



DANYELA FRANCINE BENVENUTTI

**CHALCONA (2E)-1-fenil-3-(4-metoxifenil)-2-propen-1-ona: ESTUDOS
DE PRÉ-FORMULAÇÃO, TOXICIDADE, DESENVOLVIMENTO DE
SISTEMA DE LIBERAÇÃO E ANÁLISE *in vivo* EM FERIDA CRÍTICA
NA CALOTA CRANIANA**

Itajaí (SC)
2019

UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SUBSTÂNCIAS SINTÉTICAS BIOATIVAS

DANYELA FRANCINE BENVENUTTI

**CHALCONA (2E)-1-fenil-3-(4-metoxifenil)-2-propen-1-ona: ESTUDOS
DE PRÉ-FORMULAÇÃO, TOXICIDADE, DESENVOLVIMENTO DE
SISTEMA DE LIBERAÇÃO E ANÁLISE *in vivo* EM FERIDA CRÍTICA
NA CALOTA CRANIANA**

Tese submetida à Universidade do Vale do Itajaí
como parte dos requisitos para a obtenção do grau
de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Tania Mari Bellé Bresolin
Co-orientador: Prof. Dr. Rogério Corrêa

Itajaí (SC)
Agosto 2019

B447c

Benvenuti, Danyela Francine, 1987-

Chalcona (2e)-1-fenil-3-(4-metoxifenil)-2-propen-1-ona [Manuscrito]: estudos de pré-formulação, toxicidade, desenvolvimento de sistema de liberação e análise *in vivo* em ferida crítica na calota craniana. / Danyela Francine Benvenuti. Itajaí, - SC. 2019.

283 f. ; il. ; graf. ; fig. ; tab.

Bibliografias f. 239-278

(Cópia de computador (Printout(s))).

Tese submetida à Universidade do Vale do Itajaí como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

“Orientador: Prof. Dr. Tania Mari Bellé Bresolin”.

“Co-orientador: Prof. Dr. Rogério Corrêa”.

1. Chalcona. 2. Toxicologia. 3. Farmacologia. 4. Biomateriais.

I. Universidade do Vale do Itajaí. II. Título.

CDU: 615.32



UNIVALI

UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ

“CHALCONA (2E)-1-fenil-3-(4-metoxifenil)-2-propen-1-ona: ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO, TOXICIDADE, DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA DE LIBERAÇÃO E ANÁLISE *in vivo* EM FERIDA CRÍTICA NA CALOTA CRANIANA”

DANYELA FRANCINE BENVENUTTI

Esta Tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutor (a) em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Produtos Naturais e Substâncias Bioativas e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Vale do Itajaí.

Professor Cláudio Antônio Rodrigues, Doutor
Coordenador PPGCF

Apresentada perante a Banca Examinadora composta pelos Professores:

Prof^ª. Dra. TANIA MARI BELLÉ BRESOLIN (UNIVALI) – Presidente e Orientadora

Prof. Dr. ROGERIO CORREA (UNIVALI) – Coorientador

Prof^ª. Dra. RUTH MERI LUCINDA DA SILVA (UNIVALI) – Membro Interno

Prof^ª. Dra. FATIMA DE CAMPOS BUZZI (UNIVALI) – Membro Interno

Prof^ª. Dra. MAIRA GALDINO DA ROCHA PITTA (UFPE) – Membro Externo

Prof. Dr. MARCOS ANTONIO SEGATTO SILVA (UFSC) – Membro Externo

Itajaí, 19 de agosto de 2019.

Dedico esta tese ao meu amado filho Vinícius.

“Ser profundamente amado por alguém
nos dá força;
amar alguém profundamente
nos dá coragem”.

Lao-Tsé

AGRADECIMENTOS

Talvez esta etapa seja tão difícil quanto escrever a tese, difícil porque é praticamente impossível descrever em poucas palavras o quanto sou grata pelas pessoas que fizeram parte deste período da minha vida. Algumas nem sequer têm noção do quanto são importantes para mim, e do quanto me mudaram como profissional e pessoa durante este período.

Primeiramente não posso deixar de agradecer a Deus, por me direcionar e colocar no caminho de tantas pessoas maravilhosas e por me permitir ter saúde para percorrer este caminho e paciência e perseverança para não desistir e não desanimar nas horas difíceis.

Agradecimento mais que especial para minha amiga, professora, orientadora Tania, você não imagina o quanto te admiro como pessoa e como profissional, me ensinou muito durante todo esse tempo, não só profissionalmente, mas no âmbito pessoal também. Obrigada por todas as oportunidades que você me proporcionou, obrigada pela amizade, por me ensinar a ter mais calma, por me ensinar a ver o lado bom de tudo. Nunca me esquecerei de você, te adoro profe, obrigada por tudo, tem um pedacinho no meu coração reservado pra você.

Profe Ricci, mio carissimo amico, ti porterò per sempre nel mio cuore. Non trovo le parole giuste per poterti ringraziare per tutto ciò che hai fatto per me e per il grande affetto che mi hai dimostrato. Grazie per quelle risate che ci riempivano le giornate, grazie per le tue dolci parole pronunciate con affetto, grazie di essere mio amico. Spero rivederci molte volte in questa vita. Ti adoro.

Profe Giovagnoli, voglio ringraziarti per avermi accolto così bene in Italia, per tutto l'insegnamento che mi hai dato durante l'anno in cui sono rimasta, per l'amicizia e affetto. Ho amato stare insieme a Lei e ti ammiro molto. Spero di incontrarti nuovamente, mi manca lavorare con te. Non dimenticherò mai queste bellissimo anno della mia vita. Ti adoro.

Vorrei ringraziare l'amicizia e l'affetto degli Professore Riccardo Vivani (così carino), Luana Perioli, Valeria Ambrogi e Aureli Schoubben, e amici Cinzia Pagano, Marco e Alessandro.

Agli amici Barbara Albertini, Matteo Puccetti, Silvia Zucchini, Giuliana Euticchio, Emanuela Ciccone, Ylenia Ciculi, Simona Cannella, Maria Chiara Fabi, vorrei ringraziare la compagnia di tutti i giorni e soprattutto i deliziosi pranzi insieme in laboratorio e i momenti rilassanti e piacevoli dei nostri caffè, mi mancano molto.

Agradeço também a todos os professores da Univali que fizeram parte desta etapa Angélica, Nara, Fátima. Muito obrigada por toda ajuda que me deram, por todo ensinamento compartilhado e pela amizade.

Um agradecimento especial para os professores Ruth e Clóvis, pela ajuda que me deram durante este período e pelo carinho.

Professora Angela Malheiros, agradeço a ajuda com a elucidação dos produtos de degradação e também gostaria de agradecer sua amizade e carinho.

Ao professor Zeca Santin, muito obrigada pela colaboração nos experimentos de toxicologia, pelas inúmeras ajudas, amizade e ensinamentos, você é um exemplo para mim como profissional, muito obrigada.

Ao professor Theodoro Wagner, obrigada por toda ajuda com as análises de CGMS e LCMS, e por todo ensinamento passado sobre cromatografia.

Agradeço ao professor David Tames e Telmo Mezdri pela colaboração nas análises *in vivo* de regeneração óssea, assim como as técnicas de laboratório Maria e Claudia pelo auxílio nas análises.

Victor e Clarissa, agradeço pela ajuda nas análises de HPLC.

Aos amigos da Universidade em especial um agradecimento a Fernanda Stenger, pela companhia no Brasil e na Itália, uma amizade que fiz para a vida toda, passamos momentos muito especiais neste período que serão inesquecíveis, “nunca desanimeis, embora venham ventos contrários”.

Outro amigo muito especial que gostaria de agradecer é o Fellippe Wolff, obrigada pelo carinho, pela ajuda com os experimentos de toxicologia, adoro você.

Gostaria de agradecer ao aluno de Engenharia Química, Thales Sobrinho pelas análises de docking molecular.

Um agradecimento aos funcionários do programa de pós-graduação, que sempre auxiliam tão bem os alunos, Juliano e Helenize.

E por último, porém não menos importante, gostaria de agradecer a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), (PVE, bolsa 88887.116106 / 2016- 00) Brasil, por fornecer apoio financeiro na forma de bolsa de doutorado e ao apoio financeiro (Programa Científico Sem Fronteiras - Pesquisador Visitante Especial - PVE), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Edital Universal, bolsa 88887.122964 / 2016-00).

Agradecimento especial para a família

Gostaria de agradecer meu filho Vinícius por sempre estar ao meu lado, em todos os momentos e por apesar de tão jovem, sempre ter palavras para me fazer levantar a cabeça nas horas difíceis, e por me acompanhar com felicidade e coragem onde quer que eu vá. Obrigada por ser um filho tão especial, amoroso, dedicado em tudo que faz, paciente e sem sombra de dúvidas esse menino corajoso, que enfrenta todas as dificuldades com a sabedoria de um homem adulto, obrigada pelos momentos maravilhosos na Itália, garanto que guardaremos essa experiência para sempre em nossos corações e com certeza aprendemos muito, você é e sempre será o meu maior orgulho, meu maior amor, amor esse que não sei expressar em palavras, te amo mais do que amo a mim mesma, és uma marca que permanecerá em minha alma por toda eternidade.

Agradeço ao meu esposo, que dedicou 1 ano de sua vida inteiramente à nossa família, me acompanhando na Itália, obrigada pelo seu altruísmo, pelo cuidado que teve com nosso filho durante esse ano, obrigada por estar ao meu lado, por me dar coragem. Este período de doutorado nos mudou, nos tornamos mais amigos, mais pacientes, mais dedicados ao núcleo familiar e foram muitos acontecimentos, alguns tristes outros alegres, mas superamos todas as etapas juntos e é esse o verdadeiro sentido do matrimônio, obrigada por tudo, te amo.

Agradeço também meus pais por sempre estarem presentes na minha vida, me ajudando em tudo que preciso, me apoiando sempre, me dando forças para continuar. Vocês me ensinaram a ser quem sou hoje, e eu sou eternamente grata por tudo que vocês sempre fizeram por mim, amo muito vocês. Obrigada por serem tão dedicados aos filhos e netos, tão amorosos e amigos, tenho muito orgulho vocês, agradeço a Deus por ser filha de vocês, tenho muita sorte de ter nascido neste lar.

Agradeço aos meus irmãos Taty e Bel e meus cunhados Edu e Luma, pela amizade, carinho, por sempre estarem ao meu lado. Eu amo muito vocês. Não fiquem com ciúmes, mas tenho que destacar a minha irmã Taty neste agradecimento, que é minha segunda mãe, sempre cuidando de mim, te amo demais minha irmã e obrigada por tudo sempre, você é minha melhor amiga, confidente, e uma das pessoas que mais confio nesta vida, te amo te amo.

Meus sobrinhos lindos e amados, Tota e Guigui, a tia dinda ama vocês demais, são raios de luz na minha vida, quando estou com vocês me sinto mais feliz e mais completa, obrigada pelo amor que têm por mim, que enche o coração da tia de felicidade.

E para finalizar, uma homenagem à minha sogra, uma amiga que me ajudou muito nesta jornada, cuidando tão bem do meu filho e auxiliando em tantas outras tarefas do dia a dia, obrigada por estar sempre presente enquanto estavas aqui, onde quer que você esteja, sei que sabes o quanto sou grata, “A vida é feita de momentos, momentos pelos quais temos que passar, sendo bons ou não, para o nosso aprendizado. Nada é por acaso. Precisamos fazer a nossa parte, desempenhar o nosso papel no palco da vida, lembrando de que a vida nem sempre segue o nosso querer, mas ela é perfeita naquilo que tem que ser”. “Saudade é uma dor que fere nos dois mundos” - Chico Xavier.

“All that we are is the
result of what we have
thought. The mind is
everything. What we
think, we become.”

Buddha

“Quando o espírito toma
consciência de que é o
construtor de si mesmo, o
artífice de sua felicidade,
ele não para mais.
Pode acontecer o que for,
que ele continua.”

Chico Xavier

CHALCONA (2E)-1-fenil-3-(4-metoxifenil)-2-propen-1-ona: ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO, TOXICIDADE, DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA DE LIBERAÇÃO E ANÁLISE *in vivo* EM FERIDA CRÍTICA NA CALOTA CRANIANA

Danyela Francine Benvenutti

Agosto/2019

Orientador: Tania Mari Bellé Bresolin, Doutora.

Co-orientador: Rogério Corrêa, Doutor.

Área de Concentração: Produtos Naturais e Substâncias Sintéticas Bioativas.

Número de Páginas: 283

Com o aumento da expectativa de vida, o risco de fraturas e doenças do sistema ósseo tornam-se um problema de saúde pública. Estudos anteriores mostram que a chalcona 4-metoxi (4-MC) apresenta atividade anti-inflamatória e osteogênica, sendo assim, o desenvolvimento de um sistema de liberação de fármaco utilizando-se biomateriais, que seja eficaz na regeneração óssea e forneça resultados permanentes, representa um desafio tecnológico promissor. Este trabalho visou realizar estudo de pré-formulação da 4-MC obtida por síntese, caracterizar sua toxicidade *in silico* e *in vivo* (toxicologia aguda e sub-crônica) e HET-CAM, subsidiando o desenvolvimento de um sistema de liberação (*scaffold*) para regeneração óssea pela microencapsulação da 4-MC em polímeros biodegradáveis. As micropartículas (MPs) foram caracterizadas quanto ao tamanho, perfil de liberação do fármaco, capacidade de encapsulação de fármaco, morfologia por MEV e cristalinidade por raio-X, sendo empregadas na confecção de *scaffolds* e a atividade osteogênica dos *scaffolds* foi analisada, *in vivo*, em modelo de ferida crítica na calota craniana de ratos. Os resultados obtidos nos estudos de pré-formulação da 4-MC, após sua purificação, indicam que este composto é insolúvel, apresenta-se na forma de cristais, é passível de sofrer degradação por oxidação, em sítios específicos da molécula e é fotossensível. Quanto à sua segurança, a 4-MC não apresenta evidências de toxicidade em tecido renal e cardíaco em doses de até 2000 mg/kg e não causa irritabilidade ocular. As MPs de PDLG 7507 (Copolímero DL-Lactídeo-co-Glicolídeo) apresentaram tamanho médio entre 100 e 200 µm. Os *scaffolds* desenvolvidos contendo 10% de 4-MC mostraram liberação de 70,45% de 4-MC em 60 dias, capacidade de encapsulação de 85,5%, rigidez e morfologia adequadas e demonstraram eficácia no modelo *in vivo* de regeneração óssea, com cerca de 80% de fechamento da calota craniana após 60 dias com evidente estimulação de síntese de colágeno, sendo biocompatível, osteocundutor e osteoindutor. Em conjunto os resultados demonstram que os *scaffolds* de 4-MC são uma alternativa segura e eficaz na regeneração óssea.

Palavras-chave: Chalcona. Pré-formulação. Toxicologia. Biomateriais. *Scaffolds*. Osteogênese.

(2E) -1-phenyl-3- (4-methoxy-phenyl) -2-propen-1-one CHALCONE: PREFORMULATION STUDIES, TOXICITY, DEVELOPMENT OF A RELEASE SYSTEM AND *in vivo* ANALYSES IN CRITICAL-SIZED CALVARIAL DEFECT

Danyela Francine Benvenutti

August/2019

Supervisor: Tania Mari Bellé Bresolin, PhD.

Co-supervisor: Rogério Corrêa, PhD.

Area of Concentration: Natural Products and Synthetic Bioactive Substances.

Number of Pages: 283

With the increase in life expectancy, the increased incidence of fractures and diseases of the bone system has become a public health problem. Previous studies have shown that chalcone 4-methoxy (4-MC) has anti-inflammatory and osteogenic activity. Thus, the development of a drug release system using biomaterials that is effective in bone regeneration and provides permanent results represents a promising technological challenge. This work aimed to perform a preformulation study of 4-MC obtained by synthesis, and to characterize its *in-silico* and *in vivo* toxicity (acute and sub-chronic toxicology) and HET-CAM, to support the development of a release system (*scaffold*) for bone regeneration by the microencapsulation of 4-MC in biodegradable polymers. Microparticles (MPs) were characterized by size, drug release profile, drug encapsulation ability, SEM morphology and X-ray crystallinity, and were employed in the manufacture of scaffolds. The osteogenic activity of the scaffolds was analyzed *in vivo*, in a model of critical-sized defect in the calvarial bone in rats. The results obtained in the preformulation studies of 4-MC, after purification, indicate that this compound is insoluble; presents in the form of crystals; is susceptible to oxidation degradation at specific sites of the molecule; and is photosensitive. In regard to its safety, 4-MC showed no evidence of renal or cardiac toxicity at doses up to 2000 mg/kg and did not cause eye irritability. PDLG 7507 (DL-lactide-*co*-glycolide copolymer) MPs had an average size of between 100 and 200 µm. The developed scaffolds containing 10% 4-MC showed 70.45% release of 4-MC within 60 days, 85.5% encapsulation capacity, and adequate stiffness and morphology, and demonstrated efficacy in the bone regeneration *in vivo* model, with about 80% skullcap closure after 60 days with evident stimulation of collagen synthesis. The scaffolds also proved to be biocompatible, osteoconductive and osteoinductive. Together, the results demonstrate that 4-MC scaffolds are a safe and effective alternative for use in bone regeneration.

Keywords: Chalcone. Preformulation. Toxicology. Biomaterials. Scaffolds. Osteogenesis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-MC- Chalcona (2E)-1-fenil-3-(4-metoxifenil)-2-propen-1-ona
ALT- Alanina aminotransferase
AST- Aspartato aminotransferase
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BMP- Proteína morfogenéticas óssea
BMP-2- Proteína morfogenética óssea -2
BPF- Boas práticas de fabricação
BSP- Sialoproteína Óssea (*Bone Sialoprotein*)
CatK- Catepsina k
CC- Cromatografia em Coluna
CCD- Cromatografia em Camada Delgada
CEUA- Comitê de Ética no Uso de Animais
CG- Cromatografia a gás
CG-MS- Cromatografia a gás com espectro de massas acoplado
CLAE- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CONCEA- Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CPL- Coprolactama
DRX- Difração de Raio X
DSC- Calorimetria Exploratória Diferencial
EMA- *European Medicines Agency*
FDA- *Food and Drug Administration*
FTIR- Infra-vermelho por Transformada de Fourier
FGFs- Fatores de Crescimento de Fibroblastos
GGCX- *γ -glutamyl carboxilase*
GlaOC- *Osteocalcina γ -carboxilada*
GluOC- *Osteocalcina γ - não carboxilada*
GSTs- *Glutathione S-transferase*
HÁ- Hidroxiapatita
HCT-8- Linhagem celular de adenocarcinoma ileocecal humano
HET-CAM- *Hens Egg Test-Chorion Allantoic Membrane*
IFA- Insumo farmacêutico ativo
IGFs- Fatores de Crescimento Semelhante à Insulina
LogP- Coeficiente de Partição
MDA-MB-435 - Linhagem celular de câncer de mama
MEV- Microscopia Eletrônica de Varredura
MMP2- Metaloproteinase de Matriz-2

MMP9- Metaloproteinase de Matriz-9
MSC- Sélulas-tronco mesenquimais
MTT- Sal brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazolium
NIQFAR- Núcleo de Investigações Químico Farmacêuticas
NIH- *National Institute of Health*
Nrf2- Fator nuclear eritroide 2
OECD- *Organisation for Economic Cooperation and Development*
OPG- Osteoprotegerina
OPN- Osteopontina
PCs- Proteínas Colágenas
PNCs- Proteínas Não Colágenas
pK_a- Constante de Ionização
PDLG - Copolímero DL-Lactídeo- *co*-Glicolídeo
PGA- Ácido poliglicólido
PLA- Ácido polilático
PLGA- poli ácido láctico-*co*-ácido glicólico
PLLA- Poli (ácido L-lático)
PDLLA- Poli (ácido D,L- lático)
PPAR γ - *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*
PDGFs= Fatores de Crescimento Derivado de Plaquetas
RMN- Ressonância Nuclear Magnética
RTMS- *Real Time Multiple Strip*
RANKL- Fator nuclear kappa-B ligante
RANK- Fator nuclear kappa-B
rhBMP-2= Proteínas morfogenéticas ósseas recombinantes humanas
SF-295- Linhagem celular de glioblastoma
SIBLING- *Small integrin binding ligand N-linked glycoprotein*
SPARC- *Secreted protein, acidic and rich in cysteine*
TCP- Fostato tricalcio
TG- Termogravimetria
TGFs- Fatores de Transformação do Crescimento
TNF- Fator de Necrose Tumoral
UPLC- *Ultra Performance Liquid Chromatography*
USEPA- *United States Environment Protection Agency*
UV- Ultravioleta
UNIVALI - Universidade do Vale do Itajaí

VIS- visível

VEGFs- Fatores de Crescimento Vasculares Endoteliais

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	29
1 INTRODUÇÃO	31
2 OBJETIVOS.....	33
2.1 Objetivo Geral	33
2.2 Objetivos Específicos.....	33
CAPÍTULO II.....	35
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	35
1 FISIOLOGIA DO OSSO	37
2 PROCESSO DE REGENERAÇÃO DO OSSO E POSSÍVEIS TRATAMENTOS PARA DEFEITOS ÓSSEOS	47
3 POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS	51
4 MICROENCAPSULAÇÃO	54
5 SCAFFOLDS.....	56
6 CHALCONAS.....	61
6.1 CHALCONA (2E)-1-FENIL-3-(4-METOXIFENIL)-2-PROPEN-1-ONA (4-MC).....	64
CAPÍTULO III.....	67
CHALCONA (2E) -1-FENIL-3- (4-METOXI-FENIL) -2-PROPEN-1-ONA: ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO E ESTABILIDADE.....	67
ESTE ARTIGO FOI SUBMETIDO AO PERIÓDICO <i>PHARMACEUTICAL RESEARCH</i> COM FATOR DE IMPACTO IGUAL A 3.42.....	67
CHALCONA (2E) -1-FENIL-3- (4-METOXI-FENIL) -2-PROPEN-1-ONA: ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO E ESTABILIDADE.....	69
RESUMO	69
INTRODUÇÃO.....	71
2 MATERIAIS E MÉTODOS	72
2.1 MATERIAIS	72
2.2 SÍNTESE E PURIFICAÇÃO DA CHALCONA (2E)-1-FENIL-3-(4-METOXIFENIL)-2-PROPEN-1-ONA	72
2.3 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA 4-MC	73
2.3.1 ANÁLISE DE INFRA-VERMELHO–FTIR.....	73
2.3.2 ESPECTROMETRIA DE MASSA E CROMATOGRAFIA GASOSA (CG-MS).....	73
2.3.3 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO ¹H E CARBONO ¹³C (RMN)	74
2.3.4 DIFRAÇÃO DE RAIO X (DRX)	74
2.4 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL E TERMOGRAVIMETRIA (DSC E TG)	74
2.5 ANÁLISE DE SOLUBILIDADE.....	75

2.6 PREDIÇÃO DA ESTABILIDADE <i>IN SILICO</i>	76
2.7 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO DA CHALCONA POR CLAE-UV E UPLC-MSMS.....	77
2.7.1 MÉTODO POR CLAE-UV	77
2.7.1.2 PREPARO DA AMOSTRA	78
2.7.1.3 VALIDAÇÃO ANALÍTICA	78
2.8 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO POR UPLC-MSMS.....	79
2.8.1 PREPARO DA AMOSTRA	80
2.9 ANÁLISE DE ESTABILIDADE <i>IN VITRO</i> DO COMPOSTO	80
2.9.1 FOTOESTABILIDADE	80
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	81
3.1 SÍNTESE DA CHALCONA (2E)-1-FENIL-3-(4-METOXIFENIL)-2-PROPEN-1-ONA E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	81
3.1.1 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL.....	82
3.1.2 ANÁLISE DE DIFRAÇÃO DE RAIO X.....	88
3.2 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC) E TERMOGRAVIMETRIA (TG).....	90
3.3 SOLUBILIDADE	92
3.4 PREDIÇÃO <i>IN SILICO</i>	93
3.5 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE-UV.....	96
3.5.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ISOCRÁTICO	99
3.5.2 ANÁLISE DA FOTOESTABILIDADE POR CLAE-UV.....	101
3.6 ANÁLISE DA FOTOESTABILIDADE POR UPLC-MSMS	107
4 CONCLUSÕES	121
CAPÍTULO IV.....	123
AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA <i>IN SILICO</i>, <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> DA CHALCONA 4-METOXI.....	123
RESUMO	125
1 INTRODUÇÃO	127
2 METODOLOGIA.....	129
2.1 ENSAIO DE TOXICOLOGIA <i>IN SILICO</i>	129
2.2 ANÁLISE DO POTENCIAL TÓXICO DA 4-MC EM MEMBRANA CORIOALANTOIDE (CAM)	129
2.3 ANIMAIS.....	130
2.4 ENSAIO DE TOXICOLOGIA AGUDA	130
2.5 ENSAIO DE TOXICOLOGIA SUB-CRÔNICA	131
2.5.1 ANÁLISE BIOQUÍMICA E HISTOLÓGICA	132

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	132
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	133
3.1 ANÁLISE TOXICOLÓGICA <i>IN SILICO</i>	133
3.2 ANÁLISE DE POTENCIAL TÓXICO DA 4-MC EM MEMBRANA CORIOALANTOIDE (CAM)	133
3.3 CHALCONA 4-MC NÃO PROVOCA ALTERAÇÕES TOXICOLÓGICAS AGUDAS	136
3.2 ANÁLISE TOXICOLÓGICA SUB-CRÔNICA	139
4 CONCLUSÃO	147
CAPÍTULO V.....	149
UMA NOVA ABORDAGEM ESTABILIZADORA PARA MELHORAR A FABRICAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS BIODEGRADÁVEIS QUE INCORPORAM MOLÉCULAS ATIVAS PLASTIFICANTES: O CASO DA CHALCONA 4-METOXI.....	149
RESUMO	151
1 INTRODUÇÃO.....	153
2 MATERIAIS E MÉTODOS	155
2.1 MATERIAIS	155
2.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA CHALCONA.....	155
2.3 MÉTODO DE PREPARAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS.....	155
2.4 PREPARAÇÃO DO COMPOSTO DE INCLUSÃO 4MC-SHTC.....	156
2.5 PREPARAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS CARREGADAS COM 4-MC-SHTC	157
2.6 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS	157
2.7 LIBERAÇÃO DO FÁRMACO IN VITRO.....	159
2.8 CINÉTICA E MECANISMO DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS	159
2.9 ESTABILIDADE DE ARMAZENAMENTO DA MP CARREGADA COM 4-MC	160
2.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	161
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	162
3.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA CHALCONA.....	162
3.2 EFEITO DO CARREGAMENTO DO 4-MC NA MP DE POLIÉSTER	162
3.2.1 CARACTERIZAÇÃO DA MP CARREGADA COM 4-MC (MP 4-MC).....	162
3.2.2 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO PLASTIFICANTE DO 4-MC SOBRE O POLÍMERO	168
3.2.3 EFEITO DE CARGA DE 4-MC NOS PERFIS DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	174
3.2.4 CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACO	178
3.3 COMPOSTOS DE INCLUSÃO DE HIDROTALCITA COMO ESTRATÉGIA PARA EVITAR PROBLEMAS DE FABRICAÇÃO DE MP	184
3.3.1 ESTABILIDADE DA MP CARREGADA COM 4-MC E 4-MC-SHTC	192
4 CONCLUSÃO	196

CAPÍTULO VI.....	197
ATIVIDADE OSTEOGÊNICA DA 4-METOXI CHALCONA EM SCAFFOLDS BIODEGRADÁVEIS.....	197
ATIVIDADE OSTEOGÊNICA DA 4-METOXI CHALCONA EM SCAFFOLDS BIODEGRADÁVEIS.....	199
RESUMO	199
1 INTRODUÇÃO	201
2 METODOLOGIAS.....	203
2.2 DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA DE LIBERAÇÃO	203
2.3 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS (MP).....	203
2.4 DESENVOLVIMENTO DE <i>SCAFFOLDS</i>	204
2.5 ANÁLISE DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACO (CÉLULA DE FRANZ)	204
2.6 ANÁLISE DO POTENCIAL IRRITANTE EM MODELO DE MEMBRANA CORIOALANTOIDE (CAM).....	205
2.7 MONITORAMENTO DE EFEITO OSTEOGÊNICO EM MODELOS PRÉ-CLÍNICOS.....	205
2.7.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	206
2.7.3 ANÁLISE DA REGENERAÇÃO ÓSSEA.....	207
2.7.3.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA	207
2.7.3.2 ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	208
2.7.3.4 ANÁLISE DA PRESENÇA DE COLÁGENO.....	208
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	210
3.1 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS <i>SCAFFOLDS</i>	210
3.2 LIBERAÇÃO DO FÁRMACO A PARTIR DOS <i>SCAFFOLDS</i>	211
3.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IRRITANTE DOS <i>SCAFFOLDS</i> PELO MÉTODO DE HET-CAM	213
3.4 AVALIAÇÃO <i>IN VIVO</i> DE REGENERAÇÃO ÓSSEA.....	213
3.3.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA	215
3.3.1.1 GRUPO SHAN APÓS 30 DIAS	215
3.3.1.2 GRUPO CONTROLE APÓS 30 DIAS.....	216
3.3.1.3 GRUPO TRATADO APÓS DURANTE 30 DIAS	217
3.3.1.4 GRUPO CONTROLE APÓS 60 DIAS.....	218
3.3.1.5 GRUPO TRATADO APÓS 60 DIAS	219
3.3.2 ANÁLISE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) E PESQUISA DE FORMAÇÃO DE COLÁGENO	221
3.3.2.1 ANÁLISE DO GRUPO SEM TRATAMENTO (SHAN).....	221
3.3.2.2 GRUPO CONTROLE APÓS 30 DIAS.....	222
3.3.2.3 GRUPO TRATADO APÓS 30 DIAS	223
3.3.2.4 GRUPO CONTROLE APÓS 60 DIAS.....	224

3.3.2.5 GRUPO TRATADO APÓS 60 DIAS.....	225
3.5 AVALIAÇÃO DE DOCKING MOLECULAR DA CHALCONA 4-MC.....	227
3.5.1 CATEPSINA K	227
3.5.2 MEK1	229
4 CONCLUSÃO	234
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	235
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	237
ANEXO A - PROTOCOLO DE ACEITAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA	
NO USO DE ANIMAIS - CEUA.....	279

CAPÍTULO I

Introdução e Objetivos

1 INTRODUÇÃO

A classe das chalconas representa uma interessante fonte de obtenção de novos fármacos, devido à sua versatilidade estrutural, facilidade de síntese e ampla gama de atividade farmacológica (FONSECA, 2012). São encontradas em fontes naturais como as espécies do gênero *Angelica* (TABATA *et al.*, 2005), *Glycyrrhiza* (MA *et al.*, 2005), *Piper* (MEISSNER; HABERLEIN, 2005) e *Ruscus* (BOYLE *et al.*, 2003). Análogos desta mesma classe vêm sendo estudados pelo NIQFAR (Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas) da UNIVALI há mais de 18 anos. Entre estes, destaca-se a chalcona (2E) -1-fenil-3-(4-metoxifenil) -2-propen-1-ona (4-MC), que apresenta potencial osteogênico e ação anti-inflamatória (ORTOLAN *et al.*, 2014; 2017).

No entanto, as chalconas apresentam baixa solubilidade em água e algumas são fotossensíveis (MATTOS *et al.*, 2012), o que representa um desafio farmacotécnico com relação à formulação na qual será veiculada, bem como com relação à embalagem, armazenamento e exposição ao meio ambiente. Conhecendo essas características, a microencapsulação torna-se uma estratégia eficaz na administração de medicamentos pouco solúveis e possibilitando o controle sobre a liberação de fármacos durante um longo período de tempo, além disso, contribuindo para a estabilidade do fármaco. No entanto, uma série de problemas relacionados à interação entre o polímero e o fármaco exigem um manejo cuidadoso dos procedimentos de microencapsulação, como por exemplo a plastificação de micropartículas (MP) devido à adição de fármaco, a qual pode afetar a estabilidade das formulações (HUANG *et al.*, 2008).

Portanto, visando o estabelecimento de um novo fármaco, faz-se necessário ampliar a sua caracterização físico-química, sua estabilidade em condições fisiológicas, de armazenamento e de processo, e conhecer a sua toxicidade. Estes dados contribuem para direcionar o desenvolvimento do sistema de liberação da 4-MC, visando à regeneração óssea.

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo um estudo de pré-formulação e toxicidade da 4-MC, além de sua microencapsulação em diferentes polímeros biodegradáveis para o desenvolvimento de *scaffolds* cuja eficácia na regeneração óssea foi avaliada no modelo de defeito crítico de calota craniana em ratos, procurando obter um sistema de liberação com eficácia terapêutica, baixa toxicidade e estável para a terapia de regeneração óssea.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver um sistema de liberação eficaz, seguro e estável para veicular a chalcona 4-MC com aplicação na regeneração óssea.

2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver estudos de pré-formulação da 4-MC, analisando suas propriedades físico-químicas; estabilidade *in silico* e *in vitro*, por meio de estudos de degradação forçada (radiação UV e visível);
- Analisar o potencial de irritação ocular (HET-CAM) da 4-MC, a toxicidade *in silico* e a toxicidade aguda e sub-crônica em camundongos;
- Desenvolver biopolímero de aplicação tópica contendo a 4-MC, que solucione seus problemas de solubilidade e fotoinstabilidade, com atividade na regeneração óssea;
- Desenvolver *scaffolds* apropriados ao modelo *in vivo* de regeneração óssea, monitorando o efeito osteogênico e a biocompatibilidade do sistema.

CAPÍTULO II

Revisão Bibliográfica

1 FISIOLOGIA DO OSSO

O osso, embora seja rígido, é dinâmico e está em constante remodelamento e possui as funções de hematopoiese, reserva mineral, manutenção da integridade estrutural e é também conhecido como um órgão endócrino que contribui para a regulação de vários processos fisiológicos, sendo formado por células e material extracelular calcificado (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2003; WEI; KARSENTY, 2015).

A matriz óssea é constituída de minerais, matriz orgânica, porção celular e água (RATH *et al.*, 2000). A matriz mineral ou inorgânica é formada por cálcio (Ca) e fósforo (P), na forma de cristais de hidroxiapatita, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, sendo responsável pelas propriedades de rigidez e resistência à compressão. Outros minerais também são encontrados, como CaCO_3 e $\text{Mg}(\text{PO}_4)_2$ (FIELD, 2000).

Já a matriz orgânica, é composta por proteínas colágenas (PCs) e não colágenas (PNCs). Além de células como osteoblastos, osteoclastos e osteócitos (ANDRADE *et al.*, 2007).

1.1 Proteínas colágenas

Nas PCs, tem-se o colágeno tipo I que corresponde a 90% da constituição proteica e serve de arcabouço estrutural da fase mineralizada (YOUNG, 2003; THEIL *et al.*, 2002).

Até o momento existem 28 tipos de colágeno identificados, sendo que o colágeno tipo I é a proteína mais abundante no corpo humano, esta proteína tem a função de proporcionar elasticidade, flexibilidade e estabilidade ao tecido em que se encontra. Secretada por osteoblastos e fibroblastos, esta proteína é formada por três cadeias polipeptídicas paralelas helicoidais, enroladas uma na outra, contendo ligações cruzadas intermoleculares, formando estruturas ordenadas conhecidas como fibrilas (MARINI *et al.*, 2017; KNOTT; BAILEY, 1998).

Estas estruturas se ligam a outras macromoléculas (colágenos e proteoglicanos) em proporções variáveis para formar as fibras de colágeno, que então se juntam para formar estruturas de tecido como: tecido ósseo, membranas basais, ligamentos, tendões, pele e vasos sanguíneos (YAMAUCHI; SRICHOLPECH, 2012; VARMA *et al.*, 2016).

Assim como essa proteína faz diferentes ligações para formar as fibrilas e fibras de colágeno em diferentes tipos de tecido, ela também se encontra em

diferentes concentrações, dependendo do tipo de tecido em que se encontram (RITTÍE, 2017).

No processo da formação do tecido ósseo pode-se observar diferentes graus de organização do colágeno na matriz, caracterizando diferentes etapas desse processo. No calo ósseo há um alto grau de desorganização dessas fibras, este é gradualmente substituído por osso lamelar durante a cicatrização óssea, o qual apresenta um grau de organização maior, e evolui para osso lamelar cortical que apresenta um elevado grau de organização (HOERTH *et al.*, 2018). Este é um componente essencial nos processos de formação, remodelação e regeneração óssea.

1.2 Proteínas não colágenas

As PNCs têm a função de promover a mineralização óssea, regulando a adesão e atividade celular (YOUNG, 2003). Existem vários tipos de PNC, como: osteocalcina, sialoproteína óssea, osteoprotegerina (ANDRADE *et al.*, 2007; ROSS, 2000), osteonectina (AARDEN *et al.*, 1994) e fibronectina glicoproteica (YOUNG, 2003).

1.2.1 Osteocalcina

A osteocalcina é uma das proteínas não colagênicas mais abundantes no osso, secretada por osteoblastos maduros, condrócitos hipertrofiados e odontoblastos e composta estruturalmente por uma cadeia de 49 aminoácidos. Esta proteína sofre uma modificação pós-translacional nas posições 17, 21 e 24, resultando em três resíduos de γ -carboxiglutamato, através de uma reação de carboxilação pela γ -glutamil carboxilase (GGCX) tendo como cofator a vitamina K (OWEN *et al.*, 1990; ANDRADE *et al.*, 2007; RAIF e HARMAND, 1993).

Essa modificação aumenta sua afinidade pelo cálcio e cristais de hidroxiapatita, sendo então incorporada na matriz óssea, promovendo mineralização óssea ou regulação do crescimento dos cristais, sendo que sua síntese é aumentada pela 1,25-diidroxivitamina D e sua concentração é proporcional à concentração de cálcio. Porém a osteocalcina γ -carboxilada (GlaOC) contida na matriz óssea sofre uma descarboxilação em contato com o ambiente ácido gerado durante os processos de reabsorção óssea, diminuindo sua afinidade pela hidroxiapatita, promovendo sua liberação na circulação. Este processo faz com que exista duas formas de osteocalcina circulante, a GlaOC γ -

carboxilada e GluOC não carboxilada (MORRIS *et al.*, 1995; FERRON *et al.*, 2010; YOUNG, 2003).

Esta proteína também atua como indicador no prognóstico de evolução de osteopatias, apresentando-se diminuída em doenças como osteoporose, síndrome de Cushing, hipoparatiroidismo e aumentada em casos de osteomalacia, doença de Paget, carcinoma metastático em osso, entre outras (VIEIRA, 1999).

Embora durante muito tempo esta proteína tenha sido correlacionada apenas ao processo de mineralização óssea, hoje sabe-se que a forma não carboxilada está diretamente ligada à função endócrina exercida pelo osso, sendo considerada um hormônio proveniente do tecido ósseo que atua na homeostase da glicose (WEI; KARSENTY, 2015). Karsenty (2017) apresentou uma revisão sobre esta proteína, na qual demonstrou que ela melhora vários aspectos do metabolismo energético, desenvolvimento cerebral e cognição.

Estudos demonstram que GluOC não carboxilada estimula a produção de insulina, aumenta o gasto de energia e a sensibilidade à insulina em órgãos-alvo, bem como previne a obesidade e a intolerância à glicose através de um aumento na concentração circulante da mesma (MIZOKAMI *et al.*, 2017).

1.3.2 Osteopontina

Osteopontina (OPN) é uma fosfoproteína glicosilada situada nos depósitos e na superfície da matriz óssea, sugerindo seu papel na mineralização da matriz óssea. Sendo produzida por vários tipos de células, como osteoblastos, osteoclastos, células imunes, células endoteliais e células epiteliais, atuando em diversos níveis fisiológicos (ANDRADE *et al.*, 2007; HAO *et al.*, 2017).

Estudos demonstraram que a OPN estimula a adesão, migração e reabsorção óssea através dos osteoclastos, estimulando a expressão de CD44 (glicoproteína da superfície celular envolvida nas interações célula-célula, adesão celular e migração) na superfície celular, sendo esta atividade necessária para a motilidade dos osteoclastos e reabsorção óssea (SUZUKI *et al.*, 2002).

Osteoblastos, osteócitos e osteoclastos secretam OPN durante o processo de remodelação óssea e aumentam a sua expressão em resposta a estímulos mecânicos, o que faz desta proteína fator importante na formação e reabsorção óssea (KLEIN-NULEND *et al.*, 1997). Também foi reportado

que o processo de angiogenese na remodelação óssea é facilitada pela OPN (ASOU *et al.*, 2001).

Hunter (2013) afirmou que a OPN modula a formação de hidroxiapatita no tecido ósseo, e propôs dois possíveis mecanismos: evitando o crescimento de cristais em áreas "inapropriadas" ou regulando o hábito de crescimento do cristal.

Outros estudos mostraram que a presença de OPN no meio tumoral leva ao aumento do crescimento do tumor e à metástase e conseqüentemente ao mau prognóstico (WAI; KUO, 2008). Porém, ainda não se tem o conhecimento se o aparecimento de OPN circulante é devido ao recrutamento através do processo inflamatório presente no microambiente tumoral ou se é propriamente recrutada pelas células tumorais (SHEVDE; SAMANT, 2014).

A OPN atua também como promotor ou supressor da inflamação e carcinogênese inflamatória, essa ação está associada com apoptose, e estudos mostram que essa proteína altera essa associação dependendo do tipo de doença e da fase da atividade da doença (IIDA *et al.*, 2018).

Diversos autores correlacionam também esta proteína ao mau prognóstico de alguns tipos de câncer, sendo então considerada um biomarcador para câncer de mama (XU *et al.*, 2016), gástrico, nofigado (CAO *et al.*, 2012), pulmão (CHEN *et al.*, 2013; SHI *et al.*, 2017), tireóide (FERREIRA *et al.*, 2016), carcinoma hepatocelular (SHANG *et al.*, 2011) entre outros.

1.2.3 Osteonectina

A osteonectina, também conhecida como SPARC (*secreted protein, acidic and rich in cysteine*) é uma proteína não colagênica abundante no osso, localiza-se nas células osteoprogenitoras, osteoblastos e osteócitos recentemente formados e está relacionada com a mineralização óssea. Seu papel na mineralização óssea está relacionado com a habilidade de diminuir a produção de cristais e controlar o crescimento de cristais de hidroxiapatita (AARDEN *et al.*, 1994; ROACH, 1994);

Esta proteína pode influenciar a formação, manutenção e remodelação óssea através da regulação da expressão do colágeno I na matriz óssea e em tecidos não mineralizados, além de atuar na mineralização, diferenciação e atividade dos osteoblastos e osteoclastos.

Como estes fatores estão interligados entre si, perturbações podem originar efeito cascata levando a consequências para outros mediadores da biologia óssea (ROSSET; BRADSHAW, 2016).

Vários estudos associam esta proteína a metástases tumorais, porém com resultados divergentes entre si. Alguns descrevem que a osteonectina atua como agente tumorigênico e metastático, quando expresso pelas células do estroma, através do aumento da atividade da metaloproteinase, produção de VEGF (Fator de Crescimento do Endotélio Vascular) ou quimioatração (DE *et al.*, 2003; MCKNIGHT *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2007; DEROSA *et al.*, 2012). Podgorski *et al* (2009) afirmaram que a Catepsina K regula a atividade biológica de osteonectina na metástase óssea do câncer de próstata.

Por outro lado, outros autores a descrevem como inibidora de tumor e metástases, quando produzida por células malignas, suprimindo o desenvolvimento da lesão óssea induzida pelo câncer no osso através da regulação da maturação e função dos osteoclastos ou através da redução da agregação plaquetária (MCCABE *et al.*, 2011).

Outro estudo mais antigo evidencia a osteonectina atuando em tecidos não mineralizados, como facilitadora de doenças fibróticas, como as da pele, coração, fígado e rim (EYRE *et al.*, 1984).

1.2.4 Sialoproteína óssea

A Sialoproteína Óssea (BSP-*Bone Sialoprotein*) também conhecida como SIBLING (*small integrin binding ligand N-linked glycoprotein*), é uma fosfoproteína não- colágena expressada em tecidos mineralizados (BIANCO *et al.*, 1991; GANSS *et al.*, 1999). É sintetizada e secretada por células formadoras de osso, dentina, cimento e condrócitos hipertróficos (INANÇ *et al.*, 2007; FISHER *et al.*, 2001).

Estudos demonstram que a estimulação mecânica de osteoblastos aumenta a expressão de BSP, e ao mesmo tempo, esta proteína promove reabsorção óssea via osteoclastos, aumentando a adesão deste tipo celular na matriz óssea (CARVALHO *et al.*, 2002; ANDRADE *et al.*, 2007).

Raynal *et al.* (1996) mostraram que a BSP participa de três etapas da reabsorção óssea, sendo elas: formação, fixação e ativação de osteoclastos e também que esta proteína estimula a reabsorção óssea de forma dose dependente em estudos *in vitro*.

Estudos *in vivo* corroboram estes resultados ao mostrar que a ausência de BSP afeta tanto a formação quanto a atividade dos osteoclastos (BOUDIFFA *et al.*, 2010).

Esta proteína interage com as células e com o mineral ósseo via integrinas, deste modo, encontra-se em uma posição que facilita sua atividade no desenvolvimento, remodelação e reparo ósseo (FISCHER; FEDARKO, 2003). Além disso, Hunter *et al.* (1994), através de estudos *in vitro*, sugerem que a mesma possa iniciar a formação de cristais de hidroxiapatita na matriz óssea.

A ausência de BSP gera um aumento na expressão de osteopontina. A regulação cruzada entre estas proteínas afeta o microambiente ósseo, gerando uma dificuldade na reabsorção de matrizes mineralizadas e ao mesmo tempo essa ausência provoca um aumento na expressão de cathepsina-k, MMP2 (Metaloproteinase de Matriz-2) e MMP9 (Metaloproteinase de Matriz-9), por sua vez, estes componentes provavelmente afetam a liberação de fatores ativos da matriz celular (BOUDIFFA *et al.*, 2010).

Vários autores buscam descobrir todas as funções que a BSP exerce no nosso organismo, que não se restringe somente à remodelação óssea. Por exemplo, Marinovich *et al.* (2016), mostraram que a BSP atua no crescimento da fibrocartilagem calcificada, além do enfraquecimento das propriedades mecânicas do tendão, podendo ser empregada terapeuticamente como conector de tendões e ligamentos ao osso.

1.2.5 Osteoprotegerina

A osteoprotegerina (OPG), também chamada de membro da superfamília do receptor de fator de necrose tumoral (TNF) 11B, é produzida por osteoblastos, fibroblastos e muitos outros tipos de células. A OPG protege o esqueleto da reabsorção óssea excessiva, ligando-se ao receptor ativador do fator nuclear kappa-B ligante (RANKL) e evitando ligação ao receptor ativador do fator nuclear kappa-B (RANK) (BELIBASAKIS *et al.*, 2012; SIMONET *et al.*, 1997).

Desse modo, a OPG inibe efetivamente a ativação e a maturação dos osteoclastos, sendo assim, os fatores que inibem ou estimulam a reabsorção óssea via osteoclastos agem via RANKL, RANK e/ou osteoprotegerina (ANDRADE *et al.*, 2007; ROSS, 2000).

Com isso, pode-se afirmar que a associação entre RANKL/OPG influencia a massa óssea. Estudos indicaram que a OPG também protege as artérias da calcificação medial, mostrando que essa molécula possui funções fora do tecido ósseo (BOYCE; XING, 2007).

Zhang *et al.* (2016) analisaram a OPG quanto ao seu papel na regulação da diferenciação das células-tronco mesenquimais da medula óssea e da adipogênese da medula óssea, mostrando que esta proteína está diretamente envolvida nesses processos.

Outros autores sugerem que, o fato de crianças obesas terem dificuldade em acumular massa óssea adequadamente é influenciado pela OPG (DIMITRI *et al.*, 2011).

Alguns pesquisadores avaliaram a relação entre os níveis séricos de OPG e a síndrome metabólica, e nestes casos esta proteína apresentou-se em quantidades mais elevadas em relação à indivíduos saudáveis (MUSIALIK *et al.*, 2017).

Outros estudos mostram também que a OPG desempenha um papel importante no desenvolvimento da arteriosclerose e é considerada marcadora desta patologia, porém seu mecanismo de ação ainda não está totalmente elucidado (HEN *et al.*, 2011).

1.2.6 Fibronectina glicoproteica

A fibronectina é um mediador de diferenciação e sobrevivência de osteoblastos (GLOBUS *et al.*, 1998). Se acumula extracelularmente em locais de osteogênese (YOUNG, 2003).

Esta glicoproteína atua em diversos processos como adesão celular, migração, diferenciação, proliferação, desenvolvimento embrionário, coagulação e cicatrização de feridas (STEFFENSEN *et al.*, 2011).

Seu papel na remodelação óssea está ligado a outros componentes do tecido ósseo como colágeno, glicosaminoglicanas e várias glicoproteínas, que juntos atuam mediando a liberação de fatores de crescimento endógenos e a expressão de genes (MARKS *et al.*, 1988; REDDI *et al.*, 1989; TAIPALE *et al.*, 1997).

Al-Qattan *et al.* (2014) estudaram a ação da fibronectina em cirurgia na calota craniana e relataram que esta proteína atua mediando a ligação célula a célula durante o reparo do defeito ósseo, tornando-se um importante

elemento na tecnologia de células-tronco relacionadas à cirurgia craniofacial.

Porém, assim como as outras proteínas presentes no osso, a fibronectina também exerce outras funções no organismo. Alguns pesquisadores afirmaram que a fibronectina plasmática está inversamente relacionada ao aparecimento de trombose, afirmando que sua diminuição gera um atraso no aparecimento de trombos, e sugerindo que a mesma mantém o equilíbrio entre hemostasia e trombose (WANG; NI, 2016; MATUSKOVA, 2006).

1.2.7 Catepsina K

A Catepsina K (CatK) é uma protease lisossomal expressa por macrófagos ativos e predominantemente por osteoclastos no tecido ósseo. Ela se torna ativa em pH ácido e apresenta acentuada atividade de collagenase, degradando principalmente o colágeno tipo I dando origem a peptídeos como resultado da clivagem do colágeno. Com isso pode-se afirmar que é um fator importante no processo de remodelação e reabsorção óssea (PENNYPACKER *et al.*, 2009; CHAPPARD *et al.*, 2010; BARASCUK *et al.*, 2010; LECAILLE *et al.*, 2008).

Mutações no gene que codifica a catepsina K são a base de uma patologia conhecida como picnodisostose, esta doença é uma displasia esquelética que apresenta como consequência baixa estatura, osteoesclerose, fraturas frequentes e deformidades cranianas (MOTYCKOVA *et al.*, 2002).

Estudos mostram que esta proteína também é expressada em patologias como tuberculose (KUBLER *et al.*, 2015), pneumonite (REGHELLIN *et al.*, 2010), neoplasias como melanoma (QUINTANILLA-DIECK *et al.*, 2008), tumor de células gigantes (LINDEMAN *et al.*, 2004), entre outras.

Estudos indicam também que a CatK está relacionada a casos de osteoporose, que é um desequilíbrio entre a reabsorção e a formação óssea, processo mediado por osteoclastos e osteoblastos. Visto que a CatK reduz a reabsorção óssea, substâncias inibidoras dessa proteína têm sido pesquisadas com grande frequência pelas indústrias farmacêuticas em busca de um tratamento para esta patologia (DRAKE *et al.*, 2017; LU *et al.*, 2018).

1.3 Principais células do sistema ósseo

Osteoblastos são células do tecido ósseo derivadas de células-tronco mesenquimais (MSC) e estão dispostas ao longo da superfície óssea (CAPULLI *et al.*, 2014). Estas células se caracterizam por possuírem retículo endoplasmático rugoso abundante, complexo de Golgi e vesículas secretoras (DAMOULIS; HAUSCHKA, 1997).

Estas células possuem prolongamentos citoplasmáticos, que se comunicam com os prolongamentos dos osteócitos (sinalização direta por junções comunicantes), possibilitando uma relação entre superfície óssea e matriz calcificada, sendo que essa comunicação também pode ocorrer de forma indireta através da via paracrina extracelular (DOTY, 1981; POWELL *et al.*, 2011).

Os osteoblastos são as células responsáveis pela formação do tecido ósseo, são elas que sintetizam os componentes de matriz orgânica e controlam a mineralização dessa matriz. Após esse período de formação óssea, os osteoblastos achatam-se em transformam-se em células de revestimento ósseo ou se diferenciam em osteócitos (JUDAS *et al.*, 2012).

Os osteócitos são as células mais abundantes no tecido ósseo, além disso, participam da regulação da homeostasia do cálcio sanguíneo, percebem a carga mecânica, transmitem essa informação às outras células dentro do osso e mantêm o equilíbrio entre osteoblastos e osteoclastos no metabolismo ósseo (KATAYAMA, 2016).

Sendo assim, estas células controlam a remodelação, reabsorção e formação óssea, além de exercerem influências regulatórias em outros locais do corpo humano, como por exemplo nas vias endócrinas, regulando o metabolismo do fosfato (SCHAFFLER *et al.*, 2014).

Outras células encontradas no tecido ósseo são os osteoclastos, células multinucleadas que se originam de monócitos hematopoieticos, macrófagos e células de revestimento do osso (ANDRADE *et al.*, 2007).

Estas células são especializadas na reabsorção da matriz óssea. Durante o processo de remodelação óssea (Figura 2.1), os osteoclastos secretam citocinas e outros fatores, com importante papel regulatório nesse processo. Além disso, os osteoclastos atuam na diferenciação de precursores de osteoblastos, no deslocamento de células da medula óssea para o sangue, em respostas imunes, processos inflamatórios e neoplásicos que afetam o osso (BOYCE *et al.*, 2009).

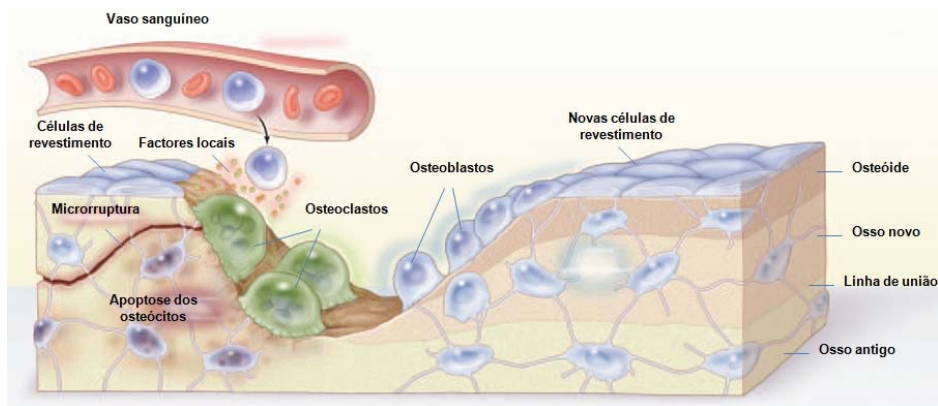
Figura 2.1: Processo de remodelação óssea.

Imagem adaptada de: Cruz, 2011.

2 PROCESSO DE REGENERAÇÃO DO OSSO E POSSÍVEIS TRATAMENTOS PARA DEFEITOS ÓSSEOS

O tecido ósseo como mencionado anteriormente, está em constante remodelação, esse processo de remodelação óssea ocorre através de eventos coordenados com a participação de diversos elementos como, proteínas colágenas e não-colágenas, hormônios como o hormônio da paratiroide, vitamina D3, citocinas como fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs), fatores de crescimento derivado de plaquetas (PDGFs), fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs), fatores de crescimento vasculares endoteliais (VEGFs), fatores de transformação do crescimento (TGFs) e proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), que regulam o metabolismo ósseo, a função e a regeneração (MARKS; ODGREN, 2002; BILEZIKIAN *et al.*, 2002).

Estudos demonstram que as BMPs são importantes reguladores envolvidos na formação de ossos novos e no reparo de fraturas. Essas proteínas promovem a cicatrização de fraturas estimulando a diferenciação de células precursoras não comprometidas em osteoblastos (SERRANO *et al.*, 2013).

E através do estímulo dos fatores de crescimento transformador β e das proteínas morfogenéticas ósseas -2 (BMP-2) ocorre o processo de diferenciação das células mesenquimais em células osteogênicas (ANDRADE *et al.*, 2007).

Resumidamente este processo de remodelação se dá pela ação de osteoclastos, osteócitos e osteoblastos mediados pelos fatores descritos acima, onde osteócitos mantêm o equilíbrio entre osteoblastos e osteoclastos e, à medida que os osteoclastos absorvem o osso, osteoblastos são recrutados para formar ossos novos e esse evento permite que o osso mantenha sua estrutura perfeita por toda uma vida (DELAISSE, 2014).

Devido à capacidade de remodelação e regeneração, a maior parte dos defeitos ósseos podem ser curados espontaneamente sob ambiente fisiológico apropriado, com exceção dos defeitos críticos, onde devido a magnitude do ferimento o osso fica incapacitado de se regenerar (LI *et al.*, 2015).

A regeneração óssea ocorre em três estágios, o primeiro onde ocorre o processo de osteogênese (formação e desenvolvimento do osso), o segundo ocorre a osteoindução, ou seja, indução da diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos ou condroblastos e por fim, a osteocondução que é o processo de crescimento ósseo por meio da aposição do osso circunjacente (GARTNER; HIATT, 2003).

Por outro lado, a consolidação óssea é um processo com maior complexidade e pode ser dividido em três estágios principais:

- Fase inflamatória que inicia imediatamente após a fratura e ocorre aproximadamente nas primeiras duas a três semanas;

- Formação do calo ósseo, onde os leitos circulatórios tanto medulares quanto periosteais proliferam muito, o sistema arterial medular representa um papel fundamental no suprimento sanguíneo para essa etapa do reparo ósseo;

- Remodelação óssea, onde o calo ósseo é reabsorvido e remodelado, neste processo, atuam os osteoclastos e osteoblastos, removendo e depositando osso respectivamente (ISOLA; MORAES, 2012).

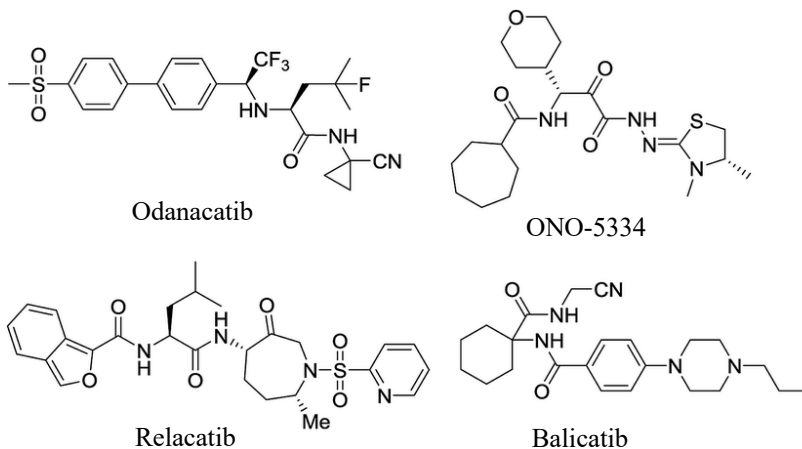
Com base no conhecimento da fisiologia óssea, podemos destacar a osteoporose como umas das principais doenças que acometem este tecido, ela é caracterizada pela perda progressiva de massa e densidade óssea devido ao desequilíbrio entre a reabsorção óssea realizada pelos osteoclastos e a formação de osso novo realizada pelos osteoblastos (TROEN, 2006).

Conhecendo o mecanismo de ação dos osteoclastos no tecido ósseo, pode-se sugerir que medicamentos que atuem na inibição da atividade ou formação dos osteoclastos, podem ser de grande utilidade na terapia de doenças que causam perda óssea (KHAJURIA *et al.*, 2011).

Neste contexto, pode-se mencionar novamente a catepsina K (CatK), uma cisteína protease altamente expressa pelos osteoclastos. Estudos pré-clínicos genéticos e farmacológicos demonstram que a inibição da CatK diminui a reabsorção óssea e aumenta a expressão de células da linhagem osteoblástica, podendo promover a neoformação óssea, melhorando sua microarquitetura e resistência (DUONG *et al.*, 2015).

Alguns fármacos inibidores de CatK (Figura 2.3) já vêm sendo estudados como o relacatib, balicatib, odanacatib e ONO-5334 os quais entraram em estudo clínico de distúrbios ósseos metabólicos que causam aumento da reabsorção óssea, como a osteoporose, porém causaram importantes efeitos colaterais (DUONG *et al.*, 2015; XUE *et al.*, 2019).

Figura 2.3: Estrutura química de fármacos inibidores de catepsina K.



Adaptado de: XUE *et al.*, 2019.

Os dados de fase III da Merck sugerem que o odanacatib é eficaz no aumento da densidade óssea e reduz o risco de fraturas (CHAPURLAT, 2015), porém aumenta também o risco de acidente vascular cerebral, cuja causa deste efeito é ainda desconhecida, como informado pela empresa.

A Novartis abandonou o balicatib em 2006 devido aos eventos adversos dermatológicos e a GlaxoSmithKline abandonou o relacatib em 2007, possivelmente devido à toxicidade. A Sanofi abandonou seu inibidor de catepsina S/K, o SAR114137, em 2012 por razões desconhecidas, porém pesquisadores estão estudando esta substância como um candidato ao tratamento da doença de Chagas sob o programa *New Therapeutic Uses* do *National Institutes of Health* (NIH) (MULLARD, 2016).

Atualmente, há apenas um inibidor da catepsina K em estudos clínicos, o Medivir MIV-711, que avançou para testes de fase II para osteoartrite em janeiro de 2016 (MULLARD, 2016). Última atualização deste estudo ocorreu em março de 2019 e avaliou a segurança, tolerabilidade e eficácia de seis meses adicionais de tratamento com MIV-711 em pacientes tratados no estudo inicial durante seis meses que mostraram evidência de resposta, e segurança, tolerabilidade e eficácia no tratamento (MEDIVIR, 2019).

Por outro lado, há também estudos sendo desenvolvidos pensando na solução de problemas com fraturas em geral, e não apenas a osteoporose, incluindo estudos com biomateriais para a substituição do tecido ósseo, que

podem ser divididos em dois grandes grupos: os que substituem funções puramente mecânicas e os destinados ao preenchimento de cavidades ósseas com o intuito de reconstrução e estimulação da neoformação de tecido mineralizado (PAGAN, 2003). Neste contexto, os biopolímeros representam uma possível aplicação.

3 POLÍMEROS BIODERGRADÁVEIS

Polímeros biodegradáveis, ou seja, que podem se degradar em componentes biologicamente compatíveis sob condições fisiológicas, podem ser feitos com vários tipos de materiais, e estes materiais podem ser naturais ou sintéticos, entre eles: proteínas (FRIESS, 1998), polissacarídeos (MANO *et al.*, 2007), poliésteres, que podem ser obtidos de plantas e bactérias (SURIYAMONGKOL *et al.*, 2007) ou sinteticamente (LABET e THIELEMAN, 2009), além de policarbonatos (ROKICKI, 2000) e polianidridos (KUMARA *et al.*, 2002).

Amplamente estudados, apresentam muitas vantagens com relação aos implantes elaborados com materiais não degradáveis, sendo uma delas, o potencial risco de rejeição do material pelo hospedeiro. Dentre os materiais comumente utilizados como implantes e veículos em sistemas de liberação de fármacos, os polímeros apresentam grande potencial de uso, sendo fáceis de produzir, manusear e apresentam características mecânicas semelhantes as dos materiais biológicos (JELONEK e KASPERCZYK, 2013; BARBANTI *et al.*, 2006; BARBANTI *et al.*, 2005).

São alternativas seguras e vantajosas para a aplicação em regeneração óssea (JAHAN e TRABIZIAN, 2016), *stents* (SPADACCIO *et al.*, 2009), fios de sutura (ALTMAN *et al.*, 2003), sistemas de liberação de fármacos (HAN *et al.*, 2016) e arcabouços na engenharia tecidual (WU e DING, 2004).

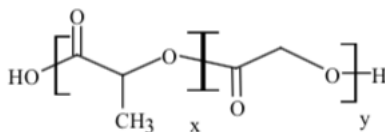
Na terapia de regeneração tecidual estes polímeros são utilizados em forma de *scaffold*, que se adapta a diferentes tipos de células possibilitando uma completa regeneração tecidual ou óssea. Para a sua aplicação é importante que se tenha pleno conhecimento sobre a cinética de degradação do polímero selecionado, pois a taxa de degradação do mesmo deve ser igual ou menor que a taxa de crescimento do novo tecido ou osso (HOLY *et al.*, 1999).

Com relação aos biopolímeros utilizados na terapia tecidual, os mecanismos de degradação mais comuns são: hidrólise, onde a degradação se dá através da reação que ocorre entre as cadeias poliméricas vulneráveis em contato com as moléculas de água, resultando em cadeias de menor tamanho, sendo esta uma reação de segunda ordem, dependendo da concentração de ligações atacáveis e da água (IOZZINO *et al.*, 2017) e oxidação, a qual ocorre através de agentes oxidantes (peróxidos) produzidos por células originárias de um processo inflamatório gerado ao redor do implante, devido à ação de defesa do sistema imune, levando a uma quebra de cadeias e diminuição do peso molecular do

polímero (RASSELET *et al.*, 2014; CASAS *et al.*, 1999; LYU e UNTEREKER, 2009).

Dentre os materiais existentes, destaca-se o poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) (Figura 2.4) é um copolímero biodegradável e bioreabsorvível amplamente utilizado no encapsulamento de fármacos, incluindo moléculas pequenas hidrofílicas e hidrofóbicas, DNA e proteínas (ZHENG, 2009; MALAVIA *et al.*, 2015), aprovado pelas agências reguladoras internacionais, Agência de Medicamentos e Alimentos dos Estados Unidos (FDA) e a Agência Europeia de Medicamentos (EMA) devido à sua biocompatibilidade e biodegradabilidade (BARROW, 2004; KAPOOR *et al.*, 2015).

Figura 2.4: Estrutura química geral do polímero poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) - PLGA.



Existem diversos tipos de PLGA disponíveis no mercado. Entre eles os que possuem grupos funcionais na cadeia polimérica como éster, chamados de *endcapped* ou ácido carboxílico, chamados de *non-endcapped*, e os polímeros sem a presença de grupos funcionais na terminação da cadeia (MAKADIA *et al.*, 2011).

Outro fator que difere um polímero do outro são as diferentes proporções de ácido láctico e ácido glicólico na sua estrutura, produzindo co-polímeros com diferentes pesos moleculares. Além disso, a hidrofiliicidade e a lipofiliicidade são determinadas pela proporção destes elementos, o PLA (ácido polilático) possui maior hidrofobicidade devido à presença do grupo metila na sua estrutura e o PGA (ácido poliglicólido) é bastante susceptível a hidrólise, essa característica confere ao PLGA tempos de degradação e valores de T_g (Temperatura vítrea) diferentes (FIALHO *et al.*, 2003; MAKADIA *et al.*, 2011).

Assim como existem diversos tipos de PLGA, também existem vários métodos de encapsular o fármaco nesse polímero, entre eles, os mais conhecidos para produzir micropartículas são, *spray drying*, fluido supercrítico, pulverização em banho térmico, leito fluidizado, extrusão, co-cristalização, liofilização, inclusão molecular, polimerização interfacial, coacervação, emulsão simples e dupla por evaporação de solvente, *eletrospray coaxial*, *templates* de hidrogel e

fabricação microfluídica (HAN *et al.*, 2016; MAKADIA *et al.*, 2011; SUAVE *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2000).

Este polímero pode ser utilizado em formulações destinadas à liberação do fármaco por via oral (CHAVES *et al.*, 2018), parenteral (WISCHKE *et al.*, 2010), pulmonar (GIOVAGNOLI *et al.*, 2007), músculos (KIM *et al.*, 2006), válvulas cardíacas (FILOVÁ *et al.*, 2009), cicatrização de feridas (CHEREDDY *et al.*, 2015), na forma de *scaffolds* nas terapias teciduais (MIRONOV *et al.*, 2017), em regeneração óssea (PARK *et al.*, 2017) e para desenvolver cartilagem (CAMINAL *et al.*, 2016).

A liberação do fármaco é obtida via degradação e erosão da matriz polimérica (ANDERSON E SHIVE, 1997, 2012; FREDENBERG *et al.*, 2011; YUN-SEOK *et al.*, 2010).

Estudos anteriores realizados por Göpferich (1996) demonstraram que a degradação do PLGA se dá predominantemente através de hidrólise química das ligações ésteres, tendo como produtos de degradação ácido láctico e ácido glicólico, que são substâncias atóxicas e podem ser removidas do organismo por vias metabólicas normais. Posteriormente Holy *et al.* (1999) demonstraram que a taxa de degradação do mesmo é influenciada por vários fatores como peso molecular, cristalinidade, polidispersividade, morfologia, pH e temperatura.

Com base em todos esses dados, pode-se afirmar que o polímero PLGA é uma escolha apropriada para o desenvolvimento de sistemas de liberação de moléculas com ação osteogênica e produção de *scaffolds* como alternativa na terapia de regeneração óssea.

