

**Universidade Federal do Rio Grande Do Sul
Faculdade de Farmácia**

Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

**Avaliação da permeação cutânea de 3OMQ isolada por HPCCC e
incorporada em hidrogéis contendo diferentes ciclodextrinas.**

Eduarda Doneda

Porto Alegre, dezembro de 2017

**Universidade Federal do Rio Grande Do Sul
Faculdade de Farmácia**

Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

**Avaliação da permeação cutânea de 3OMQ isolada por HPCCC e
incorporada em hidrogéis contendo diferentes ciclodextrinas.**

Eduarda Doneda

Orientadora: Profa. Dra. Valquiria Linck Bassani

Coorientadora: MSc Sara Elis Bianchi

Porto Alegre, dezembro de 2017

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Valquíria Linck Bassani, pela oportunidade, orientação e confiança em mim depositada. Pelos conselhos, ensinamentos e amizade.

À minha coorientadora, Sara Elis Bianchi pelos ensinamentos, dedicação e amizade. Fico imensamente grata pelo auxílio e apoio imediato sempre que necessitei.

A todos os meus colegas do Laboratório de Desenvolvimento Galênico pela receptividade, carinho e amizade.

A todas as minhas amigas e colegas de faculdade que viveram junto este momento apoiando e incentivando.

Aos meus pais, Sonia Budke Doneda e José Francisco Doneda pela confiança à mim depositada, pelo constante incentivo, amor e apoio em todos os momentos. Por nunca me deixar desistir, mesmo quando achei que não conseguiria.

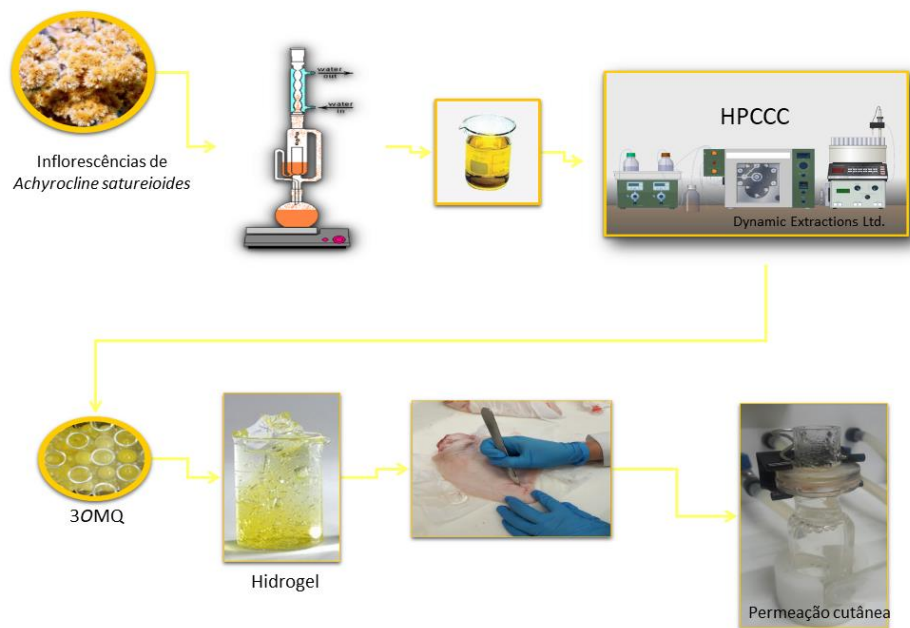
Ao meu irmão José Francisco Doneda Junior e minha cunhada Suana Behnen pelo incentivo, carinho, parceria e amizade.

Ao meu namorado Felipe Baldi por todo incentivo e apoio durante a elaboração do meu trabalho, sempre com muita paciência, carinho e amor.

A todos, que mesmo não citados contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

Este artigo foi elaborado segundo as normas da Revista Química Nova apresentadas em anexo.

GRAPHICAL ABSTRACT



Skin permeation of 3OMQ hydrogels, a compound isolated from *Achyrocline satureioides* by high performance current chromatography (HPCCC).

Avaliação da permeação cutânea de 3OMQ isolada por HPCCC e incorporada em hidrogéis contendo diferentes ciclodextrinas.

.

Eduarda Doneda^a, Sara Elis Bianchi^a, Valquiria Linck Bassani^a*

^aLaboratório de Desenvolvimento Galênico, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90610-000, Porto Alegre –RS, Brasil

*Correspondencia autor: +55-51-33085515, valquiria.bassani@ufrgs.br (V. L. Bassani)

EVALUATION OF CUTANEOUS PERMEATION OF 3OMQ ISOLATED BY HPCCC AND INCORPORATED IN HYDROGELS CONTAINING DIFFERENT CYCLODEXTRINS

The use of formulations for topical delivery is an excellent option for cutaneous therapy, especially for the treatment of infections caused by the Herpes Simplex virus (HSV-1). In this context, 3OMQ is a natural methoxyflavonoid with low solubility and pronounced antiviral activity. In this work, 3OMQ was isolated from the enriched flavonoid-aglycones fraction (FEF) of *Achyrocline satureioides* inflorescences by high performance countercurrent chromatography (HPCCC) to evaluate its cutaneous permeation from HPMC hydrogels containing the HP- β -CD, β -CD and γ -CD. Permeation studies were performed using Franz type diffusion cells and revealed that the 3OMQ hydrogel in the absence of cyclodextrins obtained greater retention and permeation in the skin (6,71 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ in the stratum corneum, 0,98 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ in the epidermis and 1,62 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ in the dermis). $^1\text{H-NMR}$ analysis and 2D-ROESY contour maps were performed suggesting inclusion complex formation between 3OMQ and cyclodextrins HP- β -CD and γ -CD, but not for β -CD. Thus, the 3OMQ/HP- β -CD and 3OMQ/ γ -CD formulations which showed complex formation, released less 3OMQ in cutaneous permeation studies. In the 3OMQ/ β -CD formulation, 3OMQ probably has been retained in the association of β -CD with HPMC hydrophilic matrix, which also decrease its release from the hydrogel. Thus, cyclodextrins revealed a negative effect on 3OMQ permeation.

Keywords: 3OMQ; HPCCC; permeation; cyclodextrins.

INTRODUÇÃO

Herpes oral é uma infecção nos lábios e áreas circunvizinhas causada principalmente pelo vírus *Herpes Simplex* tipo 1 (HSV-1), o qual é um vírus de DNA de cadeia dupla pertencente a *Herpes viridae*. Herpes é uma doença recorrente que afeta a população mundial^{1,2}. Esta patologia gera lesões periorais, sendo a gengivoestomatite herpética a manifestação clínica bucal mais frequente². Possui características específicas como latência e reativação. A epiderme é o sítio primário de exposição, onde inicia-se a replicação viral. Uma vez reativado, o vírus migra ao longo de neurônios sensoriais até sítios inervados na epiderme levando às recorrências clínicas caracterizadas por lesões herpéticas. Geralmente, a infecção primária é mais invasiva que a recorrente devido à falta de imunidade celular e humoral do hospedeiro, entretanto, as lesões recorrentes do herpes simples são altamente contagiosas^{1,3}. Os tratamentos convencionais mais usados são análogos de nucleosídeos, como o aciclovir. Estes, são medicamentos eficazes, no entanto, o uso comum resultou no surgimento de fármacos resistentes. Assim, é de grande interesse o desenvolvimento de alternativas seguras e eficazes para os fármacos antivirais convencionais¹⁻⁴.

Os produtos oriundos de fontes naturais nas últimas décadas são utilizados no tratamento e profilaxia de diversas patologias, sendo crescente o interesse em suas propriedades terapêuticas, apresentando-se como uma alternativa no desenvolvimento farmacêutico^{5,6}. Neste contexto, situa-se *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC, espécie pertencente à família Asteraceae, nativa do Sul da América e conhecida popularmente como marcela^{7,8}. A administração tópica de flavonóides isolados a partir de extratos de *Achyrocline satureioides* fornece uma oportunidade promissora no tratamento de vários distúrbios da pele⁹⁻¹². Dentre os metabólitos secundários presentes em *Achyrocline satureioides* destacam-se os flavonoides quercetina (QCT), luteolina (LUT) e 3-O-metilquercetina (3OMQ)^{7,8}.

A 3OMQ (3',4',5,7-tetrahydroxi-3-metoxiflavona) é um metoxiflavonoide natural com atividade antiviral pronunciada. Outros potenciais terapêuticos atribuídos a este flavonoide são: atividades antitumorais, anti-inflamatórias e antioxidantes¹³⁻¹⁵. A síntese da 3OMQ já foi relatada por Krishnamachari e colaboradores (2004)¹⁶, no entanto apresentou baixo rendimento com formação de subprodutos tóxicos e de difícil purificação. Mais recentemente, a síntese da 3OMQ foi relatada por Komei e colaboradores (2016)¹⁷ porém, ainda envolve muitas etapas. Há estudos que relatam que

a 3OMQ tem capacidade de inibir uma etapa anterior à replicação viral poucas horas após à infecção, reduzindo a carga de RNA e a síntese de proteínas virais^{4,18}. Bettega e colaboradores (2004)¹⁰ expõe perspectivas no uso de flavonoides como a 3OMQ no tratamento de infecções herpéticas do tipo-1 através de ensaios *in vitro*.

