAE-UV demonstrou boa sensibilidade (3 $\mu\text{g/mL}$), linearidade (3 - 100 $\mu\text{g/mL}$), precisão intra (0,05 - 5,32%) e inter-ensaio (0,28 - 2,76%) e exatidão (95,58 - 101,29%) de acordo com a resolução 899/2003 da ANVISA. O complexo de inclusão foi preparado por liofilização e malaxagem e analisado por meio de estudo de solubilidade de fases, ressonância magnética nuclear (RMN), infravermelho (IV) e termogravimetria (TG). O estudo de solubilidade de fases demonstrou a formação de um complexo do tipo B com uma constante de estabilidade ($6494 \pm 837 \text{ M}^{-1}$). A estequiometria do complexo 4-NRC: HP- β -CD foi de 2:1, segundo o método de variação contínua (Job's plot). Os dados de RMN- ^1H , IV e TG, evidenciaram a formação do complexo.

ABSTRACT

4-Nerolidylcatechol (4-NRC) is the major secondary metabolite from *Pothomorphe umbellata* L. Miq. (Piperaceae). It displays an important antioxidant activity and remarkable photoprotective, antimalaric and anti-inflammatory activities. In addition, a quimioprotective action was demonstrated at micromolecular concentration; according to ethnopharmacological uses. However, therapeutic uses of the catechol are limited due to its unfavorable physicochemical properties, especially its very poor water solubility. Cyclodextrins (CDs), cyclic oligosaccharides with a hydrophobic cavity has been widely used to improve the solubility and dissolution rate of poorly water soluble drugs. Therefore, the aim of this study was to prepare and characterize a 4-NRC:HP- β -CD inclusion complex and validate the analytical method for quantification of 4-NRC by HPLC-UV. The analytical method showed good sensitivity (3.0 $\mu\text{g/mL}$), linearity (3.0 – 100.0 $\mu\text{g/mL}$), intra-assay (0.05 – 5.32%) and inter-assay precision (0.28 - 2.76%) and also great accuracy (95.58 – 101.29%), according to ANVISA guidelines. The inclusion complexes were prepared using kneading and freeze-drying methods and the 4-NRC solubility enhancement was investigated by the solubility method. Inclusion complex formation was assessed by thermal analysis (DTA) and Fourier transform infrared (FTIR) methods, in addition to UV-Vis and ^1H nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopies. Phase solubility studies of inclusion complex in water showed a B-type diagram and a stability constant of $6494 \pm 837 \text{ M}^{-1}$. Stoichiometry of 4-NRC: HP- β -CD complex (2:1) was established by the UV spectrophotometer using Job's plot. Data from ^1H -NMR, FTIR, DTG experiments provided an evidence of inclusion complexation of 4-NRC and HP- β -CD.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Exemplares jovens de <i>Pothomorphe umbellata</i> (L.) Miq. Centroflora, São Paulo, maio de 2007.....	19
Figura 2	Estrutura do 4-Nerolidilcatecol.....	20
Figura 3	Estruturas das α - (a), β - (b) e γ - (c) ciclodextrinas, adaptado de DAVIS e BREWSTER, 2004.....	22
Figura 4	Representação esquemática da estrutura tridimensional das CDs, mostrando as características estruturais definidas pelo arranjo das unidades de glicose, adaptado de BRITO et al., 2004.....	22
Figura 5	Dimensões geométricas (nm) aproximadas de α -, β - e γ - ciclodextrinas, adaptado de JINDRICH, 2007.....	23
Figura 6	Estrutura da HP- β -CD.....	25
Figura 7	Representação esquemática da formação de um complexo de inclusão de ciclodextrina com <i>p</i> -xileno em solução aquosa (círculos representam moléculas de água), adapt. de CEREDA, 2003	26
Figura 8	Diagrama de solubilidade de fases e classificação dos complexos de acordo com Higuchi e Connors, (1965) (A_P - aumento positivo de solubilidade; A_L - aumento linear de solubilidade; A_N - aumento de solubilidade com desvio negativo; B_S - aumento limitado da solubilidade; B_I - redução de solubilidade com complexo insolúvel, a- solubilidade limite do complexo, b-consumo final soluto). Adaptado de Loftsson et al., 2005b	30
Figura 9	Fluxograma de extração e purificação do 4-NRC.....	46
Figura 10	Espectro de RMN 1H do 4-NRC ($CDCl_3/TMS/300MHz$).....	57
Figura 11	Espectro de RMN ^{13}C do 4-NRC ($CDCl_3/TMS/300MHz$).....	58
Figura 12	Espectro de massas de 4-NRC.	59
Figura 13	Cromatograma da fase móvel MeOH:ACN:TFA 0,1% 62:20;18 v:v:v obtido em CLAE-UV, coluna C18 (150 mm x 4,6 mm) com fluxo de 1,0 mL/ min.....	60
Figura 14	Cromatograma da injeção de metanol obtido em CLAE-UV, fase móvel: MeOH:ACN:TFA 0,1% 62:20:18 v:v:v , coluna C18 (150 mm x 4,6 mm) e fluxo de 1,0 mL/min.....	60

Figura 15	Cromatograma de solução aquosa de HP-β-CD, obtido em CLAE-UV, fase móvel: MeOH:ACN:TFA 0,1% 62:20:18 v:v:v, coluna C18 (150 mm x 4,6 mm) e fluxo de 1,0 mL/min.....	61
Figura 16	Cromatograma de solução metanólica de 4-NRC a 100 µg/mL, obtido em CLAE-UV, fase móvel: MeOH:ACN:TFA 0,1% 62:20:18 v:v:v, coluna C18 (150 mm x 4,6 mm) e fluxo de 1,0 mL/min.....	61
Figura 17	Cromatograma de 4-NRC em complexo de inclusão com HP-β-CD (solução aquosa) em CLAE-UV, fase móvel MeOH:ACN:TFA 0,1% 62:20:18 v:v:v, coluna C18 (150 mm x 4,6 mm) e fluxo de 1,0 mL/min.....	61
Figura 18	Curva de calibração para análise do 4-NRC no intervalo de concentrações de 3,0 a 100,0 µg/mL de 4-NRC em metanol referente à linearidade do método.	62
Figura 19	Cromatogramas das soluções da curva de calibração de 4-NRC em metanol, por CLAE-UV, com fase móvel: MeOH/ ACN/ TFA 0,1% 62:20:18 v:v:v, coluna C18 (150 mm x 4,6 mm) e fluxo de 1,0 mL/min, em λ=282 nm	63
Figura 20	Diagrama de solubilidade de fases de 4-NRC em solução aquosa em função das concentrações de HP-β-CD.....	67
Figura 21	Porção ascendente e linear do diagrama de solubilidade de fases...	68
Figura 22	Espectros de infravermelho de (a) HPβCD, (b) 4-NRC (c) Mistura física HPβCD:4-NRC (d) Complexo HP-β-CD: 4-NRC por malaxagem, (e) Complexo HP-β-CD: 4-NRC por liofilização.....	71
Figura 23	Termogramas de 4-NRC, do complexo HP-β-CD: 4-NRC por malaxagem, do complexo HP-β-CD: 4-NRC por liofilização, da mistura física de HP-β-CD:4-NRC e da HP-β-CD.....	73
Figura 24	Espectro de RMN ¹ H da HPβCD (D ₂ O/ 500MHz).....	77
Figura 25	Espectro de RMN ¹ H de 4-NRC (D ₂ O/ 500MHz).....	78
Figura 26	Espectro de RMN ¹ H do complexo de inclusão de 4-NRC: HP-β-CD obtido por liofilização (D ₂ O/ 500MHz).....	79
Figura 27	Espectro de RMN ¹ H do complexo de inclusão de 4-NRC:HP-β-CD obtido por malaxagem (D ₂ O/ 500MHz).....	80

Figura 28	Espectro de RMN ^1H da mistura física de 4-NRC:HP- β -CD (D ₂ O/500MHz)	81
Figura 29	Espectros de RMN ^1H do 4-NRC, complexos de inclusão de 4-NRC: HP- β -CD por liofilização e por malaxagem, mistura física 4-NRC: HP- β -CD e HP- β -CD. Em vermelho salienta-se as alterações dos hidrogênios da HP- β -CD, e em azul do 4-NRC.....	82
Figura 30	Varição de intensidade de absorbância de 4-NRC (Job's plot) em diferentes razões molares de 4-NRC:HP- β -CD.....	84

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Propriedades e características das ciclodextrinas.....	23
Tabela 1	Classificação dos testes, segundo sua finalidade.....	35
Tabela 2	Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade.....	36
Tabela 3	Deslocamentos químicos (em ppm) observados nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do 4-NRC experimental e da literatura (KIJOA, 1980, GUSTAFSON et al., 1992).....	56
Tabela 4	Coeficientes das equações lineares das soluções de calibração do 4-NRC (3,0 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em metanol).....	62
Tabela 5	Dados de precisão e exatidão analítica do 4-NRC por CLAE-UV.....	65
Tabela 6	Concentração máxima de 4-NRC dissolvido em presença de concentrações crescentes de HP- β -CD.....	66
Tabela 7	Constante de estabilidade (K) do complexo de inclusão de 4-NRC:HP β CD, determinada pelo estudo de solubilidade de fases.....	69
Tabela 8	Alterações dos sinais RMN ^1H (D_2O) de HP β CD e 4-NRC livres e no complexo de inclusão por liofilização. Onde $\Delta\delta = \delta_{\text{complexo}} - \delta_{\text{livre}}$; n.r.: não resolvido; n.d.: não determinado.....	75
Tabela 9	Varição dos valores de absorvância ultravioleta de 4-NRC em presença (A) e ausência (A_0) de HP- β -CD e $r =$ razão molar de 4-NRC, $R =$ razão molar de HP- β -CD e $\Delta A = A_0 - A$	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ΔA	Diferença de absorvância de 4-NRC em ausência e presença de HP- β -CD
$^{\circ}C$	Grau(s) Celsius
4-NRC	4-nerolidilcatecol
A	Absorvância ultravioleta 4-NRC em presença de HP- β -CD
A_0	Absorvância ultravioleta 4-NRC em ausência de HP- β -CD
ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CCD	Cromatografia de camada delgada comparativa
$CDCl_3$	Clorofórmio deuterado – fórmula molecular
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-UV	Cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado à detecção Ultravioleta
cm	Centímetro(s)
COSY	Correlation Spectroscopy
CV	Coeficiente de variação
<i>d</i>	Dubleto
D_2O	Óxido de deutério – fórmula molecular
Da	Dalton
DCM	Diclorometano
<i>dd</i>	Duplo dubleto
DOSY	Diffusion-ordered spectroscopy
DP	Desvio padrão
ETOH	Etanol
FTIR	Fourier transform infrared
HEX	Hexano
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HP- β -CD	Hidroxipropil- β -ciclodextrina
Hz	Hertz

ICH	International Conference on Harmonization ou Conferência Internacional de Normatização
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
ISO	International Standards Organization
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento
K	Constante de estabilidade
KBr	Brometo de potássio – fórmula química
<i>m</i>	Multiplete
MeOH	Metanol
mg	Miligrama (s)
min	Minuto (s)
mL	Mililitro (s)
mm	Milímetro (s)
mM	Milimolar
ng	nanogramas
nm	Nanômetros(s)
NMR	Nuclear magnetic resonance
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
p. e.	Por exemplo
<i>P. umbellata</i>	<i>Pothomorphe umbellata</i>
P.A.	Padrão Analítico
p/p	Peso/peso
ppm	Partes por milhão
PTFE	Politetrafluoretileno
R ²	Coeficiente de correlação linear
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
ROESY	Rotational Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
rpm	Rotações por minuto
s	Singleto

t	Tripleto
TA	Thermal analysis
TFA	Ácido trifluoroacético
TG	Termogravimetria
TMS	Tetrametilsilano
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-visível
v/v	Volume/volume
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
δ	Deslocamento químico
λ	Comprimento de onda
μg	Micrograma(s)
μL	Microlitro(s)
μm	Micrômetro(s)

SUMÁRIO

RESUMO.....	5
ABSTRACT	6
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE QUADROS E TABELAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	11
1. INTRODUÇÃO	18
1.1. A <i>Pothomorphe umbellata</i> e o 4-nerolidilcatecol.....	18
1.2. Ciclodextrinas e complexos de inclusão.....	21
1.2.1. Estrutura das ciclodextrinas.....	21
1.2.2. Propriedades das ciclodextrinas.....	23
1.2.3. Complexos de inclusão.....	25
1.2.4. Preparo de complexos de inclusão.....	27
1.2.5. Detecção da formação dos complexos de inclusão.....	28
1.2.6. Determinação da constante de equilíbrio ou estabilidade (K) do complexo de inclusão	30
1.2.7. Caracterização dos complexos de inclusão.....	31
1.2.7.1. Estequiometria dos complexos de inclusão	34
1.3. Validação da Metodologia Analítica para Quantificação de Drogas.....	35
1.3.1. Seletividade.....	37
1.3.2. Linearidade e intervalo de aplicação.....	37
1.3.3. Limite de Detecção e Quantificação.....	37
1.3.4. Precisão	38
1.3.5. Exatidão.....	38
1.3.6. Robustez.....	38
2. OBJETIVOS	40
3. MATERIAIS..E MÉTODOS	42
3.1. MATERIAIS.....	42
3.1.1. Reagentes e Soluções	42
3.1.2. Equipamentos.....	43
3.1.3. Material Botânico.....	44
3.2. MÉTODOS.....	44

3.2.1. Preparo do extrato bruto de <i>Pothomorphe umbellata</i> e isolamento do 4-NRC.....	44
3.2.1.1. Preparo do extrato bruto de <i>Pothomorphe umbellata</i>	44
3.2.1.2. Fracionamento do extrato bruto e isolamento do 4-NRC....	45
3.2.2. Validação da metodologia analítica de quantificação do 4-NRC por CLAE-UV.....	46
3.2.2.1. Seletividade	47
3.2.2.2. Linearidade	47
3.2.2.3. Limites de Detecção e Quantificação.....	48
3.2.2.4. Precisão e exatidão.....	48
3.2.2.5. Robustez.....	49
3.2.3. Preparo da Mistura Física.....	49
3.2.4. Preparo dos complexos de Inclusão.....	49
3.2.4.1. Liofilização.....	49
3.2.4.2. Malaxagem.....	50
3.2.5. Estudos de formação e estabilidade do complexo de inclusão do 4-NRC:HP- β -CD.....	50
3.2.5.1. Estudo de solubilidade de fases.....	50
3.2.5.2. Determinação da constante de estabilidade do complexo de inclusão 4-NRC:HP- β -CD.....	51
3.2.6. Análise e caracterização da mistura física e complexos de inclusão.	51
3.2.6.1. Espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier.....	51
3.2.6.2. Análise Térmica.....	51
3.2.6.3. Ressonância magnética nuclear.....	52
3.2.6.4. Determinação da estequiometria do complexo por espectrofotometria UV-Vis.....	52
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
4.1. Obtenção e fracionamento do extrato clorofórmico para isolamento e purificação do 4-NRC.....	54
4.2. Validação da metodologia analítica de quantificação do 4-NRC por CLAE-UV.....	60

4.2.1. Seletividade.....	60
4.2.2. Linearidade e intervalo de aplicação.....	62
4.2.3. Limite de Detecção e Quantificação.....	63
4.2.4. Precisão e Exatidão.....	63
4.2.5. Robustez.....	64
4.3. Estudos da formação e estabilidade do complexo de inclusão do 4-NRC em HP- β -CD.....	66
4.3.1 - Estudo de solubilidade das fases.	66
4.3.2. Determinação da constante de estabilidade (K) do complexo de inclusão 4-NRC:HP- β -CD.....	68
4.4. Análise e caracterização da mistura física e dos complexos de inclusão.	69
4.4.1. Espectrofotometria de Infravermelho.....	69
4.4.2. Análise Térmica.....	72
4.4.3. Ressonância Magnética Nuclear de ^1H	74
4.4.4. Determinação da estequiometria do complexo por espectrofotometria UV-Vis.	83
5. CONCLUSÕES.....	87
6. PERSPECTIVAS.....	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Pothomorphe umbellata* e o 4-Nerolidilcatecol

As plantas medicinais constituem importante recurso terapêutico no tratamento da saúde humana. São utilizadas tanto na conhecida medicina alternativa, que faz parte da cultura popular de vários países, como de matéria-prima para elaboração de medicamentos fitoterápicos ou extração de substâncias químicas farmacologicamente ativas (SIMÕES et al., 2004).

As grandes indústrias farmacêuticas, apesar da preferência pelo desenvolvimento de medicamentos pela via sintética, nas últimas décadas têm aumentado o interesse pelo potencial terapêutico das plantas medicinais (KOEHN e CARTER, 2005). Tal fato é comprovado pela evidência de que hoje cerca de 25% dos fármacos prescritos no mundo são obtidos direta ou indiretamente de plantas. Além disso, cerca de 49% dos medicamentos desenvolvidos entre 1981 a 2002 foram obtidos a partir de produtos naturais, ou análogos semi-sintéticos ou ainda moléculas sintéticas baseados em produtos naturais (KOEHN e CARTER, 2005).

Entre os medicamentos oriundos de plantas, podemos mencionar exemplos relevantes como a morfina (*Papaver somniferum*), a digoxina (*Digitalis lanata*), o paclitaxel (*Taxus brevifolia*), o quinino (casca da *Chinchona sp.*), a vincristina e a vinblastina (*Catharanthus roseus*), dicumarol (*Melilotus officinalis*), atropina (*Atropa belladonna*) dentre outros (GOTTLIEB e MORS, 1980; RATES, 2001). Dessa forma, na terapêutica moderna, as plantas medicinais fornecem o modelo molecular para a produção de substâncias biologicamente ativas ou passíveis de modificações e otimizações estruturais, que dão origem aos fármacos.

O Brasil, nesse contexto, é um país privilegiado, pois ocupa o primeiro lugar dentre os 17 países mais ricos do mundo em biodiversidade, detendo cerca de 23% do total de espécies existentes no planeta (RATES, 2001). A imensa variedade de espécies de plantas, animais e microrganismos existentes no ecossistema brasileiro, sem dúvida, representa um importante diferencial para o desenvolvimento de medicamentos. Mesmo assim, apenas pouco mais de 0,4% das 120 mil espécies de plantas genuinamente nacionais foram avaliadas quanto a seus constituintes químicos (KATO, 2001). Assim, à existência desta importante megabiodiversidade,

deve-se agregar tecnologia para transformação deste potencial em produtos acessíveis à população.

O gênero *Pothomorphe*, da família Piperaceae, foi estabelecido em 1840 por Miquel para representar cerca de dez espécies vegetais. No Brasil existem apenas duas espécies deste gênero: *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. e *P. peltata* (L.) Miq. A espécie *P. umbellata* (L.) Miq. (Figura 1) com sinonímia *Piper umbellata*, *Heckeria umbellata*, *Heckeria sidaefolia*, *Pothomorphe sidaefolia*, entre outros (MORAES et al., 1986-1987), é uma planta arbustiva, de crescimento rápido, de folhas grandes e cordadas com pecíolo inserido marginalmente em bainha alargada, na região do nó caulicular. Sua inflorescência é em forma de umbela de espigas com flores aclamídeas e protegidas por brácteas peltadas triangulares e marginalmente ciliadas (MORAES, 1986). Sua distribuição geográfica é espontânea desde a Amazônia até o sul do Brasil (YUNKER, 1973) ocorrendo com freqüência nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo e sul da Bahia (PECKOLT, 1941; RIEDEL, 1946).



Figura 1: Exemplos jovens de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. – Centroflora, São Paulo, maio de 2007.

Esta planta é conhecida como pariparoba, capeba, caapeba, caapeba-do norte, catajé, malvarisco, capeua, aguaxima, caapeba verdadeira, malvaíscio (PANIZZA, 1998), e tem sido utilizada na medicina popular para tratamento de várias doenças, destacando-se o emprego na disfunção hepática, bronquite asmática, como cicatrizante e antiinflamatório (de FEO, 1991), na epilepsia (COIMBRA e SILVA, 1958), como antipirético (DI STASI et al., 1993), e como repelente de insetos (CHARTOL, 1964). A Farmacopéia Brasileira (SILVA, 1926), ainda em sua primeira edição, preconizou a utilização das raízes de *P. umbellata* (L.) Miq. Atualmente, destaca-se o uso do extrato bruto de *P. umbellata* em formulação dermocosmética com ação fotoprotetora na prevenção de formação de rugas (ROPKE et al., 2005).

Das raízes de *P. umbellata* isolou-se o 4-nerolidilcatecol (4-NRC) (Figura 2) como constituinte majoritário (KIJOA et al., 1980), um fenilterpenóide de biossíntese mista de cor amarelo ouro e aspecto oleoso, com $\alpha_D = +3,3^\circ$ (CH_2Cl_2 , c 3,9) (GUSTAFSON et al., 1992).

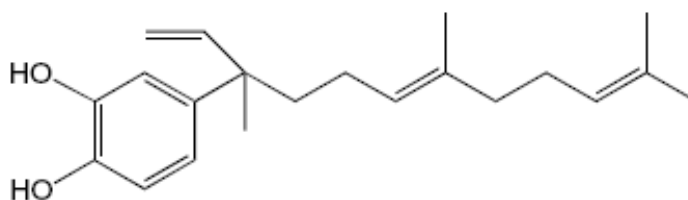


Figura 2- Estrutura do 4-nerolidilcatecol

Tanto *in vitro* (BARROS et al., 1997) quanto *in vivo* (ROPKE, 2003) o 4-nerolidilcatecol exibe atividade antioxidante superior ao α -tocoferol, indicando-o como potencial fármaco para condições patológicas onde ocorra participação do estresse oxidativo (BARROS et al., 1997; DESMACHELIER et al., 1997a; DESMACHELIER et al., 1997b). Destaca-se ainda a ação antimalárica (AMORIM et al., 1988). Outras propriedades farmacológicas incluem a ação analgésica (BIOKA e ABENA, 1990; PERAZZO et al., 2005), antiinflamatória (BARROS, 2005; PERAZZO et al., 2005), tranqüilizante (BERNARD e TIELI, 1978), ação fotoprotetora (ROPKE et al., 2005, 2006), ação antimicrobiana (MONGELLI et al., 1995) e citotóxica (MONGELLI et al., 1999). Estudos prévios, não demonstraram potencial mutagênico em *Salmonella typhimurium*, ou mutagênese micronuclear em eritrócitos, nem tampouco toxicidade oral (BARROS, 2005), além de possuir efeito protetor na genotoxicidade induzida por ciclofosfamida (VALADARES, et al., 2007).

No entanto, a viabilidade terapêutica ou mesmo a avaliação da biodisponibilidade deste catecol é limitada por suas propriedades físico-químicas desfavoráveis, especialmente sua baixa solubilidade em água (3 µg/mL), coeficiente de partição ($\log P = 6,997 \pm 0,37$) e baixa estabilidade frente a luz. Estudos prévios (REZENDE e BARROS, 2004) demonstraram a solubilização de até 2,5 mg/mL em solução de HP- β -CD a 30% (p/v) tornando esta molécula bastante atrativa quanto às possibilidades de manipulações tecnológicas e potencial terapêutico.

1.2. Ciclodextrinas e Complexos de Inclusão

O interesse pelas ciclodextrinas (CDs) tem aumentado exponencialmente nos últimos anos, demonstrado pelo grande número de publicações científicas que, até março de 2007, chegava à 39679. Grande parte destas publicações refere-se à sua capacidade em aumentar a solubilidade aquosa de fármacos, favorecendo sua dissolução nos líquidos biológicos e conseqüentemente melhorando sua absorção (BREWSTER e LOFTSSON, 2007).

1.2.1. Estrutura das ciclodextrinas

As CDs são oligossacarídeos cíclicos naturais constituídos de 6 ou mais unidades glicopiranosídicas unidas entre si por ligações do tipo α (1→4). As mais conhecidas são alfa, beta e gama (α , β e γ) ciclodextrinas, constituídas por 6, 7 ou 8 unidades de glicose, respectivamente (Figura 3) (DAVIS e BREWSTER, 2004). Elas foram isoladas pela primeira vez em 1891, por Villiers, como subprodutos de degradação do amido por *Bacillus amylobacter*, através da ciclodextrinaglicosil-transferase (CGT). Os produtos resultantes desta degradação foram denominados celulosinas, porque lembravam a celulose devido às propriedades não-redutoras. No entanto, foi Frank Schardinger, entre 1903 e 1911, que descreveu detalhes da preparação e as propriedades dos compostos (SZEJTLI, 1998).

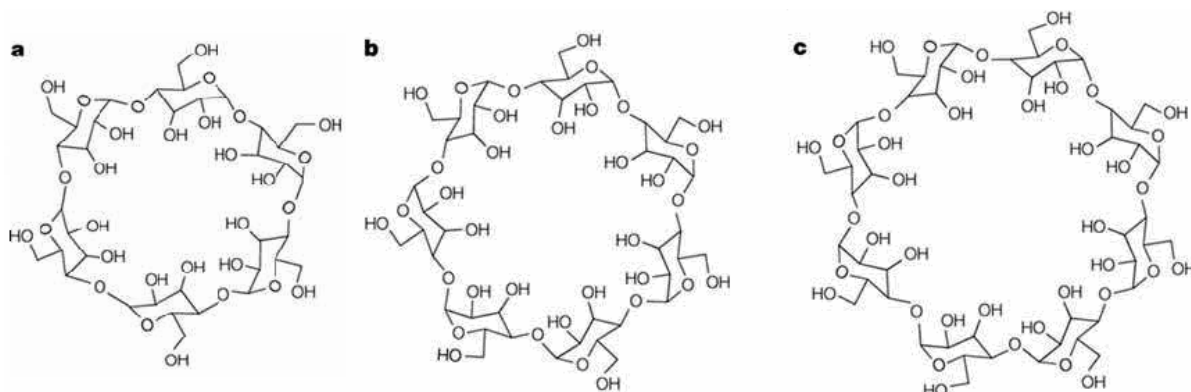


Figura 3- Estruturas das α - (a), β - (b) e γ - (c) ciclodextrinas, adaptado de DAVIS e BREWSTER, 2004.

