

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ESTUDO FÍSICO-QUÍMICO DO COMPLEXO DE
INCLUSÃO DO FÁRMACO TRIMETOPRIM COM A
 β CICLODEXTRINA ALEATORIAMENTE
METILADA**

São Cristóvão

2010

**ESTUDO FÍSICO-QUÍMICO DO COMPLEXO DE
INCLUSÃO DO FÁRMACO TRIMETOPRIM COM A
 β CICLODEXTRINA ALEATORIAMENTE
METILADA**

DANIELA KUBOTA

Dissertação apresentada ao
Núcleo de Pós-Graduação em
Química da Universidade
Federal de Sergipe como um dos
requisitos para a obtenção do
título de Mestre em Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Iara de Fátima Gimenez

São Cristóvão

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

Kubota, Daniela

K95e Estudo físico-químico do complexo de inclusão do fármaco trimetoprim com a β ciclodextrina aleatoriamente metilada / Daniela Kubota. – São Cristóvão, 2010.

83 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, Universidade Federal de Sergipe, 2010.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Iara de Fátima Gimenez

1. Ciclodextrinas. 2. Trimetoprim. 3. Farmacologia. 4. Físico-química. I. Título.

CDU 543.5:615

*Dedico este trabalho à Minha
Mãe Vera Lúcia que jamais
deixou de me incentivar nos
melhores e piores momentos que
a vida me propôs*

“Carpiem Diem”

Horácio

AGRADECIMENTOS

Agradeço de todo o meu coração à minha mãe. Sem ela jamais chegaria aonde cheguei. Sempre me incentivou, ouviu, corrigiu e nunca deixou a doçura que lhe é característica. A minha irmã Tati que sempre esteve presente nos momentos de dúvidas, angústias e desentendimentos, mas também dividiu comigo as alegrias, conquistas e realizações. Você é uma inspiração para mim!

Ao Prof. Dr. Luís Eduardo de Almeida (NMA-UFS) pelo carinho de ter me recebido no QUIBION. Jamais esquecerei isso.

À minha orientadora Profa. Dra. Iara de Fátima Gimenez, nunca esquecerei as palavras de incentivo, quando o desânimo esteve presente, ou tão pouco a disposição que sempre teve em me receber quando as dúvidas apareciam. Chegarei um dia a ser brilhante também!

À Dr^a Leila S. Conegero e ao Prof. Dr Italo O. Mazali (IQ- UNICAMP) pelos espectros de RMN.

Ao Prof.Dr.Sandro Navickiene pela gentileza e atenção com que me recebia nos momentos de dúvidas nos tramites burocráticos da pós-graduação.

À minha querida amiga Maricélia pelos longos anos de amizade e as conversas que tivemos sobre nossas carreiras profissionais. A minha amiga Daniele pelos momentos de desabafo e conquistas.

Ao colega de laboratório Fabiano que sempre esteve disposto a me ensinar sobre UV-vis e o fluorímetro. Ainda a Cris, Paulo, Ricardo e Liliane pelas conversas descontraídas no laboratório.

À Genelane e a Gabi pelas análises térmicas e DRX.

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

À CAPES pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

Lista de Figuras	Vi
Lista de Tabelas	Viii
Lista de Símbolos e Abreviações	iX
Lista de Esquemas	X
Capítulo I – Introdução	01
1 Ciclodextrinas	03
1.1 Histórico	04
1.1.2 Estrutura e Propriedades das CD's	04
1.1.3 Ciclodextrinas Modificadas	08
1.2 Complexos de inclusão	10
1.2.1 Métodos de obtenção dos complexos de inclusão	15
1.2.2 Detecção dos complexos de inclusão	16
1.2.2.1 Estudo do complexo em solução	16
1.2.2.2 Detecção do complexo em estado sólido	20
1.3 Trimetoprim	21
1.4 Aplicação das CD's na área farmacêutica	22
Capítulo II – Objetivos	28
1.1 Objetivo geral	28
1.2 Objetivos Específicos	28
Capítulo III – Materiais e Métodos	29
2.1 Materiais	29
2.2 Preparação das soluções tampões	29
2.3 Caracterização do complexo de inclusão TMP/RAMEB em solução	29
2.4 Absorção no UV-Vis	30
2.5 Determinação da solubilidade do TMP	31
2.6 Determinação dos parâmetros espectroscópicos (ϵ e λ_{max}) do TMP	32
2.7 Cinética de formação do complexo TMP/RAMEB	32
2.8 Estudo de solubilidade de fases a 25°C	32
2.9 Estudo de solubilidade de fases a 45°C	33
2.10 Determinação da estequiometria do complexo (Método das Variações Contínuas)	33

2.11 Preparação do complexo de inclusão TMP/RAMEB	33
2.12 Caracterização do complexo no estado sólido	34
2.13 Análise térmica	34
2.14 Difractometria de raios-X	34
2.15 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier	34
2.16 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear	34
Capítulo IV – Resultados e Discussões	35
3.1 Determinação da solubilidade do TMP	35
3.2 Determinação dos parâmetros espectroscópicos do TMP (ϵ e $\lambda_{\max}$)	36
3.3 Cinética de formação do complexo TMP/RAMEB	40
3.4 Diagrama de solubilidade de fases a 25°C	42
3.5 Diagrama de solubilidade de fases a 45°C	46
3.6 Espectroscopia de Fluorescência	48
3.6.1 Determinação da estequiometria do complexo (Método das Variações Contínuas)	49
3.7 Determinação das análises térmicas	50
3.7.1 Análises termogravimétricas (TGA)	50
3.7.2 Análise térmica diferencial (DTA)	52
3.8 Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	52
3.9 Difração de raios-X	54
3.10 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	56
Capítulo V – Conclusão	61
Conclusão	61
Capítulo VI – Bibliografia	62
Bibliografia	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ligação α - 1,4 entre as unidades de glicose	03
Figura 2 – Estrutura das α , β e γ – ciclodextrinas	03
Figura 3 – Estrutura da CD representação das características estruturais tronco-cônica	05
Figura 4 – Disposição das hidroxilas na estrutura da ciclodextrina	06
Figura 5 – Disposição da cavidade hidrofóbica e superfície lipofílica da CD	06
Figura 6 – Dimensões das CD's naturais (α , β , γ)	08
Figura 7 – Sítios de modificação frequentes na β -CD	09
Figura 8 – Representação esquemática da formação do complexo de inclusão entre o p-xileno e as moléculas de CD	12
Figura 9 – Principais tipos de complexos de inclusão	12
Figura 10 – Equilíbrio dinâmico estabelecido entre a CD e o fármaco	14
Figura 11 – Diagrama de solubilidade de fases, apresentando os perfis A e B	18
Figura 12 – Estrutura do TMP (2,4-diamino-5-(3,4,5 trimetoxilbenzil pirimetamina)	21
Figura 13 – Ação do complexo de inclusão CD-F em meio aquoso até a circulação sistêmica	26
Figura 14 – Espectro de absorção do UV-vis do TMP em água	36
Figura 15 – Curva de calibração do TMP em água	37
Figura 16 – Espectro de absorção do TMP em tampão acetato	37
Figura 17 – Curva de calibração do TMP em tampão acetato	38
Figura 18 – Espectro de absorção do UV-vis em tampão borato	38
Figura 19 – Curva de calibração do TMP em tampão borato	39
Figura 20 – Curva cinética de complexação do TMP em água	40
Figura 21 – Curva cinética de complexação do TMP em tampão acetato	41
Figura 22 – Curva cinética de complexação do TMP em tampão borato	41
Figura 23 – Isoterma de solubilidade do TMP/RAMEB em água -25°C	43
Figura 24 - Isoterma de solubilidade do TMP/RAMEB em pH 9- 25°C	43
Figura 25 - Isoterma de solubilidade do TMP/RAMEB em pH 4 -25°C	44
Figura 26 – Isoterma de solubilidade do TMP/RAMEB em água- 45°C	47
Figura 27 – Isoterma de solubilidade do TMP/RAMEB em pH 4- 45°C	47
Figura 28 – Isoterma de solubilidade do TMP/RAMEB em pH 9- 45°C	48

Figura 29 – Gráfico obtido pelo método de JOB do complexo TMP/RAMEB	49
Figura 30 – Curva termogravimétrica (TG) das espécies livres e do complexo	51
Figura 31 – Curva DTG das espécies livres e do complexo	51
Figura 32 – Curvas de DTA das espécies livres e do complexo	52
Figura 33 – Espectros de FTIR (a)RAMEB, (b)complexo,(c) TMP liofilizados	53
Figura 34 – Difrátogramas de raios-X (a)RAMEB,(b)complexo,(c)TMP lio	56
Figura 35 – Espectro de RMN ^1H do TMP em CD_3OD	57
Figura 36 – Deslocamentos do espectro do TMP de RMN ^1H em DMSO-d_6	57
Figura 37 – Estrutura da unidade de glicopirranose	58
Figura 38 – Espectro de RMN ^1H da RAMEB em CD_3OD	58
Figura 39 – Disposição dos H3 e H5 no interior da cavidade da CD	59
Figura 40 – Disposição das metilas Me2 e Me6 e H3 e H5	59
Figura 41 – Espetro RMN ^1H do complexo liofilizado	60

LISTA DE TABELAS

Tabela I – Propriedades físico-químicas da α , β e γ - ciclodextrina	07
Tabela II – Propriedades físico-químicas das CD's naturais e de alguns derivados metilados	09
Tabela III – Propriedades de algumas ciclodextrinas de interesse farmacêutico	10
Tabela IV – Medicamentos disponíveis que contêm CD's na formulação	25
Tabela V - Solubilidade do TMP nos diferentes meios	35
Tabela VI – Parâmetros espectroscópicos do TMP nas soluções tampão e em água	39
Tabela VII – Dados referentes a solubilidade do TMP nos diferentes meios, valor de K_S ($L.mol^{-1}$) e da eficiência de complexação (CE) e do perfil da isoterma 25°C	44
Tabela VIII – Dados referentes a solubilidade do TMP nos diferentes meios, valor de K_S ($L.mol^{-1}$) e da eficiência de complexação (CE) e do perfil da isoterma 45°C	48

