

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA – CAMPUS GOVERNADOR
VALADARES
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
BIOLOGIA MOLECULAR**

BOLIVAR RALISSON AMARO

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E DO POTENCIAL ANTITUMORAL DOS
COMPLEXOS DE INCLUSÃO DE OFLOXACINO COM CICLODEXTRINAS**

GOVERNADOR VALADARES - MG

2019

Bolivar Ralisson Amaro

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E DO POTENCIAL ANTITUMORAL DOS
COMPLEXOS DE INCLUSÃO DE OFLOXACINO COM CICLODEXTRINAS**

Dissertação de mestrado apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre pelo Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Juiz de Fora *campus* Governador Valadares.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Sandra Bertelli Ribeiro de Castro

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Fabiana Simão Machado

GOVERNADOR VALADARES - MG

2019

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Amaro, Bolivar Ralisson.

Síntese, caracterização físico-química e avaliação da atividade antibacteriana e do potencial antitumoral dos complexos de inclusão de ofloxacino com ciclodextrinas / Bolivar Ralisson Amaro. -- 2019. 111 f.

Orientador: Sandra Bertelli Ribeiro de Castro

Coorientadora: Fabiana Simão Machado

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Avançado de Governador Valadares, Instituto de Ciências da Vida - ICV. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, 2019.

1. Ofloxacino. 2. Ciclodextrinas. 3. Complexos de inclusão. 4. A549. I. Castro, Sandra Bertelli Ribeiro de, orient. II. Machado, Fabiana Simão, coorient. III. Título.

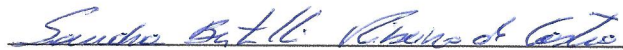
Bolivar Ralisson Amaro

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E DO POTENCIAL ANTITUMORAL DOS
COMPLEXOS DE INCLUSÃO DE OFLOXACINO COM CICLODEXTRINAS**

Dissertação de mestrado apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre pelo Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Juiz de Fora *campus* Governador Valadares.

Aprovada em 09 de ABRIL de 2019

BANCA EXAMINADORA

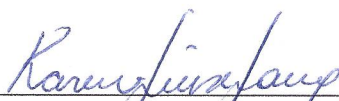


Dra. Sandra Bertelli Ribeiro de Castro - Orientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora-UFJF-Governador Valadares

Dra. Fabiana Simão Machado - Coorientadora
Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG



Dra. Ana Candida Araújo e Silva
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri-UFVJM



Dra. Karen Luise Lang
Universidade Federal de Juiz de Fora-UFJF-Governador Valadares

Dedico este trabalho à Deus, aos meus pais, Roberto Amaro e Maria Aparecida, meu irmão Roniele José de Almeida Amaro e à minha sobrinha, Beatriz Roberta.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, por me conceder e permitir cumprir mais essa etapa da minha vida, dando condições de lutar e alcançar os objetivos pretendidos. Agradeço por cada momento, as alegrias e tristezas, as derrotas e vitórias. Aprendi muito e com eles eu cresci!

À minha orientadora professora Dr^a. Sandra Bertelli Ribeiro de Castro, por mais que eu possa dizer e agradecer aqui, é pouco diante da sua competente orientação, amizade, confiança, boa vontade e incentivo que sempre me ofereceu.

À professora Dr^a. Fabiana Simão Machado (coorientadora) por ter se colocado a disposição de co-orientar e por todo incentivo para a realização deste trabalho.

Aos colaboradores, que não foram poucos, mas que também sem eles não seria possível a realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Caio Cesar Alves que não mediu esforços em estar vindo muitas vezes para Governador Valadares para contribuir e colaborar na realização dos experimentos.

Ao professor Dr. Ângelo Márcio Leite Denadai pela imensa ajuda e colaboração na realização da caracterização físico-química dos complexos, além de toda ajuda em diversas dúvidas que surgiram durante a realização deste trabalho.

À professora Dr^a. Gabriela Freitas por toda contribuição, ideias e incentivo na realização dos experimentos na parte microbiológica.

Ao professor Dr. Jeferson Gomes da Silva, que sempre prestativo, esclareceu minhas dúvidas e ajudou em alguns experimentos, que sozinho eu não conseguiria realizar.

Ao departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora, na pessoa do professor Mauro Vieira de Almeida, pela imensa contribuição com a caracterização por RMN.

A minha família. Meu porto seguro! A ela dedico este trabalho! Meu pai (Roberto Amaro) e minha mãe (Maria Aparecida de Almeida Amaro) que são minhas inspirações, meus modelos e que me faz ver que dá tudo certo e que eu posso. Meu irmão (Roniele José de Almeida Amaro), que mais que tudo é meu amigo. À minha sobrinha (Beatriz Roberta) que me alegrou e me distraiu nesses momentos, que muitas vezes não foram fáceis. Minha avó, tias, tios e primos. Obrigado a todos pelo companheirismo.

Aos amigos de trabalho do Departamento de Farmácia da UFJF-GV, Ana Maria, Leticia, Vanessa Medeiros, Vanessa Bittencourt, Juliano, Cristhian Kele e Wtemberg pela amizade, contribuição, cooperação, incentivo e compreensão nesse período de realização deste trabalho. Obrigado por todo apoio que me deram.

A todos meus amigos pelas palavras nas horas difíceis, pelas companhias, pela compreensão das ausências e dos momentos de estresse. Muito obrigado, pois vocês tornaram essa caminhada mais fácil e agradável.

Às companheiras acadêmicas, Vanessa e Áquila, pela longa caminhada percorrida juntos, não só o mestrado, mas graduação, curso técnico. Muito obrigado mesmo, pelos bons momentos vividos, pelas angústias e preocupações divididas. E hoje posso dizer que conquistamos juntos essa vitória.

Às companheiras de experimento, Elaine e Paloma, posso dizer que esse título também é de vocês. Sem a ajuda de cada uma, acho que não seria possível estar concluindo essa etapa hoje. Meu muito obrigado por tudo.

Aos professores do mestrado, que contribuíram muito, sendo também responsáveis pela conclusão dessa etapa em minha vida.

Às alunas de iniciação científica e treinamento profissional, Marcela, Jéssica, Cleonice e Bárbara, pela ajuda e companhia durante a realização dos experimentos.

Ao Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular, e à Universidade Federal de Juiz de Fora – *campus* Governador Valadares pela oportunidade oferecida.

À FAPEMIG, CNPq, CAPES, pelo fomento aos equipamentos e bolsas de iniciação científica.

Aos membros da banca examinadora da qualificação e da defesa pelas valiosas opiniões e sugestões.

A todos, que direta ou indiretamente me ajudaram na realização deste trabalho, seja com qualquer tipo de ajuda ou com o incentivo que recebia diariamente. Muito obrigado!

Posso todas as coisas naquele que me fortalece. (Filipenses 4:13)

RESUMO

O ofloxacino (OFLOX) é um antibiótico de segunda geração da classe das fluoroquinolonas com amplo espectro de ação bactericida contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, eliminando-as através da inibição da DNA girase e topoisomerase IV. Além de seu efeito bactericida, diversas fluoroquinolonas e seus derivados sintéticos demonstram atividade citotóxica em diferentes linhagens de células tumorais, apresentando-se como agentes promissores para o tratamento de câncer. Na tentativa de desenvolver, ou até mesmo melhorar as características dos fármacos já existentes, a inclusão em ciclodextrinas de fármacos pouco solúveis em água tem se destacado devido à melhora na solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade. Portanto, o objetivo desse trabalho foi sintetizar, caracterizar e avaliar a melhora da atividade antibacteriana e antitumoral do OFLOX após inclusão em β CD e HP β CD. A caracterização físico-química foi realizada por espectroscopia de infravermelho, ressonância magnética nuclear de ^1H (RMN de ^1H), análise térmica, titulação calorimétrica isotérmica (ITC) e espalhamento dinâmico de luz (DLS). Para os ensaios biológicos realizou-se a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e avaliação da curva de morte em *E. coli* e *S. aureus*, o ensaio de citotoxicidade pelo método do MTT e avaliação de apoptose por citometria de fluxo das células A549 após tratamento com os complexos de inclusão (CI's). Através dos resultados de infravermelho, análise térmica e RMN de ^1H foi possível verificar a ocorrência da inclusão do OFLOX em ambas as ciclodextrinas. Os dados termodinâmicos obtidos por ITC mostraram a formação de CI's com estequiometria 1:1, sendo os processos espontâneos e com valores distintos para as constantes de associação. Através do DLS avaliou-se o tamanho dos CI's, e esses apresentaram um menor tamanho quando comparado ao OFLOX. Com relação aos testes biológicos *in vitro*, as CIM's dos CI's foram menores para as linhagens bacterianas testadas, porém o perfil de morte permaneceu o mesmo que o OFLOX. No ensaio de citotoxicidade foi possível observar que os CI's foram capazes de reduzir a viabilidade de células A549, apresentando melhor resultado quando comparados com o OFLOX. A morte causada nessas células foi em sua maioria por apoptose. Os resultados demonstram a melhor atividade antimicrobiana e antitumoral dos CI's. Maiores estudos são necessários para confirmar o uso destes CI's como futuros candidatos para o tratamento dessas enfermidades.

Palavras-chave: Ofloxacino, Ciclodextrinas, Complexos de inclusão, A549.

ABSTRACT

The ofloxacin (OFLOX) is a second-generation antibiotic of the fluoroquinolone class with a broad spectrum of action against Gram-negative and Gram-positive bacteria, killing them by the inhibition of DNA gyrase and topoisomerase IV. In addition to its bactericidal activity diverse fluoroquinolones, and their synthetic derivatives, shown a cytotoxic effect in different tumor cell lines, being as promising agents for the treatment of cancer. In the attempt to develop, or even improve the characteristics of existing drugs, the inclusion of poorly water soluble drugs in cyclodextrins has been highlighted due to the improvement in solubility, stability and bioavailability. Therefore, the objective of this work was to synthesize, characterize and evaluate the improvement of the anti-bacterial and antitumor activity of OFLOX after inclusion in β CD and HP β CD. The physico-chemical characterization was performed by infrared spectroscopy, nuclear magnetic resonance of ^1H (NMR of ^1H), thermal analysis, isothermal calorimetric titration (ITC) and dynamic light scattering. The minimum inhibitory concentration (MIC), death curve evaluation, MTT cytotoxicity assay and apoptosis by flow cytometry of inclusion complexes (IC's) were performed for the biological assays. Through the results of infrared, thermal analysis and NMR of ^1H it was possible to verify the occurrence of inclusion of OFLOX in both cyclodextrins. The thermodynamic data obtained by ITC showed the formation of IC's with 1:1 stoichiometry, being the spontaneous processes and with different values for the association constants. Through the DLS the size of the ICs was evaluated, and these presented a smaller size when compared to OFLOX. In relation to the *in vitro* biological tests, the MIC of the IC's was lower for the tested bacterial strains, but the death profile remained the same as to pure OFLOX. In the cytotoxicity assay, it was possible to observe that the IC's were able to reduce the viability of A549 cells, presenting better results when compared to OFLOX. The death caused in these cells was mostly by apoptosis. The results showed better antimicrobial and anticancer activities of the IC's. Further studies are necessary to prove the use of these IC's as candidates to treating these pathologies.

Key words: Ofloxacin; Cyclodextrin; Inclusion complex; A549.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Resumo da relação estrutura-atividade do ofloxacino.	20
Figura 2	Estrutura, função principal da DNA girase e topoisomerase IV e ponto de inibição realizado pelo ofloxacino.	23
Figura 3	Estrutura química das ciclodextrinas naturais e representação estrutural de uma unidade glicosídica na conformação de cadeira.	34
Figura 4	Estrutura química da HP β CD.	35
Figura 5	Representação esquemática da formação do CI com ciclodextrina.	37
Figura 6	Fluxograma dos experimentos de caracterização físico-química dos CI's.	40
Figura 7	Fluxograma dos experimentos de atividades biológicas dos CI's.	41
Figura 8	Representação esquemática da placa de microdiluição do OFLOX.	44
Figura 9	Representação esquemática da placa de curva de morte.	45
Figura 10	Esquema do plaqueamento no experimento de curva de morte.	46
Figura 11	Correlação do espectro de FITR do OFLOX com seus principais grupos funcionais.	50
Figura 12	Espectros de infravermelho do OFLOX, β CD, MM e β CD/OFLOX na região 4000 a 400 cm^{-1} em KBr.	51
Figura 13	Espectros de infravermelho do OFLOX, HP β CD, MM e HP β CD/OFLOX na região 4000 a 400 cm^{-1} em KBr.	52
Figura 14	Curva de TG para OFLOX, β CD, MM e β CD/OFLOX.	54
Figura 15	Curva de DTA para OFLOX, β CD, MM e β CD/OFLOX.	55
Figura 16	Curva de TG para OFLOX, HP β CD, MM e HP β CD/OFLOX.	57
Figura 17	Curva de DTA para OFLOX, HP β CD, MM e HP β CD/OFLOX.	59
Figura 18	ITC da β CD (20 mM em DMSO:H ₂ O (40:60)) em solução de OFLOX (1 mM em DMSO:H ₂ O (40:60)) a 25 °C.	60
Figura 19	ITC da HP β CD (20 mM em DMSO:H ₂ O (40:60)) em solução de OFLOX (1 mM em DMSO:H ₂ O (40:60)) a 25 °C.	62
Figura 20	Espectros de RMN de ¹ H da β CD, β CD/OFLOX e OFLOX em D ₂ O, 500 MHz.	64
Figura 21	Espectro de RMN de ¹ H do OFLOX em D ₂ O, 500 MHz.	64
Figura 22	Ampliação de alguns deslocamentos dos sinais de ¹ H da β CD/OFLOX, OFLOX e β CD.	66
Figura 23	Espectros de RMN de ¹ H da HP β CD, HP β CD/OFLOX e OFLOX em D ₂ O, 500 MHz.	67
Figura 24	Ampliação de alguns deslocamentos dos sinais de ¹ H da HP β CD/OFLOX e OFLOX.	68
Figura 25	Proposta de inclusão da molécula de OFLOX nas ciclodextrina (β CD e HP β CD).	69
Figura 26	Distribuição de tamanho de partículas em solução de OFLOX, β CD/OFLOX e HP β CD/OFLOX em função da concentração.	70
Figura 27	Curvas de morte de <i>Escherichia coli</i> (C10) geradas em diferentes	75

momentos. *E. coli* foram tratadas com OFLOX, β CD/OFLOX, HP β CD/OFLOX ou não tratadas.

- Figura 28** Curvas de morte de *Staphylococcus aureus* (C4) geradas em diferentes momentos. *S. aureus* foram tratadas com OFLOX, β CD/OFLOX, HP β CD/OFLOX ou não tratadas. 75
- Figura 29** Avaliação da citotoxicidade do OFLOX, β CD/OFLOX e HP β CD/OFLOX na concentração de 300 μ M, 100 μ M e 50 μ M. em células A549 com 48 horas de cultura. 76
- Figura 30** Avaliação da citotoxicidade do OFLOX, β CD/OFLOX, HP β CD/OFLOX na concentração de 300 μ M, 100 μ M e 50 μ M em células A549 com 72 horas de cultura. 78
- Figura 31** Avaliação da citotoxicidade da β CD e HP β CD na concentração de 300 μ M, 100 μ M e 50 μ M em células A549 com 72 horas de cultura. A Doxo (10 μ M) foi utilizada como controle de citotoxicidade. 80
- Figura 32** Porcentagem de apoptose em células A549 tratadas com OFLOX, β CD/OFLOX, HP β CD/OFLOX, β CD e HP β CD a 300 μ M em 36 horas. 82

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Concentrações do ofloxacino nos tecidos e fluidos após a administração oral em indivíduos saudáveis ou doentes que necessitaram de terapêutica antibacteriana.	21
Quadro 2	Atividade <i>in vitro</i> do ofloxacino em bactérias Gram-negativas, Gram positivas, anaeróbicas, atípicas e intracelulares.	26
Quadro 3	Exemplos de fármacos reposicionados ou em teste clínico para uso.	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Propriedades físico-químicas de algumas ciclodextrinas.	35
Tabela 2	Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho de β CD, OFLOX, MM e β CD/OFLOX.	51
Tabela 3	Principais modificações das bandas observadas no espectro de infravermelho de β CD/OFLOX.	52
Tabela 4	Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho de HP β CD, OFLOX, MM e HP β CD/OFLOX.	53
Tabela 5	Principais modificações das bandas observadas nos espectros de infravermelho de HP β CD/OFLOX.	53
Tabela 6	Principais eventos térmicos atribuídos para o OFLOX, β CD, MM e β CD/OFLOX.	55
Tabela 7	Principais eventos térmicos atribuídos para o OFLOX, HP β CD, MM e HP β CD/OFLOX.	58
Tabela 8	Parâmetros termodinâmicos de interação entre OFLOX e β CD (T = 25 °C).	61
Tabela 9	Parâmetros termodinâmicos de interação entre OFLOX e HP β CD (T = 25 °C).	62
Tabela 10	Deslocamentos químicos de hidrogênios (^1H) do OFLOX e β CD/OFLOX (D_2O , 500 MHz).	65
Tabela 11	Deslocamentos químicos de hidrogênios (^1H) da β CD e β CD/OFLOX (D_2O , 500 MHz).	65
Tabela 12	Deslocamentos químicos de hidrogênios (^1H) da HP β CD e HP β CD/OFLOX (D_2O , 500 MHz).	67
Tabela 13	Deslocamentos químicos de hidrogênios (^1H) do OFLOX e HP β CD/OFLOX (D_2O , 500 MHz).	68
Tabela 14	CIM do OFLOX, β CD/OFLOX e HP β CD/OFLOX frente às linhagens de <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> .	71
Tabela 15	CIM do β CD e HP β CD frente às linhagens de <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> .	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Å	Angström
A549	Linhagem celular de adenocarcinoma de pulmão humano
A431	Linhagem celular de carcinoma epidermóide humano
BMSC	Linhagem de células mesenquimais da medula óssea de rato
Caco2	Linhagem celular de adenocarcinoma colorretal humano
CC531	Linhagem celular de adenocarcinoma de cólon de rato
CHO	Linhagem de células de ovário de hamster chinês
CI	Complexo de inclusão
CIM	Concentração inibitória mínima
CIM ₉₀	Concentração inibitória mínima para 90% das cepas testadas
C _{max}	Concentração plasmática máxima
D ₂ O	Óxido de deutério (água deuterada)
ΔG	Energia livre de Gibbs
D _h	Diâmetro hidrodinâmico
ΔH	Variação de entalpia
DLS	Dynamic Light Scattering – Espalhamento de luz dinâmico
Δm	Variação de massa
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ΔS	Variação de entropia
DTA	Análise térmica diferencial
EMB	Eosina azul de metileno
FITC	Fluorescein isothiocyanate – Isotiocianato de fluoresceína
FTIR	Fourier-transform infrared spectroscopy – Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
HCT8	Linhagem celular de adenocarcinoma colorretal humano
Hep3B2.1-7	Linhagem celular de hepatocarcinoma humano
HepG2	Linhagem celular de hepatocarcinoma humano
HL60	Linhagem celular de leucemia promielocítica aguda humana
HPβCD	Hidroxipropil-beta-ciclodextrina
HPβCD/OFLOX	Complexo de inclusão de ofloxacino com hidroxipropil-beta-ciclodextrina
HT29	Linhagem celular de adenocarcinoma colorretal humano
HuDe	Linhagem de fibroblastos dérmicos humano
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50%
ITC	Isothermal Titration Calorimetry - Titulação calorimétrica isotérmica
K	Constante de associação

KBr	Brometo de potássio
L1210	Linhagem celular de leucemia linfocítica murina
MCF7	Linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano
MH	Mueller-Hinton
MHz	Megahertz
MLC8891	Linhagem de células prostáticas normais
MM	Mistura mecânica
MTT	Brometo de dimetiltiazol difeniltetrazólio
N	Estequiometria
PC3	Linhagem celular de adenocarcinoma de próstata humano
OFLOX	Ofloxacino
pKa	Negativo do logaritmo da constante de dissociação ácida
ppm	Partes por milhão
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN de ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RNA	Ácido ribonucleico
SMMC7721	Linhagem celular de hepatocarcinoma humano
SW403	Linhagem celular de adenocarcinoma colorretal humano
t _{1/2}	Meia-vida
T _i	Temperatura inicial
TG	Termogravimetria
T _f	Temperatura final
UFC	Unidade formadora de colônias
αCD	Alfa-ciclodextrina
βCD	Beta-ciclodextrina
βCD/OFLOX	Complexo de inclusão de ofloxacino com beta-ciclodextrina
γCD	Gama-ciclodextrina
Δδ	Variação de deslocamento químico
μM	Micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1	Ofloxacino: propriedades físico-química, farmacocinética e mecanismo de ação	19
2.1.1	Aspectos físico-químicos e farmacocinéticos	19
2.1.2	Mecanismo de ação	22
2.2	Atividade antibacteriana do ofloxacino	24
2.3	Reposicionamento de fármacos	30
2.3.1	Definição e exemplos de reposicionamento de fármacos	30
2.3.2	Atividade antitumoral das fluoroquinolonas	31
2.4	Formulações nanoestruturadas	33
3	OBJETIVOS	39
3.1	Objetivo geral	39
3.2	Objetivos específicos	39
4	MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1	Materiais	40
4.2	Métodos	40
4.2.1	Delineamento experimental	40
4.2.2	Síntese e caracterização físico-química	41
4.2.2.1	Obtenção dos complexos de inclusão e mistura mecânica	41
4.2.2.2	Espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier	42
4.2.2.3	Análises térmicas: termogravimetria e análise térmica diferencial	42
4.2.2.4	Titulação calorimétrica isotérmica	42
4.2.2.5	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio	43
4.2.2.6	Espalhamento dinâmico de luz	43
4.2.3	Avaliação das atividades biológicas	43
4.2.3.1	Determinação da concentração inibitória mínima dos complexos de inclusão	43
4.2.3.2	Avaliação da curva de morte de bactérias tratadas com os complexos de inclusão	45
4.2.3.3	Cultura de células A549	46
4.2.3.4	Avaliação da citotoxicidade dos complexos de inclusão em células A549	47
4.2.3.5	Avaliação de apoptose em células A549 tratadas com os complexos de inclusão	47
4.2.4	Análise estatística	48
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1	Espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier	49
5.2	Análises térmicas: termogravimetria e análise térmica	53

	diferencial	
5.3	Titulação calorimétrica isotérmica	59
5.4	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio	63
5.5	Espalhamento dinâmico de luz	69
5.6	Determinação da concentração inibitória mínima dos complexos de inclusão	71
5.7	Avaliação da curva de morte de bactérias tratadas com o ofloxacino e seus complexos de inclusão	74
5.8	Avaliação da citotoxicidade dos complexos de inclusão em células A549	76
5.9	Avaliação de apoptose em células A549 tratadas com os complexos de inclusão	81
6	CONCLUSÕES	85
	REFERÊNCIAS	86
	APÊNDICES	103

1. INTRODUÇÃO

A descoberta de novos fármacos tem se tornado cada vez mais necessária em função de diversos fatores, muitos associados ao envelhecimento global e à expansão das populações (BOUNTRA; LEE; LEZAUN, 2017), à resistência a antibióticos já conhecidos (LOUREIRO et al., 2016), às epidemias de doenças infecciosas tropicais negligenciadas (OMS, 2012) e doenças ainda incuráveis como as autoimunes, infecções virais, e muitos tipos de câncer (MA; YU, 2006). Para enfrentar esses desafios, muitos pesquisadores têm buscado novas moléculas a partir de diversas fontes, como fungos, bactérias, plantas, insetos e organismos marinhos, a fim de encontrar fármacos eficazes contra determinadas doenças estudadas (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

Sabe-se que a descoberta de novos fármacos é extremamente importante, porém o processo de pesquisa e desenvolvimento dos mesmos demanda muito dinheiro e tempo (CALIXTO; SIQUEIRA, 2008), podendo este processo ter duração de aproximadamente dezessete anos, desde a primeira etapa (descoberta de uma substância com atividade terapêutica) até a fase final dos estudos clínicos (LIMA et al., 2003). Visto estas dificuldades, novos estudos têm sido desenvolvidos por meio de tecnologia farmacêutica para realizar o aperfeiçoamento de medicamentos já existentes e que muitas vezes encontram-se obsoletos, pois foram substituídos por fármacos mais eficientes (KALEPU; NEKKANTI, 2015). Exemplo de um método encontrado pelos pesquisadores é o emprego das ciclodextrinas, que assume um impacto significativo como opção viável e segura para aperfeiçoar as características físico-químicas dos fármacos e conseqüentemente melhorar a solubilidade aquosa, biodisponibilidade e estabilidade das substâncias bioativas (SALTÃO; VEIGA, 2001).

Um fármaco que encontra-se pouco utilizado é o ofloxacino (OFLOX), pois muitos outros já foram lançados no mercado após o seu descobrimento. O OFLOX é uma fluoroquinolona de segunda geração que foi descoberta no ano de 1981 e atualmente essa classe de antibiótico está em sua quarta geração, com antibióticos que abrangem um maior espectro de ação e boas características farmacocinéticas (ANDRIOLE, 2005). Dentre os antibióticos dessa classe, o OFLOX, mesmo que antiga, é um dos que apresenta melhores parâmetros farmacocinéticos, como absorção após administração oral quase completa (biodisponibilidade entre 95 e 100%), ampla distribuição nos órgãos e fluidos corpóreos, baixa metabolização (aproximadamente 5%) e eliminação principalmente por via renal (LODE et al., 1987; MOUTON; LEROY, 1991).

Devido às características apresentadas pelo OFLOX e por ser um fármaco que já passou pelos testes pré-clínicos e clínicos exigidos para seu registro pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o estudo dessa molécula complexada com ciclodextrinas surge como um sistema promissor para elaboração de novas formulações contendo esse fármaco, além da possibilidade de serem avaliadas outras atividades biológicas do mesmo com suas propriedades físico-químicas melhoradas, visto que já é conhecida, por diversos estudos, a atividade antitumoral de algumas fluoroquinolonas (BISACCHI; HALE, 2016; IDOWU; SCHWEIZER, 2017).

Embora existam trabalhos do OFLOX complexado com ciclodextrinas (CHAO et al., 2014; LI; ZHANG, 2011; MISIUK; JOZEFOWICZ, 2015), os estudos que demonstram a vantagem da atividade biológica desta inclusão são escassos. Desta forma, o principal objetivo do presente trabalho foi complexar o OFLOX com β CD e HP β CD e comparar os dois complexos de inclusão (CI's) quanto às características físico-químicas e atividades biológicas. Todos os complexos foram caracterizados por espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), análise térmica, espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H (RMN de ^1H), titulação calorimétrica isotérmica (Isothermal Titration Calorimetry - ITC) e espalhamento dinâmico de luz (Dynamic Light Scattering - DLS). Para a avaliação da atividade biológica foram realizados experimentos *in vitro* em células de adenocarcinoma de pulmão (A549) e microbiológicos em *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), a fim de verificar o impacto da complexação no crescimento de células tumorais e microbianas.

2. REFERÊNCIAL TEÓRICO

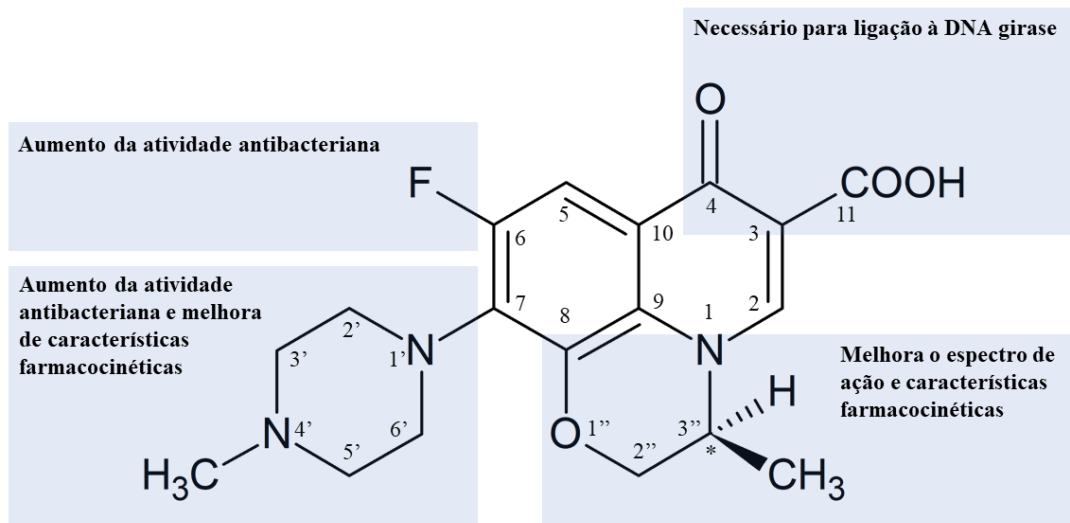
2.1 Ofloxacino: propriedades físico-químicas, farmacocinética e mecanismo de ação

2.1.1 Aspectos físico-químicos e farmacocinéticos

O OFLOX é um antibiótico de segunda geração da classe das fluoroquinolonas, quimicamente descrito pela *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) como ácido(9-fluor-2,3-diidro-3-metil-10-(4-metil-1-piperazinil)-7-oxo-7H-pirido [1,2,3-de]-1,4-benzoxazina-6-carboxílico). Possui fórmula molecular $C_{18}H_{20}FN_3O_4$, com massa molar de 361,37 g/mol e apresenta-se fisicamente como um pó amarelo pálido a amarelo brilhante, que se funde aproximadamente a 250 °C (AL-OMAR, 2009; FARMACOPEIA, 2010). Sua solubilidade em água varia de acordo com o pH, sendo 60 mg/mL em pH variando de 2 a 5 e 4 mg/mL em pH 7. Por possuir dois grupos funcionais ionizáveis é considerado um fármaco com caráter zwitteriônico, cujo pK_{a1} é 6,05 e pK_{a2} é 8,22, correspondendo à ionização do ácido carboxílico e ao nitrogênio do anel piperazina, respectivamente (OKERI; ARHEWOH, 2008; ROSS; RILEY, 1990).

O OFLOX foi sintetizado no ano de 1981 utilizando como protótipo o ácido nalidíxico, através da adição de um flúor na posição 6, uma N-metilpiperazina na posição 7 e a formação de um anel oxazina entre o N-1 e C-8 do núcleo quinolônico (HAYAKAWA et al., 1986). A adição desses substituintes promoveu uma melhora dos aspectos farmacológicos e farmacocinéticos do OFLOX em relação ao precursor, pois o átomo de flúor resultou no fortalecimento da atividade antibacteriana, o grupo N-metilpiperazina garantiu uma melhora na absorção oral e atividade *in vitro* contra enterobactérias e o anel oxazina melhorou a atividade contra bactérias Gram-positivas e anaeróbicas, além de garantir uma proteção contra a biotransformação da molécula de OFLOX (CHU; FRENANDES, 1989; HOOPER; WOLFSON, 1985). Outra característica estrutural desse fármaco é a presença de um carbono quiral no anel oxazina, resultando na formação de enantiômeros (*R* e *S*) com diferentes potências contra bactérias, sendo que o isômero *S* é cerca de 100 vezes mais potente do que o isômero *R* contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e cerca de duas vezes mais potente que a mistura racêmica de OFLOX (HAYAKAWA et al., 1986). A Figura 1 apresenta um esquema da relação estrutura-atividade do OFLOX.

Figura 1- Resumo da relação estrutura-atividade do ofloxacino.



Fonte: Adaptado de DOMAGALA, 1994; DREVENSEK et al., 2006.

O OFLOX é absorvido quase completamente quando administrado por via oral, com uma biodisponibilidade variando entre 95% a 100% (LODE et al., 1987). Em estudos anteriores foram obtidas faixas de concentrações plasmáticas máximas (C_{max}) de 2,2 a 2,4; 3,2 a 4,3 e 6,8 a 10,7 $\mu\text{g/mL}$, 1 a 2 horas após administração oral de 200 mg, 400 mg e 600 mg de OFLOX, respectivamente, sendo elas mais elevadas que a concentração inibitória mínima (CIM) para muitos patógenos (FILLASTERE; LEROY; HUMBERT, 1987; LOCKLEY; WISE; DENT, 1984; LODE et al., 1987; VERHO et al., 1986). O OFLOX é um fármaco que possui maior C_{max} em comparação com outras fluoroquinolonas (BEERMAN et al., 1984) e quando administrada com alimentos ela não tem sua biodisponibilidade alterada, provocando apenas um aumento no tempo necessário para atingir a C_{max} (VERHO et al., 1986).

O processo de distribuição do OFLOX é extenso e atinge concentrações antimicrobianas efetivas em quase todos os tecidos e fluídos corpóreos, com um volume de distribuição de 1 a 2 L/kg (FARINOTTI et al., 1988; LODE et al., 1987; YUK et al., 1991) e ligação às proteínas plasmáticas de aproximadamente 25% (LODE et al., 1987). Esses parâmetros farmacocinéticos garantem ao OFLOX uma ampla atuação em diversas infecções que acometem diferentes órgãos, como pulmão, vesícula biliar, próstata, pele, ossos e tecido tonsilar, além de ser encontrada em saliva, escarro, líquido cefalorraquidiano, secreção brônquica, suco pancreático e fluido inflamatório. No Quadro 1 estão resumidas as concentrações encontradas em órgãos e fluídos corpóreos relatados em diversos estudos já realizados.

Quadro 1- Concentrações do ofloxacino nos tecidos e fluidos após a administração oral em indivíduos saudáveis ou doentes que necessitaram de terapêutica antibacteriana.

Distribuição do ofloxacino			
Órgão/fluido	Dosagem	Concentração	Referências
Bile			
Vesícula biliar	400 mg	3,1 µg/mL	CHIN et al., 1990
Ducto biliar comum	200 mg	10,1 µg/mL	KAZMIERCZAK et al., 1987
Cartilagem	200 mg	1,38 µg/mL	MEISSNER; BORNER; KOEPE, 1990 WITTMANN; KOTTHAUS, 1986
	400 mg	2,24 µg/mL	
Escarro	400 mg	2,70 µg/mL	DAVIES et al., 1987
	600 mg	6,1 µg/mL	DAVIES et al., 1987
	800 mg	6,3 µg/mL	DAVIES et al., 1987
Fluido inflamatório	200 mg	2,86 µg/mL	WARLICH et al., 1990
	600 mg	5,2 µg/mL	LOCKLEY; WISE; DENT, 1984
Líquido cefalorraquidiano	300 mg	1,4 µg/mL	DRANCOURT et al., 1988
Ossos	200 mg	1,70 µg/mL	MEISSNER; BORNER; KOEPE, 1990
Tecido prostático	400 mg	4,46 µg/mL	NABER; ADAM; KEES, 1987
Secreção prostática	400 mg	4,58 µg/mL	NABER; ADAM; KEES, 1987
Pulmão	200 mg	3,5 µg/mL	COURAUD et al., 1987
Saliva	300 mg	4,53 µg/mL	KOIZUMI et al., 1994
Secreção brônquica	400 mg	2,8 µg/mL	SYMONDS et al., 1987
Suco pancreático	400 mg	2,7 µg/mL	BRATTSTROM; MALMBORG; TYDEN, 1988
Tonsilas	200 mg	1,41 µg/mL	VAN LANDUYT; GORDTS; D'HONDT, 1988

A baixa taxa de metabolização do OFLOX é devido à limitação provocada pelo anel oxazina (CHU; FERNANDES, 1989). Os metabólitos representam 5% da dose do OFLOX administrada e são encontrados 2 tipos no plasma de pacientes que fazem uso da mesma, sendo eles o desmetil-ofloxacino e N-óxido de OFLOX (LODE et al., 1987). Dos metabólitos encontrados o desmetil-ofloxacino também possui atividade antimicrobiana, mas pequena quando comparada com o OFLOX inalterado (WHITE et al., 1987). A eliminação desses dois metabólitos é realizada por via renal (COURAUD et al., 1987).

O processo de eliminação do OFLOX ocorre principalmente por excreção renal, sendo recuperado cerca de 80% da mesma inalterada 24 horas após administração oral (LOCKLEY; WISE; DENT, 1984; LODE et al., 1987). Sua meia-vida ($t_{1/2}$) varia de 5 a 8 horas, sendo

dependente de dose e função renal, pois pacientes com alterações da função renal apresentaram um maior tempo de eliminação (FARINOTTI et al., 1988; WHITE et al., 1988).