Estruturalmente as ciclodextrinas apresentam-se como um cone invertido (Figura 4), formando uma cavidade, cujo tipo e dimensão são determinados pelo número de unidades de glicose constituintes (Figura 5). Nesta estrutura, as hidroxilas secundárias situadas nos carbonos C2 e C3, estão localizadas na base superior, enquanto as hidroxilas primárias em C6 na base inferior. Os hidrogênios H1, H2 e H4 situam-se na superfície externa da ciclodextrina, enquanto a cavidade é delineada pelos hidrogênios H3 e H5 e pelos oxigênios glicosídicos. Devido à posição das hidroxilas, a superfície externa da CD adquire um caráter hidrofílico, enquanto a cavidade interna apresenta caráter hidrófobo, resultante das ligações C-C e da alta densidade eletrônica produzida pelos pares de elétrons não-ligantes dos oxigênios glicosídicos (SZEJTLI, 1998).

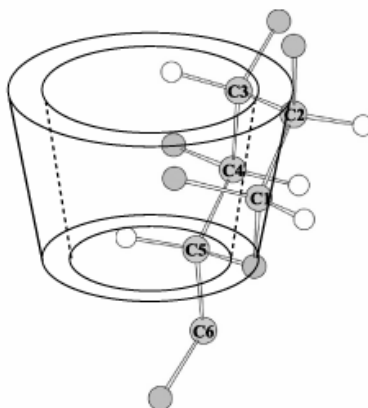


Figura 4. Representação esquemática da estrutura tridimensional das CDs, mostrando as características estruturais definidas pelo arranjo das unidades de glicose, adaptado de BRITO et al., 2004.

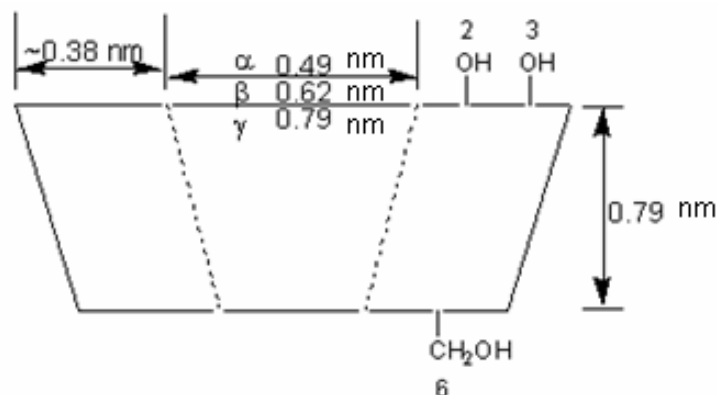


Figura 5 – Dimensões geométricas (nm) aproximadas de α -, β - e γ -ciclodextrinas, adaptado de JINDRICH, 2007.

1.2.2. Propriedades das ciclodextrinas

As ciclodextrinas apresentam propriedades físico-químicas únicas como consequência de seus fatores estruturais. Algumas propriedades estão listadas no quadro 1 (SILVA, 1996). Destacando-se a propriedade mais importante que é a habilidade em formar complexos de inclusão com uma variedade de moléculas.

Quadro 1. Propriedades e características das ciclodextrinas, adaptado de CEREDA, 2003.

Propriedades	α -CD	β -CD	γ -CD
Unidades de glicose	6	7	8
Massa molecular	972	1135	1297
Solubilidade em água (g/100mL) 25°C	14,5	1,85	23,2
Diâmetro da cavidade (mm)	0,47-0,53	0,60-065	0,75-0,83
Volume da cavidade (nm ³)	0,176	0,346	0,510
Ponto de fusão (°C)	275	280	275

No geral, as CDs são estáveis em soluções alcalinas, embora susceptíveis à hidrólise ácida (temperatura acima de 60°C e pH menor que 3,5) resultando em glicose e glicosídeos acíclicos (LI et al., 1992). São moderadamente ou pouco solúveis em água, metanol e etanol e, facilmente solúveis em solventes

polares apróticos, como o dimetilsulfóxido (DMSO). Curiosamente, a β -CD apresenta solubilidade em soluções aquosas inferior às outras duas CDs (SZEJTLI, 1998). A explicação para a baixa solubilidade em água da β -CD é que as hidroxilas secundárias dos carbonos C2 e C3 formam ligações hidrogênio entre si, gerando um “cinturão eletrônico” e uma estrutura rígida, o que não ocorre na α -CD, onde se formam apenas 4 das 6 ligações hidrogênio possíveis e na γ -CD, devido a estrutura não-coplanar mais flexível aumentar a solubilidade aquosa (MICARONI, 1994; SZEJTLI, 1998).

As CDs têm se tornado uma ferramenta padrão durante a etapa de desenvolvimento farmacotécnico de novas formulações, tanto do ponto de vista toxicológico quanto mecanístico, pois estas solubilizam drogas numa função linear, enquanto os solventes orgânicos o fazem em função log linear, ou seja, o poder de solubilização de uma formulação em solventes orgânicos logo se perde.

Biologicamente, as CDs naturais não apresentam toxicidade após administração oral e tópica, visto que, devido ao tamanho molecular (1000 – 2000 Da) e à característica hidrofílica não são absorvidas pela mucosa do trato gastrointestinal e pele. Elas não são metabolizadas por enzimas humanas, mas podem ser hidrolisadas pela microflora presente no reto. Porém, podem ser tóxicas quando administradas por via parenteral devido à sua capacidade de interação com a membrana plasmática das células, removendo colesterol e fosfolípidos, provocando hemólise, além de nefrotoxicidade, causada por sua deposição nos túbulos contorcidos proximais, onde provoca vacuolização citoplasmática e destruição celular (IRIE e UEKAMA, 1996; BREWSTER e LOFTSSON, 2007).

Diversos derivados das ciclodextrinas naturais foram desenvolvidos no intuito de melhorar suas características físico-químicas e biológicas. Atualmente, o grupo de derivados mais utilizados são as ciclodextrinas hidroxialquiladas. A hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) (Figura 6) é resultante da reação entre a β -ciclodextrina e o óxido de propileno (PITHA, 1986). Comparativamente ao seu precursor natural β -CD, a HP- β -CD apresenta maior solubilidade em água (superior a 50 g/100mL de água a 25°C). Isso se deve à quebra das ligações hidrogênio entre as hidroxilas secundárias da CD natural, promovida pela adição de grupamentos hidroxipropil. A HP- β -CD também apresenta redução da toxicidade parenteral, o que viabiliza sua utilização em formulações intravenosas (ARCHONTAKI, VERTZONI e

ATHANASSIOU-MALAKI, 2001; GOULD e SCOTT, 2005) sendo, portanto, a representante mais amplamente utilizada pela indústria farmacêutica.

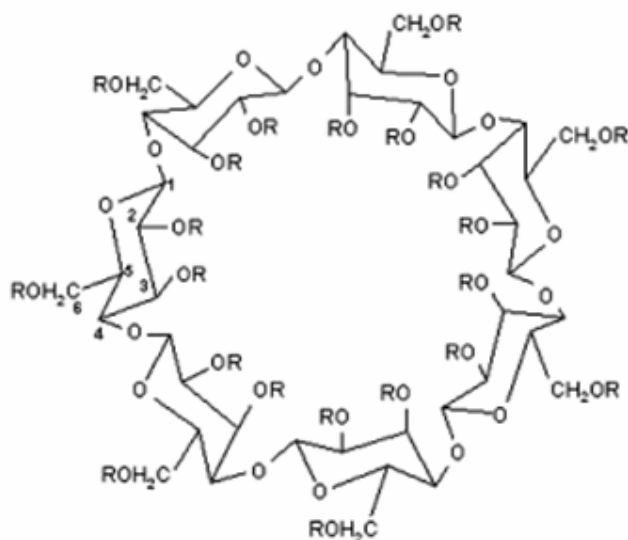


Figura 6 - Estrutura química da HP-β-CD. R= -CH₂CHOHCH₃ ou -H

1.2.3. Complexos de inclusão

Complexos de inclusão são formas de arranjos químicos supramoleculares nos quais uma molécula (hóspede) é incluída dentro de outra molécula (hospedeira), resultando em uma associação estável.

Devido ao caráter hidrofílico da superfície exterior, as ciclodextrinas podem se dissolver na água ao mesmo tempo em que disponibilizam uma cavidade apolar (lipofílica) capaz de formar complexos de inclusão com vários tipos de moléculas hóspedes, geralmente apolares ou pouco solúveis em água, resultando em uma associação estável (SINGH, et al., 2002; DAVIS e BREWSTER, 2004). Apenas as moléculas ou grupos funcionais de moléculas com dimensões adaptáveis à cavidade das ciclodextrinas e com caráter apolar apresentam capacidade de inclusão nesta cavidade. (MARTIN et al., 1993; LOFTSSON et al., 2002). A ciclodextrina promove o aprisionamento de substâncias sem formação de ligações covalentes. A molécula inclusa pode estar totalmente ou parcialmente contida na

cavidade, sendo a ligação entre elas não permanente e submetida a um equilíbrio dinâmico (KRISTMUNDSTÓTTIR et al., 1996).

O mecanismo de formação de complexos (Figura 7) pode ser descrito da seguinte forma: em solução aquosa, a cavidade hidrofóbica da CD é ocupada por moléculas de água, resultando em um ambiente termodinamicamente desfavorável (interações polar-apolar), a presença de uma molécula menos polar (hóspede) na solução expulsa as moléculas de água e ocupa a cavidade da CD.

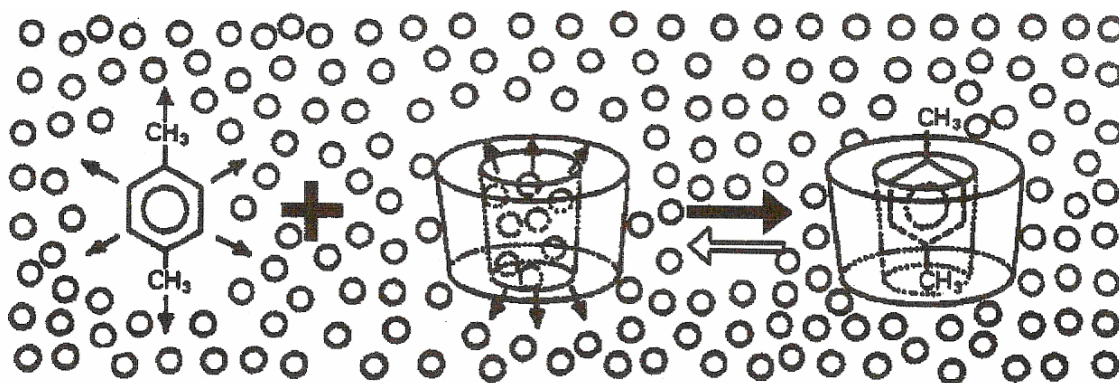


Figura 7- Representação esquemática da formação de um complexo de inclusão de uma ciclodextrina com *p*-xileno em solução aquosa (os círculos representam moléculas de água), adaptado de CEREDA, 2003.

Na formação do complexo, a energia termodinâmica envolvida no processo não demanda nenhuma quebra de ligação (SCHNEIDERMAN e STALCUP, 2000). Geralmente as forças de ligação mais importantes envolvidas são interações de van der Waals, interações dipolo-dipolo induzidas, forças de dispersão de London e ligações de hidrogênio entre a molécula hóspede e a ciclodextrina (SZEJTLI, 1998; LIU e GUO, 2001).

Biologicamente, as ciclodextrinas podem funcionar como carreadores de fármacos que mantêm tais moléculas em solução liberando-as na membrana biológica (MÁSSON et al., 1999).

Assim, a formação deste complexo de inclusão, entre um substrato (hóspede) pouco solúvel em água e uma CD em solução aquosa, pode acarretar:

- Elevação da taxa de dissolução e/ou biodisponibilidade de substâncias, principalmente aquelas denominadas, segundo a Classificação Biofarmacêutica de Fármacos, classes II (baixa solubilidade/alta permeabilidade) e IV (baixa

solubilidade e permeabilidade) (CHOW e KARARA, 1986; PITHA et al., 1986; BLANCO et al., 1991; AMIDON et al., 1995; DAVIS e BREWSTER, 2004; RAJEWSKI e STELA, 2001; LOFTSSON et al., 2005a);

- Elevação da estabilidade química de substâncias susceptíveis à hidrólise, fotólise, desidratação (ANDERSEN e BUNGARD, 1984; LOFTSSON e BREWSTER, 1996),
- Isomerização e estabilização de peptídeos (LOFTSSON et al., 1989) e papel crioprotetor para fármacos submetidos à “freeze-drying”;
- Aplicação cromatográfica na resolução óptica de racematos (IRIE e UEKAMA, 1997; SCHENEIDERMAN e STALCUP, 2000);
- Aplicação na indústria alimentícia, reduzindo a evaporação e estabilizando o aroma, mascarando o sabor e removendo o colesterol (LIU, et al., 2000; DAVIS e BREWSTER, 2004);
- Aplicação na área de cosméticos e em alguns itens de higiene pessoal como carreadores de tocoferóis (UEKAMA, 1988).

Enfim, como resultado da formação de complexos com CDs, as propriedades características da substância incluída, tais como a solubilidade, e reatividade química são freqüentemente modificadas.

Comercialmente, mais de 35 fármacos são atualmente produzidos nas indústrias farmacêuticas na forma de derivados complexados com HP- β -CD (DAVIS e BREWSTER, 2004) com o intuito de aumentar a solubilidade em água, melhorar a biodisponibilidade ou, a estabilidade desses fármacos. Como exemplo cita-se o supositório de cisaprida (Propulsid[®]), a hidrocortisona oral (Dexocort[®]), o colírio de indometacina (Indocid[®]), o itraconazol oral e intravenoso (Sporanox[®]) (MIYAKE et al., 1999), dentre outros.

1.2.4. Preparo de complexos de inclusão

Não existe um método universal de preparação dos complexos de inclusão. Existem vários, e estes são escolhidos de acordo com o rendimento, a simplicidade e a rapidez (HEDGES, 1998).

Os complexos de inclusão podem ser formados em fase líquida, semi-sólida e sólida. Em fase líquida pode-se utilizar para o preparo do complexo a coprecipitação, a neutralização, a liofilização. Já em fase semi-sólida há a possibilidade de fazer a malaxagem, enquanto a moagem é feita para a fase sólida (HIRAYAMA e UEKAMA, 1987; MARTIN, 1993). Dentre esses métodos, é bastante utilizada a liofilização e a malaxagem.

A liofilização consiste em preparar uma solução de ciclodextrinas com a substância hóspede em quantidades estequiométricas, deixá-las em agitação até atingir o equilíbrio de solubilidade. A solução é filtrada, congelada e liofilizada. Este método já foi utilizado em diversos trabalhos, obtendo-se ótimos resultados, dentre eles cita-se a complexação de warfarina (ZINGONE e RUBESSA, 2005) e colesterol com β -CD (WILLIAMS et al., 1998), de ácido ursodeosílico com HP- β -CD (VANDELLI et al., 1995), de nicardipina (FERNANDES et al., 2002), sulfametoxazol (POSE-VILARNOVO et al., 2001) e tolbutamida com β - e HP- β -CD (VEIGA et al., 1996) e entre outros.

Na malaxagem a substância hóspede é adicionada a uma solução concentrada de CD e misturadas até a obtenção de uma pasta que é então seca. O processo é rápido e barato, porém tem o inconveniente de não garantir a obtenção do complexo de inclusão puro. Devido à praticidade, vários estudos foram desenvolvidos utilizando essa técnica, cita-se entre eles: complexação de furosemida com HP- β -CD (SPAMER et al., 2002), de cetoconazol com CDs (TANERI et al., 2003), de triantereno com β -CD (MUKNE e NAGARSENKER, 2004), dentre outros.

1.2.5. Detecção da formação dos complexos de inclusão

A detecção da formação de complexos é realizada pelo método de solubilidade de fases, descrito por Higuchi e Connors, 1965. Este método fundamenta-se nas alterações da solubilidade da molécula hóspede frente à adição de ciclodextrinas em concentrações crescentes. As diferentes amostras são submetidas à agitação e, após ter sido alcançado o equilíbrio da solubilidade da molécula hóspede, são filtradas. Os valores de concentração da molécula hóspede são representados graficamente em função das concentrações de ciclodextrina,

gerando o diagrama de solubilidade de fases, (Figura 8), segundo Higuchi e Connors (1965).

Conforme o gráfico obtido classifica-se o complexo em A (complexo solúvel em água) ou B (complexo com solubilidade aquosa limitada). O diagrama do tipo A indica que a solubilidade da molécula hóspede aumenta com as concentrações crescentes da ciclodextrina, enquanto o diagrama tipo B indica a formação de um complexo de solubilidade limitada e inferior à da ciclodextrina.

No diagrama do tipo A podem ser observados vários comportamentos, sendo classificados como A_L , A_P e A_N (Figura 8).

O tipo A_L é caracterizado por um aumento linear da solubilidade da molécula hóspede (H) em relação à CD, indicando complexos solúveis de composição constante.

O tipo A_P apresenta um desvio positivo da linearidade, sugerindo a formação de complexos de maior ordem molecular, em relação à CD, onde mais de uma CD se complexa com a molécula hóspede ($H-CD$, $H-CD_2$, $H-CD_3$). Tal fato indica, neste caso, que o solubilizante é mais eficiente em maiores concentrações.

O tipo A_N é semelhante ao A_P , porém apresenta um desvio negativo da linearidade (*i.e.* a CD é proporcionalmente menos eficiente em maiores concentrações), refletindo o estabelecimento de interações soluto-soluto, soluto-solvente (HIGUCHI e CONNORS, 1965).

No diagrama do tipo B observam-se dois comportamentos: tipo B_S e o tipo B_i . No tipo B_S , observa-se que a solubilidade do complexo aumenta até atingir seu limite, representada pelo ponto *a* no diagrama de solubilidade (Figura 8). No ponto *b* mostra que toda a molécula hóspede foi consumida. A partir deste ponto, se houver aumento na concentração de CD, acarretará a precipitação do complexo sólido. Já no tipo B_i , o complexo de inclusão é praticamente insolúvel, o que justifica a ausência da parte inicial da curva de solubilidade (HIGUCHI e CONNORS, 1965).

A distinção entre o diagrama do tipo B_S e o do tipo A, pode ser feita mediante a observação da quantidade de molécula hóspede consumida. No diagrama do tipo B, quando toda esta é consumida, ocorre a precipitação do complexo. Já no tipo A, a solubilização é crescente até atingir a solubilidade máxima da droga adicionada e quando isso ocorre pode ser observada a formação de um platô, porém sem a ocorrência de precipitação (BREWSTER e LOFTSSON, 2007).

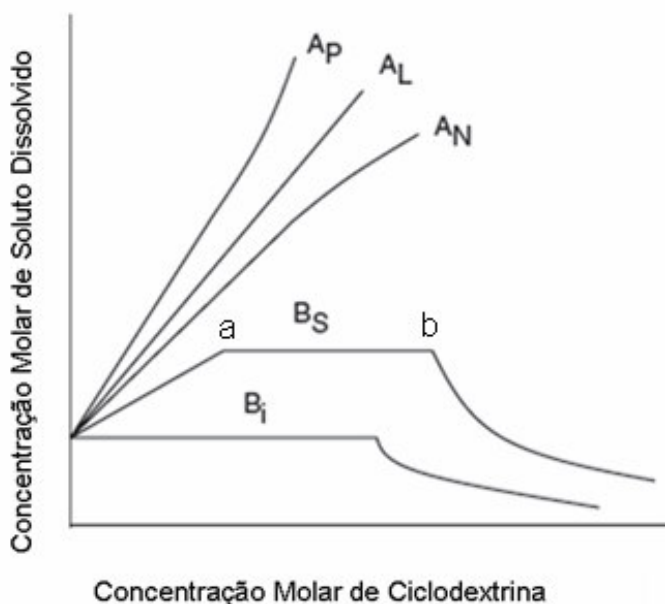


Figura 8 – Diagrama de solubilidade de fases e classificação dos complexos de acordo com Higuchi e Connors, (1965) (A_P - aumento positivo de solubilidade; A_L - aumento linear de solubilidade; A_N - aumento de solubilidade com desvio negativo; B_S - aumento limitado da solubilidade; B_I - redução de solubilidade com complexo insolúvel, a- solubilidade limite do complexo, b-consumo final soluto), adaptado de Loftsson et al., 2005b.

1.2.6. Determinação da constante de equilíbrio ou estabilidade (K) do complexo de inclusão

Um complexo de inclusão em solução encontra-se em equilíbrio cinético ou termodinâmico com as moléculas livres. Este equilíbrio é descrito como a constante de estabilidade ou equilíbrio (K) e pode ser quantificado. Conhecer tal valor é crucial, pois assim se obtêm um índice que reflete a mudança das propriedades físico-químicas que resultam da ligação hóspede-hospedeiro (BREWSTER e LOFTSSON, 2007).

Vale ressaltar que os complexos de inclusão com ciclodextrinas não são permanentes, pois não são formadas ligações covalentes entre o ligante e o substrato. Assim, o que determina se um complexo formado é estável, ou não, é a sua constante de estabilidade ou ainda, sua constante de dissociação.

Os métodos utilizados para a determinação da K, baseiam-se em modificações em propriedades físicas ou químicas da substância hóspede na presença da CD, como solubilidade, reatividade química, absorvidade molar, pKa, tempo de retenção em CLAE (HIRAYAMA e UEKAMA, 1987), dentre outros.

No método cinético, é observada a velocidade de degradação da substância hóspede em presença de CD, é obtido um gráfico que fornece dados para o cálculo de K (BREWSTER E LOFTSSON, 2007).

Também são utilizados métodos espectrofotométricos e espectroscópicos, onde as mudanças de absorbância, absorvidade molar, deslocamentos químicos observadas na presença de CD são utilizadas em equações específicas como de Benesi-Hildebrand, fornecendo o valor de K (BREWSTER e LOFTSSON, 2007).

A constante de estabilidade pode ainda ser determinada pelo método potenciométrico, que avalia os efeitos da complexação no pKa da substância hóspede ou por CLAE, onde serão observadas mudanças no tempo de retenção da substância hóspede. As alterações observadas são aplicadas em equações específicas que determinam o valor de K (HIRAYAMA e UEKAMA, 1987; BREWSTER E LOFTSSON, 2007)

Dentre estes métodos, privilegia-se o estudo de solubilidade de fases, descrito no item anterior, onde se utiliza a parte ascendente e linear do diagrama de solubilidade, para a obtenção da equação linear que fornece dados utilizados no cálculo da K.

1.2.7 Caracterização dos complexos de inclusão

A caracterização de complexos de inclusão pode ser realizada por diversos métodos que se baseiam em alterações físico-químicas tanto da molécula incluída quanto da molécula de ciclodextrina (HIRAYAMA e UEKAMA, 1987).

Dentre as técnicas utilizadas para a caracterização dos complexos as mais utilizadas são (HIRAYAMA e UEKAMA, 1987; LOFTSON, 2002):

- *Espectrofotometria ultravioleta-visível (UV-Vis)*: Através dessa técnica são observadas alterações nos espectros de absorção UV-Vis das moléculas hóspedes, ocorrendo geralmente um deslocamento batocrômico e/ou alargamento

das bandas. Essa metodologia foi utilizada em alguns estudos de formação de complexos, como no trabalho de Ashnagar e col. (2007) na complexação de imipramina em β -ciclodextrina.

- *Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)*: O avanço das técnicas de RMN nos últimos anos possibilitou a melhor elucidação estrutural das ciclodextrinas e de seus complexos. A técnica de RMN ^1H baseia-se em alterações nos deslocamentos químicos dos hidrogênios localizados na cavidade das CD (H3 e H5), com pouca ou nenhuma alteração nos hidrogênios da superfície (H1, H2 e H6). Também são analisadas as mudanças nos deslocamentos químicos dos hidrogênios da molécula hóspede, sugerindo assim qual parte desta está interagindo com a CD (SCHNEIDER et al., 1998). As técnicas de ressonância magnética nuclear bidimensionais como NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy), ROESY (Rotating Frame Overhauser Effect Spectroscopy) e DOSY (Diffusion-Ordered Spectroscopy), também são importantes para a determinação estrutural do complexo de inclusão. Grande número dos estudos de formação de complexos utiliza a técnica de RMN na caracterização dos produtos obtidos, *p.e.* a complexação de progesterona em HP- β -CD (TORRI et al., 2007) e a complexação de piroxicam (ROZOU et al., 2004) e diclofenaco (ABDOH et al., 2007) com diversas CDs.
- *Análise Térmica*: A inclusão de moléculas hóspedes na cavidade das CDs provoca alterações nos eventos térmicos da substância hóspede. Observa-se aumento nas temperaturas de fusão, ebulição e sublimação, ou de degradação da substância. Técnicas como a calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria (TG) e análise térmica diferencial (DTG) são bastante utilizadas nos estudos de complexação (VIANNA et al., 1998). Na técnica de DSC, mede-se a diferença de energia fornecida à substância e a um material de referência em função da temperatura, enquanto a substância e a referência são submetidas a uma programação controlada de temperatura (VYAZOVKIN, 2002). A inclusão de uma molécula na cavidade da CD acarreta um aumento nas temperaturas de fusão e ebulição das substâncias. Já a técnica de TG, permite acompanhar por meio de uma termobalança as variações de massa (perda ou ganho de massa) sofridas pela amostra em função da temperatura e/ou tempo, enquanto a amostra

é submetida a uma programação controlada de temperatura. Quando ocorre a formação do complexo, a temperatura de decomposição térmica da substância complexada deixa de ser observada no mesmo ponto onde ocorria com a substância pura (CANOTILHO et al., 1992). A DTG leva às mesmas informações que a TG, porém com acréscimo de resolução pois registra a velocidade da alteração da massa (CANOTILHO et al., 1992). Como exemplos desses estudos citam-se a complexação de pirimetamina (ARAÚJO et al., 2007), de meloxicam e nimesulida (NALLURI et al., 2005) e de complexação de naproxeno (MURA et al., 2005) com HP- β -CD.