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

CD – Ciclodextrina
αCD – <i>Alfa</i> - ciclodextrina
βCD – <i>Beta</i> - ciclodextrina
γCD – <i>Gama</i> – Ciclodextrina
CGtase – Enzima glicosiltransferase
K_C – Constante de Associação, Formação, Estabilidade
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
DRX – Difração de Raio – X
DSC – Calorimetria Diferencial de Varredura
TG – Análise Termogravimétrica
UV-Vis – Região espectral desde o ultra-violeta ao visível
S₀ – Solubilidade Intrínseca
S_p – Solubilidade do TMP em 1 mmol de RAMEB
RAMEB – Beta Ciclodextrina aleatoriamente Metilada
DMβCD – Dimetil Beta Ciclodextrina
TMβCD – Trimetil Beta Ciclodextrina
HPβCD – Hidroxipropil Beta Ciclodextrina
SBEβCD – Sulfobutilo-éter-beta-ciclodextrina
G₂βCD – Maltosil-Beta-Ciclodextrina
HPγCD – Hidroxipropil Gama Ciclodextrina
TMP – Trimetoprim
SMX – Sulfametoxazol
AIDS – Vírus da Imunodeficiência Humana
TGI – Trato Intestinal
BSC – Biopharmaceutical System Classification
ϵ – coeficiente de absorvidade molar
λ_{max} – comprimento de onda máximo
ν – frequência de luz absorvida
h – constante de Plack
E – Variação de energia
E_f - Energia final

E_0 – Energia inicial

P – intensidade da luz transmitida

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema I – Representação das etapas decorrentes entre a dissolução do fármaco no estado sólido no fluído TGI até absorção sistêmica. 24

Esquema II – Equilíbrio de associação e dissociação entre a CD e um fármaco básico. 45

RESUMO

Ciclodextrinas são conhecidas como bons solubilizantes para vários fármacos, pois aumentam a solubilidade dos mesmos, sendo por isso, incorporadas em formulações farmacêuticas. O presente trabalho teve por objetivo preparar e caracterizar complexos de inclusão entre um derivado metilado de ciclodextrina, a β -ciclodextrina aleatoriamente metilada (RAMEB) (*randomly methylated β -cyclodextrin*) e o fármaco Trimetoprim (TMP). Os complexos foram preparados pelo método da suspensão, sendo que o estudo da cinética de complexação do TMP na RAMEB foi importante para identificar o tempo necessário de formação deste complexo. Sendo este tempo de vinte quatro horas até o estabelecimento do equilíbrio. O complexo de inclusão no estado sólido foi caracterizado por TG, DSC, FTIR, DRX e espectroscopia de RMN ^1H , bidimensional (ROESY). Foram estabelecidos três meios para o estudo em solução: em água, em um meio ácido (pH 4) e um meio básico (pH 9). A ocorrência de inclusão nos estudos em solução foi evidenciada através do aumento da solubilidade do TMP em presença da RAMEB, descritos pelo diagrama de solubilidade de fases. Nestes, obteve-se um perfil do tipo A_L para o meio ácido, B_S em água e A_N para o meio básico, sendo que um perfil do tipo A_L demonstra um aumento da solubilidade do TMP em concentrações crescentes de RAMEB, fato que não ocorre para os outros perfis. Ainda, a partir destes estudos, um valor de $754,9\text{L.mol}^{-1}$ para a constante de associação do complexo em meio ácido foi obtido. Isso confirma que formação do complexo é mais pronunciada em meio ácido. A estequiometria de 1:1 para o complexo foi sugerida tanto a partir do diagrama de solubilidades quanto pelo método das variações contínuas. Evidências adicionais da inclusão foram propiciadas por análises termogravimétricas (TGA), onde foi observado um aumento de estabilidade térmica do fármaco quando encapsulado na ciclodextrina. Por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), foi possível determinar o modo de inclusão envolvido na formação do complexo, através da orientação do fármaco na cavidade da ciclodextrina. Por esse estudo fica evidenciado que o fármaco trimetoprim entra na cavidade maior da ciclodextrina e sua orientação é pelo o anel trimetoxifenil, pois foram encontradas correlações que indicam proximidade espacial dos átomos de hidrogênios deste grupo com átomos do interior da cavidade da CD.

Palavras Chaves: Complexo de Inclusão, Solubilidade, Trimetoprim

ABSTRACT

Cyclodextrins are well-known as good solubilizers for many drug molecules, since they are capable of increasing the solubility of the drugs by the formation of inclusion complexes, which in turn can be used in pharmaceutical formulations. In this work we aimed to prepare and characterize inclusion complexes of the randomly methylated β -cyclodextrin (RAMEB) and the antibiotic drug trimethoprim (TMP). The inclusion complex has been prepared by the suspension method and a kinetic study of the inclusion process allowed us to determine that a contact time of 24 hours is necessary for the equilibrium establishment. The inclusion complex in the solid state has been characterized by TG, DSC, FTIR, XRD, uni- and bidimensional ^1H NMR spectroscopy (ROESY). Three different media were chosen for the study of the solution behavior: water, acid (pH 4.0) and basic (pH 9.0). The occurrence of inclusion has been evidenced primarily by the increase of the solubility of TMP in the presence of RAMEB according to the phase-solubility diagrams. The phase-solubility diagram obtained in acid medium, water and basic medium exhibited respectively the characteristic A_L , B_S , A_N profiles. The A_L profile is related to linear increasing in the solubility with increasing CD concentration, in contrast to the other profiles. The phase-solubility diagrams also provide a means of determining the values of association constants, in the case of linear behavior. Here a value of $754,9 \text{ L.mol}^{-1}$ has been found for the formation in acid medium, indicating that formation of the complex is favored in this medium. A 1:1 stoichiometry was found for the inclusion complex both from the phase-solubility and from the Job Plot, as known as continuous variation method. Additional evidences of complexation were provided by TG analysis which showed an increasing of TMP stability when complexed to RAMEB. From NMR spectroscopy it was possible to evaluate the orientation adopted by drug molecules inside the RAMEB cavity. From this result, it became clear that TMP is included in the cavity through the trimethoxyphenyl ring, according to cross-peaks that indicate proximity in space between protons from this ring and protons from the RAMEB cavity.

CAPITULO I

INTRODUÇÃO

As ciclodextrinas (CD's) tem se tornado cada vez mais alvo de pesquisas científicas nas mais diversas áreas (VENTURINI *et.al*, 2008), sendo de grande importância para o segmento farmacológico. O principal interesse desta área em utilizar as CD's está na busca por novas formulações que resultem em preparações mais estáveis e melhoras terapêuticas.

Sendo assim, a incorporação das CD's em sistemas farmacêuticos constitui uma realidade consolidada, segundo estatísticas recentes, 515 princípios ativos já foram estudados em associação com ciclodextrinas (SZEJTLI, 2005). Mais de 30 medicamentos comercializados mundialmente já possuem CD's presentes em suas formulações (DAVIS e BREWSTER, 2004; LOFTSSON e DUCHETE, 2007). Como no caso de princípios largamente utilizados, como o antiinflamatório Piroxicam - β CD (Brexin[®]) (JESUS *et al*, 2006) e o protetor gástrico Omeprazol - β CD (Omebeta[®]) (FIGUEIRA *et al*, 2007), que tiveram seus efeitos colaterais minimizados após a utilização da β -CD como excipiente.

A complexação de ciclodextrinas com fármacos tem sido a aplicação mais estudada, pelo fato do encapsulamento molecular modificar consideravelmente as características físico-químicas do substrato. As mudanças resultantes melhoram ou diminuem algumas propriedades referentes aos substratos, dentre elas: mascaramento de odores e sabores, fixação de substâncias muito voláteis, estabilização de substâncias sensíveis à luz, calor e oxidação, proteção contra a degradação, diminuição da irritação gástrica e ocular (LOFTSSON e BREWSTER, 1996; VENTURINI *et al*, 2008), além de melhorar consideravelmente a biodisponibilidade, estabilidade e solubilidade dos fármacos complexados.

A consequência mais distinta da formação de complexos de inclusão com fármacos está no aumento da solubilidade, já que é ela que constitui requisito prévio à absorção e obtenção da resposta terapêutica, principalmente para medicamentos administrados por via oral (RAMA, VEIGA, FIGUEIREDO *et al*, 2006). Vários estudos

demonstram um aumento da solubilidade para fármacos pouco solúveis em água (MURA *et al*, 1998; ALUAS *et al*, 2007; MAESTRELLI *et al*, 2009).

O trimetoprim (TMP) é um agente antibacteriano pertencente à família dos 2,4-diamino-5-pirimidina com baixa solubilidade em água. Ele age inibindo a dihidrofolato redutase, tendo um tempo de meia vida de aproximadamente 10 horas. O TMP tem rápida e completa absorção na porção superior do trato gastrointestinal, sendo a excreção por secreção tubular renal, pela bile e urina. A eliminação pode ser prolongada no idoso e nos pacientes com problema renal grave (CLINICA MÉDICA). A associação do TMP com o sulfametoxazol (SMZ) é ativa contra a maioria das bactérias gram-positivas e gram-negativas, protozoários como *Pneumocystis carinii*, *Toxoplasma gondii* e *Isospora belli*, entre outros.

O presente trabalho vem contribuir com o estudo do complexo de inclusão do fármaco trimetoprim com a β ciclodextrina aleatoriamente metilada (RAMEB), através da análise do complexo em solução e no estado sólido.

1. CICLODEXTRINAS

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos, compostos por unidades de D-glicose, unidas através de ligações glicosídicas α -1,4 (Figura1) e obtidas a partir da degradação enzimática do amido pela ação da enzima glicosiltransferase (CGtase). A CGtase, que é obtida a partir do microorganismo *Bacillus macerans*, catalisa a formação de ligações α -1,4, promovendo a ciclização do amido, produzindo dessa forma uma mistura de ciclodextrinas (VETTER; THORN, 1992; STEJTLI, 1998).

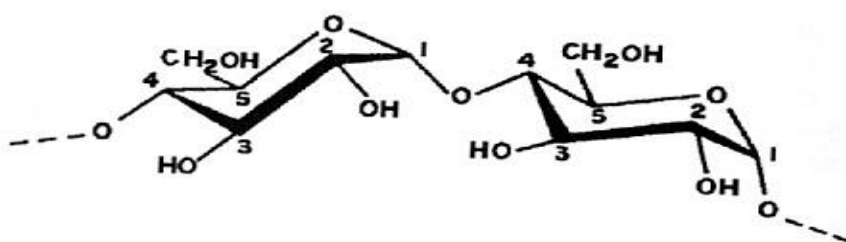


Figura 1 – Ligação α -1,4 entre as unidades de glicose (SILVA, 2006).

As CD's mais importantes são as de ocorrência natural, conhecidas como α , β e γ -CD's (Figura 2) que possuem respectivamente 6, 7 e 8 monômeros de glicose. São substâncias cristalinas, homogêneas e não-higroscópicas (STEJTLI, 1998).