2.1.2 Mecanismo de ação

As bactérias são organismos que medem de 1 a 3 μm e possuem uma longa molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA) cromossômico, cujo tamanho aproxima-se de 1000 μm (DRLICA; ZHAO, 1997; KRAWIEC; RILEY, 1990). Para comportar todo esse material genético, o cromossomo bacteriano sofre uma condensação através da interação do DNA com proteínas e ácido ribonucleico (RNA), garantindo que o mesmo ocupe um pequeno espaço no interior da célula. No entanto, esse DNA não permanece compactado constantemente, pois as bactérias necessitam que ocorra um relaxamento da dupla fita de DNA superenovelado para que possam realizar seus processos vitais de replicação, transcrição e reparo de danos ao DNA (KRAWIEC; RILEY, 1990).

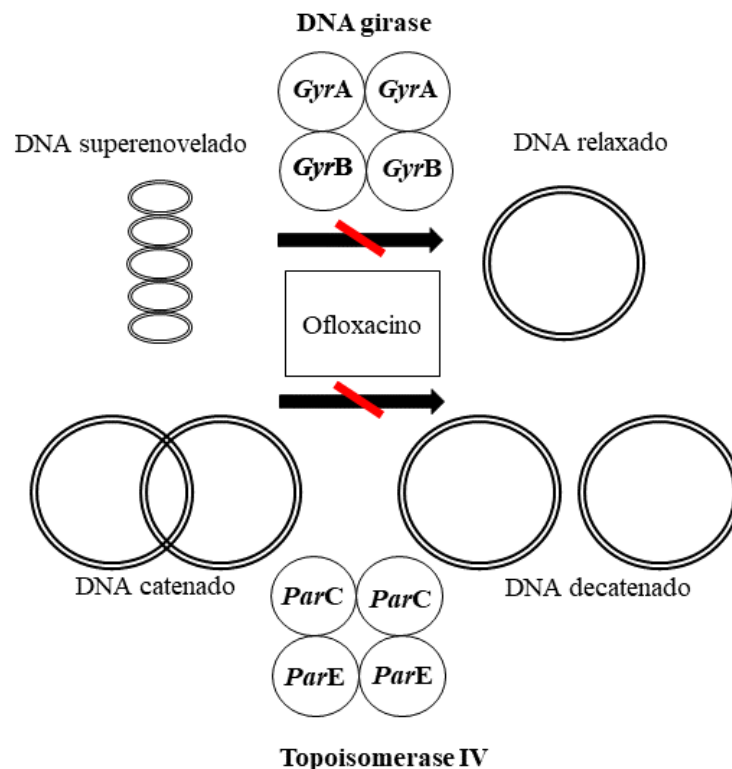
A replicação do DNA é um processo complexo desempenhado por um sofisticado aparato enzimático responsável por realizá-la em três etapas, sendo elas a iniciação, alongamento e terminação (MARIANS, 1992). Para que ocorra a iniciação é necessário que se forme um ponto de origem, conhecido como forquilha de replicação, onde as enzimas irão se organizar para dar início à replicação do DNA (O'DONNELL; LANGSTON; STILLMAN, 2013). Dentre as enzimas envolvidas nessa fase, as topoisomerases do tipo II desempenham papéis fundamentais, tais como, alívio da tensão provocada pela torção da cadeia dupla durante a abertura da mesma pela helicase e separação das fitas de DNA recentemente replicados. As topoisomerases tipo II, representadas nas bactérias pela DNA girase e topoisomerase IV, são assim conhecidas por realizarem suas funções através da clivagem de ambas as fitas do DNA para permitir a modulação do estado topológico do mesmo (CHAMPOUX, 2001; LEVINE; HIASA; MARIANS, 2001).

A DNA girase apresenta-se na forma de um tetrâmero, composto por duas subunidades A e duas subunidades B, que são codificados pelo gene *gyrA*, uma proteína de 97 kDa, e *gyrB*, responsável por codificar uma proteína de 89,9 kDa, respectivamente (ADACHI et al., 1987; SWANBERG; WANG, 1987). Essa enzima reduz a tensão a frente da forquilha de replicação através da introdução de supertorções negativas no DNA, que são realizadas pela passagem de uma porção do mesmo através de uma fragmentação temporária realizada pela subunidade A da DNA girase. Após a passagem do fragmento pela quebra, as ligações fosfodiéster são então reestabelecidas (REECE; MAXWELL, 1991).

A topoisomerase IV também é um tetrâmero composto por quatro subunidades, sendo duas subunidades C, codificada pelo gene *parC* e duas subunidades E, codificadas pelo gene *parE* (KATO; SUZUKI; IKEDA, 1992). A principal função desta enzima consiste na separação (decatenação) dos cromossomos envolvidos na replicação. O mecanismo de reação pela qual a topoisomerase IV desenvolve sua função de decatenação é semelhante ao mecanismo realizado pela DNA girase para introduzir supertorções negativas no DNA (KATO et al., 1990).

O mecanismo de ação pelo qual o OFLOX promove o efeito antibacteriano é através da inibição da DNA girase e topoisomerase IV, duas enzimas responsáveis por controlar a topologia do DNA bacteriano, facilitando todos os processos que irão envolver a extensa molécula de DNA (LEWIN; SMITH, 1988; SATO et al., 1986). O complexo DNA-enzima-OFLOX não permite que a DNA girase ou topoisomerase IV realize a reestruturação das fitas fragmentadas, gerando extremidades livres e conseqüentemente, expostas à degradação por nucleases, causando então a morte das bactérias (HOOPER, 1998; SATO et al., 1986). Na Figura 2 estão apresentadas as funções da DNA girase e topoisomerase IV, bem como um esquema da ação do OFLOX.

Figura 2- Estrutura, função principal da DNA girase e topoisomerase IV e ponto de inibição realizado pelo ofloxacino.



Fonte: Adaptado de HOOPER, 1999.

2.2 Atividade antibacteriana do ofloxacino

O OFLOX é um antibiótico ativo contra uma ampla variedade de bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e anaeróbicas, seguindo essa ordem decrescente de susceptibilidade. Esse largo espectro de ação também se estende para algumas bactérias atípicas e intracelulares, incluindo micobactérias (SMYTHE; RYBAK, 1989; TUNKEL; SCHELD, 1991).

A susceptibilidade de bactérias ao OFLOX é avaliada através de teste *in vitro* que determina a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano, denominada CIM, e dependendo do resultado encontrado as bactérias podem ser classificadas em susceptível, moderadamente susceptível e resistente (NCCLS, 2003). A CIM para classificar um micro-organismo em susceptível, moderadamente susceptível e resistente ao OFLOX é $\leq 5,52 \mu\text{M}$, $> 5,52$ a $< 22,08 \mu\text{M}$ e $\geq 22,08 \mu\text{M}$, respectivamente (TUNKEL; SCHELD, 1991).

Em estudos prévios, as bactérias Gram-negativas se mostraram mais sensíveis ao OFLOX com base nos valores da CIM para 90% das cepas testadas (CIM₉₀) (MAPLE; BRUMFITT; HAMILTON-MILLER, 1990; MONK; CAMPOLI-RICHARDS, 1987; MOUTON; LEROY, 1991; NEU, 1989; TODD; FAULDS, 1991). A maioria das enterobactérias são altamente sensíveis ao OFLOX apresentando MIC₉₀ $\leq 2,76 \mu\text{M}$, incluindo entre elas *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Plesiomonas shigelloides*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Providencia stuartii*, *Salmonella spp.*, *Serratia marcescens*, *Shigella spp.* e *Yersinia enterocolitica*. Uma boa atividade contra bactérias do gênero *Neisseria* e *Haemophilus* também foi demonstrada em alguns estudos. Por outro lado, *Pseudomonas aeruginosa* e *Gardnerella vaginalis* apresentaram sensibilidade moderada quando avaliada a atividade *in vitro* do OFLOX (ANDERSSON; MACGOWAN, 2003; TUNKEL; SCHELD, 1991).

Estudos mostram que o OFLOX também apresenta atividade contra bactérias Gram-positivas, porém os valores da CIM₉₀ são maiores quando comparados com os valores encontrados nos ensaios com bactérias Gram-negativas (TODD; FAULDS, 1991). As bactérias do gênero *Staphylococcus* são sensíveis ao OFLOX, com CIM₉₀ $\leq 2,76 \mu\text{M}$, já os valores de CIM₉₀ para bactérias do gênero *Streptococcus* foram mais elevados, mostrando uma sensibilidade moderada das mesmas (DREW; GALLIS, 1988).

Os micro-organismos intrinsicamente resistentes ao OFLOX são as bactérias anaeróbicas. Com exceção dos *Clostridium perfringens*, que apresentou CIM₉₀ de $2,76 \mu\text{M}$, outras bactérias anaeróbicas são moderadamente sensíveis ou resistentes. Algumas bactérias

intracelulares como *Legionella pneumophilla* e *Mycobacterium tuberculosis* apresentaram uma alta sensibilidade ao OFLOX ($CIM_{90} \leq 2,76 \mu M$), mas em alguns estudos também foi possível verificar a baixa atividade do OFLOX contra *Ureaplasma urealyticum* e *Mycobacterium intracellulare* (CIM_{90} igual a $22,08 \mu g/mL$) (MOUTON; LEROY, 1991). As CIM_{90} para algumas bactérias Gram-negativas, Gram positivas, anaeróbicas, bactérias atípicas e intracelulares estão apresentadas no Quadro 2.

Quadro 2- Atividade *in vitro* do ofloxacino em bactérias Gram-negativas, Gram positivas, anaeróbicas, atípicas e intracelulares.

Bactérias	CIM ₉₀ (µM)	Referências
Gram-negativas		
<i>Acinetobacter spp.</i>	2,20	SATO et al., 1982; SATO et al., 1986
<i>Aeromonas spp.</i>	0,04	AUCKENTHALER; MICHEA-HAMZEHPOVR; PECHERE, 1986; MANDELL; NEU, 1986; NEU, 1989
<i>Bordetella pertussis</i>	0,08	TODD; FAULDS, 1991; TUNKEL; SCHELD, 1991
<i>Branhamella catarrhalis</i>	0,33	MAPLE; BRUMFITT; HAMILTON-MILLER, 1990; NEU, 1989; PATON; REEVES, 1988
<i>Campylobacter jejuni</i>	2,20	DREW, GALLIS, 1988; PATON, REEVES, 1988
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0,69	NEU, 1989; PATON; REEVES, 1988
<i>Escherichia coli</i>	0,69	DREW; GALLIS, 1988; SATO et al., 1982, MAPLE; BRUMFITT; HAMILTON-MILLER, 1990
<i>Gardnerella vaginalis</i>	5,52	GRUNEBERG et al., 1988; KING; SHANNON; PHILLIPS, 1985
<i>Haemophilus ducreyi</i>	0,08	TODD; FAULDS, 1991; TUNKEL; SCHELD, 1991
<i>Haemophilus influenzae</i>	0,08	AUCKENTHALER; MICHEA-HAMZEHPOVR; PECHERE, 1986; GRUNEBERG et al., 1988; KING; SHANNON; PHILLIPS, 1985; MANDELL; NEU, 1986; NEU, 1989
<i>Hafnia alvei</i>	0,16	PATON; REEVES, 1988; TODD; FAULDS, 1991
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,69	AUCKENTHALER; MICHEA-HAMZEHPOVR; PECHERE, 1986; CULLMANN et al., 1985; MANDELL; NEU, 1986; NEU, 1989
<i>Morganella morganii</i>	0,33	KING; SHANNON; PHILLIPS, 1985; MANDELL; NEU, 1986; NEU, 1989
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	0,16	PEETERS; VAN DYCK; PIOT, 1984; SATO et al., 1982

Continuação...

Bactérias	CIM₉₀ (µM)	Referências
<i>Neisseria meningitidis</i>	0,04	AUCKENTHALER; MICHEA-HAMZEHPOVR; PECHERE, 1986; GRUNEBERG et al., 1988
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	0,04	MAPLE; BRUMFITT; HAMILTON-MILLER, 1990; TODD; FAULDS, 1991
<i>Proteus mirabilis</i>	0,69	MANDELL; NEU, 1986; NEU, 1989; SATO et al., 1982; WISE; ANDREWS; EDWARDS, 1984
<i>Proteus vulgaris</i>	0,35	DREW; GALLIS, 1988; MAPLE; BRUMFITT; HAMILTON-MILLER, 1990
<i>Providencia rettgeri</i>	5,52	CULLMANN, et al., 1985; MANDELL; NEU, 1986; NEU, 1989
<i>Providencia stuarti</i>	2,76	DREW; GALLIS, 1988; MAPLE; BRUMFITT; HAMILTON-MILLER, 1990
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11,04	GRUNEBERG et al., 1988; KING; SHANNON; PHILLIPS, 1985; VAN CAEKENBERGHE; PATTYN, 1984; WISE; ANDREWS; EDWARDS, 1984
<i>Salmonella spp.</i>	1,38	MAPLE; BRUMFITT; HAMILTON-MILLER, 1990; VAN CAEKENBERGHE; PATTYN, 1984
<i>Serratia marcescens</i>	2,76	MANDELL; NEU, 1986; NEU, 1989; VAN CAEKENBERGHE; PATTYN, 1984
<i>Shigella spp.</i>	0,69	NEU, 1989; PATON; REEVES, 1988
<i>Vibrio cholerae</i>	0,04	TODD; FAULDS, 1991; TUNKEL; SCHELD, 1991
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0,33	AUCKENTHALER; MICHEA-HAMZEHPOVR; PECHERE, 1986; GRUNEBERG et al., 1988

Continuação...

Bactérias	CIM₉₀ (µM)	Referências
Gram-positivas		
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	2,76	GRUNEBERG et al., 1988; MANDELL; NEU, 1986
<i>Corynebacterium urealyticum</i>	1,38	NEU, 1989; TODD; FAULDS, 1991
<i>Listeria monocytogenes</i>	11,04	GRUNEBERG, et al., 1988; PATON; REEVES, 1988
<i>Staphylococcus aureus oxacilina-sensível</i>	1,38	AUCKENTHALER; MICHEA-HAMZEHOVR; PECHERE, 1986; GRUNEBERG et al., 1988; MANDELL; NEU, 1986; VAN CAEKENBERGHE; PATTYN, 1984; WISE; ANDREWS; EDWARDS, 1984
<i>Staphylococcus coagulase negativo</i>	2,20	GRUNEBERG et al., 1988; TODD; FAULDS, 1991
<i>Streptococcus agalactiae</i>	5,52	KING; SHANNON; PHILLIPS, 1985; MANDELL; NEU, 1986
<i>Streptococcus faecalis</i>	11,04	GRUNEBERG et al., 1988; MANDELL; NEU, 1986
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	5,52	GRUNEBERG et al., 1988; KING; SHANNON; PHILLIPS, 1985
<i>Streptococcus pyogenes</i>	5,52	ANDERSSON; MACGOWAN; 2003; NEU, 1989; PATON; REEVES, 1988
Bactérias anaeróbicas		
<i>Bacteroides fragilis</i>	22,08	MANDELL; NEU, 1986; KING; SHANNON; PHILLIPS, 1985
<i>Clostridium difficile</i>	44,16	DELMEE; AVESANI, 1986; GRUNEBERG et al., 1988; KING; SHANNON; PHILLIPS, 1985
<i>Clostridium perfringens</i>	2,76	ANDERSSON; MACGOWAN, 2003; DREW; GALLIS, 1988; GRUNEBERG et al., 1988
<i>Fusobacterium spp.</i>	11,04	KING; SHANNON; PHILLIPS, 1985; PATON; REEVES, 1988
<i>Mobiluncus spp.</i>	5,52	MAPLE; BRUMFITT; HAMILTON-MILLER, 1990; TODD; FAULDS, 1991

Continuação ...

Bactérias	CIM ₉₀ (µM)	Referências
<i>Peptococcus spp.</i>	11,04	KING; SHANNON; PHILLIPS, 1985; PATON; REEVES, 1988
<i>Peptostreptococcus spp.</i>	5,52	GRUNEBERG et al., 1988; KING; SHANNON; PHILLIPS, 1985; MANDELL, NEU, 1986
Bactérias atípicas e intracelulares		
<i>Chlamydia trachomatis</i>	11,04	DREW; GALLIS, 1988; MAPLE; BRUMFITT; HAMILTON-MILLER, 1990; SMYTHE; RYBAK, 1989
<i>Legionella pneumophila</i>	0,08	ANDERSSON; MACGOWAN, 2003; GRUNEBERG et al., 1988
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	2,76	FENLON; CYNAMON, 1986; LEYSEN; HAEMERS; PATFYN, 1989
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	22,08	FENLON; CYNAMON, 1986; LEYSEN; HAEMERS; PATFYN, 1989
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	4,41	SMYTHE; RYBAK, 1989; TODD; FAULDS, 1991
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	22,08	DREW; GALLIS, 1988; PATON; REEVES, 1988; SMYTHE; RYBAK, 1989

2.3 Reposicionamento de fármacos

2.3.1 Definição e exemplos de reposicionamento de fármacos

A descoberta de novos fármacos é um processo extremamente importante, porém como anteriormente citado o percurso traçado desde a pesquisa até a comercialização é complexo, com alto custo (500 a 2 bilhões de dólares) e longo (10 a 17 anos) (CALIXTO; SIQUEIRA, 2008; LIMA et al., 2003). Além disso, na maioria das vezes a taxa de sucesso é bem menor que 10%, podendo apenas um fármaco ser aprovado num montante de 5.000 a 10.000 substâncias descobertas (ASHBURN; THOR, 2004; CALIXTO; SIQUEIRA, 2008).

O reposicionamento de fármacos (também chamado de reaproveitamento, redirecionamento, reperfilamento ou realocação) é o processo da descoberta de utilizações diferentes da indicação original de fármacos aprovados e comercializados, ou até mesmo, substâncias que não demonstraram sucesso em ensaios clínicos para o qual foram pesquisadas (DEOTARSE et al., 2015; SHIM; LIU, 2014). A capacidade de pesquisar uma nova utilização para um fármaco é possível pelo motivo de que quase todos têm mais de uma propriedade farmacológica, sugerindo a possibilidade de uso de substâncias conhecidas, cuja segurança e eficácia já estão bem estabelecidas pelos órgãos de vigilância, no controle de doenças distintas de sua indicação inicial (STAHL, 2009).

A estratégia de reposicionamento é muito apropriada para a descoberta de novas terapias, porque os fármacos já existentes possuem métodos de fabricação e compatibilidade fármaco-excipiente bem estabelecidos, parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos (dose de indicação original) bem descritos na literatura, além de que dados de segurança clínica da fase IV (vigilância pós-comercialização) já foram obtidos (DEOTARSE et al., 2015; LI; JONES, 2012; PADHY; GUPTA, 2011). Essas características tornam o desenvolvimento de novos medicamentos um método menos oneroso, mais curto e seguro quando comparado com o processo convencional de pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos (ASHBURN; THOR, 2004).

Alguns exemplos de reposicionamento de fármacos aprovados ou em estudo clínico para novas indicações podem ser observados no Quadro 3.

Quadro 3- Exemplos de fármacos reposicionados ou em teste clínico para uso.

Fármaco	Indicação original	Nova indicação	Status
Ácido acetilsalicílico	Anti-inflamatório	Antiagregante plaquetário	Aprovado
Alopurinol	Antineoplásico	Uricosúrico	Aprovado
Ciclosporina	Antifúngico	Imunossupressor	Aprovado
Dapoxetina	Antidepressivo	Ejaculação precoce	Aprovado
Dissulfiram	Alcoolismo crônico	Antineoplásico	Ensaio clínico
Duloxetina	Antidepressivo	Incontinência urinária de esforço	Aprovado
Finasterida	Anti-hiperplásico prostático	Antiqueda capilar	Aprovado
Hidroxiureia	Antineoplásico	Antianêmico (anemia falciforme)	Aprovado
Itraconazol	Antifúngico	Antineoplásico	Ensaio clínico
Minoxidil	Anti-hipertensivo	Antiqueda capilar	Aprovado
Sildenafil	Antianginoso	Disfunção erétil	Aprovado
Talidomida	Antinauseante matinal	Antieritematoso nodoso hansênico	Aprovado
Zidovudina	Antineoplásico	Antirretroviral	Aprovado

Fonte: ASHBURN; THOR, 2004; DEOTARSE et al., 2015; JAFARI et al., 2018; LI; JONES, 2012; MUTHYALA, 2011; SHIM; LIU, 2014; SMITH, 2011; YELLA et al., 2018.

2.3.2 Atividade antitumoral das fluoroquinolonas

Além de seu efeito antibacteriano contra Gram-positivas e Gram-negativas, diversas fluoroquinolonas e derivados sintéticos têm demonstrado uma alta atividade citotóxica em diferentes linhagens de células tumorais, apresentando-se como agentes promissores para o tratamento de câncer (ASIF, 2014). Muitos estudos realizados foram capazes de demonstrar essa atividade das fluoroquinolonas em inibir células tumorais, e algumas vezes, apresentar uma baixa citotoxicidade para células normais.

Herold e colaboradores (2002) avaliaram o efeito citotóxico do ciprofloxacino em linhagens de células CC531 (adenocarcinoma de cólon de rato), SW403 (adenocarcinoma colorretal humano), HT29 (adenocarcinoma colorretal humano) e HepG2 (hepatocarcinoma humano). Os estudos citados demonstraram uma redução da proliferação e indução de apoptose das células de câncer colorretal, mas as células de hepatocarcinoma humano não foram afetadas pela mesma.

Aranha e colaboradores (2003) avaliaram o potencial citotóxico do ciprofloxacino em células PC3 (adenocarcinoma de próstata humano) e MLC8891 (células prostáticas normais) e observaram que o ciprofloxacino promoveu inibição de 90% do crescimento das células PC3 na menor concentração de tratamento (50 µg/mL). Já quando as células MLC8891 foram tratadas com ciprofloxacino na mesma concentração, apresentaram uma inibição do crescimento de apenas 25% em relação ao controle.

Bourikas e colaboradores (2009) observaram que o ciprofloxacino promoveu a diminuição da proliferação de células HT29 a uma taxa significativa, na concentração de 9,46 µg/mL, de forma tempo-dependente. Foi constatado que o ciprofloxacino exerceu seu efeito antiproliferativo nessas células por meio da indução de parada do ciclo celular na fase S.

Al Trawneh e colaboradores (2010) realizaram um estudo para avaliar a atividade antiproliferativa de fluoroquinolonas tetracíclicas contra linhagens de células MCF7 (adenocarcinoma de mama humano), A549 (adenocarcinoma de pulmão humano) e HuDe (fibroblastos dérmicos humano). Eles observaram que duas das substâncias inibiram o crescimento das células MCF7 e A549, além de apresentarem uma baixa citotoxicidade contra as células HuDe.

Hu e colaboradores (2012) avaliaram a atividade citotóxica de derivados heterocíclicos de fluoroquinolonas contra células L1210 (leucemia linfocítica murina), HL60 (leucemia promielocítica aguda humana) e CHO (células de ovário de hamster chinês). Os resultados mostraram que os derivados promoveram uma redução significativa da viabilidade celular com IC₅₀ variando de 0,14 a 50,2 µM.

Sun e colaboradores (2013) avaliaram o efeito citotóxico de um derivado sintético de levofloxacino contra células Hep3B2.1-7 (hepatocarcinoma humano), SMMC7721 (hepatocarcinoma humano), HCT8 (adenocarcinoma colorretal humano), MCF7 e BMSC (células mesenquimais da medula óssea de rato). Os resultados obtidos através do ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) mostrou citotoxicidade seletiva contra Hep3B2.1-7, SMMC7721, MCF7 e HCT8, e uma baixa citotoxicidade frente à BMSC.

2.4 Formulações nanoestruturadas

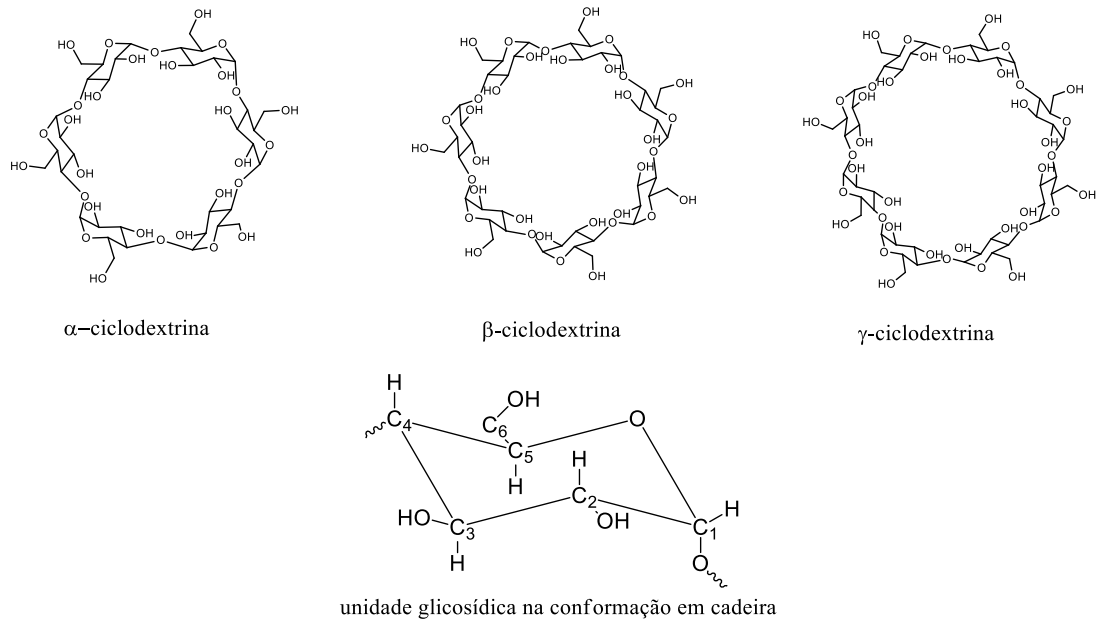
A indústria farmacêutica também tem buscado aumentar e aprimorar o seu arsenal terapêutico através de inovações tecnológicas, que envolvam a utilização de nanotecnologia, para desenvolver novos medicamentos ou até mesmo melhorar características dos medicamentos já existentes (ALVES, 2004).

Diversos tipos de nanoestruturas são utilizadas pela indústria farmacêutica como método de encapsulamento de fármacos, sendo os principais os lipossomas, nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas e as ciclodextrinas (ALVES; MARTINS; SANTANA, 2008; KUMARI et al., 2014; NII; ISHII, 2005; PATEL et al., 2012; SOMA et al., 2017). Apesar de todos esses métodos serem bem empregados e aceitos, as ciclodextrinas têm se consolidado no mercado farmacêutico devido ao seu baixo custo, grande disponibilidade e baixa toxicidade (VENTURINI et al., 2008). Por esse motivo, as associações com ciclodextrinas já foram estudadas em mais de 500 princípios ativos (CUNHA-FILHO; SÁ-BARRETO, 2007; LOFTSSON; DUCHENE, 2007), otimizando diversas propriedades dos fármacos, como estabilidade, biodisponibilidade e segurança (SZEJTLI, 2005).

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos, que foram descobertas em 1891 por Villiers, a partir da observação da hidrólise que bactérias da espécie *Bacillus amylobacter* realizavam do amido, transformando-o em uma substância cristalina, que foi denominada inicialmente de celulosina (VENTURINI et al., 2008) e mais tarde, ciclodextrina. Atualmente sabe-se que as ciclodextrinas são produzidas pela ação da enzima ciclodextrina glicosiltransferase, sintetizada por diversos micro-organismos, como *Bacillus macerans*, *B. megaterium*, *B. circulans*, *B. stearothermophilus*, *B. alcalofílico*, *B. subtilis*, *Micrococcus varians*, *M. luteus* e *Klebsiella pneumoniae* e que o processo utilizado para a produção das mesmas em escala industrial segue protocolo similar, mas com adaptações pela utilização de processos biotecnológicos ao que foi observado por Villiers (SCHMID, 1989; VENTURINI et al., 2008).

Dentre as diversas ciclodextrinas de ocorrência natural existentes (FRENCH, 1965) as principais são a α -ciclodextrina (α CD), β -ciclodextrina (β CD) e γ -ciclodextrina (γ CD), constituídas por seis, sete e oito moléculas de D-glicopiranosose, respectivamente, unidas por ligações glicosídicas α -1,4 (LOFTSSON; DUCHENE, 2007; LOFTSSON; MASSON, 2001; SZEJTLI, 1998). A estrutura química das principais ciclodextrinas naturais estão apresentadas na Figura 3.

Figura 3- Estrutura química das ciclodextrinas naturais e representação estrutural de uma unidade glicosídica na conformação de cadeira.



Fonte: Adaptado de BOOIJ, 2009.

As ciclodextrinas assemelham-se a um cone truncado que possui uma cavidade capaz de receber diversas substâncias em seu interior (DEL VALLE, 2004; SZEJTLI, 1998). O diâmetro dessa cavidade varia de acordo com o número de glicopiranoose que forma cada uma das ciclodextrinas. As extremidades dessas moléculas são formadas por hidroxilas primárias e secundárias, sendo as primárias presentes na extremidade mais estreita em C-6 e as secundárias na extremidade mais larga em C-2 e C-3 (SAENGER, 1980; SZEJTLI, 1998). As propriedades físico-químicas de algumas ciclodextrinas estão apresentadas na Tabela 1.

A ciclodextrina natural mais utilizada pela indústria farmacêutica, sendo esse uso refletido em muitas formulações existentes no mercado, é a β CD (CUNHA-FILHO; SÁ-BARRETO, 2007; LOFTSSON; DUCHENE, 2007). Essa ciclodextrina apresenta capacidade de acomodar grande número de moléculas em seu interior, cuja massa molar pode variar entre 100 e 400 g/mol. Além disso, possui baixo custo, elevada disponibilidade e seu uso é aprovado como excipiente para formulações de uso oral (CUNHA-FILHO; SÁ-BARRETO, 2007). Apesar dessas vantagens, a β CD possui baixa solubilidade aquosa. Devido a esse fato, diversos estudos buscaram melhorar algumas características dessa ciclodextrina através de modificações químicas em sua estrutura. Uma das modificações que promoveu o surgimento de uma ciclodextrina com melhor solubilidade e menor toxicidade por via intravenosa em relação ao precursor, foi a substituição de 6-OH da β CD por grupos hidroxipropila, formando a hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD) (PITHA et al., 1986). Na Tabela 1 são apresentas

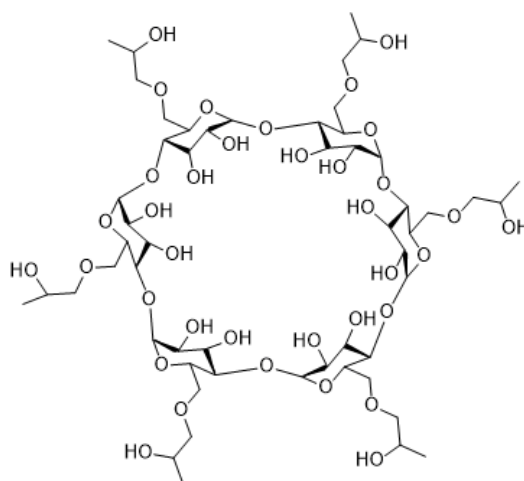
algumas das características na HP β CD e na Figura 4 é possível observar a sua estrutura química.

Tabela 1- Propriedades físico-químicas de algumas ciclodextrinas.

Propriedades	α CD	β CD	γ CD	HP β CD
Número de unidades de glicopiranosose	6	7	8	7
Fórmula empírica	C ₃₆ H ₆₀ O ₃₀	C ₄₂ H ₇₀ O ₃₅	C ₄₈ H ₈₀ O ₄₀	-
Diâmetro interno da cavidade (Å)	4,7 – 5,3	6,0 – 6,5	7,5 – 8,3	6,0 – 6,5
Diâmetro externo da cavidade (Å)	14,6	15,4	17,5	-
Volume da cavidade (Å ³)	174	262	472	262
Altura (Å)	7,9	7,9	7,9	7,9
Massa molar (g/mol)	972	1135	1297	1400
Solubilidade em água a 25 °C (mg/mL)	145	18,5	232	>600
% de água	10,2	13,2 – 14,5	8,13 – 17,7	-

Fonte: SZEJTLI, 1998.

Figura 4- Estrutura química da HP β CD.



Fonte: Adaptado de BREWSTER; LOFTSSON, 2007.

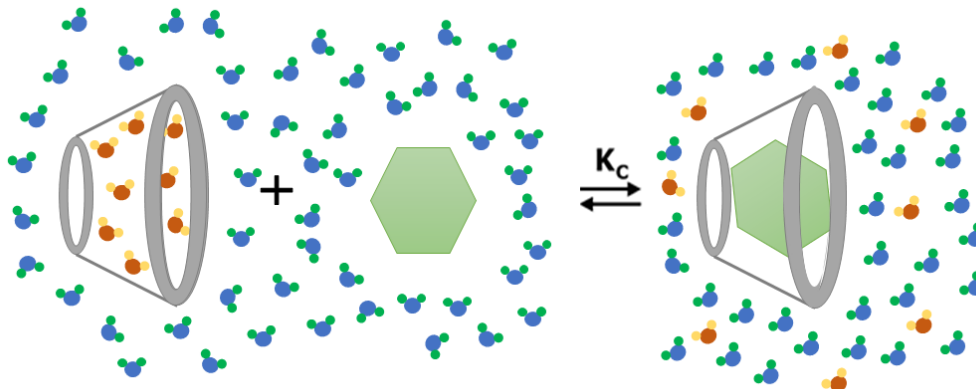
As ciclodextrinas são moléculas anfífilas pois apresentam uma cavidade hidrofóbica, capaz de acomodar substâncias de caráter mais apolar, e extremidades hidrofílicas, que permitem a sua solubilização em meio aquoso (CHOWDARY; SHANKAR; TANNIRU, 2014; SZEJTLI, 1998). Essa característica intrínseca das ciclodextrinas permite às mesmas formar CI's quando interage com outras moléculas (conhecidas como hóspedes), alojando-as em seu interior de forma total ou parcial (BREWSTER; LOFTSSON, 2007; VENTURINI et al., 2008).

De acordo com sua definição, os CI's são supramoléculas constituídas por duas ou mais moléculas distintas que se auto-organizam sem que alguma delas perca a sua identidade química (DEL VALLE, 2004). Para a formação desses complexos várias forças intermoleculares estão envolvidas e contribuem para a estabilização dos mesmos, sendo elas interações eletrostáticas, forças de van der Waals, interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. Durante o processo de complexação não há formação e nem quebras de ligações iônicas ou covalentes (LOFTSSON; BREWSTER, 1996).

A formação e estequiometria do CI vai depender de características das moléculas envolvidas, sendo que a polaridade, o tamanho e a geometria do hóspede deverá ser compatível com as características hidrofóbicas e ao tamanho da cavidade da molécula hospedeira (também chamada de matriz). De acordo com essas características e das possíveis interações entre elas podem ser formados complexos com as estequiometrias (matriz:hóspede) 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 1:2 ou 1:3, sendo a primeira a mais frequente (SZEJTLI, 1998).

A inclusão envolve a substituição de moléculas de água presentes nas cavidades das ciclodextrinas pelo hóspede. Esse mecanismo ocorre, pois na ausência do hóspede a cavidade hidrofóbica da ciclodextrina é ocupada por moléculas de água, cujas interações são energeticamente desfavoráveis (estado de alta entalpia e baixa entropia) dada a natureza apolar da cavidade e polar da água, originando interação polar-apolar. Conseqüentemente, ao adicionar moléculas cuja polaridade seja menor do que a da água ocorrerá o deslocamento das moléculas de água da cavidade para a solução, promovendo a sua troca pela substância hidrofóbica (THOMPSON, 1997; VENTURINI et al., 2008). Na Figura 5 está representado o mecanismo de inclusão de uma molécula hóspede na ciclodextrina.

Figura 5- Representação esquemática da formação do CI com ciclodextrina.



Fonte: Adaptado de SZEJTLI, 1998.

