



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADA À
BASE DE CUMARINAS (ESCOPOLETINA E CUMARINA) E ZIF-8**

PEDRITA ALVES SAMPAIO

RECIFE-PE

2021

PEDRITA ALVES SAMPAIO

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADA À
BASE DE CUMARINAS (ESCOPOLETINA E CUMARINA) E ZIF-8**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia-RENORBIO, como requisito final para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia em Saúde.

Orientadora: Prof^a Dra. Larissa Araújo Rolim.

RECIFE-PE

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S192d Sampaio, Pedrita Alves
Desenvolvimento de sistemas de liberação modificada à base de cumarinas (escopoletina e cumarina) e ZIF-8 / Pedrita Alves Sampaio. - 2021.
173 f. : il.
- Orientadora: Larissa Araujo Rolim.
Inclui referências e anexo(s).
- Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Doutorado em Biotecnologia – Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Recife, 2021.
1. Sistema de liberação prolongada . 2. cumarinas. 3. escopoletina. 4. MOF . I. Rolim, Larissa Araujo, orient. II. Título

CDD 620.8

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**

TERMO DE APROVAÇÃO

PEDRITA ALVES SAMPAIO

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADA À
BASE DE CUMARINAS (ESCOPOLETINA E CUMARINA) E ZIF-8**

Tese defendida e aprovada em 26 de fevereiro de 2021

BANCA EXAMINADORA

Orientador:

Prof^a. Dr^a. Larissa de Araújo Rolim
Universidade Federal do Vale do São Francisco

Examinadores:

Prof. Dr. Mário Adriano Ávila Queiroz
Universidade Federal do Vale do São Francisco

Prof. Dr. Marigilson Pontes de Siqueira Moura
Universidade Federal do Vale do São Francisco

Prof. Dr. Luciano Augusto de Araujo Ribeiro
Universidade Federal do Vale do São Francisco

Prof^a. Dr^a. Ana Paula de Oliveira
Instituto Federal do Sertão Pernambucano

AGRADECIMENTOS

O processo de doutoramento não começou em 2017, mas desde minha graduação em farmácia. Eu sabia onde queria chegar e o que precisaria fazer. Mas este não é um processo que se faça sozinho e neste ponto eu fui afortunada, pois tive ao meu lado os melhores parceiros e incentivadores. Deixo a menção e agradecimento as pessoas mais importantes neste processo.

Aos meus pais, Marluce Alves e José Rocha pelo amor e exemplo, me ensinaram a importância de se dedicar a tudo que escolhemos fazer nesta vida. Em especial, a minha amada mãe que me acompanhou dia após dia minha trajetória. Obrigada pela compreensão em meus momentos de ausência.

Ao meu esposo Christiano Carvalho pelo amor, compreensão e torcida. No ano de 2020 ele se dividiu em dois para me trazer à Petrolina todos os meses, mas sempre com a maior satisfação e entusiasmo. Obrigada por ser hoje meu maior incentivador na realização deste sonho e acreditar quando nem eu mesma acreditava.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Larissa Rolim, por tudo e tudo ainda seria pouco, pois ela tem infinitas qualidades como mentora. Primeiramente, obrigada por me ensinar a ser grata por cada conquista, e nós compartilhamos muitas desde 2015. Obrigada pela orientação, pelas oportunidades, por compartilhar seu conhecimento e antes de tudo, pela amizade e confiança. Se tem algo que aprendi com você foi que há solução para tudo, basta ter calma e diálogo. Ela é assim, encantadora e admirável.

A minha parceira de pesquisa, Stephany Serafim, aluna de iniciação científica com a qual eu fui apresentada. Grata pelos companheirismo e dedicação no desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu amigo Prof. Msc. José Marcos, parceiro de pesquisa e amigo querido. Ele que em meus momentos de indecisão tinha sempre a melhor resposta e que vibrava com cada conquista como se fosse a dele.

Aos amigos queridos, Prof. Dr. James Almada, Msc. Pedro Modesto e Msc. Emanuella Pereira pelas contribuições com os experimentos e conhecimento compartilhado.

À família da Central de Análise de Fármacos, Medicamentos e Alimentos (CAFMA): Stephany Serafim, Emanuela Pereira, Isabela Araújo, José Marcos, Pedro Modesto, Natália Souza, Janaine Almeida, Tarcísio Cícero, Iure Carvalho, Ana Paula, Pedro Guilherme, Délis Galvão, Victória Laysna, Tiago Feitosa e Rodolfo Nishimura. Obrigada por serem minha segunda família, com vocês eu aprendi e compartilhei grandes momentos de minha vida.

Às minhas amigas: Mariana Gama, Maria Eduarda, Morganna Thinesca, Ísis Cavalcante, Luciana Costa, Yonara Martins, Amara Araújo e Nathália Sá por dividir comigo conquistas e experiências de uma amizade.

Ao Prof. Dr. Luciano Augusto que foi meu primeiro orientador e incentivador. Nos quase quatro anos sendo sua aluna de iniciação científica eu pude aprender mais que farmacologia. Foi o primeiro a me explicar o que verdadeiramente significava o título de doutor e fez com que eu sonhasse com isso desde então.

À Universidade Federal do Vale do São Francisco e à CAFMA pelo apoio técnico ao desenvolvimento da pesquisa. Esta foi minha casa por anos, desde 2009 com a graduação, e tenho muito orgulho de cada passo que dei até chegar ao doutorado.

Aos professores e coordenação do Programa de Pós-Graduação Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) por tornar esse processo mais gratificante.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), meu ponto focal, pelo apoio técnico e educacional ao andamento desta pesquisa.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pelo apoio financeiro nestes quatro anos.

Ao Laboratório de Farmacologia Experimental (LAFEX) da UNIVASF pelo suporte técnico e colaboração nos experimentos.

Ao Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos (LTM) na pessoa do Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto pela colaboração e pelo espaço na realização das análises térmicas.

Ao Laboratório de Espectroscopia de Impedância e Materiais Orgânicos (LEIMO) da UNIVASF pela colaboração nas análises de MEV.

Aos professores que participaram da banca pelo aceite do convite e pela disponibilidade em fazer valiosas contribuições ao trabalho.

RESUMO

Escopoletina (7-hidroxi-6-metoxi-2H-cromen-2-ona, ESC) e a cumarina (cromen-2-ona, CM) são comumente encontradas em diversas plantas medicinais, porém sua utilização *in vivo* é dificultada por apresentarem baixa solubilidade aquosa. Assim, objetivou-se o desenvolvimento de um *drug delivery system* (DDS) dessas cumarinas e o carreador Zeolitic Imidazolate Framework-8 (ZIF-8). Inicialmente, foi realizada uma revisão sistemática da literatura sobre as atividades farmacológicas da ESC. Já o desenvolvimento do sistema ESC:ZIF-8 se deu por um método *in situ* e tanto a ESC, ZIF-8 e sistema foram caracterizados por difração de raios-X (DRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV), ressonância magnética nuclear (RMN), termogravimetria (TG), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). A quantificação de ESC em solução foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à arranjo de diodo (CLAE-DAD) e o perfil de liberação da ESC e ESC:ZIF-8 foi avaliado em condições *non-sink* nos pHs 4,5 e 6,5. Como base no desenvolvimento do CM:ZIF-8, a CM foi caracterizada pelas técnicas DRX, MEV, TG, DSC, FTIR, quantificada em solução por CLAE-DAD e perfil de liberação em condições *non-sink* nos pHs 2,0, 4,5 e 6,86. ESC, ESC:ZIF-8 e CM foram avaliadas quanto à atividade expectorante e o efeito antitussígeno, avaliado apenas para CM. Os dados demonstraram que o sistema ESC:ZIF-8 foi obtido com uma eficiência de encapsulação de 22,5% confirmada a partir das técnicas analíticas utilizadas. ESC apresentou ainda atividade expectorante nas doses 30 e 100 mg/kg. CM foi caracterizada com sucesso e observou-se ainda seu efeito antitussígeno na dose de 100 mg/kg. O desenvolvimento do sistema CM:ZIF-8 necessita de otimização visto que, os sistemas desenvolvidos apresentaram baixos valores de eficiência de encapsulação ou não obtiveram taxas de liberação adequadas.

Palavras-chave: Sistema de liberação prolongada, cumarinas, escopoletina, MOF.

ABSTRACT

Scopoletin (7-hydroxy-6-metoxychromen-2-one, SC) and coumarin (chromen-2-one, CM) are commonly found in several medicinal plants, however, its use *in vivo* has been a problem due to its low aqueous solubility. Thus, the aim of this work was the development of drug delivery system (DDS) of these coumarins and the Zeolitic Imidazolate Framework-8 (ZIF-8) carrier. Initially, a systematic review of the literature on the pharmacological activities of SC was done. The development of the system SC:ZIF-8 was also done by an *in situ* method and both SC, ZIF-8 and the system were characterized by X-ray diffraction (XRD), scanning electron microscopy (SEM), nuclear magnetic resonance (NMR), thermogravimetry (TG), differential scanning calorimetry (DSC) and absorption spectroscopy in the Fourier transform infrared region (FTIR). The quantification of SC in the solution was performed by high-performance liquid chromatography with diode-array detection (HPLC-DAD) and the release profile of SC and SC:ZIF-8 was evaluated under non-sink conditions at pHs 4.5 and 6.5. As a basis for the development of CM:ZIF-8, CM was characterized by XRD, SEM, TG, DSC, FTIR techniques, quantified in solution by HPLC-DAD and release profile under non-sink conditions at pHs 2.0, 4.5 and 6.86. SC, SC:ZIF-8 and CM were evaluated for expectorant activity and the antitussive effect, evaluated only for CM. The data showed that SC:ZIF-8 system was obtained with an encapsulation efficiency of 22.5% confirmed from the analytical techniques used. SC also showed expectorant activity at 30 and 100 mg/kg doses. CM was successfully characterized, and its antitussive effect was also observed at the dose of 100 mg/kg. The development of the CM:ZIF-8 system requires optimization since the developed systems had low encapsulation efficiency values or did not obtain adequate release rates.

Keywords: Delayed-action Preparations, coumarins, scopoletin, coumarin, Metal-organic frameworks.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ATR – Reflectância total atenuada
- BET – Brunauer-Emmett-Teller
- CLAE-DAD – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos
- DDS – *Drug Delivery System*
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DRX – Difractometria de raios-X
- DSC – Calorimetria exploratória diferencial
- DTA – Análise térmica diferencial
- DTG- Termogravimetria diferencial
- EDS – Espectroscopia por energia dispersiva
- ESC – Escopoletina
- FC – Fluxo contínuo
- FF – Forma farmacêutica
- FFSO – Forma farmacêutica sólida oral
- FID – Decaimento livre de indução
- FT – Transformada de Fourier
- FTIR – Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (do inglês *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)
- MEV – Microscopia eletrônica de varredura
- MOF – do inglês *Metal organic frameworks*
- RMN – Ressonância magnética nuclear
- RPM- Rotações por minuto
- S_{BET} – Área de superfície específica
- TG – Termogravimetria
- TGI – Trato gastrointestinal
- UV-Vis – Ultravioleta-Visível
- ZIF-8 – *Zeolitic Imidazolate Framework*

LISTA DE SÍMBOLOS/UNIDADES

% – por cento

g.mol⁻¹ – gramas por mol

α – alfa

mg/mL – miligrama por mililitro

μg/mL – micrograma por mililitro

h – hora

s – segundo

min – minutos

Å – Angstrom

m².g⁻¹ – metro quadrado por grama

¹H – próton

MHz – Megahertz

l – Número quântico de spin

Z – Número atômico

A – Massa atômica

B – Campo magnético externo

δ – Deslocamento químico

J – Constante de acoplamento

cm⁻¹ – número de onda

λ – comprimento de onda

d_{hkl} – espaço interatômico

eV – elétron-volt

Au – ouro

Au-Pd – Liga ouro-paládio

Pt – platina

mL – mililitro

nm – nanômetro

mg – miligrama

mol/mol- mol por mol

2-MIm – 2-metilimidazol

Zn⁺² – íon zinco

M – molar
® – Marca registrada
TM – Marca comercial
DMSO- d_6 – dimetilsulfóxido deuterado
ppm – partes por milhão
ZnSe – Seleneto de zinco
°C – grau Celsius
kV – quilovolt
mW – miliwatts
mJ – milijoules
 ΔH – variação de entalpia
HCl – ácido clorídrico
mM – milimolar
mm – milímetro
 μm – micrômetro
 μL – microlitro
 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ – mililitro por minuto
 $\text{cm}^3\cdot\text{g}^{-1}$ – centímetros cúbicos por grama
rpm – rotações por minuto
 $\text{Zn}(\text{OAc})_2$ – Acetato de zinco
 p – pressão de equilíbrio
 p_0 – pressão de saturação
 r^2 – coeficiente de determinação

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1. Estrutura química (a) e tridimensional da escopoletina (b).	24
Figura 2. Estrutura química (a) e tridimensional da cumarina (b).	28
Figura 3. Representação da estrutura básica de uma MOF.	31
Figura 4. Panorama da pesquisa com MOFs.	33
Figura 5. Representação dos tipos de biocompósitos.	34
Figura 6. Desenho esquemático da ZIF-8.	37
Figura 7. Sistemas matriciais, a- matriz insolúvel; b- matriz hidrofílica.	42
Figura 8. Sistemas reservatório.	43
Figura 9. Bombas osmóticas.	44
Figura 10. Perfis de liberação (convencional <i>versus</i> modificada).	48

CAPÍTULO 1

Fig.1. Estrutura química da ESC (C ₁₀ H ₈ O ₂).	70
Fig.2. Estratégias de pesquisa de acordo com PRISMA.	72
Fig.3. Distribuição dos artigos por país.	72

CAPÍTULO 2

Fig.1. a: Cromatograma da ESC, b: Espectro de UV da ESC.	106
Fig.2. Difractogramas da ZIF-8, ESC e ESC:ZIF-8.	111
Fig.3. MEV da ZIF-8 (a- 30000x), EDS – ZIF-8 (b- 5000x), carbono (c), zinco (d) e nitrogênio (e).	112
Fig.4. MEV da ZIF-8 (a- 5000x), ESC (b- 1000x) e ESC:ZIF-8 (c- 3000 x, d- 5000x).	113
Fig.5. Espectro de RMN de ¹ H da ESC.	114
Fig.6. Espectro de RMN de ¹ H do ESC:ZIF-8.	115
Fig.7. Curvas de TG do ESC:ZIF-8, ESC e ZIF-8.	117
Fig.8. Curvas DSC do ESC:ZIF-8, ESC e ZIF-8.	118
Fig.9. Espectros de FTIR do ESC:ZIF-8, ZIF-8 e ESC.	119
Fig.10. Perfis de liberação <i>in vitro</i> de ESC livre.	121
Fig.11. Perfis de liberação <i>in vitro</i> do ESC:ZIF-8.	122

Fig.12. Perfil de liberação <i>in vitro</i> do ESC:ZIF-8 (pH 6,5).	122
Fig.13. Atividade expectorante da ESC, ESC:ZIF-8, Veículo e guaifenesina (n=6).	125

CAPÍTULO 3

Fig.1. Difractograma da CM.	140
Fig.2. MEV da CM (a- 200x, b- 5.000x).	141
Fig.3. Curva de TG da CM.	142
Fig.4. Curva de DSC da CM.	142
Fig.5. Espectro de FTIR da CM.	143
Fig.6. a: Cromatograma da CM, b: Espectro de UV da CM.	144
Fig.7. Perfis de liberação <i>in vitro</i> de CM livre.	145
Fig.8. Efeito da CM (10, 30 e 100 mg/kg), salina, veículo e ambroxol (120 mg/kg) (n=6) sobre a quantidade de vermelho de fenol.	147
Fig.9. Efeito percentual de tosse da CM (10, 30 e 100 mg/kg), veículo e codeína (30 mg/kg) (n=6).	149

CAPÍTULO 4

Fig.1. MEV da ZIF-8 (a- 5000x), MF (b- 5000x) e CM:ZIF-8 (c-10000x).	161
Fig.2. Espectros de FTIR do CM:ZIF-8 e ZIF-8.	163
Fig.3. Perfis de liberação <i>in vitro</i> de CM:ZIF-8 (sistema A).	164
Fig.4. Perfis de liberação <i>in vitro</i> de CM:ZIF-8 (sistema B).	165

LISTA DE TABELAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Tabela 1. Propriedades físico-químicas da escopoletina.	25
Tabela 2. Propriedades físico-químicas da cumarina.	28
Tabela 3. MOFs utilizadas no desenvolvimento de alguns DDS.	36

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Principais características e resultados dos estudos selecionados da escopoletina.	74
--	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1. R ² ajustados obtidos a partir dos modelos cinéticos obtido do ensaio de liberação <i>in vitro</i> em condições <i>non sink</i> da ESC e sistema ESC:ZIF-8 em diferentes pH (4,5 e 6,5).	123
--	-----

CAPÍTULO 3

Tabela 1. R ² ajustados obtidos a partir dos modelos cinéticos obtido do ensaio de liberação <i>in vitro</i> em condições <i>non sink</i> da CM nos pHs 2,0; 4,5 e 6,86.	146
--	-----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
REFERÊNCIAS	21
2 REFERENCIAL TEÓRICO	24
2.1 Escopoletina	24
2.1.1 Características gerais.....	24
2.1.2 Atividades farmacológicas.....	26
2.2 Cumarina	27
2.2.1 Características gerais.....	27
2.2.2 Atividades farmacológicas.....	29
2.3 Metal Organic Frameworks (MOFs)	30
2.3.1 Características gerais.....	30
2.3.2 Tipos e aplicações das MOFs	33
2.4 Zeolitic Imidazolate Framework-8 (ZIF-8)	36
2.4.1 Características gerais.....	36
2.4.2 ZIF-8: aplicações como <i>Drug Delivery Systems</i>	38
2.5 Liberação Modificada	40
2.5.1 Características gerais e mecanismos de liberação	40
2.6 Técnicas de caracterização	48
2.6.1 Difração de Raios-X (DRX)	48
2.6.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	49
2.6.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	50
2.6.4 Análise térmica.....	52
2.6.5 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	53

2.6.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à arranjo diodo (CLAE-DAD)	54
REFERÊNCIAS.....	57
3 OBJETIVOS.....	66
3.1 Geral	66
3.2 Específicos	66
CAPÍTULO 1	67
RESUMO.....	68
1 INTRODUÇÃO	69
2 MATERIAL E MÉTODOS	70
2.1 Estratégias de seleção.....	70
2.2 Seleção dos artigos	70
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
3.1 Análise geral dos estudos	71
3.2 Estudos pré-clínicos	84
3.2.1 Anti-inflamatória e antioxidante	84
3.2.2 Antidiabético	86
3.2.3 Antidislipidêmico.....	88
3.2.4 Antibacteriana e antifúngica	89
3.2.5 Anti-hipertensivo.....	90
3.2.6 Inibição da MAO	90
3.2.7 Antipsicótico	91
3.2.8 Neuroprotetora	92
3.2.9 Esclerose múltipla	92
3.2.10 Citotóxica.....	92
3.2.11 Melanogênese.....	93
3.2.12 Antiangiogênica.....	94

3.2.13 Antienvelhecimento	95
4 CONCLUSÃO	95
REFERÊNCIAS.....	96
CAPÍTULO 2.....	99
RESUMO.....	100
1 INTRODUÇÃO	101
2 MATERIAL E MÉTODOS	102
2.1 Material.....	102
2.2 Desenvolvimento do sistema ESC:ZIF-8.....	102
2.3 Caracterização do sistema ESC:ZIF-8	103
2.3.1 Difractometria de Raios-X (DRX)	103
2.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	103
2.3.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	104
2.3.4 Análise térmica.....	104
2.3.5 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	105
2.3.6 Quantificação da ESC por CLAE-DAD	105
2.3.7 Testes de liberação in vitro da ESC	106
2.4 Determinação do modelo cinético do perfil de liberação da ESC.....	107
2.5 Avaliação da atividade expectorante.....	107
2.6 Análise estatística	108
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	109
3.1 Desenvolvimento do sistema ESC:ZIF-8.....	109
3.2 Caracterização do sistema ESC:ZIF-8	110
3.2.1 Difractometria de Raios-X (DRX)	110
3.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	111
3.2.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	113

3.2.4 Análise térmica.....	115
3.2.5 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	118
3.2.6 Testes de liberação <i>in vitro</i> da ESC	120
3. 3 Avaliação da atividade expectorante da ESC e do ESC:ZIF-8.....	124
4 CONCLUSÃO	126
REFERÊNCIAS.....	127
CAPÍTULO 3.....	132
RESUMO.....	133
1 INTRODUÇÃO	134
2.2 Caracterização da cumarina.....	135
2.2.1 Difractometria de Raios-X (DRX)	135
2.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	135
2.2.3 Análise térmica.....	135
2.2.4 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	136
2.2.5 Quantificação da CM por CLAE-DAD.....	136
2.2.6 Testes de liberação <i>in vitro</i> da CM	137
2.2.7 Determinação do modelo cinético do perfil de liberação da CM.....	138
2.3 Atividade expectorante.....	138
2.4 Atividade antitussígena	139
2.5 Análise estatística	139
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	140
3.1 DRX e MEV	140
3.2 Análise térmica.....	141
3.3 FTIR	143
3.4 Perfil de liberação <i>in vitro</i> da CM.....	143

3.5 Atividade expectorante	146
3.6 Atividade antitussígena	147
4 CONCLUSÃO	149
REFERÊNCIAS.....	150
CAPÍTULO 4.....	153
RESUMO.....	154
1 INTRODUÇÃO	155
2 MATERIAL E MÉTODOS	156
2.1 Material.....	156
2.2 Desenvolvimento <i>in situ</i> dos sistemas CM:ZIF-8	157
2.3 Caracterização dos sistemas CM:ZIF-8	158
2.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	158
2.3.5 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	159
2.3.6 Quantificação da CM por CLAE-DAD.....	159
2.3.7 Testes de liberação <i>in vitro</i> da CM	160
2.5 Análise estatística	160
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	161
3.1 Caracterização do sistema A.....	161
3.2 Caracterização do sistema B.....	164
4 CONCLUSÃO	165
REFERÊNCIAS.....	166
CONSIDERAÇÕES FINAIS	168
ANEXO A- Depósito de Patente	170
ANEXO B- Artigo Publicado	171
ANEXO C- Autorização do CEUA-UNIVASF	172

1 INTRODUÇÃO

As cumarinas são metabólitos secundários amplamente encontrados em diferentes espécies vegetais e são usadas principalmente devido ao seu efeito anticoagulante na terapia antitrombótica para doenças cardiovasculares (LI; YAO; LI, 2017). Estudos demonstram que as cumarinas apresentam atividades: antiviral, antibacteriana, anti-inflamatória, antioxidante (BISSONNETTE et al., 2009); antitumoral e hipouricêmica (CAI et al., 2013).

Um dos exemplos de compostos cumarínicos é a escopoletina (7-hidroxi-6-metoxi-2H-cromen-2-ona, ESC), uma cumarina fenólica que pode ser isolada de muitas espécies de plantas (KAI et al., 2008). Diferentes estudos demonstram suas atividades farmacológicas tais como, antitumoral, anti-hipertensiva e anti-hiperglicêmica (CHANG et al., 2015), anti-inflamatório (DING et al., 2008), anti-depressivo (CAPRA et al., 2010), antioxidante (PANDA; KAR, 2006), inibidora de acetilcolinesterase (HORNICK et al., 2011), inibidora de aldose redutase (LEE et al., 2010) e inibidora da gama-aminotransferase (MISHRA et al., 2010).

Outro exemplo de composto cumarínico é a cumarina (cromen-2-ona, CM), um constituinte químico fenólico natural, presente em diferentes plantas medicinais (RODRIGUES, et al., 2008). Esse composto apresenta diferentes atividades farmacológicas descritas na literatura tais como, atividade quimiopreventiva (BASKARAN et al., 2012), atividade anti-inflamatória (PASQUA et al., 2019), atividade antifúngica (XU et al., 2019) e broncodilatadora (BERTOLDI et al., 2016).

Além das propriedades biológicas e farmacológicas, outro ponto importante para candidata à molécula no desenvolvimento de um sistema são as características físico-químicas. No caso dessas cumarinas a solubilidade em água é considerada baixa. Essa baixa solubilidade em água pode ser confirmada pelo log de P, escopoletina (1,3) e cumarina (1,4) (MOLINSPIRATION, 2017).

Diferentes tipos de tecnologias têm sido utilizados no desenvolvimento de um *Drug Delivery System* (DDS) e tem como principal objetivo, a melhora da liberação e absorção de compostos de baixa solubilidade (GARCÍA-ARIETA, 2014). Tem-se como exemplo de novas tecnologias as: pró-drogas, lipossomas,

biopolímeros, nanopartículas, ciclodextrinas e as Redes Metalorgânicas ou Redes de Coordenação Organometálicas, do inglês *Metal Organic Frameworks* (MOFs) (FURUKAWA et al., 2013). As MOFs possuem as mais variadas funcionalidades em diversas áreas, tais como adsorção de substâncias, membranas de troca de substâncias (CACHO-BAILO et al., 2014), catálise (YU et al., 2015), separação e armazenamento de gases e vapores (HARA et al., 2014) e na formulação de um DDS (SUN et al., 2013).

Dentre as MOFs utilizadas na formação de um DDS, tem-se a subclasse *Zeolitic Imidazolate Frameworks* (ZIFs) e com destaque para o subtipo ZIF-8, utilizado como excipiente neste trabalho. A ZIF-8 tem uma estrutura estável devido às pontes realizadas entre o 2-metilimidazol (2-MIm) e o zinco tetraédrico (KIDA et al., 2013; ZHUANG et al., 2014). As ZIFs destacam-se pelas suas características de microporosidade, elevada área superficial, estabilidade cinética e alta estabilidade térmica (FANG et al., 2015).

Considerando-se os efeitos farmacológicos dessas cumarinas assim como, a baixa solubilidade destas em meio aquoso e o papel da ZIF-8 como um importante carreador no desenvolvimento de um sistema, esta pesquisa propõe o desenvolvimento de um *Drug Delivery Systems*, por incorporação dessas cumarinas à rede reticular da ZIF-8.

REFERÊNCIAS

- BASKARAN, N. *et al.* Chemopreventive potential of coumarin in 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene induced hamster buccal pouch carcinogenesis. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, n. 10, p. 5273–5279, 2012.
- BERTOLDI, F.C. *et al.* Validação de um método analítico rápido por CLAE-UV para determinação de cumarina em guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) confirmado com espectrometria de massas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 11, p.316-325, 2016.
- BISSONNETTE, E.Y *et al.* Coumarinic derivatives show anti-inflammatory effects on alveolar macrophages, but their anti-elastase activity is essential to reduce lung inflammation *in vivo*. **International Immunopharmacology**, v. 9, p. 49-54, 2009.
- CAI, X *et al.* Synthesis and biological evaluation of scopoletin derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, p. 84-92, 2013.
- CACHO-BAILO, F. *et al.* ZIF-8 continuous membrane on porous polysulfone for hydrogen separation. **Journal of Membrane Science**, v. 464, p. 119–126, 2014.
- CAPRA, J.C. *et al.* Antidepressant-like effect of scopoletin, a coumarin isolated from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in mice: evidence for the involvement of monoaminergic systems. **European Journal Pharmacology**, v. 643, p. 232-238, 2010.
- CHANG, W. *et al.* Scopoletin protects against methylglyoxal-induced hyperglycemia and insulin resistance mediated by suppression of advanced glycation endproducts (AGEs) generation and anti-glycation. **Molecules: A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry**, v. 20, n. 2, p. 2786–2801, 2015.
- DING, Z. *et al.* Anti-inflammatory effects of scopoletin and underlying mechanisms. **Pharmaceutical Biology**, v. 46, p. 854-860, 2008.
- FANG, M. *et al.* ZIF-8/PDMS mixed matrix membranes for propane/nitrogen mixture separation: Experimental result and permeation model validation. **Journal of Membrane Science**, v. 474, p. 103–113, 2015.
- FURUKAWA, H. *et al.* The Chemistry and Applications of Metal-Organic Frameworks. **Science**, v. 341, p. 1- 14. 2013.
- GARCÍA-ARIETA, A. Interactions between active pharmaceutical ingredients and excipients affecting bioavailability: Impact on bioequivalence. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 65, p. 89–97, 2014.

- HARA, N. et al. Diffusive separation of propylene/propane with ZIF-8 membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 450, p. 215–223, 2014.
- HORNICK, A. et al. The coumarin scopoletin potentiates acetylcholine release from synaptosomes, amplifies hippocampal long-term potentiation and ameliorates anticholinergic-and age-impaired memory. **Neuroscience**, v. 197, p. 280-292, 2011.
- KAI, K. et al. Scopoletin is biosynthesized via ortho-hydroxylation of feruloyl CoA by a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v.55, p. 989–999, 2008.
- KIDA, K. et al. Formation of high crystalline ZIF-8 in an aqueous solution. **Crystal engineering communications**, v. 15, n. 9, p. 1794- 1801, 2013.
- LEE, J., et al. Scopoletin from the flower buds of *Magnolia fargesii* inhibits protein glycation, aldose reductase, and cataractogenesis ex vivo. **Archives Pharmacology Research.**, v. 33, p. 1317-1323, 2010.
- LI, H.; YAO, Y.; LI, L. Coumarins as potential antidiabetic agentes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 69, pp. 1253 –1264, 2017.
- MOLINSPIRATION, Calculation of Molecular Properties and Bioactivity Score. Disponível em: <http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>. Acessado em: 18 de março de 2017.
- MISHRA, N. et al. Anticonvulsant activity of *Benkara malabarica* (Linn.) root extract: in vitro and in vivo investigation. **Journal of Ethnopharmacology.**, v. 128, p. 533-536, 2010.
- PANDA, S., KAR, A. Evaluation of the antithyroid, antioxidative and anti-hyperglycemic activity of scopoletin from *Aegle marmelos* leaves in hyperthyroid rats. **Phytotherapy Research.**, v.20, 1103-1105, 2006.
- PASQUA, C. S. P. DELLA et al. Pharmacological study of anti-inflammatory activity of aqueous extracts of *Mikania glomerata* (Spreng.) and *Mikania laevigata* (Sch. Bip. ex Baker). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 231, p. 50–56, 2019.
- RODRIGUES, R. F et al. Coumarin solubility and extraction from emburana (*Torresea cearensis*) seeds with supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 43, n. 3, p. 375–382, 2008.
- SUN, C-Y. et al. Metal-organic frameworks as potential drug delivery systems. **Expert Opinion Drug Delivery**.v.10, n. 1, p. 89-101, 2013.

YU, B. et al. Self-template synthesis of core-shell ZnO@ZIF-8 nanospheres and the photocatalysis under UV irradiation. **Materials Letters**, v. 156, p. 50–53, 2015.

ZHUANG, J. et al. Optimized metal-organic-framework nanospheres for drug delivery: Evaluation of small-molecule encapsulation. **ACS Nano**, v. 8, n. 3, p. 2812–2819, 2014.

XU, K. et al. Activity of coumarin against *Candida albicans* biofilms. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 29, n. 1, p. 28–34, 2019.

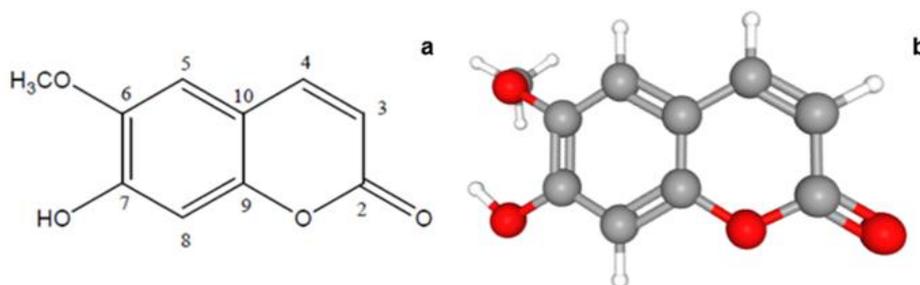
2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Escopoletina

2.1.1 Características gerais

A escopoletina (7-hidroxi-6-metoxi-2H-cromen-2-ona, $C_{10}H_8O_4$, ESC, Figura 1) é uma cumarina fenólica derivada da via dos fenilpropanoides que pode ser isolada de muitas espécies de plantas. Esta cumarina tem atividade de fitoalexina, ou seja, é produzida pelas plantas em situações de infecção, estresse, lesão mecânica e desidratação (KAI et al., 2008). Quimicamente é uma hidroxycumarina, com substituição na posição 6 de uma metoxila. De acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry- IUPAC*) designa-se como 7-hidroxi- 6-metoxi-2H-cromen-2-ona.

Figura 1. Estrutura química (a) e tridimensional da escopoletina (b).



Fonte: Autoria própria.

As propriedades físico-químicas de uma molécula, grupos funcionais, são de fundamental importância na farmacodinâmica dos fármacos. As propriedades de coeficiente de partição (lipofilicidade), que expressa a relação entre o seu perfil de hidro e lipossolubilidade, e o coeficiente de ionização (pKa) são capazes de alterar o perfil farmacoterapêutico de um candidato a fármaco (BARREIRO et al., 2015).

Segue abaixo algumas propriedades físico-químicas desta molécula presentes no banco de dados Pubchem (Tabela 1). Essas propriedades foram

importantes para confirmar alguns dados obtidos no desenvolvimento da pesquisa.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas da escopoletina.

Propriedade	Valor
Massa molar	192,17 g/mol
Doador de hidrogênio	1
Aceptor de hidrogênio	4
Ponto de fusão	204° C
log de P	1,5

Fonte: PubChem, 2019.

O valor do log de P demonstra que a escopoletina apresenta mais afinidade pela fase orgânica. Desse modo, considera-se como referência um valor entre 1 e 3 como ideal para que haja permeabilidade por biomembranas (BARREIRO et al., 2015). Fato este que, confirmaria sua baixa solubilidade e pelo valor do log P demonstra alta permeabilidade por biomembranas. De acordo, com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) essa molécula seria de classe II (BRASIL, 2016).

Há mais duas pesquisas importantes acerca das suas propriedades físico-químicas e que justificam de antemão o desenvolvimento do sistema. Zeng e colaboradores (2015) realizaram experimentos no quais quantificava escopoletina em plasma de rato após administração por via oral. Os autores observaram que em todas as doses utilizadas administradas por via oral a biodisponibilidade foi em média 6%, valor este considerado baixo e determinado pela baixa solubilidade em água da molécula.

O trabalho de Zeng e colaboradores (2017) deram segmento aos resultados obtidos em 2015 pelo grupo de pesquisa. Desse modo, com o objetivo de melhorar a biodisponibilidade dessa cumarina desenvolveram um sistema utilizando *Soluplus* (micelas) para incorporar. Os resultados obtidos evidenciaram que a biodisponibilidade da escopoletina foi três maior quando comparada com a substância pura e a atividade foi significativa. As propriedades

físico-químicas foram determinantes na escolha dessa molécula e no método de desenvolvimento de um dos sistemas pretendidos.

2.1.2 Atividades farmacológicas

A escopoletina é um agente farmacologicamente ativo e tem sido isolado a partir de várias espécies vegetais, tais como *Erycibe obtusifolia* Benth, *Aster tataricus* e *Foeniculum vulgare* (MOON et al., 2007). Presente também em algumas espécies de plantas comestíveis e frutas entre as quais, aveia (*Avena sativa*), alho (*Allium ampeloprasum*), aipo (*Apium graveolens*), pimenta vermelha (*Capsicum annuum*), pimenta (*Capsicum frutescens*), cenoura (*Daucus carota*), limão (*Citrus limon*) e batata doce (*Ipomoea batata*) (CARPINELLA; FERRAYOLI; PALACIOS, 2005).

Jamuna e colaboradores (2015) isolaram a escopoletina do extrato *Hypochoeris radicata* e observaram um efeito anti-inflamatório com redução de algumas citocinas pró-inflamatórias, TNF- α , IL-1 β e IL-6. Outro estudo, isolou a escopoletina dos frutos de *Foeniculum vulgare* e constatou sua atividade anti-inflamatória e antioxidante (YANG; LEE; SHIN, 2015). Já Wan Osman e colaboradores (2017) isolaram a escopoletina do extrato das folhas de *Morinda elliptica* (noni) e realizaram um estudo pré-clínico com o qual observaram um efeito anti-inflamatório em modelo de osteoartrite.

Ding e colaboradores (2008) avaliaram também o efeito anti-inflamatório e constataram que o efeito era independente do óxido nítrico endotelial assim como, da inibição da biossíntese dos eicosanoides, influxo celular e peroxidação. Moon e colaboradores (2007) delinearão experimentos para investigar como essa cumarina afeta a produção de citocinas inflamatórias. Desse modo, alguns eventos foram observados: inibiu a produção de fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucinas 6 e 8 (IL-6 e IL-8).

Em um estudo no qual a escopoletina foi isolada do extrato de *Nicotiana glauca* (tabaco) evidenciou-se que esta molécula apresenta atividade antitumoral por ação antiangiogênica (TABANA et al., 2016). A escopoletina também é marcador químico e farmacológico da *Morinda citrifolia* (noni) e demonstrou uma atividade antipsicótica (PANDY; VIJEEPALLAM, 2017).

Já Li e colaboradores (2015) evidenciaram que a escopoletina apresenta efeito citotóxico sobre uma linhagem de células de câncer de próstata humano (LNCaP). Kim e colaboradores (2017) investigaram os eventos moleculares que fazem com que a escopoletina estimule a melanogênese. Basu e colaboradores (2016) constataram por meio de sua pesquisa que a escopoletina é um inibidor parcialmente seletivo da monoamino oxidase B e com isso aumenta os níveis de dopamina no cérebro. Evidenciou-se ainda que essa cumarina apresenta ação inibitória distinta sobre a α -amilase e α -glicosidase em ratos diabéticos (JANG; PARK; HAN, 2018). Outro efeito metabólico da escopoletina avaliado em modelo *in vivo* é o de anti-obesidade e anti-hepatoesteatose realizado por Ham e colaboradores (2016).

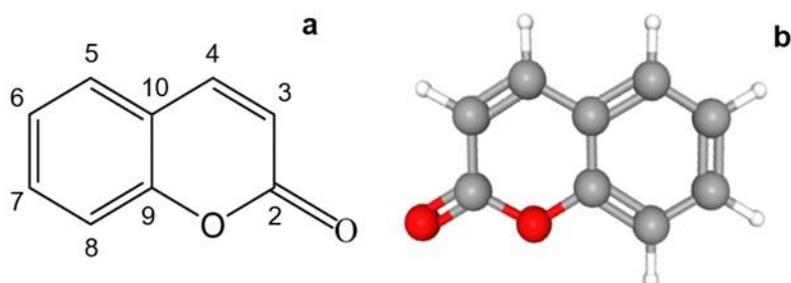
Em um estudo mais recente os autores evidenciaram que a escopoletina efetivamente melhorou a encefalomielite autoimune experimental (EAE), em modelo animal de esclerose múltipla, por meio de novos mecanismos reguladores que envolvem inibição da atividade de fator nuclear kappa (NF- κ B) em células dendríticas. O tratamento com escopoletina melhorou significativamente a severidade da doença e diminuição acentuada da inflamação e desmielinização do sistema nervoso central nesses animais (ZHANG et al., 2019).

2.2 Cumarina

2.2.1 Características gerais

A 2-benzopirona ou cumarina propriamente dita (cromen-2-ona, $C_9H_6O_2$, CM, Figura 2) é um constituinte natural presente em diversas espécies de plantas (RODRIGUES et al., 2008). Essa molécula é utilizada como marcador químico da *Mikania glomerata*, além disso, estudos demonstraram suas atividades farmacológicas espasmolíticas, anti-inflamatória e broncodilatadora (BERTOLDI et al., 2016). Quimicamente é uma cumarina simples e sua designação segundo a IUPAC é cromen-2-ona, há outros sinônimos tais como, cumarina, 1,2-benzopirona, 2-H-cromen-2-ona.

Figura 2. Estrutura química (a) e tridimensional da cumarina (b).



Fonte: Autoria própria.

Na Tabela 2 observa-se algumas propriedades físico-químicas de grande importância para confirmar alguns dados obtidos na pesquisa (PubChem, 2019).

Tabela 2. Propriedades físico-químicas da cumarina.

Propriedade	Valor
Massa molar	146,14 g/mol
Doador de hidrogênio	0
Aceptor de hidrogênio	2
Ponto de fusão	71° C
log de P	1,4

Fonte: PubChem, 2019.

Assim como a escopoletina pode-se afirmar que essa cumarina apresenta maior afinidade pela fase orgânica e dessa forma maior permeabilidade por biomembranas (BARREIRO et al., 2015). Fato este que confirma sua baixa solubilidade em água e boa solubilidade em solventes orgânicos como etanol, clorofórmio, éter dietílico, metanol e outros óleos (AZEVEDO et al., 2014). Como também o valor de coeficiente de ionização (pKa) que é de grande importância para a farmacocinética, uma vez que o pKa é inversamente proporcional à lipofilicidade, sendo assim espécies não ionizadas conseguem atravessar passivamente biomembranas (BARREIRO et al., 2015)

Além disso, suas propriedades farmacológicas estão relacionadas a sua estrutura e as suas propriedades físico-químicas de anel heterocíclico, que permitem a ligação com proteínas-alvos. Vale ressaltar que seu grupo lactona

concede as cumarinas uma capacidade de estabelecer ligações de hidrogênio e acilar alvos proteicos (AHMED et al., 2020)

2.2.2 Atividades farmacológicas

Essa cumarina é encontrada em uma grande diversidade de plantas e frutas, tais como: como guaco (*Mikania glomerata*), emburana (*Amburana cearenses*), agrião (*Nasturtium officinale*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*), morango (*Fragaria* spp), damasco (*Prunus armeniaca*) e cereja (*Cerasus*) (RODRIGUES, et al., 2008) e apresenta uma ampla variedade de atividades farmacológicas descritas na literatura. Diante disso, seguem abaixo alguns estudos importantes sobre suas atividades.

Pasqua e colaboradores (2019) evidenciaram atividade anti-inflamatória da cumarina por meio de testes em animais (edema de pata, pleurite e degranulação de mastócitos). A cumarina foi utilizada nas doses de 10, 50,75,100 mg/Kg e os resultados obtidos pelo teste de edema de pata demonstraram que esta cumarina inibiu significativamente o edema. Já no teste de degranulação de mastócitos, a liberação de histamina não foi afetada e para o teste de pleurite a cumarina reduziu significativamente a infiltração de celular.

A cumarina possui ainda atividade quimiopreventiva. Um estudo realizado relatou a eficácia da cumarina como atividade quimiopreventiva contra o estresse oxidativo renal induzido por KBrO_3 . Para tanto realizou-se os testes de toxicidade e resposta hiperproliferativa em ratos Wistar (KHAN, SHARMA e SULTANA, 2004).

Xu e colaboradores (2019) evidenciaram atividade antifúngica da cumarina. Os resultados demonstraram que a cumarina inibe a formação de biofilmes de *Candida Albicans*, além de influenciar na biomassa total e atividade metabólica desse fungo. Outra atividade foi evidenciada por Panda e Kar (2007), estes pesquisadores evidenciaram que a cumarina apresenta regulação no hipertiroidismo.

Vale ressaltar ainda que a cumarina é um dos compostos químicos de maior concentração no guaco (*Mikania glomerata*), conhecido por suas atividades no sistema respiratório (BERTOLDI et al., 2016). Estudos realizados

por Ramanitrahasimbola e colaboradores (2005) demonstraram que a cumarina é constituinte bioativo também da *Phymatodes scolopendria* (Burm.) Ching e apresentou efeitos no sistema respiratório. Desse modo, evidenciou-se o efeito broncodilatador da planta e de seu constituinte bioativo.