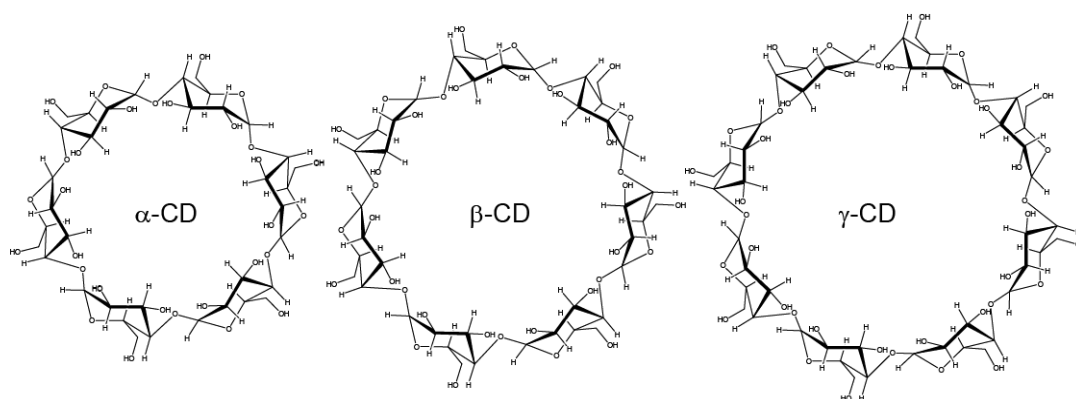


Figura 2 – Estruturas das α , β e γ ciclodextrinas (BUDAL, 2003).

1.1– HISTÓRICO

As ciclodextrinas foram descobertas por Villiers em 1891 (STEJTLI, 1998). Já por volta de 1904 Schardinger descreveu detalhes da sua preparação, caracterização, isolamento e a determinação das suas estruturas. Nos anos posteriores Freudenberg e French ampliaram os conhecimentos das CD's quanto à sua produção enzimática, fracionamento e a caracterização de suas propriedades (CONNORS, 1997). Cramer, Saenger e outros enfatizaram os estudos na formação de complexos de inclusão entre as CD's e moléculas hóspedes. Por volta de 1953 Freudenberg, French e Plieninger obtiveram uma patente, a qual tratava de uma das principais propriedades das ciclodextrinas: a formação de complexos de inclusão. Ela trazia aspectos como o aumento da solubilidade de fármacos pouco solúveis em água, proteção de substâncias que poderiam ser facilmente oxidadas e a redução da volatilidade de algumas substâncias (FERNANDES e VEIGA, 1999).

Por volta da metade da década de 70, as CD's naturais já haviam sido caracterizadas estrutural e quimicamente e muitos complexos tinham sido estudados. Desta forma, por apresentarem a capacidade de complexação, o baixo custo e outras vantagens, houve um grande progresso no desenvolvimento de novas tecnologias para sua produção e aplicação (CALDERINI, 2006).

1.1.2 - ESTRUTURA E PROPRIEDADES DAS CICLODEXTRINAS

A estrutura molecular das ciclodextrinas foi definida após estudos cristalográficos, pela técnica de difração de raios-X, apresentando a forma tronco - cônica (Figura 3) (SAENGER e LINDNER, 1982). Esta forma é devido à ausência de livre rotação das ligações glicosídicas e da conformação em cadeia da unidade de glicose (LOFTSSON E BREWSTER, 1996).

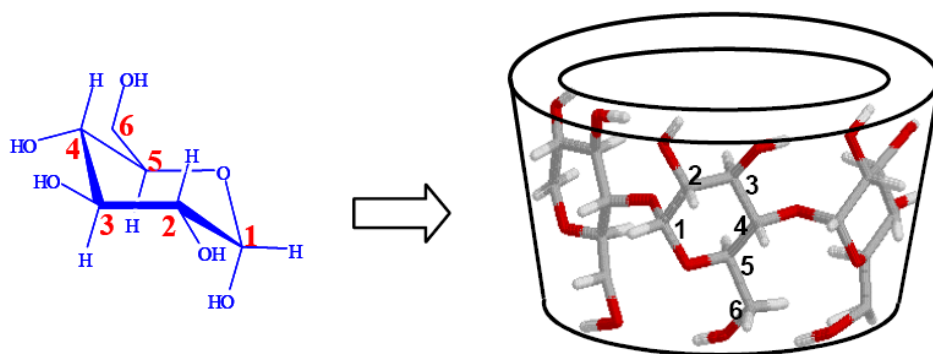
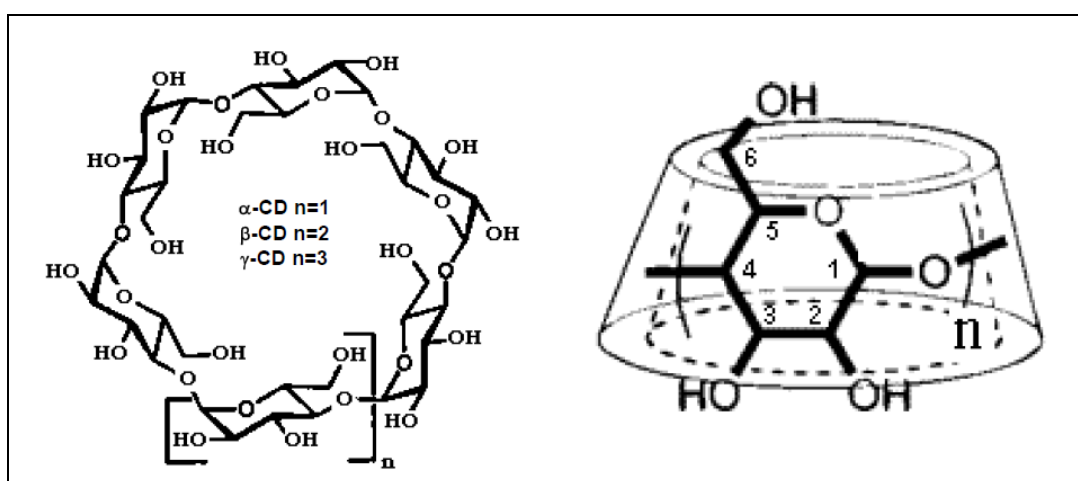


Figura 3 – Estrutura da ciclodextrina representação das características estruturais tronco-cônicas (BUDAL, 2003).

A estrutura descrita para as ciclodextrinas apresenta dois grupos hidroxílicos: os grupos hidroxílicos –OH secundários, que se encontram localizados na extremidade mais larga, estando ligados aos átomos de carbono C2 e C3, ao passo que os grupos hidroxílicos –OH primários se encontram na extremidade mais estreita e ligado aos carbonos C6 (Figura 4). Essa característica é devido à livre rotação dos grupos hidroxílicos primários que reduz o diâmetro efetivo da cavidade na respectiva face, enquanto o grupo de hidroxilas secundárias constitui uma cadeia relativamente rígida, por isso esta cavidade da CD é mais larga (BEKERS, UITENDAAL E BEIJNEN, 1991).



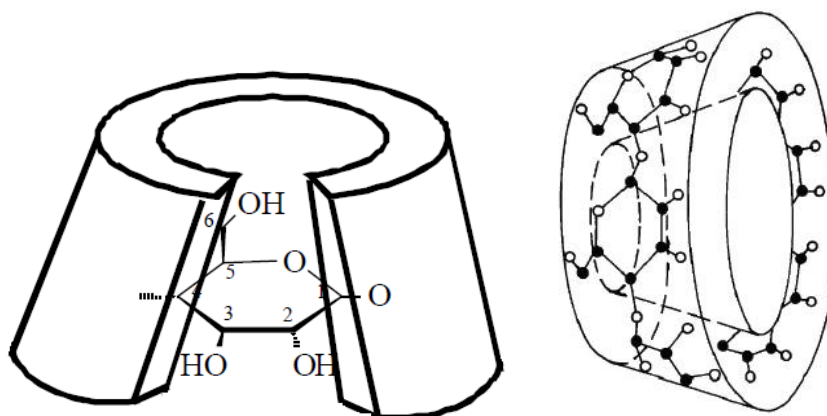


Figura 4- Disposição das hidroxilas na estrutura da CD (RIBEIRO, 2002, 2004).

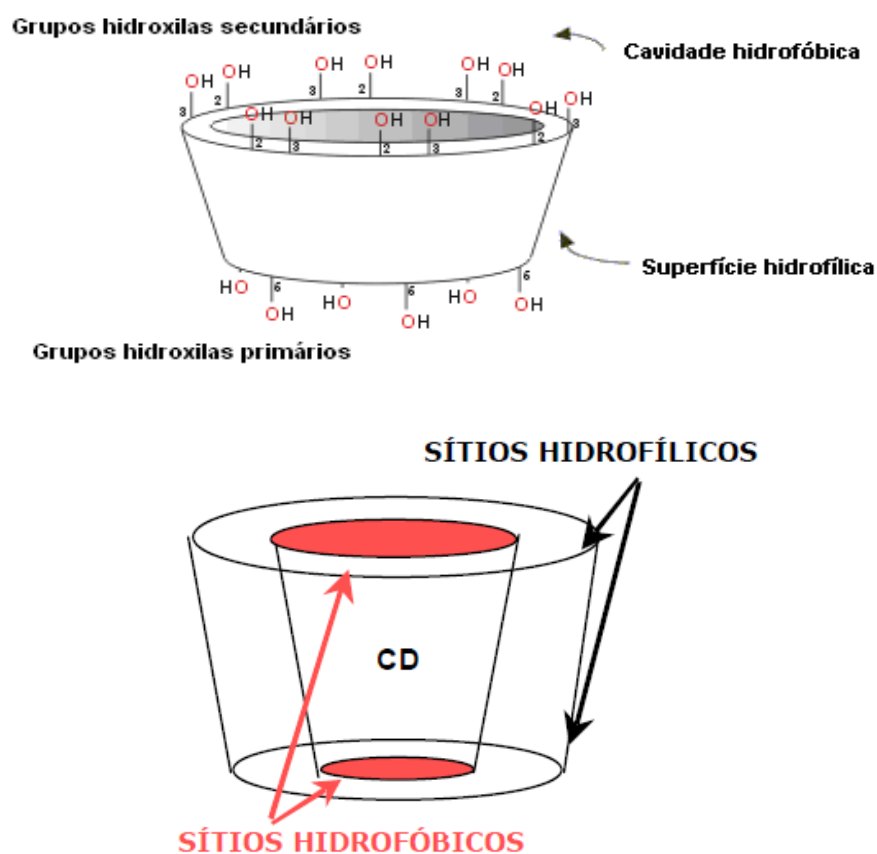


Figura 5 – Disposição da cavidade hidrofóbica e superfície hidrofílica da ciclodextrina (RIBEIRO, 2004 e CALDERINE, 2006).