Legenda: CI: complexo de inclusão.

A complexação com ciclodextrina promove alterações em várias características físico-químicas da substância hóspede, acarretando em melhoras na solubilidade, estabilidade, biodisponibilidade, alterações de caracteres organolépticos e liberação controlada (HEDGES, 1998; VENTURINI et al., 2008). Essas melhorias foram comprovadas em diversos estudos realizados.

Zi e colaboradores (2008) demonstraram que a HP β CD promoveu uma melhora na solubilidade da capsaicina, além de intensificar a absorção percutânea da mesma quando realizado teste *in vitro* de permeação.

Em estudo realizado por Ranpise e colaboradores (2009) foi verificada a solubilidade, atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do aceclofenaco complexado com β CD e HP β CD. Os resultados obtidos nesse estudo demonstraram uma melhor solubilidade dos CI's quando comparados com o aceclofenaco puro, e dentre os complexos, o sistema com HP β CD apresentou maior solubilidade do que o CI com β CD. Em relação à atividade anti-inflamatória, observaram uma maior inibição no edema da pata traseira de ratos tratados com os CI. O mesmo foi observado quando avaliaram as contorções abdominais induzidas por ácido acético.

Em 2010, Madan e colaboradores realizaram um estudo com a substância noscapina no objetivo de avaliar a sua solubilidade e biodisponibilidade quando complexado com β CD. Os autores observaram que houve aumento na solubilidade da noscapina quando aumentavam a concentração de β CD e demonstraram um aumento na sua biodisponibilidade após a inclusão.

Jiang e colaboradores (2011) avaliaram a atividade *in vitro*, *in vivo* e a toxicidade da 9-nitro-camptotecina complexada com HP β CD. Os resultados obtidos foram que o CI foi mais ativo nas quatro linhagens de células de câncer testadas, apresentando uma menor IC₅₀. Em relação aos ensaios *in vivo* não houve diferença significativa na redução do volume do tumor, mas apresentaram uma baixa toxicidade.

Chao e colaboradores (2014) complexaram o OFLOX com metil β CD e observaram que houve um aumento da solubilidade do CI formado em comparação com o OFLOX livre, alterando a solubilidade do OFLOX puro de 1,28 mg/mL para 4,26 mg/mL do complexo. Outro estudo realizado por Misiuk e Jozefowicz (2015) também avaliou a solubilidade do OFLOX complexada com ciclodextrinas, mas dessa vez com HP β CD. Os resultados obtidos corroboram com o estudo de Chao e colaboradores (2014), pois o CI apresentou maior solubilidade em relação ao OFLOX puro. Em ambos os estudos não foram realizados ensaios biológicos.

Desta forma, diversos estudos mostraram que as ciclodextrinas podem servir como mecanismos úteis para aumentar e melhorar o fornecimento de fármacos problemáticos e também aqueles que possuem outras propriedades indesejáveis, como baixa estabilidade, sabor e odor desagradáveis e efeitos adversos (TIWARI; TIWARI.; RAI, 2010). Portanto, um dos principais objetivos deste trabalho foi verificar se a complexação do OFLOX com ciclodextrina seria capaz de potencializar sua ação, tanto na atividade antibacteriana como na antitumoral.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Sintetizar, caracterizar e avaliar a melhora das atividades antibacteriana e do potencial antitumoral de novas composições nanoestruturadas do OFLOX em β CD e HP β CD.

3.2 Objetivos específicos

- Preparar os complexos de inclusão (CI's) de OFLOX em β CD e HP β CD;
- Avaliar as interações intermoleculares entre as ciclodextrinas e o OFLOX no estado sólido por espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR);
- Avaliar o efeito das ciclodextrinas na estabilidade térmica dos CI's por análise térmica diferencial (DTA) e termogravimetria (TG);
- Determinar os parâmetros termodinâmicos de complexação (entalpia – ΔH° , entropia – ΔS° , energia livre de Gibbs – ΔG° e constante de associação - K) através da titulação calorimétrica isotérmica (ITC);
- Avaliar as interações intermoleculares entre as ciclodextrinas e a OFLOX em solução por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H);
- Avaliar o diâmetro hidrodinâmico dos CI's por medidas de espalhamento dinâmico de luz (DLS);
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos CI's frente às bactérias *E.coli* e *S. aureus*;
- Determinar a curva de morte de *E. coli* e *S. aureus* após tratamento com os CI's;
- Verificar a viabilidade das células de adenocarcinoma de pulmão (A549) tratadas com os CI's;
- Avaliar a indução de apoptose após tratamento das células A549 com os CI's OFLOX-ciclodextrinas por citometria de fluxo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

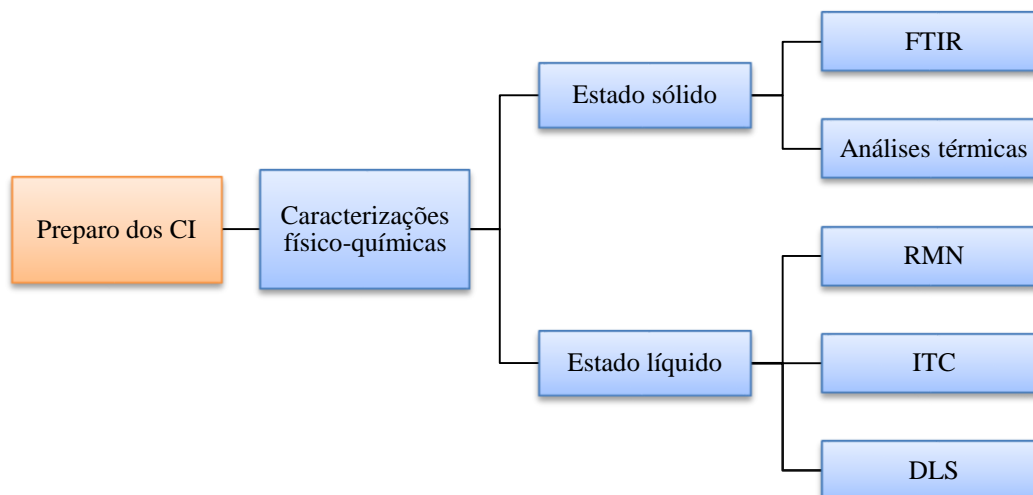
O OFLOX, β CD e HP β CD utilizados foram adquiridas da Sigma-Aldrich. Os demais reagentes químicos (D_2O , brometo de potássio, dimetilsulfóxido, corante MTT, meio de cultura RPMI-1640, soro bovino fetal, penicilina/estreptomicina, tripsina, caldo Mueller-Hinton, ágar Mueller-Hinton, ágar eosina azul de metileno e ágar manitol) e kit para detecção de apoptose por citometria de fluxo foram adquiridos de empresas idôneas (Sigma-Aldrich, Vetec, Invitrogen). A linhagem de célula tumoral A549 foi cedida pelo Centro de Tecnologia Celular e Imunologia Aplicada (Imunocet - UFJF). As linhagens de *S. aureus* (ATCC e clínica) e *E. coli* (ATCC e clínica) foram cedidas pelo Laboratório de Microbiologia da Universidade Vale do Rio Doce (UNIVALE).

4.2 Métodos

4.2.1 Delineamento experimental

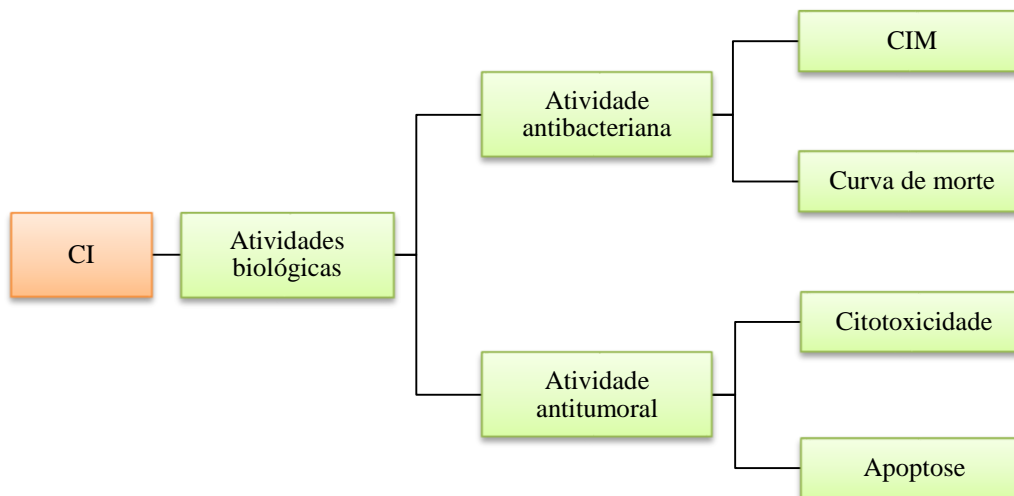
Nas Figuras 6 e 7 estão apresentados fluxogramas das etapas executadas nesse trabalho. Após a obtenção dos CI's, os experimentos foram divididos em duas etapas, sendo elas: caracterização físico-química (Figura 6) e atividades biológicas (Figura 7).

Figura 6- Fluxograma dos experimentos de caracterização físico-química dos CI's.



Legenda: CI's: complexos de inclusão; FTIR: Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier; RMN: ressonância magnética nuclear; ITC: titulação calorimétrica isotérmica; DLS: espalhamento dinâmico de luz.

Figura 7- Fluxograma dos experimentos de atividades biológicas dos CI's



Legenda: CI's: complexos de inclusão; CIM: concentração inibitória mínima.

4.2.2 Síntese e caracterização físico-química

4.2.2.1 Obtenção dos complexos de inclusão e mistura mecânica

Os CI's foram preparados usando quantidades equimolares de OFLOX e ciclodextrinas (β CD e HP β CD) baseados nos métodos de coprecipitação/liofilização com adaptações (CAO; GUO; PING, 2005).

Em béqueres separados, foram preparadas soluções aquosas de OFLOX e ciclodextrinas em concentrações equimolares. Em seguida, a solução de OFLOX foi vertida para o béquer contendo as soluções de β CD e HP β CD e mantidas sob agitação por 24 horas. As suspensões formadas foram congeladas e liofilizadas para obtenção dos CI's no estado sólido. Os sólidos obtidos foram submetidos à caracterização.

As misturas mecânicas (MM's) de OFLOX com as ciclodextrinas foram preparadas na proporção molar de 1:1, sendo o hóspede e a ciclodextrina pesados e homogeneizados levemente em grau de ágata com auxílio de pistilo, acondicionados em microtubos e armazenados em geladeira. Estas MM's foram utilizadas para efeitos de comparação nas análises no estado sólido, sendo importantes para demonstrar que o complexo não trata-se de uma simples mistura (DENADAI, 2005).

4.2.2.2 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier

Os espectros na região do infravermelho médio (4000 a 400 cm^{-1}) do OFLOX, ciclodextrinas, MM's e dos CI's foram registrados em equipamento Spectrum TwoTM (Perkin Elmer), com transformada de Fourier, a partir de pastilhas contendo KBr (Brometo de potássio). Os espectros foram obtidos como a média de quatro varreduras consecutivas, com resolução de 2 cm^{-1} e intervalo de onda de 4000 a 400 cm^{-1} . Para a aquisição e processamento dos espectros foi utilizado o programa Perkin Elmer Spectrum ES (versão do aplicativo: 10.03.08.0133). Os dados foram exportados para o Microcal Origin 9.0 para edição (DENADAI et al., 2006a).

4.2.2.3 Análises térmicas: termogravimetria e análise térmica diferencial

As análises térmicas (TG e DTA) para o OFLOX, ciclodextrinas, MM's e os CI's foram realizadas em equipamento Hitachi STA7200RV. Os experimentos foram realizados com rampa de temperatura de 30 °C a 800 °C e taxa de aquecimento de 10 °C, com massa aproximada de 5,0 mg da substância a ser analisada em cadinho de platina. Os dados foram exportados para o Microcal Origin 9.0 para edição (DENADAI et al., 2006a).

4.2.2.4 Titulação calorimétrica isotérmica

Os parâmetros termodinâmicos envolvidos na formação dos CI's em solução foram determinados a partir da ITC, envolvendo o sistema OFLOX em ciclodextrinas a 25 °C. O experimento foi realizado utilizando um Microcalorímetro VP-ITC da Microcal e os seguintes parâmetros experimentais: rotação de 300 rpm, tempo de injeção de 2 segundos, tempo de equilíbrio de 5 minutos, 41 injeções automáticas de 6,3 μL de titulante em 1,5 mL do titulado. A primeira injeção de 1 μL foi descartada a fim de eliminar os efeitos de difusão de material da seringa para a célula e vice-versa. O titulante consistiu na solução de βCD e $\text{HP}\beta\text{CD}$ em DMSO/água (40/60) na concentração de 20 mM. Já o titulado foi a solução de OFLOX no mesmo solvente na concentração de 1 mM. Após os experimentos, as curvas de titulação foram subtraídas dos respectivos brancos a fim de se eliminar matematicamente os efeitos de interação das substâncias com o solvente. Os experimentos foram realizados em duplicata e o tratamento dos dados executado com o auxílio do programa Microcal Origin 9.0 (DENADAI et al., 2006b).

4.2.2.5 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio

As análises de RMN de ^1H do OFLOX, ciclodextrinas e dos CI's foram realizadas por colaboradores do Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora. Os espectros foram adquiridos utilizando um espectrômetro Bruker Avance III HD, 500 MHz. As amostras foram dissolvidas em óxido de deutério (D_2O) sem TMS. Os espectros foram editados utilizando o programa MestReNova[®] 12.0 (DENADAI et al., 2006b).

4.2.2.6 Espalhamento dinâmico de luz

O tamanho da molécula hóspede (OFLOX) e dos CI's ($\beta\text{CD}/\text{OFLOX}$ e $\text{HP}\beta\text{CD}/\text{OFLOX}$) foram avaliados por medidas de tamanho de partículas (diâmetro hidrodinâmico – D_h) por DLS. Os experimentos foram realizados em um módulo fotométrico de DLS, Zetasizer Nano ZS90 da Malvern, a 25 °C, com termostatização via sistema Peltier. As amostras foram inseridas em cubeta de polietileno de 1 cm de caminho óptico, padrão Malvern, e submetidas a um feixe de luz monocromático (Laser He-Ne de 4 mW e comprimento de onda de 633 nm), com intensidade de luz espalhada medida a um ângulo de 90°. O D_h foi determinado pela média de cinco medidas independentes, cada uma delas obtida a partir da média de cinco contagens. Para a realização do experimento foram utilizadas soluções na concentração de 40 mM de OFLOX, $\beta\text{CD}/\text{OFLOX}$ e $\text{HP}\beta\text{CD}/\text{OFLOX}$ solubilizados em DMSO. Em seguida, foram realizadas 30 injeções de 10 μL da solução em 1,5 mL de água Milli-Q. O tratamento dos dados foi executado com o auxílio do programa Microcal Origin 9.0.

4.2.3 Avaliação das atividades biológicas

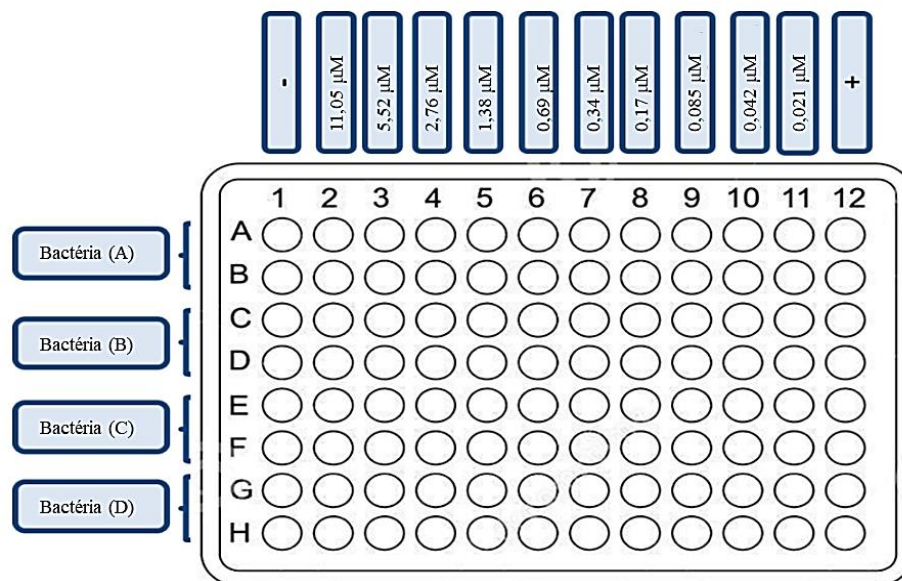
4.2.3.1 Determinação da concentração inibitória mínima dos complexos de inclusão

As CIM's do OFLOX, βCD , $\text{HP}\beta\text{CD}$, $\beta\text{CD}/\text{OFLOX}$ e $\text{HP}\beta\text{CD}/\text{OFLOX}$ foram avaliadas frente à nove linhagens de cada espécie de *E. coli* e *S. aureus*, conforme proposto pelo documento M7-A6 do “*National Committee for Clinical Laboratory Standards*”, com modificações. (NCCLS, 2003). O inóculo bacteriano foi preparado a partir de culturas das bactérias e incubadas a 37 °C, por 24 horas em placas de Petri contendo Ágar Eosina azul de metileno (EMB) para *E. coli* e ágar manitol para *S. aureus*. A suspensão bacteriana foi

preparada em um tubo de ensaio contendo 5 mL de solução salina esterilizada. As suspensões foram homogeneizadas em vórtex e padronizadas usando a escala de McFarland 0,5, que corresponde à concentração de 1×10^8 a 3×10^8 UFC/mL. Em seguida, os inóculos foram diluídos em solução salina de modo a alcançar a concentração de 1×10^6 a 3×10^6 UFC/mL (NCCLS, 2003).

Para avaliar a CIM de OFLOX, ciclodextrinas e CI's, uma solução inicial de cada amostra foi solubilizada em água estéril de modo a alcançar a concentração de 11 mM. Em seguida foram feitas diluições seriadas em caldo Mueller-Hinton (MH) de modo que as concentrações das amostras variassem de $0,03 \mu\text{M}$ a $2,76 \mu\text{M}$. Posteriormente, alíquotas de $100 \mu\text{L}$ de cada concentração foram distribuídas em orifícios da placa de microdiluição de 96 poços de acordo com a Figura 8. Como controle de crescimento (controle positivo) e de esterilidade (controle negativo) foi utilizado o caldo MH com inóculo bacteriano e puro, respectivamente.

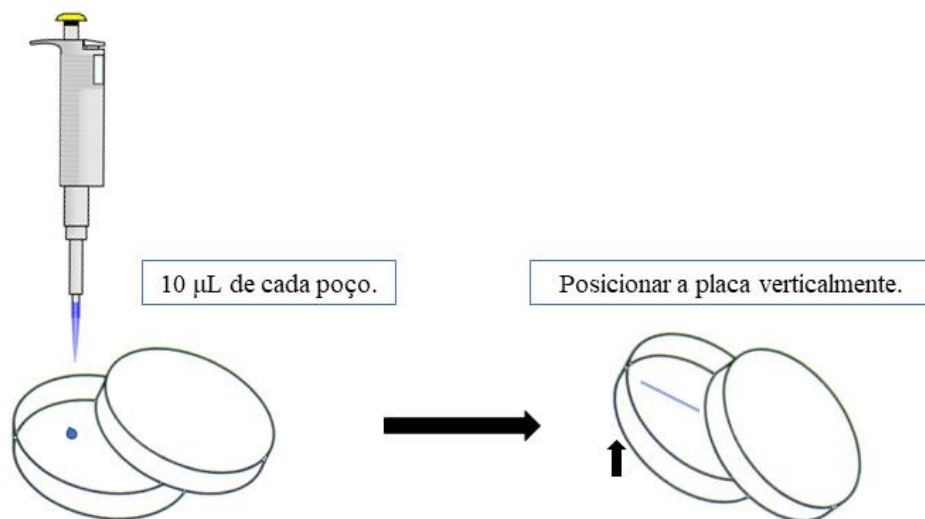
Figura 8- Representação esquemática da placa de microdiluição do OFLOX.



A cada orifício teste e de controle de crescimento foram acrescentados $10 \mu\text{L}$ de inóculo bacteriano. As placas foram incubadas por 24 horas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. A leitura foi realizada pelo método de MTT, onde após a incubação das bactérias com as substâncias foram adicionados $10 \mu\text{L}$ de MTT (5 mg/mL) e posteriormente incubado em estufa a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1 hora. Transcorrido o período de 1 hora a reação foi finalizada com a adição de isopropanol acidificado ($\text{HCl } 0,04\text{M}$) e realizado a leitura em espectrofotômetro de microplaca

Para a realização desse experimento uma alíquota de 10 μL da suspensão de bactérias tratadas foram plaqueadas em meio de ágar MH para *E. coli* e ágar manitol para *S. aureus*. O método utilizado para plaqueamento foi a técnica da gota vertical, onde após a adição de 10 μL da suspensão-teste a placa foi posicionada verticalmente de forma que a gota adicionada percorresse uma certa distância, a fim de possibilitar a contagem das colônias bacterianas formadas. O plaqueamento ocorreu nos tempos de 0, 3, 6, 12 e 24 horas para as duas espécies testadas. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C e após a incubação as colônias foram contadas manualmente para determinação das unidades formadoras de colônias (UFC), sendo elaborada a curva de morte em função do número de UFC/mL recuperadas ao longo do tempo. Todos os testes foram realizados em duplicata. Um esquema do plaqueamento da suspensão-teste de cada poço é mostrado na Figura 10.

Figura 10- Esquema do plaqueamento no experimento de curva de morte.



4.2.3.3 Cultura de células A549

As células A549 foram cultivadas em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal, 1% de aminoácidos essenciais e 0,5% penicilina/estreptomicina (10.000 UI/mL, 10.000 mg/mL). Após atingirem confluência, as garrafas foram raspadas e as células colocadas em placas de 96 poços na concentração de 2×10^5 células/mL, para os ensaio da atividade citotóxica, e 1×10^6 células/mL, para ensaios de apoptose. As células foram então incubadas em atmosfera úmida de 5% de CO_2 a 37 °C (CASTRO et al., 2012).

4.2.3.4 Avaliação da atividade citotóxica dos complexos de inclusão em células A549

A viabilidade de A549 foi determinada pelo método colorimétrico do MTT (Sigma, St, Louis, MO, USA). Para o teste, os sobrenadantes dos poços da cultura foram cuidadosamente removidos após transcorrido o tempo de tratamento com o OFLOX, ciclodextrinas (β CD e HP β CD) e CI's (β CD/OFLOX e HP β CD/OFLOX) nas concentrações de 300 μ M, 100 μ M e 50 μ M (KAMAT; DEHAVEN; LAMM, 1999; KLJUN et al., 2011; SEAY; PERETSMAN; DIXON, 1996), por 48 e 72 horas. Transcorridos os tempos necessários de cultivo o sobrenadante de cada poço foi removido e 100 μ L de RPMI-1640 foram adicionados em todos os poços contendo as células cultivadas e em seguida 10 μ L de MTT (5 mg/mL) também foram acrescentados a cada poço. As placas foram incubadas a 37 °C em estufa com 5% de CO₂. Após o período de 4 horas, a reação foi finalizada com a retirada do meio e a adição de 100 μ L de DMSO. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplaca *MultiskanTM FC* Microplate Photometer no comprimento de onda de 570 nm (CASTRO et al., 2012). Como controle de morte as células foram tratadas com doxorubicina na concentração de 10 μ M (BUAHORM et al., 2015; LOOI et al., 2013), nas mesmas condições que os CI's. Os dados foram inseridos no software Prisma 6.0 para análise e foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Experimento realizado com adaptações de Castro e colaboradores (2012).

4.2.3.5 Avaliação de apoptose em células A549 tratadas com os complexos de inclusão

A avaliação de morte por apoptose foi realizado utilizando o kit de detecção de apoptose Anexina V (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific). Para esse ensaio foi utilizada uma concentração de 1×10^6 células/mL de A549 cultivadas em microplacas de 96 poços e incubadas na ausência e presença de OFLOX, β CD, HP β CD, β CD/OFLOX e HP β CD/OFLOX na concentração de 300 μ M. Transcorridas 36 horas de tratamento as células foram tripsinizadas e lavadas com tampão fosfato. Após lavagem das células as mesmas foram marcadas com Anexina V – FITC e iodeto de propídio, conforme instruções do fabricante. As células foram então incubadas em temperatura ambiente por 15 minutos no escuro, e posteriormente foi feito a aquisição dos dados em citômetro de fluxo (FACSVerse, BD Biosciences). Os dados foram analisados no software FCSEXpress 3.0. Experimento realizado com adaptações de Perillo e colaboradores (2015).

4.2.4 Análise estatística

Os resultados apresentados são representativos de pelo menos três experimentos independentes e são mostrados como média \pm desvio padrão. A significância de diferença foi analisada usando o teste t de Student e teste de Mann-Whitney quando apropriado. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

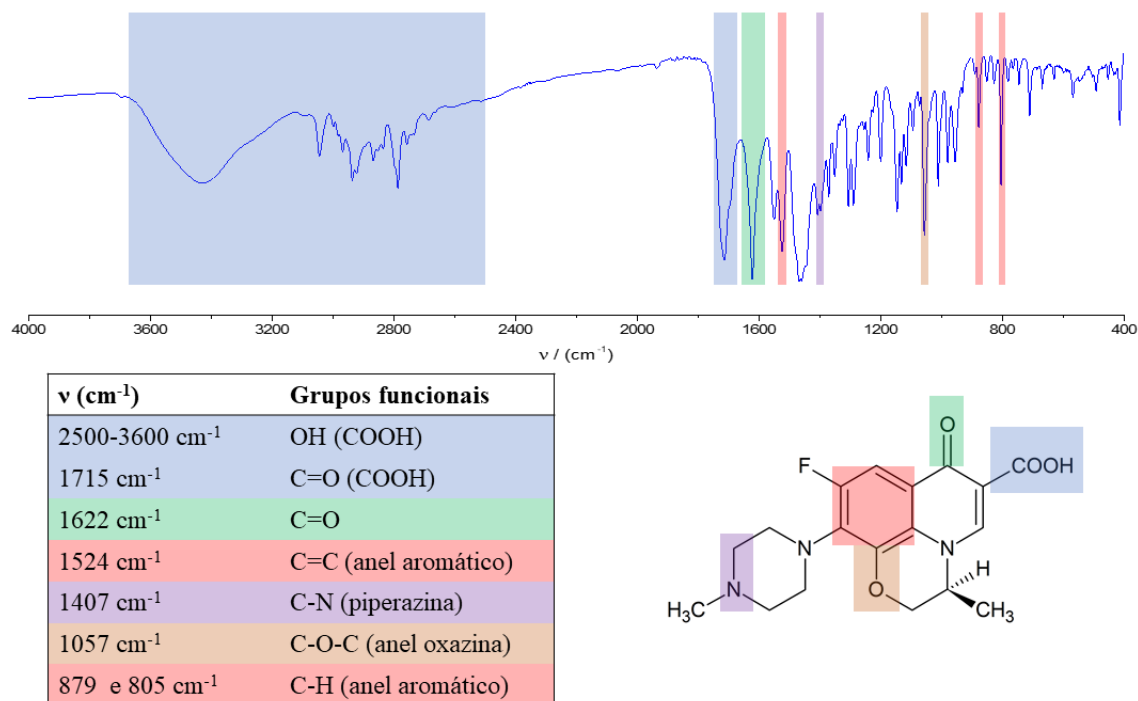
5.1 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier

A FTIR é uma técnica que relaciona-se com a variação do momento de dipolo elétrico das ligações químicas em virtude de seus movimentos, vibracionais ou rotacionais, frente um feixe de luz incidido nas amostras. A energia de vibração dos átomos no interior da molécula corresponde à região do infravermelho (100 a 10.000 cm^{-1}). Essa técnica mede os diferentes tipos de vibrações entre átomos de uma molécula de acordo com suas ligações interatômicas, sendo a região mais utilizada aquela situada entre 4000 e 400 cm^{-1} , denominada região fundamental ou infravermelho médio (BERTHOMIEU; HIENERWADEL, 2009). O infravermelho médio é um método bastante utilizado para a identificação de grupos funcionais em substâncias orgânicas, inorgânicas e organometálicas, tanto no estado líquido quanto no estado sólido (cristalino ou amorfo), por ser bastante sensível às vibrações das ligações químicas (FORATO et al., 1998; FORATO et al., 2010).

Os CI's são substâncias em que uma molécula (hóspede) penetrou total ou parcialmente na cavidade da ciclodextrina (SZEJTLI, 1998). Neste caso, a penetração de grupos funcionais da molécula hóspede na cavidade da ciclodextrina gera uma série de novas interações intermoleculares, as quais alteram a distribuição eletrônica sobre os núcleos atômicos envolvidos (LOFTSSON; BREWSTER, 1996). Como consequência, o momento de dipolo das ligações ou grupos funcionais podem sofrer alterações, se refletindo no espectro de FTIR como aumento ou redução da intensidade das bandas. Outro efeito que pode ocorrer em decorrência das interações é a de restrição ou intensificação do movimento vibratório, que se reflete no espectro como deslocamentos das bandas (DENADAI et al., 2006a; DENADAI et al., 2007; SUAREZ et al., 2014). Diante do exposto, pretendeu-se identificar as possíveis interações entre o OFLOX e as ciclodextrinas através da comparação dos espectros de FTIR das moléculas livres, MM e dos CI's.

A Figura 11 apresenta uma comparação entre o espectro do OFLOX e seus principais grupos funcionais com seus respectivos números de onda.

Figura 11- Correlação do espectro de FITR do OFLOX com seus principais grupos funcionais.

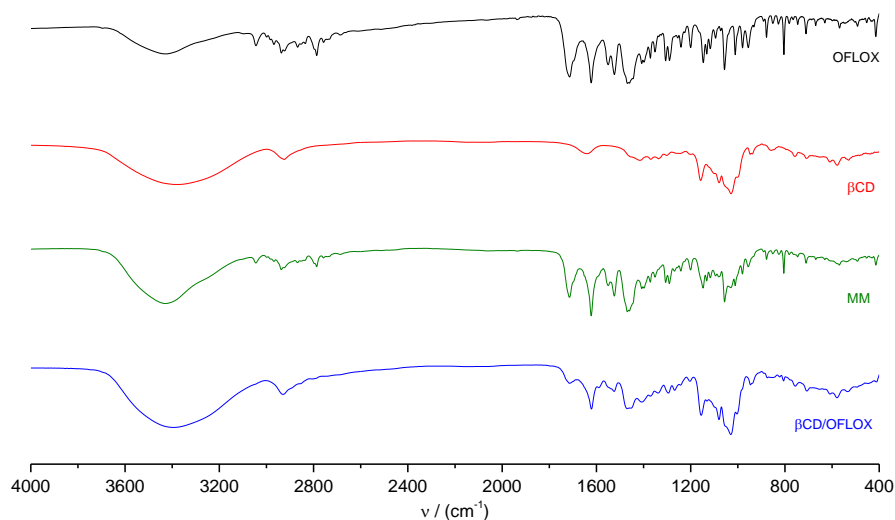


Legenda: v: número de onda.

No espectro de FTIR do OFLOX em pastilha de KBr é possível observar a presença de bandas de absorção referentes aos seus principais grupos funcionais, sendo eles: 3600 a 2500 cm⁻¹, 1715 cm⁻¹, 1622 cm⁻¹, 1524 cm⁻¹, 1407 cm⁻¹, 1057 cm⁻¹, 879 cm⁻¹ e 805 cm⁻¹. O ácido carboxílico na posição C-3 do OFLOX é caracterizado por duas bandas presentes no espectro, a banda na região que vai de 3600 a 2500 cm⁻¹ é atribuída ao estiramento da hidroxila (OH) do ácido carboxílico, e a banda presente na região 1715 cm⁻¹ que é característica da carbonila (C=O) (PANCHPURI et al., 2013; SZÉKELLY-SZENTMIKLÓSI; TÓKES, 2016). A banda de absorção em 1622 cm⁻¹ mostra o estiramento da carbonila cetônica presente na posição C-4 (MÁCIAS et al., 2002). A presença do anel aromático é caracterizada nas bandas situadas entre 900 e 800 cm⁻¹, indicando a vibração angular fora do plano de C-H do anel, e a confirmação da presença do mesmo pode ser feita na região entre 1600 e 1500 cm⁻¹, onde estão localizadas as ligações C=C do anel (COATES, 2000; MISIUK; JOZEFOWICZ, 2015). A banda em 1407 cm⁻¹ está associada à ligação C-N da piperazina e a banda em 1057 cm⁻¹ corresponde ao estiramento C-O-C do grupo éter do anel oxazina (COATES, 2000; PANCHPURI et al., 2013).

Na Figura 12 estão apresentados os espectros de infravermelho do OFLOX, βCD, MM e βCD/OFLOX na região de 4000 a 400 cm⁻¹.

Figura 12- Espectros de infravermelho do OFLOX, β CD, MM e β CD/OFLOX na região 4000 a 400 cm^{-1} em KBr.



Legenda: OFLOX: ofloxacino; β CD: β -ciclodextrina; MM: mistura mecânica; β CD/OFLOX: complexo de inclusão ofloxacino/ β -ciclodextrina; KBr: brometo de potássio; ν : número de onda.

O espectro da β CD está de acordo com o descrito na literatura, com absorções principais em 3381 cm^{-1} , 2925 cm^{-1} , 1158 cm^{-1} e 947 cm^{-1} , que correspondem ao estiramento OH, estiramento C-H, vibração C-O e a vibração envolvendo a ligação α -1,4, respectivamente (EGYED, 1990; YUAN, 2015).

Através do espectro da MM é possível observar que não ocorreram mudanças significativas nas posições das principais bandas observadas para o OFLOX e a β CD (Tabela 2), sendo que o perfil apresentado nos resultados é justificado pela sobreposição das bandas oriundas das mesmas (Figura 12). A MM foi preparada para demonstrar que o produto obtido (CI) apresenta características físico-químicas diferentes do que apenas uma mistura dos dois componentes isolados, sendo necessário um tempo de contato entre as espécies em solução, para que a interação ocorra.

Tabela 2- Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho de β CD, OFLOX, MM e β CD/OFLOX.

Substâncias	$\nu(\text{O-H})$	$\nu(\text{C=O})$	Vibração do anel piranose	$\nu(\text{C-O-C})$
β CD	3381	-	1158;1028	-
OFLOX	3427	1715;1622	-	1057
MM	3427	1715;1622	- ; 1028	1057
β CD/OFLOX	3393	1713;1623	1156; 1029	1054

Legenda: β CD: β -ciclodextrina; OFLOX: ofloxacino; MM: mistura mecânica; β CD/OFLOX: complexo de inclusão ofloxacino/ β -ciclodextrina; ν : número de onda.

No espectro da β CD/OFLOX é possível observar modificações do perfil das bandas, como desaparecimento, redução da intensidade e fusão de duas bandas, indicando que de

alguma forma o OFLOX encontra-se incluída na cavidade da β CD. Na Tabela 2 é possível realizar uma comparação entre algumas bandas principais da β CD/OFLOX com o OFLOX e MM. Na Tabela 3 são apresentadas as modificações e atribuições das bandas da β CD/OFLOX.

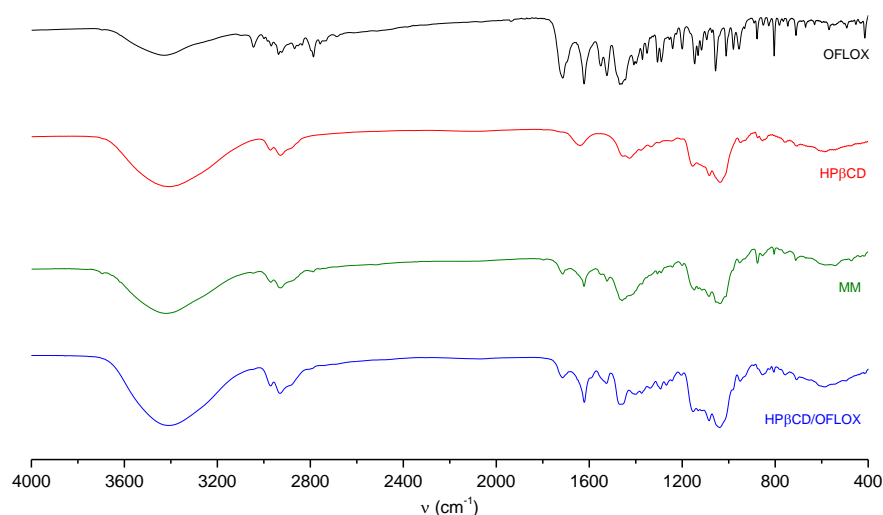
Tabela 3- Principais modificações das bandas observadas no espectro de infravermelho de β CD/OFLOX.