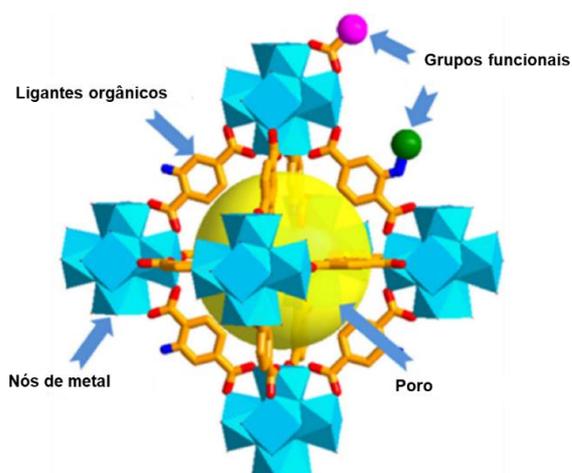
2.3 Metal Organic Frameworks (MOFs)

2.3.1 Características gerais

As redes metalorgânicas são redes de coordenação, do inglês *Metal Organic Frameworks* (MOFs). Desse modo, a IUPAC definiu que uma unidade de coordenação corresponde a uma molécula iônica ou neutra, composta por um átomo central geralmente um metal, ao qual está ligada uma matriz em torno de átomos ou grupos de átomos, cada um destes denominados *linkers* (ligantes). Essa definição encontra-se em consonância com a *Commission on Metal Organic Frameworks* (IUPAC, 2005; IUPAC, 2016).

MOFs são, portanto, conhecidos como polímeros porosos de coordenação e são formadas por ligantes orgânicos (*linker*) e íons/aglomerados metálicos (cobre, ferro, titânio, molibdênio, níquel, magnésio e manganês) (Figura 3) (FURUKAWA et al., 2013; JIAO et al., 2018). Esse processo é conhecido como “blocos de construção” (*linker* e metal), esses blocos fornecem o controle da funcionalidade química, forma, tamanho de poros e morfologia dos cristais (DOONAN et al., 2017). Essas características determinam em grande parte as propriedades de uma MOF tais como, cristalinidade bem definida, elevada estabilidade térmica e química, biodegradabilidade intrínseca como resultado de ligações de metais relativamente lábeis e versáteis, que são desejáveis quando o intuito é o transporte de moléculas (FANG et al., 2015; VASCONCELOS et al., 2012).

Figura 3. Representação da estrutura básica de uma MOF.



Fonte: Adaptado de JIAO et al., 2018.

As MOFs apresentam uma grande área de superfície que pode variar de 1000 a 10000 m²/g, esta característica contribui para sua versatilidade de uso em diversas áreas. As MOFs podem ter ainda tamanhos de poros que variam de micro porosos a macro porosos. Essa peculiaridade faz com que esses materiais apresentem a capacidade de acomodar diferentes tipos de substâncias tais como, nanopartículas, complexos metálicos, corantes orgânicos, polioxometalatos, polímeros e peptídeos (JIAO et al., 2018).

As MOFs podem ser classificadas como flexíveis ou rígidas, e isso tem relação com o tamanho de poro. As rígidas possuem porosidade permanente e estruturas porosas robustas semelhantes aos materiais porosos inorgânicos. As MOFs flexíveis, por sua vez, possuem porosidade dinâmica e respondem aos fatores externos tais como, moléculas hóspedes, temperatura e pressão. A flexibilidade estrutural, também conhecida como a "respiração", permite que essas MOFs possam modular reversivelmente o seu tamanho de poro de acordo com as moléculas hóspedes adsorvidas/incorporadas (KESKIN; SEDA; KIZILEL, 2010).

A estabilidade das MOFs pode ser afetada por vários fatores, incluindo o ambiente operacional, íons metálicos, ligantes orgânicos, geometria de coordenação metal-ligante, hidrofobicidade da superfície dos poros. O conhecimento mais aprofundado das estruturas químicas possíveis de MOF, das técnicas de desenvolvimento e caracterização dessas estruturas, fez com que

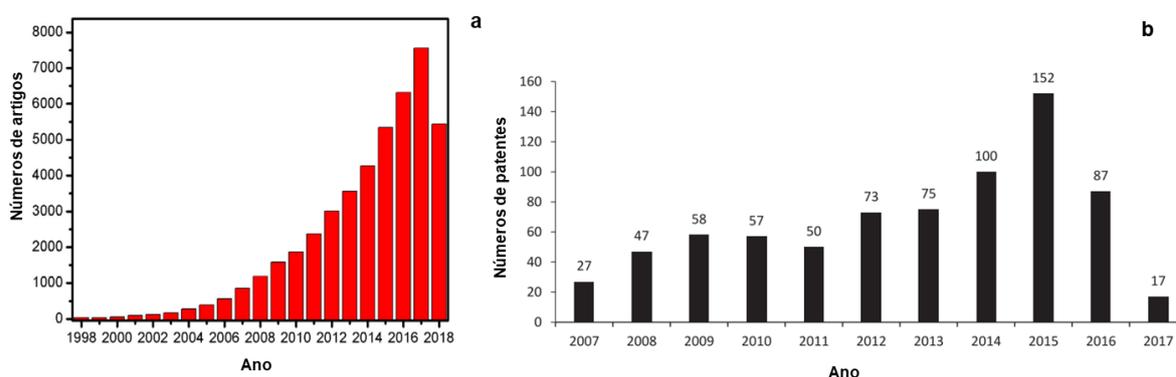
os pesquisadores da área identificassem os pontos de instabilidade de cada tipo de MOF. Desse modo, nos últimos anos tem-se MOFs cada vez mais estáveis (YUAN et al., 2018). Porém, quando se trata da utilização dessas MOFs na área médica, um certo grau de instabilidade se faz necessário (SUN et al., 2013; LI et al., 2017).

Como as MOFs são compostos formados inteiramente por ligações fortes (C-C, C-H, C-O e M-O), elas demonstram alta estabilidade térmica, variando de 250 a 500° C. Já o primeiro exemplo de uma MOF com estabilidade química excepcional foi a *Zeolitic Imidazolate framework-8* (ZIF-8). No estudo de Park e colaboradores (2006), este tipo de MOF permaneceu inalterada após imersão em metanol, benzeno e água fervente por até 7 dias, e em hidróxido de sódio concentrado a 100° C por 24 h.

Até o momento são conhecidos mais de 20000 diferentes tipos de MOF. A pesquisa, artigos publicados e número de patentes, nessa área só cresce a cada ano, considerando a importância e versatilidade dessas estruturas (Figura 4) (YAP; FOW; CHEN, 2017) (JIAO et al., 2019).

Realizando-se a mesma pesquisa no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), utilizando os termos *Metal organic framework*, MOF, MOFs, no título e/ou resumo foram encontradas apenas seis patentes depositadas (INPI, 2019). Dentre essas, apenas uma patente tem base científica/tecnológica para o trabalho desenvolvido, depósito de patente de número BR10 2016 0034086 com título “Formulações farmacêuticas contendo associação de Benznidazol e MOFs para obtenção tecnológica de Sistemas *Drug Delivery*” (FERRAZ et al., 2016).

Figura 4. Panorama da pesquisa com MOFs.



Fonte: Adaptado (a-JIAO et al., 2018) (b- YAP; FOW; CHEN, 2017). a) amostragem de número de artigos; b) número de patentes na World Intellectual Property Organization (WIPO).

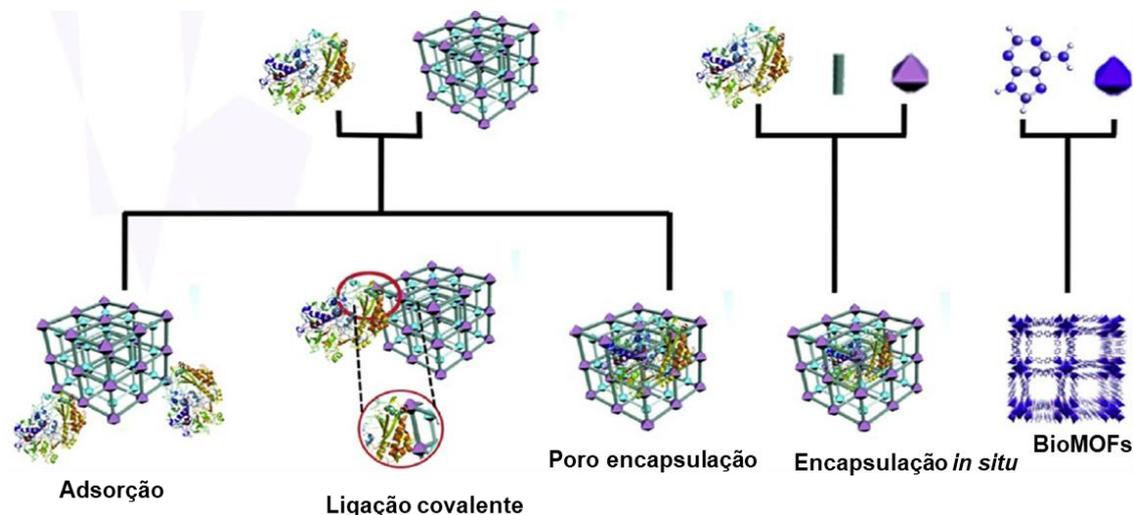
2.3.2 Tipos e aplicações das MOFs

As diversas aplicações das MOFs estão diretamente relacionadas às suas características físico-químicas. Desse modo, os estudos cresceram muito nos últimos anos com o objetivo de demonstrar sua aplicabilidade nas áreas de nanotecnologia e ciências dos materiais (DOONAN et al., 2017). Outras pesquisas buscaram a aplicabilidade das MOFs para indústria, como fonte de energia renováveis. Desse modo, houve o desenvolvimento de novas aplicações nesta área dentre elas, o armazenamento e/ou conversão de energia, separação de gases, biosensores, biocatalises e *Drug Delivery System* (DDS) (YAP; FOW; CHEN, 2017).

Na área da biotecnologia diversos tipos de MOFs apresentam aplicações interessantes e isto está diretamente relacionado às estratégias de obtenção. Dessa forma, as MOFs podem formar estruturas chamadas de biocompósitos (MOF + biomoléculas) e são classificadas considerando o tipo de interação (DOONAN et al., 2017). As estratégias de obtenção dependem de condições biologicamente compatíveis e podem ser classificadas em quatro diferentes métodos (*ex situ* e/ou *in situ*). Esses métodos podem ser: (1) as biomoléculas podem ser absorvidas aos poros das MOFs; (2) adsorvidas/anexadas à parte externa das MOFs; (3) encapsuladas de maneira *in situ* aos cristais de MOF; (4) as biomoléculas podem ser os ligantes na formação das MOFs. Desse modo, a

partir desses quatro métodos de obtenção pode-se ter os diferentes tipos de biocompósitos. A partir dessas estruturas há a possibilidade de diferentes aplicações na área da biotecnologia e ciências farmacêuticas (AN et al., 2019).

Figura 5. Representação dos tipos de biocompósitos.



Fonte: Adaptado (AN et al., 2019).

Os chamados *Drug Delivery System*, sistemas carreadores de fármacos, são constituídas por diversos materiais, a exemplo das dispersões sólidas, nanopartículas e lipossomas (SOARES-SOBRINHO et al., 2012). Desse modo, a utilização das MOFs, se consolida como um dos mais recentes DDS e é utilizado quando há interesse de incremento de solubilidade e modulação da liberação.

Na área das ciências farmacêuticas dentre os métodos demonstrados anteriormente os mais utilizados no desenvolvimento de DDS são a poro encapsulação e a encapsulação *in situ* (AN et al., 2019). A poro encapsulação, por exemplo, é uma das estratégias mais simples e pode acomodar vários tipos de biomoléculas (substratos, enzimas ou cofatores) com consideráveis taxas de carregamento (CUI et al., 2018). Já a encapsulação *in situ* tem como vantagem encapsular grandes biomoléculas, pois ocorre com a formação da MOF em torno da molécula (LIAO et al., 2017).

Horcajada e colaboradores (2006) utilizaram os Materiais do Instituto Lavoisier (MIL) e cromo como metal obtendo-se as MOFs MIL-100 e MIL-101. Esses pesquisadores propuseram pela primeira vez que as MOFs tinham

potencial de formação de DDS. Fato este atribuído à capacidade de carga considerável (tamanho de poro e área de superfície) e ao comportamento de liberação controlada. Essa pesquisa serviu de base para os diversos trabalhos nessa área.

Um ponto que favorece o uso de MOFs em DDS é a baixa toxicidade de muitos metais utilizados na sua produção. Dentre os mais utilizados tem-se: cálcio (Ca), cobre (Cu), manganês (Mn), magnésio (Mg), zinco (Zn), ferro (Fe), titânio (Ti) ou zircônio (Zr), porém os dados sobre seu destino biológico são limitados. A toxicidade destes metais é estimada pela dose letal oral 50% (DL₅₀), sendo: Ca: 1 g/kg; Cu: 25 µg/kg; Mn: 1,5 g/kg; Mg: 8,1 g/kg; Zn: 350 µg/kg; Fe: 30 g/kg; Ti: 25 g/kg e Zr: 4,1 g/kg (SUN et al., 2013).

Horcajada e colaboradores (2006) utilizaram ainda MOFs à base ferro (III) poroso não-tóxico e o anti-inflamatório não-esteroidal ibuprofeno (HORCAJADA et al., 2006). Posteriormente, Horcajada e colaboradores (2010) evidenciaram que determinadas nano-MOFs são capazes de adsorver e, posteriormente, liberar fármacos, tornando-se carreadores não-tóxicos. Até agora, viu-se que apenas uma parcela de MOFs permite a carga de uma grande quantidade de fármacos, com tempo de modulação de liberação entre 6 e 23 dias (HUXFORD; DELLA ROCCA; LIN, 2010).

Sun e colaboradores (2012) realizaram o estudo de liberação do 5-fluoracil associado a MOF ZIF-8 como uma topografia inédita. A partir de diálise em meio tampão fosfato salino (pH 7,4) a 37° C foi observada uma liberação de 92% do fármaco ao final de 120 h, exibindo uma liberação lenta. Os autores sugeriram que essa lenta liberação está ligada ao grande potencial de formação de ligações de hidrogênio entre o 5-FU e a ZIF-8. Os testes mostraram uma liberação de 50% em etapas iniciais (30 horas), com o aparecimento de uma acentuada e mais rápida liberação do fármaco a partir de 72 horas, caracterizada pela degradação da rede, o que foi posteriormente corroborado pelo difratograma da amostra.

Na literatura é possível encontrar outros tipos de MOFs que foram utilizadas também no desenvolvimento de DDS e a tabela a seguir traz uma compilação da substância principal, tipo de MOF, método utilizado no desenvolvimento e atividade biológica (quando avaliada).

Tabela 3. MOFs utilizadas no desenvolvimento de alguns DDS.

Substância	MOF	Nome	Método	Atividade biológica	Referência
Doxorrubicina 5-fluoracila	ZIF-90	5-FU@ZIF- 90-DOX	<i>in situ</i>	Citotoxicidade	ZHANG et al., 2007
Alendronato	UiO-66 (Zr)	AL-UiO-66	<i>ex situ</i>	Antitumoral	ZHU et al., 2014
Aspirina	MIL-100 (Fe)	ASA@MIL- 100(Fe)	<i>ex situ</i>	-	SINGCO et al., 2016
Curcumina	MIL-101 (Fe)	MIL-101 (Fe)@CCM	<i>ex situ</i>	Citotoxicidade	ALAVIJEH e AKHBARI, 2020
Doxorrubicina [Asn ⁶ , Pro ³⁴]- NPY (AP)	ZIF-90	AP-ZIF- 90@DOX	<i>in situ</i>	Anticâncer	JIANG et al., 2019

Dessa forma, fica evidente que há diferentes tipos de MOF e suas características físico-químicas demonstram o potencial de uso em diversas áreas. Dentre elas, destaca-se a *Zeolitic Imidazolate Framework-8* no desenvolvimento de *Drug Delivery Systems* e por esse motivo foi escolhida para o desenvolvimento do DDS à base de escopoletina e está descrita mais detalhadamente a seguir.

2.4 Zeolitic Imidazolate Framework-8 (ZIF-8)

2.4.1 Características gerais

A *Zeolitic Imidazolate Framework* é uma classe de MOF, chamadas de zeólitas e são construídas a partir de tetraedros com os átomos silício ou alumínio nos centros e os de oxigênio em cada vértice, TO₄ (T=Al, Si), formando túneis interconectados ou cavidades (TAO et al., 2006; PARK et al., 2006).

Um desafio de longa data era o de incorporar íons de metais de transição e unidades orgânicas na estrutura. Desse modo, a pesquisa de Park e colaboradores (2006) onde 12 subtipos diferentes de ZIFs denominadas de ZIF-1 a ZIF-12 foram sintetizadas por copolimerização utilizando como metal o zinco

(ZIF- 1, 2, 3, 4, 5 6, 7 8, 10 e 11), cobalto (ZIF-9 e 12) e como “linker” tipo de imidazolato.

ZIF-8 é construída a partir dos íons 2-metilimidazol (2-MIm) (ligante orgânico) e o zinco (metal) tetraédrico. Park e colaboradores (2006) determinaram ainda o diâmetro do poro (1,16 nm), volume do poro (0,663 cm³/g) e área de superfície (1,947 m²/g) (Figura 6). Entretanto, esses poros se comportam como uma espécie de “janela”, espaços interarticulares, de tamanho médio 3,4Å, o que pode dificultar a entrada de moléculas de grande porte (PHAN et al., 2010).

Figura 6. Desenho esquemático da ZIF-8.



Fonte: Adaptado (PARK et al., 2006)

A estrutura cristalina da ZIF-8 apresenta: o átomo de zinco em uma rede de coordenação ligeiramente distorcida devido a ligação N-Zn-N com ângulo de aproximadamente 145°. Desse modo, a rede de coordenação assume uma topologia característica das sodalitas, assumindo um padrão octaédrico central partilhado por faces tetragonais e hexagonais. A conformação central oferece um volume de, aproximadamente, 0,4 nm³ para o aporte de moléculas-hospedeiras. Esse volume, por exemplo, pode ser preenchido por dez moléculas de água. É justamente esse fato que incentiva a aplicação da ZIF-8 como um adjuvante farmacêutico (HUANG; ZHANG; CHEN, 2003; PHAN et al., 2010; PENG; ZHANG; YAN, 2019).

Dentre as características que fazem a ZIF-8 funcionar como excipiente inteligente de formulações farmacêuticas é a possibilidade da associação/intercalação de insumos farmacêuticos no espaço existente entre lamelas adjacentes ou por toda a extensão da mesma lamela (HUXFORD; DELLA ROCCA, 2010).

Outro ponto importante é a estabilidade da ZIF-8 frente a outros tipos de MOFs convencionais. Esta possui alta estabilidade química e térmica, mantendo-se íntegra até, pelo menos 400° C. Essa ZIF, por exemplo, mantém a cristalinidade e tamanho de poros mesmo depois de fervida em água, em soluções alcalinas ou em solventes orgânicos sob refluxo (LIÉDANA et al., 2012; PARK et al., 2006; PHAN et al., 2010).

2.4.2 ZIF-8: aplicações como *Drug Delivery Systems*

Drug delivery Systems é uma das aplicações mais promissoras para saúde humana e representam um meio de constante evolução para tecnologia farmacêutica. Até o momento, várias estratégias diferentes foram estudadas para aplicações biológicas, como polímeros orgânicos e materiais porosos inorgânicos. No entanto, suas aplicações são limitadas pela menor capacidade de carga ou pela liberação descontrolada. Desse modo, o uso de MOFs surge como uma das estratégias mais promissoras no desenvolvimento de *Drug Delivery Systems* (SUN et al., 2013).

A formação de sistemas carreadores se dá devido a interação entre o fármaco e o carreador. Essas interações controlam o aporte e a liberação do fármaco através das MOFs. Uma série de exemplos de aplicação da ZIF-8 como carreador está descrita a seguir.

Cheng e colaboradores (2019) desenvolveram um nano-compósito formado por Fe₃O₄-ZIF-8 para promover a liberação de doxorubicina (DOX). Desse modo, desenvolveu-se o sistema Fe₃O₄-ZIF-8@DOX, funcionando o Fe₃O₄-ZIF-8 como um nanocarreador da DOX. Verificou-se que o sistema apresenta uma liberação lenta e sustentada de DOX e que este teria uma ação citotóxica melhor sobre a linhagem celular de hepatocarcinoma (MHCC97H). Liang e colaboradores (2018) também trabalharam com a DOX e ZIF-8 onde utilizaram a albumina de soro bovino biocompatível (BSA) no preparo das nanopartículas (DOX/BSA). O sistema desenvolvido BSA/DOX@ZIF apresentou liberação de DOX pH dependente e atividade citotóxica sobre a linhagem de células do câncer de mama.

Anteriormente, a DOX foi incorporada com sucesso à rede da ZIF-8 e verificou-se que a liberação da mesma era maior em pH ácido (ADHIKARI; DAS; CHAKRABORTY, 2015). Tang e colaboradores (2017) também desenvolveram um sistema com DOX e ZIF-8 e observaram uma liberação maior do fármaco em pH ácido assim como, atividade citotóxica do sistema.

Ettlinger e colaboradores (2019) desenvolveram um sistema formado por ZIF-8 e trióxido de arsênio (As@ZIF-8). Neste estudo, os autores verificaram que o sistema formado libera mais arsênio em pH ácido e que este teria atividade citotóxica em linhagem de células para tumores rabdoïdes teratoides atípicos (ATRT). Nos estudos citados anteriormente, os autores verificaram que a utilização da ZIF-8 como nanocarreador permite a liberação lenta de cada substância, porém, maior em pH ácido o que é considerado ideal para o tipo de atividade farmacológica avaliada.

Sava Gallis e colaboradores (2019) desenvolveram um sistema com ceftazidima e ZIF-8 (ceftazidima@ZIF-8) e observou-se que a liberação era lenta e que tinha ação sobre bactérias gram negativas. Outro estudo, desenvolveu um sistema com ação antibacteriana utilizando como fármaco vancomicina e ZIF-8 (ZIF-8/VAN). Os autores observaram uma liberação controlada da vancomicina e atingiu uma concentração de 77% ao final de 48 h em pH 5,4 (KARAKEÇILI et al., 2019).

Liédana e colaboradores (2012) desenvolveram um sistema à base de cafeína e ZIF-8 (CAF@ZIF-8), observou-se também uma liberação do tipo controlada durante a 27 dias. Outro estudo também verificou uma liberação do tipo controlada, pH dependente, quando incorporou a 6-mercaptopurina na rede da ZIF-8 (KAUR et al., 2017). Já Tiwari e colaboradores (2017) desenvolveram um sistema à base de curcumina e ZIF-8. Os dados evidenciaram que no pH 5,0 a liberação em percentual da curcumina é três vezes maior do que em pH 7,4. Ferraz e colaboradores (2016) desenvolveram formulações farmacêuticas contendo associação de benznidazol e MOFs (ZIF-8) para obtenção tecnológica de DDS. Os autores verificaram que a liberação do benznidazol é do tipo prolongada.

2.5 Liberação Modificada

2.5.1 Características gerais e mecanismos de liberação

Primeiramente, se faz necessário entender que os medicamentos contêm uma ou mais substâncias ativas. Essas devem ser administradas ao paciente por meio de uma das vias possíveis (a mais apropriada), veiculada(s) em uma forma farmacêutica sólida, semissólida ou líquida. As formas farmacêuticas sólidas de uso oral (FFSO) são as mais usadas (ALLEN; POPOVICH; ANSEL,2013).

As FFSO com liberação convencional (pronta liberação ou liberação imediata) são desenvolvidas para liberar o fármaco rapidamente após a administração (média até 2 h), sendo empregados nesses sistemas diluentes solúveis, desintegrantes e/ou outros recursos que favorecem os processos de liberação e dissolução do fármaco. Por outro lado, as FFSO de liberação modificada proporcionam uma liberação “controlada”, ou seja, modulam a liberação do fármaco de modo que possa ocorrer retardo ou prolongação do processo de dissolução. Os objetivos destas formulações podem ser: tornar a FF gastrorresistente, prolongar o efeito farmacológico, liberar o fármaco em um local específico do trato gastrointestinal (TGI) ou após um período definido (PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007).

Muitas vantagens são atribuídas à liberação modificada de fármacos em detrimento da convencional, são elas: maior segurança, eficácia, toxicidade reduzida (menor incidência de efeitos indesejáveis) e o aumento da adesão do paciente, por manter a concentração do fármaco constante na faixa terapêutica por um período prolongado, utilizando-se de uma única dosagem. Nesses sistemas, o fármaco está ligado a um transportador (carreador), que é o responsável por contornar as propriedades físico-químicas limitantes dos fármacos encapsulados, melhorando, desta forma, a farmacodinâmica, farmacocinética e os efeitos toxicológicos dos mesmos (ADIBKIA; ALAEI-BEIRAMI; BARZEGAR-JALALI, 2012).

O uso de sistemas poliméricos é uma das alternativas no desenvolvimento de sistema de liberação modificada e tem sido amplamente utilizado. Esses

polímeros funcionam como carreadores de fármacos e podem agir por diferentes mecanismos tais como, erosão, difusão e sistema ativado por solvente, estes eventos podem ocorrer de maneira simultânea. Os polímeros apresentam capacidade de formar estruturas microporosas/ semipermeáveis, capacidade de intumescimento e complexação com fármacos (PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007). Levando-se em consideração as características citadas até agora sobre os sistemas de liberação modificada e sabendo-se que a ZIF-8 é sistema polimérico. Desse modo, faz-se necessário detalhar um pouco mais sobre a classificação das formulações e os mecanismos de liberação de fármacos.

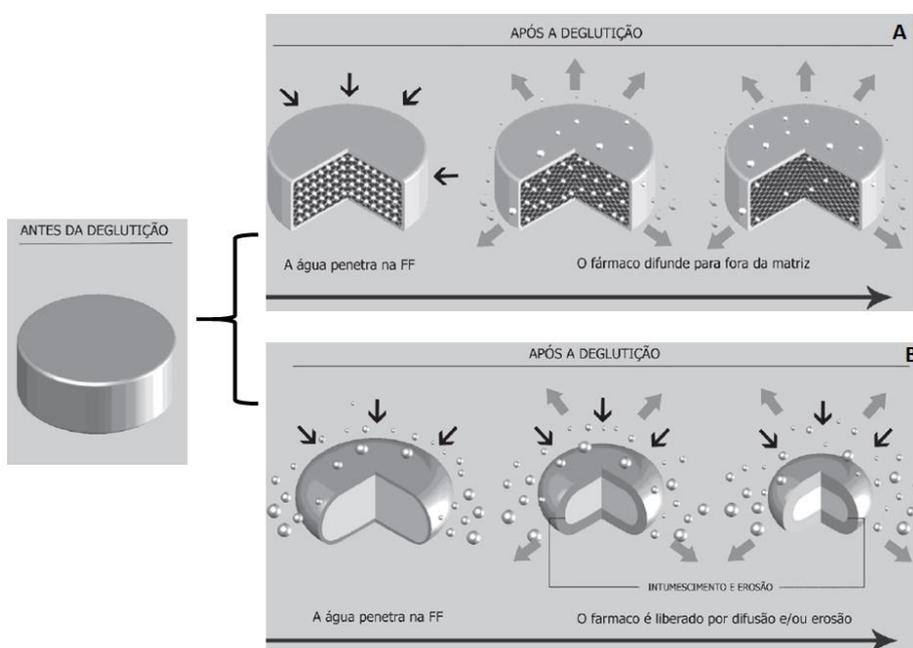
Desse modo, é possível controlar a liberação do fármaco por diferentes tecnologias e com isso classificar as formulações como: sistemas matriciais, sistemas reservatórios e bombas osmóticas (monolíticos). Os primeiros são os sistemas matriciais, nos quais as matrizes são dispersões ou soluções de um fármaco em uma ou mais substâncias capazes de modular a sua liberação, geralmente polímeros de natureza hidrofílica ou inerte. Essas matrizes podem ser elaboradas sob a forma de comprimidos, cápsulas gelatinosas, grânulos, péletes ou minicomprimidos (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2013).

Nos sistemas matriciais, a liberação do fármaco pode envolver processos de intumescimento do polímero, difusão do fármaco ou erosão da matriz. Em alguns casos, o fármaco pode estar ligado quimicamente à cadeia polimérica e ser liberado pela quebra hidrolítica ou enzimática dessa ligação (LOPES; SOUSA; COSTA, 2005). Um ou mais desses processos podem regular a liberação em uma mesma FFSO, dependendo do tipo de polímero empregado e das propriedades físico-químicas do fármaco (PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007).

Nas matrizes insolúveis ou inertes, o fármaco é liberado essencialmente por difusão ou associado ao mecanismo de erosão. Já nas matrizes hidrofílicas a liberação do fármaco pode se dá por intumescimento, difusão e erosão (ocorre ao mesmo tempo ou separados). No primeiro tipo de matriz alguns dos polímeros utilizados são: cera de carnaúba, cera de abelha, parafina, polietileno, etilcelulose e cloreto de polivinila. Já no segundo tipo de matriz seria: hidroxipropilcelulose, hidroxietilcelulose, hipromelose, goma xantana e alginato de sódio. (PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007).

Na Figura 7, tem-se a demonstração do que ocorreria após a deglutição de uma forma farmacêutica (FF) que é formado por um sistema matricial. Na Figura 7a, tem-se uma matriz insolúvel (hidrofóbica) e observa-se que a água dos fluidos do trato gastrointestinal (TGI) penetra na FF e dissolve o fármaco. Desse modo, a partir da formação de canalículos na matriz o fármaco é aos poucos liberado da FF (difusão). Já na Figura 7b, observa-se que água do TGI penetra na FF e ocorre um intumescimento da mesma e com isso a liberação do fármaco.

Figura 7. Sistemas matriciais, a- matriz insolúvel; b- matriz hidrofílica.



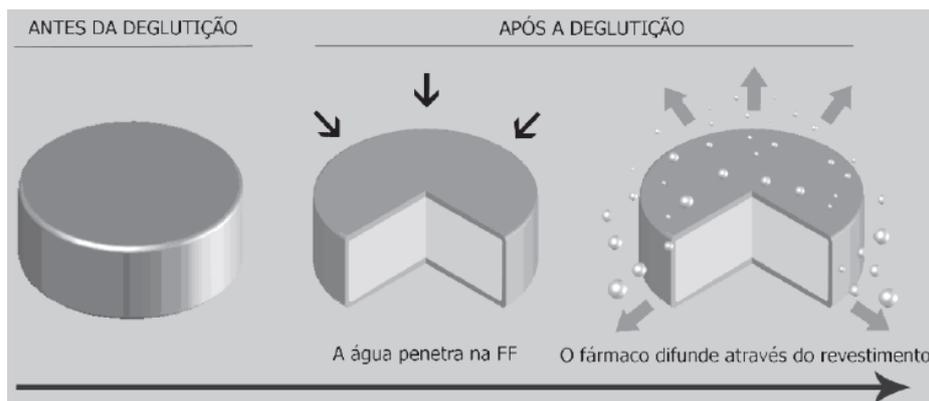
Fonte: Adaptado (PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007).

Os sistemas reservatórios por sua vez, apresentam um núcleo (reservatório) que contém um fármaco revestido por uma membrana polimérica. O núcleo pode ser um comprimido, pélete, grânulo ou minicomprimido. O fármaco pode ser liberado por difusão através da membrana de revestimento, que pode ser microporosa ou sem poros. Neste tipo de sistema pode ser utilizado o copolímero de metilmetacrilato, copolímero de etilcrilato e etilcelulose (PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007).

Outra forma de obter uma liberação prolongada com o sistema reservatório seria o preparo da FFSO em camadas alternadas, de ativo e

polímero hidrossolúvel. Desse modo, o fármaco é liberado gradualmente à medida que a camada de polímero se dissolve (AULTON, 2016; PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007). Na Figura 8, tem-se a demonstração de um sistema reservatório, observa-se que água penetra na FF e dissolve o fármaco este por sua vez, se difunde através do revestimento da FF.

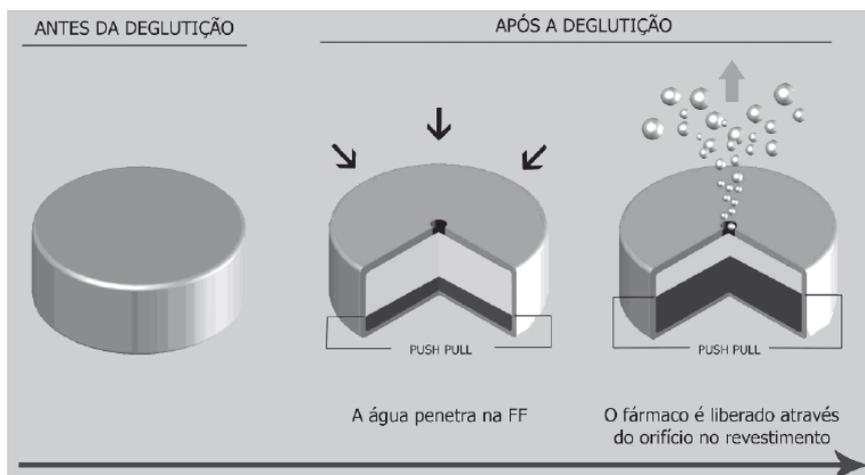
Figura 8. Sistemas reservatório.



Fonte: Adaptado (PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007).

As bombas osmóticas são sistemas que utilizam pressão osmótica para modular a liberação do fármaco e podem ser usados na sua formação o acetato de celulose ou poliuretano, assim como outros polímeros. Esse tipo de formulação é formada por um núcleo revestido com uma membrana semipermeável e possui um orifício feito à laser. O núcleo contém um agente osmótico, que pode ser a substância ativa ou outro material. Após a administração da FF, o solvente penetra no núcleo (atraído pelo agente osmótico), aumentando a pressão interna, o que resulta na liberação do fármaco dissolvido ou disperso, através do orifício na membrana (PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007).

Figura 9. Bombas osmóticas.



Fonte: Adaptado (PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007).

Alguns pontos importantes devem ser acrescentados quanto ao processo de difusão. Estabelecendo assim, base para a compreensão dos modelos farmacocinéticos. A difusão das substâncias a partir de um polímero é regida pela lei de Fick. No entanto, quando o fármaco é matriciado ou quando a matriz entra em contato com o solvente, isto pode promover alguma alteração na estrutura do polímero e, portanto, desencadear um comportamento não-Fickiano ou anômalo. Desse modo, os modelos farmacocinéticos podem ser utilizados a fim de classificar a velocidade de difusão do solvente e de relaxamento do polímero (LOPES; LOBO; COSTA, 2005; PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007).

Esses mecanismos de transporte podem ser classificados em: difusão Fickiana (caso I), difusão não-Fickiana (caso II) e transporte anômalo, uma combinação dos dois primeiros. No caso I, ocorre gradiente de concentração entre a matriz e o meio de dissolução (difusão normal), atingindo o equilíbrio. Já no caso II, ocorre o intumescimento ou relaxamento do polímero, formando uma camada de gel e com isso impossibilita a entrada imediata de solvente no núcleo da matriz (ARORA et al., 2011; KHALID et al., 2014).

2.5.2 Modelos farmacocinéticos

Os modelos farmacocinéticos são utilizados de maneira geral, para classificar o tipo de liberação do fármaco. Como visto anteriormente a liberação dos fármacos pode ocorrer por intumescimento do polímero, difusão, erosão ou por mais de um desses processos. Esses modelos são utilizados para explicar os processos citados acima e foram utilizados também nessa pesquisa para determinar o perfil/tipo de liberação da escopoletina. São chamados também de modelos matemáticos, estes utilizam como parâmetro R^2 ajustado quando se compara diferentes modelos e tem como objetivo determinar qual seria o que melhor determina o perfil de liberação de um fármaco (COSTA, 2002; SIEPMANN; SIEPMANN, 2013).

Dentre os principais modelos tem-se: ordem zero, primeira ordem, Higuchi, Korsmeyer-Peppas e Peppas Sahlin. O modelo de ordem zero baseia-se na liberação imediata, também chamada de efeito *burst*, causada pela liberação do fármaco aderido à superfície da matriz, seguido de liberação lenta, especificamente em matrizes que não sofrem erosão. Nesses casos, verifica-se que a velocidade de difusão do fármaco é inferior à velocidade de dissolução, estabelecendo um equilíbrio entre o interior e o exterior da matriz, o que permite essa liberação lenta. Entretanto, a falta de ajuste faz com que o modelo seja considerado, em partes, obsoleto (LYRA et al., 2007; LOPES; LOBO; COSTA, 2005).

O modelo de primeira ordem foi proposto por Gibaldi e Felman (1967) e mais tarde, por Wagner (1969). Este modelo tem sido, também, muito empregado para descrever a absorção e/ou eliminação de alguns fármacos, embora seja difícil conceituar esse mecanismo em bases teóricas. Neste modelo, a velocidade de dissolução das partículas sólidas em um meio líquido depende da relação quantidade dissolvida de fármaco e quantidade remanescente deste no carreador, de modo que a quantidade de fármaco liberada vai diminuindo ao longo tempo. Esse é um modelo que pode caracterizar liberações prolongadas, mas está principalmente relacionado as liberações convencionais (COSTA, 2002; LYRA et al., 2007).

O modelo de Higuchi tem como base a lei de Fick. É utilizado para descrever a velocidade de liberação controlada do fármaco a partir de um sistema matricial. Entretanto, o método leva em consideração o processo de intumescimento/relaxamento da cadeia polimérica. Logo, apresenta alguns problemas de ajuste, sendo mais indicado para matrizes unidimensionais pouco solúveis, que não apresentem capacidade de intumescimento, como por exemplo o acetato de celulose (LOPES; LOBO; COSTA, 2005).

Korsmeyer-Peppas tem como base o modelo de Higuchi, mas leva em consideração outros mecanismos de liberação não-Fickianos tais como, os transportes anômalo, caso II e super caso II. Ele deve ser utilizado para descrever a liberação do fármaco por meio de um mecanismo duplo, que associa dois mecanismos de liberação: transportes casos I e II. Este deve ser utilizado para interpretar casos em que o mecanismo não é único e ocorre, tanto por transporte Fickiano, quanto por intumescimento/relaxamento e formação de uma camada gel, ou seja, a transição de um estado vítreo para o maleável (LOPES; LOBO; COSTA, 2005; PEPPAS; NARASIMHAN, 2014).

O modelo de Peppas-Sahlin foi desenvolvido a fim de complementar as ideias trazidas por Korsmeyer (1983). Ele é utilizado para identificar a magnitude da influência da difusão e do relaxamento neste mecanismo de liberação que associa mais de um tipo de transporte. Isto é possível devido a inserção de dois termos (K_1 e K_2), referentes às constantes de liberação. Vale salientar que, diferente dos modelos de ordem zero e Higuchi que são mutualmente exclusivos, os modelos de Korsmeyer-Peppas e Peppas-Sahlin tendem a ser utilizados concomitantemente, a fim de corroborar os resultados obtidos (LOPES; LOBO; COSTA, 2005; DASH et al., 2010).

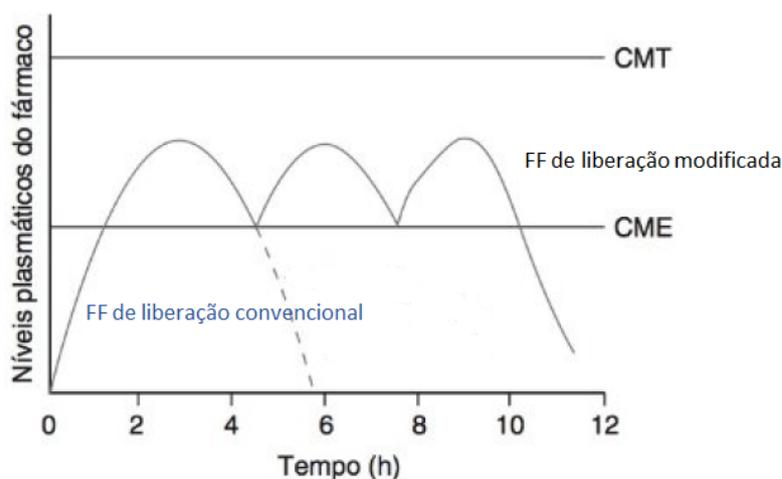
No modelo de Hopfenberg a liberação de fármacos de sistemas com diversas geometrias em cuja superfície ocorre erosão foi objeto de estudo por Hopfenberg (1976), e mais tarde por Katzhendler (1997). Este modelo assume que a liberação não é influenciada pela difusão interna ou externa à matriz, mas sim que o processo limitante é a própria erosão (COSTA, 2002).

2.5.3 Tipos de liberação modificada

Muitos autores atribuem ao termo liberação modificada como um termo geral e outros seria liberação controlada/modulada. Desse modo, aqui será atribuído à título de compreensão que as formulações farmacêuticas que apresentam perfis de liberação diferente do convencional (imediate), englobam a liberação modificada. Dessa forma, a liberação modificada pode ser do tipo: retardada, sustentada, repetida e prolongada (principais) (ALLEN.; POPOVICH; ANSEL, 2013). Características gerais e as principais vantagens foram descritas no tópico anterior. No mercado atual há tantas outras formas farmacêuticas com outros tipos de liberação, mas nesse momento serão descritos os principais tipos.

A liberação do tipo retardada (*retarded release*) caracteriza-se por uma liberação em um tempo diferente daquele imediatamente após administração, o que ocorreria na convencional. A sustentada (*sustained release-SR*), mantém a concentração do fármaco por mais tempo (platô) entre a concentração mínima eficaz (CME) e a tóxica (CMT). A de liberação repetida (AR) o medicamento pode possuir duas doses ou mais e dessa forma, uma dose é liberada de forma imediata e a outra de forma retardada. Neste caso, a concentração é mantida também entre o CME e CMT. A de liberação prolongada (*extended release/delayed-action preparation*) pode ser confundida por definição com a sustentada ou seja, há uma liberação mantida em platô entre o CME e CMT por mais tempo (ALLEN.; POPOVICH; ANSEL, 2013). Na Figura 10, pode-se de forma simplificada a diferença entre uma FF de liberação convencional de uma modificada.

Figura 10. Perfis de liberação (convencional versus modificada).



Fonte: Adaptado (ALLEN.; POPOVICH; ANSEL, 2013).

2.6 Técnicas de caracterização

2.6.1 Difração de Raios-X (DRX)

Dentre as várias técnicas experimentais disponíveis para a identificação de formas sólidas, incluindo polimorfos, solvatos, sais, co-cristais e formas amorfas, a DRX se destaca no estudo dessas formas farmacêuticas. DRX é baseada na lei de Bragg, em que o padrão de difração apresenta uma série de reflexões, as quais são identificadas no difratograma pelo ângulo (2θ) ou pela distância interplanar (d) contra a sua intensidade. Estando este padrão relacionado com a composição química e com o ordenamento cristalino das moléculas no cristal (SYKUŁA-ZAJĄ C et al., 2011).

Macromoléculas e polímeros podem formar cristais da mesma forma que compostos inorgânicos e minerais. No princípio da DRX, muitas funções nas análises farmacêuticas são assumidas, sendo essa uma poderosa ferramenta que permite alta precisão nos resultados quantitativos e qualitativos de misturas sólidas. Essa técnica utiliza o espalhamento coerente da radiação X, por estruturas organizadas (cristais), permitindo realizar estudos morfológicos em materiais, determinando sua estrutura cristalina e sua fração (percentual) cristalina. O feixe é aplicado na amostra, e bandas de interferência podem ser detectadas, o ângulo cujas bandas de interferências podem ser detectadas

depende do comprimento de onda aplicado e da geometria da amostra com respeito a periodicidades na estrutura (MANSUR, 2007).