4 MICROENCAPSULAÇÃO

A microencapsulação de compostos é uma técnica que fornece muitas vantagens no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos, permite que o composto encapsulado esteja protegido de possíveis processos de degradação, como fotólise, por exemplo, e aumenta a biodisponibilidade do fármaco tornando as moléculas mais solúveis em meio aquoso (SINGH *et al.*, 2010; ZVONAR *et al.*, 2010).

Além disso, é uma alternativa eficaz no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos, tanto localmente como na forma sistêmica, e possibilita a adaptação do tempo em que se deseja realizar a liberação do fármaco através do tipo de polímero escolhido e seu peso molecular (SINGH *et al.*, 2010).

Sendo assim, micropartículas poliméricas (MPs) representam uma ferramenta adequada para variadas aplicações terapêuticas, devido à possibilidade de controlar suas propriedades como tamanho de partícula, forma, estrutura interna, porosidade, carga de fármaco, eficiência de encapsulação, e para obter o desejado perfil de liberação (TRAN *et al.*, 2011). Por este princípio, várias vias de administração podem ser exploradas, como a via oral (PASSERINI *et al.* 2016), intramuscular (CAMBRONERO-ROJAS *et al.*, 2015), intraperitoneal (LU *et al.*, 2008), intra-articular (MWANGI *et al.*, 2015), pulmonar (GIOVAGNOLI *et al.*, 2014) e intranasal (TAKENAGA *et al.*, 1998).

Este processo é caracterizado pela formação de partículas que possuem um tamanho variado entre 1 a 1000 μm e podem ser denominadas de micropartículas (MPs), microesferas, microcápsulas ou micromatrizes. Existem vários métodos de se obter essas MPs, como a técnica de evaporação de solvente por emulsão única ou dupla emulsão, *spray drying*, *spray cooling*, desolvatação por *spray*, fluido supercrítico, extrusão, coacervação, liofilização, emulsificação, entre outras (YEO; PARK, 2005; SILVA *et al.*, 2014).

Um exemplo de como esta técnica pode ser aplicada no auxílio de diferentes terapias foi demonstrado por Azevedo *et al.* (2018), que utilizaram o poli (ácido D,L-lático) (PDLLA) para encapsular acetilacetato de hólmio utilizando uma técnica de evaporação de solvente por emulsão única, com o objetivo de desenvolver um método eficaz para fins de braquiterapia e obtenção de imagem do sistema pulmonar.

Outro estudo investigou a microencapsulação de uma proteína, utilizando como polímero o PLGA 75:25, incorporando-a via emulsão por *eletrospray* ou *eletrospray* coaxial, no intuito de obter um modelo de liberação

controlada. Os autores concluíram que ambos os métodos de fabricação das MPs promoveram a liberação controlada da proteína, sendo o método de emulsão mais eficaz (WANG *et al.*, 2013).

Aziz *et al.* (2014) propuseram um método de desenvolvimento de microcápsulas multinucleares de goma arábica contendo óleo de krill encapsulado, pelo método de coacervação complexa, obtendo com sucesso microcápsulas multinucleadas, de forma circular e com estabilidade suficiente para manter sua estrutura.

Ma (2014) utilizou polímeros biodegradáveis como PLGA e microesferas de quitosana para encapsular proteínas e peptídeos como estratégia para desenvolver um sistema de liberação de fármacos. Outros estudos utilizaram polímeros do tipo PLGA para encapsular cetoprofeno, sabendo-se que este fármaco atua como agente plastificante em matrizes poliméricas, utilizou-se como método preventivo a inclusão prévia do fármaco em β -ciclodextrinas e posteriormente foi realizado a microencapsulação deste composto no polímero, para neutralizar este efeito plastificante (ALBERTINI *et al.*, 2015).

A microencapsulação também pode ser uma estratégia promissora no encapsulamento de fármacos de baixa massa molecular, hidrofílicos e anfifílicos (RAMAZANI *et al.*, 2016), células procarióticas como *Lactobacillus acidophilus* (DELLA PORTA *et al.*, 2012) e fármacos hidrofóbicos (KLEEMANN *et al.*, 2017) comprovando sua versatilidade de aplicação.

Devido à sua vasta aplicabilidade, a microencapsulação torna-se uma alternativa promissora e eficaz no desenvolvimento de novos fármacos, promovendo uma liberação controlada do fármaco ajustável de acordo com a molécula e a via de administração desejada, facilitando também a adesão do paciente ao tratamento com a possibilidade de diminuição de doses diárias, fornecendo estabilidade ao fármaco e auxiliando na diminuição de efeitos tóxicos do mesmo.

5 SCAFFOLDS

A necessidade global pela busca de biomateriais, especialmente na aplicação óssea aumenta a cada ano. Biomateriais são considerados materiais naturais ou sintéticos utilizados para substituir parte de um sistema ou funcionar em contato íntimo com o tecido vivo. Eles podem servir como um *scaffold* projetado para substituir, reparar e manter estruturas de órgãos (PATEL; FISHER, 2008).

Esta tecnologia inovadora tem atraído atenção crescente como uma estratégia alternativa para tratar órgãos e tecidos danificados que não podem se autorregenerar, como queimadura de espessura total da pele, defeitos ósseos críticos e doença crônica da cartilagem. A engenharia de tecidos tem como objetivo eliminar as desvantagens dos tratamentos clínicos convencionais (THAVORNYUTIKARN *et al.*, 2014).

O método mais utilizado como enxerto ósseo é o autógeno, o qual fornece os três elementos-chave para gerar e manter o tecido ósseo: as células progenitoras (osteogênicas), fatores de crescimento e matrizes osteocondutoras e osteoindutoras, mas este método ainda está sujeito a restrições devido a quantidade limitada e um procedimento cirúrgico adicional. O enxerto alogênico promove todos os fatores de regeneração óssea, porém, envolve alto custo, tempo de espera de doador, bem como o possível risco de doença transmitida viral e bacteriana (DAULAY *et al.*, 2015; SCHIEKER *et al.*, 2006).

Outro método aplicado é o uso de biomateriais como enxertos ósseos, sendo uma alternativa promissora, pois não danificam tecidos saudáveis, não aumentam os riscos de contaminações virais e bacterianas, além de serem disponibilizados comercialmente (WILLIAMS, 1987). Com isso, pesquisas no campo de biomateriais vêm sendo realizadas continuamente por décadas, para desenvolver os materiais sintéticos substitutos de osso mais apropriados. Os *scaffolds* devem imitar a morfologia do osso, estrutura e função, a fim de otimizar a integração do tecido circundante, ou seja, que tenham propriedades semelhantes a tecido ósseo (DAULAY *et al.*, 2015; KARAGEORGIU; KAPLAN, 2005).

Biomateriais empregados em *scaffolds* possuem arcabouço tridimensional poroso, propriedades bioativas e biodegradáveis, que servem de molde para a formação do novo tecido e normalmente possuem propriedades osteocondutivas, e raramente propriedades osteoindutivas ou osteogênicas, além de possuírem a grande vantagem de servir de suporte mecânico (BLOM, 2007;

LIU; MA, 2008). Podem ser polímeros biodegradáveis naturais como o colágeno, a fibrina, a quitosana e o amido, que apresentam boa biocompatibilidade e algumas propriedades osteocondutoras. No entanto, o uso desses materiais é limitado devido à sua baixa estabilidade mecânica. Podem ser de origem natural como as cerâmicas (fosfato de cálcio), especialmente hidroxiapatita (HA) e fosfato tricálcico (TCP) os quais assemelham-se à fase mineral do osso e são caracterizados como biocompatíveis, bioativos e osteocondutores. Também há os materiais sintéticos bioabsorvíveis, como o PLGA (poli ácido lático-*co*-ácido glicólico); caprolactama (CPL) e cerâmicas porosas, ou híbridos (AHSAN; NEREM, 2005; HUTMACHER *et al.*, 2007; SCHIEKER *et al.*, 2006).

A porosidade e o tamanho de poro dos *scaffolds* desempenham um papel crítico na formação do osso *in vitro* e *in vivo* (Tabela 2.1). *In vitro*, a menor porosidade estimula a osteogênese por suprimir a proliferação de células e forçar a agregação de células. Em contraste, *in vivo*, maior porosidade e tamanho de poros resultam em maior crescimento ósseo, por permitirem uma maior vascularização no local da regeneração óssea. Este fator contribui para que as propriedades mecânicas do arcabouço sejam diminuídas, necessitando assim o estabelecimento de um limite superior para o tamanho dos poros e porosidade, para que se possa obter um equilíbrio de acordo com a reparação, a taxa de remodelação e a taxa de degradação do material de *scaffold* (KARAGEORGIOU; KAPLAN, 2005).

Tabela 2.1: Exemplos de *scaffolds* e taxa de porosidade e tamanho de poro.

Composição cerâmica	Scaffold polímero	Porcentagem de cerâmica (%)	Porosidade (%)	Tamanho de Poro (µm)
CaP amorfo	PLGA	28-75	75	>100
HA	PLLA	50	85-96	100 x 300
	PLGA	60-75	81-91	800-1,800
	PLGA		30-40	110-150
Biolglass®	PLGA	75	43	89
	PLLA	20-50	77-80	~100
				~10
	PLGA	0,1-1		50-300
	PDLLA	5-29	94	~100

Fonte: Adaptado de (CHEN *et al.*, 2008; REZWAN *et al.*, 2006)

Independentemente do tipo de tecido, um conjunto de aspectos fundamentais são importantes na fabricação de um *scaffold*, como: biocompatibilidade, biodegradabilidade, propriedades mecânicas, arquitetura e tecnologia de produção (PATEL; FISHER, 2008; O'BRIEN, 2011; SHOICHET, 2010).

Biocompatibilidade: as células devem aderir; a função do tecido deve se manter normal; as células devem migrar para a superfície através do *scaffold* e o início da proliferação ocorrer antes de estabelecer uma nova matriz (O'BRIEN, 2011).

Biodegradabilidade: o arcabouço projetado deve permitir que as células do próprio corpo o substituam, sendo assim, o mesmo precisa ser biodegradável, de modo a permitir que as células reproduzam sua própria matriz extracelular.

A taxa de degradação também influencia na degradação de subprodutos: velocidade de degradação rápida resulta em concentrações locais elevadas de potenciais moléculas inflamatórias, que podem interferir com o processo de reparo tecidual, obstruindo o crescimento do tecido (PATEL; FISHER, 2008; O'BRIEN, 2011; SHOICHET, 2010).

Propriedades mecânicas: deve ter propriedades mecânicas consistentes com a localização anatômica para o qual será implantado e, forte o suficiente para permitir a manipulação cirúrgica. A produção de *scaffolds* com propriedades mecânicas adequadas é um dos grandes desafios na tentativa de projetar osso ou cartilagem. Para estes tecidos, o *scaffold* implantado deve ter integridade mecânica suficiente para funcionar a partir do tempo de implantação para a realização do processo de remodelação óssea (O'BRIEN, 2011);

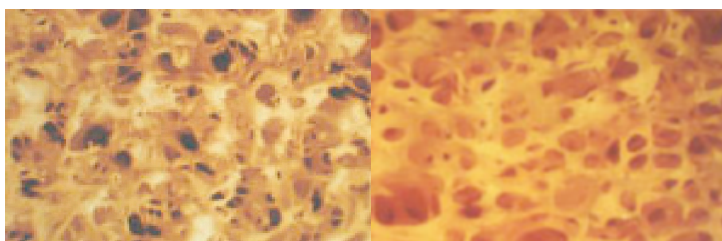
Arquitetura: deve ter uma estrutura de poros interligados e a porosidade elevada para promover proliferação e diferenciação celular e também para a troca de nutrientes e metabolitos. Além disso, uma estrutura porosa interligada é necessária para permitir a difusão dos produtos de resíduos para fora do *scaffold*, e os produtos de degradação devem ser capazes de sair do corpo, sem interferência com outros órgãos e tecidos circundantes. Outro componente é o tamanho médio do poro, pois as células interagem principalmente com os *scaffolds* através de grupos químicos sobre a superfície do material (PATEL; FISHER, 2008; O'BRIEN, 2011);

Tecnologia de produção: para que um *scaffold* se torne clinicamente e comercialmente viável, ele deve ser rentável e reproduzível em escalas maiores. Também deve ser obtido por meio de processos de fabricação que atendam às

boas práticas de fabricação (BPF). Deve-se determinar como será sua forma final de apresentação e a melhor forma de armazenamento (O'BRIEN, 2011).

Inúmeros métodos têm sido desenvolvidos e utilizados para fabricar *scaffolds* 3D para aplicações na engenharia tecidual (THAVORNYUTIKARN *et al.*, 2014), entre eles, lixiviação particulada (Figura 2.5) (XIANG *et al.*, 2006; THAVORNYUTIKARN *et al.*, 2014), lixiviação porogênia (MANO *et al.*, 2007), formação de espuma a gás (IKADA, 2006), auto montagem (ZHANG *et al.*, 2003, 2006), *eletrospinning* (LIANG *et al.*, 2007), separação de fases (SMITH *et al.*, 2006), prototipagem rápida (HUTMACHER *et al.*, 2000, 2001), malha de fibra (CHEN *et al.*, 2002), fibra de ligação (MOONEY *et al.*, 1996), modelagem por fundição (THOMPSON *et al.*, 1995a,b), membrana de laminação (MAQUET; JEROME, 1997) e liofilização (BOLAND *et al.*, 2004; MANDAL; KUNDU, 2008; THAVORNYUTIKARN *et al.*, 2014).

Figura 2.5: Micrografias de luz de cortes transversais de *scaffold* de PLGA 75:25 sintetizado por uma técnica de inversão de fase / lixiviação de partículas (esquerda) e o osso trabecular humano (direita). Uma estrutura de poros semelhantes, tamanho e distribuição pode ser observado em ambas imagens.



Fonte: Adaptado de Shoichet, 2010.

Projetar *scaffolds* com uma composição bioativa e um sistema de liberação de fármaco de longa duração é um método promissor de fornecer uma eficácia terapêutica na regeneração óssea. El-Figi e colaboradores (2015) propuseram o desenvolvimento de *scaffolds* eletrospun fibroso, incorporando mesoporos de nanopartículas de vidro bioativas de gelatina policaprolactona, como matriz para a regeneração óssea, e apresentaram em seu estudo resultados significativos na reparação óssea.

Outro estudo aplicado em população pediátrica apresentou a construção de um *scaffold* constituído por apatita carbonatada com placas de ácido polilático para a reparação de um defeito de crânio. Trinta e quatro pacientes pediátricos

foram tratados e examinados a cada três meses de pós-operatório utilizando-se tomografia computacional e os resultados demonstraram rápida osteogênese e redução no tamanho do defeito craniano (PATEL; FISHER, 2008).

Bonvallet e colaboradores (2015) analisaram o comportamento de *scaffolds* acelulares semeados com fibroblastos, os quais foram enxertados em defeitos de pele de tamanho crítico. Verificou-se que os suportes de fibroblastos semeados estimularam a cicatrização de feridas com maior eficácia do que os *scaffolds* acelulares e estimularam a formação de uma matriz dérmica e pele semelhante à nativa. Além disso, promoveram a regeneração dos apêndices da pele, como folículos pilosos.

Wang e colaboradores (2015) mostraram um conceito para a preparação de *scaffolds* 3D biomimético poli (ϵ -caprolactona) / hidroxiapatita / colágeno com excelente osteoindução e capacidade de proliferação e regeneração óssea.

Outros pesquisadores relataram a preparação de nanofibras de quitosana pelo método de *electrospinning* e tratadas com fluido corporal simulado para estimular a formação de hidroxiapatita na superfície, obtendo-se uma relação de cálcio e fósforo na hidroxiapatita formada, semelhantes ao osso natural, esses *scaffolds* apresentaram um bom desempenho na terapia de regeneração óssea (THIEN *et al.*, 2013).

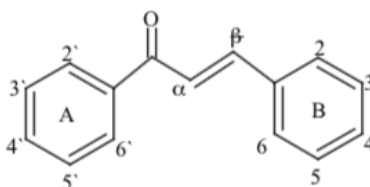
Portanto, devido à comprovação da eficácia dos *scaffolds* em tratamentos de fraturas do sistema ósseo, a incorporação de agentes com atividade osteogênica, como as chalconas, representa uma possível alternativa terapêutica em processos de defeito ósseo.

6 CHALCONAS

As chalconas são uma família de compostos caracterizados por uma porção cetona α , β -insaturada (Figura 2.6) (ZHUANG *et al.*, 2017). Estes compostos apresentam em seu esqueleto um sistema capaz de conferir pigmento amarelo às pétalas de algumas plantas e possuem dois estereoisômeros, sendo o isômero E, a forma termodinamicamente mais estável, devido a isto, é a mais comumente encontrada entre as chalconas. A configuração do isômero Z é instável devido aos fortes efeitos estéricos entre o grupo carbonila e o anel β (CAMPOS-BUZZI *et al.*, 2007; CORRÊA *et al.*, 2001; NI *et al.*, 2004; EVRANOS AKSÖZ; ERTAN, 2011).

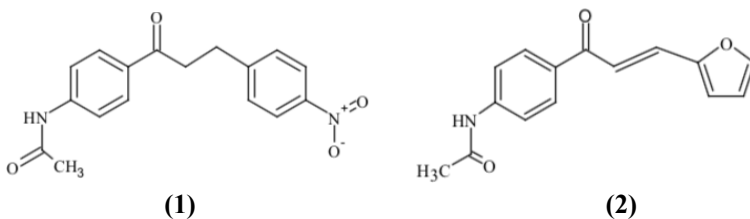
As primeiras chalconas foram sintetizadas em laboratório em meados de 1800, e a partir de 1910 foram isoladas de plantas medicinais (SHIMOKORIYAMA, 1962). Estes compostos são amplamente estudados devido ao seu amplo espectro de atividades biológicas interessantes e à grande facilidade de síntese. As chalconas têm sido associadas a agentes antimicrobianos (PANDHURNEKAR *et al.*, 2013; NIELSEN *et al.*, 2004; SATO *et al.*, 1996), antifúngicos (PANDHURNEKAR *et al.*, 2013; LAHTCHEV *et al.*, 2008; DE CARVALHO TAVARES *et al.*, 2011), antiviral (TRIVEDI *et al.*, 2007), antimalárico (KAUR *et al.*, 2010, TOMAR *et al.*, 2010); anti-leishmania (BOECK *et al.*, 2006, CHEN *et al.*, 2001), anti-inflamatório (VOGEL *et al.*, 2010; YADAV *et al.*, 2011; SHIH *et al.*, 2018), antiagregante plaquetário (REDDY *et al.*, 2011), antitumoral (RAO *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2010, SZLISZKA *et al.*, 2010; YADAV *et al.*, 2011; KACHADOURIAN *et al.*, 2012, MAHAPATRA *et al.*, 2015), anti-obesidade (BIRARI *et al.*, 2011), efeitos antioxidantes e osteogênicos (ORTOLAN *et al.*, 2014; 2017).

Figura 2.6: Representação esquemática da estrutura geral das chalconas.



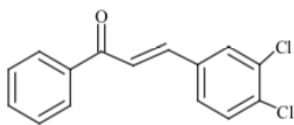
Outra propriedade referenciada às chalconas é que algumas apresentam atividades similares à insulina e melhoram a absorção da glicose nos adipócitos (ENOKI *et al.*, 2007).

Estudos realizados pelo NIQFAR mostraram que as acetamidochalconas **(1)** e **(2)**, avaliadas em testes antinociceptivos *in vivo* apresentaram efeitos duas vezes maiores que fármacos de referência como ácido acetilsalicílico e acetoaminofen (CAMPOS-BUZZI *et al.*, 2007).

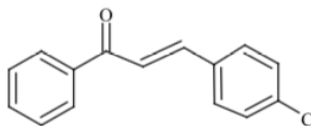


Os derivados 1,3-diaril-2-propen-1-ona têm sido amplamente estudados devido suas açõ (1) inociceptivas, como o compos (2) oxilina, o qual apresenta atividade dose-dependente, não competitiva e antagonista da acetilcolina, histamina e ocitocina em modelos *in vitro* (CECHINEL FILHO *et al.*, 1996).

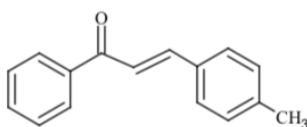
Ortolan *et al.* (2014; 2017) estudaram também as chalconas (2E)-1-fenil-3-(3,4-diclorofenil)-2-propen-1-ona **(3)**; (2E)-1-fenil-3-(4-clorofenil)-2-propen-1-ona **(4)**; (2E)-1-fenil-3-(4-metilfenil)-2-propen-1-ona **(5)**; (2E)-1-fenil-3-(4-metoxifenil)-2-propen-1-ona **(6)** e (2E)-1,3-difenil-2-propen-1-ona **(7)**, incorporadas em vaselina e obtiveram um resultado significativo quanto à atividade osteogênica para todas as chalconas testadas na concentração de 10%, sendo que a chalcona (2E)-1-fenil-3-(4-clorofenil)-2-propen-1-ona **(4)** apresentou um melhor resultado na formação do tecido ósseo, promovendo reparo completo no grupo de animais 45 dias após o tratamento.



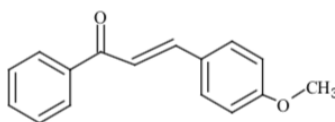
(3)



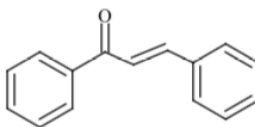
(4)



(5)



(6)



(7)

Em outro estudo mais recente realizado pelo NIQFAR foram demonstrados novos potenciais inibidores seletivos de COX-2, onde seis compostos foram analisados, os resultados obtidos mostraram que todos os compostos sintetizados foram mais potentes que o celecoxib na inibição da COX-2, possuindo também um maior índice de seletividade (MACARINI *et al.*, 2019).

Em conclusão, os compostos apresentados podem ser avaliados em modelos in vivo, baseados nos resultados in silico e in vitro, e podem servir como moléculas de sucesso para o desenvolvimento de novos inibidores de COX-2.

A licochalcona A demonstrou acelerar o ritmo de desenvolvimento do esqueleto de peixe-zebra e a formação de tecido ósseo é melhorada sobre o perióstio dos ossos da calota craniana de ratos (KIM *et al.*, 2012). Algumas chalconas foram investigadas para o tratamento da doença de Alzheimer e apresentaram potência nanomolar para a inibição da colinesterase e perfil neuroprotetivo (RAMPA *et al.*, 2017, 2018).

A trans-chalcona apresenta atividades anti-diabética e anti-inflamatória com aumento do efluxo de colesterol hepático e prevenindo a resistência à insulina e a inflamação do fígado (KARIMI-SALES, 2018).

Com isso, destaca-se a importância da obtenção de derivados obtidos a partir do núcleo chalcônico no intuito de encontrar moléculas estruturalmente relacionadas com a bioatividade (SANTOS, 2008).

6.1 CHALCONA (2E)-1-fenil-3-(4-metoxifenil)-2-propen-1-ona (4-MC)

A chalcona 4-MC é obtida facilmente por condensação de Claisen-Schmidt. Possui fórmula molecular de $C_{16}H_{14}O_2$, peso molecular ~ 238 g/mol e apresenta LogP 3,1 (PubChem, 2018). Este composto está relacionado à irritação ocular, na pele e no sistema respiratório (ECHA, 2018). Não há dados na literatura acerca de outras propriedades físico-químicas ou sobre a sua estabilidade. Quanto à atividade biológica, Rashi *et al.* (1986) demonstraram que a chalcona 4-MC não é mutagênica sendo que este composto tem se demonstrado de grande interesse para diversas áreas de pesquisa devido às suas promissoras ações terapêuticas já comprovadas e à facilidade de obtenção através da síntese orgânica.

A 4-MC é particularmente atraente possuindo citotoxicidade significativa observada contra MDA-MB-435 (linhagem celular de câncer de mama), SF-295 (linhagem celular de glioblastoma), e linhas celulares HCT-8 (linhagem celular de adenocarcinoma ileocecal humano) (RAMALHO *et al.*, 2013). Estudos realizados por Lim e colaboradores (2013) demonstraram que a 4-MC possui efeitos regulatórios adversos no mecanismo de defesa mediado por Nrf2 (fator nuclear eritroide 2), havendo um duplo benefício, sendo quimiossensibilizador ao promover a morte celular em células cancerosas e quimioprotetor, ao evitar que células normais sofram a toxicidade induzida por drogas anticancerígenas.

Outra atividade biológica relacionada a esse composto é a atuação como inibidor da enzima cathepsina K, enzima essa predominantemente expressa em osteoclastos e que exibe alta atividade da colagenase em relação aos colágenos, sendo fortemente envolvida na progressão da osteoporose (RAMALHO *et al.*, 2013).

Stompor *et al.* (2015) estudaram a chalcona 4-MC juntamente com outros compostos em uma linha totalmente diferente de investigação, para o uso desse composto como inseticida natural com ação fagoinibidora contra pulgões da batata pêssago (*M. persicae* [Sulz.]) e esta substância mostrou atividade moderada nesta análise.

Outros pesquisadores avaliaram o efeito de flavonóides e chalconas na viabilidade celular, dano ao DNA e expressão do gene da topoisomerase IIa / IIb em uma linhagem de células tumorais caninas (DH82), entre os compostos estudados a 4-MC apresentou o alto grau de citotoxicidade na ausência de danos consideráveis no DNA e exerceu maior inibição da expressão da topoisomerase

Ila do que a topoisomerase IIb e justificaram que o efeito mais específico dessa chalcona sobre a topoisomerase IIa pode ser devido à sua estrutura de cadeia aberta (SILVA *et al.*, 2013).

Iftikhar *et al.* (2017) avaliaram a atividade de alguns compostos incluindo o 4-MC, contra linhagens celulares de câncer humano colorretal (HCT116) e de mama (CAL-51) onde revelou atividades antiproliferativas potentes, sendo que o 4-MC causou rápido acúmulo de p53 em células HCT116 semelhantes à sua indução por controle positivo (Nutlin-3), esse resultado demonstra que esta substância atua como um estabilizador de p53 potente, com atividade antiproliferativa aumentada.

Outros autores estudaram a 4-MC frente a quatro tipos de linhagens celulares, demonstrando um valor de IC₅₀ de 81,34 µM em A549 (células epiteliais de adenocarcinoma de pulmão humano), 50,15 µM para B-16 (melanoma de camundongo) e 64,34 µM para 3T3 (fibroblastos de camundongo) (BORTOLOTO *et al.*, 2014).

Foi relatado por Henmi *et al.* (2009) que este composto atua na supressão da proliferação de células brancas de blastogênese e na proliferação de células de melanoma A375. Assim como, possui ação anti-inflamatória avaliada através do modelo de edema de pata de rato induzido por carragenina (DHANAPAL *et al.*, 2013).

Han *et al.* (2017) demonstraram que a chalcona 4-MC aumenta significativamente a diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1, aumenta a atividade transcricional induzida pelo PPARγ e reverte o efeito inibitório do TNF-α na diferenciação de adipócitos e na expressão da adiponectina, podendo então, ser utilizado na prevenção e tratamento da síndrome metabólica e diabetes.

Este composto também apresentou atividade inibitória de glutathione S-transferase (GSTs), este tipo de fármaco frequentemente empregado na terapia do câncer, devido ao fato de que a GSTs aumenta o metabolismo de drogas anticâncer, contribuindo para a resistência aos medicamentos, sendo assim, a inibição desta enzima desempenha um papel fundamental na terapia do câncer (ÖZASLAN *et al.*, 2018).

Além disso, estudos recentes em ferida crítica da calota craniana em ratos wistar utilizando como tratamento a chalcona 4-MC demonstraram que a mesma possui promissora ação osteogênica, havendo o fechamento da ferida em 45 dias e anti-inflamatória (ORTOLAN *et al.*, 2017).

Com base nas atividades terapêuticas já comprovadas em literatura, a chalcona 4-MC foi escolhida para ser investigada neste trabalho quanto à sua

ação osteogênica ao ser incorporada em formulações apropriadas, destinadas à regeneração óssea. Apesar destas atividades biológicas promissoras, a 4-MC apresenta baixa solubilidade em água.

Além disso, fotossensibilidade foi relatada para outra chalcona, a 5-(2-benzoiletênil)-N-benzil-2 metoxibenzenesulfonamida (MATTOS *et al.*, 2012), ressaltando a necessidade de estudos de pré-formulação para a melhor compreensão das propriedades físico-químicas desta molécula, incluindo também a sua estabilidade. Além disso, faz-se necessário desenvolver sistemas de liberação adequados para melhorar a sua solubilidade, proteger contra a degradação e direcionar o fármaco para o sítio de ação, contribuindo para estabelecer um promissor agente terapêutico.

CAPÍTULO III

Chalcona (2E) -1-fenil-3- (4-metoxi-fenil) -2-propen-1-ona: ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO E ESTABILIDADE

Este artigo foi submetido ao periódico *Pharmaceutical Research* com fator de impacto igual a 3.42.

Chalcona (2E) -1-fenil-3- (4-metoxi-fenil) -2-propen-1-ona: ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO E ESTABILIDADE

Danyela Francine Benvenutti^a, Fatima de Campos Buzzi^a, Rogerio Corrêa^a, Angélica Garcia Couto^a, Theodoro Wagner^a, Favero R. Paula^b, Lanfranco Barberini^c, Ricardo Vivani^c, Maurizio Ricci^c, Tania Mari Bellé Bresolin^{a [1]}

^a Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), P.O. Box 360,88302-202, Itajaí, SC, Brazil

^b Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos - *Programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas*, Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, RS, Brasil.

^c Department of Pharmaceutical Sciences Università degli Studi di Perugia, Via del Liceo 1, 06123 Perugia, Italy

Resumo

As chalconas são uma classe de compostos amplamente estudados devido à sua gama de atividades biológicas e pela facilidade de obtenção através de síntese. Em especial, a chalcona (2E) -1-fenil-3- (4-metoxi-fenil) -2-propen-1-ona (4-MC), apresenta importante atividade anti-inflamatória e osteogênica, entre outras, sendo um promissor agente terapêutico. Apesar de sua importância terapêutica, as chalconas apresentam baixa solubilidade sendo também relatado fotosensibilidade, características que influenciam na sua síntese e no desenvolvimento de sistemas de liberação. Portanto, estudos de pré-formulação são de grande importância para direcionar o futuro desenvolvimento de sistemas de liberação adequados para esta molécula. Portanto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a 4-MC obtida por síntese de Claisen-Schmidt, empregando técnicas espectroscópicas como ressonância magnética nuclear (RMN), Infra-vermelho (FTIR) e espectrometria de massas (CG-MS), analisar suas características físico-química como solubilidade em diversos solventes e, análise de comportamento térmico por DSC/TG e hábito cristalino por difração de raio-X (DRX), bem como analisar a sua estabilidade em modelos *in silico* e *in vitro* (fotoestabilidade), empregando cromatografia líquida com detector de UV e MS. Os resultados obtidos comprovaram a estrutura química da 4-MC, a qual apresentou fusão em 75 °C, e apresentando-se na forma cristalina, com ausência de polimorfismo, sendo praticamente insolúvel em água, com solubilidade de

1,39, 1,56 e 2,08 µg/mL em metanol/PBS (60/40 v/v) a 18, 25 e 37 °C, respectivamente. Na análise *in silico*, observou-se que o hidrogênio ligado ao carbono localizado na posição C6 de ambos os anéis são as posições mais prováveis para a auto-oxidação, sendo sugeridas as possíveis estruturas dos produtos de degradação. Nas análises de degradação *in vitro* a 4-MC mostrou-se fotoinstável frente à exposição à luz visível (degradação de 22,1 e 56,4% a 1,2 e 2,4 milhões de lux/h, respectivamente), monitorando por LC-UV. A análise por LC-MS revelou o aparecimento de 4 produtos de degradação, em concordância com o estudo *in silico*. Estes resultados possibilitaram a compreensão da labilidade da 4-MC frente à incidência de luz e exposição ao oxigênio, de modo a direcionar o desenvolvimento de sistemas de liberação que preservem sua estabilidade e melhorem a sua biodisponibilidade, bem como para a escolha dos materiais de embalagem a serem empregados.

Introdução

As chalconas são amplamente estudadas devido à sua ampla atividade biológica, incluindo ação antimicrobiana (SUWITO *et al.*, 2015), anti-hepatotóxica (KHAN *et al.*, 2006), antileucêmica (WINTER *et al.*, 2014), anti-inflamatória (IQBAL *et al.*, 2014), antimalárica (BHATTACHARJEE *et al.*, 2007), quimiopreventiva (XU *et al.*, 2015), entre outras.

Em especial a chalcona 4-metoxi (4-MC) apresenta atividade anti-inflamatória (DHANAPAL *et al.*, 2013), osteogênica (ORTOLAN *et al.*; 2017), quimiosensibilizadora e quimiopreventiva (LIM *et al.*, 2013), inibidora de catepsina K (RAMALHO *et al.*, 2013), eficaz no tratamento da síndrome metabólica e diabetes (HAN *et al.*, 2017), apresenta atividade inibitória de glutathione S-transferase (ÖZASLAN *et al.*, 2018) e atua na supressão da proliferação de células brancas de blastogênese e de células de melanoma A375 (HENMI *et al.*, 2009).

Embora seja um composto com ampla atividade terapêutica comprovada, não há relatos de estudos de pré-formulação que incluam a sua solubilidade ou hábito cristalino e presença de polimorfismo, os quais podem afetar a sua biodisponibilidade, assim como sua estabilidade.

A degradação química e estabilidade são assuntos bastante abordados no desenvolvimento de novos fármacos, sendo as reações de hidrólise e auto-oxidação as reações de degradação mais comuns. Algumas metodologias computacionais são utilizadas para prever a estabilidade ou o tipo de via de degradação que um composto pode apresentar em condições especiais (ANDERSSON *et al.*, 2014; REIS *et al.*, 2018). Neste contexto, estudos de predição *in silico* de estabilidade tornam-se uma ferramenta valiosa para o futuro desenvolvimento de um sistema de liberação de fármaco.

2 Materiais e métodos

2.1 Materiais

Acetofenona; anisaldeído; hidróxido de sódio; placa de sílica gel para cromatografia em camada delgada (CCD) Merck GF254 20 x 20 cm; sílica gel 60, 70-230 mesh (0,063-0,20 mm); sílica gel 60, 10-230 mesh (0,063-0,20 mm); CDCl₃; KBr. A água ultrapura tipo I foi obtida em um sistema Miliq. Os solventes para uso em LC-UV eram de grau HPLC e no LC-MS eram de grau LC-MS. Todos os demais solventes eram de grau PA.

2.2 Síntese e purificação da chalcona (2E)-1-fenil-3-(4-metoxifenil)-2-propen-1-ona

A 4-MC foi sintetizada por condensação de Claisen-Schmidt (BUKHARI *et al.*, 2014). Inicialmente foi feita uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) (0,2184 g) solubilizada em 5 mL de etanol. Após completa solubilização do NaOH a mesma foi levada a banho de gelo, onde adicionou-se p-anisaldeído (0,472 mL) e acetofenona (0,485 mL), essa solução permaneceu sob agitação até o término da reação, monitorando-se com CCD. Ao final da reação a mesma foi evaporada a pressão reduzida e permaneceu em dessecador durante 24 h.

A reação foi monitorada por CCD eluídas com solventes gradientes como hexano e acetato de etila (70:30 v/v) para confirmar o término da reação. Os produtos obtidos foram filtrados sob pressão reduzida, vertidos em água gelada e lavados sucessivamente até as lavagens se tornarem neutras ao teste em papel tornassol, foram então secos num dessecador durante 24 h e purificados por cromatografia em coluna.

A fração obtida foi impregnada com sílica gel 70-230 mesh 60 como uma pastilha, produzindo um peso final de 9 g. A coluna foi recheada com 85,756 g de sílica gel 60 e eluída de forma gradiente iniciando com hexano 100% e a polaridade aumentada gradativamente com acetato de etila. Aliquotas de 5 mL foram coletadas em um total de 215 sub-frações que foram evaporadas e agrupadas de acordo com seu perfil cromatográfico por CCD.

A subfração 91-153 (83,26% de rendimento) apresentou a forma de cristais de agulha de cor levemente amarelada. Esta amostra foi recristalizada a

partir de etanol aquecido utilizando carvão ativado, subsequentemente filtrada sob pressão negativa e seca durante 24 h.

A coluna foi recheada com 53,193 g de sílica gel 60 e eluída em um sistema de solvente gradiente iniciando com 100% hexano, aumentando a polaridade gradativamente com acetato de etila. A amostra foi impregnada com sílica gel 60 de granulometria 10-230 mesh na forma de pastilha (5,655 g), a

Após a secagem, as frações puras do produto foram coletadas e caracterizadas conforme descrito abaixo.

2.3 Caracterização estrutural da 4-MC

2.3.1 Análise de infra-vermelho–FTIR

Espectros de FTIR foram registrados em um FT-IR Shimadzu® IR Prestige-21 (Kyoto, Japão), utilizando espectroscopia de refletância difusa DRS-FTIR com o composto misturado em KBr. Cada espectro foi obtido de 3600 a 750 cm^{-1} .

2.3.2 Espectrometria de massa e Cromatografia gasosa (CG-MS)

Estas análises foram realizadas utilizando um cromatógrafo a gás com um detector de massa acoplado, modelo Shimadzu QS-2010® (Kyoto, Japão).

A amostra foi dissolvida em diclorometano. Foi utilizado um sistema de injeção automatizado (auto-injetor) da Shimadzu modelo OAC 20i, o qual, injetou 1 μL da solução. A separação foi feita usando uma coluna DB-1 (30 m x 0,25 mm, 0,10 μm) de fase estacionária 100% de dimetilpolisiloxano. O fluxo de gás Hélio foi mantido constante em 0,70 mL/min e a temperatura do injetor foi de 300 °C no modo *splitless* com divisão (Split) de 1:40. A temperatura inicial da coluna foi mantida a 190 °C por 1 min e em seguida a velocidade de aquecimento foi de 30 °C/min até atingir 310 °C, permanecendo nesta temperatura por 8 min. O detector de massas Shimadzu modelo QP2010S, foi usado no modo SCAN com a razão massa/carga de 30 a 450 Da e no modo de ionização por impacto de elétrons (EI) a 70 eV.

2.3.3 Ressonância magnética nuclear de Hidrogênio ^1H e Carbono ^{13}C (RMN)

As análises de RMN foram realizadas em equipamento Bruker Advance DPT-300 (Billerica, Massachusetts). A chalcona foi solubilizada em CDCl_3 e os espectros de hidrogênio (RMN ^1H) obtidos a 300 MHz e carbono (RMN ^{13}C) obtidos a 75,5 MHz.

Os deslocamentos químicos foram referenciados ao padrão tetrametilsilano (TMS). Os dados foram relatados como desvio químico (δ , em ppm), multiplicidade, constante de acoplamento (J, em Hz) e intensidade integrada. A multiplicidade de um sinal particular foi indicada como s (singlete), d (duplete), t (triplete) ou m (multiplete).

2.3.4 Difração de Raio X (DRX)

Esta análise foi realizada em parceria com o departamento de química da *Università Degli Studi di Perugia* (UniPG), os padrões de difração de raios X (XRPD) foram coletados de acordo com o procedimento de varredura com o difratômetro de radiação PANalytical X'Pert Pro (Malvern, Reino Unido), equipado com radiação $\text{K}\alpha$ - Cobre ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$), operado em uma corrente de 40 mA e voltagem 40 kV, girador de amostra e um detector RTMS (*Real Time Multiple Strip*).

A chalcona foi analisada em sua forma pura para avaliar seu perfil de cristalinidade e foi submetida a processo de recristalização em diversos solventes para verificar a presença de polimorfismo, os solventes utilizados foram acetato de etila, acetona, acetonitrila, hexano, etanol e metanol.

Os pós foram depositados em um poço raso de um porta-amostras. Antes da análise, uma superfície plana levemente áspera foi usada para pressionar o pó, para minimizar a orientação preferencial dos ângulos.

2.4 Calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria (DSC e TG)

Para a caracterização termoquímica e pureza da chalcona, as curvas DSC e TG foram obtidas em analisador DSC/TG Netzsch STA 449 F3 Jupiter® (Alemanha), utilizando cadinho de porcelana parcialmente fechado com $\sim 2 \text{ mg}$ da amostra, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL/min) e taxa de

aquecimento de 1 °C/min; Faixa de temperatura de 20- 450 °C. A equação de Van't Hoff foi usada para determinar a pureza (Equação 1).

$$T_f = T_0 - x_2 \times \left(\frac{RT_0^2}{\Delta H_f} \right) \quad \text{Equação 1}$$

2.5 Análise de solubilidade

Três tipos de testes de solubilidade foram feitos, para diferentes abordagens. Inicialmente foi realizado o ensaio de solubilidade aparente segundo os critérios da Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2010), utilizando diferentes solventes como DMSO, acetonitrila, álcool metílico, álcool etílico, água e diclorometano, para realizar uma caracterização geral da solubilidade da 4-MC, em solventes de interesse analítico e farmacotécnico. Para tanto, as amostras de 4-MC previamente trituradas em gral de porcelana, foram transferidas para tubos de ensaio (10 mg) com adição gradual de cada solvente até a completa solubilização visual das amostras, com agitação em vórtex. A solubilidade em cada um dos solventes foi classificada de acordo com o volume necessário de solvente para a completa solubilização da amostra (BRASIL, 2010), por observação visual.

Visando mimetizar o ambiente fisiológico, para posterior realização de teste de liberação, foi testado o tampão fosfato (PBS) 0,1 M (pH = 7,4) e a mistura metanol/PBS (60/40 v/v). Preparou-se uma Solução Estoque (SE) de Chalcona (concentração: 10 mg/100 mL) em metanol/PBS (60/40 v/v). Esta combinação de solventes foi escolhida para superar o limite da fraca solubilidade da chalcona apenas no PBS. Soluções de chalcona na faixa de 1 a 10 µg/mL, foram preparados por diluição da SE com metanol/PBS para se obter uma curva analítica após a leitura da absorbância de cada solução em 346 nm em espectrofotômetro Agilent, modelo 8453 (Milão, Itália), utilizando o solvente como branco, em cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico.

A solubilidade termodinâmica também foi realizada. Foi preparada uma solução saturada de 4-MC em metanol/PBS (60/40 v/v) e deixada sob agitação durante 24 h (a 18, 25 e 37 °C). As alíquotas da amostra foram centrifugadas a 3500 rpm durante 10 min. A absorbância do sobrenadante foi analisada em 346 nm e a concentração foi calculada utilizando a curva analítica previamente construída, conforme descrito acima. O ensaio foi realizado em triplicata para cada temperatura.

Para que uma metodologia apropriada para análises de HPLC pudesse ser desenvolvida, foi realizado um ensaio de solubilidade com um sistema de solventes composto de água e acetonitrila. Uma SE numa concentração de 1000 µg/mL foi preparada dissolvendo a quantidade exatamente pesada de 4-MC em acetonitrila. Desta SE foram aliqotados 100 µL em balão volumétrico de 10 mL completando o volume com cada um dos solventes, para obter uma concentração de 10 µg/mL de chalcona em cada solvente. Os sistemas de solventes usados foram 9:1; 8:2; 5:5; 2:8; 1:9 de H₂O:ACN (v/v). Cada solução foi analisada em espectrofotômetro UV-1601 Shimadzu® (Kyoto, Japão) no comprimento de onda de 346 nm, utilizando cubeta de quartzo (1 cm) usando o solvente como branco. O sistema solvente escolhido foi aquele que proporcionou a maior absorbância.

2.6 Predição da estabilidade *in silico*

No estudo *in silico* a predição realizada foi feita em parceria com a Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), sob supervisão do prof. Fávero R. Paula, as análises computacionais foram realizadas utilizando o software Spartan 08 116.2TM versão para Windows (EUA) e todas as estruturas iniciais foram construídas utilizando átomos estruturais e fragmentos de seu editor molecular. A otimização da geometria foi realizada utilizando o *Molecular Merck* força de campo (MMFF94) seguido por Modelo Austin (AC1). A estrutura foi submetida à análise conformacional. Incremento de ângulo de torção foi definido para 30° na faixa 0-360°, usando a pesquisa sistemática, pelo método *Density Functional Theory* (DFT) e B3LYP / 6.311G (d, f). O nível de conjunto de base da teoria e a menor energia conformacional foi reotimizada. Nesta etapa foram calculados o número de elétrons em análise de população natural atômica (NPA) usando a energia de ponto único no mesmo nível da teoria da otimização de geometria.

O principal mecanismo de auto-oxidação observado na reação de degradação fotolítica (energias de captação de átomos de hidrogênio) são calculados para um átomo de hidrogênio ligado a um átomo de carbono na molécula, utilizando a equação 2 (SHARP, 2011; LIENARD *et al.*, 2015.). Este procedimento pode ser usado tanto para auto-oxidação, quanto para as previsões de degradação fotolítica (YAMADA *et al.*, 2008).

$$(BDE) EH_{\text{abstração}} = E_{\text{radical}} + EH_{\text{radical}} - E_{\text{estado fundamental}}$$

$$\text{Equação 2}$$

Estruturas químicas de degradação por fotólise foram previstas utilizando-se software Zeneth (Zeneth7.0.0_27_07_2016), este software é eficaz na predição de estruturas químicas de produtos de degradação, os quais podem ser gerados experimentalmente e detectados por um espectrômetro de massa, ou outros métodos de detecção, auxiliando na previsão de prováveis vias de degradação.

2.7 Desenvolvimento de método analítico da chalcona por CLAE-UV e UPLC-MSMS

Um método analítico por CLAE foi desenvolvido para analisar o perfil cromatográfico da chalcona e para monitorar a sua fotoestabilidade. A metodologia foi validada quanto à precisão e linearidade (ICH, 2005).

2.7.1 Método por CLAE-UV

A análise foi realizada em cromatografia a líquidos Shimadzu®, modelo LC 20-AC (Kyoto, Japão), equipado com uma bomba quaternária (LC-10ADvp), detector tipo PDA (SPD-M10Avp) e amostrador automático (SIL-20AF), comunicador (SCL-10Avp) e forno de coluna (CTO-10Avp). Foi empregada coluna C18 250 x 4,6 mm, 5 µm modelo Luna, Phenomenex® (Torrance, USA), injeção de 20 µL, temperatura do forno 35 °C, tempo de corrida de 20 min. Como fases móveis foram utilizados solventes orgânicos grau HPLC e água ultrapura, sendo inicialmente empregado sistema isocrático com solvente Água:Metanol 75:25 v/v. A detecção foi realizada em 346 nm. Foram avaliados o tempo de retenção, resolução, simetria de pico e pureza dos picos.

Posteriormente foi empregado sistema gradiente para avaliação dos produtos de degradação obtidos na análise de fotoestabilidade, com solventes Água:Metanol:Acetonitrila (Tabela 3.1), utilizando a mesma coluna, nas mesmas condições do sistema isocrático.

Tabela 3.1: Sistema gradiente utilizado na avaliação dos produtos da fotodegradação.

Tempo (min)	Acetonitrila (%)	Metanol (%)	Água ultrapura (%)
0,01	45	5	50
5	70	5	25
10	80	5	15
18	85	5	10
22	95	5	0
24	45	5	50
26	45	5	50

2.7.1.2 Preparo da amostra

Inicialmente, pesou-se 10 mg de 4-MC, em balão volumétrico (100 mL) e solubilizado em metanol para atingir uma concentração de 100 µg/mL (solução estoque, SE).

Depois de solubilizar a amostra em ultrassom durante 15 min, 1 mL da solução foram transferidos a um balão volumétrico (10 mL) e o volume completado com o mesmo solvente. A solução foi novamente levada à ultrassom por 5 min obtendo-se uma solução de concentração de 10 µg/mL, seguida por filtração em membrana de PTFE modificada de 0,45 µm e injetada no cromatografo.

2.7.1.3 Validação analítica

O método isocrático selecionado foi submetido à validação analítica de acordo com a RDC nº 166 (BRASIL, 2017) e segundo a ICH (2005). A validação consistiu nos parâmetros de linearidade, seletividade e precisão do método.

A linearidade é a capacidade de um método analítico demonstrar que o sinal obtido é diretamente proporcional à concentração do analito. Sendo assim, uma curva analítica foi construída com a chalcona previamente purificada e caracterizada. Foram realizadas diluições sucessivas de uma solução estoque (SE) a 100 µg/mL, preparada conforme descrita acima. A partir desta solução foram realizadas diluições no intervalo de 2,5 a 30 µg/mL, em 8 níveis, injetando cada solução em triplicata. Usando o programa excel foi construída a curva analítica através da elaboração de um gráfico de área média do pico *versus* concentração, realizando a regressão linear e a análise de resíduos.

Para analisar a precisão, foi utilizado o método de repetibilidade (precisão intra-dia) que define a precisão do método em repetir, em um pequeno intervalo de tempo, os resultados obtidos nas mesmas condições de análise, com

o mesmo analista, no mesmo equipamento e fazendo uso dos mesmos reagentes. Nesta análise foram realizadas seis determinações independentes de soluções da amostra contendo 100% da concentração do teste (10 µg/mL) da chalcona, preparadas no mesmo dia, pelo mesmo analista, conforme descrito no item 2.7.1.2. A precisão foi expressa como desvio padrão relativo (DPR), usando Excel.

A seletividade foi determinada por meio da análise da pureza do pico da chalcona usando o detector PDA.

2.8 Desenvolvimento de método analítico por UPLC-MSMS

As análises foram realizadas em cromatografia a líquidos Agilent, modelo 1260 Infinity (Santa Clara, USA), equipado com uma bomba quaternária, operada com os eluentes no modo gradiente, com detector de arranjo de fotodiodo, a 254 nm, e um detector de massa triplo quadrupolo modelo 6420 que foi operado utilizando a energia do capilar em 4 kV e a interface ESI (*Electrospray ionization*) no modo positivo. A temperatura do gás de dessolvatação (nitrogênio) mantida a 300 °C com fluxo de 9 L/min e pressão de 15 psi. A varredura de massas (modo SCAN) de 100 a 1000 Da. O equipamento estava equipado com um injetor automatizado modelo 1260 ALS, onde o volume da amostra injetada foi de 5 µl, e o processo de separação foi realizado em uma coluna EclipsePlus RRHD C18 Agilent (Santa Clara, EUA) de 50 mm x 2,1 mm ID e 1,8 µm de tamanho de partícula. A coluna foi condicionada a 40 °C, utilizando um forno (modelo 1260 TCC).

Utilizou-se o seguinte gradiente de eluição: fase móvel A - ácido fórmico 0,1%, a fase móvel C - metanol (mantido constante a 5%) e a fase móvel B - acetonitrila (grau LCMS). A separação foi realizada por meio da utilização de um gradiente que iniciou com 5% a 65% da fase B em 5 min, então até 80% em 12 min. E em seguida isocrático durante 8 min. A fase móvel foi então retornada à sua composição inicial em 1 min permanecendo durante 4 min no fluxo de 0,4 mL/min.

2.8.1 Preparo da amostra

Sendo uma análise qualitativa, uma quantidade suficiente de chalcona foi adicionada em vial de 1,5 mL e posteriormente solubilizada com 1 mL de metanol grau HPLC, a solução foi levada ao ultrassom durante 15 min, para completa solubilização do composto.

2.9 Análise de estabilidade *in vitro* do composto

2.9.1 Fotoestabilidade

Foram preparadas 3 placas de Petri contendo aproximadamente 10 mg de chalcona e expostas a 1,2 e 2,4 milhões de lux.h (VIS baixo e VIS alto), sendo uma delas revestida com papel laminado para controle negativo. Outras 3 placas de Petri contendo a mesma quantidade de chalcona foram expostas à luz ultravioleta de 200 e 400 watts h/m² (UV baixo e UV alto, com espectro de emissão entre 320 e 400 nm) sendo uma delas revestida com papel laminado para controle negativo. As placas foram alocadas e câmara de fotoestabilidade Mecalor®, modelo EC/0,2/R-F (São Paulo, Brasil) (BRASIL, 2005).

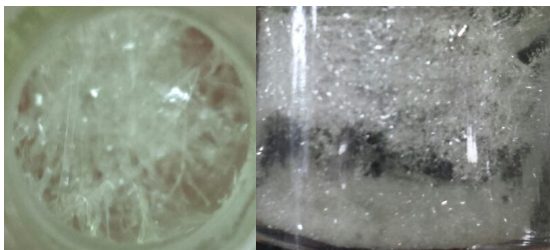
As amostras degradadas (10 mg), foram adicionadas em balão volumétrico (100 mL) e dissolvidas com 50 mL de metanol sendo levados ao ultrassom durante 15 min e após o volume do balão foi completado com metanol para atingir uma concentração de 100 µg/mL (SE). Uma alíquota de 1 mL da SE foi transferido a um balão volumétrico (10 mL) e o volume completado com o mesmo solvente, para obtenção da concentração alvo de 10 µg/mL o qual foi analisado por CLAE-UV e UPLC-MSMS e CG-MS.

3 Resultados e Discussão

3.1 Síntese da chalcona (2E)-1-fenil-3-(4-metoxifenil)-2-propen-1-ona e caracterização físico-química

Após a síntese as amostras de chalconas foram armazenadas em dessecador, totalizando 18,7372 g e foram purificadas através de cromatografia em coluna aberta (CC). Após purificação em coluna, a sub-fração 91-153 (6,865 g) apresentou-se na forma de cristais agulha de cor levemente amarelada (Figura 3.1). Segundo perfil analisado por CCD, estas frações correspondiam à chalcona em estudo, porém restando alguma impureza (dados não mostrados).

Figura 3.1: Foto ilustrativa do cristal de chalcona.



Esta amostra foi recrystalizada em etanol aquecido, utilizando-se carvão ativo, sendo posteriormente filtrada sob pressão negativa e mantida em dessecador durante 24 h. Após a secagem foi pesada obtendo-se 4,2435 g de produto final puro (61,81% de rendimento).

As demais frações foram primeiramente recrystalizadas em etanol aquecido com carvão ativo e posteriormente filtrados sob pressão reduzida e dessecados em dessecador durante 24 h. Após a secagem as amostras foram reunidas, obtendo-se um total de 1,5 g. Esta amostra foi novamente purificada por CC. Ao final do procedimento obteve-se um total de 1 g de chalcona purificada (66,66% de rendimento).

3.1.1 Caracterização estrutural

Para confirmação estrutural da chalcona (Figura 3.2), foram realizadas análises no infravermelho, espectrometria de massa e ressonância magnética nuclear RMN- ^1H e RMN- ^{13}C , comparando-se os resultados com estudos prévios.

O espectro de absorção no IV (Figura 3.3), apresentou bandas de absorção, caracterizada pela deformação axial de $\nu \text{C}=\text{C}$ (C, sp^2) em 1598 cm^{-1} . Observou-se também deformação axial em $1654,92\text{ cm}^{-1}$, indicativo de carbono de grupamento cetona $\nu \text{C}=\text{O}$ e deformação axial em 1263 cm^{-1} , referente ao carbono da ligação $\nu \text{C}-\text{O}$.

Os dados obtidos foram comparados com a literatura (ORTOLAN *et al.*, 2014), comprovando a estrutura do composto (Figura 3.2).

Figura 3.2: Estrutura química da chalcona.

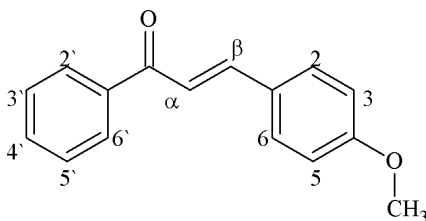
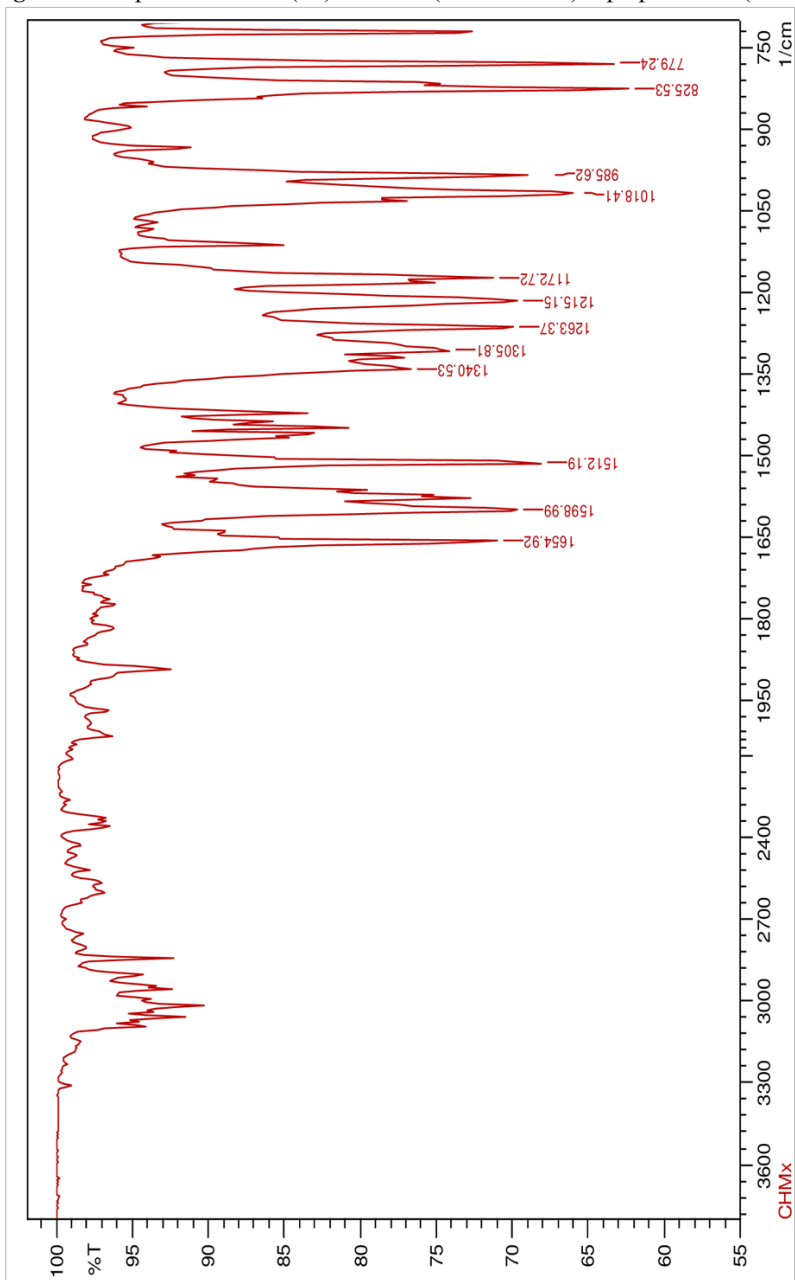
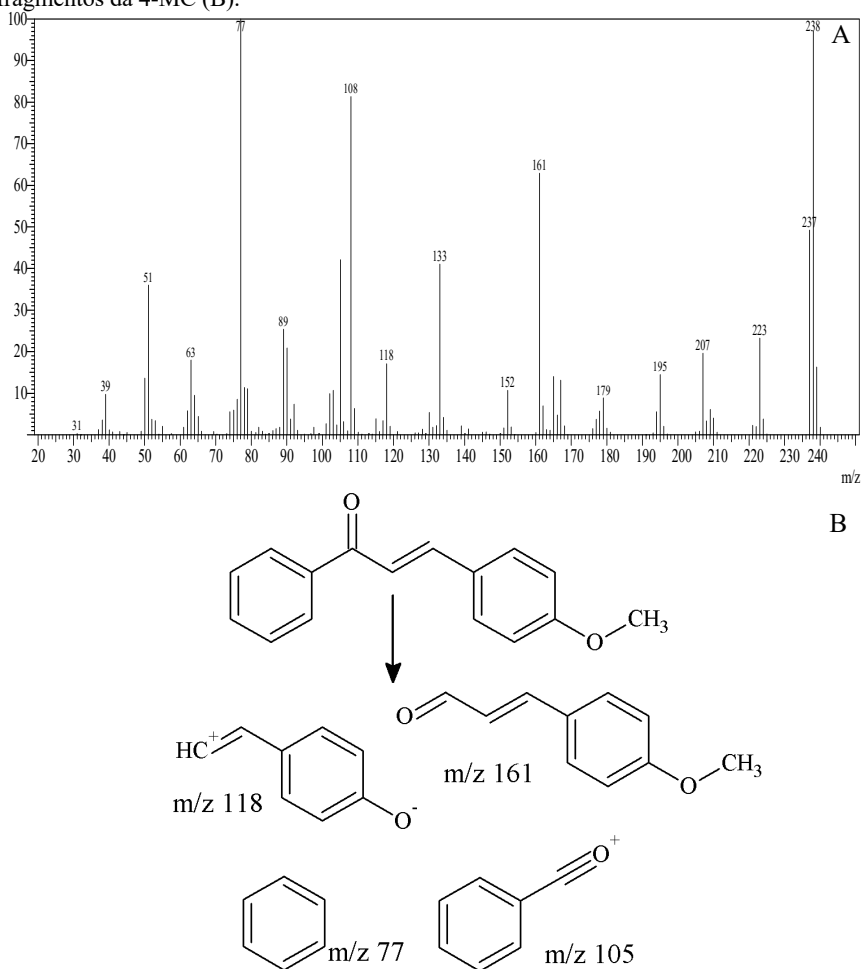


Figura 3.3: Espectro de IV da (2E)-1-fenil-3-(4-metoxifenil)-2-propen-1-ona (FTIR).



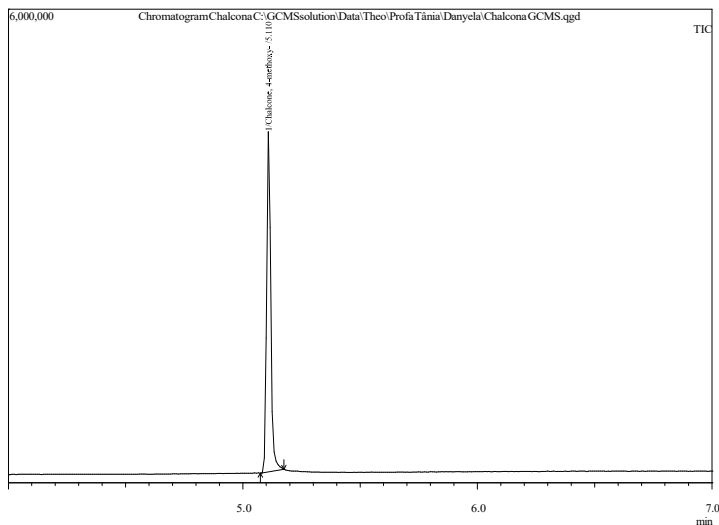
Na análise de espectrometria de massa (figura 3.4), obtidas em cromatografia a gás conforme item 2.3.2, pode-se comprovar a estrutura da substância em estudo, pois apresenta um padrão de picos típicos da chalcona (2E)-1-fenil-3-(4-metoxifenil)-2-propen-1-ona. Pode-se observar a presença do íon molecular em m/z 238, o pico base em m/z 77, pico em m/z 161 e m/z 133, referentes aos fragmentos resultantes das quebras dos carbonos (Figura 3.4B).

Figura 3.4: Espectro de Massas obtido em cromatografia a gás em 70 eV (A), seus respectivos fragmentos gerados em maior proporção e as estruturas dos principais fragmentos da 4-MC (B).



O cromatograma obtido indicou alta pureza do composto, apresentando apenas um pico (Figura 3.5), com tempo de retenção de 5,11 min.

Figura 3.5: Perfil cromatográfico (CG) da chalcona 4-MC.



Os perfis RMN-¹H e RMN-¹³C registados da 4-MC apresentaram os seguintes sinais: RMN-¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ : 3,85 (3H, s, OCH₃), 6,92 (2H, d, H-3'), 6,95 (2H, d, H-5'), 7,39 (1H, d, H-2), 7,44 (1H, d, H-3'), 7,52 (3H, s, H-4'), 7,59 (2H, dd, H-5'), 7,62 (2H, d, H-2'), 7,82 (1H, d, H-6'), 8,0 (2H, dd, H-2'), 8,02 (2H, dd, H-6') (Figuras 3.6 - 3.8).

RMN-¹³C (CDCl₃, 75,5 MHz): 55,42 (OCH₃), 114,45 (C-3, C-5), 119,81 (C-2), 127,64 (C-1), 128,42 (C-2'), C-6'), 128,57 (C-3', C-5'), 130,23 (C-2'', C-6''), 132,55 (C-4'), 138,53 (C-1'), 144,70 (C-3), 161,71 (C-4''), 190,59 (CO) (Figuras 3.9).

Os perfis foram comparados com a literatura, confirmando a estrutura do composto, como mostra a tabela 3.2.

Figura 3.6: Espectro de RMN- ^1H da 4-MC obtido em equipamento Bruker Advance DPT-300 300 MHz, CDCl_3 de solvente.

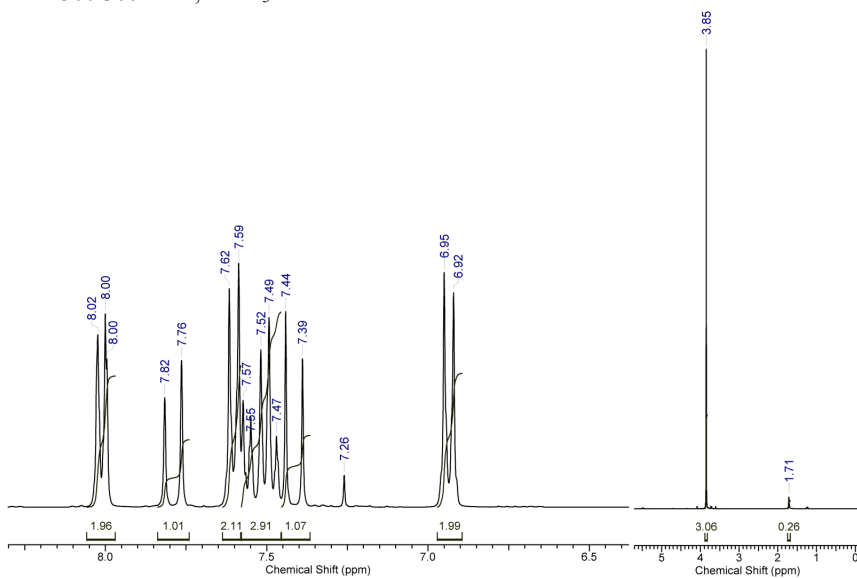


Figura 3.7: Espectro ampliado de RMN- ^1H da 4-MC obtido em equipamento Bruker Advance DPT-300 300 MHz, CDCl_3 de solvente.

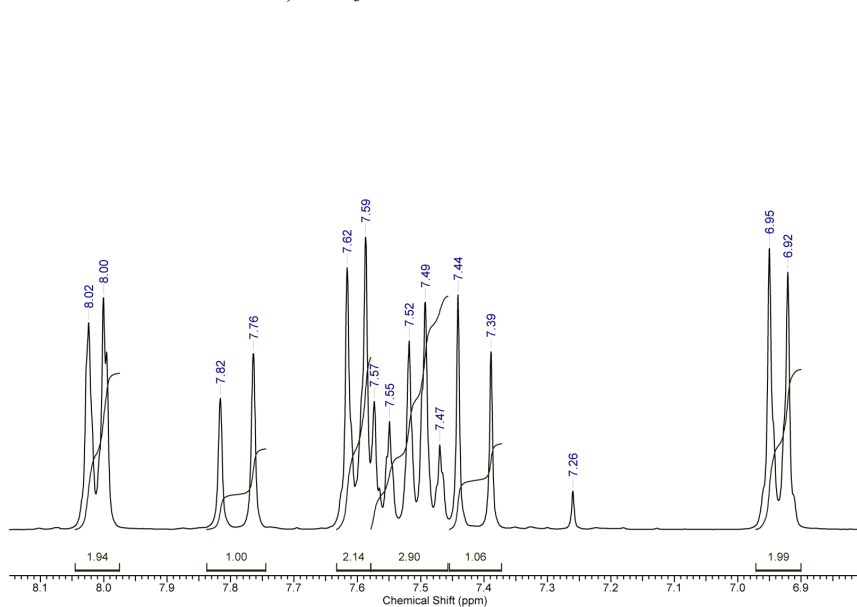


Figura 3.8: Espectro ampliado de RMN- ^1H da 4-MC obtido em equipamento Brucker Advance DPT-300 300 MHz, CDCl_3 de solvente.