β CD/OFLOX (cm^{-1})	Modificação	Atribuição da banda
1713	Redução da intensidade	Estiramento de C=O do ácido carboxílico
1623	Redução da intensidade	Estiramento de C=O da cetona
1550	Redução da intensidade	Vibração da ligação C=C do anel aromático
1524	Redução da intensidade	Vibração da ligação C=C do anel aromático
1409 e 1399	Fusão das bandas	Vibração da ligação C-N da piperazina
1054	Redução da intensidade	Estiramento C-O-C do anel oxazina
879	Desaparecimento da banda	Vibração da ligação C-H do anel aromático
805	Redução da intensidade	Vibração da ligação C-H do anel aromático

Legenda: β CD/OFLOX: complexo de inclusão ofloxacino/ β -ciclodextrina.

Na Figura 13 estão apresentados os espectros de infravermelho do OFLOX, HP β CD, MM e HP β CD/OFLOX na região de 4000 a 400 cm^{-1} .

Figura 13- Espectros de infravermelho do OFLOX, HP β CD, MM e HP β CD/OFLOX na região 4000 a 400 cm^{-1} em KBr.



Legenda: OFLOX: ofloxacino; HP β CD: hidroxipropil- β -ciclodextrina; MM: mistura mecânica; HP β CD/OFLOX: complexo de inclusão ofloxacino/hidroxipropil- β -ciclodextrina; ν : número de onda.

Os espectros da HP β CD estão de acordo com o descrito na literatura, com absorções principais em 3410 cm^{-1} , 2929 cm^{-1} , 1155 cm^{-1} , 948 cm^{-1} , que correspondem ao estiramento

OH, estiramento C-H, vibração C-O e a vibração envolvendo a ligação α -1,4, respectivamente para HP β CD (EGYED, 1990; YUAN, 2015).

Na MM não ocorreram mudanças significativas nas posições das principais bandas observadas para o OFLOX e HP β CD isoladas. Na Tabela 4 é possível comparar algumas bandas principais da HP β CD, OFLOX, MM e HP β CD/OFLOX.

Tabela 4- Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho de HP β CD, OFLOX, MM e HP β CD/OFLOX.

Substâncias	v(O-H)	v(C=O)	Vibração do anel piranose	v(C-O-C)
HP β CD	3410	-	1155;1037	-
OFLOX	3427	1715;1622	-	1057
MM	3420	1715;1622	1155; 1037	1057
HP β CD/OFLOX	3410	1712;1622	1153; 1038	-

Legenda: HP β CD: hidroxipropil- β -ciclodextrina; OFLOX: ofloxacino; MM: mistura mecânica; HP β CD/OFLOX: complexo de inclusão ofloxacino/hidroxipropil- β -ciclodextrina; v: número de onda.

No espectro da HP β CD/OFLOX é possível observar modificações do perfil das bandas, como desaparecimento, redução da intensidade e fusão de duas bandas, sugerindo a inclusão do OFLOX na cavidade da HP β CD dados que podem ser observados na Tabela 5.

Tabela 5- Principais modificações das bandas observadas nos espectros de infravermelho de HP β CD/OFLOX.

HP β CD/OFLOX (cm ⁻¹)	Modificação	Atribuição da banda
1712	Redução da intensidade	Estiramento de C=O do ácido carboxílico
1622	Redução da intensidade	Estiramento de C=O da cetona
1551 e 1525	Fusão das bandas	Vibração da ligação C=C do anel aromático
1408	Redução da intensidade	Vibração da ligação C-N da piperazina
1057	Desaparecimento	Estiramento C-O-C do anel oxazina
879	Desaparecimento da banda	Vibração da ligação C-H do anel aromático
805	Redução da intensidade	Vibração da ligação C-H do anel aromático

Legenda: HP β CD/OFLOX: complexo de inclusão ofloxacino/hidroxipropil- β -ciclodextrina.

5.2 Análises térmicas: termogravimetria e análise térmica diferencial

As análises térmicas são técnicas termoanalíticas que avaliam mudanças nas propriedades físico-químicas das amostras quando expostas a uma varredura de temperatura (GIOLITO; IONASHIRO, 1980). Existem várias técnicas amplamente difundidas (IONASHIRO, 2005), mas serão abordadas apenas a TG e DTA, pois foram as utilizadas no presente trabalho.

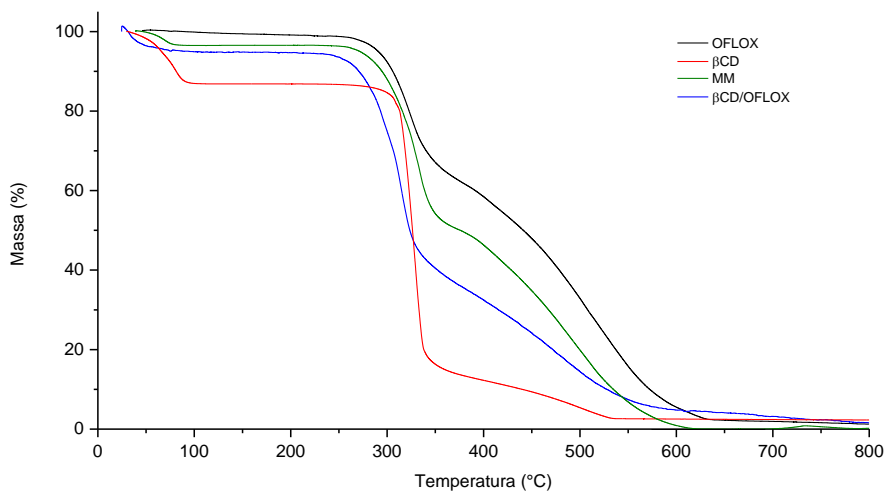
A TG é um método que baseia-se na medida da alteração da massa em função da temperatura ou do tempo, permitindo verificar processos de decomposição e oxidação,

intimamente relacionados à estabilidade das substâncias (CALDERINI, 2006). A DTA por sua vez é uma técnica de monitoramento contínuo das temperaturas da amostra e da referência (material termicamente inerte) à medida que ambas vão sendo aquecidas ou arrefecidas em um forno. Ela fornece o fluxo de calor resultante da diferença entre a temperatura da referência e da amostra em função da temperatura ou do tempo e permite determinar a natureza dos eventos (endotérmicos/exotérmicos) (GIOLITO; IONASHIRO, 1988; IONASHIRO, 2005). Tais técnicas podem ser utilizadas para avaliar a estabilidade térmica dos CI's e compará-los com seus precursores (OLIVEIRA; YOSHIDA; GOMES, 2011).

A avaliação das propriedades térmicas é importante para o CI, visto que ao ser formado podem ocorrer modificações na transição de fases (fusão, ebulição e sublimação), e também em eventos como desidratação, decomposição, entre outros. Essas modificações levam a uma alteração do comportamento térmico do complexo quando comparado com os componentes que o formaram (VILLAVARDE et al., 2004; YAO et al., 2014).

As curvas de TG do OFLOX, β CD, MM e β CD/OFLOX são apresentadas na Figura 14. Os eventos com temperaturas e porcentagens de perdas de massa das substâncias são apresentadas na Tabela 6.

Figura 14- Curva de TG para OFLOX, β CD, MM e β CD/OFLOX.



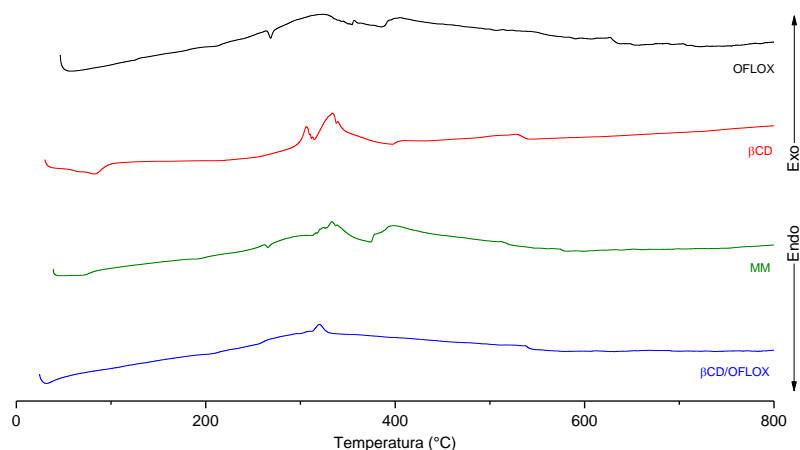
Legenda: TG: termogravimetria; OFLOX: ofloxacino; β CD: β -ciclodextrina; MM: mistura mecânica; β CD/OFLOX: complexo de inclusão ofloxacino/ β -ciclodextrina.

Tabela 6- Principais eventos térmicos atribuídos para o OFLOX, β CD, MM e β CD/OFLOX.

Substância	TG			
	Eventos		Δm (%)	Atribuição
	T _i	T _f		
OFLOX	30	249	1,24	Desidratação
	270	636	96,34	Fusão/Decomposição
	637	800	2,42	
β CD	30	99	13,05	Perda de moléculas de água
	239	340	67,78	Decomposição
	341	531	16,16	
MM	39	90	3,5	Perda de moléculas de água
	245	346	40,89	Decomposição da mistura MM
	347	617	55,36	
β CD/OFLOX	30	96	5,03	Perda de moléculas de água
	236	326	45,2	Decomposição do complexo
	327	606	44,28	

Legenda: TG: termogravimetria; T_i: temperatura inicial do evento; T_f: temperatura final do evento; Δm : variação de massa; OFLOX: ofloxacino; β CD: β -ciclodextrina; MM: mistura mecânica; β CD/OFLOX: complexo de inclusão ofloxacino/ β -ciclodextrina.

A curva de TG do OFLOX mostra uma estabilidade térmica da mesma até 249 °C, com perda de apenas 1,24% da massa, o que pode ser atribuído à evaporação das moléculas de água adsorvidas. Na curva DTA (Figura 15) um evento endotérmico a 268 °C foi atribuído à fusão da substância seguido de sua decomposição, estando de acordo com os dados da literatura (AL-OMAR, 2009; FARMACOPEIA, 2010). A segunda perda de massa ocorreu em duas etapas. Começou em aproximadamente 270 °C e terminou em 636 °C, com perda de 96,34%. A massa restante ($m = 2,42\%$) foi totalmente decomposta na temperatura final. Na curva de DTA, a desidratação e a decomposição foram observadas como picos endotérmicos.

Figura 15- Curva de DTA para OFLOX, β CD, MM e β CD/OFLOX.

Legenda: DTA: análise térmica diferencial; OFLOX: ofloxacino; β CD: β -ciclodextrina; MM: mistura mecânica; β CD/OFLOX: complexo de inclusão ofloxacino/ β -ciclodextrina; Endo: endotérmico; Exo: exotérmico.

A curva de TG para β CD apresenta um evento que inicia em 30 °C finalizando em 99 °C, perdendo 13,05% de massa referente à saída de moléculas de água presentes na cavidade da mesma (GIORDANO; NOVAK; MOYANO, 2001). Na curva de DTA é possível observar um pico endotérmico iniciando em 30 °C e finalizando aproximadamente a 105 °C, confirmando que essa primeira perda de massa que ocorre na β CD é devido a sua desidratação (Figura 15). Outra perda inicia-se após um período de estabilidade térmica (100 a 264 °C) observado entre 265 a 340 °C, comprometendo 67,54% da massa, faixa de temperatura em que ocorre a sua fusão acompanhada de decomposição. A partir de 341 °C até 534 °C ocorrem sucessivos eventos de decomposição (GIORDANO; NOVAK; MOYANO, 2001; KOHATA; JYODOI; OHYOSHI, 1993), após essa temperatura até 800 °C é possível observar uma estabilização com um resíduo de 2,3% da massa da amostra inicial de β CD.

A curva de TG da MM apresenta uma perda de massa de 3,5% na faixa 39 °C a 90 °C, referente à saída de moléculas de água presentes nas substâncias. Ocorre uma estabilização térmica na faixa de 91 °C a 245 °C, iniciando dois processos de decomposição, que após esse intervalo de temperatura resultam na perda de 40,89% (246 a 346 °C) e 55,43% (347 a 621 °C) de sua massa. Em seguida, ocorre uma estabilização com um resíduo de 0,07% da massa inicial. Na curva de DTA é possível observar um pico endotérmico que se inicia na temperatura de 39 °C a 89 °C, corroborando com o dado da TG, indicando um evento de desidratação. Além disso, a MM permanece com o pico endotérmico referente à fusão do OFLOX na temperatura de 268 °C, indicando que não ocorreram interações com a simples mistura de cada componente.

A curva de TG do CI de β CD/OFLOX mostra uma perda de 5,03% de massa, na faixa de temperatura de 30 °C a 96 °C, referente à perda de moléculas de água presentes na β CD. A estabilização térmica da β CD/OFLOX ocorre de 97 °C a 236 °C, após essa temperatura iniciam-se processos de decomposição da massa do complexo com perda de 45,2%, entre 237 °C a 326 °C e 44,28% entre 327 °C a 606 °C. Na curva de DTA foi possível observar que o pico endotérmico que indicava o evento de fusão do OFLOX na temperatura de 268 °C desapareceu.

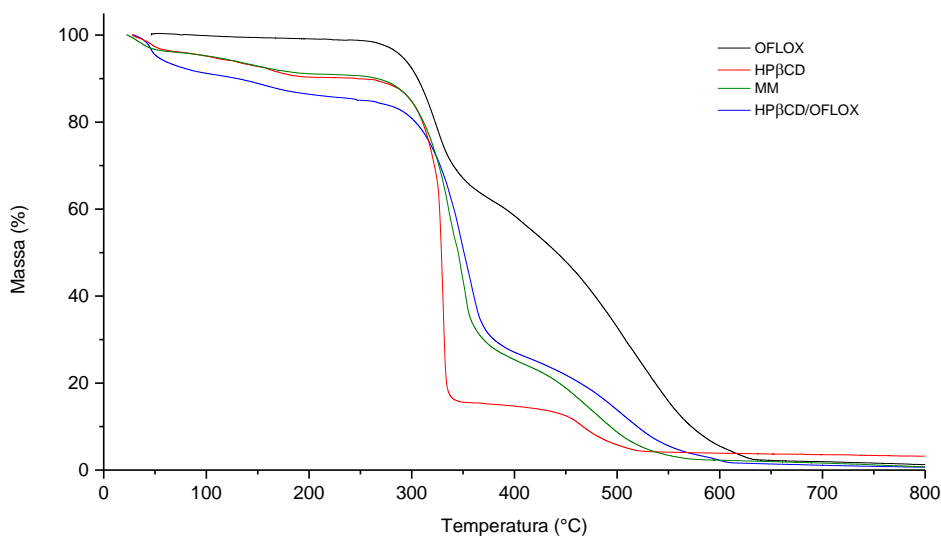
Retornando à Figura 14, onde são apresentadas as quatro curvas de TG, é possível sugerir que houve interação entre o OFLOX e β CD através de três fenômenos. O primeiro é referente à temperatura de início da primeira perda de massa do CI quando comparado com a MM, sendo que no CI ocorre em 25 °C e na MM em 39 °C. O segundo fenômeno é a quantidade de massa perdida relacionado à perda de moléculas de água do CI quando comparado com a β CD, sendo que no complexo a perda é de 5,03% e na β CD é de 13,05%.

Isso mostra que a β CD/OFLOX possui menos moléculas de água, evento decorrente da introdução do OFLOX na cavidade da β CD com consequente expulsão de algumas dessas moléculas (BREWSTER; LOFTSSON, 2007). O terceiro e último fenômeno é redução da temperatura de início da decomposição do CI quando comparado com o OFLOX, sendo que no CI ocorre em 236 °C e no OFLOX puro em 270 °C. Ainda sobre a temperatura de decomposição, é possível observar a perda do pico endotérmico (268 °C) presente na curva de DTA, concernente à fusão do OFLOX, mostrando que de alguma forma ocorreu a interação entre hóspede e matriz, pois alterou o perfil térmico do OFLOX quando complexada com β CD.

As curvas de TG do OFLOX, HP β CD, MM e HP β CD/OFLOX são apresentadas na Figura 16. Na Tabela 7 estão resumidos os eventos com suas determinadas temperaturas e porcentagens de perdas de massa.

A curva de TG para HP β CD mostrou dois eventos iniciais de perdas de massa de 3,73% e 5,88%, que ocorreram em consequência da eliminação de moléculas de água de adsorção (30 a 60 °C) e desidratação (61 a 198 °C). Outros eventos são observados a partir da temperatura de 263 °C decorrente da decomposição térmica da HP β CD, perdendo 85,44% de sua massa até a temperatura de 527 °C (VEIGA et al., 2002). Após a temperatura de 527 °C ocorre estabilização com um resíduo de 4,28% da massa inicial da amostra.

Figura 16- Curva de TG para OFLOX, HP β CD, MM e HP β CD/OFLOX.



Legenda: TG: termogravimetria; OFLOX: ofloxacino; HP β CD: hidroxipropil- β -ciclodextrina; MM: mistura mecânica; HP β CD/OFLOX: complexo de inclusão ofloxacino/hidroxipropil- β -ciclodextrina.

Tabela 7- Principais eventos térmicos atribuídos para o OFLOX, HP β CD, MM e HP β CD/OFLOX.

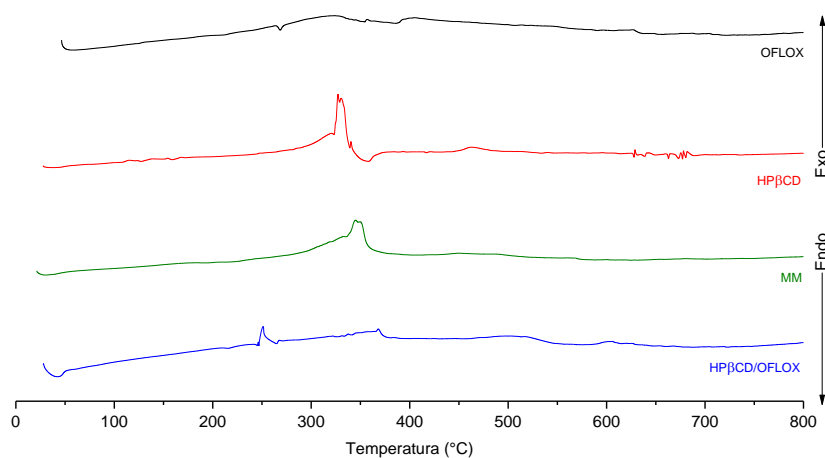
Substância	TG			
	Eventos		Δm (%)	Atribuição
	T _i	T _f		
OFLOX	30	249	1,24	Desidratação
	270	636	96,34	Fusão/Decomposição
	637	800	2,42	
HP β CD	30	60	3,73	Perda de moléculas de água adsorvidas na molécula
	61	198	5,88	Desidratação
	263	346	73,98	Decomposição
	347	527	11,46	
MM	30	62	3,76	Perda de moléculas de água
	63	200	5,12	
	240	359	57,12	Decomposição da MM
	360	578	31,20	
HP β CD/OFLOX	30	69	6,98	Perda de moléculas de água
	70	262	8,29	
	263	373	52,92	Decomposição do complexo
	374	619	29,67	

Legenda: TG: termogravimetria; Ti: temperatura inicial do evento; Tf: temperatura final do evento; Δm : variação de massa; OFLOX: ofloxacino; HP β CD: hidroxipropil- β -ciclodextrina; MM: mistura mecânica; HP β CD/OFLOX: complexo de inclusão ofloxacino/hidroxipropil- β -ciclodextrina

A MM do OFLOX com HP β CD tem a primeira perda de 3,76% de massa na temperatura de 30 °C a 62 °C, referente às moléculas de água presentes na mistura. Uma segunda perda de 5,12% é observada na faixa de 63 °C a 200 °C, sendo que a partir dessa temperatura inicia-se o processo de estabilização até 240 °C. Após essa temperatura ocorre uma decomposição com grande perda de massa dividida em dois eventos, 57,12% (241 a 359 °C) e 31,12% (360 a 578 °C). Em seguida dá-se início a um período de estabilização da massa com um resíduo de 2,44%.

Na curva de TG da HP β CD/OFLOX observa-se a alteração do perfil térmico do OFLOX complexado com a HP β CD quando comparada com o OFLOX puro. Primeiramente ocorre uma perda de 6,98% de massa na faixa de temperatura de 30 °C a 69 °C, referente à perda de moléculas de água presentes no complexo. Esse evento pode ser observado também na curva de DTA, onde um pico endotérmico inicia-se na temperatura de 30 °C e finaliza-se em 55 °C (Figura 17). A principal mudança que ocorre e que sugere a formação do CI é a alteração da temperatura de início da decomposição, pois a em HP β CD/OFLOX inicia-se em 263 °C com perda de 87,77% da massa, e no OFLOX puro inicia em 270 °C com perda de 96,39% de massa.

Figura 17- Curva de DTA para OFLOX, HP β CD, MM e HP β CD/OFLOX.



Legenda: DTA: análise térmica diferencial; OFLOX: ofloxacino; HP β CD: hidroxipropil- β -ciclodextrina; MM: mistura mecânica; HP β CD/OFLOX: complexo de inclusão ofloxacino/hidroxipropil- β -ciclodextrina; Endo: endotérmico; Exo: exotérmico.

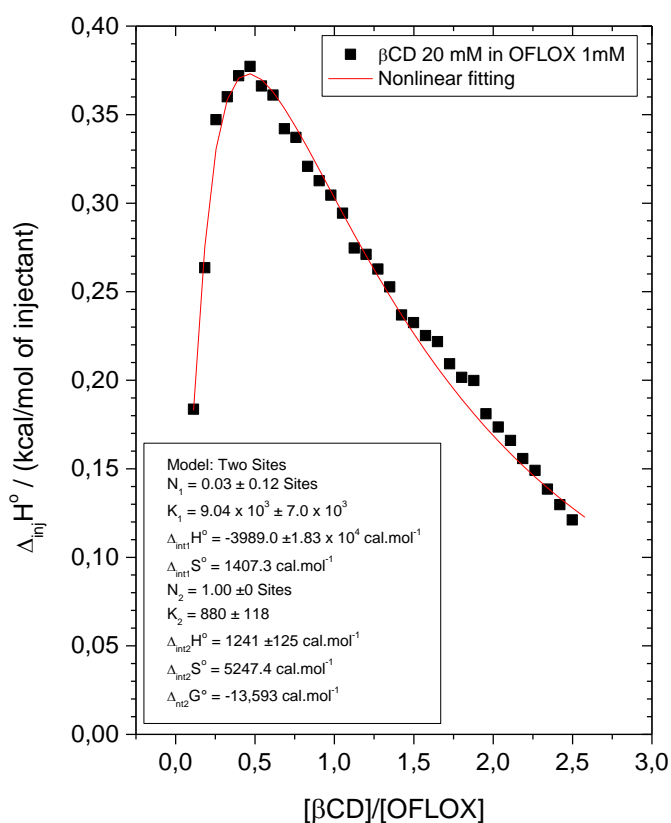
5.3 Titulação calorimétrica isotérmica

A ITC é uma técnica usada para determinar os parâmetros termodinâmicos de interações moleculares, que geram alterações nas propriedades termodinâmicas podendo ser medidas por microcalorimetria. Essa técnica mede diretamente o fluxo de calor (energia) liberado ou absorvido pelo sistema ao longo de uma reação, onde estão envolvidas interações inter e intramoleculares. A energia é registrada em função da concentração de reagente titulante, sendo o calor liberado ou absorvido proporcional à quantidade de reagente injetado (WISEMAN et al., 1989). As variações de calor entre a amostra e a referência são devidas às interações e quebras de interações que ocorrem durante a titulação, sendo determinadas por um sistema de resposta eletrônico, o qual garante que a temperatura no sistema seja sempre constante (FERNANDES et al., 2007; SELVA et al., 2010).

A ITC é uma técnica muito utilizada na caracterização dos CI's por permitir a determinação direta da estequiometria de complexação (N), da constante de associação (K) e da variação de entalpia (ΔH). Além disso, os parâmetros como variação de entropia (ΔS) e energia livre de Gibbs (ΔG) do processo podem ser calculados a partir do emprego de equações termodinâmicas e dos dados obtidos no experimento de ITC, proporcionando um perfil termodinâmico completo da interação molecular em um único ensaio (SELVA et al., 2010).

Na Figura 18 é apresentada a curva final de titulação da β CD em OFLOX. Inicialmente foram realizadas as titulações das substâncias em água e, após a subtração dessa curva de diluição (branco), obteve-se a curva final de titulação. Esse procedimento teve como objetivo excluir os efeitos de interação soluto-soluto, soluto-solvente e solvente-solvente, a fim de avaliar apenas as interações soluto-ciclodextrina (DENADAI, 2005), especialmente porque foi utilizado a mistura DMSO/H₂O 40:60 como solvente. Na Tabela 8 estão apresentados os valores termodinâmicos de interação entre OFLOX e β CD obtidos pelo experimento, na unidade de cal.mol⁻¹.

Figura 18- ITC da β CD (20 mM em DMSO:H₂O (40:60)) em solução de OFLOX (1 mM em DMSO:H₂O (40:60)) a 25 °C.



Legenda: ITC: titulação calorimétrica isotérmica; HP β CD: hidroxipropil- β -ciclodextrina; OFLOX: ofloxacino; N: estequiometria; K: constante de associação; Δ H: variação de entalpia; Δ S: variação de entropia; Δ G: energia livre de Gibbs.

Tabela 8- Parâmetros termodinâmicos de interação entre OFLOX e β CD (T = 25 °C).

Complexo	N	K	ΔG° (cal.mol ⁻¹)	ΔH° (cal.mol ⁻¹)	ΔS° (cal.mol ⁻¹)
β CD/OFLOX	1,0 \pm 0,0	880 \pm 118	- 4006	+ 1241 \pm 125	+ 5247,4

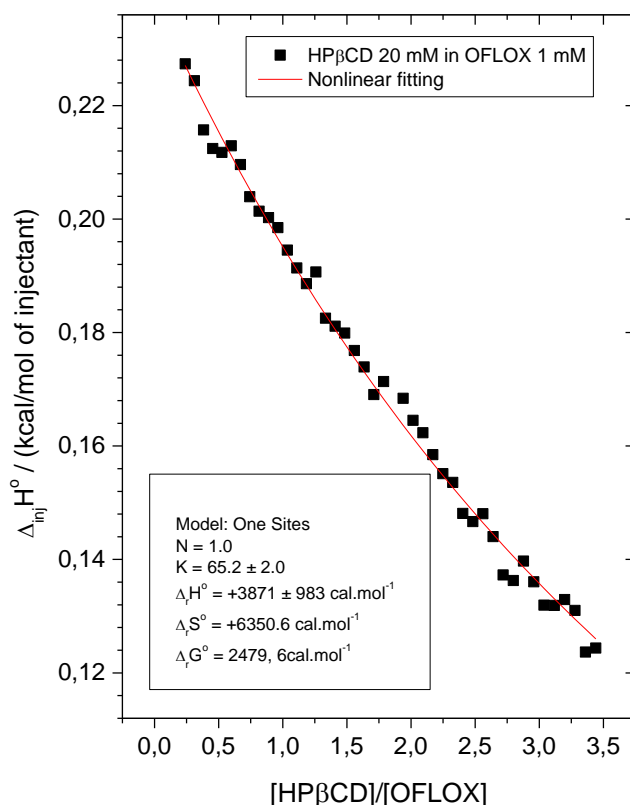
Legenda: β CD/OFLOX: complexo de inclusão ofloxacino/ β -ciclodextrina; N: estequiometria; K: constante de associação; ΔH : variação de entalpia; ΔG : energia livre de Gibbs; ΔS : variação de entropia.

Para a titulação da β CD em OFLOX foi possível verificar que a estequiometria do complexo é 1:1, uma vez que o “N” encontrado foi de 1,0 \pm 0,0. De acordo com os dados termodinâmicos, pôde-se observar que a complexação é um processo endotérmico favorecido pela entropia. O processo endotérmico ($\Delta H^\circ > 0$) ocorrido durante a titulação, indica quebra de interações intermoleculares com subsequente formação de interações menos estáveis do que as existentes antes da complexação. Esse efeito geralmente é endotérmico devido à quebra de muitas ligações de hidrogênio (REKHARSKY; INOUE; 1998; TURNBULL; DARANAS, 2003). A variação positiva de entropia (ΔS°) indica que moléculas hidrofóbicas, neste caso o OFLOX, tendem a apresentar interação molecular conhecida como “efeito hidrofóbico” no processo de inclusão. Durante esse processo ocorre quebra da estrutura de solvatação dos grupos funcionais do OFLOX com consequente liberação de moléculas de água, que ganham graus de liberdade rotacionais e translacionais gerando desta forma uma elevação da entropia (desordem) do sistema (LOFTSSON; BREWSTER, 1996; SELVA et al., 2010). Em relação à constante de associação encontrada para o complexo da β CD/OFLOX, o valor obtido foi relativamente baixo (REKHARSKY; INOUE; 1998; TURNBULL; DARANAS, 2003), mas da mesma magnitude da encontrada na literatura para outros CI's (DENADAI et al., 2007; SILVA, 2015).

Na Figura 19 está apresentada a curva final de titulação da HP β CD em OFLOX. O CI apresentou novamente uma estequiometria de 1:1 sendo o processo para sua formação espontâneo ($\Delta G^\circ < 0$), porém com uma menor constante de associação quando comparado com o sistema β CD/OFLOX (Tabela 9). Os resultados mostraram que o processo de complexação foi endotérmico ($\Delta H^\circ > 0$) e favorecidos pela entropia ($\Delta S^\circ > 0$). Neste caso também ocorreu o processo de quebra e formação de interações menos estáveis sugerido pela $\Delta H^\circ > 0$, e como a complexação é com a mesma molécula hóspede (OFLOX) o efeito hidrofóbico justifica a $\Delta S^\circ > 0$ (FERNANDES et al., 2007; SELVA et al., 2010; TURNBULL; DARANAS, 2003). No entanto, a constante de associação foi muito baixa (K= 65,2), sendo atribuída ao impedimento estérico causado pelos grupos hidroxipropílicos

presentes na superfície externa da HP β CD. A maior polaridade desta ciclodextrina também pode contribuir para reduzir a afinidade entre as moléculas.

Figura 19- ITC da HP β CD (20 mM em DMSO:H₂O (40:60)) em solução de OFLOX (1 mM em DMSO:H₂O (40:60)) a 25 °C.



Legenda: ITC: titulação calorimétrica isotérmica; HP β CD: hidroxipropil- β -ciclodextrina; OFLOX: ofloxacino; N: estequiometria; K: constante de associação; Δ H: variação de entalpia; Δ S: variação de entropia; Δ G: energia livre de Gibbs.

Tabela 9- Parâmetros termodinâmicos de interação entre OFLOX e HP β CD (T = 25 °C).

Complexo	N	K	ΔG° (cal.mol ⁻¹)	ΔH° (cal.mol ⁻¹)	ΔS° (cal.mol ⁻¹)
H β CD/OFLOX	1,0 \pm 0,0	65,2 \pm 2,0	- 2479,6	+ 3871 \pm 983	+ 6350,6

Legenda: OFLOX/HP β CD: complexo de inclusão ofloxacino/hidroxipropil- β -ciclodextrina; N: estequiometria; K: constante de associação; Δ H: variação de entalpia; Δ G: energia livre de Gibbs; Δ S: variação de entropia.

Esses dados reafirmam que os complexos de estequiometria de 1:1 foram os mais favorecidos, o que justificou a preparação dos mesmos com essa estequiometria. Além disso, os parâmetros termodinâmicos são compatíveis com os de outros CI's (DENADAI et al., 2006a; DENADAI et al., 2006b, DENADAI et al., 2007; FERNANDES et al., 2007), porém

apresentaram valores diferentes de constante de associação. A magnitude das constantes de associação obtidas neste estudo foi distinta da obtida por Li e Zhang (2011) por fluorescência em meio aquoso, a qual é atribuída às diferenças no solvente utilizado nas duas abordagens experimentais. No entanto, esses autores também encontraram maiores valores de K para o sistema β CD/OFLOX se comparado com o sistema HP β CD/OFLOX, corroborando a hipótese sobre a ocorrência de impedimento estérico na presença de HP β CD.

5.4 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

A espectroscopia de RMN está baseada na absorção da radiação eletromagnética, pelos núcleos de uma molécula submetida a um campo magnético externo forte. Essas absorções fornecerão um espectro com sinais em determinadas frequências contra suas intensidades (ALVES, 2010).

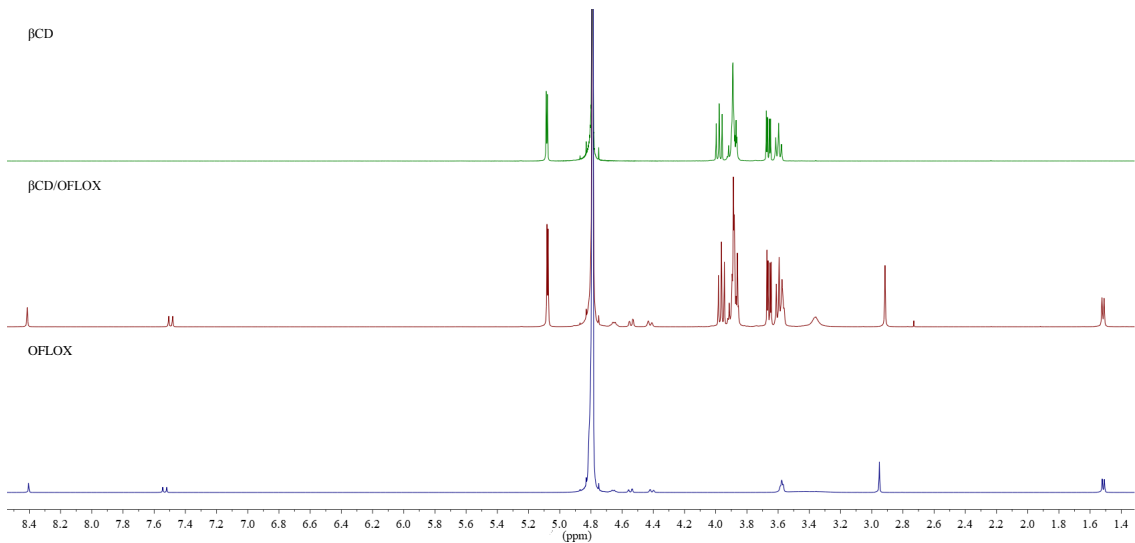
Diversos núcleos podem ser detectados e estudados por RMN tais como: ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F e ^{31}P . A RMN de ^1H é muito usada na caracterização dos CI's devido à facilidade de interpretação dos dados, bem como boa sensibilidade, uma vez que os deslocamentos químicos envolvidos na interação matriz-hóspede fornecem informações fundamentais sobre a complexação (CAMERON; FIELDING, 2001; SCHNEIDER et al., 1998).

No espectro dos CI's, as modificações dos sinais da matriz se devem às alterações causadas pela associação com o hóspede, visto que ocorre alteração no ambiente químico ao redor dos átomos de hidrogênio no interior da cavidade da ciclodextrina (SCHNEIDER et al., 1998). Além disso, a molécula hóspede sofre alterações dos sinais de seus núcleos que penetram na cavidade da ciclodextrina, pois os mesmos se encontram em um novo ambiente químico, distinto daquele onde estavam originalmente solvatado (SCHNEIDER et al., 1998).

A RMN de ^1H foi realizada para investigar a interação do OFLOX com a β CD e HP β CD através da variação do deslocamento químico dos sinais de ^1H , tanto da matriz quanto do hóspede, a fim de obter evidências concretas da formação dos CI's.