O isolamento de produtos naturais, como a 3OMQ, é extremamente necessário para a investigação aprofundada dos compostos bioativos derivados de plantas. Entretanto, o isolamento de substâncias com alto teor de pureza tem sido considerada uma tarefa difícil envolvendo diversas etapas. Acerca disso, a cromatografia em contracorrente (CCC) apresenta-se como uma técnica extremamente útil para separação, isolamento e purificação de constituintes ativos a partir de plantas¹⁹. É uma técnica que tem se destacado devido à rápida e eficiente partição das substâncias de interesse e ao reduzido tempo de separação²⁰. Tem por princípio básico a partição de um soluto entre duas fases líquidas imiscíveis. Assim, esta técnica consiste em uma forma de cromatografia de partição líquido-líquido, cuja fase estacionária é retida na coluna com o auxílio de uma força gravitacional e uma força centrífuga, sem o uso de suporte sólido. E, na sequência, a fase móvel passa através da fase estacionária, ocorrendo a partição do soluto entre elas^{20,21}.

Considerando que formulações de uso tópico contendo 3OMQ parece ser de interesse terapêutico especialmente para o tratamento das infecções pelo vírus do Herpes Simplex, neste estudo, foi realizada incorporação de 3OMQ em hidrogel de HPMC bem como ensaios de permeação. A permeação cutânea é uma estratégia eficiente e muito utilizada para avaliar o perfil de permeação de substâncias através da pele. Há evidências que a epiderme de suínos é histologicamente comparável à humana pela estrutura celular e espessura²². Dentre as formulações tópicas, alguns hidrogéis são usados como veículos de formulações devido as grandes vantagens de promoção de mucoadesão e penetração^{23,24}. Visto que, formulações de uso tópico dependem da capacidade de penetrar na pele para alcançar o local de ação desejado, sendo o extrato córneo a principal barreira, foram usadas ciclodextrinas como promotores de penetração. Ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos com relativa solubilidade em água devido a sua estrutura molecular com cavidade hidrofóbica e face externa hidrofílica oferecendo vantagens tecnológicas às formulações, especialmente aumento de solubilidade de compostos lipofílicos, penetrabilidade e melhoria de estabilidade²⁵⁻²⁷. Neste estudo, foram utilizadas as ciclodextrinas gama (γ -CD), beta (β -CD), e hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) com intuito de promover maior permeação cutânea da 3OMQ. A γ -CD, quando

comparada às demais ciclodextrinas naturais, possui biodisponibilidade favorável, melhor solubilidade em meio aquoso por se tratar de uma molécula não-coplanar de estrutura mais flexível e com diâmetro da cavidade maior²⁸. A β -CD possui baixa solubilidade em água devido às ligações de hidrogênio intramoleculares, originando assim uma estrutura rígida²⁵. Apesar da sua limitada solubilidade, a β -CD é a ciclodextrina natural com maior aplicação no campo farmacêutico, obtida industrialmente com alto rendimento, elevada qualidade e menor custo²⁹. Além disso, possui uma cavidade interna cujas dimensões são excelentes para incorporar compostos aromáticos hidrófobos. A HP- β -CD tem sido amplamente utilizado como agente solubilizante para moléculas hidrofóbicas²⁵. Além disto, ao contrário da β -ciclodextrina, a maior solubilidade em água e a baixa toxicidade da HP- β -CD têm permitido sua utilização em ensaios que envolvem cultura celular, bem como administração parenteral, ocular, nasal, pulmonar e outras vias^{30,31}. A ação promotora da permeação cutânea de substâncias pelas ciclodextrinas tem sido relacionada com sua capacidade de extrair componentes (lipídios) do estrato córneo^{26,32,33}. As ciclodextrinas não necessitam formar complexos de inclusão para promover a permeação das moléculas na pele, uma vez que o fluxo é proporcional à concentração livre de fármaco. Outras investigações revelam que os lipídios da pele podem competir com as moléculas de fármaco ou constituintes do veículo pela cavidade central das ciclodextrinas²⁶. Contudo, apesar das CD interagirem com as membranas biológicas, a sua ação não é tão agressiva sobre estas como outros promotores de absorção convencionais, não apresentando deste modo potencial citotóxico³⁴.

Considerando as atividades supracitadas para a 3OMQ e seu efeito terapêutico para o tratamento de doenças cutâneas como infecções do vírus HSV-1, o objetivo deste estudo foi avaliar a permeação cutânea de 3OMQ a partir de hidrogéis contendo diferentes ciclodextrinas. Para tanto, esta foi isolada a partir de fração enriquecida em flavonoides-agliconas de inflorescências *Achyrocline satureioides* por cromatografia em contracorrente de alta performance (HPLC) em modo de fase reversa³⁵.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiais

A matéria-prima vegetal foi gentilmente doada pelo Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agronômicas (CPQBA, Universidade de Campinas, Campinas, Brasil). Autorização para acesso ao patrimônio genético pelo CNPq: 0108542013-4.

A quantificação das concentrações de 3OMQ foram realizadas nos extratos, frações ou compostos isolados através método de HPLC utilizando o equipamento Shimadzu (Kyoto, Japão), composto por bomba HPLC-20AT, SIL-20A injetor automático (20 µL) e um detector do sistema SPD-M20A (Tóquio, Japão) detector SPD-20AV UV / vis (ajustado a 362 nm). A coluna HPLC utilizada foi um Agilent ZORBAX Eclipse XDB Phenyl (4,6 x 150 mm i.d., 3,5 µm) (Califórnia, EUA) acoplado a uma coluna de proteção RP-18 (4,0 mm × 3,0 mm i.d.) (Phenomenex, EUA). Os dados foram analisados pelo software LC-Solution Multi-PDA³⁶.

O isolamento e purificação da 3OMQ foram realizados utilizando Cromatografia em Contracorrente de Alta Performance (HPCCC; Dynamic Extractions Ltd., Slough, Reino Unido)³⁵. O instrumento é constituído de colunas de politetrafluoroetileno (PTFE, bombas isocráticas (Scientific Systems, Inc., Pensilvânia, EUA) e coletor de fração Gilson FC203B (Villiers-le-Bel, França). Detector UV de comprimento de onda variável (ECOM, Praga, CZ) foi acoplado a HPCCC e os dados analisados pelo software Clarity (DataApex, Praga, CZ).

Obtenção de extrato seco bruto

Os constituintes fenólicos das inflorescências de *Achyrocline satureioides* foram extraídos utilizando extrator tipo Soxhlet. Dezoito gramas de planta secas foram submetidas à extração utilizando 500 mL de *n*-hexano e sequenciamnte, 500 mL de acetato de etila (4 horas por solvente)³⁷. A solução extrativa obtida com acetato de etila foi concentrada sob pressão reduzida (evaporador rotativo, Heidolph, Schwabach, DE) à 40 °C e o extrato seco bruto obtido foi armazenado sob proteção da luz. A concentração de flavonoides-agliconas presentes no extrato seco foi avaliada por CLAE-PDA, conforme metodologia previamente validada³⁶.

Obtenção da fração enriquecida em flavonoides-agliconas

O fracionamento a partir do extrato seco foi realizado utilizando cromatografia em contracorrente de alta performance (HPCCC, Dynamic Extractions Ltd., Slough, RU), em coluna semi-preparativa com 136 mL de volume. Na primeira etapa, 300 mg da amostra (extrato seco) obtida a partir da solução extrativista de acetato de etila foi dissolvida em 7 mL de um sistema de solventes composto por *n*-hexano:acetato de etila:metanol:água (0,8:1,0:0,8:1,0, v/v), submetida a filtração em membrana de 0.45 µm. O método em HPCCC foi o descrito por Bianchi e colaboradores (2017)³⁵, em que a fase estacionária composta por metanol:água foi bombeada através da coluna até preenchimento completo. Em seguida, após a coluna atingir a velocidade de rotação de 1600 rpm, a fase móvel composta por *n*-hexano:acetato de etila foi bombeada com fluxo de 6 mL/min até estabelecimento do equilíbrio hidrodinâmico (fase normal). Somente então a amostra foi injetada no sistema. Sessenta tubos (6 mL cada) foram coletados e as frações contendo as substâncias de interesse selecionadas, originando a fração enriquecida em flavonoides-agliconas (FEF). O solvente foi evaporado sob pressão reduzida e as concentrações de QCT, LUT e 3OMQ avaliadas por CLAE-PDA³⁶.