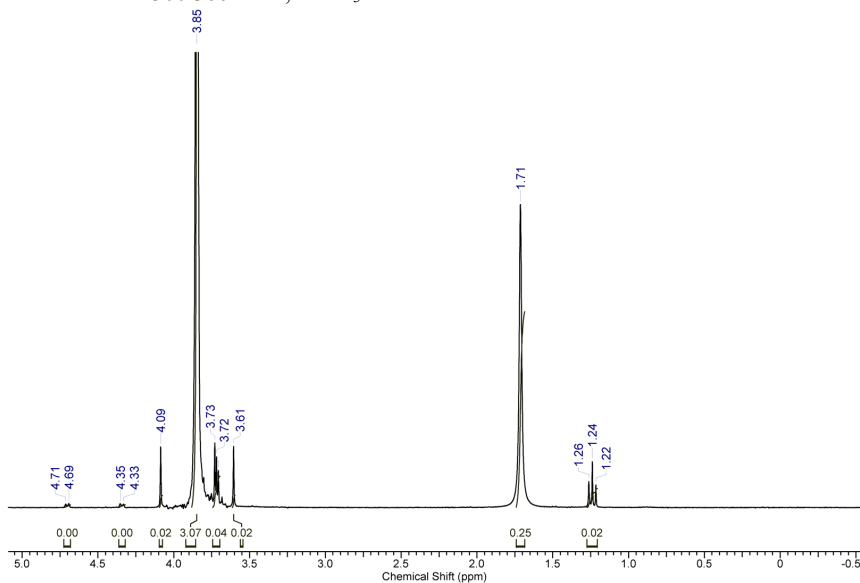


Figura 3.9: Espectro de RMN- ^{13}C da 4-MC obtido em equipamento Brucker Advance DPT-300 75,5 MHz, CDCl_3 de solvente.

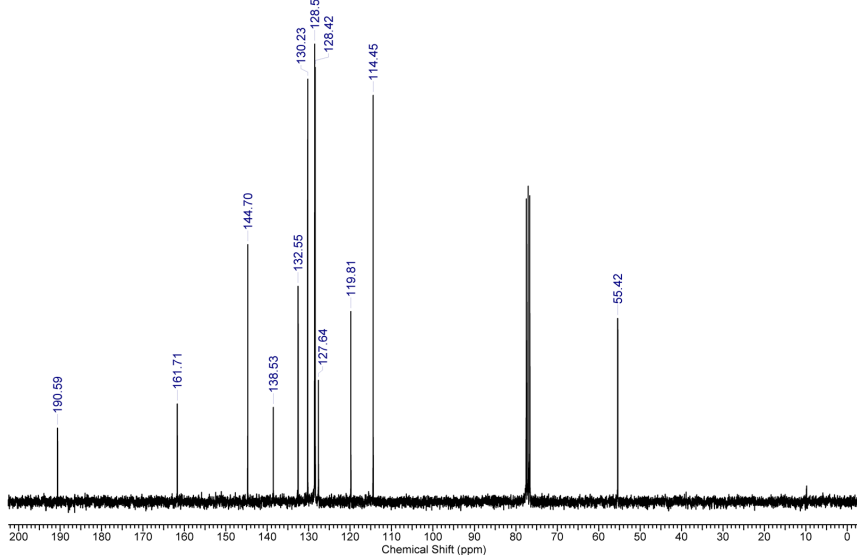


Tabela 3.2: Tabela contendo dados de deslocamentos químicos da 4-MC em RMN-¹³C e RMN-¹H em comparação com dados da literatura (CABRERA *et al.*, 2007; ROMANELLI *et al.*, 2011; ORTOLAN *et al.*, 2014).

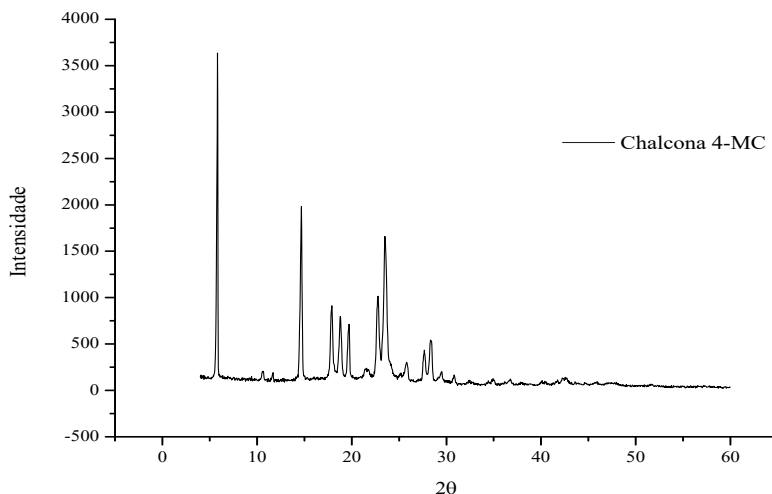
Referência (RMN- ¹³ C)	Chalcona (RMN- ¹³ C)	Referência (RMN- ¹ H)	Chalcona (RMN- ¹ H)
55,2	55,42 (-OCH ₃)	3,85 (s)	3,85 (s) (OCH ₃)
114,7	114,45 (C-3'', C-5'')	6,93 (d)	6,92 (d) (H-3'')
119,5	119,81 (C-2)	6,96 (d)	6,95 (d) (H-5'')
127,7	127,64 (C-1'')	7,3	7,39 (H-2)
128,4	128,42 (C-2', C-6')	7,43 (d)	7,44 (d) (H-3')
128,5	128,57 (C-3', C-5')	7,51 (d)	7,52 (s) (H-4')
130,4	130,23 (C-2'', C-6'')	7,58 (dd)	7,59 (dd) (H-5')
132,4	132,55 (C-4')	7,62 (d)	7,62 (d) (H-2'')
138,5	138,53 (C-1')	7,81 (d)	7,82 (d) (H-6'')
144,5	144,70 (C-3)	8,00 (dd)	8,0 (dd) (H-2')
161,5	161,71 (C-4'')	8,03 (dd)	8,02 (dd) (H-6')
190,4	190,59 (CO)		

s= singleto, d= duplete, dd= duplo duplete.

3.1.2 Análise de Difração de Raio X

Todo composto cristalino sólido apresenta seu próprio padrão de difração de raios-X que consiste em um conjunto de picos de Bragg, sendo que o padrão de difração de um composto pode ser considerado análogo a uma impressão digital, com as posições de pico determinado pela simetria da célula unitária e pelos parâmetros de rede (BAROT *et al.*, 2013). Na análise de difração de raio X com a 4-MC original, recristalizada conforme descrito na metodologia da síntese (Figura 3.10) pode ser observado que a amostra apresentou comportamento típico de estrutura cristalina, havendo vários picos de Bragg que caracterizam o perfil cristalino da chalcona.

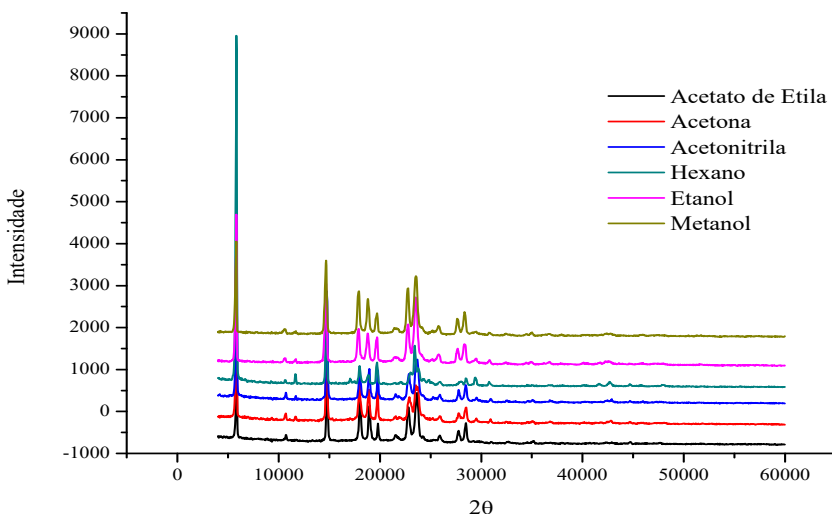
Figura 3.10: Difratograma obtido em difratômetro de radiação PANalytical X'Pert Pro, equipado com radiação K α - Cobre ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$), operado em uma corrente de 40 mA e voltagem 40 kV, da chalcona 4-MC recristalizada conforme descrito na síntese.



Nas análises realizadas com as amostras recristalizadas em diferentes solventes, em todos os solventes o composto apresentou o mesmo padrão de cristalinidade, indicando a ausência de polimorfismo, como pode ser observado na figura 3.11.

Estes dados são importantes no desenvolvimento de um fármaco, visto que o polimorfismo, um fenômeno que ocorre com diversas moléculas de característica cristalina, representa uma grande preocupação para a indústria farmacêutica. Essa característica que um fármaco pode haver de se cristalizar em diversas formas diferentes, pode afetar a solubilidade, biodisponibilidade, estabilidade, toxicidade e ação terapêutica do fármaco, assim como, pode afetar as formulações alterando características do fármaco como fluxo do pó e compressibilidade (PRADO; ROCHA, 2015).

Figura 3.11: Difratoograma obtido em difratômetro de radiação PANalytical X'Pert Pro, equipado com radiação $K\alpha$ - Cobre ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$), operado em uma corrente de 40 mA e voltagem 40 kV, da chalcona 4-MC recristalizada em diferentes solventes.



3.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Termogravimetria (TG)

Análise térmica refere-se a um grupo de técnicas nas quais propriedades físicoquímicas de uma substância são mensuradas em função da temperatura ou do tempo, enquanto a temperatura da amostra, sob uma atmosfera específica, é submetida a uma programação controlada (GIRON, 2002).

A termogravimetria (TG), mede a perda ou o ganho de massa de uma substância em função da temperatura. As curvas termogravimétricas apresentam informações sobre estabilidade térmica (capacidade da substância em manter suas propriedades, durante o processo térmico, o mais próximo possível de suas características iniciais) e a composição da amostra original, composição de algum composto intermediário e composição de resíduos (WENDLANDT, 1986; DANIELS, 1973).

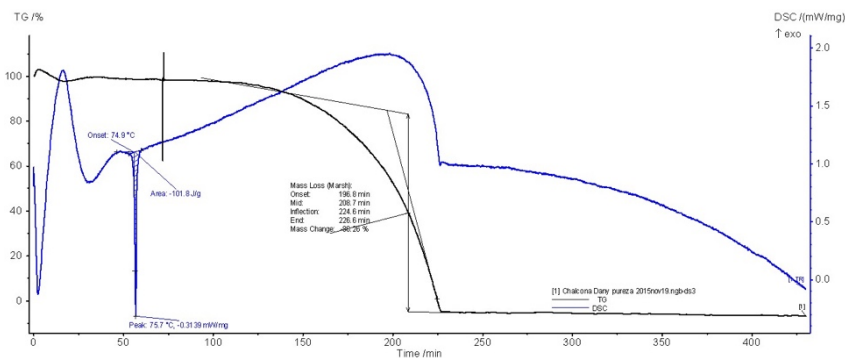
A calorimetria exploratória diferencial (DSC), mede a quantidade de energia envolvida nos processos físicos ou químicos de uma amostra que é submetida a um programa de temperatura controlada juntamente com um material de referência termicamente inerte, esta técnica fornece informações

sobre caracterização como: transição vítrea, temperatura e tempo de cristalização, ponto de fusão, calor específico, oxidação, estabilidade térmica e cinética de reação (DANIELS, 1973).

A 4-MC foi caracterizada termicamente através de DSC e TG (Figura 3.12). A curva de DSC demonstra um evento endotérmico, na faixa de temperatura de 74 °C a 77 °C, com um consumo de energia de 101,8 J g⁻¹, característico do processo de fusão da substância, em concordância com valores encontrados na literatura onde a temperatura de fusão varia de 75 a 76 °C (JOVTSCHIEFF, 1969). A curva de DSC demonstra também que a substância apresenta um T_{onset} de fusão em 74,9 °C. O processo de decomposição tem início na temperatura de 196,8° C e térmico em 230 °C. Apresenta também perda de massa de 88,26%.

A curva termogravimétrica (TG) apresenta um evento bem definido em 196,6 °C a 226,6 °C com perda de massa (Δm) de 88,26%, onde ocorre carbonização e eliminação do material carbonáceo (Figura 3.10).

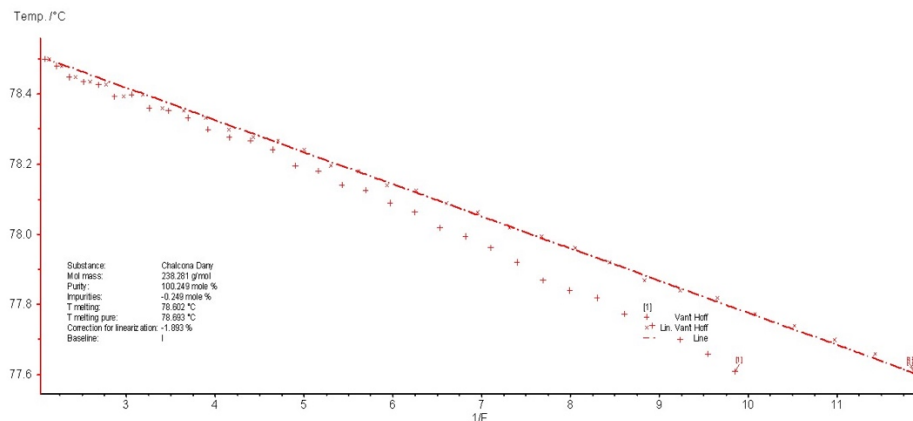
Figura 3.12: Curva DSC e TG da 4-MC, em atmosfera de N₂ a 1 °C min⁻¹.



Através da curva de DSC pode-se determinar a pureza da substância baseando-se na equação de Van't Hoff. A figura 3.13 apresenta o grau de pureza da substância em estudo aplicando-se a equação de Van't Hoff (Equação 1), onde pode-se observar um alto grau de pureza, com valor de 100,249 mol%. Esta curva também fornece outros dados de caracterização como a massa molar do composto (238,281 g/mol) e temperatura de fusão em ~78 °C.

Com base no resultado do ensaio percebe-se uma pureza satisfatória da substância, para que se obtenha resultados fidedignos nas análises de caracterização.

Figura 3.13: Curva de análise térmica da 4-MC com aplicação da equação de Van't Hoff.



3.3 Solubilidade

Na literatura não há relato sobre a solubilidade para este composto, sendo assim, a escolha dos solventes (água, etanol, metanol, diclorometano, acetonitrila e DMSO) se deu em função da necessidade de uma caracterização mais detalhada para auxiliar as próximas etapas do projeto, com interesse analítico e farmacotécnico.

No teste de solubilidade aparente, de acordo com as análises, o composto se mostrou praticamente insolúvel em água (10 mg em 100 mL de água), facilmente solúvel em álcool etílico e metílico (10 mg em 700 μ L), solúvel em DMSO e diclorometano (10 mg em 10 μ L) e ligeiramente solúvel em acetonitrila (1 mg em 1 mL).

No teste de solubilidade dinâmica, com metanol:PBS 60:40 v/v, quanto maior a temperatura, maior foi a solubilidade da chalcona no meio, obtendo-se os valores de solubilidade de 1,394; 1,562 e 2,084 μ g/mL nas temperaturas de 18, 25 e 37 °C, respectivamente.

A diluição da SE (inicialmente preparada a 100 μ g/mL em acetonitrila, sendo portanto facilmente solúvel neste solvente) em misturas de H₂O:ACN demonstrou que solubilidade da chalcona foi proporcional ao volume do solvente

orgânico, com valores de absorvância de 0,728; 0,703; 0,825; 0,905 e 0,921 para as diluições 9:1, 8:2, 5:5, 2:8 e 1:9 (H₂O:ACN), respectivamente, todas na concentração final teórica de 10 µg/mL. Estes resultados direcionaram o desenvolvimento da metodologia por CLAE.

Tendo caracterizado a estrutura química e as propriedades físico-químicas da 4-MC, foi então realizada a análise de sua estabilidade *in silico* e *in vitro*.

3.4 Predição *in silico*

A degradação química e estabilidade são fatores importantes em estudos de pré-formulação, as reações de degradação mais comuns são hidrólise e oxidação (por oxigênio do ar). Para prever a estabilidade ou o tipo de via de degradação de uma determinada molécula, algumas metodologias computacionais são utilizadas, para hidrólise e condições oxidantes são recomendados métodos ambientais que usam funções de Fukui, que permite prever a suscetibilidade em reações envolvendo transferência de elétrons, e para estabilidade de radicais de hidrogênio-abstraido, o método utilizado são os cálculos de energias de dissociação de ligação (BDE) (KIEFFER *et al.*, 2010; ANDERSSON *et al.*, 2014; LIENARD *et al.*, 2015).

No caso da 4-MC a função BDE foi utilizada para estimar as energias de abstração de hidrogênio, para estudar a auto-oxidação do composto. Todos os resultados estão apresentados na tabela 3.3. Também se utilizou a função Fukui, a qual demonstrou que átomos de hidrogênio dos carbonos C2 e C6 do anel de benzeno da chalcona apresentaram valores altos sendo as principais regiões de susceptibilidade à oxidação. No entanto, estes átomos de hidrogênio são estabilizados por ressonância e podem ter dificuldade em receber um elétron. Portanto, o mecanismo de transferência de elétrons provavelmente não está ocorrendo na oxidação da estrutura química da chalcona.

BDE é uma medida da força de ligação de uma ligação química, que é definida como a energia padrão da mudança quando uma ligação é quebrada por uma reação (BLANKSBY, ELLISON, 2003). O BDE é indicador de sítio primário de auto-oxidação de compostos orgânicos e é útil na previsão de estabilidade de fármacos (ANDERSSON *et al.*, 2014, LIENARD *et al.*, 2015).

Observando os baixos valores de BDE da estrutura (Tabela 3.3), as energias dos átomos de hidrogênio de ligação olefínica (anexo ao carbono α e β) revelam alta susceptibilidade oxidativa que caracteriza uma instabilidade nesta

região em ambiente oxidante. O hidrogênio ligado ao carbono localizado na posição C6 de ambos os anéis apresentaram valores baixos BDE em comparação com outros átomos dos mesmos anéis, indicando essas posições como as mais prováveis para a auto-oxidação. Os resultados calculados também sugerem que o radical metoxila é a região mais estável em todas as condições estudadas.

Tabela 3.3: Valores da função Fukui e títulos de energias de dissociação dos radicais (abstração de hidrogênio) de hidrogênio da estrutura 4-MC.

Átomos de hidrogênio	f^0	BDE (EH abstração) Kcal mol ⁻¹
H-C2	0.372129	103.9651
H-C3	0.363964	115.1199
H-C4	0.363139	114.5793
H-C5	0.364253	102.7451
H-C6	0.370338	101.5996
H-C α Olefin	0.357547	87.24826
H-C β Olefin	0.363882	93.24597
H-C2'	0.361054	106.3495
H-C3'	0.361372	109.2143
H-C5'	0.360638	107.2577
H-C6'	0.361677	105.4928
H1-Metoxila	0.352051	128.9337
H2-Metoxila	0.358678	128.9555
H3-Metoxila	0.351966	207.0838

Nas análises de predição *in silico* por fotodegradação utilizando-se o software Zeneth, algumas estruturas químicas foram elucidadas. Os resultados obtidos nesta análise mostram as possíveis vias de degradação que podem ocorrer com esta molécula, e estão descritas na Tabela 3.4.

Tabela 3.4: Possíveis estruturas químicas de produtos de degradação da chalcona 4-MC através de exposição à luz.

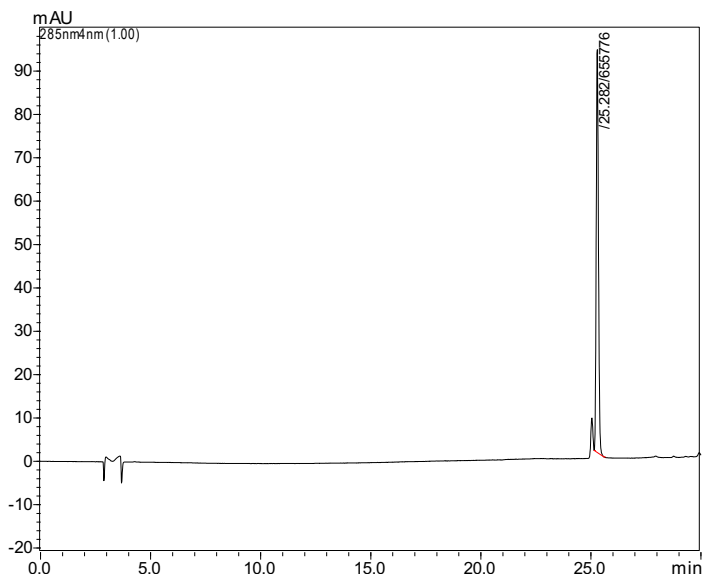
Nomenclatura da transformação	Estrutura Química	
Isomerização fotoquímica de alceno		
Hidratação de alceno		
Cicloadição fotoquímica de dois alcenos		
Oxidação de álcool em composto de carbonila		
Adição conjugada intermolecular de heteronucleófilos		
Oxidação benzílica a álcool ou cetona		
Reação aldol intramolecular		
Oxidação de carbono benzílico terciário em hidroperóxido		

3.5 Desenvolvimento de método analítico por CLAE-UV

A fim de estimar a pureza cromatográfica das amostras de chalcona sintetizadas e de monitorar os testes de degradação forçada foi desenvolvida uma metodologia por CLAE-UV, com base no estudo de solubilidade e perfil de absorção no UV da molécula.

Inicialmente foi empregado como fase estacionária uma coluna de fase reversa Luna Phenomenex® C18 (250 x 4,6 mm), temperatura de 35 °C, usando como fase móvel, uma mistura de acetonitrila:água (20:80 v/v), em um gradiente linear de 30 min até chegar a 100% de acetonitrila (gradiente 1), com fluxo de 1 mL/min. Foram injetados 20 µL da amostra a 10 µg/mL em metanol, resultando no cromatograma da Figura 3.14.

Figura 3.14: Perfil cromatográfico por CLAE-UV da 4-MC (10 µg/mL) no gradiente 1.



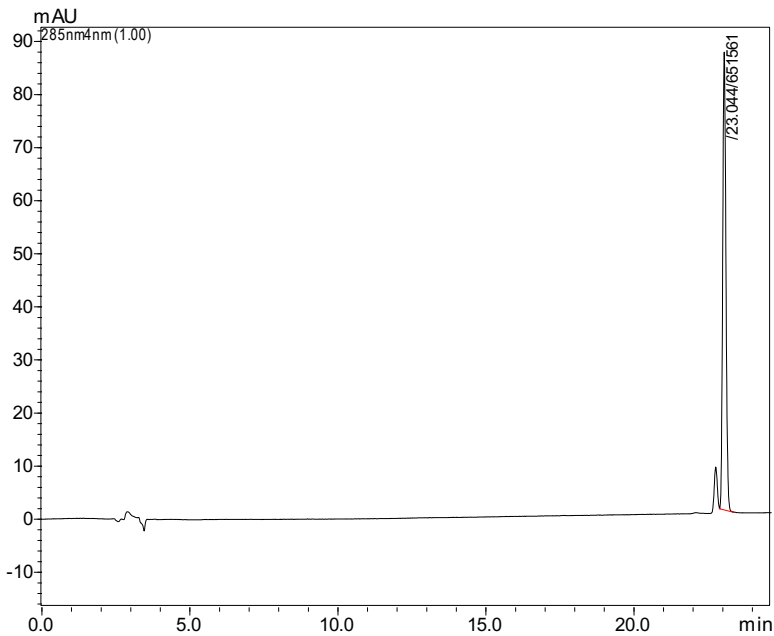
Tendo em vista a elevada retenção da chalcona, a qual eluiu num tempo de retenção de 25 min, com um pico anterior adjacente, foi aumentada a força da fase móvel iniciando a corrida com 70:30 (Água: ACN), segundo o gradiente 2 (Tabela 3.5).

Tabela 3.5: Gradiente 2 para análise da 4-MC por CLAE-UV.

Tempo (min)	Acetonitrila (%)	Água ultrapura (%)
0,01	30	70
21	100	0
31	30	70
35	30	70

O cromatograma obtido está representado na Figura 3.15, no qual se observou uma redução no tempo de retenção da chalcona, a qual eluiu em 23 min.

Figura 3.15: Perfil cromatográfico por CLAE-UV da 4-MC (10 µg/mL) no gradiente 2.

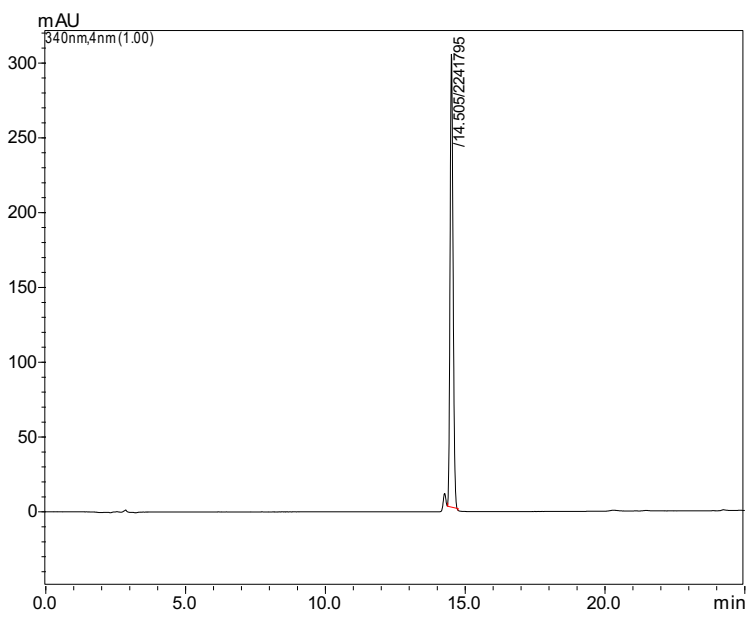


Visando diminuir ainda mais o tempo de eluição, foi testado um novo, gradiente 3 (Tabela 3.6), aumentando ainda mais a força de eluição no início da corrida, cujo resultado está na Figura 3.16, com eluição da chalcona em 14 min.

Tabela 3.6: Gradiente 3 para análise da 4-MC por CLAE-UV.

Tempo (min)	Acetonitrila (%)	Água ultrapura (%)
0,01	50	50
21	100	0
26	50	50
28	50	50

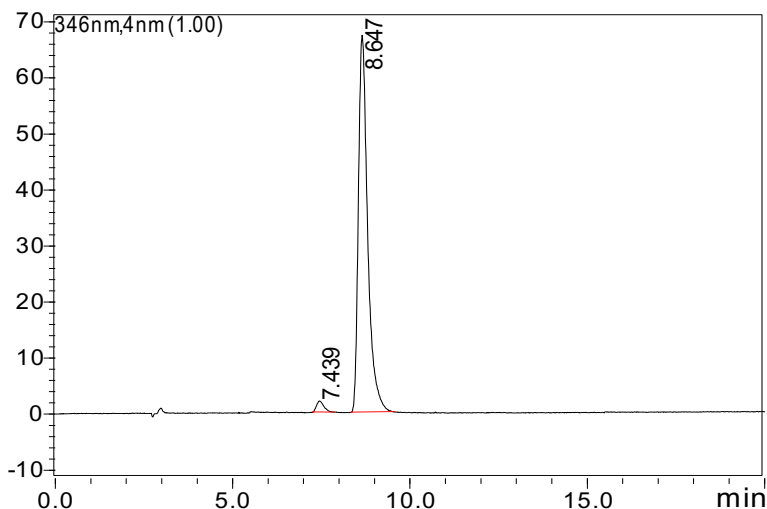
Figura 3.16: Perfil cromatográfico por CLAE-UV da 4-MC (10 µg/mL) no gradiente 3.



Porém, tendo em vista que o cromatograma continuava apresentando um pico com tempo de retenção muito próximo ao da chalcona e a análise ainda estava com um tempo prolongado, testou-se um novo sistema de solvente usando água: metanol (75:25) no modo isocrático, por 20 min.

Como resultado obteve-se o cromatograma apresentado na Figura 3.17. Nestas condições de análise, houve melhor resolução entre os picos e a chalcona apresentou um tempo de retenção de 8,6 min. Devido aos resultados obtidos, este sistema de solvente foi escolhido e posteriormente foi validado.

Figura 3.17: Perfil cromatográfico por CLAE-UV da 4-MC (10 µ/mL) no modo isocrático



3.5.1 Validação do método isocrático

A *International Conference Harmonization* (ICH) (2005) determina que a validação é necessária quando a metodologia analítica empregada não é oficial ou para novas substâncias onde nenhuma metodologia analítica foi aplicada e aconselha que as mesmas sejam adequadas para a detecção e quantificação de produtos de degradação. A validação analítica seguiu os protocolos segundo a RDC nº 166 (BRASIL, 2017) e segundo a ICH (2005).

O método mostrou seletividade adequada, com pureza do pico da chalcona de ~ 99% e a resolução entre os picos vizinhos foi de 2,01.

A metodologia mostrou ser linear no intervalo de concentração testado, de 5 – 30 µg/mL ((Figura 3.18). Através da análise de regressão linear, calculou-se a equação da reta $y = 26,316 x - 36,296$ com coeficiente de correlação (r) de 0,999 e coeficiente de determinação de (r^2) de 0,998. A distribuição aleatória dos resíduos deixados pelo modelo, representados graficamente na Figura 3.19, indicam aparente homocedasticidade dos dados.

Figura 3.18: Curva analítica da 4-MC, por CLAE-UV.

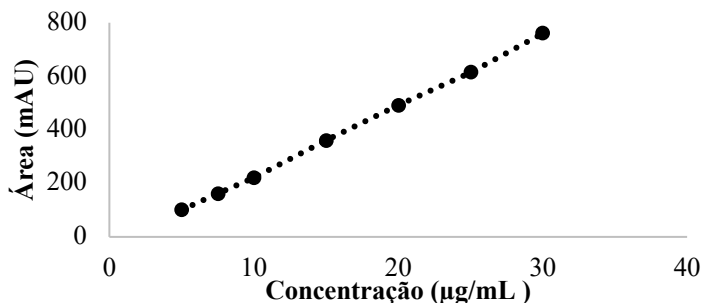
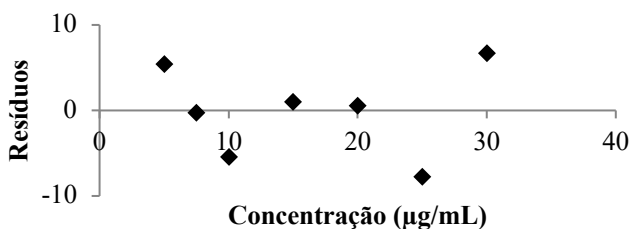


Figura 3.19: Gráfico de distribuição de resíduos da 4-MC.



A precisão do método foi determinada através da análise de seis réplicas da solução padrão de 4-MC na concentração de 10 µg/mL, nas mesmas condições e pelo mesmo analista, os resultados obtidos estão expressos na Tabela 3.7.

Através dos resultados obtidos o método utilizado para a análise da 4-MC apresentou-se preciso, visto que os coeficientes de variação foram inferiores a 2% (BRASIL, 2003).

Tabela 3.7: Determinação da variação da quantificação da 4-MC na concentração de 10 µg/mL no ensaio de repetibilidade.

Réplicas	Concentração (µg/mL)
1	10,12
2	10,11
3	9,97
4	9,98
5	10,00
6	10,00
Média	10,03
S	0,07
DPR (%)	0,68

3.5.2 Análise da fotoestabilidade por CLAE-UV

Nas análises iniciais por CLAE-UV, não foi observada a presença de produtos de degradação das amostras, tanto as expostas na luz visível quanto no UV, quando comparadas com as amostras controle (Figura 3.20).

Figura 3.20: Análises de fotodegradação por CLAE-UV, método isocrático, da 4-MC submetidas a intensidade de luz de: (a) UV 200 watts hora/m², (b) UV 400 watts hora/m², (c) amostra controle.

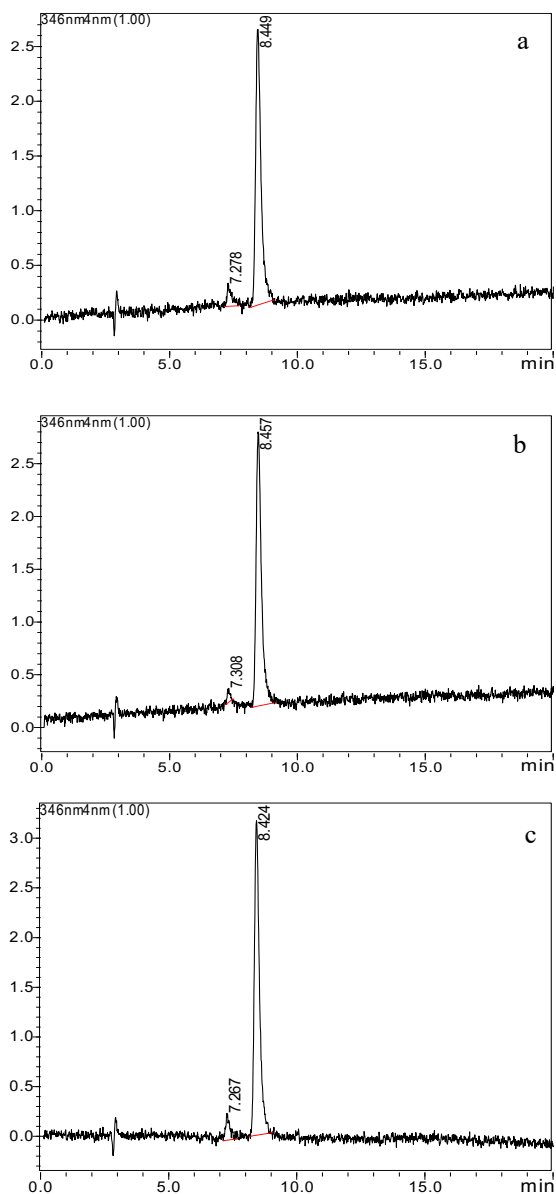
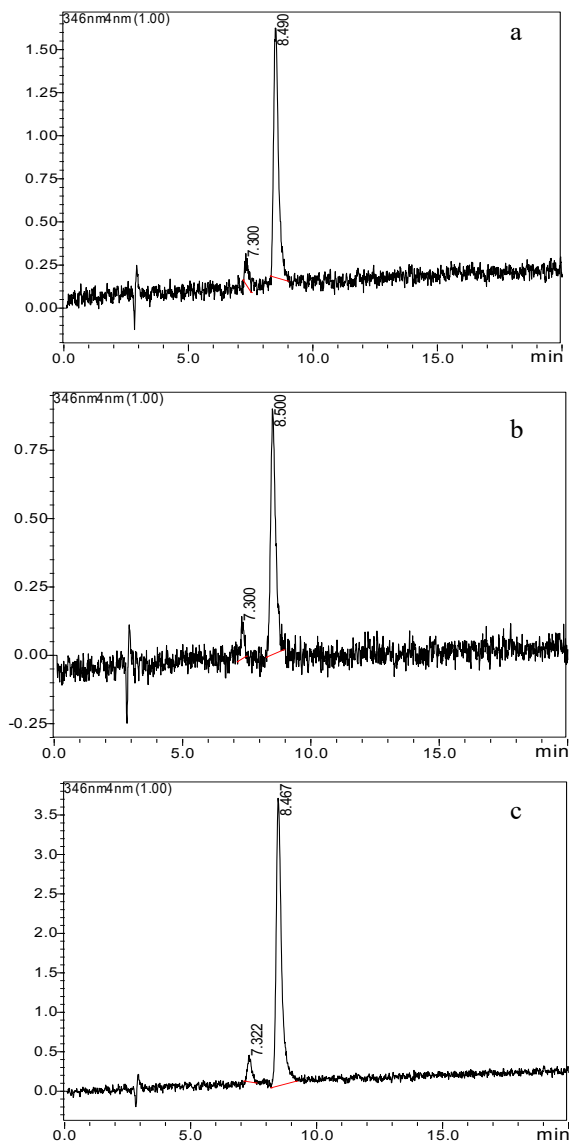


Figura 3.21: Análises de fotodegradação por CLAE-UV, método isocrático, da 4-MC submetidas a intensidade de luz de: (a) 1,2 milhões lux/h, (b) 2,4 milhões lux/h e (c) amostra controle.



Porém, as amostras expostas à radiação revelaram uma diminuição na área do pico do analito, indicando que houve degradação. O teor de 4-MC foi de 81,2; 69 e 65,4% para as amostras submetidas à luz UV controle, UV 200 e UV 400 watts horas/m², respectivamente. Já as amostras submetidas à luz visível apresentaram um teor equivalente a 93,5; 39,48 e 21,57% de chalcona para as amostras controle, 1,2 e 2,4 milhões de lux, respectivamente. Estes resultados indicam que a chalcona 4-MC é mais sensível à luz visível.

Devido este resultado, um novo gradiente foi testado para analisar estas amostras, utilizando-se um gradiente semelhante ao aplicado nas análises em UPLC-MS-MS, o qual apresentou os produtos de degradação.

Nesta análise pode-se observar a presença de 4 picos de degradação para as amostras submetidas a luz UV (Figura 3.22), os mesmos observados na análise por UPLC-MS-MS e CG-MS, e 5 picos de degradação para as amostras submetidas a degradação em luz visível (Figura 3.23). Estes dados preliminares, sugerem que o composto 4-MC é bastante sensível a luz UV e visível, necessitando de maiores cuidados na sua síntese, armazenamento e manipulação.

Porém, nesta análise, também pode ser observado que a amostra controle (Figura 3.22c e 3.23c), apresenta um pico suplementar em 13,39 min, indicando que o lote utilizado de chalcona, o qual foi sintetizado no ano de 2015 e analisado em 2019, embora tenha sido conservado em local apropriado, com baixa umidade e protegido da luz, sofreu degradação. Em análise macroscópica dos cristais, foi observada descoloração (dados não mostrados).

Figura 3.22: Análises de fotodegradação por CLAE-UV, método gradiente, da 4-MC submetidas a intensidade de luz de: (a) UV 200 watts hora/m², (b) UV 400 watts hora/m², (c) amostra controle.

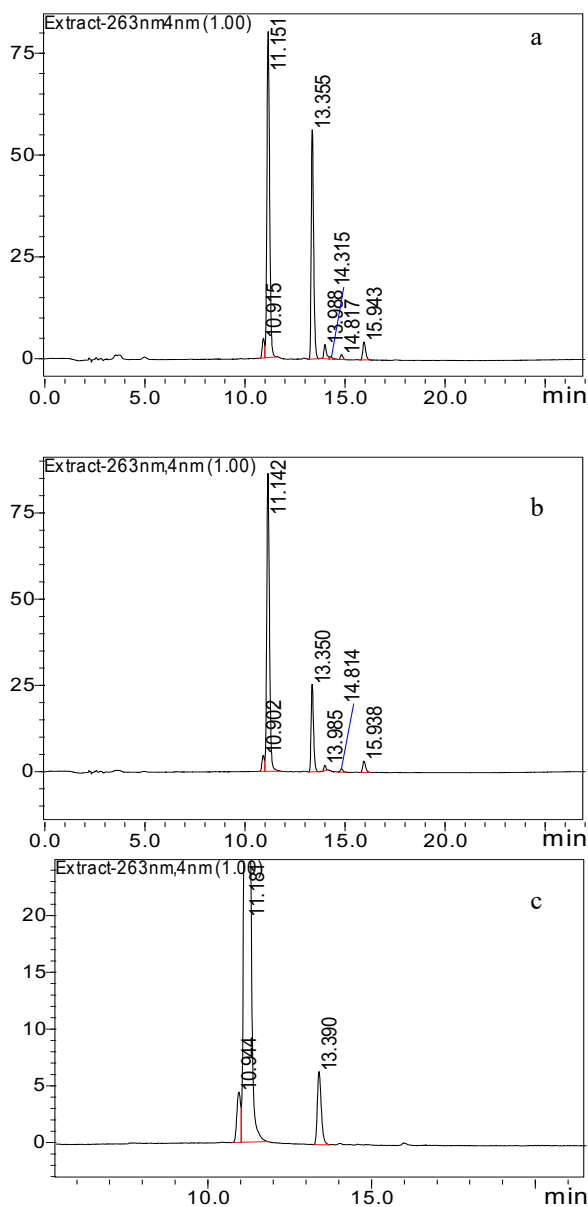
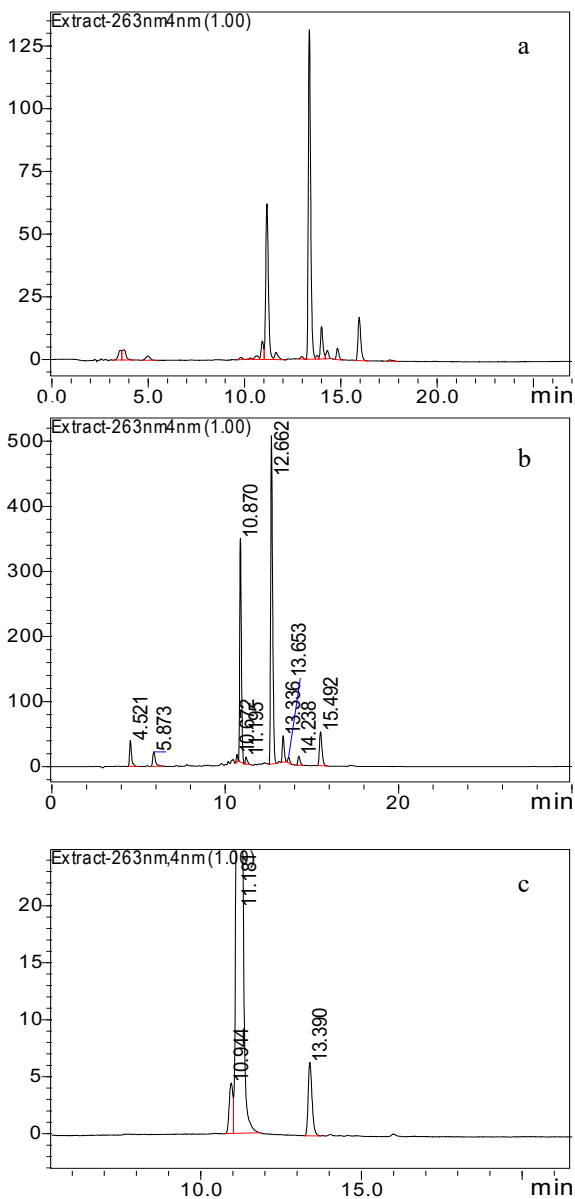


Figura 3.23: Análises de fotodegradação por CLAE-UV, método gradiente, da 4-MC submetidas a intensidade de luz de: (a) 1,2 milhões lux/h, (b) 2,4 milhões lux/h e (c) amostra controle.

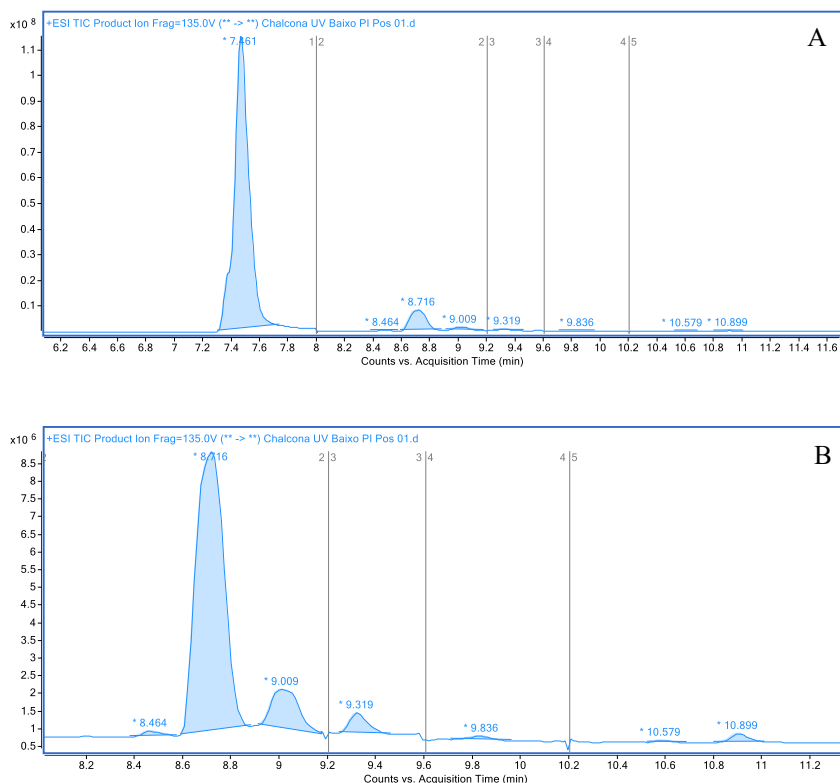


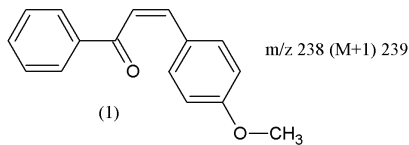
3.6 Análise da fotoestabilidade por UPLC-MSMS

Como não houve separação adequada dos produtos de degradação das amostras expostas à radiação por CLAE-UV no método isocrático, procedeu-se à análise por UPLC-MSMS o qual utiliza uma coluna com menor tamanho de partícula.

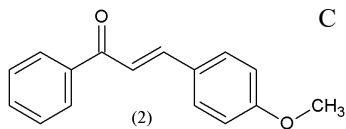
O perfil cromatográfico e possíveis estruturas de produtos de degradação da chalcona no modo SCAN positivo da amostra submetida à exposição à luz visível com intensidade de 1,2 milhões de lux.h (VIS baixo) são apresentadas na figura 3.24.

Figura 3.24: Perfil cromatográfico (A e B) e possíveis estruturas dos produtos de degradação da chalcona (C) em análise por UPLC-MS-MS no modo SCAN+ da amostra 4-MC submetida a luz visível com intensidade de 1,2 milhões de lux.h.

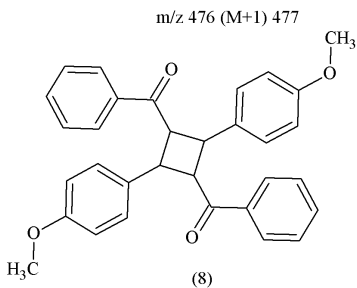
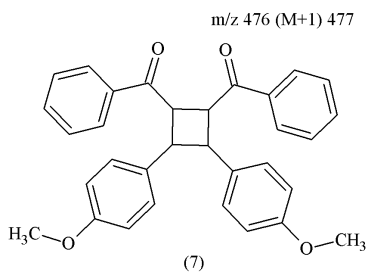
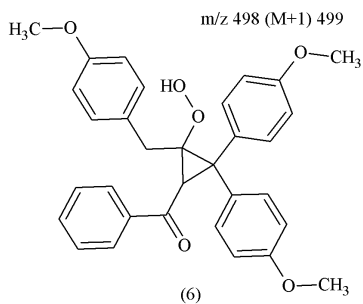
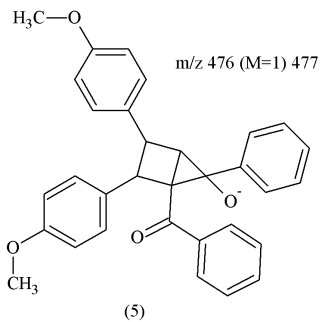
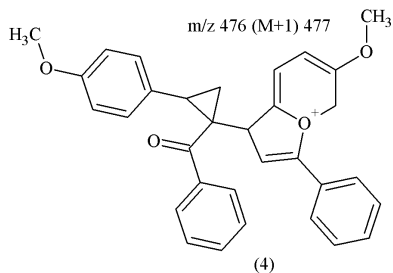
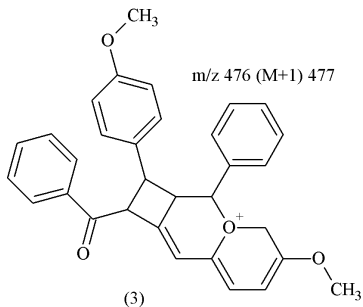




(2Z)-3-(4-methoxyphenyl)-1-phenylprop-2-en-1-one



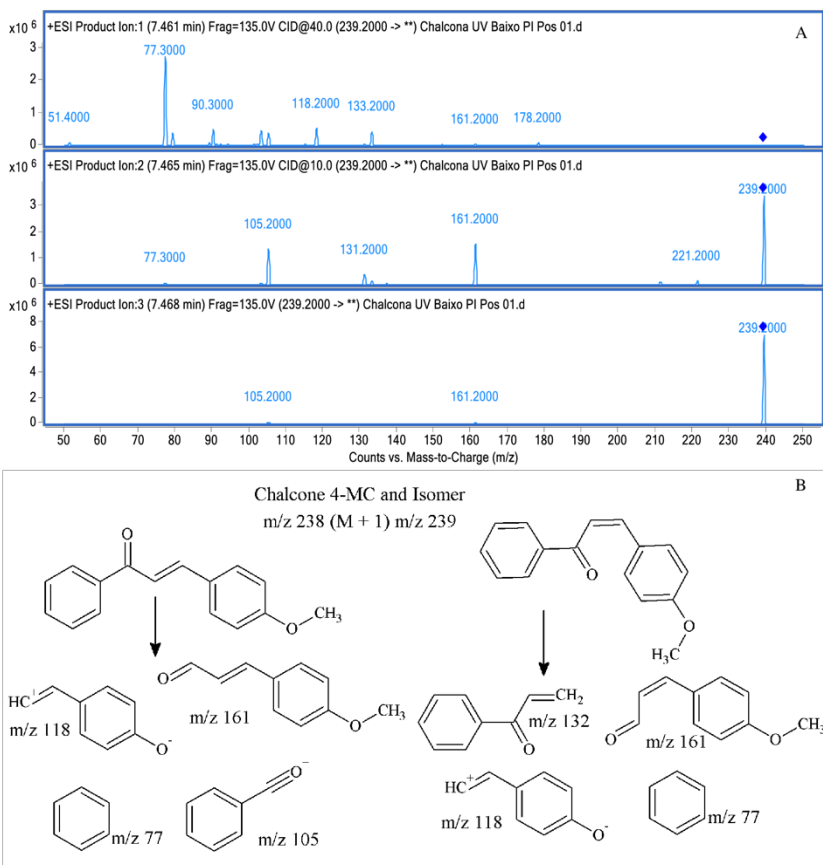
(2E)-3-(4-methoxyphenyl)-1-phenylprop-2-en-1-one



A análise por UPLC-MS-MS revelou dois picos aos 7.461 minutos, ambos com íons moleculares m/z 238, identificados como 4-MC e seu isômero

geométrico, como pode ser observado nos espectros de massa de íon produto (Figura 3.25). Alcenos conjugados podem sofrer uma mudança de configuração induzida pela luz de E para Z ou Z para E isômero. O grupo conjugador garante que a olefina tenha uma absorção apreciável na faixa quase UV do espectro (comprimento de onda tipicamente 300 nm ou mais) e pode ser um anel aromático, um grupo insaturado em ambos os lados do alceno ou um sistema estendido que consiste em de um alceno ou alcino que por si só é conjugado com outro grupo insaturado (na posição 2) (BAERTSCHI *et al.*, 2011).

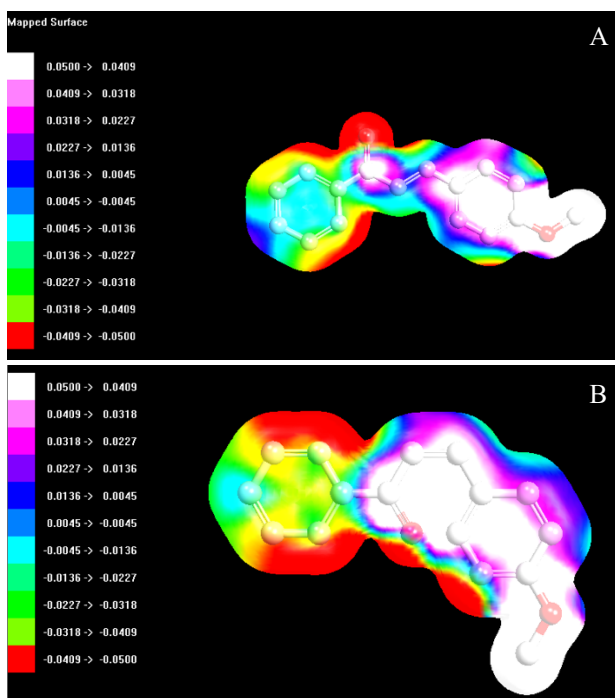
Figura 3.25: Espectro de massas da análise de LC-MS-MS no modo SCAN+ do pico em 7,461 minutos, da amostra de 4-MC submetida a luz visível com intensidade de 1,2 milhões de lux.h. (A); Fragmentação proposta de 4-MC e seu isômero (B).



A isomerização de chalconas fotoinduzidas tem sido descrita na literatura há algum tempo, devido ao fato desse grupo de compostos possuir alta sensibilidade à radiação UV e visível (BRAUN *et al.*, 2006). Mais estudos são necessários para determinar a estrutura dos isômeros formados.

Considerando a natureza apolar da fase sólida da coluna cromatográfica, o composto que apresentar o maior tempo de aquisição, naturalmente, é o que apresenta maior tempo de retenção e consequentemente, é aquele que apresenta maior afinidade pela coluna, sendo, portanto, mais apolar. Assim, procedeu-se à análise do momento dipolar dos dois isômeros (E e Z) atribuíveis à chalcona 1-fenil-3-(4-metoxifenil)-2-propen-1-ona, para identificar cada um dos isômeros no cromatograma, foram atribuídos a eles os respectivos percentuais de ocorrência, 16.52299152 debye para o isômero E (Figura 3.26 A) e 12.99349276 debye para o isômero Z (Figura 3.26 B) (SONZA, 2017).

Figura 3.26: Mapa de densidade eletrônica dos isômeros E e Z da chalcona 4-metoxi.



Os picos em 8.716 min (Figura 3.27), 9.009 min (Figura 3.28), 9.319 min (Figura 3.29), 10.57 min (Figura 3.30) e 10.89 min (Figura 3.31) são provavelmente dímeros formados na fotodegradação correspondente ao íon molecular de 476,2 Da, alcenos, alenos, cetenos e cumulenos que não são estereoquimicamente exigentes, podem sofrer cicloadição $[2 + 2]$ sob irradiação UV para produzir os derivados de ciclobutano. Pelo menos um dos alcenos deve ser substituído por um grupo conjugador (aril, alcenil, alcinil ou carbonil) para garantir que o alceno tenha uma absorção apreciável na faixa UV próxima do espectro (comprimento de onda tipicamente 300 nm ou mais).

O pico em 9.836 minutos corresponde ao íon molecular de 498,2 Da (Figura 3.32). Os alcenos ativados podem sofrer adição intermolecular por grupos nucleofílicos; os alcenos são ativados por um grupo de retirada de elétrons, como a cetona. A reação é catalisada pela base e o escopo da transformação é restrito a alcenos ativados por um grupo fortemente retraído e com pelo menos um hidrogênio na posição beta. Além disso, quinonas, quinonas metidas e compostos relacionados são excluídos; suas adições conjugadas são cobertas por outras transformações.

Todos os dados obtidos a partir dos espectros de massa dos produtos de degradação (Figura 3.27 - 3.32) estão de acordo com algumas estruturas previstas no teste *in silico* (Tabela 2). Algumas estruturas químicas foram propostas com base no estudo *in silico*, propondo a estrutura mais provável combinada com a fragmentação de íons do espectro de massa, mas estudos adicionais precisam ser realizados para provar esses produtos.

Figure 3.27. Espectro de massas da análise de LC-MS-MS no modo SCAN+ do pico em 8,716 minutos da amostra de 4-MC submetida a luz visível com intensidade de 1,2 milhões de lux.h. (A); Fragmentação proposta do dímero de 4-MC (B).

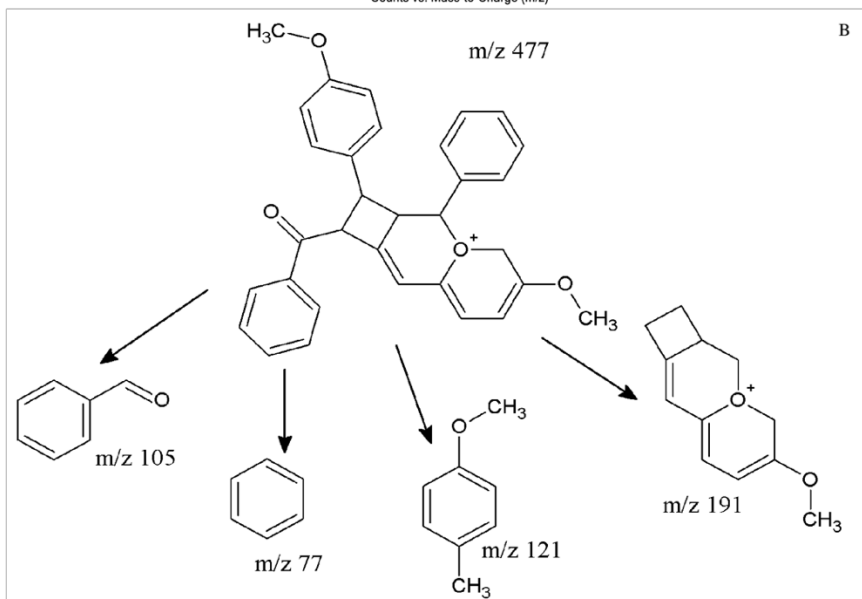
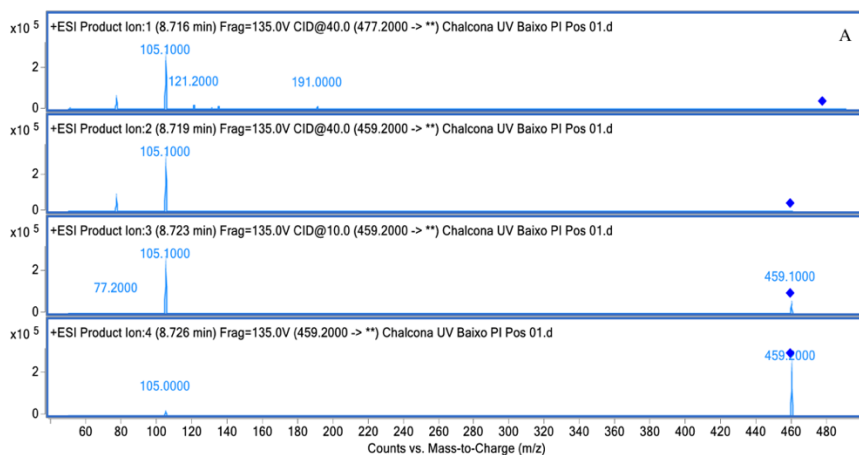


Figure 3.28. Espectro de massas da análise de LC-MS-MS no modo SCAN+ do pico em 9,009 minutos da amostra de 4-MC submetida a luz visível com intensidade de 1,2 milhões de lux.h. (A); Fragmentação proposta do dímero de 4-MC (B).

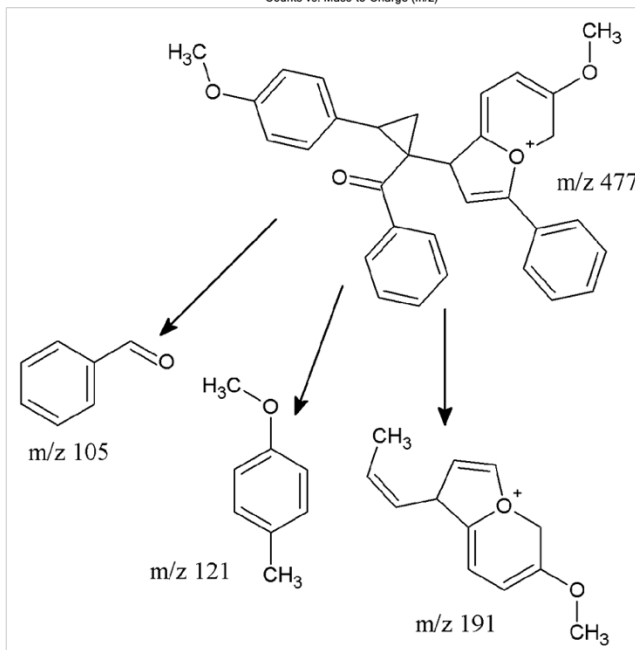
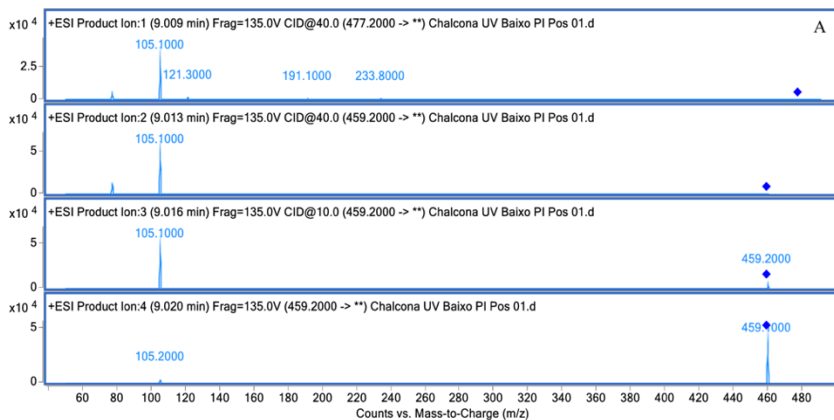


Figure 3.29. Espectro de massas da análise de LC-MS-MS no modo SCAN+ do pico em 9,319 minutos da amostra de 4-MC submetida a luz visível com intensidade de 1,2 milhões de lux.h. (A); Fragmentação proposta do dímero de 4-MC (B).

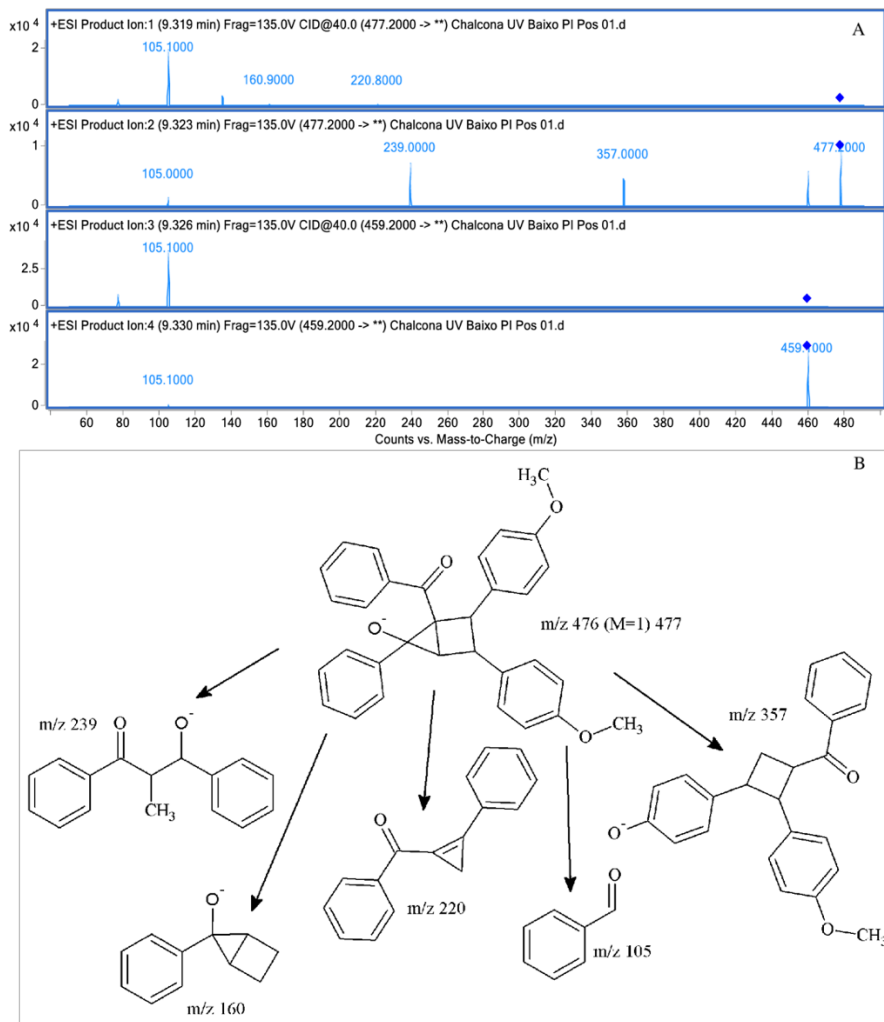


Figure 3.30. Espectro de massas da análise de LC-MS-MS no modo SCAN+ do pico em 10,579 minutos da amostra de 4-MC submetida a luz visível com intensidade de 1,2 milhões de lux.h. (A); Fragmentação proposta do dímero de 4-MC (B).

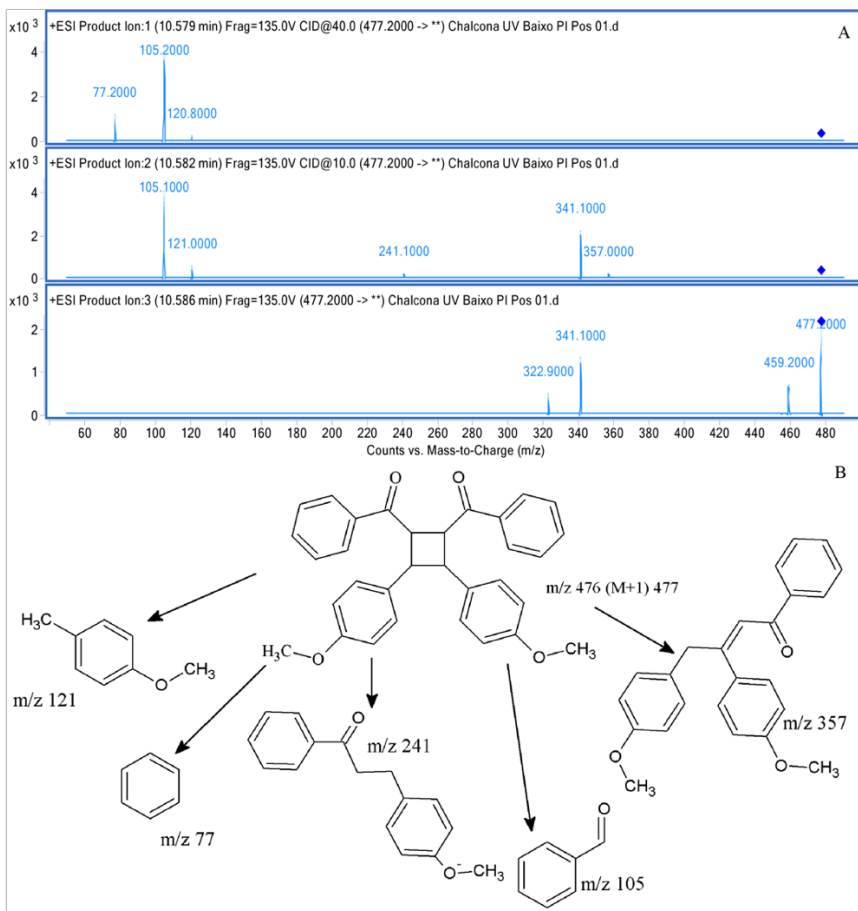


Figure 3.31. Espectro de massas da análise de LC-MS-MS no modo SCAN+ do pico em 10,899 minutos da amostra de 4-MC submetida a luz visível com intensidade de 1,2 milhões de lux.h. (A); Fragmentação proposta do dímero de 4-MC (B).