Os espectros de RMN de ^1H do OFLOX, β CD e β CD/OFLOX são mostrados na Figura 20. Os espectros foram referenciados ao sinal do solvente (D_2O) em 4,79 ppm.

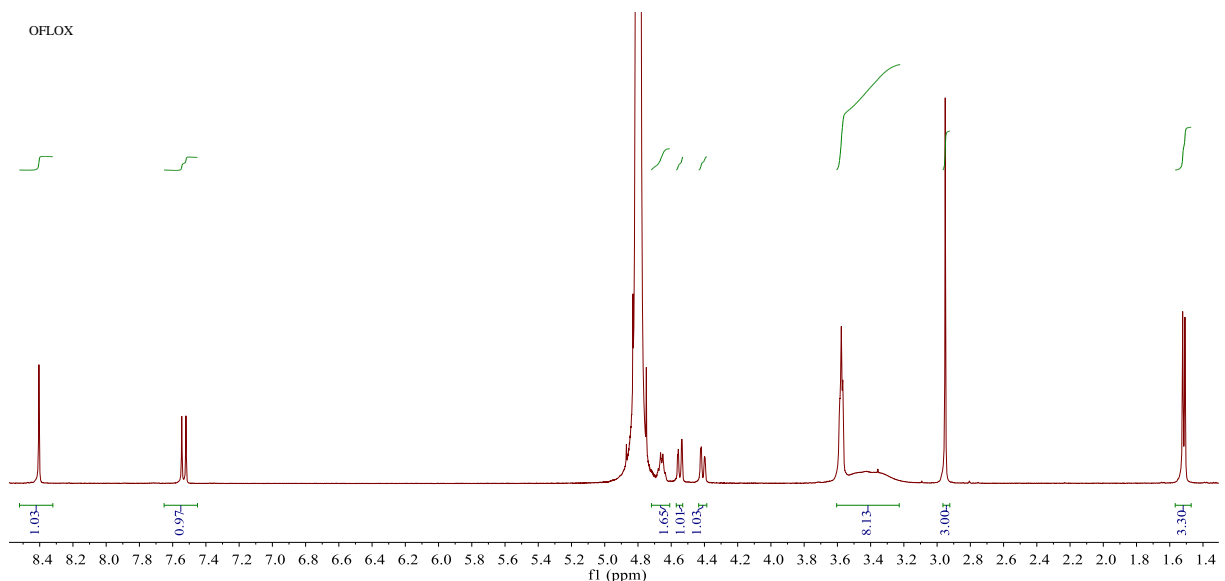
Figura 20- Espectros de RMN de ^1H da βCD , $\beta\text{CD}/\text{OFLOX}$ e OFLOX em D_2O , 500 MHz.



Legenda: RMN de ^1H : ressonância magnética nuclear de hidrogênio; βCD : β -ciclodextrina; $\beta\text{CD}/\text{OFLOX}$: complexo de inclusão ofloxacino/ β -ciclodextrina; OFLOX : ofloxacino; D_2O : óxido de deutério; MHz: mega-hertz; ppm: partes por milhão.

O espectro de RMN de ^1H , a 500 MHz, para o OFLOX está apresentado na Figura 21 na qual é possível verificar que a integral de cada sinal corresponde ao número total de hidrogênios da molécula. As atribuições dos sinais de ^1H estão de acordo com o relatado na literatura (AL-OMAR, 2009; CHAO et al., 2014). Na tabela 10 encontram-se as atribuições dos sinais e deslocamento químico dos hidrogênios do OFLOX e $\beta\text{CD}/\text{OFLOX}$.

Figura 21: Espectro de RMN de ^1H do OFLOX em D_2O , 500 MHz.



Legenda: RMN de ^1H : ressonância magnética nuclear de hidrogênio; OFLOX : ofloxacino; D_2O : óxido de deutério; MHz: mega-hertz; ppm: partes por milhão.

Tabela 10- Deslocamentos químicos de hidrogênios (^1H) em ppm do OFLOX e $\beta\text{CD}/\text{OFLOX}$ (D_2O , 500 MHz).

Atribuições	OFLOX	COMPLEXO		
		$\beta\text{CD}/\text{OFLOX}$	$\Delta\delta$	
2	—CH	8,4048	8,4136	0,0088
5	—CH	7,5326	7,4944	0,0382
2''	—CH ₂	4,6569	4,6522	0,0047
3''	—CH	4,4095	4,4211	0,0116
2', 6'	—CH ₂	3,5675	3,5621	0,0054
3', 5'	—CH ₂	3,3564	3,3573	0,0009
12	—CH ₃	2,9511	2,9148	0,0363
13	—CH ₃	1,5154	1,5170	0,0016

Legenda: OFLOX: ofloxacino; $\beta\text{CD}/\text{OFLOX}$: complexo de inclusão ofloxacino/ β -ciclodextrina; $\Delta\delta$: variação do deslocamento dos sinais de ^1H da βCD no respectivo complexo; ppm: partes por milhão.

Para a βCD o espectro de RMN de ^1H a 500 MHz, em D_2O , está de acordo com relatos na literatura (MORAIS, 2016; SOUSA, 2007, VEIGA et al., 2001). As atribuições e valores dos deslocamentos químicos da βCD e $\beta\text{CD}/\text{OFLOX}$, bem como a variação de deslocamento quando comparado os dois espectros estão relacionados na Tabela 11.

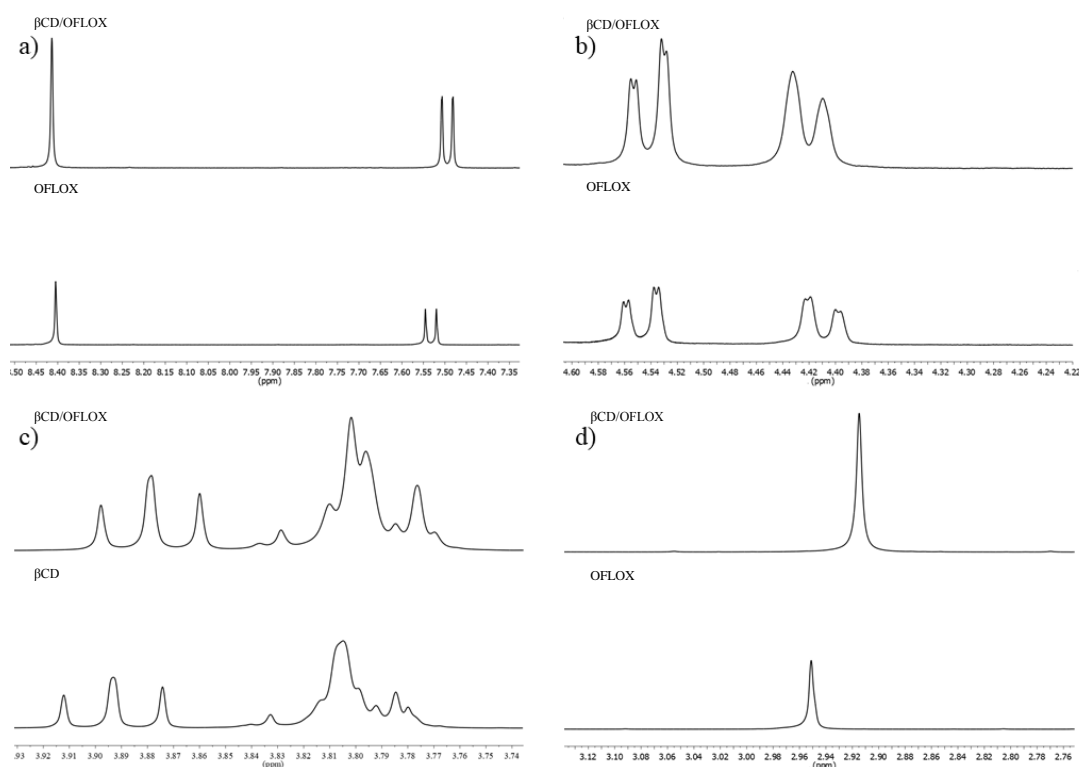
Tabela 11- Deslocamentos químicos de hidrogênios (^1H) em ppm da βCD e $\beta\text{CD}/\text{OFLOX}$ (D_2O , 500 MHz).

Atribuições	βCD	COMPLEXO		
		$\beta\text{CD}/\text{OFLOX}$	$\Delta\delta$	
1	—CH	4,9979	4,9933	0,0046
2	—CH	3,5908	3,5868	0,0040
3	—CH	3,9121	3,8979	0,0142
4	—CH	3,5635	3,5596	0,0039
5	—CH	3,8328	3,8287	0,0041
6	—CH ₂	3,8048	3,8017	0,0031

Legenda: βCD : β -ciclodextrina; $\beta\text{CD}/\text{OFLOX}$: complexo de inclusão ofloxacino/ β -ciclodextrina; $\Delta\delta$: variação do deslocamento dos sinais de ^1H da βCD no respectivo complexo; ppm: partes por milhão.

Na Figura 22 é possível observar as ampliações das principais variações de deslocamentos químicos entre OFLOX, βCD e $\beta\text{CD}/\text{OFLOX}$.

Figura 22- Ampliação de alguns deslocamentos dos sinais de ^1H da $\beta\text{CD}/\text{OFLOX}$, OFLOX e βCD .

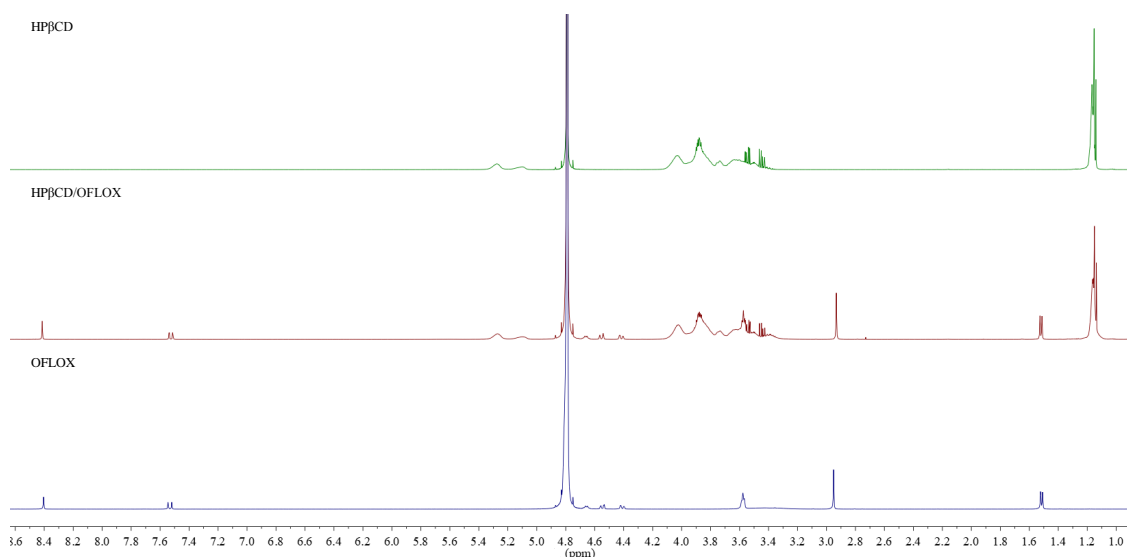


Legenda: Ampliação dos deslocamentos químicos dos espectros de RMN de ^1H da $\beta\text{CD}/\text{OFLOX}$ e OFLOX , e $\beta\text{CD}/\text{OFLOX}$ e βCD . Deslocamentos dos sinais de ^1H : a) H2 ($\approx 8,4$ ppm) e H5 ($\approx 7,5$ ppm) de $\beta\text{CD}/\text{OFLOX}$ e OFLOX ; b) H3'' ($\approx 4,4$ ppm) de $\beta\text{CD}/\text{OFLOX}$ e OFLOX ; c) H3 ($\approx 3,9$ ppm) de $\beta\text{CD}/\text{OFLOX}$ e βCD ; d) H12 ($\approx 2,9$ ppm) de $\beta\text{CD}/\text{OFLOX}$ e OFLOX . $\beta\text{CD}/\text{OFLOX}$: complexo de inclusão ofloxacino/ β -ciclodextrina; OFLOX : ofloxacino; βCD : β -ciclodextrina.

A formação dos complexos com ciclodextrinas gera alterações sobre a densidade eletrônica dos núcleos de hidrogênios envolvidos nas interações, o que reflete nos espectros de RMN como alterações dos deslocamentos químicos ou alargamento dos sinais (SCHNEIDER et al., 1998). Os dados apresentados nas Tabelas 10 e 11 mostram que os hidrogênios da cavidade da βCD (principalmente H3) e OFLOX foram influenciados após a complexação. Através dos dados obtidos, principalmente em relação à variação do deslocamento químico de H3 e H5 da βCD , pode-se concluir que ocorreu uma inclusão parcial, pois segundo Greatbanks e Pickford (1987) quando $\Delta\delta \text{H3} > \Delta\delta \text{H5}$ ocorre a inclusão parcial do hóspede dentro da cavidade e quando $\Delta\delta \text{H5} \geq \Delta\delta \text{H3}$ ocorre a inclusão total.

Na Figura 23 estão apresentados os espectros de RMN de ^1H da $\text{HP}\beta\text{CD}$, OFLOX e $\text{HP}\beta\text{CD}/\text{OFLOX}$. Os espectros foram referenciados ao sinal do solvente (D_2O) em 4,79 ppm.

Figura 23- Espectros de RMN de ^1H da HP β CD, HP β CD/OFLOX e OFLOX em D_2O , 500 MHz.



Legenda: RMN de ^1H : ressonância magnética nuclear de hidrogênio; HP β CD: hidroxipropil- β -ciclodextrina; HP β CD/OFLOX: complexo de inclusão ofloxacino/hidroxipropil- β -ciclodextrina; OFLOX: ofloxacino; D_2O : óxido de deutério; MHz: mega-hertz; ppm: partes por milhão.

As atribuições e os valores dos deslocamentos do espectro de RMN de ^1H da HP β CD estão de acordo com a literatura (WANG et al., 2014). Na Tabela 12 estão apresentadas as variações de deslocamentos dos sinais de ^1H entre a HP β CD e HP β CD/OFLOX.

Algumas variações nos deslocamentos foram observadas no espectro de RMN de ^1H da HP β CD/OFLOX quando comparado com o espectro do OFLOX. As atribuições dos sinais e deslocamentos químicos dos hidrogênios do OFLOX e HP β CD/OFLOX, bem como as variações de deslocamentos dos sinais de ^1H entre os dois espectros encontram-se apresentadas na Tabela 13. Na figura 24 são apresentadas as ampliações dos deslocamentos dos sinais de ^1H da HP β CD/OFLOX e OFLOX

Tabela 12- Deslocamentos químicos de hidrogênios (^1H) em ppm da HP β CD e HP β CD/OFLOX (D_2O , 500 MHz).

Atribuições	HP β CD	COMPLEXO		
		HP β CD/OFLOX	$\Delta\delta$	
1	—CH	5,1892	5,1844	0,0048
2	—CH	3,4746	3,4727	0,0019
3	—CH	3, 8265	3,8244	0,0021
4	—CH	3,9420	3,9370	0,0050
5	—CH	3,7662	3,3641	0,0021
6	—CH ₂	3,6503	3,6487	0,0016

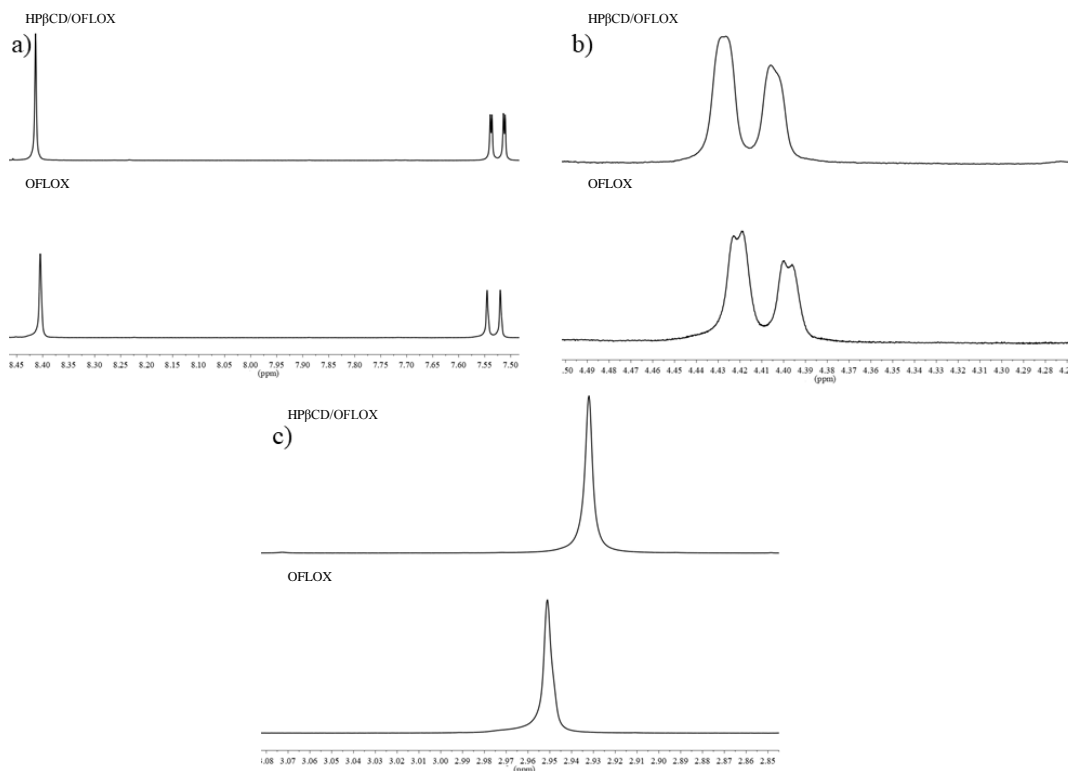
Legenda: HP β CD: hidroxipropil- β -ciclodextrina; HP β CD/OFLOX: complexo de inclusão ofloxacino/hidroxipropil- β -ciclodextrina; $\Delta\delta$: variação do deslocamento dos sinais de ^1H da HP β CD no respectivo complexo; ppm: partes por milhão.

Tabela 13- Deslocamentos químicos de hidrogênios (^1H) do OFLOX e HP β CD/OFLOX (D_2O , 500 MHz).

Atribuições	OFLOX	COMPLEXO		
		HP β CD/OFLOX	$\Delta\delta$	
2	—CH	8,4048	8,4137	0,0089
5	—CH	7,5326	7,5248	0,0078
2''	—CH ₂	4,6569	4,6610	0,0041
3''	—CH	4,4095	4,4172	0,0077
2', 6'	—CH ₂	3,5675	3,5736	0,0061
3', 5'	—CH ₂	3,3564	---	----
12	—CH ₃	2,9511	2,9321	0,0190
13	—CH ₃	1,5154	1,5197	0,0043

Legenda: OFLOX: ofloxacino; HP β CD/OFLOX: complexo de inclusão ofloxacino/hidroxiopropil- β -ciclodextrina; $\Delta\delta$: variação do deslocamento dos sinais de ^1H da HP β CD no respectivo complexo; ppm: partes por milhão.

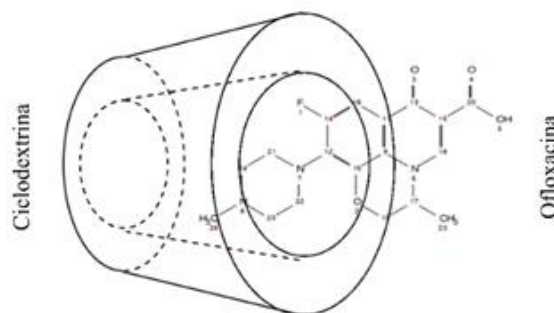
Comparando as mudanças nos deslocamentos químicos dos CI's, observa-se que para sistema com β CD houve uma maior variação desse parâmetro. Essa mudança é condizente com o maior valor da constante de associação encontrada para o CI de β CD/OFLOX.

Figura 24- Ampliação de alguns deslocamentos dos sinais de ^1H da HP β CD/OFLOX e OFLOX.

Legenda: Ampliação dos deslocamentos químicos dos espectros de RMN de ^1H da HP β CD/OFLOX e OFLOX. Deslocamentos dos sinais de ^1H : a) H2 ($\approx 8,4$ ppm) e H5 ($\approx 7,5$ ppm); b) H3'' ($\approx 4,4$ ppm); c) H12 ($\approx 2,9$ ppm). HP β CD/OFLOX: complexo de inclusão ofloxacino/hidroxiopropil- β -ciclodextrina; OFLOX: ofloxacino.

Os dados de RMN de ^1H permitiram propor a seguinte estrutura supramolecular para os CI's, apresentada na Figura 25.

Figura 25- Proposta de inclusão da molécula de OFLOX nas ciclodextrina (βCD e $\text{HP}\beta\text{CD}$).



5.5 Espalhamento dinâmico de luz

A técnica de DLS é amplamente utilizada para avaliar o tamanho médio das partículas em meio líquido. Essa técnica consiste na iluminação da amostra por um feixe de laser, que ao passar pela cubeta que contém a amostra, essa luz é espalhada e detectada em um determinado ângulo em relação à direção do feixe incidente (KANTER et al., 2016; LORBER, et al., 2012). Nesse experimento o D_h das moléculas é determinado pela análise da flutuação da luz espalhada, que é causada pelo movimento browniano das partículas, movimento este que depende do tamanho das mesmas, ou seja, partículas pequenas movimentam-se mais rápido e partículas grandes apresentam um movimento mais lento (HALLETT, 1994; STETEFELD; MCKENNA; PATEL, 2016; XU, 2015). No presente trabalho, as medidas de D_h foram realizadas com o objetivo de avaliar o tamanho das nanoestruturas formadas após a complexação.

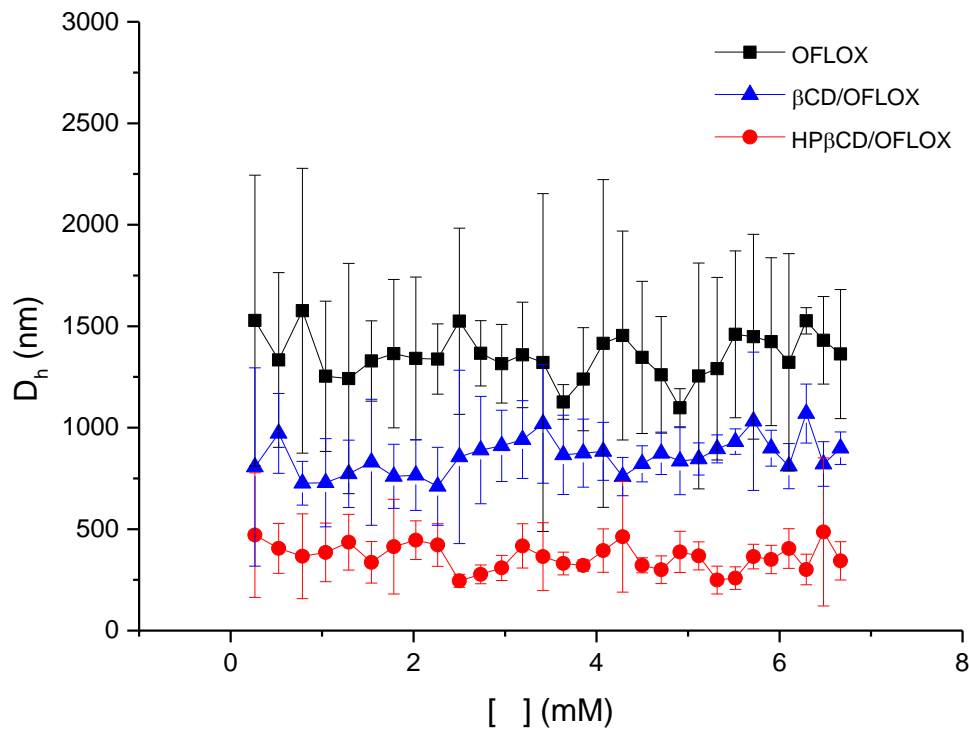
Na Figura 26 está apresentado o gráfico de D_h em função do aumento das concentrações do OFLOX, $\beta\text{CD}/\text{OFLOX}$ e $\text{HP}\beta\text{CD}/\text{OFLOX}$.

A partir dos resultados de D_h versus concentração do OFLOX puro ou complexada, pode-se observar menores valores de tamanho de partícula para os CI's em comparação com o OFLOX livre. A redução do tamanho das partículas dos CI's ocorre porque devido à presença das hidroxilas das ciclodextrinas, esses complexos apresentam uma maior capacidade de interagirem com a água quando comparada com o OFLOX puro. Essa maior afinidade com a água contribui para uma menor tendência de agregação, coalescência e aumento do tamanho

da partícula (MOREIRA et al., 2018). A redução do tamanho dos CI's garante que uma maior área superficial da partícula seja exposta ao solvente, no caso água, possibilitando um novo padrão de interações com o meio e consequentemente aumentando sua solubilidade (SAVJANI; GAJJAR; SAVJANI, 2012).

Dentre os CI's, a HP β CD/OFLOX ($364,55 \pm 64,51$) foi a que apresentou o menor tamanho médio de partícula quando comparada com a β CD/OFLOX ($860,17 \pm 88,64$). Esse resultado pode ser explicado devido à maior solubilidade da HP β CD (> 600 mg/mL) em água em relação ao valor de solubilidade da β CD (18,5 mg/mL) no mesmo solvente (SZEJTLI, 1998). O resultado encontrado nesse experimento vai ao encontro ao que é relatado na literatura para solubilidade dos CI's do OFLOX, tanto em HP β CD como em β CD, pois a solubilidade do complexo com HP β CD (MISIUK; JOZEFOWICZ, 2015) é maior quando comparada com a solubilidade do sistema com β CD (PANCHPURI et al., 2013), sendo 3 e 2,1 vezes mais solúveis que o OFLOX.

Figura 26- Distribuição de tamanho de partículas em solução de OFLOX, β CD/OFLOX e HP β CD/OFLOX em função da concentração.



Legenda: OFLOX: ofloxacino; β CD/OFLOX: complexo de inclusão ofloxacino/ β -ciclodextrina; HP β CD/OFLOX: complexo de inclusão ofloxacino/hidroxipropil- β -ciclodextrina; D_h : diâmetro hidrodinâmico, nm: nanometro; []: concentração; mM: milimolar.

A redução do tamanho e conseqüentemente o aumento da solubilidade, principalmente da HP β CD, foram fatores importantes nos resultados de atividades biológicas avaliadas para os CI's testados neste trabalho.

5.6 Determinação da concentração inibitória mínima dos complexos de inclusão

A CIM consiste na menor concentração de um fármaco capaz de inibir o crescimento de um microrganismo após incubação por 24 horas (NCCLS, 2003). Esse teste foi realizado com o intuito de avaliar a capacidade dos CI's em inibir o crescimento da *E. coli* e *S. aureus*, comparando com o OFLOX puro.

A CIM do OFLOX, β CD/OFLOX e HP β CD/OFLOX frente as linhagens de *E. coli* e *S. aureus* foi determinadas por teste de microdiluição em placa de 96 poços com coloração por MTT, como proposto pela NCCLS (2003), com adaptações. Os resultados dos experimentos são mostrados na Tabela 14.

Tabela 14- CIM do OFLOX, β CD/OFLOX e HP β CD/OFLOX frente às linhagens de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Linhagens	Valores de CIM _{100%} (μ M)		
	OFLOX	β CD/OFLOX	HP β CD/OFLOX
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	1,38	0,16	0,07
<i>E. coli</i> AMB	1,38	0,16	0,14
<i>E. coli</i> C2	1,38	0,16	0,14
<i>E. coli</i> C4	1,38	0,08	0,03
<i>E. coli</i> C7	1,38	0,16	0,07
<i>E. coli</i> C8	0,34	0,08	0,07
<i>E. coli</i> C9	0,34	0,08	0,03
<i>E. coli</i> C10	1,38	0,08	0,03
<i>E. coli</i> C13	0,34	0,04	0,03
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27853	2,76	0,33	0,14
<i>S. aureus</i> C923	1,38	0,33	0,14
<i>S. aureus</i> C602	2,76	0,33	0,28
<i>S. aureus</i> C6	1,38	0,33	0,14
<i>S. aureus</i> C5	1,38	0,33	0,14
<i>S. aureus</i> C4	1,38	0,16	0,14
<i>S. aureus</i> C601	1,38	0,33	0,14
<i>S. aureus</i> C003	1,38	0,33	0,14
<i>S. aureus</i> C707	1,38	0,33	0,14

Legenda: CIM: concentração inibitória mínima; OFLOX: ofloxacino; β CD/OFLOX: complexo de inclusão ofloxacino/ β -ciclodextrina; HP β CD/OFLOX: complexo de inclusão ofloxacino/hidroxipropil- β -ciclodextrina; ATCC: American Type Culture Collection; AMB: ambiental, C: clínica.

Os valores de CIM obtidos quando as bactérias foram tratadas com OFLOX para inibição de 100% de *E. coli* variaram de 0,34 a 1,38 μ M e para *S. aureus* foram de 1,38 a 2,76 μ M. Esses resultados encontrados estão de acordo com trabalhos anteriormente publicados

tanto para *E. coli* (CATTOIR et al., 2006; DELIA et al., 1990; DREVENSEK et al., 2006; DREW; GALLIS, 1988; GRUNEBERG et al., 1988; SATO et al., 1986) como para *S. aureus* (ADEYEMI-DORO; ROTOWA, 1986; CHAU; LEUNG; NG, 1986; CHAUDHRY et al., 1990; GRUNEBERG et al., 1988; KING; SHANNON; PHILLIPS, 1985; MANDELL, NEU, 1986; MRAOVIC; CANIC-RADOJLOVIC, 1986; TORRES et al., 1986; WISE; ANDRENS; EDWARDS, 1984).

Os resultados da CIM encontrados para os CI's foram menores quando comparados com o OFLOX. O complexo da β CD/OFLOX apresentou uma CIM que variou de 0,04 a 0,16 μ M para *E. coli* e de 0,16 a 0,33 μ M para *S. aureus*. Já o complexo da HP β CD/OFLOX inibiu *E. coli* com uma concentração que variou de 0,03 a 0,14 μ M e 0,14 a 0,28 μ M para *S. aureus*.

As ciclodextrinas (β CD e HP β CD) também foram testadas, porém não apresentaram nenhuma inibição frente às cepas avaliadas.

Tabela 15: CIM da β CD e HP β CD frente às linhagens de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Linhagens	Valores de CIM 100% (μ M)	
	β CD	HP β CD
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	>22,08	>22,08
<i>E. coli</i> AMB	>22,08	>22,08
<i>E. coli</i> C2	>22,08	>22,08
<i>E. coli</i> C4	>22,08	>22,08
<i>E. coli</i> C7	>22,08	>22,08
<i>E. coli</i> C8	>22,08	>22,08
<i>E. coli</i> C9	>22,08	>22,08
<i>E. coli</i> C10	>22,08	>22,08
<i>E. coli</i> C13	>22,08	>22,08
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27853	>22,08	>22,08
<i>S. aureus</i> C923	>22,08	>22,08
<i>S. aureus</i> C602	>22,08	>22,08
<i>S. aureus</i> C6	>22,08	>22,08
<i>S. aureus</i> C5	>22,08	>22,08
<i>S. aureus</i> C4	>22,08	>22,08
<i>S. aureus</i> C601	>22,08	>22,08
<i>S. aureus</i> C003	>22,08	>22,08
<i>S. aureus</i> C707	>22,08	>22,08

Legenda: CIM: concentração inibitória mínima; β CD: β -ciclodextrina; HP β CD: hidroxipropil- β -ciclodextrina; ATCC: American Type Culture Collection; AMB: ambiental, C: clínica.

Avaliando a atividade antimicrobiana dos CI's em relação ao hospede, observou-se que esses foram mais ativos que OFLOX puro, apresentando valores de CIM menores. Em estudos anteriores que também avaliaram a atividade antibacteriana de CI's, mostraram que foi necessária uma menor concentração dos complexos para inibir as espécies testadas quando comparada a concentração utilizada pelo fármaco puro.

Cortés e colaboradores (2001) avaliaram a eficácia do CI de clorexidina com β CD contra bactérias patogênicas bucais. Através dos resultados obtidos verificaram que a clorexidina complexada apresentou melhor resultado em relação à clorexidina pura, inibindo o crescimento bacteriano a uma concentração cerca de duas vezes menor, em algumas espécies testadas.

Athanassiou e colaboradores (2003) realizaram a inclusão de alguns antibióticos β -lactâmicos em ciclodextrinas e avaliaram suas atividades frente as espécies bacterianas, inclusive em linhagens produtoras de β -lactamase. Através dos resultados observou-se que alguns CI's apresentaram-se mais ativos quando comparados com o antibiótico puro, tanto em linhagens sensíveis como também em produtoras de β -lactamase.

Deng (2013) realizou a complexação da metilicina com dois derivados sintéticos da β CD e avaliou a atividade dos mesmos contra duas linhagens de *S. aureus* resistentes ao fármaco. Os resultados obtidos demonstraram que a complexação foi um potenciador para a metilicina, sendo que um dos complexos apresentou resultado idêntico quando comparado com outros antibióticos usados para essas bactérias resistentes.

Em estudo realizado por Hill, Gomes e Taylor (2013) foi avaliado o efeito antimicrobiano de alguns extratos e óleos essenciais complexados com β CD. Das amostras testadas, os complexos de eugenol, extrato de casca de canela e extrato de broto de cravos foram mais ativos contra as bactérias testadas quando avaliados em sua forma pura.

Iacovino e colaboradores (2013) realizaram um estudo do ácido pipemídico complexado com HP β CD. Dentre os ensaios realizados, foi avaliada a atividade antibacteriana do complexo contra *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Os resultados mostraram que a atividade antibacteriana do CI contra *E. coli* e *S. aureus* foi maior que o ácido pipemídico livre, reduzindo EC₉₀ cerca de 17 e 15 vezes, respectivamente.

No ano de 2014, Kamimura e colaboradores relataram que a inclusão do carvacrol com HP β CD promoveu uma melhora em sua atividade antibacteriana, reduzindo a CIM cerca de 60 a 74% para as duas espécies testadas, quando comparada com o carvacrol puro.

Seguindo esse perfil de melhora da atividade antibacteriana de substâncias complexadas com ciclodextrinas, os resultados encontrados na determinação da CIM para o presente trabalho mostram que a inclusão promoveu uma melhora dessa atividade contra as duas espécies testadas, sendo refletido na redução da CIM. Realizando uma comparação entre os CI's, a HP β CD/OFLOX apresentou melhores resultados frente às linhagens bacterianas em relação à β CD/OFLOX. Esse melhor resultado obtido, principalmente pela HP β CD/OFLOX, está relacionado ao tamanho de partícula dos CI', como observado nos resultados de DLS.

Assim como mencionado anteriormente que a redução do tamanho de partícula melhora a solubilidade de substâncias (ver item 5.5), Hill, Gomes e Taylor (2013), relataram que a redução da CIM dos CI's frente às linhagens bacterianas testadas ocorreu provavelmente devido à maior solubilidade dos mesmos em água, acarretando um maior contato do fármaco com as bactérias, e conseqüentemente às eliminando.

É importante ressaltar que a complexação com β CD e HP β CD não alterou o padrão de inibição bacteriano do OFLOX, pois o resultado vai ao encontro do que é relatado na literatura, sendo bactérias Gram-negativas (*E. coli*) mais sensíveis que bactérias Gram-positivas (*S. aureus*) (ANDERSSON; MACGOWAN; 2003; MOUTON; LEROY, 1991; PATON; REEVES, 1988; SMYTHE; RYBAK, 1989).