Isolamento e purificação de 3OMQ

O isolamento e purificação do flavonoide 3OMQ foi realizado em duas etapas. Na primeira, utilizou-se o sistema de solventes diclorometano:metanol:água (3,5:3,5:2,5, v/v), em fase reversa. Amostra da FEF (300 mg) foi dissolvida em 7 mL do sistema de solventes, submetida a filtração em membrana de 0.45 µm. Na sequência, procedeu-se conforme descrito anteriormente, estabelecendo-se o equilíbrio hidrodinâmico do método no HPCCC. Foram selecionados os tubos contendo 3OMQ, de acordo com o observado pelo detector UV acoplado ao HPCCC (362 nm). O solvente foi evaporado sob pressão reduzida e a amostra contendo 3OMQ armazenada ao abrigo da luz. Em uma segunda etapa, a amostra contendo 3OMQ foi submetida ao fracionamento no sistema de solventes composto por *n*-hexano:acetato de etila:metanol:água (0,8:1,0:0,8:1,0, v/v), seguindo conforme protocolo acima descrito. Nesta etapa, a amostra de 3OMQ foi purificada utilizando a metodologia de HPCCC e o teor do flavonoide foi avaliado por CLAE-PDA³⁶.

Preparação dos hidrogéis

Foram preparadas quatro formulações diferentes de hidrogel com concentração de 3,5% (m/m) de hipromelose (HPMC/Methocel-K4M) aos quais foi incorporada 3OMQ na concentração de 0,1 % (m/m), conforme descrito abaixo:

Tabela 1. Composição das formulações contendo 3OMQ

Componentes	Formulação 1	Formulação 2	Formulação 3	Formulação 4
3OMQ	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%
HPMC	3,5%	3,5%	3,5%	3,5%
Propilenoglicol	-	1%	1%	1%
HP- β -CD ¹	-	5%	-	-
β -CD ²	-	-	5%	-
γ -CD ³	-	-	-	5%
Água	q.s.p. 100g	q.s.p. 100g	q.s.p. 100g	q.s.p. 100g

¹HP- β -CD: hidroxipropil- β -ciclodextrina

² β -CD: β -ciclodextrina

³ γ -CD: γ -ciclodextrina.

A preparação dos hidrogéis foi realizada de acordo com as técnicas descritas a seguir:

- Formulação 1. 3OMQ foi dispersa em água (q.s.p.), posteriormente, incorporou-se HPMC homogeneizando com auxílio de um bastão de vidro até completa dispersão.
- Formulação 2. O hidrogel foi preparado dispersando HPMC em água com auxílio de um bastão de vidro até completa dispersão. A 3OMQ foi levigada com 1% de propilenoglicol. À esta mistura foi incorporada 5% de hidroxipropil- β -ciclodextrina. A mistura resultante foi, em seguida, foi incorporada na base de hidrogel.
- Formulações 3 e 4. Procedeu-se conforme descrito na formulação 3, associando 5% das respectivas ciclodextrinas: β -ciclodextrina ou γ -ciclodextrina.

Permeação cutânea

Os estudos do perfil de permeação da 3OMQ foram realizados utilizando pele de orelha suína sem danificações teciduais, fornecidas pela Cooperativa dos Suinocultores Ouro do Sul (Harmonia, BR). Após o recebimento as orelhas foram lavadas em água corrente. A pele da parte externa das orelhas foi retirada com bisturi e o excesso de gordura

subcutânea e pelos foram removidos com auxílio de tesoura. Foram cortados segmentos circulares com aproximadamente 1 mm de espessura, utilizados como membrana e armazenados a -18 °C. Os segmentos de peles foram utilizados num prazo máximo de 30 dias. No dia do experimento, as peles suínas foram descongeladas e hidratadas em tampão fosfato pH 7,4 por 30 minutos. O estudo de permeação foi realizado utilizando aparelho de difusão do tipo Franz (Vhtex) em cujas células foram dispostos discos de pele de suíno de 2,54 cm² de área, entre o compartimento doador e receptor. A epiderme ficou voltada para a parte superior e a face da derme ficou em contato com o meio receptor. Amostras de 500 mg da formulação foram dispostas diretamente sobre os cortes circulares de pele de orelha suína no compartimento doador, cuja temperatura foi mantida a 32 ± 1 °C. O compartimento receptor foi preenchido com 10 mL de fluido acceptor (tampão fosfato:etanol, 70:30 v/v) e mantido sob agitação constante a 650 rpm, mantendo as condições *sink*³⁶. Para cada formulação foram realizadas sextuplicatas.

Após 8 horas de permeação, foi coletada uma alíquota do fluido acceptor e a pele removida da célula. O excesso de formulação remanescente sobre a pele foi retirado com algodão. O extrato córneo foi separado da epiderme por técnica de *tape stripping*, em que diferentes fitas adesivas foram aplicadas 15 vezes sobre a pele suína com intervalo de 1 min sob a pressão de 1 kg. A primeira fita retirada, a qual, continha excesso de formulação foi descartada. As 4 fitas seguintes ao serem removidas foram adicionadas a um tubo de ensaio e as outras 10 fitas foram adicionadas a outro tubo de ensaio, com intuito de extrair o toda a formulação das fitas. A epiderme foi separada da derme usando um bisturi e a derme restante foi cortada em pequenos pedaços. As duas camadas, epiderme e derme, foram dispostas em tubos de ensaio diferentes.

Posteriormente, a 3OMQ foi extraída do estrato córneo (fitas), epiderme e derme através da adição de 2 mL de metanol a cada tubo de ensaio contendo as respectivas amostras. Após, os tubos de ensaio foram sonicados durante 30 minutos e o conteúdo final de cada foi filtrado para vial. As concentrações de 3OMQ em diferentes camadas da pele foram determinadas por CLAE/PDA³⁶. Os resultados das análises foram expressos a partir da média ± desvio padrão de 3OMQ retidos por centímetro quadrado (µg/cm²) de 2 experimentos independentes (n = 6) e foram analisados pelo teste de Tukey para determinar a significância estatística (p<0,05).

Estudo de espalhabilidade

Para determinação da espalhabilidade para cada uma das formulações, foi utilizada uma placa-molde circular de vidro com orifício central de 1,2 cm de diâmetro, colocada sobre uma placa suporte de vidro posicionado sobre papel milimetrado. A amostra foi inserida no orifício e ajustada com auxílio de espátula. A placa móvel foi retirada e então foi colocada sobre a amostra uma placa de vidro com peso conhecido, após o intervalo de 1 min foi realizada a leitura do diâmetro abrangido pela amostra, com auxílio do papel milimetrado e, após, calculado o diâmetro médio. O procedimento foi repetido acrescentando-se as placas de vidro com pesos crescentes pré-determinados em intervalos de 1 min entre cada placa até não ser mais possível observar o deslocamento da formulação no papel milimetrado. O procedimento a cima descrito foi realizado com as quatro formulações. A espalhabilidade foi calculada a partir da equação a seguir:

$$E_i = d^2 \cdot \pi/4$$

Onde:

E_i: Espalhabilidade da amostra para um determinado peso em milímetro quadrado (mm²);

d: Diâmetro médio em milímetros (mm).

Perfil reológico

O perfil reológico das formulações foram avaliadas utilizando viscosímetro rotacional de Brookfield Modelo RVDV-II+ e spindle n° 29, com sequências crescentes de velocidades (rpm) escolhidas através de testes preliminares. As análises foram realizadas respeitando o intervalo de 1 min para estabilização da amostra e assim observando o valor expresso em centipoise (cP) e de torque (%). As leituras foram realizadas em triplicata para cada uma das formulações e a viscosidade foi calculada a partir da relação entre tensão e taxa de cisalhamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Obtenção do extrato bruto

A obtenção do extrato bruto em aparelho de Soxhlet foi realizada utilizando sequência de dois solventes *n*-hexano e acetato de etila. A extração preliminar com *n*-hexano permitiu a extração de substâncias altamente lipofílicas e não desejáveis, possibilitando também um aumento na extração das substâncias de interesse. A solução extrativa obtida com acetato de etila obtida após a extração prévia com *n*-hexano, apresentou concentração dos

flavonoides agliconas de 18,10% (m/m) de 3OMQ, 6,98% (m/m) de QCT e 2,33% (m/m) de LUT. Os resultados representam a média de 3 determinações.

Obtenção de fração enriquecida em flavonoides-agliconas (FEF)

O fracionamento do extrato seco por HPCCC realizado com o sistema de solventes composto por *n*-hexano:acetato de etila:metanol:água (0,8:1,0:0,8:1,0, v/v), possibilitou a separação dos flavonoides majoritários do extrato seco de forma eficiente e rápida, conforme demonstrado na Figura 1. Os tubos contendo as substâncias de interesse foram selecionados e, assim, obteve-se a FEF contendo 46,0% (m/m) de 3OMQ, 19,6% (m/m) de QCT e 6,2% (m/m) de LUT, representando uma concentração cerca de 2,5 a 2,7 vezes maior que a concentração no extrato bruto.