- *Difração de Raios-X*: a observação de mudanças nos difratogramas dos complexos e substâncias isoladas permite detectar e conhecer a estrutura do complexo formado. Porém, a principal limitação desta técnica relaciona-se à dificuldade de obtenção de um complexo monocristal (BEKERS et al., 1991; CONNORS, 1997). Essa técnica foi utilizada no trabalho de Manosroi e col. (2005) na formação do complexo de ácido azeláico e HP- β -CD e na complexação de 3-hidroxi-flavona com α - e β -CDs (CALABRO et al., 2004).
- *Espectrofotometria na região do Infravermelho (IV)*: é utilizada para avaliar as interações que se estabelecem entre a molécula hóspede e a ciclodextrina. A interação da molécula hóspede com as CD provoca alterações nas frequências vibracionais na região do infravermelho das substâncias, geralmente com desaparecimento de algumas bandas (CALABRO et al., 2004). Quando não há a interação entre as moléculas, as bandas continuam com as mesmas características das substâncias isoladas (HIRAYAMA e UEKAMA, 1987). A técnica de IV é bastante utilizada em estudos de complexos de inclusão, como no trabalho de Liu e Zhu, (2006) para o complexo de inclusão de prazosina e β - e HP- β -CD e o trabalho de Bertacche e col. (2006) na inclusão de resveratrol em diversas ciclodextrinas.
- *Microscopia Eletrônica de Varredura*: técnica utilizada para o estudo da morfologia dos complexos de inclusão sólidos. Como o estado cristalino do complexo é diferente de uma simples mistura física, pode-se detectar a formação do complexo (MURA et al., 2003). Essa técnica foi utilizada no estudo do

complexo de quercetina com β - e HP- β -CD (PRALHAD et al., 2004), de β -bloqueadores e β -CD (FICARRA et al., 2000) e de nicardipina com diversas CDs (FERNANDES et al., 2002).

- *Modelagem Molecular*: técnica computacional que permite obter informações sobre a geometria e a estrutura dos complexos de inclusão formados entre uma CD e um fármaco (LIPKOWITZ, 1998). Essa técnica foi utilizada nos trabalhos de complexação de praziquantel e β -CD (JESUS et al., 2006), ácido retinóico e diclofenaco com diversas CDs (YAP et al., 2005; ABDON et al., 2007).

1.2.7.1. Estequiometria dos complexos de inclusão

A proporção estequiométrica mais comumente encontrada nos estudos de formação de complexos com CDs é de 1:1, onde uma molécula hóspede está interagindo com uma molécula de CD. Porém, quando uma molécula é suficientemente longa ou a cavidade da CD é muito pequena, mais de uma molécula de CD poderá interagir com a molécula hóspede, formando complexos de maior ordem molecular, *p.e.* 1:2, 1:3, 2:2, 2:3. Em casos de CDs com cavidade mais larga ou moléculas hóspedes de baixo peso molecular, poderá ocorrer a inclusão de duas ou mais moléculas hóspedes na cavidade da CD, formando complexos com proporções estequiométricas de 2:1, 3:1 etc (HIRAYAMA e UEKAMA, 1987).

A estequiometria de complexos de inclusão pode ser obtida por meio do método de variação contínua, também conhecido como método “Job’s plot”, desenvolvido por Job (1928). Esse método baseia-se na variação de um parâmetro físico-químico da substância de interesse (*p.e.* absorvância de luz UV-Vis, deslocamentos químicos de C e H, etc), que possa ser observado tanto na presença quanto na ausência da ciclodextrina, de modo que tal característica seja mensurável por técnicas espectroscópicas ou espectrofotométricas, como RMN, fluorescência ou ultravioleta, dentre outras.

Essa técnica foi utilizada na determinação da estequiometria de complexos de inclusão de diversas substâncias como haloperidol (LOUKAS et al., 1997); sulfametizol (POSE-VILARNOVO et al., 2001); tolbutamida (VEIGA et al.,

2001); carotenóides (POLYAKOV et al., 2004a); um inibidor sintético de metaloproteinases (PASCAL, 2005), β -ionona (POLYAKOV et al., 2004b); ácido níflúmico (TEREKHOVA et al., 2006); s(-) bupivacaína (MORAES et al., 2007), benzocaína (PINTO et al., 2005) bromoadamantano (IVANOV et al., 1996), ropivacaína (FRACETO et al., 2007) entre outros, fornecendo ótimos resultados.

1.3. Validação de Metodologia Analítica de Quantificação de Fármacos

A validação de metodologias é a avaliação sistemática de um procedimento analítico visando garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Metodologias analíticas devem ser validadas por várias razões, sejam elas técnicas ou comerciais, sempre que maior acreditação ou qualidade dos dados gerados são desejadas. No Brasil, a ANVISA e o INMETRO são as agências responsáveis pelo credenciamento de laboratórios. No âmbito internacional, sociedades como: International Conference on Harmonization (ICH), International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) e International Standards Organization (ISO) organizaram guias com testes, recomendações, requerimentos e parâmetros mínimos de avaliação de métodos na tentativa de harmonizar diferenças nas aplicações farmacêuticas entre os vários segmentos da sociedade, como representantes das indústrias e agências reguladoras dos EUA, Europa e Japão.

O desenvolvimento e a validação de métodos analíticos devem ser conduzidos de modo a atender às características e peculiaridades de cada caso e situação. Desenvolver um método para doseamento de uma substância traço é bastante diferente da identificação de ativos ou componentes majoritários de uma mistura. Assim, as características a serem estudadas e a metodologia a aplicar variam em função do tipo de procedimento a validar. Esses procedimentos, ou testes, são classificados segundo a sua finalidade em 4 categorias (BRASIL, 2003), conforme a tabela 1, e para cada categoria é sugerido um conjunto de testes, relacionados na tabela 2.

Tabela 1. Classificação dos testes, segundo sua finalidade. Fonte: BRASIL (2003).

Categoria	Finalidade do teste
I	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas
II	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas
III	Testes de performance (<i>p.e.</i> dissolução, liberação do ativo)
IV	Testes de identificação

Tabela 2. Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade. Fonte: BRASIL (2003).

Parâmetro	Categoria	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
	I	Quantitativo	Ensaio limite		
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão intra-dia	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Precisão inter-dia	**	**	Não	**	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

* pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

** não é necessária se houver comprovação da reprodutibilidade.

A validação para métodos cromatográficos de ensaio de quantificação enquadra-se na categoria I das diretrizes da ANVISA para guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos (BRASIL, 2003). Assim, os parâmetros de desempenho analítico sugeridos para a validação desse método compreendem: seletividade, linearidade, intervalo, precisão, exatidão e robustez (BRASIL, 2003; RIBANI et al., 2004).

1.3.1. Seletividade

A seletividade ou especificidade demonstra a capacidade do método de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação (RIBANI et al., 2004). Pode ser demonstrada comparando os resultados dos testes de amostras contendo impurezas ou produtos de degradação, ou ainda através do placebo, com valores encontrados após análise da amostra sem os interferentes.

1.3.2. Linearidade e intervalo de aplicação

A linearidade permite avaliar se os resultados possuem uma proporção direta às concentrações das substâncias em estudo dentro de um intervalo de aplicação (BRASIL, 2003). Este atributo da validação pode ser estabelecido pela confecção de uma curva padrão. Havendo uma relação linear, os resultados da análise devem ser avaliados com base em apropriados métodos estatísticos, como o método dos quadrados mínimos.

1.3.3. Limite de Detecção e Quantificação

O limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas.

O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003).

1.3.4. Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Podendo ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%) de uma série de medidas e valores superiores a 5% não são geralmente tolerados (BRASIL, 2003). Esta pode ser avaliada em dois níveis:

- Repetibilidade (precisão intra-dia ou intra-ensaio): representa a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação.
- Precisão intermediária (precisão inter-dia ou inter-ensaio): representa a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes.

1.3.5. Exatidão

A exatidão de um método analítico representa a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro, ou seja a porcentagem da razão entre as concentrações experimentais médias e as nominais do analito, segundo RE 899 ANVISA.

Outra maneira de expressar a exatidão do método é através do erro sistemático ou tendência, que corresponde à diferença entre o valor obtido e o aceitável como referência, podendo ser determinada pela razão entre a diferença da concentração nominal e a experimental e a respectiva concentração nominal.

1.3.6. Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal (BRASIL, 2003).

Objetivos

2. Objetivos

Objetivo geral

- ✓ Preparação e análise do complexo de inclusão de 4-NRC:HP- β -CD, utilizando-se técnicas espectroscópicas.

Objetivos específicos

- ✓ Obtenção do extrato bruto de *Pothomorphe umbellata* (*Piperaceae*), e posterior isolamento, purificação e caracterização do 4-NRC;
- ✓ Validação de uma metodologia analítica para quantificação do 4-NRC por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector UV (CLAE-UV);
- ✓ Obtenção e caracterização do complexo de inclusão entre HP- β -CD e 4-NRC, empregando técnicas de espectrofotometria na região do infravermelho (IV), análise térmica e ressonância magnética nuclear de hidrogênios (RMN ^1H).
- ✓ Determinação da constante de estabilidade para a formação do complexo entre HP- β -CD e 4-NRC.
- ✓ Determinação da razão estequiométrica do complexo de inclusão entre HP- β -CD e 4-NRC;

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1 Reagentes e soluções

- O grau de pureza dos solventes variou de acordo com a finalidade. Para a preparação do extrato e purificação do 4-NRC foram utilizados hexano (HEX), diclorometano (DCM), metanol (MeOH) e etanol (ETOH) de grau analítico (P.A).
- Para a análise em CLAE, os solventes foram acetonitrila (ACN), metanol (MeOH) e ácido trifluoroacético (TFA) (Sigma-Aldrich®) de grau espectroscópico, todos desaerados sob ultrassonicação a vácuo (15 min/L).
- A complexação do 4-NRC foi realizada na presença de HP-β-CD (Aldrich®). As soluções e os solventes utilizados em CLAE no estudo de solubilidade de fases foram filtrados com filtros Millex LCR (Millipore®) com membrana PTFE (politetrafluoroetileno) modificada com poros de membrana de 0,45 μm e 13 mm (diâmetro). A água utilizada foi de grau ultra-puro, obtida através de MilliQ modelo SIMPLICITY 185 (Millipore®).
- A purificação do 4-NRC foi realizada em cromatografia em coluna aberta utilizando Sephadex LH20 (Sigma®) como fase estacionária (partículas de 18-111 μm). A separação dos constituintes foi verificada por cromatografia em camada delgada comparativa (CCD) de sílica gel 60 F254 (partículas de 15 μm) (Merck®).
- Na obtenção dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C foram utilizados solventes deuterados: clorofórmio (CDCl₃) 99%, óxido de deutério (D₂O) 99,9% e tetrametilsilano (TMS) 99% (Aldrich®) como padrão interno.
- As placas cromatográficas foram visualizadas com irradiações na região do UV (254 e 366 nm), e reveladas com vanilina ácida seguido de aquecimento.

- A solução reveladora de vanilina sulfúrica foi preparada com vanilina (1g/100mL) Após a total dissolução da vanilina, acrescentou-se 2 mL de ácido sulfúrico concentrado.

3.1.2. Equipamentos

- O agitador magnético de multiposições (Solab[®]) modelo LC-382/4 foi empregado no preparo das amostras dos complexos de inclusão.
- O aparelho de liofilização utilizado foi o modelo Freezone 4,5 da marca Labconco[®] gentilmente cedido pelo Laboratório de Produtos Naturais, do Instituto de Química da UFG.
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência modelo ProStar 210 utilizado foi acoplado a detector UV (Varian[®]) modelo 340, utilizando coluna Phenomenex[®] Synergi Fusion 4 μ RP-80A C18 (150 mm x 4,6 mm) e pré-coluna Phenomenex[®] Fusion RP C18 (4,0 mm x 3,0 mm) com “loop” de injeção Reodyne[®] de 20 μ L.
- Espectrofotômetro Varian Cary foi empregado utilizando cubetas de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico, no Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos da Faculdade de Farmácia da UFG.
- Análise térmica foi realizada em termogravímetro DTG-60H, n^o de série C30574300094TK (Shimadzu[®]), na Central Analítica do Instituto de Química da UFG.
- Os espectros de infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro de Infravermelho BX/RX Perkin Elmer[®] modelo 60508. Para preparo das pastilhas foi utilizado KBr (Vetec[®]) e prensa hidráulica Perkin Elmer[®] modelo 4037. As análises foram realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos da Faculdade de Farmácia da UFG.
- Os espectros de RMN ¹H e ¹³C de identificação do 4-NRC foram registrados em espectrômetro de RMN Varian Mercury Plus com magneto supercondutor 7,05T

(300 MHz), realizados no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Instituto de Química da UnB. TMS foi usado como referência interna (δ 0,0) e CDCl_3 como o solvente do sistema. Os espectros de RMN¹H obtidos foram coletados com sonda (ATB) de 5 mm, pulso de 45° e 8 transientes. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm, a constante de acoplamento J em Hz. e as multiplicidades descritas na forma de singleto (s), dubleto (d), duplo dubleto (dd), tripleto (t) e multiplete (m).

- Espectrômetro massas, modelo Quattro LC, marca Micromass (UK), acoplado ao cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE), marca Shimadzu foi hifenado a coluna analítica Chromolith Speed Rod, Merck, RP-18 e C18 4,6 x 50,0 mm e “loop” de injeção Rheodyne de 20 μL .
- Os espectros de RMN ¹H de caracterização do complexo de inclusão foram realizados no Centro de Biotecnologia da Amazônia, utilizando espectrômetro RMN Varian Inova 500 MHz.

3.1.3. Material botânico

As raízes de *Pothomorphe umbellata* foram coletadas no jardim de espécies cultivadas de Piperaceae do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP) em março de 2006. O material botânico foi identificado e uma amostra depositada no Instituto de Botânica da USP.

3.2. Métodos

3.2.1 Preparo do extrato bruto de *Pothomorphe umbellata* e isolamento do 4-NRC

3.2.1.1 Preparo do extrato de *Pothomorphe umbellata*.

As raízes de *P. umbellata* foram secas em estufa (40 °C) com circulação de ar por 48h. Após a secagem procedeu-se a moagem em moinho de facas. O pó

obtido (201,1 g) foi passado em tamis nº II (Bertel[®]) e submetido à percolação com etanol/água 3:2 v:v até o esgotamento da droga segundo Farmacopéia Brasileira 1^a edição (1926). O extrato obtido foi levado a rotaevaporador para eliminação do etanol. A fração aquosa foi submetida à extração líquido-líquido com clorofórmio (3 x 50 mL), resultando no extrato clorofórmico (3,7 g). O fluxograma de extração e purificação do 4-NRC pode ser visto na figura 9.

3.2.1.2. Fracionamento do extrato bruto e isolamento do 4-NRC.

O fracionamento do extrato clorofórmico foi realizado em coluna cromatográfica aberta (300,0 mm x 20,0 mm) utilizando Sephadex LH20 (Sigma[®]) como fase estacionária e DCM: HEX: MeOH na proporção de 5: 2: 1 como fase móvel (Figura 9). As frações obtidas e a amostra padrão de 4-NRC foram submetidas à cromatografia em camada delgada comparativa (CCD) em sílica. Manchas foram observadas após irradiação de luz na região do ultravioleta (254 e 366 nm) com revelação colorimétrica após borrifação de solução de vanilina ácida (1g/100mL), seguida de aquecimento a 70°C/5 min. Após comparação cromatográfica com amostra padrão, as frações semelhantes foram reunidas e repurificadas através de repetições do procedimento de fracionamento. O produto obtido foi protegido com papel alumínio contra a incidência de luz.

O produto obtido (4-NRC) foi analisado em CLAE-UV juntamente com uma amostra padrão e submetido à análise de RMN de ¹H e ¹³C em espectrômetro de 300 MHz. Adicionalmente, caracterizou-se a fragmentação do 4-NRC por espectrometria de massas com ionização química empregando-se fase móvel MeOH: H₂O (90 : 10) e fluxo de 1,0 mL/min.

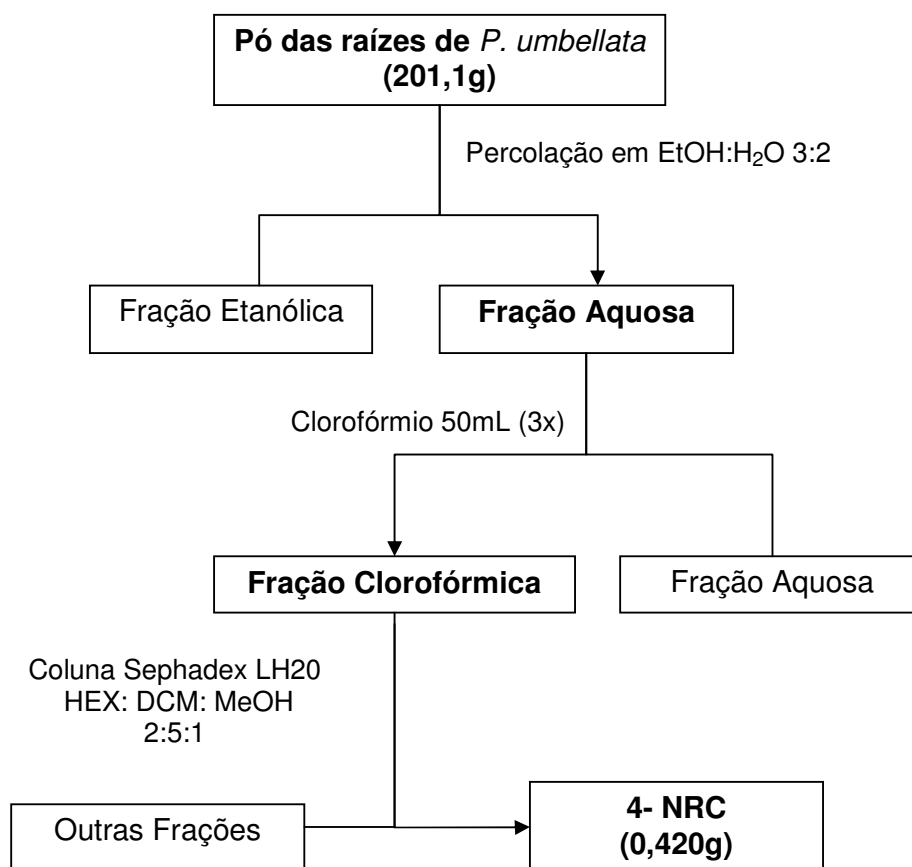


Figura 9. Fluxograma de extração e purificação do 4-NRC

3.2.2. Validação da metodologia analítica de quantificação do 4-NRC por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector ultravioleta (CLAE-UV)

Na quantificação de 4-NRC, a técnica de CLAE tem sido amplamente empregada por ser uma metodologia bastante versátil e prática, com as vantagens da automatização. Colunas de fase estacionária apolar (C8, C18, sephadex LH20) e fases móveis com teor elevado de solventes orgânicos (tipicamente 80-90%) são empregadas para a separação e quantificação dos componentes, em poucos minutos (faixa de 10-20 min), com alta resolução, eficiência e sensibilidade (ng a µg). Os detectores freqüentemente empregados são o ultravioleta (REZENDE e

BARROS, 2004; SILVA et al., 2005; NORIEGA et al., 2005), eletroquímico (ROPKE et al., 2002) ou espectrometria de massas (REZENDE, 2002).

Para a validação do método, preparou-se uma solução estoque (1 mg/mL) de 4-NRC em metanol, originando seis soluções de trabalho com as seguintes concentrações: 3,0; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 100,0 µg/mL. Todas as soluções foram acondicionadas em frascos âmbar para proteção contra incidência da luz. Triplicatas destas soluções foram analisadas em CLAE-UV, por três dias consecutivos. Todas as soluções foram mantidas por 7 dias a -20°C e nenhum sinal cromatográfico de degradação da amostra foi detectado após análise cromatográfica,

As condições cromatográficas foram adaptadas de estudos prévios (CAMPOS VIANA et al., 2004; REZENDE e BARROS, 2004). A fase móvel utilizada foi ACN: MeOH: TFA 0,1% 62:20:18 v:v:v, com fluxo de 1 mL/min, volume de injeção de 20 µL e monitoramento em 282 nm.

Curvas de calibração foram construídas a partir dos dados cromatográficos das áreas dos picos *versus* as concentrações teóricas das soluções de trabalho. A correlação linear entre os valores de X (concentração) e Y (área dos picos) foi quantificada mediante explicitação dos valores de coeficiente de correlação linear (R^2).

Os parâmetros de desempenho analítico avaliados durante a validação deste método foram: a seletividade, linearidade e intervalo, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e robustez. (BRASIL, 2003; RIBANI, 2004).

3.2.2.1 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada mediante comparação dos cromatogramas da fase móvel, metanol (solvente utilizado na curva de calibração), da solução de HP-β-CD, na ausência de 4-NRC e presença do 4-NRC. A ausência de interferentes no pico do 4-NRC indica boa seletividade do método.

3.2.2.2 Linearidade

Os dados de absorbância à 282 nm das seis soluções do 4-NRC foram correlacionados à faixa de concentrações avaliadas (3,0; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 100,0

$\mu\text{g/mL}$), obtendo-se uma curva de calibração com as concentrações do 4-NRC versus a área dos picos.

A equação da reta ($y = ax + b$) foi então determinada, calculando-se o intercepto (b), a inclinação (a) e o coeficiente de correlação linear (R^2). Valores de $R^2 > 0,99$ são aceitáveis, segundo ANVISA, 2003.

3.2.2.3. Limites de Detecção e Quantificação

Os parâmetros da curva analítica foram estabelecidos baseado nas replicatas obtidas ($n=9$) das concentrações (3,0-100,0 $\mu\text{g/mL}$) em três dias distintos. Estes parâmetros foram empregados nas equações abaixo para estabelecimento dos valores de LD e LQ, segundo a ANVISA (2003):

$$\text{LD} = \frac{3 \times \text{DPb}}{\text{IC}}$$

$$\text{LQ} = \frac{10 \times \text{DPb}}{\text{IC}}$$

Onde, **DPb**= desvio padrão do intercepto ($n=9$) com o eixo y da curva e **IC**= média do coeficiente angular ($n=9$) da curva de calibração (BRASIL, 2003).

3.2.2.4. Precisão e exatidão

A precisão intra-ensaio e inter-ensaio e a exatidão do método foram avaliadas durante três dias diferentes, com injeção em triplicata de 6 soluções de concentrações diferentes de 4-NRC em metanol (3,0; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 100,0 $\mu\text{g/mL}$). Para a precisão intra-ensaio considerou-se o desvio padrão relativo ou coeficiente de variação (CV) das médias diárias, isto é, a razão entre o desvio padrão e as médias diárias ($n=3$). Na precisão inter-ensaio foi considerado a razão entre o desvio padrão e a média das médias diárias ($n=3$).

A exatidão foi determinada mediante a utilização da equação abaixo:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

E também, mediante a porcentagem de erro sistemático, pela seguinte equação:

$$\text{Exatidão}_{\% \text{ erro}} = \frac{\text{concentração média experimental} - \text{concentração teórica}}{\text{concentração média experimental}} \times 100$$

3.2.2.5. Robustez

A robustez foi avaliada segundo pequenas alterações de fase móvel como a marca dos solventes utilizados, variações de pH e fluxo, e utilização de analistas diferentes.

3.2.3. Preparo da mistura física

A mistura física foi preparada segundo Veiga et al. (1996), através da mistura simples de 4-NRC: HP- β -CD (1:1 razão molar) em gral de ágata e pistilo, por 5 min. A amostra obtida foi submetida à análise de RMN, infravermelho e análise térmica.

3.2.4. Preparo dos complexos de inclusão

3.2.4.1. Liofilização

Soluções aquosas de 10 mL de HP- β -CD em concentrações crescentes (0 - 50 mM) foram adicionadas a frascos contendo 1 mg de 4-NRC, obtendo-se as seguintes proporções estequiométricas: 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:6, 1:8, 1:10, 1:12, 1:15, 1:31, 1:62, 1:94 e 1:156. Os frascos foram envolvidos com papel alumínio para proteção contra a incidência de luz. As soluções foram agitadas em agitador magnético à velocidade de 15 rpm por um período de três dias, com temperatura controlada entre 23 ± 1 °C. Após atingir o equilíbrio, as amostras foram filtradas em membrana (PTFE, 0,45 μ m), congeladas em freezer e liofilizadas (VEIGA et al., 1996). O produto obtido foi analisado em espectrômetro de infravermelho, RMN e análise térmica.

3.2.4.2. Malaxagem

Quantidades estequiométricas de HP- β -CD e 4-NRC (1:1 razão molar) foram trituradas em gral de ágata liso e misturadas a uma solução de etanol/água 50% (v/v) (HIRAYAMA e UEKAMA, 1987). A mistura foi agitada em agitador magnético a 10 rpm por 60 min. Posteriormente o solvente foi evaporado em rotaevaporador e o produto obtido foi congelado e liofilizado. A amostra foi submetida à análise de RMN, infravermelho e análise térmica.

3.2.5. Estudos da formação e estabilidade do complexo de inclusão do 4-NRC em HP- β -CD.

3.2.5.1. Estudo de solubilidade de fases.

O estudo de solubilidade de fases foi realizado de acordo com o método descrito por Higuchi e Connors (1965), para verificação da formação do complexo (VEIGA et al., 1996; BADAWY, GHORAB e ADEYEYE, 1996; WILLIAMS, MAHAGUNA e SRIWONGJANYA, 1998). Soluções aquosas contendo concentrações crescentes de HP- β -CD (0 - 50 mM) foram adicionadas a frascos contendo uma proporção fixa de 4-NRC (1mg/10 mL; $3,18 \times 10^{-3}$ mM), resultando diversas proporções estequiométricas molares (1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:6, 1:8, 1:10, 1:12, 1:15, 1:31, 1:62, 1:94 e 1:156).

As soluções foram agitadas em agitador magnético à velocidade de 15 rpm por um período de 15 dias, com temperatura controlada entre 23 ± 1 °C. Alíquotas de 0,5 mL foram coletadas em intervalos constantes, filtradas em filtro 0,45 μ m PTFE Millipore® e analisadas em CLAE-UV. O volume coletado foi repostado com solução de HP- β -CD de concentração correspondente. O experimento foi realizado em triplicata.

3.2.5.2. Determinação da constante de estabilidade (K) do complexo de inclusão 4-NRC:HP- β -CD

A determinação da constante de estabilidade (K) do complexo foi realizada a partir da porção ascendente e linear do diagrama de solubilidade utilizando a equação abaixo, segundo Higuchi e Connors em 1965.

$$K = \frac{\text{inclinação}}{S_0(1-\text{inclinação})}$$

O termo *inclinação*, refere-se à inclinação da reta obtida pelo diagrama de solubilidade de fases e S_0 corresponde à solubilidade de 4-NRC na ausência de HP- β -CD.