A presença de grupos hidroxilas nas extremidades favorece a solubilidade das ciclodextrinas em água. O interior da cavidade é delineado pelos átomos de hidrogênio (H3 e H5) e pelas pontes de oxigênio glicosídicas. Os pares de elétrons não-ligantes do oxigênio estão voltados para o interior da cavidade, produzindo alta densidade eletrônica e resultando num ambiente com características de base de Lewis e um caráter extremamente hidrofóbico (BUDAL, 2003 e CALDERINI 2006). Já a disposição dos hidrogênios H1, H2 e H4 bem como dos grupos hidroxilas, voltados para o exterior da CD, torna a superfície externa hidrofílica (Figura 5) (VEIGA, PECORELLI e RIBEIRO, 2006).

As ligações de hidrogênio intramoleculares estabelecidas entre o grupo OH ligados aos carbonos C2 e C3 proporcionam estabilidade ao anel macrocíclico, a qual confere uma estrutura rígida às CD's, formando um cinturão secundário de pontes de hidrogênio e gerando uma estrutura rígida. Na β -CD todas as ligações de hidrogênio possíveis ocorrem e a rigidez do anel reduz a solubilidade aquosa da mesma. Na α -CD quatro das seis possíveis ligações de hidrogênio podem ocorrer devido a uma unidade de glicose estar em posição distorcida. A γ -CD possui uma estrutura não-coplanar, o que a torna a mais flexível e mais solúvel entre as três ciclodextrinas (VEIGA, PECORELLI e RIBEIRO, 2006).

Como mencionado anteriormente, as três principais ciclodextrinas diferem entre si pela quantidade de unidade de glicose e é essa diferença que confere a cada ciclodextrina propriedades físico-químicas particulares, as quais se encontram listadas na Tabela I e Figura 6.

TABELA I – Propriedades físico-químicas da α , β e γ ciclodextrina (VEIGA *et al*, 2006).

	α CD	β CD	γ cd
Unidade de glicose	6	7	8
Massa molar (g/mol)	972	1135	1297
Solubilidade aquosa (g/100mL a 25°C)	14,5	1,85	23,2
Diâmetro interno (Å)	4,7 – 5,3	6,0 – 6,5	7,5 – 8,3
Altura da estrutura (Å)	7,9 $\pm$ 0,1	7,9 $\pm$ 0,1	7,9 $\pm$ 0,1
Volume aproximado (Å) ³	174	262	427
pKa (25°C)	12,333	12,202	12,081

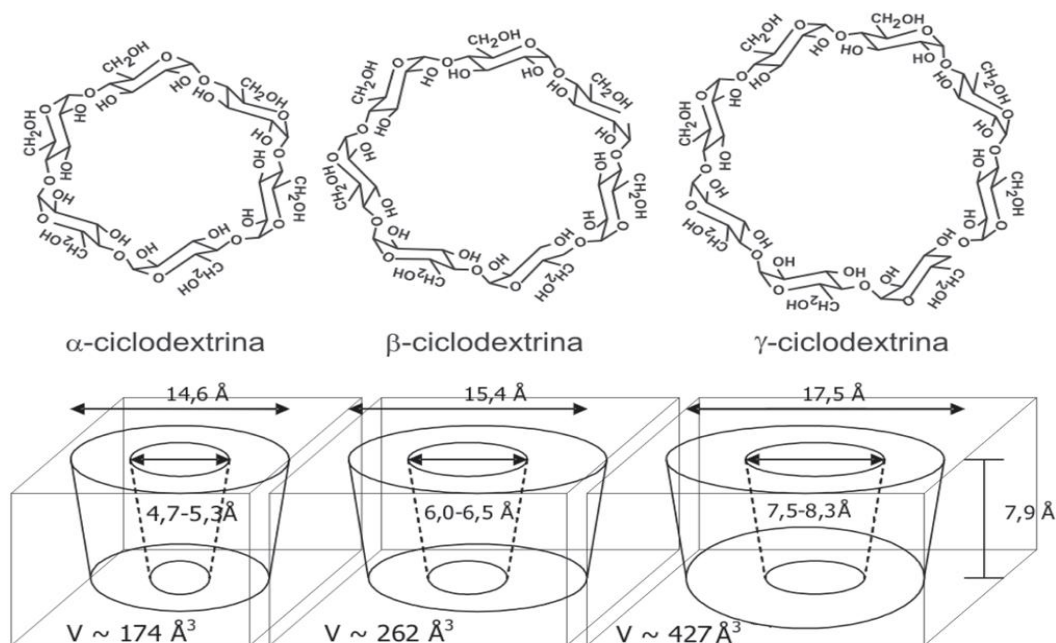


Figura 6 – Dimensões das ciclodextrinas naturais (α , β , γ) (VENTURINI, 2008)

1.1.3 CICLODEXTRINAS MODIFICADAS

A aplicação mais comum das ciclodextrinas na área farmacêutica é como solubilizante de fármacos, fator muito importante quando se trata de biodisponibilidade e determinante quanto à via de administração de fármacos. Como as ciclodextrinas naturais (α , β e γ – CD's) têm seus usos limitados, por apresentarem propriedades inapropriadas, como baixa solubilidade aquosa e toxidez, restringe-se a aplicabilidade destas principalmente como carregadores de fármacos. Desta forma, vários derivados de ciclodextrinas têm sido desenvolvidos, principalmente com base na β -CD, a fim de estender as propriedades físico-químicas, em especial ao aumento da solubilidade (BREWSTER e LOFTSSON, 2007).

As modificações na estrutura das ciclodextrinas geralmente são realizadas pela substituição dos grupos hidroxílicos primários e/ou secundários (Figura 7) por diversos grupos funcionais, sendo classificadas em derivados hidrofílicos (grupos metil e hidroxipropil), hidrofóbicos (grupos acetil e etil), anfifílicas (estruturas de micelas) e derivados iônicos (sulfobutilo-éter) (UEKAMA *et al*, 1998; VEIGA *et al*, 2006).

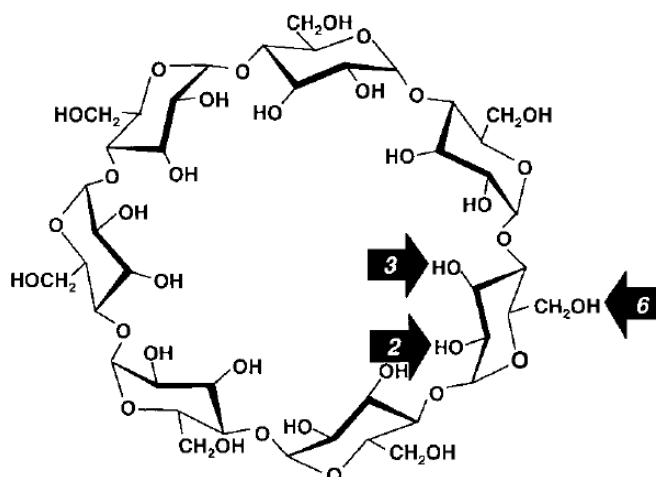


Figura 7 – Sítios de modificação freqüentes na β -cd (VEIGA *et al*, 2006).

Os derivados metilados

As propriedades físico-químicas das ciclodextrinas metiladas são bastante alteradas quando comparadas com a β CD, algumas das quais são apresentadas na Tabela II. Esses derivados são obtidos por metilação seletiva: como no caso da 2,6 di-*O*- metil- β CD conhecida por DM- β CD, onde a metilação ocorre C2 e C6; a 2,3,6 tri-*O*- metil- β CD conhecida por TM- β CD metilação ocorre C2, C3 e C6. Na derivada de β CD conhecida como RAMEB, a metilação ocorre de forma aleatória na posição C2, C3 ou C6 (VEIGA *et al*,2006).

Tabela II - Propriedades físico-químicas das CD's naturais e de alguns derivados metilados (BREWSTER e LOFTSSON, 2007)

Ciclodextrinas	Número de unidades de glicose	Massa Molar (Dalton)	Ponto de fusão (°C)	Solubilidade a 25°C (mg/mL)
α -CD	6	973	275	150
β -CD	7	1153	280	18,5
γ -CD	8	1297	275	230
DM β CD	7	1331	295-300	570
TM β CD	7	1430	157	310

A metilação no C2 e C6 favorece a cavidade hidrofóbica, o que confere a DM- β CD maior solubilidade em água. Além disso, os derivados metilados são mais solúveis em meio aquoso e em solventes orgânicos, sendo ainda menos higroscópicos. Esta

última característica é útil para complexos com fármacos sensíveis a umidade, mas faz com que sejam hidrolisadas em ácidos fortes, originando sistemas lineares (VEIGA *et al*, 2006).

A RAMEB

Dentre as CD's metiladas, a RAMEB é a mais viável comercialmente, pois mantém seu preço e qualidade constante. É um composto com grande solubilidade em água e elevada capacidade de formar complexos de inclusão com fármacos pouco solúveis.

Na Tabela III são apresentadas algumas propriedades dos principais derivados de ciclodextrinas de interesse farmacêutico. A solubilidade em água é um fator facilmente perceptível, quando comparamos com as demais CD's, com um aumento por volta de trinta vezes no caso da RAMEB, em comparação com a β -CD. Tal aspecto aparentemente está relacionado com a questão de este composto ser amorfo, em contradição com uma estrutura cristalina rígida da β -CD (MURA *et al*, 2003; LI *et al*, 2005).

Tabela III – Propriedades de algumas ciclodextrinas de interesse farmacêutico (BREWSTER e LOFTSSON, 2007)

Ciclodextrinas	N	R	Massa Molar (Dalton)	Solubilidade em água (mg/mL)
β -CD	1	H	1135	18,5
HP β CD	1	$\text{CH}_2\text{CHOHCH}_3$	1400	>600
SBE β CD	1	$(\text{CH}_2)_4\text{SO}_3\text{Na}^+$	2163	>500
RAMEB	1	CH_3	1312	>500
G $_2\beta$ CD	1	MALTOSI	1459	>1500
HP γ CD	2	$\text{CH}_2\text{CHOHCH}_3$	1576	>500

1.2 - COMPLEXOS DE INCLUSÃO

Devido à sua estrutura, as ciclodextrinas apresentam a habilidade de formar complexos de inclusão com uma variedade muito grande de substratos, tanto em

solução como em estado sólido (DEL VALLE, 2004). Esta característica tem levado a aplicação das CD's nas mais variadas áreas da indústria como: alimentos, farmacêutica, cosmética, biotecnologia, química analítica, agricultura e tecnologia ambiental.