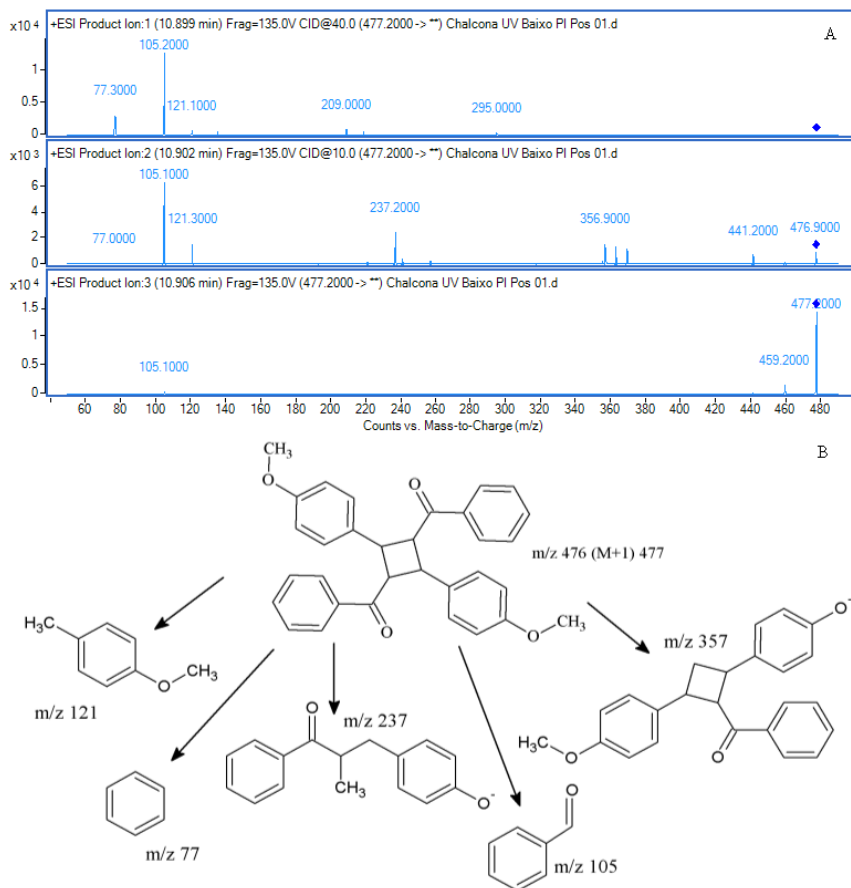
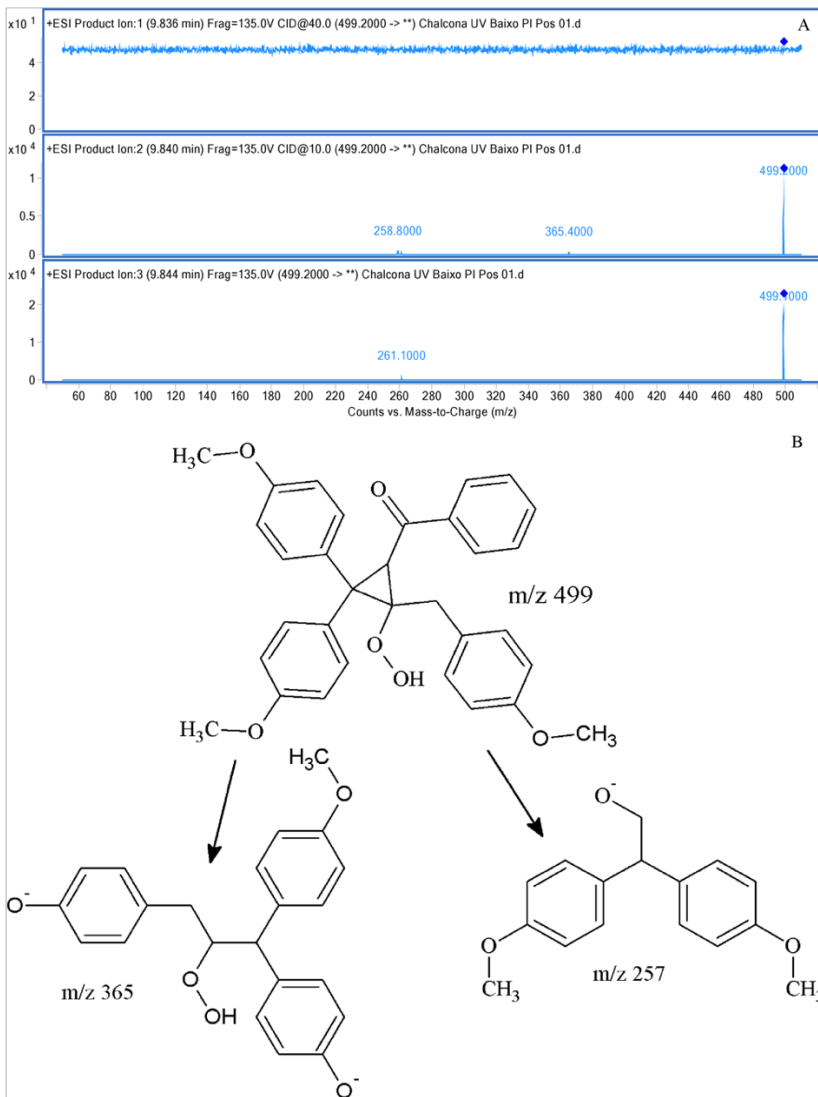


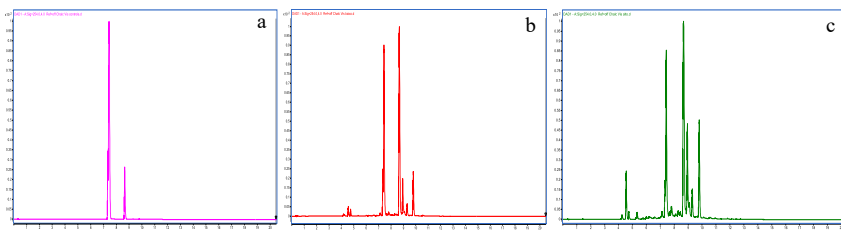
Figure 3.32. Espectro de massas da análise de LC-MS-MS no modo SCAN+ do pico em 9,836 minutos da amostra de 4-MC submetida a luz visível com intensidade de 1,2 milhões de lux.h. (A); Fragmentação proposta do dímero de 4-MC (B).



Após identificação do perfil do espectro de massas dos compostos de degradação, foi realizada uma comparação entre os perfis cromatográficos das amostras expostas a diferentes intensidades de luz. A Figura 3.33 traz o perfil cromatográfico da análise por UPLC-UV no comprimento de onda de 254 nm da 4-MC nas diferentes intensidades de luz visível comparando com a amostra controle, a qual não foi submetida à exposição de luz. Nesta análise observa-se a presença de ao menos 4 picos suplementares após exposição.

Através desta análise, pôde-se concluir que os produtos de degradação possuem grupos cromóforos, podendo ser detectados com o detector PDA. A presença do pico 3 (eluição próximo de 9 min) já na amostra controle (recoberta com papel laminado) pode ser indicio de uma degradação desta amostra, pois logo após a síntese este pico não era observado e a amostra mostrou sofrer modificação da cor (diminuiu a intensidade da cor amarelada mesmo armazenada em dessecador, nas condições ambiente).

Figura 3.33: Perfil cromatográfico por UPLC-UV no comprimento de onda de 254 nm da amostra de chalcona, onde (a) Vis controle, (b) Vis baixo e (c) Vis alto.



De acordo com os resultados observados nos cromatogramas, sugere-se que a exposição à luz visível é dose-dependente, aumentando a quantidade de produtos de degradação com o aumento da intensidade.

Assim como a luz visível, a 4-MC também apresentou sensibilidade frente à luz UV. Como pode ser observado na Figura 3.34, que apresenta o perfil cromatográfico da análise por UPLC-UV (254 nm) da 4-MC, submetida a diferentes intensidades de luz UV, comparando-se com a amostra controle.

Porém, esta análise não apresentou comportamento dose-dependente, obtendo-se picos de maior intensidade da amostra exposta à luz UV de menor intensidade. Estes dados sugerem que a chalcona apresenta certa sensibilidade a luz UV, permanecendo estável após certa exposição, ao contrário da luz visível, frente a qual demonstra grande instabilidade.

Estes dados são de suma importância para o desenvolvimento de novos fármacos, auxiliando no direcionamento da escolha do método de administração a ser utilizado e da forma farmacêutica mais adequada, neste caso é necessária a proteção frente a luz, para assegurar a estabilidade deste composto a longo prazo.

Nas análises por CG-MS das amostras degradadas (Figuras 3.35 e 3.36), pode-se observar a presença de alguns dos produtos de degradação observados anteriormente, porém não aparecem todos os produtos formados, possivelmente, estes produtos não são compostos voláteis, não podendo ser observados por este método.

Nesta análise, também pode ser observado que a amostra de menor incidência de luz UV (UV baixo) apresentou picos mais intensos, sugerindo maior concentração dos produtos de degradação, ou ainda que na maior dose de radiação os produtos de degradação possam ter sofrido uma degradação adicional.

As estruturas dos produtos de degradação sugeridas com base nos espectros de massa estão representadas na figura 3.24-B. Os dados obtidos nos espectros de massa mostram que o peso molecular de alguns produtos formados coincidem com algumas estruturas previstas no ensaio *in silico*, como é o caso das estruturas (2) Isômero da chalcona, (3) Cicloadição fotoquímica de dois alcenos, (4) Adição conjugada intermolecular de heteronucleófilos e (6) Cicloadição fotoquímica de dois alcenos. A estrutura química (5) foi proposta com base no estudo *in silico*, na tentativa de desenhar a estrutura mais provável, porém estudos adicionais precisam ser realizados para a comprovação da estrutura química destes produtos.

Figura 3.34: Perfil cromatográfico da análise por UPLC-UV no comprimento de onda de 254 nm da amostra de 4-MC, onde (a) UV controle, (b) UV baixo e (c) UV alto.

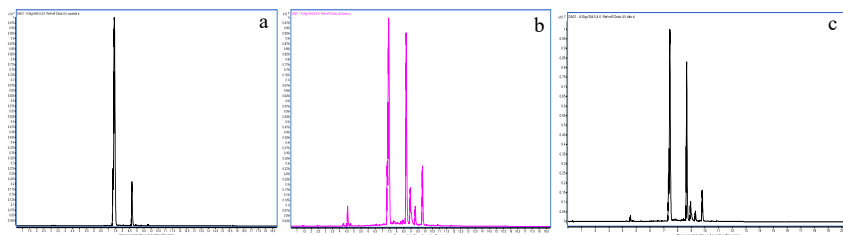


Figura 3.35: Sobreposição do perfil cromatográfico da 4-MC analisado por CG-MS, onde (a) UV controle, (b) UV alto e (c) UV baixo.

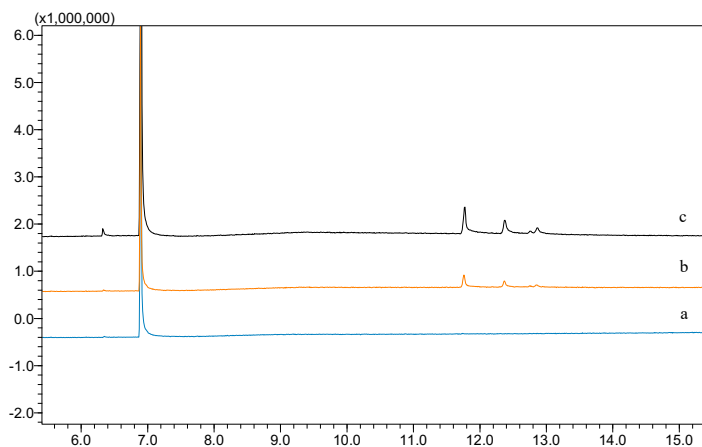
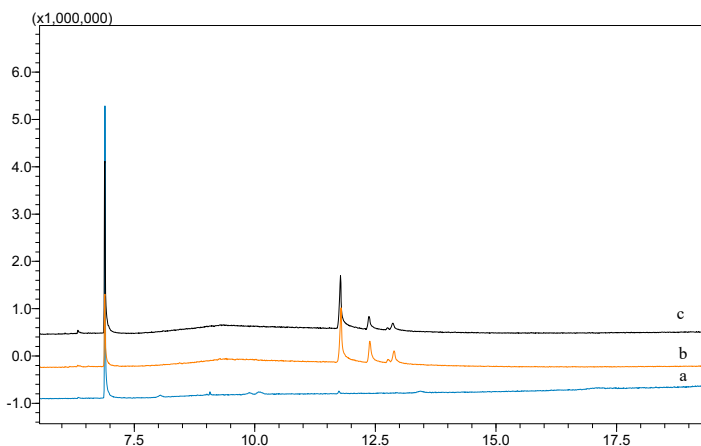


Figura 3.36: Sobreposição do perfil cromatográfico da 4-MC analisado por CG-MS, onde (a) VIS controle, (b) VIS baixo e (c) VIS alto.



De acordo com os resultados, o método por UPLC-MSMS foi indicativo de estabilidade pois mostrou boa resolução entre o pico do analito e dos produtos de degradação por fotoestabilidade.

4 Conclusões

Aspectos como pureza da molécula, características estruturais, físico-químicas e estabilidade de compostos são fatores de suma importância no desenvolvimento de um novo produto. Sendo assim foram empregados ensaios de pré-formulação para a chalcona 4-MC, para avaliar as características inerentes ao processo de desenvolvimento de sistema de liberação para este composto.

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que a chalcona foi sintetizada com elevado grau de pureza, tendo sua estrutura identificada por meios espectroscópicos e sua pureza comprovada por meio de RMN, análise térmica e CG-MS. Trata-se de um composto desafiador para a tecnologia farmacêutica, possuindo algumas características críticas para o desenvolvimento de um sistema de liberação de fármaco, como a baixa solubilidade e fotossensibilidade. A 4-MC possui sensibilidade a luz visível, tendo uma degradação de 22,14 e 56,35% a 1,2 e 2,4 milhões de lux/h, respectivamente, necessitando de maiores cuidados durante a síntese e manipulação e tornando necessário o desenvolvimento de sistemas que o protejam da luz e ao mesmo tempo melhorar a sua solubilidade, para que aumentem sua biodisponibilidade.

Estudos *in silico* foram essenciais para este estudo, pois possibilitaram verificar estruturalmente o local mais provável onde ocorre os processos de degradação. Nesta análise de predição observou-se que os átomos de hidrogênio dos C2 e C6 do anel de benzeno são as regiões mais suscetíveis à oxidação. Os hidrogênios do C6, de ambos os anéis, apresentaram valores baixos BDE em comparação com outros átomos dos mesmos anéis, indicando essas posições como as mais prováveis para auto-oxidação do benzeno. A predição de instabilidade via oxidação da molécula foi confirmada nos testes de fotoestabilidade, o qual apresentou 4 produtos de degradação. Sendo que as estruturas propostas para estes produtos na análise *in vitro* de fotoestabilidade coincidiram com algumas estruturas encontradas no ensaio de predição *in silico*, mostrando a eficiência e importância deste estudo.

Todos esses dados corroboram com o desenvolvimento de um sistema de liberação de fármaco eficaz e seguro para este fármaco e como consequência com o desenvolvimento de novos produtos.

CAPÍTULO IV

Avaliação toxicológica *in silico*, *in vitro* e *in vivo* da chalcona 4-metoxi

Este artigo será submetido ao periódico *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, fator de impacto 2,996.

Avaliação toxicológica *in silico*, *in vitro* e *in vivo* da chalcona 4-metoxi

Danyela Francine Benvenutti^a, Rogerio Corrêa^a, Lanfranco Barberini^b, Stefano Giovagnoli^b, Maurizio Ricci^b, Tania Mari Bellé Bresolin^a, Fellippe Ramos Wolff^a, Maria Verônica Dal Pastor^a, ^[1]^[1]_[SEP] José Roberto Santin^a

^a Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), P.O. Box 360,88302-202, Itajaí, SC, Brazil

^b Department of Pharmaceutical Sciences Università degli Studi di Perugia, Via del Liceo 1, 06123 Perugia, Italy

Resumo

A chalcona 4-metoxi (4-MC) é um composto muito promissor possuindo ação anti-inflamatória, osteogênica, entre outras, com indícios de atuação como inibidor de catepsina K. Apesar disso, pouco se sabe sobre seus mecanismos de ação e toxicidade. Estudos realizados com fármacos inibidores de catepsina K demonstraram efeitos tóxicos importantes, aumentando o risco de derrame, efeitos adversos demartológicos entre outros. Portanto, este trabalho buscou investigar, através de técnicas *in silico*, *in vitro* e *in vivo* os possíveis efeitos tóxicos da 4-MC. Os dados preliminares obtidos por análise toxicológica *in silico*, sugerem que a chalcona 4-MC não causa mutagenicidade com base em teste de AMES com coeficiente de similaridade maior que 0,70. Nos ensaios de toxicologia aguda e sub-crônica em camundongos pela via oral, não foram observadas reações tóxicas, danos renais ou cardiotoxicidade. Somente na dose de 2000 mg/kg houve efeito hepatotóxico. Esses dados obtidos sugerem a segurança deste candidato a insumo farmacêutico ativo (IFA) e servem de subsídio para um desenvolvimento racional de um novo fármaco, como alternativa segura aos inibidores de catepsina K.

1 Introdução

Chalconas são cetonas α,β -insaturadas que apresentam atividades terapêuticas comprovadas por diversos autores, destacando-se a ação anti-inflamatória (SHIH *et al.*, 2018), anticancerígena (MAHAPATRA *et al.*, 2015), osteogênica (ORTOLAN *et al.*, 2014; 2017) e quimiopreventiva (ORLIKOVA *et al.*, 2011). Pelo fato das chalconas apresentarem indícios de atuação como inibidores de Catepsina K, ressalta-se a importância de estudos de toxicidade, uma vez que este alvo apresenta interesse para a indústria farmacêutica e fármacos inibidores de Catepsina K, como o relacatib, o balicatib, o odanacatib e o ONO-5334 tiveram seus estudos clínicos suspensos pelo fato de causarem importantes efeitos colaterais (DUONG *et al.*, 2015).

Estudos toxicológicos são importantes durante a o desenvolvimento de novos fármacos pois proporcionam o entendimento das interações que ocorrem entre os fármacos e o organismo, possibilitando ao investigador conhecer os efeitos adversos, que podem ser desde irritações leves até lesões graves e permanentes de um órgão. Sendo assim, esse conhecimento reduz a probabilidade de uma nova molécula falhar nas etapas de estudos clínicos, que requerem elevado investimento, evitando riscos à saúde (OGA, 2008).

Para a análise de irritação, o ensaio de membrana corioalantoide (HET-CAM) é uma boa alternativa por apresentar muitas vantagens em comparação aos ensaios de toxicidade convencional, como o baixo custo, a facilidade de manipulação dos embriões, a possibilidade de monitoramento contínuo da resposta do hospedeiro e, acima de tudo, este ensaio é considerado um ensaio *in vivo* com a vantagem de, nos primeiros 12 dias de incubação do embrião de frango, não ser necessária a permissão do Comitê Nacional de Ética para realizar experimentos (MANCIOCCO *et al.*, 2011). Este ensaio é um método alternativo ao teste de Draize, de irritação ocular, realizado em animais.

Neste sentido, a fim de assegurar o uso e estabelecer os limites de doses seguros de uma substância, é necessário realizar ensaios toxicológicos pré-clínicos, tais como estudos *in silico*, *in vitro* e *in vivo*. A avaliação toxicológica empregando métodos computacionais pode auxiliar na elucidação do mecanismo de ação da substância, além de proporcionar a predição de possíveis reações de toxicidade da molécula. Aliado aos métodos *in silico*, a avaliação da toxicidade aguda, seguida de ensaios de doses repetidas (sub-agudo) por 28 dias (ANVISA, 2019) e avaliação da mutagenicidade empregando animais de experimentação fornece dados importantes que visam ao uso seguro de uma substância.

Tendo em vista todas essas necessidades, o objetivo deste trabalho foi avaliar os possíveis efeitos toxicológicos da chalcona 4-metoxi empregando ensaios *in silico*, *in vitro* e em animais. Estes dados contribuem para o estabelecimento de um novo insumo farmacêutico ativo (IFA), o qual apresenta potencial para ser incorporado em diferentes formas farmacêuticas, no tratamento de diversas enfermidades.

2 Metodologia

2.1 Ensaio de toxicologia *in silico*

A avaliação toxicológica *in silico* da chalcona 4-MC foi realizada utilizando o programa T.E.S.T – *Toxicity Estimation Software Tool*, versão 11.0 (<http://www.epa.gov/nrmrl/std/qsar/qsar.html>). Este programa é fornecido gratuitamente pela USEPA (*United States Environment Protection Agency*) e foi desenvolvido para permitir uma rápida estimativa da toxicidade, usando uma variedade de metodologias de QSAR. No programa T.E.S.T foram desenhadas e inseridas as estruturas dos compostos isolados. Uma vez introduzida a estrutura química do composto, a sua toxicidade foi estimada utilizando metodologias avançadas de QSAR. O composto foi submetido a análise toxicológica *in silico* utilizando a metodologia de hierarquia (*Hierarchical method*) que determinou os seguintes parâmetros: a capacidade mutagênica e carcinogênica do composto e o potencial toxicológico para a reprodução.

2.2 Análise do potencial tóxico da 4-MC em membrana corioalantoide (CAM)

O monitoramento do potencial tóxico da chalcona foi realizado através do ensaio da membrana corioalantoide de frango denominado HET CAM (*Hens Egg Test-Chorion Allantoic Membrane*) na Università Degli Studi di Perugia sob supervisão do prof. Lanfranco Barberini. Para o ensaio CAM, foi preparada uma solução de chalcona em PBS:DMSO a duas concentrações diferentes (1 e 10 μ M).

Primeiramente os instrumentos foram desinfetados em etanol 70%, em seguida os ovos de galinha branca fertilizados foram higienizados com etanol a 70% e incubados a 37 °C com umidade de 60% em uma incubadora de ovos.

No sétimo dia de incubação, foi colocado um Delrin® (E. I. du Pont de Nemours) na superfície da CAM, a casca foi novamente fechada com a mesma película protetora e o ovo novamente colocado na incubadora.

No oitavo dia de incubação (T0), foi realizado o tratamento da CAM com a amostra e o controle e o ovo colocado novamente na incubadora.

Nos dias 9 (T24) e 10 (T48) de incubação, foram avaliados os eventos macroscópicos e microscópicos da resposta angiogênica, em microscópio com

aumento de 6,5x, para a verificação do aparecimento de irritação e extravasamento das veias sanguíneas.

2.3 Animais

Para realização dos experimentos de toxicologia aguda foram utilizados ratos Wistar fêmeas, idade entre 2 a 3 meses, com peso médio de 150 a 200 g e para os experimentos de toxicologia sub-crônica foram utilizados camundongos Swiss machos e fêmeas, idade entre 2 a 3 meses, com peso médio de 25 a 35 g, provenientes do Biotério da Universidade do Vale do Itajaí. Antes de iniciar todos os experimentos, os animais permaneceram em adaptação pelo período de 3 dias, e durante o período experimental, foram mantidos em alojamentos de caixas de polipropileno específicas, sendo 05 o número máximo de animais por caixa. A cama utilizada nas caixas foi a maravalha, que foi substituída 03 vezes na semana (segunda, quarta e sexta-feira). Destaca-se que os animais foram mantidos em condições normais de biotério, com ciclo de luz, temperatura e umidade controlados, bem como acesso a alimento e água *ad libitum*. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal recomendados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e de acordo com a Lei nº 11.794 de 2008 da Constituição Federal. Ao final do experimento, os animais foram submetidos a procedimentos cirúrgicos para retirada de órgãos e coleta de sangue, recebendo anestésicos para completa sedação antes do processo. No que tange a questões éticas, o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-Parecer 035/18p) da Universidade do Vale do Itajaí.

2.4 Ensaio de toxicologia aguda

O estudo foi conduzido de acordo com o OECD (*Guidelines for testing chemicals* – teste número 420) (OECD, 2001) e aprovado no CEUA-UNUVALI (parecer 046/17). Para todo o experimento, foram utilizados ratos Wistar, fêmeas (n=16). Inicialmente, dois animais (n=2) previamente em jejum de 12 horas, receberam uma dose oral única via gavagem de chalcona 4-MC na concentração de 300 mg/kg. Após a administração, durante as primeiras 12 h, nos períodos de 15, 30 e 60 minutos e a cada 4 h os sinais tóxicos de caráter geral foram observados, sendo avaliados os seguintes parâmetros: atividade geral, frêmito vocal, irritabilidade, resposta ao toque, aperto da cauda, contorção, trem

posterior, tônus corporal, força de agarrar, ataxia, tremores, convulsões, estimulações, cauda em straub, hipnose, anestesia, lacrimação, ptoses, micção, defecação, piloereção, respiração, cianose. Os animais foram monitorados durante 48 h, quanto sua sobrevivência e início de qualquer sinal de toxicidade, sendo o início e a duração dos sintomas tóxicos observados e registrados sistematicamente.

Se os primeiros animais não demonstrassem nenhum sinal de toxicidade, sobrevivendo pelas 48 h, dois outros animais, ratos Wistar fêmea (n=2) receberiam uma dose elevada de chalcona 4-MC (2000 mg/kg), sendo observado da mesma forma por 48 h.

Se, estes outros animais também sobrevivessem pelas 48 h após a administração da dose elevada de 4-MC, dar-se-ia continuidade ao experimento com ratos Wistar fêmea (n=12), que receberiam a dose de 2000 mg/kg de 4-MC cada, monitorando-os por 12 dias, para observar o tempo de sobrevivência e sinais tóxicos. Durante este período, o peso corporal dos animais foi aferido e registrado. Ao final dos experimentos, os animais foram anestesiados e eutanasiados por meio de deslocamento cervical e o sangue coletado para análise bioquímica onde foram avaliados os parâmetros bioquímicos alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e parâmetros de função renal (ureia, creatinina) (OECD 407, 1995).

2.5 Ensaio de toxicologia sub-crônica

Para realização desta metodologia, camundongos Swiss de ambos os sexos (n=50, sendo 25 machos/25 fêmeas), foram tratados por via oral através de gavagem com chalcona 4-MC ou veículo (água), durante 30 dias, seguindo diretrizes da OECD *Testing Chemicals* Diretriz 407 (OCDE, 2008) e aprovado no CEUA-UNUVALI (parecer 035/18p). Os animais foram divididos em 05 grandes grupos (n=10). Os grupos 1 a 4, receberam chalcona 4-MC nas doses de 250, 500, 1000 e 2000 mg/kg, respectivamente, enquanto o grupo 5 recebeu solução veículo (salina), oralmente, uma vez a cada dois dias, durante 30 dias. O horário de administração do extrato foi padronizado para minimizar a variação biológica entre os animais durante o estudo.

Durante o tratamento, foram observados e monitorados sinais de toxicidade, mudanças no comportamento, consumo alimentar, ingestão hídrica e mortalidade. Assim como foram observados ao longo do estudo a resposta à dor,

tremores, convulsões, reflexos, micção, salivação e cor da pele. O peso corporal dos animais foi aferido semanalmente.

2.5.1 Análise bioquímica e histológica

Ao final do estudo, após 30 dias, os animais foram anestesiados utilizando solução de cloridrato de xilasina (10 mg/kg, i. p.) e cloridrato de quetamina (70 mg par/kg, i.p.). Após completa anestesia dos animais, foi realizado a retirada de sangue pela artéria mesentérica superior para realização de exames bioquímicos. No sangue foram avaliados parâmetros bioquímicos alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e parâmetros de função renal (ureia, creatinina) (OECD 407, 1995).

Após a coleta do sangue, foram eutanasiados através da técnica de deslocamento cervical para retirada dos órgãos. Foram coletados pulmões, rins, fígados e corações para avaliação das características macroscópicas. Para avaliação histológica, os órgãos vitais (coração, rins e fígado) foram devidamente armazenados em solução de formol 10% e encaminhadas para produção das lâminas histológicas. As lâminas obtidas foram submetidas a coloração, para posterior análise.

2.6 Análise estatística

Os resultados serão expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) e analisados estatisticamente pela análise de variância com comparações múltiplas (ANOVA). Os dados serão analisados no programa Excel, admitindo como significativamente estatístico o $p < 0,05$.

3 Resultados e Discussão

3.1 Análise toxicológica *in silico*

Análises foram obtidas pelo software TEST (*Toxicity Estimation Software Tool*).

Estas análises mostraram que o composto 4-MC não apresenta risco de causar mutagenicidade, com base em teste de AMES (*Toxicity Benchmark*), o resultado foi negativo, apresentando um coeficiente de similaridade maior que 0,70.

Na predição de toxicidade para o desenvolvimento (reprodução), o 4-MC, os dados não são relevantes, resultando num coeficiente de similaridade baixo. A similaridade do teste foi com base nos seguintes compostos: fenindiona, que tem ação anticoagulante e feniltoloxamina, que atua como inibidor de receptores H1.

3.2 Análise de potencial tóxico da 4-MC em membrana corioalantoide (CAM)

A fotografia das membranas corioalantoides da 4-MC nas concentrações de 1 e 10 μM em DMSO 0,12% e amostra controle em PBS/DMSO 0,12% (Figura 4.1) demonstra uma provável desnaturação das proteínas de CAM, pois tornaram a superfície do anel opacas. No entanto, não se observou atividade inflamatória, hemorragias ou neoangiogênese após a remoção do anel de Delrin®. O anel Delrin® foi utilizado para delimitar a área de contato da 4-MC e ajustar a concentração do composto no local, facilitando a visualização da ação do composto na membrana corioalantoide. Na tabela 4.1, encontram-se os parâmetros avaliados nesta análise e seus resultados.

Sugerindo-se que a chalcona 4-MC é compatível com terapias que visam o tratamento em mucosas ou regeneração tecidual, sendo seguro seu uso em *scaffolds* para regeneração óssea.

Figura 4.1: Fotografia das membranas corioalantoide tratadas com as amostras contendo chalcona 1 e 10µM em DMSO 0,12% e amostra controle (PBS/DMSO 0,12%), utilizando lente de ampliação de 6,5x.

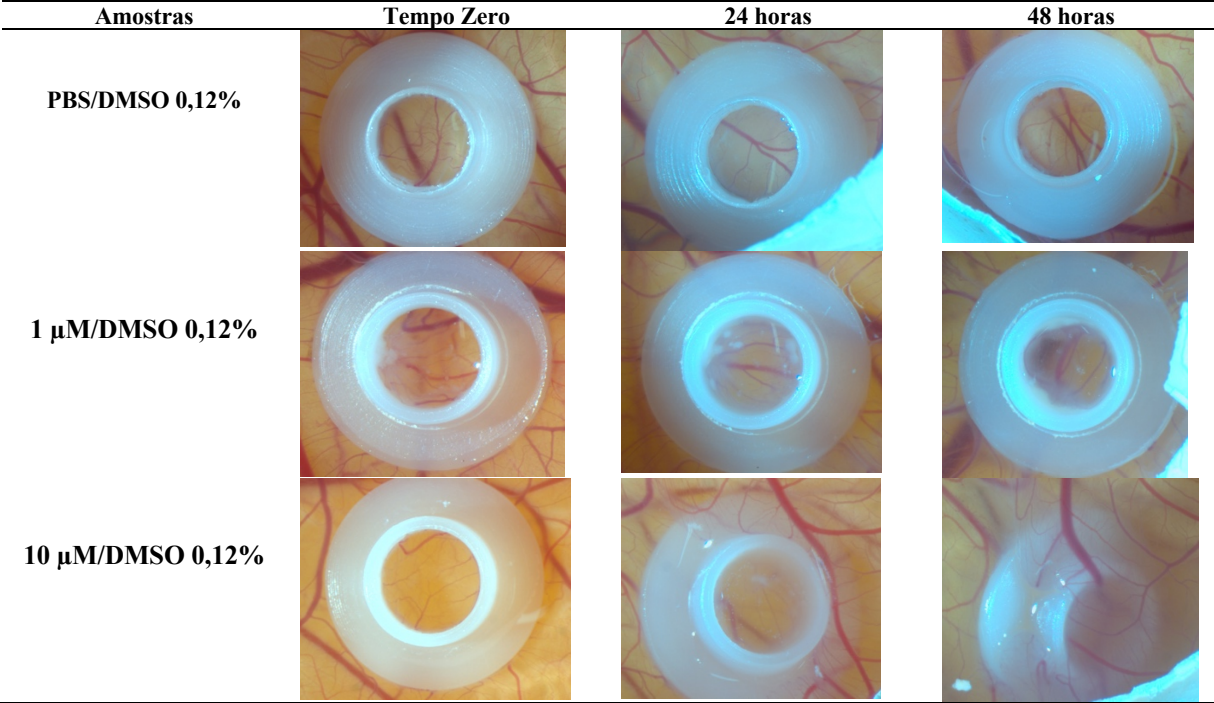


Tabela 4.1: Parâmetros das membranas corioalantoides tratadas e controle.

Embrião	Amostra	Volume	Sobrevivência Embrião			Efeito nos vasos sanguíneos
			T0h	T24h	T48h	
1	Mortos após tratamento					
2	CH 1μM + DMSO 0.012%	20 μL	S	S	S	
3	CH 1μM + DMSO 0.012%	20 μL	S	S	S	
4	CH 1μM + DMSO 0.012%	20 μL	S	S	S	
5	CH 1μM + DMSO 0.012%	20 μL	S	S	S	Pequeno sangramento, não letal
6	CH 10μM + DMSO 0.12%	20 μL	S	N	N	
7	CH 10μM + DMSO 0.12%	20 μL	S	S	S	
8	Mortos após tratamento					
9	CH 10μM + DMSO 0.12%	20 μL	S	S	S	
10	CH 10μM + DMSO 0.12%	20 μL	S	S	N	
11	PBS + DMSO 0.12%	20 μL	S	S	S	
12	PBS + DMSO 0.12%	20 μL	S	S	S	
13	PBS + DMSO 0.12%	20 μL	S	S	S	
14	PBS + DMSO 0.12%	20 μL	S	N	N	
15	PBS + DMSO 0.012%	20 μL	S	S	S	
16	PBS + DMSO 0.12%	20 μL	S	S	S	
17	PBS + DMSO 0.12%	20 μL	S	S	S	
18	PBS + DMSO 0.12%	20 μL	S	S	S	

Legenda: (S)= embriões que sobreviveram; (N)= embriões que não sobreviveram.

A CAM é transparente e amplamente vascularizada, sendo que a vascularização é um passo importante para a nova regeneração tecidual, portanto, com o ensaio CAM, foi possível monitorar os efeitos da 4-MC nos vasos sanguíneos e a mesma não apresentou nenhum sinal de toxicidade. Geralmente, a biocompatibilidade e a ausência de toxicidade de uma molécula, ou de uma

formulação, resultam, neste ensaio, na ausência de hemorragias, vasos fantasmas, neoangiogênese ou outras reações adversas.

3.3 Chalcona 4-MC não provoca alterações toxicológicas agudas

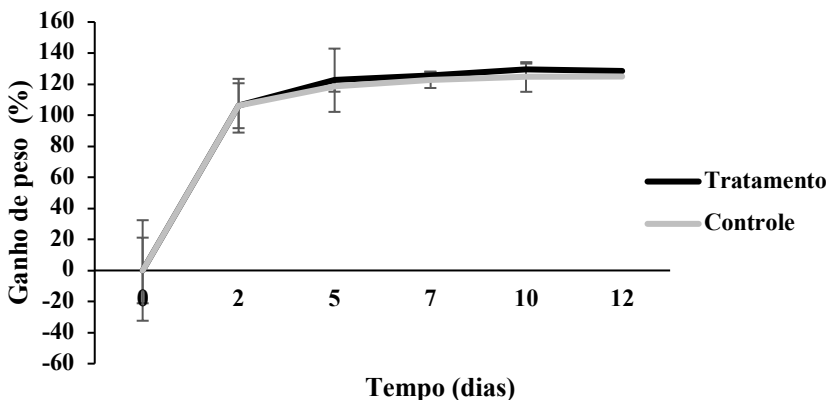
Nesta análise os animais que receberam as primeiras doses v.o. de 300 mg/kg e 2000 mg/kg não demonstraram nenhum sinal de toxicidade. Todos os animais sobreviveram nas primeiras 48 h. Com isso, se deu prosseguimento na análise de toxicologia aguda para avaliação de 12 dias.

Nos 12 dias seguintes, os animais foram monitorados a cada 2 dias quanto ao comportamento, variação de peso e alimentação. Não foi observado: irritabilidade, resposta ao toque, contorção, alterações no trem posterior ou tônus corporal, tremores, convulsões, movimento de straub, hipnose, sinais de anestesia, aumento ou diminuição de defecação, piloereção ou cianose.

Alterações de peso corporal e de peso relativo dos órgãos é um índice simples e sensível de toxicidade após exposição a substâncias potencialmente tóxicas (STANLEY *et al.*, 2005).

Quanto à variação de peso acumulado durante os 12 dias do experimento, não foi observado variação anormal (Figura 4.2).

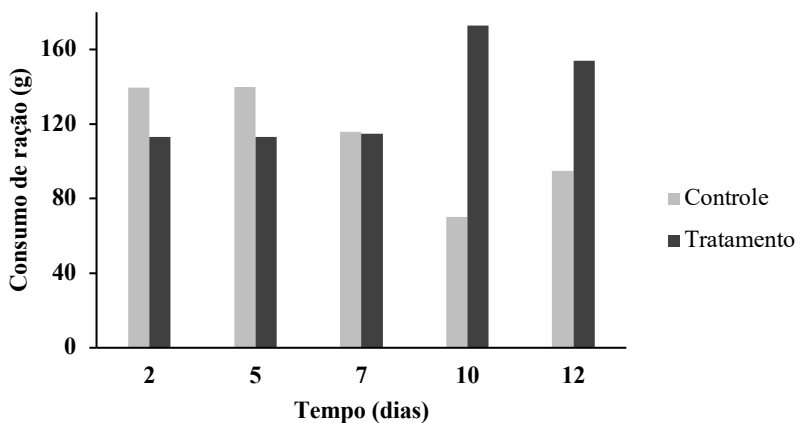
Figura 4.2: Parâmetros de variação de peso acumulado da análise toxicológica aguda do composto 4-MC (2000 mg/kg v.o; n=12).



Os resultados obtidos mostram um consumo de ração semelhante ao grupo controle no início do experimento e uma mudança no hábito dos animais

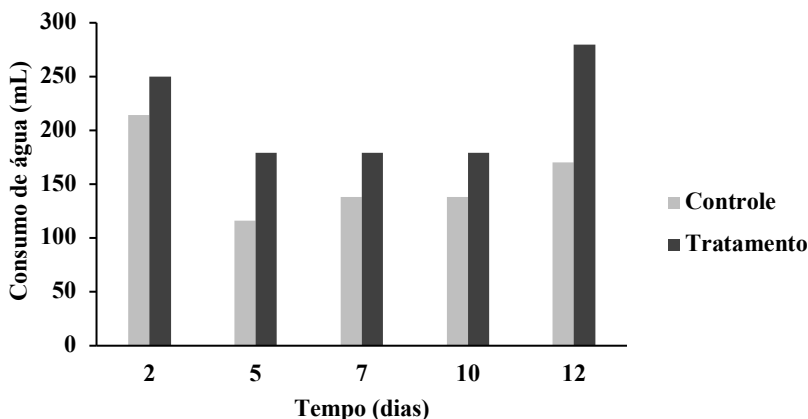
após 10 dias de tratamento com um consumo maior para o grupo tratado com chalcona em comparação com o grupo controle (Figura 4.3).

Figura 4.3: Parâmetros de variação de consumo de ração da análise toxicológica aguda do composto 4-MC (2000 mg/kg v.o; n=12).



Nos dados obtidos de variação de consumo de água, mostram nos animais tratados com a chalcona 4-MC um consumo maior de água maior que o grupo controle, com um aumento de consumo nos últimos 2 dias de análise em comparação com o grupo controle (Figura 4.4).

Figura 4.4: Parâmetros de variação de consumo de água da análise toxicológica aguda do composto 4-MC (2000 mg/kg v.o; n=12).

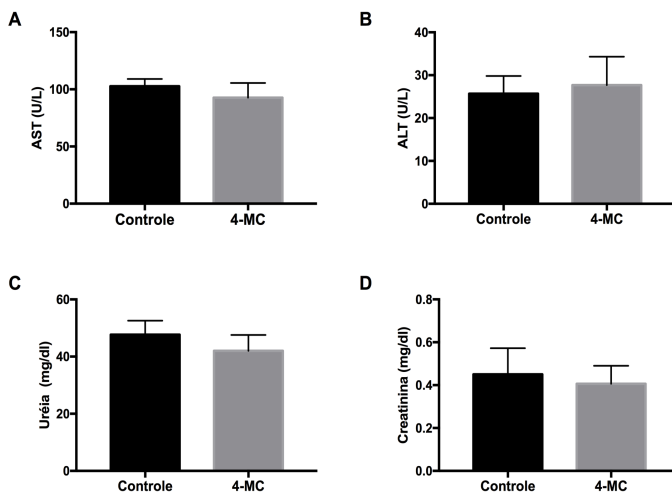


Os dados obtidos mostraram que a chalcona 4-MC não afetou o peso dos animais, sugerindo que este composto não impede o crescimento de ratos, e não promove mudanças significativas na ingestão de alimentos e água, indicando metabolismo normal e condição de saúde normal dos animais tratados (Figuras 4.2, 4.3 e 4.4).

Após 12 dias, os animais foram anestesiados, o sangue foi coletado, para avaliação da função hepática e renal (Figura 4.5), de acordo com os resultados não foram observadas alterações significativas destes dois parâmetros quando comparados com a amostra controle, indicando que a chalcona 4-MC não provoca alterações toxicológicas aguda nestes dois órgãos e posteriormente foram eutanasiados com deslocamento cervical.

De acordo com análises estatísticas ANOVA, não houve significância nos resultados obtidos em todas as amostras em comparação com grupo controle. Sugerindo ausência de toxicidade aguda, em relação aos parâmetros analisados.

Figura 4.5: Parâmetros de avaliação de função hepática (AST e ALT) e função renal (Uréia e Creatinina), da análise toxicológica aguda do composto 4-MC.



Além disso, o exame macroscópico não revelou quaisquer lesões, alterações de coloração ou patológicas de órgãos vitais que poderiam ser atribuídas ao tratamento com 4-MC, e o mesmo, não produziu qualquer alteração anormal nos pesos relativos ou absolutos dos órgãos, como pode ser observado na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Efeitos da chalcona 4-MC no peso de órgãos de ratos. Os animais foram tratados oralmente com água destilada (controle) e chalcona 4-MC (2000 mg/kg). Valores expressos como média \pm Desvio padrão (n = 3).

Órgãos		Tratamento	
		Controle	Chalcona 4-MC
Fígado	Absoluto	8,98 \pm 1,38	8,80 \pm 0,87
	Relativo	3,83 \pm 0,65	3,87 \pm 0,45
Rim direito	Absoluto	1,11 \pm 0,08	1,35 \pm 0,30
	Relativo	0,47 \pm 0,03	0,59 \pm 0,10
Rim esquerdo	Absoluto	1,14 \pm 0,08	1,14 \pm 0,09
	Relativo	0,48 \pm 0,03	0,50 \pm 0,02
Baço	Absoluto	0,73 \pm 0,12	1,01 \pm 0,21
	Relativo	0,31 \pm 0,04	0,44 \pm 0,08
Coração	Absoluto	1,01 \pm 0,34	1,36 \pm 0,60
	Relativo	0,43 \pm 0,14	0,60 \pm 0,08
Pulmão	Absoluto	1,16 \pm 0,10	1,12 \pm 0,49
	Relativo	0,49 \pm 0,05	0,49 \pm 0,014

3.2 Análise toxicológica sub-crônica

A avaliação da toxicidade sub-crônica da 4-MC é fundamental para a aplicação na terapia de regeneração bem como visando o futuro emprego deste candidato a IFA em outras vias de administração e formas farmacêuticas, tendo em vista seu potencial como inibidor de catepsina k, a ser comprovado. Antes de desenvolver um sistema de liberação para o composto que seja biocompatível para a regeneração do tecido ósseo, é crucial conhecer suas características físico-químicas e toxicidade (RIBATTI *et al.*, 2006).

Nesta análise, no decorrer dos 30 dias, os animais não demonstraram nenhum sinal de toxicidade e todos sobreviveram.

Durante toda a análise, não foram observados sinais tais como: irritabilidade, resposta ao toque, contorção, alterações no trem posterior ou tônus corporal, tremores, convulsões, movimento de straub, hipnose, sinais de anestesia, aumento ou diminuição de defecação, piloereção ou cianose.

Nos dados coletados de variação de peso (Figura 4.6) e água (Figura 4.8), pode ser observado que a chalcona 4-MC não apresentou alterações significativas nestes parâmetros, no consumo de ração (Figura 4.7), pode ser observado um aumento de consumo em todos os grupos entre os dias 19 e 26 de análise para machos e fêmeas, porém esse aumento não afetou o peso dos animais. Sendo assim, a chalcona 4-MC não promoveu mudanças na ingestão de

alimentos e água, indicando metabolismo e condição de saúde normal dos animais tratados.

De acordo com análises estatísticas ANOVA, não houve significância nos resultados obtidos nestas amostras em comparação com grupo controle. Sugerindo ausência de toxicidade sub-crônica, em relação aos parâmetros analisados.

Figura 4.6: Variação de peso em animais tratados com diferentes concentrações de chalcona 4-MC, submetidos ao ensaio de toxicidade sub-crônica (30 dias). A) Camundongos fêmeas; B) Camundongos machos. Dados expressos como média \pm e.p.m. de cinco animais por grupo. Análise estatística foi realizada utilizando ANOVA.

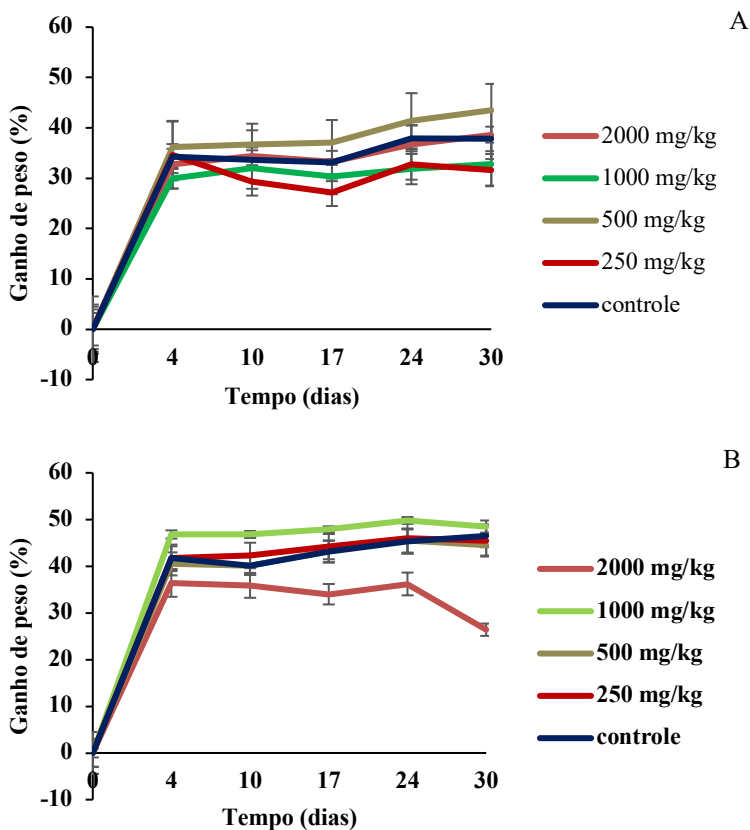


Figura 4.7: Parâmetros de variação de consumo de ração da análise toxicológica aguda do composto 4-MC. A) Camundongos fêmeas; B) Camundongos machos. Dados expressos como média de cinco animais por grupo. Análise estatística foi realizada utilizando ANOVA.

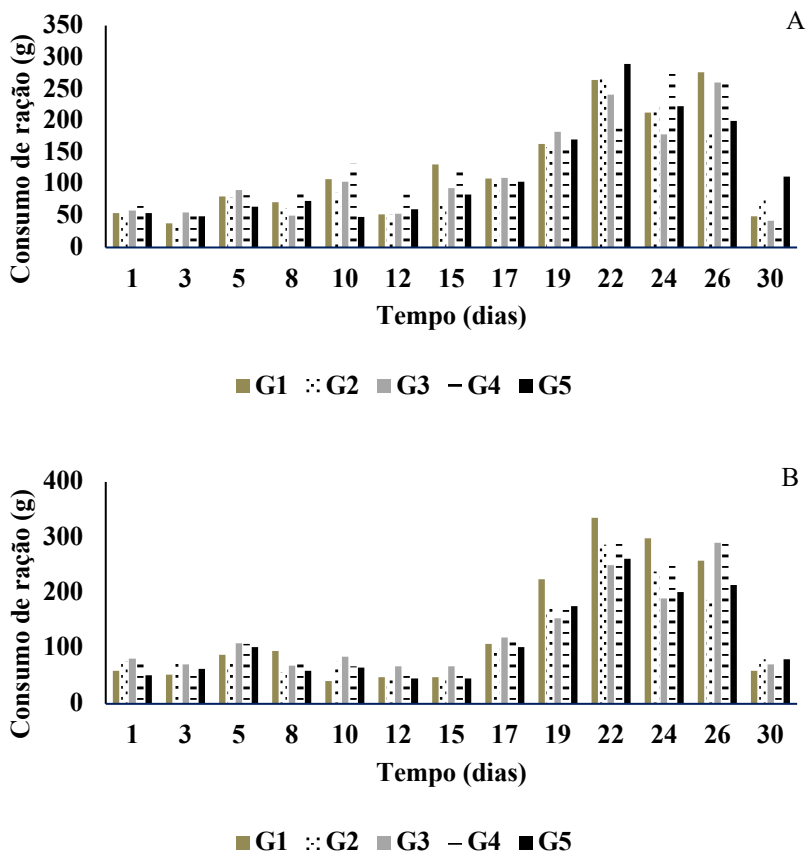
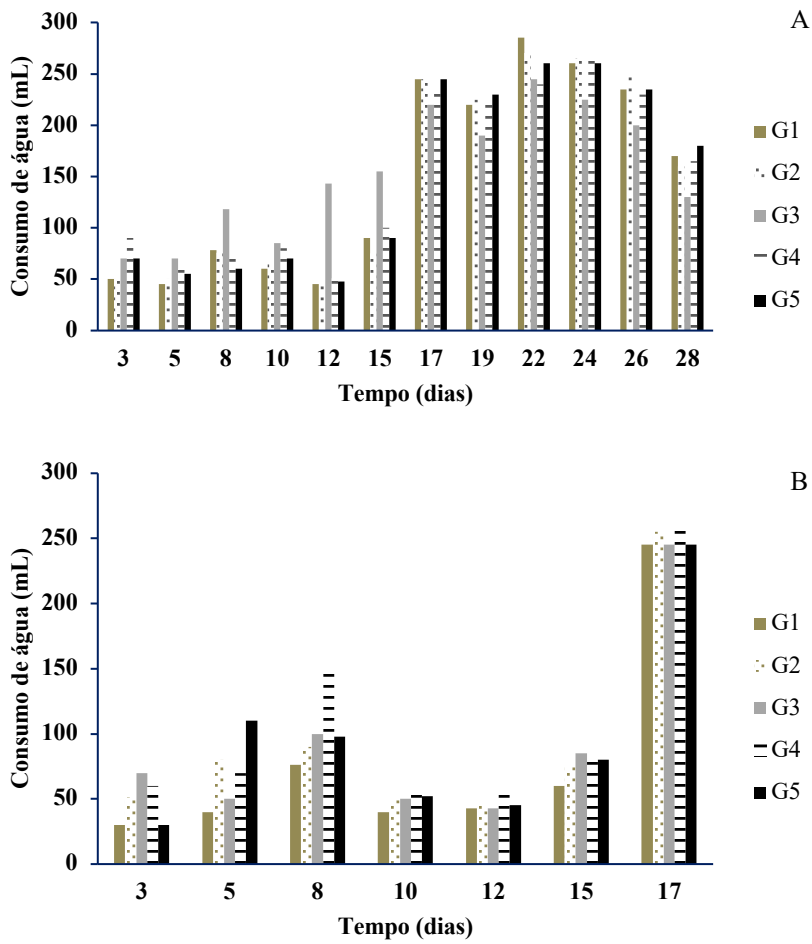


Figura 4.8: Parâmetros de variação de consumo de água da análise toxicológica aguda do composto 4-MC. A) Camundongos fêmeas; B) Camundongos machos. Dados expressos como média de cinco animais por grupo. Análise estatística foi realizada utilizando ANOVA.



Após 30 dias, os animais foram anestesiados e o sangue foi coletado através de punção cardíaca para avaliação da função hepática e renal de machos e fêmeas (Figura 4.9 e 4.10, respectivamente), de acordo com os resultados não foram observadas alterações significativas destes dois parâmetros quando comparados com a amostra controle.

De acordo com análises estatísticas ANOVA, não houve significância nos resultados obtidos em todas as amostras em comparação com grupo controle (Figura 4.9 e 4.10), sugerindo ausência de alterações crônicas nos parâmetros analisados.

Figura 4.9: Parâmetros de avaliação de função hepática (AST e ALT) e função renal (Uréia e Creatinina), da análise toxicológica sub-crônica do composto 4-MC de camundongos machos.

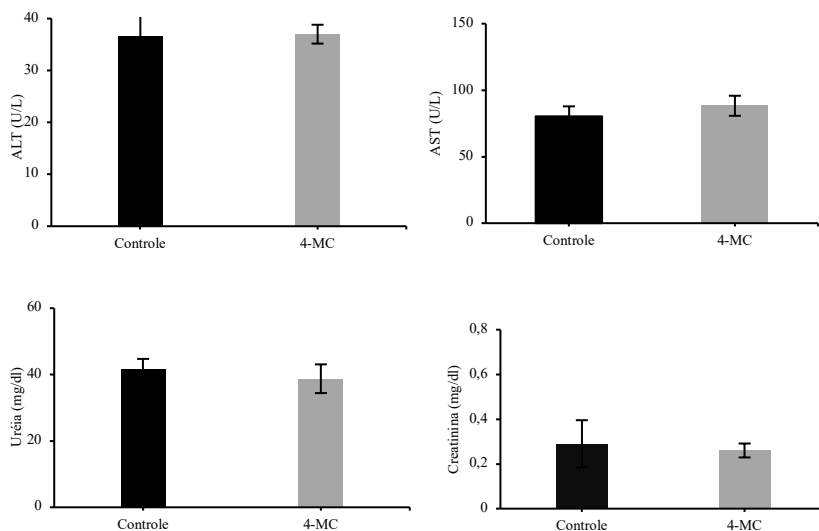
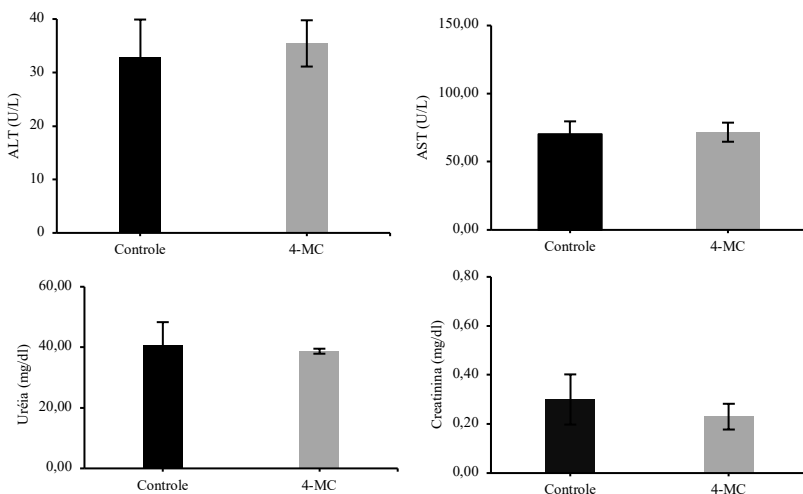


Figura 4.10: Parâmetros de avaliação de função hepática (AST e ALT) e função renal (Uréia e Creatinina), da análise toxicológica sub-crônica do composto 4-MC de camundongos fêmeas.



Posteriormente os animais foram eutanasiados com deslocamento cervical e órgãos retirados para análise histológica (coração, rins e fígado), de acordo com os resultados preliminares obtidos (dados não mostrados), não foram observados toxicidade cardíaca e renal, porém foi observado alguma toxicidade hepática na dose mais elevada (2000 mg/kg), sendo assim, estudos adicionais precisam ser realizados para a comprovação destes dados obtidos, os quais serão avaliados por especialistas em patologia.

Tabela 4.3: Efeitos da chalcona 4-MC no peso de órgãos de camundongos fêmeas. Os animais foram tratados oralmente com água destilada (controle) e chalcona 4-MC (250, 500, 1000 e 2000 mg/kg). Valores expressos como média \pm Desvio padrão (n = 5).

Órgãos		Tratamento				
		Controle	Chalcona 4-MC (250 mg/kg)	Chalcona 4-MC (500 mg/kg)	Chalcona 4-MC (1000 mg/kg)	Chalcona 4-MC (2000 mg/kg)
Fígado	Absoluto	1,67 \pm 0,2	1,55 \pm 0,22	1,57 \pm 0,16	1,50 \pm 0,19	1,43 \pm 0,06
	Relativo	4,24 \pm 0,15	4,23 \pm 0,22	3,88 \pm 0,48	4,19 \pm 0,51	3,78 \pm 0,29
Rim direito	Absoluto	0,22 \pm 0,04	0,19 \pm 0,03	0,20 \pm 0,01	0,21 \pm 0,02	0,21 \pm 0,02
	Relativo	0,57 \pm 0,04	0,54 \pm 0,04	0,51 \pm 0,05	0,59 \pm 0,06	0,56 \pm 0,07
Rim esquerdo	Absoluto	0,23 \pm 0,04	0,20 \pm 0,01	0,22 \pm 0,03	0,21 \pm 0,02	0,21 \pm 0,02
	Relativo	0,59 \pm 0,07	0,55 \pm 0,03	0,54 \pm 0,04	0,60 \pm 0,08	0,55 \pm 0,02
Baço	Absoluto	0,16 \pm 0,01	0,13 \pm 0,02	0,13 \pm 0,01	0,13 \pm 0,02	0,13 \pm 0,014
	Relativo	0,40 \pm 0,04	0,35 \pm 0,02	0,33 \pm 0,05	0,36 \pm 0,05	0,34 \pm 0,04
Coração	Absoluto	0,16 \pm 0,03	0,16 \pm 0,016	0,17 \pm 0,01	0,17 \pm 0,04	0,15 \pm 0,009
	Relativo	0,41 \pm 0,018	0,44 \pm 0,06	0,42 \pm 0,09	0,48 \pm 0,11	0,41 \pm 0,05
Pulmão	Absoluto	0,26 \pm 0,05	0,22 \pm 0,04	0,20 \pm 0,01	0,21 \pm 0,05	0,22 \pm 0,04
	Relativo	0,66 \pm 0,13	0,63 \pm 0,10	0,50 \pm 0,06	0,59 \pm 0,14	0,59 \pm 0,10

Tabela 4.4: Efeitos da chalcona 4-MC no peso de órgãos de camundongos machos. Os animais foram tratados oralmente com água destilada (controle) e chalcona 4-MC (250, 500, 1000 e 2000 mg/kg). Valores expressos como média \pm Desvio padrão (n = 5).

Órgãos		Tratamento				
		Controle	Chalcona 4-MC (250 mg/kg)	Chalcona 4-MC (500 mg/kg)	Chalcona 4-MC (1000 mg/kg)	Chalcona 4-MC (2000 mg/kg)
Fígado	Absoluto	1,73 \pm 0,18	2,08 \pm 0,12	1,86 \pm 0,22	1,95 \pm 0,17	1,73 \pm 0,15
	Relativo	3,83 \pm 0,65	3,87 \pm 0,45	4,38 \pm 0,31	4,5 \pm 0,2	3,98 \pm 0,21
Rim direito	Absoluto	0,27 \pm 0,04	0,30 \pm 0,03	0,29 \pm 0,02	0,33 \pm 0,02	0,30 \pm 0,02
	Relativo	0,47 \pm 0,03	0,59 \pm 0,01	0,68 \pm 0,03	0,78 \pm 0,05	0,69 \pm 0,03
Rim esquerdo	Absoluto	0,28 \pm 0,04	0,30 \pm 0,02	0,28 \pm 0,04	0,33 \pm 0,03	0,28 \pm 0,02
	Relativo	0,48 \pm 0,03	0,50 \pm 0,02	0,67 \pm 0,07	0,77 \pm 0,04	0,66 \pm 0,05
Baço	Absoluto	0,12 \pm 0,01	0,13 \pm 0,01	0,11 \pm 0,02	0,12 \pm 0,02	0,11 \pm 0,01
	Relativo	0,31 \pm 0,04	0,44 \pm 0,08	0,26 \pm 0,04	0,28 \pm 0,03	0,26 \pm 0,04
Coração	Absoluto	0,17 \pm 0,02	0,20 \pm 0,01	0,20 \pm 0,02	0,21 \pm 0,04	0,18 \pm 0,01
	Relativo	0,43 \pm 0,14	0,60 \pm 0,08	0,47 \pm 0,09	0,49 \pm 0,08	0,42 \pm 0,03
Pulmão	Absoluto	0,25 \pm 0,02	0,23 \pm 0,03	0,22 \pm 0,02	0,21 \pm 0,02	0,20 \pm 0,04
	Relativo	0,49 \pm 0,05	0,49 \pm 0,014	0,53 \pm 0,04	0,49 \pm 0,05	0,47 \pm 0,08

4 Conclusão

A 4-MC não revelou toxicidade relevante nos testes *in silico* onde foi observado que este composto não apresenta risco de causar mutagenicidade e apesar de na predição de toxicidade para o desenvolvimento (reprodução), o mesmo ter apresentado potencial toxicológico, esses dados precisam ser realviados pois o resultado obtido não foi relevantes, apresentando um coeficiente de similaridade baixo.

Nos ensaios *in vivo* de toxicologia aguda e ensaio em membrana corioalantoide (HET-CAM) este composto também não apresentou nenhuma alteração significativa.

Nos ensaios de toxicologia sub-crônica não foram observados efeitos tóxicos nas análises bioquímicas do sangue, assim como não foi observada toxicidade nos tecidos cardíaco e renal. Em contrapartida, foi observado efeito tóxico no tecido hepático na dose mais elevada, porém são resultados preliminares qualitativos, que necessitam ser reavaliados por especialista em patologia e estudos adicionais precisam ser realizados para que se possa estabelecer a dose segura desta molécula.

Sendo assim, conclui-se que a 4-MC embora tenha apresentado toxicidade hepática na dose mais elevada, é uma molécula segura e compatível na dose recomendada para uso na terapia de regeneração óssea, onde demonstrou efeitos terapêuticos significativos com uma dose de concentração igual a 10% de 4-MC (3,4 mg).

CAPÍTULO V

Uma nova abordagem estabilizadora para melhorar a fabricação de micropartículas biodegradáveis que incorporam moléculas ativas plastificantes: o caso da chalcona 4-metoxi

Este artigo foi publicado no periódico *Journal of Pharmaceutical Innovation*, com fator de impacto igual a 1,934 (2019).

Uma nova abordagem estabilizadora para melhorar a fabricação de micropartículas biodegradáveis que incorporam moléculas ativas plastificantes: o caso da chalcona 4-metoxi

Danyela Francine Benvenutti ^a, Tania Mari Bellé Bresolin^a, Rogério Corrêa ^a, Stefano Giovagnolli ^b, Riccardo Vivani ^b, Maurizio Ricci ^b

^a Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), P.O.Box 360,88302-202, Itajaí, SC, Brasil

^b Departamento de Ciências farmacêuticas - Università degli Studi di Perugia, Via del Liceo 1, 06123 Perugia, Itália

Resumo

A microencapsulação é uma estratégia vantajosa para veicular moléculas ativas de maneira controlada. No entanto, o carregamento de fármacos pode ser extremamente desafiador, especialmente quando se emprega polímeros pseudoplásticos vítreos, como polilactídeos (PLA) e poli (ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA), que podem sofrer extensas alterações físicas e morfológicas na fabricação de micropartículas (MP), devido ao efeito plastificante dos fármacos, levantando sérias preocupações com armazenamento a longo prazo. Como a 4-metoxi chalcona (4-MC) mostrou ser pouco solúvel e fotossensível, a microencapsulação apresenta-se como uma estratégia interessante para veicular este candidato a fármaco. O objetivo deste capítulo foi investigar o efeito da proporção de 4-MC em MP de PLA e PLGA de diferentes pesos moleculares e terminações de cadeia bem como o uso de hidrotalcitas modificadas com estearato (sHTC) como uma solução inovadora nas formulações de MPs, para sobrepor o efeito plastificante do fármaco nos polímeros empregados. Foram utilizados sete tipos de polímeros, do tipo poliéster, e as MP produzidas pelo método de evaporação de solvente, carregadas com até 20% (m/m) de 4-MC. A intercalação de 4-MC-sHTC foi obtida com uma dupla emulsão O/A/O. Todas as formulações foram caracterizadas. A carga de 4-MC nas MPs demonstrou uma certa alteração dose-dependente no tamanho, morfologia e comportamento de liberação, além de aglomeração das MPs e baixo teor do fármaco em algumas formulações, devido ao um efeito plastificante da 4-MC. Em alguns casos, houve segregação e aparecimento de cristais de 4-MC na superfície da partícula. A plastificação foi maior para os polímeros mais hidrofóbicos e uma relação

inversa foi observada entre a liberação do fármaco e a plastificação, que também afetou a cinética de liberação do fármaco. A formulação contendo o R202S MP a 20% de 4-MC foi a mais afetada pela ação plastificante. A adição de hidrotalcita intercalada com 4-MC como composto de inclusão (4-MC-sHTC) conferiu maior estabilidade às MPs, sendo observado um aumento de estabilidade ao longo de 8 meses de armazenamento à t. a. e 30% de umidade relativa. Portanto, esta estratégia mostrou ser eficaz e pode ser aplicada a outros sistemas de liberação de fármacos microparticulados.

Palavras chave: chalcona 4-metoxi, hidrotalcitas, plastificação, estabilidade de formulações, micropartículas biodegradáveis.

1 Introdução

As chalconas são uma família de compostos caracterizados por um arcabouço comum 1,3-diaril-2-propen-1-ona contendo em sua estrutura um grupamento cetona α , β -insaturado (ZHUANG *et al.*, 2017). São amplamente estudadas por possuírem ampla atividade terapêutica e grande facilidade de síntese. Vários autores comprovaram diferentes atividades biológicas atribuídas às chalconas como, agente antimicrobiano (NIELSEN *et al.*, 2004; PANDHURNEKAR *et al.*, 2013; SATO *et al.*, 1996), antifúngicos (PANDHURNEKAR *et al.*, 2013; DE CARVALHO TAVARES *et al.*, 2011; LAHTCHEV *et al.*, 2008), antiviral (TRIVEDI *et al.*, 2007), antimalárico (KAUR *et al.*, 2010; TOMAR *et al.*, 2010); anti-leishmania (BOECK *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2001).), anti-inflamatório (VOGEL *et al.*, 2010; YADAV *et al.*, 2011), antiagregante plaquetário (VIJAYA *et al.*, 2011), antitumoral (YADAV *et al.*, 2011; RAO *et al.*, 2010), (KACHADOURIAN *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2010; MAHAPATRA *et al.*, 2015; SZLISZKA *et al.*, 2010), efeitos antioxidantes e osteogênicos (ORTOLAN *et al.*, 2014; 2017).

Entre todos, a (2E)-1-fenil-3-(4-metoxifenil)-2-propen-1-ona (4-MC) é particularmente atraente com algumas comprovações de atividade citotóxica frente às linhagens celulares MDA-MB-435, SF-295 e HCT-8 (RAMALHO *et al.*, 2013), além de se apresentar como agente quimioprotetor, quimiossensibilizador (LIM *et al.*, 2013) e anti-inflamatório (DHANAPAL *et al.*, 2013). No entanto, essas características promissoras do 4-MC refletem questões intrínsecas, como baixa solubilidade em água e fotossensibilidade já relatada para outra chalcona, como a 5-(2-benzoiletênil)-N-benzil-2-metoxibenzenesulfonamida (MATTOS *et al.*, 2012). Portanto, a microencapsulação pode ser útil para desenvolver abordagens eficazes de liberação de 4-MC. A este respeito, micropartículas poliméricas biodegradáveis (MPs) representam uma ferramenta poderosa em muitas áreas terapêuticas, devido à possibilidade de controlar propriedades como tamanho de partícula, forma, estrutura interna, porosidade, teor de fármaco e liberação controlada (TRAN *et al.*, 2012; WEI *et al.*, 2012). Por este princípio, várias vias de administração, como oral (PASSERINI *et al.*, 2016), intramuscular (CAMBRONERO-ROJAS *et al.*, 2015), intraperitoneal (LU *et al.*, 2008), intra-articular (MWANGI *et al.*, 2015), pulmonar (GIOVAGNOLI *et al.*, 2014) e intranasal (TAKENAGA *et al.*, 1998), podem ser exploradas.

Porém, vários problemas podem afetar a fabricação e a estabilidade das MPs quando pequenas moléculas hidrofóbicas, como o 4-MC, estão sendo aprisionadas na matriz polimérica. Muitas dessas questões estão relacionadas à interação fármaco-polímero (HUANG *et al.*, 2008) e são mais frequentemente observadas com polímeros pseudoplásticos vítreos, como polilactídeos (PLA) e poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) (BLASI *et al.*, 2007). Esses polímeros são aprovados pelo *Federal Drug Administration* (FDA) para uso parenteral e têm sido explorados como materiais de suporte para uma ampla variedade de aplicações farmacêuticas e biomédicas, desde direcionamento de fármacos até estruturas de engenharia de tecidos (DeLUCA *et al.*, 1993; GE *et al.*, 2009 GIOVAGNOLI *et al.*, 2008, 2007, 2004).

O aspecto mais interessante na utilização de poliésteres é a possibilidade de adaptar a liberação do fármaco de acordo com propriedades precisas do polímero, como peso molecular (PM) e composição de monômeros, que alteram seu perfil de tempo de biodegradação (MAKADIA; SIEGEL, 2011). No entanto, pelas razões acima, pequenas moléculas retidas podem alterar drasticamente as propriedades térmicas e mecânicas das partículas, bem como seu comportamento de liberação. Além disso, sabe-se que o efeito plastificante de pequenos fármacos hidrofóbicos produz sérios problemas de fabricação, baixo rendimento das formulações e baixo teor de fármaco encapsulado após a preparação, bem como a estabilidade limitada ao armazenamento (KALOGERAS, 2011).