3.2.6. Análise e caracterização da mistura física e complexos de inclusão.

3.2.6.1. Espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier

Os espectros de infravermelho foram obtidos utilizando espectrofotômetro de Infravermelho BX/RX Perkin Elmer[®]. As amostras de HP- β -CD, 4-NRC, mistura física, complexos preparados por liofilização e malaxagem foram previamente dessecadas e trituradas com KBr (Vetec[®]). As pastilhas de KBr com as respectivas amostras foram obtidas por compressão do pó em prensa hidráulica com pressão de 9 toneladas por 2 minutos.

Os dados foram expressos em números de onda (cm^{-1}). A faixa espectral utilizada compreendia números de onda entre 4000 e 400 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} . O procedimento foi realizado em triplicata.

3.2.6.2. Análise Térmica

A análise foi realizada em TGA modelo 50 Shimadzu[®]. As amostras, contendo 1-3 mg, foram colocadas em painéis de platina fechadas. A leitura foi realizada a

10°C por min de 0 a 900°C, em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL/min. Uma panela de platina vazia foi utilizada como referência. A análise foi realizada em duplicata.

3.2.6.3. Ressonância magnética nuclear

Os espectros unidimensionais de ^1H das amostras de HP- β -CD, 4-NRC, mistura física e complexos preparados por liofilização e malaxagem foram realizados em espectrômetro de RMN (500 MHz).

Água deuterada (D_2O) foi usada como o solvente do sistema. Os espectros de RMN ^1H foram coletados em janela espectral de 4998,14 Hz contendo 16 k de pontos de dados sendo aplicados antes da transformada de Fourier a apodização do conjunto de pontos para 128 k.

O pico em 4,75 ppm, referente à água residual, presente como impurezas (H_2O e HDO), foi usado como referência externa a 298 K. Os dados foram coletados sem uma referência interna devido a uma possível interação com a cavidade da HP- β -CD (SCHNEIDER et al., 1998; MORAES et al., 2007) e expressos em deslocamento químico (δ / ppm) e constante de acoplamento (J em Hz).

3.2.6.4. Determinação da estequiometria do complexo por espectrofotometria UV-Vis.

A estequiometria de complexação foi determinada pela técnica de variação contínua (Job's plot) (JOB, 1928), a partir de soluções equimolares de 4-NRC e HP- β -CD em metanol preparadas e misturadas de forma que a concentração total (M) da mistura permanecesse constante ($M = [4\text{-NRC}]_{\text{total}} + [\text{HP-}\beta\text{-CD}]_{\text{total}} = 2 \text{ mM}$), variando-se a fração molar das espécies entre 0 e 1 (0; 0,2; 0,33; 0,5; 0,66; 0,8; 1,0).

As soluções foram analisadas em triplicata, utilizando espectrofotômetro UV-Vis Varian Cary com cubetas de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico em comprimento de onda de 282 nm. Também foram analisadas soluções contendo apenas 4-NRC em metanol.

Resultados e Discussão

4. Resultados e Discussão

4.1. Obtenção e fracionamento do extrato clorofórmico para isolamento e purificação do 4-NRC.

As raízes secas e moídas (201,1g) quando submetidas à percolação, seguida de extração clorofórmica e evaporação do solvente produziram um resíduo seco (3,7 g), correspondente ao extrato clorofórmico, com rendimento equivalente a 1,8%, em relação ao peso seco. Posteriormente, outras metodologias de obtenção dos extratos brutos de *P. umbellata* foram desenvolvidas e otimizadas por integrantes do nosso grupo de pesquisa. Nestas, o método de maceração em ciclohexano seguido de acetato de etila, apesar de consumir maior quantidade de solvente, produziu rendimento superior (2,6%) à percolação em MeOH/H₂O 3:2 v:v (1,8%).

O fracionamento do extrato em Sephadex[®] LH 20 resultou na purificação de 420,17 mg de 4-NRC, representando um rendimento de 11,5%, em relação ao extrato seco. Tal rendimento foi bastante superior aos métodos previamente publicados, quando purificações em sílica gel 60 seguida de coluna C8 (NUNES et al., 2005; 6,7%) ou Sephadex[®] LH 20 seguida de C18 (GUSTAFSON et al., 2,4%), foram utilizadas, indicando maior eficiência para a metodologia de purificação aqui desenvolvida.

O emprego de Sephadex[®] LH 20 como fase estacionária justifica o elevado rendimento durante as etapas de purificação, pois, devido à natureza da separação cromatográfica (exclusão molecular) há preservação das propriedades físico-químicas do 4-NRC.

Diferentes fases estacionárias, como a sílica fase normal (polar), ou a fase reversa (C18), apresentam grupos silanóis livres, responsáveis não apenas por interações moleculares com este analito, mas também por ligações fortes (*p.e.* covalentes), que podem promover a degradação do 4-NRC durante os sucessivos fracionamentos cromatográficos, necessários à purificação.

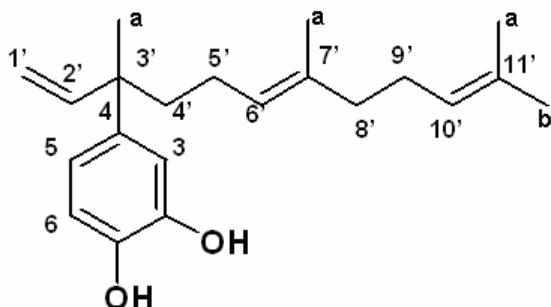
Outros possíveis fatores responsáveis pela degradação do 4-NRC são a fotossensibilidade, o pH do meio e a temperatura que necessitam de posteriores investigações (em andamento).

A identificação estrutural do 4-NRC presente nas raízes de *Pothomorphe umbellata* foi realizada mediante obtenção de dados de RMN de ^1H e ^{13}C (Figuras 10 e 11, respectivamente), através da análise em espectrômetro de RMN (300 MHz), utilizando CDCl_3 como solvente. O estudo espectroscópico dos deslocamentos químicos (δ) da amostra, apresentados na tabela 3, evidenciou valores semelhantes àqueles publicados anteriormente (KIJOA et al., 1980; GUSTAFSON et al., 1992).

O espectro de RMN de ^1H evidenciou, em região espectral de maior blindagem, a presença de singletos referentes a hidrogênios metílicos (δ 1,32 a 1,68) e multipletos equivalentes a hidrogênios metilênicos (δ 1,74 a 2,03). Os hidrogênios metínicos ($\text{H1}'\text{a/b}$ e $\text{H2}'$) foram observados na forma de *dd*, com os deslocamentos químicos: δ 5,03 ($J=17,3$ e $1,3\text{Hz}$), δ 5,05 ($J=10,6$ e $1,3\text{Hz}$) e δ 5,96 ($J=17,4$ e $10,8\text{Hz}$), respectivamente, característicos de acoplamento *trans/gem*, *cis/gem* e *trans/cis*, de dupla ligação terminal. Já os hidrogênios metínicos $\text{H6}'$ e $\text{H10}'$ foram observados como dois tripletos em δ 5,08 ($J=6,70\text{Hz}$). Os hidrogênios aromáticos encontram-se na região espectral de menor blindagem com desdobramentos que caracterizam substituição (1, 3, 5)-aromática evidenciando H3 (*d*, $J_{\text{meta}}=1,8\text{Hz}$), H5 (*dd*, $J_{\text{orto,meta}}=8,3$ e $2,0\text{Hz}$) e H6 (*d*, $J_{\text{orto}}=8,2\text{Hz}$), confirmando assim a identidade da substância isolada. Os hidrogênios e carbonos foram assinalados mediante o auxílio das técnicas bidimensionais COSY (Correlation Spectroscopy) e HMQC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence) e HMBC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence).

Adicionalmente dados de espectrometria de massas confirmaram o íon molecular do 4-NRC (m/z 313,6) e seu íon filho mais abundante (m/z 162,19) (Figura 12).

Tabela 3. Deslocamentos químicos (em ppm) observados nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do 4-NRC experimental e da literatura (KIJOA, 1980, GUSTAFSON et al., 1992).



Tipo C (Nº)	Literatura (270 MHz, CDCl_3) ^1H	Experimental (300 MHz, CDCl_3) ^1H	Literatura (67,5 MHz) ^{13}C	Exp. (75 MHz) ^{13}C
CH_3 (3'a)	1,30 (s)	1,32 (s; 3H)	25,0	24,9
C (3')	----	----	43,8	43,7
CH_3 (11'b)	1,51 (s)	1,51 (s; 3H)	17,7	17,7
CH_3 (11'a)	1,59 (s)	1,59 (s; 3H)	25,7	25,7
C (11')	----	----	131,4	131,3
CH_3 (7'a)	1,67 (s)	1,68 (s; 3H)	15,9	15,9
C (7')	----	----	135,1	135,0
CH_2 (5')	1,90 – 2,10 (m; 4H)	1,94 – 2,03 (m; 4H)	23,2	23,1
CH_2 (9')			26,8	26,7
CH_2 (4')	1,60 – 1,90 (m; 4H)	1,74 – 1,9 (m; 4H)	41,2	41,1
CH_2 (8')			39,7	39,6
CH_2 (1a')	5,00 (dd; J=17,0 e 1,3 Hz)	4,99 (dd; J=17,3 e 1,3 Hz)	111,6	111,5
CH_2 (1b')	5,05 (dd; J=10,5 e 1,3 Hz)	5,05 (dd; J=10,6 e 1,3 Hz)		
CH (6')	5,09 (2t; J=7,5 Hz)	5,08 (2t; J=6,7 Hz)	124,5	124,3
CH (10')			124,7	124,5
CH (2')	5,97 (dd; J= 17,0 e 10,5 Hz)	5,96 (dd; J=17,4 e 10,8 Hz)	147,1	147,0
CH (6)	6,78 (d; J=8,0 Hz)	6,78 (d; 8,2 Hz)	114,4	114,2
CH (5)	6,73 (dd; J=8,0 e 2,0 Hz)	6,76 (dd; J=8,3 e 2,0 Hz)	119,3	119,1
CH (3)	6,83 (d; J=2,0 Hz)	6,84 (d; J=1,8 Hz)	115,1	115,0
C (2)	----	----	143,2	143,0
C (1)	----	----	141,1	140,9
C (4)	----	----	141,4	141,2

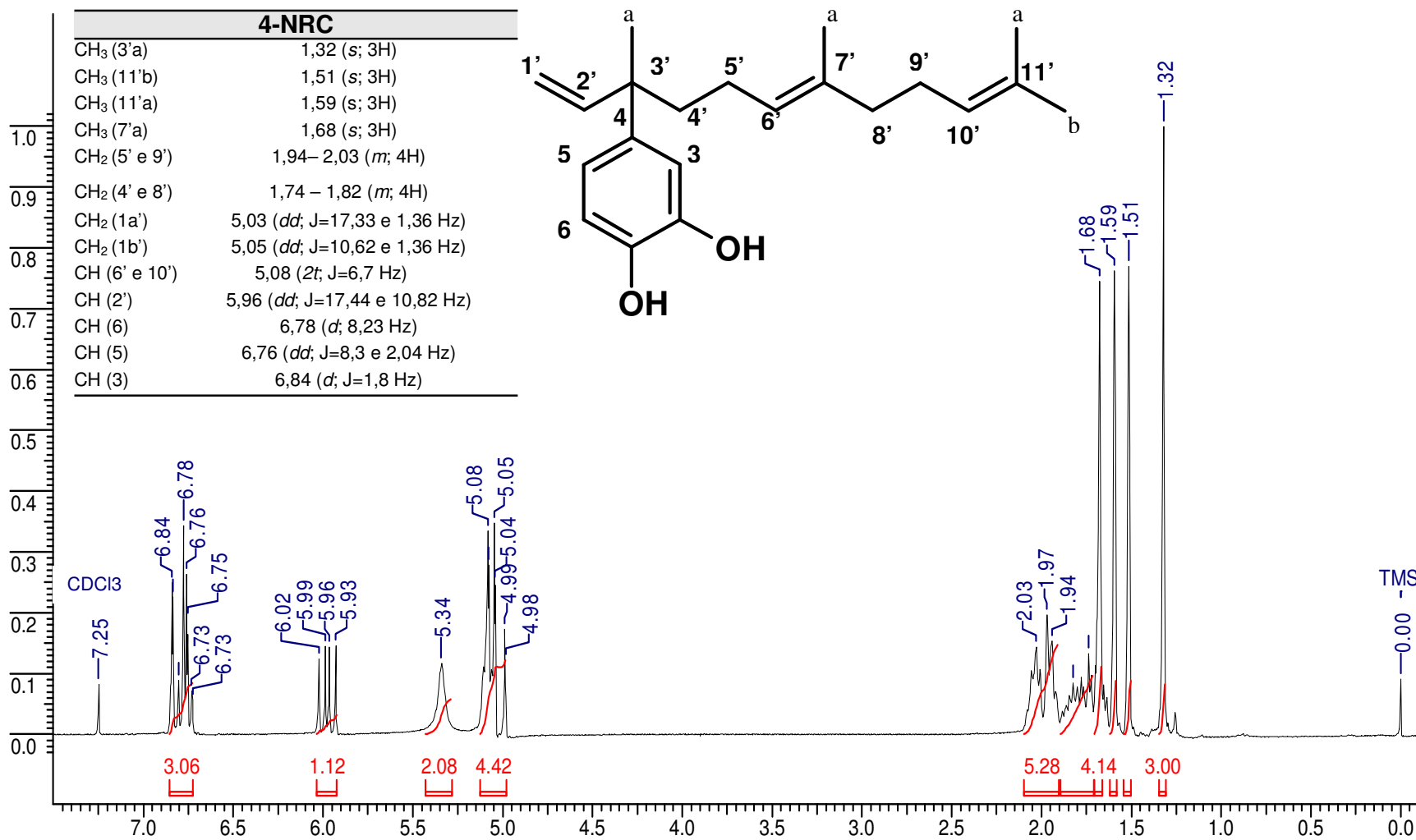


Figura 10. Espectro de RMN ¹H do 4-NRC (CDCl₃/ TMS/ 300MHz).

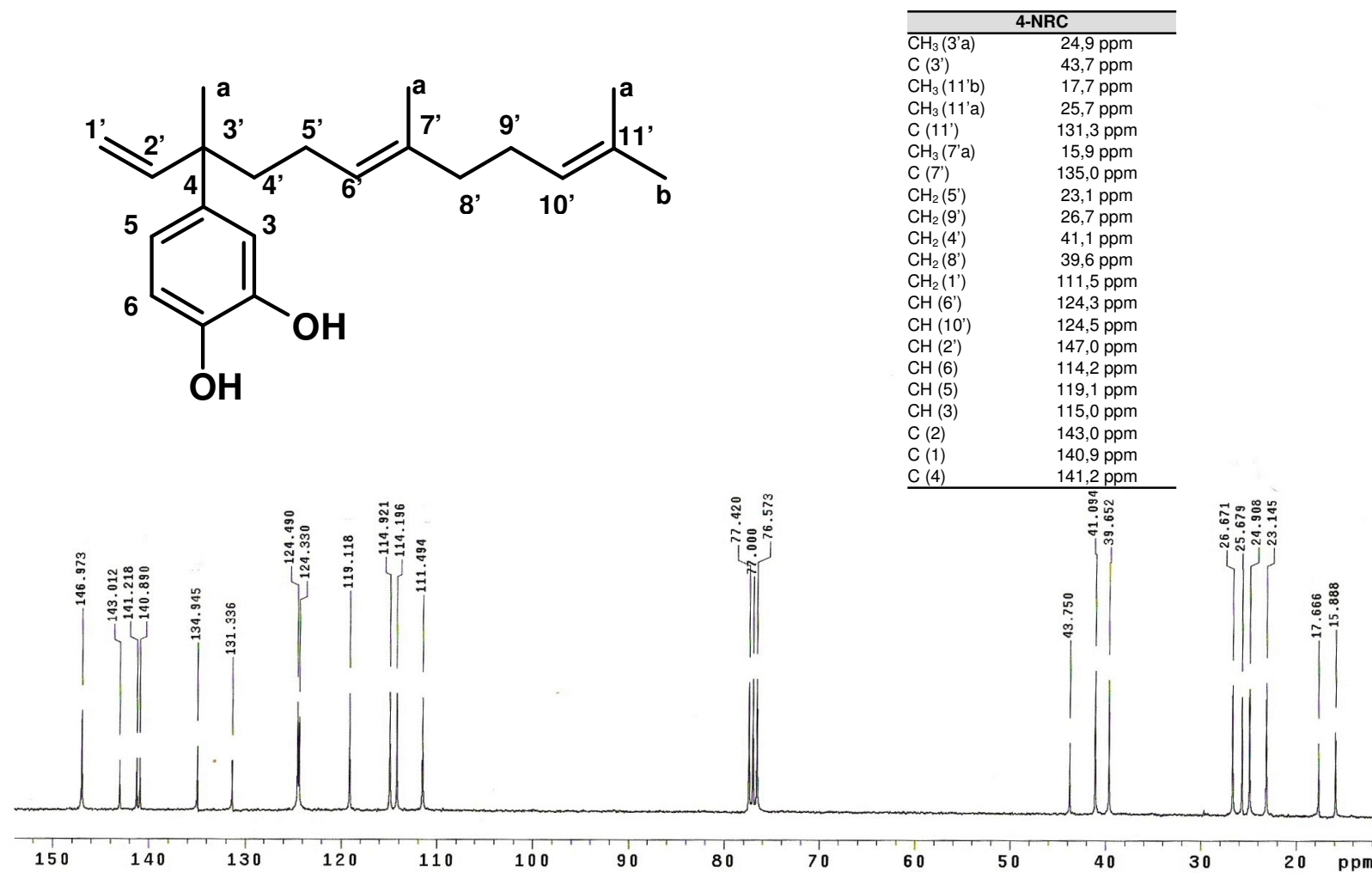


Figura 11. Espectro de RMN ¹³C do 4-NRC (CDCl₃/ TMS/ 300MHz)

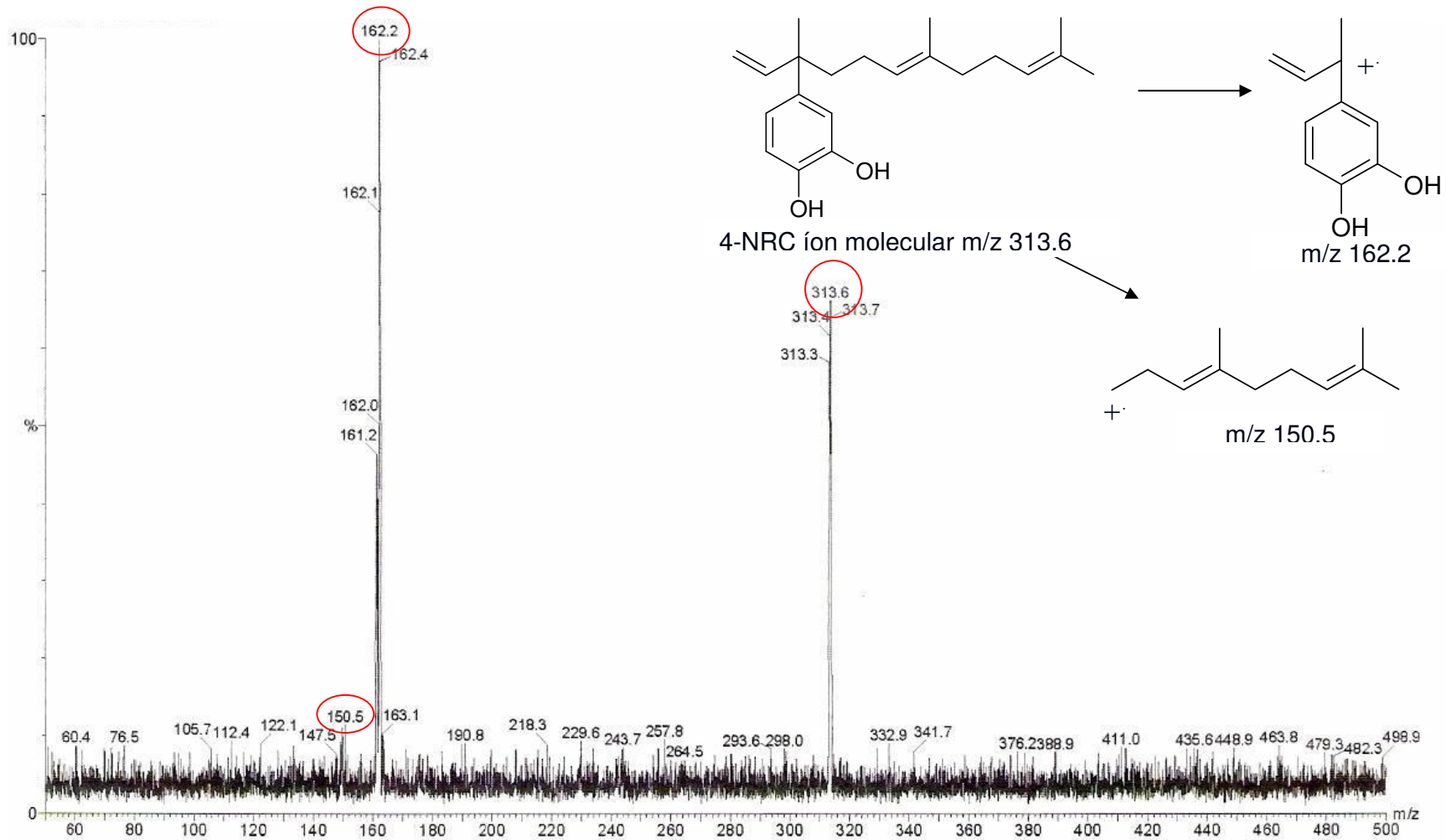


Figura 12. Espectro de massas de 4-NRC.

4.2. Validação da metodologia analítica de quantificação do 4-NRC por CLAE-UV

4.2.1. Seletividade

A seletividade do método pode ser verificada pela comparação dos cromatogramas obtidos da fase móvel (Figura 13), metanol (Figura 14) e solução de HP- β -CD (Figura 15) na ausência de 4-NRC, com os cromatogramas de 4-NRC em metanol (Figura 16) e na forma de complexo com HP- β -CD (Figura 17). Essa comparação não evidenciou interferentes em relação ao pico do 4-NRC, assegurando a seletividade do método.

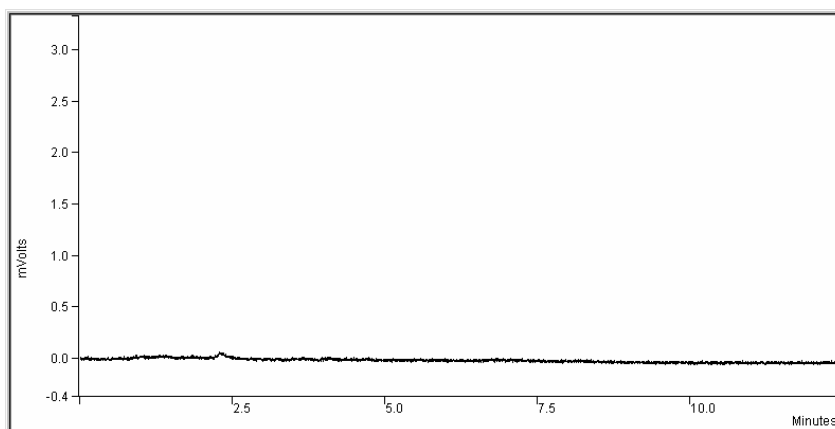


Figura 13. Cromatograma da fase móvel MeOH:ACN:TFA 0,1% 62:20:18 v:v:v obtido em CLAE-UV, coluna C18 (150 mm x 4,6 mm) com fluxo de 1,0 mL/ min.

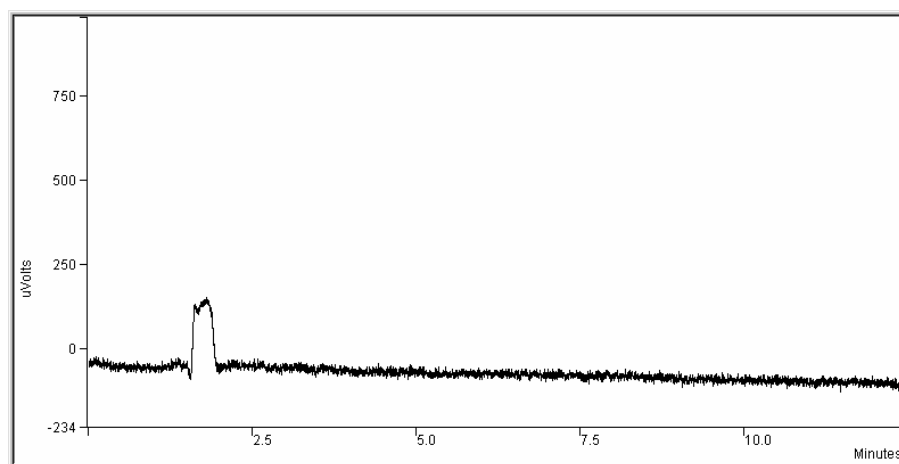


Figura 14. Cromatograma da injeção de metanol obtido em CLAE-UV, fase móvel: MeOH:ACN:TFA 0,1% 62:20:18 v:v:v, coluna C18 (150 mm x 4,6 mm) e fluxo de 1,0 mL/min.

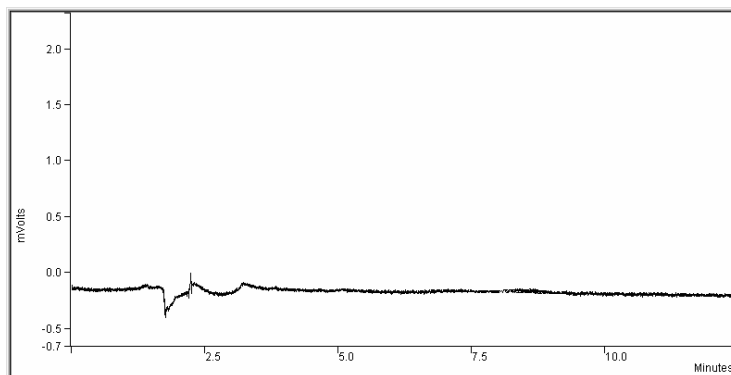


Figura 15. Cromatograma de solução aquosa de HP- β -CD, obtido em CLAE-UV, fase móvel: MeOH:ACN:TFA 0,1% 62:20:18 v:v:v, coluna C18 (150 mm x 4,6 mm) e fluxo de 1,0 mL/min.