A cristalinidade na amostra é refletida por uma região característica denominada *fingerprint* (impressão digital) na difração do padrão, devido à especificidade do *fingerprint*, a cristalinidade no fármaco pode ser identificada separadamente pela cristalinidade do carreador. Além disso, essa técnica combina especificidade com um alto nível de exatidão para a caracterização dos fármacos sólidos e é um método especialmente útil para descrever o possível comportamento polimórfico de fármacos. Igualmente permite a identificação simultânea de ingredientes ativos múltiplos em formulações farmacêuticas diferentes (MANSUR, 2007).

Utilizando-se a equação de Bragg (Equação 1) é possível calcular o espaçamento basal. Estudos têm mostrado a utilização do espaçamento basal como um parâmetro determinante na liberação sustentada de fármacos e no tratamento de água e outros materiais adsorvidos. O espaçamento basal (d) pode ser definido pela equação 1 (XIONG et al., 2015):

$$2.d. \text{sen } \theta = n.\lambda \quad (1)$$

Onde: d - espaçamento basal; $\text{sen } \theta$ - seno do ângulo *theta*; n – constante; e λ - comprimento de onda do cobre.

$$d_{\text{espaçamento}} = d_{\text{lamela}} + d_{\text{inter}} \quad (2)$$

Onde d_{lamela} representa a estrutura do material e d_{inter} corresponde ao comprimento de espécies intercaladas e de absorção de água no espaço entre lamelas.

2.6.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A técnica de MEV é utilizada para caracterização de materiais no estado sólido. Diferentemente do microscópio óptico que usa luz para formação de imagem, os microscópios eletrônicos utilizam feixe de elétrons. Esta técnica

contribui para que os aspectos morfológicos sejam caracterizados visualmente. A interação entre a amostra e os elétrons resulta na emissão de uma série de radiações, que são detectadas e utilizadas para a formação das imagens de alta resolução para então serem fotografadas (STORPIRTIS et al., 2011). Desse modo, a técnica baseia-se na varredura da superfície do material por um feixe fino de elétrons de ponto a ponto. A interação entre esses elétrons e a superfície do material gera radiações que são captadas por detectores. As informações sobre a morfologia e composição da amostra são obtidas separadamente pela captação de tipos específicos de elétrons emitidos, que são os elétrons secundários (com energia menor que 50 eV), elétrons retroespalhados (com energia maior que 50 eV) e raios-X, estes últimos fornecem informações acerca da composição do material (SUGA et al., 2014).

Essa técnica apresenta várias vantagens se comparada a microscopia óptica sendo a principal delas a resolução, definida como a menor distância entre dois pontos da amostra que podem ser visualizados como dois pontos distintos na imagem (SOARES-SOBRINHO, 2009). O uso dessa técnica vem se tornando mais frequente por fornecer informações detalhadas, com aumentos de até 300.000 vezes ou mais do estado de cristalização de produtos obtidos por diferentes técnicas de complexação e dispersão. O conhecimento da microestrutura dos materiais permite o entendimento e, em muitos casos, até a previsão das propriedades e do comportamento dos mesmos. A partir da técnica avalia-se a contribuição com relação à diminuição da cristalinidade das partículas obtidas por meio dos diversos métodos (MANSUR, 2007).

2.6.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A Ressonância Magnética Nuclear é uma das principais técnicas espectroscópicas utilizadas atualmente para o estudo químico e identificação estrutural de novos compostos orgânicos. Essa radiação é descrita como sendo uma onda com duas componentes, uma elétrica e outra magnética, que variam de maneira perpendicular entre si, sendo que ambas são também perpendiculares à direção de propagação da luz. Dessa forma, a interação entre a radiação eletromagnética e a matéria que compõe a amostra em análise pode

ocorrer de duas formas distintas: pela sua componente elétrica ou pela sua componente magnética. No caso da RMN, a componente magnética está em evidência (PAVIA et al., 2010).

Uma das diferenças fundamentais entre a RMN e as outras técnicas espectroscópicas consiste no fato de que, na RMN, essa interação se dá com o campo magnético da REM e não com o campo elétrico, como ocorre nas técnicas de infravermelho ou do ultravioleta, por exemplo. Contudo, o componente magnético evidenciado pela RMN é uma característica própria apenas de alguns átomos que possuem massa ou número atômico ímpar, como é o caso do 1^{H} e do 13^{C} (isótopo pouco abundante do 12^{C}), os principais analisados por esse método (NASCIMENTO; BLOCH-JUNIOR, 2001).

Esses átomos possuem um estado de *spin* nuclear característico, sendo capazes de promover um campo magnético natural, sendo estes spins orientados de forma aleatória. A influência de um campo externo promove o alinhamento do spin nuclear de modo paralelo ou contrário ao campo, sendo que cada um desses estados fundamentais assumem um nível energético diferente. Normalmente, o momento spin nuclear paralelo ao campo magnético externo exibe um menor nível de energia, enquanto o momento spin nuclear contrário ao campo magnético externo exibe um maior nível de energia (PAVIA et al., 2010).

A técnica de RMN envolve ainda a aplicação de ondas de radiofrequência sob a forma de pulsos, promovendo uma inversão dos spins inicialmente orientados de forma paralela para a forma contrária ao campo magnético externo, ou vice-versa, fazendo com que este saia de um estado de mais baixa energia para um estado de mais alta energia. Sendo assim, ao retornar para o seu estado fundamental (de mais baixa energia), o núcleo acaba liberando a energia absorvida, que é percebida pelo aparelho de RMN, sendo registrada no espectro de RMN sob a forma de sinais (NASCIMENTO; BLOCH-JUNIOR, 2001).

A análise de um espectro (principalmente de RMN de 1^{H}) frequentemente requer um estudo detalhado dos desdobramentos das bandas para que o máximo de informações possa ser obtido dos dados experimentais. Contudo, nem sempre as informações fornecidas pelos espectros de um só átomo são suficientes para se chegar a uma estrutura inequívoca, sendo necessário na maioria das vezes reunir informações fornecidas por mais de um tipo de espectro, incluindo aqueles que são

obtidos em duas dimensões, também chamados de bidimensionais. A junção de todas essas informações, aliado à realização de outras técnicas de identificação de compostos, possibilitam o estudo detalhado da estrutura química de uma série de compostos, sendo muito útil na análise de produtos naturais (SILVA et al., 2005; CONSTANTINO et al., 2006).

2.6.4 Análise térmica

Para caracterização de materiais farmacêuticos é imprescindível que seja realizado a análise térmica, e dentre as técnicas que englobam essa categoria, a termogravimetria (TG) e a calorimetria exploratória diferencial (DSC) foram as utilizadas nessa pesquisa.

A termogravimetria ou análise termogravimétrica baseia-se no estudo da variação da massa de uma amostra, resultante de uma transformação física (sublimação, evaporação, condensação) ou química (degradação, decomposição, oxidação) em função do tempo ou da temperatura. O tipo mais usado de TG é a isotérmica na qual a variação de massa da amostra seja registrada com uma função tempo a uma temperatura constante (MOTHÉ; AZEVEDO, 2009).

Os experimentos são realizados por meio de uma termobalança, que apresenta elevada sensibilidade, reprodutibilidade e insensibilidade a variações externas, bem como rápida resposta às variações de massa. Os parâmetros experimentais incluem taxa de aquecimento, atmosfera (N_2 ou O_2), vazão de gás, quantidade de amostra, granulometria, forma cristalina, composição do cadinho e o calor de reação envolvido (STORPIRTIS et al., 2011).

A calorimetria exploratória diferencial permite a detecção qualitativa e quantitativa de todos os processos em que requer produção de energia. Essa técnica é uma derivada da análise térmica diferencial (DTA), por isso, são consideradas técnicas semelhantes e complementares, pois permitem avaliar as variações entálpicas que ocorrem com uma dada substância durante um processo de aquecimento ou resfriamento (STORPIRTIS et al., 2011).

A DSC pode proporcionar sobre caracterização e medidas específicas, tais como: transição vítrea, temperatura e tempo de cristalização, ponto de fusão,

calor específico, oxidação, pureza, estabilidade térmica, ponto de ebulição, grau de velocidade de cura, cinética de reação e outras. A DSC apresenta algumas vantagens, tais como: rápido tempo de análise; fácil preparo da amostra; pode ser aplicado para sólidos e líquidos; larga faixa de temperatura e medidas quantitativas. Já como desvantagens tem-se: redução da sensibilidade quando a linha de base está em inclinação ou curvatura; necessidade de elevar razões de aquecimento para aumentar a sensibilidade; algumas transições observadas são complexas e apresentam dificuldade de interpretação (MOTHÉ; AZEVEDO, 2009).

2.6.5 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Espectroscopia é o estudo da interação da radiação eletromagnética com a matéria. A radiação eletromagnética é composta de um vetor campo elétrico e um vetor campo magnético, mutuamente ortogonal, que se propagam em uma dada direção, apresentando a dualidade onda-partícula, onde a natureza ondulatória manifesta-se por meio da interferência, dispersão, polarização e coerência da radiação eletromagnética (STORPIRTIS et al., 2011).

Parte da energia associada aos modos de vibração das moléculas está compreendida na região que varia de 400 a 4000 cm^{-1} do espectro eletromagnético. Esta região é referida como infravermelho intermediário ou médio, e constitui uma ferramenta muito importante na caracterização de substâncias químicas, especialmente quando medida pelo método de transformada de Fourier. Desse modo, a espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier é uma técnica bastante utilizada por diversos laboratórios (BRITTAIN, 2018).

O princípio da técnica baseia-se na interação da radiação eletromagnética com o material sendo analisado. Quando a luz de uma fonte de infravermelho incide sobre uma substância, o campo elétrico oscilante associado interage com ligações químicas, fazendo que elas absorvam energia em frequências ressonantes, o que resulta em vibrações. Essas vibrações se manifestam de

diversas formas como estiramentos e deformações, sendo características de cada grupo funcional (BUREAU; COZZOLINO; CLARK, 2019).

Sendo assim, a partir do momento em que duas moléculas, com exceção dos isômeros ópticos, são distintas, o espectro de absorção na região do infravermelho delas são únicos. Esses espectros são representados por meio dos estiramentos e deformações observados em função do número de onda (cm^{-1}) em ordem decrescente. Essa característica permite aos analistas distinguir e, a depender do caso, quantificar, moléculas e até mesmo constatar mudanças estruturais, através de comparações, em materiais compostos por mais de uma substância química (BUREAU; COZZOLINO; CLARK, 2019).

2.6.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à arranjo diodo (CLAE-DAD)

Cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica de separação que, em menos de trinta anos, passou a ser um dos métodos analíticos mais utilizados para fins qualitativos e quantitativos. As razões para este crescimento estão relacionadas à sua adaptabilidade para determinações quantitativas com boa sensibilidade, a possibilidade de separar espécies não voláteis e termicamente instáveis, com destaque para a indústria farmacêutica, bem como, as suas aplicações em determinações ambientais e em muitos outros campos da ciência, como o da medicina (TONHI, 2002).

A separação cromatográfica por meio da CLAE baseia-se na repartição dos componentes da amostra entre duas fases imiscíveis: a fase estacionária que é sólida e encontra-se acomodada em uma coluna cilíndrica e a fase móvel líquida que passa através da coluna que contém a fase estacionária. As separações cromatográficas são obtidas por partição, adsorção, troca iônica, exclusão por tamanho de partícula ou interações estereoquímicas, dependendo do tipo de fase estacionária empregada (BRASIL, 2019; MARTIN; GUIOCHON 2005).

Diversos tipos de matrizes podem ser utilizados na composição da fase estacionária, dentre elas a sílica é a mais utilizada por ser robusta e quimicamente estável quando em contato com a maioria dos solventes orgânicos

e em sistemas que apresentam pH baixo. A fase estacionária é escolhida de acordo com a amostra que será utilizada e com o objetivo da análise, podendo ser em fase normal (polar) ou fase reversa (apolar) (GUPTA et al, 2012; PAITHANKAR, 2013).

A composição da fase móvel afeta a resolução, a seletividade e a eficiência da separação cromatográfica. Quando a fase estacionária utilizada é normal os solventes utilizados na fase móvel são apolares, quando a fase estacionária é reversa os solventes utilizados são de caráter polar. A forma como a fase móvel elui através da fase estacionária também influencia a qualidade da análise, esta pode acontecer de forma isocrática, quando a composição da fase móvel permanece constante durante o processo de separação, ou de forma gradiente, quando a composição apresenta mudanças durante esse processo. (GUPTA et al, 2012). A fase móvel elui pela fase estacionária devido a ação de uma bomba que a empurra pelo sistema cromatográfico e é de grande importância que a pressão da bomba se mantenha constante para garantir a reprodutibilidade das análises (PAITHANKAR, 2013).

A solução que elui através da coluna cromatográfica é analisada pelo detector do sistema, um componente que emite uma resposta em função dos analitos presentes na amostra, essa resposta gerada é proporcional a concentração do analito na amostra e sinaliza um pico no cromatograma. Existem diversos tipos de detectores que são acoplados ao cromatógrafo: detector de índice de refração (RI), de ultravioleta (UV), de Espectrometria de massa (MS), de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e de espalhamento de luz (LS) (MINKIEWICZ et al., 2006).

A seleção do detector utilizado nas análises acontece de acordo com as características químicas dos analitos, interferência potencial, limite de detecção necessário e disponibilidade do detector (GUPTA, 2012). O detector de UV é frequentemente utilizado uma vez que o instrumento é simples e a maioria dos compostos apresenta absorvância no UV, caso haja necessidade pode-se expandir o comprimento de onda para a região do visível (VIS) e assim detectar analitos coloridos (LENDI, MEYER, 2005).

O equipamento utilizado consiste em um reservatório que contém a fase móvel, uma bomba com a finalidade de impelir a fase móvel pelo sistema

cromatográfico, um injetor para introduzir a amostra no sistema, uma coluna cromatográfica, um detector e um dispositivo de captura de dados, como um *software*, integrador ou registrador. Além de receber e enviar informações para o detector, *softwares* são utilizados para controlar todo o sistema cromatográfico, proporcionando maior operacionalidade e logística de análise (BRASIL, 2019).

REFERÊNCIAS

- ADIBKIA, K.; ALAEI-BEIRAMI, M.; BARZEGAR-JALALI, M. Evaluation and optimization of factors affecting novel diclofenac sodium- eudragit RS100 nanoparticles. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 6, n. 12, p. 941–947, 2012.
- ADHIKARI, C.; DAS, A.; CHAKRABORTY, A. Zeolitic Imidazole Framework (ZIF) Nanospheres for Easy Encapsulation and Controlled Release of an Anticancer Drug Doxorubicin under Different External Stimuli: A Way toward Smart Drug Delivery System. **Molecular Pharmaceutics**, v. 12, n. 9, p. 3158–3166. 2015.
- AHMED, E. Y. et al. VEGFR-2 inhibiting effect and molecular modeling of newly synthesized coumarin derivatives as anti-breast cancer agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 5, p. 115328, 2020.
- ALAVIJEH, R.K; AKHBARI, K. Biocompatible MIL-101(Fe) as a Smart Carrier with High Loading Potential and Sustained Release of Curcumin. **Inorganic Chemistry**, v. 59, n. 6, p. 3570–3578, 2020.
- ALLEN, L.V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H.C. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de Fármacos**. 9. Ed. Porto Alegre: Artmed, xii, 716 p. 2013.
- AN, H. *et al.* Incorporation of biomolecules in Metal-Organic Frameworks for advanced applications. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 384, p. 90–106, 2019.
- ARORA, G. et al. Formulation and evaluation of controlled release matrix mucoadhesive tablets of domperidone using Salvia plebeian gum. **Journal of advanced pharmaceutical technology & research**, v. 2, n. 3, p. 163–9, 2011.
- AULTON, M. E.; TAYLOR, K. M. G. Delineamento de formas farmacêuticas. 4. Ed. Rio de Janeiro. Ed. Artmed., 2016. 855 p.
- AZEVEDO, L. F. M. et al. Electrochemical oxidation, adsorption and quantification of 1,2-benzopyrone employing a glassy carbon electrode. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 3, p. 469–477, 2014.
- BARREIRO, E.J. et al. Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos, 3ª Ed. Porto Alegre, Ed. Artmed, p. 24-28, 2015.
- BASU, M. et al. Effect of scopoletin on monoamine oxidases and brain amines. **Neurochemistry International**, v. 93, p. 113–117, 2016.
- BERTOLDI, F. C. et al. Validação de um método analítico rápido por CLAE-UV para determinação de cumarina em guaco (*Mikania glomerata* Sprengel)

confirmado com espectrometria de massas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 1 suppl 1, p. 316–325, 2016.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**, 6. ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 2019. p. 01-874. v. 1. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/farmacopeia> >. Acesso em: 12 set. 2019.

BRASIL. Instrução Normativa nº 10. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, DF, 29 de setembro de 2016.

BRITAIN, H. G. **Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology**. Ed. Elsevier, 2018. 399 p.

BUREAU, S; COZZOLINO, D; CLARK, C. J. Contributions of Fourier-transform mid infrared (FT-MIR) spectroscopy to the study of fruit and vegetables: A review. **Postharvest Biology and Technology**. v. 148, p.1-14, 2019.

CARPINELLA, M. C., FERRAYOLI, C. G., PALACIOS, S. M. Antifungal synergistic effect of scopoletin, a hydroxycoumarin isolated from *Melia azedarach* L. fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 8, p. 2922–2927, 2005.

CHENG, C. et al. Doxorubicin-loaded Fe₃O₄-ZIF-8 nano-composites for hepatocellular carcinoma therapy. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 33, n. 10, p. 1373–1381, 2019.

CONSTANTINO, M. G. et al. Simulação de desdobramentos complexos de espectros de RMN de 1H. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 160-167, 2006.

COSTA, P.J.C. Avaliação da bioequivalência de formulações farmacêuticas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 38, n. 2, p. 141-153, 2002.

CUI, J. et al. Optimization protocols and improved strategies for metal-organic frameworks for immobilizing enzymes: Current development and future challenges. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 370, p. 22–41, 2018.

DING, Z. *et al.* Anti-Inflammatory Effects of Scopoletin and Underlying Mechanisms. **Pharmaceutical Biology**, v. 46, n. 12, p. 854–860, 2008.

DOONAN, C. et al. Metal–Organic Frameworks at the Biointerface: Synthetic Strategies and Applications. **Accounts of Chemical Research**, v. 50, n. 6, p. 1423–1432, 2017.

ETTLINGER, R. et al. Zeolitic Imidazolate Framework-8 as pH-Sensitive Nanocarrier for “Arsenic Trioxide” Drug Delivery. **Chemistry – A European Journal**, v.25, p. 1-9. 2019.

FANG, M. et al. ZIF-8/PDMS mixed matrix membranes for propane/nitrogen mixture separation: Experimental result and permeation model validation. **Journal of Membrane Science**, v. 474, p. 103–113, 2015.

FERRAZ, L.R.M., et al. **Formulações farmacêuticas contendo associações de benznidazol e MOF's para obtenção tecnológica de sistemas de drug delivery**. Depositante: Universidade Federal do Pernambuco. Procurador: Instituto nacional de propriedade industrial- INPI. BR n. 1020160034086. Depósito: 18 de fevereiro de 2016.

FURUKAWA, H. et al. The Chemistry and Applications of Metal-Organic Frameworks. **Science**, v. 341, n. 6149, p. 1230444–1230444. 2013.

GUPTA, V et al. Development and validation of HPLC method- a review. **International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences**. v. 2, n.4, p. 17-25, 2012.

HAM, J. R. et al. Anti-obesity and anti-hepatosteatosis effects of dietary scopoletin in high-fat diet fed mice. **Journal of Functional Foods**, v. 25, p. 433–446, 2016.

HORCAJADA, P. et al. Metal-organic frameworks as efficient materials for drug delivery. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 45, n. 36, p. 5974–5978, 2006.

HORCAJADA, P. et al. Porous metal-organic-framework nanoscale carriers as a potential platform for drug delivery and imaging. **Nature materials**, v. 9, n. 2, p. 172–178, 2010.

HUANG, X.; ZHANG, J.; CHEN, X. [Zn(bim)₂] · (H₂O)_{1.67}: A metal-organic openframework with sodalite topology. **Chinese Science Bulletin**, v. 48, n. 15, p. 1531– 1534, 2003.

HUXFORD, R. C.; DELLA ROCCA, J.; LIN, W. Metal-organic frameworks as potential drug carriers. **Curr Opin Chem Biol**, v. 14, n. 2, p. 262–268, 2010.

INSTITUTO NACIONAL DE PROPRIEDADE INDUSTRIAL- INPI Disponível em: <https://gru.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController>
Acessado em: 08 de outubro de 2019.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY - IUPAC recommendations 2005, N. G. Connelly, T. Damhus, R. M. Hartshorn, A. T. Hutton, International Union of Pure and Applied
[http://www.iupac.org/nc/home/publications/iupac-books/booksdb/bookdetails.html?tx_wfqbe_pi1%5Bbookid%5D=5Chemistry by The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2005.](http://www.iupac.org/nc/home/publications/iupac-books/booksdb/bookdetails.html?tx_wfqbe_pi1%5Bbookid%5D=5Chemistry%20by%20The%20Royal%20Society%20of%20Chemistry)

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY - IUPAC. Coordination polymers and metal organic frameworks: terminology and

nomenclatureguidelines. Disponível em: <<http://www.iza-online.org/MOF/MOFforIZA.pdf>> Acesso em: 9 setembro 2019.

JAMUNA, S. et al. Confertin and scopoletin from leaf and root extracts of *Hypochoeris radicata* have anti-inflammatory and antioxidant activities. **Industrial Crops and Products**, v. 70, p. 221–230, 2015.

JANG, J. H.; PARK, J. E.; HAN, J. S. Scopoletin inhibits α -glucosidase in vitro and alleviates postprandial hyperglycemia in mice with diabetes. **European Journal of Pharmacology**, v. 834, p. 152–156, 2018.

JIANG, Z. et al. Dual ATP and pH responsive ZIF-90 nanosystem with favorable biocompatibility and facile post-modification improves therapeutic outcomes of triple negative breast cancer in vivo. **Biomaterials**, v. 197, p. 41-50, 2019.

JIAO, L. et al. Metal–organic frameworks: Structures and functional applications. **Materials Today**, v. 27, p. 43–68, 2018.

KAI, K. et al. Scopoletin is biosynthesized via ortho-hydroxylation of feruloyl CoA by a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v.55, p. 989–999, 2008.

KARAKEÇILI, A. et al. Metal-organic frameworks for on-demand pH controlled delivery of vancomycin from chitosan scaffolds. **Materials Science and Engineering: C**, v. 105, p. 110098, 2019.

KAUR, H. et al. Synthesis and characterization of ZIF-8 nanoparticles for controlled release of 6-mercaptopurine drug. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 41, p. 106–112, 2017.

KESKIN, S.; SEDA, K.; KIZILEL, S. Biomedical Applications of Metal Organic Frameworks. **Science**, v. 50, p. 1799–1812, 2010.

KHALID, I. et al. Formulation and in vitro evaluation of mucoadhesive controlled release matrix tablets of flurbiprofen using response surface methodology. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 3, p. 493–504, 2014.

KIM, D.-S. et al. Scopoletin Stimulates Melanogenesis via cAMP/PKA Pathway and Partially p38 Activation. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 40, n. 12, p. 2068–2074, 2017.

KHAN, N.; SHARMA, S.; SULTANA, S. Attenuation of potassium bromate-induced nephrotoxicity by coumarin (1,2-benzopyrone) in Wistar rats: Chemoprevention against free radical-mediated renal oxidative stress and tumor promotion response. **Redox Report**, v. 9, n. 1, p. 19–28, 2004.

LENDI, B.E; MEYER V.R. The UV Detector for HPLC — An Ongoing Success Story. *Liquid chromatography, gas chromatography Europe*, v.18, n.3, 2005.

- LIANG, Z. et al. A protein@metal–organic framework nanocomposite for pH-triggered anticancer drug delivery. **Dalton Transactions**, v. 47, n. 30, p. 10223–10228, 2018.
- LI, C. et al. Effect of Scopoletin on Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Human Prostate Cancer Cells In vitro. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 4, p. 611, 2015.
- LI, L. et al. Synthesis, in vitro and in vivo antitumor activity of scopoletin-cinnamic acid hybrids. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 93, p. 300–307, 2015.
- LI, X. et al. Metal–organic frameworks based membranes for liquid separation. **Chemical Society Reviews**, v. 46, n. 23, p. 7124–7144, 2017.
- LI, Y. et al. Biocompatible surface modification of nano-scale zeolitic imidazolate frameworks for enhanced drug delivery. **RSC Advances**, v. 8, n. 42, p. 23623–23628, 2018.
- LIAO, F.-S. et al. Shielding against Unfolding by Embedding Enzymes in Metal–Organic Frameworks via a de Novo Approach. **Journal of the American Chemical Society**, v. 139, n. 19, p. 6530–6533, 2017.
- LIÉDANA, N. et al. CAF@ZIF-8: One-Step Encapsulation of Caffeine in MOF. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 4, n. 9, p. 5016–5021, 2012.
- LYRA, M. A. M. et al. Sistemas Matriciais Hidrofílicos e Mucoadesivos para Liberação Controlada de Fármacos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 25, n. 5, p. 784-793, 2007.
- LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 143–154, 2005.
- MANSUR, H. S. Técnicas de caracterização de Materiais. **Biomateriais: Fundamentos e Aplicações**, p. 552, 2007.
- MARTIN M., GUIOCHON, G. Effects of high pressures in liquid chromatography. **Journal of chromatography. A.**, v. 1090, p. 16-38, 2005.
- MINKIEWICZ, P. et al. Application of High-Performance Liquid Chromatography on-Line With Ultraviolet/Visible Spectroscopy In Food Science. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 15, n. 56, pp. 145–153, 2006.
- MOON, P.D. et al. Use of scopoletin to inhibit the production of inflammatory cytokines through inhibition of the κ B/NF- κ B signal cascade in the human mast cell line HMC-1. **European Journal of Pharmacology**, v. 555, n. 2–3, p. 218–225, 2007.

MOTHÉ, C.G.; AZEVEDO, A.D. **Análise térmica de materiais**. 1ª Edição. Ed. Arliber. 324 p. 2009.

NASCIMENTO, C. J.; BLOCH-JUNIOR, C. Ressonância Magnética Nuclear: Gradus Primus. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, n. 21, p. 52-61, 2001.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. PubChem Database. Scopoletin, CID=5280460, Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Scopoletin>. Acessado em: 5 de outubro de 2019.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. PubChem Database. Coumarin, CID: 323, Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Coumarin>. Acessado em: 20 de dezembro de 2020.

PAITHANKAR, H.V. HPLC method validation for pharmaceuticals: a review **International Journal of Universal Pharmacy and Bio Sciences**. v. 2, n.4, p.229 -240, 2013.

PANDA, S.; KAR, A. Evaluation of the antithyroid, antioxidative and antihyperglycemic activity of scopoletin from *Aegle marmelos* leaves in hyperthyroid rats. **Phytotherapy Research**, v. 20, n. 12, p. 1103–1105, 2006.

PANDY, V.; VIJEEPALLAM, K. Antipsychotic-like activity of scopoletin and rutin against the positive symptoms of schizophrenia in mouse models. **Experimental Animals**, v. 66, n. 4, p. 417–423, 2017.

PARK, K. S. et al. Exceptional chemical and thermal stability of zeolitic imidazolate frameworks. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 27, p. 10186–10191, 2006.

PASQUA, D.C.S.P. et al. Pharmacological study of anti-inflammatory activity of aqueous extracts of *Mikania glomerata* (Spreng.) and *Mikania laevigata* (Sch. Bip. ex Baker). **Journal of Ethnopharmacology**, v.231, p. 50-56, 2019.

PAVIA, D. L. et al. *Introdução à Espectroscopia*. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PENG, J.; ZHANG, H.; YAN, Y. Preparation and characterization of a novel ZIF-8 membrane over high voidage paper-like stainless steel fibers. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 269, p. 203–211, 2019.

PEPPAS, N. A.; NARASIMHAN, B. Mathematical models in drug delivery: How modeling has shaped the way we design new drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 75–81, 2014.

PEZZINI, B. R.; SILVA, M. A. S.; FERRAZ, H. G. Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 4, p. 12, 2007.

PHAN, A. et al. Synthesis, structure, and carbon dioxide capture properties of Zeolitic imidazolate frameworks. **Accounts of Chemical Research**, v. 43, n. 1, p. 58–67, 2010.

RAMANITRAHASIMBOLA, D. et al. Bronchodilator activity of *Phymatodes scolopendria* (Burm.) Ching and its bioactive constituent. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, n. 3, p. 400–407, 2005.

RODRIGUES, R. F. et al. Coumarin solubility and extraction from emburana (*Torresea cearensis*) seeds with supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 43, n. 3, p. 375–382, 2008.

SAVA GALLIS, D. F. et al. Antibacterial Countermeasures via Metal–Organic Framework-Supported Sustained Therapeutic Release. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 11, n. 8, p. 7782–7791, 27 fev. 2019.

SHAHID, S. Polymer-Metal Organic Frameworks (MOFs) **Mixed Matrix Membranes for Gas Separation Applications**. 2015. 198 f. Tese (Doutorado em Engenharia) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Membranas, Universidade de Twente, Enschede, 2015.

SIEPMANN, J.; SIEPMANN, F. Mathematical modeling of drug dissolution. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, n. 1, p. 12–24, 2013.

SILVA, J. B. P. et al. Aplicação de análise de componentes principais para verificação de atribuições de sinais nos espectros de RMN 1H: O caso dos 3-aril(1,2,4)-oxadiazol-5-carboidrazida Benzilidenos. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 492-496, 2005.

SINGCO, B. et al. Approaches to drug delivery: Confinement of aspirin in MIL-100(Fe) and aspirin in the de novo synthesis of metal–organic frameworks. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 223, p. 254–260, 2016.

SOARES-SOBRINHO, J. L. et al. Benzimidazole drug delivery by binary and multicomponent inclusion complexes using cyclodextrins and polymers. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 2, p. 323–330, 2012.

STORPIRTIS, Sílvia et al. **Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 321 p.

SUGA, M et al. Recent progress in scanning electron microscopy for the characterization of fine structural details of nano materials. **Progress in Solid State Chemistry**, v. 42, n. 1-2, p.1-21, 2014.

SUN, C.-Y. et al. Metal-organic frameworks as potential drug delivery systems. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 10, n. 1, p. 89–101, 2013.

SUN, C.-Y. et al. Zeolitic imidazolate framework-8 as efficient pH-sensitive drug delivery vehicle. **Dalton Transactions**, v. 41, n. 23, p. 6906, 2012.

SYKUŁA-ZAJĄ C, A. et al. Thermal and X-ray analysis of racemic bupivacaine hydrochloride. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry. Anais.** v. 105, n. 3. p. 1031-1036.2011.

TABANA, Y.M. et al. Scopoletin, an active principle of tree tobacco (*Nicotiana glauca*) inhibits human tumor vascularization in xenograft models and modulates ERK1, VEGF-A, and FGF-2 in computer model. **Microvascular Research**, v. 107, p. 17-33, 2016.

TANG, L. et al. Coordination polymer nanocapsules prepared using metal-organic framework templates for pH-responsive drug delivery. **Nanotechnology**, v. 28, n. 27, p. 275601, 2017.

TAO, Y. et al. Mesopore-modified zeolites: preparation, characterization, and applications. **Chemical Reviews**, v. 106, n. 3, p. 896-910, 2006.

TIWARI, A. et al. Curcumin encapsulated zeolitic imidazolate frameworks as stimuli responsive drug delivery system and their interaction with biomimetic environment. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 12598, 2017.

TONHI, E. et al. Fases Estacionárias para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE-FR) Baseadas em Superfícies de Óxidos Inorgânicos Funcionalizados. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p.616-623, 2002.

VASCONCELOS, I. B. et al. Cytotoxicity and slow release of the anti-cancer drug doxorubicin from ZIF-8. **RSC Advances**, v. 2, n. 25, p. 9437, 2012.

WAN OSMAN, W. N.; LAU, S. F.; MOHAMED, S. Scopoletin-standardized *Morinda elliptica* leaf extract suppressed inflammation and cartilage degradation to alleviate osteoarthritis: A preclinical study. **Phytotherapy Research**, v. 31, n. 12, p. 1954–1961, 2017.

YANG, I. J.; LEE, D. U.; SHIN, H. M. Anti-inflammatory and antioxidant effects of coumarins isolated from *Foeniculum vulgare* in lipopolysaccharide-stimulated macrophages and 12- O -tetradecanoylphorbol-13-acetate-stimulated mice. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 37, n. 3, p. 308–317, 2015.

YAP, M. H.; FOW, K. L.; CHEN, G. Z. Synthesis and applications of MOF-derived porous nanostructures. **Green Energy & Environment**, v. 2, n. 3, p. 218–245, j2017.

YUAN, S. et al. Stable Metal-Organic Frameworks: Design, Synthesis, and Applications. **Advanced Materials**, v. 30, n. 37, p. 1704303, 2018.

XIONG, P. et al. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems Materials design and control synthesis of the layered double hydroxide with the desired basal spacing. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 144, p. 11–16, 2015.

ZENG, YING-CHUN et al. Soluplus micelles for improving the oral bioavailability of scopoletin and their hypouricemic effect in vivo. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 38, n. 3, p. 424-433, 2017.

ZENG, YINGCHUN et al. Validated LC-MS/MS method for the determination of Scopoletin in rat plasma and its application to pharmacokinetic studies. **Molecules**, v. 20, n. 10, p. 18988–19001, 2015.

ZHANG, F. et al. Postsynthetic Modification of ZIF-90 for Potential Targeted Codelivery of Two Anticancer Drugs. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 9, n. 32, p. 27332-27337, 2017.

ZHANG, F et al. Scopoletin Suppresses Activation of Dendritic Cells and Pathogenesis of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Inhibiting NF- κ B Signaling. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, 2019.

ZHANG, H.; ZHAO, M.; LIN, Y. S. Stability of ZIF-8 in water under ambient conditions. **Microporous and Mesoporous Materials**, p. 201–210, 2019.

ZHU, X. et al. Inherent anchorages in UiO-66 nanoparticles for efficient capture of alendronate and its mediated release. **Chem. Commun.** v. 50, p. 8779-8782, 2014.

XU, K. et al. Activity of coumarin against *Candida albicans* biofilms. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 29, n. 1, p. 28–34, 2019.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Desenvolver *Drug Delivery Systems* à base de cumarinas (escopoletina e cumarina) e ZIF-8 como carreador.

3.2 Específicos

- Realizar uma revisão sobre as atividades farmacológicas da escopoletina (ESC);
- Desenvolver uma metodologia de obtenção *in situ* do sistema escopoletina: ZIF-8 (ESC:ZIF-8);
- Caracterizar o sistema desenvolvido (ESC:ZIF-8) assim como, a ESC e ZIF-8 por meio das técnicas difratometria de Raios-X (DR-X), termogravimetria (TG), calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de fourier (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e ressonância magnética nuclear (RMN);
- Determinar a concentração de ESC livre no meio de dissolução por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à arranjo diodo (CLAE-DAD);
- Determinar o perfil de liberação *in vitro* da ESC a partir da rede de ZIF-8;
- Determinar o modelo cinético do perfil de liberação tanto da ESC quanto do sistema ESC:ZIF-8;
- Investigar a atividade expectorante da ESC e ESC:ZIF-8 a partir do modelo experimental que usa como indicador o vermelho de fenol;
- Realizar o estudo de pré-formulação da cumarina (CM) caracterizando-a por meio das técnicas de DRX, MEV, TG, DSC e FTIR;
- Determinar a concentração de CM livre no meio de dissolução por CLAE-DAD;
- Investigar a atividade expectorante e antitussígena da CM;
- Desenvolver uma metodologia de obtenção *in situ* dos sistemas cumarina: ZIF-8 (CM:ZIF-8);
- Determinar o perfil de liberação *in vitro* da CM pura e a partir da rede de ZIF-8 dos sistemas desenvolvidos;

CAPÍTULO 1- UMA REVISÃO SISTEMÁTICA DOS ASPECTOS FARMACOLÓGICOS DA ESCOPOLETINA

Artigo será submetido na: *Journal Pharmacy and Pharmacology*

UMA REVISÃO SISTEMÁTICA DOS ASPECTOS FARMACOLÓGICOS DA ESCOPOLETINA

RESUMO

Escopoletina (7-hidroxi-6-metoxi-2H-cromen-2-ona, ESC) é uma cumarina fenólica presente em diferentes espécies de plantas medicinais. O principal objetivo desta revisão consiste em realizar uma revisão sistemática dos últimos cinco anos sobre as atividades farmacológicas da ESC. Para isso, utilizou-se os termos “scopoletin” e “pharmacology” nas bases de dados Science Direct, PubMed e Scopus. Outros critérios de seleção foram considerados como, artigos em inglês com os descritores no título, resumo ou texto completo e estudos pré-clínicos (*in vitro* e/ou *in vivo*) da ESC pura ou isolada de extrato padronizado. Após cuidadosa análise dos artigos obteve-se um total de 465 artigos e ao final 25 trabalhos foram selecionados considerando todos os critérios de inclusão. Os trabalhos foram classificados de acordo com a atividade farmacológica e apresentados em ordem crescente de número de trabalhos. As atividades farmacológicas relacionadas à ESC foram: anti-inflamatória e antioxidante; antidiabética; antidislipidêmica; antibacteriana e antifúngica; anti-hipertensiva; inibidora da monoaminoxidase; antipsicótica; neuroprotetora; esclerose múltipla; citotóxica; melanogênese; antiangiogênica e antienvhecimento. Por fim, pode-se afirmar que a ESC apresenta muitas atividades farmacológicas e interessantes fazendo deste composto um bom candidato à um estudo mais detalhado.

Palavras-chave: cumarinas, escopoletina, atividades farmacológicas

1 INTRODUÇÃO

A escopoletina (7-hidroxi-6-metoxi-2H-cromen-2-ona, ESC, Fig.1) também conhecida como 7-hidroxi 6-metoxicumarina está presente em diferentes espécies de plantas medicinais. A biossíntese das cumarinas nas plantas ainda não é completamente compreendida, mas no geral, se dá pela via dos fenilpropanoides. Kai e colaboradores (2006) em estudos biossintéticos com *Arabidopsis thaliana* Columbia relataram altos níveis de escopoletina e seu β -D-glicopiranosídeo (escopolina) encontrado em uma concentração 180 vezes maior na raiz que nas partes aéreas. Nas plantas a escopoletina tem um papel de defesa principalmente contra fungos (CARPINELLA; FERRAYOLI; PALACIOS, 2005). El Ordi e colaboradores (2010) avaliaram o mecanismo de resistência da *Nicotiana tabacum* (tabaco) a espécie de *Botrytis cinerea* e identificaram que estava relacionada a função da escopoletina antifúngica na planta.

Esta cumarina é um dos principais compostos da *Erycibe obtusifolia* Benth, esta por sua vez, é utilizada no tratamento de artrite reumatoide (CHENG, 2012). A ESC pode ser encontrada ainda em outras espécies tais como, *Erycibe obtusifolia*, *Aster tataricus* e *Foeniculum vulgare* (MOON et al., 2007). Presente também em algumas espécies de plantas comestíveis e frutas como a aveia (*Avena sativa*), alho (*Allium ampeloprasum*), aipo (*Apium graveolens*), pimenta vermelha (*Capsicum annuum*), pimenta (*Capsicum frutescens*), cenoura (*Daucus carota*), limão (*Citrus limon*) e batata doce (*Ipomoea batata*) (CARPINELLA; FERRAYOLI; PALACIOS, 2005).

Diferentes atividades farmacológicas são atribuídas à escopoletina tais como, anti-inflamatória (DING et al., 2008), antidepressiva, anticolinesterásico, antioxidante, antitumoral e antiproliferativa (CHENG, 2012). Essas são algumas das atividades atribuídas à escopoletina, assim o objetivo desta pesquisa foi a de sumarizar as atividades farmacológicas mais recentes dessa cumarina.

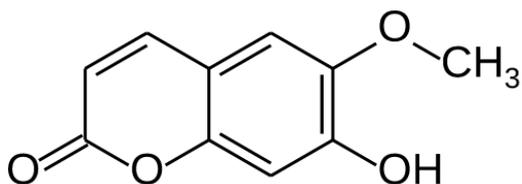


Fig.1. Estrutura química da ESC (C₁₀H₈O₂).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Estratégias de seleção

Foi realizada uma revisão sistemática de acordo com os Relatórios para Revisões Sistemáticas e Meta-Análises (PRISMA) (MOHER et al., 2009). Esta revisão sistemática foi conduzida por uma pesquisa da literatura especializada publicada nos últimos cinco anos (janeiro de 2015 a janeiro de 2020). A busca se deu nas principais bases de dados da área, Science Direct, PubMed e Scopus, utilizando a combinação dos descritores: “scopoletin” e “pharmacology”.

2.2 Seleção dos artigos

A seleção do manuscrito foi baseada nos seguintes critérios de inclusão: 1) artigos publicados em inglês; 2) com os descritores no título, resumo ou texto completo; 3) estudos pré-clínicos (*in vitro* e/ou *in vivo*) da escopoletina pura ou isolada de extrato padronizado. Além disso, resumos, editoriais, conferências, capítulos de livros foram excluídos do estudo.

Nesta seleção inicialmente, três investigadores independentes (P.A.S, J.M.TA.F e P.M.N.M) selecionaram os artigos de acordo com o título, em seguida de acordo com o resumo e, por fim, por meio da leitura do texto completo. Qualquer desentendimento sobre quais artigos deveriam entrar na revisão foi resolvida em comum acordo entre os três investigadores. Os artigos resultantes foram revisados com o objetivo de identificar quais se encaixavam ou não nos critérios de inclusão. Em casos de não consenso, uma quarta revisão independente foi consultada (L.A.R.) para decisão final.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise geral dos estudos

A busca primária identificou 465 artigos, sendo 123 do PubMed, 118 do Scopus e 224 do Science Direct. Entretanto, 107 trabalhos estavam indexados em uma ou mais base de dados e com isso foram contados somente uma vez, totalizando 358 artigos. Em seguida, a partir de uma análise do título, do resumo ou do texto completo, 334 artigos foram excluídos, pois não se encaixavam nos critérios de inclusão preestabelecidos inicialmente, restando 24 trabalhos originais para análise. Um trabalho publicado posteriormente ao período de análise foi incluído nessa revisão (Fig.2). Desse modo, um total de 25 estudos foram inclusos para análise e processamento dos dados estes por sua vez, foram classificados por tipo de atividade farmacológica.

Com relação à origem destes trabalhos a maior parte era da Coreia do Sul (9 artigos, 36%), seguido da China (4 artigos, 16%), Índia (3 artigos, 12%) e Malásia (3 artigos, 12%). Outros países foram citados, mas apenas uma vez cada (6 artigos, 24%) são eles: Brasil, Hungria, Argentina, Tailândia, México e Taiwan (Fig.3). Outra questão que merece destaque é o número de plantas medicinais das quais a escopoletina foi isolada ou foi testado diretamente o extrato padronizado. Observou-se um total de 7 espécies são elas *Foeniculum vulgare*, *Hypochaeris radicata*, *Polygala sabulosa*, *Lasianthus lucidus*, *Malva parviflora*, *Nicotiana glauca* e por fim *Morinda citrifolia* mencionada em dois trabalhos.