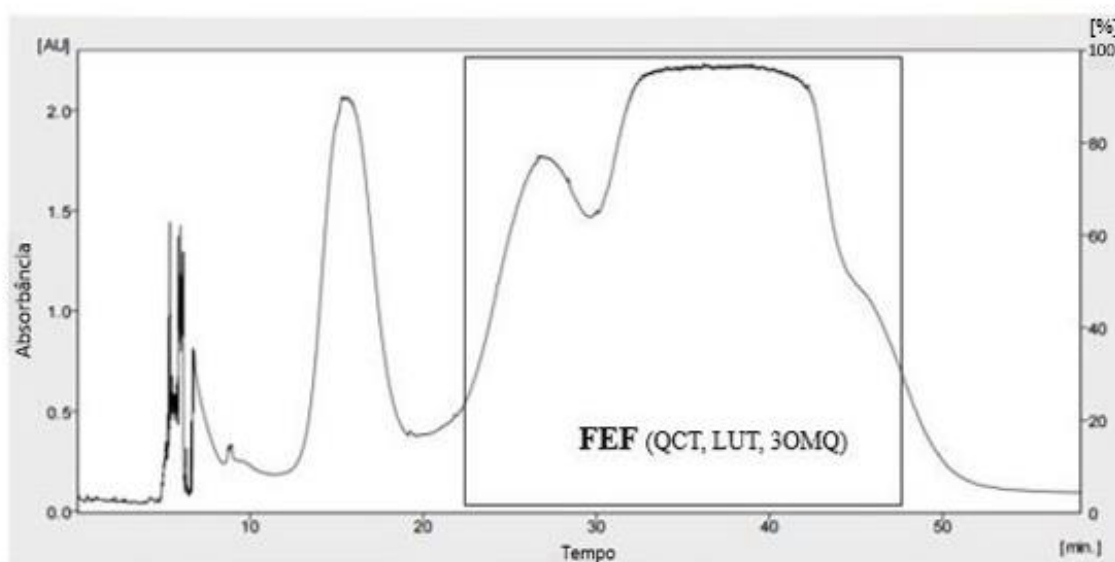


Figura 1. Perfil cromatográfico da fração enriquecida em flavonoides-agliconas (FEF) obtido através do detector UV ($\lambda = 362$ nm) acoplado ao HPCCC.

Isolamento e purificação de 3OMQ

O isolamento de 3OMQ foi realizado a partir da FEF utilizando o método publicado por Bianchi e colaboradores (2017)³⁵, também por HPCCC utilizando o sistema de solventes diclorometano:metanol:água (3.5:3.5:2.5, v/v), em fase reversa estabelecendo-se o equilíbrio hidrodinâmico entre as fases. Este passo permitiu que 3OMQ fosse separada dos demais flavonoides presentes na FEF, resultando em teor de aproximadamente 70% (m/m). A análise realizada por CLAE-PDA³⁶ revelou a presença de impurezas, o que justificaria o teor não satisfatório de 3OMQ encontrado. Desse modo, realizou-se uma etapa adicional de separação por HPCCC com o intuito de purificar a amostra. Esta etapa foi realizada com sistema de solventes composto por *n*-hexano:acetato de

etila:metanol:água (0.8:1:0.8:1, v/v). Após esta etapa, a amostra de 3OMQ foi purificada utilizando a metodologia de HPLCC (Figura 2) e novamente analisada quanto ao teor, demonstrando um valor de 90% (m/m) como pode ser observado na Figura 3.

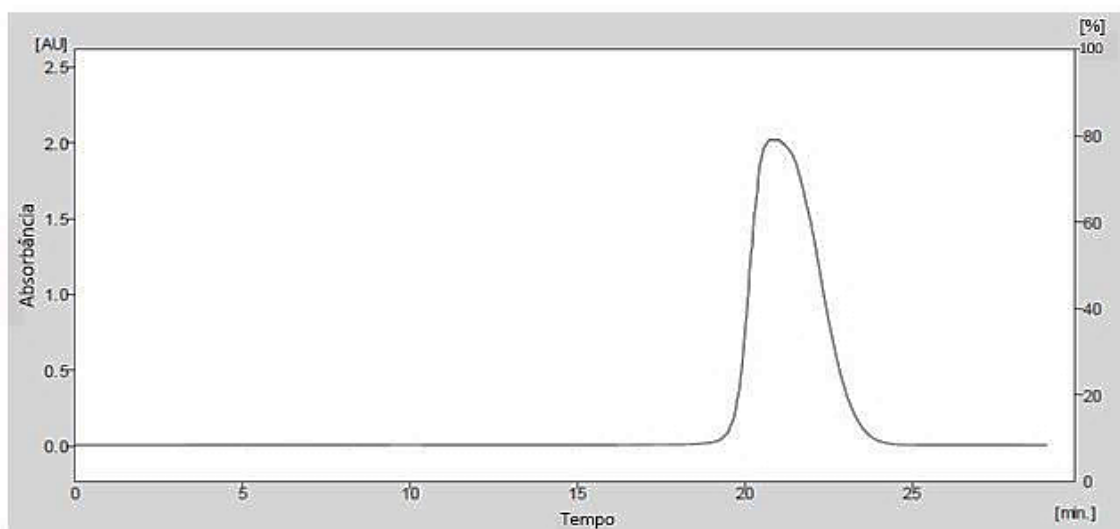


Figura 2. Perfil cromatográfico do método de purificação de 3OMQ obtido através do detector UV ($\lambda = 362\text{nm}$) acoplado ao HPLCC.

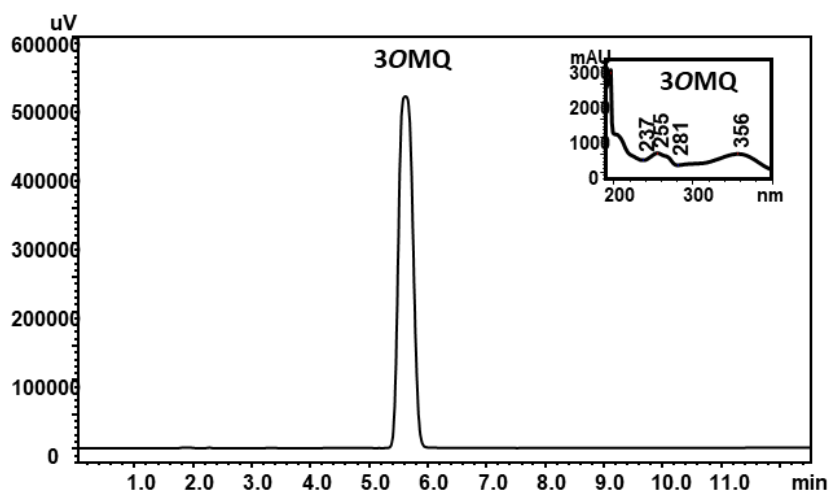


Figura 3. Perfil cromatográfico (CLAE) da 3OMQ ($\lambda = 362\text{nm}$) obtido através de método de HPLCC e espectro de arranjo de diodo de 200 - 400nm.

Caracterização dos géis

A caracterização dos hidrogeis utilizados como base para a incorporação da 3OMQ e diferentes ciclodextrinas (HP- β -CD, β -CD, γ -CD) foi realizada por meio de avaliação do perfil reológico e espalhabilidade.

A Figura 4 apresenta os perfis reológicos das respectivas formulações: 3OMQ/HPMC, 3OMQ/HP- β -CD/HPMC, 3OMQ/ β -CD/HPMC e 3OMQ/ γ -CD/HPMC. As formulações

apresentaram perfil semelhante de viscosidade, demonstrando que à medida que a tensão de cisalhamento aumentou também aumentou a taxa de cisalhamento, sendo assim, houve um decréscimo da viscosidade, caracterizando um comportamento pseudoplástico não newtoniano. Este resultado, vem ao encontro do observado por Romanski colaboradores (2011)³⁸, em que concentrações de polímeros superiores à 2 %, os hidrogéis apresentaram aumentada viscosidade e transição para um comportamento não newtoniano.