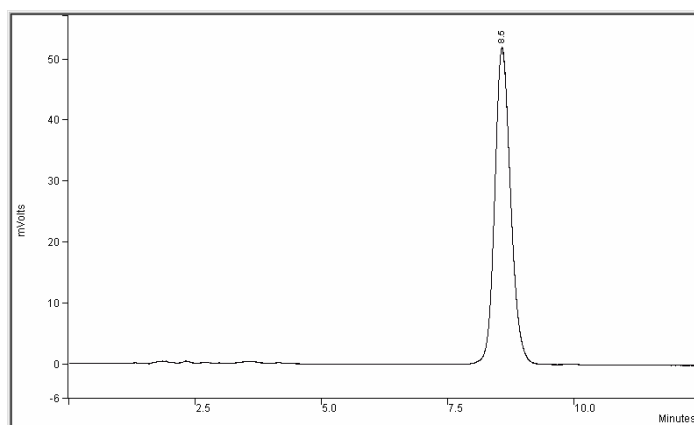


Figura 16. Cromatograma de solução metanólica de 4-NRC a 100 μ g/mL, obtido em CLAE-UV, fase móvel: MeOH:ACN:TFA 0,1% 62:20:18 v:v:v, coluna C18 (150 mm x 4,6 mm) e fluxo de 1,0 mL/min.

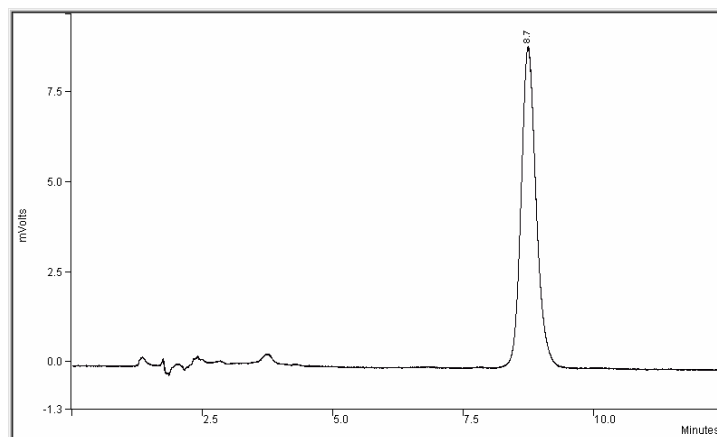


Figura 17. Cromatograma de 4-NRC em complexo de inclusão com HP- β -CD (solução aquosa), em CLAE-UV, fase móvel MeOH:ACN:TFA 0,1% 62:20:18 v:v:v, coluna C18 (150 mm x 4,6 mm) e fluxo de 1,0 mL/min.

4.2.2 Linearidade

A curva de calibração de 4-NRC e seus respectivos cromatogramas podem ser visualizados a seguir (figuras 18 e 19). A tabela 4 apresenta dados da curva analítica. Os resultados obtidos demonstram coeficientes de correlação linear adequados ($R^2 = 0,99998 \pm 0,00017$), dentro dos limites especificados pela ANVISA ($R^2 \geq 0,99$), para a validação de métodos cromatográficos.

Tabela 4. Coeficientes das equações lineares das soluções de calibração do 4-NRC (3,0 a 100 $\mu\text{g/mL}$ em metanol)

Dias	Inclinação (IC)	Intercepto (b)	R ²
DIA 1	5820,3	-6262,8	1
	5802,5	-4766,4	0,9999
	5783,9	-4370,4	0,9997
DIA 2	5477,0	-4079,3	0,9999
	5584,0	-2871,9	1
	5901,8	-7581,5	0,9995
DIA 3	5603,6	-1853,4	0,9999
	5674,5	-3578,4	1
	5730,2	-4080,1	1
Média	5708,644	-4382,69	0,999878
DP	135,1427	1711,172	0,000172

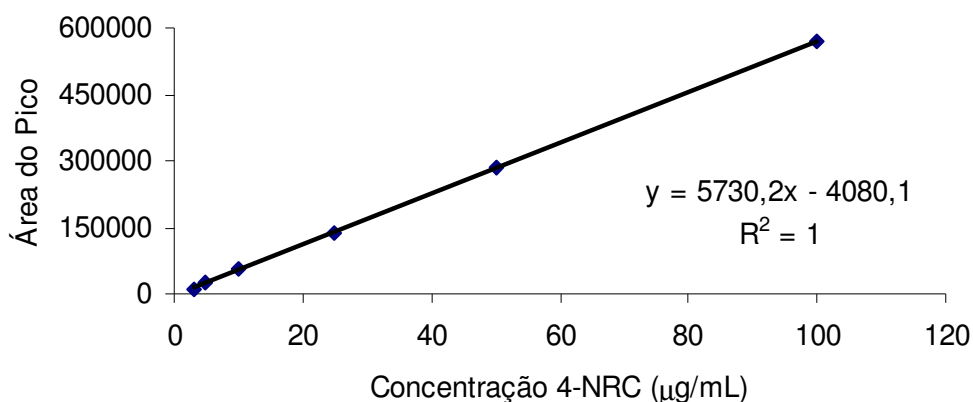


Figura 18. Curva de calibração para análise do 4-NRC no intervalo de concentrações de 3,0 a 100,0 $\mu\text{g/mL}$ de 4-NRC em metanol, referente à linearidade do método.

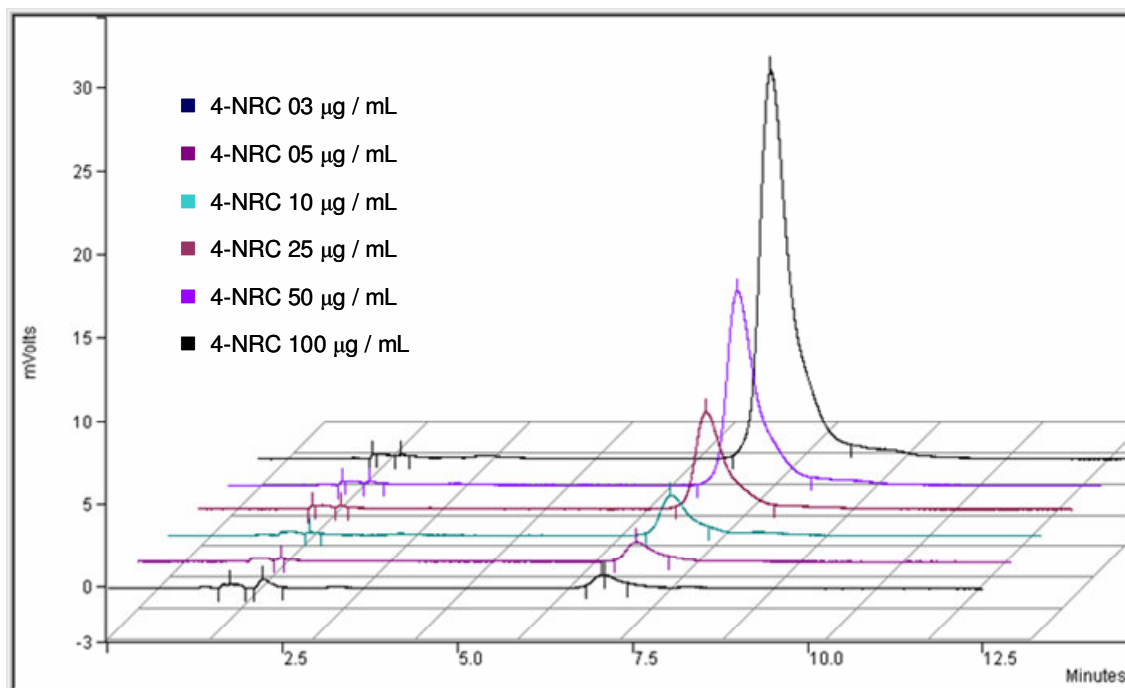


Figura 19. Cromatogramas das soluções da curva de calibração de 4-NRC em metanol, por CLAE-UV, com fase móvel: MeOH:ACN:TFA 0,1% 62:20:18 v:v:v, coluna C18 (150 mm x 4,6 mm) e fluxo de 1,0 mL/min, em $\lambda=282$ nm

4.2.3 Limite de Detecção e Quantificação

O LD foi estabelecido em 0,89 $\mu\text{g/mL}$, baseado em parâmetros da curva analítica (Tabela 4), significando boa sensibilidade para o método. O LQ calculado para o método foi 2,99 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados obtidos para concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível quantificável, ou a menor concentração da curva de calibração (3 $\mu\text{g/mL}$) também produziu valores de CV inferiores a 5%, confirmando o LQ obtido através dos cálculos.

4.2.4. Precisão e exatidão

Os resultados da precisão intra e inter-ensaio podem ser visualizados na tabela 5. Os coeficientes de variação inter-dia máximo e mínimo encontrados foram 2,76% e 0,28% revelando ótima precisão com valores inferiores a 5% (ANVISA, 2003).

Para os dados de exatidão, a faixa de valores encontrados situava-se entre 95,58 e 101,29% (Tabela 5). Os valores encontrados estão dentro da faixa estabelecida pela ANVISA (80 a 120%). Quando considerado a exatidão em % de erro sistemático, os resultados de exatidão obtidos situavam-se na faixa de -4,62% a 1,27%, e, portanto adequados à validação metodológica (BRASIL, 2003) (Tabela 5).

4.2.5. Robustez

Não foram demonstradas mudanças significativas nos resultados frente às condições estabelecidas para avaliação da robustez.

Tabela 5. Dados de precisão e exatidão analítica do 4-NRC por CLAE-UV.

Concentração adicionada	3 µg/mL	5 µg/mL	10 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
Concentrações obtidas (µg/mL)						
Dia 1	2,95	4,96	10,35	24,88	49,72	100,14
	2,96	4,79	9,74	25,15	50,72	99,64
	2,69	5,01	9,36	25,39	51,14	99,41
Dia 2	2,77	4,94	10,50	24,99	49,69	100,12
	2,79	4,92	10,22	25,09	50,03	99,95
	3,04	5,19	10,37	25,34	48,38	100,68
Dia 3	2,79	4,74	10,15	25,18	50,37	99,78
	2,98	4,68	10,34	24,83	50,30	99,88
	2,84	4,90	10,13	24,89	50,43	99,81
Dia 1 (média, n=3, DP)	2,87±0,15	4,92±0,12	9,82±0,50	25,14±0,25	50,52±0,73	99,73±0,37
CV intra-dia 1 (%)	5,2	2,36	5,09	1,01	1,44	0,37
Dia 2 (média, n=3, DP)	2,87±0,15	5,02±0,15	10,36±0,14	25,14±0,18	49,37±0,87	100,25±0,38
CV intra-dia 2 (%)	5,32	3,04	1,33	0,71	1,76	0,38
Dia 3 (média, n=3, DP)	2,87±0,1	4,77±0,11	10,21±0,11	24,97±0,19	50,36±0,06	99,82±0,05
CV intra-dia 3 (%)	3,4	2,31	1,1	0,75	0,13	0,05
Média dias 1, 2 e 3 (n=3, DP)	2,87±0,01	4,9±0,12	10,13±0,28	25,08±0,10	50,09±0,63	99,93±0,28
CV inter-dia (%)	0,348	2,45	2,76	0,4	1,26	0,28
Exatidão (%)	95,58	98,06	101,29	100,33	100,17	99,93
Exatidão (% de erro)	-4,62	-1,97	1,27	0,33	0,17	-0,07

4.3. Estudos da formação e estabilidade do complexo de inclusão do 4-NRC em HP- β -CD.

4.3.1 - Estudo de solubilidade das fases.

O equilíbrio de solubilidade das soluções aquosas de 4-NRC na presença de concentrações crescentes HP- β -CD foi atingido após 3 dias de agitação. Para a determinação do equilíbrio de solubilidade, as soluções contendo 4-NRC e HP- β -CD em diferentes proporções estequiométricas foram submetidas à agitação e análise em CLAE por 15 dias para a determinação da quantidade de 4-NRC dissolvida. Assim, foi observado que a solubilidade atingiu um equilíbrio no terceiro dia de estudo. Os dados obtidos após análise de alíquotas destas soluções em CLAE são apresentados na tabela 6.

Tabela 6: Concentração máxima de 4-NRC dissolvido em presença de concentrações crescentes de HP- β -CD.

Proporção estequiométrica 4-NRC:HP-β-CD	4-NRC (mM)	HP-β-CD (mM)	Concentração máxima de 4-NRC solubilizada ($\times 10^{-2}$ mM)
1:0	0,32	0	1,06
1:1	0,32	0,32	2,20
1:2	0,32	0,64	5,05
1:3	0,32	0,96	7,50
1:4	0,32	1,27	10,30
1:6	0,32	1,92	11,60
1:8	0,32	2,55	14,60
1:10	0,32	3,19	13,8
1:12	0,32	3,83	14,90
1:15	0,32	4,78	13,70
1:31	0,32	10	26,80
1:62	0,32	20	26,10
1:94	0,32	30	27,30
1:156	0,32	50	26,50

A solubilidade intrínseca do 4-NRC em água, determinada em triplicata, neste estudo foi de $3,32 \pm 1,7 \mu\text{g/mL}$ ($1,06 \times 10^{-2} \pm 0,005 \text{ mM}$). Já a concentração máxima dissolvida na presença de HP- β -CD foi de $85,8 \pm 9,0 \mu\text{g/mL}$ ($0,27 \pm 0,03 \text{ mM}$), representando um incremento na solubilidade aquosa do 4-NRC em, aproximadamente, 26 vezes a original.

Representando graficamente a média ($n=3$) dos valores de concentração 4-NRC (mM) em função das concentrações de HP- β -CD (mM), obteve-se um diagrama de solubilidade do tipo B (Figura 20), conforme definido por Higuchi e Connors (1965), pois acima de 10 mM de HP- β -CD não se observa elevação significativa na solubilidade 4-NRC.

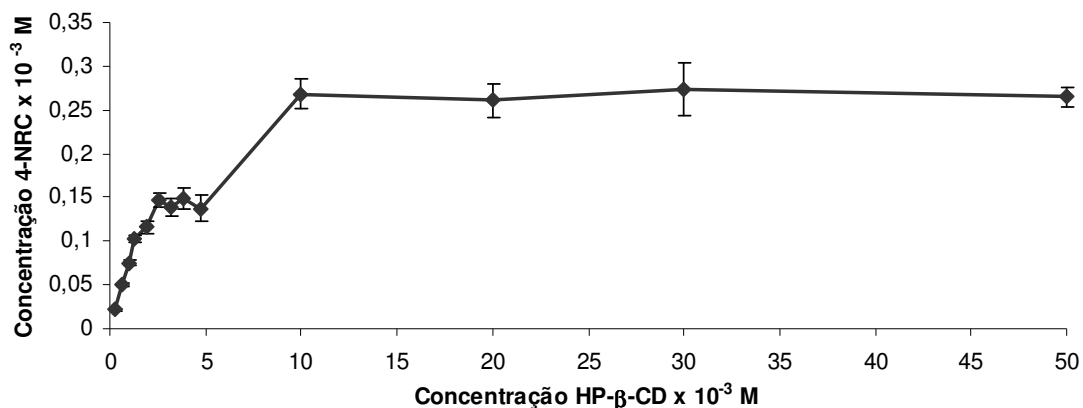


Figura 20. Diagrama de solubilidade de fases de 4-NRC em solução aquosa em função das concentrações de HP- β -CD.

A obtenção do diagrama do tipo B indica a formação de um complexo de inclusão com solubilidade limitada em água, fato esse corroborado pela incompleta solubilização do 4-NRC (Tabela 6). Estudos complementares poderão ser realizados com maiores concentrações de HP- β -CD, até o ponto limite da precipitação do complexo (ponto *b* do diagrama de solubilidade de fases, figura 8).

Diante da formação de um complexo de solubilidade limitada, vislumbra-se a possibilidade de estudos de microencapsulação do 4-NRC com CDs de maior solubilidade aquosa, *p.e.* a sulfobutiléter- β -CD, na tentativa de se obter complexos de inclusão do tipo A (*i.e.* solubilidade não limitada pelo meio).

Diante do perfil de solubilidade intrínseca do 4-NRC, aliada aos dados de biodisponibilidade prévios (REZENDE e BARROS, 2004) pode-se sugerir que o 4-NRC seja tentativamente classificado como um fármaco classe II (baixa

solubilidade/alta permeabilidade), como definido pelo Sistema de Classificação Biofarmacêutica de Fármacos (AMIDON et al., 1995). Contudo, Loftsson (2002) afirma que as substâncias originalmente pertencentes às classes II e IV tendem a comportar-se como classe I (alta solubilidade e permeabilidade) após a formação do complexo, elevando assim a biodisponibilidade destas.

Embora a biodisponibilidade seja uma característica importante no desenvolvimento de novos fármacos, Lipinski (2004) afirma que promissores candidatos a fármacos devem possuir, além de boas características de solubilidade ($\log P$ entre 2-3), apresentar número de unidades de massa atômica menor ou igual a 500, número de sítios receptores de ligação de hidrogênio menor ou igual a 10, além de número de sítios doadores de ligação de hidrogênio menor ou igual a 5. Dentre estas características, apenas o $\log P$ do 4-NRC ($6,997 \pm 0,37$) não se encontra entre os limites pré-estabelecidos. Deste modo, a redução do $\log P$ por meio da microencapsulação deve convertê-lo num protótipo ideal de fármaco.

4.3.2. Determinação da constante de estabilidade (K) do complexo de inclusão 4-NRC:HP- β -CD

A determinação da constante de estabilidade (K) do complexo foi realizada a partir da porção ascendente e linear do diagrama de solubilidade (Figura 21), segundo Higuchi e Connors (1965):

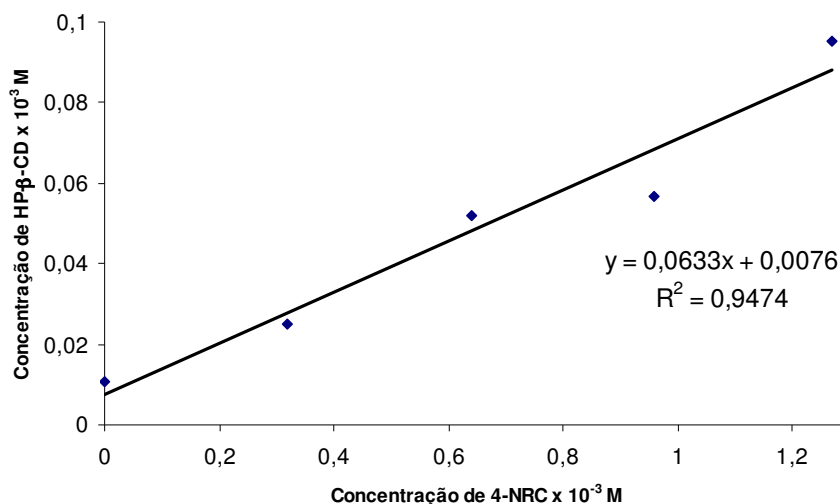


Figura 21: Porção ascendente e linear do diagrama de solubilidade de fases.

A constante de estabilidade obtida neste estudo ($6494 \pm 837 \text{ M}^{-1}$) (Tabela 7) permite inferir que o complexo formado exibe boa estabilidade. Segundo Blanco e col. (1991), e Pitha e col. (1986), somente os complexos com K compreendidas entre 200 e 5000 M^{-1} possuem aplicações práticas, visto que, os complexos lábeis ($k < 200 \text{ M}^{-1}$) levam à liberação prematura do fármaco e os complexos muito estáveis ($K > 5000 \text{ M}^{-1}$) originam uma liberação retardada ou incompleta da droga.

Tabela 7. Constante de estabilidade (K) do complexo de inclusão de 4-NRC:HP- β -CD, determinada pelo estudo de solubilidade de fases.

$S_o \text{ (M)} \times 10^{-5}$	Inclinação	$K \text{ (M}^{-1}\text{)} \times 10^3$
$1,06 \pm 0,542$	$0,064 \pm 0,008$	$6,494 \pm 0,837$

Contrariamente aos estudos referidos anteriormente, Koizumi e col. (1987) obtiveram valores de K entre 7 e 100 M^{-1} para fenobarbital em diversas CDs, com significativa melhora nas propriedades físico-químicas da substância. Já o trabalho de complexação do estradiol com dimetil- β -CD (VENTURA et al., 1994) apresentou valor de $K = 55000 \text{ M}^{-1}$, *i.e.*, muito superior ao valor máximo, no entanto, com expressiva melhora da estabilidade de suas propriedades físico-químicas.

Estudos prévios com outros catecóis demonstram valores de K próximos ao encontrado neste trabalho ($8,61 \pm 0,9 \times 10^3$ e $8,8 \pm 1,1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$) com promoção significativa na estabilidade e na solubilidade em água (IMONIGIE e MACARTNEY, 1992; AFKHAMI e KHALAFI, 2007), enfatizando presumível aplicabilidade para o suposto complexo de inclusão desenvolvido neste trabalho.

4.4. Análise e caracterização da mistura física e dos complexos de inclusão.

4.4.1. Espectrofotometria de Infravermelho

Os espectros de infravermelho são apresentados na Figura 22. O espectro de HP- β -CD (Figura 22a) indica banda de alta intensidade em 3401 cm^{-1} [$\nu(\text{O-H})$], 2930 cm^{-1} [$\nu(\text{C-H})$], 1158 e 1031 cm^{-1} [$\nu(\text{C-O})$]. O espectro de 4-NRC (Figura

22b) mostra entre outras, bandas características de insaturações em 1635 e 1522 cm^{-1} [$\nu(\text{C}=\text{C})$], e de estiramento C-O em 1285 cm^{-1} [$\nu(\text{C}-\text{O})$].

No espectro da mistura física (Figura 22c) observa-se um somatório das bandas referentes ao 4-NRC (1519 e 1286 cm^{-1}) e à HP- β -CD (2926, 1157 cm^{-1}) sugerindo que a amostra é apenas uma mistura das duas substâncias, sem interações significativas.

O espectro do produto obtido por malaxagem (Figura 22d) apresentou bandas mais intensas em 3392 e 1157 cm^{-1} atribuídas à HP- β -CD. O mesmo foi observado para o complexo de inclusão obtido por liofilização (Figura 22e), que apresentou bandas em 3391, 1158 e 1032 cm^{-1} , também correspondentes à HP- β -CD. Em contrapartida, foi observada, nesses espectros a ausência das bandas características do 4-NRC (1635 e 1522 cm^{-1}).

A intensidade da absorção no infravermelho está relacionada com a energia do fóton que pode ser transferida à molécula, a qual depende da variação de dipolo durante sua vibração. Se há menor amplitude para que a vibração ocorra, a variação de dipolo ocorrerá de forma restrita, ou não ocorrerá e, conseqüentemente a intensidade da banda será menor ou desaparecerá (MANHÃES, 1998).

Assim, o desaparecimento das bandas referentes ao 4-NRC no espectro dos produtos obtidos por liofilização e malaxagem, somados aos resultados obtidos na TG, constituem indício de interação do 4-NRC na cavidade da HP- β -CD (VEIGA et al., 1997).

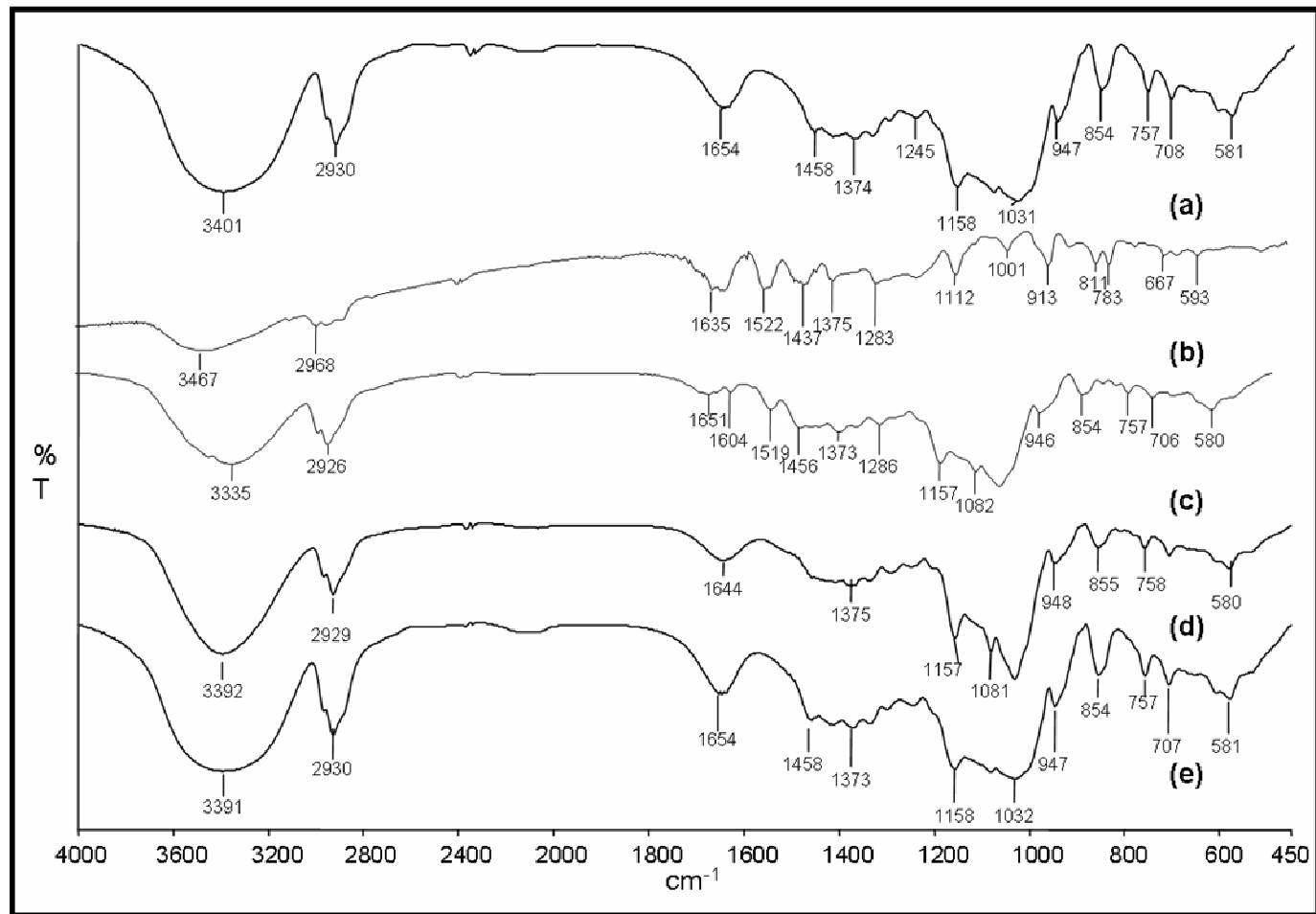


Figura 22. Espectros de infravermelho de (a) HP- β -CD, (b) 4-NRC (c) Mistura física HP- β -CD:4-NRC (d) Complexo HP- β -CD:4-NRC por malaxagem, (e) Complexo HP- β -CD:4-NRC por liofilização.