Apesar da importância desses aspectos que potencialmente dificultam o desenvolvimento de tais formas farmacêuticas, faltam soluções nesta área. Recentemente, demonstrou-se que as ciclodextrinas são capazes de prevenir a plastificação induzido por cetoprofeno em MP de poliéster de baixo PM, evitando as interações físicas entre o fármaco e as cadeias poliméricas (ALBERTINI *et al.*, 2015). Seguindo este princípio, no presente trabalho foi explorada uma nova abordagem de estabilização para melhorar a produção e o armazenamento a longo prazo de MP de poliéster carregado com 4-MC, empregando pela primeira vez o uso de uma argila aniônica hidrotalcita modificada com estearato (sHTC). Inicialmente a 4-MC foi encapsulada em MPs de poliéster avaliando o efeito da carga de 4-MC em vários lotes de PLA e PLGA, analisando o comportamento de liberação e cinética. Posteriormente, o uso de sHTC foi explorado no lote de MP mais afetado pelo fármaco.

2 Materiais e Métodos

2.1 Materiais

Os polímeros poli (DL-Lactídeo- *co*-Glicolídeo) (75:25), viscosidade inerente 0,76 dL/g, PM 66000-107000 e 1,1-1,54 g/cm³ de densidade (PDLG7507), com terminação ácida; ácido poli (DL-Lactídeo- *co*-Glicolídeo) (50:50), PM 38.000-54.000 e viscosidade inerente 0,45-0,60 dL/g (Resomer® RG504H), com terminação ácida; poli (DL-Lactídeo- *co*-Glicolídeo, 50:50), PM 38.000-54.000 e viscosidade inerente 0,45-0,60 dL/g (Resomer® RG504), com terminação éster; Poli (DL-Lactídeo- *co*-Glicolídeo) (50:50), PM 7.000-17.000 e viscosidade inerente 0.16-0.24 dL/g de (Resomer® RG502), com terminação éster; poli (DL-Lactídeo- *co*-Glicolídeo) (50:50), PM 40.000 e viscosidade inerente 0,4 dL/g (PDLG5004A 50:50), com terminação em ácido carboxílico; ácido poli (D, L - lactídeo) PM 10.000-18.000 e viscosidade inerente 0.16-0.24 dL/g (Resomer® R202H), com terminação ácida; poli (D, L- lactídeo), PM 10.000-18.000 e viscosidade inerente,0,16-0,24 dL/g (Resomer® R202S), com terminação éster; foram adquiridos da Purasorb® (PURAC Bihem, Gorinchem, Holanda) e Boehringer Ingelheim (Milão, Itália). O polietilenoglicol 400 foi adquirido da Farmalabor srl (Milão, Itália). Todos os outros produtos químicos e reagentes eram de grau PA.

2.2 Síntese e caracterização estrutural da chalcona

A 4-MC foi sintetizada e caracterizada de acordo com item 2.2 do capítulo III deste trabalho.

2.3 Método de preparação das micropartículas

As micropartículas (MPs) foram preparadas pelo método de emulsificação/evaporação de solvente de emulsão única O/A. De acordo com estudos anteriores, estabeleceu-se que a quantidade de estabilizador adequado para a fase estérica é de 0,1% de PVA, preparado em água ultrapura, sob agitação a 70 °C durante 6 h seguido pela agitação em temperatura ambiente, durante a noite.

Para a fase oleosa, foi escolhido um solvente apropriado para solubilizar a chalcona e os polímeros, assim, ambos foram pesados de acordo com a

concentração estabelecida a 5, 10 e 20% (p/p), onde foi pesado 22,5; 45 e 90 mg de chalcona 4-MC, para 427,5; 405 e 360 mg do polímero, respectivamente de carga teórica e a relação de fase interna:externa na emulsão foi de 1:100 v/v, depois foram adicionados 5 mL de diclorometano e a mistura foi agitada em vórtex para solubilizar. Os polímeros escolhidos foram PDLG7507, Resomer® RG504H, Resomer® RG504, Resomer® RG502, PDLG5004A, Resomer® R202H e Resomer® R202S.

A temperatura inicial do reator foi de 4 °C. Em seguida, 500 mL de PVA 0,1% foi adicionado no interior do reator, até se conseguir a estabilidade da temperatura de partida, a agitação foi realizada a 600 rpm durante todo o processo. Depois, foi adicionado a solução contendo a chalcona e polímero, descrita acima, a qual foi adicionada lentamente ao PVA, para uma formação homogênea de MPs, na temperatura de 4 °C mantida por 5 min, então a temperatura foi aumentada para 25 °C durante 1 h, depois ajustada a 30 °C durante 1 h, a 40 °C durante 30 min para evaporar o solvente. Em seguida foi resfriado a 15 °C, uma temperatura abaixo da temperatura de transição vítrea do polímero (T_g) para evitar a deformação das partículas durante a filtração em Hidrogênio gasoso. As MPs foram filtradas sob pressão de N_2 à temperatura ambiente através de um filtro de Nitrocelulose Millipore de 5 μm (Millipore, Milão, Itália). Três ciclos de lavagem consecutivos foram realizados com água ultrapura e, em seguida, as MPs foram secas a vácuo por 24 h, em temperatura ambiente.

2.4 Preparação do composto de inclusão 4MC-sHTC

O 4-MC foi incluído na região intercamada de um Mg-Al HTC (Hidrotalcita) na forma de estearato.

Primeiro, o Mg-Al HTC permutado com ânions $CH_3(CH_2)_{16}CO_2^-$ estearato (ST), até 75% da capacidade de troca iônica (COSTANTINO *et al.*, 2005). O composto final de estearato HTC (sHTC) tinha a seguinte composição: $Mg_{0,67}Al_{0,33}(OH)_2$ $ST_{0,248}(NO_3)_{0,082}$ $0,5H_2O$ como determinado por análise termogravimétrica (TGA). Porções de 1 g deste composto foram então intimamente misturadas com 1 g de 4-MC sólido moendo-as suavemente num gral de porcelana, durante cerca de 10 min. A mistura sólida foi então aquecida a 80 °C durante 5 dias num forno. Depois disso, o composto final foi armazenado em um recipiente fechado à temperatura ambiente protegido da luz. A análise de XRPD e RMN- 1H foi realizada para confirmar a inclusão da 4-MC.

2.5 Preparação de micropartículas carregadas com 4-MC-sHTC

A preparação de MP mais afetada pela carga de 4-MC foi selecionada para investigar o uso de 4-MC-sHTC na fabricação de MP. As MP foram carregadas com 4-MC-sHTC a uma razão fármaco-polímero equivalente a 5%, 10 e 20% m/m. Foi utilizado um método de emulsificação/evaporação de solvente A/O/A de dupla emulsão, utilizando os mesmos procedimentos e condições descritos na seção 2.3. Uma quantidade pesada de 4-MC-sHTC foi completamente dispersa em água e misturada por vórtex em solução de diclorometano contendo o polímero a uma relação de 1:10 v/v para formar uma emulsão de A/O. A emulsão foi transferida gota a gota para uma segunda solução aquosa de PVA a 0,1% p/v, agitada a 600 rpm, a uma razão de 1:100 v/v. Posteriormente, o mesmo programa de temperatura descrito anteriormente foi empregado para evaporar o solvente orgânico e após a sua formação, a MP foi recuperada por filtração sob pressão de N₂ e lavada três vezes com água ultrapura. A secagem a vácuo foi então realizada por 24 h.

2.6 Caracterização das micropartículas

O comportamento térmico da MP foi avaliado por DSC utilizando um calorímetro de varredura diferencial Mettler Toledo DSC 821 (Mettler Toledo, Suíça) equipado com um sistema de resfriamento com N₂ líquido. O sistema foi calibrado usando um padrão de índio. As MPs contendo a chalcona foram comparadas com 4-MC livre e MP em branco.

O efeito de 4-MC na temperatura de transição vítrea do polímero (T_g) foi avaliado num conjunto de amostras preparadas como descrito abaixo. As quantidades de 5 mg de cada amostra foram exatamente pesadas e hermeticamente seladas em cadinhos de alumínio com 40 μ L de tampa com pino. As amostras foram submetidas a dois ciclos de aquecimento: de 15 a 90 °C, a uma taxa de 5 °C/min e de -5 a 85 °C a 5 °C/min, em triplicata. A T_g foi determinada como o ponto de inflexão entre o início da T_g e o T_g na segunda rampa de aquecimento, a fim de evitar qualquer histórico térmico da amostra. Os dados de DSC foram tratados com o software STARE.

As características morfológicas, estrutura superficial e porosidade foram investigadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) usando um microscópio eletrônico de varredura FEG LEO 1525 (Bruker, Milan, Itália). As

amostras foram preparadas colocando-se a MP sobre um suporte metálico (stub) coberto com um disco adesivo de carbono de dupla face. As amostras foram revestidas por aspersão com cromo antes da imagem. O revestimento foi realizado a 20 mA durante 25 s.

Os padrões de difração de raios X (XRPD) foram coletados de acordo com o método de varredura por passos com o difratômetro de radiação PANalytical X'Pert Pro, Cu Ka, operando a 40 kV e 40 mA. Os pós foram depositados em um poço raso de um suporte de amostras. Antes da análise, uma superfície plana levemente áspera foi usada para pressionar o pó, embalando-o no poço para minimizar a orientação preferencial.

Para determinar a distribuição de tamanho de MP, utilizou-se um Accusizer C770 (PSS Inc., Santa Bárbara, CA, EUA) baseado em “Single Optical Optical Sensing” e equipado com um sistema de auto diluição. As MPs foram suspensas em água deionizada antes da análise. As análises foram realizadas em triplicata e o tamanho foi expresso como diâmetro médio volumétrico (d_{mv}). O período de população foi calculado de acordo com a Eq. (1)

$$Span = \frac{d_{90} - d_{10}}{d_{50}} \quad (1)$$

onde d_{10} , d_{50} e d_{90} são os diâmetros das partículas a 10, 50 e 90%, respectivamente, da distribuição da população calculada a partir da amostra.

O teor de fármaco (% DC, Eq. 2) e a eficiência de encapsulação (% EE, Eq. 3) foram medidos por espectrofotometria utilizando um espectrofotômetro UV Agilent 8453 equipado com um controlador de temperatura Peltier.

A extração do 4-MC na MP para realizar essas análises foi realizada dissolvendo uma quantidade fixa de MP numa solução de acetonitrila: metanol a 1:4 v/v. A solução/dispersão obtida foi centrifugada a 3400 rpm durante 15 minutos à temperatura ambiente. Após a centrifugação, 1 mL de sobrenadante foi diluído em metanol e submetido à análise UV-Vis. Todas as medidas foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como média \pm D.P. Uma curva analítica de 4-MC em metanol foi construída na faixa de concentração de 2-20 $\mu\text{g/mL}$ ($\gamma_{\text{max}} = 346 \text{ nm}$, $r^2 = 0,9991$).

$$\%DC = \frac{\text{quantidade de fármaco encapsulado}}{\text{Peso MP}} * 100 \quad (2)$$

$$\%EE = \frac{\text{carga de fármaco real}}{\text{carga de fármaco teórica}} * 100 \quad (3)$$

2.7 Liberação do fármaco *in vitro*

Os experimentos de liberação do fármaco foram realizados pelo método do saco de diálise. De modo a assegurar condições de imersão ao longo da experiência, empregou-se uma solução de PEG400 a 30% p/v em PBS 0,1 M a pH 7,4 como meio de liberação. Resumidamente, uma quantidade pesada de MP foi dispersa no meio de liberação e colocada num saco de diálise (12-14 kDa MWCO). A bolsa foi afundada em um tubo Falcon cônico de 50 mL e incubada a 37 °C. Em intervalos de tempo predeterminados, as alíquotas foram retiradas e substituídas por uma solução de liberação fresca mantida a 37 °C. O perfil de fármaco liberado de cada formulação em função do tempo foi construído por espectrofotometria de UV utilizando o método descrito acima. Todas as medidas foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em média \pm D.P.

2.8 Cinética e mecanismo de liberação de fármaco

Modelos clássicos foram empregados para investigar o mecanismo de liberação de 4-MC da MP e para verificar o efeito do teor de 4-MC-sHTC (GIOVAGNOLI *et al.*, 2008):

- a) o modelo Higuchi (Eq. 4) é um dos mais populares para estudar o transporte Fickiano puro, embora limitado à difusão unidimensional a partir de superfícies planas (HIGUCHI, 1961):

$$M_t = A\sqrt{D(2C_0 - C_s)} t \quad (4)$$

onde M_t é a quantidade cumulativa de fármaco liberada no tempo t , t é o tempo, A é a área superficial, D a difusividade do fármaco através da matriz e C_0 e C_s são a concentração inicial do fármaco e a solubilidade do fármaco, respectivamente.

- b) a equação de Korsmeyer-Peppas, é utilizado para analisar liberação de fármaco de micropartículas poliméricas, e em casos onde a liberação é uma

combinação do transporte Fickiano puro e do transporte de caso II (Eq. 5) (RITER e PEPPAS, 1987a):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (5)$$

onde M_∞ é a quantidade de fármaco liberado no infinito, k é uma constante que incorpora características estruturais e geométricas da microcápsula, n é correlacionado ao mecanismo de liberação e $\frac{M_t}{M_\infty}$ é a liberação fracional do princípio ativo.

- c) para n aproximando-se de 1, o mecanismo é deslocado para um transporte de caso II (KOSMIDIS *et al.*, 2003) e Eq. 5 se transforma em uma cinética de ordem zero (Eq. 6).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt \quad (6)$$

Os perfis de liberação de 4-MC da MP foram ajustados aos modelos acima. A falta de ajuste foi avaliada pela aplicação de um método de Levenberg-Marquardt para a minimização da função χ^2 reduzida (KATARE *et al.*, 2004; LEVENBERG, 1944; MARQUARDT, 1963; RIVALS, PERSONNAZ, 2003). As estimativas calculadas do parâmetro n da Eq. 5 foram utilizados para avaliar o mecanismo de liberação predominante.

2.9 Estabilidade de armazenamento da MP carregada com 4-MC

A estabilidade da MP 4-MC e 4-MC-sHTC foi avaliada por análises de MEV, DSC e XRPD. Alterações na morfologia e estado físico do fármaco foram determinadas em 20% m/m de MP carregada ao longo de 8 meses de armazenamento à temperatura ambiente e 30% de umidade relativa. Amostras para análises de MEV, DSC e XRPD foram preparadas conforme descrito na seção 2.4.

2.10 Análise estatística

Os dados de transição vítrea foram analisados para diferença estatística por ANOVA unidirecional e ANOVA unidirecional em categorias aplicando os métodos *post-hoc* de comparação múltipla de Dunnet e Holm-Sidak para determinar diferenças em relação ao grupo de referência MP branco com nível de significância de 95%. Os dados de liberação *in vitro* foram analisados aplicando ANOVA *two-way* e o método de comparação múltipla *post-hoc* de Holm-Sidak, para determinar as diferenças entre e dentro dos grupos com nível de significância de 95%.

3 Resultados e discussão

3.1 Síntese e caracterização estrutural da chalcona

Os resultados obtidos nesta etapa estão descritos no item 3.1 do Capítulo III.

3.2 Efeito do carregamento do 4-MC na MP de poliéster

3.2.1 Caracterização da MP carregada com 4-MC (MP 4-MC)

As propriedades e características da MP 4-MC são mostradas na Tabela 5.1. O rendimento total do processo de preparação variou entre 43 e 99%, com % de eficiência de encapsulação (EE) entre 56 e 100%. Uma redução de % EE dependente da carga foi observada para os polímeros com terminação éster RG504 e R202S, enquanto os polímeros com terminação ácida RG504H e R202H, mostraram um comportamento oposto com % EE e % teor aumentando com o carregamento. Todas as outras formulações apresentaram um comportamento mais consistente com valores de % EE > 80%. O teor de fármaco variou entre 3,7 e 4,4%; 4,6 e 10%; 11 e 20 % a 5%, 10% e 20% m/m de carga de 4-MC, respectivamente. Esses achados destacam a alta afinidade de 4-MC pelas matrizes de PLA e PLGA, como comprovado pelo alto teor do fármaco, medido que, nos melhores casos, atingiu quase 100%.

O tamanho das partículas e as observações morfológicas evidenciaram mudanças significativas dependendo da carga do 4-MC. Conforme relatado na Tabela 5.1, os valores de d_{mv} foram menores nas MPs com 5% m/m, variando entre 50 e 80 μm , aumentando sensivelmente com o teor. O maior aumento foi registrado para RG504H e RG504. Tal aumento não foi acompanhado por um aumento de amplitude que, com valores de 1,03 e 1,72, respectivamente, permaneceu praticamente inalterado. O maior aumento de *span* dependente da carga foi registrado para R202H e R202S MP, com valores de até 1,85 e 2,41 a 20% m/m de carga de 4-MC, respectivamente.

Tabela 5.1: Propriedades de micropartículas de polímeros biodegradáveis contendo chalcona 4-MC encapsulada em diferentes porcentagens.

Branco		5%					10%				20%			
Polímero	$d_{mv}(\mu m)$ (D.P.)	Span	$d_{mv}(\mu m)$ (D.P.)	Span	Teor (%) (D.P.)	EE (%) (D.P.)	$d_{mv}(\mu m)$ (D.P.)	Span	Teor (%) (D.P.)	EE (%) (D.P.)	$d_{mv}(\mu m)$ (D.P.)	Span	Teor (%) (D.P.)	EE (%) (D.P.)
PDLG7507	81,3 (37,1)	1,18	84,4 (38,2)	1,08	4,1 ± 0,6	82,2 ± 6,1	71,3 (32,2)	1,19	8,6 ± 0,1	85,5 ± 7,6	82,9 (36,3)	1,11	17,3 ± 0,9	86,3 ± 9,3
RG504H	55,2 (25,1)	1,47	59,2 (24)	1,07	3,7 ± 0,9	74,2 ± 9,4	54 (24,2)	1,20	8,6 ± 0,3	85,7 ± 3,3	288,7 (113,23)	1,03	19,6 ± 1,6	98,2 ± 15,7
RG504	67,7 (34,1)	1,50	59,9 (27,2)	1,26	4,2 ± 0,6	84,1 ± 6,2	54,5 (26,7)	1,45	4,6 ± 1,4	46,2 ± 13,6	108,9 (66,8)	1,72	12,4 ± 1,1	61,5 ± 11,1
RG502	78,1 (39,9)	1,36	65,6 (26,2)	1,04	4,2 ± 0,5	84,2 ± 5,2	54,9 (22,8)	1,10	9 ± 0,8	90,1 ± 7,6	67,2 (30,9)	1,13	19,3 ± 1,3	96,6 ± 13,5
PDLG5004A	50,5 (21)	1,19	62,5 (25,3)	1,09	4,4 ± 0,4	87,9 ± 4,3	65,8 (27,4)	1,06	10 ± 0,7	100 ± 7,0	79,1 (32,9)	1,04	19,9 ± 1,7	99,3 ± 17,2
R202H	67,3 (23,3)	0,87	72,3 (26,3)	1,01	3,9 ± 0,7	78,8 ± 6,9	71,5 (28,4)	0,83	10,1 ± 1,1	100 ± 10,8	91,8 (58,4)	1,85	18,7 ± 2,6	93,6 ± 26,1
R202S	67,9 (25,3)	0,92	74,2 (21,1)	0,77	4,3 ± 0,1	85,6 ± 1,5	109,1 (61,1)	1,64	6,6 ± 1,4	65,7 ± 13,7	64,2 (41,3)	2,41	11,3 ± 1,1	56,4 ± 11,5

A figura 5.1 mostra as distribuições de tamanho das MPs. Consistentemente com a Tabela 5.1, a dispersão populacional aumentou com o carregamento de 4-MC e foi particularmente alta para MPs elaboradas com RG504H, RG504, R202H e R202S.

A presença de agregados foi considerada a responsável por tal dispersão, como mostram os grandes picos com diâmetros $> 150 \mu\text{m}$. A este respeito, a comparação com observações de morfologia de partículas confirmou tal suposição para todos os lotes de MP 4-MC, mas MP RG504H e R202S a 20% m/m de carga (Fig. 5.2). De fato, as microfotografias de MEV evidenciaram a presença de grandes partículas na MP RG504H, com um tamanho consistente com o medido pela análise de tamanho de partícula (Fig. 5.2H), enquanto que a ampla população de MP R202S com blocos irregulares de polímero resultantes da aglomeração e fusão de partículas, foi principalmente atribuída a uma provável polimerização dos polímeros (Fig. 5.2D).

Ampla agregação de MPs foi observada mesmo na menor carga de 4-MC para R202S e RG504H, sendo atribuída ao efeito plastificante do polímero, uma vez que foi observado sinais evidentes de fusão de matriz (Fig. 5.2C, 5.2H). Deformação considerável e rachaduras aleatórias foram observadas para MP RG502 e PDLG5004A a 20% m/m de carga (Fig. 5.2N, 5.2n).

Esses resultados sugerem um efeito plastificante do 4-MC que mostra um impacto direto na morfologia e formação da MP. Tal comportamento variável observado na dependência da carga de 4-MC pode estar relacionado com as diferenças na composição do polímero e peso molecular (PM). Como os polímeros de PLA e PLGA apresentam baixa T_g e alta deformabilidade, o encapsulamento de moléculas como 4-MC pode afetar notavelmente as características e a estabilidade das MPs.

Em particular, o carregamento de 4-MC mostrou um impacto profundo na MP R202S que, a 20% m/m de carga, perdeu sua morfologia, produzindo agregados grandes e blocos poliméricos fundidos. A comparação entre a MP R202H e a R202S, polímero mais hidrofóbico e com terminação éster, mostra claramente que a hidrofobicidade do polímero é um fator chave na interação com o 4-MC. De fato, a MP R202H manteve sua morfologia apesar do aumento no tamanho devido à presença de agregados em maiores cargas, o que é provavelmente devido ao efeito plastificante sobre o polímero (Fig. 5.1B, 5.2a-5.2d).

Uma vez que a hidrofobicidade aumenta com o aumento do PM do polímero, polímeros PLGA 50:50 ainda maiores, tais como RG504H, RG502 e

PDLG5004A foram afetados pelo aprisionamento de 4-MC com mudanças morfológicas drásticas na maior carga. Com estes polímeros, a terminação éster pareceu não ter a mesma importância observada para os polímeros de PLA de baixo PM (Fig. 5.2H, 5.2h). Além disso, o MP no carregamento mais alto, embora menos aglomerado, exibiu perda de regularidade, aumento de tamanho, rugosidade superficial, bem como a presença de fraturas e resíduos citados anteriormente, provavelmente atribuíveis aos cristais de 4-MC (Fig. 5.2H, 5.2N, 5.2n).

Por outro lado, o PDLG7507, que é um polímero de PLGA de 75:25 de alto peso molecular, representa uma exceção, uma vez que, embora mais hidrofóbico, apresentou a maior estabilidade após o encapsulamento de 4-MC (Fig. 5.1 G, 5.2 O - 5.2 R). É provável que o maior PM juntamente com um maior teor de ácido láctico determinou maior resistência na interação entre o polímero e o fármaco, embora a presença de cristais de 4-MC ainda fosse observada na superfície do MP a 20% m/m de carga (Fig. 5.2R).

Figura 5.1 Comparação das distribuições de tamanho de partícula de MP em branco e MP carregado em 4MC: A) R202S, B) R202H, C) RG504H, D) RG504, E) RG502, F) PDLG5004A, G) PDLG7507.

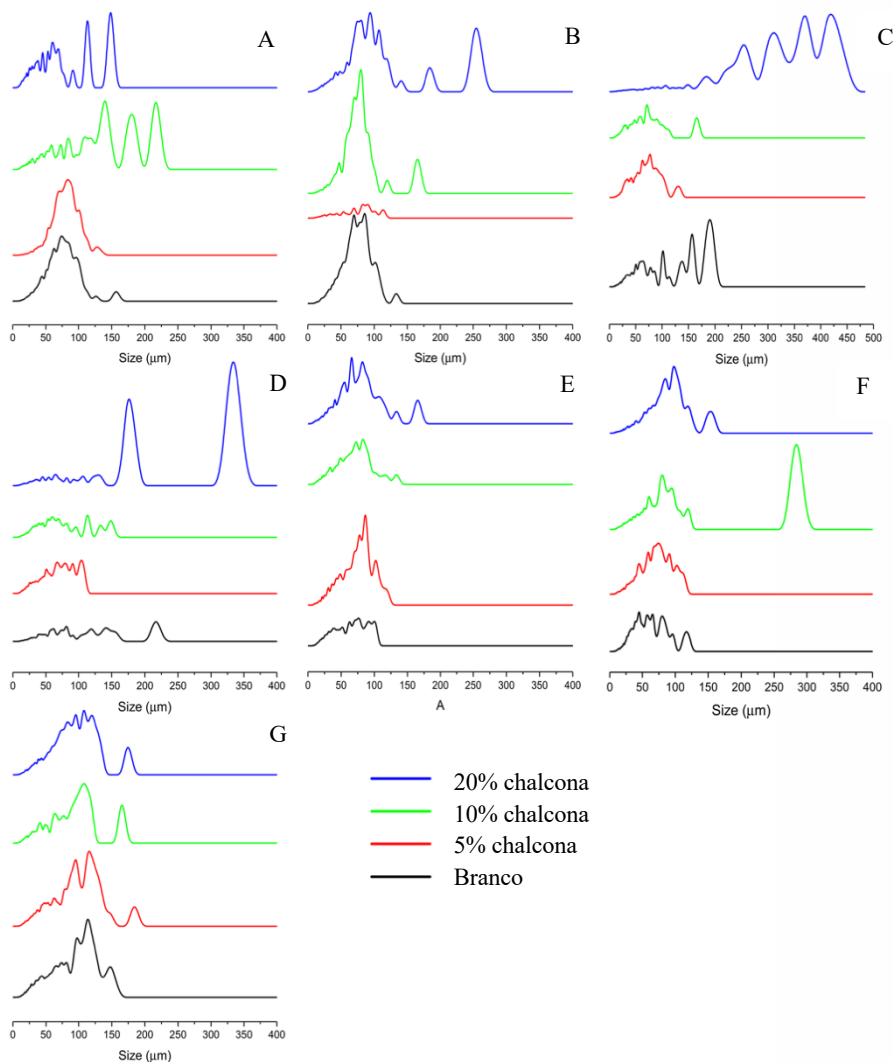
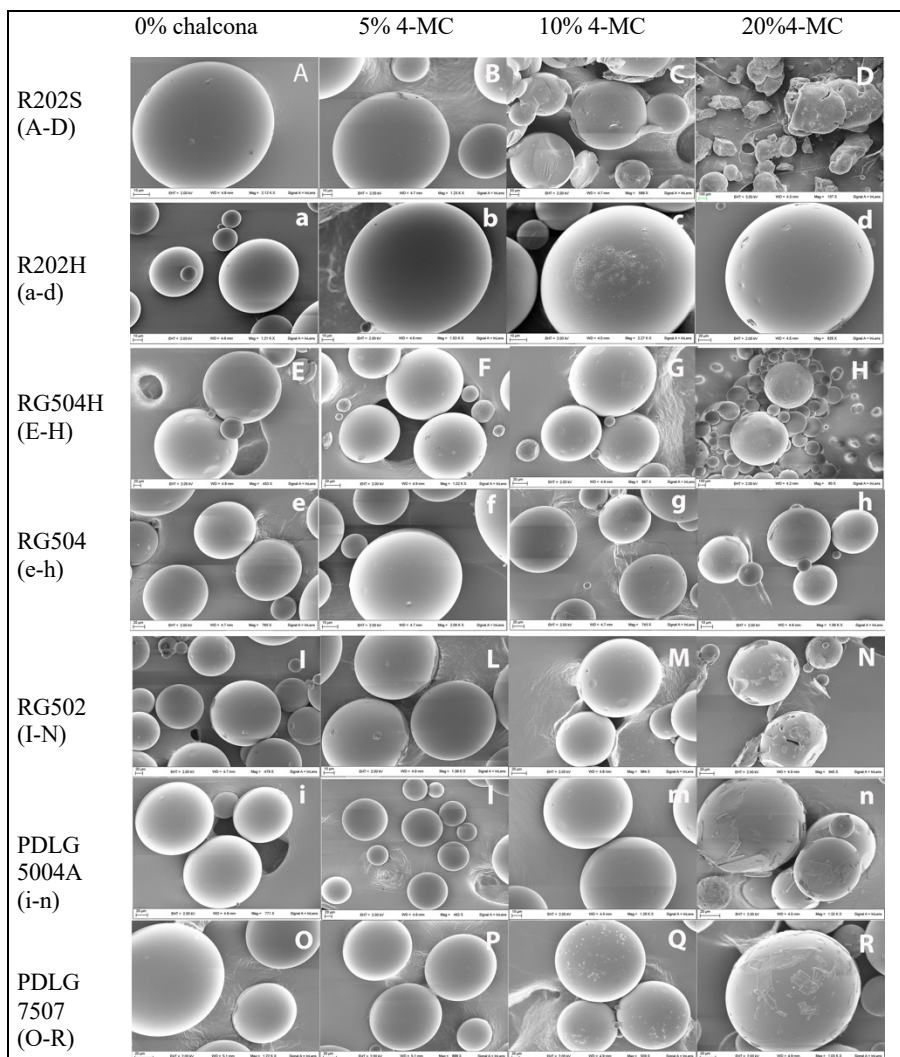


Figura 5.2 Comparação da morfologia MP, da esquerda para a direita, 0%, 5%, 10%, 20% m/m 4-MC carregamento: (A-D) R202S, (a-d) R202H, (E-H) RG504H, (e-h) RG504 (I-N) RG502, (i-n) PDLG5004A, (O-R) PDLG7507.



3.2.2 Investigação do efeito plastificante do 4-MC sobre o polímero

À luz dos resultados obtidos pelas análises de tamanho de partícula e MEV, uma investigação mais profunda do efeito plastificante do 4-MC sobre o polímero foi realizada através da aquisição de perfis térmicos e XRPD de MPs branco e carregadas. Como mostrado na Tabela 5.2, a 4-MC causou uma mudança na T_g do polímero dependente da carga. Além disso, a alteração observada na T_g também foi dependente das propriedades do polímero. Em particular, foi registado um desvio linear significativo dependente da carga de anti-plastificante para efeito plastificante para RG502 e, particularmente, MP RG504H ($p < 0,05$). RG504 e PDLG5004A foram os menos afetados ($p > 0,05$).

As maiores alterações de T_g foram registradas para os polímeros com terminação ácida RG504H, PDLG7507, R202H e R202S com terminação éster. Em detalhe, registrou-se um efeito anti-plastificante significativo para RG504H a 5% e 10% m/m de carga ($p < 0,05$) que se transformou numa plastificação marcante, com uma diminuição de -17 a 20% m/m de carga ($p < 0,05$).

O PDLG7507 sofreu efeito plastificante significativo em todas as cargas, enquanto o R202S apresentou um aumento quase linear de plastificação com carga e a 20% m/m, mostrou o efeito mais forte. Este comportamento corresponde a observações anteriores que revelaram dificuldades na formação de MP. Surpreendentemente, o R202H foi fortemente plastificado a 5% e 20% m/m de carga ($p < 0,05$), enquanto apenas um ligeiro efeito foi observado a 10% m/m.

Como 4-MC parece ser igualmente capaz de produzir um efeito plastificante ou anti-plastificante, dependente da concentração, em polímeros de poliéster, a razão para esse comportamento pode residir em uma espécie de equilíbrio entre os dois efeitos a 10% de carga.

A Figura 5.3 exibe os perfis DSC dos diferentes lotes de MP. Além de confirmar os resultados acima com desvios dependentes da carga dos perfis de T_g , também mostra que, em linha com a análise morfológica, a maioria dos lotes de MP contendo 20% de 4-MC, mostram uma pequena transição adicional correspondente à fusão do composto, a qual, no estado puro, se funde em torno de 74 °C (Fig. 5.3H). Os sinais pareciam mais intensos para os lotes MP RG504, RG504H, RG502 e PDLG5004A. Isso sugere que 4-MC, nesse valor de carga, poderia saturar a matriz polimérica e segregar em pequenos aglomerados na superfície do MP.

Uma confirmação adicional desta hipótese foi obtida por análise de XRPD (Figura 5.4). De fato, os perfis de MP RG504H, PDLG5004A, R202S e

RG502 mostraram a presença a 20% m/m de pequenos sinais típicos de 4-MC cristalino (Figura 5.4D - 5.4G, 5.4H). Em particular, RG504H e RG502 apresentaram a maior cristalinidade. Todos os outros lotes foram completamente amorfos em todas as cargas de 4-MC (Figura 5.4A - 5.4C).

A energia da temperatura de transição vítrea T_g foi inversamente proporcional ao conteúdo de 4-MC na matriz polimérica. De fato, como já observado (BENOIT *et al.*, 1986), os eventos de T_g mudam de acordo com a quantidade de fármaco molecularmente dispersa na matriz. Na Figura 5.5, uma etapa de T_g mais nítida correspondeu à MP com menor carga de 4-MC (Tabela 5.1) e se tornou mais difusa à medida que a %DC aumentou.

De fato, as MP RG504H e R202S que apresentam os menores valores de %DC apresentaram proporcionalmente um maior valor de T_g a 20% m/m de 4-MC em comparação com cargas mais baixas. Este fenômeno confirma a plastificação da matriz com um possível impacto na liberação do fármaco e no envelhecimento das partículas de poliéster (ALLISON, 2008; RAWAT, BURGESS, 2011).

Tabela 5.2: Análise térmica de MPs contendo 4-MC. Valores de temperatura de T_g em diferentes cargas de 4-MC e mudança de T_g em comparação com a MP branco.

Polímero	Branco	5%		10%		20%	
	$T_g \pm \text{D.P.}$	$T_g \pm \text{D.P.}$	ΔT_g^*	$T_g \pm \text{D.P.}$	ΔT_g^*	$T_g \pm \text{D.P.}$	ΔT_g^*
PDLG7507	41,7 \pm 3,1	32,4 \pm 2,8	-9,3**	33,3 \pm 0,5	-8,4**	27,4 \pm 0,5	-14,3**
RG504H	24,5 \pm 0,6	33,1 \pm 2,4	+8,6**	28,4 \pm 3,2	+3,9**	7,6 \pm 0,6	-16,9**
RG504	25,9 \pm 0,5	28,1 \pm 0,6	+2,2	24,6 \pm 0,5	-1,2	26,8 \pm 1,8	+0,9
RG502	29,1 \pm 2,8	31,7 \pm 1,3	+2,6	31,3 \pm 1,0	+2,2	25,62 \pm 0,05	-3,5**
PDLG5004A	29,6 \pm 2,8	27,4 \pm 4,2	-2,3	29,8 \pm 2,2	+0,2	26,5 \pm 1,2	-3,1
R202H	44,7 \pm 5,6	30,0 \pm 1,4	-14,7**	40,8 \pm 3,5	-3,9	28,5 \pm 1,2	-16,2**
R202S	39,2 \pm 2,0	41,1 \pm 1,8	+1,9	30,3 \pm 0,7	-9,0**	16,5 \pm 2,2	-22,8**

* $\Delta T_g = T_{g \text{ carregada}} - T_{g \text{ branco}}$; ** $p < 0,05$ comparado com branco.

Figura 5.4: Perfis XRPD de MPs carregadas com 4-MC: A) R202H, B) RG504H, C) PDLG7507, D) RG504H, E) RG504 PLDG5004A, F) R202S, G) RG502, H) Perfil XRPD de 4-MC cristalino.

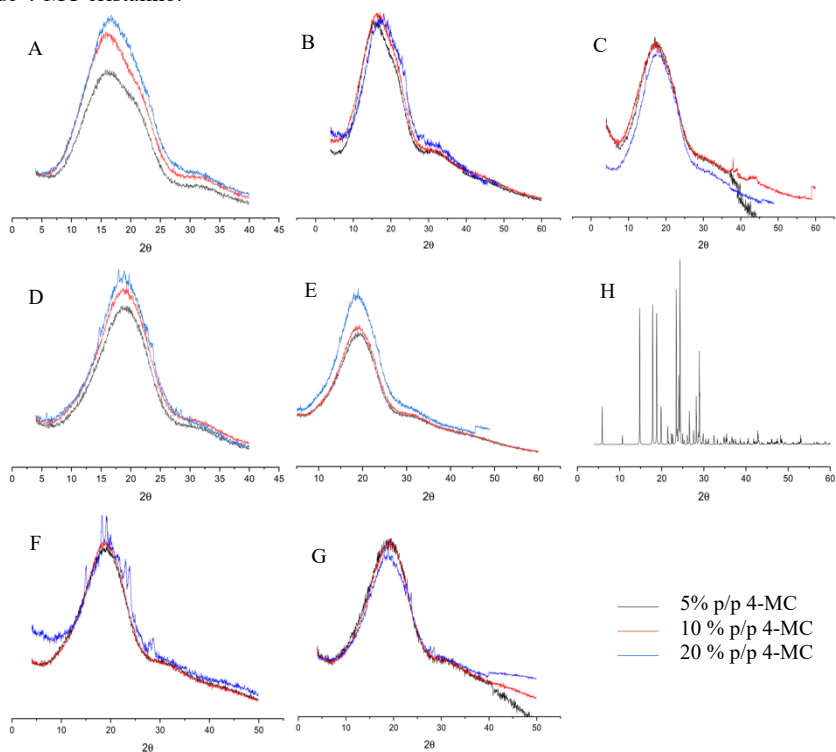
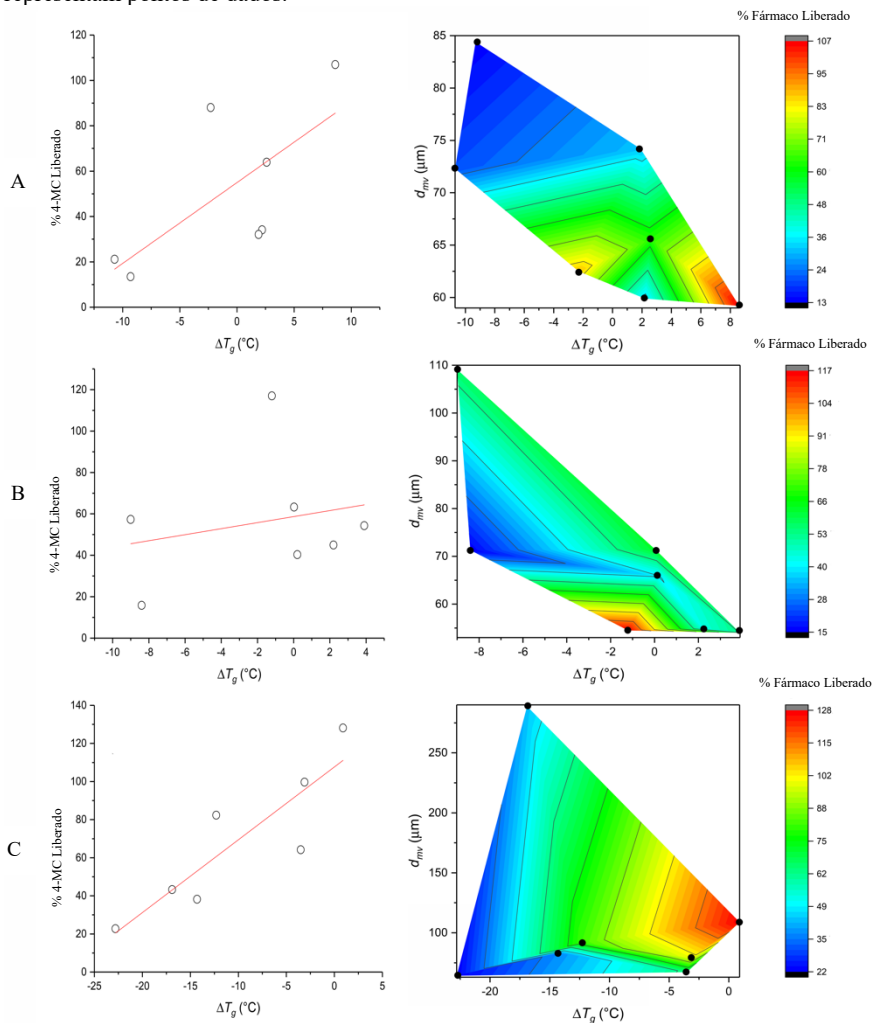


Figura 5.5: Painel esquerdo - Gráficos de correlação lineares entre a variação medida de T_g do polímero e a % de liberação do fármaco; Painel direito - Gráficos de contorno que mostram a relação entre o tamanho do MP, a mudança de T_g e a porcentagem de liberação do medicamento. A) 5%, B) 10% e C) 20% p / p de carga de 4-MC. Círculos pretos representam pontos de dados.



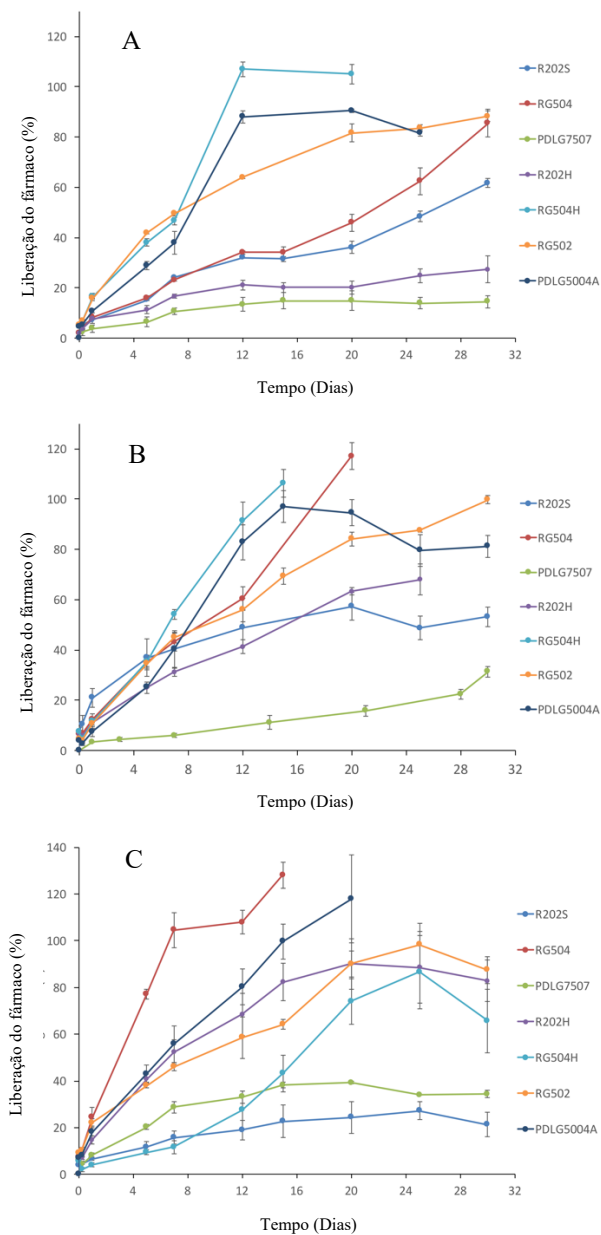
3.2.3 Efeito de carga de 4-MC nos perfis de liberação *in vitro*

Como esperado e amplamente documentado na literatura, as modificações observadas induzidas pela carga de 4-MC sobre a matriz polimérica influenciaram sua liberação a partir da MP, como resultado de uma organização física diferente da matriz polimérica, bem como do estado físico da molécula ativa.

Para quase todos os lotes, os perfis de liberação do fármaco *in vitro* foram de fato afetados pelo carregamento, embora não de uma maneira linear. A 5% m/m, as MPs PDLG7507, R202H e R202S apresentaram liberação incompleta ao longo de 30 dias, com apenas 10, 20 e 60% de liberação, respectivamente (Fig. 5.6A). A liberação mais rápida foi observada para RG504H e PDLG5004A a qual atingiu o máximo no dia 12, enquanto RG504 e RG502 atingiram 80% aos 30 dias. A 10% m/m, o PDLG7507 MP foi o mais lento, atingindo quase 30% após 30 dias e todos os outros lotes aumentaram de acordo com a concentração de 4-MC. Em particular, RG504H e RG504 liberaram completamente 4-MC nos dias 14 e 20, respectivamente, e R202H atingiu 60% no dia 30. RG502 e PDLG5004A foram os menos afetados pela carga da chalcona (Fig. 5.6B). A 20% m/m de carga, os únicos lotes liberando 100% foram MP RG504, PDLG5004A e RG502 nos dias 14, 20 e 24, respectivamente, enquanto que até 80% da liberação foi medida no dia 20 e 24 para MP R202H e RG504H. PDLG7507 e R202S permaneceram bastante baixos, com apenas cerca de 30% e 20% de 4-MC liberados, respectivamente (Fig. 5.6C).

Tal comportamento complexo pode ser entendido em parte considerando as alterações causadas pela 4-MC na morfologia das partículas, tamanho e estrutura da matriz.

Figura 5.6: Perfis de liberação *in vitro* de MP contendo 4-MC durante um período de 30 dias. A) 5%, B) 10% e C) 20% p/p de carga de 4-MC. A experiência foi realizada em triplicata em 30% p/v de PEG400, 0,1 M de PBS pH 7,4 a 37 °C.



As alterações destacadas pelas análises de tamanho de partícula, MEV e DSC e os dados relatados nas Tabelas 5.1 e 5.2 se correlacionam com o comportamento de liberação observado acima. Em particular, a consistência da liberação do fármaco do RG502 e PDLG5004A reflete a estabilidade observada pelo DSC com o aumento da carga de chalcona, embora as diferenças morfológicas já discutidas a 20% de carga (Fig. 5.3). Além disso, a redução na liberação do fármaco da MP R202S e RG504H a 20% de carga é o resultado da formação de aglomerado observada para MP R202S e o aumento de 5 vezes do tamanho de MP RG504H (Tabela 5.3, Fig. 28, 29). Por outro lado, o aumento de 4-MC cristalino na MP, como mostrado por análises de XRPD ou DSC e a presença de aglomerados de fármaco na superfície da partícula mostrada por MEV, provavelmente contribuiu para a liberação mais rápida de MP RG504H, RG504 e PDLG5004A.

A liberação particularmente baixa de MP PDLG7507 em todas as cargas provavelmente resultou do alto PM deste polímero e da maior porcentagem de monômeros de ácido láctico. A liberação foi apenas parcialmente influenciada pelo efeito plastificante e pela segregação do 4-MC na superfície do MP a 20% de carga (Fig. 5.2, Tabela 5.1).

A fim de estabelecer uma ligação entre as propriedades da MP, o efeito do carregamento de 4-MC e a porcentagem de liberação do fármaco, análise de correlação e gráficos de contorno foram construídos como mostrado na Figura 5.5. Os gráficos de contorno mostram claramente que, a 5% m/m, a maior porcentagem de liberação de fármaco (área sombreada vermelho-laranja) foi observada quando ocorreu o efeito anti-plastificante ($\Delta T_g > 0$). Com carga de 10% e 20%, o máximo foi deslocado para uma área de efeito plastificante moderado ($-5 < \Delta T_g < 0$). A liberação dependente do tamanho foi observada a 5% de carga, onde MP de tamanhos maiores liberaram o fármaco mais devagar que as partículas menores (Fig. 5.5A, painel direito). Em cargas mais altas, essa correlação foi perdida, como mostrado pela área sombreada em azul na Figura 5.5B e 5.5C no painel direito. A liberação mais lenta de fármaco em MP de partículas menores a 20% de carga pode ser explicada considerando fenômenos agregativos e a formação de aglomerados, como no caso do RG202S discutido anteriormente. Por outro lado, a liberação mais rápida de partículas maiores pode ser parcialmente atribuída à presença de aglomerados de 4-MC na superfície do MP, como mostrado anteriormente por análises de MEV, XRPD e DSC.

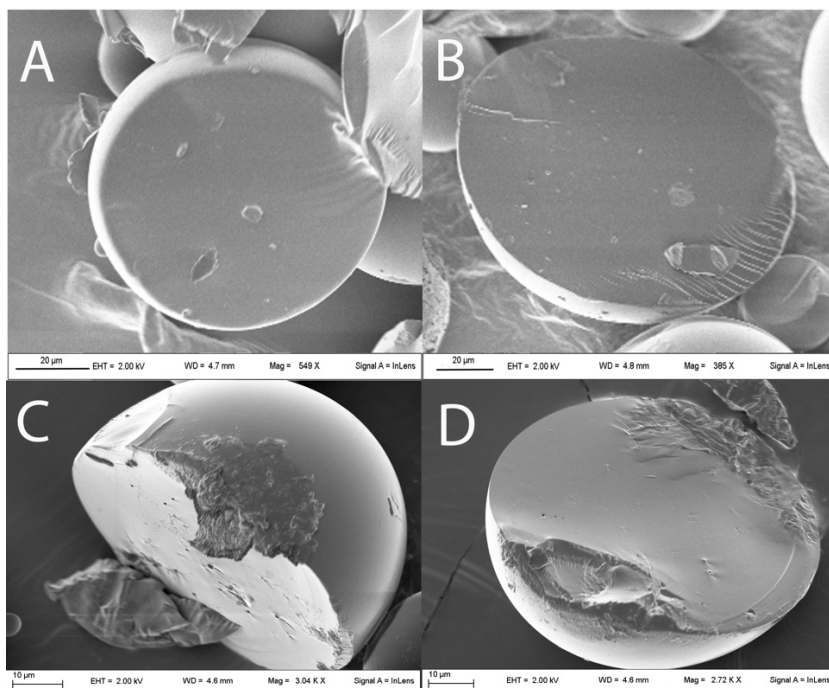
De acordo com os gráficos de correlação no painel esquerdo da Figura 5.5A - 5.5C, a liberação do fármaco e o ΔT_g estão correlacionados em uma

relação inversa, especialmente a 20% m/m de carga ($r^2 = 0,87907$, Fig. 5.5C). Em cargas mais baixas, essa correlação diminuiu ($r^2 = 0,69357$ a 5% m/m; $r^2 = 0,23598$ a 10% p/p, Fig. 5.5A, 5.5B). Inesperadamente, estes dados sugerem claramente que o aumento do efeito plastificante do polímero devido ao carregamento do 4-MC reduziu a liberação do fármaco.

Este comportamento pode ser explicado considerando que, no caso de materiais com baixo T_g , tais como polímeros de PLA e PLGA, o efeito da exposição de longo prazo a temperaturas próximas a T_g ou superior é conhecido por causar o recozimento de matrizes sólidas que podem resultar em polímeros menos poroso, mais deformável e com textura homogênea (FREDENBERG *et al.*, 2011).

Este é o caso das MPs carregadas com 4-MC, as quais se apresentaram não porosas e com um núcleo contínuo, independentemente do polímero utilizado (Fig. 5.7).

Figura 5.7: Exemplos de morfologia interna de MPs contendo 20% de 4-MC. (A) R202S, (B) R202H, (C) RG504H e (D) PDLG5004A.



A homogeneidade interna e a falta de poros observados para a MP que sofreu efeito plastificante e o provável amolecimento da matriz da MP podem explicar a relação inversa entre taxa de liberação e efeito plastificante. Esta suposição pode correlacionar-se com o efeito observado de fechamento de poros observado em MP PLGA devido à plastificação em água e relaxamento estrutural (ALLISON, 2008; HUANG *et al.*, 2015; KANG, SCHWENDEMAN, 2007). Além disso, a alta depleção de T_g , medida para alguns lotes a 20% de carga, torna o amolecimento de MP inevitável e esse fenômeno é frequentemente associado à agregação de partículas e aglomeração que reduzem a superfície disponível para hidratação e difusão de drogas. Tal efeito pode ser predominante sobre o aumento da difusividade e permeação devido a fenômenos de relaxamento da matriz.

Além disso, embora a plastificação posterior devido à água deva ser esperada após o primeiro passo de hidratação, a liberação de 4-MC reduz progressivamente a extensão da plastificação devido ao vazamento da molécula plastificante. Tais fenômenos podem desempenhar um papel na determinação do abrandamento da liberação do fármaco ao longo do tempo.

3.2.4 Cinética de liberação de fármaco

A fim de compreender melhor a cinética de liberação, os perfis de liberação obtidos foram ajustados a modelos cinéticos bem conhecidos. Os resultados de ajuste com os modelos de Higuchi, Peppas e ordem zero (Eq. 4, 5 e 6) são relatados na Tabela 5.3. O modelo de Peppas é usualmente aplicável sobre os primeiros 60% da curva de liberação, no entanto, uma vez que não foram observadas diferenças significativas no desempenho, o modelo foi aplicado a todo o conjunto de dados. Por outro lado, o modelo Higuchi, embora aplicável à superfícies planas e processos de difusão unidimensional, foi útil para destacar o transporte Fickiano puro inicial.

Previsivelmente, o modelo de Peppas (Eq.5) ajustou melhores dados experimentais, como mostrado por valores r^2 geralmente mais altos e menor χ^2 reduzido. R202S, R202H e PDLG7507 MP apresentaram a maior correlação e a menor redução do χ^2 correspondente, enquanto um menor desempenho foi observado para MP dos polímeros RG504H e PDLG5004A.

O único caso em que Eq. 6 era comparável à Eq. 5 foi para a liberação de fármaco da MP PDLG7507 a 10% p/p de carga ($r^2 = 0,98001$ e $0,98214$,

respectivamente) (Tabela 5.3), cujo perfil de liberação quase linear está próximo de um comportamento de taxa constante.

O modelo de Higuchi (Eq. 4) mostrou seu melhor desempenho para a MP RG502 e funcionou melhor que a Eq. 5 para R202S, R202H, RG502, PDLG5004A e PDLG7507 a 5 e 20% de carga. Uma certa mudança não linear do desempenho da interação do polímero com a carga de fármaco foi observada.

Tabela 5.3: Comparação de ordem zero, modelos Higuchi e Peppas com dados de liberação *in vitro* de 4-MC de MP biodegradável.

Modelo		Ordem Zero		Higuchi		Peppas		
Polímero	% p/p conteúdo	r ^{2*}	Red. χ ^{2**}	r ^{2*}	Red. χ ^{2**}	r ^{2*}	Red.χ ^{2**}	n ± (E.P.)
R202S	5	0.93566	26.03	0.94355	22.84	0.96754	13.14	0.69 ± 0.07
	10	0.31446	308.88	0.80750	86.73	0.94453	24.99	0.28 ± 0.04
	20	0.57485	37.79	0.89985	8.90	0.93912	5.41	0.35 ± 0.05
R202H	5	0.68301	29.31	0.95217	4.42	0.97531	2.28	0.38 ± 0.04
	10	0.91631	52.93	0.97736	14.32	0.98736	7.99	0.60 ± 0.04
	20	0.71833	369.72	0.95072	64.68	0.95761	55.65	0.43 ± 0.06
RG502	5	0.78798	258.74	0.98739	15.39	0.99103	10.94	0.45 ± 0.03
	10	0.90918	124.14	0.98662	18.29	0.99414	8.00	0.59 ± 0.03
	20	0.80597	237.34	0.96392	44.14	0.96440	43.55	0.48 ± 0.06
RG504H	5	0.89992	212.22	0.91090	188.94	0.93322	141.62	0.67 ± 0.13
	10	0.99029	16.56	0.91400	146.69	0.99083	15.65	0.91 ± 0.07
	20	0.89385	109.32	0.77327	233.51	0.88224	121.28	0.98 ± 0.21
RG504	5	0.97138	21.37	0.87195	95.61	0.96822	23.73	0.99 ± 0.10
	10	0.97760	34.49	0.88341	179.47	0.97584	37.19	0.92 ± 0.10
	20	0.85187	408.10	0.97234	76.22	0.97241	76.02	0.51 ± 0.07
PDLG5004A	5	0.80973	276.28	0.89126	157.90	0.89660	150.15	0.57 ± 0.13
	10	0.70183	488.15	0.85191	242.45	0.85193	242.41	0.50 ± 0.13
	20	0.96038	74.90	0.96997	56.76	0.99416	11.04	0.69 ± 0.04
PDLG7507	5	0.22668	19.86	0.73034	6.93	0.78947	5.41	0.36 ± 0.09
	10	0.97663	2.72	0.84177	18.39	0.97344	3.09	1.05 ± 0.12
	20	0.29836	134.59	0.79337	39.64	0.86320	26.24	0.34 ± 0.08

* $r^2 = r^2$ ajustado para o número de termos do preditor no modelo; **Reduzido $\chi^2 = \chi^2/\text{DoF}$ conforme obtido pelo método de Levenberg-Marquardt.

Estimativas do expoente n de Peppas calculadas a partir da Eq. 5 foram utilizados para estimar o processo responsável pela liberação. Na Tabela 5.3, os valores de n variaram de 0,28 a 1,14. Uma difusão Fickiana pura das esferas foi associada a $n = 0,43$ (RITGER e PEPPAS, 1987b, 1987c; SIEPMANN e PEPPAS, 2001). Para partículas esféricas, é estabelecido que para $n \leq 0,43$ um transporte Fickiano puro pode ser assumido, enquanto $0,43 < n < 0,85$ é geralmente ligado a um mecanismo combinado de difusão e transporte de caso II, muitas vezes referido como transporte anômalo, e quando $n \geq 0,85$ ocorre um transporte de caso-II indicando uma cinética de ordem zero à medida que o n se aproxima de 1 (RITGER e PEPPAS, 1987b, 1987c; SIEPMANN e PEPPAS, 2001).

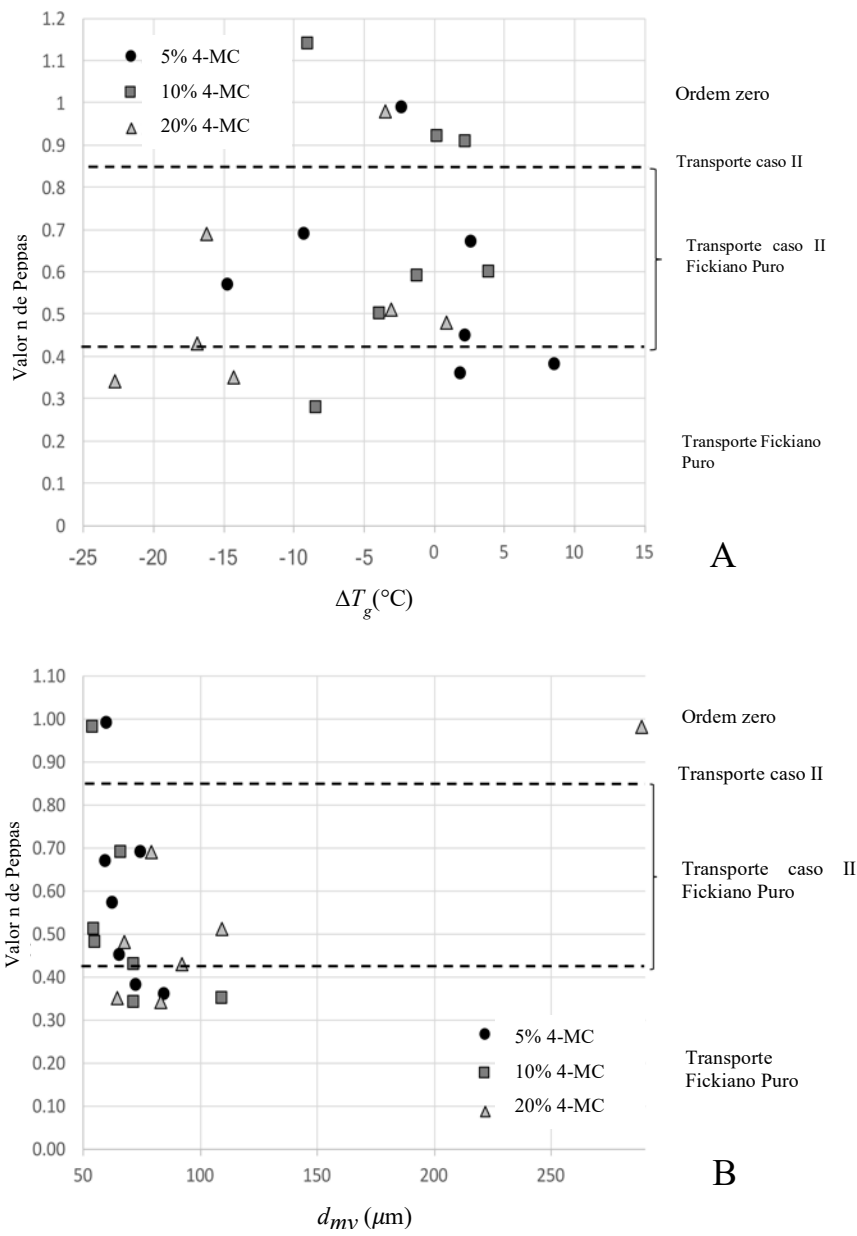
O transporte Caso II caracteriza sistemas de liberação controlada por inchamento, enquanto o transporte anômalo é uma mistura de processos Fickianos e não-Fickianos. Naturalmente, no presente trabalho, sendo a contribuição da degradação do polímero não modelada pela equação cinética empregada, as seguintes deduções devem ser cuidadosamente consideradas especialmente para polímeros PLGA 50:50 de baixo peso molecular, para os quais a modelagem de liberação pode ser significativamente distorcida em tempos mais altos.

Apesar dessas limitações, a liberação do 4-MC pareceu se correlacionar bem com as características do polímero. De fato, a difusão Fickiana pura pareceu ocorrer a partir do polímero de baixo peso molecular MP R202S, R202H e RG502, com a exceção do polímero PDLG7507 de elevado PM. Por outro lado, um mecanismo de liberação combinada mais complexo foi encontrado para RG504H, RG504 e PDLG5004A ($n > 0,50$). Como mencionado anteriormente, o carregamento de fármaco teve alguma influência no mecanismo de liberação, no entanto, tal dependência não é direta. Para alguns lotes de MP, um aumento na carga de fármaco causou uma mudança de um transporte anômalo para o caso II ou para transporte Fickiano puro. Este é o caso do MP RG504 e R202S. Um comportamento mais consistente, quase independente da carga, foi observado para MP R202H, RG502 e PDLG5004A que mostrou um mecanismo de difusão Fickiano puro predominante ($0,38 < n < 0,60$) e um mecanismo de combinação de transporte de difusão Fickiano - transporte caso-II ($0,45 < n < 0,69$), respectivamente. O MP PDLG7507, como já destacado, pareceu se comportar de forma menos consistente ao seguir um mecanismo de difusão Fickiano puro a 5 e 20% de carga ($n = 0,36; 0,34$), enquanto a liberação se aproximou de uma cinética de ordem zero a 10% de carga ($n = 1,14$).

Enquanto um mecanismo Fickiano puro predominante pode ser associado com a presença aumentada de 4-MC na superfície do MP, o transporte de caso II e os processos anômalos dependem das propriedades da matriz da MP e do estado físico, bem como das características do polímero. A relação global entre todos os parâmetros de formulação pode explicar o comportamento complexo observado para os diferentes lotes de MP. Juntamente com o aumento da carga, os eventos de plastificação têm um papel no aumento da difusividade, provocando assim uma mudança para o transporte Fickiano. A este respeito, MP altamente plasticizado mostrou uma tendência a liberar a 4-MC principalmente através de difusão (Figura 5.8-A). O tamanho teve uma influência no mecanismo de liberação que também dependia do carregamento. De fato, a 5% e 10% de carga, um deslocamento de quase ordem zero para o transporte anômalo e Fickiano ocorreu com o aumento do tamanho de 50 para > 100 μm . Um comportamento mais esparsa foi observado a 20% de carga, embora uma tendência à cinética de ordem zero foi novamente vista para partículas extremamente grandes (MP RG504H a 20% de carga - Figura 5.8-B).

Portanto, além das propriedades do polímero, o efeito de carga da 4-MC foi decisivo para influenciar a cinética de liberação do MP PLA e do PLGA, pois alterou a morfologia da MP, tamanho, distribuição do fármaco no MP, plastificação da matriz e, portanto, a tendência ao amolecimento da matriz polimérica.

Figura 5.8: Influência de A) T_g *shift* e B) d_{mv} no processo de liberação, representado pelas estimativas de Peppas, dos diferentes lotes MP no aumento da carga de 4-MC.



3.3 Compostos de inclusão de Hidrotalcita como estratégia para evitar problemas de fabricação de MP

Considerando o notável efeito do carregamento do 4-MC em todos os lotes, mas em particular na MP R202S a 20% de carga, este lote foi selecionado para testar o uso de hidrotalcita (sHTC) como uma estratégia para evitar problemas de fabricação que possam ocorrer ao microencapsular fármacos fortemente plastificantes em MP de PLA e PLGA. O pressuposto inicial é que o encapsulamento de compostos de inclusão sHTC do fármaco possa evitar o contato direto da molécula ativa com o polímero, favorecendo assim a formação de MP e limitando as questões de estabilidade durante o armazenamento.

Para atingir este objetivo, abordagens inovadoras foram aplicadas para permitir o carregamento de 4-MC em argilas lamelares sHTC. De fato, o 4-MC é altamente hidrofóbico e é desprovido da carga negativa necessária para a ligação com as camadas HTC carregadas positivamente. Portanto, HTC foi modificada com ST para formar um bolso hidrofóbico capaz de acomodar 4-MC em grandes quantidades. Deste modo, foi possível obter > 50% m/m de composto 4-MC-sHTC. O composto de inclusão foi obtido como descrito acima e tinha a seguinte composição: $\text{Mg}_{0,67}\text{Al}_{0,33}(\text{OH})_2\text{ST}_{0,248}(\text{NO}_3)_{0,082}(4\text{-MC})_{0,56}$.

Os padrões de XRPD (Fig. 5.9) exibiram um aumento do espaçamento basal de 30,5 Å (distância entre camadas típica de sHTC) a cerca de 38 Å. Ao mesmo tempo, os picos típicos do 4-MC cristalino estavam ausentes, atestando que o 4-MC estava aprisionado dentro do espaço hidrofóbico gerado pela intercalação com ST. As medições de RMN- ^1H em 4-MC extraídas com etanol a partir de sHTC mostraram que a sua estrutura molecular permaneceu inalterada.

O composto 4-MC intercalado com hidrotalcita (4-MC-sHTC) foi então encapsulado em MP R202S utilizando um método de emulsificação/evaporação de solvente A/O/A de emulsão dupla. As MPs foram carregadas em quantidades equivalentes a 5%, 10% e 20% m/m de 4-MC-sHTC. A mudança no método de preparação utilizada foi necessária uma vez que o método de emulsão O/A utilizado para a preparação de MP carregado com 4-MC não é compatível com a utilização do 4-MC-sHTC. De fato, a dispersão de 4-MC-sHTC em diclorometano levaria à extração de 4-MC da HTC com a óbvia perda das vantagens dessa estratégia. Por conseguinte, o 4-MC-sHTC foi primeiro disperso em água e depois emulsionado na solução de polímero orgânico e assim disperso numa segunda fase aquosa com um estabilizador. Tal procedimento deve

assegurar um contato reduzido do composto com o solvente orgânico, evitando assim a lixiviação do 4-MC da argila.

As características da MP obtida são apresentadas na Tabela 5.4. O tamanho de partícula resultou aumentado em comparação com a MP obtida anteriormente a 5% e 10% de carga, mas muito mais baixo a 20% de carga (Figura 5.9). O teor de fármaco foi geralmente comparável ao relatado na Tabela 5.2 e consistente com o aumento da carga, com % EE entre 60% e 80%. O achado mais importante foi a redução drástica do efeito plastificante, com uma depleção máxima de T_g de apenas cerca de $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 20% de carga, comparado com $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ medido para MP R202S carregado com 4-MC (ver Tabela 5.2 e 5.4) (Figura 5.11).

As distribuições de tamanho de partícula foram geralmente mais homogêneas, especialmente a 20% de carga, com a presença de poucos agregados apenas a 5 % de carga (Figura 5.9 e Tabela 5.4). A MP manteve sua forma esférica, não apresentando alterações com o carregamento, mas com uma superfície rugosa como resultado das diferenças no processo de formação de partículas (Figura 5.9). A razão para tal morfologia pode ser entendida olhando para a estrutura interna da MP (Figura 5.9). O método de dupla emulsão produziu MP com cavidades internas que representam o espaço anteriormente ocupado por gotículas orgânicas e menores gotas de água internas. O núcleo poroso mais heterogêneo produz as irregularidades responsáveis pela rugosidade superficial observada. Essa porosidade interna não é transferida para a superfície da partícula que, embora irregular, parece compacta e contínua.

Análise de EDX foram realizadas e os espectros obtidos e mostram os sinais dependentes de carga dos componentes Mg e Al da sHTC, assim como o mapeamento de EDX mostra a distribuição de 4-MC-sHTC dentro e fora da MP em 5, 10 e 20% de carga (Figura 5.10).

Os perfis térmicos e XPRD da MP são apresentados na Figura 5.11, onde a presença de fusão da 4-MC é observada a 10 e 20% de carga (Figura 5.11 A). Os perfis de DSC correlacionam-se com perfis de XPRD que mostram pequenos picos a 20% de carga, provavelmente atribuíveis a uma pequena quantidade de 4-MC cristalino (Figura 5.11 B).

Tais observações sugerem que uma pequena quantidade de 4-MC pode ser liberada do composto de inclusão durante a preparação, um fenômeno provavelmente devido a um contato parcial do sólido 4-MC-sHTC disperso com o solvente orgânico por emulsificação.

Esta presença foi confirmada mesmo medindo a liberação de 4-MC ao longo de 30 dias (Figura 5.12). De fato, MP carregadas com o composto intercalado (4-MC-sHTC) a 20% de carga, o 4-MC foi quase completamente liberado na primeira semana. Este comportamento pode ser explicado considerando uma localização da molécula perto da superfície e a presença parcial de 4-MC livre como sugerido por DSC e XRPD.