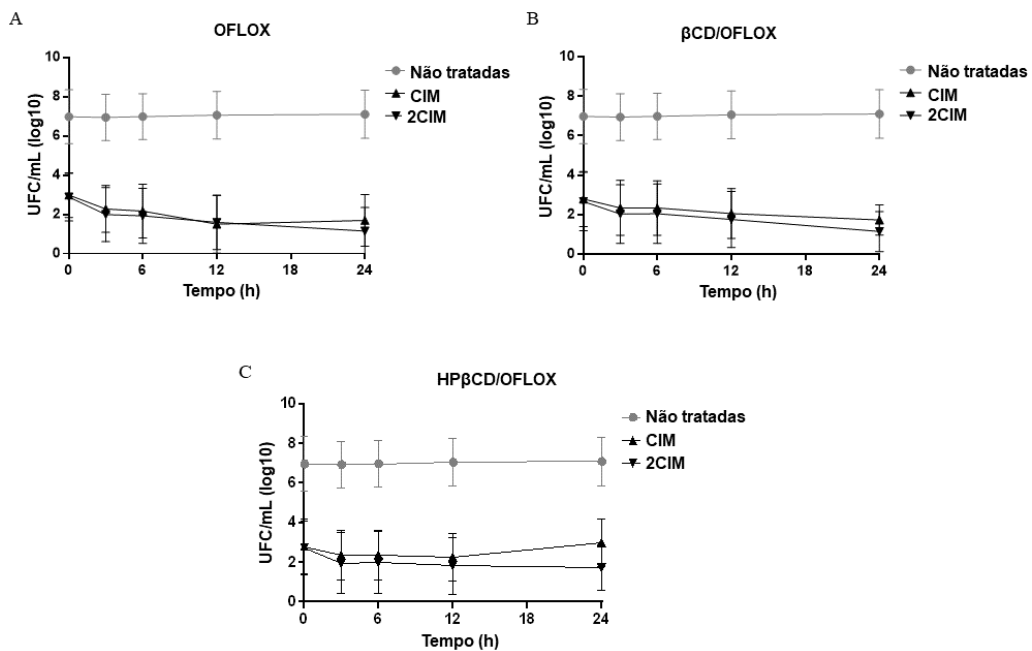
5.7 Avaliação da curva de morte de bactérias tratadas com os complexos de inclusão

A curva de morte é um ensaio realizado para avaliar a atividade antibacteriana de uma substância por um determinado período de tempo, sendo testada uma concentração fixa, geralmente a CIM, e a taxa de morte avaliada em diversos intervalos. Portanto é um método capaz de detectar diferenças nas atividades antibacterianas de diversas substâncias, pois proporciona a cinética do crescimento e morte das bactérias frente ao tratamento, fornecendo informações importantes sobre as substâncias testadas (FOERSTER et al., 2016; TAM; SCHILLING; NIKOLAOU, 2005).

A ação do OFLOX, β CD/OFLOX e HP β CD/OFLOX frente às linhagens clínicas de *E. coli* (C10) e *S. aureus* (C4) também foi avaliada por experimentos de curva de morte. As Figuras 27 e 28 apresentam os resultados do perfil de morte para as linhagens testadas em função do tempo de interação com as substâncias avaliados.

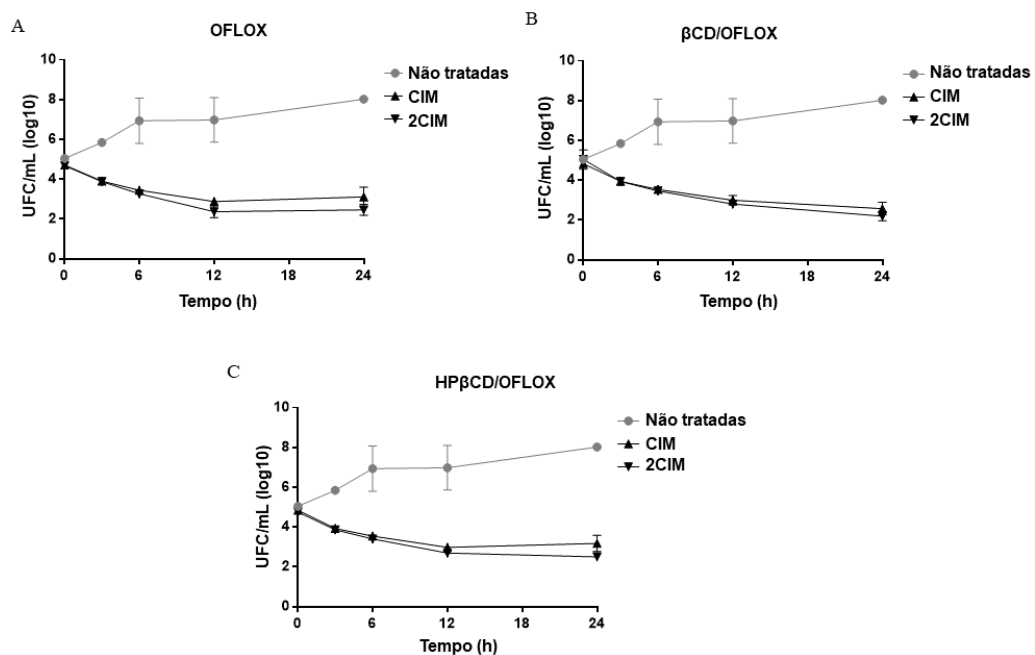
Para avaliar a cinética de ação dos complexos contra *E. coli* e *S. aureus*, foram geradas curvas de morte em diferentes tempos e concentrações, utilizando linhagens clínicas de cada bactéria. É possível observar que o OFLOX, β CD/OFLOX e HP β CD/OFLOX exibiram perfis semelhantes, mesmo com a diminuição da concentração de CIM dos CI's em relação à OFLOX. Para *E. coli*, as substâncias geraram uma curva bactericida, com uma redução de 99,9% na densidade bacteriana viável após 24 horas em comparação com o inóculo inicial. Para *S. aureus*, todas as substâncias forneceram uma curva bacteriostática, uma vez que há uma ligeira redução (1-2 log₁₀) da quantidade de UFC/mL em comparação com o inóculo inicial (PANKEY; SABATH, 2004).

Figura 27- Curvas de morte de *Escherichia coli* (C10) geradas em diferentes momentos. *E. coli* foram tratadas com OFLOX, β CD/OFLOX, HP β CD/OFLOX ou não tratadas.



Legenda: A) Bactérias tratadas com OFLOX; B) bactérias tratadas com β CD/OFLOX e C) bactérias tratadas com HP β CD/OFLOX. OFLOX: ofloxacino; β CD/OFLOX: complexo de inclusão ofloxacino/ β -ciclodextrina; HP β CD/OFLOX: complexo de inclusão ofloxacino/hidroxipropil- β -ciclodextrina; CIM: concentração inibitória mínima; 2CIM: duas vezes a concentração inibitória mínima; UFC/mL: unidades formadoras de colônias/mL.

Figura 28- Curvas de morte de *Staphylococcus aureus* (C4) geradas em diferentes momentos. *S. aureus* foram tratadas com OFLOX, β CD/OFLOX, HP β CD/OFLOX ou não tratadas.



Legenda: A) Bactérias tratadas com OFLOX; B) Bactérias tratadas com β CD/OFLOX e C) Bactérias tratadas com HP β CD/OFLOX. OFLOX: ofloxacino; β CD/OFLOX: complexo de inclusão ofloxacino/ β -ciclodextrina; HP β CD/OFLOX: complexo de inclusão ofloxacino/hidroxipropil- β -ciclodextrina; CIM: concentração inibitória mínima; 2CIM: duas vezes a concentração inibitória mínima; UFC/mL: Unidades Formadoras de Colônias/mL.

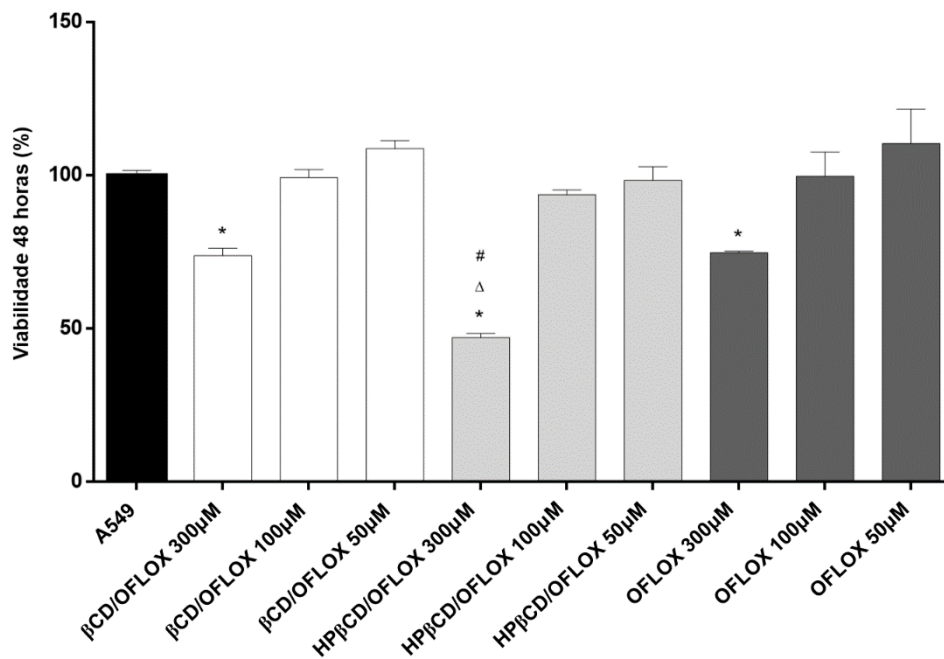
5.8 Avaliação da citotoxicidade dos complexos de inclusão em células A549

O ensaio de citotoxicidade pelo método do MTT é um teste que verifica a viabilidade celular após a exposição à substância em estudo, sendo um dos métodos colorimétricos mais empregados, devido ao baixo custo e rapidez no processamento das amostras (ARAÚJO et al., 2008).

O ensaio com MTT avalia a função mitocondrial da célula através da atividade redutora da enzima desidrogenase mitocondrial, sendo que as células incorporam o MTT, corante amarelo, reduzindo-o a formazan, um cristal púrpura insolúvel em água, que após solubilizado em DMSO ou isopropanol, permite determinar a concentração através da leitura da densidade óptica. A concentração de formazan no meio é diretamente proporcional à quantidade de células vivas, proporcionando a determinação da viabilidade celular após tratamento das mesmas com as substâncias teste (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006; MOSMANN, 1983).

Na Figura 29 são apresentados os resultados da viabilidade de células A549 após 48 horas de cultura, tratadas com OFLOX, β CD/OFLOX, HP β CD/OFLOX.

Figura 29- Avaliação da citotoxicidade do OFLOX, β CD/OFLOX e HP β CD/OFLOX na concentração de 300 μ M, 100 μ M e 50 μ M. em células A549 com 48 horas de cultura.



Legenda: OFLOX: ofloxacino; β CD/OFLOX: complexo de inclusão ofloxacino/ β -ciclodextrina; HP β CD/OFLOX: complexo de inclusão ofloxacino/hidroxiopropil- β -ciclodextrina; *p <0,05 A549 versus OFLOX ou β CD/OFLOX ou HP β CD/OFLOX. Δp <0,05 OFLOX versus β CD/OFLOX ou HP β CD/OFLOX. #p <0,05 β CD/OFLOX versus HP β CD/OFLOX.

Através dos resultados obtidos foi possível observar que o OFLOX promoveu uma redução significativa da viabilidade celular, na concentração de 300 μM , quando comparado com o controle não tratado. Esse resultado corrobora com o estudo realizado por Seay, Peretsman e Dixon (1996), em que avaliaram o efeito antitumoral do OFLOX e ciprofloxacino em três linhagens de células de câncer de bexiga e observaram um efeito citotóxico do OFLOX dependente de dose e tempo para todas as linhagens testadas.

Outro estudo que também comparava a atividade antitumoral do ciprofloxacino e OFLOX em linhagens de células de câncer de bexiga foi realizado por Kamat, DeHaven e Lamm (1999). O tratamento dessas células promoveu uma citotoxicidade máxima para o OFLOX de $95,2 \pm 0,3\%$ em uma das linhagens, na concentração de 800 $\mu\text{g/mL}$.

Além dos resultados obtidos no presente trabalho, bem como os encontrados por Seay, Peretsman e Dixon (1996) e por Kamat, DeHaven e Lamm (1999), muitos estudos envolvendo outras fluoroquinolonas também foram realizados anteriormente (AL TRAWNEH et al., 2010; ARANHA et al., 2003; BOURIKAS et al., 2009; HEROLD et al., 2002; HU et al., 2012; SUN et al., 2013), com o objetivo de avaliar um possível efeito antitumoral dessa classe de fármacos. Os resultados obtidos foram muito promissores para tal efeito pesquisado.

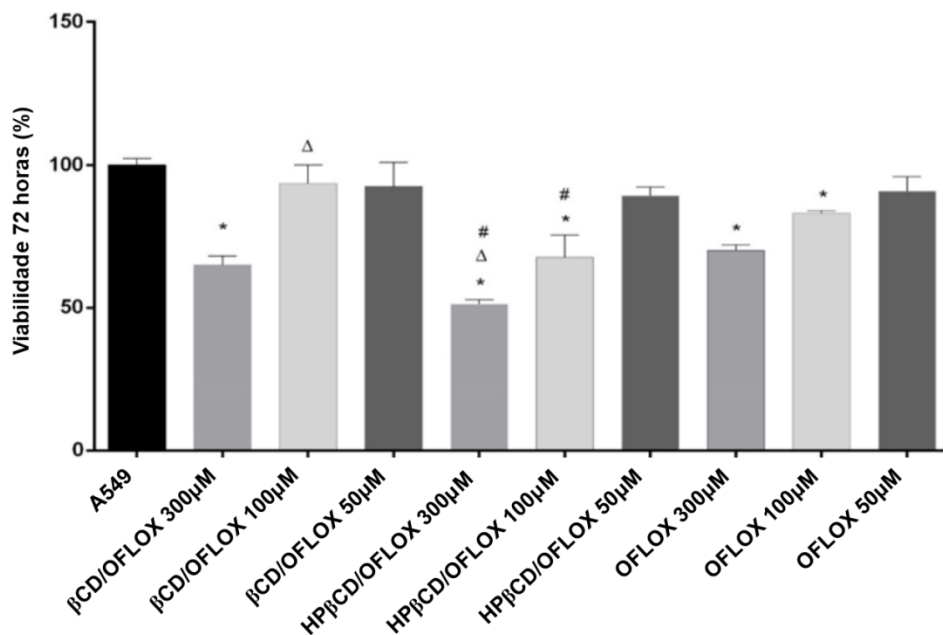
Apesar das fluoroquinolonas serem fármacos que exercem o seu efeito bactericida através da inibição da DNA girase e topoisomerase IV (LEWIN; SMITH, 1988; SATO et al., 1986), enzimas essas pertencentes à classe das topoisomerases, é importante salientar que as topoisomerases também já foram identificadas em todas as células eucarióticas, e as mesmas possuem domínios homólogos com as topoisomerases existentes nas células procarióticas (CHAMPOUX, 2001). Portanto, a ação citotóxica do OFLOX em células tumorais provavelmente seja exercida de forma análoga ao seu mecanismo de ação nas bactérias (KLJUN et al., 2011), sendo que já foi demonstrado por Hussy e colaboradores (1986) esse efeito de inibição das topoisomerases I e II de células eucariontes causado por algumas fluoroquinolonas. Outra observação importante que deve-se levar em consideração para tal efeito é que as topoisomerases são enzimas essenciais nos processos de replicação e transcrição, além de promover a separação dos cromossomos durante a mitose, sendo assim, não só espera-se, como também já foi comprovado que elas estão super-expressas em algumas linhagens de células tumorais humanas (GIACCONE et al., 1995; HUSAIN et al., 1994).

Com os resultados apresentados na Figura 29 é possível observar que além do OFLOX, que reduziu a viabilidade de A549 a 74,77%, os complexos $\beta\text{CD}/\text{OFLOX}$ e $\text{HP}\beta\text{CD}/\text{OFLOX}$ também promoveram esse efeito, sendo capazes de diminuir a viabilidade

celular a 73,82% e 47,06%, respectivamente, na concentração de 300 μM . Os CI's mostraram-se significativamente mais ativos que o OFLOX na maior concentração testada. Realizando uma comparação entre os CI's, observou-se que HP β CD/OFLOX reduziu a viabilidade celular a valores significativamente menores que β CD/OFLOX.

A alteração sobre a viabilidade celular de A549 também foi avaliada após 72 horas de cultivo das células tratadas com OFLOX, β CD/OFLOX e HP β CD/OFLOX. Conforme na Figura 30, em 72 horas OFLOX, β CD/OFLOX e HP β CD/OFLOX também foram capazes de reduzir a viabilidade celular a 70,00%, 64,87% e 51,31%, respectivamente, em relação ao grupo controle (células A549 não tratadas), na concentração de 300 μM . HP β CD/OFLOX apresentou uma redução significativa quando comparado com o OFLOX e β CD/OFLOX.

Figura 30- Avaliação da citotoxicidade do OFLOX, β CD/OFLOX, HP β CD/OFLOX na concentração de 300 μM , 100 μM e 50 μM em células A549 com 72 horas de cultura.



Legenda: OFLOX: ofloxacino; β CD/OFLOX: complexo de inclusão ofloxacino/ β -ciclodextrina; HP β CD/OFLOX: complexo de inclusão ofloxacino/hidroxipropil- β -ciclodextrina; * $p < 0,05$ A549 versus OFLOX ou β CD/OFLOX ou HP β CD/OFLOX. $\Delta p < 0,05$ OFLOX versus β CD/OFLOX ou HP β CD/OFLOX. # $p < 0,05$ β CD/OFLOX versus HP β CD/OFLOX.

Avaliando os resultados de citotoxicidade de 48 e 72 horas dos CI's em relação ao hospede, observou-se que os complexos foram mais ativos que o OFLOX, sendo responsáveis por promover uma maior redução da viabilidade das células A549. Entre os CI's a HP β CD/OFLOX apresentou melhores resultados frente às células de câncer de pulmão A549 quando comparada com a β CD/OFLOX.

Assim como foi observado no teste de determinação da CIM, a complexação do OFLOX com as duas ciclodextrinas também promoveu um efeito mais acentuado no ensaio de citotoxicidade, quando comparado com o OFLOX puro, na mesma concentração. Esse aprimoramento provavelmente ocorreu devido ao aumento da solubilidade do fármaco causada pela redução do tamanho de partícula após inclusão, o que promoveu um maior contato do mesmo com a membrana das células e possivelmente facilitando a penetração para atuar em seu alvo farmacológico (IACOVINO et al., 2012). Outra possível causa envolvida nesses resultados promissores dos CI's é que as ciclodextrinas agem se ligando ao colesterol da membrana plasmática, levando a uma modificação da permeabilidade dessa membrana e conseqüentemente facilitando a entrada da molécula hóspede nas células (HOVGAARD; BRONDSTED, 1995; IRIE; UEKAMA, 1999).

A fim de avaliar a melhora do efeito de fármacos complexados com ciclodextrinas, outros estudos também já foram realizados e obtiveram resultados semelhantes ao presente trabalho.

Iacovino e colaboradores (2013) avaliaram as diferenças na atividade citotóxica do ácido pipemídico puro e complexado com β CD nas linhagens de células HepG2 e MCF7. Os resultados encontrados mostraram que o CI apresentou valores de IC_{50} abaixo da metade do valor encontrado para o ácido pipemídico puro.

Wang e colaboradores mostraram em um trabalho realizado em 2014, que o aumento da citotoxicidade da escutelareína foi atribuído à formação do CI com HP β CD. Ao avaliar a atividade citotóxica da escutelareína pura e complexada com HP β CD em 4 linhagens de células de câncer de cólon, verificaram que o CI apresentou um IC_{50} até 3 vezes menor quando comparado à molécula hóspede.

No ano de 2015, Gontijo e colaboradores avaliaram o efeito do erlotinibe puro e complexado com HP β CD em células A431 (carcinoma epidermóide humano) e em osteoblastos. Nesse trabalho eles observaram que o CI induziu uma maior citotoxicidade em A431 quando comparado com o erlotinibe puro, na maior concentração testada (37,5 μ M). Os resultados para os osteoblastos seguiram o mesmo perfil, o CI apresentou-se mais ativo na maior concentração testada.

Donato e colaboradores (2016) realizaram a comparação do efeito citotóxico da 5-fluorouracila pura e complexada com α CD e β CD em células Caco2 (adenocarcinoma colorretal humano), MCF7, HepG2 e A549. Os resultados obtidos mostraram que a 5-fluorouracila apresentou valores mais elevados de IC_{50} quando comparados com os valores de

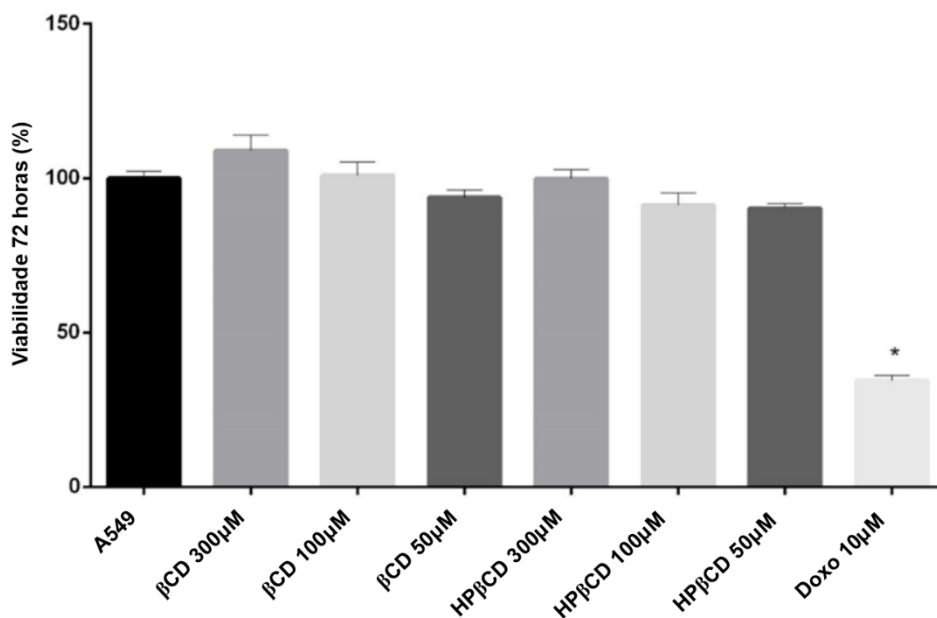
ambos os CI's. Entre os complexos o sistema com β CD teve a maior atividade citotóxica em MCF7 e o complexo com α CD maior atividade citotóxica em A549.

Recentemente Já'Far e colaboradores (2018) avaliaram o efeito antiproliferativo da curcumina complexada com β CD contra células MCF7. O resultado obtido foi uma maior taxa de inibição da proliferação das células tumorais para o CI, principalmente nas primeiras 24 horas de tratamento.

Esses estudos corroboram com o presente trabalho, e mostram mais uma vez que as ciclodextrinas foram capazes de promover uma melhoria na ação dos fármacos a qual foram complexadas.

As células A549 também foram tratadas com as ciclodextrinas puras (β CD e HP β CD) nas mesmas condições que os CI's, porém não apresentaram redução da viabilidade celular, como demonstrado na Figura 31. Como controle positivo, as células foram tratadas com doxorubicina na concentração de 10 μ M. O tratamento das células com essa concentração causou uma redução de 65.50% da viabilidade celular.

Figura 31- Avaliação da citotoxicidade da β CD e HP β CD na concentração de 300 μ M, 100 μ M e 50 μ M em células A549 com 72 horas de cultura. A doxorubicina (10 μ M) foi utilizada como controle de citotoxicidade.



Legenda: β CD: β -ciclodextrina; HP β CD: hidroxipropil- β -ciclodextrina; Doxo: doxorubicina; *p <0,05 A549 versus β CD ou HP β CD.

5.9 Avaliação de apoptose em células A549 tratadas com os complexos de inclusão

A citometria de fluxo é uma técnica que possibilita a análise e quantificação de células ou partículas biológicas suspensas em meio líquido em fluxo. Permite verificar vários parâmetros simultaneamente, através da dispersão da luz frontal (*forward scatter* – FSC), que correlaciona-se com o volume celular; luz lateral (*side scatter* – SSC), que estabelece a complexidade morfológica da célula e também a fluorescência emitida pelos fluorocromos ligados a anticorpos monoclonais (ADAN et al., 2017; VALET, 2003).

A citometria de fluxo possui várias aplicações, dentre elas está a avaliação do tipo de morte celular através do uso simultâneo da anexina V conjugada com FITC e iodeto de propídio, permitindo a distinção entre células em apoptose e necrose, respectivamente. Esse ensaio consiste na ligação da anexina V aos resíduos do fosfolípido fosfatidilserina. Na célula viável a fosfatidilserina encontra-se na face interna da membrana plasmática, porém quando o processo de apoptose é iniciado esses fosfolípidos são rapidamente translocados para a face externa da membrana permitindo a ligação da proteína anexina V. O iodeto de propídio é uma molécula que intercala no DNA, sendo usado para distinguir células viáveis de não-viáveis, uma vez que células viáveis com membrana intacta são impermeáveis ao corante, enquanto que a membrana de células mortas ou danificadas são permeáveis (BRUMATTI; SHERIDAN; MARTIN, 2008; MOCHIZUKI et al., 2003). Portanto, nesse ensaio é possível determinar a proporção de células vivas; células em estágio inicial de apoptose, onde ocorre apenas a exposição da fosfatidilserina na face externa da membrana plasmática com consequente marcação com a anexina V e células em estágio tardio de apoptose ou em necrose, onde além da exposição da fosfatidilserina, a membrana plasmática sofre colapso e se torna permeável ao iodeto de propídio, fazendo com que a célula possua dupla marcação (PEC et al., 2003).

Para verificar se houve apoptose induzida pelos CI's de OFLOX com β CD e HP β CD nas células A549, em função da morte celular evidenciada em ensaio de MTT, foi realizado o ensaio de apoptose por citometria de fluxo.

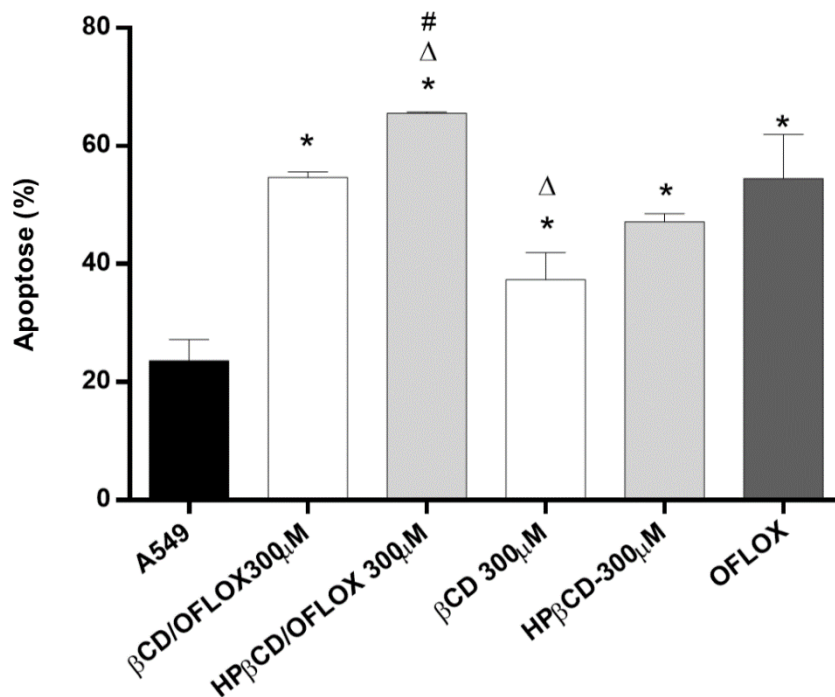
A Figura 32 mostra o resultado de apoptose das células A549 após 36 horas de tratamento com 300 μ M dos CI's e OFLOX.

Os complexos β CD/OFLOX e HP β CD/OFLOX apresentaram uma indução significativa de morte por apoptose quando comparados com o controle (células A549 sem tratamento).

Assim, como demonstrado no MTT, a inclusão do OFLOX nas ciclodextrinas promoveu um melhor efeito quando comparado com o OFLOX puro, sendo possível verificar no ensaio de apoptose que permaneceu o mesmo perfil, CI's apresentando melhor efeito que o fármaco puro.

A morte celular por apoptose causada pelos CI's provavelmente ocorreu por causa do efeito do OFLOX em inibir as topoisomerasas, pois ao se ligar a elas impede que as mesmas realizem a reestruturação das ligações fosfodiéster, causando na célula uma quebra na dupla fita de DNA (HOOPER, 1998; SATO et al., 1986). Alguns trabalhos mostraram que a fragmentação no DNA causada por diversos motivos, tais como agentes químicos, desencadeia a ativação de mecanismos para iniciar um processo de apoptose e eliminar a célula com o DNA danificado (BAKALKIN et al., 1994; KAINA, 2003; LIPS; KAINA, 2001; NORBURY; ZHIVOTOVSKY, 2004; ROOS; KAINA, 2006).

Figura 32- Porcentagem de apoptose em células A549 tratadas com OFLOX, β CD/OFLOX, HP β CD/OFLOX, β CD e HP β CD a 300 μ M em 36 horas.



Legenda: OFLOX: ofloxacino; β CD/OFLOX: complexo de inclusão ofloxacino/ β -ciclodextrina; HP β CD/OFLOX: complexo de inclusão ofloxacino/hidroxipropil- β -ciclodextrina; β CD; β -ciclodextrina-HP β CD: hidroxipropil- β -ciclodextrina; *p <0,05 A549 versus β CD/OFLOX ou HP β CD/OFLOX. Δ p <0,05 OFLOX versus β CD/OFLOX ou HP β CD/OFLOX. #p <0,05 β CD/OFLOX versus HP β CD/OFLOX.

Em estudo realizado por Sheng e colaboradores (2008) para elucidar o mecanismo da apoptose induzida por OFLOX em condrócitos, foi avaliada a ativação das caspases-9, -8 e -3, translocação do citocromo c das mitocôndrias para o citosol, e a expressão das proteínas Bax, tBid e p53. Os autores observaram que a ativação da caspase-3 (caspase executora) foi dependente da ativação das caspases-8 e -9 (caspases iniciadoras) por OFLOX, além de que o OFLOX induziu a despolarização do potencial de membrana mitocondrial permitindo a liberação do citocromo c do espaço intermembrana das mesmas para o citosol e verificaram também que os níveis de p53, Bax e tBid aumentaram. A partir dos resultados encontrados os autores concluíram que a via mitocondrial está envolvida na apoptose induzida por OFLOX nas células testadas.

A apoptose é um tipo de morte celular caracterizado por uma sequência de eventos que levam à eliminação de células indesejáveis sem a liberação de substâncias nocivas na área circundante, evitando um processo inflamatório local (ELMORE, 2007; LEE et al., 1999). A iniciação desse processo ocorre por meio da ativação de proteases endógenas, denominadas caspases, que comprometem toda a estrutura interna da célula, contribuindo para a morte e preparação da remoção da mesma por fagocitose (TAYLOR; CULLEN; MARTIN, 2008). Sendo assim, a apoptose é considerada um mecanismo de defesa antitumoral, onde vários agentes quimioterápicos agem através da indução desse tipo de morte celular, reduzindo a população de células alteradas (NICHOLSON, 2000; WONG, 2011).

As caspases são proteases altamente específicas que reconhecem e clivam os seus substratos. A família de caspases é dividida em iniciadoras e executoras. As primeiras são capazes de auto-ativar e iniciar o processamento proteolítico de outras caspases e as segundas são ativadas pelas caspases iniciadoras. As caspases executoras clivam a grande maioria dos substratos durante a apoptose, sendo responsáveis por todos os acontecimentos na morfologia e bioquímica da célula (MCILWAIN; BERGER; MAK, 2013; PARRISH; FREEL; KORNBLUTH, 2013).

Uma das vias de ativação da apoptose é a via intrínseca, também chamada de via mitocondrial. Essa via é ativada por diversos estímulos de estresse ou dano celular que resultam em disfunção e consequente permeabilização da mitocôndria, causando liberação de moléculas pró-apoptóticas, por exemplo citocromo c, provenientes de seu espaço intermembrana (DESAGHER; MARTINO, 2000; GALLUZZI et al., 2018). A via intrínseca é regulada por proteínas anti e pró-apoptóticas da família Bcl-2. As proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL) estão localizadas na membrana externa da mitocôndria, no citosol ou na membrana do retículo endoplasmático e são responsáveis por inibir a apoptose impedindo que

ocorra a liberação de proteínas do espaço intermembrana. As proteínas pró-apoptóticas são subdivididas em dois grupos, sendo que o primeiro é de proteínas pró-apoptóticas efetoras (Bax, Bak), que atuam diretamente na membrana externa da mitocôndria, promovendo a liberação de proteínas que irão atuar na ativação das caspases. O segundo grupo (Bid, Bim, Bad, Bik, Puma, Noxa, Bmf e Hrk) atua inibindo as proteínas anti-apoptóticas ou potencializando a ação de Bax e Bak (AUTRET; MARTIN, 2009; MARTINEZ-CABALLERO et al., 2009; ZHANG et al., 2016).

A ocorrência de um estímulo apoptótico promove a translocação de proteínas pró-apoptóticas (Bak, Bax) para a membrana externa da mitocôndria, agrupando-se e formando uma estrutura que resultará na liberação para o citosol do citocromo-c. No citosol, o citocromo-c forma um complexo com o fator ativador da apoptose 1 (APAF-1), levando a ativação da caspase-9, que ativa caspases efetoras, principalmente a caspase-3, dando início à cascata proteolítica e consequentemente a eliminação da célula (GALLUZZI et al., 2018).

Nesse experimento também foi avaliada a ação das ciclodextrinas (β CD e HP β CD) e OFLOX nas células A549, observando-se diferença significativa quando analisada a indução de apoptose comparando com o controle não tratado.

6. CONCLUSÕES

A conclusão geral deste trabalho é que o método de coprecipitação/liofilização foi eficiente para preparação dos dois complexos de inclusão, β CD/OFLOX e HP β CD/OFLOX, e que através da inclusão foi possível reduzir o tamanho médio de partícula, promovendo um aumento da atividade biológica do OFLOX quando associado a ciclodextrina em relação ao mesmo puro. Pode-se concluir também que:

Os espectros de FTIR e as análises térmicas indicaram a ocorrência de interação entre o OFLOX e as ciclodextrinas (β CD e HP β CD), observado através das modificações ocorridas nos espectros de infravermelho e também alterações do perfil térmico dos CI's quando comparado com as substâncias puras;

A ITC forneceu dados termodinâmicos da complexação, sendo todas as estequiometrias 1:1, embora apresentando constantes de associação distintas para os dois CI's (β CD/OFLOX – $K = 880 \pm 118$; HP β CD/OFLOX – $K = 65,2 \pm 2,0$);

A RMN de ^1H foi fundamental para confirmar a inclusão do OFLOX em β CD e HP β CD através da variação dos deslocamentos químicos dos hidrogênios de ambas as moléculas, além de permitir propor a estrutura supramolecular formada pela interação entre hóspede e hospedeira;

Os CI's apresentaram D_h , na faixa de concentrações estudadas, valores menores que do OFLOX livre.

Os CI's apresentaram uma menor CIM para as linhagens bacterianas testadas;

A curva de morte realizada após tratamento com os CI's apresentou perfis semelhantes ao OFLOX puro para as linhagens bacterianas testadas;

A atividade citotóxica dos CI's frente às células A549 foi melhor quando comparada com o OFLOX puro nas mesmas condições de experimento;

A taxa de morte de células A549 por apoptose foi maior para os CI's quando em relação ao OFLOX puro, sendo HP β CD/OFLOX apresentou maior capacidade em induzir a apoptose quando em comparação com β CD/OFLOX.

Enfim, pode-se concluir que a inclusão do OFLOX em β CD e HP β CD favoreceu as atividades biológicas dessas substâncias.