Na Tabela 1, encontram-se as características gerais dos estudos selecionados. Os dados de cada artigo foram apresentados a partir dos tópicos: autores, ano, país; substância (origem); tipo de animal; dose/ concentração e via de administração; modelo experimental; amostra analisada e os resultados obtidos.

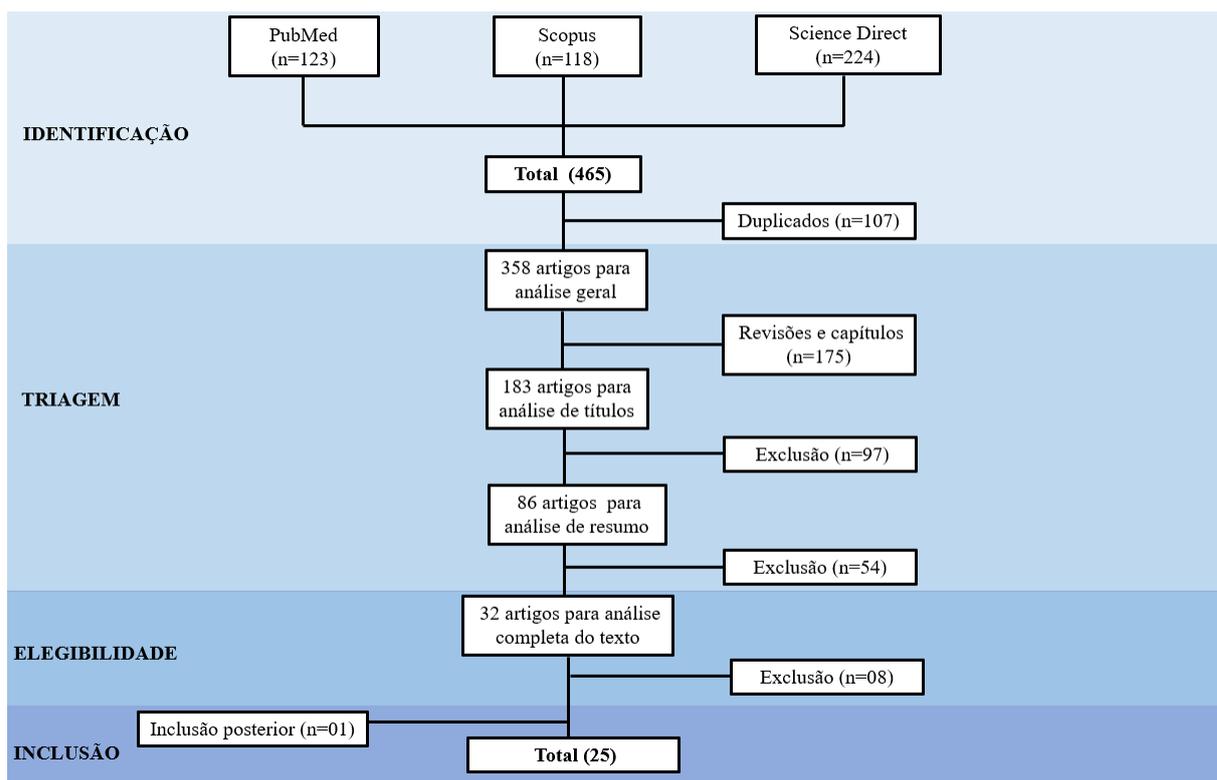


Fig.2. Estratégias de pesquisa de acordo com PRISMA.

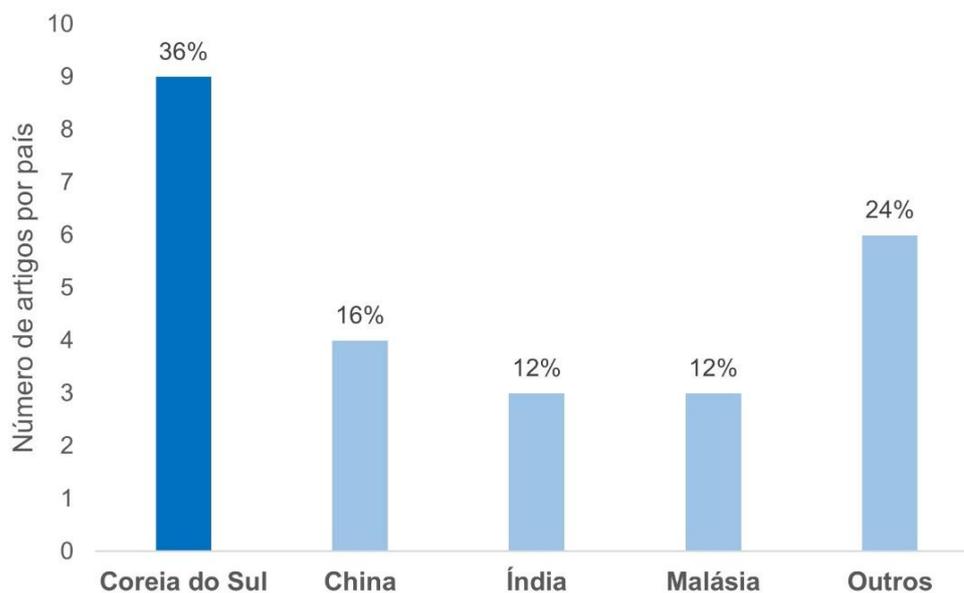


Fig.3. Distribuição dos artigos por país.

Tabela 1

Principais características e resultados dos estudos selecionados da escopoletina.

Autor, ano, país	Escopoletina (origem)	Modelo animal	Concentração/ Dose (via)	Modelo experimental	Amostra analisada	Resultados
Yang et al., 2015 (Coreia do Sul)	Isolada de <i>F. vulgare</i>	Camundongos ICR Cultura de células	30 μ M (<i>in vitro</i>) 200 μ g/mL (aplicação tópica)	Viabilidade/proliferação celular (RAW 264.7) com LPS e inflamação de pele induzida por TPA	Células e orelha dos animais	- \uparrow viabilidade celular - \downarrow PGE2 e NO - \downarrow expressão de mRNA de COX-2 e iNOS - \downarrow IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α - \downarrow 48,34% DPPH e - \downarrow 47,05% ABTS.
Jamuna et al., 2015 (Índia)	Isolada de <i>H. radicata</i>	Camundongos Swiss; Ratos Sprague-Dawley	10, 50 ou 100 mg/kg (VO/gavagem)	Toxicidade dose única; atividade anti-inflamatória e antioxidante	Sangue Plasma Órgãos	- \downarrow edema de pata em 92,88% e \downarrow NO, TNF- α , IL- β e IL-6. - Modelo de predição da atividade biológica apresentou: antimutagênica, espasmolítica e urinária e antisséptica.

Nascimento et al., 2016 (Brasil)	Isolada de <i>P. sabulosa</i>	Camundongos Swiss	0,1 - 5 mg/kg (IP)	Ensaio de inflamação pleural e perfil enzimático	Fluido pleural Tecido	- ↓ células inflamatórias - Regulação da mieloperoxidase, adenosina desaminase, NO, TNF- α , IL-1 β , NF- κ B e p38.
Leema e Tamizhselvi, 2018 (Índia)	Sigma-Aldrich, (Bangalore, Índia)	Camundongos Swiss	10 mg/kg (IP)	Análise de dano pancreático e pulmonar por ceruleína	Sangue Plasma Tecidos	- ↓ amilase - Modulação de: mieloperoxidase, inflamação, edema, necrose ↓ IL-1 β e TNF- α ↓ NF- κ B, IL-33, MCP-1
Osman et al., 2018 (Malásia)	Pura e extrato padronizado de <i>M. citrifolia</i>	Cultura celular	1 - 2,5 μ g/poço <i>M. citrifolia</i> 1 - 5 μ g/poço escopoletina	Ensaio de osteoartrite e degradação cartilaginosa	Células Sangue Plasma Tecidos	- ↓ liberação de glicosaminoglicano - ↓ NO em cultura de cartilagem.

	(2,2 ± 0,3% de ESC)	Ratos Sprague-Dawley	(<i>in vitro</i>) 200 - 400 mg/kg <i>M. citrifolia</i> (VO)			- Extrato ↓ condição inflamatória e alterações histopatológicas regulando citocinas (IL-1β, MMP1, 3, 13) e expressão de genes danosos
Chang et al., 2015 (Taiwan)	não mencionado	Ratos Wistar Células isoladas	15,625 - 125 μM (<i>in vitro</i>) 10 mg/kg (VO/gavagem)	Hiperglicemia induzida por metilglioxal e análise em cultura de hepatócitos FL83B	Células Sangue Plasma	- ↓ produtos de glicação e [] glicose - restaurou dos níveis normais de peptídeo C - ↑ sensibilidade à insulina e translocação de GLUT2 em hepatócitos
Jang et al., 2018 (Coreia do Sul)	Sigma, St. Louis, MO, USA	Reação enzimática Cultura celular (3T3-L1) Camundongo ICR	5 - 100 μM (<i>in vitro</i>) 10 mg/kg (VO/gavagem)	Inibição enzimática, viabilidade celular em cultura de fibroblastos embrionários (3T3-L1) e animais diabéticos	Enzimas Células Sangue Plasma	- Não apresentou citotoxicidade (3T3-L1). - (-) da α-glicosidase [CI ₅₀ = 85,12 (79,93-90,31) μM] e α-amilase [CI ₅₀ =37,36 (32,47-42,25) μM]

Jang, Park, Han, 2020 (Coreia do Sul)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO	Cultura de células (3T3-L1)	1-20 μ M (<i>in vitro</i>)	Análise metabólica das células de pré-adiposas e diferenciadas de camundongo (3T3-L1)	Células	- \downarrow concentração de glicose e área sob a curva, pós-prandial - \uparrow captação de glicose - \uparrow fosforilação de Akt e AMPK, ativação de PI3K e expressão de GLUT4
Lee e Lee, 2015 (Coreia do Sul)	Sigma, St. Louis, MO, USA	Ratos Sprague-Dawley	0,001%-0,005% (m/v) (VO)	Dano hepático induzido por consumo de etanol	Sangue Plasma	- Controle do: peso total, fibrose hepática, colesterol, TG e taxa de lipoproteínas - \downarrow citocinas pró-inflamatórias, enzimas hepáticas; alteração na expressão gênica de diversas proteínas
Ham et al., 2016 (Coreia do Sul)	TCI Co., Ltd, Tokyo, Japan	Camundongos C57BL/6J	0,01% e 0,05% (m/v) (VO)	Influência metabólica de dieta rica em gordura	Sangue Plasma Tecidos	- \downarrow peso corporal e gordura visceral - \downarrow níveis séricos de leptina, TNF α , IL-6, IFN γ ; resistência à

insulina e acúmulo de lipídios hepáticos.
 - ↑ níveis de adiponectina e lipídios fecais
 - Regulação dos genes metabólicos e inflamatórios lipídicos.

Choi et al.,
2017
(Coreia do Sul)

TCI (Tokyo,
Japan)

Camundongos
C57BL/6N

0,01 % (m/m)
(VO)

Alteração no metabolismo de carboidratos e lipídeos, animais diabéticos e com alimentação lipídica

Sangue
Plasma
Tecidos

- ↓ glicose sanguínea, HbA_{1c}, sem alteração do peptídeo C.
 - ↓ TG e colesterol
 - Regulação de genes e nos níveis de TNF- α , IL-6 e MCP-1

Napiroon et al., 2018
(Tailândia)

Extrato de *L. lucidus*
(1,4 μ mol de ESC/g de extrato)

Cultura de *P. aeruginosa*
(DMSC 37166 e ATCC 27853)

Diluição seriada

Atividade antibacteriana em cepa produtora de AmpC β -lactamase (ATCC 27853) e clínica (DMSC 37166)

Cultura bacteriana

- Atividade antibacteriana contra cepas DMSC 37166 e ATCC 27853 de *P. aeruginosa*
 MIC=256 μ g/mL (extrato das folhas)
 MIC=128 μ g/mL (extrato da casca do caule)

 MIC=0,66 µM (ESC)

- Não foi um antibacteriano efetivo frente as cepas: *S. aureus* (0198), *S. haemolyticus* (562B), *S. epidermidis* (1042), *S. haemolyticus* (731B), *S. aureus* (ATCC 29213) com $CI_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$
Para *S. aureus* (0198) foi considerado ativo ($CI_{50} = 100 \mu\text{g/mL}$)

Cruz-Sánchez et al., 2019 (México)

Isolada de *M. citrifolia*

Culturas bacterianas

12,5-100 µg/mL
(*in vitro*)

Atividade antibacteriana

Cultura bacteriana

Das et al., 2020 (Hungria)

Sigma-Aldrich
Chemie GmbH,
Steinheim,
Germany

Culturas fúngicas

-

Atividade antimicrobiana frente a diferentes cepas

Culturas fúngicas

- Antifúngica
C. glabrata
($MIC_{90} = 21,83-142,1 \mu\text{g/mL}$)
C. tropicalis
($MIC_{90} = 67,22-119 \mu\text{g/mL}$)
C. albicans
($MEC_{10} = 132,17 \pm 4,19$)
C. dubliniensis
($MEC_{10} = 132,17 \pm 5,08$)

						<p><i>C. tropicalis</i> (MEC₁₀=134,27 ±4,66) <i>C. guilliermondii</i> (MEC₁₀=149,2±5,32); <i>C. parapsilosis</i> (MEC₁₀=164,7±26) (µg/mL) ↓ viabilidade das cepas</p>
Herrera et al., 2019 (Argentina)	Isolada de <i>M. parviflora</i>	Camundongos ICR	0,01 - 5 mg/kg (VO/gavagem)	Hipertensão induzida por angiotensina II	Sangue Plasma Tecidos	<p>- Controle da pressão diastólica e sistólica DE₅₀ = 0,02 mg/kg (pressão diastólica) DE₅₀ = 0,12 mg/kg (pressão sistólica)</p>
Basu et al., 2016 (Índia)	Sigma, St. Louis, MO, USA	Camundongos Swiss	8 mg/kg (uso repetido) ou 80 mg/kg (forma aguda) (IP)	Ensaio enzimáticos (MAO-A e MAO-B) e concentração de amina biogênicas, docking	Sangue Plasma Tecidos	<p>- (-) seletiva de MAO-B Ki=20,7 µM (humanos) Ki=22 µM (camundongo). - ↑ dopamina - ↓ metabólito Ácido 3,4-diidroxifenilacético</p>
Seong et al., 2019	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO	Sprague Dawley	0-25 µM	Interação de enzimas MAO-A e B,	Enzimas e tecidos	- ↓ eficácia em inibir as enzimas MAO-A

(Coreia do Sul)			(<i>in vitro</i>)	além da β -amiloide. Atividade de lipoperoxidação Docking		($CI_{50} = 207,65 \pm 1.91$) e MAO-B ($CI_{50} > 300 \mu M$). Para TBARS a $CE_{50} > 30 \mu M$ e em relação aos agregados β -amiloides $CI_{50} > 100 \mu M$
Pandy e Vijeepallman, 2017 (Malásia)	Friendemann Schmidt Chemicals	Camundongos ICR	0,05 - 1 mg/kg (VO/gavagem)	Análise comportamental	-	- \downarrow comportamentos estereotipados - \downarrow escalada inclinada
Zhou et al., 2020 (China)	não mencionado	Ratos Sprague-Dawley	100 mg/kg (IP)	Protocolo de lesão medular	Célula e tecido	- Melhorou parâmetros motores (BBB score) e proteção neuronal - Modulação da via AMPK/mTOR - Promoveu autofagia como efeito protetor
Zhang et al., 2019 (China)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO	Camundongos C57BL/6	50 mg/kg (IP)	Modelo de encefalomielite autoimune experimental (esclerose múltipla)	Sangue Plasma Tecidos	- (-) da atividade de NF- κ B em células dendríticas, regulando a inflamação e

						desmielinização de neurônios do SNC. - ↓ expressão MHC II
Li et al., 2015 (China)	Sigma, St. Louis, MO, USA	Cultura celular (LNCaP)	0 - 100 μ M (<i>in vitro</i>)	Viabilidade e ciclo celular em cultura de câncer prostático (LNCaP)	Células	- (-) crescimento de LNCaP, modificando seu ciclo celular (CI_{50} =65,1 μ M). Antecipou a apoptose em até 21%
Tian et al., 2019 (China)	não mencionado	Cultura de células (DoTc2, SiHa, HeLa e C33A)	0 - 30 μ M (<i>in vitro</i>)	Viabilidade, apoptose e invasão de células câncer cervical humano (DoTc2, SiHa, HeLa e C33A)	Células	-Apresentou inibição do crescimento das células DoTc2 (CI_{50} =25 μ M), SiHa (CI_{50} =15 μ M), HeLa (CI_{50} =7,5 μ M) e C33A (CI_{50} =25 μ M), - ↓ formação de colônias celulares - ↑ da expressão de caspase 3, 8, 9 e PARP - ↓ de fosforilação de PI3k e Akt Antimetátase

Kim et al., 2017 (Coreia do Sul)	S2500, Sigma, U.S.A.	Cultura de células (B16F10 e HDFn)	0-40 µg/mL (<i>in vitro</i>)	Análise de melanogênica em células de melanoma murino (B16F10) e fibroblasto dérmico neonatal humano (HDFn)	Células	- ↑ atividade e expressão de tirosinase e TRP-1 - ↑ AMPc e fosforilação de p38 MAPK em células B16F10
Nam e Kim, 2015 (Coreia do Sul)	Sigma, St. Louis, MO, USA	Cultura celular (IMR90)	1 - 16 µM (<i>in vitro</i>)	Viabilidade e ciclo celular de fibroblasto pulmonar humano (IMR90)	Células	- Induziu a autofagia - ↓ de β-galactosidade, - ↑ da atividade de p53 - expressão de histonas acetilases controle na expressão de genes envolvidos com inflamação, <i>anti-aging</i> e reprogramação celular.
Tabana et al., 2016 (Malásia)	Isolada de <i>N. glauca</i>	Ratos Sprague-Dawley; Camundongos Cultura celular (HUVECs, CCD-18Co e HCT 116)	0,06 - 0,5 µM (<i>in vitro</i>) 50-200 mg/kg (VO/gavagem)	Proliferação celular derivadas do endotélio de veias do cordão umbilical humano (HUVECs), fibroblasto de colón humano (CCD-18Co) e câncer de	Células Sangue Plasma Tecidos	- DL ₅₀ >2000 mg/kg - Anti-angiogênica e antiproliferativa - (-) neovascularização (células HCT-116). - Inibição tumoral e anti-angiogênica

cólon humano (HCT 116) vascularização tumoral, toxicidade dose aguda (DL₅₀), docking

(camundongos imunossuprimidos)
- Eficiência de ligação com os fatores angiogênicos (ERK1, VEGF-A e FGF-2)

Legenda: (-): inibição, ↑: aumento, ↓: redução, CE₅₀= concentração de fármaco que induz 50% do efeito máximo, CI₅₀= concentração de fármaco que inibe 50% do efeito máximo, DL₅₀= dose letal que mata 50% dos animais, MIC= concentração mínima inibitória, MEC 10 = mínima concentração efetiva.

3.2 Estudos pré-clínicos

3.2.1 Anti-inflamatória e antioxidante

As principais atividades encontradas para escopoletina, tanto na forma isolada quanto como constituinte químico de uma planta medicinal são os efeitos anti-inflamatório e antioxidante. Desse modo, o trabalho de Yang e colaboradores (2015) avaliou quatro cumarinas (escopoletina, 8-metoxipsroleno, bergapteno e imperatorina) isoladas do extrato metanólico da *Foeniculum vulgare*. Para a avaliação da atividade antioxidante utilizou-se o teste de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e método do radical de ácido 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS), as cumarinas e controles positivos na concentração de 30 µM. Os autores afirmam que as cumarinas apresentaram uma atividade antioxidante “excelente”, porém, não foi possível observar isto nos resultados. A escopoletina apresentou atividade inibitória de 48,34% e 47,05% para os testes DDPH e ABTS respectivamente, e os controles positivos apresentaram atividade inibitória acima de 70% para os mesmos testes. Desse modo, a escopoletina nessas condições experimentais não apresentou atividade antioxidante significativa assim como, as outras cumarinas.

Já com relação à atividade anti-inflamatória foram avaliadas a atividade de cada cumarina (30 µM) frente aos mediadores pró e anti-inflamatórios. Dessa forma, utilizou-se o modelo *in vitro* de viabilidade celular de macrófagos (RAW 264,7) ativados por lipo-polissacarídeos (LPS) e modelo *in vivo* de inflamação (YANG et al., 2015). No processo inflamatório os macrófagos têm um importante papel e apresentam três funções principais: apresentação de antígeno, fagocitose e imunomodulação por meio da produção de citocinas e fatores de crescimento (FUJIWARA; KOBAYASHI, 2005). Quando essas as células são ativadas, há uma expressão de enzimas inflamatórias (iNOS e COX-2) e citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-6). No entanto, os macrófagos também podem atuar como anti-inflamatórios quando expressam as citocinas IL-4, IL-13, ou IL-10 (ARIEL e SERHAN, 2012).

Levando-se em consideração os mecanismos da inflamação os resultados mais expressivos demonstraram que a escopoletina tem atividade

anti-inflamatória. Desse modo, foi observado aumento da viabilidade celular, bloqueio da produção de prostaglandina E₂ (PGE₂) e óxido nítrico (NO), assim como a expressão de mRNA de ciclooxigenase 2 (COX-2) e iNOS. A escopoletina reduziu ainda a produção dos mediadores inflamatórios IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α (YANG et al., 2015).

Em um outro importante estudo, duas cumarinas (escopoletina e confertina) foram isoladas do extrato metanólico de *Hypochoeris radicata*. Os testes foram realizados comparando-se a atividade dos extratos (folhas e raízes) e das cumarinas. Nos testes *in vivo* os extratos foram utilizados nas doses 100 a 3000 mg/kg e as cumarinas nas doses de 10, 50 e 100 mg/kg. A atividade anti-inflamatória foi avaliada por meio do teste de edema de pata induzido por carragenina. A escopoletina apresentou uma redução de 92,88% do edema na dose de 10 mg/kg, resultado este superior a confertina que apresentou 79,05% na mesma dose. Essa atividade foi superior também aos extratos das folhas nas doses de 150 e 300 mg/kg (67,59% e 77,07%) e das raízes nas mesmas doses com 85,77% e 87,74% de atividade. A escopoletina reduziu ainda de maneira significativa ($p < 0,001$) a liberação dos mediadores pró-inflamatórios TNF- α , IL-1 β e IL-6. Outro resultado que se mostrou promissor foi a redução da migração de macrófagos. A atividade antioxidante foi avaliada *in vivo* com a dosagem das enzimas: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione-s-transferase (GPS), glutathione peroxidase (GPx), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD); atividade antioxidante não enzimática (glutathione e ácido ascórbico). Os autores não destacam a discussão desses dados, mas partir da análise pode-se evidenciar que a escopoletina apresentou resultados significativos comparado com o controle negativo (JAMUNA et al., 2015).

Nascimento e colaboradores (2016) avaliaram a escopoletina isolada da *Polygala sabulosa* em modelo animal de pleurisia induzida por carragenina. Alguns parâmetros avaliados são similares aos estudos citados anteriormente. A escopoletina foi administrada nas doses 0,1, 1 e 5 mg/kg foi observado que na dose de 1mg/kg houve redução significativa de redução do influxo leucócitos e migração de neutrófilos. Esta dose foi utilizada posteriormente para análise de outros parâmetros. Escopoletina reduziu significativamente TNF- α e IL-1 β , assim como inibiu a fosforilação do fator nuclear kappa β (NF- κ β) e proteína quinase

ativada por mitógeno p38 (p38 MAPK). Esses últimos estariam envolvidos na modulação de mediadores inflamatórios.

Leema e colaboradores (2018) destacaram a atividade anti-inflamatória da escopoletina na dose de 10 mg/kg em modelo animal de pancreatite aguda induzida por ceruleína associada a lesões pulmonares. Mensurou-se principalmente, os seguintes parâmetros: atividade de amilase e mieloperoxidase, mediadores pro-inflamatórios, análise morfológica e sulfureto de hidrogênio (H₂S). Os principais resultados apontam para redução da inflamação, necrose e edema. Isso pode estar relacionado aos dados complementares observados nessa pesquisa como: a redução da atividade enzimática da amilase e mieloperoxidase tanto no pâncreas quanto no pulmão; redução dos níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-33, H₂S, inibição do NF- κ β e ativação de mastócitos.

Por fim, Osman e colaboradores (2018) utilizaram uma metodologia *in vivo* e *ex vivo* para avaliar osteoartrite e deterioração de cartilagem subcondrial. Para tanto, avaliaram o extrato padronizado de *Morinda citrifolia* (noni) (MC) para epicatequina e escopoletina, sendo a concentração da cumarina no extrato de 2,2%. Desse modo, o extrato de MC foi utilizado na concentração de 200 e 400 mg/kg em ratos e discos de cartilagem bovina frescas. Os autores avaliaram os resultados por meio de análises histológicas (tíbia e fêmur), macroscópicas, radiografias, reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) quantitativo e dosagens de marcadores inflamatórios. Os resultados apontam que MC na dose de 400 mg/kg reduziu tanto a deterioração das cartilagens quanto os mediadores pró-inflamatórios que estão envolvidos neste mecanismo (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, COX-2, PGE2, iNO).

3.2.2 Antidiabético

Chang e colaboradores (2015) investigaram a capacidade da escopoletina de proteger contra a indução de hiperglicemia e resistência à insulina promovido por metilglioxal (MG). Para tanto, utilizaram modelo *in vivo*, assim como testes bioquímicos, imuno-histoquímicas, western blot, cultura de células (hepatócitos FL83B) e teste de tolerância oral à glicose (TOTG). A escopoletina foi utilizada

nas doses de 15,625 a 125 μM no teste de inibição percentual da formação de produtos finais da glicação avançada (AGES) e nos demais testes *in vivo* foi utilizada na dose de 10 mg/kg. Os principais resultados apontam uma redução dos níveis de glicose no sangue nos grupos de animais nos quais foi administrado concomitantemente a escopoletina, assim como redução da formação de AGES. Outro ponto foi a modificação de parâmetros bioquímicos como colesterol total, lipoproteína de baixa e de alta densidade (LDL, HDL) quando se compara o grupo de animais que só recebeu MG, mostrando que a escopoletina provocou redução significativa desses índices. Além disso, promoveu aumento na sensibilidade à insulina e aumentou a translocação de GLUT2 em hepatócitos FL83B.

Outro estudo de Jang e colaboradores (2018) avaliaram o efeito antidiabético da escopoletina utilizando modelo de diabetes induzida por estreptozotocina. Foram analisados os níveis de glicose no sangue e atividade enzimática em modelo *in vitro*, assim como o teste de citotoxicidade em células de ratos (embrio fibroblastos, CT3-L1). Os principais resultados apontam primeiramente que esta cumarina não apresenta citotoxicidade. A inibição das enzimas α -glicosidase e α -amilase é concentração-dependente, com um CI_{50} de 85,12 e 37,36 μM , respectivamente mais potente quando comparado com a acarbose. Somando-se a evidência anterior, a escopoletina reduziu significativamente os níveis de glicose pós-prandial em ratos diabéticos e normais quando comparado com o controle.

Jang e colaboradores (2020) fizeram também pesquisa sobre outro mecanismo de ação da escopoletina no qual teria efeito antidiabético nos adipócitos. Para tal objetivo foi utilizado células de adipócitos (3T3-L1) com as quais, foram realizados diferentes experimentos com concentrações crescentes de escopoletina e os controles necessários. A partir dos resultados, observou-se que a escopoletina aumenta a expressão do transportador de glicose, GLUT-4. Esse fato estaria relacionado com o mecanismo desta cumarina de fosforilar a proteína cinase B (PKB) e ativar a fosfatidilinositol 3 cinase (PI3K) e com isso promover a maior captação de glicose. Com isso, os autores demonstraram um outro mecanismo que demonstra que a escopoletina tem um potencial antidiabético interessante.

3.2.3 Antidislipidêmico

Lee e Lee (2015) investigaram efeitos da escopoletina sobre o metabolismo lipídico no tecido adiposo branco e fígado, assim como os mecanismos associados ao uso crônico de álcool em ratos. Realizou-se os estudos *in vivo* com animais tratados por oito semanas com álcool e escopoletina (0,001 e 0,005%), sendo avaliados diferentes parâmetros histopatológicos e bioquímicos. Os resultados mais significantes dos dados bioquímicos e histológicos da pesquisa demonstram efeitos importantes da escopoletina. Nos grupos tratados com esta cumarina houve manutenção do peso, atenuação da fibrose hepática, controle de colesterol total, triglicerídeos (TG), lipoproteínas (HDL e LDL), citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-10, TNF α , IL β), enzimas hepáticas e aumento na circulação de adiponectina. Outro importante dado demonstra inibição também da lipólise via inibição dos genes ATGL e HSL, no tecido adiposo branco. Esses genes estariam envolvidos com o mecanismo da lipase nesses tecidos.

Ham e colaboradores (2016) investigaram o efeito da escopoletina em ratos com dieta rica em gorduras e não alcoólicas, diferente do estudo anteriormente citado. Foram realizados testes *in vivo* com 0,01% e 0,05% de escopoletina por 16 semanas. Os principais resultados apontam para um efeito relevante nos grupos tratados com as doses 0,01% e 0,05% de escopoletina. Assim, observou-se redução do peso corporal, dos lipídios, da gordura visceral, marcadores de inflamação e das enzimas hepáticas. Por sua vez, houve aumento dos níveis séricos de adiponectina e lipídios fecais, assim como a regulação de genes inflamatórios e resistência à insulina.

Por fim, Choi e colaboradores (2017) objetivaram um estudo para verificar diferentes atividades, porém relacionadas e que poderiam demonstrar que a escopoletina interfere na glicemia, esteatose hepática e inflamação. Para tanto, foi utilizado modelo animal de indução de diabetes por estreptozotocina, sendo que nos grupos tratados com escopoletina utilizou-se a dose de 0,01 g/100 g de dieta. Foram analisados alguns parâmetros bioquímicos, histológicos e outras técnicas foram usadas para mensurar os resultados (RT-PCR, western blot e

ELISA). Alguns dados corroboram com os estudos mencionados anteriormente. A escopoletina (0,01%) reduziu níveis de glicose e aumentou a sensibilidade à insulina. Por sua vez, reduziu colesterol hepático e TG, assim como melhorou o perfil de esteatose e fibrose hepática, regulou genes de proteínas hepáticas (PPAR γ e DGAT2).

3.2.4 Antibacteriana e antifúngica

Naiproom e colaboradores (2018) avaliaram atividade antibacteriana da escopoletina isolada da espécie *Lasianthus lucidus* e seus extratos. A avaliação especificamente da escopoletina é justificada pelo fato desta cumarina ser isolada em grandes concentrações (1,4 $\mu\text{mol/g}$) e ser um dos principais marcadores da espécie. Para isso, utilizou-se duas cepas patogênicas de *Pseudomonas aeruginosa* (DMSC 37166 e ATCC 27853) e os resultados demonstraram que tanto os extratos quanto a escopoletina apresentaram atividade contra as cepas assim como, lise e alongamento celular.

Cruz-Sánchez e colaboradores (2019) avaliaram a escopoletina isolada da *Morinda citrifolia*, assim como os extratos e frações dessa planta quanto a atividade antibacteriana sobre diferentes cepas de *Staphylococcus*. A escopoletina não foi um antibacteriano efetivo frente a *S. aureus* (0198), *S. haemolyticus* (562B), *S. epidermidis* (1042), *S. haemolyticus* (731B), *S. aureus* (ATCC 29213). Porém, foi considerado ativo contra *S. aureus* (0198) com uma concentração mínima inibitória (MIC) de 100 $\mu\text{g/mL}$.

Das e colaboradores (2020) avaliaram a atividade antifúngica da escopoletina sobre diferentes espécies do gênero *Candida* que formam biofilmes. Desse modo, apresentou atividade antifúngica sobre várias espécies, os valores de MIC₉₀ variaram entre 83,43 e 119 $\mu\text{g/mL}$, sendo mais efetiva sobre *C. glabrata* e *C. tropicalis*. Na análise de mínima concentração efetiva (MEC 10) foi eficaz contra algumas cepas. Desse modo, *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. glabrata* tiveram redução de 60% na biomassa. Reduziu também a viabilidade das cepas, além de aumentar o balanço oxidativo. Essas atividades da escopoletina foram atribuídas tanto a inibição de bombas de efluxo quanto a indução de apoptose.

3.2.5 Anti-hipertensivo

Lagunas-Herrera e colaboradores (2019) avaliaram a atividade anti-hipertensiva da escopoletina, assim como das frações e extratos. A escopoletina foi uma das principais substâncias isoladas do extrato etanólico da *Malva parviflora*. Foi utilizado um modelo animal de hipertensão induzida por angiotensina II e a escopoletina foi administrada nas doses de 0,01 a 5 mg/kg. Foram avaliados parâmetros de pressão diastólica e sistólica, estudo histopatológico dos rins e quantificação de citocinas. Os dados relacionados especificamente à cumarina demonstram um controle da hipertensão se comparados com os grupos controles ($DE_{50} = 0,12$ mg/kg para pressão sistólica e 0,02 mg/kg para pressão diastólica). Como a administração de angiotensina II aumentou citocinas inflamatórias nos rins, foi avaliado o efeito dos extratos e frações de *Malva parviflora*. Desse modo, observou-se que o extrato etanólico e a fração acetato de etila, além de modular a pressão arterial como as substâncias isoladas, reduziram também de maneira significativa TNF- α e IL-6.

3.2.6 Inibição da MAO

Na área de doenças neurodegenerativas a descoberta de moléculas que inibam enzimas do tipo monoamina oxidase (MAO-A e MAO-B) é de grande importância. Desse modo, Basu e colaboradores (2016) avaliaram o potencial da escopoletina de inibir a MAO, como já havia sido descrito na literatura. Para tanto, utilizaram enzimas, MAO-A e MAO-B (isoladas de humanos e de ratos) e a escopoletina foi avaliada nas concentrações de 1 a 100 μ M. Também foram realizados estudos de *docking* molecular e quantificação dos níveis de aminas em cérebro de ratos. Os dados mais relevantes demonstram que a escopoletina promove uma inibição parcialmente seletiva da MAO-B e que esta é 3,5 vezes maior que para MAO-A, assim como demonstrou ter uma atividade reversível. No estudo de *docking* há evidências de que esta molécula se liga às duas isoformas de MAO e que ocupa regiões hidrofóbicas. Já em testes *in vivo*,

observou-se um aumento significativo de dopamina quando os animais foram tratados com a escopoletina.

Seong e colaboradores (2019) avaliaram a atividade inibidora sobre a MAO humana de diferentes cumarinas, dentre elas a escopoletina. Os resultados foram diferentes do estudo apresentado anteriormente, neste caso houve maior seletividade de inibição pela MAO-A do que pela MAO-B. Porém, especificamente em relação à escopoletina a eficácia foi baixa se comparado às outras cumarinas avaliadas.

3.2.7 Antipsicótico

Pandy e Vijeepallam (2017) utilizaram a escopoletina e rutina com o objetivo de avaliar a atividade antipsicóticas. Para tanto, utilizaram modelo animal de escalada induzida por apomorfina e comportamento estereotipado induzido por metanfetamina. Em estudos anteriores o grupo já havia observado que essas duas substâncias seriam as responsáveis pelo efeito do extrato metanólico da *Morinda citrifolia* nessa atividade. Especificamente, em relação à escopoletina, esta foi utilizada nas doses de 0,05 a 1 mg/kg nos dois testes em animais. Os resultados demonstraram que a escopoletina, comparado com os grupos controles, reduziu significativamente o tempo de escalada apenas na dose de 0,1 mg/kg, assim como para comportamento estereotipado. Considerando que a apomorfina é um agonista dopaminérgico, D1 e D2, e que os receptores D2 estariam envolvidos na via mesolímbica, responsável pelos sintomas positivos da esquizofrenia. Além disso, a metafetamina (psicoestimulante) que impede a recaptção de monoaminas por meio do bloqueio de transportador de dopamina. Desse modo, considerando o mecanismo de ação dos controles positivos e o efeito significativo da escopoletina nas atividades avaliadas. Pode-se afirmar que esta cumarina diminui sintomas positivos da psicose em camundongos.

3.2.8 Neuroprotetora

Zhou e colaboradores (2020) avaliaram o efeito neuroprotetor da escopoletina em modelo animal de lesão medular pelo mecanismo de autofagia.

A escopoletina foi utilizada na dose de 100 mg/kg e foram avaliados os parâmetros de recuperação motora (dos membros posteriores) utilizando-se BBB scores; análises histológicas com contagem de neurônios motores e apoptóticos; western blot. Os dados demonstram que, a escopoletina reduziu significativamente o dano nos tecidos neuronais em animais induzidos à lesão medular. Além disso, a via AMPK/mTOR (envolvido na apoptose neuronal) foi ativada remetendo ao efeito benéfico assim como, ativação de outras proteínas.

3.2.9 Esclerose múltipla

Zhang e colaboradores (2019) avaliaram o potencial terapêutico da escopoletina em modelo experimental de encefalomielite autoimune (EAE) por meio do modelo animal de esclerose múltipla.

A escopoletina foi utilizada na dose de 50 mg/kg e observou-se como principais resultados que os camundongos tratados com esta cumarina reduziu o desenvolvimento da doença EAE, assim como houve a redução da desmielinização das áreas analisadas. Outro ponto, é que a escopoletina reduziu a ativação de células dendríticas, que por sua vez demonstrou expressão reduzida do complexo de histocompatibilidade classe II (MHC-II), moléculas co-estimulatórias e redução da fosforilação NF- κ B. Esses resultados demonstram uma atividade preditiva que estaria envolvida na histopatologia da esclerose múltipla.

3.2.10 Citotóxica

Para avaliação da atividade citotóxica sobre a linhagem de células de câncer de próstata humano (LNCaP) da escopoletina, Li e colaboradores (2015) utilizaram diferentes metodologias. Para o teste de viabilidade celular utilizou-se o ensaio do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazólio);

avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo; detecção de apoptose e necrose; avaliação da morfologia celular e formação de corpo apoptótico.

Os dados demonstraram que a escopoletina apresentou efeito citotóxico dose-dependente sobre a linhagem de células LNCaP com uma CI_{50} de 65,1 μM além disso, apenas 7,91 % de células vivas foram encontrados. A partir da avaliação do ciclo celular ficou claro que após o tratamento com escopoletina houve um declínio de células na fase S e aumento na fase G2/M, o que significou ao longo do tempo apoptose celular. Os resultados obtidos com a citometria de fluxo demonstraram que houve aumento percentual da apoptose precoce, tardia e da morte celular necrótica. Desse modo, o dado mais expressivo foi em relação à apoptose precoce no qual houve aumento de respectivamente 15,45; 32,6 e 21,71 (%) para doses de 40, 80 e 100 (μM). Observou-se também aumento de 0,21 % de necrose celular.

Já Tian e colaboradores (2019) investigaram os efeitos anticâncer da escopoletina em linhagens de células de câncer de colo uterino, assim como o mecanismo de ação. Para tanto, utilizaram a linhagem de células normais (HCvEpC) e cancerígenas (DoTc2, SiHa, HeLa e C33A), e avaliaram: o efeito antiproliferativo (contagem de células), apoptose (promotores de coloração), distribuição celular (citometria de fluxo) e expressão proteica (western blot).

Os dados demonstram que a escopoletina inibe a proliferação celular de maneira dose-dependente induz morte celular por apoptose nas células HeLa (aumento de células na fase G2/M), reduz migração celular (efeito antimetástese) e inibi a via de sinalização PI3K-AKT (fosfatidilinositol-3-cinase – proteína cinase). Essa via está envolvida no controle e proliferação celular bem como, induz um sinal de sobrevivência para a proteção de células contra apoptose. Esses estudos reafirmam o potencial farmacológico desta cumarina.

3.2.11 Melanogênese

Kim e colaboradores (2017) investigaram os eventos moleculares que fazem com que a escopoletina induza melanogênese. Os autores inspiraram-se em uma outra pesquisa de Ahn e colaboradores (2014) que avaliaram a indução

de melanogênese pela escopoletina isolada da espécie medicinal *Cirsium setidens* Nakai, porém não investigaram o mecanismo de ação dessa atividade.

Para atingir os objetivos foram utilizadas as células B16 de melanoma (B16F10) e fibroblastos neonatais. Essas células foram avaliadas primeiramente, quanto à a viabilidade para os testes posteriores. Nesses testes a escopoletina foi utilizada nas concentrações de 0, 20 e 40 µg/mL. Portanto, outras metodologias foram utilizadas tais como: medição da melanina intracelular e atividade de tirosina cinase (B16F10); para análises utilizou-se as técnicas de Western Blot e RT-PCR (reação em cadeia de polimerase); radioimunoensaio do AMPc (adenosina monofosfato cíclica), avaliação dos níveis de AMPc em células tratadas com escopoletina ou hormônio estimulante de α-melanócitos; transfecção siRNA (ácido ribonucleico pequeno) da p38 MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno). Os resultados confirmaram que a escopoletina induz a biossíntese de melanina e tirosina cinase, e que este efeito é dose-dependente. O mecanismo molecular desta melanogênese foi determinado e observou-se que se dá pela via AMPc/ PKA e ativação parcial da p38 MAPK. Considerando que, quando a PKA (proteína quinase A) foi inativada a via AMPc/PKA e com isso a síntese de melanina pelas células tratadas com escopoletina foi nula.

3.2.12 Antiangiogênica

Tabana e colaboradores (2016) avaliaram a atividade antiangiogênica (antineovascularização) da escopoletina isolada do extrato de *Nicotiana glauca* (tabaco). Para comprovar a principal atividade da escopoletina deste estudo foram utilizados modelos *in vivo*, *ex vivo* e *in sílico*. A escopoletina foi utilizada por via oral em ratos nas doses 50, 100 e 200 mg/kg em modelo de xenoenxerto de atividade anticancerígena (implantes de células tumorais HT-116).

Os principais resultados demonstram que a escopoletina causou redução significativa de novos vasos, $CI_{50} = 0,06 \mu M$, com 59,72% (100 mg/kg) e 89,4% (200mg/kg). Outro importante resultado está relacionado a redução do crescimento tumoral (mm^2), com 34,2% (100 mg/kg) e 94,7% (200mg/kg). Nas análises de modelagem molecular, os dados sugeriram que a escopoletina teria forte afinidade pela proteína quinase (ERK1), fator de crescimento endotelial

vascular A (VEGF-A) e fator de crescimento 2 de fibroblasto (FGF-2). Esse dado é de fundamental importância pois esses fatores (VEGF, FGF e ERK1) estão envolvidos no processo de início e prolongamento da vascularização. Assim, o efeito anticancerígeno da escopoletina se dá por meio da atividade de antineovascularização.

3.2.13 Antienvhecimento

Investigou-se também o potencial de antienvhecimento da escopoletina e com isso os autores avaliaram qual seria o mecanismo de ação para esta atividade. Utilizando-se de técnicas *in vitro* e de fibroblastos pulmonares humanos (IMR90), verificou-se que a escopoletina modula a inativação do p53 e com isso indução do processo de autofagia. Desse modo, os resultados desta pesquisa evidenciam que a escopoletina pode influenciar na expressão de genes de programação e com isso seria um bom candidato à molécula *anti-aging* (NAM et al., 2015).