Figura 5.9: Comparação da distribuição de tamanho de partícula (esquerda) e morfologia externa e interna (direita) de R202S MP carregada com 4-MC-sHTC em A) 5%, B) 10%, C, D) 20% p / p.

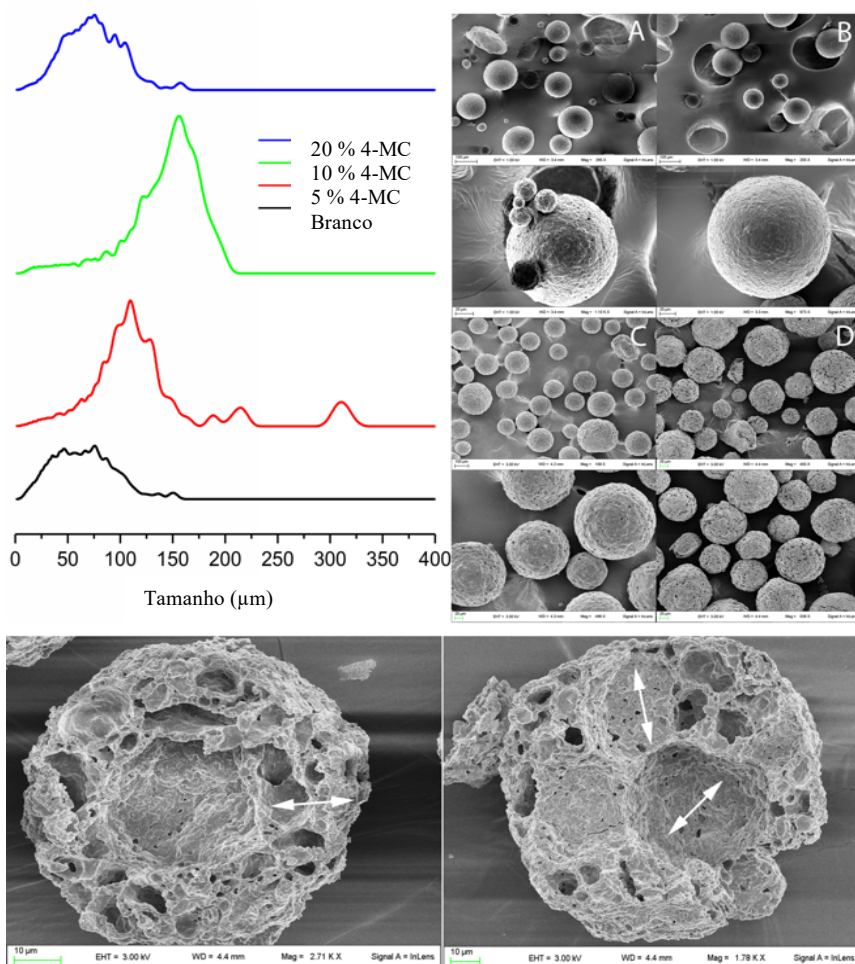


Tabela 5.4: Propriedades e efeito nos valores de T_g para MP contendo 4-MC-sHTC em diferentes cargas de fármaco.

Polímero	Branco		5%				10%				20%			
	d_{mv} (μm) (D.P.)	Span	d_{mv} (μm) (D.P.)	Span	Teor (%) \pm D.P.	EE (%) \pm D.P.	d_{mv} (μm) (D.P.)	Span	Teor (%) \pm D.P.	EE (%) \pm D.P.	d_{mv} (μm) (D.P.)	Span	Teor (%) \pm D.P.	EE (%) \pm D.P.
R202S	49.6 (28.3)	1.61	98.6 (49.8)	1.01	3.4 ± 0.3	68.2 ± 2.8	122.4 (49.7)	1.00	8.0 ± 0.5	80.3 ± 5.4	61.5 (28.0)	1.24	12.2 ± 0.5	60.9 ± 5.4
	$T_g \pm \text{D.P.}$		$T_g \pm \text{D.P.}$		ΔT_g^*		$T_g \pm \text{D.P.}$		ΔT_g^*		$T_g \pm \text{D.P.}$		ΔT_g^*	
	41.4 ± 0.4		38.3 ± 1.0		-3.0^{**}		39.1 ± 0.2		-2.2^{**}		36.2 ± 0.6		-5.2^{**}	

* $\Delta T_g = T_g \text{ contendo 4-MC} - T_g \text{ branco}$; ** $p < 0,05$ comparado com branco.

Em carregamentos mais baixos, a liberação foi muito mais lenta, com apenas 25 - 30% de 4-MC liberados ao longo de 30 dias. Em comparação com os perfis obtidos com a MP R202S carregado com 4-MC, o uso do sHTC parece permitir a extensão da liberação por um período de tempo mais longo. Deve-se ter em mente que o baixo perfil de liberação de 4-MC a 20% m/m na MP R202S foi devido à agregação de partículas e formação de grandes aglomerados com perda da morfologia das partículas. Pelo contrário, com a MP sHTC, o tamanho e a forma das MPs são preservados e a liberação lenta observada é imputável ao efeito da inclusão de 4-MC na argila e a um estado vítreo superior da matriz polimérica.

A investigação do possível mecanismo de liberação da MP foi realizada como já descrito para MP carregada com 4-MC. Mesmo nesse caso, o modelo mais adequado foi o dos Peppas, que foi, portanto, empregado para teorizar o mecanismo de liberação mais provável (Tab. 5.5).

As estimativas n relatadas na Tabela 5.5, sugerem que um transporte Fickiano puro é o processo dominante que leva à liberação de 4-MC ($0,12 < n < 0,32$) em todas as cargas. Portanto, o uso de sHTC não alterou drasticamente os processos de liberação da MP R202S, no entanto, a evidente porosidade interna resultante do método de preparação de emulsão dupla mudou ainda mais o mecanismo principal de liberação para a difusão Fickiana pura. Este efeito já foi descrito para partículas porosas (KLOSE *et al.*, 2006).

Os resultados evidenciam que a inclusão nas argilas sHTC reduz o impacto da encapsulação do 4-MC no estado físico da MP, resultando em um comportamento mais consistente.

Tabela 5.5: Comparação de ordem Zero, modelos de Higuchi e Peppas para dados de liberação in vitro de 4-MC de R202S MP carregados com o composto de inclusão 4-MC-sHTC.

Modelo	Zero order		Higuchi		Peppas		
	r^{2*}	Red. χ^{2**}	r^{2*}	Red. χ^{2**}	r^{2*}	Red. χ^{2**}	$n \pm (\text{S.E.})$
5	0.29612	71.63	0.87003	13.23	0.95858	4.22	0.32 ± 0.05
10	0.23766	99.96	0.86092	18.24	0.97501	3.28	0.30 ± 0.03
20	0.92165	1628.24	0.22508	656.60	0.90815	77.82	0.12 ± 0.05

Figura 5.10: Painei a) Espectro de EDX mostrando os sinais dependentes de carga dos componentes Mg e Al da sHTC; Painei b) mapeamento EDX da distribuição 4-MC-HTCs dentro e fora do MP em 1) 5%, 2) 10% e 3) 20% de carga (vermelho = sinal Mg, verde = sinal Al).

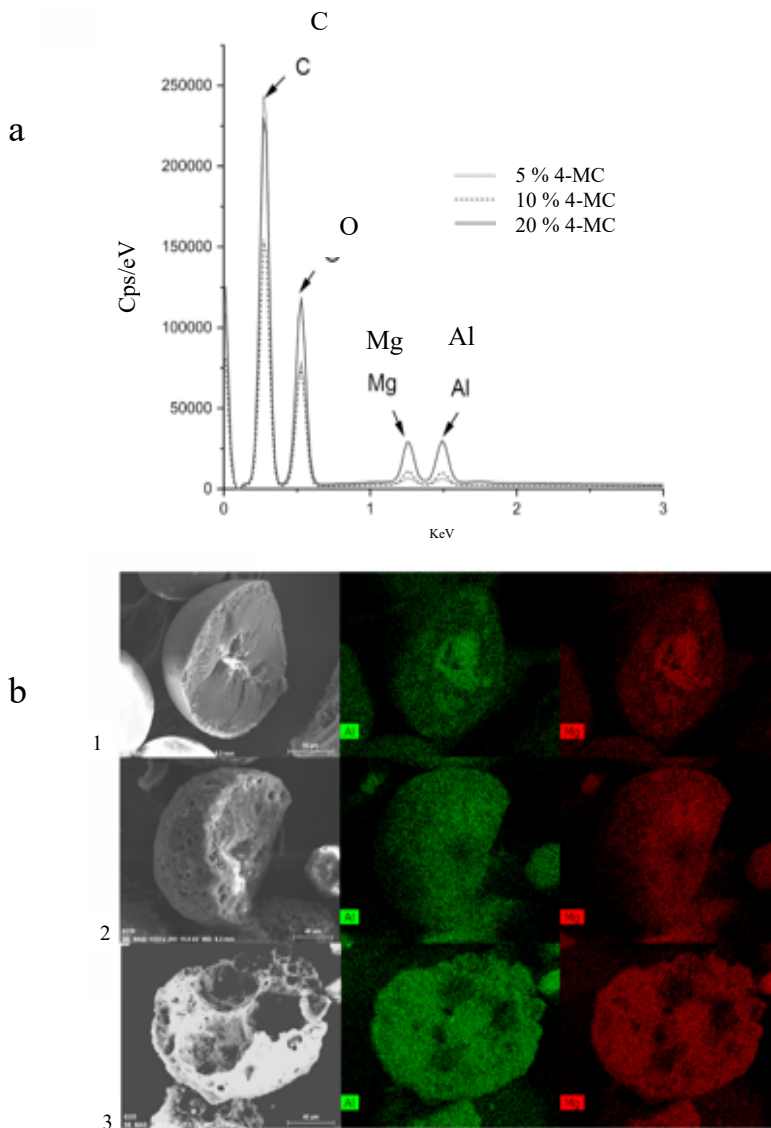


Figura 5.11: A) Termogramas de DSC para MP R202S contendo 4-MC- sHTC. B) Perfil de XPRD para MP R202S contendo 4-MC- sHTC.

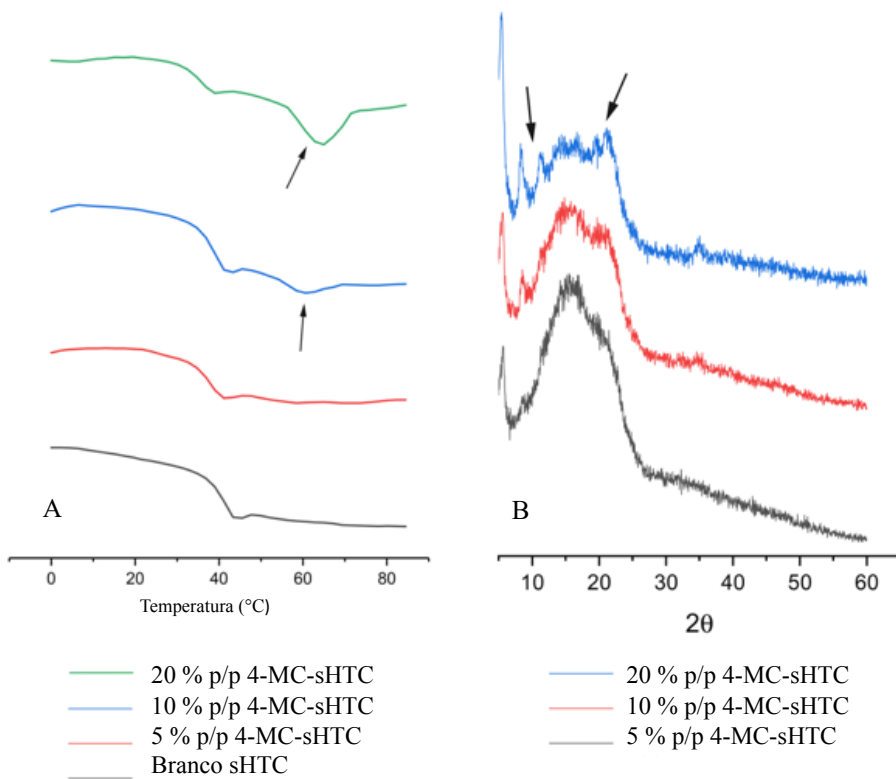
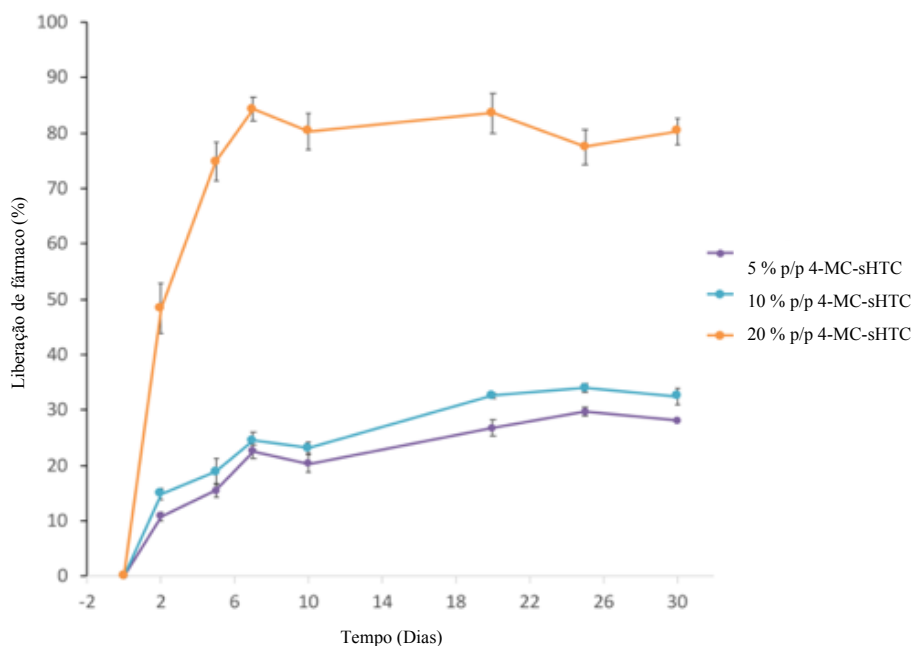


Figura 5.12: Perfil de liberação da MP R202S contendo 4-MC- sHTC durante 30 dias.



3.3.1 Estabilidade da MP carregada com 4-MC e 4-MC-sHTC

A fim de obter dados sobre como a estratégia sHTC pode afetar a estabilidade do armazenamento de MP, os lotes de MP carregados com 4-MC a 20% m/m e 4-MC-sHTC foram mantidos durante 8 meses a temperatura e umidade controladas. Análises térmicas e de XRPD, bem como observações morfológicas, foram então replicadas.

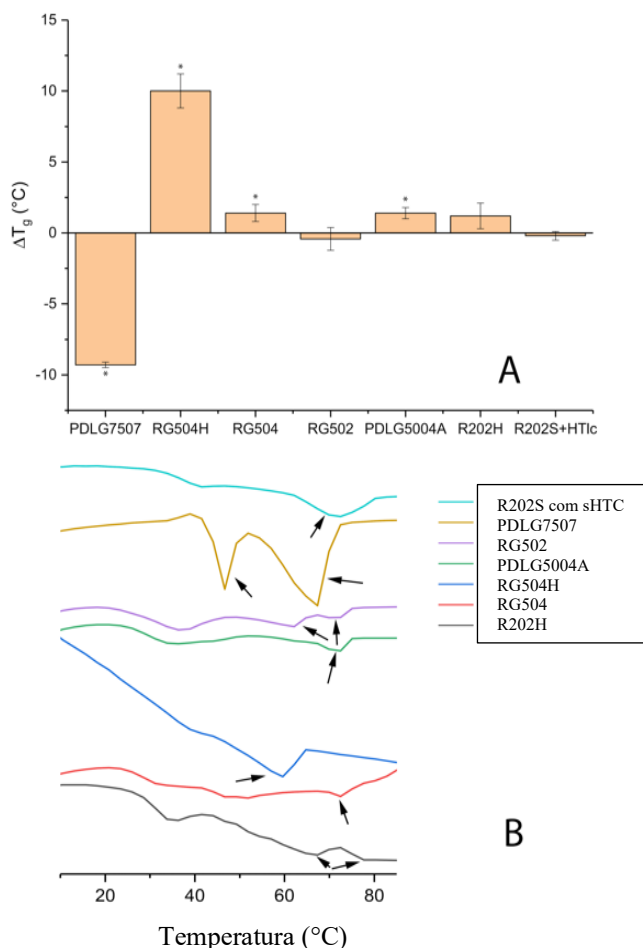
Variações significativas de T_g foram registradas para MP RG504H, PDLG7505, RG504 e PDLG5004A (Figura 5.13), alinhados com as pequenas alterações observadas na cristalinidade (Figura 5.14). Além disso, os perfis DSC também mostraram um aumento no sinal de fusão de 4-MC quase em todos os lotes mencionados (Figura 5.13B).

Variações de T_g não significativas foram medidas para MP RG502 e R202S carregadas com o composto de inclusão.

Estas mudanças observadas podem ser o resultado de uma reorganização da distribuição de 4-MC na matriz polimérica. Se uma cristalização lenta ocorre, um aumento combinado de T_g é esperado devido à segregação de cristais que dão origem a uma nova fase física, reduzindo a quantidade de ativos molecularmente dispersos na matriz polimérica. Por sua vez, se ocorrer solubilização adicional, mais depleção de T_g pode ser registrada.

Tais eventos podem corresponder aos observados na Figura 5.13, onde o aumento de T_g registrado para MP RG504H e, em muito menor proporção, para MP RG504 e PDLG5004A refletem uma possível cristalização e segregação de 4-MC, parcialmente confirmada pelos perfis de XRPD (Figura 5.14).

Figura 5.13: Perfil térmico das MPs após 8 meses de armazenamento.



Os perfis de XRPD (Figura 5.14) após 8 meses de incubação mostraram um pequeno aumento de cristalinidade para alguns lotes, tais como MP RG504H, PDLG5004A e, em menor grau, MP PDLG75057 (Figura 5.14). Estas modificações podem ser devidas a uma tendência lenta do 4-MC em recristalizar e segregar, o que pode tornar-se um problema considerável em relação ao armazenamento a longo prazo de tais formulações.

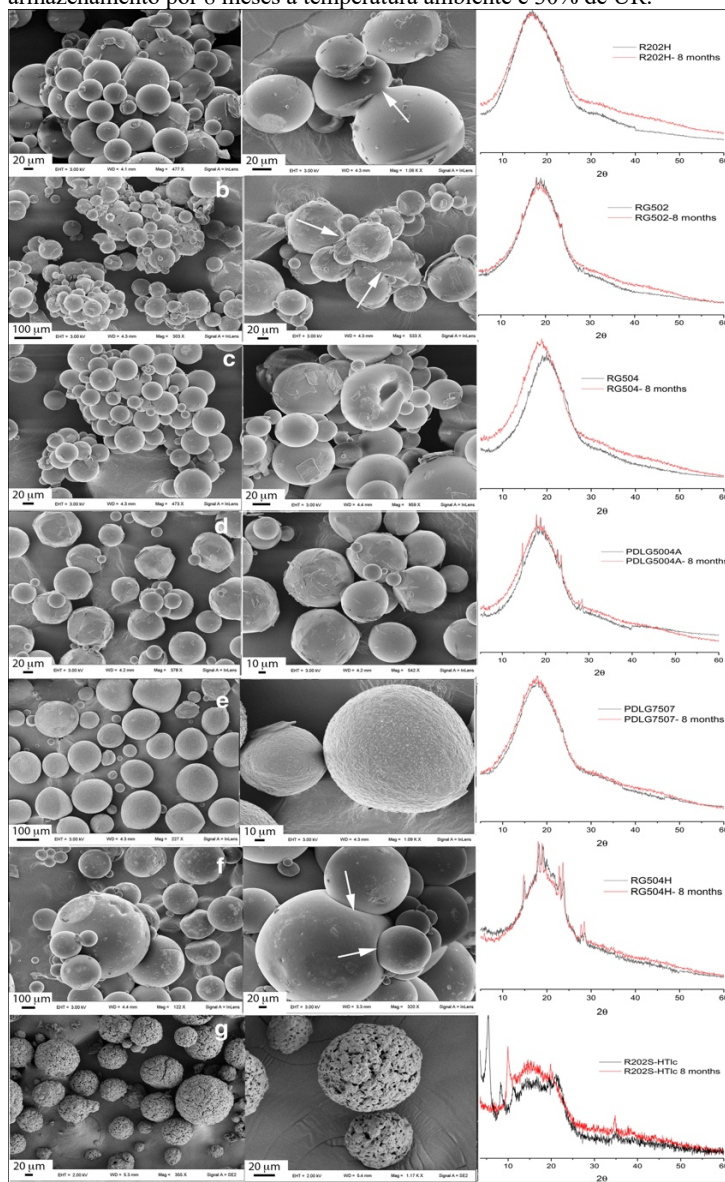
A MP R202S carregada com 4-MC-sHTC era quase idêntica, com perfis mostrando pequenos picos não correspondentes aos principais sinais de 4-MC.

As mudanças de perfil destacadas na Figura 5.14 foram parcialmente confirmadas pela medição das alterações de T_g nos lotes envelhecidos.

Como pode ser visto na Figura 5.14, a MP carregada com 4-MC preservou a sua forma esférica, no entanto, foi observado um aumento significativo de agregados para quase todos os lotes (Fig. 5.14A - 5.14D, 5.14F). Apenas a MP PDLG7507 apareceu menos aglomerada, embora com um aumento de cristais de superfície, provavelmente atribuível a 4-MC. A agregação é devida ao amolecimento do polímero que suaviza a matriz polimérica ao longo do tempo e favorece a fusão e a aderência das partículas.

Por outro lado, a MP R202S carregada com 4-MC-sHTC estava praticamente inalterada (Figura 5.14G). MP R202S carregada com 4-MC a 20% m/m não foram consideradas neste estudo, uma vez que a sua estrutura e morfologia já foram perdidas pouco tempo após a preparação.

Figura 5.14: Morfologia do MP carregado com 20% p/p 4-MC e 4-MC-sHTC após armazenamento por 8 meses à temperatura ambiente e 30% de UR.



Setas = aglomerados e pontos de aderência entre partículas devido ao recozimento de polímeros.
Direita = comparação dos perfis de XRPD correspondentes registrados antes e depois do armazenamento por 8 meses.

4 Conclusão

Os resultados evidenciam informações importantes para abordar questões de fabricação de MPs com PLA e PLGA contendo 4-MC e apontam para uma nova estratégia de estabilização. O efeito plastificante considerável induzido pela retenção de 4-MC provocou sérios problemas na fabricação e armazenamento da MP, confirmando o efeito plastificante que pequenas moléculas podem exercer sobre matrizes poliméricas de temperaturas vítreas baixas. Em particular, o efeito extensivo sobre a MP R202S carregada com 4-MC impediu a recuperação e sua estabilidade.

A formação do complexo de inclusão 4-MC-sHTC proposta como uma estratégia de estabilização foi bem-sucedida na melhoria da estabilidade da MP. Embora esta abordagem tenha sido testada apenas no lote da MP R202S carregado a 20% m/m, a mais problemática, os resultados obtidos poderiam ser razoavelmente estendidos a todas as MP PLA e PLGA semelhantes. A suposição de que o aprisionamento de 4-MC na argila teria limitado a interação com o polímero foi confirmada pela maior estabilidade durante a obtenção e armazenamento de 8 meses. Portanto, esta estratégia se mostra uma alternativa viável a ser transferida para outros sistemas de liberação de fármacos, via MPs. Cabe ressaltar, porém, que além da restrição a um único lote de MP, outra limitação potencial do presente estudo é a diferença entre o método de preparação de emulsão única *versus* o de emulsão dupla requerido para encapsular o composto de inclusão de 4-MC-sHTC.

Entretanto, embora tenham sido obtidas MPs mais porosas e irregulares, essas diferenças morfológicas não impedem as interações fármaco-polímero responsáveis pela desestabilização observada, especialmente considerando a alta afinidade do 4-MC com os polímeros de poliéster. Portanto, as diferenças no método empregado isoladamente não podem justificar a melhoria observada na estabilização da MP.

CAPÍTULO VI

Atividade osteogênica da 4-metoxi chalcona em *scaffolds* biodegradáveis

Este artigo será submetido ao periódico *European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutics*, com fator de impacto igual a 4,67.

Atividade osteogênica da 4-metoxi chalcona em *scaffolds* biodegradáveis

Danyela Francine Benvenutti^a, David Tames^a, Telmo Mezadri^a, Rogério Corrêa^a, Fatima de Campos Buzzi^a, Maria Verônica Davila Pastor^a, José Roberto Santin^a, Stefano Giovagnoli^b, Riccardo Vivani^b, Maurizio Ricci^b, Tania Mari Bellé Bresolin^a

^a Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), P.O.Box 360,88302-202, Itajaí, SC, Brasil

^b Departamento de Ciências Farmacêuticas - Università degli Studi di Perugia, Via del Liceo 1, 06123 Perugia, Itália

Resumo

O tecido ósseo apresenta capacidade inerente para regenerar-se, entretanto, em algumas circunstâncias a sua capacidade regenerativa é alterada ou o dano é tão extenso que impossibilita o reparo ósseo. Diante da baixa eficácia ou elevado custo das alternativas disponíveis para enxertos e reparos ósseos, há necessidade de investimento em novos fármacos e enxertos para a reparação óssea, sendo a chalcona 4-metoxi (4-MC) muito promissora por apresentar ação osteogênica e anti-inflamatória. Este candidato a fármaco foi previamente submetido a estudos de pre-formulação e incorporação em micropartículas poliméricas biodegradáveis. Este trabalho visou desenvolver uma plataforma de liberação da 4-MC para regeneração óssea, por meio de *scaffold* polimérico biodegradável. O polímero escolhido para o desenvolvimento dos *scaffolds* foi o PLGA 7507 com o qual foi desenvolvido micropartículas (MPs) contendo 10% de chalcona, com formação de *scaffolds* através do processo de sinterização. As MPs e os *scaffolds* foram caracterizados através de análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV), análise de tamanho de partículas, eficiência de encapsulação e análise de comportamento térmico (DSC). Também foi realizada análise de liberação de fármaco em células de Franz e o potencial irritante dos *scaffolds* no modelo HET-CAM. A regeneração óssea foi avaliada no modelo de ferida crítica na calota craniana de ratos. Os grupos controle (*scaffolds* branco) e tratado (*scaffolds* contendo a 4-MC), após 30 e 60 dias, foram eutanasiados e as calotas retiradas para análise de transiluminescência, análises histológicas e MEV. Os *scaffolds* produzidos apresentaram tamanho de poros entre 100 e 200 μm e liberação de fármaco de 70,45% em 60 dias, ambos parâmetros desejáveis na terapia tecidual

óssea. Os *scaffolds* contendo 4-MC demonstraram um fechamento da ferida de aproximadamente 25,98% e 62,99% para os grupos controle e tratado de 30 dias, respectivamente e de 58,88 e 79,44% para os grupos controle e tratado de 60 dias, respectivamente. Foi evidenciada grande quantidade de células e vasos sanguíneos dentro dos poros dos *scaffolds*, sendo essa característica mais evidente nos *scaffolds* contendo a chalcona, quando comparados com os *scaffolds* controle (sem a chalcona). A ação osteogênica da 4-MC foi comprovada pela maior formação de colágeno e ossos primário e secundário em comparação com o grupo controle. Portanto, a plataforma desenvolvida é um sistema eficaz e que atinge todos os requisitos para a terapia de regeneração óssea, sendo que a incorporação da 4-MC melhorou significativamente a atividade osteogênica do sistema.

1 Introdução

O Defeitos ósseos de grande extensão, podem resultar de incidentes traumáticos, fragilidade óssea originária de doenças degenerativas ou idade avançada, anormalidades congênitas, infecção ou câncer e representam um grande desafio para a medicina reconstrutiva (PARK *et al.*, 2017).

No Brasil o crescente problema da violência, doenças ocupacionais e acidentes de trânsito, constituem mais de 90% dos atendimentos médicos destinados à traumatologia, resultando em um problema epidemiológico e de gestão, devido ao elevado número de procedimentos realizados e alto valor de recursos financeiros envolvidos. No ano de 2017 foram realizados cerca de 7.392 procedimentos de alta complexidade e 92.400 procedimentos de média complexidade em traumatologia e ortopedia (BRASIL, 2018). Nas cirurgias ortopédicas realizadas pelo Sistema Único de Saúde (SUS) são disponibilizados enxertos metálicos (cromo-cobalto), parafusos de titânio ou liga de titânio, cimento ósseo sem antibiótico e componentes de polietileno de alto peso molecular (BRASIL, 2017).

Para que ocorra remodelação óssea, os enxertos devem possuir características específicas imprescindíveis, tais como: ser osteocondutores (porosos para que ocorra a migração celular promovendo um ambiente vascularizado), rígidos para garantir resistência mecânica, osteoindutores (possuir uma substância com ação osteogênica), apresentar segurança biológica, ausência de restrições de tamanho, longa vida útil e custo razoável (HUANG *et al.*, 2016).

Atualmente, entre as opções terapêuticas disponíveis, existe a terapia a laser de baixa potência que tem sido utilizada para auxiliar no reparo do tecido ósseo após cirurgia, porém essa metodologia não está devidamente padronizada quanto aos parâmetros de estimulação (SANTINONI *et al.*, 2017).

Outra opção são as proteínas morfogenéticas ósseas recombinantes humanas (rhBMP-2). Seu uso foi aprovado pela Agência Federal de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (*Food and Drug Administration* [FDA]) em 2002. Essa proteína apresenta uma ação de aceleração na reparação óssea quando inserida no local de tratamento, independente da associação com o material carreador. Entretanto, além do processo de difusão ser rápido, quando aplicada em altas concentrações, diretamente no tecido ósseo, não é tão efetiva em osteogênese e é um material de alto custo, dificultando sua utilização em áreas muito extensas (LEE *et al.*, 1994; BOSTROM *et al.*, 1995; ZHAO *et al.*, 2005;

ISSA *et al.*, 2008; ISSA *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2017). Seu uso está correlacionado a aumentos significativos nas despesas hospitalares e estima-se que seu uso em procedimentos toracolombaros degenerativos potencialmente custou mais de US\$ 900 milhões em despesas hospitalares de 2002 a 2008 nos Estados Unidos da América (EUA) (DAGOSTINO *et al.*, 2014).

Este cenário motiva a investigação de novos fármacos e enxertos para o processo de reparação óssea, sendo as chalconas potenciais candidatos devido à sua ampla atividade terapêutica, descrita por vários autores. Choi *et al.* (2018), estudaram quatro tipos de chalconas e observaram que as mesmas possuem capacidade de diferenciação osteogênica *in vitro* e propriedades antibacterianas, sendo que substituições nos anéis A e B por grupamentos hidroxila e metoxi geram diferentes potenciais de toxicidade e proliferação celular. Ortolan *et al.* (2014; 2017), avaliaram a ação osteogênica e anti-inflamatória de diversas chalconas e em especial a chalcona (2E)-1-fenil-3-(4-metoxifenil)-2-propen-1-ona (4-MC) apresentou resultados expressivos, mesmo veiculada em vaselina, no modelo de ferida crítica na calota craniana de ratos, onde apresentou cerca de 60% de fechamento da ferida em 30 dias. Porém, não há relato de veiculação de chalconas em plataformas de liberação adequadas ao uso em enxertos ósseos, tampouco foi explorado o mecanismo de ação osteogênica.

Sendo assim, este trabalho teve como objetivo desenvolver um sistema de liberação da chalcona 4-MC, na forma de *scaffolds* poliméricos biodegradáveis e biocompatíveis, como arcabouço na terapia de regeneração óssea com todas as características necessárias para promover uma completa remodelação óssea, empregando uma tecnologia acessível para países em desenvolvimento como é o caso do Brasil.

2 Metodologias

2.1. Materiais

A 4-MC foi sintetizada e caracterizada de acordo com item 2.2 do capítulo III deste trabalho. O polímero, de grau farmacêutico, Poli (D, L-lactideo:glicolideo, 75:25), ou PLGA 7507, com viscosidade 0,76 dL/g, peso molecular 66,000 - 107,000 e densidade 1,1 – 1,54 g/cm³ foi adquirido da Purasorb® (PURAC Bihem, Gorinchem, Holanda). Os demais reagentes e solventes utilizados foram de grau analítico.

2.2 Desenvolvimento de sistema de liberação

O desenvolvimento de um sistema de liberação para a 4-MC foi realizado de acordo com a metodologia descrita no capítulo V. Esta etapa foi realizada em parceria com o professor Dr. Maurizio Ricci na Universidade de Perugia, Itália. A chalcona foi incorporada inicialmente em diversos tipos de polímeros pelo método microencapsulação por evaporação de solvente e posteriormente foi selecionado o polímero que melhor se adaptou à chalcona para produzir os *scaffolds*, o qual apresenta ação osteocondutiva. De acordo com estudos prévios mencionados no capítulo V deste trabalho, o polímero escolhido para o desenvolvimento dos *scaffolds* foi o PDLG 7507, o qual é aprovado pelo FDA como sendo um polímero seguro e eficaz na regeneração óssea. A técnica utilizada na produção das MPs foi a mesma descrita no item 2.3 do capítulo V deste trabalho. A concentração de 10% de chalcona se baseou em estudos anteriores, onde a 4-MC foi incorporada nesta concentração, em vaselina (ORTOLAN *et al.*, 2014).

2.3 Caracterização das micropartículas (MP)

As MPs foram caracterizadas quanto à sua estrutura superficial e porosidade por MEV usando um microscópio eletrônico de varredura FEG LEO 1525 (Bruker, Milan, Itália). Os padrões de difração de raios X (XRPD) foram coletados de acordo com o procedimento de varredura de passos com o difratômetro de radiação PANalytical X'Pert Pro, Cu Ka, operando a 40 kV e 40 mA e para determinar a distribuição de tamanho de MP, utilizou-se um Accusizer

C770 (PSS Inc., Santa Bárbara, CA, EUA) baseado em “Single Optical Optical Sensing” e equipado com um sistema de auto diluição.

O teor de fármaco (% DC, Eq. 1) e a eficiência de encapsulação (% EE, Eq. 2) foram medidos por espectrofotometria utilizando um espectrofotômetro UV Agilent 8453 equipado com um controlador de temperatura Peltier, empregando curva analítica previamente construída, na faixa de 2-20 µg/mL ($\gamma_{\max} = 346 \text{ nm}$, $r^2 = 0,9991$).

$$\%DC = \frac{\text{quantidade de fármaco encapsulado}}{\text{Peso MP}} * 100 \quad \text{Eq.1}$$

$$\%EE = \frac{\text{carga de fármaco real}}{\text{carga de fármaco teórica}} * 100 \quad \text{Eq.2}$$

Estes procedimentos estão descritos no item 2.6 do capítulo V deste trabalho. Estes ensaios foram realizados na Università Degli Studi di Perugia em Perugia, Itália.

2.4 Desenvolvimento de *scaffolds*

Os *scaffolds* contendo MPs com 10% de 4-MC e MPs branco (isentas de fármaco) foram produzidos através da sinterização.

Foi pesada uma quantidade de MPs equivalente à 3,4 mg de 4-MC, conforme estudos prévios (ORTOLAN *et al.*, 2014) levando em consideração a %DC e a %EE. Essas MPs foram adicionadas em uma placa de acrílico contendo um molde metálico com formato cilíndrico, com orifício central de 4,5 mm de diâmetro, e 1 mm de altura, considerando o tamanho da ferida crítica de 5 mm de diâmetro. Todo o desenvolvimento das MPs e consequentemente dos *scaffolds* foi realizado com base neste diâmetro, para que pudesse ser realizado a análise *in vivo* de regeneração óssea.

Em seguida as MPs foram levadas à estufa a 40 °C durante 5 h, para que ocorresse a sinterização, ou seja, a junção das MPs, que se reorganizam formando um aglomerado rígido e resistente (*scaffolds*).

2.5 Análise de liberação de fármaco (Célula de Franz)

A liberação de fármaco dos *scaffolds* foi analisada por células de Franz, onde uma solução PBS/PEG 400 30% foi usada como fase receptora (volume de

15 mL) para garantir uma solubilidade adequada do fármaco e a manutenção das condições *sink* durante o experimento, tendo em vista os estudos de solubilidade demonstrados no capítulo III do presente trabalho. As células de difusão foram mantidas a 37 °C usando um banho de água circulante. *Scaffolds* feitos com o polímero PDLG 7507 contendo 10% de 4-MC (3,4 mg) foram colocados na superfície da membrana sintética de acetato de celulose (5 mm²) voltada para o compartimento doador da célula de difusão de Franz. Amostras da fase receptora (1 mL) foram retiradas a 1, 6 e 24 h, 3, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 e 60 dias e substituídas por solução de fase receptora fresca. A quantidade de fármaco liberada em função do tempo foi analisada por espectrometria UV.

2.6 Análise do potencial irritante em modelo de membrana corioalantoide (CAM)

O monitoramento do potencial tóxico dos *scaffolds* contendo chalcona foi previamente realizado através do ensaio da membrana corioalantoide de frango denominado HET CAM (*Hens Egg Test-Chorion Allantoic Membrane*) na Università Degli Studi di Perugia sob supervisão do prof. Lanfranco Barberini, conforme descrito no capítulo IV.

Para avaliar o potencial irritante do polímero, um *scaffold* contendo 10% de chalcona foi fabricado com as características idênticas aos utilizados em análise *in vivo* neste trabalho.

Após realizar os procedimentos de esterilização de instrumentos, higienização e incubação dos ovos, no terceiro dia foi realizada a dissociação da membrana da casca do ovo e realizado o corte na casca e o ovo colocado novamente na incubadora.

No oitavo dia de incubação (T0), foi realizado o tratamento da CAM com a amostra de *scaffold* e o ovo colocado novamente na incubadora. Nos dias 9 (T24) e 10 (T48) de incubação, foram avaliados os eventos macroscópicos e microscópicos (com lente de ampliação de 6,5x) da resposta angiogênica.

2.7 Monitoramento de efeito osteogênico em modelos pré-clínicos

O monitoramento do efeito osteogênico da substância em estudo foi realizado através do procedimento de feridas críticas na calota craniana de ratos.

Foram utilizados 46 ratos Wistar, machos com 45 dias de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade do vale do Itajaí, os mesmos

foram alimentados com ração granulada Nuvital® na quantidade de 10 a 20 g/animal/dia e água a vontade, mantidos em ambiente com ciclo claro/escuro de 12/12 h à temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2$. Quanto às questões éticas, o projeto foi submetido à apreciação no Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade do Vale do Itajaí e foi aprovado sob nº de protocolo CEUA 046/17 (Anexo 1).

2.7.1. Animais

Para realização dos experimentos foram utilizados ratos Wistar fêmeas, idade entre 2 a 3 meses, com peso médio de 150 a 200 g, provenientes do Biotério da Universidade do Vale do Itajaí. Antes de iniciar todos os experimentos, os animais permaneceram em adaptação pelo período de 7 dias, e durante o período experimental, foram mantidos em alojamentos de caixas de polipropileno específicas, sendo 05 o número máximo de animais por caixa. A cama utilizada nas caixas foi a maravalha, que foi substituída 03 vezes na semana (segunda, quarta e sexta-feira). Destaca-se que os animais foram mantidos em condições normais de biotério, com ciclo de luz, temperatura e umidade controlados, bem como acesso a alimento e água *ad libitum*. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal recomendados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e de acordo com a Lei nº 11.794 de 2008 da Constituição Federal. Ao final do experimento, os animais foram anestesiados e posteriormente eutanasiados por deslocamento cervical. No que tange a questões éticas, este modelo foi realizado após aprovação do CEUA Univali (parecer nº 046/17).

2.7.2 Procedimento experimental

Os animais, sob condições estéreis do campo cirúrgico foram anestesiados com solução de cloridrato de cetamina (10%), xilazina (2%) e água destilada; aplicando-se 0,1 mL/100 g, via ip e tricotomizados manualmente. Na região da linha média da calota craniana, os planos cutâneo (pele e hipoderme) e periosteal foram rebatidos e entre as suturas interparietal e interocipital, com uma trefina cirúrgica de 5 mm de diâmetro, adaptada em peça de mão de baixa rotação e, sob constante irrigação com soro fisiológico, foi removido um disco de tecido contendo as corticais ósseas e o osso esponjoso subjacente até a exposição da dura-máter.

Após este procedimento a ferida foi lavada com soro fisiológico e aplicado o tratamento contendo *scaffolds* branco para grupo controle, e o tratamento com *scaffolds* contendo 10% de 4-MC no grupo tratado, além do grupo Shan, no qual não foi aplicado nenhum tipo de tratamento. Em seguida, o periósteo foi reposicionado e suturado, utilizando-se fio absorvível Catgut 5-0 simples (Polysuture®), seguindo-se a síntese dos tecidos moles com fio não absorvível 6-0 (Polysuture®). Para analgesia, foi administrado por via subcutânea, cetoprofeno 1% (0,25 mL/100 g) nas primeiras 72 h, conforme as diretrizes da SBCAL (princípio do bem estar animal) (ORTOLAN *et al.*, 2014).

2.7.3 Análise da regeneração óssea

Após 30 e 60 dias da intervenção cirúrgica, os animais foram eutanasiados com sobredose anestésica seguida de perfusão intracardíaca de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 removendo-se as calotas cranianas e mantendo as amostras na mesma solução fixadora utilizada para a perfusão intracardíaca durante 7 dias.

Após este período, foram obtidas fotografias das feridas para análise quantitativa, calculando-se as áreas das feridas remanescentes (em mm²) através do software Image J (NIH, USA), calculando-se a porcentagem média de regeneração óssea para cada grupo. Os dados obtidos neste programa foram tratados estatisticamente utilizando-se análise de variância ANOVA ($p < 0.05$), utilizando o programa Excel.

2.7.3.1 Análise histológica

Prosseguindo com as análises de regeneração óssea, foram selecionadas algumas amostras para avaliação histológicas. Estas amostras foram desmineralizadas em solução de EDTA a 7% em tampão fosfato, desidratadas em álcoois de concentrações crescentes (70, 90 e 100%), clareadas em xilol e incluídas em parafina. Cinco cortes semisseriados (1:10) obtidos em micrótomo rotatório, com espessura de 7 µm, corados com Hematoxilina e Eosina, foram utilizados para observação, em microscopia de luz transmitida. Nesta análise foram avaliados os tipos celulares e teciduais presentes na área de reparo das feridas e os mesmos foram documentados com fotomicroscópio (BX50, Olympus, Tokio, Japão).

2.7.3.2 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Nesta etapa, foram separadas 3 amostras de cada grupo para análises de MEV, onde foi observado o processo de degradação do polímero em meio *in vivo* e a regeneração óssea. Estas análises foram processadas com colaboração do professor Dr. Rilton Alves de Freitas no centro de microscopia eletrônica da Universidade Federal do Paraná - UFPR.

As amostras foram primeiramente desidratadas via ponto crítico CO₂ utilizando equipamento BAL-TEC CPD 030 Critical Point Dryer. Após a desidratação, as amostras foram fixadas em suporte metálico utilizando-se fita adesiva de cobre e posteriormente revestidas com íon-ouro por um auto-revestidor de íons SCD 030 Balzers Union FL 9496 Balzers. Em seguida foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura JSM-6360LV (JEOL, Japão), onde foram sistematicamente observadas a 45x, 450x, 2000x, 3500x e 10000x ampliações de magnificação.

2.7.3.4 Análise da presença de colágeno

Foi realizado a análise para confirmar a presença de fibras de colágeno sugeridas na análise de MEV.

As amostras foram desmineralizadas, desidratadas, clareadas e incluídas em parafina conforme procedimento descrito no item 2.7.3.1 deste capítulo. Cinco cortes semisseriados (1:10) foram obtidos em micrótomo rotatório, com espessura de 7 µm. Em seguida, as lâminas foram coradas seguindo a metodologia de Masson Martoja realizada em três etapas.

Na primeira etapa, as lâminas foram banhadas com Xilol (3 min), álcool absoluto (3 min), álcool 90% (3 min), álcool 70% (3 min) e água destilada (3 min). Após, as lâminas foram banhadas em hematoxilina férrica (4 min), fucsina punceau (4 min), depois foram lavadas em água acética 1%, em seguida banhadas em verde claro acético (6 min), novamente lavadas em água acética 1% e desidratadas em álcool.

Por fim, foram colocadas em álcool 99% (3 min) duas vezes, seguido de álcool 99%:xilol (50:50) durante 3 min e por último xilol puro (3 min) duas vezes. Estas lâminas foram utilizadas para observação, em microscopia óptica.

2.9 Docking molecular da chalcona 4-MC com catepsina K e MEK1

As análises de *docking* molecular foram realizadas pelo aluno Thales Uchoa da Costa Sobrinho, do curso de engenharia química da Universidade do vale do Itajaí - Univali.

Por meio do RSCB *Protein Data Bank* – Banco de dados de proteínas, obteve-se as estruturas das enzimas Catepsina K (1ATK) e MEK1 (1S9J). Os receptores alvo, foram preparados com a remoção de solventes, adição de hidrogênio e adição de cargas eletrostáticas, sendo que os aminoácidos incompletos foram corrigidos pelo banco de dados de rotâmeros de Dunbrank.

Todos os ligantes foram desenvolvidos pelo espaço de trabalho do ACD/ChemSketch (ACD, 2015), sendo estes submetidos a posterior otimização geométrica no software Chimera 1.12 (PETTERSEN *et al.*, 2004), empregando pacote de campos de força Amber ff14s. As cargas eletrostáticas foram adicionadas utilizando pacote de Gasteiger.

Admitiu-se o ligante como flexível em número máximo de 8 poses, sendo selecionadas e apresentadas as menores energias. O *docking* molecular realizado pelo software Autodock Vina, foi desenvolvido por intermédio de scripts para *Virtual Screening* com linguagem Shell. Após o atracamento foram observadas as poses dos ligantes utilizando Chimera 1.12 e AutoDockTools (SANNER, 1999), sendo que as interações intermoleculares entre o ligante e os aminoácidos do receptor, foram representadas graficamente.

3 Resultados e discussão

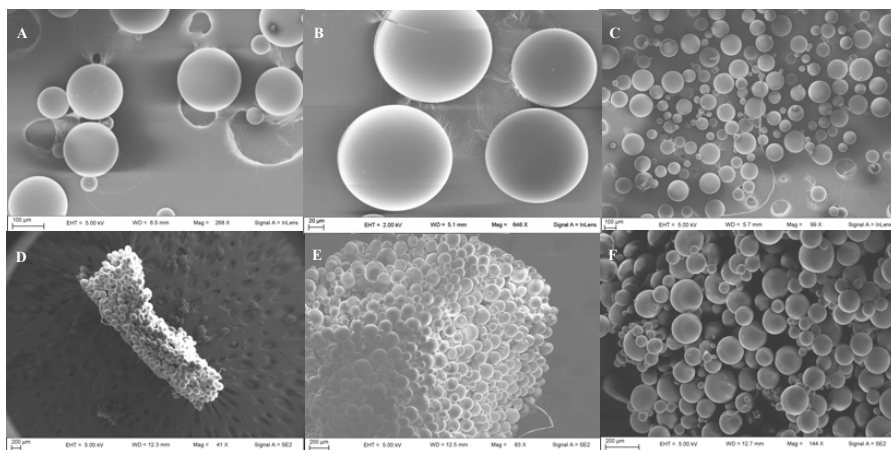
Os resultados sobre o rendimento, capacidade de encapsulação do fármaco e caracterização das MPs de PDLG 7507 foram descritos no item 3.2 no capítulo IV deste trabalho, as quais foram empregadas para a obtenção dos *scaffolds*.

3.1 Desenvolvimento e caracterização dos *scaffolds*

Os *scaffolds* obtidos através de sinterização das MPs apresentaram rigidez, aspectos morfológicos e poros típicos para a regeneração óssea. A partir das imagens obtidas por MEV, é possível verificar a diferença entre as MPs antes e após passarem pelo processo de sinterização. Ao serem transformadas em *scaffolds*, as estruturas apresentaram poros interconectados entre si, uma geometria interna regular e distribuição uniforme de partículas (Figura 6.1).

Os *scaffolds* de PLGA porosos fornecem uma superfície adequada para as células do tecido ósseo se anexarem, proliferarem e diferenciarem (CHEN *et al.*, 2017). Os poros obtidos ficaram entre 100 a 200 μm , sendo um tamanho ideal para proporcionar um ambiente adequado à formação de novos ossos e matriz extracelular. Combinado com a inclusão de uma molécula com atividade osteogênica, esta plataforma representa uma alternativa na terapia da regeneração óssea, sendo um sistema com ação osteocondutora devido à porosidade adequada e osteoindutora pela ação da 4-MC.

Figura 6.1: Fotomicrografias das MPs do polímero PDLG7507 contendo 10% de 4-MC antes do processo de sinterização (A, B e C) e após sinterização para formação de *scaffolds* (D, E e F), em diferentes aumentos.



3.2 Liberação do fármaco a partir dos *scaffolds*

De acordo com dados na literatura para que ocorra regeneração óssea é necessário um tempo de aproximadamente 3 a 4 meses (LIU; KERNS, 2014), com isso, o objetivo do sistema de liberação criado foi de obter uma liberação lenta da 4-MC.

No estudo realizado por meio do método célula de Franz (figura 6.2), *scaffolds* contendo 10% de 4-MC os resultados obtidos demonstraram uma liberação lenta, sendo que após 60 dias cerca de 70% do fármaco havia sido liberado da matriz polimérica (Figura 6.3), efeito este esperado para o polímero selecionado, o qual possui um alto PM.

Figura 6.2: Sistema de células de Franz utilizado para analisar o perfil de liberação do 4-MC em *scaffolds* de PDLG7507.

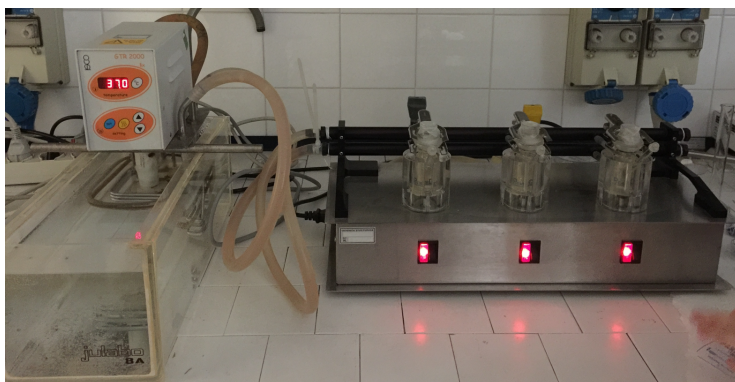
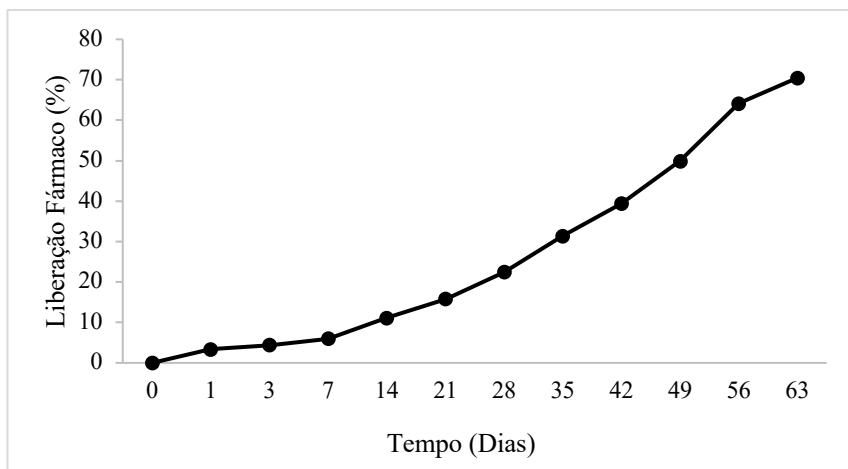


Figura 6.3: Perfil de liberação do 4-MC em *scaffolds* de PDLG7507.



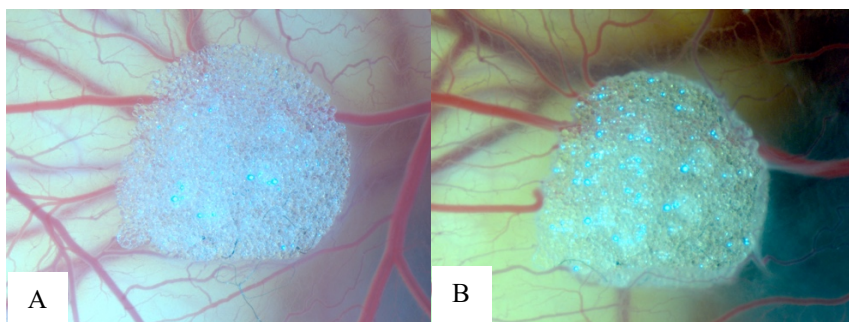
As características físico-químicas do composto encapsulado também influenciam na taxa de liberação do mesmo, como PM, hidrofilicidade e concentração do fármaco dentro do polímero, sendo que quando hidrofóbicos, como é o caso da 4-MC, conforme a caracterização demonstrada no capítulo III, essa característica dificulta a difusão da água em sistemas microparticulados e reduzem a taxa de degradação do polímero, diminuindo assim a taxa de liberação do fármaco (KLOSE *et al.*, 2008).

3.3 Avaliação do potencial irritante dos *scaffolds* pelo método de HET-CAM

Seguindo a tendência de estudos de biocompatibilidade de polímeros, o ensaio HET- CAM, preditivo do potencial irritante em mucosas (SPIELMANN *et al.*, 1997) foi utilizado neste trabalho com a mesma finalidade, verificar se o polímero que foi utilizado é seguro e compatível com o sistema em que foi proposto ser utilizado (BORGES *et al.*, 2003; CHIU; RADISIC, 2010; DEVOLDER *et al.*, 2012). O método de ensaio CAM é bastante utilizado para avaliar biomateriais por ser um ensaio rápido, de baixo custo e que não necessita de aprovação de comitê de ética (MANCIOCCO *et al.*, 2011).

Após o tratamento da CAM com a amostra, nos dias 9 (T24) e 10 (T48) de incubação (Figura 6.4), não foram observados sinais de atividade inflamatória, hemorragias ou neoangiogênese, confirmando que o polímero PLGA 7507 é compatível com terapias que visam ao tratamento em mucosas ou regeneração tecidual, sendo seu uso seguro nos *scaffolds* de regeneração óssea segundo o procedimento descrito no presente trabalho.

Figura 6.4: Fotografias da membrana corioalatóide contendo *scaffold* PLGA 7507 + 4-MC a 10%, onde A= tempo 24 h e B= tempo 48 h aumento de 6,5x.



3.4 Avaliação *in vivo* de regeneração óssea

Após observação das fotografias das feridas no programa ImageJ (Figura 6.5), foram obtidos valores de médias das áreas de feridas remanescentes tendo como parâmetro a área da ferida crítica do grupo Shan (Figura 6.6).

Estes resultados foram avaliados quantitativamente utilizando-se análise de variância ANOVA e demonstraram que, as feridas no tempo de 30 dias

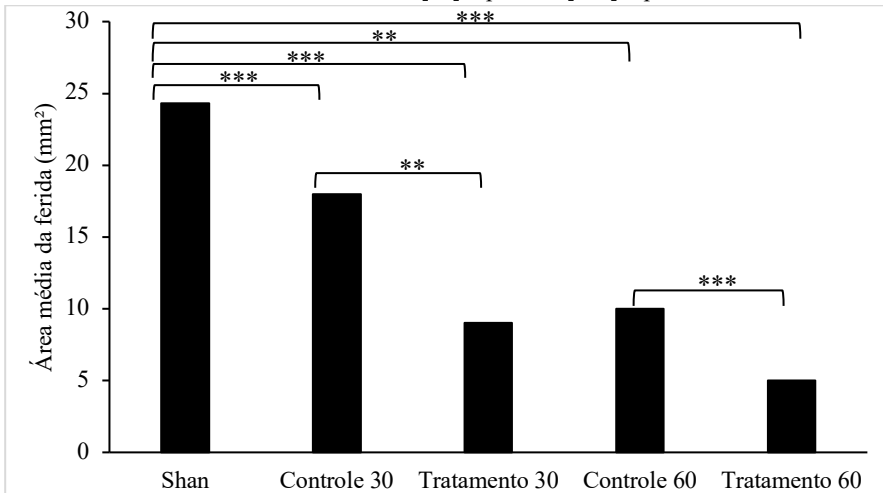
apresentaram uma porcentagem de fechamento de ferida de aproximadamente 25,98 e 62,99% para o grupo controle (*scaffold*) e tratamento (*scaffold* contendo 4-MC), respectivamente. Ortolan *et al.* (2017), relatam uma redução de cerca de 60% da área da ferida no grupo tratado com 10% de 4-MC veiculado em vaselina, portanto a plataforma de liberação parece ter melhorado o desempenho da 4-MC, na mesma dose. Para os grupos no tempo de 60 dias foi alcançado um fechamento de aproximadamente 58,88 e 79,44%, para os grupos controle e tratamento, respectivamente. Destaca-se que no presente trabalho a 4-MC foi exaustivamente purificada até apresentar uma potência $> 95\%$.

As análises apresentaram significância em todos os parâmetros testados, grupos controle e tratamento de 30 e 60 dias, demonstrando que, mesmo sem conter a chalcona encapsulada, o *scaffold* de PLGA atua como condutor de regeneração óssea, facilitando a formação tecido ósseo na ferida.

Figura 6.5: Fotografias das feridas críticas da calota craniana de ratos submetidos a tratamento com *scaffold* contendo chalcona 4-MC encapsulada.



Figura 6.6: Área média da ferida (mm²) dos grupos Shan, controle 30 dias, tratamento 30 dias, controle 60 dias e tratamento 60 dias. [**] = p<0,01; [***] = p<0,001 ANOVA.

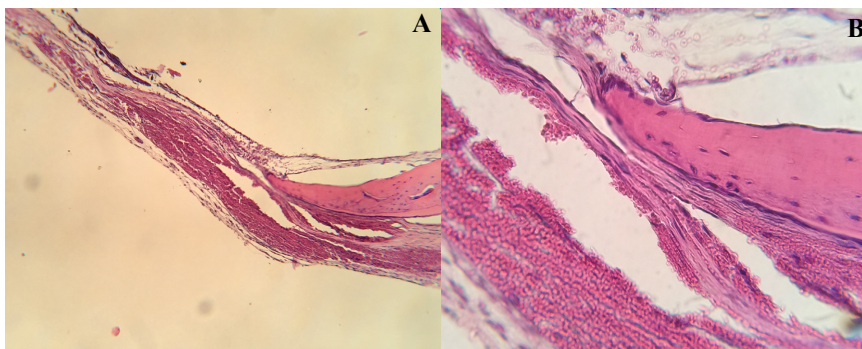


3.3.1 Análise histológica

3.3.1.1 Grupo Shan após 30 dias

Na análise histológica, as feridas remanescentes do grupo Shan (Figura 6.7), o grupo no qual não foi utilizado nenhum tipo de tratamento, a área central do defeito não mostrou sinal de inflamação, após 30 dias de análise. No entanto, não ocorreu neoformação óssea nas bordas da ferida crítica, com superfícies ósseas revestidas principalmente por células achatadas que caracterizam osteoblastos inativos, ou seja, não houve processo de regeneração óssea no local, com discreta presença de osteócitos na matriz óssea.

Figura 6.7: Corte histológico de defeito crítico na calota craniana do grupo Shan, 30 dias após o experimento, onde A (aumento 10x) e B (aumento 40x). Coloração H.E.

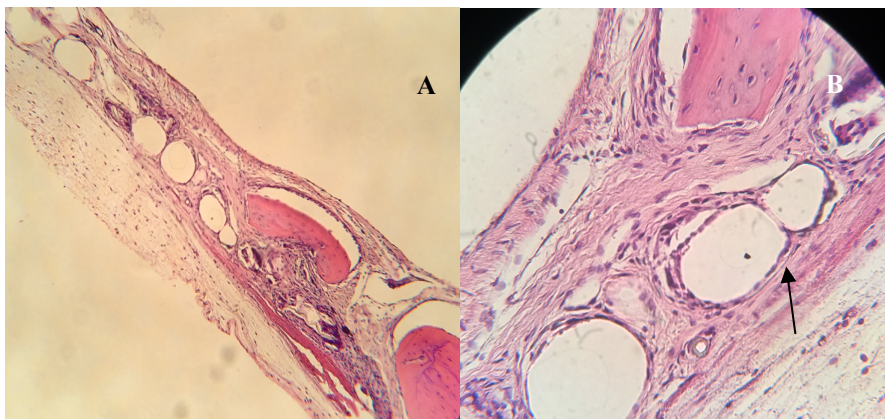


3.3.1.2 Grupo controle após 30 dias

O grupo controle de 30 dias (Figura 6.8) apresentou formação de tecido conjuntivo fribroso, discreto indício de inflamação, com a presença de leucócitos e macrófagos, sendo essa resposta imune esperada no processo de degradação do polímero. Embora o uso do PLGA seja indicado para a regeneração óssea, tenha bons resultados clínicos e biocompatibilidade comprovada por órgãos como FDA, alguns estudos mostraram que os subprodutos ácidos gerados no processo de degradação do polímero *in vivo* podem levar ao surgimento de respostas inflamatórias no local da ferida (PARK *et al.*, 2017; BROWN *et al.*, 2015).

Este grupo também apresentou neoformação óssea, com osteoblastos ativos e inativos nas bordas ósseas. Assim como, osteócitos na matriz óssea mineralizada, porém, de forma desorganizada indicando formação de osso primário. Também foi observada a presença das MPs de PLGA com evidente processo de degradação (Figura 6.8 B), onde percebeu-se a perda de sua forma esférica, indicando a biodegradação esperada do arcabouço polimérico. Assim como, grande quantidade de células entre as MPs indicando que este sistema teve uma importante ação osteocondutora, facilitando a migração e adesão das células do tecido ósseo.

Figura 6.8: Corte histológico de defeito crítico na calota craniana do grupo controle após 30 dias, onde A (aumento 10x) e B (aumento 40x), com seta indicando a presença de MPs remanescentes. Coloração H. E.



Legenda: Processo de degradação do polímero sinalizado com seta.

3.3.1.3 Grupo tratado após durante 30 dias

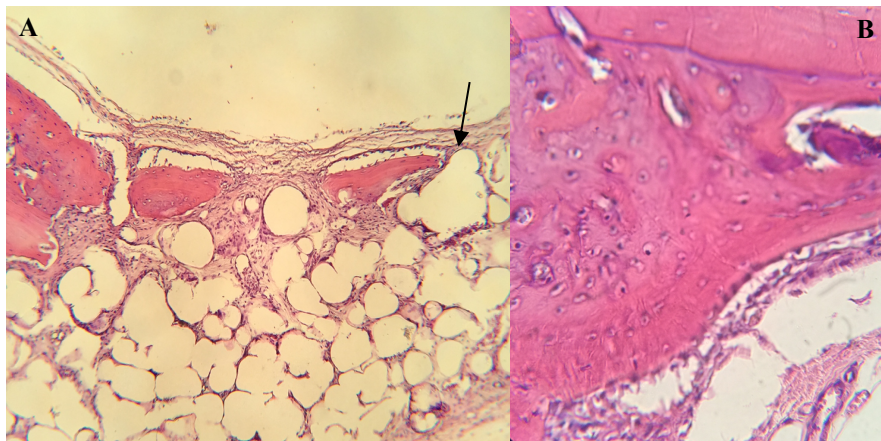
O grupo tratamento com 30 dias de análise (Figura 6.9), apresentou formação de tecido conjuntivo fribroso, discreto indicio de inflamação, formação de vasos sanguíneos entre as MPs, neoformação óssea apresentando matriz osteóide secretada pelos osteoblastos ativos nas bordas ósseas. Pode-se observar indícios de remodelamento ósseo com áreas características de osso primário com grande quantidade de osteócitos desorganizados. Apresenta sinais característicos de matriz mineralizada e não mineralizada.

Neste grupo pôde-se observar grande quantidade de PLGA remanescente apresentando sinais típicos de degradação (Figura 6.9 A) e grande quantidade de células e formação de vasos sanguíneos nos poros do *scaffold*, com uma maior quantidade de osteoblastos ativos na superfície da ferida em comparação com o grupo controle, sugerindo ação osteocondutora do sistema desenvolvido, conforme já verificado no grupo controle (Figura 6.8), e adicionalmente uma ação osteoindutora devido à presença da 4-MC (Figura 6.9).

O estudo de liberação (Figura 6.3) mostrou a liberação de cerca de 40% do fármaco a partir dos *scaffolds*, após 30 dias. Embora em condições fisiológicas

a liberação possa diferir do modelo *in vitro*, pode-se inferir que a plataforma de liberação desenvolvida funcionou com um reservatório de liberação prolongada da 4-MC, uma vez que, após 30 dias, ainda há indícios de MPs no tecido (Figura 6.9).

Figura 6.9: Corte histológico de defeito crítico na calota craniana do grupo tratado após 30 dias, onde A (aumento 10x), com seta indicando a presença de MPs remanescentes e B (aumento 40x). Coloração H. E.



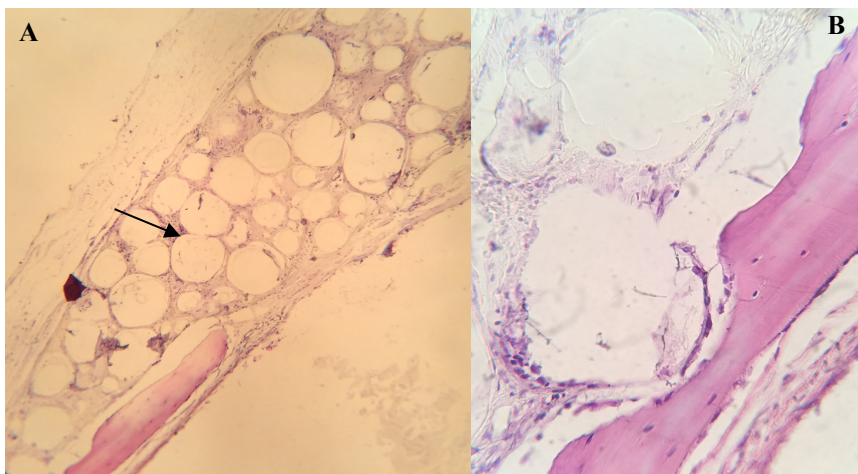
Legenda: Processo de degradação do polímero sinalizado com a seta.

3.3.1.4 Grupo controle após 60 dias

O grupo controle de 60 dias (Figura 6.10) apresentou formação de tecido conjuntivo fribroso, discreto indício de inflamação e neoformação óssea, com osteoblastos ativos e inativos na superfície da ferida crítica. Apresentou poucos osteócitos na matriz óssea mineralizada, de forma desorganizada indicando formação de osso primário. Também pode ser visto nesta análise a presença de grande quantidade de MPs em processo de degradação. De modo similar aos demais experimentos, este grupo controle com *scaffolds* branco, apresentou células e vasos sanguíneos entre as MPs indicando ação osteocondutora do sistema. Pode ser observado na figura 6.10 que embora tenha grande quantidade celular entre os poros, esta amostra apresentou menor regeneração óssea, apresentando cerca de 58,88% de fechamento de ferida e menor degradação do polímero quando comparada com o grupo tratado com chalcona por 30 dias (Figura 6.9) onde a ferida crítica teve um fechamento de 62,99% (Figura 6.5),

reforçando a hipótese de que a presença da chalcona no interior das MPs favorece sua degradação, assim como, estes dados corroboram com a afirmação de que a 4-MC possui atividade osteogênica.

Figura 6.10: Corte histológico de defeito crítico na calota craniana do grupo controle após 60 dias, onde A (aumento 10x), com seta indicando a presença de MPs remanescentes e B (aumento 40x). Coloração H. E.



Legenda: Processo de degradação do polímero sinalizado com a seta.

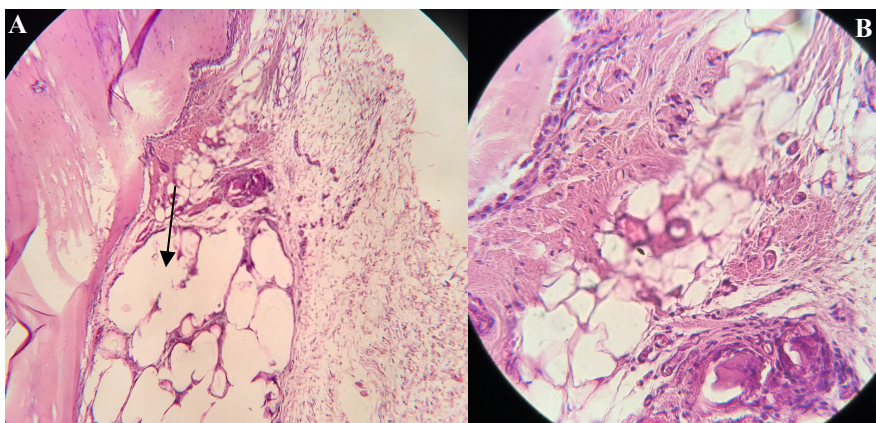
3.3.1.5 Grupo tratado após 60 dias

No grupo tratado após 60 dias de experimento (Figura 6.11), houve formação de tecido conjuntivo frouxo, muitos ossos novos, poucas MPs remanescentes foram observadas ao longo da margem do defeito, além de um discreto processo inflamatório, consequência dos subprodutos de degradação do polímero. Também se destaca o aparecimento de matriz osteóide com osteócitos organizados e vasos sanguíneos no centro do defeito indicando remodelação óssea com áreas características de osso secundário, além disso, podem ser vistos sinais característicos de matriz mineralizada e não mineralizada.