Os complexos de inclusão formados entre as ciclodextrinas e fármacos (complexos F-CD) são do tipo *host-guest*, onde *host* vem do inglês hospedeiro e *guest* de hóspede ou também chamado de substrato. As moléculas hospedeiras ou também conhecidas como receptoras são as CD's e a hóspede ou substrato o fármaco (BUDAL, 2003; ARAÚJO, 2007).

A condição mínima requerida para a formação do complexo de inclusão está na compatibilidade geométrica entre a molécula receptora e o substrato. O tamanho e a geometria da molécula a ser incluída na CD devem ser adequados a cavidade apolar, pois dependendo da CD utilizada, a cavidade pode ser pequena ou grande demais para acomodação da substância hóspede. A α -CD por possuir uma cavidade pequena é utilizada na complexação de moléculas pequenas ou de cadeias laterais de moléculas grandes (por exemplo a prostaglandinas), enquanto a γ -CD para complexar moléculas grandes, como antibióticos macrolídeos e esteróides, e a β -CD sendo muito útil na complexação de moléculas que possuam pelo menos um anel aromático (LOFTSSON e BREWSTER, 1997).

Outra condição a ser observada é a polaridade da molécula hóspede, pois em geral moléculas hidrofóbicas têm maior afinidade pela cavidade apolar da ciclodextrina quando em solução aquosa (LOFTSSON e BREWSTER, 1997). Assim, a formação do complexo de inclusão está condicionada à estrutura e propriedades físico-químicas dos fármacos e das CD's.

Em solução aquosa, a cavidade hidrofóbica da ciclodextrina é preenchida por moléculas de água. A adição de moléculas hidrofóbicas, como fármacos, promove o deslocamento das moléculas de água, que se encontram originalmente no interior da cavidade da CD. Isto se dá, pois, devido ao microambiente termodinamicamente desfavorável (interação polar-apolar) da cavidade, as moléculas de água tendem a sair da cavidade da CD (Figura 8) (SZEJTLI, 1998), contribuindo também para um aumento da entropia. Esse processo leva a encapsulação total ou parcial da molécula hóspede na cavidade da CD (Figura 8), tornando-a solúvel em água.

A estequiometria desses complexos pode variar nas seguintes proporções: 1:1, 1:2, 2:1 e 2:2, mas de um modo geral a mais comum é formar complexos 1:1 (uma molécula de CD para uma molécula de fármaco), quando em solução aquosa. Uma

grande variedade de complexos de inclusão tem sido registrada e algumas formas estão representadas na Figura 9.

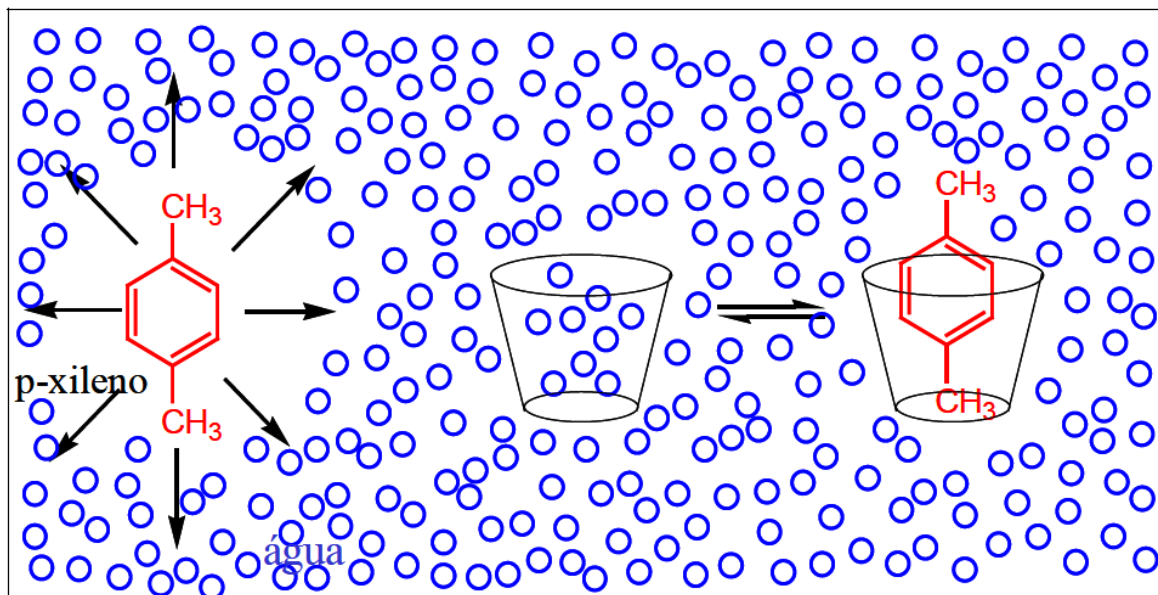


Figura 8 – Representação esquemática da formação de complexos de inclusão entre o p-xileno e a molécula de CD, em solução aquosa (RBEIRO, 2004).

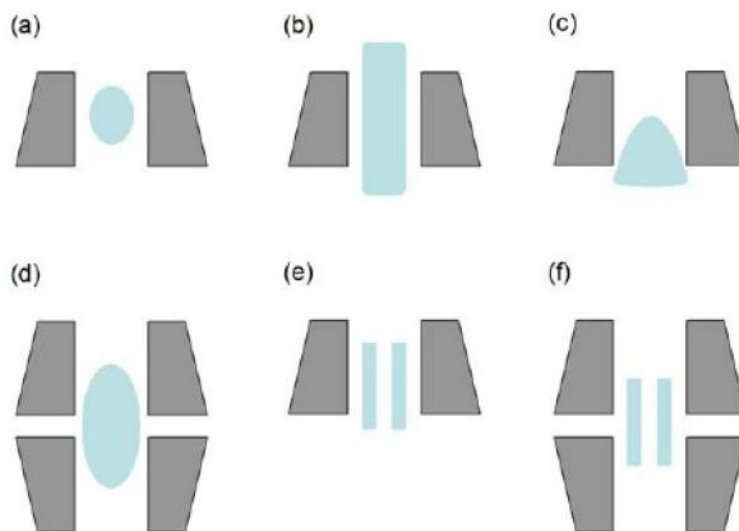


Figura 9 – Principais tipos de complexos de inclusão (CALDERINE, 2006).

onde:

- a) Completa: a molécula hospedeira entra totalmente na cavidade da CD (Figura 9a);
- b) Parcial: a molécula entra parcialmente na cavidade da CD (Figura 9c);

- c) Axial: a molécula é de tamanho longo e estreito e se estende através da CD (Figura 9b);
- d) Sanduíche: a molécula hóspede é muito grande e necessita de duas moléculas de CD para formar o complexo (Figura 9d);
- e) Complexos 1:2 (Figura 9e) e 2:2 (Figura 9f).

A extensão da complexação em meio aquoso é caracterizada pela constante de estabilidade K_C (também chamada formação ou associação) do complexo. Essa constante é diretamente proporcional ao grau de associação da molécula hóspede na cavidade da CD. Seu valor deve estar compreendido entre 50 e 2000 $L.mol^{-1}$, para que os complexos formados tenham aplicação prática, visto que complexos pouco estáveis liberam rapidamente a substância hóspede e os muito estáveis o liberam com dificuldade (PITHA apud VEIGA *et al*, 2006; BREWSTER e LOFTSSON, 2007).

A constante K_C é um parâmetro muito importante na avaliação da afinidade e do grau de ligação das moléculas encapsuladas na cavidade da CD. Um método freqüentemente utilizado para a determinação da constante é o diagrama de solubilidade de fases desenvolvido por Higuchi e Connors, 1965, que será descrito mais adiante.

A identificação do valor de K_C traz a informação sobre a estabilidade do complexo formado, mas além desse valor mensurável se faz necessário também a compreensão das interações envolvidas, pois são estas que proporcionam a estabilidade ao complexo formado.

As interações freqüentemente envolvidas são não-covalentes, que deriva de interações tais como:

- Ligação de hidrogênio, a qual envolve um átomo de hidrogênio ligado a um elemento eletronegativo. Geralmente, as ligações de hidrogênio entre o hóspede e a CD são provenientes dos grupos hidroxilas primários (C6 –OH) das CD's, que podem girar na ligação na ligação C(5)-C(6). Em contraste, as hidroxilas secundárias, ligadas aos carbonos C2 e C3, estão rigidamente ligadas. (INOUE, 1993)
- Interações eletrostáticas, que ocorrem quando duas moléculas de cargas opostas interagem. No caso das CDs, a interação envolvida durante a complexação é do tipo dipolo-dipolo.
- As forças de van der Waals, segundo Tabushi *et al* apud Venturini *et al* (2008), são responsáveis pela estabilização do complexo de inclusão, bem como pela remoção da água na cavidade da CD. A interação hidrofóbica é favorecida após a remoção da água

presente na cavidade da CD, o que promove a agregação de solutos não-polares em soluções aquosas (REKHARSKY e INOUE, 1998).

Todas estas interações podem ser consideradas relativamente “fracas”, mas proporcionam efeitos sinérgicos quando em conjunto. Desta forma, as moléculas interagem umas com as outras, resultando na formação de complexos com estabilidade suficiente para garantir seu isolamento (QUIÑONES, 2001)

Apesar de inúmeros esforços para compreender a formação de complexos de inclusão, o processo ainda não está totalmente esclarecido, uma vez que esse processo é extremamente complicado, mas considera-se que as principais forças que levam a complexação são as interações de van der Waals e hidrofóbicas.

Sobre o complexo formado, em solução aquosa, é estabelecido um equilíbrio dinâmico entre as moléculas de hospedeiro e convidado livres com o complexo (fármaco encapsulado na CD), pois essas moléculas associam-se e dissociam-se constantemente (Figura 10). Tal equilíbrio envolve um conjunto de espécies CD/hóspede com diferentes estequiometrias em proporções médias variáveis, sendo que a espécie que apresentar maior tempo de existência é referida como o complexo de inclusão (RAMA *et al*, 2005).