4.4.2. Análise Térmica

Os termogramas (TGs) estão representados na figura 23. Os picos da DTG em 207 °C e 350 °C são observados para o 4-NRC e HP- β -CD, respectivamente, e referem-se à decomposição térmica destes compostos.

Nos TGs da mistura física e do produto obtido por malaxagem é observada uma diminuição da intensidade do pico de degradação térmica do 4-NRC, com deslocamento do intervalo de degradação térmica para faixas de temperatura mais elevadas, com máximo em 350°C. Esse resultado indica a ocorrência de interações entre 4-NRC e a HP- β -CD, com provável formação do complexo, porém, ainda incompleta, devido à presença de vestígios de 4-NRC puro, evidenciada na figura 23 por círculos vermelhos.

No TG do produto obtido por liofilização não se observa o pico do 4-NRC em 207°C, com total deslocamento deste para a temperatura de 350°C. Esse resultado indica uma forte interação entre as moléculas, com possível formação de um sólido amorfo e/ou a formação de um complexo de inclusão (KUROZUMI et al., 1975; ESCLUSA-DIAZ et al., 1994; MURA et al., 1999; FERNANDES et al., 2002).

O deslocamento do pico da DTG referente à degradação do 4-NRC para temperaturas mais elevadas (de 207°C para 350°C), sugere que a interação entre 4-NRC e HP- β -CD, promove o aumento da estabilidade térmica do 4-NRC tanto pelo método da malaxagem, quanto por liofilização, resultado este corroborado pelo valor de constante de estabilidade obtido ($6494 \pm 837 \text{ M}^{-1}$).

Deste modo, sugere-se que a metodologia de preparo do complexo de inclusão por liofilização demonstrou ser mais eficiente, quando comparada à malaxagem, fato este observado pela presença de vestígios do 4-NRC livre no produto obtido neste último, conforme destacado na figura 23.

A provável elevação da estabilidade térmica do 4-NRC, devido à formação do complexo de inclusão por liofilização, pode possibilitar o desenvolvimento de formulações orais *p.e.* comprimidos por compressão direta do pó, visto que, o processo que fabricação tradicional de comprimidos pode acarretar na degradação de substâncias termolábeis.

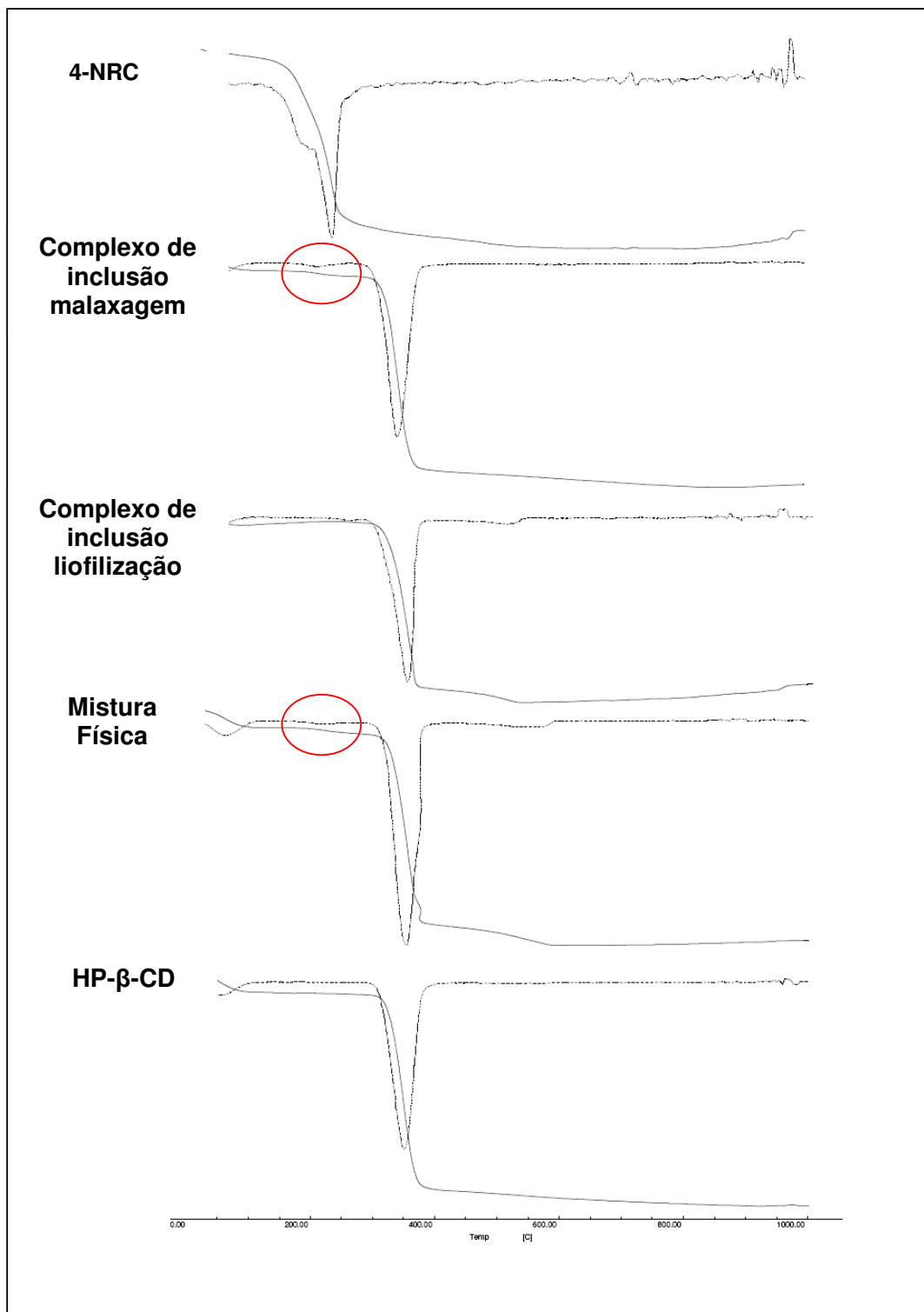


Figura 23. Termogramas de 4-NRC, do complexo HP-β-CD: 4-NRC por malaxagem, do complexo HP-β-CD: 4-NRC por liofilização, da mistura física de HP-β-CD:4-NRC e da HP-β-CD

4.4.3. Ressonância Magnética Nuclear de ^1H

A inclusão do 4-NRC na cavidade da HP- β -CD foi avaliada por meio das alterações nos valores de deslocamentos químicos (δ) dos hidrogênios da CD na ausência e presença do 4-NRC. O método fundamenta-se nas modificações causadas no ambiente químico dos hidrogênios localizados na cavidade da molécula de CD pela presença de uma molécula hospedeira, fornecendo evidências diretas da complexação (CALABRO et al., 2004; VEIGA et al., 2001).

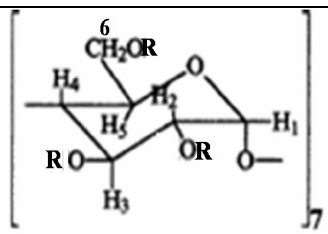
A HP- β -CD possui seis hidrogênios identificáveis por RMN (Figura 24). Os hidrogênios H1, H2, H4 situam-se na superfície externa da molécula, enquanto os hidrogênios H3 e H5 localizam-se em sua cavidade ou superfície interna, e são muito importantes para o estudo da interação entre as moléculas hóspede-hospedeira. Já o hidrogênio H6 localiza-se na cadeia lateral da HP- β -CD e, às vezes, pode também interagir com a molécula hóspede.

A tabela 8 apresenta as atribuições dos hidrogênios da HP- β -CD e as alterações nos deslocamentos químicos (δ) devido à complexação. O hidrogênio H3, na molécula de HP- β -CD pura, apresenta sinal em δ 3,97, e mostra-se deslocado para δ 3,94 no complexo por liofilização, o hidrogênio H5 sofre modificação de δ 3,74 para 3,72 ppm. Os valores obtidos para os hidrogênios situados na cavidade da HP- β -CD, em região de maior blindagem, sugere a formação do complexo entre 4-NRC e HP- β -CD (CALABRO et al. 2004; SUN et al., 2006; HAZEKAMP e VERPOORTE, 2006).

O hidrogênio H6 também sofre modificação de δ 3,88 para 3,87, sugerindo a interação deste com o 4-NRC. Infelizmente os deslocamentos químicos dos hidrogênios H2 e H4 não puderam ser determinados devido à sobreposição destes sinais no espectro. Os dados espectrais da HP- β -CD e do produto obtido na liofilização podem ser visualizados nas figuras 24 e 26, respectivamente.

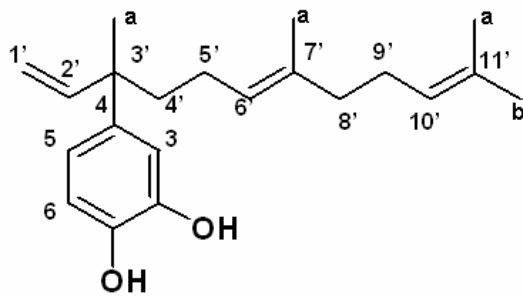
A determinação da constante de acoplamento e as multiplicidades dos sinais para os hidrogênios da HP- β -CD não foram obtidas em função desta ciclodextrina constituir-se numa mistura de isômeros (VEIGA et al., 2001). Idealmente emprega-se a β -CD como complexante (indisponível nesta ocasião), de modo a verificar tais determinações pela técnica de RMN.

Tabela 8. Alterações dos sinais RMN ^1H (D_2O , 500MHz) de HP β CD e 4-NRC livres e no complexo de inclusão por liofilização. Onde $\Delta\delta = \delta_{\text{complexo}} - \delta_{\text{livre}}$; n.r.: não resolvido; n.d.: não determinado.



R= H ou $\text{CH}_2\text{CHOHCH}_3$

HP β CD	δ livre	δ complexo	$\Delta\delta$
H-1	5,08	5,08	0,00
H-2	n.r.	n.r.	n.d.
H-3	3,97	3,94	-0,03
H-4	n.r.	n.r.	n.d.
H-5	3,74	3,72	-0,02
H-6	3,88	3,87	-0,01



4-NRC	δ livre	δ complexo	$\Delta\delta$
CH_3 (3'a)	1,07	1,45	+0,38
CH_3 (11'b)	1,38	1,62	+0,24
CH_3 (11' a)	1,46	1,66	+0,20
CH_3 (7'a)	1,54	1,73	+0,19

Nos espectros da malaxagem e mistura física (Figuras 27 e 28, respectivamente), as alterações dos deslocamentos químicos observadas para os hidrogênios na cavidade da HP- β -CD também sugerem interações entre as moléculas hóspede-hospedeira quando preparadas por estas metodologias, no entanto, com menor eficiência dada pelos valores de δ encontrados.

Na figura 29 a reunião dos espectros do 4-NRC, HP- β -CD, mistura física e complexos de inclusão por liofilização e malaxagem permite evidenciar as alterações

nos deslocamentos químicos dos hidrogênios da HP- β -CD e do 4-NRC, destacados por barras vermelhas e azuis, respectivamente.

O reflexo das alterações nos deslocamentos químicos (δ) dos hidrogênios da molécula de 4-NRC não foi evidenciado nos complexos obtidos e nem tampouco na molécula isolada, devido à baixa solubilidade desta em D₂O. Tal fato impediu uma clara definição e resolução dos sinais no espectro desta substância. Neste caso, apenas as metilas puderam ser claramente analisadas quanto à multiplicidade dos seus sinais (Figura 25 e tabela 8).

A desblindagem dos hidrogênios metílicos observada pelo elevado valor de $\Delta\delta$ (tabela 8), nos espectros dos produtos de liofilização e malaxagem, sugerem interações van der Waals entre duas moléculas de 4-NRC, e interações destas com a com a cavidade da HP- β -CD.

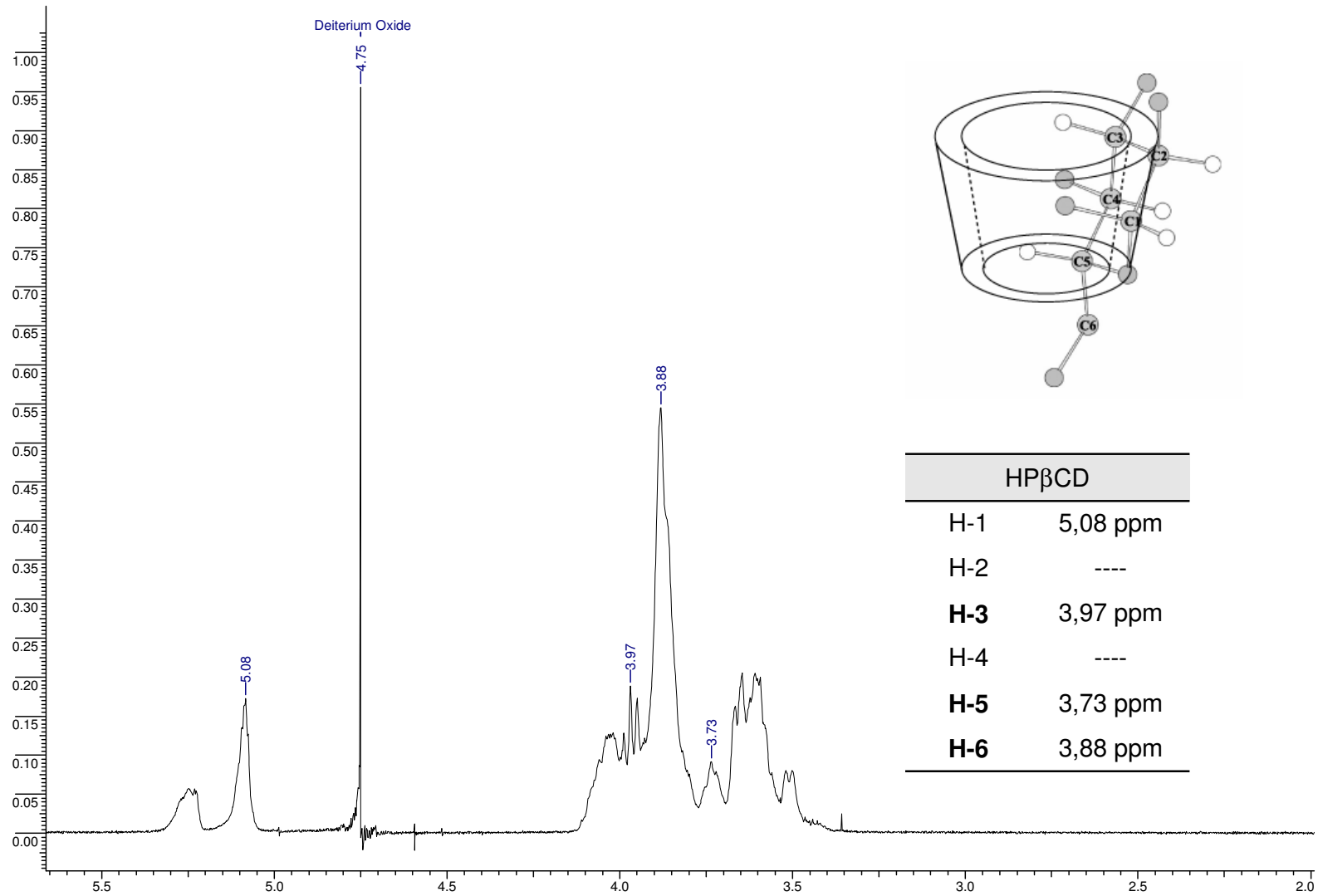


Figura 24. Espectro de RMN ^1H da HP- β -CD ($\text{D}_2\text{O}/ 500\text{MHz}$)

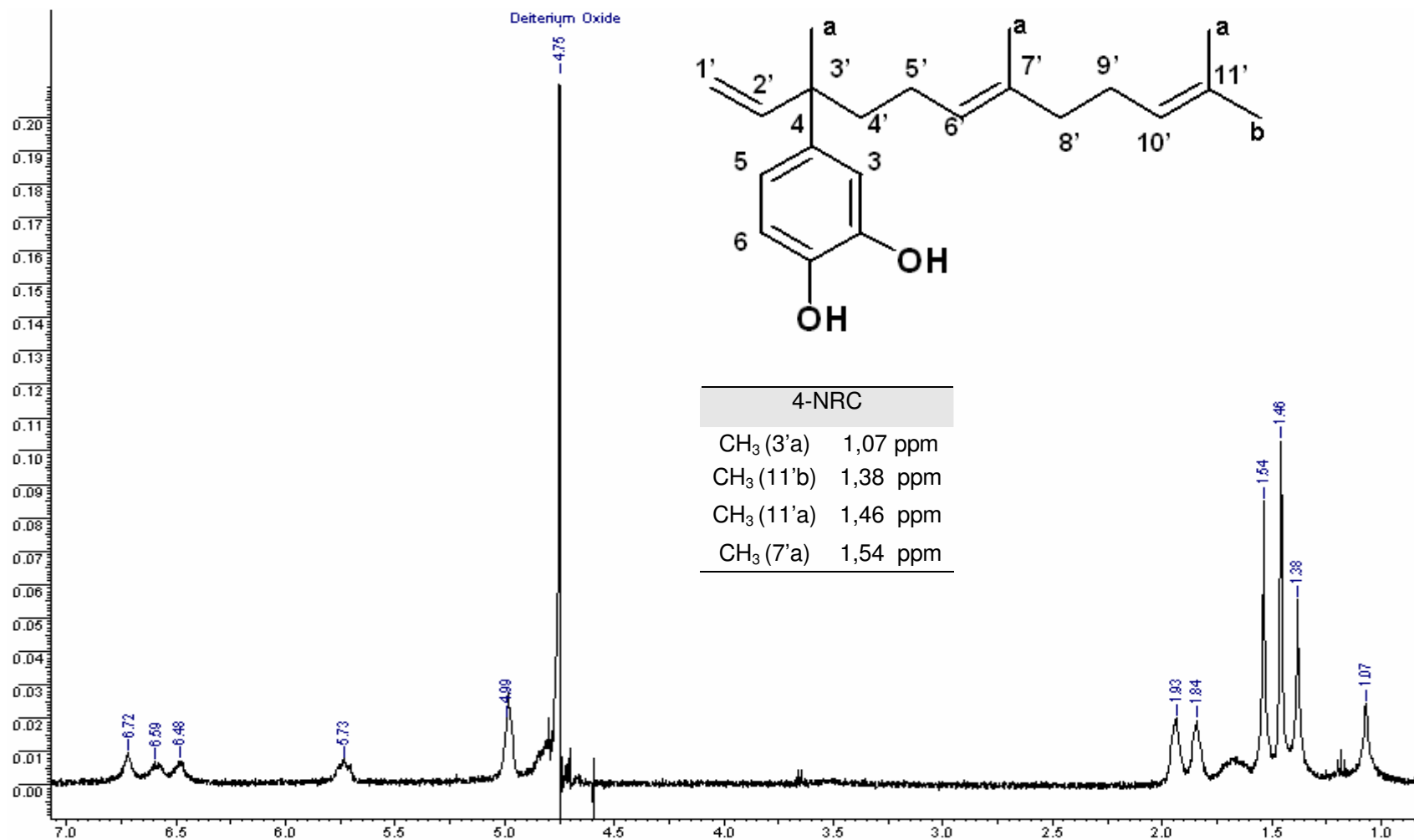


Figura 25. Espectro de RMN ¹H de 4-NRC (D₂O/ 500MHz)

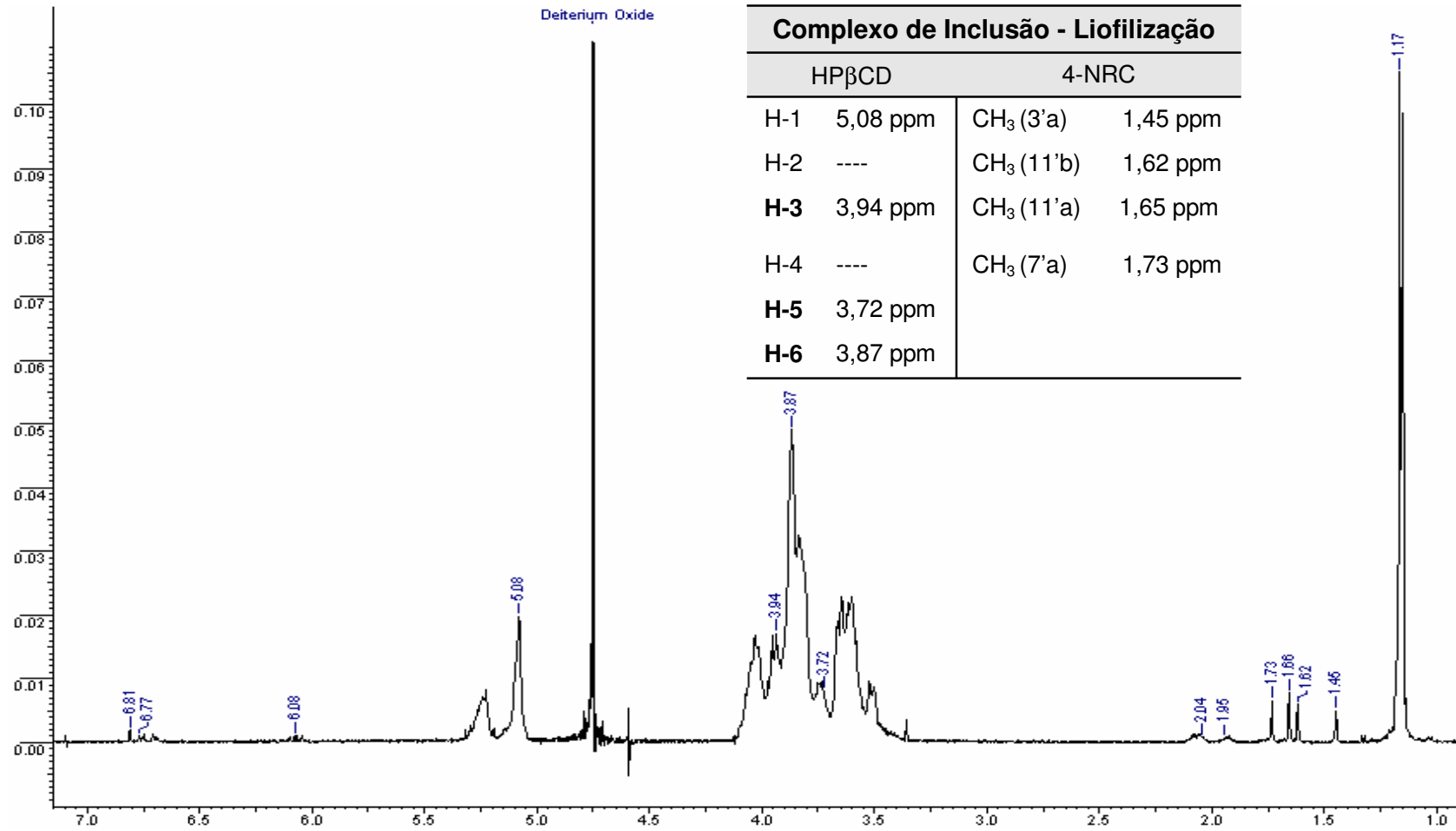


Figura 26. Espectro de RMN ¹H do complexo de inclusão de 4-NRC: HP-β-CD obtido por liofilização (D₂O/ 500MHz)