4 CONCLUSÃO

Essa revisão sistemática de literatura confirmou que a escopoletina apresenta uma ampla variedade de atividades farmacológicas fazendo dessa molécula um bom candidato à estudos mais detalhados. A partir dos 25 artigos selecionados observou-se que a escopoletina apresenta atividade: anti-inflamatória e antioxidante; antidiabética; antidislipidêmica; antibacteriana e antifúngica; anti-hipertensiva; inibição da monoaminoxidase; antipsicótico; neuroprotetora; esclerose múltipla; citotóxica; melanogênese; antiangiogênica e antienvhecimento. Assim, tendo em vista o potencial terapêutico dos compostos cumarínicos e as atividades farmacológicas atribuídas à escopoletina, esta cumarina seria um bom candidato no desenvolvimento de um medicamento.

REFERÊNCIAS

ARIEL, A.; SERHAN, C. N. New Lives Given by Cell Death: Macrophage Differentiation Following Their Encounter with Apoptotic Leukocytes during the Resolution of Inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 3, 2012.

BASU, M. et al. Effect of scopoletin on monoamine oxidases and brain amines. **Neurochemistry International**, v. 93, p. 113–117, 2016.

CARPINELLA, M. C.; FERRAYOLI, C. G.; PALACIOS, S. M. Antifungal Synergistic Effect of Scopoletin, a Hydroxycoumarin Isolated from *Melia azedarach* L. Fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 8, p. 2922–2927, 2005.

CHANG, W.C. et al. Scopoletin Protects against Methylglyoxal-Induced Hyperglycemia and Insulin Resistance Mediated by Suppression of Advanced Glycation Endproducts (AGEs) Generation and Anti-Glycation. **Molecules**, v. 20, n. 2, p. 2786–2801, 2015.

CHENG, Z. Studies on the interaction between scopoletin and two serum albumins by spectroscopic methods. **Journal of Luminescence**, v. 132, n. 10, p. 2719–2729, 2012.

CHOI, R.Y. et al. Scopoletin Supplementation Ameliorates Steatosis and Inflammation in Diabetic Mice. *Phytotherapy Research*, v. 31, n. 11, p. 1795–1804, 2017.

DAS, S. et al. Cytotoxic Action of Artemisinin and Scopoletin on Planktonic Forms and on Biofilms of *Candida* Species. **Molecules**, v. 25, n. 3, p. 476, 22 jan. 2020.

CRUZ-SÁNCHEZ, N. G. et al. Antibacterial activity of *Morinda citrifolia* Linneo seeds against Methicillin-Resistant *Staphylococcus* spp. **Microbial Pathogenesis**, v. 128, p. 347–353, 2019.

DING, Z. et al. Anti-Inflammatory Effects of Scopoletin and Underlying Mechanisms. **Pharmaceutical Biology**, v. 46, n. 12, p. 854–860, 2008.

EL OIRDI, M.; TRAPANI, A.; BOUARAB, K. The nature of tobacco resistance against *Botrytis cinerea* depends on the infection structures of the pathogen. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 239–253, 2010.

HAM, J. R. et al. Anti-obesity and anti-hepatosteatosis effects of dietary scopoletin in high-fat diet fed mice. **Journal of Functional Foods**, v. 25, p. 433–446, 2016.

JAMUNA, S. et al. Confertin and scopoletin from leaf and root extracts of *Hypochoeris radicata* have anti-inflammatory and antioxidant activities. **Industrial Crops and Products**, v. 70, p. 221–230, 2015.

JANG, J. H.; PARK, J. E.; HAN, J. S. Scopoletin increases glucose uptake through activation of PI3K and AMPK signaling pathway and improves insulin sensitivity in 3T3-L1 cells. **Nutrition Research**, v. 74, p. 52–61, 2020.

JANG, J. H.; PARK, J. E.; HAN, J. S. Scopoletin inhibits α -glucosidase in vitro and alleviates postprandial hyperglycemia in mice with diabetes. **European Journal of Pharmacology**, v. 834, p. 152–156, set. 2018.

KAI, K. et al. Accumulation of coumarins in *Arabidopsis thaliana*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 4, p. 379–386, 2006.

KIM, D.S. et al. Scopoletin Stimulates Melanogenesis via cAMP/PKA Pathway and Partially p38 Activation. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 40, n. 12, p. 2068–2074, 2017.

LAGUNAS-HERRERA, H. et al. Acute and Chronic Antihypertensive Effect of Fractions, Tiliroside and Scopoletin from *Malva parviflora*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 42, n. 1, p. 18–25, 2019.

LEE, H.I.; LEE, M.K. Coordinated regulation of scopoletin at adipose tissue–liver axis improved alcohol-induced lipid dysmetabolism and inflammation in rats. **Toxicology Letters**, v. 237, n. 3, p. 210–218, 2015.

LEEMA, G.; TAMIZHSELVI, R. Protective Effect of Scopoletin Against Cerulein-Induced Acute Pancreatitis and Associated Lung Injury in Mice. **Pancreas**, v. 47, n. 5, p. 577–585, 2018.

LI, C. et al. Effect of Scopoletin on Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Human Prostate Cancer Cells In vitro. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 4, p. 611, 2015.

MOON, P.D. et al. Use of scopoletin to inhibit the production of inflammatory cytokines through inhibition of the I κ B/NF- κ B signal cascade in the human mast cell line HMC-1. **European Journal of Pharmacology**, v. 555, n. 2–3, p. 218–225, 2007.

NAM, H.; KIM, M.M. Scopoletin has a potential activity for anti-aging via autophagy in human lung fibroblasts. **Phytomedicine**, v. 22, n. 3, p. 362–368, 2015.

NAPIROON, T. et al. Scopoletin from *Lasianthus lucidus* Blume (Rubiaceae): A potential antimicrobial against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 8, n. 9, p. 1–6, 2018.

NASCIMENTO, P.S.M. V. et al. Inhibition of the NF- κ B and p38 MAPK pathways by scopoletin reduce the inflammation caused by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 38, n. 5, p. 344–352, 2016.

OSMAN, W. W. N. et al. Epicatechin and scopoletin rich *Morinda citrifolia* (Noni) leaf extract supplementation, mitigated Osteoarthritis via anti-inflammatory, anti-oxidative, and anti-protease pathways. **Journal of Food Biochemistry**, v. 43, n. 3, 2019.

PANDY, V.; VIJEEPALLAM, K. Antipsychotic-like activity of scopoletin and rutin against the positive symptoms of schizophrenia in mouse models. **Experimental Animals**, v. 66, n. 4, p. 417–423, 2017.

SEONG, S. H. et al. Umbelliferone derivatives exert neuroprotective effects by inhibiting monoamine oxidase A, self-amyloid β aggregation, and lipid peroxidation. **Bioorganic Chemistry**, v. 92, 2019.

SUN, H. et al. Scopoletin is a phytoalexin against *Alternaria alternata* in wild tobacco dependent on jasmonate signalling. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 15, p. 4305-4315, 2014.

TABANA, Y. M. et al. Scopoletin, an active principle of tree tobacco (*Nicotiana glauca*) inhibits human tumor vascularization in xenograft models and modulates ERK1, VEGF-A, and FGF-2 in computer model. **Microvascular Research**, v. 107, p. 17–33, 2016.

TIAN, Q. et al. Scopoletin exerts anticancer effects on human cervical cancer cell lines by triggering apoptosis, cell cycle arrest, inhibition of cell invasion and PI3K/AKT signalling pathway. **Journal of B.U.ON. : official journal of the Balkan Union of Oncology**, v. 24, n. 3, p. 997–1002, 2019.

YANG, I. J.; LEE, D. U.; SHIN, H. M. Anti-inflammatory and antioxidant effects of coumarins isolated from *Foeniculum vulgare* in lipopolysaccharide-stimulated macrophages and 12- O -tetradecanoylphorbol-13-acetate-stimulated mice. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 37, n. 3, p. 308–317, 2015.

ZHANG, F. et al. Scopoletin Suppresses Activation of Dendritic Cells and Pathogenesis of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Inhibiting NF- κ B Signaling. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, 2019.

ZHOU, R. et al. Scopoletin Activates Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase/Mammalian Target of Rapamycin Signaling Pathway and Improves Functional Recovery after Spinal Cord Injury in Rats. **Pharmacology**, v. 105, n. 5–6, p. 349–359, 2020.

CAPÍTULO 2- DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *DRUG DELIVERY SYSTEM*: ESCOPOLETINA:ZIF-8

Artigo publicado na revista: Journal of Drug Delivery Science and Technology
DOI: 10.1016/j.jddst.2020.102131 (06/10/2020)

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *DRUG DELIVERY SYSTEM*: ESCOPOLETINA:ZIF-8

RESUMO

Escopoletina (7-hidroxi-6-metoxi-2H-cromen-2-ona, ESC) é uma cumarina fenólica comumente encontrada em algumas plantas medicinais. Este composto apresenta dados relevantes na literatura que demonstram suas atividades anti-inflamatória, antioxidante, citotoxicidade, hipocolesterolêmica e hipoglicêmica. ESC foi carregado *in situ* na Zeolitic Imidazolate Framework-8 (ZIF-8), um material de liberação lenta com aplicação farmacêutica. Tanto ZIF-8 como o drug delivery systems (DDS) ESC:ZIF-8 foram caracterizados por difração de raios-X (DRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV), ressonância magnética nuclear (NMR), termogravimetria (TG), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). A quantificação de ESC em solução foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à arranjo de diodo (CLAE-DAD) e o perfil de liberação de ESC e ESC:ZIF-8 foi comparado em condições *non-sink* nos pHs 4,5 e 6,5. A atividade expectorante também foi avaliada. O sistema ESC:ZIF-8 mostrou uma eficiência de encapsulação de 22,5%. Foi observado um perfil de liberação dependente de pH no DDS ESC:ZIF8. O modelo cinético mais adequado para ESC puro em ambos os pHs foi o modelo Korsmeyer-Peppas. Para ESC:ZIF-8 no pH 4,5, o melhor modelo foi Korsmeyer-Peppas, mas em pH 6,5 foi Peppas-Sahlin. ESC também apresentou atividade expectorante nas doses 30 e 100 mg/kg, porém, o sistema não mostrou atividade expectorante na dose testada.

Palavras-chave: preparação de ação prolongada; pH dependente; cumarinas; escopoletina; expectorante; metal-organic frameworks.

1 INTRODUÇÃO

A escopoletina (ESC), 7-hidroxi-6-metoxi-2H-cromen-2-ona (C₁₀H₈O₄), é uma cumarina presente em diferentes espécies de plantas medicinais, tais como *Erycibe obtusifolia*, *Aster tataricus* e *Foeniculum vulgare* (LI et al., 2015). As pesquisas demonstram importantes atividades farmacológicas, tais como: antioxidante e anti-inflamatória (JAMUNA et al., 2015; OSMAN et al., 2017), anti-câncer (LI et al., 2015; SEO et al., 2016), antitumoral devido ao seu potencial antiangiogênico (TABANA et al., 2016), anti-diabética (JANG et al., 2018), indução de melanogênese (KIM et al., 2017), inibidor seletivo da monoamino oxidase (BASU et al., 2016) e anti-velhecimento (NAM e KIM, 2015).

Além dessas atividades farmacológicas, outro importante estudo com a ESC evidenciou a influência desta cumarina sobre a liberação de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-6 e IL-8). Fato este que evidencia a possível relação de atividade da ESC sobre diferentes doenças inflamatórias, tais como asma, osteoartrite e artrite reumatoide (MOON et al., 2007). Um estudo mais recente demonstrou que a escopoletina melhorou efetivamente um quadro de encefalomielite autoimune experimental (modelo animal de esclerose múltipla) (ZHANG et al., 2019).

Levando-se em consideração as atividades biológicas citadas acima, a escopoletina seria um bom candidato à fármaco. Ademais, suas características físico-químicas evidenciadas por essa pesquisa e sua baixa solubilidade em água (ZENG et al., 2015) fazem dessa molécula uma candidata à incorporação em um *Drug Delivery System*.

Sistema *Drug Delivery* é uma das aplicações mais promissoras para o cuidado com a saúde humana e representa um campo em constante evolução para a área da tecnologia farmacêutica. Desse modo, nessa área há um desafio crucial que seria a busca de carreadores não-tóxicos e eficientes. Até agora diferentes estratégias têm sido estudadas para aplicações biológicas, como polímeros orgânicos e materiais porosos inorgânicos (SUN et al., 2013).

Nos últimos anos novas tecnologias de produção de carreadores estão sendo desenvolvidas para melhorar a liberação, dissolução e absorção de fármacos de baixa solubilidade (GARCÍA-ARIETA, 2014). Dentre os exemplos

de novas tecnologias tem-se as Redes Metalorgânicas, do inglês *Metal Organic Frameworks* (MOFs). As MOFs são construídas a partir de íons metálicos e ligantes orgânicos. Estudos recentes demonstraram essas estruturas podem ter um tamanho na escala nanométrica e apresentar uma morfologia regular (JIAO et al., 2018). Dentre os diversos tipos de MOF, a *Zeolitic Imidazolate Frameworks* (ZIF) subtipo ZIF-8, utilizada nesta pesquisa, destaca-se como uma das mais promissoras para o desenvolvimento de *Drug Delivery System* devido às suas diversas vantagens. Dentre as suas vantagens destacam-se: boa estabilidade química e térmica; alta área de superfície e de poro; zinco como “*linker*” (TIAN et al., 2017; LIÉDANA et al., 2012; AN et al., 2019).

Considerando as atividades farmacológicas da escopoletina já evidenciadas na literatura e o papel da ZIF-8 como um carreador importante no desenvolvimento de um *Drug Delivery System*, apresentando vantagens quando comparadas a outros tipos de MOFs, essa pesquisa propõe o desenvolvimento de um sistema de *Drug Delivery System*, por incorporação de Escopoletina à rede reticular da ZIF-8, além do que, verificar a atividade expectorante deste sistema.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

A escopoletina (ESC) (CAS:92-61-5, Lote nº MKBZ008V) foi obtida da Sigma-Aldrich® com pureza $\geq 99\%$. O 2-metilimidazol (2-MIm) (CAS:693-98-1, Lote nº 0000060698) e o sulfato de zinco heptahidratado [Zn (SO)₂·7 H₂O] (CAS:7446-20-0, Lote nº SLBV1742) foram obtidos da Sigma-Aldrich® com pureza $> 99\%$.

2.2 Desenvolvimento do sistema ESC:ZIF-8

Para o desenvolvimento do sistema ESC:ZIF-8 utilizou-se a técnica de incorporação *in situ*. Nesse método, utilizou-se como matéria-prima: 2-MIm (82,1 g.mol⁻¹), Zn (SO₄)₂·7H₂O (287,54 g.mol⁻¹, Zn (65,41 g.mol⁻¹)) e ESC (192,17 g.mol⁻¹), na proporção molar de 70:1:1.

Primeiramente, a ESC foi pré-solubilizada em dimetilsulfóxido (DMSO), enquanto isso o 2-MIm foi solubilizado com uma mistura de H₂O e DMSO, colocado sob agitação a 200 rpm, e o Zn (SO₄)₂.7H₂O foi solubilizado apenas em H₂O. A solução de ESC foi adicionado lentamente à solução de 2-MIm que estava sob agitação e pôr fim a solução de Zn (SO₄)₂.7H₂O. Após 24 h sob agitação constante e a temperatura de 23° C, o sistema foi filtrado e lavado com 10 mL de metanol e água destilada. Essa metodologia de desenvolvimento do sistema foi adaptada de Kaur e colaboradores (2017), que utilizou o mesmo método de desenvolvimento *in situ*. A ZIF-8 (não carregada) foi obtida nas mesmas condições experimentais que o sistema para posterior controle do processo.

A taxa de carregamento do sistema foi determinada a partir do preparo de soluções metanólicas acidificadas com ácido trifluoroacético com o sistema ESC:ZIF-8 e com isso a ESC liberada contida na solução foi quantificada por CLAE-DAD (TIWARI et al., 2017).

2.3 Caracterização do sistema ESC:ZIF-8

Foram realizados testes de caracterização com as matérias primas isoladas (ESC e ZIF-8) e do sistema ESC:ZIF-8, a fim de comparar e determinar as características do sistema desenvolvido.

2.3.1 Difratometria de Raios-X (DRX)

Os padrões de difração das amostras foram obtidos usando um difratômetro de raios X (Shimadzu®, XRD 7000), a emissão utilizada foi a de cobre a uma velocidade de varredura de 1,2°.min⁻¹, na faixa do ângulo 2θ de 5° - 45°. Os difratogramas obtidos mostraram informações sobre o grau de cristalinidade da ESC, ZIF-8 e ESC:ZIF-8 obtido.

2.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Nas análises por MEV as amostras foram dispersas em fita carbono fixadas no suporte (*stub*). Em seguida, foram metalizadas com ouro atômico em um metalizador Quorum modelo Q150R ES com uma corrente de 15 mA por 5 minutos com um *tooling fator* de 2,30. As amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura Vega3 SEM da Tescan acoplado à um sistema de análise por espectroscopia de raios-X por energia dispersiva (EDS). Para amostra de ZIF-8 como controle obteve-se a análise qualitativa e quantitativa por EDS.

2.3.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

O sistema ESC:ZIF-8 foi caracterizado também por RMN, os espectros unidimensionais de ^1H -RMN (400 MHz), foram obtidos com um espectrômetro Bruker Ascend 400. A amostra da ESC foi solubilizada em DMSO deuterado (DMSO-d_6), no entanto a amostra do sistema só foi possível a análise quando solubilizada em água deuterada acidificada com ácido acético anteriormente para quebra da rede metalorgânica formada (PARK et al., 2006).

2.3.4 Análise térmica

Para análises térmicas foram utilizadas as técnicas calorimetria diferencial exploratória (DSC) e termogravimetria (TG). Desse modo, para as análises de TG as amostras foram preparadas utilizando uma termobalança Shimadzu® (modelo TGA Q60) em atmosfera de nitrogênio em fluxo de 100 mL/min. Para tal, foi utilizado cerca de 5 mg de cada amostra acondicionada em cadinho de platina e submetido a análise na faixa de temperatura de 25 a 900° C (ESC foi até 600° C) com uma razão de aquecimento de 10° C/min. Os dados obtidos foram analisados em software Shimadzu® TA-60WS com cálculo da primeira derivada da curva TG (DTG) e auxílio da DTA (VIEIRA et al., 2015).

As curvas DSC foram obtidas no calorímetro exploratório diferencial da Shimadzu® (modelo DSC-60) integrado ao software Shimadzu® TA-60WS com atmosfera de nitrogênio de 50 mL/min⁻¹ nas razões de aquecimento de 2° C/min na faixa de temperatura de 25–300° C. Cerca de 2 mg de amostra foi posta em

cadinho de alumínio hermeticamente fechado. Índio (156,4° C) e Zinco (419,5° C) foram utilizados para calibrar a escala de temperatura e a resposta de entalpia do equipamento (VIEIRA et al., 2015).

2.3.5 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

O espectro de infravermelho por transformada de Fourier foi obtido utilizando o equipamento Shimadzu® (IRTracer-100) com dispositivo de reflectância total atenuada (ATR). As amostras analisadas foram transferidas diretamente para o compartimento do dispositivo de ATR com seleneto de zinco. A varredura foi realizada na faixa de 600 a 4000 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} e 150 scans.

2.3.6 Quantificação da ESC por CLAE-DAD

As análises foram realizadas utilizando um cromatógrafo líquido Shimadzu® (modelo LC-20 AT) equipado com um amostrador automático (SIL-20 A) e um detector de arranjo de diodos (SPD-M20A) controlado por software LC-Solution® 1.0. Todas as alíquotas referentes a concentração de ESC foram submetidas individualmente à análise nas seguintes condições cromatográficas: fase estacionária foi utilizada uma coluna C18 (250 x 4,6 mm) e tamanho de partícula de 5 μm (Supelco® Hypersil); a fase móvel: água (solução A) e metanol (solução B). Método caracteriza-se como gradiente, com fluxo de 1 mL/min, volume de injeção de 10 μL e tempo de corrida de 17 min. A temperatura da coluna foi mantida constante em 30° C durante toda a análise.

Todas as soluções foram degaseificadas e filtradas através de membrana filtrante de 0,22 μm (Chromafil® Xtra, EUA), antes de serem analisadas no cromatógrafo. A detecção foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à arranjo de diodo (CLAE-DAD) no comprimento de onda de 340 nm. Esse método foi desenvolvido e adaptado a partir do estudo de Wang e colaboradores (2017). A partir desse método obteve-se a curva de calibração, na faixa de concentração de 50 a 200 ($\mu\text{g/mL}$), e obteve-se a equação da reta

($y = 3,64 \cdot 10^{-7}x - 0,000045$; $r^2 = 0,9918$), com a qual foi possível quantificar ESC nas alíquotas retiradas dos testes de liberação *in vitro*. Os cromatogramas foram analisados de acordo com o tempo de retenção do pico da ESC e o espectro de UV das amostras, de acordo com os dados do padrão analítico observados respectivamente nas Fig. 1 (a e b).

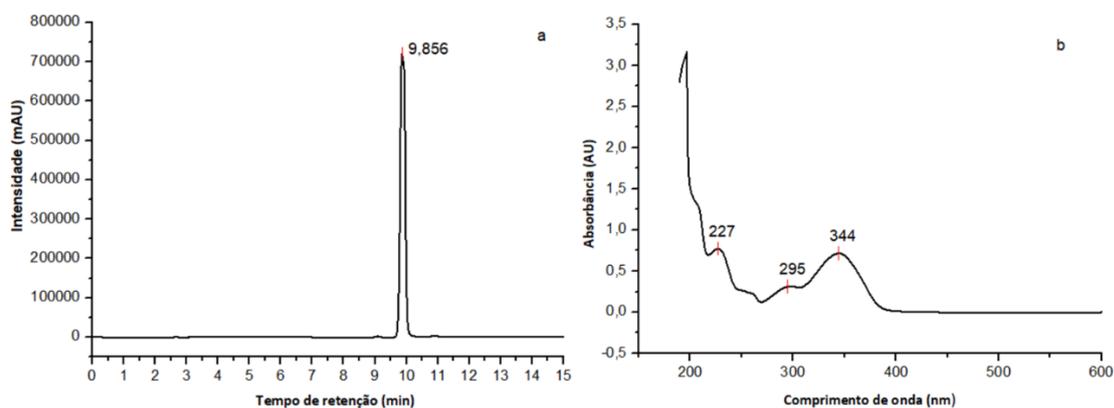


Fig.1. a: Cromatograma da ESC, b: Espectro de UV da ESC.

2.3.7 Testes de liberação *in vitro* da ESC

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária por meio da Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 31 dispõe sobre a realização de Estudos de Equivalência Farmacêutica e de Perfil de Liberação Comparativo e com isso determina-se que os testes de liberação sejam realizados em pelo menos três pH diferentes e em condições laboratoriais específicas (BRASIL, 2010).

O teste de liberação foi realizado nos pH de 4,5 e 6,5, a fim de simular o que ocorre no sistema gastrointestinal. O teste de dissolução não foi realizado no pH mais ácido (pH=1,2) pois aconteceria uma rápida dissociação estrutural da ZIF-8 (PARK et al.,2006), desestruturando o sistema ESC:ZIF-8.

O teste de liberação foi realizado nos pHs de 4,5 e 6,5, a fim de simular o que ocorre no sistema gastrointestinal. Para isso, utilizou-se soluções tamponantes preparadas de acordo com a Farmacopeia Brasileira (2019). No pH 4,5 preparou-se o tampão acetato de sódio e para o pH 6,5 preparou-se o tampão fosfato.

As análises foram realizadas tanto com a ESC quanto com o ESC:ZIF-8. O teste foi realizado por 7 horas (9 pontos de coleta), nos quais foram retiradas

alíquotas em intervalos de tempo pré-determinados (0,25; 0,5; 0,75; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7 h) para quantificação de ESC liberada. Os testes foram realizados na temperatura de 37° C, sob agitação constante de 200 rpm e em cada coleta foram retiradas alíquotas de 1 mL, com reposição do meio. Nas análises do teste de liberação da ESC pura e sistema levou-se em consideração a concentração teórica no meio, para os testes com o sistema levou-se em consideração também a taxa de carregamento.

Para as amostras de ESC:ZIF-8 no pH de 6,5 realizou-se o teste de liberação por mais tempo afim de determinar o tipo de liberação modificada. Desse modo, realizou-se o teste por 7 dias. A concentração de ESC nas amostras foi determinada a partir da análise por CLAE-DAD.

2.4 Determinação do modelo cinético do perfil de liberação da ESC

A fim de determinar o modelo farmacocinético do perfil de liberação das amostras nos pH de 4,5 e 6,5 foi utilizado como ferramenta o software DDSolver (ZHANG et al., 2010). Para tanto, os dados foram avaliados utilizando os modelos: Ordem zero, Primeira ordem, Higushi, Korsmeyer-peppas, Peppas-Sahlin, Hixson-Crowell e Hopfenberg. Para a avaliação do modelo farmacocinético mais adequado foi utilizado como parâmetro o coeficiente de determinação ajustado (R^2), calculado por meio da equação 1. Desse modo, o maior valor obtido de R^2 para determinado modelo de cada amostra analisada foi considerado para tanto, o mais representativo do perfil de liberação.

$$R^2_{\text{ajustado}} = 1 - \frac{n-1}{n-p} \times (1 - r^2) \quad (1)$$

Onde: n = número de pontos da amostra; p = número de parâmetros do modelo e r^2 = coeficiente de determinação.

2.5 Avaliação da atividade expectorante

Os experimentos com animais foram previamente aprovados pelo Comitê de ética no uso de animais da Universidade Federal do Vale do São Francisco (CEUA-UNIVASF, Protocolo nº 0017/270219). Os camundongos (*Mus*

musculus) ficaram três dias para adaptação no local de experimentação com acesso a água e ração a vontade até 2 h, no mínimo, do procedimento experimental, com administração de guaifenesina 100mg/kg (controle positivo), NaCl 0,9% (controle negativo) e 10, 30 e 100 mg/kg de escopoletina e 10 mg/kg do ESC:ZIF-8, por via oral com 6 animais por grupo.

Os animais foram pré-tratados e após 30 min realizou-se a administração de suspensão de vermelho de fenol (500 mg/kg – 12,5 mg/mL) por via intraperitoneal. Passados mais 30 min da administração do vermelho de fenol, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical para, através de incisão cirúrgica promover a recuperação do lavado bronco alveolar (LBA) com 2 mL de NaCl 0,9%, recuperando-se 600 µL de LBA que foi posto sob rotação a 2500 rpm por 10 min.

Após esse procedimento, foram adicionados 500 µL de sobrenadante em cubeta de quartzo e 0,05 mL de hidróxido de sódio (NaOH 0,1 M) para quantificação do vermelho de fenol. A atividade expectorante foi determinada levando-se em consideração a curva de calibração do vermelho de fenol ($y = 0,1741x + 0,0168$) com método desenvolvido e validado por Menezes e colaboradores (2019).

2.6 Análise estatística

Os espectros foram obtidos pelo software LC-Solution® 1.0 (Shimadzu®, TA 60 WS) e plotados no OriginPro versão 8.0 (OriginLab®). As análises dos dados foram realizadas utilizando os softwares Microsoft Excel® (Microsoft Office®), OriginPro versão 8.0 (OriginLab®) e os resultados quantitativos expressos em média ± desvio padrão.

Já nos testes de liberação os resultados foram expressos como a porcentagem de ESC liberada ± desvio padrão de três repetições por ensaio. Para a avaliação do modelo cinético de liberação utilizou-se o add-in DDSolver® (ZHANG et al., 2010).

Os testes farmacológicos foram avaliados estatisticamente pelo software GraphPad Prism versão 6.0. As análises como média ± erro padrão da média e

avaliadas por análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do pós-teste de Dunnett, considerando significativamente diferente quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Desenvolvimento do sistema ESC:ZIF-8

No desenvolvimento do sistema ESC:ZIF-8 levou-se em consideração tanto os dados da literatura referentes à sistemas já desenvolvidos com a ZIF-8, quanto resultados preliminares dessa pesquisa com a ESC. Desse modo, a estratégia de incorporação escolhida foi a *in situ*.

Esse tipo de método tem como principal característica o fato de que a ZIF-8 é formada ao mesmo tempo que a substância de interesse pode ser encapsulada na rede metalorgânica dessa MOF. Ainda há poucos estudos na literatura utilizando a ZIF-8 como um carreador de fármacos, no entanto, tem-se alguns exemplos de sucesso com os quais obteve-se sistemas de liberação modificada a partir dessa técnica.

Liédana e colaboradores (2012) desenvolveram um sistema com a cafeína e ZIF-8, tanto pela técnica *ex situ* quanto *in situ*. Outro exemplo de estudo no qual desenvolveu-se nanocápsulas utilizando-se também a ZIF-8 como carreador na liberação pH dependente do fármaco doxorrubicina (TANG et al., 2017). Kaur e colaboradores (2017) desenvolveu também um sistema de liberação modificada do tipo controlada se utilizando a ZIF-8 como carreador da 6-mercaptopurina.

Um dos primeiros pontos observados após o procedimento de desenvolvimento do sistema foi o aspecto macroscópico do pó obtido. Considerando que a ESC é um pó cristalino de cor amarela intensa, a ZIF-8 de coloração branca assim como, as matérias-primas para sua formação. O sistema desenvolvido por sua vez, apresentou após o processo de secagem a coloração amarela clara. Essa característica macroscópica foi observada também por Tiwari e colaboradores (2017), no qual observou-se que a encapsulação da curcumina fez com esta passasse da cor amarela para laranja. Portanto, a modificação de aspecto e coloração é considerada uma das primeiras evidências de que houve a formação de um sistema.

3.2 Caracterização do sistema ESC:ZIF-8

3.2.1 Difractometria de Raios-X (DRX)

A análise de DRX foi utilizada para verificar o padrão de cristalinidade da ZIF-8 desenvolvida nas mesmas condições que no sistema. O difratograma da ZIF-8 (Fig. 2) determinou a característica altamente cristalina da molécula, devido a presença de pico bastante intenso como aquele em 2θ igual a $7,29^\circ$ e outros de média intensidade em $10,34^\circ$; $12,66^\circ$ e $17,93^\circ$.

Esses dados corroboram com os dados obtidos do DRX da ZIF-8 sintetizada por Feng e colaboradores (2016), no qual desenvolveram a ZIF-8 utilizando também DMSO como um dos solventes e corrobora também com o estudo de Sahim e colaboradores (2018) que utilizou as mesmas proporções molares de 2-MIm e zinco. Outros estudos sintetizaram a ZIF-8 e obtiveram o mesmo padrão de cristalinidade (LIÉDANA et al., 2012; TANG et al., 2017., ZHANG et al., 2017; PENG et al., 2019). Esses dados confirmam que a ZIF-8 desenvolvida nesta pesquisa tem o mesmo perfil de cristalinidade.

Na Figura 2, encontra-se ainda o perfil difratométrico da ESC e do sistema. Com relação ao perfil da ESC foi possível constatar numerosos picos de difração (reflexões), de alta intensidade com 2θ igual a $12,48^\circ$ e $13,30^\circ$; e outros de média intensidade $7,64^\circ$; $19,15^\circ$ e $26,37^\circ$ e com isso confirma sua natureza cristalina. Esse perfil corrobora com os dados de Zeng e colaboradores (2017).

O sistema ESC:ZIF-8 apresentou um perfil com picos característicos semelhantes à ZIF-8 assim como, muitos picos apresentam-se sobrepostos à ESC só que de maior e/ou menor intensidade assim como, o pico de $7,64^\circ$ que não existe no difratograma do sistema. Esse fato poderia estar relacionado ao fato de que a ESC foi incorporada à rede metalorgânica da ZIF-8 e com isso o perfil cristalino observado do sistema é diferente. Assim, a análise do espectro do sistema demonstrou deslocamentos químicos característicos tanto da ZIF-8 quanto da ESC.

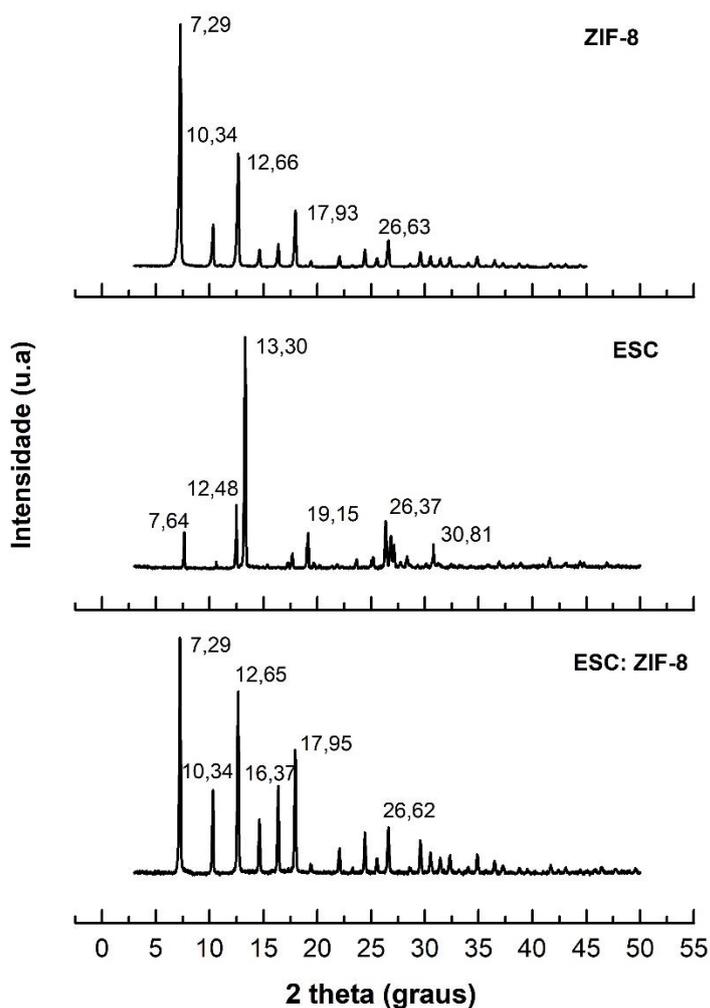


Fig.2. Difractogramas da ZIF-8, ESC e ESC:ZIF-8.

3.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As análises por MEV das amostras foram necessárias para verificar primeiramente, se a morfologia da ZIF-8 desenvolvida nas mesmas condições experimentais que o sistema era o padrão obtido em outros estudos. Desse modo, a partir dessa micrografia verificou-se uma morfologia semelhante ao formato de um rômbo dodecaédrico uniforme (quase esférico) (Fig. 3 a). Esse padrão morfológico se assemelha a ZIF-8 desenvolvida em outros estudos (ŞAHIN et al., 2018; TANG et al., 2017; HOOP et al., 2018).

Na Figura 3 b, tem-se uma micrografia (aumento de 5000 x) com análise qualitativa por EDS no qual destaca-se os principais elementos químicos da

amostra. Desse modo, tem-se o carbono, zinco e nitrogênio considerando que estes são principais constituintes da rede metalorgânica.

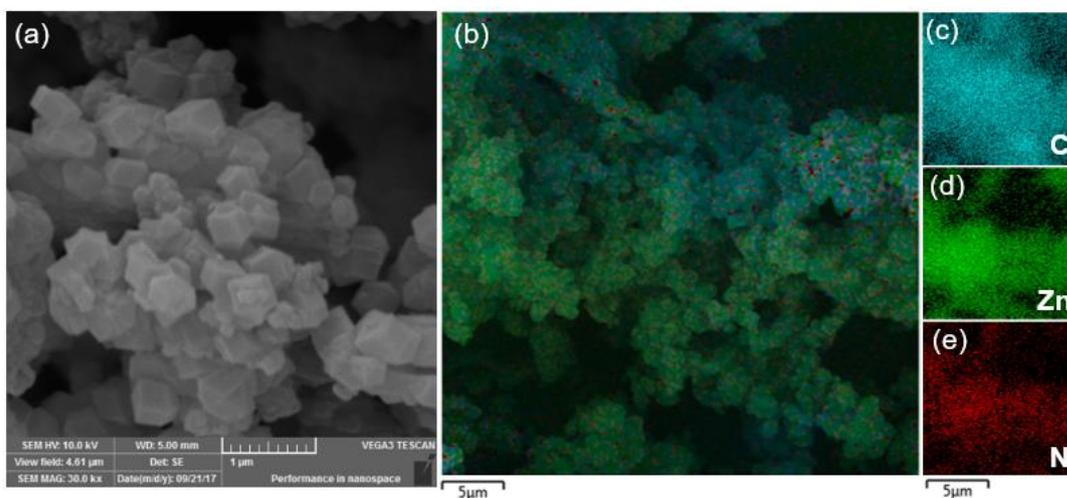


Fig.3. MEV da ZIF-8 (a- 30000x), EDS – ZIF-8 (b- 5000x), carbono (c), zinco (d) e nitrogênio (e).

Observa-se nas imagens abaixo a morfologia da ZIF-8 utilizando-se um aumento 5.000 x (Fig. 4 a), o mesmo padrão morfológico, rômbo dodecaédrico uniforme. Na Figura 4 b, observa-se a morfologia dos cristais da ESC confirmando o perfil difratométrico obtido no DRX, esta portanto apresenta os cristais em formato de agulha e/ou retangular, dado este que corrobora com o estudo de Zeng e colaboradores (2017). Já com relação as micrografias obtidas do sistema (Fig 4. c e d) observa-se que a morfologia assemelha-se à ZIF-8 confirmando que a ESC foi encapsulada à rede metalorgânica. Na Figura 4 c, observa-se amostra residual de ESC que encontra-se adsorvida à ZIF-8.

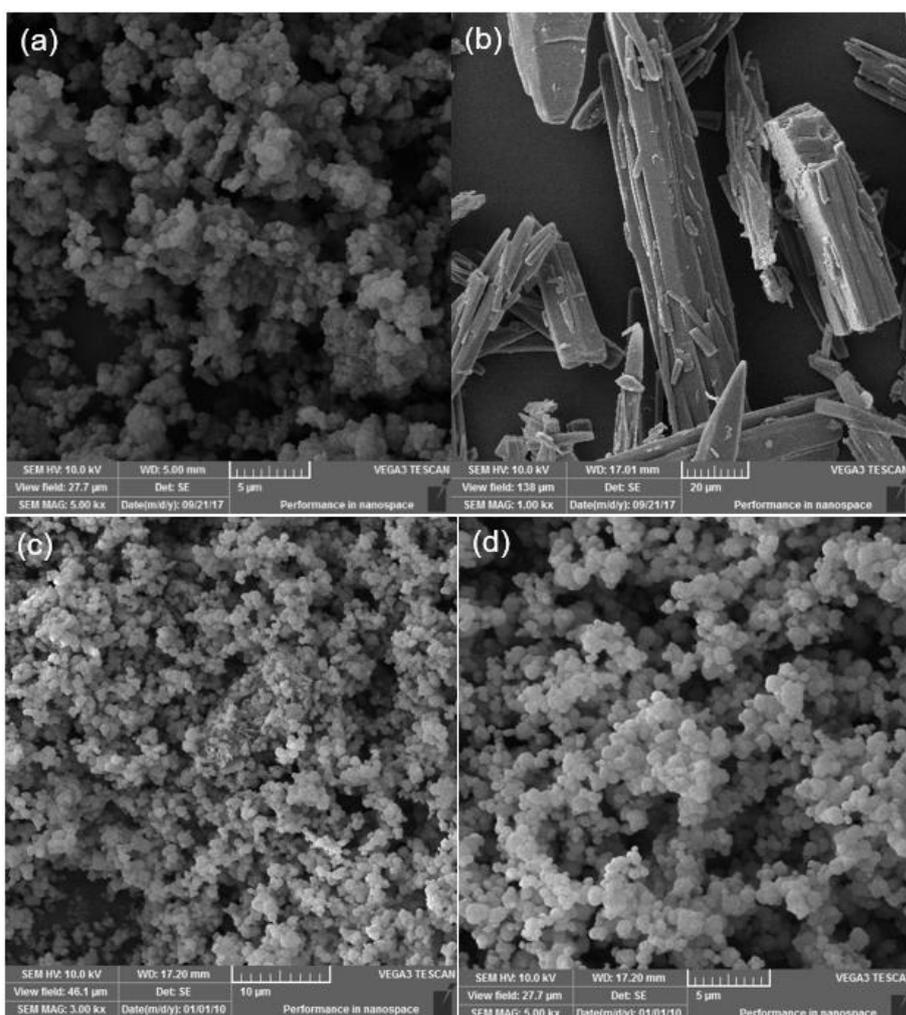


Fig.4. MEV da ZIF-8 (a- 5000x), ESC (b- 1000x) e ESC: ZIF-8 (c- 3000 x, d- 5000x).

3.2.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A escopoletina teve sua estrutura química confirmada por meio da espectroscopia de RMN de ^1H para controle e comparação com os dados do sistema. No espectro pode-se observar dois dupletos em δ_{H} de 6,26 e 7,6 ppm referentes aos hidrogênios H_4 e H_3 ; e três simpletos em δ_{H} de 6,92 e 6,85 referentes aos H_8 e H_5 ; e um simpleto em δ_{H} de 3,96 ppm referente ao grupo carboxila (Fig. 5).

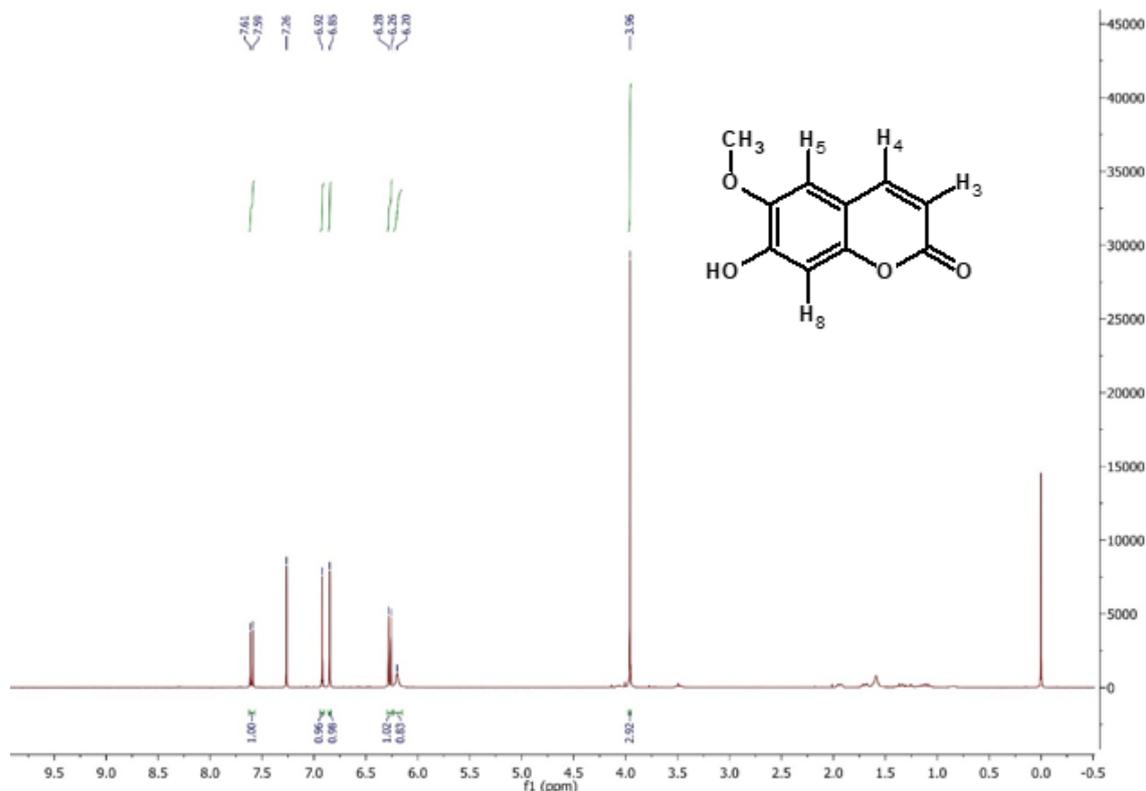


Fig. 5. Espectro de RMN de ^1H da ESC.