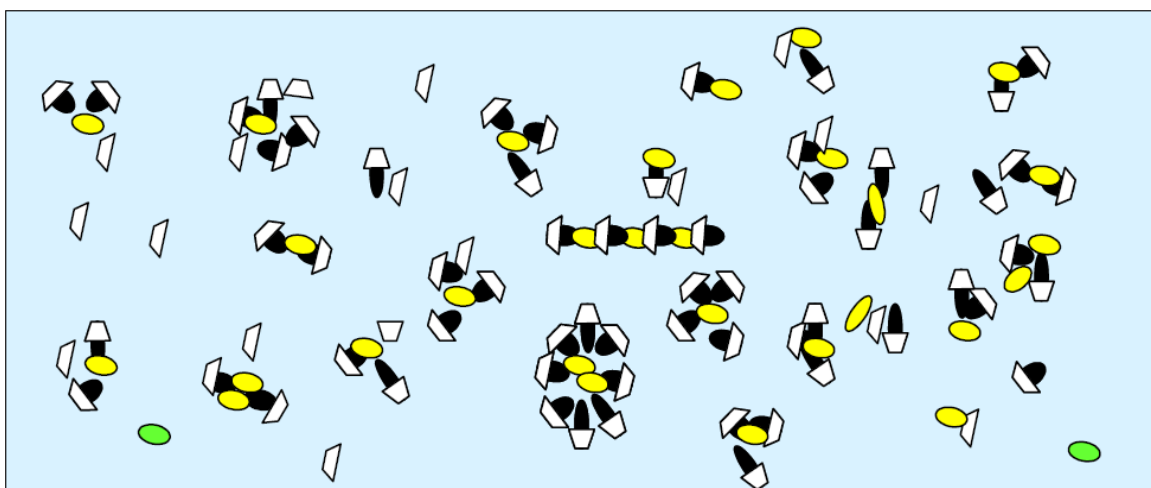


Figura 10 – Equilíbrio dinâmico estabelecido entre a CD e o Fármaco (LOFTSSON, 2004)

-  - Fármaco livre
-  - Fármaco não incluído no complexo
-  - Fármaco incluído no complexo
-  - Ciclodextrina livre
-  - Fármaco/CD complexo de inclusão

Os valores de K_C podem ainda ser afetados por diversos fatores experimentais, os quais vamos apenas abordar os seguintes (SHIMPI *et al*, 2005):

- a) mudanças de temperatura. A formação do complexo de inclusão é um processo exotérmico, assim sendo um aumento da temperatura não favorece sua formação e os valores de K_C , são afetados. Favorecendo apenas na dissociação do complexo.
- b) mudança de pH
- c) polaridade do solvente.

1.2.1 MÉTODOS DE OBTENÇÃO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO

Muitas técnicas são usadas para obter os complexos de inclusão, geralmente são simples e a escolha de uma delas depende da natureza do substrato. Os métodos mais utilizados na preparação dos complexos são descritos a seguir (UEKAMA *et al*, 1998; MARTINS, 2003; SHIMPI *et al*, 2005).

a) Co-precipitação – adiciona-se uma solução do convidado a uma solução aquosa de CD. Caso seja preciso utiliza-se um solvente diferente da água para solubilizar o co convidado. Deve-se escolher um solvente que seja miscível com água. A mistura é agitada até o equilíbrio e o complexo sólido obtido por evaporação a vácuo ou liofilizado.

b) Suspensão – o convidado sólido é adicionado a uma solução aquosa de CD formando uma suspensão que é agitada vigorosamente e filtrada. O complexo sólido, dissolvido no filtrado é coletado à vácuo ou liofilização.

c) Empastagem (*kneading*) – o convidado sólido é adicionado a uma mistura de CD com água, sendo utilizadas apenas 0,5 partes de água por parte de CD. O complexo sólido formado pode ser removido sob vácuo ou aquecimento.

d) Moagem conjunta (*grinding*) – misturam-se a CD e o convidado no estado sólido que são triturados vigorosamente por um determinado tempo na presença de uma pequena quantidade de água até que esta evapore durante a mistura.

1.2.2 DETECÇÃO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO

1.2.2.1 – Estudo do complexo em solução

A caracterização do complexo de inclusão em solução está baseada na determinação da constante de estabilidade, estequiometria do complexo e das interações presentes entre a ciclodextrina e o hóspede. São utilizadas as determinações relacionadas com mudanças espectrais, como no caso da espectroscopia por ultravioleta, fluorescência e ressonância magnética nuclear (RMN) (LOFTSSON, 1995).

a) Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A RMN tem sido a técnica que evidencia mais diretamente a formação do complexo de inclusão, portanto uma das mais importantes para a detecção do complexo. Através da observação das mudanças provocadas nos sinais de próton ^1H ou ^{13}C presentes na molécula da ciclodextrina e no hóspede (CONNORS, 1996). No caso de RMN de ^1H mudanças nos deslocamentos químicos dos prótons H3 e H5 da CD é o que proporcionam a informação sobre a formação do complexo, em especial nos espectros bidimensionais como NOESY e ROESY.

b) Espectroscopia de ultravioleta/visível (UV-vis)

A formação de complexos de inclusão altera significativamente as propriedades físico-químicas da molécula hóspede e essas alterações podem ser detectadas em seus espectros de UV/Vis, que são sensíveis até uma concentração de 10^{-5}mol.L^{-1} (KITAGAWA, 1988; STEJTIL, 1998).

A alteração geralmente é perceptível com alargamento, desvio batocrômico ou mesmo mudanças na intensidade do comprimento de onda máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) da banda, esses efeitos são similares aos causados por solventes diferentes. Essas modificações são causadas por perturbações nos níveis de energia dos elétrons de valência da molécula hóspede, resultantes da interação direta com a CD, pela expulsão das moléculas de água da cavidade ou por combinação dos dois efeitos (VEIGA *et al*, 2006; FRACETO *et al*, 2007).

c) Diagrama de solubilidade de fases

A aplicação mais importante das ciclodextrinas na área farmacêutica está no aumento da solubilidade do fármaco em meio aquoso devido à formação do complexo de inclusão. O diagrama de solubilidade de fase desenvolvido por Higuchi e Connors (1965) é habitualmente utilizado para a verificação da formação de complexos de inclusão. Este método baseia-se no monitoramento das alterações da solubilidade do substrato pela adição de quantidades crescentes de ciclodextrinas. Experimentalmente, um excesso do substrato é adicionado a soluções de mesmo volume, mas com concentrações crescentes de CD's (LOFTSSON e BREWSTER, 1997; UEKAMA *et al* 1998; VEIGA *et al*, 2006).

O diagrama nada mais consiste em um gráfico, onde é representada a solubilidade do substrato em função da concentração de CD, existindo dois tipos de perfis: A e B (Figura 11).

Diagramas do tipo A correspondem aos complexos solúveis, portanto observa-se incremento da solubilidade do fármaco com o aumento da concentração de CD. Podem ser de três tipos (LOFTSSON e BREWSTER, 1997):

- A_L, diagrama linear: a solubilidade do fármaco aumenta linearmente com o aumento da concentração da CD. Os diagramas lineares resultam de complexos de primeira ordem em relação a CD e ao F.
- A_P, diagrama com desvio positivo da linearidade: o complexo formado é de primeira ordem em relação ao fármaco e de segunda ou superior em relação à CD. Neste caso a solubilização é mais efetiva em concentrações elevadas de CD.
- A_N, diagrama com o desvio negativo: não possui interpretação generalizada, devido a interações complexas entre soluto-soluto e soluto-solvente, que dependem de cada caso.

Os diagramas do tipo B correspondem à formação de complexos com solubilidade limitada, observado frequentemente nos complexos com a β -CD, podendo ser de dois tipos:

- B_S, neste diagrama observa-se três pontos: primeiro existe um aumento da solubilidade, depois uma região de platô que é considerada a máxima solubilidade, e na terceira tem-se a precipitação do complexo insolúvel com o aumento da CD.
- B_I, refere-se a um complexo tão insolúvel que a possibilidade de aumento inicial na concentração do fármaco não é detectável.

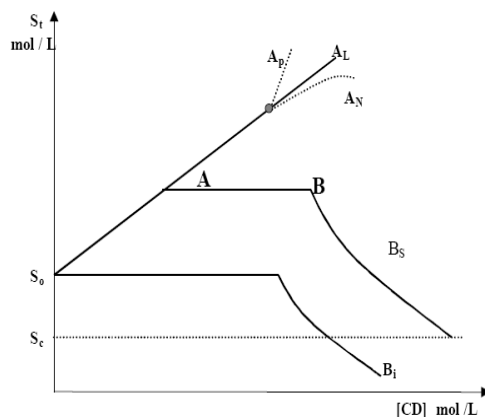
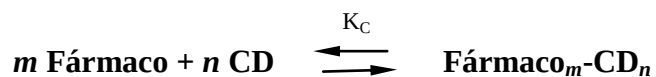


Figura 11 - Diagrama de solubilidade de fases, apresentando os perfis A e B (BUDAL, 2003).

A informação obtida pelos diagramas de solubilidade de fases permite fazer inferências sobre a estequiometria de inclusão e estimar o valor da constante de associação K_C . O valor de K_C é obtido pelo segmento linear dos diagramas observado nos perfis A_L , A_P e B_S .

Assumindo a formação de um complexo de estequiometria 1:1, ou seja, de primeira ordem para CD ($n=1$) e de primeira ordem para o fármaco ($m=1$), tem-se o seguinte equilíbrio estabelecido:



sendo o valor de K_C determinado pela equação 1:

$$K_c = \frac{[\text{Fármaco}_m\text{-CD}_n]}{[\text{Fármaco}]^m \cdot [\text{CD}]^n} \quad [1]$$

Assim, a solubilidade total do fármaco pode ser calculada por (LOFTSSON *et al*, 2004):

$$S_t = S_0 + m \times [\text{Fármaco}_m\text{-CD}_n] \quad [2]$$

$$S_t = \underbrace{S_0}_{\text{verde}} + \frac{K_C \times S_0}{1 + K_C \times S_0} \quad [\text{CD}]$$

[3]

Neste caso, S_t corresponde a solubilidade do fármaco livre e complexado, S_0 a solubilidade intrínseca do fármaco, $[\text{Fármaco}_m - \text{CD}_n]$ ao complexo de estequiometria 1:1 (onde m e n são iguais a 1).