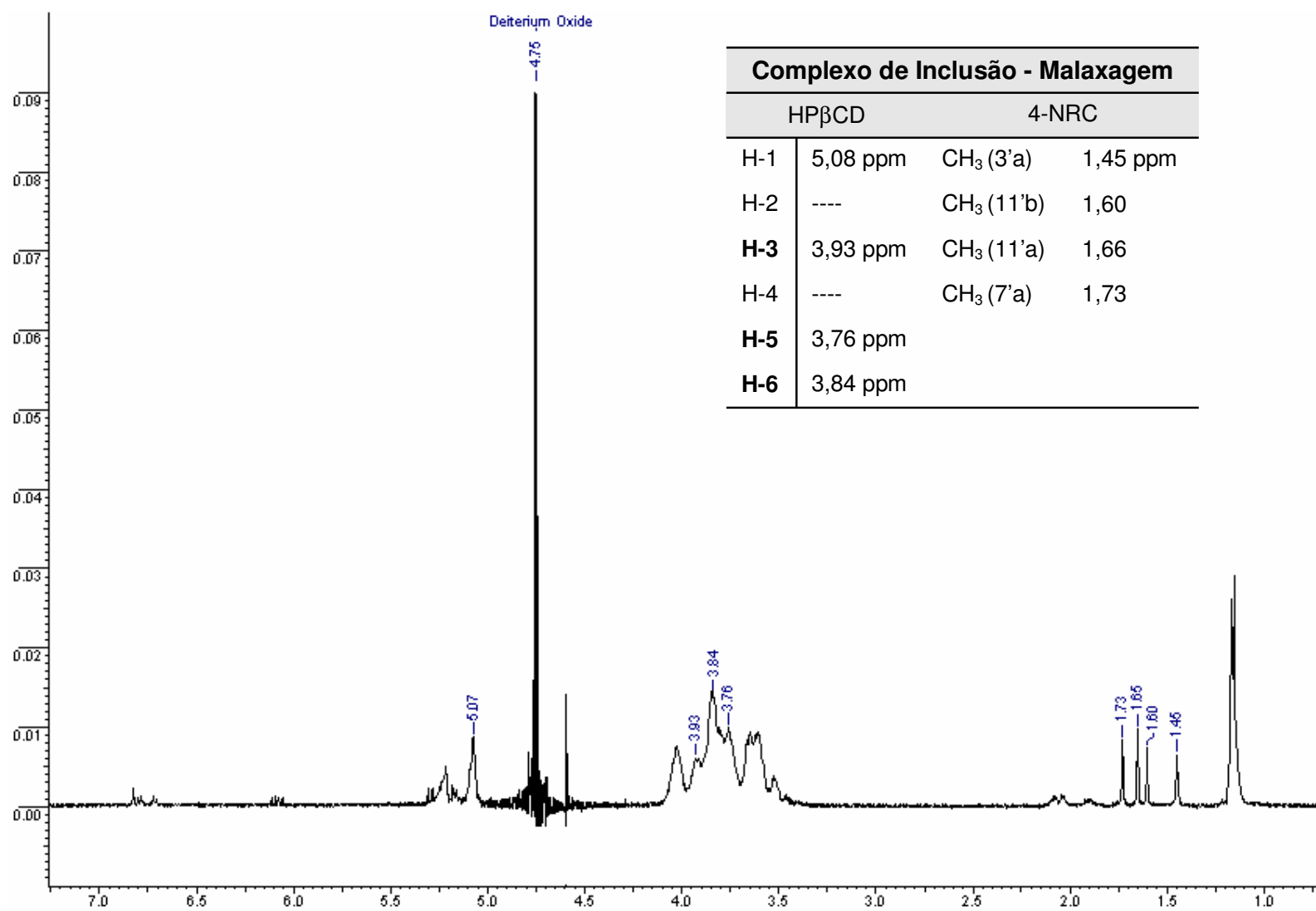


Figura 27. Espectro de RMN ¹H do complexo de inclusão de 4-NRC: HP-β-CD obtido por malaxagem (D₂O/ 500MHz)

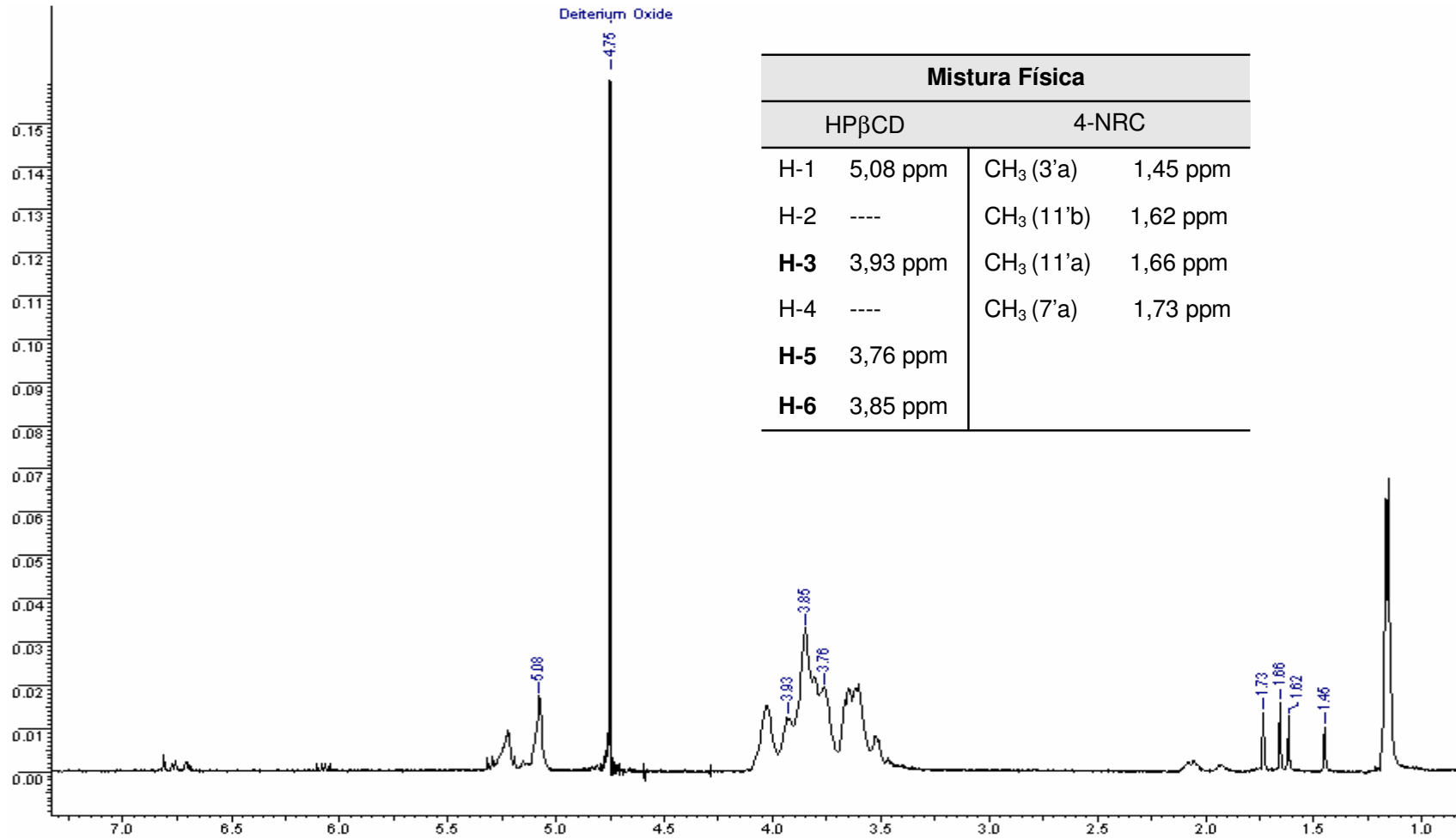


Figura 28. Espectro de RMN ¹H da mistura física de 4-NRC: HP-β-CD (D₂O/ 500MHz)

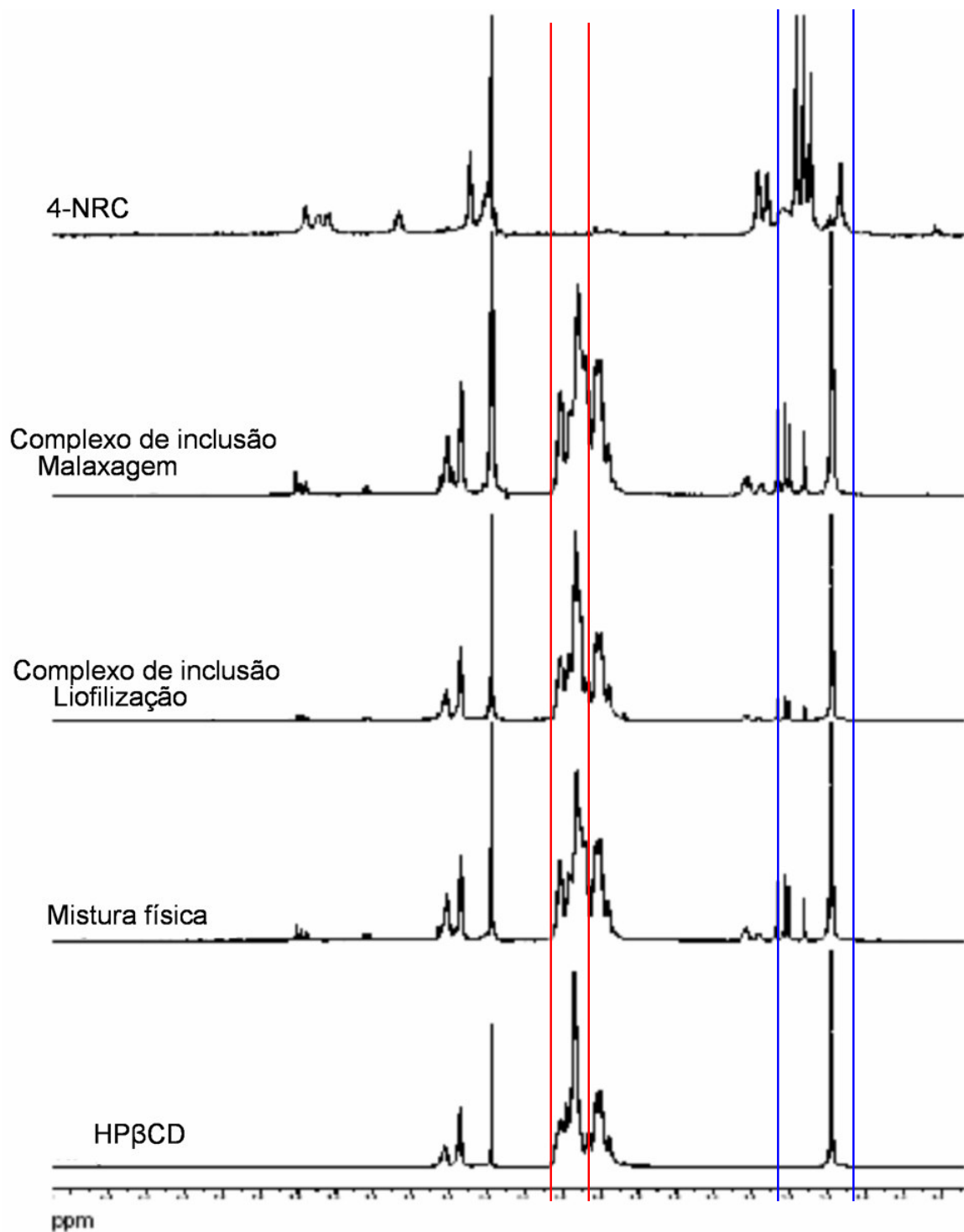


Figura 29. Espectros de RMN ^1H do 4-NRC, complexos de inclusão de 4-NRC: HP- β -CD por liofilização e por malaxagem, mistura física 4-NRC: HP- β -CD e HP- β -CD. Em vermelho salienta-se as alterações dos hidrogênios da HP- β -CD, e em azul do 4-NRC.

4.4.4. Determinação da estequiometria do complexo por espectrofotometria UV-VIS.

O parâmetro físico-químico analisado neste trabalho foi a intensidade de absorção de luz ultravioleta do 4-NRC na ausência (A_0) e na presença (A) de HP- β -CD à 282 nm. Os resultados estão expressos na tabela 9.

A análise dos dados foi realizada construindo-se um gráfico (Figura 30) de $\Delta A \cdot r$ em função de r , onde ΔA representa a diferença da absorbância do analito na presença (A) e na ausência (A_0) de HP- β -CD ($\Delta A = A_0 - A$) e r representa a razão molar de 4-NRC num ponto qualquer ($r = [4\text{-NRC}] / \{[4\text{-NRC}] + [HP\text{-}\beta\text{-CD}]\}$).

Numa dada razão (r), a concentração do complexo fármaco:ciclodextrina atingirá um máximo, correspondente ao ponto onde a derivada $d[\text{fármaco:ciclodextrina}]/dr = 0$ (Figura 30), uma vez que ΔA implica na concentração do complexo (JOB, 1928; HIRAYAMA e UEKAMA, 1987; LOUKAS, et al., 1998; GIBAUD et al., 2005; LANDY et al., 2007; FRACETO et al., 2007).

Tabela 9. Variação dos valores de absorbância ultravioleta de 4-NRC em presença (A) e ausência (A_0) de HP- β -CD e r = razão molar de 4-NRC, R = razão molar de HP- β -CD e $\Delta A = A_0 - A$, ($\lambda = 282$ nm).

R	r	A_0	A	ΔA	$\Delta A \times r$
1	0	0,000	0,000	0,000	0,000
0,8	0,2	0,339	0,334	0,006	0,001
0,66	0,33	0,516	0,506	0,010	0,003
0,5	0,5	0,802	0,773	0,029	0,014
0,33	0,66	0,890	0,863	0,027	0,018
0,2	0,8	0,890	0,878	0,012	0,010
0	1	0,893	0,893	0,000	0,000

A posição de máximo no "Job plot" ocorre em $r \approx 0,66$ para o 4-NRC, sugerindo que o complexo entre 4-NRC e HP- β -CD, possui proporção estequiométrica de 2:1 (0,66 de 4-NRC para 0,33 HP- β -CD) (LOUKAS et al., 1998; HIRAYAMA e UEKAMA, 1987). Outros complexos de inclusão com estequiometria 2:1 (substância hóspede: ciclodextrina) foram obtidos para o adamantanol (LANDY e

col., 2007); azuleno (ABOU-ZEID, 2005); tetrahydrocannabinol (HAZEKAMP e VERPOORTE, 2006) e alguns retinóides (MUNOZ-BOTELLA et al., 2006).

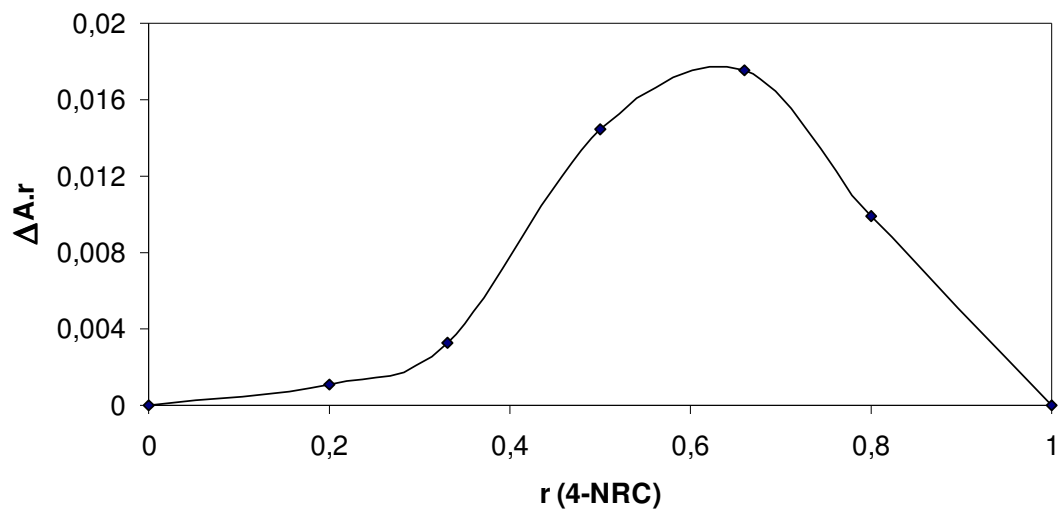


Figura 30. Variação de intensidade de absorvância de 4-NRC (Job's plot) em diferentes razões molares de 4-NRC:HP- β -CD, ($\lambda = 282$ nm).

Conclusões

5. Conclusões

Neste trabalho, o fracionamento do extrato bruto de *P. umbellata* obtido (1,8%) possibilitou otimizar a purificação do 4-NRC em Sephadex LH20 com rendimento (11,5%), bastante superior aos demais trabalhos, ora publicados.

A metodologia analítica desenvolvida em CLAE-UV mostrou-se adequada à quantificação do 4-NRC em fase aquosa, pois demonstrou boa sensibilidade (3 µg/mL), excelente linearidade ($R^2=0,999$) com precisão intra- (0,05 – 5,32%) e inter-ensaio (0,28 – 2,76%), além de exatidão (95,58 – 101,29%) de medidas, todas de acordo com a Resolução 899/2003 da ANVISA.

Na preparação do complexo de inclusão, a liofilização demonstrou ser a técnica mais eficiente, quando comparada a malaxagem, provavelmente em função da velocidade mais lenta do processo otimizar o processo de complexação. Tal eficiência é sugerida devido à inexistência de 4-NRC livre no produto liofilizado, mas detectado, em vestígios, no TG do produto da malaxagem (figura 23).

A classificação do complexo de inclusão obtido (tipo B_S) e a determinação da constante de estabilidade ($6494 \pm 837 \text{ M}^{-1}$) foram obtidas com sucesso, utilizando o diagrama de solubilidade de fases de HIGUCHI e CONNORS (1965), apontando a formação de um complexo estável e com potencial desenvolvimento farmacotécnico.

Além disso, diante do perfil de solubilidade original do 4-NRC e àquele obtido para os produtos de liofilização e malaxagem, cuja solubilidade foi 26 vezes superior à original, sugere-se que nestes produtos, o 4NRC pode comportar-se como uma substância da classe I (alta solubilidade e permeabilidade) (AMIDON et al., 1995).

Por fim, os dados de RMN de H^1 evidenciaram destacada desblindagem ($\Delta\delta$) dos hidrogênios metílicos sugerindo a interação entre duas moléculas de 4-NRC, e destas com a cavidade da HP- β -CD, nos produtos de liofilização e malaxagem.

A estequiometria determinada para o complexo de inclusão de 4-NRC em HP- β -CD foi de 2:1, segundo o método de variação contínua.

Perspectivas

6. Perspectivas

O sucesso na introdução de um novo fármaco no mercado não é apenas um processo complicado e de custo extremamente elevado, mas também carregado de substancial risco de falhas. Na atualidade, cerca de 10000 substâncias são necessárias para colocar um único medicamento no mercado. E a principal contribuição a esta elevada taxa de retiradas (mais de 40%) refere-se ao perfil de metabolismo e farmacocinética dos candidatos, onde estão envolvidas propriedades biofarmacêuticas desfavoráveis, como fraca solubilidade e permeabilidade (PALMER, 2003).

Neste contexto, espera-se que a melhoria das propriedades biofarmacêuticas do 4NRC, enfocadas neste trabalho, possa contribuir de modo substancial no desenvolvimento de medicamentos genuinamente brasileiros. Como perspectiva deste trabalho pode-se incluir o desenvolvimento de formulações orais *p.e.* comprimidos. Estes poderão ser desenvolvidos utilizando o complexo de inclusão de 4-NRC:HP- β -CD por compressão direta do pó, com a vantagem do processo inovador por "*freeze drying*" resultar em uma mínima degradação do 4-NRC, a qual ocorre durante os métodos convencionais de secagem. Além disso, outras formulações farmacêuticas nanoestruturadas poderão ser preparadas permitindo estudos de biodisponibilidade e de correlação farmacocinética-farmacodinâmica fortemente recomendado atualmente pelo FDA como estratégia de otimização do regime e intervalo de doses.

Além disso, outras avaliações físico-químicas poderão ser incorporadas à caracterização do complexo de inclusão formado, utilizando técnicas de difração de raios X, microscopia eletrônica de varredura, ROESY, DOSY e modelagem molecular a fim de caracterizar o arranjo espacial do complexo.

Estudos de estabilidade térmica, pH, fotólise e oxidação comparativa entre a molécula livre e o produto da microencapsulação, encontram-se em andamento.

No tangente ao perfil farmacológico do 4-NRC, resultados preliminares do grupo de pesquisa do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular, coordenado pela Profa Dra Marize C. Valadares, demonstraram que o 4-NRC possui uma surpreendente atividade anti-leucêmica, na forma livre e complexado com HP-

β -CD, sobre a linhagem leucêmica K-562, e anti-carcinoma sobre as células do tumor ascítico de Ehrlich. Neste estudo, verificou-se que a complexação com a HP- β -CD aumentou de forma significativa o perfil de citotoxicidade do 4-NRC, em relação à sua forma livre. Neste contexto, a perspectiva está no depósito e subsequente, obtenção de uma licença patentária referente ao preparo e utilização do complexo de inclusão do 4-NRC: HP- β -CD aplicado à utilização farmacológica potencial desta formulação farmacêutica inovadora (manuscrito em preparação).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOH, A. A.; ZUGHUL, M. B.; DAVIES, J. E. D., BADWA, A. A. Inclusion complexation of diclofenac with natural and modified cyclodextrins explored through phase solubility, $^1\text{H-NMR}$ and molecular modeling studies. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, v.57, p.503–510, 2007.

ABOU-ZEID, O. K.; A spectroscopic study of the inclusion of azulene by β and γ -cyclodextrins. *Spectrochim. Acta Part A*, v.62, p.245, 2005.

AFKHAMI, A.; KHALAFI, L. Spectrophotometric determination of the stability constant of the inclusion complexes of some catechol derivatives with β -cyclodextrin based on their reaction with iodate. *J. of the Chin. Chem. Soc.*, v. 54, p.957-962, 2007.

AMIDON, G. L.; LENNERNAS, H.; SHAH, V. P.; CRISON, J.R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm. Res.*, v.12, p.413-420, 1995.

AMORIM, C. Z.; FLORES, C. A.; GOMES, B. E.; MARQUES A. D. CORDEIRO, R. S. B. Screening for antimalarial activity in the genus *Pothomorphe*. *J. Ethnopharmacol.*, v.24, p.101-106, 1988.

ANDERSEN, F. A.; BUNGARD, H. Inclusion complexation of metronidazole with β -cyclodextrin and its depression of anhydrate-hydrate transition in aqueous suspensions. *Int. J. Pharm.*, v.19, p.189-197, 1984.

ARAÚJO, M. V. G.; VIEIRA, E. K. B.; LÁZARO, G. S.; CONEGERO, L. S.; FERREIRA, O. P.; ALMEIDA, L. E.; BARRETO, L.S.; COSTA JÚNIOR, N. B. C.; GIMENEZ, I.F. Inclusion complexes of pyrimethamine in 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin: characterization, phase solubility and molecular modelling. *Bioorg. Med. Chem.*, v.15, p.5752-5759, 2007.

ARCHONTAKI, H. A.; VERTZONI, M. V.; ATHANASSIOU-MALAKI, M. H. Study on the inclusion complexes of bromazepam with β - and hydroxypropyl- β -cyclodextrins. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v.28, p.761-769, 2002.

ASHNAGAR, A.; NASERI, N. G.; KHANAKI, B. Study of the β -cyclodextrin imipramine hydrochloride inclusion complex and determination of its stability constant (k) by UV-visible spectroscopy. *E-Journal of Chemistry*, v.4, n.4, p.550-558, 2007.

BADAWY, S. I. F.; GHORAB, M. M.; ADEYEYE, C. M. Characterization and bioavailability of danazol-hydroxypropyl- β -cyclodextrin coprecipitates. *Int. J. Pharm.*, v.28, p.45-54, 1996.

BARROS, S. B. M.; TEIXEIRA, D. S.; AZNAR, A. E.; MOREIRA JÚNIOR, J. A.; ISHII, I.; FREITAS, P. C. D. Antioxidant activity of ethanolic extracts of *Pothomorphe umbellata* L. Miq (Pariparoba). *J. Assoc. Adv. Sci.*, v.48, p.114-116, 1997.

BARROS, S.; ROPKE, C. D.; SAWADA, T. C. H.; SILVA, V. V.; PEREIRA, S. M. M.; BARROS, S. B. M et al. Assessment of acute and subchronic oral toxicity of ethanolic extract of *Pothomorphe umbellata* L. Miq (Pariparoba). *Braz. J. Pharm. Sci.*, v.41, n.1, p.53-61, 2005.

BEKERS, O.; UIJTENDAAL, E. V.; BEIJNEN. Cyclodextrins in pharmaceutical field. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, v.17, p.1503-1549, 1991.

BERNARD, H. O.; TIELI, K. Isolierung von 1-allyl-2,3-dimethoxy-4,5-methylendioxybenzol (=dill-apiol) aus *Heckeria umbellata* (L.) Kunth (Piperaceae). *Helv. Chim. Acta*, v.61, p.2273, 1978.

BERTACCHE, V.; LORENZI, N.; NAVA, D.; PINI, E.; SINICO, C. Host-guest interaction study of resveratrol with natural and modified cyclodextrins. *J. Inc. Phen. Macroc. Chem.*, v.55, p.279-287, 2006.

BIOKA, D.; ABENA, A. Psychopharmacological profile of *Piper umbellatum* aqueous extract. *L'Encephale*, v.16, p.205-208, 1990.

BLANCO, J.; VILA-JATO, J. L.; OTERO, F.; ANGUIANO, S. Influence of method of preparation on inclusion complexes of naproxen with different cyclodextrins. *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, v.17, p. 943-945, 1991.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução RE nº 899, de 29/05/2003.

BREWSTER, M. E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.59, p.645-666, 2007.

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

CAMPOS VIANA, V. R.; ALVES, H. M.; SIMOES, C.; FIGUEIREDO, S. F. L. Produção de 4-nerolidilcatecol em suspensões celulares de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq (Piperaceae). *Rev Cubana Plant Méd.*, v.9, n.1, 2004, ISSN 1028-4796.

CANOTILHO, J.; SOUSA, A. T. B. de; PINTO, J. A. M. da C. Análise térmica: interesse em tecnologia farmacêutica. Revisão do conjunto. *Revista Portuguesa de Farmácia*, v.42, n.4, p.5-12, 1992

CALABRO, M. L.; TOMMASINI, S.; DONATO, P.; RANIERI, D.; STANCANELLI, R.; FICARRA, P.; FICARRA, R., COSTA, C.; CATANIA, S.; RUSTICHELLI, C.; GAMBERINI, G. Effects of α - and β -cyclodextrin complexation on the physico-chemical properties and antioxidant activity of some 3-hydroxyflavones. *J. Pharm. Biom. Anal.*, v.35, p.365-367, 2004.

CEREDA, MARNEY PASCOLI. Ciclodextrinas: características e aplicações. In:_____. *Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas latino americanas*. v.3. São Paulo: Fundação Cargill, 2003, Cap. 17.

CHARTOL, A. *Piper umbellatum* a vegetable insect repellent. *Med. Trop.*, v.24, p.743, 1964.

CHOW, D. D.; KARARA, A. H. Characterization, dissolution and bioavailability in rats of ibuprofen- β -cyclodextrin complex system. *Int. J. Pharm.* v.28, p.95-101, 1986.

COIMBRA M. R.; SILVA, E. D. *Notas de Fitoterapia*. Rio de Janeiro, 1958. 292 p.

COLLINS C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. *Introdução a Métodos Cromatográficos*. 7.ed. Campinas: Ed. Unicamp, 1997. 279 p.

CONNORS, Kenneth. A. The Stability of cyclodextrin complexes in solution. *Chem. Rev.*, v.97, p.1325-1357, 1997.

DAVIS, M. E.; BREWSTER, M. E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nat. Rev. Drug Disc.* v.3, n.12, p.1023-1035, 2004.