REFERÊNCIAS

- ADACHI, T. et al. DNA sequence of the *E. coli gyrB* gene: application of a new sequencing strategy. **Nucleic Acids Research**, v. 15, n. 2, p. 771-784, 1987.
- ADAN, A. et al. Flow cytometry: basic principles and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 163-176, 2017.
- ADEYEMI-DORO, F. A. B.; ROTOWA, A. Comparison of the *in vitro* of ofloxacin and gentamicina against isolates from hospitalised patients. *Infection*, v. 14, n. 4, p. 240-242, 1986.
- AL-OMAR, M. A. Ofloxacin. **Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology**, v. 34, n. 1, p. 265-298, 2009.
- AL-TRAWNEH, S. A. et al. Synthesis and biological evaluation of tetracyclic fluoroquinolones as antibacterial and anticancer agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 16, p. 5873-5884, 2010.
- ALVES, G. P.; MARTINS, F.; SANTANA, M. H. A. Nanotecnologia aplicada ao desenvolvimento de produtos farmacêuticos. **Fármacos & Medicamentos**. São Paulo, n. 9, p. 44-50, 2008.
- ALVES, J. M. A. M. **Aplicação de técnicas de RMN em solução ao estudo de sistemas químicos e biológicos**. Dissertação (Mestrado em Química). Faculdade de Ciências. Departamento de Química e Bioquímica. Universidade de Lisboa. 2010. 85 p.
- ALVES, O. L. Nanotecnologia, nanociência e nanomateriais: quando a distância entre o presente e futuro não é apenas questão de tempo. **Parcerias Estratégicas**. Brasília, v. 18, p. 23-40, 2004.
- ANDERSSON, M. I.; MACGOWAN, A. P. Development of the quinolones. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 1, v. 1, p. 1-11, 2003.
- ANDRIOLE, V. T. The quinolones: past, present, and future. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, n. 2, p. 113-119, 2005.
- ARANHA, O. et al. Suppression of human prostate cancer cell growth by ciprofloxacin is associated with cell cycle arrest and apoptosis. **International Journal of Oncology**, v. 22, n. 4, p. 787-794, 2003.
- ARAÚJO, S. et al. Avaliação *in vitro* da atividade citotóxica de drogas antivirais em fibroblastos caprinos. **Ciência Animal**, v. 18, n. 1, p. 25-31, 2008.
- ASHBURN, T. T.; THOR, K. B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 8, p. 673-683, 2004.
- ASIF, M. A review on anticancer and antimicrobial activity of tetrafluoroquinolone compounds. **Annals of Medicinal Chemistry and Research**, v. 1, n. 1, p. 1003-1013, 2014.

ATHANASSIOU, G. et al. Antimicrobial activity of β -lactam antibiotics against clinical pathogens after molecular inclusion in several cyclodextrins. A novel approach to bacterial resistance. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 55, n. 1, p. 291-300, 2003.

AUCKENTHALER, R.; MICHEA-HAMZEHOVR, M.; PECHERE, J. C. *In vitro* activity of newer quinolones against aerobic bacteria. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 17, n. 1, p. 29-39, 1986.

AUTRET, A.; MARTIN, S. J. Emerging role for members of the Bcl-2 family in mitochondrial morphogenesis. **Molecular Cell**, v. 36, n. 3, p. 355-363, 2009.

BAKALKIN G. et al. p53 binds single-stranded DNA ends and catalyzes DNA renaturation and strand transfer. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 91, n. 1, p. 413-417, 1994.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BEERMANN, D. et al. Comparative pharmacokinetics of three new quinolone carboxylic acid antibiotics after oral administration in healthy volunteers. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 24, n. 2, p. 403, 1984.

BERTHOMIEU, C.; HIENERWADEL, R. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. **Photosynthesis Research**, v. 101, n. 2, p. 157-170, 2009.

BISACCHI, G. S.; HALE, M. R. A. "Double-edged" scaffold: antitumor power within the antibacterial quinolone. **Current Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 1, p. 520-577, 2016.

BOOIJ, L. H. D. J. Cyclodextrins and the emergence of sugammadex. **Anaesthesia**, v. 64, n. 1, p. 31-37, 2009.

BOUNTRA, C.; LEE, W. H.; LEZAUN, J. A new pharmaceutical commons: transforming drug discovery. **Oxford Martin Policy Paper**, v. 1, n. 1, p. 1-27, 2017.

BOURIKAS, L. A. et al. Ciprofloxacin decreases survival in HT-29 cells via the induction of TGF- β 1 secretion and enhances the anti-proliferative effect of 5-fluorouracil. **British Journal of Pharmacology**, v. 157, n. 3, p. 362-370, 2009.

BRATTSTROM, C.; MALMBORG, A. S.; TYDÉN, G. Penetration of ciprofloxacin and ofloxacin into human allograft pancreatic juice. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 22, n. 2, p. 213-219, 1988.

BREWSTER, M. E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 7, p. 645-666, 2007.

BRUMATTI, G.; SHERIDAN, C.; MARTIN, S. J. Expression and purification of recombinant annexin V for the detection of membrane alterations on apoptotic cells. **Methods**, v. 44, n. 3, p. 235-240, 2008.

BUAHORM, S. et al. Cardanol isolated from Thai *Apis mellifera* propolis induces cell cycle arrest and apoptosis of BT-474 breast cancer cells via p21 upregulation. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 23, n. 55, p. 1-11, 2015.

CALDERINI, A. Encapsulação e caracterização físico-química do fármaco vasodilatador minoxidil em ciclodextrinas. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, São Paulo. 2006. 196 f.

CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA J. M. Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 78, n. 1, p. 98-106, 2008.

CAMERON, K. S.; FIELDING, L. NMR diffusion spectroscopy as a measure of host-guest complex association constants and as a probe of complex size. **The Journal of organic chemistry**, v. 66, n. 21, p. 6891-6895, 2001.

CAO, F. T.; GUO, J.; PING, Q. The physicochemical characteristics of freeze-dried scutellarin-cyclodextrin tetracomponent complexes. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 31, n. 1, p. 747-756, 2005.

CASTRO, S. B. R. et al. Synthesis of lipophilic genistein derivatives and their regulation of IL-12 and TNF- α in activated J774A.1 cells. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 79, n. 3, p. 347-352, 2012.

CATTOIR, V. et al. *In vivo* selection during ofloxacin therapy of *Escherichia coli* with combined topoisomerase mutations that confer high resistance to ofloxacin but susceptibility to nalidixic acid. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, n. 5, p. 1054-1057, 2006.

CHAMPOUX, J. J. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. **Annual Review Biochemistry**, v. 70, n. 1, p. 369-413, 2001.

CHAO, J. et al. Investigation of the inclusion behavior of ofloxacin with methyl- β cyclodextrin. **Journal of Molecular Liquids**, v. 200, n. 2, p. 404-409, 2014.

CHAU, P. Y.; LEUNG, Y. K.; NG, W. W. S. Comparative *in vitro* ciprofloxacin against isolates antibacterial activity of ofloxacin and some selected Gram-positive and Gram-negative. **Infection**, v. 14, n. 4, p. 237-239, 1986.

CHAUDHRY, A. Z. et al. Antistaphylococcal activities of sparfloxacin (CI-978; AT-4140), ofloxacin, and ciprofloxacin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 34, n. 9, p. 1843-1845, 1990.

CHIN, A. et al. Intraoperative concentrations of ofloxacin in serum, bile fluid, and gallbladder wall tissue. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 34, n. 12, p. 2354-2357, 1990.

CHOWDARY, K. P. R.; SHANKAR, K. R.; TANNIRU, A. Recent research on cyclodextrin complexation in formulation development: a review. **Journal of Global Trends in Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 1, p. 1576-1583, 2014.

CHU, D. T. W.; FERNANDES, P. B. Structure-activity relationships of the fluoroquinolones. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 33, n. 2, p. 131-135, 1989.

COATES, J. Interpretation of infrared spectra, a practical approach. **Encyclopedia of Analytical Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 10815-10837, 2000.

CORTÉS, M. E. et al. The chlorhexidine: β -cyclodextrin inclusion compound: preparation, characterization and microbiological evaluation. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 40, n. 3, p. 297-302, 2001.

COURAUD, L. et al. Diffusion of ofloxacin into human lung tissue. **Drugs**, v. 34, n. 1, p. 37-38, 1987.

CULLMANN, W. et al. Comparative evaluation of recently developed quinolone compounds - with a note on the frequency of resistant mutants. **Chemotherapy**, v. 31, n. 1, p. 19-28, 1985.

CUNHA-FILHO, M. S. S.; SÁ-BARRETO, L. C. L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 1, p. 1-9, 2007.

DAVIES, B. I. et al. Penetration of ofloxacin from blood to sputum. **Drugs**, v. 34, n. 1, p. 26-32, 1987.

DEL VALLE, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 9, p. 1033-1046, 2004.

DELIA, S. et al. Ofloxacin: Clinical Evaluation in Urinary and Respiratory Infections. **Infection**, v. 14, n. 4, p. 297-299, 1986.

DELMEE, M.; AVESANI, V. Comparative *in vitro* activity of seven quinolones against 100 clinical isolates of *C. difficile*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 29, n. 2, p. 374-375, 1986.

DENADAI, Â. M. L. et al. A supramolecular complex between proteinases and β -cyclodextrin that preserves enzymatic activity. **BioDrugs**, v. 20, n. 5, p. 283-291, 2006a.

DENADAI, A. M. L. et al. Self-assembly characterization of the beta-cyclodextrin and hydrochlorothiazide system: NMR, phase solubility, ITC and QELS. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 55, n. 2, p. 41-49, 2006b.

DENADAI, Â. M. L. et al. Supramolecular self-assembly of β -cyclodextrin: an effective carrier of the antimicrobial agent chlorhexidine. **Carbohydrate Research**, v. 342, n. 15, p. 2286-2296, 2007.

DENADAI, Â. M. L. **Caracterização estrutural e termodinâmica de complexos supramoleculares formados por β -ciclodextrina e fármacos**. Tese (Doutorado em química). Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo-Horizonte. 2005. 166p.

DENG, J. Z. Methicillin/per-6-(4-methoxybenzyl)-amino-6-deoxy- β -cyclodextrin 1:1 complex and its potentiation *in vitro* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antibiotics**, v. 66, n. 1, p. 517-521, 2013.

DEOTARSE P. P. et al. Drug repositioning: a review. **International Journal of Pharma Research & Review**, v. 4, n. 8, p. 51-58, 2015.

DESAGHER, S.; MARTINO, J. C. Mitochondrial as the central control point of apoptosis. **Trends in Cell Biology**, v. 10, n. 9, p. 369-376, 2000.

DI DONATO, C. et al. Alpha- and Beta-cyclodextrin inclusion complexes with 5-fluorouracil: characterization and cytotoxic activity evaluation. **Molecules**, v. 21, n. 12, p. 1644-1657, 2016.

DOMAGALA, J. M. Structure-activity and structure-side-effect relationships for the quinolone antibacterials. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 33, n. 5, p. 685-706, 1994.

DRANCOURT, M. et al. Ofloxacin penetration into cerebrospinal fluid. **Correspondence Infectology**, v. 1, n. 1, p. 263-265, 1988.

DREVENSEK, P. et al. X-Ray crystallographic, NMR and antimicrobial activity studies of magnesium complexes of fluoroquinolones – racemic ofloxacin and its S-form, levofloxacin. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 100, n. 11, p. 1755-1763, 2006.

DREW, R. H.; GALLIS, H. A. Ofloxacin: its pharmacology, pharmacokinetics, and potential for clinical application. **Pharmacotherapy**, v. 8, n. 1, p. 35-46, 1988.

DRLICA, K.; ZHAO, X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 3, p. 377-392, 1997.

EGYED, O. Spectroscopic studies on β -cyclodextrin. **Vibrational Spectroscopy**, v. 1, n. 2, p. 225-227, 1990.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

FARINOTTI, R. et al. Pharmacokinetics of ofloxacin after single and multiple intravenous infusions in healthy subjects. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 32, n. 10, p. 1590-1592, 1988.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. Agência Nacional de Vigilância Brasileira, 5 ed., Brasília, v. 2, p. 1176, 2010.

FENLON, C. H.; CYNAMON, M. H. Comparative *in vitro* activity of ciprofloxacin and other 4-quinolones against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium intracellulare*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 29, n. 3, p. 386-388, 1986.

FERNANDES, V. C. et al. Caracterização físico-química de complexos de insulina: dimetil-beta-ciclodextrina e insulina: hidroxipropil-beta-ciclodextrina e avaliação da influência do

tipo de complexo na produção de microesferas biodegradáveis. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêutica**, v. 43, n. 4, p. 543-553, 2007.

FILLASTRE, J. P.; LEROY, A.; HUMBERT, G. Ofloxacin pharmacokinetics in renal failure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 31, n. 2, p. 156-160, 1987.

FOERSTER, S. et al. Time-kill curve analysis and pharmacodynamic modelling for *in vitro* evaluation of antimicrobials against *Neisseria gonorrhoeae*. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 1-11, 2016.

FORATO, L. A. et al. A espectroscopia na região do Infravermelho e algumas aplicações. **Embrapa Instrumentação**. São Carlos, São Paulo, n. 51, 2010.

FORATO, L. A. et al. Protein structure in KBr pellets by infrared spectroscopy. **Analytical Biochemistry**, v. 259, n. 1, p. 136-141, 1998.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. *In vitro* cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v. 160, n. 2, p. 171-177, 2006.

FRENCH, D. et al. The molecular size and structure of the δ -, ϵ -, ζ -, and η -dextrans. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 111, n. 1, p. 153-160, 1965.

GALLUZZI, L. et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death and Differentiation**, v. 25, n. 3, p. 486-541, 2018.

GIACCONE, G. et al. Differential expression of DNA topoisomerases in non-small cell lung cancer and normal lung. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1264, n. 1, p. 337-346, 1995.

GIOLITO, I.; IONASHIRO, M. A nomenclatura em análise térmica: Parte II. **Cerâmica**, v. 34, n. 225, p. 163-164, 1988.

GIOLITO, I.; IONASHIRO, M. A. Nomenclatura, padrões e apresentação dos resultados em análise térmica. **Cerâmica**, v. 26, n. 121, p. 17-24, 1980.

GIORDANO, F.; NOVAK, C.; MOYANO, J. R. Thermal analysis of cyclodextrins and their inclusion compounds. **Thermochimica Acta**, v. 380, n. 2, p. 123-151, 2001.

GONTIJO, S. M. L. et al. Erlotinib/hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex: characterization and *in vitro* and *in vivo* evaluation. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 83, n. 3, p. 267-279, 2015.

GRARE, M. et al. Tetrazolium salts for MIC determination in microplates: Why? Which salt to select? How? **Journal of Microbiological Methods**, v. 75, n. 2, p. 156-159, 2008.

GREATBANKS, D.; PICKFORD, R. Cyclodextrins as chiral complexing agents in water, and their application to optical purity measurements. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 25, n. 3, p. 208-215, 1987.

- GRUNEBERG, R. N. et al. The comparative *in vitro* activity of ofloxacin. **Jounal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 22, n. 1, p. 9-19, 1988.
- HALLETT, F. R. Particle size analysis by dynamic light scattering. **Food Research International**, v. 27, n. 2, p. 195-198, 1994.
- HAYAKAWA, I. et al. Synthesis and antibacterial activities of optically active ofloxacin. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 29, n. 1, p. 163-164, 1986.
- HEDGES, A. R. Industrial applications of cyclodextrins. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 5, p. 2035-2044, 1998.
- HEROLD, C. et al. Ciprofloxacin induces apoptosis and inhibits proliferation of human colorectal carcinoma cells. **British Journal of Cancer**, v. 86, n. 3, p. 443-448, 2002.
- HILL, L. E.; GOMES, C.; TAYLOR, T. M. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing essential oils (trans-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamon bark, and clove bud extracts) for antimicrobial delivery applications. **LWT - Food Science and Technology**, v. 51, n. 1, p. 86-93, 2013.
- HOOPER, D. C. Bacterial topoisomerases, anti-topoisomerases, and anti-topoisomerase resistance. **Clinical Infectious Diseases**, v. 27, n. 1, p. 54-63, 1998.
- HOOPER, D. C. Mechanisms of fluoroquinolone resistance. **Drug Resistances Updates**, v. 2, n. 3, p. 38-55, 1999.
- HOOPER, D. C.; WOLFSON, J. S. The fluoroquinolones: pharmacology, clinical uses, and toxicities in humans. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 28, n. 5, p. 716-721, 1985.
- HOVGAARD, L.; BRONDSTED, H. Drug delivery studies in Caco-2 monolayers. IV. Absorption enhancer effects of cyclodextrins. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 9, p. 1328-1332, 1995.
- HU, G. et al. Design, synthesis and antitumor activities of fluoroquinolone C-3 heterocycles (IV): s-triazole Schiff-Mannich bases derived from ofloxacin. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 2, n. 3 p. 312-317, 2012.
- HUSAIN, I. et al. Elevation of topoisomerase I messenger RNA. Protein and catalytic activity in human tumors: demonstration of tumor type specificity and implications for cancer chemotherapy. **Cancer Research**, v. 54, n. 3, p. 539-546, 1994.
- HUSSY, P. et al. Effect of 4-quinolones and novobiocin on calf thymus dna polymerase α primase complex, topoisomerases I and II, and growth of mammalian lymphoblasts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 29, n. 6, p. 1073-1078, 1986.
- IACOVINO, R. et al. Physicochemical characterization and cytotoxic activity evaluation of hydroxymethylferrocene: β -cyclodextrin inclusion complex. **Molecules**, v. 17, n. 1, p. 6056-6070, 2012.

- IACOVINO, R. et al. β -cyclodextrin inclusion complex to improve physicochemical properties of pipemidic acid: characterization and bioactivity evaluation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 1, p. 13022-13041, 2013.
- IDOWU, T.; SCHWEIZER, F. Ubiquitous nature of fluoroquinolones: the oscillation between antibacterial and anticancer activities. **Antibiotics**, v. 6, n. 4, p. 26-49, 2017.
- IONASHIRO, M. Giolito: Fundamentos da Termogravimetria. Análise Térmica Diferencial e Calorimetria Exploratória Diferencial. São Paulo: GIZ, 2005. 80p.
- IRIE, T.; UEKAMA, K. Cyclodextrins in peptide and protein delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 36, n. 1, p. 101-123, 1999.
- JA'FAR, M. H. et al. Inclusion of curcumin in β -cyclodextrins as potential drug delivery system: preparation, characterization and its preliminary cytotoxicity approaches. **Sains Malaysiana**, v. 47, n. 5, p. 977-989, 2018.
- JAFARI, R. M. et al. Drug repositioning: a review. **Journal of Iranian Medical Council**, v. 1, n. 1, p. 7-10, 2018.
- JIANG, Y. et al. Enhanced anti-tumor effect of 9-nitro-camptothecin complexed by hydroxypropyl- β -cyclodextrin and safety evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 415, n. 2, p. 252-258, 2011.
- KAINA, B. DNA damage-triggered apoptosis: critical role of DNA repair, double-strand breaks, cell proliferation and signaling. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, n. 8, p. 1547-1554, 2003.
- KALEPU, S.; NEKKANTI, V. Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 5, n. 5, p. 442-453, 2015.
- KAMAT, A. M.; DEHAVEN, J. I.; LAMM, D. L. Quinolone antibiotics: a potential adjunct to intravesical chemotherapy for bladder cancer. **Adult Urology**, v. 54, n. 1, p. 56-61, 1999.
- KAMIMURA, J. A. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of carvacrol microencapsulated in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. **LWT - Food Science and Technology**, v. 57, n. 2, p. 701-709, 2014.
- KANTER, M. et al. Enabling the measurement of particle sizes in stirred colloidal suspensions by embedding dynamic light scattering into an automated probe head. **Measurement**, v. 80, n. 1, p. 92-98, 2016.
- KATO, J. et al. New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*. **Cell**, v. 63, n. 3, p. 393-404, 1990.
- KATO, J.; SUZUKI, H.; IKEDA, H. Purification and characterization of DNA topoisomerase IV in *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 36, p. 25676-25684, 1992.
- KAZMIERCZAK, A. et al. Biliary tract excretion of ofloxacin in man. **Drugs**, v. 34, n. 1, p. 39-43, 1987.

- KING, A.; SHANNON, K.; PHILLIPS I. The *in vitro* activities of enoxacin and ofloxacin compared with that of ciprofloxacin. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 15, n. 5, p. 551-558, 1985.
- KLJUN, J. et al. Physicochemical studies and anticancer potency of ruthenium η^6 -p-cymene complexes containing antibacterial quinolones. **Organometallics**, v. 30, n. 9, p. 2506-2512, 2011.
- KOHATA, S.; JYODOI, K.; OHYOSHI, A. Thermal decomposition of cyclodextrins (α , β -, γ -, and modified β -CyD) and of metal-(β -CyD) complexes in the solid phase. **Thermochimica Acta**, v. 217, n. 1, p. 187-198, 1993.
- KOIZUMI, F. et al. Effective monitoring of concentrations of ofloxacin in saliva of patients with chronic respiratory tract infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, n. 5, p. 1140-1143, 1994.
- KRAWIEC, S.; RILEY, M. Organization of the bacterial chromosome. **Microbiological Reviews**, v. 54, n. 4, p. 502-539, 1990.
- KUMARI, A. et al. Nanoencapsulation for drug delivery. **EXCLI Journal**, v. 13, n. 1, p. 265-286, 2014.
- LEE, J. et al. The Fas system, a regulator of testicular germ cell apoptosis, is differentially up regulated in sertoli cells versus germ cell injury of the testis. **Endocrinology**, v. 140, n. 2, p. 852-858., 1999.
- LEVINE, C.; HIASA, H.; MARIANS, K. J. DNA gyrase and topoisomerase IV: biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1400, n. 3, p. 29-43, 2001.
- LEWIN, C. S.; SMITH, J. T. Bactericidal mechanisms of ofloxacin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 22, n. 3, p. 1-8, 1988.
- LEYSEN, D. C.; HAEMERS, A.; PATFYN, S. R. Minireview: mycobacteria and the new quinolones. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 33, n. 1, p. 1-5, 1989.
- LI, J.; ZHANG, X. Preparation and characterization of the inclusion complex of ofloxacin with β CD and HP β CD. **Journal of Inclusion Phenomena Macrocyclic Chemistry**, v. 69, n. 1, p. 173-179, 2011.
- LI, Y. Y.; JONES, S. J. M. Drug repositioning for personalized medicine. **Genome Medicine**, v. 4, n. 3, p. 27-41, 2012.
- LIMA, J. S. et al. Pesquisa clínica: fundamentos, aspectos éticos e perspectivas. **Revista da SOCERJ**, v. 16, n. 4, p. 225-233, 2003.
- LIPS, J.; KAINA, B. DNA double-strand breaks trigger apoptosis in p53-deficient fibroblasts. **Carcinogenesis**, v. 22, v. 4, p. 579-585, 2001.

LOCKLEY, M. R.; WISE, R.; DENT, J. The pharmacokinetics and tissue penetration of ofloxacin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 14, n. 6, p. 647-652, 1984.

LODE, H. et al. Pharmacokinetics of ofloxacin after parenteral and oral administration. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 31, n. 9, p. 1338-1342, 1987.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M. E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: drug solubilization and stabilization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, n. 10, p. 1017-1025, 1996.

LOFTSSON, T.; DUCHENE D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 329, n. 2, p. 1-11, 2007.

LOFTSSON, T.; MASSON, M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 225, p. 15-30, 2001.

LOOI, C. Y. et al. Induction of apoptosis in human breast cancer cells via caspase pathway by vernodalin isolated from *Centratherrum anthelminticum* (L.) Seeds. **PLOS One**, v. 8, n. 2, p. 1-20, 2013.

LORBER, B. et al. Protein analysis by dynamic light scattering: methods and techniques for students. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 40, n. 6, p. 372-382, 2012.

LOUREIRO, R.; J. et al. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, v. 34, n. 1, p. 77-84, 2016.

MA, X.; YU, H. Global burden of cancer. **Cancer Epidemiology**, v. 79, n. 1, p. 85-94, 2006.

MACIAS, B. et al. Complexes of Co(II) and Zn(II) with ofloxacin. Crystal structure of [Co(oflo)₂(MeOH)₂].4MeOH. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, n. 11, p. 2417-2423, 2002.

MADAN, J., et al. Inclusion complexes of noscapine in β -cyclodextrin offer better solubility and improved pharmacokinetics. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 65, n. 3, p. 537-548, 2010.

MANDELL, W.; NEU, H. C. *In vitro* activity of CI-934, a new quinolone, compared with other quinolones and other antimicrobial agents. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 29, n. 5, p. 852-857, 1986.

MAPLE, P.; BRUMFITT, W.; HAMILTON-MILLER, J. M. T. A review of the antimicrobial activity of the fluoroquinolones. **Journal of Chemotherapy**, v. 2, n. 5, p. 280-294, 1990.

MARIANS, K. J. Prokaryotic DNA replication. **Annual Review Biochemistry**, v. 61, n. 1, p. 673-719, 1992.

MARTINEZ-CABALLERO, S. et al. Assembly of the mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 18, p. 12235-12245, 2009.

MCILWAIN, D. R.; BERGER, T.; MAK, T. W. Caspase functions in cell death and disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 5, p. 1-29, 2013.

MEISSNER, A.; BORNER, K.; KOEPPE, P. Concentrations of ofloxacin in human bone and in cartilage. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 26, n. 1, p. 69-74, 1990.

MISIUK, W.; JOZEFOWICZ, M. Study on a host–guest interaction of hydroxypropyl- β -cyclodextrin with ofloxacin. **Journal of Molecular Liquids**, v. 202, n. 2, p. 101-106, 2015.

MOCHIZUKI, T. et al. Detection of apoptotic tumor response *in vivo* after a single dose of chemotherapy with ^{99m}Tc -Annexin V. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 44, n. 1, p. 92-97, 2003.

MONK, J. P.; CAMPOLI-RICHARDS, D. M. Ofloxacin: A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use. **Drugs**, v. 33, n. 4, p. 346-391, 1987.

MORAIS, C. A. S. **Caracterização termodinâmica e estrutural de sistemas supramoleculares envolvendo pentoxifilina e ciclodextrinas**. 2016. Dissertação (Mestrado em Química) - Programa de PósGraduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais, Universidade Federal De Itajubá, Itajubá, p. 67, 2016.

MOREIRA, A. M. S. et al. Hydrophobic nanoprecipitates of β -cyclodextrin/avermectins inclusion compounds reveal insecticide activity against *Aedes aegypti* larvae and low toxicity against fibroblasts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 28, p. 7275-7285, 2018.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1, p. 55-63, 1983.

MOUTON, Y.; LEROY, O. Ofloxacin. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 1, n. 2, p. 57-74, 1991.

MRAOVIC, M.; CANIC-RADOJLOVIC, M. The activity of ofloxacin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Infection**, v. 14, n. 4, p. 231-232, 1986.

MUTHYALA, R. Orphan/rare drug discovery through drug repositioning. **Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies**, v. 8, n. p. 3–4, 2011.

NABER, K. G.; ADAM, D.; KEES, F. *In vitro* activity and concentrations in serum, urine, prostatic secretion and adenoma tissue of ofloxacin in urological patients. **Drugs**, v. 34, n. 1, p. 44-50, 1987.

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. M7-A6. 6th ed. Wayne, Pennsylvania, USA, 2003.

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents**: M26-A. Wayne, Pennsylvania, USA, 1999.

NEU, H. C. Clinical utility of DNA gyrase inhibitors. **Pharmacology Therapeutics**, v. 41, n. 1, p. 207-221, 1989.

NICHOLSON, D. W. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. **Nature**, v. 407, n. 1, p. 810-816, 2000.

NII, T.; ISHII, F. Encapsulation efficiency of water-soluble and insoluble drugs in liposomes prepared by the microencapsulation vesicle method. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 298, n. 1, p. 198-205, 2005.

NORBURY, C. J.; ZHIVOTOVSKY, B. DNA damage-induced apoptosis. **Oncogene**, v. 23, n. 16, p. 2797-2808, 2004.

O'DONNELL, M.; LANGSTON, L.; STILLMAN, B. Principles and concepts of DNA replication in bacteria, archaea, and eukarya. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 7, p. 1-13, 2013.

OKERI, H. A.; ARHEWOH, I. M. Analytical profile of the fluoroquinolone antibacterials. I. Ofloxacin. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 6, p. 670-680, 2008.

OLIVEIRA, M. A.; YOSHIDA, M. I.; GOMES, E. C. L. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1224-1230, 2011.

OMS - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Primeiro relatório da OMS sobre doenças tropicais negligenciadas: Avanços para superar o impacto global de doenças tropicais negligenciadas**. 1. ed. Brasil, 2012.

PADHY, B. M.; GUPTA, Y. K. Drug repositioning: re-investigating existing drugs for new therapeutic indications. **Journal Postgraduate Medicine**, v. 57, n. 2, p. 153-160, 2011.

PANCHPURI, M. et al. Effect of drug to β -cyclodextrin ratio and method of complexation in the development of β -cyclodextrin inclusion complex of ofloxacin. **Indian Drugs**, v. 50, n. 12, p. 34-40, 2013.

PANKEY, G. A.; SABATH, L. D. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 6, p. 864-870, 2004.

PARRISH, A. B.; FREEL, C. D.; KORNBLUTH, S. Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 6, p. 1-24, 2013.

PATEL, T. et al. Polymeric nanoparticles for drug delivery to the central nervous system. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 7, p. 701-705, 2012.

PATON, J. H.; REEVES, D. S. Fluoroquinolone antibiotics: microbiology, pharmacokinetics and clinical use. **Drugs**, v. 36, n. 2, p. 193-228, 1988.

- PEC, M. K. et al. Induction of apoptosis in estrogen dependent and independent breast cancer cells by the marine terpenoid dehydrothysiferol. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, n. 9, p. 1451-1461, 2003.
- PEETERS, M.; VAN DYCK, E.; PIOT, P. *In vitro* activities of the spectinomycin analog U-63366 and four quinolone derivatives against *Neisseria gonorrhoeae*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 26, n. 4, p. 608-609, 1984.
- PERILLO, E. et al. Liposome armed with herpes virus-derived gH625 peptide to overcome doxorubicin resistance in lung adenocarcinoma cell lines. **Oncotarget**, v. 7, n. 4, p. 4077-4092, 2015.
- PITHA, J. et al. Hydroxypropyl- β -cyclodextrin: preparation and characterization; effects on solubility of drugs. **International Journal Pharmaceutics**, v. 29, n. 1, p. 73-82, 1986.
- RANPISE, N. S. et al. Improvement of water solubility and *in vitro* dissolution rate of aceclofenac by complexation with β -cyclodextrin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 15, n. 1, p. 64-70, 2009.
- REECE, R.; MAXWELL, A. DNA gyrase: structure and function. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 26, n. 3, p. 335-375, 1991.
- REKHARSKY, M. V.; INOUE, Y. Complexation thermodynamics of cyclodextrins. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 5, 1875-1917, 1998.
- ROOS, W. P.; KAINA, B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. **Trends In Molecular Medicine**, v. 12, n. 12, n. 9, p. 440-450, 2006.
- ROSS, D. L.; RILEY, C. M. Aqueous solubilities of some variously substituted quinolones antimicrobials. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 67, n. 3, p. 237-250, 1990.
- SAENGER, W. Cyclodextrin inclusion-compounds in research and industry. **Angewandte Chemie-International Edition in English**, v. 19, n. 1, p. 344-362, 1980.
- SALTÃO, R.; VEIGA, F. Ciclodextrinas em novos sistemas terapêuticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 1, p. 1-17, 2001.
- SATO, K. et al. Antibacterial activity of ofloxacin and its mode of action. **Infection**, v. 14, n. 4, p. 226-230, 1986.
- SATO, K. et al. *In vitro* and *in vivo* activity of DL-8280, a new oxazine derivative. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 22, n. 4, p. 548-553, 1982.
- SAVJANI, K. T.; GAJJAR, A. K.; SAVJANI, J. K. Drug solubility: importance and enhancement techniques. **International Scholarly Research Network Pharmaceutics**, v. 2012, n. 1, p. 1-10, 2012.
- SCHMID, G. Cyclodextrin glycosyltransferase production: yield enhancement by overexpression of cloned genes. **Trends in Biotechnology**, v. 7, n. 9, p. 244-248, 1989.

SCHNEIDER, H. J. et al. NMR studies of cyclodextrins and cyclodextrin Complexes. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 5, p. 1755-1786, 1998.

SEAY, T. M.; PERETSMAN, S. J.; DIXON, P. S. Inhibition of human transitional cell carcinoma *in vitro* proliferation by fluoroquinolone antibiotics. **The Journal of Urology**, v. 155, n. 2, p. 757-762, 1996.

SELVA, L. R. et al. Recent trends and some applications of isothermal titration calorimetry in biotechnology. **Biotechnology Journal**, v. 5, n. 1, p.85-98, 2010.

SHENG, Z. et al. Ofloxacin induces apoptosis in microencapsulated juvenile rabbit chondrocytes by caspase-8-dependent mitochondrial pathway. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 226, n. 2, p. 119-127, 2008.

SHIM, J. S.; LIU, J. O. Recent advances in drug repositioning for the discovery of new anticancer drugs. **International Journal Biological Sciences**, v. 10, n. 7, p. 654-663, 2014.

SILVA, P. V. da. **Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Compostos de Inclusão Formados Entre Sulfadiazina de Sódio e Ciclodextrinas**. Dissertação (Mestrado em Materiais para Engenharia) – Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2015. 77 p.

SMITH, R. B. Repositioned drugs: integrating intellectual property and regulatory strategies. **Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies**, v. 8, n. 3, p. 131-137, 2011.

SMYTHE, M.; RYBAK, J. M. Ofloxacin: a review. **Drug Interaction and Clinical Pharmacy, The Annals of Pharmacotherapy**, v. 23, n. 11, p. 839-846, 1989.

SOMA, D. et al. Solid lipid nanoparticles of irbesartan: preparation, characterization, optimization and pharmacokinetic studies. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 53, n. 1, p. 1-10, 2017.

SOUSA, F. B. **Estudo e caracterização estrutural e termodinâmica de compostos de inclusão formados entre antidepressivos e ciclodextrinas**. 2007. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, p. 74, 2007.

STAHL, S. M. Multifunctional drugs: a novel concept for psychopharmacology. **CNS Spectrums**, v. 14, n. 2, p. 71-73, 2009.

STETEFELD, J.; MCKENNA, S. A.; PATEL, T. R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. **Biophysical Reviews**, v. 8, n. 4, p. 409-427, 2016.

SUÁREZ, D. F. et al. Structural and thermodynamic characterization of doxycycline/ β -cyclodextrin supramolecular complex and its bacterial membrane interactions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 118, n. 1, p. 194-201, 2014.

SUN, J. et al. Trimethoxy-benzaldehyde levofloxacin hydrazone inducing the growth arrest and apoptosis of human hepatocarcinoma cells. **Cancer Cell International**, v. 13, n. 1, p. 67-77, 2013.

SWANBERG, S. O.; WANG, J. C. Cloning and sequencing of the *Escherichia coli gyrA* gene coding for the α subunit of DNA gyrase. **Journal of molecular biology**, v. 197, n. 4, p. 729-736, 1987.

SYMONDS, J. et al. Penetration of ofloxacin into bronchial secretions. **Drugs**, v. 34, n. 1, p. 33-36, 1987.

SZEJTLI, J. Cyclodextrin complexed generic drugs are generally not bio-equivalent with the reference products: therefore the increase in number of marketed drug/cyclodextrin formulation is so slow. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 52, n. 1, p. 1-11, 2005.

SZEJTLI, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 5, p. 1743-1753, 1998.

SZÉKELY-SZENTMIKLÓSI, B.; TÓKÉS, B. Study of ofloxacin - random by methylated- β -cyclodextrin inclusion complex. **Farmacia**, v. 64, n. 1, p. 147-151, 2016.

TAM, V. H.; SCHILLING, A. N.; NIKOLAOU, M. Modelling time-kill studies to discern the pharmacodynamics of meropenem. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, n. 5, p. 699-706, 2005.

TAYLOR, R. C.; CULLEN, S. P.; MARTIN, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 3, p. 231-241, 2008.

THOMPSON, D. O. Cyclodextrins - enabling excipients: their present and future use in pharmaceuticals. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 14, n. 1, p. 101-104, 1997.

TIWARI, G.; TIWARI, R.; RAI, A. K. Cyclodextrins in delivery systems: applications. **Journal of Pharmacy Bioallied Sciences**, v. 2, n. 2, p. 72-79, 2010.