A representação gráfica de S_t em função da concentração de CD é uma reta cuja ordenada é igual a S_0 e inclinação igual a $(K_C \times S_0) / (1 + K_C \times S_0)$. A constante de estabilidade pode ser facilmente deduzida a partir da inclinação e da ordenada na origem do segmento linear. Assim tem-se a equação 4, desenvolvida por Higuchi e Connors (1965):

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

[4]

d) Cinética de complexação

Um sistema reacional pode ter sua composição monitorada durante o avanço da reação, de modo que, sabendo-se de antemão a estequiometria da mesma, tenha-se acesso velocidade da reação (ATKINS e PAULA, 2002).

e) Método das Variações Contínuas (Job's plot) por espectrometria de fluorescência

O método das variações contínuas é baseado na variação de alguma propriedade do hóspede (Fármaco) na ausência e na presença de diferentes frações molares ciclodextrina. Tal propriedade deve ser sensível à formação do complexo de inclusão. De forma prática, misturam-se soluções aquosas equimolares do hóspede e da ciclodextrina nas razões molares (e volumes) 9:1, 8:2 e assim por diante, mantendo o

número de moles total e volume total constantes, o que faz com que a soma das concentrações das duas espécies também seja constante ($[hóspede]_t + [CD]_t = M$) e a razão ($r = [CD] / [CD] + [hóspede]$) varie de 0,1 a 1,0. Em grande parte dos estudos produzidos, o método de JOB tem sido feito por RMN 1H ou por espectroscopia de fluorescência e, só recentemente por UV-vis (LOUKAS, 1997; MELO *et al*, 2007).

1.2.2.2 Detecção do complexo em estado sólido

A formação dos complexos em solução não garante necessariamente seu isolamento no estado sólido. O produto sólido resultante pode ser apenas uma dispersão fina do hóspede e a CD ou uma mistura constituída pelo complexo de inclusão, fármaco não complexado e a CD sob a forma hidratada. Assim, a caracterização físico-química dos produtos resultantes no estado sólido, torna-se indispensável.

Várias técnicas têm sido relatadas para a detecção dos complexos em estado sólido, algumas delas serão relatadas a seguir.

A análise por difração de raios-X é empregada na detecção do complexo através da comparação dos difratogramas das substâncias puras e do complexo formado, onde o difratograma do complexo formado é claramente diferente daqueles dos componentes individuais (BUDAL, 2003), porém geralmente os complexos de inclusão apresentam estrutura amorfa (CONNORS, 1997; STEJTLI, 1998)

A análise térmica também é utilizada no estudo destes compostos. Cita-se a calorimetria diferencial de varredura (DSC), a termogravimetria (TG) e análise térmica diferencial (DTA). Estas técnicas descrevem o uso de metodologias analíticas que determinam as propriedades físicas e químicas de uma amostra, em função da temperatura ou tempo.

A variação do fluxo de calor ocorrido na exploração térmica da amostra demonstra eventos termodinâmicos importantes para os mais variados fins. Picos presentes em uma curva de DSC revelam a variação de entalpia (ΔH), associada a eventos como desidratação, fusão, recristalização e decomposição (BOLDRINI, 2003). A decomposição térmica dos compostos de inclusão é freqüentemente observada em temperatura acima da temperatura de decomposição da molécula não-complexada, o que evidencia um aumento de estabilidade a molécula hóspede quando complexada. Este aspecto é tomado como evidência da formação do complexo (CALDERINI, 2006).

A caracterização dos complexos de inclusão por espectroscopia na região do infravermelho (IV) é baseada nos deslocamentos que ocorrem nas bandas de absorção da CD, devido a interações entre grupos de átomos da molécula hóspede e da CD, e o espectro da própria molécula hóspede. Pode-se observar o deslocamento nos números de onda (ν) das bandas de absorção ou a variação e sobreposição de bandas, que é mais freqüente. No entanto, essa técnica não é a mais adequada como evidência conclusiva de complexação (MANOLIKAR e SAWANT, 2003; MURA *et al*, 2003; UEKAMA e OTAGIRI, 1987) .

1.3 O TRIMETOPRIM

Como já mencionado, o trimetoprim (TMP) (Figura 12) é um fármaco sintético pertencente à família dos 2,4-diaminopirimidina com baixa solubilidade em meio aquoso, aproximadamente $1,4 \text{ mmol L}^{-1}$ a 25°C (LI *et al*, 2005; LOFTSSON e HREINPÓTTIR, 2006). É um importante agente antibacteriano utilizado no tratamento de várias infecções. Como inibidor da diidrofolato redutase, tem uma afinidade por essa enzima bacteriana até 100.000 vezes maior do que pela enzima humana equivalente.

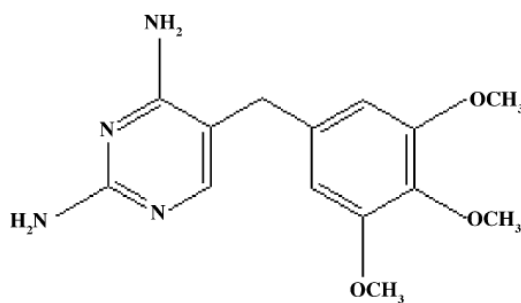


Figura 12 – Estrutura do trimetoprim (2,4-diamino-5-(3,4,5 trimetoxilbenzil) pirimetamina) (LI *et al*, 2005).

Farmacocinética

A absorção do TMP pelo organismo é rápida e completa na porção superior do trato gastrointestinal. A metabolização é renal com tempo de meia vida de

aproximadamente 10 horas. A excreção é aumentada com a acidificação da urina. Por secreção tubular renal, a excreção é de 60 a 80% dentro de 24 horas, o restante na forma de derivados pela urina, ocorrendo ainda excreção pela bile. A eliminação pode ser prolongada em pacientes idosos ou com comprometimento renal grave (CLINICA MÉDICA).

O TMP somente é comercializado no Brasil em associação com as sulfonamidas (sulfametoxazol e sulfadiazina) (CLINICA MÉDICA). Associação do sulfametoxazol (SMZ) com o TMP constitui importante avanço no desenvolvimento de fármacos antimicrobianos. Esta associação é utilizada no tratamento de infecções do trato respiratório superior e inferior, tais como: exacerbações agudas de quadros crônicos de bronquite, faringite, sinusite, otite média aguda. É também eficaz no tratamento de infecções do trato urinário e renal, infecções gastrointestinais e contra as microbactérias atípicas de protozoários como *Pneumocystis carinii*, *Toxoplasma gondii* e *Isospora belli* (QUINLIVAN *et al*, 1999; SILVA *et al* , 2007; ZAMORA *et al*, 2008; FLORES *et al*, 2009; CCS, 2010).

Doses elevadas dessa combinação SMZ/TMP têm sido utilizadas no tratamento e prevenção em pacientes que apresentam pneumonia por *Pneumocystis carinii*, principalmente em pacientes transplantados e com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Em crianças portadoras da AIDS e com mais de dois meses, é recomendado 15-20mg/kg por peso corporal ao dia de TMP. As reações adversas para o TMP/SMZ relatadas no caso das crianças: complicações gastrointestinais, hepatites, complicações renais etc. Os efeitos renais causados por doses agudas da associação TMP/SMZ foram relatados em trabalho de Monteiro *et al* (1997), onde em estudos com cães foi observado um aumento da excreção urinária de sódio por diminuição de suas respectivas reabsorções tubulares (MONTEIRO, CAMPOS e SEGURO, 1997).

1.4 APLICAÇÃO DAS CICLODEXTRINAS NA ÁREA FARMACÊUTICA

A capacidade das CD's em formarem complexos de inclusão com fármacos, tanto em estado sólido como em solução, coloca este composto com grande aplicabilidade na área farmacêutica. Como já relatado em tópicos anteriores, as propriedades físico-químicas dos fármacos são alteradas, proporcionado a estes melhores desempenhos ou reduzindo propriedades indesejáveis.

Os principais objetivos na utilização das CD's para administração via oral são (ABSBAHR, 2008):

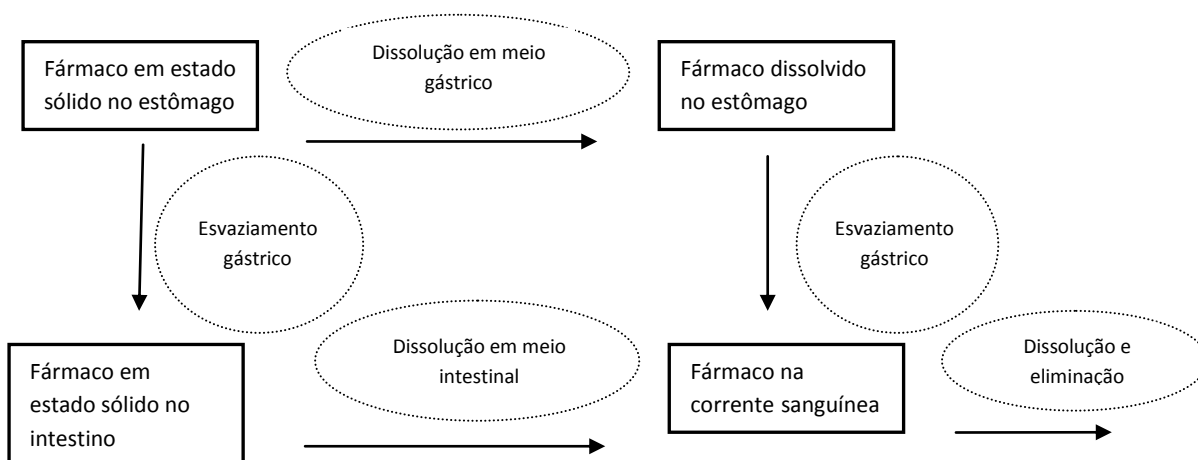
- ✓ incremento da solubilidade aquosa e biodisponibilidade, através do aumento da velocidade aparente e extensão da dissolução;
- ✓ melhoria das características físicas, para melhor homogeneização e compressão do fármaco sob a forma de comprimidos;
- ✓ aumento da estabilidade ou do tempo de liberação, durante o trânsito gastrointestinal, pela modificação do local e/ou perfil da taxa de liberação do fármaco;
- ✓ modificação dos parâmetros farmacocinéticos, implicando a melhoria da absorção dos níveis sanguíneos de fármacos pouco solúveis na água;
- ✓ diminuição da irritação dos tecidos, dos efeitos colaterais e das reações hemolíticas;
- ✓ mascaramento de odor e sabor desagradáveis;
- ✓ redução de incompatibilidade entre fármacos e outros constituintes presentes na formulação;
- ✓ obtenção de soluções aquosas estáveis de fármacos pouco solúveis em água, evitando, assim, o recurso à adição de solventes orgânicos.