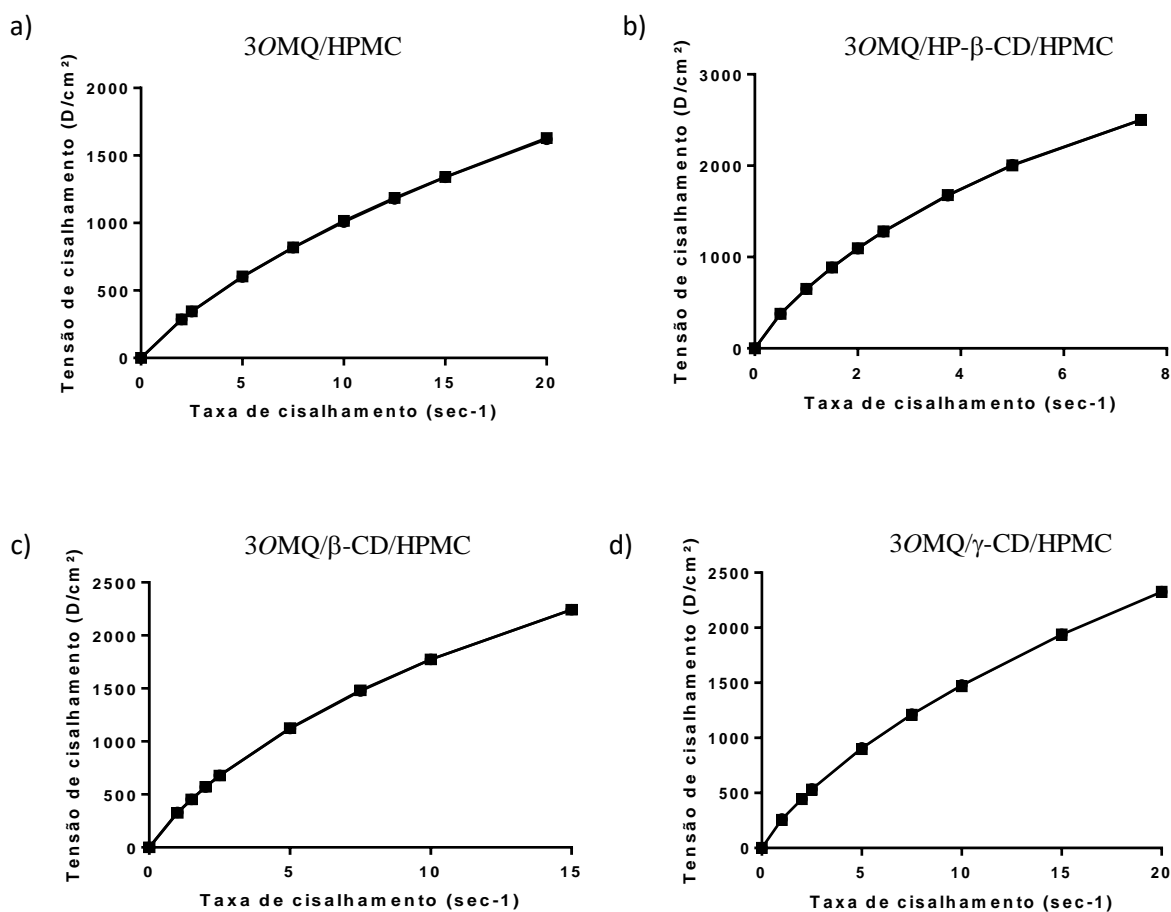


Figura 4. Perfil reológico das formulações (a) corresponde a formulação 1 (3OMQ/HPMC), (b) formulação 2 (3OMQ/HP-β-CD/HPMC), (c) formulação 3 (3OMQ/β-CD/HPMC) e (d) formulação 4 (3OMQ/γ-CD/HPMC).

Os estudos de espalhabilidade foram realizados utilizando o método de placas paralelas, amplamente empregado na avaliação de preparações semissólidas³⁹. A espalhabilidade foi representada em função do peso das placas para obtenção dos perfis de aplicação, conforme apresentado na Figura 5.

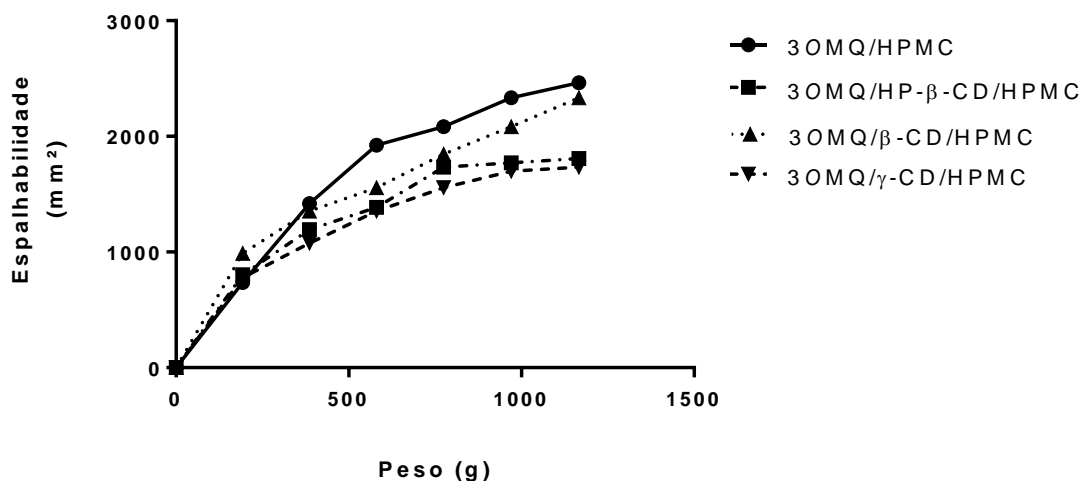


Figura 5. Curva de espalhabilidade em função do peso das placas adicionadas para as formulações 1 (3OMQ/HPMC), formulação 2 (3OMQ/HP-β-CD/HPMC), formulação 3 (3OMQ/β-CD/HPMC) e formulação 4 (3OMQ/γ-CD/HPMC).

Pode-se observar que o perfil de espalhabilidade foi semelhante para todas as formulações testadas. Este parâmetro está diretamente relacionado com a viscosidade da formulação, sendo afetado significativamente pela mesma³⁹.

Permeação cutânea

O perfil de permeação da 3OMQ proposto neste estudo foi avaliado através de células de difusão de Franz utilizando pele suína. A quantidade de 3OMQ foi determinada nas diferentes camadas: estrato córneo, epiderme e derme (Figura 6). O comportamento da retenção de 3OMQ na pele foi analisado através de ANOVA One way, seguido de teste Tukey para determinar a significância estatística ($p < 0,05$). Após 8 horas de cinética de permeação, o fluido acceptor não apresentou concentrações de 3OMQ em nenhuma das formulações testadas.

Entre as formulações estudadas, observa-se menor quantidade de 3OMQ retida na pele nas formulações contendo ciclodextrinas (HP-β-CD, β-CD, γ-CD). Claramente a formulação contendo 3OMQ/HPMC apresentou maior retenção de 3OMQ nas camadas da pele. Provavelmente este comportamento está relacionado a lipofilia da molécula de 3OMQ, uma vez que o veículo utilizado foi o hidrogel de HPMC que é hidrofílico. Sendo assim, observou-se a afinidade da 3OMQ pela pele, também lipofílica. Contudo, nas formulações que continham ciclodextrinas, entende-se que a 3OMQ pode ter formado complexos à γ-CD e HP-β-CD e até mesmo algum tipo de interação molecular com β-CD

e a rede hidrofílica de HPMC diminuindo a cedência da molécula através do hidrogel, se direcionando em menor quantidade para a pele.

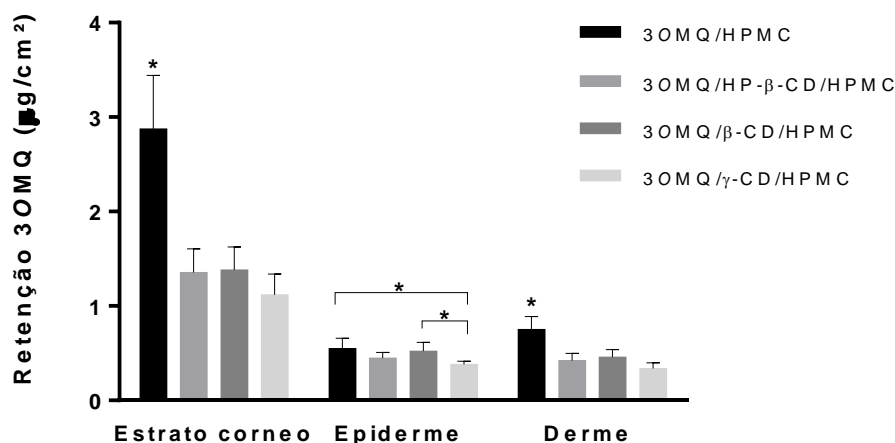


Figura 6. Avaliação da permeação em diferentes camadas da pele (estrato córneo, epiderme e derme) de hidrogéis contendo 0,1% de 3OMQ nas quatro formulações apresentadas anteriormente. *Diferença significativa ($p < 0,05$).

Schwingel (2007)⁴⁰ observou, assim como neste estudo, maior retenção de 3OMQ na pele quando não associada à ciclodextrinas. No entanto, houve aumento no perfil de permeação da 3OMQ quando utilizado a mistura à β -CD em matriz hidrofílica de HPMC. As ciclodextrinas atuam muitas vezes na permeação cutânea, como promotores de permeação, que visam aumentar a solubilidade e o transporte de moléculas pelo estrato córneo, o qual é visto como barreira para permeabilidade de substâncias ao local de interesse²⁸. A 3OMQ tem baixa solubilidade em água o que justifica o uso de coadjuvantes de solubilidade na formulação. No entanto, a permeação deste composto através das camadas da epiderme e derme foram maiores nas formulações em que as ciclodextrinas se fizeram ausentes (Figura 6).

Ressonância Magnética Nuclear (RMN de ^1H)

Com o intuito de investigar a causa da ausência de promoção de permeação da 3OMQ, realizou-se avaliação da complexação desta molécula com as diferentes ciclodextrinas empregadas, 3OMQ/HP- β -CD/HPMC, 3OMQ/ β -CD/HPMC, 3OMQ/ γ -CD/HPMC. A complexação por inclusão da 3OMQ, resultaria na indisponibilidade da cavidade das ciclodextrinas para extrair componentes lipídicos do estrato córneo e promover a permeação.