TODD, P. A.; FAULDS, D. Ofloxacin: a reappraisal of its antimicrobial activity, pharmacology and therapeutic use. **Drugs**, v. 42, n. 5 p. 825-876, 1991.

TORRES, A. et al. Comparative activity of ofloxacin and seven other against urea-splitting microorganisms antimicrobials. **Infection**, v. 14, n. 4, p. 233-236, 1986.

TUNKEL, A. R.; SCHELD, W. M. Ofloxacin. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 12, n. 9, p. 549-557, 1991.

TURNBULL, W. B.; DARANAS, A. H. On the value of c : can low affinity systems be studied by isothermal titration calorimetry?. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 48, p. 14859-14866, nov. 2003.

VALET, G. Past and present concepts in flow cytometry: a European perspective. **Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents**, v. 17, n. 3, p. 213-222, 2003.

VAN CAEKENBERGHE, D. L.; PATTYN, S. R. *In vitro* activity of ciprofloxacin compared with those of other new fluorinated piperazinyl-substituted quinoline derivatives. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 25, n. 4, p. 518-521, 1984.

VAN LANDUYT, H. W.; GORDTS, B.; D'HONDT, G. Pharmacokinetic evaluation of ofloxacin in serum and tonsils. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 22, n. 1, p. 81-83, 1988.

VEIGA, F. J. B. et al. Molecular modelling and ¹H-NMR: ultimate tools for the investigation of tolbutamide : β-cyclodextrin and tolbutamide : tydroxypropyl-β-cyclodextrin complexes. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 49, n. 10, p. 1251-1256, 2001.

VEIGA, M. D. et al. Characterization of some cyclodextrin derivatives by thermal analysis. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 68, n. 2, 511-516, 2002.

VENTURINI, C. G. et al. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 360-368, 2008.

VERHO, M. et al. The effect of food on the pharmacokinetics of ofloxacin. **Current Medical Research and Opinion**, v. 10, n. 3, p. 166-171, 1986.

VILLAVERDE, J. et al. Preparation and characterization of inclusion complex of norflurazon and β-cyclodextrin to improve herbicide formulations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 4, p. 864-869, 2004.

WANG, F. et al. Host-guest inclusion system of scutellarein with 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin: preparation, characterization, and anticancer activity. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 25, n. 6, p. 594-607, 2014.

WARLICH, R. et al. Multiple-dose pharmacokinetics of ofloxacin in serum, saliva, and skin blister fluid of healthy volunteers. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 34, n. 1, p. 78-81, 1990.

WHITE, L. O. et al. The pharmacokinetics of ofloxacin, desmethyl ofloxacin and ofloxacin N-oxide in haemodialysis patients with endstage renal failure. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 22, n. 1, p. 65-72, 1988.

WHITE, L. O. et al. A preliminary report on the pharmacokinetics of ofloxacin, desmethyl ofloxacin and ofloxacin N-oxide in patients with chronic renal failure. **Drugs**, v. 34, n. 1, p. 56-61, 1987.

WISE, R.; ANDREWS, J. M.; EDWARDS, L. J. *In vitro* activity of enoxacin (CI-919), new quinoline derivative, compared with those of other antimicrobial agents. **Journal Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 13, n. 3, p. 237-244, 1984.

WISEMAN, T. et al. Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. **Analytical Biochemistry**, v. 179, n. 1, p. 131-137, 1989.

WITTMANN, D. H.; KOTTHAUS, E. Further methodological improvement in antibiotic bone concentration measurements: penetration of ofloxacin into bone and cartilage. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 23, n. 5, p. 805-807, 1986.

WONG, R. S. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 30, n. 1, p. 1-14, 2011.

XU, R. Light scattering: a review of particle characterization applications. **Particuology**, v. 18, n. 1, p. 11-21, 2015.

YAO, Q. et al. Inclusion complexes of cypermethrin and permethrin with monochlorotriazinyl-beta-cyclodextrin: a combined spectroscopy, TG/DSC and DFT study. **Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 117, n. 1, p. 576-586, 2014.

YELLA, J. K. et al. Changing trends in computational drug repositioning. **Pharmaceuticals**, v. 11, n. 2, p. 1-21, 2018.

YUAN, C.; LIU, B.; LIU, H. Characterization of hydroxypropyl- β -cyclodextrins with different substitution patterns via FTIR, GC-MS, and TG-DTA. **Carbohydrate Polymers**, v. 118, n. 2, p. 39-40, 2015.

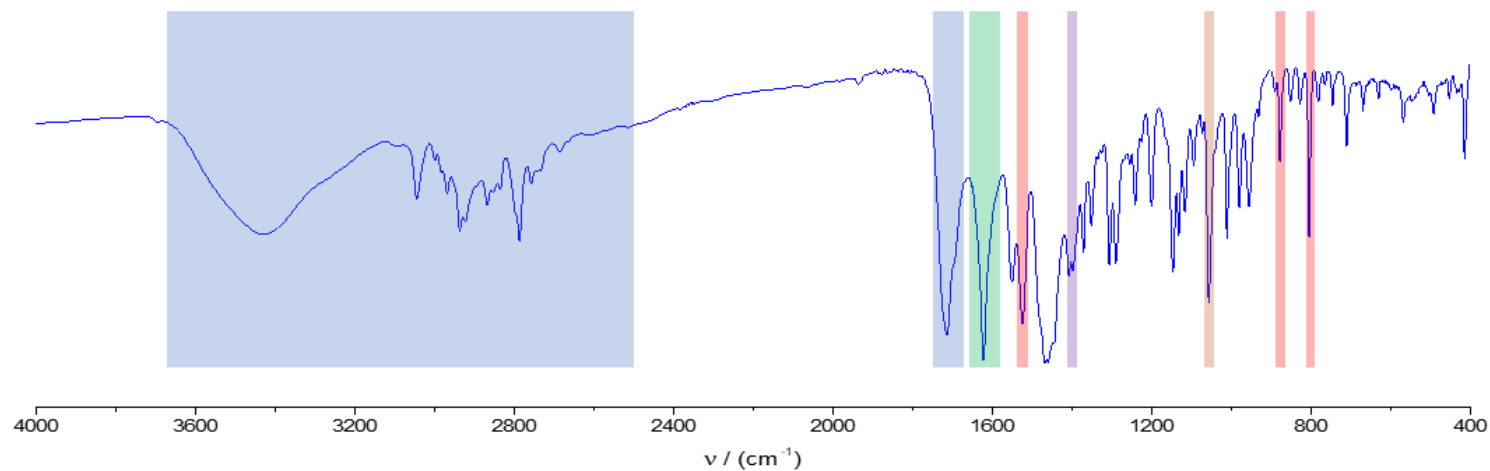
YUK, J. H. et al. Bioavailability and pharmacokinetics of ofloxacin in healthy volunteers. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, n. 2, p. 384-386, 1991.

ZI, P. et al. Effect of HP β CD on solubility and transdermal delivery of capsaicin through rat skin. **International Journal of Pharmaceutic**, v. 358, n. 2, p. 151-158, 2008.

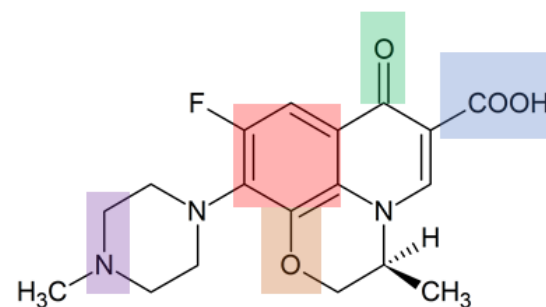
ZHANG, J. et al. Bax/Bak activation in the absence of Bid, Bim, Puma, and p53. **Cell Death and Disease**, v. 7, n. 6, p. 1-9, 2016.

APÊNDICES

APÊNDICE 01 – Correlação do espectro de FITR do OFLOX com seus principais grupos funcionais.

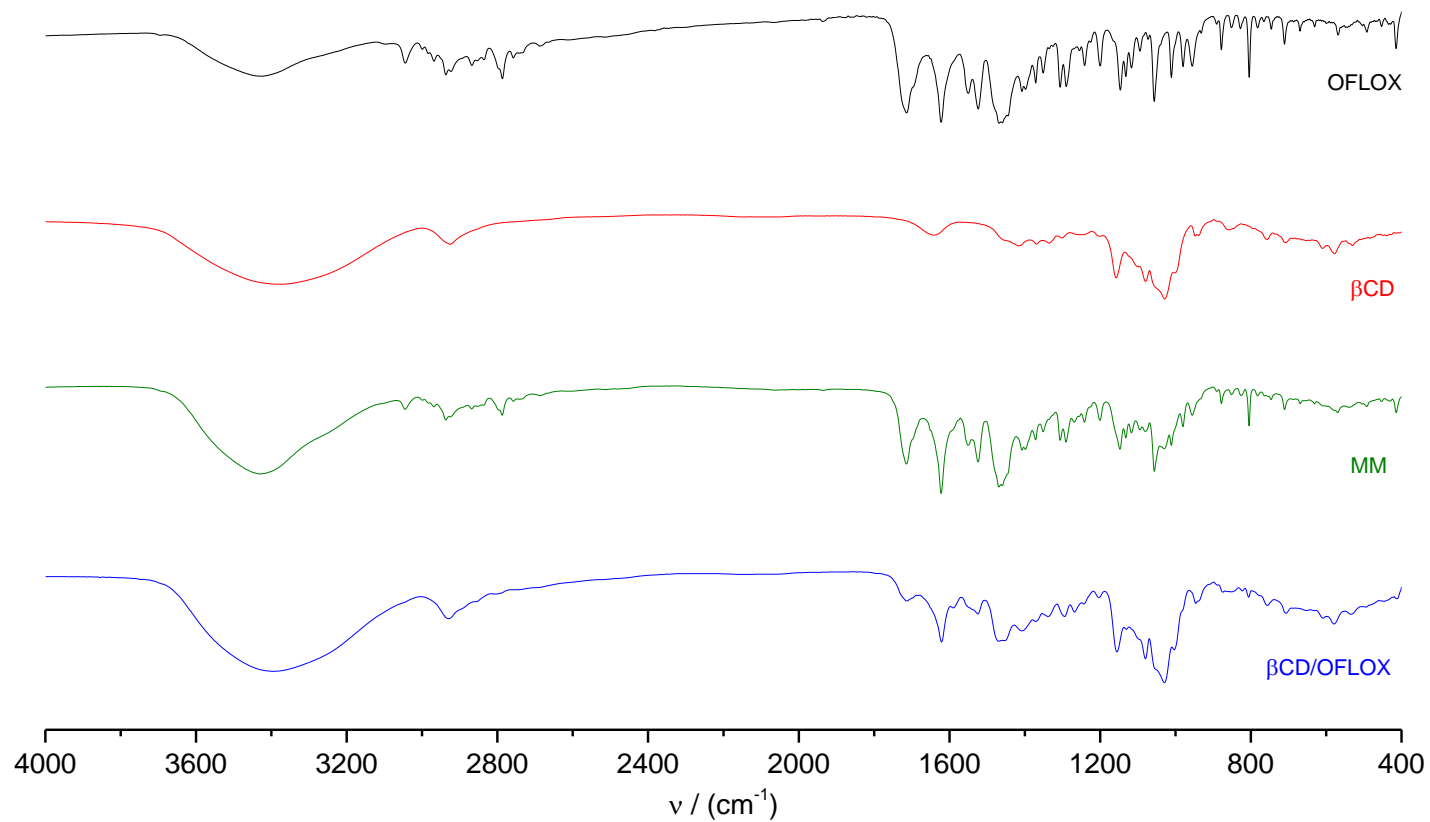


ν (cm ⁻¹)	Grupos funcionais
2500-3600 cm ⁻¹	OH (COOH)
1715 cm ⁻¹	C=O (COOH)
1622 cm ⁻¹	C=O
1524 cm ⁻¹	C=C (anel aromático)
1407 cm ⁻¹	C-N (piperazina)
1057 cm ⁻¹	C-O-C (anel oxazina)
879 e 805 cm ⁻¹	C-H (anel aromático)



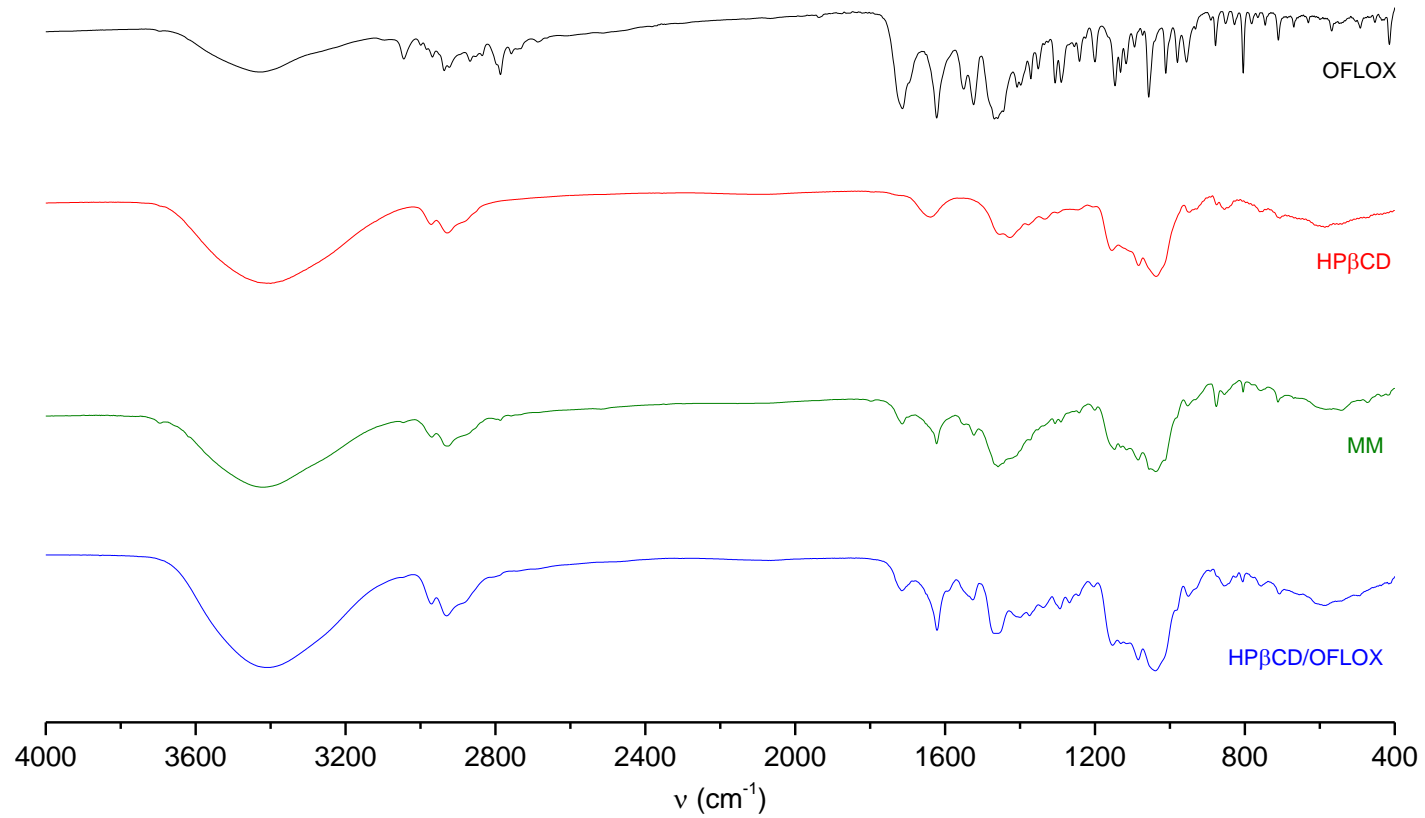
Legenda: ν : número de onda.

APÊNDICE 02 - Espectros de infravermelho do OFLOX, β CD, MM e β CD/OFLOX na região 4000 a 400 cm^{-1} em KBr.



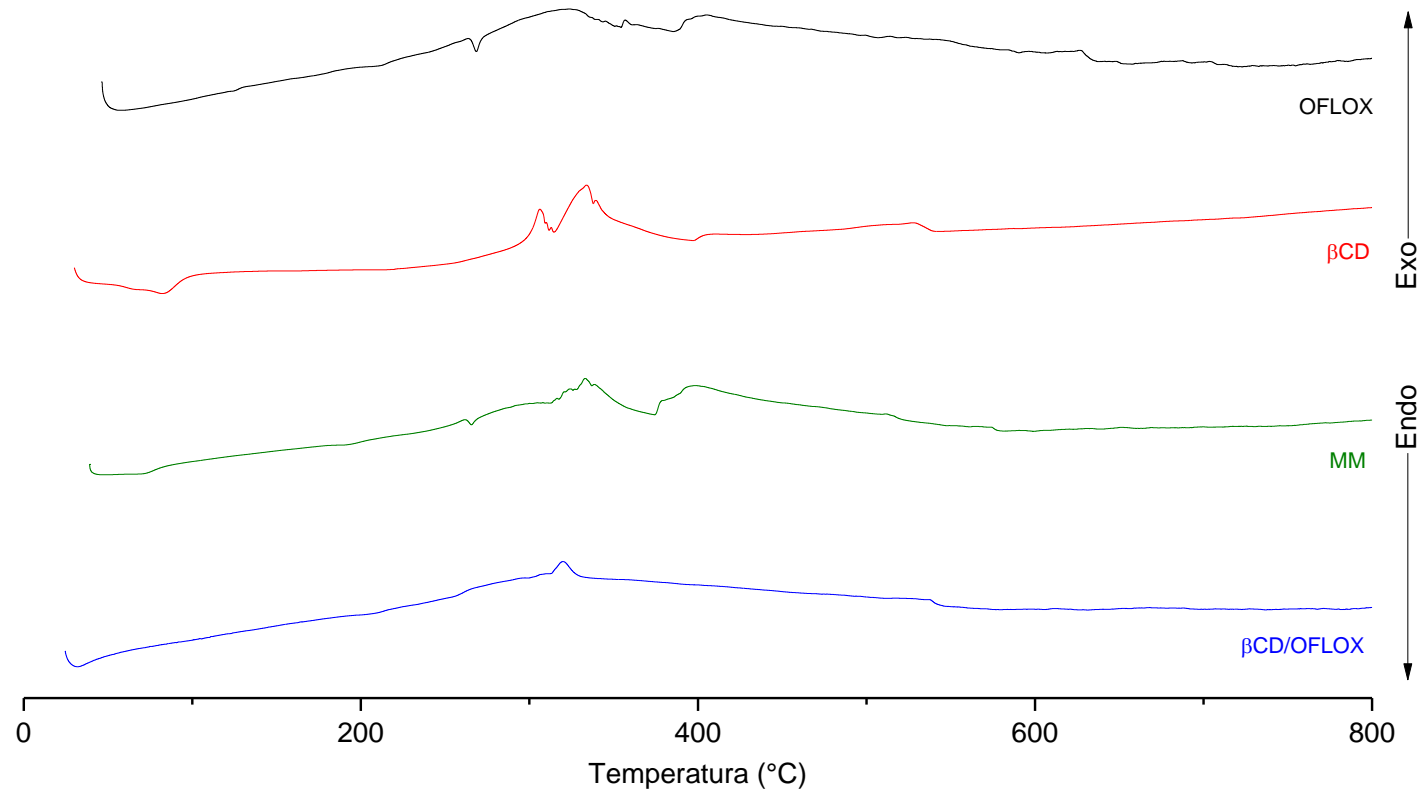
OFLOX: ofloxacino; β CD: β -ciclodextrina; MM: mistura mecânica; β CD/OFLOX: complexo de inclusão ofloxacino/ β -ciclodextrina; KBr: brometo de potássio; ν : número de onda.

APÊNDICE 03 - Espectros de infravermelho do OFLOX, HP β CD, MM e HP β CD/OFLOX na região 4000 a 400 cm^{-1} em KBr.

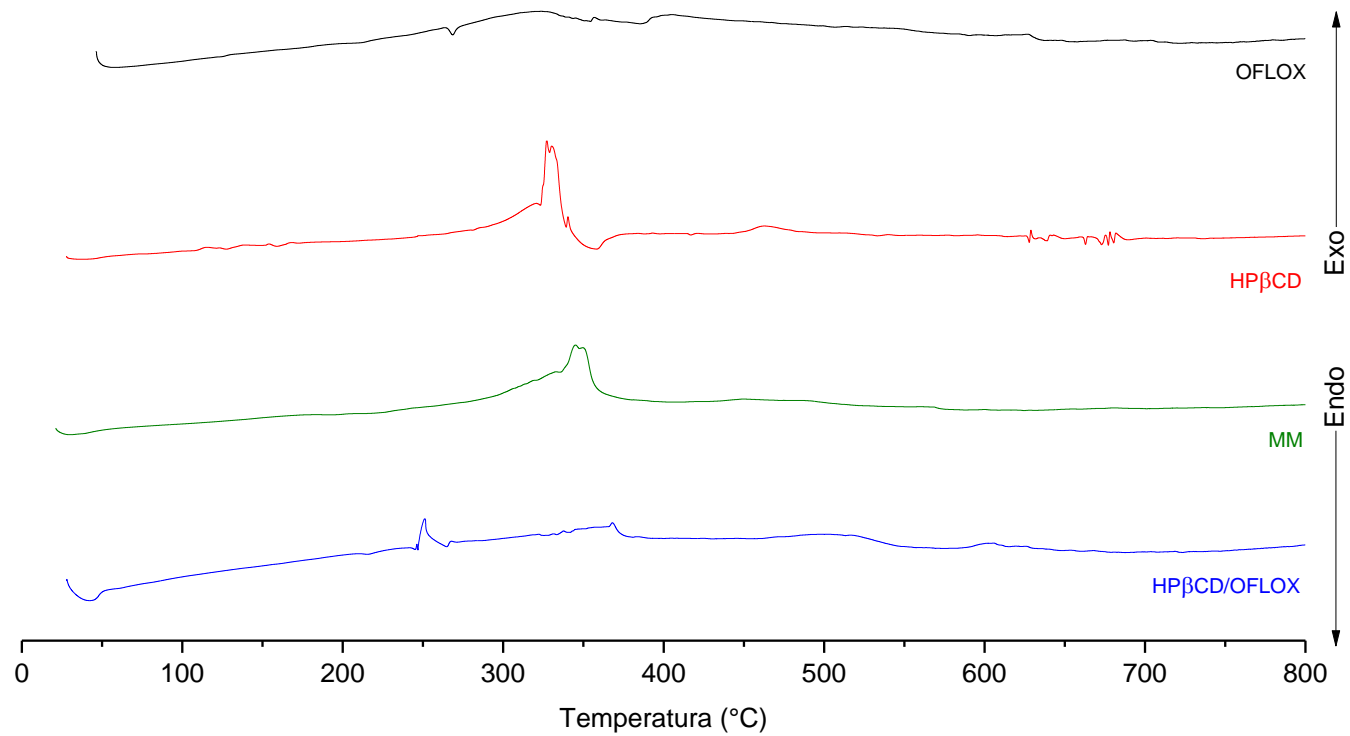


Legenda: OFLOX: ofloxacino; HP β CD: hidroxipropil- β -ciclodextrina; MM: mistura mecânica; HP β CD/OFLOX: complexo de inclusão ofloxacino/hidroxipropil- β -ciclodextrina; ν : número de onda.

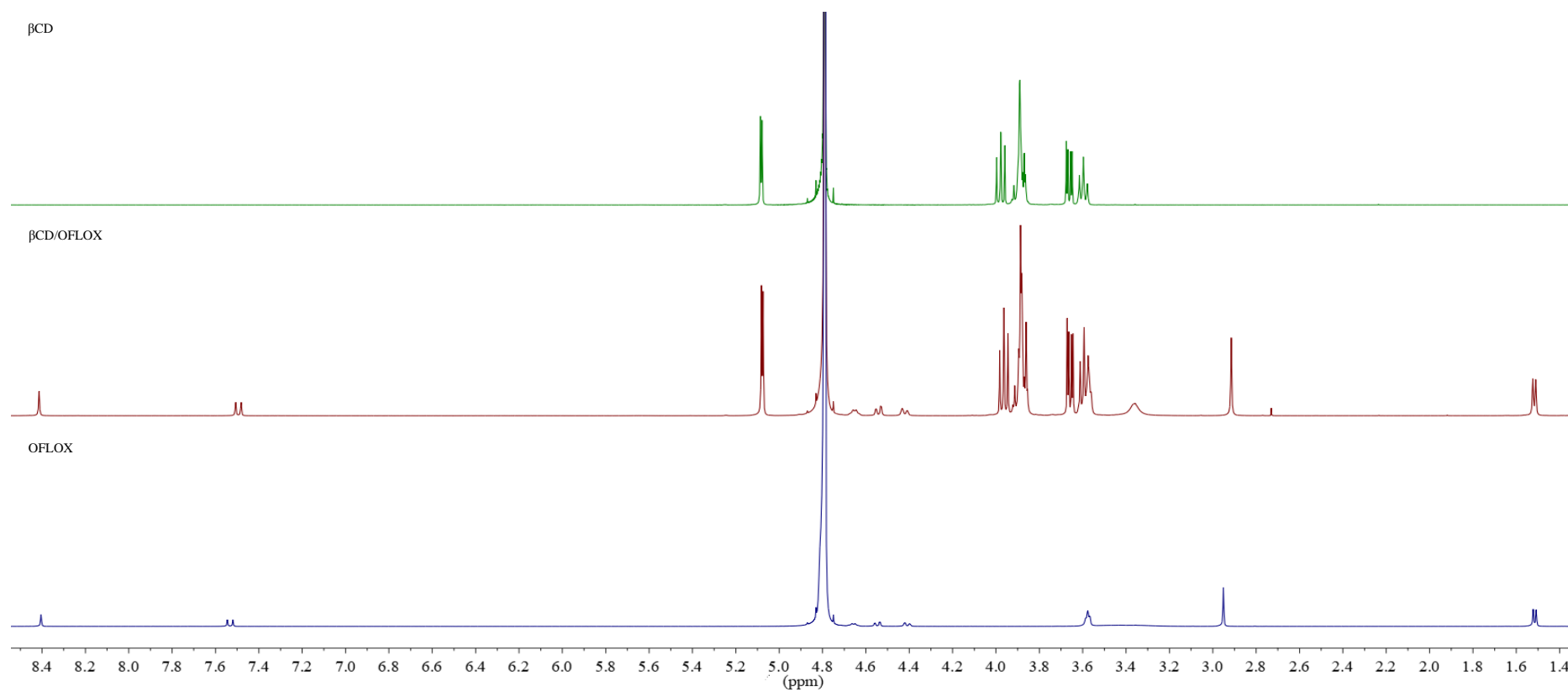
APÊNCE 04 – Curva de DTA para OFLOX, β CD, MM e β CD/OFLOX.



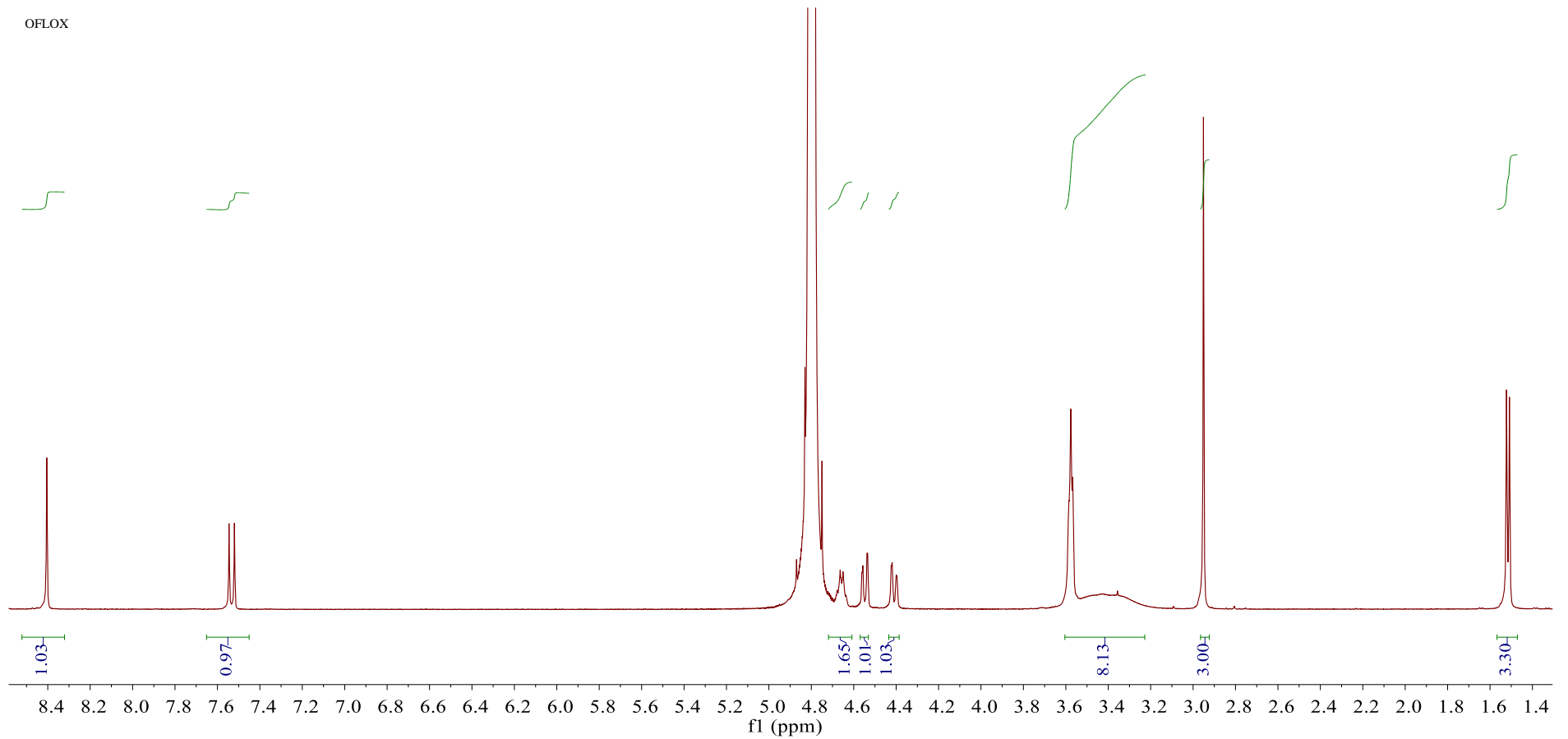
Legenda: DTA: análise térmica diferencial; OFLOX: ofloxacino; β CD: β -ciclodextrina; MM: mistura mecânica; β CD/OFLOX: complexo de inclusão ofloxacino/ β -ciclodextrina; Endo: endotérmico; Exo: exotérmico.

APÊNDICE 05 - Curva de DTA para OFLOX, HP β CD, MM e HP β CD/OFLOX.

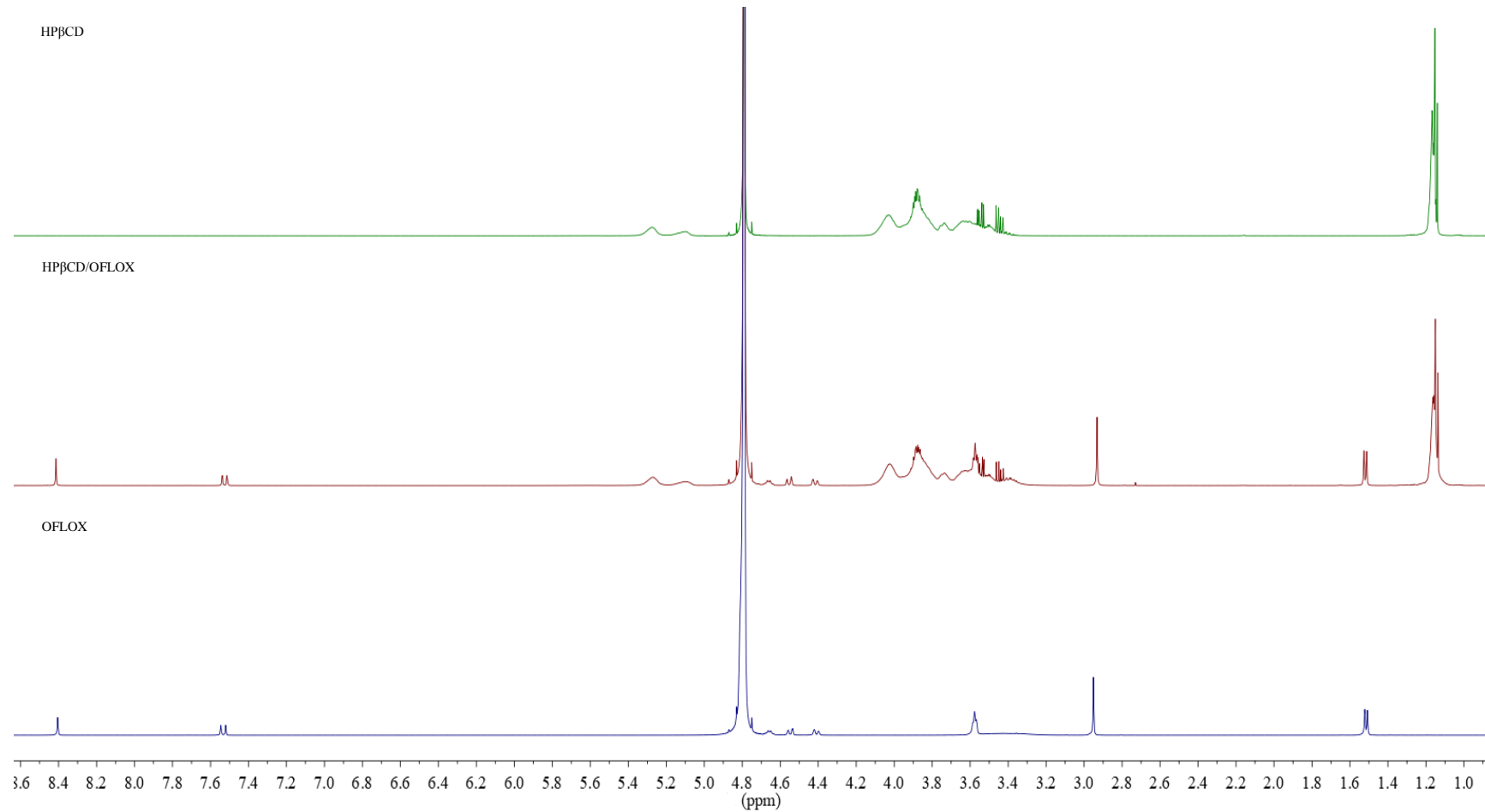
Legenda: DTA: análise térmica diferencial; OFLOX: ofloxacino; HP β CD: hidroxipropil- β -ciclodextrina; MM: mistura mecânica; HP β CD/OFLOX: complexo de inclusão ofloxacino/hidroxipropil- β -ciclodextrina; Endo: endotérmico; Exo: exotérmico.

APÊNDICE 06 – Espectros de RMN de ^1H da βCD , $\beta\text{CD}/\text{OFLOX}$ e OFLOX em D_2O , 500 MHz.

Legenda: RMN de ^1H : ressonância magnética nuclear de hidrogênio; βCD : β -ciclodextrina; $\beta\text{CD}/\text{OFLOX}$: complexo de inclusão ofloxacino/ β -ciclodextrina; OFLOX : ofloxacino; D_2O : óxido de deutério; MHz: mega-hertz; ppm: partes por milhão.

APÊNCIDE 07 - Espectro de RMN de ^1H do OFLOX em D_2O , 500 MHz.

Legenda: RMN de ^1H : ressonância magnética nuclear de hidrogênio; OFLOX: ofloxacino; D_2O : óxido de deutério; MHz: mega-hertz; ppm: partes por milhão.

APÊNDICE 08 - Espectros de RMN de ^1H da HP β CD, HP β CD/OFLOX e OFLOX em D_2O , 500 MHz

Legenda: RMN de ^1H : ressonância magnética nuclear de hidrogênio; HP β CD: hidroxipropil- β -ciclodextrina; HP β CD/OFLOX: complexo de inclusão ofloxacino/hidroxipropil- β -ciclodextrina; OFLOX: ofloxacino; D_2O : óxido de deutério; MHz: mega-hertz; ppm: partes por milhão.