O ESC:ZIF-8 foi caracterizado por meio da espectroscopia de RMN de ^1H . Na figura abaixo observam-se picos característicos do 2-MIm, um simpleto em δ_{H} de 3,00 ppm referente a H_{B} e um duplete em δ_{H} de 7,10 ppm. Foi possível observar ainda os picos característicos de baixa intensidade da ESC. Neste caso, pode-se observar dois dupletos em δ_{H} de 6,2 e 7,9 ppm referentes aos hidrogênios H_4 e H_3 ; e dois simpletos em δ_{H} de 6,92 e 6,85 referentes aos H_8 e H_5 (Fig.6).

A baixa intensidade dos picos característicos da ESC estaria relacionada ao fato de que foi necessário utilizar um sistema de solvente diferente e acidificado para que a rede metalorgânica da ZIF-8 liberasse a ESC.

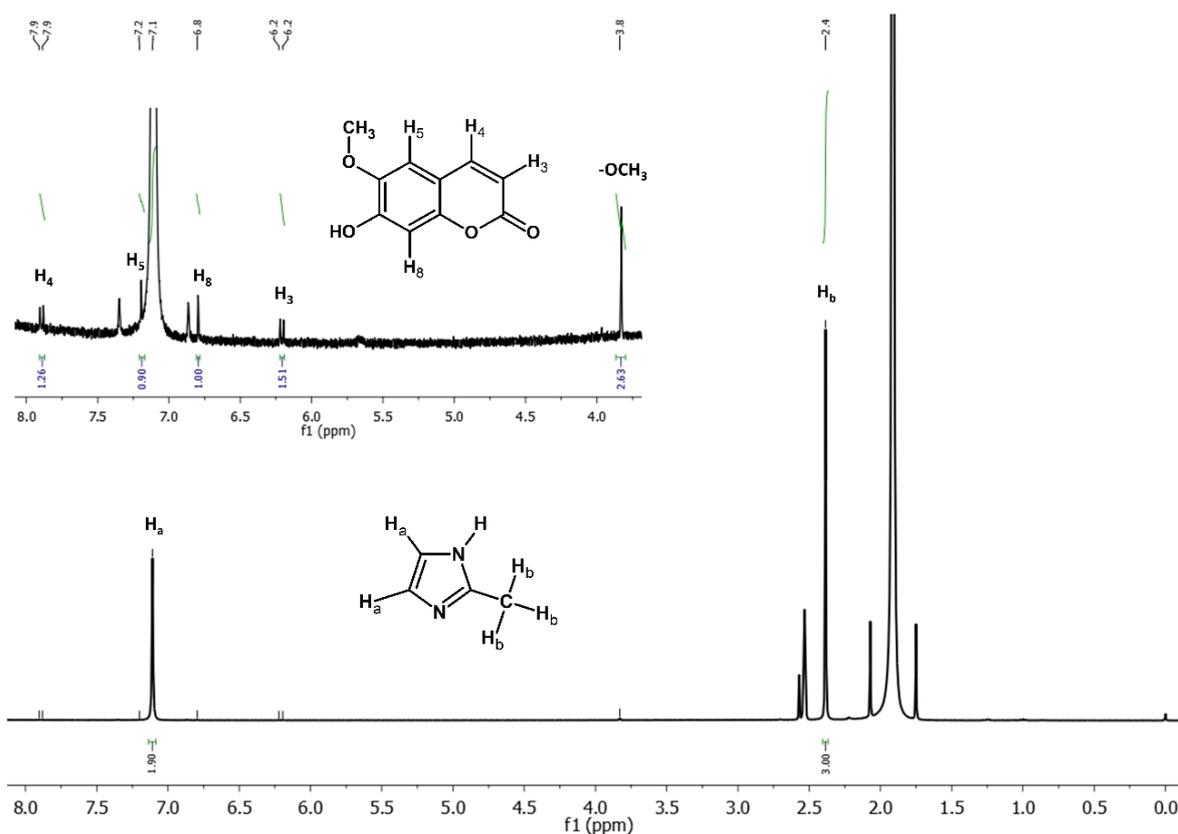


Fig. 6. Espectro de RMN de ¹H do ESC:ZIF-8.

3.2.4 Análise térmica

Na curva de TG da ESC (Fig. 7), evidenciou-se uma perda de massa de 0,02% entre 30 e 125° C resultante da perda de moléculas de água. Além disso, observou-se degradação térmica em um único evento, na faixa de temperatura entre 182,32 e 303° C, com perda de massa de 99,98% (Fig.8). Isso deve-se ao fato do evento fusão completa.

Na curva de TG do ZIF-8 (Fig.7), evidenciou-se uma perda de massa de 0,04 % na faixa de temperatura entre 30 e 125° C. Esse valor estaria relacionado ao fato de que moléculas de água foram perdidas tanto da cavidade quanto na superfície da ZIF-8 (AN et al., 2009). No intervalo de 437 a 648,36° C, foi evidenciada uma perda significativa de massa de 51,04%, relativa à degradação da porção orgânica da ZIF-8, o imidazolato. A partir da temperatura de 648,36° C não é observado nenhum outro evento térmico que caracterize perda percentual significativa de massa. Esses dados corroboram com os outros estudos nos quais verificou-se que a ZIF-8 apresenta estabilidade térmica por

volta de 400 °C (LIU et al., 2011; VASCONCELOS et al., 2012; PENG et al., 2019).

Na curva de TG do sistema ESC:ZIF-8 (Fig.7), evidenciou-se uma perda de massa de 5,5 % na faixa de temperatura entre 17 e 188° C. Esse valor estaria relacionado a perda de água adsorvida e presente no interior do sistema. Desse modo, esse dado sugere que há mais moléculas de água no sistema desenvolvido que na ZIF-8 pura, o que poderia dificultar a incorporação da ESC à rede metalorgânica. No intervalo de temperatura de 188 a 441° C não se observa nenhum evento térmico característico de degradação do fármaco, demonstrando com isso que a rede metalorgânica formada pela ZIF-8 exerceu o papel de protetor térmico da ESC. Já no intervalo de temperatura de 441,27 a 600° C foi evidenciado uma perda de massa de 17,66%, fato este que está relacionado a decomposição térmica da parte inorgânica da ZIF-8, neste caso decomposição térmica leva a formação de óxido de zinco (PENG et al., 2019).

Esses dados corroboram com Kaur e colaboradores (2017), no qual os autores não observaram grandes diferenças entre as curvas de TG do sistema desenvolvido *in situ* comparando-se com a ZIF-8. Corroboram ainda com Tiwari e colaboradores (2017) no qual não se observa diferença entre a curva de TG do sistema desenvolvido com curcumina e ZIF-8. Desse modo, pode-se constatar que a estabilidade térmica da rede metalorgânica da ZIF-8 não é afetada com a incorporação da ESC.

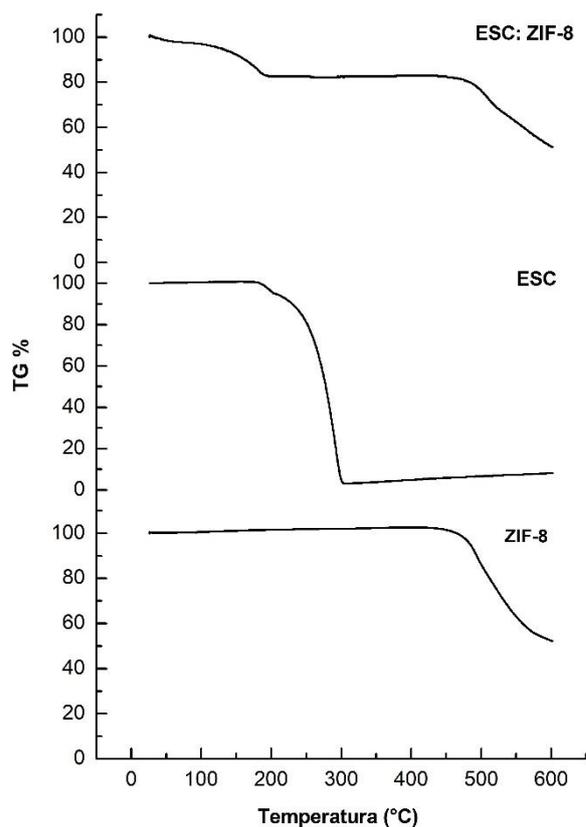


Fig. 7. Curvas de TG do ESC:ZIF-8, ESC e ZIF-8.

A curva de DSC da ESC (Fig.8) apresentou pico endotérmico intenso e bem definido, na faixa de temperatura entre 190,64- 208,67° C ($T_{pico} = 203,65$ °C) ($\Delta H = 192,02$ mJ). Já na curva de DSC da ZIF-8 (Fig.8) não foi observado picos na faixa de temperatura analisada característico desta molécula e confirmando sua estabilidade térmica. Esse dado corrobora com outros estudos da área (FERRAZ et al., 2016; KAUR et al., 2017; PENG et al., 2019). Ta e colaboradores (2018) fizeram análises térmicas e comparou-se as curvas de DSC da nano-ZIF-8 e a Basolite® Z1 200, e foi constatado que até 550°C não foi observado picos.

A curva de DSC do sistema ESC:ZIF-8 (Fig.8) não apresentou picos caracterizasse qualquer evento térmico, assim como a ZIF-8 desenvolvida nas mesmas. Esse dado corrobora com os dados de TG nos quais não foram observadas diferenças entre o sistema e a ZIF-8. Esse dado mais uma vez corrobora com Kaur e colaboradores (2017), no qual confirma a estabilidade térmica do sistema e que a incorporação da ESC não interfere neste parâmetro. Outro ponto importante que se deve levar em consideração é o fato de que era

provável que não houvesse diferença entre as análises térmicas da ZIF-8 e do sistema considerando-se o método utilizado no desenvolvimento.

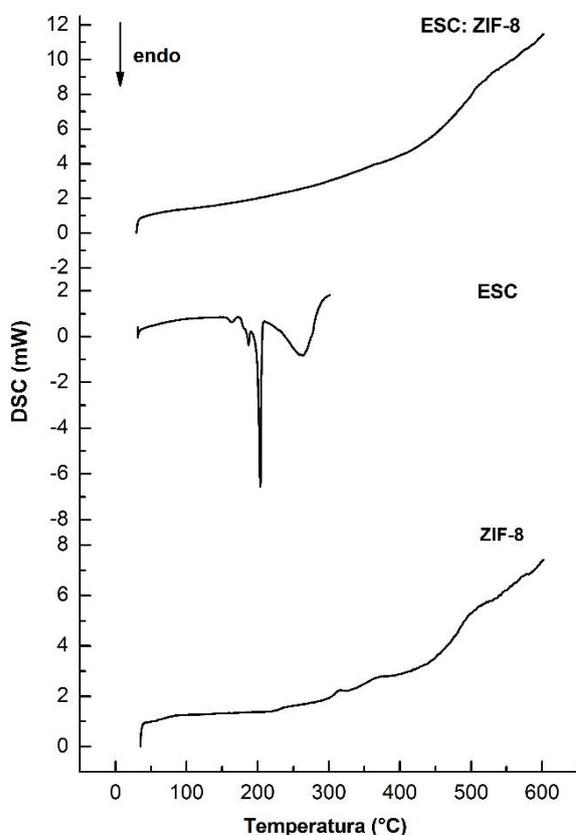


Fig. 8. Curvas DSC do ESC:ZIF-8, ESC e ZIF-8.

3.2.5 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

O espectro da ZIF-8 (Fig. 9) apresenta estiramentos característicos deste tipo de MOF, quando se leva em consideração as bandas típicas de C-H (aromático), C=C e C-N. As bandas oriundas das vibrações de estiramento C-H, encontra-se em 3130 cm^{-1} ; para C=C, encontra-se em 1670 cm^{-1} ; para C-N, foi observado na banda intensa em 1297 cm^{-1} , assim como outras bandas entre 1100 e 1400 cm^{-1} que são característicos desse tipo de ligação. Observou-se também bandas de estiramento em 2962 cm^{-1} referente a deformação axial assimétrica, em 2925 cm^{-1} referente ao estiramento de C-H do anel imidazol e

1580 cm^{-1} referente a C=N. Esses dados, corroboram com os dados da literatura (PENG et al., 2019; FERRAZ et al., 2016; PARK et al., 2006).

O espectro da ESC (Fig. 9) apresenta estiramentos característicos da molécula, quando se leva em consideração as bandas típicas de O-H, C-H alifático e C=O do anel lactona. Essas bandas foram observadas respectivamente em 3334 cm^{-1} , 2990 cm^{-1} e 1701 cm^{-1} . Esses dados, corroboram com os dados da literatura (CHENG, 2012).

A análise do espectro do ESC:ZIF-8 apresentou bandas características da ZIF-8 pura. Analisando-se o espectro do ESC:ZIF-8 foi observado que em: 3132 cm^{-1} uma banda referente à ligação de C-H (aromáticos), 2930 cm^{-1} C-H (alifáticos) esta banda é referente ao imidazol foi mais larga que a presente na ZIF-8. Isso deve-se ao fato de que novas ligações desse tipo foram formadas com a incorporação da ESC à rede da ZIF-8.

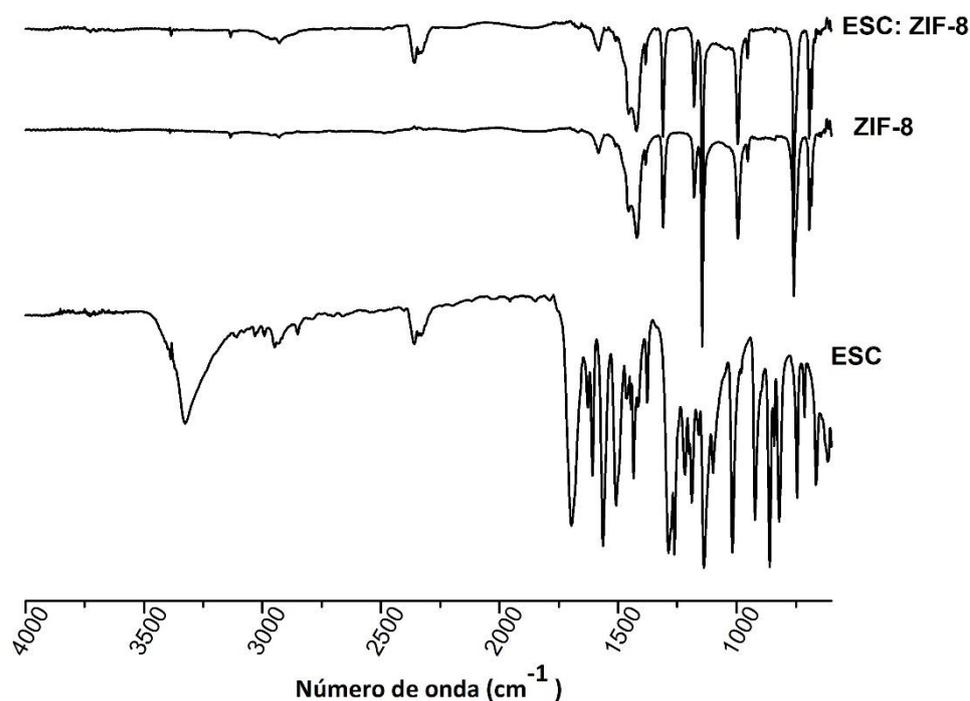


Fig. 9. Espectros de FTIR do ESC: ZIF-8, ZIF-8 e ESC.

3.2.6 Testes de liberação *in vitro* da ESC

Neste estudo utilizou-se a condição non-sink para avaliação do percentual de liberação da ESC pura e a partir do sistema. Essa condição experimental foi utilizando considerando que, a correlação *in vitro/in vivo* sob condição *sink* pode ser considerada um problema, já que a capacidade de supersaturação das substâncias estudadas, que também pode acontecer *in vivo*, pode não ser visualizada sob estas condições. Desse modo, diferentes estudos utilizam a condição *non-sink* para visualizar etapas de supersaturação, além de nucleação e cristalização de fármacos, processos que ocorrem comumente no trato gastrointestinal (SUN et al., 2012; BEVERNAGE et al., 2012; BEVERNAGE et al., 2013).

Os perfis de liberação da ESC nos pH 4,5 e 6,5 são exibidos na figura 10 como percentual de ESC liberada nos intervalos de tempo pré-determinados. No pH de 4,5 observa-se que na primeira hora ocorre o efeito *burst*, rápida liberação, chegando a $68,21 \pm 2,89\%$ de ESC liberada. A partir de então há uma liberação gradual, mas ao final do experimento atinge-se o platô, sugerindo o alcance de saturação do meio com $65,30 \pm 0,58\%$ de ESC liberada. Já no pH de 6,5 há um perfil de liberação semelhante chegando a com $74,38 \pm 2,79\%$ e ao final do experimento atingiu-se o platô com $73,89 \pm 2,85\%$ de ESC liberada. Desse modo, tanto no pH 4,5 quanto no de 6,5 o modelo farmacocinético mais adequado ao perfil de liberação foi o de Korsmeyer-Peppas.

A ESC foi considerada em estudos anteriores uma substância de baixa solubilidade em água (ZENG et al., 2017), fato este confirmado por testes no qual foi obtido um valor de $62 \mu\text{g/mL}$. Desse modo, observa-se que a baixa solubilidade em água influenciou no seu perfil de liberação, pois mesmo após 7 horas experimentais de análise não foi observado uma liberação superior a 80%.

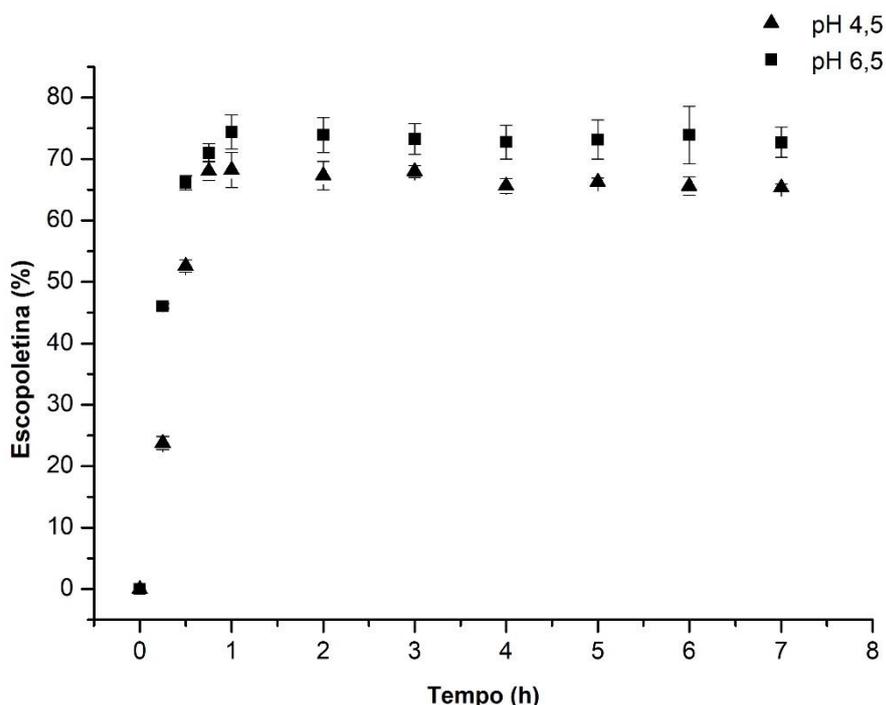


Fig.10. Perfis de liberação *in vitro* de ESC livre.

Os testes de liberação do sistema levaram-se em consideração a taxa de carregamento obtida que foi 22,5% de ESC incorporada à rede metalorgânica. Na Figura 11, tem-se os perfis de liberação da ESC a partir do sistema desenvolvido nos pH 4,5 e 6,5. Observa-se um perfil de liberação diferente do observado para ESC pura, nos dois pH ocorreu uma redução do efeito *burst* de liberação. Desse modo, no pH de 4,5 a liberação ocorreu de maneira mais prolongada, na primeira hora de experimento ocorreu liberação de apenas 40,14 ± 2,96%. A liberação prolongada é observada durante todo o teste e atinge o platô com 7 horas de experimento com uma liberação final de 74,85 ± 0,74%.

No pH de 6,5 a liberação ocorreu também de maneira mais prolongada, mas com um percentual de ESC bem menor quando comparado ao pH anterior, na primeira hora com 11,16 ± 0,74% e ao final liberou apenas 31,24 ± 3,32%. Então a fim de observar o perfil de liberação por mais tempo no pH de 6,5 avaliou-se o teste por 7 dias e obteve-se ao final uma liberação 81,98 ± 1,63% (Fig. 12). Assim, fica evidente que o sistema é capaz de prolongar a liberação do ESC, em condições *non-sink*, como as situações observadas durante a absorção de fármacos por via oral.

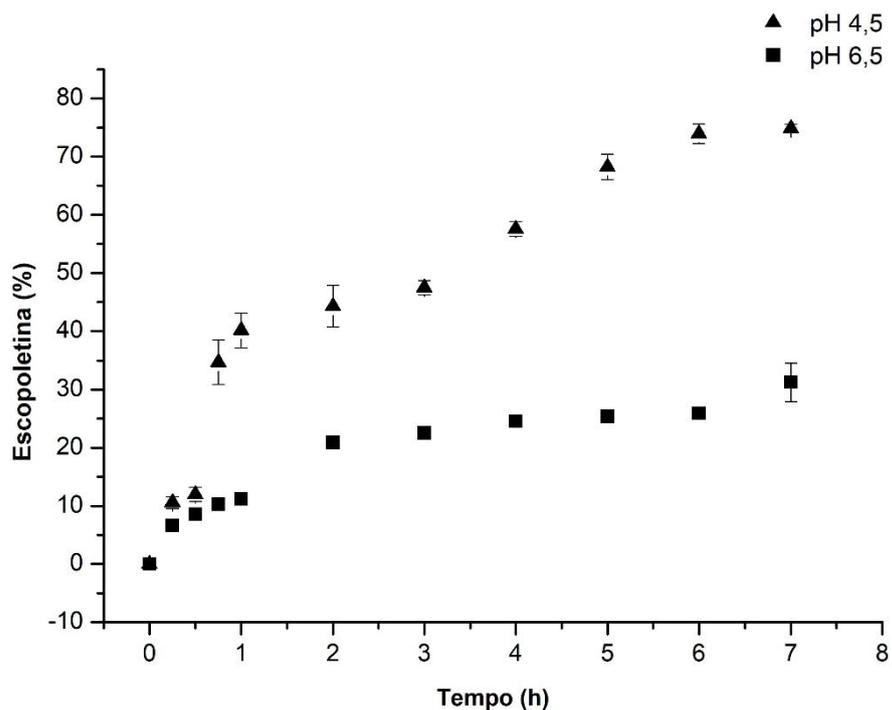


Fig.11. Perfis de liberação *in vitro* do ESC:ZIF-8.

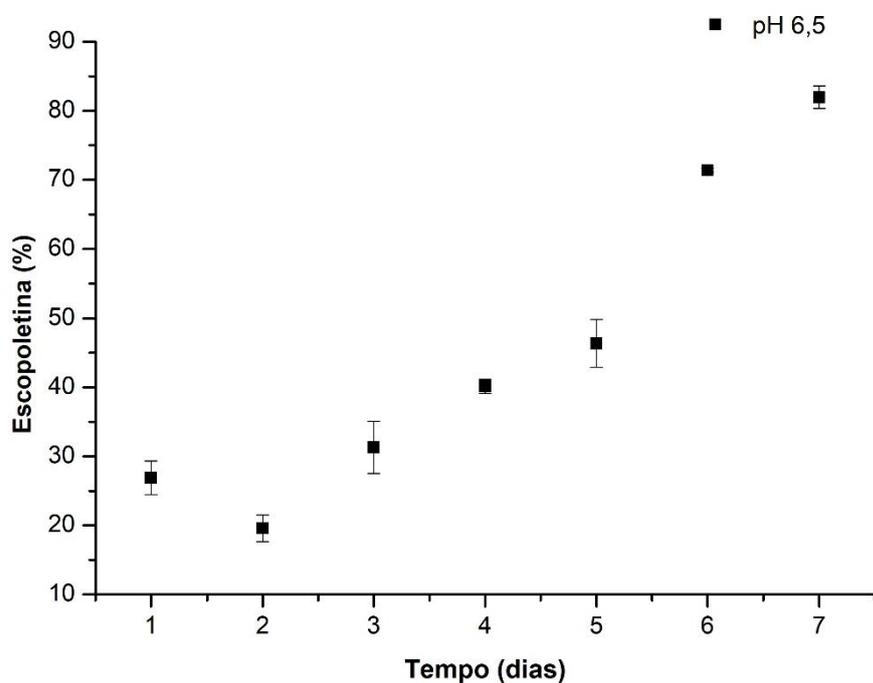


Fig.12. Perfil de liberação *in vitro* do ESC:ZIF-8 (pH 6,5).

A partir dos dados apresentados e dá proposta de pesquisa fica evidente que houve uma liberação pH-dependente da ESC a partir da ZIF-8. Observou-

se que no pH de 4,5 a liberação ocorreu de maneira rápida se comparado ao pH de 6,5, isto ocorre devido a dissociação da rede metalorgânica da ZIF-8. Esses dados corroboram com outros estudos que utilizam a ZIF-8 para desenvolvimento de DDS (FERRAZ et al., 2016; KAUR et al., 2017; LIÉDANA et al., 2012; LI et al., 2018). Outro importante estudo fez a encapsulação da curcumina na rede da ZIF-8 (TIWARI et al., 2017) e observou um perfil de liberação diferente quando comparado o pH 5 e 7,4, com uma liberação bem maior de curcumina a partir do sistema no pH mais ácido, semelhante ao que observamos nesta pesquisa.

Os modelos farmacocinéticos foram utilizados para determinar o perfil de liberação da ESC isolada e o sistema ESC:ZIF-8. Os valores de R^2 ajustado evidenciaram a modulação da liberação desta cumarina comparando-se ao sistema. Para a ESC isolada tanto no pH de 4,5 quanto de 6,5 o modelo que melhor se ajustou foi o de Korsmeyer-Peppas. Já com relação ao sistema nos dois pH o melhor modelo foi o de Peppas-Sahlin. O modelo Peppas-Sahlin tem como característica representar formulações prolongadas (PEPPAS e NARASIMHAN, 2014).

Desse modo, fica evidente uma modificação no perfil de liberação da ESC quando esta encontra-se incorporada na rede metalorgânica caracterizando-se um sistema de liberação do tipo prolongada.

Tabela 1

R^2 ajustados obtidos a partir dos modelos cinéticos obtido do ensaio de liberação *in vitro* em condições *non sink* da ESC e sistema ESC:ZIF-8 em diferentes pH (4,5 e 6,5).

Modelos	ESC		ESC:ZIF-8		ESC:ZIF-8 (7 dias)
	pH 4,5	pH 6,5	pH 4,5	pH 6,5	pH 6,5
Ordem zero	0,5514	0,5631	0,9206	0,6330	0,8757
Primeira ordem	0,8136	0,7460	0,9609	0,7137	0,8983
Higuchi	0,7232	0,7292	0,9753	0,9841	0,8931
Korsmeyer-Peppas	0,9876	0,9983	0,9471	0,9854	0,9087

Peppas-Sahlin	0,9527	0,9444	0,9760	0,9866	0,9343
Hixson-Crowell	0,7330	0,6990	0,9534	0,6890	0,9028
Hopfenberg	0,7354	0,6991	0,9534	0,6545	0,9411

3. 3 Avaliação da atividade expectorante da ESC e do ESC:ZIF-8

Até o momento não há estudos relatados quanto à avaliação da atividade expectorante da escopoletina isolada. Por isso, se fez de fundamental importância a investigação dessa atividade considerando que há muitas pesquisas nas quais comprovam-se a ação de compostos cumarínicos sobre o sistema respiratório isolados e presentes em plantas medicinais. Por exemplo, Moura e colaboradores (2002) avaliaram a ação broncodilatadora da *Mikania glomerata* e este foi atribuído a presença de cumarinas.

Com relação as atividades atribuídas à ESC que incentivaram este estudo têm-se a atividade anti-inflamatória (BISSONNETTE et al., 2009; YANG et al., 2015; JAMUNA et al., 2015; NASCIMENTO et al., 2016; LEEMA e TAMIZHSELVI, 2018; OSMAN et al., 2017; OSMAN et al., 2019). Outro estudo, demonstrou que o segundo maior constituinte do suco da *Morinda citrifolia* L. (noni) é a ESC e que este suco apresentou atividade anti-inflamatória crônica e espamolítica (DUSSOSSOY et al., 2016).

No gráfico abaixo (Fig. 13) observa-se a atividade expectorante da ESC nas doses de 1, 10, 30 e 100 mg/kg. O gráfico é a representação dos respectivos valores de média \pm erro padrão da média em $\mu\text{g/mL}$ de vermelho de fenol: Veículo ($2,08 \pm 0,82$), ESC 1 mg/kg ($2,46 \pm 0,29$), ESC 10 mg/kg ($2,14 \pm 0,49$), ESC 30 mg/kg ($5,78 \pm 0,57$), ESC 100 mg/kg ($4,95 \pm 0,45$), ESC:ZIF-8 10 mg/kg ($2,98 \pm 0,23$) e guaifenesina 100 mg/kg ($4,41 \pm 0,72$). A partir desses dados verificou-se que apenas as doses de 30 e 100 mg/kg apresentaram atividade expectorante significativa quando comparada ao veículo. Pode-se observar ainda que a ESC na dose de 30 mg/kg tem ação expectorante significativamente melhor que a guaifenesina. Esse fármaco já é conhecido por sua atividade expectorante e utilizado na forma de xarope (BALSAMO et al., 2010; MENEZES et al., 2019).

Neste gráfico, tem-se ainda a avaliação da atividade expectorante do sistema ESC:ZIF-8 e foi observado que para as condições experimentais utilizadas neste caso, não foi farmacotecnicamente possível preparar a amostra do sistema levando-se em consideração a taxa de carregamento. Portanto, considerando que há apenas 22,5% de ESC presente na concentração utilizada e que isso representa por dose 2,25 mg/kg administrada. Desse modo, pode-se evidenciar que mesmo em concentração baixa o sistema apresentou atividade expectorante, porém não significativa.

Outro fato, relevante é que se essa dose fosse para um humano de peso corpóreo de 60 kg isso representaria de acordo com os estudos de Nair e Jacob (2016) uma dose de 27,675 mg/kg, que pode ser considerada uma dose baixa tendo em vista que os medicamentos já utilizados como expectorantes tais como, guaifenesina (xarope) é utilizado na concentração de 13,3 mg/mL (163,59 mg/kg). Esses dados demonstram que a escopoletina tem uma atividade expectorante equivalente a guaifenesina.

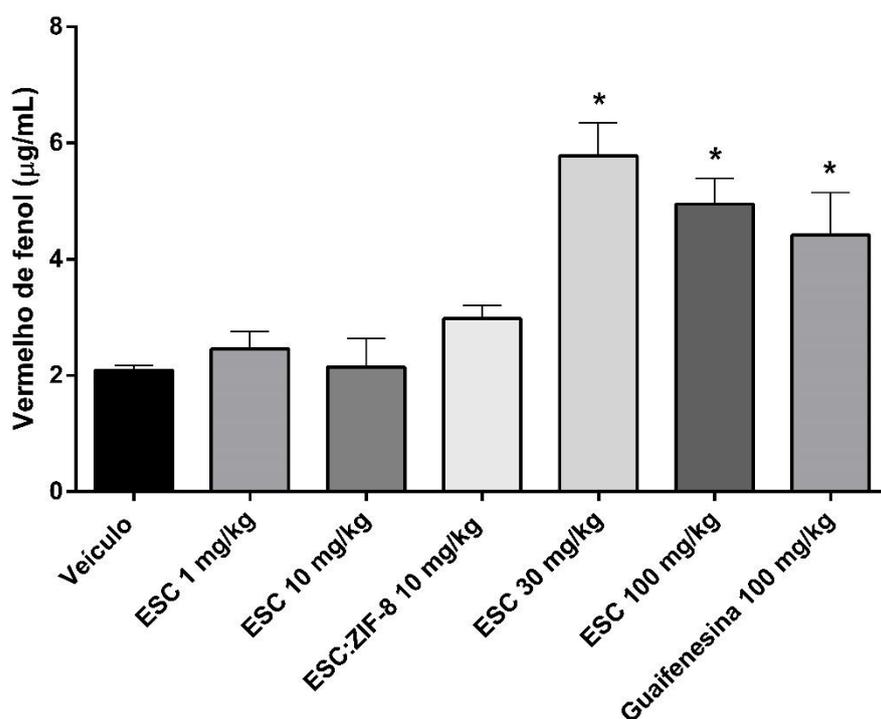


Fig. 13. Atividade expectorante da ESC, ESC:ZIF-8, Veículo e guaifenesina (n=6). Dados são apresentados como média \pm erro padrão da média (*p < 0,05).

4 CONCLUSÃO

Esse trabalho é a primeira pesquisa, que se tem conhecimento, na qual foi desenvolvido um novo *Drug Delivery System* contendo escopoletina e ZIF-8 como carreador. Foi possível obter o sistema ESC:ZIF-8 em condições *in situ* por um método rápido e eficiente assim como, caracterizá-lo utilizando as técnicas DRX, MEV, RMN, FTIR, TG, DSC e CLAE-DAD. Por meio da combinação dos resultados da caracterização foi possível confirmar a incorporação da ESC na rede da ZIF-8. Outro ponto relevante é que o sistema apresentou uma taxa de carregamento de ESC satisfatória. Além disso, o sistema ESC:ZIF-8 apresentou um perfil de liberação prolongada pH dependente.

Este estudo apresentou ainda a atividade expectorante da ESC, mostrando que esta cumarina tem potencial terapêutico. No entanto, o sistema desenvolvido não apresentou efeito quando comparado com a ESC livre, sob as mesmas condições experimentais. Ainda sim, o DDS ESC:ZIF-8 tem um grande potencial biológico, exigindo estudos mais detalhados a esse respeito.

REFERÊNCIAS

AN, J.; GEIB, S. J.; ROSI, N. L. Cation-Triggered Drug Release from a Porous Zinc-Adeninate Metal-Organic Framework. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 24, p. 8376–8377, 2009.

BALSAMO, R.; LANATA, L.; EGAN, C. G. Mucoactive drugs. **European Respiratory Review**, v. 19, n. 116, p. 127–133, 2010.

BASU, M. et al. Effect of scopoletin on monoamine oxidases and brain amines. **Neurochemistry International**, v. 93, p. 113–117, 2016.

BEVERNAGE, J. et al. Evaluation of gastrointestinal drug supersaturation and precipitation: Strategies and issues. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, n. 1, p. 25–35, 2013.

BEVERNAGE, J. et al. Supersaturation in human gastric fluids. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 81, n. 1, p. 184–189, 2012.

BISSONNETTE, E. Y. et al. Coumarinic derivatives show anti-inflammatory effects on alveolar macrophages, but their anti-elastase activity is essential to reduce lung inflammation *in vivo*. **International Immunopharmacology**, v. 9, n. 1, p. 49–54, 2009.

CHENG, Z. Studies on the interaction between scopoletin and two serum albumins by spectroscopic methods. **Journal of Luminescence**, v. 132, n. 10, p. 2719–2729, 2012.

BRASIL. Resolução RDC nº 31 de 11 de agosto de 2010. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, DF, 11 agosto, 2010. Seção 2, p.04.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**, 6. ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 2019. p. 01-874. v. 1. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/farmacopeia>>. Acesso em: 12 set. 2019

DE MOURA, R. S. et al. Bronchodilator activity of *Mikania glomerata* Sprengel on human bronchi and guinea-pig trachea. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 54, n. 2, p. 249–256, 2002.

DUSSOSSOY, E. et al. Pulmonary anti-inflammatory effects and spasmolytic properties of Costa Rican noni juice (*Morinda citrifolia* L.). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 192, p. 264–272, 2016.

GARCÍA-ARIETA, A. Interactions between active pharmaceutical ingredients and excipients affecting bioavailability: Impact on bioequivalence. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 65, p. 89–97, 2014.

FERRAZ, L.R.M., et al. **Formulações farmacêuticas contendo associações de benznidazol e MOF's para obtenção tecnológica de sistemas de drug delivery**. Depositante: Universidade Federal do Pernambuco. Procurador: Instituto nacional de propriedade industrial- INPI. BR n. 1020160034086. Depósito: 18 de fevereiro de 2016.

HOOP, M. et al. Biocompatibility characteristics of the metal organic framework ZIF-8 for therapeutical applications. **Applied Materials Today**, v. 11, p. 13–21, 2018.

JAMUNA, S. et al. Confertin and scopoletin from leaf and root extracts of *Hypochoeris radicata* have anti-inflammatory and antioxidant activities. **Industrial Crops and Products**, v. 70, p. 221–230, 2015.

JANG, J. H.; PARK, J. E.; HAN, J. S. Scopoletin inhibits α -glucosidase *in vitro* and alleviates postprandial hyperglycemia in mice with diabetes. **European Journal of Pharmacology**, v. 834, p. 152–156, 2018.

JIAO, L. et al. Metal–organic frameworks: Structures and functional applications. **Materials Today**, v. 27, p. 43–68, 2018.

KAUR, H. et al. Synthesis and characterization of ZIF-8 nanoparticles for controlled release of 6-mercaptopurine drug. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 41, p. 106–112, 2017.

KIM, D.-S. et al. Scopoletin Stimulates Melanogenesis via cAMP/PKA Pathway and Partially p38 Activation. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 40, n. 12, p. 2068–2074, 2017.

LEEMA, G.; TAMIZHSELVI, R. Protective Effect of Scopoletin Against Cerulein-Induced Acute Pancreatitis and Associated Lung Injury in Mice. **Pancreas**, v. 47, n. 5, p. 577–585, 2018.

LI, C. et al. Effect of Scopoletin on Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Human Prostate Cancer Cells In vitro. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 4, p. 611, 2015.

LI, L. et al. Synthesis, in vitro and in vivo antitumor activity of scopoletin-cinnamic acid hybrids. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 93, p. 300–307, 2015.

LI, Y. et al. Biocompatible surface modification of nano-scale zeolitic imidazolate frameworks for enhanced drug delivery. **RSC Advances**, v. 8, n. 42, p. 23623–23628, 2018.

LIÉDANA, N. et al. CAF@ZIF-8: One-Step Encapsulation of Caffeine in MOF. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 4, n. 9, p. 5016–5021, 2012.

LIU, S. et al. Zeolitic imidazolate framework-8 as a luminescent material for the sensing of metal ions and small molecules. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, n. 18, p. 6649, 2011.

MENEZES, P. M. N. et al. Analytical and pharmacological validation of the quantification of phenol red in a mouse model: An optimized method to evaluate expectorant drugs. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 98, p. 106586, 2019.

NAIR, A.; JACOB, S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. **Journal of Basic and Clinical Pharmacy**, v. 7, n. 2, p. 27, 2016.

NAM, H.; KIM, M.M. Scopoletin has a potential activity for anti-aging via autophagy in human lung fibroblasts. **Phytomedicine**, v. 22, n. 3, p. 362–368, 2015.

PARK, K. S. et al. Exceptional chemical and thermal stability of zeolitic imidazolate frameworks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 103, n. 27, p. 10186–10191, 2006.

PENG, J.; ZHANG, H.; YAN, Y. Preparation and characterization of a novel ZIF-8 membrane over high voidage paper-like stainless steel fibers. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 269, p. 203–211, 2019.

PEPPAS, N. A.; NARASIMHAN, B. Mathematical models in drug delivery: How modeling has shaped the way we design new drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, v. 190, p. 75–81, 2014.

NASCIMENTO, P.S. M. V. et al. Inhibition of the NF- κ B and p38 MAPK pathways by scopoletin reduce the inflammation caused by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 38, n. 5, p. 344–352, 2016.

SEO, E.-J. et al. Pharmacogenomics of Scopoletin in Tumor Cells. **Molecules**, v. 21, n. 4, p. 496, 15 abr. 2016.

SUN, C.-Y. et al. Metal-organic frameworks as potential drug delivery systems. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 10, n. 1, p. 89–101, 2013.

SUN, D. D.; JU, T. R.; LEE, P. I. Enhanced kinetic solubility profiles of indomethacin amorphous solid dispersions in poly(2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 81, n. 1, p. 149–158, 2012.

TA, D. N. et al. Preparation of nano-ZIF-8 in methanol with high yield. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 96, n. 7, p. 1518–1531, 2018.

TABANA, Y. M. et al. Scopoletin, an active principle of tree tobacco (*Nicotiana glauca*) inhibits human tumor vascularization in xenograft models and modulates ERK1, VEGF-A, and FGF-2 in computer model. **Microvascular Research**, v. 107, p. 17–33, 2016.

TANG, L. et al. Coordination polymer nanocapsules prepared using metal–organic framework templates for pH-responsive drug delivery. **Nanotechnology**, v. 28, n. 27, p. 275601, 2017.

TIAN, Z.; YAO, X.; ZHU, Y. Simple synthesis of multifunctional zeolitic imidazolate frameworks-8/graphene oxide nanocrystals with controlled drug release and photothermal effect. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 237, p. 160–167, 2017.

TIWARI, A. et al. Curcumin encapsulated zeolitic imidazolate frameworks as stimuli responsive drug delivery system and their interaction with biomimetic environment. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 12598, 2017.

VASCONCELOS, I. B. et al. Cytotoxicity and slow release of the anti-cancer drug doxorubicin from ZIF-8. **RSC Advances**, v. 2, n. 25, p. 9437, 2012.

VIEIRA, A. C. C. et al. Multicomponent systems with cyclodextrins and hydrophilic polymers for the delivery of Efavirenz. **Carbohydrate Polymers**, v. 130, p. 133–140, 2015.

OSMAN, W.N.W. et al. Epicatechin and scopoletin rich *Morinda citrifolia* (Noni) leaf extract supplementation, mitigated Osteoarthritis via anti-inflammatory, anti-oxidative, and anti-protease pathways. **Journal of Food Biochemistry**, v. 43, n. 3, p. e12755, 2019.

OSMAN, W.N.W.; LAU, S. F.; MOHAMED, S. Scopoletin-standardized *Morinda elliptica* leaf extract suppressed inflammation and cartilage degradation to alleviate osteoarthritis: A preclinical study. **Phytotherapy Research**, v. 31, n. 12, p. 1954–1961, 2017.

WANG, L. et al. Simultaneous determination of umbelliferone and scopoletin in Tibetan medicine *Saussurea laniceps* and traditional Chinese medicine *Radix angelicae pubescentis* using excitation-emission matrix fluorescence coupled with second-order calibration method. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 170, p. 104–110, jan. 2017.

YANG, I. J.; LEE, D. U.; SHIN, H. M. Anti-inflammatory and antioxidant effects of coumarins isolated from *Foeniculum vulgare* in lipopolysaccharide-stimulated macrophages and 12- O -tetradecanoylphorbol-13-acetate-stimulated mice. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 37, n. 3, p. 308–317, 2015.

ZENG, YING-CHUN. et al. Soluplus micelles for improving the oral bioavailability of scopoletin and their hypouricemic effect in vivo. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 38, n. 3, p. 424–433, 2017.

ZENG, YINGCHUN. et al. Validated LC-MS/MS Method for the Determination of Scopoletin in Rat Plasma and Its Application to Pharmacokinetic Studies. **Molecules**, v. 20, n. 10, p. 18988–19001, 2015.

ZHANG, F. et al. Scopoletin Suppresses Activation of Dendritic Cells and Pathogenesis of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Inhibiting NF- κ B Signaling. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, 2019.