A análise de RMN de ^1H da 3OMQ isolada é apresentada na Figura 7. Pode-se observar deslocamentos químicos característicos da molécula¹⁵ que permitem as atribuições dos sinais da 3OMQ, apresentados na tabela 2.

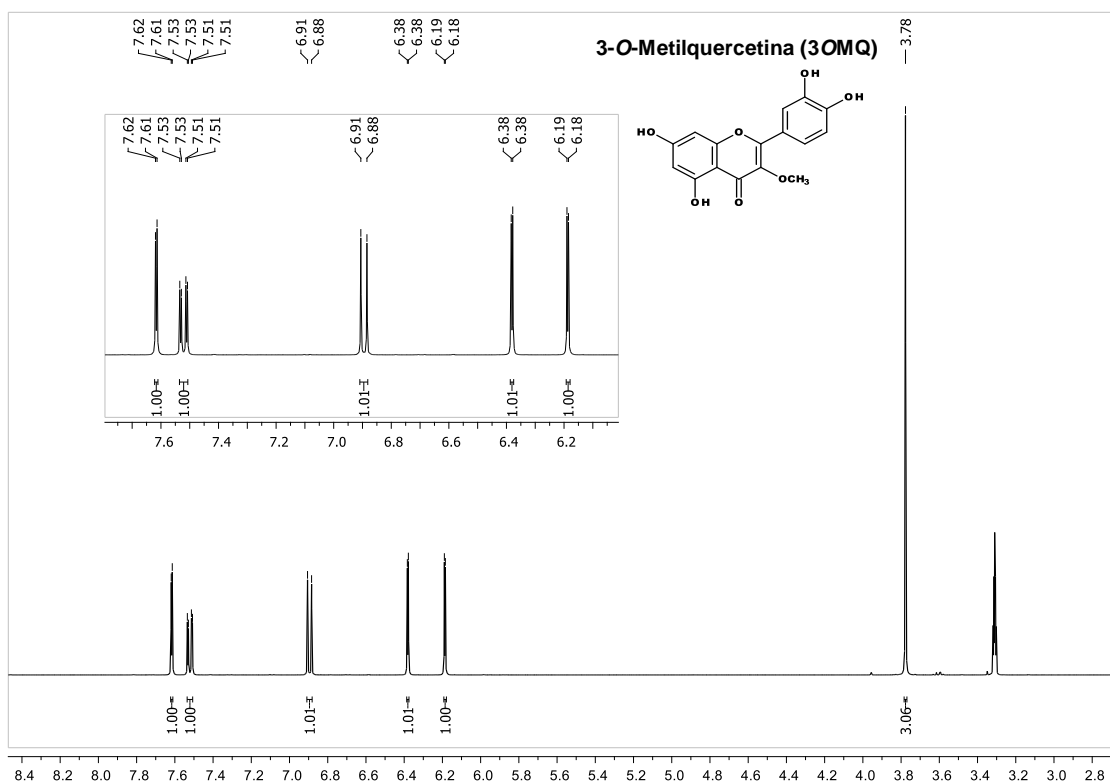


Figura 7. Espectros de ^1H -RMN da molécula de 3OMQ obtida através de HPCCC.

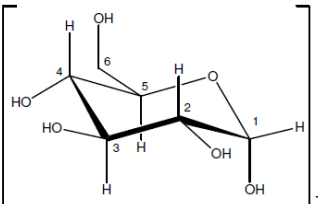
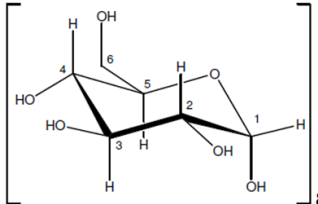
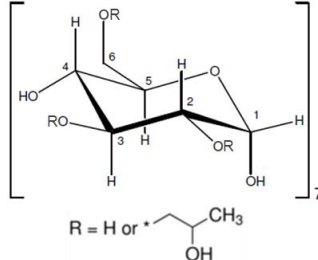
Tabela 2. Atribuições e deslocamentos químicos de RMN de ^1H da 3OMQ.

Hidrogênio	δ (ppm) e J (Hz)
H-2'	7,62 (d, 2,20)
H-5'	6,90 (d, 8,50)
H-6'	7,53 (dd, 8,50 e 2,20)
H-6	6,19 (d, 2,10)
H-8	6,38 (d, 2,10)
O-CH ₃	3,78 (s)

Os resultados de investigação da interações do tipo ^1H - ^1H da 3OMQ com as ciclodextrinas β -CD, γ -CD e HP- β -CD são apresentadas nas Figuras 8, 9 e 10,

respectivamente. Na tabela a seguir pode-se observar atribuições dos sinais e deslocamentos químicos de RMN de ^1H das ciclodextrinas (β -CD, γ -CD e HP- β -CD).

Tabela 3. Atribuições e deslocamentos químicos de RMN de ^1H da β -CD, γ -CD e HP- β -CD.

			
	β -CD	γ -CD	HP- β -CD
Hidrogênio	δ (ppm) e J (Hz)		
H-1	4,99 (d, 3,80)	5,03 (d, 3,80)	4,98 (d)
H-2	3,57 (dd, 3,70 e 10,00)	3,57 (dd, 3,70 e 10,00)	3,53 (m)
H-3	3,87 (t, 9,40)	3,86 (t, 9,40)	3,90 (m)
H-4	3,50 (t, 9,20)	3,51 (t, 9,20)	3,43 (m)
H-5	3,77 (m)	3,77 (m)	3,79 (m)
H-6a,b	3,80 (m)	3,79 (m)	3,79 (m)
CH₃	-	-	1,06 (d, 6,48)

A β -CD, bastante disponível e de baixo custo, possui limitada solubilidade em água^{25,41}, devido à formação de ligações de hidrogênio intramoleculares entre as hidroxilas secundárias, resultando na redução do número de OH capazes de fazer ligações de hidrogênio com as moléculas de água do meio, deixando a estrutura da β -CD mais rígida, sendo assim, dificultando a formação de complexo^{29,42}.

A associação 3OMQ/ β -CD não apresentou interações no espectro de RMN de ^1H , pois não foram observadas mudanças nos deslocamentos químicos dos hidrogênios da β -CD dentro da cavidade (H-3, H-5 e H-6) nem fora da cavidade (H-1, H-2 e H-4)⁴³, comparativamente aos da molécula livre. Algumas hipóteses podem ser atribuídas a não formação do complexo. A primeira é o método de associação utilizado no presente

trabalho, por simples mistura em que, de maneira geral, não se objetiva formação de complexo de inclusão. Na literatura há relatos de complexação que referem-se ao emprego em meio aquoso (também conhecido como solução), seguida de secagem por liofilização⁴⁰. Há casos em que as interações das misturas podem ser muito espaçadas, ou seja, não são detectadas através de espectro de ressonância 2D-ROESY.

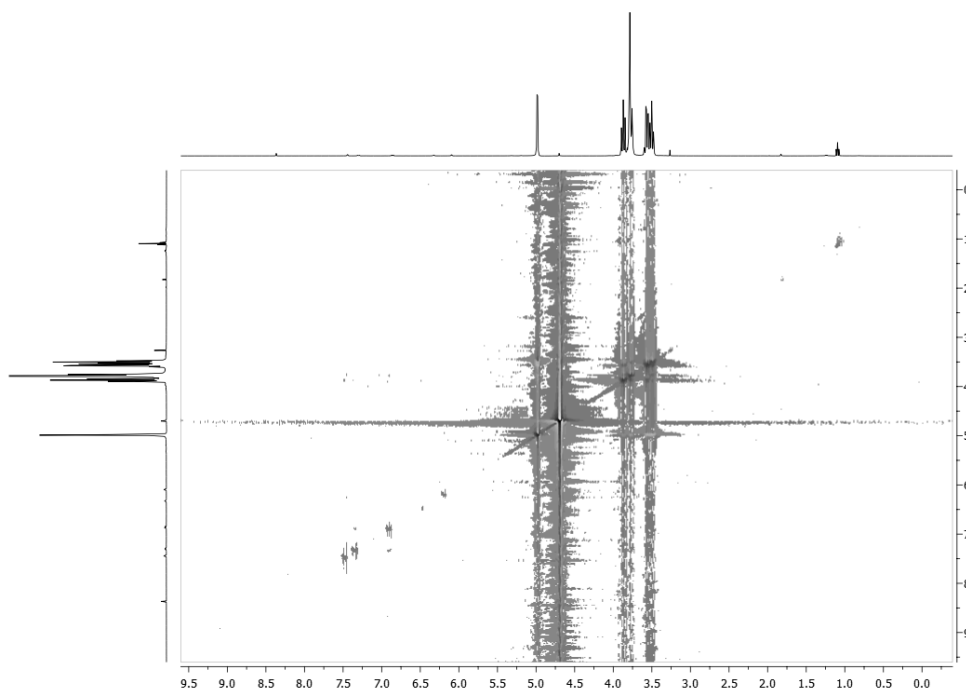


Figura 8. Mapa de contornos 2D-ROESY da associação 3OMQ/ β -CD (D_2O , 400 MHz).