Assim como o exemplo anterior (grupo tratado 30 dias, Figura 6.9), neste grupo o polímero apresentou sinais de degradação, sendo visível, em algumas áreas, completa deformação das MPs (Figura 6.11 A). Pode ser observado também grande quantidade de células nos poros do *scaffold*, sugerindo ação osteocondutora do sistema desenvolvido, e ao mesmo tempo osteoindutora

com grande quantidade de osteoblastos ativos na superfície da ferida devido a presença da 4-MC. Neste ensaio ocorreu o fechamento da ferida crítica quase por completo, cerca de 79,44% (Figura 6.5), que não havia sido evidenciada após 30 dias.

Figura 6.11: Corte histológico de defeito crítico na calota craniana do grupo tratado, 60 dias após o experimento, onde A (aumento 10x), com seta indicando a presença de MPs remanescentes e B (aumento 40x). Coloração H. E.



Legenda: Processo de degradação do polímero sinalizado com a seta.

Segundo Giannoudis e colaboradores (2007; 2008) que propuseram um conceito denominado “modelo diamante de interações na cicatrização óssea”, o ambiente em que se encontra o defeito ósseo deve ser estável e altamente vascularizado para que se possa ocorrer a regeneração óssea completa.

O sistema criado para a regeneração óssea neste trabalho, atingiu todos os requisitos necessários para esse tipo de terapia, sendo um bom suporte mecânico com rigidez adequada, osteocondutor facilitando a migração celular entre os poros, osteoindutor induzindo a formação de células osteogênicas devido a ação da molécula encapsulada e facilitou a formação de vasos sanguíneos, estes de grande importância na terapia óssea.

3.3.2 Análise Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e pesquisa de formação de colágeno

Para confirmar os resultados obtidos nas análises histológicas de H. E. foram realizadas análises em MEV combinadas com coloração tricômio Masson-Martoja para verificação de presença de colágeno indicativo de regeneração óssea.

O colágeno tipo I corresponde a 90% da matriz orgânica do osso e confere a esse tecido propriedades de resistência à tração, sendo um componente importante no processo de regeneração óssea, pode ser encontrado em diferentes graus de organização nesse processo dependendo da etapa de remodelação em que a fratura óssea se encontra (HOERTH *et al.*, 2018).

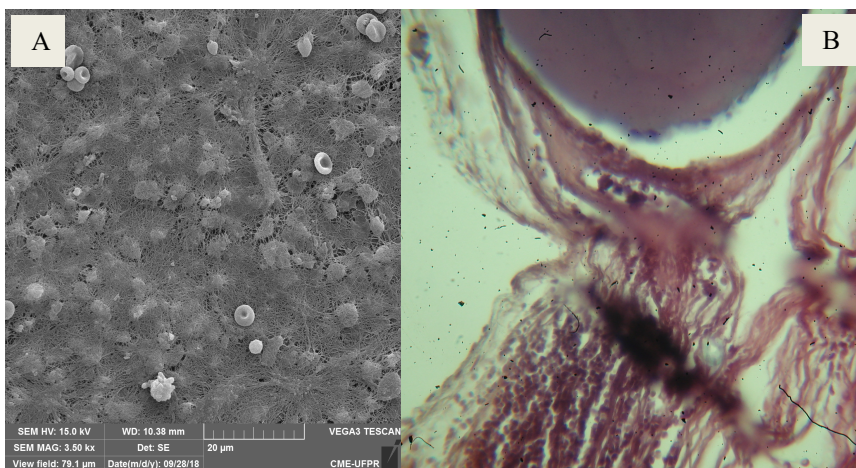
Sabendo-se da importância da formação das fibras colágenas no processo de regeneração óssea, análises histoquímicas complementares foram realizadas para confirmar a formação desse elemento nas amostras testadas.

3.3.2.1 Análise do grupo sem tratamento (Shan)

Nas análises realizadas com o grupo Shan foi observada a presença de células sanguíneas e fibroblastos na região da ferida por MEV (Figura 6.12-A), porém não foi observada a presença de fibras de colágeno ou formação óssea. Em concordância com os dados obtidos por MEV, no ensaio de coloração Tricômio Masson-Martoja não foi observada a presença de colágeno ou neoformação óssea (Figura 6.12-B).

Nesta metodologia, as fibras de colágeno apresentam coloração verde quando observadas por microscópio (MARTOJA, MARTOJA-PIERSON, 1970). Sendo assim, como pode ser observado na figura 6.12 B, as lâminas avaliadas não apresentaram formação de fibras colágenas.

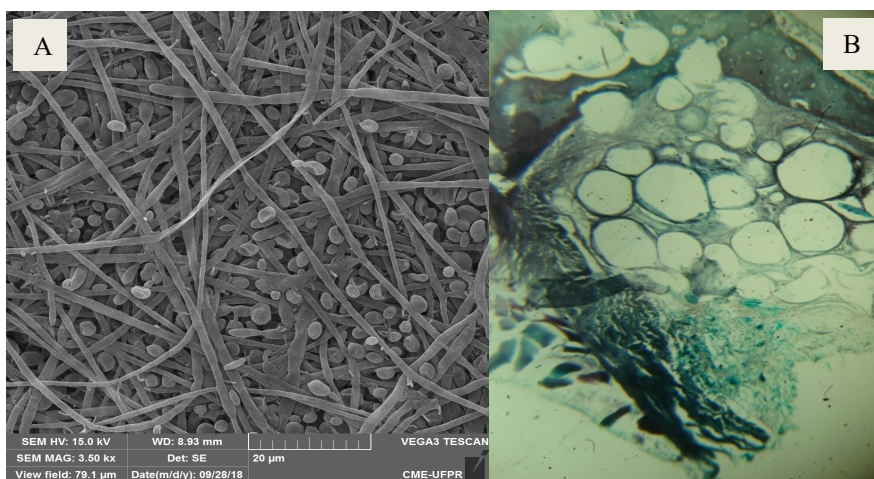
Figura 6.12: Corte histológico de defeito crítico na calota craniana do grupo Shan, A= MEV (aumento 3500 x), B= Coloração Tricômio Masson- Martoja (40x).



Na imagem por MEV, este grupo apresentou evidências da presença de fibras de colágeno (ALMEIDA JR *et al.*, 2013) e osteócitos dispostos entre o colágeno indicando um processo de regeneração óssea no local da ferida, com atuação de osteoblastos (Figura 6.13-A). As áreas com coloração verde (Figura 6.13-B), comprovam a presença de colágeno, que pode ser visto tanto na região de formação óssea a qual contém osteócitos, quanto na região entre os poros do polímero.

Estes dados complementam os obtidos nas análises anteriores, onde pode ser observado processo de regeneração óssea (Figura 6.8) facilitada pela presença do *scaffold*, comprovando mais uma vez sua ação osteocundutora. Apesar de não possuir uma molécula osteogênica encapsulada, este sistema obteve cerca de 25,98% de fechamento de ferida.

Figura 6.13: Corte histológico de defeito crítico na calota craniana do grupo controle após 30 dias, A= MEV (aumento 3500 x), B= Coloração Tricômio Masson- Martoja (aumento 40x).



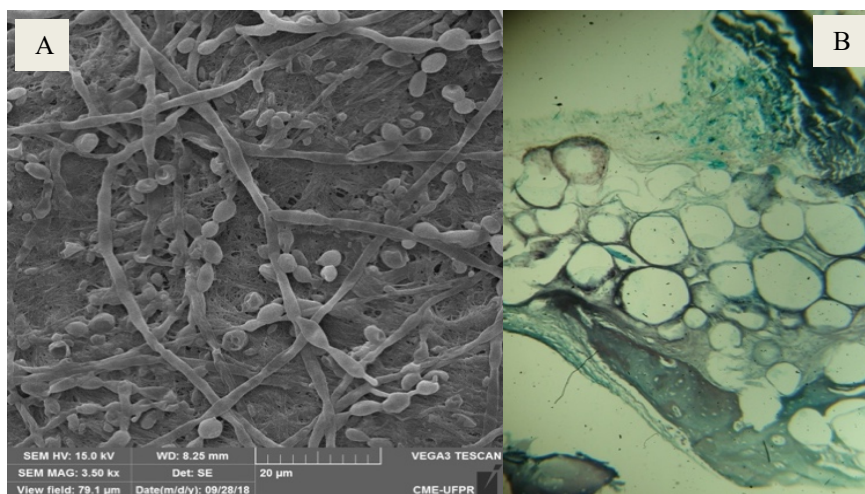
3.3.2.3 Grupo tratado após 30 dias

Este grupo apresentou presença de fibras de colágeno e osteócitos dispostos entre o colágeno indicando um processo de regeneração óssea no local da ferida, com atuação de osteoblastos (Figura 6.14-A), também pode ser observado nesta figura a formação de canais de Havers (osteons), conferindo micro-irrigação sanguínea facilitando o fluxo de nutrientes e células sanguíneas na estrutura óssea (ZANIVAN *et al.*, 2009).

A figura 6.14-B novamente indica a presença de colágeno, que pode ser visto tanto na região de formação óssea onde contém osteócitos quanto na região entre os poros do polímero.

Assim como os dados obtidos por coloração H. E. deste mesmo grupo de tratamento (Figura 6.9), a fotomicrografia obtida apresenta atividade regenerativa facilitada pela presença da molécula 4-MC. Quando comparamos essas imagens (Figura 6.14-A) com as obtidas do grupo controle (Figura 6.13-A), percebemos uma visível mudança de conformação das fibras de colágeno, que se tornam mais organizadas demonstrando uma transição do processo de regeneração óssea, onde começa a ser formado o tecido ósseo.

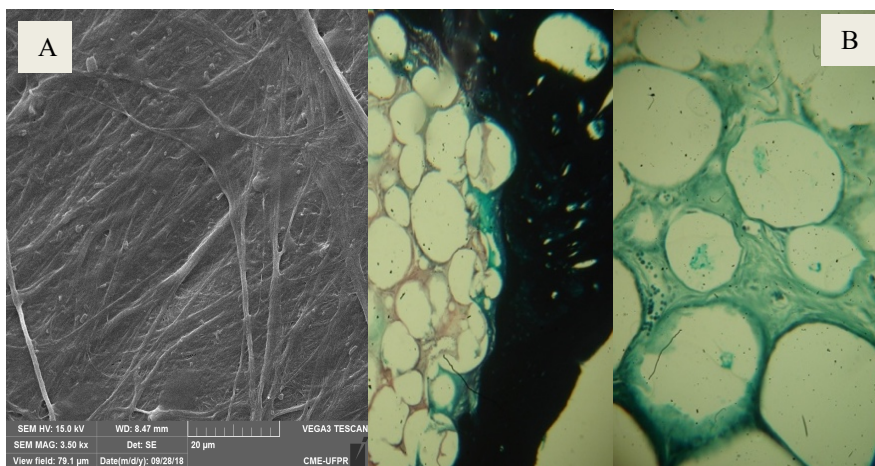
Figura 6.14: Corte histológico de defeito crítico na calota craniana do grupo tratado após 30 dias, A= MEV (aumento 3500 x), B= Coloração Tricômio Masson- Martoja (aumento 40x).



3.3.2.4 Grupo controle após 60 dias

Neste grupo pode ser observado a presença de fibras de colágeno, porém com uma maior organização entre elas, fazendo com que os osteócitos que estão dispostos entre o colágeno se tornem menos visíveis, devido à aproximação destas fibras, embora tenha ocorrido um fechamento de ferida inferior às amostras que contém a chalcona (Figura 6.5), estas análises mostram uma grande atividade regenerativa, com grande presença de colágeno entre os poros (figura 6.15-B), comprovando mais uma vez a ação osteocondutora do *scaffold* polimérico.

Figura 6.15: Corte histológico de defeito crítico na calota craniana do grupo controle após 60 dias, A= MEV (aumento 3500 x), B= Coloração Tricômio Masson- Martoja (aumento 10x e 40x).



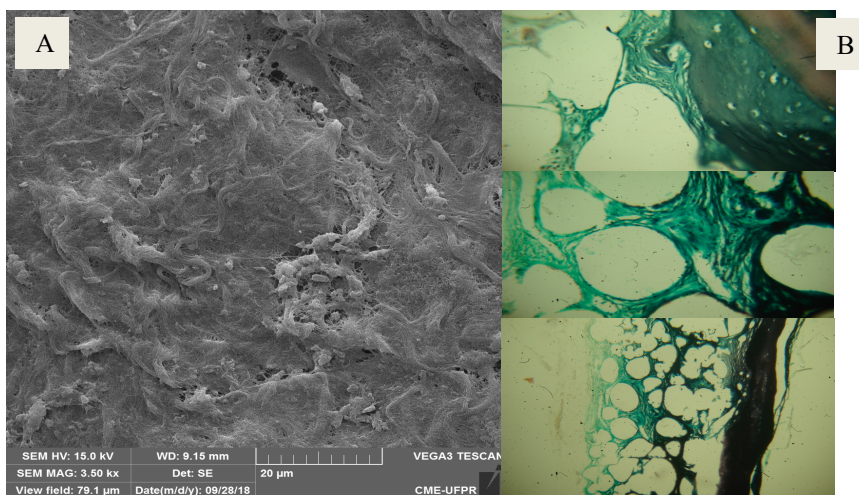
3.3.2.5 Grupo tratado após 60 dias

Na imagem por MEV com um aumento de 3500 x (figura 6.16-A), neste grupo, percebe-se um importante fechamento da ferida crítica, corroborando os resultados anteriores (Figuras 6.5 e 6.11). Pode ser observado que as fibras de colágenos estão dispostas entre si com uma maior organização entre elas, tornando o local da ferida mais compacto, este processo é indicativo de regeneração óssea, com formação de osso primário e secundário.

Em comparação com o grupo controle após 60 dias (Figura 6.15) e o grupo tratado após 30 dias (Figura 6.14), os osteócitos não estão visíveis, pois estão localizados entre as fibras de colágeno e estas como estão mais próximas umas das outras. Neste grupo também pode ser observado a presença de cristais mineralizados na superfície, indicando a presença minerais como hidroxiapatita.

Como pode ser observado nas amostras coradas (figura 6.16-B), os osteócitos estão mais organizados, característica de osso secundário. As áreas em verde mostram a maior abundância de colágeno, em comparação com o grupo controle após 60 dias (Figura 6.15-B) e o grupo tratado após 30 dias (Figura 6.14-B), tanto na região de formação óssea a qual contém osteócitos, quanto na região entre os poros do polímero.

Figura 6.16: Corte histológico de defeito crítico na calota craniana do grupo tratado após 60 dias, A= MEV (aumento 3500 x), B= Coloração Tricômio Masson- Martoja (aumento 10x e 40x).



A reconstrução de defeitos ósseos tem sido amplamente estudada há anos e métodos disponíveis atualmente possuem várias limitações. Para superar tais limitações, vários biomateriais e métodos têm sido desenvolvidos para reparar e substituir defeitos ósseos extensos.

É de suma importância conhecer todos os elementos envolvidos no processo de regeneração óssea para poder desenvolver um medicamento eficaz. Vários sistemas podem ser desenvolvidos, através da incorporação ou encapsulação de moléculas que atuem como inibidoras ou estimuladoras de algum dos elementos responsáveis pelo processo de regeneração e remodelação óssea. Como neste trabalho, onde foi desenvolvido um *scaffold* produzido com polímero biodegradável contendo uma molécula encapsulada, a qual, estudos anteriores realizados por Ortolan *et al.* (2017) indicam sua ação osteogênica e em outro estudo realizado por Ramalho *et al.* (2003), onde confirmam sua ação inibidora de catepsina K.

Visando contribuir para a elucidação do mecanismo de ação da 4-MC na regeneração óssea, análises complementares foram realizadas utilizando-se o método de *docking* molecular comparando a ação inibidora de catepsina K da chalcona 4-MC com os medicamentos de referência que já tiveram esta ação comprovada.

3.5 Avaliação de docking molecular da chalcona 4-MC

A catepsina K como mencionado anteriormente, atua na regeneração óssea ativando osteoclastos. Sendo assim, uma molécula que iniba essa enzima, também irá inibir a síntese de osteoclastos no osso, como consequência, poderá diminuir a reabsorção óssea, tornando-se um fármaco eficaz em processos de desgaste ósseo como a osteoporose e também na regeneração óssea.

3.5.1 Catepsina K

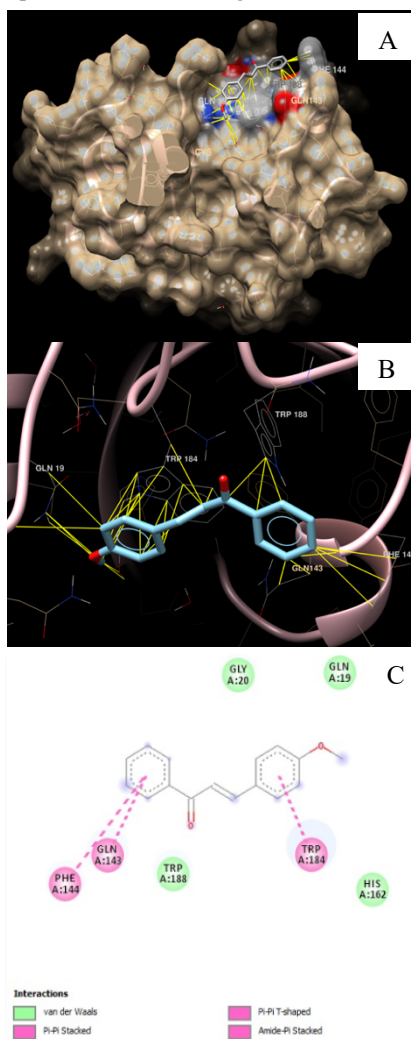
As energias de fármacos de referência inibidores de Catepsina K foram obtidas, juntamente com a energia da 4-MC e estão apresentadas na Tabela 6.1, onde se demonstra que a 4-MC apresenta energia de inibição próxima a dos fármacos de referência, comprovando o seu potencial para inibição desta enzima.

Tabela 6.1: Energias de acoplamento das estruturas chalcônicas com substituintes propostos por Topliss e dos fármacos de referência para a macromolécula alvo Catepsina K.

Estrutura	E (kcal/mol)	Estrutura	E (kcal/mol)
ArAr4Br	-6,3	ArAr4N(CH ₃) ₂	-6,5
ArAr4C(CH ₃) ₃	-6,9	ArAr4NH ₂	-6,3
ArAR4CF ₃	-7	ArAr4NHTButil	-6,6
ArAr4CH ₂ CH ₃	-6,4	ArAr4OCH ₂ Ph	-7
ArAr4CH ₃	-6,4	ArAr4OCH ₃	-6,3
ArAr4CH(CH ₃) ₂	-6,9	ArAr4O(CH ₂) ₃ CH ₃	-6,4
ArAr4Cl	-6,3	2-balicatib	-7,7
ArAr3,4Cl ₂	-6,6	3-balicatib	-7,8
ArAr4OH	-6,2	4-metoxichalcona	-6,4
ArAr4OSPropil	-6,6	L-06235	-7,7
ArAr3,4(CH ₃) ₂	-6,8	L-873724	-6,8
HArAr3CF ₃	-7,3	Odanacatib	-7,7
ArAr4CHex	-7,6	ONO-5334	-7,3
ArArNO ₂	-6,8	Relacatib	-7,3
ArAr4NCH ₂ (CH ₃) ₂	-6,4	-	-

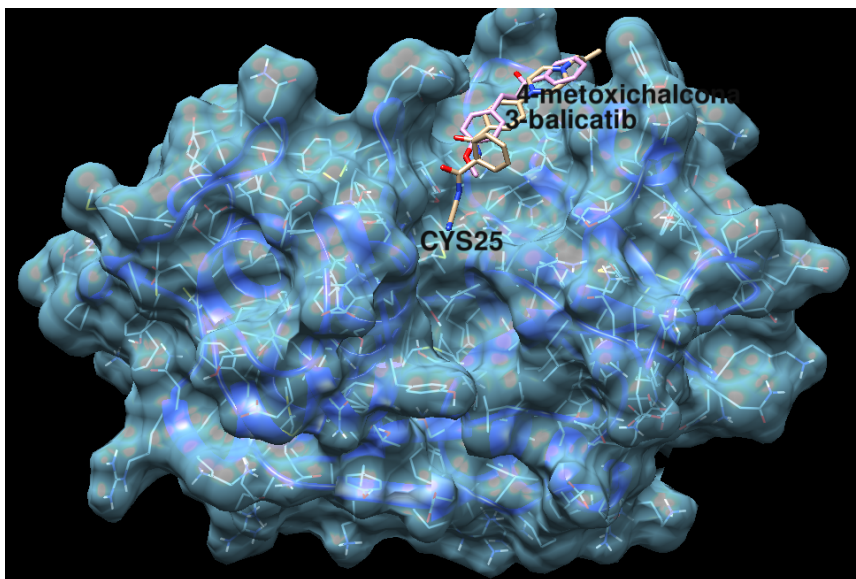
Contudo, na Figura 6.17-A pode-se verificar que não há interação entre o ligante 4-MC com o aminoácido característico do sítio ativo Cisteína (CYS). Os aminoácidos TRP¹⁸⁴ e TRP¹⁸⁵ interagem com a silhueta do ligante, especialmente com carbonos sp^2 , enquanto interações do aminoácido GLN¹⁹ vão de acordo com a lei da complementariedade, uma vez que o grupo metoxi apresenta carga negativa e o aminoácido um polo positivo.

Figura 6.17 – Pose da 4-MC: (A) silhueta da macromolécula Catpesina K formando complexo ligante-receptor com a chalcona, (B) aminoácidos que realizam interação com com a molécula e (C) tipos de interações do ligante com os aminoácidos.



Este estudo evidencia que a 4-MC não apresenta energia de acoplamento superior aos fármacos de referência provavelmente devido a pequena extensão de sua molécula, quando comparada ao 3-balicatib (fármaco de referência com melhor energia de *docking*), conforme Figura 6.18.

Figura 6.18: Pose de atracamento sobreposta do relacatib (coloração rosa) em relação a chalcona (coloração cinza).



3.5.2 MEK1

Referente a macromolécula alvo MEK1, as energias dos fármacos de referência, juntamente com os compostos chalcônicos estão dispostas na Tabela 6.2.

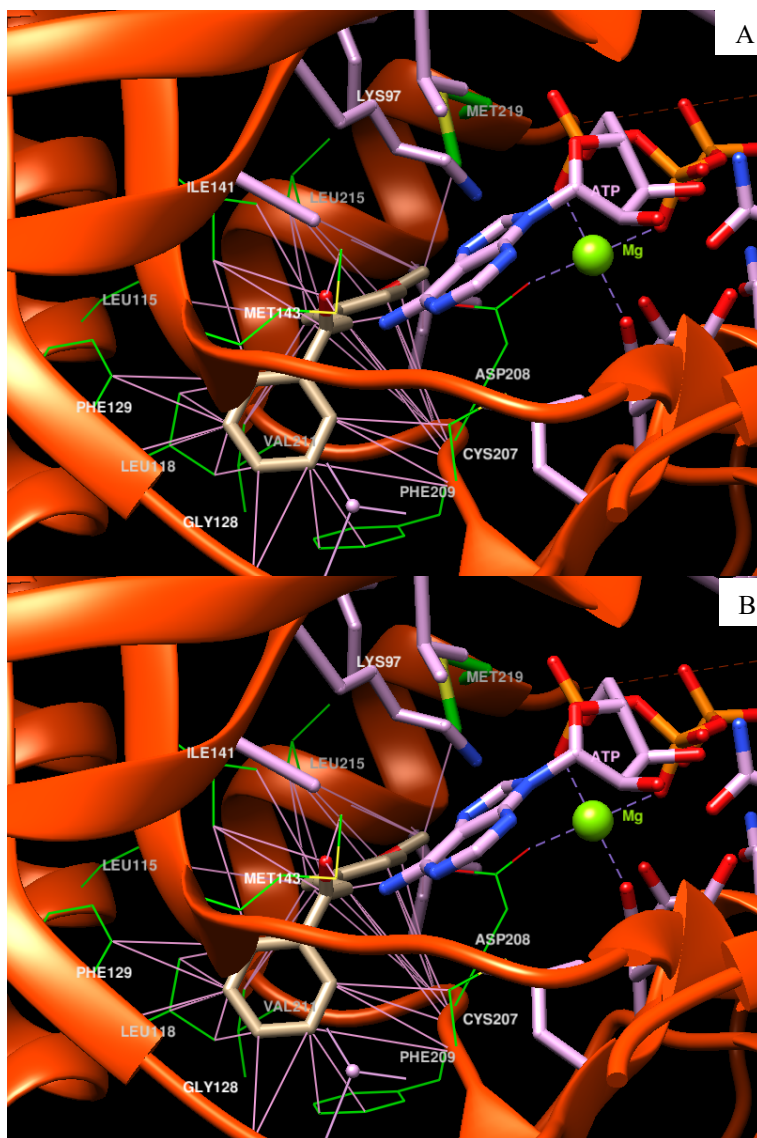
Quanto às energias de acoplamento, a 4-MC apresenta-se capaz de realizar inibição da MEK1. Quanto ao complexo ligante-receptor formado entre a chalcona e a MEK1, nota-se a ocupação do sítio ativo por interação com bolsão hidrofóbico. Entretanto não há interação com o aminoácido LYS na melhor pose, sendo este o responsável pelo reconhecimento de inibidores no sítio alostérico de acordo com a Figura 6.19 (A).

Na Figura 6.19 (B), está apresentada a segunda melhor pose do ligante com energia de -7,4 kcal/mol, onde existe a interação com o aminoácido LYS97.

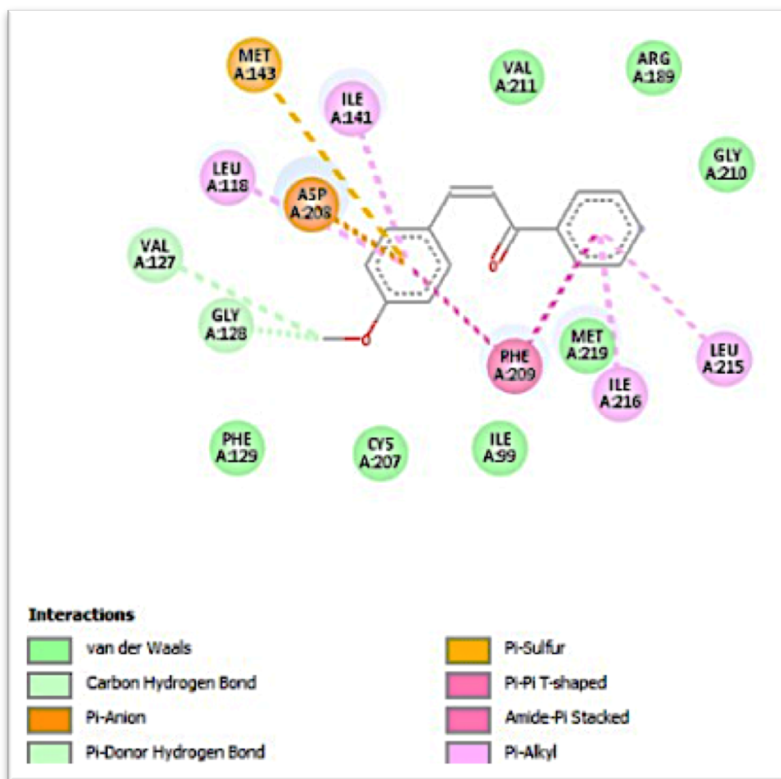
Tabela 6.2: Energias de acoplamento das estruturas chalcônicas com substituintes propostos por Topliss e dos fármacos de referência para a macromolécula alvo MEK1.

Estrutura	E (kcal/mol)	Estrutura	E (kcal/mol)
ArAr4Br	-7,8	ArAr4N(CH ₃) ₂	-7,7
ArAr4C(CH ₃) ₃	-7,9	ArAr4NH ₂	-7,8
ArAr4CF ₃	-8,9	ArAr4NHTButil	-8,3
ArAr4CH ₂ CH ₃	-8,1	ArAr4OCH ₂ Ph	-9
ArAr4CH ₃	-8	ArAr4OCH ₃	-7,6
ArAr4CH(CH ₃) ₂	-8,6	ArAr4O(CH ₂) ₃ CH ₃	-8
ArAr4Cl	-7,9	2-Balicatibe	-8,8
ArAr3,4Cl ₂	-8,1	3-Balicatibe	-8,1
ArAr4OH	-7,8	4-metoxichalcona	-7,5
ArAr4OSPropil	-8	L-06235	-8,7
ArAr3,4(CH ₃) ₂	-8,3	L-873724	-6,8
ArAr3CF ₃	-8,6	Odanacatib	-6,2
ArAr4CHex	-8,8	ONO-5334	-8,9
ArArNO ₂	-8,1	Relacatib	-7,4
ArAr4NCH ₂ (CH ₃) ₂	-7,4	-	-

Figura 6.19 Poses da 4-metóxicalcona. Em (A) interação do ligante somente com o bolsão hidrofóbico, em (B) interação do ligante com bolsão hidrofóbico e aminoácido LYS97.

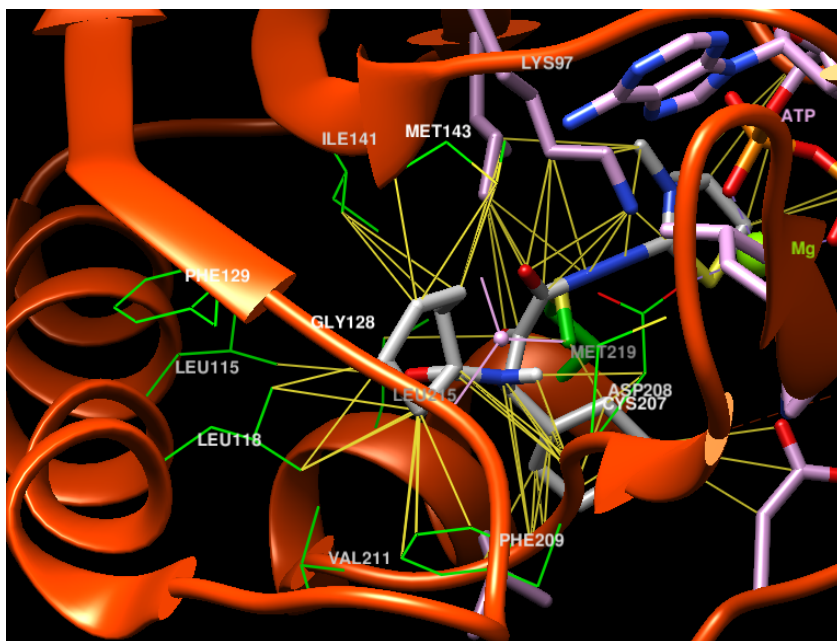


6.20: Apresentação dos tipos de interações realizadas entre o ligante 4-MC e o receptor.



A melhor energia de acoplamento referente ao ONO-5334, deve-se a capacidade de melhor interação com o bolsão hidrofóbico do sítio ativo, uma vez que sua conformação lhe permite ocupar volumes maiores e ainda interagir com o aminoácido LYS⁹⁷, conforme apresentado na Figura 6.21.

Figura 6.21: Pose de acoplamento do fármaco de referência ONO-5334 no sítio ativo alostérico da MEK1 e as interações do complexo ligante-receptor.



Os resultados obtidos nesta análise demonstram atividade inibidora de catepsina K a 4-MC, sendo esse o provável mecanismo de ação da mesma na regeneração óssea.

Esses dados também servem de justificativa para a baixa ação anti-inflamatória observada nas análises histológicas obtidas no ensaio *in vivo* de defeito crítico na calota craniana. Uma leve inflamação foi observada em todas as amostras contendo *scaffold*, sendo esta inflamação esperada devido a degradação do polímero. Sugere-se então, que devido à grande afinidade da 4-MC pela catepsina K, ao ser liberada no tecido esta se liga rapidamente a esta enzima para exercer sua função inibidora e se torna pouco disponível para se ligar a outros sítios a fim de exercer atividade anti-inflamatórias.

Esse provável acontecimento aumenta a eficácia do tratamento, pois é necessário que ocorra uma pequena ação inflamatória no meio para que células sejam recrutadas para dentro dos poros do *scaffold*, facilitando a regeneração no local.

4 Conclusão

Os resultados, em conjunto, comprovam os resultados anteriormente publicados sobre o efeito da 4-MC na regeneração óssea, porém, contribuem com evidências de prováveis mecanismos de ação, como a ação inibidora de catepsina K, comprovada pelas análises de *docking* molecular. Ao inibir a catepsina K, a ação dos osteoclastos é inibida, diminuindo o processo de reabsorção óssea, esta ação pode ser o mecanismo pelo qual a chalcona promova a regeneração óssea.

Além disso, estes resultados, em conjunto, indicam a eficácia desta plataforma de liberação da 4-MC em promover a osteocondução através dos poros com diâmetro adequado para esta terapia e a osteoindução, pela ação da 4-MC que atuou facilitando a formação de osso secundário em apenas 60 dias de tratamento, no presente modelo.

Os *scaffolds* de PGLA desenvolvidos demonstram resultados estruturais compatíveis com o desejado para a regeneração óssea com diâmetro de poros adequados para a migração celular e formação de vasos sanguíneos e tempo de degradação do polímero e liberação de fármaco adequados. Os resultados obtidos com as imagens de MEV e histológicas indicam uma degradação adequada do polímero, restando poucas MPs nas amostras após 60 dias as quais, visivelmente deformadas pela ação da degradação, perdem sua forma esférica.

Os resultados obtidos nas lâminas coradas com H. E. e Masson- Martoja, comprovaram a ação osteogênica da 4-MC veiculada nos *scaffolds*, apresentando maior atividade dos osteoblastos em comparação com o controle e maior quantidade de fibras de colágeno, assim como apresentou formação de osso primário já nas amostras de 30 dias e osso secundário nas amostras de 60 dias, comprovando a ação de regeneração e remodelação óssea da plataforma de liberação.

Pode-se concluir então, que os *scaffolds* de 4-MC produzidos são uma alternativa eficaz e segura para a terapia de regeneração óssea.

CAPÍTULO VII

Considerações Finais

Considerações Finais

Neste trabalho foi realizado um estudo de síntese, purificação e caracterização da 4-MC, onde se realizou, além da caracterização físico-química da molécula, estudos de pré-formulação, abordando análises de segurança e estabilidade do fármaco em estudo. Assim, foram realizados ensaios toxicológicos pela via oral, tendo em vista a necessidade da comprovação da segurança desta molécula para a continuação do projeto.

Nos estudos de *docking* molecular realizados neste trabalho foi evidenciada a ação inibidora de catepsina K da molécula estudada, corroborando com resultados de estudos *in vitro* demonstrados em trabalhos anteriores, como o realizado por Ramalho *et al.* (2013). Fármacos inibidores de catepsina K são de grande interesse para a indústria farmacêutica, por serem uma terapia potencial contra a osteoporose, porém os fármacos estudados até o momento apresentaram importantes reações adversas (dados descritos no capítulo II deste trabalho), com base neste histórico, análises de segurança da molécula investigada neste trabalho é de suma importância para uma futura utilização da 4-MC como um fármaco.

Em seguida, foram realizados estudos de estabilidade frente à luz e oxidação, devido ao fato de se ter conhecimento da sensibilidade das chalconas frente a luz, sendo facilmente isomerizadas nesta condição (BRAUN *et al.*, 2006). Também foram realizadas análises de predição *in silico* para caracterizar os possíveis sítios suscetíveis à degradação. Tais estudos podem subsidiar futuros desenvolvimentos de outros sistemas de liberação da 4-MC.

Atualmente tem-se observado um aumento considerável em pesquisas destinadas às terapias de regeneração tecidual. Porém, ainda não há um sistema realmente eficaz, ou seja, que possua todas as características essenciais para promover a regeneração óssea sendo osteocondutor, osteoindutor, que promova uma alta circulação sanguínea local e que veicule uma substância capaz de acelerar e promover a osteogênese, sendo ao mesmo tempo de baixo custo comparado com as alternativas disponíveis, de modo a ser acessível ao sistema público de saúde.

O objetivo principal deste projeto foi obter um sistema capaz de suprir todas essas necessidades, fabricando um *scaffold* que serve de suporte mecânico para sustentar o osso fraturado, e ao mesmo tempo composto de um polímero biodegradável e biocompatível, veiculando um fármaco seguro e com ação osteogênica, elaborado com tamanhos de partículas e poros compatíveis com o

processo de regeneração óssea, sendo assim, osteocondutor e osteoindutor, e que além de atuar como um sistema adequado para a regeneração óssea, atue como um estabilizador da molécula em uso, evitando seu contato direto com a luz.

Então, foi selecionado um polímero já bastante utilizado e aprovado por órgãos como FDA e EMA para o uso em sistemas administrados por via oral e parenteral, para tornar o sistema compatível com o mercado atual. As MPs foram desenvolvidas com os polímeros testados, visando a estabilidade do sistema de modo se obter um sistema seguro e realmente eficaz para a terapia desejada.

A MP selecionada foi empregada na obtenção de uma plataforma tipo *scaffold*, o qual se mostrou eficaz na regeneração óssea, atendendo à todas as necessidades inerentes a esse tipo de terapia. Os resultados da análise *in vivo* de ferida crítica em calota craniana demonstraram que os *scaffolds* produzidos foram biodegradáveis e biocompatíveis, não geraram resposta inflamatória significativa de rejeição no local da ferida, tiveram ação osteocundutora apresentando grande quantidade de células entre os poros inclusive nas amostras controle, indicando o benefício deste sistema, mesmo sem a presença de um fármaco. Porém, a ação osteogênica, com formação de ossos primários e secundários, foi evidenciada somente nas amostras que continham a 4-MC encapsulada.

Ao mesmo tempo, o sistema desenvolvido é de custo baixo, com polímero disponível comercialmente e seguro, a tecnologia de obtenção dos *scaffolds* é bastante acessível, bem como o fármaco é disponível comercialmente, em grau analítico e fácil de ser sintetizado. Portanto, esta plataforma, desenvolvida de forma racional, representa um sistema de liberação da 4-MC, que pode vir a ser um potencial candidato a fármaco para o tratamento de fraturas ósseas, promovendo a regeneração óssea em curto prazo.

REFERÊNCIAS

AARDEN, E. M.; BURGER, E. H.; NIJWEIDE, P. J. Function of osteocytes in bone. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 55, p. 287-299, 1994.

ALBERTINI, B.; IRACI, N.; SCHOUBBEN, A.; GIOVAGNOLI, S.; RICCI, M.; BLASI, P.; ROSSI, C. β - cyclodextrin hinders PLGA plasticization during microparticle manufacturing. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 30, p. 375-383, 2015.

ALLISON, S. D. Analysis of initial burst in PLGA microparticles. **Expert Opin. Drug Delivery**, v. 5, p. 615–628, 2008.

ALLISON, S. D. Effect of structural relaxation on the preparation and drug release behavior of poly(lactic-co-glycolic) acid microparticle drug delivery systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2008.

ALMEIDA JR, H. L.; BICCA, E. B. C.; BREUNIG, J. A.; ROCHA, N. M.; MARQUES, S. R. Microscopia eletrônica de varredura do líquen escleroso. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 88, n. 2, p. 251- 253, 2013.

ALTMAN, G. H.; DIAZ, F.; JAKUBA, C.; CALABRO, T.; HORAN, R. L.; CHEN, J.; LU, H.; RICHMOND, J.; KAPLAN, D. L. Silk-based biomaterials. **Biomaterials**, v. 24, p. 401-416, 2003.

AL-QATTAN, M. M.; ALSHOMER, F.; ALQAHTANI, A.; ALHADLG, A. Fibronectin and Craniofacial Surgery. **Annals of Plastic Surgery**, v. 73, n. 6, p. 716–720, 2014.

ANDERSON, J. M.; SHIVE, M. S. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 28, p. 5–24, 1997.

ANDERSSON, T.; BROO, A.; EVERTSSON, E. Prediction of Drug Candidates' Sensitivity Toward Autoxidation: Computational Estimation of C–H Dissociation Energies of Carbon-Centered Radicals. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, p. 1949-1955, 2014.

ANDRADE, A. D.; MARINHO, C. F.; BARCELOS, M.; ZORZAL, M. B.; CONZ, M. B.; VIDIGAL JR, G. M. Biologia óssea: uma revisão da literatura. **Revista Implant News**, v. 4, n. 6, p. 659-662, 2007.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Roteiro de Análise de Eficácia e Segurança para Avaliação de Registro de Medicamento Sintético.

Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia, Gerência Geral de Medicamentos e Produtos Biológicos, p. 27 - 31, 2019.

AHSAN, T.; NEREM, R.M. Bioengineered tissues: the science, the technology, and the industry. **Orthodontic & Craniofacial Research**, v.8, p.134- 140, 2005.

ASOU, Y.; RITTLING, S. R.; YOSHITAKE, H.; TSUJI, K.; SHINOMIYA, K.; NIFUJI, A.; DENHARDT, D. T.; NODA, M. Osteopontin Facilitates Angiogenesis, Accumulation of Osteoclasts, and Resorption in Ectopic Bone. **Endocrinology**, v. 142, n. 3, p. 1325–1332, 2001.

AZEVEDO, M. B. M.; MELO, V. H. S.; SOARES, C. R. J.; MIYAMOTO, D. M.; KATAYAMA, R. A.; SQUAIR, P. L.; BARROS, C. H. N.; TASIC, L. Development and characterisation of polymeric microparticle of poly(d,l-lactic acid) loaded with holmium acetylacetonate. **Journal of Microencapsulation**, 2018.

AZIZ, S.; GILL, J.; DUTILLEUL, P.; NEUFELD, R.; KERMASHA, S. Microencapsulation of krill oil using complex coacervation, **Journal of Microencapsulation**, v. 31, n. 8, p. 774-784, 2014.

BABICH, H.; BORENFREUND, E. Neutral red assay for toxicology *in vitro*. In: WATSON, R. R. **Methods in Toxicology and Pharmacology**, Boca Raton (FL): CRC Press, p. 237-251, 1992.

BARASCUK, N.; SKJOT-ARKIL, H.; REGISTER, T. C.; LARSEN, L.; BYRJALSEN, I.; CHRISTIANSEN, C.; KARSDAL, M. A. Human macrophage foam cells degrade atherosclerotic plaques through cathepsin K mediated processes. **BMC Cardiovascular Disorders**, v. 10, p. 1-9, 2010.

BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. Degradação Acelerada de Suportes de Poli(ε-Caprolactona) e Poli(D,L-Ácido Láctico-co-Ácido Glicólico) em Meio Alcalino. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 16, n. 2, p. 141-148, 2006.

BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 1, p. 13-21, 2005.

BAROT, V. M.; GANDHI, S. A.; MAHATO, A.; MEHTA, N.B. Synthesis, X-ray diffraction study and Antimicrobial study of 1-(4-butoxy-2-hydroxyphenyl)-3-(2,5- dimethoxyphenyl) prop-2-en-1-one. **International Journal of Scientific and Research Publications**, v. 3, n. 2, 2013.

BARREIRO, E. J. A Química Medicinal e o paradigma do composto-protótipo. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 1, p. 26-34, 2009.

BARROW, W. W. Microsphere technology for chemotherapy of mycobacterial infections. **Current Pharmaceutical Design**, v. 10, p. 3275–3284, 2004.

BHATTACHARJEE, A. K. N.; GERENA, L.; RONCAL, N.; GUTTERIDGE, C. E. An In Silico 3D Pharmacophore Model of Chalcones Useful in the Design of Novel Antimalarial Agents. **Medicinal Chemistry**, v. 3, p. 317-326, 2007.

BELIBASAKIS, G. N.; BOSTANCI, N. The RANKL-OPG system in clinical peri- odontology. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 39, p. 239–248, 2012.

BENOIT, J. P.; COURTEILLE, F.; THIES, C. A physicochemical study of the morphology of progesterone-loaded poly (d,l-lactide) microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 29, p. 95–102, 1986.

BIANCO, P.; FISHER, L. W.; YOOUNG, M. F.; TERMINE, J. D.; ROBEY, P. G. Expression of bone sialoprotein (BSP) in developing human tissues. **Calcified Tissue International**, v. 49, p. 421–426, 1991.

BILEZIKIAN, J. P.; RAISZ, L. G.; RODAN, G. A. Principles of bone biology. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 2002.

BIRARI, R. B.; GUPTA, S.; MOHAN, G.; BHUTANI, K. K. Antiobesity and lipid lowering effects of Glycyrrhiza chalcones: Experimental and computational studies. **Phytomedicine**, v. 18, p. 795–801, 2011.

BLANKSBY, S. J.; ELLISON, G. B. Bond Dissociation Energies of Organic Molecules. **Accounts of Chemical Research**, v. 36, n. 4, p. 255-263, 2003.

BLASI, P.; SCHOUBBEN, A.; GIOVAGNOLI, S.; PERIOLI, L.; RICCI, M.; ROSSI, C. Ketoprofen poly(lactide-co-glycolide) physical interaction. **AAPS PharmSciTech**, v. 8, 2007.

BLOM, A. Which *scaffold* for which application? **Current Orthopaedics**, v.21, p.280-287, 2007.

BOECK, P.; BANDEIRA FALCÃO, C. A.; LEAL, P. C.; YUNES, R. A.; Filho, V. C.; TORRES-SANTOS, E. C.; ROSSI-BERGMANN, B. Synthesis of chalcone analogues with increased antileishmanial activity. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 1538–1545, 2006.

BOGGILD, M. K.; GAJIC-VELJANOSKI, O.; MCDONALD-BLUMER, H.; RIDOUT, R.; TILE, L.; JOSSE, R.; CHEUNG, A. M. Olanacatib for the treatment of osteoporosis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 16, n. 11, p. 1717–1726, 2015.

BOLAND, E. D.; ESPY, P. G. & BOWLIN, G. L. **Tissue engineering scaffolds**. In: WENK, G. E.; BOWLIN, G. L. *Encyclopaedia of Biomaterials and biomedical engineering*. p.1633-1635, 2004.

BONVALLET, P. P.; SCHULTZ, M.J.; MITCHELL, E. H.; BAIN, J. L.; CULPEPPER, B. K.; THOMAS, S. J.; BELLIS, S. L. *Scaffolds* Pre- Seeded with Fibroblasts Promote Tissue Regeneration in Full- Thickness Skin Wounds. **Journal PLOS ONE**, P.1-17, 2015.

BORGES, J.; TEGTMEIER, F. T.; PADRON, N. T.; MUELLER, M. C.; LANG, E. M.; STARK, G. T. Chorioallantoic membrane angiogenesis model for tissue engineering: a new twist on a classic model. **Tissue Engineering**, v. 9, p. 441–450, 2003.

BORTOLOTO, L. F. B.; AZEVEDO, B. C.; SILVA, G.; MARINS, M.; FACHIN, A. L. Cytotoxic activity evaluation of chalcones on human and mouse cell lines. **BMC Proceedings**, V. 8, n. 4, p. 52, 2014.

BOSTROM, M. P.; LANE, J. M.; BERBERIAN, W. S. Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing. **Journal of Orthopaedic Research**, v.13, p.357- 367, 1995.

BOUDIFFA, M.; WADE-GUEYE, N. M.; GUIGNANDON, A.; VANDEN-BOSSCHE, A.; SABIDO, O.; AUBIN, J. E.; JURDIC, P.; VICO, L.; LAFAGE-PROUST, M. H.; MALAVAL, L. Bone sialoprotein deficiency impairs osteoclastogenesis and mineral resorption in vitro. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 25, p. 2393–2403, 2010.

BOYCE, B. F.; XING, L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. **Arthritis Research & Therapy**, v. 9, n. 1, p. S1-7, 2007.

BOYCE, B. F.; YOA, Z.; XING, L. Osteoclasts have multiple roles in bone in addition to bone resorption. **Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression**, v. 19, n. 3, p. 171–180, 2009.

BOYLE, P.; DIEHM, C.; ROBERTSON, C. Meta-analysis of clinical trials of Cyclo 3 Fort in the treatment of chronic venous insufficiency. **International Angiology**, v. 22, n. 3, p. 250-262, 2003.

BRASIL. Resolução RE nº 1, de 29 de julho de 2005. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária autoriza ad referendum, a publicação do “Guia para realização de Estudos de Estabilidade”. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Consolidado de normas CODIF (versão IV)**. Brasília, 2010.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. "Dispõe sobre a validação de métodos analíticos". **Diário Oficial da União nº 141**. Brasília, 2017.

BRASIL. Ministério da saúde. “Aprova normas de autorização de prótese total de joelho e de prótese total de quadril híbrida”. **Diário Oficial da União (DOU) nº 503**, Brasília, 2017.

BRASIL. Ministério da saúde. “Relatório de Gestão 2017. Política Nacional de Atenção a Traumatologia e Ortopedia”. **Secretaria de atenção à saúde**, p. 249-250, 2018.

BRAUN, R. U.; ANSORGE, M.; MÜLLER, T. J. Coupling–Isomerization Synthesis of Chalcones. **Chemistry – A European Journal**, v. 12: p. 9081-9094, 2006.

BROWN, A.; ZAKY, S.; RAY, H.; SFEIR, C. Porous magnesium/PLGA composite scaffolds for enhanced bone regeneration following tooth extraction. **Acta Biomaterialia**, v. 11, p. 543–553, 2015.

BUKHARI, S. N. A. *et al.* Review of methods and various catalysts used for chalcone synthesis. **Mini- Reviews in Organic Chemistry**, v. 10, n. 1, p. 73-83, 2013.

BUKHARI, S. N.; JANTAN, I.; JASAMAI, M. Anti-inflammatory trends of 1,3-diphenyl-2-propen-1-one derivatives. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 87–94, 2013.

BUKHARI, S. N.; LAURO, G.; JANTAN, I.; BIFULCO, G.; AMJAD, M. W.; Pharmacological evaluation and docking studies of α,β -unsaturated carbonyl based synthetic compounds as inhibitors of secretory phospholipase A₂, cyclooxygenases, lipoxygenases and proinflammatory cytokines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, p. 4151-4161, 2014.

CABRERA, M.; SIMOENS, M.; FALCHI, G.; LAVAGGI, M. L.; PIRO, O. E.; CASTELLANO, E. E.; VIDAL, A.; AZQUETA, A.; MONGE, A.; DE CERAIN, A. L.; SAGRERA, G.; SEOANE, G.; CERECETTO, H.; GONZALEZ, M. Synthetic chalcones, flavanones, and flavones as antitumoral agents: Biological evaluation and structure–activity relationships. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 3356–3367, 2007.

CAMBRONERO-ROJAS, A.; TORRES-VERGARA, P.; GODOY, R.; VON PLESSING, C.; SEPÚLVEDA, J.; GÓMEZ-GAETE, C. Capreomycin oleate microparticles for intramuscular administration: Preparation, in vitro release and preliminary in vivo evaluation. **Journal of Controlled Release**, v. 209, p. 229–237, 2015.

CAMINAL, M.; PERIS, D.; FONSECA, C.; BARRACHINA, J.; CODINA, D.; RABANAL, R. M.; MOLL, X.; MORIST, A.; GARCÍA, F.; CAIRÓ, J. J.; GÓDIA, F.; PLA, A.; VIVES, J. Cartilage resurfacing potential of PLGA *scaffolds* loaded with autologous cells from cartilage, fat, and bone marrow in an ovine model of osteochondral focal defect. **Cytotechnology**, v. 68, n.4, p. 907–919, 2016.

CAMPOS-BUZZI, F.; PADARATZ, P.; MEIRA, A. V.; CORRÊA, R.; NUNES, R. J.; CECHINEL FILHO, V. 4'-Acetamidochalcone derivatives as potential antinociceptive agents. **Molecules**, v. 12, p. 896-906, 2007.

CAO, D.; LI, Z.; JIANG, X.; LUM, Y. L.; KHIN, E.; LEE, N. P.; WU, G.; LUK, J. M. Osteopontin as potential biomarker and therapeutic target in gastric

and liver cancers. **World Journal of Gastroenterology**, v. 18, n. 30, p. 3923, 2012.

CAPULLI, M.; PAONE, R.; RUCCI, N. Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. **Archives of Biochemistry and Bio- physics**, v. 561, p. 3–12, 2014.

CARVALHO, R.S.; BUMANN, A.; SCHAER, J. L.; GERSTENFELD, L.C. Predominant integrin ligands expressed by osteoblasts show preferential regulation in response to both cell adhesion and mechanical perturbation. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 84, p. 497–508, 2002.

CASAS, J.; ZHAO, Q.; DONOVAN, M.; SCHROEDER, P.; STOKES, K.; UNTEREKER, D. In vitro modulation of macrophage phenotype and inhibition of polymer degradation by dexamethasone in a human macrophage/Fe/Stress system. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 46, p. 475-484, 1999.

CECHINEL-FILHO, V.; VAZ, Z. R.; ZUNINO, L.; CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A. Synthesis of xanthoxylone derivatives with antinociceptive and antioedematogenic activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 31, p. 833-839, 1996.

CHAPPARD, D.; LIBOUBAN, H.; MINDEHOLM, L.; BASLE, M. F.; LEGRAND, E.; AUDRAN, M. The Cathepsin K Inhibitor AAE581 Induces Morphological Changes in Osteoclasts of Treated Patients. **Microscopy Research and Technique**, v. 73, p. 726-732, 2010.

CHAPURLAT, R. D. Olanzapine: a review of its potential in the management of osteoporosis in postmenopausal women. **Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease**, v. 7, n. 3, p. 103–109, 2015.

CHAVES, L. L.; LIMA, S. A. C.; VIEIRA, A. C. C.; BARREIROSA, L.; SEGUNDO, M. A.; FERREIRA, D.; SARMENTO, B.; REISA, S. Development of PLGA nanoparticles loaded with clofazimine for oral delivery: Assessment of formulation variables and intestinal permeability. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 112, p. 28–37, 2018.

CHEN, M.; ZHAI, L.; CHRISTENSEN, S. B.; THEANDER, T. G.; KHARAZMI, A. Inhibition of fumarate reductase in *Leishmania major* and *L.*

donovani by chalcones. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 2023–2029, 2001.

CHEN, G.; USHIDA, T. & TATEISHI, T. Development of biodegradable porous *scaffolds* for tissue engineering. **Journal of Material Sciences and Engineering: C**, v. 17, p. 63–69, 2002.

CHEN, N. Y.; YE, X. C.; CHU, K.; NAVONE, N. M.; SAGE, E. H.; YU-LEE, L. Y.; LOGOTHETIS, C. J.; LIN, S. H. A secreted isoform of ErbB3 promotes osteonectin expression in bone and enhances the invasiveness of prostate cancer cells. **Cancer Research**, v. 67, p. 6544–6548, 2007.

CHEN, Y.; LIU, H.; WU, W.; LI, Y.; LI, J. Osteopontin genetic variants are associated with overall survival in advanced non-small-cell lung cancer patients and bone metastasis. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 32, n. 1, p. 45, 2013.

CHEN, Y.; XU, J.; HUANG, Z.; YU, M.; ZHANG, Y.; CHEN, H.; HU, J. An Innovative Approach for Enhancing Bone Defect Healing Using PLGA Scaffolds Seeded with Extracorporeal-shock-wave-treated Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells (BMSCs). **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 44130, 2017.

CHEREDDY, K. K.; VANDERMEULEN, G.; PREAT, V. PLGA based drug delivery systems: Promising carriers for wound healing activity. **Wound Repair and Regeneration**, v. 24, p. 223-236, 2016.

CHETANA, B. P.; MAHAJAN, S. K.; KATTI, S. A. Chalcone: A versatile molecule. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 1, n. 3, p. 11-22, 2009.

CHIU, L. L. Y.; RADISIC, M. Scaffolds with covalently immobilized VEGF and Angiopoietin-1 for vascularization of engineered tissues. **Biomaterials**, v. 31, p. 226–241, 2010.

CHOI, D.; PARK, J. C.; LEE, H. N.; MOON, J. H.; AHN, H. W.; PARK, K.; HONG, J. In vitro osteogenic differentiation and antibacterial potentials of chalcone derivatives. **Molecular Pharmaceutics**, v. 15, n. 8, p. 3197–3204, 2018.

CLIMENT, M.; CORMA, A.; IBORRA, S.; VELTY, A. Activated hydrotalcites as catalysts for the synthesis of chalcones of pharmaceutical interest. **Journal of Catalysis**, 221(2), 474-482, 2004.

CORDEIRO, M. N. S. **Síntese, caracterização e avaliação da atividade biológica de nitrochalconas e de chalconas derivadas da 6-acetil-2H-1,4-benzoxazin-3-(4H)-ona**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, 2013.

CORRÊA, R.; PEREIRA, M. A. S.; BUFFON, D.; DOS SANTOS, L.; CECHINEL-FILHO, V.; SANTOS, A. R. S. Antinociceptive properties of chalcones. Structure activity relationships. **Archiv der Pharmazie**, v. 10, p. 332-334, 2001.

COSTANTINO, U.; GALLIPOLI, A.; NOCHETTI, M.; CAMINO, G.; BELLUCI, F.; FRACHE, A. New nanocomposites constituted of polyethylene and organically modified ZnAl-hydrotalcites. **Polymer Degradation Stabilities**, v. 90, p. 586-590, 2005.

CRUZ, P. I. N. **Papel do denosumab no tratamenro da doença óssea metastática**. Dissertação de mestrado, Intituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto, 2011.

DAMOULIS, P. D.; HAUSCHKA, P. V. Nitric oxide acts in conjunction with proinflammatory cytokines to promote cell death in osteoblasts. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 12, n. 3, p. 412-422, 1997.

DANIELS, T.; Thermal Analysis, Kogan Page, New York, 1973.

DAULAY, A. H.; INDRANI, D. J.; AUFAN, M. R.; RAMELAN, A.; SISWOSUWARNO, M.; PURWASASMITA, B. S. Bone *scaffold* based on polymer/carbonate apatite by freeze drying method: synthesis, characterization and in vitro cytotoxicity. **Materials Science Forum**, v. 827, p. 81-86, 2015.

DE, S.; CHEN, J. H.; NARIZHNEVA, N. V.; HESTON, W.; BRAINARD, J.; SAGE, E. H.; BYZOVA, T. V. Molecular pathway for cancer metastasis to bone. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 39044-39050, 2003.

DE CARVALHO TAVARES, L.; JOHANN, S.; ALVES, M. A. A. T.; GUERRA, J. C.; SOUZA-FAGUNDES, M. E.; CISALPINO, P. S.; BORTOLUZZI, A. J.; CARAMORI, G. F.; DE MATTOS PICCOLI, R.;

BRAIBANTE, H. T. S.; BRAIBANTE, M. E. F.; PIZZOLATTI, M. G. Quinolinylnyl and quinolinylnyl N-oxide chalcones: Synthesis, antifungal and cytotoxic activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 4448–4456, 2011.

DE LUCA, P. P.; MEHTA, R. C.; HAUSBERGER, A. G.; THANOO, B. C. Biodegradable polyesters for drug and polypeptide delivery, in: EL-NOKALY, M. A.; PIATT, D. M.; CHARPENTIER, B. A. (Eds.), *Polymeric Delivery Systems Properties and Applications*. **American Chemical Society**, Washington, DC, p. 53–79, 1993.

DE ROSA, C. A.; FURUSATO, B.; SHAHEDUZZAMAN, S.; SRIKANTAN, V.; WANG, Z.; CHEN, Y.; SIEFERT, M.; RAVINDRANATH, L.; YOUNG, D.; NAU, M.; DOBI, A.; WERNER, T.; MCLEOD, D. G.; VAHEY, M. T.; SESTERNHENN, I. A.; SRIVASTAVA, S.; PETROVICS, G. Elevated osteonectin/SPARC expression in primary prostate cancer predicts metastatic progression. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, v. 15, p. 150–156, 2012.

DELAISSE, J. M. The reversal phase of the bone-remodeling cycle: cellular prerequisites for coupling resorption and formation. **BoneKEy Reports**, v. 3, n. 561, p. 1-8, 2014.

DELLA PORTA, G.; CASTALDO, F.; SCOGNAMIGLIO, M.; PACIELLO, L.; PARASCANDOLA, P.; REVERCHON, E. Bacteria microencapsulation in PLGA microdevices by supercritical emulsion extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 63, p. 1-7, 2012.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Immunology Methodology**. v. 89, p. 271-277, 1986.

DEVOLDER, R. J.; ZILL, A. T.; JEONG, J. H.; Kong, H. Microfabrication of proangiogenic cell-Laden alginate-g-Pyrrole hydrogels. **Biomaterials**, v. 33, p. 7718–7726, 2012.

DHANAPAL, V.; GOPINATH, C.; ASHAJOTHI, B.; RAMALINGAM, J.; RAMAN, A. N. A facile synthesis and the study of some new chalcones for analgesic and anti-inflammatory activity. **Am. Journal of Pharm Tech Research**, v. 3, p. 252–261, 2013.

DIMITRI, P.; WALES, J. K.; BISHOP, N. Adipokines, bone-derived factors and bone turnover in obese children; evidence for altered fat-bone signalling resulting in reduced bone mass. **Bone**, v. 48, n. 2, p. 189 - 196, 2011.

DOTY, S. B. Morphological evidence of gap junctions between bone cells. **Calcified tissue international**, v. 33, p. 509–512, 1981.

DRAKE, M. T.; CLARKE, B. L.; OURSLER, M. J.; KHOSLA, S. Cathepsin K Inhibitors for Osteoporosis: Biology, Potential Clinical Utility, and Lessons Learned. **Endocrine Reviews**, v. 38, n. 4, p. 325–350, 2017.

DUONG, L. T.; LEUNG, A. T.; LANGDAHL, B. Cathepsin K Inhibition: A New Mechanism for the Treatment of Osteoporosis. **Calcified Tissue International**, v. 98, n. 4, p. 381–397, 2015.

ECHA, European Chemicals Agency, 2018. Acessado em: 15 de setembro de 2018. <https://echa.europa.eu>.

EDDARIR, S.; COTELLE, N.; BAKKOUR, Y.; ROLANDO, C. An efficient synthesis of chalcones based on the Suzuki reaction. **Tetrahedron Letters**, v. 44, p. 5359-5363, 2003.

EL-FIGI, A.; KIM, J. H.; KIM, H. W. Osteoinductive Fibrous *Scaffolds* of Biopolymer/Mesoporous Bioactive Glass Nanocarriers with Excellent Bioactivity and Long-Term Delivery of Osteogenic Drug. **Materials Interfaces**, v. 7, n. 2, p. 1140-1152, 2015.

ENOKI, T. *et al.* Antidiabetic Activities of Chalcones Isolated from a Japanese Herb, *Angelica keiskei*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 15, p. 6013-6017, 2007.

EVANOS AKSÖZ, B.; ERTAN, R. Chemical and Structural Properties of Chalcones I. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 36, p. 223-242, 2011.

EYRE, D. R.; PAZ, M. A.; GALLOP, P. M. Cross-linking in collagen and elastin. **Annual review of biochemistry**, v. 53, p. 717–48, 1984.

FERREIRA, L. B.; TAVARES, C.; PESTANA, A.; PEREIRA, C. L.; ELOY, C.; PINTO, M. T.; CASTRO, P.; BATISTA, R.; RIOS, E.; SOBRINHO-SIMÕES, M. Osteopontin-a splice variant is overexpressed in papillary thyroid

carcinoma and modulates invasive behavior. **Oncotarget**, v. 7, p. 52003-52016, 2016.

FERRON, M.; WEI, J.; YOSHIZAWA, T.; DEL FATTORE, A.; DEPINHO, R. A.; TETI, A. Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism. **Cell**, v. 142, p. 296–308, 2010.

FIALHO, S. L.; REGO, M. G. B.; CARDILLO, J. A.; SIQUEIRA, R. C.; JORGE, R.; CUNHA JÚNIOR, A. S. Implantes biodegradáveis destinados à administração intra-ocular. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 66, p. 891-896, 2003.

FIELD, R. A. Ash and calcium as measures of bone in meat and bone mixtures. **Meat Science**, v.55, n.3, p.255-264, 2000.

FILOVÁ, E.; STRAKA, F.; MIŘEJOVSKÝ, T.; MAŠÍN, J.; BAČÁKOVA, L. Tissue-Engineered Heart Valves. **Physiological Research**, v. 58, n. 2, p. S141-S158, 2009.

FISHER, L. W.; TORCHIA, D. A.; FOHR, B.; YOUNG, M. F.; FEDARKO, N. S. Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 280, p. 460–465, 2001.

FISHER, L. W.; FEDARKO, N. S. Six genes expressed in bones and teeth encode the current members of the SIBLING family of proteins. **Connective Tissue Research**, v. 44, p. 33–40, 2003.

FONSECA, P. S. **Síntese e caracterização de chalconas e dichalconas conterndo unidades 1,2,3-triazólicas**. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, 2012.

FLORÃO, A.; MATTANA, F. V. R.; ROCHA, F. F.; NARDINI, J. M.; MACHADO JUNIOR, J.; SANTOS, A. M. W. Efeitos do dimetilsulfóxido sobre a proliferação de linfócitos humanos *in vitro*. **Latin american Journal of Phrmacy**, v. 26, n. 2, 2007.

FREDENBERG, S.; WAHLGREN, M.; RESLOW, M.; AXELSSON, A. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems—A review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 415, p. 34–52, 2011.

FRIESS, W. Collagen – biomaterial for drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 45, p. 113–36, 1998.

GANSS B.; KIM, R. H.; SODEK, J. Bone sialoprotein. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v. 10, p. 79–98, 1999.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de Histologia em cores**, 2ª edição, ed Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 122-123, 2003.

GE, Z.; TIAN, X.; HENG, B. C.; FAN, V.; YEO, J. F.; CAO, T. Histological evaluation of osteogenesis of 3D-printed poly-lactic-co- glycolic acid (PLGA) *scaffolds* in a rabbit model. **Biomedical Materials**, v. 4, 2009.

GIANNOUDS, P. V.; EINHORN, T. A.; MARSH, D. Fracture healing: the diamond concept. **Injury**, v. 38, n. 4, p. S3-6, 2007.

GIANNOUDS, P. V.; EINHORN, T. A.; SCHMIDMAIER, G.; MARSH, D. The diamond concept--open questions. **Injury**, v. 39, n. 2, p. S5-8, 2008.

GIOVAGNOLI, S.; BLASI, P.; RICCI, M.; ROSSI, C. Biodegradable microspheres as carriers for native superoxide dismutase and catalase delivery. **AAPS PharmSciTech**, v. 5, p. 1–9, 2004.

GIOVAGNOLI, S.; BLASI, P.; SCHOUBBEN, A.; ROSSI, C.; RICCI, M. Preparation of large porous biodegradable microspheres by using a simple double-emulsion method for capreomycin sulfate pulmonary delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 333, p. 103–111, 2007.

GIOVAGNOLI, S.; BLASI, P.; RICCI, M.; SCHOUBBEN, A.; PERIOLI, L.; ROSSI, C. Physicochemical characterization and release mechanism of a novel prednisone biodegradable microsphere formulation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 97, 2008.

GIOVAGNOLI, S.; PALAZZO, F.; DI MICHELE, A.; SCHOUBBEN, A.; BLASI, P.; RICCI, M. The influence of feedstock and process variables on the encapsulation of drug suspensions by spray-drying in fast drying regime: The case of novel antitubercular drug-palladium complex containing polymeric microparticles. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2014.

GIRON, D. Applications of thermal analysis and coupled techniques in pharmaceutical industry. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 68, n. 2, p. 335-357, 2002.

GLOBUS, R. K.; DOTY, S. B.; LULL, J. C.; HOLMUHAMEDOV, E.; HUMPHRIES, M. J.; DAMSKY, C. H. Fibronectin is a survival factor for differentiated osteoblasts. **Journal of Cell Science**, v. 111, n. Pt 10, p. 1385-93, 1998.

GO, M. L.; WU, X.; LIU, X. L. Chalcones: an update on cytotoxic and chemoprotective properties. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 483-499, 2005.

GOMES, M. N.; MURATOV, E. N.; PEREIRA, M.; PEIXOTO, J.; ROSSETO, L. P.; CRAVO, P. V. L.; ANDRADE, C. H.; NEVES, B. J. Chalcone Derivatives: Promising Starting Points for Drug Design. **Molecules**, v. 22, n. 1210, 2017.

GÖPFERICH, A. A mechanism of polymer degradation and erosion. **Biomaterials**, v. 17, p. 103-114, 1996.

HAN, F. Y.; THURECHT, K. J.; WHITTAKER, A. K.; SMITH, M. T. Bioerodable PLGA-Based Microparticles for Producing Sustained-Release Drug Formulations and Strategies for Improving Drug Loading. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, n. 185, p. 1-11, 2016.