ZHANG, H. et al. Improving hydrostability of ZIF-8 membranes via surface ligand exchange. **Journal of Membrane Science**, v. 532, p. 1–8, 2017.

ZHANG, Y. et al. DDSolver: An Add-In Program for Modeling and Comparison of Drug Dissolution Profiles. **The AAPS Journal**, v. 12, n. 3, p. 263–271, 2010.

**CAPÍTULO 3- ESTUDO DE CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO
FARMACOLÓGICA DA CUMARINA**

Artigo será submetido na revista: Pharmaceutical Development and Technology

ESTUDO DE CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DA CUMARINA

RESUMO

Cumarina (cromen-2-ona, CM) caracteriza-se quimicamente como um composto formado pela fusão do anel benzeno e do α -pirona sendo encontrada em algumas plantas medicinais. Este composto apresenta dados que demonstram suas atividades anti-inflamatória, antioxidante, citotoxicidade, anticâncer e broncodilatadora. O objetivo deste estudo é a caracterização da CM e avaliação das atividades farmacológicas expectorante e antitussígena *in vivo*. Para caracterização utilizou-se as técnicas de difração de raios-X (DRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV), termogravimetria (TG), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). A quantificação de CM em solução por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à arranjo de diodo (CLAE-DAD) e o perfil de liberação de CM foi comparado em condições non-sink nos pHs 2,0; 4,5 e 6,86. A partir das técnicas utilizadas confirmou-se a identidade da CM assim como, sua cristalinidade. No TG observou-se apenas um evento térmico 113 e 215° C e DSC um pico de fusão em 67,65° C. FTIR apresenta as bandas características da CM. O teste de liberação demonstrou que a CM está mais dissolvida em pH 6,86. O modelo cinético mais adequado para CM pura nos pHs 2,0 e 4,5 foi o modelo Korsmeyer-Peppas e de 6,86 foi Peppas-Sahlin. Embora não tenha apresentado atividade expectorante, os resultados demonstram seu potencial antitussígeno na dose de 100 mg/kg.

Palavras-chave: cumarinas, 1,2 benzopirona, expectorante, antitussígena,

1 INTRODUÇÃO

A cumarina (CM) (cromen-2-ona, $C_9H_6O_2$) caracteriza-se quimicamente como um composto formado pela fusão do anel benzeno e do α -pirona (α -benzopirona). Esse composto está presente em uma grande diversidade de plantas e frutas, tais como: como guaco (*Mikania glomerata*), emburana (*Amburana cearenses*), agrião (*Nasturtium officinale*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*), morango (*Fragaria* spp), damasco (*Prunus armeniaca*) e cereja (*Cerasus*) (RODRIGUES et al., 2008). Além disso, vale ressaltar que é o marcador químico da *Mikania glomerata* (BERTOLDI et al., 2016) e constituinte bioativo da *Phymatodes scolopendria* (RAMANITRAHASIMBOLA et al., 2005). De maneira geral há muitas atividades farmacológicas atribuídas às cumarinas tais como, anticâncer, anti-inflamatório, anticonvulsivante, antimicrobiano, inibidor da monoaminaoxidase e antioxidante (SRIKRISHNA et al., 2018).

Algumas dessas atividades estão relacionadas especificamente à cumarina por exemplo, no estudo de Baskaran e colaboradores (2012) foi avaliado o potencial quimiopreventivo em modelo de câncer bucal. Este resultado estaria relacionado a seu potencial peroxidativo anti-lipídico e efeito modulador sobre agentes cancerígenos. Outros trabalhos destacam também a atividade anticâncer (KAUR et al., 2015; WANG et al., 2020). Como um dos principais constituintes da *Mikania laevigata* e *Mikania glomerata* a cumarina corrobora para atividade anti-inflamatória destas espécies (PASQUA et al., 2019) e citotóxica (RUFATTO et al., 2012). Outro estudo interessante é o de Ramanitrahassimbola e colaboradores (2005), estes autores isolaram a cumarina da *Phymatodes scolopendria* e descreveram sua atividade broncodilatadora em modelo animal. Esse estudo assim como outros estimulam o conhecimento acerca de outras atividades da cumarina no sistema respiratório.

Considerando as atividades farmacológicas da CM já evidenciadas na literatura e a escassez de trabalhos relevantes quanto às suas características físico-químicas, esta pesquisa propõe um estudo detalhado de caracterização físico-química e avaliação da atividade expectorante e antitussígena.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

A cumarina (CM) (CAS:91-64-5, Lote nº SLBW8136) foi obtida da Sigma-Aldrich® com pureza $\geq 99\%$ declarada pelo fabricante. Esta substância apresenta-se como pó branco e de aspecto cristalino.

2.2 Caracterização da cumarina

2.2.1 Difractometria de Raios-X (DRX)

Os padrões de difração das amostras foram obtidos usando um difratômetro de raios X Shimadzu® (modelo XRD 7000), a emissão utilizada foi a de cobre a uma velocidade de varredura de $1,2^\circ \cdot \text{min}^{-1}$, na faixa do ângulo 2θ de $5^\circ - 45^\circ$.

2.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Nas análises por MEV as amostras foram dispersas em fita carbono fixadas no suporte (*stub*). Em seguida, foram metalizadas com ouro atômico em um metalizador Quorum modelo Q150R ES com uma corrente de 15 mA por 5 minutos com um *tooling fator* de 2,30. As amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura Vega3 SEM da Tescan acoplado à um sistema de análise por espectroscopia de raios-X por energia dispersiva (EDS).

2.2.3 Análise térmica

Para análises térmicas foram utilizadas as técnicas de termogravimetria (TG) e calorimetria diferencial exploratória (DSC). Para as análises de TG as amostras foram preparadas utilizando uma termobalança Shimadzu® (modelo TGA Q60) em atmosfera de nitrogênio com fluxo de $100 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Para tal, foi

utilizado cerca de 5 mg de cada amostra acondicionada em cadinho de platina e submetido a análise na faixa de temperatura de 25 a 600° C com uma razão de aquecimento de 10° C/min. Os dados obtidos foram analisados no software Shimadzu® TA-60WS com cálculo da primeira derivada da curva TG (DTG) e auxílio da DTA (VIEIRA et al., 2015).

As curvas DSC foram obtidas no calorímetro exploratório diferencial da Shimadzu® (modelo DSC-60) integrado ao software Shimadzu® TA-60WS com atmosfera de nitrogênio de 50 mL/min⁻¹ nas razões de aquecimento de 2° C/min na faixa de temperatura de 25 a 300° C. Cerca de 2 mg de amostra foi posta em cadinho de alumínio hermeticamente fechado. Índio (156,4° C) e Zinco (419,5° C) foram utilizados para calibrar a escala de temperatura e a resposta de entalpia do equipamento (VIEIRA et al., 2015).

2.2.4 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

O espectro de infravermelho por transformada de Fourier foi obtido utilizando o equipamento IRTracer-100 (SHIMADZU®) com dispositivo de reflectância total atenuada (ATR). As amostras analisadas foram transferidas diretamente para o compartimento do dispositivo de ATR com seleneto de zinco. A varredura foi realizada na faixa de 600 a 4000 cm⁻¹ com resolução de 4 cm⁻¹ e 150 scans.

2.2.5 Quantificação da CM por CLAE-DAD

As análises foram realizadas utilizando um cromatógrafo líquido Shimadzu® (LC-20 AT) equipado com um amostrador automático (SIL-20 A) e um detector de arranjo de diodos (SPD-M20A) controlado por software LC-Solution® 1.0. Todas as alíquotas referentes a concentração de CM foram submetidas individualmente à análise nas seguintes condições cromatográficas: fase estacionária foi utilizada uma coluna C18 (250 x 4,6 mm) e tamanho de partícula de 5 µm (Supelco® Hypersil); a fase móvel: água (solução A) e metanol (solução B). Método caracteriza-se como gradiente, com fluxo de 1 mL/min,

volume de injeção de 10 µL e tempo de corrida de 17 min. A temperatura da coluna foi mantida constante em 30° C durante toda a análise.

Todas as soluções foram degaseificadas e filtradas através de membrana filtrante de 0,22 µm (Chromafil® Xtra, EUA), antes de serem analisadas no cromatógrafo. A detecção foi realizada por CLAE-DAD no comprimento de onda de 340 nm. A partir desse método obteve-se a curva de calibração, na faixa de concentração de 50 a 200 (µg/mL), e obteve-se a equação da reta ($y = 5,88 \cdot 10^6 x - 7,06 \cdot 10^{-4}$; $r^2 = 0,992$), com a qual foi possível quantificar CM nas alíquotas retiradas dos testes de liberação *in vitro*. Os cromatogramas foram analisados comprando-se os dados com o padrão analítico (tempo de retenção e espectro de UV).

2.2.6 Testes de liberação *in vitro* da CM

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária por meio da Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 31 dispõe sobre a realização de Estudos de Equivalência Farmacêutica e de Perfil de Liberação Comparativo e com isso determina-se que os testes de liberação sejam realizados em pelo menos três pH diferentes e em condições laboratoriais específicas (BRASIL, 2010).

O teste de liberação foi realizado nos pHs de 2,0; 4,5 e 6,86, a fim de simular o que ocorre no sistema gastrointestinal. Para isso, utilizou-se soluções tamponantes preparadas de acordo com a Farmacopeia Brasileira (2019). No teste com o pH 2,0 preparou-se uma solução de ácido clorídrico, no pH 4,5 preparou-se o tampão acetato de sódio e para o pH 6,5 preparou-se o tampão fosfato.

O teste foi realizado por 7 h e durante este período foram retiradas alíquotas (9 pontos de coleta), em intervalos de tempo pré-determinados (0,25; 0,5; 0,75; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7 h) para quantificação de CM dissolvida. Os testes foram realizados na temperatura de 37° C, sob agitação constante de 200 rpm e em cada ponto de coleta foram retiradas alíquotas de 1 mL, com reposição do meio. A concentração de CM livre nas amostras foi determinada a partir da análise por CLAE-DAD.

2.2.7 Determinação do modelo cinético do perfil de liberação da CM

A fim de determinar o modelo farmacocinético do perfil de liberação das amostras nos pH de 2,0; 4,5 e 6,86 foi utilizado como ferramenta o software DDSolver® (ZHANG et al., 2010). Para tanto, os dados foram avaliados utilizando os modelos: Ordem zero, Primeira ordem, Higushi, Korsmeyer-peppas e Peppas-Sahlin. Para a avaliação do modelo farmacocinético mais adequado foi utilizado como parâmetro o coeficiente de determinação ajustado (R^2), calculado por meio da equação 1. Desse modo, o maior valor obtido de R^2 para determinado modelo de cada amostra analisada foi considerado para tanto, o mais representativo do perfil de liberação.

$$R^2_{\text{ajustado}} = 1 - \frac{n-1}{n-p} \times (1 - r^2) \quad (1)$$

Onde: n = número de pontos da amostra; p= número de parâmetros do modelo e r^2 = coeficiente de determinação.

2.3 Atividade expectorante

Os experimentos com animais foram previamente aprovados pelo Comitê de ética no uso de animais da Universidade Federal do Vale do São Francisco (CEUA-UNIVASF, Protocolo nº 0017/270219). Os camundongos (*Mus musculus*) ficaram três dias para adaptação no local de experimentação com acesso a água e ração a vontade até 2 h, no mínimo, do experimento, com administração do xarope cloridrato de ambroxol 120 mg/kg (controle positivo-CP), veículo (controle negativo-CN), salina (CN do ambroxol) e 10, 30 e 100 mg/kg da CM, por via oral (VO) com 6 animais por grupo. A cumarina foi solubilizada utilizando-se 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) e 20% de tween 80 e 70% de água destilada.

Os animais foram pré-tratados e após 30 min realizou-se a administração de suspensão de vermelho de fenol (500 mg/kg-12,5 mg/mL) por via intraperitoneal (IP). Passados mais 30 minutos da administração do vermelho de fenol, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical para, através

de incisão cirúrgica promover a recuperação do lavado bronco alveolar (LBA) com 2 mL de NaCl 0,9%, recuperando-se 600 µL de LBA que será posto sob rotação a 2500 rpm por 10 min.

Após esse procedimento, foram adicionados 500 µL de sobrenadante em cubeta de quartzo e 0,05 mL de hidróxido de sódio (NaOH 0,1 M) para quantificação do vermelho de fenol. A atividade expectorante foi determinada levando-se em consideração a curva de calibração do vermelho de fenol ($y = 0,1741x + 0,0168$) com método desenvolvido e validado por Menezes e colaboradores (2019).

2.4 Atividade antitussígena

O modelo experimental para avaliação da atividade antitussígena foi realizado de acordo com Kamei e colaboradores (2013). Os camundongos (*Mus musculus*) (n=48) foram submetidas as mesmas condições experimentais do tópico anterior. Os animais foram colocados em câmara de vidro individualmente (com volume aproximado de 500 mL) sob aeração por nebulização de ácido cítrico (0,4 M) durante 3 min para observação da tosse e separados por grupos (n=6).

Passadas 24 h da primeira exposição (para exclusão de animais insensíveis ou hiper-responsivos), os animais foram submetidos a uma nova nebulização com ácido cítrico, porém com tratamento prévio (30 min) de codeína 30 mg/kg (CP), CM (10, 30 e 100 mg/kg) ou veículo (CN), por VO. Desse modo, avaliava-se a quantidade de tosse em cada grupo. Ao final do experimento os animais serão eutanasiados por dose letal de anestésico (Tiopental 100 mg/kg e Lidocaína 10 mg/mL). A cumarina foi solubilizada utilizando-se 10% de DMSO e 20% de tween 80 e 70% de água destilada.

2.5 Análise estatística

Os espectros foram obtidos pelo software LC-Solution® 1.0 (Shimadzu® TA-60WS) e plotados no OriginPro versão 8.0 (OriginLab®). As análises dos dados foram realizadas utilizando os softwares Microsoft Excel®, OriginPro

versão 8.0 (OriginLab®) e os resultados quantitativos expressos em média \pm desvio padrão. Já nos testes de liberação os resultados foram expressos como a porcentagem de CM liberada \pm desvio padrão de três repetições por ensaio.

Os testes farmacológicos foram avaliados estatisticamente pelo software GraphPad Prism versão 6.0. As análises como média \pm erro padrão da média foram avaliadas por análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do pós-teste de Dunnett, considerando significativamente diferente quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 DRX e MEV

A técnica de DRX foi utilizada para verificar o padrão de cristalinidade da molécula e confirmar os dados presentes na literatura. Desse modo, pode-se observar no difratograma da CM (Fig. 1) um pico intenso de difração com 2θ igual a $22,73^\circ$, um pico de média intensidade em $11,21^\circ$ e dois picos de baixa intensidade em $34,47^\circ$ e $46,59^\circ$. O pico de alta intensidade confirma que a cumarina é um composto orgânico de alta cristalinidade. Outros trabalhos também confirmaram essa característica em outros tipos de cumarina (ZENG et al., 2017; SAMPAIO et al., 2020; JIANG et al., 2021).

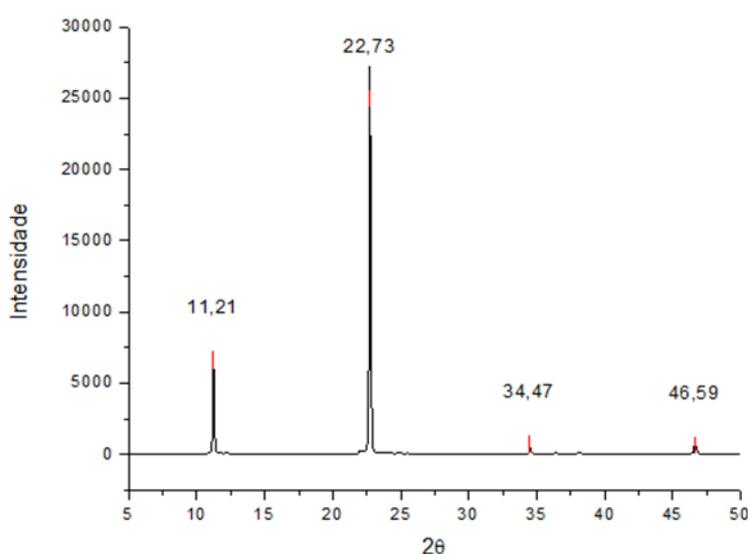


Fig.1. Difratograma da CM.

A confirmação do perfil cristalino da cumarina entra em concordância com os dados encontrados na literatura acerca da sua baixa solubilidade aquosa, uma vez que, a cristalinidade do fármaco dificulta a solubilização. A cristalinidade do fármaco é, inclusive, um dos pontos-chaves a serem trabalhados quando pretende-se incrementar a solubilidade, modificando o seu perfil cristalino para polimorfos metaestáveis, formação de sal e co-cristais (GOMES et al., 2015).

As análises por MEV foram utilizadas para corroborar com os dados de DRX e da literatura. Porém, as imagens apresentam um padrão de morfologia diferente do que se esperava para uma molécula cristalina. Desse modo, observa-se na Figura 2 padrão morfológico de uma estrutura amorfa que pode ser resultante do processo de preparo da amostra. Na Figura 3b utilizando-se um aumento de 5.000x observa-se a presença de lamelas divididas com blocos definidos.

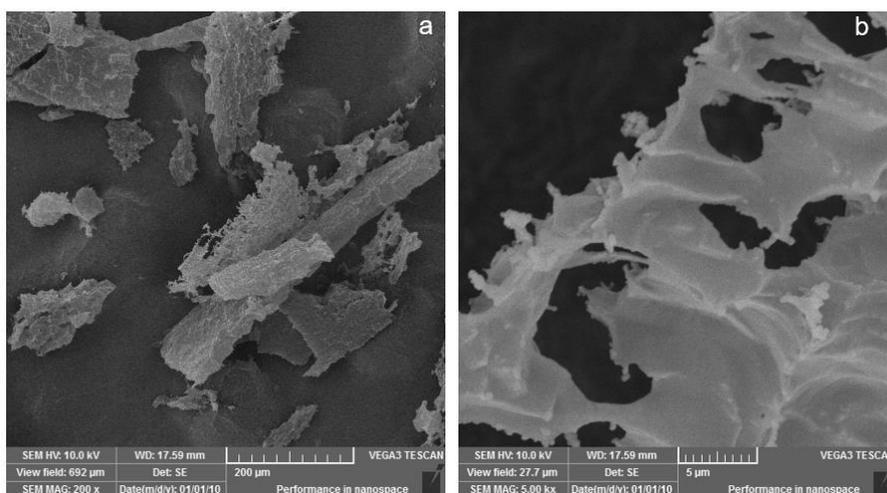


Fig.2. MEV da CM (a- 200x, b- 5.000x).

3.2 Análise térmica

Na curva de TG foi observado uma perda de massa de 2,63% entre 0 e 125° C resultante da perda de moléculas de água adsorvidas. Além disso, observou-se degradação térmica em um único evento, na faixa de temperatura entre 113 e 215° C, com perda de massa de 99,24% (Fig.3). Esse evento caracteriza-se como uma degradação completa. Utilizando-se dos mesmos parâmetros experimentais Sampaio e colaboradores (2020) analisou o TG de um

outro tipo de cumarina, escopoletina, e verificou também apenas um evento térmico entre 182 e 303° C.

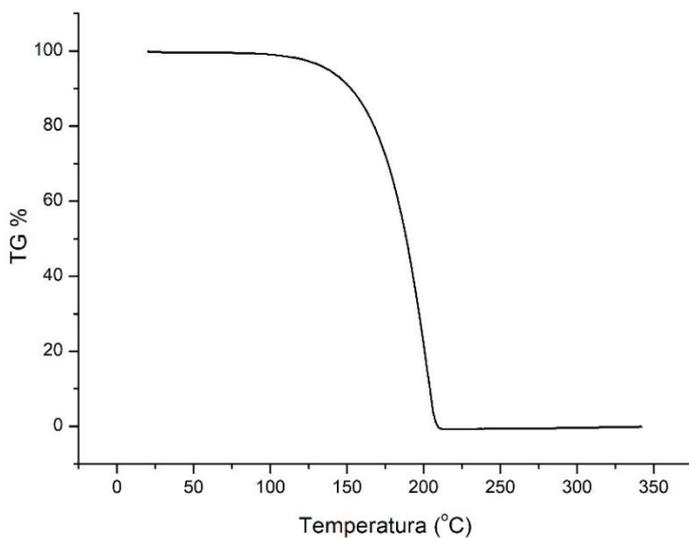


Fig. 3. Curva de TG da CM.

Já a curva de DSC da CM (Fig.4) apresentou 2 picos endotérmicos, um intenso e bem definido, na faixa de temperatura entre 66,10- 68,71° C ($T_{\text{pico}}= 67,65^{\circ}\text{C}$) ($\Delta H= 154,98\text{ mJ}$), característica de fusão de substâncias puras, e outro em torno de 150° C referente ao processo de fusão completa, sendo este dado relacionado aos dados de TG.

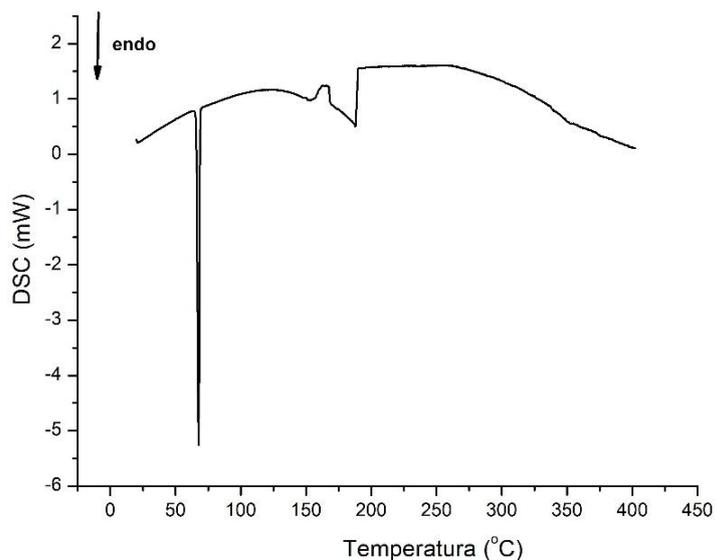


Fig. 4. Curva de DSC da CM.

3.3 FTIR

O espectro de FTIR da CM (Fig. 5) apresenta estiramentos característicos da molécula, quando se leva em consideração a banda típica do anel lactona referente aos estiramentos C=O e C-O e que foi observada em 1701 cm^{-1} , enquanto a banda característica da ligação C=C do anel benzeno foi observada em 1598 cm^{-1} (CHENG, 2012). Além desses sinais, também foram percebidas duas bandas de absorção em 749 cm^{-1} e 828 cm^{-1} referentes ao dobramento da ligação =C-H fora do plano, que corroboram com a estrutura da CM.

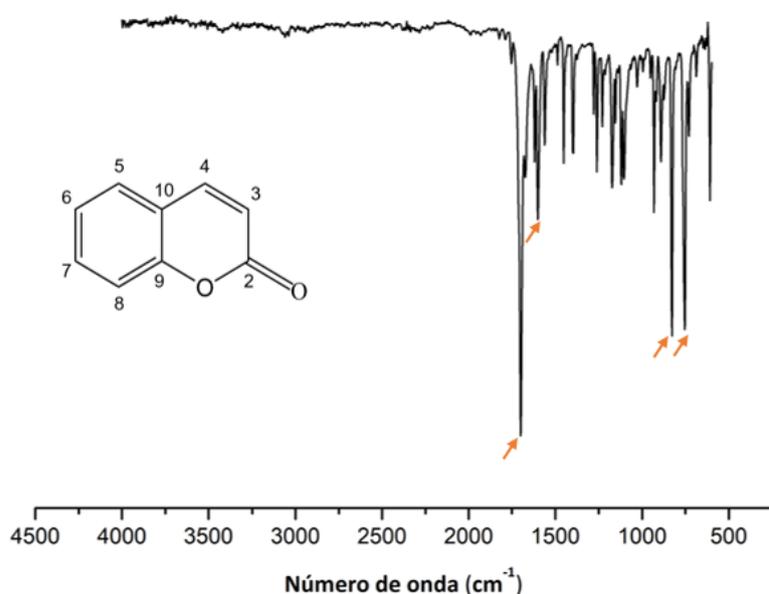


Fig. 5. Espectro de FTIR da CM.

3.4 Perfil de liberação *in vitro* da CM

Como descrito no tópico 2.2.5, a CM foi quantificada em solução a partir da análise prévia dos cromatogramas e comparação com os dados do padrão. Desse modo, observa-se na Figura 6 um cromatograma e espectro de UV de uma amostra aleatória do teste de liberação da CM em pH 2,0. Observa-se na figura 6 (a) um tempo de retenção em 10,95 min e na Figura 6 (b) o espectro de UV com absorbâncias máximas em torno de 201, 275 e 308, compatíveis com os dados do padrão.

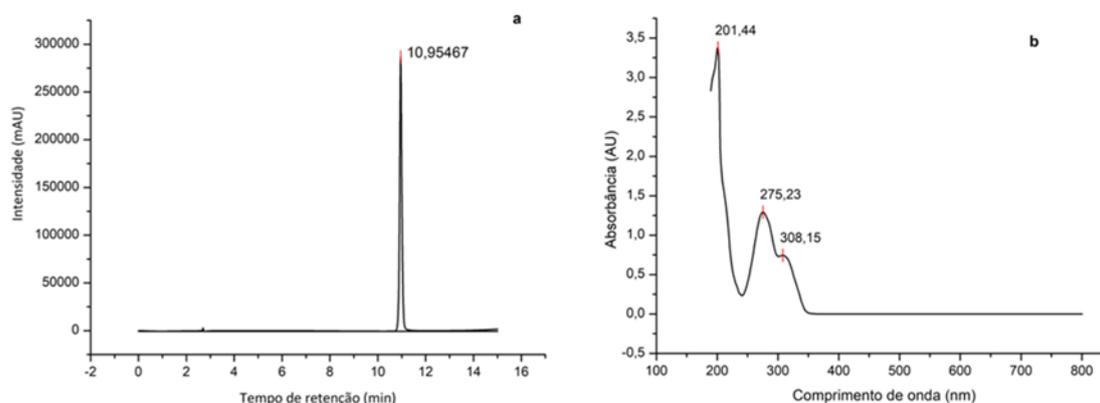


Fig.6. a: Cromatograma da CM, b: Espectro de UV da CM.

Neste estudo utilizou-se a condição non-sink para avaliação do percentual de liberação da CM pura. Essa condição experimental foi utilizando considerando que, a correlação *in vitro/in vivo* sob condição *sink* é considerada um problema, já que a capacidade de supersaturação das substâncias estudadas, que também pode acontecer *in vivo*, pode não ser visualizada sob estas condições (SUN; JU; LEE, 2012).

Na Figura 7 observa-se os perfis de liberação da CM pura nos pH 2,0; 4,5 e 6,86 como percentual de CM liberada nos intervalos de tempo pré-determinados. No pH 2,0 observa-se que na primeira hora ocorre o efeito *burst*, rápida liberação, chegando a $67,21 \pm 0,90\%$ de CM liberada. A partir de então há uma liberação gradual, mas ao final chegou-se em $70,74 \pm 1,40\%$ de CM liberada. No pH 4,5 na primeira hora o percentual de CM liberada foi de $51,56 \pm 0,014\%$ e ao final do experimento atingiu-se platô com $55,13 \pm 0,035\%$. Já no pH de 6,86 há um perfil de liberação semelhante chegando a $70,58 \pm 0,51\%$ e ao final do experimento atingiu-se o platô com $77,55 \pm 0,93\%$ de CM liberada.

Esses dados estão de acordo ao que era esperado para esta substância e foi observado isto também nos estudos com a escopoletina por Sampaio e colaboradores (2020). Os dados de solubilidade da cumarina na literatura classificavam-na como insolúvel em água e solúvel em solventes orgânicos (PUBCHEM, 2020). Deve-se deixar claro que há uma diferença conceitual e prática entre solubilidade e dissolução. A solubilidade aquosa é influenciada diretamente pela estrutura química da substância, característica do pó (cristalino

ou amorfo) e pH do meio. A dissolução tem influência direta da solubilidade quantitativa da substância analisada, como também outros parâmetros utilizados nesse teste (diferença de pH, tempo, agitação e temperatura). Desse forma, sabe-se que nos estudos de pré-formulação é importante a análise dos dois parâmetros (solubilidade e dissolução) na predição da absorção de um fármaco (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2007). Assim, os dados do teste de liberação da cumarina demonstram que a influência do pH, temperatura e agitação melhoram o perfil de dissolução desta substância.

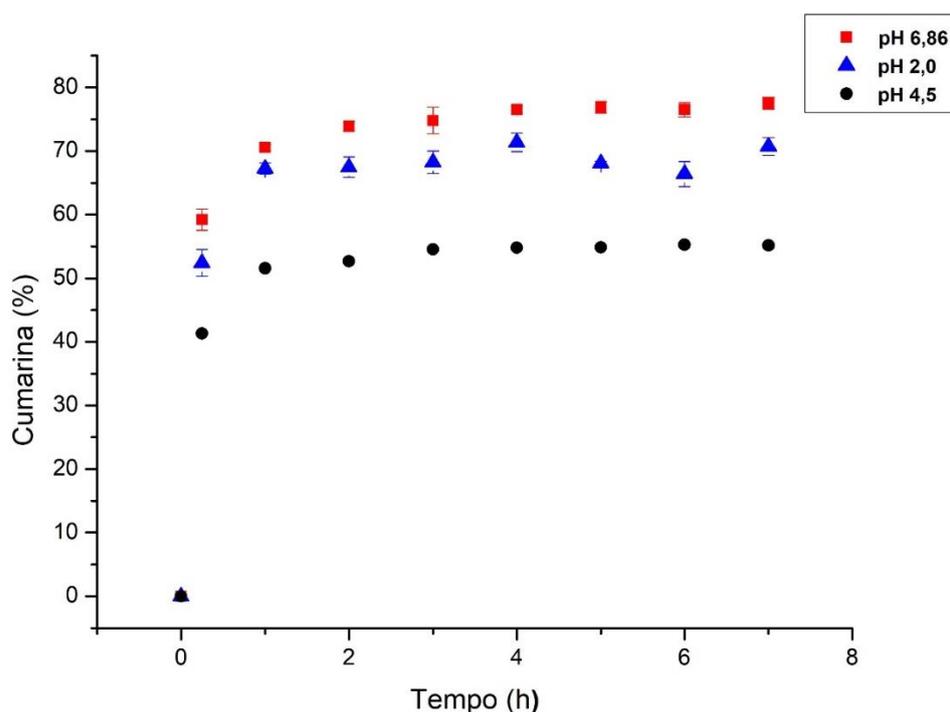


Fig.7. Perfis de liberação *in vitro* de CM livre.

Utilizou-se os modelos farmacocinéticos para determinar o perfil de liberação da CM isolada. A partir da análise dos valores de R^2 ajustado evidenciou-se que há diferença do perfil de liberação da cumarina de acordo com o pH. Desse modo, para CM isolada tanto no pH de 2,0 quanto de 4,5 o modelo que melhor se ajustou foi o de Korsmeyer-Peppas. Já com relação ao pH 6,86 o melhor modelo foi o de Peppas-Sahlin. O modelo Peppas-Sahlin tem como característica representar formulações prolongadas (PEPPAS e NARASIMHAN, 2014).

Tabela 1

R² ajustados obtidos a partir dos modelos cinéticos obtido do ensaio de liberação *in vitro* em condições *non sink* da CM nos pHs 2,0; 4,5 e 6,86.

Modelos	pH 2,0	pH 4,5	pH 6,86
Ordem zero	0,582	0,609	0,611
Primeira ordem	0,724	0,709	0,767
Higuchi	0,760	0,782	0,781
Korsmeyer-Peppas	0,990	0,995	0,962
Peppas-Sahlin	0,964	0,968	0,997

3.5 Atividade expectorante

Os medicamentos classificados como expectorantes tem um papel fundamental de aliviar a hipersecreção de muco das vias aéreas e podem ser classificados como, mucolíticos, mucocinéticos e mucorreguladores (RUBIN et al., 2014). Algumas doenças respiratórias tais como, asma e a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) tem a depuração do muco prejudicada como consequência da sua maior viscosidade e elasticidade (MENEZES et al., 2019).

Há vários estudos que relacionam a presença de compostos cumarínicos em extratos vegetais à atividade sobre o sistema respiratório (BERTOLDI et al., 2016; GASPARETTO et al., 2015; DUSSOSSOY et al., 2016). Dessa forma, este estudo avaliou a atividade expectorante da cumarina em diferentes doses (10, 30 e 100 mg/kg) frente ao veículo. No gráfico abaixo (Fig. 8) tem-se a representação dos respectivos valores de média \pm erro padrão da média em $\mu\text{g/mL}$ da secreção do vermelho de fenol: salina ($1,40 \pm 0,18$), veículo ($2,61 \pm 0,20$), CM 10 mg/kg ($1,51 \pm 0,18$), CM 30 mg/kg ($1,81 \pm 0,30$), CM 100 mg/kg ($4,95 \pm 0,45$) e ambroxol 120 mg/kg ($2,10 \pm 0,13$).

Os resultados da cumarina demonstram que esta substância não apresentou atividade expectorante quando comparado ao efeito do veículo. No entanto, o grupo de animais que recebeu ambroxol, agente secretolítico, apresentou atividade expectorante significativa quando comparado ao grupo salina.

Os dados referentes à cumarina contradizem ao que era esperado considerando as evidências da literatura. A cumarina assim como, o ácido kaurenóico, estigmasterol, friedelina, lupeol e siringaldeído foram identificadas no xarope de guaco (*Mikania laevigata* e *M. glomerata*) (OSÓRIO, MARTINS, 2004; PEDROSO et al., 2008; AMARAL et al., 2009). O guaco por sua vez, tem seu uso consolidado no Brasil em doenças respiratórias (broncodilatadora e antitussígena) e suas propriedades atribuídas primeiramente à cumarina (GARCIA et al., 2020). Este metabólito destaca-se como antioxidante (LI et al., 2020), anti-inflamatória (BISSONNETTE et al., 2009) e broncodilatadora (RAMANITRAHASIMBOLA et al., 2005). Assim, uma das hipóteses para tal resultado é que na verdade a atividade expectorante do guaco deve-se à um efeito sinérgico e não apenas à cumarina e isto já havia sido confirmado por Gasparetto e colaboradores (2015).

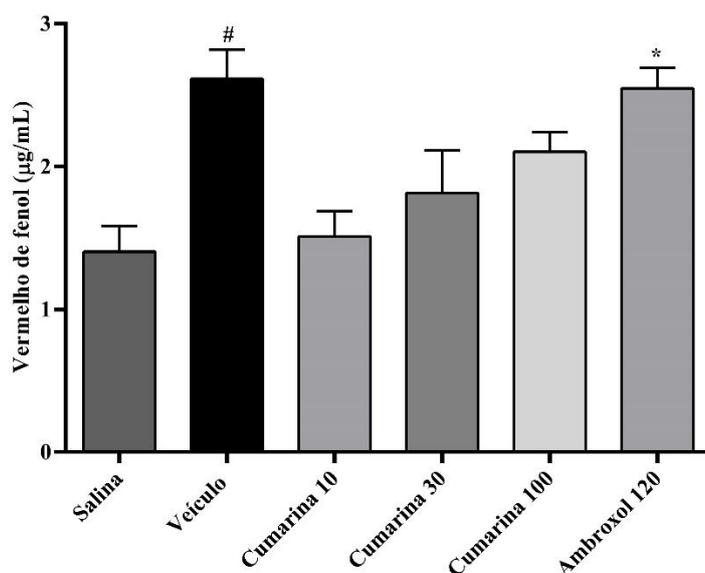


Fig. 8. Efeito da CM (10, 30 e 100 mg/kg), salina, veículo e ambroxol (120 mg/kg) (n=6) sobre a quantidade de vermelho de fenol. Dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (*p < 0,05).

3.6 Atividade antitussígena

A tosse é um processo protetor de retirada de material estranho de brônquios e bronquíolos. Esse reflexo envolve cinco grupos de componentes:

receptores de tosse, nervos aferentes, centro da tosse, nervos eferentes e músculos efetores (DICPINIGAITIS et al., 2014). Os ensaios pré-clínicos tem valor preditivo para novos tratamentos e intervenções considerando que, as vias reflexas permaneceram inalteradas entre as espécies animais incluindo os roedores (CANNING, 2008). Outro ponto é que o ácido cítrico induz tosse em camundongos mediado pelo receptor potencial transitório de vaniloide tipo-1 (TRPV1) das fibras C (CANNING; FARMER; MORI, 2006). Desse modo, considera-se uma metodologia eficaz para avaliação da atividade antitussígena da cumarina.

No gráfico abaixo (Fig. 9) tem-se a representação dos respectivos valores de média \pm erro padrão da média percentual de tosse: veículo ($78,65 \pm 22,73$), CM 10 mg/kg ($75,97 \pm 16,85$), CM 30 mg/kg ($32,40 \pm 9,62$), CM 100 mg/kg ($20,62 \pm 12,14$) e codeína 30 mg/kg ($20,32 \pm 9,63$). Dessa forma, observa-se ainda que CM (100mg/kg) reduziu significativamente a frequência de tosse em camundongos quando comparado com o grupo que recebeu veículo e que este resultado foi comparável ao obtido para o grupo de codeína. Diferentes estudos com outros tipos de cumarina apontavam evidências de que esta cumarina apresentaria atividade antitussígena. Huang e colaboradores (2020) por exemplo, isolaram a escopoletina do extrato de *Chimonanthus nitens* e evidenciaram sua atividade antitussígena.

Outro ponto importante é que sendo este composto marcador químico do xarope de guaco e este por sua vez, utilizado também no tratamento de tosse a pesquisa desta atividade se faz de fundamental importância. Já do ponto de vista clínico e epidemiológico o estudo da tosse é relevante considerando que, a tosse é um problema de saúde e está associado a diferentes doenças pulmonares tais como, asma, DPOC, fibrose pulmonar idiopática e câncer de pulmão. A tosse está associada ainda com qualidade de vida do paciente considerando que esta pode causar distúrbios do sono, náuseas, dores no peito, letargia e ainda constrangimento social (DICPINIGAITIS et al., 2014).

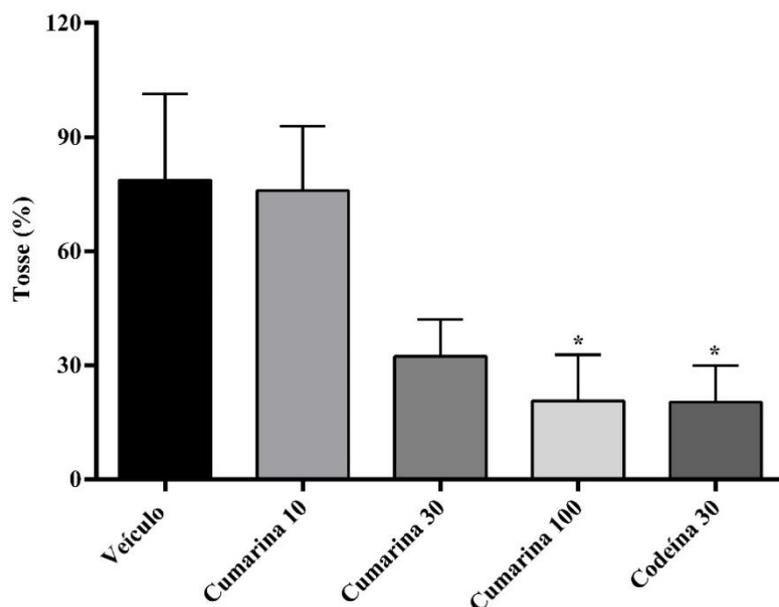


Fig. 9. Efeito percentual de tosse da CM (10, 30 e 100 mg/kg), veículo e codeína (30 mg/kg) (n=6). Dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (*p < 0,05).

4 CONCLUSÃO

Essa pesquisa foi de fundamental importância levando-se em consideração que diferentes técnicas foram utilizadas na caracterização da cumarina. Desse modo, foi possível obter informações relevantes quanto ao perfil cristalino, análise térmica e bandas características desse composto. Além disso, reuniu informações quanto ao perfil de liberação em diferentes pHs fato este, de fundamental importância como conhecimento prévio para o desenvolvimento de *Drug Delivery Systems* com esta cumarina. Os dados farmacológicos a priori demonstraram que a cumarina não apresenta atividade expectorante. No entanto, apresentou atividade antitussígena fazendo deste composto um potencial biológico a ser mais explorado em outros estudos.

REFERÊNCIAS

AMARAL, M.P.H. et al. Determinação do teor de cumarina no xarope de guaco armazenado em diferentes temperaturas. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, p. 607–611, 2009.

ANSEL, H.C; POPOVICH, N.G.; ALLEN, L. V. **Formas Farmacêuticas & Sistemas de Liberação de Fármacos**, 8ª Ed., São Paulo, Artmed, 2007.

BASKARAN, N. et al. Chemopreventive potential of coumarin in 7, 12-dimethylbenz[α]anthracene induced hamster buccal pouch carcinogenesis. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, n. 10, p. 5273–5279, 2012.

BERTOLDI, F. C. et al. Validação de um método analítico rápido por CLAE-UV para determinação de cumarina em guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) confirmado com espectrometria de massas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 1, p. 316–325, 2016.

BISSONNETTE, E. Y. et al. Coumarinic derivatives show anti-inflammatory effects on alveolar macrophages, but their anti-elastase activity is essential to reduce lung inflammation *in vivo*. **International Immunopharmacology**, v. 9, n. 1, p. 49–54, 2009.

BRASIL. Resolução RDC nº 31 de 11 de agosto de 2010. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, DF, 11 agosto, 2010. Seção 2, p.04.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**, 6. ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 2019. p. 01-874. v. 1. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/farmacopeia> >. Acesso em: 12 set. 2019.

CANNING, B.J; FARMER, D. G; MORI, N. Mechanistic studies of acid-evoked coughing in anesthetized guinea pigs. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. v. 291, 2006.

CANNING, B.J. The Cough Reflex in Animals: Relevance to Human Cough Research. **Lung**. v. 186, 2008.

CHENG, Z. Studies on the interaction between scopoletin and two serum albumins by spectroscopic methods. **Journal of Luminescence**, v. 132, n. 10, p. 2719–2729, 2012.

DICPINIGAITIS, P.V. et al. Antitussive Drugs-Past, Present, and Future. **Pharmacological reviews**. v. 66, p. 468-512, 2014.

DUSSOSSOY, E. et al. Pulmonary anti-inflammatory effects and spasmolytic properties of Costa Rican noni juice (*Morinda citrifolia* L.). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 192, p. 264–272, 2016.