Há dados na literatura que descrevem a interação 3OMQ/ β -CD através da formação de complexo de inclusão, em que o anel B da 3OMQ é inserido na cavidade da β -CD, neste caso, o modo de preparo do complexo foi realizado por liofilização⁴⁰, diferentemente deste trabalho (mistura simples). Portanto, vale ressaltar, que métodos de mistura podem resultar ou não na formação de complexos de inclusão ou simples associações.

Avaliando o espectro da 3OMQ (Figura 7) com o da associação 3OMQ/ γ -CD (Figura 9) observa-se variação nos deslocamentos químicos⁴⁴, tanto dos hidrogênios H-5 (δ 3,77) e H-6a,b (δ 3,79) da cavidade interna da γ -CD como dos hidrogênios H-2' (δ 7,62), H5' (δ 6,90), H-6' (δ 7,53), H-6 (δ 6,19) e H-8 (δ 6,38) da molécula de 3OMQ. A variação nos deslocamentos químicos dos sinais de hidrogênio induzidos pela complexação do tipo hospede-hospedeiro é uma característica importante para avaliação da formação do composto de inclusão. Sendo assim, esta análise pode dar indicações do processo de inclusão. O fato da γ -CD apresentar maior diâmetro de cavidade em relação β -CD e HP-

β -CD faz com que a 3OMQ tenha maior facilidade em entrar cavidade. A γ -CD apresenta estrutura mais flexível e maior hidrossolubilidade que a β -CD corroborando assim, para a formação de complexo^{41,45,46}.

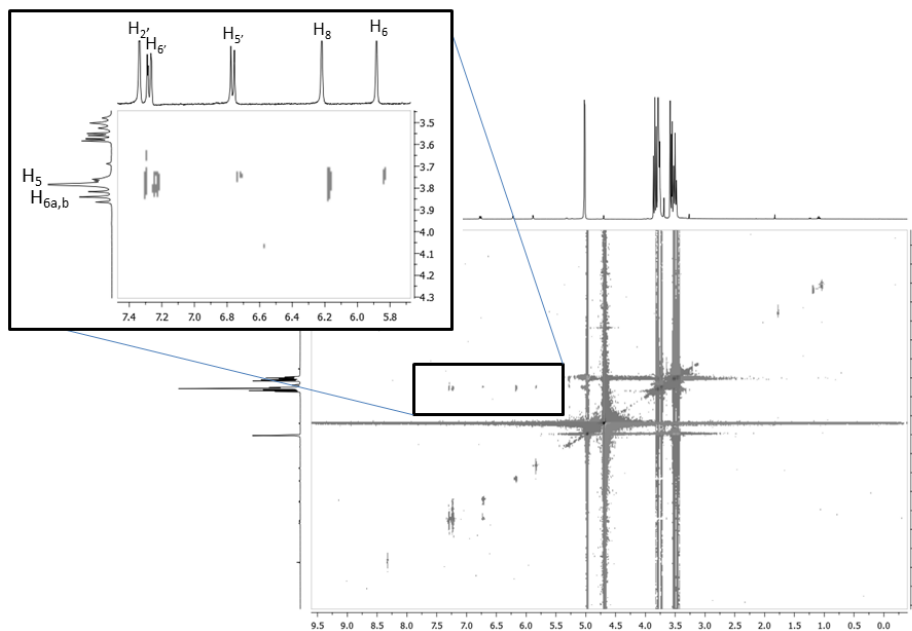


Figura 9. Mapa de contornos 2D-ROESY da associação 3OMQ/ γ -CD (D₂O, 400 MHz).

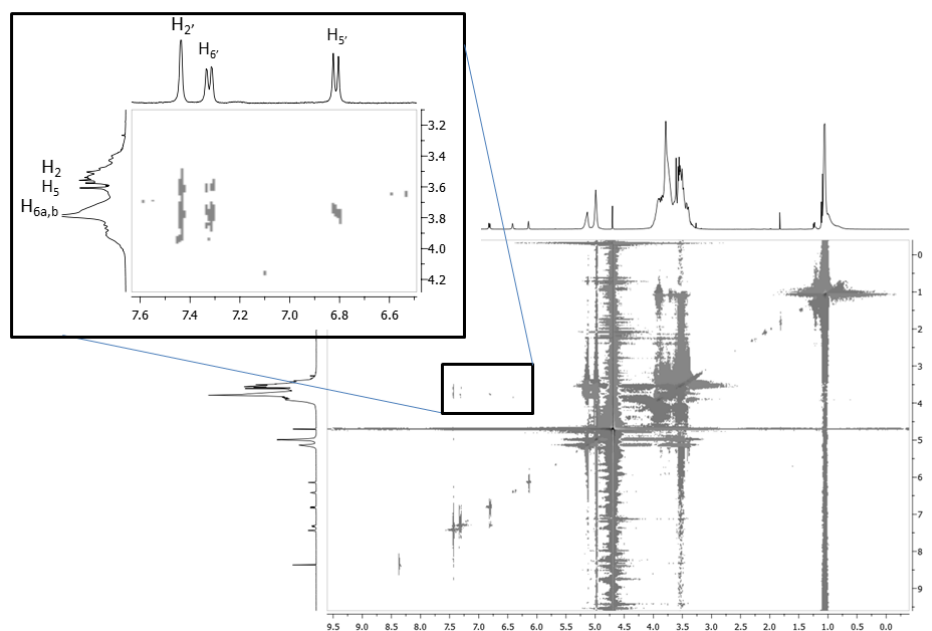


Figura 10. Mapa de contornos 2D-ROESY da associação 3OMQ/HP- β -CD (D₂O, 400 MHz).

Relacionando o espectro da 3OMQ (Figura 7) com o da associação 3OMQ/HP- β -CD (Figura 10) pode se observar interação fraca, representada por pequenos deslocamentos químicos nos dos hidrogênios H-2 (δ 3,53), H-5 (δ 3,77) e H-6a,b (δ 3,79) da cavidade da

HP- β -CD⁴⁷ e também dos hidrogênios H-2' (δ 7,62), H-5' (δ 6,90), H-6' (δ 7,53) da cadeia da 3OMQ. A HP- β -CD possui propriedades melhoradas de solubilidade em água do que a β -CD e baixa toxicidade, podendo propiciar melhor complexação com a 3OMQ. Estes fenômenos já haviam sido observados para o flavonoide quercetina, bastante semelhante estruturalmente à 3OMQ, onde a formação do complexo de inclusão entre quercetina e β -CD por mistura física foi um processo dependente do tempo⁴⁸. Vale ressaltar que, o uso de diferentes solventes na técnica de ressonância magnética também pode provocar deslocamentos de hidrogênios^{49,50}. Com o intuito de minimizar o erro e que os sinais apresentados correspondam apenas às moléculas de interesse, os solventes foram corrigidos para realização das análises acima.

Este fato, pode ser explicado pelo indicativo da formação de complexos com HP- β -CD e γ -CD, a complexação ocorre por interação não covalente quando a molécula hóspede preenche totalmente ou em parte a cavidade interna da ciclodextrina, que tem característica apolar, constituindo um processo dinâmico no qual há associação e dissociação constantemente^{41,47}.

Nesse sentido, acredita-se que a molécula da 3OMQ tenha ficado complexada, não sendo liberada para permear nas camadas da pele. Já na formulação contendo β -CD, que não obteve indícios de formação de complexo, acredita-se a molécula da 3OMQ tenha supostamente ficado retida à uma associação da β -CD com matriz hidrofílica de HPMC e assim, também sendo liberada mais lentamente para as camadas da pele.

Sabendo que as ciclodextrinas podem retardar a liberação de moléculas^{30,51} e que não necessitam necessariamente formar complexos de inclusão para promover a permeação das moléculas na pele, uma vez que o fluxo é proporcional à concentração livre da molécula²⁶, acredita-se ser necessário estudos adicionais de liberação da 3OMQ à partir de hidrogel, para observar com mais clareza o comportamento da mesma nas formulações 3OMQ/HP- β -CD/HPMC, 3OMQ/ β -CD/HPMC e 3OMQ/ γ -CD/HPMC.

CONCLUSÃO

Os resultados encontrados demonstram que a aplicação do método HPLC para a separação de constituintes da de inflorescências de *Achyrocline satureioides* resultou na produção de uma fração enriquecida em flavonoides-agliconas a partir do extrato bruto, bem como no isolamento e purificação de 3OMQ com pureza semelhante ao encontrado

em substâncias obtidas comercialmente. Ao contrário do esperado, a simples mistura de 3OMQ/HPMC resultou numa retenção maior na pele quando comparada às formulações 3OMQ/HP- β -CD/HPMC, 3OMQ/ β -CD/HPMC e 3OMQ/ γ -CD/HPMC. A 3OMQ presente na formulação 3OMQ/HPMC também apresentou maior permeação que a partir das formulações contendo ciclodextrinas. Este fenômeno pode ser devido à formação de complexos entre 3OMQ/HP- β -CD e 3OMQ/ γ -CD e afinidade pela matriz hidrofílica na presença de β -CD/HPMC. Em suma as ciclodextrinas revelaram um efeito negativo sobre a permeação da 3OMQ, nas condições de preparo das formulações estudadas. Outros métodos de incorporação e estudos de liberação da 3OMQ a partir da matriz polimérica, em presença e ausência de ciclodextrinas, deverão contribuir para elucidação do fenômeno observado.