DE FEO, V. Uso di piante ad azione antiinfiammatoria nell'Alto Ucayali Peru Orientali. *Fitoterapia*. v.62, p.481-494, 1991.

DESMACHELIER, C.; BARROS S.; REPETTO, M.; LATORRE, L. R.; KATO, M.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. 4-Nerolidylcatechol from *Pothomorphe spp* scavenges peroxy radicals and inhibits Fe(II)-dependent DNA damage. *Planta Med.*, v.67, p.561-563, 1997a.

DESMACHELIER, C.; MONGELLI, E.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Inhibition of lipid peroxidation and iron (II)-dependent DNA damage by extracts of *Pothomorphe peltata* (L.) Miq. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.30, p.85-91, 1997b.

DI STASI, L. C., HIRUMA, C. A., GUIMARÃES, E. M.; SANTOS, C. M. Medicinal plants popularly used in Brazilian Amazon. *Fitoterapia*, v.65, p.529-540, 1993.

ESCLUSA-D'IAZ, M., TORRES-LABANDEIRA, J., KATA, M., VILA-JATO, J. Inclusion complexation of glibenclamide with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin in solution and in solid state. *Eur. J. Pharm. Sci.*, v.1, p.291-296, 1994.

FERNANDES, C. M., VIEIRA, M. T., VEIGA, F. J. B. Physicochemical characterization and in vitro dissolution behavior of nicardipine-cyclodextrins inclusion compounds. *Eur. J. Pharm. Sci.*, v.15, p.79-88, 2002

FICARRA, R.; FICARRA, P.; DI BELLA, M. R.; RANERA, D.; TOMMASINI, S.; CALABRO, M. L.; GAMBERINI, M. C.; RUTSICHEL, C. Study of β -blockers/ β -cyclodextrin inclusion complex by NMR, DSC, X-ray and SEM investigation. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v.23, p.33-40, 2000.

FRACETO, L. F.; GONÇALVES, M. M.; MORAES, C. M.; de ARAÚJO, D. R.; ZANELLA, L.; de PAULA, E.; PERTINHEZ, T. A. Caracterização do complexo de inclusão ropivacaína: β -ciclodextrina. *Quim. Nova*, v.30, n.5, 1203-1207, 2007.

GIBAUD, S.; BEN ZIRAR, S.; MUTZENHARDT, P.; FRIES, I.; ASTIER, A. Melarsoprol-cyclodextrins inclusion complexes. *Int. J. Pharm.*, v.306, p.107-121, 2005.

GIORDANO, F.; NOVAK, C.; MOYANO, J. R. Thermal analysis of cyclodextrin and their inclusion compounds. *Thermoch. Acta*, v.380, p.123-151, 2001.

GOTTLIEB, O. R.; MORS, W. B. Potential utilization of brazilian wood extractives. *J. Agric Food Chem*, v.28, p.196-215, 1980.

GOULD, Sarah; SCOTT, Robert C.; 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD): A toxicology review. *Food and Chem. Toxic.*, v.43, p.1451–1459, 2005.

GUSTAFSON, K. R.; CARDELLINA, J.H.; McMAHON, J. B.; PANNELL, L. K.; CRAGG, G. M.; BOYD, M. R. The peltatols, novel HIV-inhibitory catechol derivatives from *Pothomorphe peltata*. *J. Org. Chem.*, v.57, p.2809-2811, 1992.

HAZEKAMP, A.; VERPOORTE, R. Structure elucidation of the tetrahydrocannabinol complex with randomly methylated- β -cyclodextrin. *Eur. J. Pharm. Sci.*, v.29, p-340-347, 2006.

HEDGES, A. R. Industrial applications of cyclodextrins. *Chem. Rev.*, v.98, p.2035-2044, 1998.

HIGUCHI, T.; CONNORS, K. A. Phase solubility techniques. *Adv. Anal. Chem. Instrum.*, v.4, p.117-212, 1965.

HIRAYAMA, F.; UEKAMA, K. Methods of investigating and preparing inclusion compounds. In: *Cyclodextrins and their Industrial uses*. Duchêne, D. Editions de Santé, Paris, p.133-172, 1987.

IMONIGIE, J. A.; MACARTNEY, D. H. Effects of cyclodextrin inclusion on the kinetics of the outer-sphere oxidation of 4- tert-butylcatechol by transition metal complexes in acidic aqueous media. *Inorg. Chem.*, v.32, p.1007-1012, 1993.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH); Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B, 2005.

IRIE, T.; UEKAMA, K. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological Issues and safety evaluation. *J. Pharm. Sci.*, v.86. n.2 p.147-162, 1997.

IVANOV, P. M.; SALVATIERRA, D.; JAIME, C.; Experimental (NMR) and computational (MD) studies on the inclusion complexes of 1-bromoadamantane with α -, β -, and γ -cyclodextrin. *J. Org. Chem.*, v.61, p.7012. 1996.

JINDRICH, Jindrich. *Synthesis of cyclodextrin dimer carriers of photodynamic sensitizers for cancer therapy*. Disponível em:
<http://jindrich.org/projects/cyclodextrins.html> Acesso em: 01 nov. 2007.

JOB, P. Formation and stability of inorganic complexes in solution. *Ann. Chim.*, v.9, p.113–203, 1928.

KATO, M. J. Global phytochemistry: the Brazilian approach. *Phytochemistry*, v. 57, n.5, p.621-623, 2001.

KIJOA, A.; GIESBRECHT, A. M.; AKISUE, M. K.; GOTTLIEB, O. R.; GOTTLIEB, H. E. The chemistry of Brazilian Piperaceae. 2. 4-nerolidylcatechol from *Pothomorphe umbellata*. *Planta Med.*, v.39 p.85-87, 1980.

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, v.4, n.3, p.206-20, 2005.

KOIZUMI et al.; Method for making a steroid water soluble. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v.35 n.8 p.3413-3418, 1987.

KRISTMUNDSTÓTTIR, T.; LOFTSSON, T.; HOLBROOK, W., P. Formulation and evaluation of hydrocortisone solution for the treatment of oral disease. *Int. J. Pharm.*, v.139, p.63-68, 1996.

KUROZUMI, M.; NAMBU, N.; NAGAI, T. Inclusion compounds of non-steroidal anti-inflammatory and other slightly water soluble drugs with α and γ -cyclodextrins in powdered form. *Chem. Pharm. Bull.*, v.23, p.3062-3068, 1975.

LANDY, D.; TETART, F.; TRUANT E.; BLACH, P.; FOURMENTIN, S.; SURPATEANU, G. Development of a competitive continuous variation plot for the determination of inclusion compounds stoichiometry. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, v.57, p.409–413, 2007.

LI, S.; PURDY, W. C. Cyclodextrins and their applications in analytical chemistry. *Chem. Rev.*, v.92, p.1457-1470, 1992.

LIPINSKI, C. A. Lead- and drug-like compounds: The rule-of-five revolution. *Drug Discov. Today: Technol.*, v.1 n.4, p.337-341, 2004.

LIPKOWITZ, Kenny B. Applications of Computational Chemistry to the Study of Cyclodextrins. *Chem. Rev.*, v.98, p.1829-1873, 1998.

LIU, H-M.; SUGIMOTO, N.; AKIYAMA, T.; MAITANI, T. et al. Constituents and their sweetness of food additive enzymatically modified licorice extract. *J. Agric. Food Chem.*, v.48, n.12, p.6044-6047, 2000.

LIU, L.; GUO, Q-X. The driving forces in the inclusion complexation of cyclodextrins. *J. Inc.Phén. Macroc. Chem.*, v.42, p.1-14, 2002.

LIU, L.; ZHU, S. Preparation and characterization of inclusion complexes of prazosin hydrochloride with β -cyclodextrin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v.40, p.122-127, 2006.

LOFTSSON, T.; BJÖRNSDÓTTIR, S.; PÁLSDÓTTIR, G.; BODOR, N. The effects of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin on the solubility and stability of chlorambucil and melphalan in aqueous solution. *Int. J. Pharm.*, v.57, p.63-73, 1989.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, E. M. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. Drug solubilization and stabilization. *Int. J. Pharm. Sci.*, v.85, p.1017-1025, 1996.

LOFTSSON, T. Cyclodextrins and the Biopharmaceutics Classification System of Drugs. *J. Inc.Phén. Macroc. Chem.*, v.44, n.1, p.63-67, 2002.

LOFTSSON, T. Cyclodextrin. 2002. Disponível em:
<<http://www.hi.is/~thorstlo/general.pdf>> Acesso em 1º de março de 2006.

LOFTSSON T.; HREINSDÓTTIR, D., MÁSSON, M. Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs. *Int. J. Pharm.*, v.302, 18-28, 2005a.

LOFTSSON, T.; JARHO, P.; MÁSSON, M.; JÄRVINEN, T. Cyclodextrin in drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.*, v.2, p.335-351, 2005b.

LOUKAS, Y. L.; VRAKA, V.; GREGORIADIS, G.; Drugs in cyclodextrins, in liposomes: a novel approach to the chemical stability of drugs sensitive to hydrolysis. *Int. J. Pharm.*, v.162, p.137-142, 1998.

LOUKAS, Y. L.; VRAKA, V.; GREGORIADIS, G. Novel non-acid formulations of haloperidol complexed with β -cyclodextrin derivatives. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v.16, p.263-268, 1997.

MANHÃES, Giácoma Frasson. *Compostos de inclusão com β -ciclodextrinas como convidados orgânicos e organometálicos*. Dissertação de Mestrado – Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1998.

MANOSROI, J.; APRIYANI M. G.; FOE K.; MANOSROI A. Enhancement of the release of azelaic acid through the synthetic membranes by inclusion complex formation with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Int. J. Pharm.*, v.293, p.235–240, 2005.

MARTÍN, L. et al. Detection and characterization of cyclodextrin complexes with β -carboline derivatives by spectroscopic techniques. *J. Pharmac. Biom. Anal.*, v.32, p.991-1001, 2003.

MASSON, M.; LOFTSSON, T.; MASSON, G.; STEFANSSON, E.: Cyclodextrins as permeation enhancers: some theoretical evaluations and in vitro testing. *J. Control Release*, v.59, p.107–118, 1999.

MIYAKE, K.; IRIE, T.; ARIMA, H.; UEKAMA, K. Characterization of itraconazole/ 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex in aqueous propyleneglycol solution. *Int. J. Pharm.*, v.179, p. 237-245, 1999.

MONGELLI, E.; DESMARCHELIER, F.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Actividad antimicrobiana e interacción con el AND de plantas medicinales de la Amazonia peruana. *Rev. Arg. Microb.*, v.27, p.199-203, 1995.

MONGELLI, E.; ROMANO, A.; DESMARCHELIER, C.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Cytotoxic 4-nerolidylcatechol from *Pothomorphe peltata*. Inhibits topoisomerase I activity. *Planta Med.*, v.65, p.376-378, 1999.

MORAES, M. S. Considerações sobre a pariparoba oficial *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. *Rev. Bras. Farmacog.*, v.1, p.101-103, 1986.

MORAES, C. M.; ABRAMI, P.; PAULA, E.; BRAGA, A. F. A.; FRACETO, L. F. Study of the interaction between S(-) bupivacaine and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Int. J. Pharm.* v.331, p.99-106, 2007.

MORAES, M. S.; OLIVEIRA, F.; MACINI, B.; AKISUE, M. B.; AKISUE, G. Morfodiagnose das folhas e sumidades floridas da droga Pariparoba (*Pothomorphe umbellata* (L) Miq.). *Rev. Ciênc. Farm.*, v.8/9, p.77-90, 1986-1987.

MUKNE, A. P.; NAGARSENKER, M. S. Trianterene- β -cyclodextrin systems: preparation, characterization and *in vivo* evaluation. *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, 5 (1), artigo 19, 2004. Disponível em: <http://www.aapspharmscitech.org> Acesso em 11 de julho de 2007.

MUNOZ-BOTELLA, S.; MARTIN, M. A.; DEL CASTILLO, B.; MENENDEZ, J. C.; VAZQUEZ, L.; LERNER, D. A. Analytical applications of retinoid-cyclodextrin inclusion complex. 1. Characterization of a retinal- β -cyclodextrin complex. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v.14, p.909-915, 1996.

MURA, P.; ADRAGNA, E.; RABASCO, A.; MOYANO, J.; PE´REZ-MARTINEZ, J.; ARIAS, M.; GINE´S, J. Effects of the host cavity size and the preparation method on the physicochemical properties of ibuproxam-cyclodextrin. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, v.25, p.279-287, 1999.

MURA, P.; BETTINETTI, G. P.; CIRRI, M.; MAESTRELLI, F.; SORRENTI, M.; CATENACCI, L. Solid-state characterization and dissolution properties of Naproxen-Arginine-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin ternary system. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v.59, p.99-106, 2005.

MURA, P.; MAESTRELLI, F.; CIRRI, M. Ternary systems of naproxen with hydroxypropyl- β -cyclodextrin and aminoacids. *J. Pharm. Sci.*, v.260, p.293-302, 2003.

NALLURI, B. N.; CHOWDARY K.P.R.; MURTHY K.V.R.; ATYANARAYANA V.; HAYMAN, A.R.; BECKET G. inclusion complexation and dissolution properties of nimesulide and meloxicam-hydroxypropyl- β -cyclodextrin binary systems. *J. Inc.Phén. Macroc. Chem.*, v.53, p.103-110, 2005.

NORIEGA, P.; RÖPKE, C. D.; CAMILO, C. M.; FREITAS, P. C. D.; BARROS, S. B. M. Avaliação por análise fatorial das condições da extração do 4-nerolidilcatecol de *Pothomorphe umbellata* (L). *Miq. Braz. J. Pharmac. Sci.*, v. 41, n.2, abr./jun., 2005

PALMER, Alan. M. New horizons in drug metabolism, pharmacokinetics and drug discovery. *Drug News Perspect.*, v.16 n.11, p.57-62, 2003.

PANIZZA, S. *Plantas que curam (cheiro de mato)*. 25. ed. São Paulo: Ibrasa, 1997. p.158-161.

PASCAL, B.; MAUD, G.; GEORGES, D.; ADELIN, A.; VALERY, B.; BRUNO, P.; DIDIER, C.; GÉRALDINE, P.; LUC, D.; BRIGITTE, E. The effect of cyclodextrins on

the aqueous solubility of a new MMP inhibitor: phase solubility, $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy and molecular modeling studies, preparation and stability study of nebulizable solutions. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, v.8, p.164, 2005.

PECKOLT, W. Contribuição à matéria médica vegetal do Brasil: estudo farmacognóstico de *Heckeria umbellata* (L) Kunth. *Mem. Inst. Butantan*, São Paulo, v.15, p.59-68, 1941.

PERAZZO, F. F.; SOUZA, G. H. B.; LOPES, W.; CARDOSO, L. G. V.; CARVALHO, J. C. T.; NANAYKKARA, N. P. D.; BASTOS, J. K.; Anti-inflammatory and analgesic properties of water-ethanolic extract from *Pothomorphe umbellata* (Piperaceae) aerial parts. *J. Ethnopharm.*, v.99, p.215-220, 2005.

PINTO, L. M. A.; FRACETO, L. F.; SANTANA, M. H.; PERTINHEZ, T. A.; OYAMA-JUNIOR, S.; de PAULA, E. Physico-chemical characterization of benzocaine- β -cyclodextrin inclusion complexes. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v.39, p.956-963, 2005.

PITHA, J.; MILECKI, J.; FALES, H.; PANNELL, L.; UEKAMA, K. Hydroxypropyl- β -cyclodextrin: preparation and characterization; effects on solubility of drugs. *Int. J. Pharm.*, v.29, p.73-82, 1986.

POLYAKOV, N. E.; LESHINA, T. V.; HAND, E. O.; PETRENKO, A.; KISPERS, L. D. β -Ionone cyclodextrins inclusion complexes $^1\text{H-NMR}$ study and photolysis. *J. Photochem Photobiol A: Chem.*, v.161, p.261-267, 2004a.

POLYAKOV, N. E.; LESHINA, T. V.; KONOVALOVA, T. A.; HAND, E. O., KISPERS, L. D. Inclusion complexes of carotenoids with cyclodextrins: $^1\text{H-NMR}$, EPR, and optical studies. *Free Radic. Biol. Med.*, v.36, n.7, p.872-880, 2004b.

POSE-VILARNOVO, B.; PERDOMO-LOPEZ, I.; ECHEZARRETA-LOPEZ, M.; SCHROTH-PARDO, P.; ESTRADA, E.; TORRES-LABANDEIRA, J. J. Improvement of water solubility of sulfamethizole through its complexation with β - and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. Characterization of the interaction in solution and in solid state. *Eur. J. Pharm. Sci.*, v.13, p.325-331, 2001.

PRALHAD, T.; RAJENDRAKUMAR, K. Study of freeze-dried quercetin-cyclodextrin binary systems by DSC, FT-IR, X-ray diffraction and SEM analysis. *J. Pharm. Biom. Anal.*, v.34, p.333-339, 2004.

RAJEWSKI, R. A.; STELLA, V. J. Pharmaceutical application of cyclodextrins. In vivo drug delivery. *J. Pharmac. Sci.*, v.90, p.976-986, 2001.

RAMA, A. C. R.; VEIGA, F.; FIGUEIREDO, I. V.; SOUSA, A.; CARAMONA, M. Complexos de inclusão de indometacina com hidroxipropil- β -ciclodextrina. Estudos de dissolução e coeficiente de partição. *Rev. Bras. Ciênc. Farmac.*, v.42, n.1, jan./mar., 2006.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. *Toxicon.*, v.39, n. 5, p.603-13, 2001.

REZENDE, K. R. *Biodisponibilidade oral do 4-nerolidilcatecol isolado e em extrato bruto de Pothomorphe umbellata (L.) Miq. administrado a ratos Sprague Dawley.* 2002, 78f. Tese de Doutorado em FÁRMACOS – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002

MICARONI, Antônio. *Estudo de inclusão molecular de produtos de interesse farmacológico utilizando ciclodextrinas.* Dissertação de Mestrado – Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1994.

REZENDE, K. R.; BARROS, S. B. M. Quantification of 4-nerolidylcatechol from *Pothomorphe umbellata* (Piperaceae) in rat plasma samples by HPLC-UV. *Braz. J. Pharm. Sci.*, v.40, n.3, p.373-380, 2004.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim. Nova.* v.27, n.5, p.771-780, 2004.

RIEDEL, O.O. Subsídios para o estudo farmacognóstico da *Heckeria umbellata* (L.) Kunth. *Trib. Farm.*, Curitiba, v.9, p.269-283, 1941.

ROPKE, C. D.; da SILVA, V. V.; KERA, C. Z.; MIRANDA, D. V.; de ALMEIDA, R. L.; SAWADA, T. C.; BARROS, S. B. M.; *In vitro* and *in vivo* inhibition of skin matrix metalloproteinases by *Pothomorphe umbellata* root extract. *Photochem. Photobiol.* v.82, p.439–442. 2006.

ROPKE, C. D.; KANEKO, T. M.; RODRIGUES, R. M.; SILVA V. V.; BARROS S.; SAWADA, T. C. H.; KATO, M. J.; BARROS; S. B. M. Evaluation of percutaneous absorption of 4-nerolidylcatechol from four topical formulations. *Int. J. Pharm.*, v.249, p.109-116, 2002.

ROPKE, C.; MEIRELLES, R. R. ; SILVA, V. V. ; SAWADA, T. C. H. ; BARROS, S. B. M. *Pothomorphe umbellata* extract prevents α -tocopherol depletion after UV-radiation. *Photoch. Photob.*, v.78, n.5, p.436-439, 2003.

ROPKE, C. D.; SAWADA, T. C.; da SILVA, V. V.; MICHALANY, N. S.; BARROS, S. B. M. Photoprotective effect of *Pothomorphe umbellata* root extract against ultraviolet radiation induced chronic skin damage in the hairless mouse. *Clin. Exp. Dermatol.* v.30, p.272–276, 2005.

ROZOU, S.; VOULGARI, A.; ANTONIADOU-VYZA, E. The effect of pH dependent molecular conformation and dimerization phenomena of piroxicam on the drug: cyclodextrin complex stoichiometry and its chromatographic behaviour. A new specific HPLC method for piroxicam: cyclodextrin formulations. *Eur. J.Pharm. Sci.*, v.21, p.661-669, 2004.

SCHNEIDER, H-J.; HACKET, F.; RÜDIGER, V. NMR studies of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. *Chem. Rev.*, v.98, p.1755-1785, 1998.

SCHNEIDERMAN E.; STALCUP, A. M. Cyclodextrins: a versatile tool in separation science. *J.Chomatogr.B*, v.745, p.83-102, 2000.

SILVA, R. A. D. *Pharmacopeia dos Estados Unidos do Brasil*. São Paulo: Cia Ed. Nacional, 1926. 649 p.

SILVA, E. F.; RAMOS, M. C. K. V.; AQUINO NETO, F. R. Utilização de derivados de ciclodextrinas como fase estacionária quiral em cromatografia gasosa de alta resolução. *Química Nova*, v.19, p. 473-479, 1996.

SILVA, V. V.; ROPKE, C. D., ALMEIDA, R. L.; MIRANDA, D. V.; KERA, C. Z.; RIVELLI, D. P.; SAWADA, T. C. H., BARROS, S. B. M. Chemical stability and SPF determination of *Pothomorphe umbellata* extract gel and photostability of 4-nerolidylcatechol. *Int. J. Pharmac.*, v.303, p.125–131, 2005.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2004. 1102p.

SINGH, M.; SHARMA, R.; BANERJEE, U. C.; Biotechnological applications of cyclodextrins. *Biotechnology Adv.*, v.20, p.341-359, 2002.

SPAMER, E.; MÜLLER, D. G.; WESSELS, P. L.; VENTER, J. P. Characterization of the complexes of furosemide with 2-hydroxypropyl-bcyclodextrin and sulfobutyl ether-7-b-cyclodextrin. *Eur. J. Pharm. Sci.*, v.16, p.247–253, 2002.

SUN, D.-Z., LI, L., QIU, X.-M., LIU, F., YIN, B.-L. Isothermal titration calorimetry and ^1H NMR studies on host-guest interaction of paeonol and two of its isomers with β -cyclodextrin. *Int. J. Pharm.*, v.316, p.7-13, 2006.

SZEJTLI, József. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chem. Rev.*, v.98, p.1743-1754, 1998.

TANERI, F.; GÜNERI, T.; AIGNER, Z.; KATA, M. Influence of cyclodextrin complexation on the physicochemical and biopharmaceutical properties of ketoconazole. *J. Incl. Phen. Macroc. Chem.*, v.47, p.15-23, 2003.

TEREKHOVA, I. V.; VOLKOVA, T. V.; PERLOVICH, G. L. Experimental analysis of complex formation of niflumic acid with β -cyclodextrins. *J. Incl. Phen. Macroc. Chem.* v.55, p.335-340, 2006.

TORRI, G.; BERTINI, S.; GIAVANA, T.; GUERRINI, M.; PUPPINI, N.; ZOPPETTI, G. Inclusion complex characterization between progesterone and hydroxypropyl- β -cyclodextrin in aqueous solution by NMR study. *J Incl Phenom Macrocycl Chem.*, v.57, p.317-321, 2007.

UEKAMA, K.; HORIUCHI, Y.; KIKUCHI, M.; HIRAYAMA, F. Enhanced dissolution and oral bioavailability of α -tocoferyl esters by dimethyl- β -cyclodextrin complexation. *J. Incl. Phenomena.* v.6, p.167-174, 1988.

VALADARES, M. C.; REZENDE, K. R.; PEREIRA, E. R.; SOUSA, M. C.; GONÇALVES, B.; de ASSIS, J. C.; KATO, M. J. Protective effects of 4-nerolidylcatechol against genotoxicity induced by cyclophosphamide, *Food Chem. Toxicol.*, (2007) doi:10.1016/j.fct.2007.04.016.

VANDELLI, M. A., SALVIOLI, G., MUCCI, A., PANINI, R., MALMUSI, L. 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin complexation with ursodeoxycholic acid. *Int. J. Pharm.*, v.118, p.77-83, 1995.

VEIGA, F. J. B.; FERNANDES, C. M.; CARVALHO, R. A.; GERALDES, C. F. G. C. Molecular Modelling and ^1H -NMR: Ultimate tools for the investigation of tolbutamide : β -cyclodextrin and tolbutamide:hydroxypropyl- β -cyclodextrin complexes. *Chem. Pharm. Bull*, v.49, n.10, p.1251-1256, 2001.

VEIGA, F.; TEIXEIRA-DIAS, J. J. C.; KEDZIEREWICZ, F.; SOUSA, A.; MAINCENT, P. Inclusion complexation of tolbutamine with β -cyclodextrin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Int. J. Pharm.* v.129, p.63-71. 1996.

VENTURA C. A.; PUGLISI, G.; GIAMMONA G.; BOTTINO F. A. Comparative study on inclusion compounds of 4-biphenylacetic acid with β -cyclodextrin, hydroxypropylated- β -cyclodextrins, and methylated- β -cyclodextrins. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, v.20,n.14, 2245-2265, 1994.

VIANNA, L. F. R.; BENTLEY, M. V. L. B.; RIBEIRO, G.; CARVALHO, F. S.; NETO, A. F.; OLIVEIRA, D. C. R.; COLLETT, J. H. Formation of cyclodextrin inclusion complexes with corticosteroids: their characterization and stability. *Int. J. Pharm.*, v.167, p.205-217, 1998.

VYAZOVKIN, Sergey. Thermal Analysis. *Anal. Chem.*, v.74, n.12, p.2749–2762, 2002.

WILLIAMS, R. O.; MAHAGUNA, V.; SRIWONGJANYA, M. Characterization of an inclusion complex of cholesterol and hidroxypropyl- β -cyclodextrin. *Eur. J. Pharm. Bioph.* v.46, n.3, p.355-360, 1998.

YAP, K. L.; LIU, X.; THENMOZHIAL, J. C.; HO, P. C. Characterization of the 13-*cis*-retinoic acid/cyclodextrin inclusion complexes by phase solubility, photostability, physicochemical and computational analysis. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.25, p.49–56, 2005.

YUNKER, T.G. The Piperaceae of Brazil. *Hoehnea*. v.3, p.28-29, 1973.

ZINGONE G.; RUBESSA F. Preformulation study of the inclusion complex warfarin- β -cyclodextrin. *Int. J. Pharm.*, v.291, p.3-10, 2005.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)