- GARCIA, C.G. et al. Evaluation of the Bronchodilator Effect of Guaco Syrup: a Randomized, Double-blind, Crossover Clinical Trial. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 30, p. 111-117, 2020.
- GASPARETTO, J.C. et al. Guaco Metabolites Using Syrup Formulation and the Identification of an Alternative Route of Coumarin Metabolism in Humans. **PLOS ONE**. v. 10, p. 1-22, 2015.
- GOMES, T.A et al. Estratégias utilizadas para o incremento da solubilidade do fármaco antiretroviral classe II: Efavirenz. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.36, n. 2, p. 239-249, 2015.
- HUANG, W. et al. Anticomplement and antitussive activities of major compound extracted from *Chimonanthus nitens* Oliv. leaf. **Biomedical Chromatography**. v. 34, 2020
- JIANG, B. et al. Coumarin-encapsulated MOF luminescence sensor for detection of picric acid in water environment. **Dyes and Pigments**. v. 184, 2021.
- KAMEI, J. et al. Fentanyl enhances the excitability of rapidly adapting receptors to cause cough via the enhancement of histamine release in the airways. **Cough**, v. 9, p. 1032-1048, 2013.
- KAUR, M. et al. Coumarin: A Promising Scaffold for Anticancer Agents. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 1032-1048, 2015.
- LI, W. et al. Synthesis and antioxidant activity of conjugates of hydroxytyrosol and coumarin. **Bioorganic Chemistry**. v. 105, 2020.
- MENEZES, P. M. N. et al. Analytical and pharmacological validation of the quantification of phenol red in a mouse model: An optimized method to evaluate expectorant drugs. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 98, p. 106586, 2019.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY Information. PubChem Database. Coumarin, CID: 323, Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Coumarin>. Acessado em: 20 de dezembro de 2020.
- OSÓRIO, C.A; MARTINS, J.L.S. Determinação de cumarina em extrato fluido e tintura de guaco por espectrofotometria derivada de primeira ordem. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, p. 481-486, 2004.
- PASQUA, C. S. P. D. et al. Pharmacological study of anti-inflammatory activity of aqueous extracts of *Mikania glomerata* (Spreng.) and *Mikania laevigata* (Sch. Bip. ex Baker). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 231, p. 50–56, 2019.

PEDROSO, A.P.D et al. Isolation of syringaldehyde from *Mikania laevigata* medicinal extract and its influence on the fatty acid profile of mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p. 63-69, 2008.

PEPPAS, N. A.; NARASIMHAN, B. Mathematical models in drug delivery: How modeling has shaped the way we design new drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 75–81, 2014.

RAMANITRAHASIMBOLA, D. et al. Bronchodilator activity of *Phymatodes scolopendria* (Burm.) Ching and its bioactive constituent. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, n. 3, p. 400 - 407, 2005.

RODRIGUES, R. F. et al. Coumarin solubility and extraction from emburana (*Torresea cearensis*) seeds with supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 43, n. 3, p. 375-382, 2008.

RUBIN, B. Secretion properties, clearance, and therapy in airway disease. **Translational Respiratory Medicine**. v.2, p. 1-7, 2014

RUFATTO, L. et al. *Mikania laevigata*: Chemical characterization and selective cytotoxic activity of extracts on tumor cell lines. **Phytomedicine**, v. 20, p. 883-889, 2013.

SAMPAIO, P.A. et al. Development and characterization of the zeolite imidazolate framework for a modified release of the drug scopoletin. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**. 2020.

SRIKRISHNA, D. et al. A Review on Pharmacological Properties of Coumarins. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 113–141, 2018.

SUN, D. D.; JU, T. R.; LEE, P. I. Enhanced kinetic solubility profiles of indomethacin amorphous solid dispersions in poly (2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 81, n. 1, p. 149–158, 2012.

VIEIRA, A. C. C. et al. Multicomponent systems with cyclodextrins and hydrophilic polymers for the delivery of Efavirenz. **Carbohydrate Polymers**, v. 130, p. 133–140, 2015.

WANG, G. et al. Coumarins as Potential Anti-drug Resistant Cancer Agents: A Mini Review. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 20, 2020.

ZENG, YING-CHUN. et al. Soluplus micelles for improving the oral bioavailability of scopoletin and their hypouricemic effect in vivo. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 38, n. 3, p. 424–433, 2017.

ZHANG, Y. et al. DDSolver: An Add-In Program for Modeling and Comparison of Drug Dissolution Profiles. **The AAPS Journal**, v. 12, n. 3, p. 263–271, 2010.

**CAPÍTULO 4- DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO
MODIFICADA À BASE DE CUMARINA E ZIF-8**

DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADA À BASE DE CUMARINA E ZIF-8

RESUMO

Cumarina (cromen-2-ona, CM) é quimicamente uma cumarina simples, de baixa solubilidade aquosa, e apresenta dados que demonstram suas atividades anti-inflamatória, antioxidante, citotoxicidade, anticâncer e broncodilatadora. A *Zeolitic Imidazolate Framework* (ZIF-8) é um tipo de rede organometálica de coordenação (*Metal Organic Framework*–MOF), esta tem aplicação farmacêutica no desenvolvimento de materiais de liberação lenta. Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver um sistema de liberação (*Drug Delivery Systems* - DDS) à base de CM e ZIF-8 pelo método *in situ*. A quantificação de CM em solução por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à arranjo de diodo (CLAE-DAD) e o perfil de liberação de CM dos sistemas foi comparado em condições *non-sink* nos pHs 2,0; 4,5 e 6,86. Para caracterização, especificamente do sistema 1:4:2 e ZIF-8, utilizou-se as técnicas microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Os resultados de maneira geral demonstraram que os sistemas desenvolvidos apresentaram baixos valores de eficiência de encapsulação ou ainda uma taxa de liberação adequada. Outro ponto, é que em nenhum dos sistemas mesmo observou-se uma liberação pH dependente. Já em relação aos dados de FTIR do 1:4:2 foi possível afirmar que não ocorreu a formação do sistema. Dessa forma, faz-se necessário a realização de mais experimentos.

Palavras-chave: cumarinas, 1,2 benzopirona, MOF, ZIF-8.

1 INTRODUÇÃO

A cumarina (CM) (cromen-2-ona, $C_9H_6O_2$) conhecida também como 1,2 benzopirona, caracteriza-se quimicamente como um composto formado pela fusão do anel benzeno e do α -pirona (α -benzopirona). Esse composto está presente em uma grande diversidade de plantas e frutas (RODRIGUES et al., 2008). Além disso, é o marcador químico da *Mikania glomerata* (BERTOLDI et al., 2016) e constituinte bioativo da *Phymatodes scolopendria* (RAMANITRAHASIMBOLA et al., 2005). De maneira geral há muitas atividades farmacológicas atribuídas às cumarinas tais como, anticâncer, anti-inflamatório, anticonvulsivante, antimicrobiano, inibidor da monoaminaoxidase e antioxidante (SRIKRISHNA, GODUGU e DUBEY, 2018).

Estudos realizados por Ahmed e colaboradores (2020) demonstraram que grupo lactona concede as cumarinas uma capacidade de estabelecer ligações de hidrogênio e acilar alvos proteicos. Assim, suas propriedades farmacológicas estão relacionadas a sua estrutura e as suas propriedades físico-químicas de anel heterocíclico, que permitem a ligação com proteínas-alvos. Outro ponto que faz com que haja interesse no desenvolvimento de sistema com tal molécula é fato de que esta apresenta um log de P de 2,01 (MOLINSPIRATION, 2019), ou seja, significa que ela possui uma maior afinidade pela fase orgânica, levando-se em consideração que para haver uma permeabilidade por biomembranas o valor ideal de referência estaria no intervalo entre 1 a 3 (BARREIRO et al., 2015). Fato este que confirma sua baixa solubilidade em água e boa solubilidade em solventes orgânicos como etanol, clorofórmio, éter dietílico, metanol e outros óleos (AZEVEDO, et al., 2014).

Considerando a diversidade de atividades farmacológicas citadas anteriormente e a determinação de algumas propriedades físico-químicas já realizadas no laboratório notou-se que a CM possui baixa solubilidade em água. Sendo assim, faz-se necessário a utilização de moléculas carreadoras devido a seu caráter hidrofóbico. Atualmente, novas tecnologias de fabricação de excipientes estão sendo realizadas com a finalidade de melhorar a liberação, assim como melhorar a dissolução e absorção de fármacos com baixa solubilidade (GARCÍA-ARIETA, 2014).

Tendo em vista a necessidade de uma molécula carreadora, tem-se as redes metalorgânicas do inglês *Metal Organic Framework* (MOFs). As MOFs são estruturas cristalinas formadas pela junção de unidades contendo metais com ligantes orgânicos, por ligações fortes (síntese reticular) (FURUKAWA et al., 2013). Essas redes são atualmente muito utilizadas, por apresentarem um grande potencial devido à sua estrutura altamente porosa, permitindo assim apresentar propriedades de superfície ajustáveis (ZHANG, ZHAO e LIN, 2019), e também vale ressaltar que suas propriedades físico-químicas garantem uma boa biocompatibilidade, baixa toxicidade e ainda boa estabilidade térmica e química (SUN et al., 2013). Entre as inúmeras MOFs têm-se o grupo *Zeolitic Imidazolate Framework* (ZIF) e dentre as mais utilizadas no desenvolvimento de *Drug Delivery System*, tem-se a ZIF-8.

A ZIF-8 possui uma estrutura estabilizada devido às pontes realizadas entre o 2-metilimidazol (2-MIm) e o zinco tetraédrico (ZHUANG et al., 2014). A ZIF-8 possui grande biocompatibilidade, biodegradabilidade em condições ácidas (QIN et al., 2019), área superficial elevada, citotoxicidade insignificante (GAO et al., 2019), diversidade estrutural que lhe proporciona um alto potencial de armazenamento de produto químico, encapsulação e liberação controlada (ALVES, 2016).

Portanto, considerando as diversas atividades biológicas da cumarina descritos na literatura, bem como suas características físico-químicas. A utilização da ZIF-8 como carreador é uma opção viável considerando que, permite um melhor carregamento de fármacos, modulando a sua cinética de liberação. O objetivo dessa pesquisa é desenvolver um sistema de liberação modificada incorporando a cumarina à rede de ZIF-8.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

A cumarina (CM) (CAS:91-64-5, Lote nº SLBW8136) foi obtida da Sigma-Aldrich® com pureza $\geq 99\%$. O 2-metilimidazol (2-MIm) (CAS:693-98-1, Lote nº

0000060698) e o sulfato de zinco heptahidratado [$\text{Zn}(\text{SO}_4)_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$] (CAS:7446-20-0, Lote nº SLBV1742) foram obtidos da Sigma-Aldrich® com pureza > 99%.

2.2 Desenvolvimento *in situ* dos sistemas CM:ZIF-8

Para o desenvolvimento dos sistemas CM:ZIF-8 utilizou-se a técnica de incorporação *in situ*. Vários sistemas foram desenvolvidos por meio dessa técnica, assim como pela *ex situ*, mas serão apresentados os resultados dos que foram possíveis a realização de experimentos de caracterização. Nesse método, utilizou-se como matéria-prima: 2-MIm ($82,1 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), $\text{Zn}(\text{SO}_4)_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ [$(287,54 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}, \text{Zn} (65,41 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1})$] e CM ($146,14 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), em diferentes proporções molares.

Primeiramente, foi desenvolvido um sistema na proporção molar de 1:4:2 (Zn:2MIm:CM) (sistema A) com as seguintes especificações de preparo: (1) CM foi pré-solubilizada em 3 mL de metanol; (2) 2-MIm foi solubilizado em 10 mL de água destilada (H_2O) sob agitação constante (200 rpm) por 15 min antes da adição da CM; (3) $\text{Zn}(\text{SO}_4)_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ foi solubilizado em 5 mL de H_2O . A solução de CM foi adicionada lentamente (gotejando) à solução de 2-MIm que estava sob agitação e pôr fim a solução de $\text{Zn}(\text{SO}_4)_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, completando o meio com H_2O e com isso um volume final de 20 mL. Após 2 h sob agitação constante e a temperatura de 23°C , o sistema foi filtrado (filtro quantitativo) e lavado com 10 mL de metanol e H_2O . Por fim, o sistema foi seco em estufa por 4 h à temperatura de 55°C . A ZIF-8 foi obtida nas mesmas condições experimentais que o sistema para posterior controle do processo. A ideia inicial deste sistema era saturar o meio com CM e com isso forçar seu aprisionamento na rede de ZIF-8. Esse sistema é denominado ao longo do trabalho como sistema A.

Outro sistema foi desenvolvido, mas desta vez baseando-se na metodologia de Kaur e colaboradores (2017) que utilizaram o mesmo método de desenvolvimento *in situ*, porém, com proporções maiores de 2-MIm. A ideia inicial deste sistema seria de garantir que o máximo de rede metalorgânica fosse formada e com isso a CM fosse aprisionada.

Nesse método, utilizou-se como matéria-prima: 2-MIm, $\text{Zn}(\text{SO}_4)_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e CM na proporção molar de 1:35:0,0003 (Zn:2MIm:CM) (sistema B) com as

seguintes especificações de preparo: (1) 2-MIm foi adicionado no erlemeyer com 40 mL de H₂O sob agitação constante (580 rpm) até sua completa solubilização; (2) CM foi adicionada à um béquer e solubilizada com 6 mL de DMSO e (3) Zn (SO₄)₂.7H₂O foi solubilizado separadamente com 4 mL de H₂O. A solução de CM foi adicionada lentamente (gotejando) à solução de 2-MIm que estava sob agitação e pôr fim a solução de Zn (SO₄)₂.7H₂O. Após 30 min sob agitação constante e temperatura de 23° C, o sistema foi filtrado (filtro quantitativo) e lavado com 10 mL de metanol e H₂O. Por fim, o sistema foi seco em estufa por 4 h à temperatura de 55° C. Esse sistema é denominado ao longo do trabalho como sistema B.

A taxa de carregamento de cada sistema foi determinada a partir do preparo de soluções metanólicas acidificadas com ácido trifluoroacético com cada sistema de CM:ZIF-8 e com isso a CM liberada contida na solução foi quantificada por CLAE-DAD (TIWARI et al., 2017). Todos os sistemas foram obtidos em triplicata assim como, as análises posteriores.

2.3 Caracterização dos sistemas CM:ZIF-8

Nem todos os testes de caracterização foram possíveis de ser realizados com os sistemas CM:ZIF-8. Desse modo, para o sistema CM:ZIF-8 (1:4:2) foram realizadas as análises de MEV, FTIR e teste de liberação. Para esse sistema foi realizada ainda a análise comparativa do MEV e FTIR da mistura física e ZIF-8. Já para o sistema CM:ZIF-8 (1:35:0,0003) foi realizado apenas o teste de liberação.

2.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Nas análises por MEV as amostras foram dispersas em fita carbono fixadas no suporte (*stub*). Em seguida, foram metalizadas com ouro atômico em um metalizador Quorum modelo Q150R ES com uma corrente de 15 mA por 5 min com um *tooling fator* de 2,30. As amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura Vega3 SEM da Tescan acoplado à um sistema de análise por espectroscopia de raios-X por energia dispersiva (EDS).

2.3.5 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

O espectro de infravermelho da amostra analisada foi obtido utilizando pastilhas de KBr como suporte sólido. Para preparo da pastilha utilizou-se aproximadamente 1 mg da amostra para 100 mg de KBr, os quais foram macerados até obtenção de um pó fino. A mistura foi então submetida a pressão de 78,5 KN, empregando prensa hidráulica Shimadzu® por um período de dez minutos. Após a obtenção da pastilha de KBr, esta foi analisada em espectrômetro Shimadzu® (IRTracer-100) na região entre 4500 a 400 cm^{-1} , com 45 scans e resolução de 4 cm^{-1} .

2.3.6 Quantificação da CM por CLAE-DAD

As análises foram realizadas utilizando um cromatógrafo líquido Shimadzu® (LC-20 AT) equipado com um amostrador automático (SIL-20 A) e um detector de arranjo de diodos (SPD-M20A) controlado por software LC-Solution® 1.0. Todas as alíquotas referentes a concentração de CM foram submetidas individualmente à análise nas seguintes condições cromatográficas: como fase estacionária foi utilizada uma coluna C18 (250 x 4,6 mm) e tamanho de partícula de 5 μm (Supelco® Hypersil); a fase móvel: água (solução A) e metanol (solução B). Método caracteriza-se como gradiente, com fluxo de 1 mL/min, volume de injeção de 10 μL e tempo de corrida de 17 min. A temperatura da coluna foi mantida constante em 30° C durante toda a análise.

Todas as soluções foram degaseificadas e filtradas através de membrana filtrante de 0,22 μm (Chromafil® Xtra, EUA), antes de serem analisadas no cromatógrafo. A detecção foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à arranjo de diodo (CLAE-DAD) no comprimento de onda de 340 nm. Esse método foi desenvolvido e adaptado a partir do estudo de Wang e colaboradores (2017). A partir desse método obteve-se a curva de calibração, na faixa de concentração de 50 a 200 ($\mu\text{g}/\text{mL}$), e obteve-se a equação da reta ($y = 5,88 \cdot 10^6 x - 7,06 \cdot 10^{-4}$; $r^2 = 0,992$), com a qual foi possível quantificar CM nas

alíquotas retiradas dos testes de liberação *in vitro*. Os cromatogramas eram analisados comparando-se o tempo de retenção do pico e o espectro de UV das amostras com os dados do padrão analítico da CM.

2.3.7 Testes de liberação *in vitro* da CM

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária por meio da Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 31 dispõe sobre a realização de Estudos de Equivalência Farmacêutica e de Perfil de Liberação Comparativo e com isso determina-se que os testes de liberação sejam realizados em pelo menos três pH diferentes e em condições laboratoriais específicas (BRASIL, 2010).

O teste de liberação foi realizado nos pHs de 2,0; 4,5 e 6,86, a fim de simular o que ocorre no sistema gastrointestinal. Para isso, utilizou-se soluções tamponantes preparadas de acordo com a Farmacopeia Brasileira (2019). No teste com o pH 2,0 preparou-se uma solução de ácido clorídrico, no pH 4,5 preparou-se o tampão acetato de sódio e para o pH 6,5 preparou-se o tampão fosfato.

O teste foi realizado por 7 h e durante este período foram retiradas alíquotas (9 pontos de coleta), em intervalos de tempo pré-determinados (0,25; 0,5; 0,75; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7 h) para quantificação de CM liberada. Os testes foram realizados na temperatura de 37° C, sob agitação constante de 200 rpm e em cada ponto de coleta foram retiradas alíquotas de 1 mL, com reposição do meio. A concentração de CM livre nas amostras foi determinada a partir da análise por CLAE-DAD.

2.5 Análise estatística

Os espectros foram obtidos pelo software LC-Solution® 1.0 (SHIMADZU®) e plotados no OriginPro versão 8.0 (OriginLab®). As análises dos dados foram realizadas utilizando os softwares Microsoft Excel® (Microsoft Office®), OriginPro versão 8.0 (OriginLab®) e os resultados quantitativos expressos em média \pm desvio padrão. Já nos testes de liberação os resultados

foram expressos como a porcentagem de CM liberada \pm desvio padrão de três repetições por ensaio.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização do sistema A

Esse sistema de proporção 1:4:2 (Zn:2MIm:CM) foi caracterizado inicialmente, pela técnica de MEV e para devida comparação foi analisado também a ZIF-8 e a mistura física 1:1 (MF). Observa-se nas imagens abaixo a morfologia da ZIF-8 utilizando-se um aumento 5.000 x (Fig. 1 a), um padrão morfológico irregular, ou seja, varia entre rômbo dodecaédrico e arredondado (TANG et al., 2017; HOOP et al., 2018). Na Figura 1 b, observa-se a morfologia da MF (aglomerado) e partir disso pode-se afirmar que, as estruturas cristalinas irregulares na superfície seriam da CM. Na Figura 1 c, observa-se a morfologia do sistema que se caracteriza como regular e semelhante ao da ZIF-8. Outro ponto é que não se observa cristais de CM na superfície demonstrando que o processo de lavagem com metanol retirou toda a CM que não teria sido incorporada.

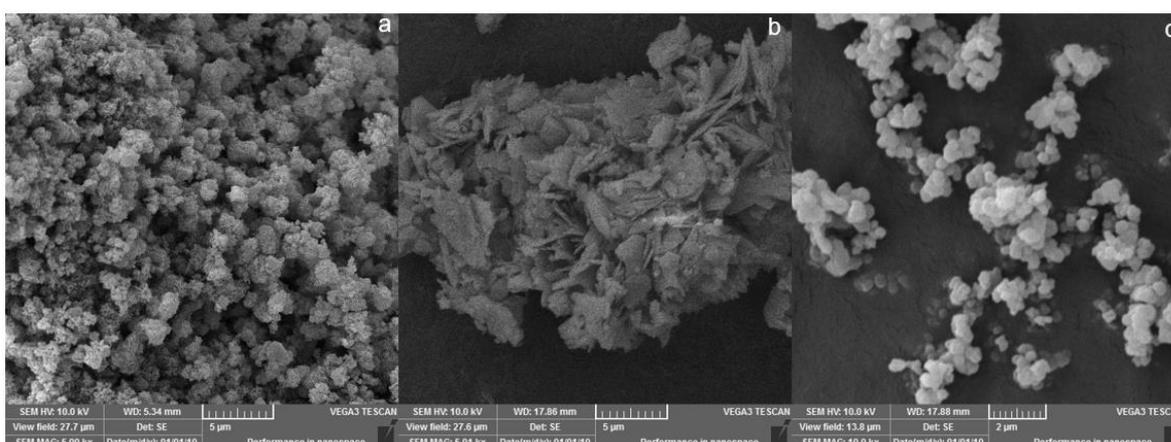


Fig.1. MEV da ZIF-8 (a- 5000x), MF (b- 5000x) e CM:ZIF-8 (c-10000x).

Outra técnica utilizada para caracterizar o sistema obtido foi a de FTIR e os dados foram analisados comparando-se o espectro do sistema obtido com o da ZIF-8. O espectro da ZIF-8 (Fig. 2) apresenta estiramentos característicos deste tipo de MOF, quando se leva em consideração as bandas de absorção típicas das ligações C-H (aromático), C=C e C-N. As bandas oriundas das vibrações de estiramento C-H, foram observadas em 3188 cm^{-1} ; enquanto para a ligação C=C, observou-se uma banda em 1702 cm^{-1} ; para C-N, foi observado a banda com frequência de 1285 cm^{-1} ; e a banda de absorção referente a ligação Zn-N foi observada em 414 cm^{-1} .

Ao comparar o espectro do sistema obtido com o da ZIF-8 (Figura 2), observou-se que este apresenta também algumas bandas características da cumarina, como visto no capítulo anterior, além das bandas da ZIF-8. Desse modo, observou-se bandas da ZIF-8 em: 3196 cm^{-1} referente à ligação C-H; em 1302 cm^{-1} correspondente a ligação C-N (menor intensidade); e uma banda média com frequência de 421 cm^{-1} característica da ligação Zn-N. Já as bandas típicas da cumarina foram observadas em: 1720 cm^{-1} referente à ligação C-O; outra banda em 1614 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação C=C; e duas bandas com frequência de 743 e 822 cm^{-1} , referentes ao dobramento fora do plano da ligação =C-H. Assim, foi possível evidenciar no espectro do sistema obtido, bandas tanto da cumarina como da ZIF-8, sem alterações significativas de intensidade assim como na frequência, o que sugere que não ocorreu formação do sistema pretendido.

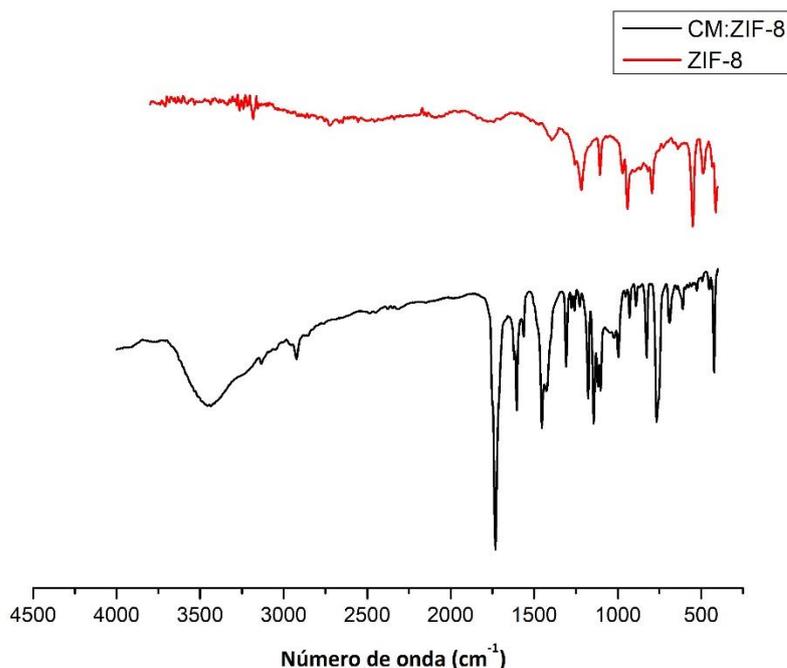


Fig.2. Espectros de FTIR do CM:ZIF-8 e ZIF-8.

Para o teste de liberação do sistema (1:4:2) levou-se em consideração a taxa de carregamento obtida que foi 37,56%. Na Figura 3, tem-se os perfis de liberação da CM a partir do sistema desenvolvido nos pH 2,0; 4,5 e 6,86. Observa-se um perfil de liberação diferente do observado para CM pura, pois não se observa o efeito *burst* de liberação. No pH 2,0 a liberação ocorreu de maneira muito lenta, na primeira hora de experimento ocorreu liberação de 5,30% e ao final das 7 h a liberação foi de 5,50%.

No pH 4,5 a liberação ocorreu de maneira semelhante ao pH anterior, na primeira hora obteve-se 4,65% e ao final do experimento foi liberado 5,29%. No pH de 6,86 a liberação ocorreu semelhante aos pHs anteriores, mas com um percentual de CM menor sendo liberado, na primeira hora foi de 4,25% e ao final das 7 h, foi liberado 5,30%. Desse modo, foi possível observar que o percentual liberado é pequeno diante do que foi incorporado à estrutura de ZIF-8 e que independe do pH do meio.

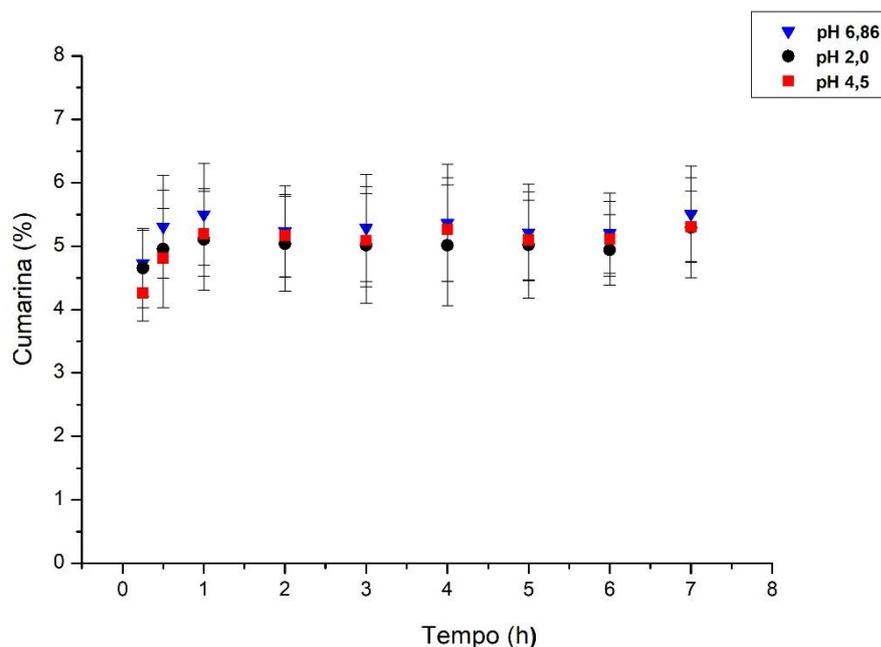


Fig.3. Perfis de liberação *in vitro* de CM:ZIF-8 (sistema A).

3.2 Caracterização do sistema B

Para o teste de liberação do sistema (1:35:0,0003) levou-se em consideração a taxa de carregamento obtida que foi 10,48%. Na Figura 4, tem-se os perfis de liberação da CM a partir do sistema desenvolvido nos pH 2,0; 4,5 e 6,86. Observa-se um perfil de liberação diferente do observado para CM pura, pois não se observa o efeito *burst* de liberação. No pH 2,0 a liberação ocorreu de maneira muito lenta, na primeira hora de experimento ocorreu liberação de 4,51% e ao final das 7 h a liberação foi de 4,59%.

No pH 4,5 a liberação ocorreu de maneira semelhante ao pH anterior, na primeira hora obteve-se 4,67% e ao final do experimento foi liberado apenas 4,23%. No pH de 6,86 a liberação ocorreu semelhante aos pHs anteriores, na primeira hora foi de 4,79% e ao final das 7 h, foi liberado 4,29%. Observa-se que nos pHs de 4,5 e 6,86 além de ser uma liberação pequena ela foi ainda menor no fim do experimento. Os dados demonstram que não se obteve um sistema. Levando-se em consideração que houve um pequeno percentual de CM liberada diante do que foi incorporado e que a mesma ocorreu independente da variação de pH.

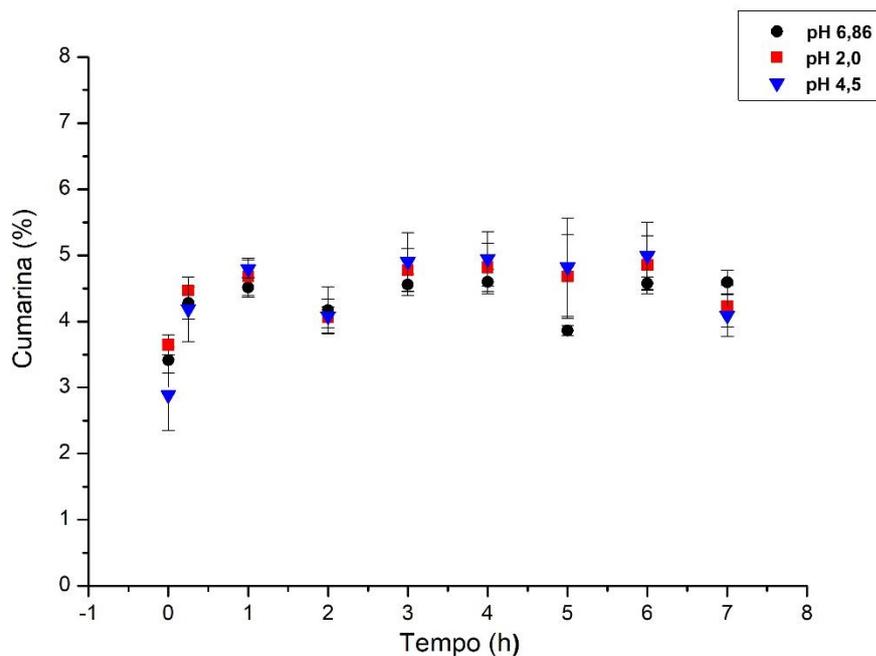


Fig.4. Perfis de liberação *in vitro* de CM:ZIF-8 (sistema B).

4 CONCLUSÃO

Esse trabalho é a primeira pesquisa, que se tem conhecimento, na qual tinha-se como objetivo o desenvolvimento de um Sistema *Drug Delivery* com a cumarina utilizando-se a ZIF-8 como carreador. Em resumo, por meio das técnicas de caracterização evidenciou-se até então que não houve a formação do sistema CM:ZIF-8. Porém, acredita-se que há potencial para o desenvolvimento de um DDS com essa cumarina.

REFERÊNCIAS

ALVES, A. E. G. **Obtenção de sistema microparticulado benzimidazol:ZIF8 para liberação prolongada otimizando o tratamento da doença de chagas** 2016. 128 f. Tese (Mestrado em Ciências de Materiais) - Programa de Pós-Graduação de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.

AHMED, E. Y. *et al.* VEGFR-2 inhibiting effect and molecular modeling of newly synthesized coumarin derivatives as anti-breast cancer agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 5, p. 115328, 2020.

AZEVEDO, L. F. M. DE *et al.* Electrochemical oxidation, adsorption and quantification of 1,2-benzopyrone employing a glassy carbon electrode. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 3, p. 469–477, 2014.

BRASIL. Resolução RDC nº 31 de 11 de agosto de 2010. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, DF, 11 agosto, 2010. Seção 2, p.04.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**, 6. ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 2019. p. 01-874. v. 1. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/farmacopeia> >. Acesso em: 12 set. 2019.

BARREIRO, E.J. *et al.* Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos, 3ª Ed. Porto Alegre, Ed. Artmed, p. 24-28, 2015.

BERTOLDI, F. C. *et al.* Validação de um método analítico rápido por CLAE-UV para determinação de cumarina em guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) confirmado com espectrometria de massas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 1, p. 316–325, 2016.

FURUKAWA, H. *et al.* The Chemistry and Applications of Metal-Organic Frameworks. **Science**, v. 341, p. 1- 14. 2013.

GAO, L. *et al.* Recent advancement of imidazolate framework (ZIF-8) based nanoformulations for synergistic tumor therapy. **Nanoscale**, v. 11, n. 44, p. 21030–21045, 2019.

GARCÍA-ARIETA, A. Interactions between active pharmaceutical ingredients and excipients affecting bioavailability: Impact on bioequivalence. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 65, p. 89–97, 2014.

HOOP, M. *et al.* Biocompatibility characteristics of the metal organic framework ZIF-8 for therapeutical applications. **Applied Materials Today**, v. 11, p. 13–21, 2018.

- KAUR, H. et al. Synthesis and characterization of ZIF-8 nanoparticles for controlled release of 6-mercaptopurine drug. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 41, p. 106–112, 2017.
- MOLINSPIRATION, Calculation of Molecular Properties and Bioactivity Score. Disponível em: <http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>. Acessado em: 02 de novembro de 2019.
- QIN, Y. T. et al. PH-Responsive Polymer-Stabilized ZIF-8 Nanocomposites for Fluorescence and Magnetic Resonance Dual-Modal Imaging-Guided Chemo-/Photodynamic Combinational Cancer Therapy. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 11, n. 37, p. 34268–34281, 2019.
- RAMANITRAHASIMBOLA, D. et al. Bronchodilator activity of *Phymatodes scolopendria* (Burm.) Ching and its bioactive constituent. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, n. 3, p. 400–407, 2005.
- RODRIGUES, R. F. et al. Coumarin solubility and extraction from emburana (*Torresea cearensis*) seeds with supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 43, n. 3, p. 375–382, 2008.
- SRIKRISHNA, D.; GODUGU, C.; DUBEY, P. K. A Review on Pharmacological Properties of Coumarins. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 2, p. 113-141, 2018.
- SUN, C-Y. et al. Metal-organic frameworks as potential drug delivery systems. **Expert Opinion Drug Delivery**.v.10, n. 1, p. 89-101, 2013.
- TANG, L. et al. Coordination polymer nanocapsules prepared using metal–organic framework templates for pH-responsive drug delivery. **Nanotechnology**, v. 28, n. 27, p. 275601, 2017.
- TIWARI, A. et al. Curcumin encapsulated zeolitic imidazolate frameworks as stimuli responsive drug delivery system and their interaction with biomimetic environment. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 12598, 2017.
- WANG, L. et al. Simultaneous determination of umbelliferone and scopoletin in Tibetan medicine *Saussurea laniceps* and traditional Chinese medicine *Radix angelicae pubescentis* using excitation-emission matrix fluorescence coupled with second-order calibration method. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 170, p. 104–110, 2017.
- ZHANG, H.; ZHAO, M.; LIN, Y. S. Stability of ZIF-8 in water under ambient conditions. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 279, n. October 2018, p. 201–210, 2019.
- ZHUANG, J. et al. Optimized metal-organic-framework nanospheres for drug delivery: Evaluation of small-molecule encapsulation. **ACS Nano**, v. 8, n. 3, p. 2812–2819, 2014.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este foi primeiro estudo do qual se tem conhecimento que tinha como objetivo o desenvolvimento de *Drug Delivery Systems* utilizando-se como substâncias principais, duas cumarinas e como carreador a ZIF-8. Havia de antemão um desafio.

Primeiramente, a partir da realização da revisão sistemática de literatura confirmou-se que a escopoletina apresenta uma ampla variedade de atividades farmacológicas fazendo desta molécula uma boa candidata à estudos mais detalhados. A partir desta revisão foram selecionados dos 25 artigos com os quais observou-se que a ESC apresenta as atividades: anti-inflamatória e antioxidante; antidiabética; antidislipidêmica; antibacteriana e antifúngica; anti-hipertensivo; inibição da monoaminoxidase; antipsicótica; neuroprotetora; esclerose múltipla; citotóxica; melanogênese; antiangiogênica e antienvhecimento. Assim, tendo em vista o potencial terapêutico da escopoletina, esta substância seria um bom candidato no desenvolvimento de um medicamento.

No estudo de desenvolvimento de um novo *Drug Delivery System* com a escopoletina e ZIF-8, foi possível obter o sistema ESC:ZIF-8 em condições *in situ* por um método rápido e eficiente. As técnicas de DRX, MEV, RMN, FTIR, TG, DSC e CLAE-DAD confirmaram a formação deste sistema. Outro ponto relevante é que o sistema apresentou uma taxa de carregamento de ESC satisfatória e um perfil de liberação prolongada pH dependente. Este estudo demonstrou ainda, que a ESC apresenta uma atividade expectorante, demonstrando com isso o seu grande potencial terapêutico. No entanto, o sistema desenvolvido não apresentou efeito quando comparado com a ESC livre, sob as mesmas condições experimentais. Ainda assim, o DDS ESC:ZIF-8 apresenta um potencial farmacológico, exigindo estudos mais detalhados a este respeito.

No estudo de caracterização da cumarina (1,2 benzopirona) foi de fundamental importância para o conhecimento da substância e servindo como base para o desenvolvimento do DDS. Desse modo, foi possível obter informações relevantes quanto ao perfil cristalino, análise térmica e bandas

características desse composto. Além disso, reuniu informações quanto ao perfil de liberação em diferentes pHs fato este, de fundamental importância como conhecimento prévio para o desenvolvimento de um DDS com esta cumarina. Os dados farmacológicos a priori demonstraram que a cumarina não apresenta atividade expectorante. No entanto, apresentou atividade antitussígena fazendo deste composto um potencial biológico a ser mais explorado em outros estudos.

Já no estudo de desenvolvimento de DDS com a cumarina e ZIF-8 como carreador, evidenciou-se por meio das técnicas de caracterização que não houve a formação do sistema CM:ZIF-8. Porém, acredita-se que há potencial para o desenvolvimento de um DDS com esta cumarina como obteve-se com a escopoletina.

ANEXO A- Depósito de Patente

28/11/2019 870190124594
12:36

29409161811251012

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2019 025109 3

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 3

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica**CPF/CNPJ:** 24134488000108**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa**Endereço:** Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária**Cidade:** Recife**Estado:** PE**CEP:** 50670-901**País:** Brasil**Telefone:** (81)2126 8959**Fax:** (81)2126 8959**Email:** patentes_dine.propesq@ufpe.br

ANEXO B- Artigo Publicado

DOI: 10.1016/j.jddst.2020.102131

Journal of Drug Delivery Science and Technology xxx (xxxx) xxx



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Drug Delivery Science and Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jddst

Research paper

Development and characterization of the zeolite imidazolate framework for a modified release of the drug scopoletin

Pedrita Alves Sampaio^{a,b}, Stephany Conceição Serafim^{a,b}, Pedro Modesto Nascimento Menezes^{b,c}, Emanuella Chiara Valença Pereira^{a,b}, Pedro Guilherme Sousa de Sá^a, José Marcos Teixeira de Alencar Filho^{a,b}, Raimundo Gonçalves de Oliveira Júnior^d, Pedro José Rolim Neto^e, James Almada da Silva^f, Larissa Araújo Rolim^{a,*}

^a Federal University of São Francisco Valley, Analytical Center of Drugs, Medicines and Food, Petrolina, PE, Brazil^b Federal Rural University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil^c Federal University of São Francisco Valley, Laboratory of Experimental Pharmacology, Petrolina, PE, Brazil^d La Rochelle Université, La Rochelle, France^e Federal University of Pernambuco, Laboratory of Medication Technology, Recife, PE, Brazil^f Federal University of Sergipe, Natural Products Chemistry Laboratory, Lagarto, SE, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Delayed-action preparations
Responsive pH
Coumarins
Scopoletin
Expectorant
Metal-organic frameworks

ABSTRACT

Scopoletin (7-hydroxy-6-methoxychromen-2-one, SC) is a phenolic coumarin commonly found in some medicinal plants. This compound presents relevant literature data demonstrating its anti-inflammatory, antioxidant, anti-tumor, hypocholesterolemic and hypoglycemic activities. SC was loaded *in situ* into the Zeolitic Imidazolate Framework-8 (ZIF-8), a slow-releasing material with pharmaceutical application. Both ZIF-8 and SC:ZIF-8 drug delivery systems (DDS) were characterized by x-ray diffraction (XRD), scanning electron microscopy (SEM), nuclear magnetic resonance (NMR), thermogravimetry (TG), differential scanning calorimetry (DSC) and Fourier transform infrared (FTIR). The quantification of SC in the solution was performed by high-performance liquid chromatography with diode-array detection (HPLC-DAD) and the release profile at pHs 4.5 and 6.5 was compared under non-sink conditions of SC and SC:ZIF-8 DDS. Expectorant activity was also evaluated. The SC:ZIF-8 DDS showed an encapsulation efficiency of 22.5%. A pH-dependent release profile of SC present in the DDS was observed when compared to the pure SC. The most suitable kinetic model for pure SC at both pHs 4.5 and 6.5 was the Korsmeyer-Peppas model. For SC:ZIF-8 DDS at pH 4.5, the best model was the Korsmeyer-Peppas, but at pH 6.5 it was Peppas-Sahlin. SC also presented expectorant activity at 30 and 100 mg/kg doses, but the system did not show expectorant activity at 10 mg/kg dose.

1. Introduction

Scopoletin (7-hydroxy-6-methoxychromen-2-one, C₁₀H₈O₄) is a phenolic coumarin found in different medicinal plant species such as *Erycibe obtusifolia*, *Aster tataricus* and *Poenicium vulgare* [1]. Several studies have showed important pharmacological activities, such as antioxidant and anti-inflammatory [2,3], anti-cancer [1,4], antitumor [5], anti-diabetic [6], melanogenesis induction [7], selective monoamine oxidase inhibitor [8] and anti-aging [9]. Another important study with scopoletin showed the influence of this coumarin on the release of inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6 and IL-8). This fact highlights the possible relationship between SC activity on different inflammatory

diseases, such as asthma, osteoarthritis and rheumatoid arthritis [10]. A more recent study has showed that this molecule has effectively ameliorated an experimental autoimmune encephalomyelitis framework (multiple sclerosis animal model) [11].

Previous pharmacological reports point out scopoletin as a potential drug candidate. Moreover, its physicochemical characteristics and its low water solubility [12] make this molecule interesting for the incorporation into drug delivery systems. These systems are one of the most promising applications for human health care and stand out as a constantly evolving field of pharmaceutical technology. In this research field, the crucial challenge is the search for non-toxic and efficient carriers. So far, different strategies have been studied for biological

* Corresponding author.

E-mail address: rolim.lar@gmail.com (L.A. Rolim).<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102131>

Received 12 August 2020; Received in revised form 24 September 2020; Accepted 26 September 2020

Available online 6 October 2020

1773-2247/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

ANEXO C- Autorização do CEUA-UNIVASF



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
MINISTÉRIO DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Certificado de autorização

Certificamos que a proposta intitulada: "DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA DE LIBERAÇÃO MODIFICADA DE ESCOPOLETINA-ZIF-8 COM ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIASMÁTICA", registrada com o nº 0017/270219, sob a responsabilidade de Larissa Araújo Rolim - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal do Vale do São Francisco - UNIVASF, em 27/02/2019.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/06/2019 a 31/12/2020
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus</i>
Nº de animais	331
Peso/Idade	30 - 40g/ 6 - 8 semanas
Sexo	321 M; 10 F
Origem	Biotério da UNIVASF, Campus Ciências Agrárias

Em: 10/04/2019

KARINE VIEIRA ANTUNES
Coordenadora do Comitê de Ética no Uso de Animais
CEUA/UNIVASF