REFERÊNCIAS

- (1) Consolaro, A.; Consolaro, M. F. M.-O. *Rev. Dent. Press Ortod. e Ortop. Facial* **2009**, *14* (3), 16–24.
- (2) Li, T.; Liu, L.; Wu, H.; Chen, S.; Zhu, Q.; Gao, H.; Yu, X.; Wang, Y.; Su, W.; Yao, X.; Peng, T. *Antiviral Res.* **2017**, *144*, 273–280.
- (3) Almeida, K. B. De.; *Dissertação de mestrado*, Universidade Federal Fluminense, Brasil, 2014.
- (4) Bidone, J.; Argenta, D. F.; Kratz, J.; Pettenuzzo, L. F.; Horn, A. P.; Koester, L. S.; Bassani, V. L.; Simões, C. M. O.; Teixeira, H. F. *Biomed Res. Int.* **2015**, *2015*.
- (5) Casanova, L. M.; Costa, S. S. **2017**, *9* (2), 575–595.
- (6) Silva, P. S. C.; Francisconi, L. S.; Gonçalves, R. D. M. R. *J. Braz. Chem. Soc.* **2016**, *27* (12), 2273–2289.
- (7) Retta, D.; Dellacassa, E.; Villamil, J.; Suárez, S. A.; Bandoni, A. L. *Ind. Crops Prod.* **2012**, *38* (1), 27–38.
- (8) Simoes, C. M., Schenkel, E. P., Bauer, L. & Langeloh, A. *J. Ethnopharmacol.* **1988**, *22*, 281–293.
- (9) Carvalho, E. L. S.; G. K. Zorzi.; G. L. V. Poser.; H. F. Teixeira.; J. C. F. Moreira.; V. L. Bassani. (PI0805156-9); **2008**.
- (10) Bettega, J. M. R.; Teixeira, H.; Bassani, V. L.; Barardi, C. R. M.; Simões, C. M.

- O. *Phyther. Res.* **2004**, *18* (10), 819–823.
- (11) Balestrin, L. A.; Bidone, J.; Bortolin, R. C.; Moresco, K.; Moreira, J. C.; Teixeira, H. F. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2016**, *163*, 269–276.
- (12) Fasolo, D.; *Dissertação de mestrado*, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2007.
- (13) Rubio, S.; Quintana, J.; López, M.; Eiroa, J. L.; Triana, J.; Estévez, F. *Eur. J. Pharmacol.* **2006**, *548* (1–3), 9–20.
- (14) Carini, J.; Klamt, F.; Linck, V. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 3131–3144.
- (15) Schwingel, L.; Fasolo, D.; Holzschuh, M.; Lula, I.; Sinisterra, R.; Koester, L.; Teixeira, H.; Bassani, V. L. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2008**, *62* (1–2), 149–159.
- (16) Krishnamachari, V.; Levine, L. H.; Zhou, C.; Paré, P. W. *Chem. Res. Toxicol.* **2004**, *17* (6), 795–804.
- (17) Kato, K.; Ninomiya, M.; Tanaka, K.; Koketsu, M. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79* (7), 1808–1814.
- (18) Vrijssen, R.; Everaert, L.; Van Hoof, L. M.; Vlietinck, A. J.; Vanden Berghe, D. A.; Boeyé, A. *Antiviral Res.* **1987**, *7* (1), 35–42.
- (19) Duo-Long, D.; Yuan-Yuan, Z.; Xiao-Fen, C.; Xin-Yi, H.; Shi-Lan, F. *Chinese J. Anal. Chem.* **2011**, *39* (392), 269–275.
- (20) Sutherland, I. A. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1151* (1–2), 6–13.
- (21) Carini, J. P.; Leitao, G. G.; Schneider, P. H.; Santos, C. C.; Costa, F. N.; Holzschuh, M. H.; Bassani, F. K. and V. L. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2015**, *16* (1), 66–71.
- (22) Fernandez, C.; Marti-mestres, G.; Mestres, J. P.; Maillols, H. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2000**, *22*, 393–402.
- (23) Hurler, J.; Engesland, A.; Poorahmary Kermany, B.; Škalko-Basnet, N. *J. Appl. Polym. Sci.* **2012**, *125* (1), 180–188.
- (24) Lopes, C. M.; Lobo, J. M. S.; Costa, P. *Rev. Bras. Ciências Farm.* **2005**, *41* (2), 143–154.
- (25) Del Valle, E. M. M. *Process Biochem.* **2004**, *39* (9), 1033–1046.
- (26) Loftsson, T.; Masson, M. *Int J Pharm* **2001**, *225* (1–2), 15–30.
- (27) Loftsson, T.; Hreinsdóttir, D.; Másson, M. *Int. J. Pharm.* **2005**, *302* (1–2), 18–28.
- (28) Carvalho, I. M. **2013**.
- (29) Zhang, M.-Q.; Rees, D. C. *Expert Opin. Ther. Pat.* **1999**, *9* (12), 1697–1717.

- (30) Melo, N. F. S.; Grillo, R.; Moraes, C. M.; Brito, C. L.; Trossini, G. H. G.; Menezes, C. M. S.; Ferreira, E. I.; Rosa, A. H.; Fraceto, L. F. *Rev. Ciencias Farm. Basica e Apl.* **2007**, 28 (1), 35–44.
- (31) Loftsson, T.; Bodor, N. *Acta Pharm. Nord.* **1989**, 1 (4), 185–194.
- (32) Ventura, C. A.; Fresta, M.; Paolino, D.; Pedotti, S.; Corsaro, A.; Puglisi, G. J. *Drug Target.* **2001**, 9 (5), 379–393.
- (33) Irie T., U. K. *J. Pharm. Sci.* **1997**, 86 (2), 147–162.
- (34) Swarbrick, J. *Pharm. Technol.* **2007**, 3, 2004–2020.
- (35) Bianchi, Sara Elis; Kaiser, Samuel; Pittol, Vanessa; Doneda, Eduarda; De Souza, Kellen Cristhini Borges; Bassani, V. L. *J. Sep. Sci.* **2017**.
- (36) Bidone, J.; Zorzi, G. K.; Carvalho, E. L. S.; Simões, C. M. O.; Koester, L. S.; Bassani, V. L.; Teixeira, H. F. *Ind. Crops Prod.* **2014**, 62, 421–429.
- (37) De Souza, K. C. B.; Schapoval, E. E. S.; Bassani, V. L. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, 28 (3–4), 771–777.
- (38) Romanski, F. S.; Jayjock, E.; Muzzio, F. J.; Tomassone, M. S. *J. Pharm. Innov.* **2011**, 6 (2), 97–106.
- (39) Alves, M. P.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, **2006**.
- (40) Schwingel, L. C.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2007.
- (41) Marques, H. M. C. *Flavour Fragr. J.* **2010**, 25 (5), 313–326.
- (42) Loftsson, T.; Másson, M.; Brewster, M. E. *J. Pharm. Sci.* **2004**, 93 (5), 1091–1099.
- (43) Fraceto, L. F.; Sorocaba, U. De; Tavares, R. R.; Paulo, S. S.; Moraes, C. M.; Araújo, D. R. De; Zanella, L.; Pertinhez, T. D. A. **2007**, 30 (5), 1203–1207.
- (44) Loukas, Y. L.; Jayasekera, P.; Gregoriadis, G. *J. Phys. Chem* **1995**, 99, 11035–11040.
- (45) Meier, M. M.; *Dissertação de mestrado*, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 2000.
- (46) Acuña-Rougier, C.; Olea-Azar, C. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2013**, 75 (1–2), 119–136.
- (47) Qiu, N.; Cheng, X.; Wang, G.; Wang, W.; Wen, J.; Zhang, Y.; Song, H.; Ma, L.; Wei, Y.; Peng, A.; Chen, L. *Carbohydr. Polym.* **2014**, 101 (1), 623–630.
- (48) Borghetti, G. S.; Lula, I. S.; Sinisterra, R. D.; Bassani, V. L. *AAPS Pharm.*

Sci.Tech. **2009**, *10* (1), 235–242.

- (49) Pavia, D.; Lampman, G.; Kriz, G.; Vyvyan, J. *Cengage Learn.* **2012**, 700.
- (50) Ci, B. A. C. D. E.; Gradua, D. E. C. D. E.; Farm, E. M. **2013**, 1–56.
- (51) Martins, M. R. F. M.; Veiga, F. *Rev. Bras. Ciências Farm.* **2002**, *38* (1), 33–54.