HAN, Y.; LEE, S. H.; LEE, I.-S.; LEE, K. Y. Regulatory effects of 4-methoxychalcone on adipocyte differentiation through PPAR γ activation and reverse effect on TNF- α in 3T3-L1 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 106, p. 17-24, 2017.

HAO, C.; CUI, Y.; OWEN, S.; LI, W.; CHENG, S.; JIANG, W. G. Human osteopontin: Potential clinical applications in cancer (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, v. 39, n. 6, p. 1327-1337, 2017.

HEN, K.; BOGDANSKI, P.; PUPEK-MUSIALIK, D. Osteoprotegerin - a new atherosclerosis marker. **Pol Merkur Lekarski**, v. 31, n. 134, p. 244- 248, 2011.

HENMI, K.; HIWATASHI, Y.; HIKITA, E.; TOYAMA, N.; HIRANO, T. Methoxy- and Fluoro-chalcone Derivatives Arrest Cell Cycle Progression and Induce Apoptosis in Human Melanoma Cell A375. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, n. 6, p. 1109–1113, 2009

HIGUCHI, T. Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, p. 874–875, 1961.

HOERTH, R. M.; KERSCHNITZKI, M.; AIDO, M.; SCHMIDT, I.; BURGHAMMER, M.; DUDA, G. N.; WAGERMAIER, W. Correlations between nanostructure and micromechanical properties of healing bone. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 77, p. 258–266, 2018.

HOLY, C. E.; DANG, S. M.; DAVIES, J. E.; SHOICHET, M. S. In vitro degradation of a novel poly(lactide-co-glycolide) 75/25 foam. **Biomaterials**, v. 20, p. 1177-1185, 1999.

HOLZMANN, I *et al.* Antidepressant-like effect of quercetin in bulbectomized mice and involvement of the antioxidant defenses, and the glutamatergic and oxidonitrergic pathways. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 136, p. 55-63, 2015.

HUANG, J.; WIGENT, R. J.; SCHWARTZ, J. B. Drug-polymer interaction and its significance on the physical stability of nifedipine amorphous dispersion in microparticles of an ammonio methacrylate copolymer and ethylcellulose binary blend. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, p. 251–262, 2008.

HUANG, J.; MAZZARA, J. M.; SCHWENDEMAN, S. P.; THOULESS, M. D.; Self-healing of pores in PLGAs. **Journal of Controlled Release**, v. 206, p. 20–29, 2015.

HUANG, R. L.; KOBAYASHI, E.; LIU, K.; LI, Q. Bone Graft Prefabrication Following the In Vivo Bioreactor Principle. **EBioMedicine**, v. 12, p. 43-54, 2016.

HUNTER, G. K.; GOLDBERG, H. A. Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: role of glutamic acid-rich sequences in the nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. **Biochemical Journal**, v. 302, p. 175–179, 1994.

HUNTER, G. K. Role of Osteopontin in Modulation of Hydroxyapatite Formation. **Calcified Tissue International**, v. 93, n. 4, p. 348- 354, 2013.

HUSSEIN, H.; BOYAKA, P.; DULIN, J.; RUSSELL, D.; SMANIK, L.; AZAB, M.; BERTONE, A. L. Cathepsin K Localizes to Equine Bone *In Vivo* and Inhibits Bone Marrow Stem and Progenitor Cells Differentiation *In Vitro*.” **Journal of stem cells & regenerative medicine**, v. 13, p. 2 45-53, 2017.

HUTMACHER, D. W. *Scaffold* in tissue engineering bone and cartilage. **Biomaterials**, v. 21, p. 2529-2543, 2000.

HUTMACHER, D. W. *Scaffold* design and fabrication technologies for engineering tissues- state of the art and future perspectives. **Journal of Biomaterial Science, Polymer Edition**, v. 12, p. 107-124, 2001.

HUTMACHER, D.W. *et al.* State of the art and future directions of *scaffold*-based bone engineering from a biomaterials perspective. **Journal of Tissue and Engineering Regenerative Medicine**, v. 1, p. 245-260, 2007.

IFTIKHAR, S.; KHAN, S.; BILAL, A.; MANZOOR, S.; ABDULLAH, M.; EMWAS, A. H.; SIOUD, A.; GAO, X.; CHOTANA, G. A.; FAISAL, A.; SALEEM, R. S. Z. Synthesis and evaluation of modified chalcone based p53 stabilizing agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, p. 4101-4106, 2017.

IIDA, T.; WAGATSUMA, K.; HIRAYAMA, D.; NAKASE, H. Is Osteopontin a Friend or Foe of Cell Apoptosis in Inflammatory Gastrointestinal and Liver Diseases? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 19, 2018.

IKADA, Y. **Scope of tissue engineering** In: IKADA, Y. Tissue engineering: fundamental and applications, p. 29, Academic press, USA, 2006.

İNANÇ B.; ELÇİN, A. E.; ELÇİN, Y. M. Effect of Osteogenic Induction on the in Vitro Differentiation of Human Embryonic Stem Cells Cocultured With Periodontal Ligament Fibroblasts. **Artificial Organs**, v. 31, n. 11, p. 792–800, 2007.

IOZZINO, V.; ASKANIAN, H.; LEROUX, F.; VERNEY, V.; PANTANI, R. Tuning the hydrolytic degradation rate of poly-lactic acid (PLA) to more durable applications. **American Institute of Physics** in: AIP Conference Proceedings 1914, 210001, 2017.

ISSA, J. P. M.; DO NASCIMENTO, C.; BENTLEY, M. V. Bone repair in rat mandible by rhBMP-2 associated with two carriers. **Micron (Oxford, 1993)**, v. 39, p. 373- 379, 2008.

ISSA, J. P. M.; *et al.* Evaluation of rhBMP-2 and natural látex as potential osteogenic proteins in critical size defects by histomorphometric methods. **The Anatomical Record**, v. 293, p. 794-801, 2010.

ISOLA, J. G. M. P.; MORAES, P. C. Estrutura e regeneração óssea: revisão da literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Periódico semestral, ano IX, n. 18, 2012.

IQBAL, H.; PRABHAKAR, V.; SANGITH, A.; CHANDRIKA, B.; BALASUBRAMANIAN, R. Synthesis, anti-inflammatory and antioxidant activity of ring-A-monosubstituted chalcone derivatives. **Medicinal Chemistry Research**, v. 23, p. 4383–4394, 2014.

JAHAN, K E TRABIZIAN, M. Composite biopolymers for bone regeneration enhancement in bony defects. **Biomaterials Science**, v. 4, p. 25-39, 2016.

JELONEK, K.; KARPERCZYK, J. Polyesters and polyestercarbonates for controlled drug delivery. **Polimery**, v. 58, n. 9, p. 654-662, 2013.

JOVTSCHIEFF, A.; SPASSOV, S. L.; STEFANOVSKY, J. N.; STOILOV, L.; GOTSCHÉWA, W. Brom-acetoxylierung 4-substituierter chalkone durch n-bromsuccinimid und eisessig. **Monatshefte für Chemie**, v. 100, p. 51- 63, 1969.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Histologia básica. 9a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Capítulo 8, 2003.

KACHADOURIAN, R.; DAY, B. J.; PUGAZHENTI, S.; FRANKLIN, C. C.; GENOUX.BASTIDE, E.; MAHAFFEY, G.; GAUTHIER, C.; DI PIETRO, A.; BOUMENDJEL, A. A synthetic chalcone as a potent inducer of glutathione biosynthesis. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, p. 1382–1388, 2012.

KALOGERAS, I. M. A novel approach for analyzing glass-transition temperature vs. composition patterns: Application to pharmaceutical compound + polymer systems. **European Journal of Pharmaceutical Science**, v. 42, p. 470–483, 2011.

KARAGEORGIOU, V.; KAPLAN, D. Porosity of 3D biomaterial *scaffolds* and osteogenesis. **Biomaterials**, v. 26, p. 5474– 5491, 2005.

KARIMI-SALES, E.; JEDDI, S.; EBRAHIMI-KALAN, A.; ALIPOUR, M. R. trans-Chalcone prevents insulin resistance and hepatic inflammation and also promotes hepatic cholesterol efflux in high-fat diet-fed rats: modulation of miR-34a-, miR-451-, and miR-33a-related pathways. **Food & Function**, 2018.

KANG, J.; SCHWENDEMAN, S. P. Pore closing and opening in biodegradable polymers and their effect on the controlled release of proteins. **Molecular Pharmaceutics**, v. 4, p. 104–118, 2007.

KAPOOR, D. N.; BHATIA, A.; KAUR, R.; SHARMA, R.; KAUR, G.; DHAWAN, S. PLGA: a unique polymer for drug delivery. **Therapeutic Delivery**, v. 6, p. 41–58, 2015.

KARSENTY, G. Update on the biology of osteocalcin. **Endocrine Practice**. v. 23, n. 10, p. 1270–1274, 2017.

KATARE, S.; KALOS, A.; WEST, D. A hybrid swarm optimizer for efficient parameter estimation. In: **Proceedings of the 2004 Congress on Evolutionary Computation (IEEE Cat. No.04TH8753)**, v. 1, p. 309–315, 2004.

KATAYAMA, Y. Osteocytes and osteonetwork. **Clinical Calcium**, v. 26, n. 8, p. 1111 - 1118, 2016.

KAUR, K.; JAIN, M.; REDDY, R.CP.; JAIN, R. Quinolines and structurally related heterocycles as antimalarials. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, 2010.

KHAJURIA, D. K.; RAZDAN, R.; MAHAPATRA, D. R. Medicamentos para o tratamento da osteoporose: revisão. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 51, n. 4, p. 365-382, 2011.

KHAN, A. A.; AHMED, B.; ALAM, T. Synthesis and antihepatotoxic activity of some new chalcones containing 1,4-dioxane ring system Pak. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 19, n. 4, p. 290-294, 2006.

KIEFFER, J.; BRÉMOND, E.; LIENARD, P.; BOCCARDI, G. In silico assessment of drug substances chemical stability. **Journal of Molecular Structure, THEOCHEM**, v. 954, p. 75–79, 2010.

KIM, M. J.; CHOI, Y. S.; YANG, S. H.; HONG, H. N.; CHO, S. W.; CHA, S. M.; PAK, J. H.; KIM, C. W.; KWON, S. W.; PARK, C. J. Muscle regeneration by adipose tissue-derived adult stem cells attached to injectable PLGA spheres. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 348, p. 386–392, 2006.

KIM, T. H.; SEO, W. D.; RYU, H. W.; SEO, H. R.; JIN, Y. B.; LEE, M.; JI, Y. H.; PARK, K. H.; LEE, Y. S. Anti-tumor effects by a synthetic chalcone compound is mediated by c-Myc- mediated reactive oxygen species production. **Chemico- Biological Interactions**, v. 188, p. 111–118, 2010.

KIM, S. N.; KIM, S. H.; KIM, C. H.; BAE, S. J. In vitro and in vivo Osteogenic activity of lincochalcone A. **Amino acids**, v. 42, n. 4, p. 1455- 1465, 2012.

KLEEMANN, C. R.; SANTOS, T. C.; TAVARES, L. C.; PIZZOLATTI, M. G. CAMPOS, A. M. Development and Characterization of Synthetic Chalcones-Loaded Eudragit RS 100 Microparticles for Oral Delivery. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 6, p. 1074-1080, 2017.

KLEIN-NULEND, J.; ROELOFSEN, J.; SEMEINS, C. M.; BRONCKERS, A. L. J. J.; BURGER, E. H. Mechanical stimulation of osteopontin mRNA expression and synthesis in bone cell cultures. **Journal of Cellular Physiology**, v. 170, n. 2, p. 174–181, 1997.

KLOSE, D.; SIEPMANN, F.; ELKHARRAZ, K.; KRENZLIN, S.; SIEPMANN, J. How porosity and size affect the drug release mechanisms from PLGA-based microparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 314, p. 198-206, 2006.

KLOSE, D.; SIEPMANN, F.; ELKHARRAZ, K.; KRENZLIN, S.; SIEPMANN, J. PLGA-based drug delivery systems: importance of the type of drug and device geometry. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 354, p. 95-103, 2008.

KNOTT, L.; BAILEY, A. J. Collagen cross-links in mineralizing tissues: a review of their chemistry, function, and clinical relevance. **Bone**, v. 22, n. 3, p. 181-187, 1998.

KOSMIDIS, K.; RINAKI, E.; ARGYRAKIS, P.; MACHERAS, P. Analysis of Case II drug transport with radial and axial release from cylinders. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 254, p. 183-188, 2003.

KUBLER, A.; LARSSON, C.; LUNA, B.; ANDRADE, B. B.; AMARAL, E. P.; URBANOWSKI, M.; BISHAI, W. R. Cathepsin K Contributes to Cavitation and Collagen Turnover in Pulmonary Tuberculosis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 213, n. 4, p. 618 - 627, 2015.

KUMARA, N.; LANGERB, R. S.; DOMBA, A. J. Polyanhydrides: an overview. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 889-910, 2002.

LABET, M.; THIELEMANS, W. Synthesis of polycaprolactone: a review. **Chemical Society Reviews**, v. 38, p. 3484-504, 2009.

LAHTCHEV, K. L.; BATOVSKA, D. I.; PARUSHEV, S. P.; UBIYVOVK, V. M.; SIBIRNY, A. A. Antifungal activity of chalcones: A mechanistic study using various yeast strains. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 2220-2228, 2008.

LECAILLE, F.; BROMME, D.; LALMANACH, G. Biochemical properties and regulation of cathepsin K activity. **Biochimie**, v. 90, p. 208-226, 2008.

LEE, S. C.; SHEA, M.; BATTLE, M. A. Healing of large segmental defects in rat femurs is aided by rhBMP-2 in PLGA matrix. **Journal of Biomedical Material Research**, v. 28, p. 1149-1156, 1994.

LEVENBERG, K. A method for the solution of certain non-linear problems in least squares. **The Quarterly Journal of Mechanics and Applied Mathematics**, v. 2, p. 164-168, 1944.

LI, J.T *et al.* Improved synthesis of chalcones under ultrasound irradiation. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 9, p. 237-239, 2002.

LI, Y.; CHEN, S.-K.; LI, L.; QIN, L.; WANG, X.-L.; LAI, Y.-X. Bone defect animal models for testing efficacy of bone substitute biomaterials. **Journal of Orthopaedic Translation**, v. 3, n. 3, p. 95–104, 2015.

LIANG, D.; HSIAO, B. S. & CHU, B. Functional electrospun nanofibrous *scaffolds* for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 1392-1412, 2007.

LIENARD, P.; GAVARTIN, J.; BOCCARDI, G.; Meunier, M. Predicting drugs substances autoxidation. **Pharmaceutical Research**, v. 32, p. 300-310, 2015.

LIM, J.; LEE, S. H.; CHO, S.; LEE, I. S.; KANG, B. Y.; CHOI, H. J. 4-methoxychalcone enhances cisplatin-induced oxidative stress and cytotoxicity by inhibiting the Nrf2/ARE- mediated defense mechanism in A549 lung cancer cells. **Molecules and Cells**, v. 36, p. 340–346, 2013.

LINDEMAN, J. H.; HANEMAAIJER, R.; MULDER, A. Cathepsin K is the principal protease in giant cell tumor of bone. **The American Journal of Pathology**, v. 165, p. 593 - 600, 2004.

LIU, J.; KERNS, D. Mechanisms of Guided Bone Regeneration: A Review. **The Open Dentistry Journal**, v. 8, n. 1-M3, p. 56-65, 2014.

LIU, X.; MA, P.X. Polymeric *Scaffolds* for Bone Tissue Engineering. **Ann. Biomedical Engineering**, v. 32, n. 3, p. 477-486, 2004.

LU, Z.; TSAI, M.; LU, D.; WANG, J.; WIENTJES, M. G.; AU, J. L. S. Tumor-Penetrating Microparticles for Intraperitoneal Therapy of Ovarian Cancer. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 327, p. 673–682, 2008.

LU, J.; WANG, M.; WANG, Z.; FU, Z.; LU, A.; ZHANG, G. Advances in the discovery of cathepsin K inhibitors on bone resorption. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 33, n. 1, p. 890–904, 2018.

LYU, S.; UNTEREKER, D. Degradability of polymers for implantable biomedical devices. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, p. 4033-4065, 2009.

MA, C.; LI, G.; ZHANG, D.; LIU, K.; FAN, X. One step isolation and purification of liquiritigenin and isoliquiritigenin from *Glycyrrhiza uralensis* Risch. using high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1078, n. 1–2, p. 188–192, 2005.

MA, P. X. Biomimetic materials for tissue engineering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, p. 184–98, 2008.

MA, G. Microencapsulation of protein drugs for drug delivery: Strategy, preparation, and applications. **Journal of Controlled Release**, v. 193, p. 324–340, 2014.

MACARINI, A. F.; SOBRINHO, T. U. C.; RIZZI, G. W.; CORRÊA, R. Pyrazole–chalcone derivatives as selective COX-2 inhibitors: design, virtual screening, and in vitro analysis. **Medicinal Chemistry Research**. v. 28, p. 1235–1245, 2019.

MAHAPATRA, D. K.; BHARTI, S. K.; ASATI, V. Anti-cancer chalcones: Structural and molecular target perspectives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 98, p. 69–114, 2015.

MAKADIA, H. K.; SIEGEL, S. J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. **Polymers (Basel)**, v. 3, p. 1377–1397, 2011.

MALAVIA, N.; REDDY, L.; SZINAI, I.; BETTY, N.; PI, J.; KANAGARAJ, J. *et al.* Biodegradable sustained-release drug delivery systems fabricated using a dissolvable hydrogel template technology for the treatment of ocular indications. **IOVS**, v. 56, p. 1296, 2015.

MANCIOCCO, A.; ROMANO, E.; ZORATTO, F.; BRANCHI, I.; BERRY, A. Sperimentazione animale: aspetti teorici, normativi e applicativi della nuova Direttiva europea 2010/63. **Roma: Istituto Superiore di Sanità**; 2011. (ISTISAN 11/39).

MANDAL, B. B. & KUNDU, S. C. Non-bioengineered silk gland fibroin protein: characterization and evaluation of matrices for potential tissue engineering applications. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 100, n. 6, p. 1237–50, 2008.

MANDGE, S.; SINGH, H. P.; GUPTA, S. D.; MOORTHY, N. H. N. Synthesis and characterization of some chalcone derivatives. **Trends in Applied Sciences Research**, v. 2, n. 1, p. 52-56, 2007.

MANO, J. F.; SILVA, G. A.; AZEVEDO, H. S.; MALAFAYA, P. B.; SOUSA, R. A.; SILVA, S. S.; BOESEL, L. F.; OLIVEIRA, J. M.; SANTOS, T. C.; MARQUES, A. P.; NEVES, N. M.; REIS, R. L. Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 4, p. 999-1030, 2007.

MAQUET, V.; JEROME, R. Design of macroporous biodegradable polymer *scaffolds* for cell transplantations. **Materials Science Forum**, v. 250, p. 15-24, 1997.

MARINI, J. C.; FORLINO, A.; BÄCHINGER, H. P.; BISHOP, N. J.; BYERS, P. H.; PAEPE, A. D.; SEMLER, O. Osteogenesis imperfecta. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p. 17052, 2017.

MARINOVICH, R.; SOENJAYA, Y.; WALLACE, G. Q.; ZUSKOV, A.; DUNKMAN, A.; FOSTER, B. L.; GOLDBERG, H. A. The role of bone sialoprotein in the tendon–bone insertion. **Matrix Biology**, v. 52-54, p. 325–338, 2016.

MARKS, S. C.; POPOFF, S. N. Bone cell biology: the regulation of development, structure, and function in the skeleton. **The American Journal of Anatomy**, v. 183, p. 1Y44, 1988.

MARKS, S. C.; ODGREN, P. R. **Structure and development of the skeleton**. In: BILEZIKIAN, J. P.; RAISZ, L. G.; RODAN, G. A., editors. Principles of bone biology. 2nd ed. San Diego: Academic Press, p. 3-15, 2002.

MARQUARDT, D. W. An Algorithm for Least-Squares Estimation of Nonlinear Parameters. **Journal of the Society for Industrial and Applied Mathematics**, v. 11, p. 431–441, 1963.

MARTOJA, R.; LELAND, C. G.; MARTOJA-PIERSON, M. *Técnicas de histologia animal*. Barcelona: Toray- Masson, 1970.

MATTOS, C. B.; DEPONTI, B.; BARRETO, S. C. M. O. Andrighetti-Frohner, C.R., Nunes, R.J., Steindel, M., Teixeira, H.F., Koester, L.S., Development of a stability- indicating LC method for determination of a synthetic chalcone derivative in a nanoemulsion dosage form and identification of the main photodegradation product by LC–MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 70, p. 652–656, 2012.

MATUSKOVA, J. Decreased Plasma Fibronectin Leads to Delayed Thrombus Growth in Injured Arterioles. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 26, n. 6, p. 1391–1396, 2006.

MAVOURNIN, K. H.; BLANKEY, D. H.; CIMINO, M. C.; SALAMONE, M. F.; HEDDLE, J. A. The vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U. S. Environmental Protection agency Gene- ToxProgram. **Mutation Research**, v. 239, p. 29-80, 1990.

MCCABE, N. P.; KERR, B. A.; MADAJKA, M.; VASANJI, A.; BYZOVA, T. V. Augmented osteolysis in SPARC-deficient mice with bone-residing prostate cancer. **Neoplasia**, v. 13, p. 31–39, 2011.

MCKNIGHT, D. A. C.; SOSNOSKI, D. M.; KOBLINSKI, J. E.; GAY, C. V. Roles of osteonectin in the migration of breast cancer cells into bone. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 97, p. 288–302, 2006.

MEDIVIR, 2019. Acessado em 17 de julho de 2019.
<https://www.medivir.com/investors/press-releases/2019/safety-and-efficacy-data-from-the-miv-711-phase-ii-open-label-extension-study-presented-at-the-oarsi-world-congress>.

MEISSNER, O.; HÄBERLEIN, H. HPLC analysis of flavokavins and kavapyrones from Piper methysticum Forst. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 5, n. 826, p. 46-9, 2005.

MIRONOV, A. V.; GRIGORYEV, A. M.; KROTOVA, L. I.; SKALETISKY, N. N.; POPOV, V. K.; SEVASTIANOV, V. I. 3D Printing of PLGA *Scaffolds* for Tissue Engineering. **Journal of Biomedical Materials and Research Part A: 105A**, p. 104–109, 2017.

MIZOKAMI, A.; KAWAKUBO-YASUKOCHI, T.; HIRATA, M. Osteocalcin and its endocrine functions. **Biochemical Pharmacology**, v. 132, p. 1- 8, 2017.

MONTANARI, C. A. **Química Medicinal: Métodos e Fundamentos em Planejamento de Fármacos**, 1a Ed, Edusp: São Paulo, 2011.

MOONEY, D. J.; McNAMARA, K.; HERN, D.; VACANTI, J. P. & LANGER, R. Stabilized polyglycolic acid fibre-based tubes for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 17, p. 115–124, 1996.

MORRIS, D. P.; STEVENS, R. D.; WRIGHT, D. J.; STAFFORD, D. W. Processive post-translational modification: Vitamin K-dependent carboxylation of a peptide substrate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 30491–30498, 1995.

MOTYCKOVA, G; FISHER, D. E. Pycnodysostosis: role and regulation of cathepsin K in osteoclast function and human disease. **Current Molecular Medicine**, v. 2, n. 12, p. 407–421, 2002.

MUKHERJEE, K.; CHATTOPADHYAY, N. Pharmacological inhibition of cathepsin K: A promising novel approach for postmenopausal osteoporosis therapy. **Biochemical Pharmacology**, v. 117, p. 10–19, 2016.

MULLARD, A. Merck & Co. drops osteoporosis drug odanacatib. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, n. 10, p. 669–669, 2016.

MUSIALIK, K.; SZULINSKA, M.; HEN, K.; SKRYPNIK, D.; BOGDANSKI, P. The relation between osteoprotegerin, inflammatory processes and atherosclerosis in patients with metabolic syndrome. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 21, n. 19, p. 4379 - 4385, 2017.

MWANGI, T. K.; BOWLES, R. D.; TAINTER, D. M.; BELL, R. D.; KAPLAN, D. L.; SETTON, L. A. Synthesis and characterization of silk fibroin microparticles for intra-articular drug delivery. **International Journal of Pharmaceuticals**, v. 485, p. 7–14, 2015.

NARENDER, T.; REDDY, K. P. A simple and highly efficient method for the synthesis of chalcones by using borotrifluoride-etherate. **Tetrahedron Letters**, v. 48, n. 18, p. 3177-3180, 2007.

NI, L.; MENG, C. Q.; SIKORSKY, J. A. Recent advances in therapeutic chalcones. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 14, p. 1669 – 1691, 2004.

NIELSEN, S. F.; BOESEN, T.; LARSEN, M.; SCHØNNING, K.; KROMANN, H. Antibacterial chalcones - Bioisosteric replacement of the 4'-hydroxy group. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 3047–3054, 2004.

O'BRIEN, F. J. Biomaterials and *scaffolds* for tissue engineering. **Materials Today**, v. 14, n. 3, p. 88-95, 2011.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de toxicologia**. 3 ed. Editora Atheneu, 2008.

OLIVEIRA, O. R. G.; MARTINS, S. P. R.; LIMA, W. G.; GOMES, M. M. The use of bone morphogenetic proteins (BMP) and pseudarthrosis, a literature review. **Revista Brasileira de Ortopedia (English Edition)**, v. 52, n. 2, p. 124–140, 2017.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD) Guideline for the Testing of Chemicals, OECD 420. Acute Oral Toxicity Fixed Dose Procedure. **Organization for Economic Cooperation and Development**, Paris, 2001.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guideline for the testing of chemicals, OECD 420. Acute oral toxicity - Fixed dose method. Paris, **Organization for Economic Cooperation and Development**, Paris, 1992.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD) Guideline for the Testing of Chemicals, OECD 474. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. **Organization for Economic Cooperation and Development**, Paris, 1997.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guideline for the Testing of Chemicals, OECD 473. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. **Organization for Economic Cooperation and Development**, Paris, 1997.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD) Guideline for the Testing of Chemicals, OECD 407. Repeated Dose 28 Day Oral Toxicity Study in Rodents. **Organization for Economic Cooperation and Development**, Paris, 2008.

ORLIKOVA, B.; TASDEMIR, D.; GOLAIS, F.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Dietary chalcones with chemopreventive and chemotherapeutic potential. **Genes & Nutrition**, v. 6, p. 125–147, 2011.

ORTOLAN, X. R.; FENNER, B. P.; MEZADRI, T. J.; TAMES, D. R.; CORRÊA, R.; DE CAMPOS BUZZI, F. Osteogenic potential of a chalcone in a critical-size defect in rat calvaria bone. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 42, p. 520–524, 2014.

ORTOLAN, X. R.; MEZADRI, T. J.; TAMES, D. R.; CORRÊA, R.; DE CAMPOS BUZZI, F. Osteogenic potential of different chalcones in an in vivo model: A preliminary study. **Journal of Oral Research**, v. 6, p. 209–215, 2017.

ÖTVÖS, S. B.; HSIEH, C.T.; WU, Y. C.; LI, J. H.; CHANG, F. R.; FÜLÖP, F. Continuous-flow synthesis of deuterium-labeled antidiabetic chalcones: studies towards the selective deuteration of the alkenone core. **Molecules**, v. 21, n. 318, 2016.

OWEN, T. A.; ARONOW, M.; SHALHOUB, V., BARONE, L. M.; WILMING, L.; TASSINARI, M. S. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. **Journal of Cellular Physiology**, v. 143, p. 420–30, 1990.

ÖZASLAN, M. S.; DEMIR, Y.; ASLAN, H. E.; BEYDEMIR, S.; ÖMER, I. K. Evaluation of chalcones as inhibitors of glutathione S-transferase. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 32, n. 5, p. e 22047, 2018.

PALMA, P. J. R. **Estudo de novas formulações para regeneração óssea em defeitos de dimensão crítica**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, 2009.

PANDHURNEKAR, C. P.; MESHAM, E. M.; CHOPDE, H. N.; BATRA, R. J. Synthesis, characterization and biological activity of 4-(2-hydroxy-5-(aryl-diazenyl)phenyl)-6- (aryl)pyrimidin-2-ols derivatives. **Organic Chemistry International**, 2013.

PAGAN, A. L. **Preenchimento de falhas ósseas diafisárias em ovelhas com colágeno aniônico**. 2003. 75f. Dissertação (Pós Graduação em Ciências da Saúde). Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto. São José do Rio Preto, 2003.

PARK, S.; HYUN-A, H.; KWANG-BAE, L.; HAN-GOO, K.; SUNG-WOON, P. Improved bone regeneration with multiporous PLGA *scaffold* and BMP-2–transduced human adipose-derived stem cells by cell-permeable peptide. **Implant Dentistry**, v. 26, n. 1, p. 4–11, 2017.

PARNHAM, M. J.; WETZIG, H. Toxicity screening of liposomes. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 64, n. 1–3, p. 263–274, 1993.

PASSERINI, N.; ALBERTINI, B.; SABATINO, M. D.; CORACE, G.; LUPPI, B.; CANISTRO, D.; VIVARELLI, F.; CIRILLO, S.; SOLETI, A.; MERIZZI, G.; PAOLINI, M. Development of microparticles for oral administration of the non-conventional radical scavenger IAC and testing in an inflammatory rat model. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 512, p. 126–136, 2016.

PATEL, M.; FISHER, J. P. Biomaterial *Scaffolds* in Pediatric Tissue Engineering. **Pediatric Research**, v. 63, n. 5, p. 497–501, 2008.

PENNYPACKER, B.; SHEA, M.; LIU, Q.; MASARACHIA, P.; SAFTIG, P.; RODAN, S.; KIMMEL, D. Bone density, strength, and formation in adult cathepsin K (–/–) mice. **Bone**, v. 44, n. 2, p. 199–207, 2009.

PETROV, O.; IVANOVA, Y.; GEROVA, M. SOCl₂/EtOH: Catalytic system for synthesis of chalcones. **Catalysis Communications**, v. 9, n. 2, p. 315–316, 2008.

PODGORSKI, I.; LINEBAUGH, B. E.; KOBLINSKI, J. E.; RUDY, D. L.; HERROON, M. K.; OLIVE, M. B.; SLOANE, B. F. Bone marrow-derived cathepsin K cleaves SPARC in bone metastasis. **The American Journal of Pathology**, v. 175, p. 1255–1269, 2009.

POWELL, W. F.; BARRY, K. J.; TULUM, I.; KOBAYASHI, T.; HARRIS, S. E.; BRINGHURST, F. R.; PAJEVIC, P. D. Targeted ablation of the PTH/PTHrP receptor in osteocytes impairs bone structure and homeostatic calcemic responses. **Journal of Endocrinology**, v. 209, p. 21–32, 2011.

PUBCHEM, 2018. Acessado em: 15 de setembro de 2018.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/641819>.

QUINTANILLA-DIECK, M. J.; CODRIANSKI, K.; KEADY, M. Cathepsin K in melanoma invasion. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 128, p. 2281–2288, 2008.

RAIF, E. M.; HARMAND, M. F. Molecular interface characterization in human bone matrix. **Biomaterials**, v. 14, n.13, p. 978–984, 1993.

RAYNAL, C.; DELMAS, P. D.; CHENU, C. Bone sialoprotein stimulates in vitro bone resorption. **Endocrinology**, v. 137, p. 2347–2354, 1996.

RAMALHO, S. D.; BERNARDES, A.; DEMETRIUS, G.; NODA-PEREZ, C.; VIEIRA, P. C.; DOS SANTOS, C. Y.; DA SILVA, J. A.; DE MORAES, M. O.; MOUSINHO, K. C. Synthetic chalcone derivatives as inhibitors of cathepsins K and B, and their cytotoxic evaluation. **Chemistry & Biodiversity**, v. 10, p. 1999–2006, 2013.

RAMAZANI, F.; CHENA, W.; NOSTRUMA, C. F.; STORMA, G.; KIESSLINGB, F.; LAMMERSB, T.; HENNINKA, W. E.; KOK, R. J. Strategies for encapsulation of small hydrophilic and amphiphilic drugs in PLGA microspheres: State-of-the-art and challenges. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 499, p. 358–367, 2016.

RAMPA, A.; MONTANARI, S.; PRUCCOLI, L.; BARTOLINI, M.; FALCHI, F.; FEOLI, A.; CAVALLI, A.; BELLUTI, F.; GOBBI, S.; TAROZZI, A.; BISI, A. Chalcone-based carbamates for Alzheimer's disease treatment. **Future Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 8, p. 749–764, 2017.

RAMPA, A.; BARTOLINI, M.; PRUCCOLI, L.; NALDI, M.; IRIEPA, I.; MORALEDA, I.; BELLUTI, F.; GOBBI, S.; TAROZZI, A.; BISI, A. Exploiting the Chalcone *Scaffold* to Develop Multifunctional Agents for Alzheimer's Disease. **Molecules**, v. 23, n. 7, 1902, 2018.

RAO, Y. K.; KAO, T.Y.; Ko, J.L.; TZENG, Y.M. Chalcone HTMC causes in vitro selective cytotoxicity, cell-cycle G(1) phase arrest through p53-dependent pathway in human lung adenocarcinoma A549 cells, and in vivo tumor growth suppression. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 6508–6512, 2010.

RASHI, K. A.; MULLIN, C. A.; MUMMA, R. O. Structure-mutagenicity relationships of chalcones and their oxides in the Salmonella assay. **Mutation Research**, v. 169, p. 71-79, 1986.

RASSELET, D.; RUELLAN, A.; GUINAULT, A.; MIQUELARD-GARNIER, G.; SOLLOGOUB, C. Oxidative degradation of polylactide (PLA) and its effects on physical and mechanical properties. **European Polymer Journal**, Elsevier. v. 50, n. 1, p. 109-116, 2014.

RATH, N. C.; HUFF, G. R.; HUFF, E. W. BALOG, J. M. Factors regulating bone maturing and strenght in poultry. **Poultry Science**, v. 79, p. 1024-1032, 2000.

RAWAT, A.; BURGESS, D. J. Effect of physical ageing on the performance of dexamethasone loaded PLGA microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 415, p. 164–168, 2011.

REDDI, A. H.; MUTHUKUMARAN, N.; MA, S. Initiation of bone development by osteogenin and promotion by growth factors. **Connect Tissue Research**, v. 20, p. 303Y312, 1989.

REDDY, V. B. M.; TSAI, W. J.; QIAN, K.; LEE, K. H.; WU, T. S. Structure-activity relationships of chalcone analogs as potential inhibitors of ADP- and collagen-induced platelet aggregation. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 7711–7719, 2011.

REGHELLIN, D.; POLETTI, V.; TOMASSETT, S. Cathepsin-K is a sensitive immunohistochemical marker for detection of micro-granulomas in hypersensitivity pneumonitis. **Sarcoidosis Vasculitis and Diffuse Lung Disease**, v. 27, p. 57 - 63, 2010.

REIS, R. H. D.; PAULA, F. R.; MACHADO, M. M.; DUARTE, J. A.; OLIVEIRA, L. F. S.; PAIM, C. S.; MALESUIK, M. D. Stability Study of Finasteride: Stability-Indicating LC Method, In Silico and LC-ESI-MS Analysis of Major Degradation Product, and an *In Vitro* Biological Safety Study. **Journal of Chromatographic Science**, v. 56, p. 652-656, 2018.

RIBATTI, D.; NICO, B.; VACCA, A.; PRESTA, M. The gelatin sponge–chorioallantoic membrane assay. **Natural Protocols**, v. 1, p. 85–91, 2006.

RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. **Journal of Controlled Release**, v. 5, p. 23–36, 1987a.

RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solution release I. frickian and non-frickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. **Journal of Controlled Release**, v. 5, p. 23–36, 1987b.

RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. **Journal of Controlled Release**, v. 5, p. 37–42, 1987c.

RITTIÉ, L. Type I Collagen Purification from Rat Tail Tendons. **Methods in Molecular Biology**, p. 287–308, 2017.

RIVALS, I.; PERSONNAZ, L. MLPs (Mono-Layer Polynomials and Multi-Layer Perceptrons) for Nonlinear Modeling. **Journal of Machine Learning Research**, v. 3, p. 1383–1398, 2003.

ROACH, H. Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralisation and resorption. **Cell Biology International**, v. 18, n. 6, p. 617–628, 1994.

ROMANELLI, G.; PASQUALE, G.; SATHICQ, Á.; THOMAS, H.; AUTINO, J.; VÁZQUEZ, P. Synthesis of chalcones catalyzed by aminopropylated silica sol–gel under solvent-free conditions. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 340, n. 1-2, p. 24-32, 2011.

ROKICKI, G. Aliphatic cyclic carbonates and spiroorthocarbonates as monomers. **Progress in Polymer Science**, v. 25, p. 259–342, 2000.

ROSS, F. P. Ranking the importance of measles virus in Paget's disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 105, p. 5555-5558, 2000.

ROSSET, E. M.; BRADSHAW, A. D. SPARC/osteonectin in mineralized tissue. **Matrix biology: Journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 52-54, p. 78–87, 2016.

SATO, M.; TSUCHIYA, H.; MIYAZAKI, T.; FUJIWARA, S.; YAMAGUCHI, R.; KURESHIRO, H.; IINUMA, M. Antibacterial activity of hydroxychalcone against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Antimicrobiology Agents**, v. 6, p. 227–231, 1996.

SANTINONI, C. S.; OLIVEIRA, H. F. F.; BATISTA, V. E. S.; LEMOS, C. A. A.; VERRI, F. R. Influence of low-level laser therapy on the healing of human bone maxillofacial defects: A systematic review. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 169, p. 83–89, 2017.

SANTOS, A. B.; FERREIRA, V. P.; GROSSO, C. R. F. Microcapsulas: Uma alternativa viável. Microencapsulação de produtos sensíveis à oxidação óleo-resina de páprica. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 3, 16, p. 26-30, 2000.

SANTOS, L. **Síntese, caracterização e avaliação do potencial biológico de derivados obtidos a partir de chalconas**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.

SCHIEKER, M.; SEITZ, H.; DROSSE, I.; SEITZ, S.; MUTSCHLER, W. Biomaterials as *scaffolds* for bone tissue engineering. **European Journal of Trauma**, n. 2, p. 114-124, 2006.

SEBTI, S.; SOLHY, A.; TAHIR, R.; BOULAAJAJ, S.; MAYORAL, J. A.; FRAILE, J. M.; KOSSIR, A.; OUMIMOUN, H. Calcinated sodium nitrate/natural phosphate: an extremely active catalyst for the easy synthesis of chalcones in heterogeneous media. **Tetrahedron Letters**, v. 42, p. 7953-7955, 2001.

SERRANO, J.; ROMO, E.; BERMÚDEZ, M.; NARAYANAN, A. S.; DAVID, M. Z.; SANTOS, L.; ARZETE, H. Bone Regeneration in Rat Cranium Critical-Size Defects Induced by Cementum Protein 1 (CEMP1). **PLOS One**, v. 8, n. 11, p. e78807, 2013.

SHANG, S.; PLYMOTH, A.; GE, S.; FENG, Z.; ROSEN, H. R.; SANGRAJRANG, S.; BERETTA, L. Identification of osteopontin as a novel marker for early hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, v. 5, n. 2, p. 483–490, 2011.

SHARP, T. R. Calculated carbon-hydrogen bond dissociation enthalpies for predicting oxidative susceptibility of drug substance molecules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 418, p. 304-307, 2011.

SHEVDE, L. A.; SAMANT, R. S. Role of osteopontin in the pathophysiology of cancer. **Matrix Biology**, v. 37, p. 131-141, 2014.

SHI, L.; XIANGDONG, W. Role of osteopontin in lung cancer evolution and heterogeneity. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 64, p. 40-47, 2017.

SHIH, T. L.; LIU, M. H.; LI, C. W.; KUO, C. F. Halo-substituted chalcones and azachalcones inhibited lipopolysaccharide-stimulated pro-inflammatory responses through the TLR4-mediated pathway. **Molecules**, v. 23, n. 597, p. 1-15, 2018.

SHIMOKORIYAMA, M. In: **Flavanones chalcones and aurones**. Geissman, T. A. New York: MacMillan Company. p. 286-313, 1962.

SHOICHET, M.S. Polymer *Scaffolds* for Biomaterials Applications. **Macromolecules**, v. 43, p. 581-591, 2010.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2001.

SIMONET, W. S.; LACEY, D. L.; DUNSTAN, C. R. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. **Cell**, v. 89, p. 309-319, 1997.

SILVA, G.; FACHIN, A. L.; BELEBONI, R. O.; FRANÇA, A. C.; MARINS, M. *In Vitro* Action of Flavonoids in the Canine Malignant Histiocytic Cell Line DH82. **Molecules**, v. 18, p. 15448-15463, 2013.

SILVA, P. T.; FRIES, L. L. M.; MENEZES, C. R.; HOLKEM, A. T.; SCHWAN, C. L.; WIGMANN, É. F.; BASTOS, J. O.; SILVA, C. B. Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology. **Ciência Rural**, v. 44, n. 7, p. 1304-1311, 2014.

SINGH, M. N.; HEMANT, K. S. Y.; RAM, M.; SHIVAKIMAR, H. G.
Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery.
Research in Pharmaceutical Sciences, v. 5, n. 2, p. 65-77, 2010.

SMITH, L. A.; BECK, J. A. & MA, P. X. **Nano fibrous scaffolds and their biological effects**. In: KUMAR, C. Tissue Cell and Organ Engineering. p.195, 2006.

SPADACCIO, C.; CHELLO, M.; TROMBETTA, M.; RAINER, A.;
TOYODA, Y.; GENOVESE, J. A. Drug releasing systems in cardiovascular
tissue engineering. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 13, n. 3,
p. 422-439, 2009.

SPIELMANN H.; LIEBSCH, M. M.; MOLDNHAVER, F.; HOLZHUTTER,
H. G.; BAGLEY, D. M.; LIPMAN, J. M.; PAPE, W. J. W.;
MILTENBURGER, H.; DE SILVA, O.; HOFER, H.; STEILING, W. CAM
based assays. **Food Chemical Toxicology**, v. 35, p. 39-66. 1997.

SRIVASTAVA, Y.K. Ecofriendly Microwave Assisted Synthesis of Some
Chalcones. **Journal of Chemical Research**, v.1, n.4, p.884- 886, 2008.

STANLEY, O. A.; FLORENCE, C. N.; DAVID, D. A. Toxicity studies in rats
fed nature cure bitters. **African Journal of Biotechnology**, 4, p. 72- 78, 2005.

STEFFENSEN, B.; CHEN, Z.; PAL, S. Fragmentation of fibronectin by
inherent autolytic and matrix metalloproteinase activities. **Matrix Biology**, v.
30, p. 34Y- 42, 2011.

STOMPOR, M.; DANCEWICZ. K.; GABRYS', B.; ANIOT, M. Insect
Antifeedant Potential of Xanthohumol, Isoxanthohumol, and Their Derivatives.
Journal of Agriculture and Food Chemistry, v.63, p. 6749–6756, 2015.

SUAVE, J., DALL'AGNOL, E. C., PEZZIN, A. P. T., SILVA, D. A. K.,
MEIER, M. M., SOLDI, V. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas.
Revista Saúde e Ambiente / Health and Environment Journal, v. 7, n. 2, p. 12-
20, dez. 2006.

SURIYAMONGKOL, P.; WESELAKE, R.; NARINE, S.; MOLONEY, M.;
Shah, S. Biotechnological approaches for the production of
polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants – a review,
Biotechnology Advances, v. 25, p. 148–75, 2007.

SUZUKI, K.; ZHU, B.; RITTLING, S. R.; DENHARDT, D. T.; GOLDBERG, H. A.; MCCULLOCH, C. A. G.; SODEK, J. Colocalization of Intracellular Osteopontin With CD44 Is Associated With Migration, Cell Fusion, and Resorption in Osteoclasts. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 17, n. 8, p. 1486–1497, 2002.

SUWITO, H; MATUZAHROH, N.; KRISTANTI, A. N.; HAYATI, S.; DEWI, S. R.; AMALINA, I.; PUSPANINGSIH, N. N. T. Antimicrobial activities and in silico analysis of methoxy amino chalcone derivatives. **Procedia Chemistry**, v. 18, p. 103–111, 2016.

SZLISKA, E.; CZUBA, Z. P.; MAZUR, B.; PARADYSZ, A.; KROL, W. Chalcones and dihydrochalcones augment TRAIL-mediated apoptosis in prostate cancer cells. **Molecules**, v. 5, p. 5336–5353, 2010.

TABATA, K.; MOTANI, K.; TAKAUANAGI, N.; NISHIMURA, R.; ASAMI, S.; KIMURA, Y.; UKIYA, M.; HASEGAWA, D.; AKIHISA, T.; SUZUKI, T. Xanthoangelol, a major chalcone constituent of *Angelica keiskei* induces apoptosis in neuroblastoma and leukemia cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28; n. 8; p. 1404–1407, 2005.

TAKENAGA, M.; SERIZAWA, Y.; AZECHI, Y.; OCHIAI, A.; KOSAKA, Y.; IGARASHI, R.; MIZUSHIMAI, Y. Microparticle resins as a potential nasal drug delivery system for insulin. **Journal of Controlled Release**, v. 52, p. 81–87, 1998.

TAIPALE, J.; KESKI-OJA, J. Growth factors in the extracellular matrix. **FASEB Journal**, v. 11, p. 51Y59, 1997.

THAVORNYUTIKARN, B.; CHANTARAPANICH, N.; SITTHISERIPRATIP, K.; THOUAS, G. A.; CHEN, Q. Bone tissue engineering *scaffolding*: computer-aided *scaffolding* techniques. **Progress in Biomaterials**, v. 3, p. 61–102, 2014.

THEILL, L. E.; BOYLE, W. J.; PENNINGER, J. M. Rank-L and Rank: T cells, bone loss, and mammalian evolution. **Annual Review of Immunology**, v. 20, p. 795–823, 2002.

THIEN, D. V. H.; HSIAO, S. W.; HO, M. H.; LI, C. H.; SHIH, J. L. Electrospun chitosan/hydroxyapatite nanofibers for bone tissue engineering. **Journal of Materials Science**, v. 48, p. 1640–1645, 2013.

THOMPSON, R. C.; WAKE, M. C.; YASZEMSKI, & MIKOS, A. G. Biodegradable polymer *scaffolds* to regenerate organs. **Advances in Polymer Science**, v.122, n. 245-274, p.173-195, 1995a.

THOMPSON, R. C.; YASZEMSKI, M. J.; POWERS, J. M.; HARIGAN, T. P. & MIKOS, A. G. **Poly (a-hydroxy ester)/short fiber hydroxyapatite composite foams for orthopaedic applications**. In: MIKOS, A. G.; LEONG, K. W.; YASZEMSKI, M. J. *Polymers in Medicine and Pharmacy*, v.394, p.25-30, **Materials Research Society Symposium**, 1995b.

TOMAR, V.; BHATTACHARJEE, G.; KAMALUDDI, R. S.; SRIVASTAVA, K.; PURI, S. K. Synthesis of new chalcone derivatives containing acridinyl moiety with potential antimalarial activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 745–751, 2010.

TRAN, V. T.; BENOIT, J. P.; VENIER-JULIENNE, M. C. Why and how to prepare biodegradable, monodispersed, polymeric microparticles in the field of pharmacy? **International Journal of Pharmaceutics**, v. 407, p. 1–11, 2011.

TRAN, V. T.; KARAM, J. P.; GARRIC, X.; COUDANE, J.; BENOÎT, J. P.; MONTER-MENEI, C. N.; VENIER-JULIENNE, M. C. Protein-loaded PLGA-PEG-PLGA microspheres: A tool for cell therapy. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, p. 128–137, 2012.

TRIVEDI, J. C.; BARIWAL, J. B.; UPAGHYAY, K. D.; NALIAPARA, Y. T.; JOSHI, S. K.; PANNECOUQUE, C. C.; DE CLERCQ, E.; SHAH, A. K. Improved and rapid synthesis of new coumarinyl chalcone derivatives and their antiviral activity. **Tetrahedron Letters**, v. 48, p. 8472–8474, 2007.

TROEN, B. R. Osteoporosis in Older People: A Tale of Two Studies (and Three Treatments). **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 54, n. 5, p. 853–855, 2006.

VARMA, S.; ORGEL, J. P. R. O.; SCHIEBER, J. D. Nanomechanics of Type I Collagen. **Biophysical Journal**, v. 111, n. 1, p. 50–56, 2016.

VIEIRA, J. G. H. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia Metabólica**, v. 43, n. 6, 1999.

VIJAYA, B. R. M.; TSAI, W. J.; QIAN, K.; LEE, K. H.; WU, T. S. Structure-activity relationships of chalcone analogs as potential inhibitors of ADP- and collagen-induced platelet aggregation. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 7711–9, 2011.

VOGEL, S.; BARBIC, M.; JÜRGENLIEMK, G.; HEILMANN, J. Synthesis, cytotoxicity, anti-oxidative and anti-inflammatory activity of chalcones and influence of A-ring modifications on the pharmacological effect. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 2206–2213, 2010.

WAI, P. Y.; KUO, P. C. Osteopontin: regulation in tumor metastasis. **Cancer Metastasis Review**, v. 27, n. 1, p. 103–118, 2008.

WANG, Y.; YANG, X.; LIU, W.; ZHANG, F.; CAI, Q.; DENG, X. Controlled release behaviour of protein-loaded microparticles prepared via coaxial or emulsion electrospray, **Journal of Microencapsulation**, v. 30, n. 5, p. 490–497, 2013.

WANG, T.; YANG, X.; QI, X.; JIANG, C. Osteoinduction and proliferation of bone-marrow stromal cells in three-dimensional poly (ϵ -caprolactone)/hydroxyapatite/collagen *scaffolds*. **Journal of Translational Medicine**, v.13, n.152, p.1-11, 2015.

WANG, Y; NI, H. Fibronectin maintains the balance between hemostasis and thrombosis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 17, p. 3265–3277, 2016.

WEI, J.; KARSENTY, G. An overview of the metabolic functions of osteocalcin. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 16, n. 2, p. 93 –98, 2015.

WEI, Y.; WANG, Y.; KANG, A.; WANG, W.; HO, S. V.; GAO, J.; MA, G.; SU, Z. A novel sustained-release formulation of recombinant human growth hormone and its pharmacokinetic, pharmacodynamic and safety profiles. **Molecular Pharmaceutics**, v. 9, p. 2039–2048, 2012.

WENDLANDT, W. W. Thermal Analysis. Toronto: John Wiley & Sons, 3a Edição, p. 814, 1986.

WILLIAMS, D.F. **Definitions in biomaterials**, Elsevier: New York, 1987.

WINTER, E.; CHIARADIA, L. D.; SILVA, A. H.; NUNES, R. J.; YUNES, R. A.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Involvement of extrinsic and intrinsic apoptotic pathways together with endoplasmic reticulum stress in cell death induced by naphthylchalcones in a leukemic cell line: Advantages of multi-target action. **Toxicology In Vitro**, v. 28, p. 769–777, 2014.

WISCHKE, C.; ZHANG, Y.; MITTAL, S.; SCHWENDEMAN, S. P. Development of PLGA-based injectable delivery systems for hydrophobic renretinide. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 10, p. 2063–2074, 2010.

WU, L.; DING, J. In vitro degradation of three-dimensional porous poly (d,l-lactide-co- glycolide) *scaffolds* for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 25, p. 5821–5830, 2004.

WU, X. F.; NEUMANN, H.; SPANNENBERG, A.; SCHULZ, T.; JIAO, H.; BELLER, M. Development of a General Palladium-Catalyzed Carbonylative Heck Reaction of Aryl Halides. **Journal of American Chemical Society**, v. 132, p. 14596–14602, 2010.

XIANG, Z.; LIAO, R., KELLY, M. S. & SPECTOR, M. Collagen–GAG *scaffolds* grafted onto myocardial infarcts in a rat model: a delivery vehicle for mesenchymal stem cells, **Journal of Tissue Engineering**, v. 12, p. 2467–2478, 2006.

XU, S.; CHEN, M.; CHEN, W.; HUI, J.; JI, J.; HU, S.; ZHOU, J.; WANG, Y.; LIANG, G. Chemopreventive effect of chalcone derivative, L2H17, in colon cancer development. **BMC Cancer**, v. 15, n.870, 2015.

XU, K.; TIAN, X.; OH, S. Y.; MOVASSAGHI, M.; NABER, S. P.; KUPERWASSER, C.; BUCHSBAUM, R. J. The fibroblast Tiam1-osteopontin pathway modulates breast cancer invasion and metastasis. **Breast Cancer Research**, v. 18, n. 1, 2016.

XUE, S.; WANG, Y.; HAN, X.; YI, H.; JIANG, W.; SI, S.; LI, Z. Novel cathepsin K inhibitors block osteoclasts in vitro and increase spinal bone density in zebrafish. **RSC Advances**, v. 9, n. 15, p. 8600–8607, 2019.

YADAV, V. R.; PRASAD, S.; SUNG, B.; AGGARWAL, B. B. The role of chalcones in suppression of NF-kappaB-mediated inflammation and cancer. **International Immunopharmacology**, v. 11, p. 295–309, 2011.

YAMADA, S.; NAITO, Y.; TAKADA, M.; NAKAI, S.; HOSOMI, M. Photodegradation of hexachlorobenzene and theoretical prediction of its degradation pathways using quantum chemical calculation. **Chemosphere**, v. 70, p. 731–736, 2008.

YAMAUCHI, M.; SRICHOLPECH, M. Lysine post-translational modifications of collagen. **Essays in Biochemistry**, v. 52, p. 113–133, 2012.

YEO, Y.; PARK, K. Recent Advances in Microencapsulation Technology. **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**, p. 1-15, 2005.

YI, C.; HAO, K.-Y.; MA, T.; LIN, Y.; GE, X.-Y.; ZHANG, Y. Inhibition of cathepsin K promotes osseointegration of titanium implants in ovariectomised rats. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.

YOUNG, M. F. Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis. **Osteoporos International**, v. 14, n. 3, p. S35–S42, 2003.

YUN-SEOK, R.; CHUM-WOOG, P.; PATRICK, P. D.; HEIDI, M. M. Sustained- release injectable drug delivery: a review of current and future systems. **Pharmaceutical Technology**, p. 1–7, 2010.

ZANIVAN, D. S.; ELIAS, C. N.; DARÓZ, S. R. Análise da superfície de fratura de implante osseointegrado e mecanismos envolvidos na cicatrização. **Revista ImplantNews**, v. 6, n. 1, p. 39-46, 2009.

ZHANG, S. Fabrication of novel biomaterial through molecular self assembly. **Journal of Nature Biotechnology**, v. 21, p. 1171-1178, 2003.

ZHANG, S.; ZHAO, X. & SPIRIO, L. **Pura matrix: self assembling peptide nanofiber scaffolds**. In “*scaffolding in tissue Engineering* (P.X. Ma and J Elisseeff eds.) p. 217-236, 2006.

ZHANG, L.; LIU, M.; ZHOU, X.; LIU, Y.; JING, B.; WANG, X.; SUN, Y. Role of Osteoprotegerin (OPG) in Bone Marrow Adipogenesis. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 40, n. 3-4, p. 681–692, 2016.

ZHAO, L. M.; JIN, H. S.; SUN, L. P.; PIAO, H. R.; QUAN, Z. S. Synthesis and evaluation of antiplatelet activity of tryhydroxychalcone derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, p. 5027 – 5029, 2005.

ZHENG, W. A water-in-oil-in-oil-in-water (W/O/O/W) method for producing drug-releasing, double-walled microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 374, p. 90–95, 2009.

ZHUANG, C.; ZHANG, W.; SHENG, C.; ZHANG, W.; XING, C.; MIAO, Z. Chalcone: A Privileged Structure in Medicinal Chemistry. **Chemistry**, 2017.

ZVONAR, A.; BERGINC, K.; KRISTL, A.; GASPERLIN, M. Microencapsulation of self-microemulsifying system: Improving solubility and permeability of furosemide. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 388, p. 151–158, 2010.

ANEXO A - Protocolo de aceitação da Comissão de ética no uso de animais - CEUA.



PARECER COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UNIVALI

Protocolo: CEUA 046/17	Data: 01/09/2017
Título: CHALCONA (2E)-1-fenil-3-(4-metoxifenil)-2-propen-1-ona: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, ESTABILIDADE E DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA DE LIBERAÇÃO.	
Coordenador do Projeto: Prof. Dra. Tania Mari Bellé Bresolin;	
Executores: Mst. Danyela Francine Benvenuti	
Colaboradores: Prof. Dr. José Roberto Santin	
Objetivos	
<p>Objetivo Geral: Sintetizar e caracterizar físico-quimicamente e biologicamente a chalcona (2E)-1-fenil-3-(4-metoxifenil)-2-propen-1-ona (chalcona), analisar sua estabilidade e desenvolver um sistema de liberação do fármaco.</p> <p>Objetivos Específicos: - sintetizar e caracterizar a estrutura química da chalcona empregando métodos cromatográficos (CCD, CLAE) e espectroscópicos (UV, fragmentação de massas, FTIR); - analisar as propriedades físico-químicas da chalcona tais como solubilidade em diferentes solventes, comportamento térmico, morfologia (microscopia eletrônica e difração de raios X), presença de polimorfismo; - desenvolver metodologia analítica por CLAE indicativa de estabilidade da chalcona, analisando a estabilidade da chalcona em estudos de degradação forçada empregando ácido, álcali, agentes oxidantes, calor, umidade, radiação (UV e visível), metais e diferentes valores de pH, bem como em estudo de estabilidade acelerada e de longa duração; - analisar a citotoxicidade da chalcona; - desenvolver sistema de liberação do fármaco, monitorando o efeito osteogênico em modelos pré-clínicos; - analisar a biocompatibilidade do polímero utilizado.</p>	

I. RESUMO: Chalconas são cetonas α - β - insaturadas com dois anéis aromáticos, um ligado diretamente à função cetona (anel A) e outro à dupla ligação (anel B). Entre as atividades farmacológicas, atribuídas à presença desta insaturação na estrutura, estão as propriedades anti-inflamatórias, antinociceptivas, antitumorais, antivirais, antileishmania e osteogênica. Elas podem ser encontradas em produtos naturais sendo extraídas de plantas ou obtidas por síntese. O presente trabalho tem como objetivo sintetizar a chalcona (2E)-1-fenil-3-(4-metoxifenil)-2-propen-1-ona, por condensação aldólica de Claisen Schmidt a partir da acetofenona variando-se os benzaldeídos substituídos, sendo as reações monitoradas por CCD, caracterizar quimicamente, por meio de métodos espectroscópicos e cromatográficos, além de analisar suas propriedades físico-químicas como solubilidade, comportamento térmico, morfologia e cristalinidade. Visa também analisar sua estabilidade frente a diferentes solventes, valores de pH, calor, radiações (UV e visível), desenvolvendo e validando metodologia analítica indicativa de estabilidade do fármaco por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Assim como, desenvolver um sistema de liberação do fármaco, como scaffolds, visando a regeneração óssea e ainda, caracterizar a sua citotoxicidade e analisar a sua ação osteogênica assim como, a eficácia do sistema de liberação produzido em feridas críticas na calota craniana. Tais informações servirão de subsídio para o desenvolvimento de um sistema de liberação do fármaco promissor na terapia de regeneração óssea.

II. ANÁLISE:



- **Data de início e término: ADEQUADA.**

Início - 09/2017; Término - 03/2018.

- **Qualificação da equipe e treinamento: ADEQUADA.**

Orientadora do projeto não possui experiência prévia com o modelo animal ou metodologia proposta. A executora possui experiência prévia de um ano e o colaborador, experiência de 12 anos.

- **Justificativa do projeto: ADEQUADA.**

- **Detalhamento dos procedimentos experimentais: ADEQUADO.**

Procedimento cirúrgico: Feridas críticas em calota craniana - Os animais, sob condições estéreis do campo cirúrgico serão anestesiados com solução de cloridrato de cetamina (10%), xilazina (2%) e água destilada; aplicando-se 0,1ml/100g/p e tricotomizados manualmente na região da linha média da calota craniana, os planos cutâneo (pele e hipoderme) e periosteal serão rebatidos e entre as suturas interparietal e interocipital, com uma trefina cirúrgica de 5 mm de diâmetro, adaptada em peça de mão de baixa rotação e sob constante irrigação com soro fisiológico será removido um disco de tecido contendo as corticais ósseas e o osso esponjoso subjacente até a exposição da dura-máter. Após este procedimento a ferida será lavada com soro fisiológico e aplicado o tratamento contendo scaffolds sem a molécula para grupo controle e nos animais experimentais, após esta irrigação, será aplicado o tratamento com scaffolds contendo a molécula, (2E) 1-fenil-3-(4-metoxifenil)-2-propen-1-ona na concentração de 10%, concentração esta avaliada em estudos anteriores como sendo a mais eficaz (ORTOLAN et al., 2013). Em seguida, o periosteio será reposicionado e suturado, utilizando-se fio absorvível Catgut 5-0 simples (Polysuture®), seguindo-se a síntese dos tecidos moles com fio não absorvível 6-0 (Polysuture®). Para analgesia, será administrado por via subcutânea, cetoprofeno 1% (0,25 ml/100g) nas primeiras 72 horas, conforme as diretrizes da SBCAL (princípio do bem estar animal) (ORTOLAN et al., 2013).

Análise de Biocompatibilidade do Polímero: Serão utilizados 2 grupos para Branco e Tratamento contendo 5 animais cada, para análises nos tempos de 60 e 90 dias. Sob condições estéreis do campo cirúrgico serão anestesiados com solução de cloridrato de cetamina (10%), xilazina (2%) e água destilada; aplicando-se 0,1ml/100g/p e tricotomizados manualmente na região dorsal do animal, após higienização da área com álcool iodado, onde serão adicionados tubetes de polietileno contendo o polímero no seu interior puro e tubetes contendo polímero com chalcona no seu interior. Antes de serem adicionados na região dorsal do animal e preenchidos com as amostras, os tubetes serão higienizados com álcool e água purificada, e enxugados com gaze estéril. Em seguida será realizada a sutura da região, utilizando-se fio não absorvível 6-0 (Polysuture®). Para analgesia, será administrado por via subcutânea, cetoprofeno 1% (0,25 ml/100g) nas primeiras 72 horas, conforme as diretrizes da SBCAL (princípio do bem estar animal) (KOLOKURIS, et al., 1996). Após 60 e 90 dias os animais serão eutanasiados com sobredose anestésica seguida de perfusão intracardíaca de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 e os tubetes serão removidos para análises histológicas.

- **Condições de manutenção: ADEQUADAS.**

Caixas de polipropileno contendo maravalha, 5 animais por caixa. Os animais serão mantidos no laboratório 209 do setor F6 (Farmacologia). Serão utilizadas caixas de papelão e papel como enriquecimento ambiental.

- **Número de animais solicitados e planejamento estatístico: ADEQUADO.**



- Os resultados obtidos serão apresentados como as médias \pm erro padrão das médias de $n=10$ (ORTOLAN et al., 2013). A análise de variância (ANOVA) de uma via seguida por teste post hoc de Bonferroni será utilizada para avaliar os níveis de significância estatística entre os grupos. Seguido pelo teste de múltiplas comparações Student - Newman - Keuls, utilizando o programa para windows, GraphPadPrism versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego, EUA). Um valor de $p<0,05$ será considerado estatisticamente significativo e as lâminas analisadas qualitativamente em microscopia de luz transmitida, avaliando-se tipos celulares e teciduais na área de reparo das feridas. Os exemplares padronizados das áreas de reparo serão documentados com fotomicroscópio (BX50, Olympus, Tokio, Japão).
- Espécie, linhagem e sexo: ADEQUADA.**
Ratos, Wistar, fêmeas, 45 dias e 150-200g.

III. PARECER:

IV. REANÁLISE:

V. PARECER FINAL: APROVADO

<input checked="" type="checkbox"/> (X) Aprovado	<input type="checkbox"/> () Pendente	<input type="checkbox"/> () Não Aprovado
--	---------------------------------------	---

Telmo José Mezadri
Coordenador CEUA/UNIVALI



PARECER COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UNIVALI

Protocolo: 035/18p	Data: 01/10/2018
Título: Avaliação toxicológica in vivo, in vitro e in silico da chalcona 4-metoxi	
Coordenador do Projeto: Profa. Dra. José Roberto Santin.	
Executores: Mst. Danyela Francine Benvenuti.	
Colaboradores: Tania Mari Bellé Bresolin.	
Objetivos Objetivos Geral: Avaliar os possíveis efeitos toxicológicos crônico, mutagênico e citotóxico da chalcona 4-metoxi em camundongos, assim como sua toxicidade in silico.. Objetivos Específicos: <ul style="list-style-type: none"> • Avaliar os efeitos toxicológicos sub-crônicos da chalcona 4-metoxi utilizando o ensaio de doses repetidas (28 dias); • Verificar os efeitos da chalcona 4-metoxi sobre o ganho de peso no modelo de toxicidade sub-crônica; • Avaliar parâmetros hematológicos, bioquímicos, enzimáticos e renais no soro de animais submetidos ao ensaio de toxicidade aguda e sub-crônica; • Realizar a análise de peso relativo e absoluto dos órgãos (fígado, rins, baço, pulmões, coração e cérebro); • Avaliar o efeito mutagênico da chalcona 4-metoxi utilizando o ensaio micronúcleo; • Avaliar a citotoxicidade da chalcona 4-metoxi em células HepG2 (hepatócitos) utilizando o ensaio de MTT; • Quantificar a capacidade de hemólise da chalcona 4-metoxi; • Verificar a toxicidade da chalcona 4-metoxi utilizando o programa de toxicologia preditiva TEST. 	

I. RESUMO:

Chalconas são cetonas α - β - insaturadas com dois anéis aromáticos, um ligado diretamente à função cetona (anel A) e outro à dupla ligação (anel B). Entre as atividades farmacológicas, atribuídas à presença desta insaturação na estrutura, estão as propriedades anti-inflamatórias, antinociceptivas, antitumorais, antivirais, antileishmania e osteogênica. Elas podem ser encontradas em produtos naturais sendo extraídas de plantas ou obtidas por síntese. O presente trabalho tem como objetivo sintetizar a chalcona (2E)-1-fenil-3-(4-metoxifenil)-2-propen-1-ona, por condensação aldólica de Claisen Schmidt a partir da acetofenona variando-se os benzaldeídos substituídos, sendo as reações monitoradas por CCD, caracterizar quimicamente, por meio de métodos espectroscópicos e cromatográficos, além de analisar suas propriedades físico-químicas como solubilidade, comportamento térmico, morfologia e cristalinidade. Visa também analisar sua estabilidade frente a diferentes solventes, valores de pH, calor, radiações (UV e visível), desenvolvendo e validando metodologia analítica indicativa de estabilidade do fármaco por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Porém, para contribuir com o estabelecimento de um novo fármaco, faz-se necessário também estudar sua estabilidade em condições fisiológicas, de armazenamento e de processo, e conhecer a sua toxicidade, afim de assegurar o seu uso e estabelecer os limites de doses seguros para a sua utilização. Assim o objetivo do projeto será avaliar os possíveis efeitos toxicológicos crônico, mutagênico e citotóxico do Avaliação toxicológica in vivo, in vitro e in silico da chalcona 4-metoxi em camundongos e sua toxicidade in silico. Estes dados permitirão direcionar o desenvolvimento do sistema de liberação do fármaco em questão, almejando uma alternativa terapêutica para a regeneração óssea.

II. ANÁLISE:

- **Data de início e término:** 01/09/2018 à 31/12/2018 – ADEQUADO.
- **Qualificação da equipe e treinamento:** ADEQUADO.
- **Justificativa do projeto:** ADEQUADO.
- **Detalhamento dos procedimentos experimentais:** INADEQUADO – Verificar parecer.
- **Condições de manutenção:** ADEQUADO.
- **Número de animais solicitados e planejamento estatístico:** ADEQUADO.
- **Espécie, linhagem e sexo:** ADEQUADO.

III. PARECER: *Ad referendum*

- Faz-se necessário informar, de maneira clara e padronizada, o método de eutanásia dos animais ao longo do protocolo;
- Faz-se necessário deixar claro qual é o experimento 3, o qual não está inserido no item 9.1.

O detalhamento dos procedimentos experimentais apresenta as seguintes inconsistências:

- No item 11.3 observa-se a negativa para o uso de fármacos anestésicos, no entanto, no item 11.1 menciona-se que a eutanásia será realizada por deslocamento cervical em animais anestesiados. Além disso, no item 15.2 o método de eutanásia é discordante do indicado no item 11.1.
- Nos itens 11.6, 14 e 15.2 observa-se a menção de um experimento número 3, o qual não consta no item 9.1.

De acordo com todos os itens acima descritos, o projeto fica PENDENTE – *Ad referendum*, para que todos os pontos abordados sejam respondidos pelos autores do projeto.

IV. REANÁLISE:

Todos os itens acima foram devidamente corrigidos.

V. PARECER FINAL: APROVADO

David Til
Coordenador CEUA/UNIVALI