Biodisponibilidade

A biodisponibilidade sistêmica consiste na quantidade de fármaco que chegou até a circulação sistêmica após a metabolização de primeira passagem, vale lembrar a diferença entre biodisponibilidade e absorção, onde esta última é a etapa de permeação do fármaco na mucosa do trato intestinal, quando ainda não está na circulação sistêmica (RAMA *et al*, 2006).

A via oral é a mais usada para a administração de fármacos, por questões de conveniência e/ou estabilidade, o que coloca as limitações de disponibilidade do fármaco no trato intestinal (TGI), uma vez que é a partir daí que ocorre todo o processo de dissolução e conseqüentemente absorção do fármaco pelo organismo. O esquema 1 ilustra todo o processo de dissolução do fármaco no TGI até a absorção sistêmica. A exemplo disso Veiga *et al* (2006) coloca que muitos fármacos apresentam problemas de biodisponibilidade devido a absorção ocorrer durante um período de tempo limitado

após a ingestão, assim o processo de dissolução no TGI acaba sendo limitado pelo tempo (AMIDON *et al*, 1995; RAMA *et al*, 2006; VEIGA *et al*, 2006).



Esquema I – Representação das etapas decorrentes entre a dissolução do fármaco no estado sólido no fluido do TGI até a absorção sistêmica (VEIGA *et al*, 2006).

A absorção dos fármacos no TGI é um processo bastante complexo, devido aos fenômenos que ocorrem no mesmo: como esvaziamento gástrico, permeabilidade, etc., além de outros fatores que influenciam na absorção, como as características físico-químicas do próprio fármaco, pKa, solubilidade, lipofilicidade, tamanho da partícula, etc. e questões como pH do meio (RAMA *et al*, 2006).

Estratégias para melhorarem a biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis têm colocado as ciclodextrinas, através de seus complexos de inclusão, como importantes excipientes, pois a utilização das CD's tem demonstrado um incremento considerável na solubilidade e dissolução dos fármacos (VEIGA *et al*, 2006).

Solubilidade

A solubilidade de um fármaco constitui requisito prévio à absorção e obtenção de resposta clínica, para a maioria dos medicamentos administrados por via oral. Segundo o sistema de classificação biofarmacêutica (*Biopharmaceutical Classification System – BSC*), os fármacos são distribuídos em quatro categorias, com base nas suas características de solubilidade e permeabilidade: classe I - elevada solubilidade e permeabilidade; classe II – baixa solubilidade e elevada permeabilidade; classe III –

elevada solubilidade e baixa permeabilidade; classe IV – baixa solubilidade e baixa permeabilidade. Atualmente 40% dos fármacos se encontram na classe II, caso do trimetoprim. Esta baixa solubilidade conduz a ineficiência de dissolução e conseqüentemente afeta diretamente na biodisponibilidade do fármaco (BUDAL, 2003; BREWSTER e LOFTSSON, 2007; MELO *et al*, 2007).

Desta forma, a utilização das ciclodextrinas como solubilizante de fármacos, tem contribuído significativamente no incremento da solubilidade aquosa, convertendo fármacos da classe II para a I, não afetando a permeabilidade nas membranas no TGI e adequada biodisponibilidade oral. Este é o caso de centenas de trabalhos e patentes publicadas ao longo dos anos, como do antiinflamatório piroxicam e o protetor gástrico omeprazol, que tiveram sua biodisponibilidade melhorada com a complexação com CD's (MELO *et al*, 2007). A Tabela IV traz algumas formulações farmacêuticas que contêm ciclodextrinas.

Tabela IV – Medicamentos disponíveis que contêm CD's na formulação

	Fármaco	Indicação	Formulação	Fabricante/País
βCD	Nimesulida	Antiinflamatório	Sachê oral	Novartis/Itália
	Omeprazol	Antiulcerogênico	Comprimido	Betapharm/Alemanha
	Piroxicam	Antiinflamatório	Comprimido/sachê/supositório	Masterpharma/Itália, Chiesi/Itália
RAMEB	17β-estradiol	Terapia hormonal	Spray nasal	Servier/França
	Cloranfenicol	Antibiótico	Colírio	Oftalder/Portugal
SBEβCD	Zipracidona	Antipsicótico	Solução parenteral	Pfizer/EUA
	Voriconazol	Antimicótico	Solução parenteral	Pfizer/EUA
HPβCD	Indometacina	Antiinflamatório	Colírio	Merk Sharp & Dohme/U.E
	Intraconazol	Antifúngico	Oral	Janssen/Bélgica
	Mitomicina	Antineoplástico	Solução parenteral	Novartis/Suíça
αCD	PGE ₁	Vasodilatador	Solução parenteral	Ono/Japan Schwarz pharma/Alemanha
	Cefotiam-hexatil	Antibiótico	Comprimido	Takeda/Japão
	3-metoxi-Limaprost	Vasodilatador	Comprimido	Ono/Japan, Dainippon Pharma/Japão
HPγCD	Diclofenaco sódico	Antiinflamatório/ analgésico	Colírio	Novartis/Suíça
	Tc-99 Teboroxime	Diadnóstico	Solução parenteral	Bracco/EUA

Sistemas de transporte e liberação controlada de fármacos

As estratégias de manipulação molecular e formação de derivados, além de melhorarem a questão da solubilidade, velocidade de dissolução e biodisponibilidade, proporcionam às ciclodextrinas outras aplicabilidades muito estudadas como: sistemas transportadores e liberadores de fármacos.

As CD's funcionam como transportadores, carregando as moléculas hidrofóbicas de fármaco (F-CD) em solução e liberando-o à superfície das membranas celulares lipofílicas, com a qual apresentam maior afinidade (Figura13). Isto implica em uma maior extensão com que os fármacos são absorvidos, o que pode levar a uma otimização da resposta terapêutica e minimização de efeitos colaterais (VEIGA, 2006).

Além do que foi descrito acima, pode-se ainda administrar/liberar o fármaco apenas no local onde se deseja que ele atue como somente no local afetado/doente, em concentração adequada e tempo certo. Estas características são típicas de um transportador/carregador de fármacos, que reduzem a quantidade a ser administrada, perda, degradação e ocorrência de efeitos diversos (UEKAMA e HIRAYAMA, 1998; CALDERINI, 2006).

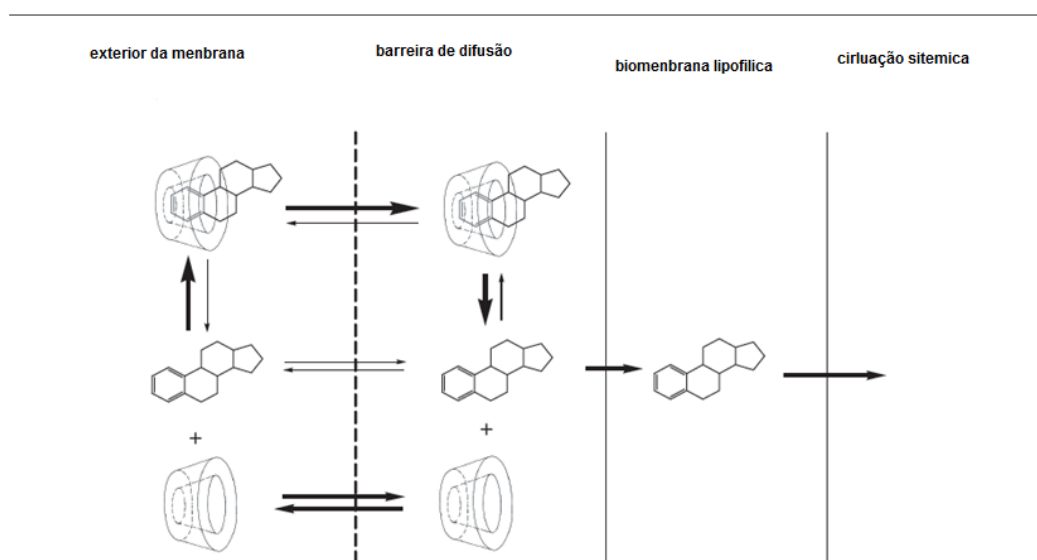


Figura 13 – Ação do complexo de inclusão F-CD em meio aquoso até a circulação sistêmica (Loftosson, 2005).

Geralmente o sistema de liberação controlada utiliza os derivados hidrofóbicos, onde estão inclusas as ciclodextrinas acetiladas e aciladas, cuja principal função é controlar a velocidade de dissolução dos fármacos. Esses derivados são pouco solúveis em água, sendo esta a característica principal de sua utilização (VEIGA *et al*, 2006; CALDERINI, 2006).

CAPÍTULO II

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral:

Este trabalho teve por finalidade preparar e caracterizar o complexo de inclusão entre a β -ciclodextrina aleatoriamente metilada (RAMEB) e o fármaco trimetoprim (TMP) visando a contribuir para a melhoria das propriedades terapêuticas do fármaco.

1.2 Objetivos Específicos:

- Preparar o complexo TMP/RAMEB pelo método de suspensão;
- Determinar a estequiometria do complexo utilizando o diagrama de solubilidade e o método das variações contínuas (método de JOB);
- Calcular a constante de estabilidade pelo método do diagrama de solubilidade;
- Estudar a partir do diagrama de solubilidade a variação da solubilidade do TMP em diferentes soluções tampão, bem como nas temperaturas ambiente e a 45°C, na presença da RAMEB.
- Caracterizar o TMP e RAMEB puros e o complexo formado utilizando técnicas de caracterização adequadas.

CAPITULO III

2 MATERIAS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Utilizaram-se amostras de:

- Trimetoprim (5-(3,4,5-trimetoxilbenzil)2,4-diaminopirimidina), marca SIGMA, 99,8 %, PM = 290,7 Dalton.
- B-ciclodextrina aleatoriamente metilada, marca SIGMA, 99,8%, PM = 1310 Dalton.
- Soluções tampões: acetato de sódio trihidratado, VETEC, 99,0% e tetraborato de sódio decahidratado, CROMOLINE, 99,5%. As soluções foram preparadas com água ultra pura (Purificador Aquapur, Permution).

2.2 Preparação das soluções tampões

As soluções tampões (acetato e borato) foram preparadas na concentração de 1×10^{-3} mol. L⁻¹, onde o pH foi ajustado em 4,0 para acetato e 9,0 para o borato.

2.3 Caracterização do complexo de inclusão TMP/RAMEB em solução

Aparelhos utilizados:

- a) Espectroscopia de absorção no UV:** as medidas espectrométricas foram realizadas na faixa de 200-400 nm com um aparelho UV-Vis Perkin Elmer Lambda 45.
- b) Fluorescência:** As medidas de emissão de fluorescência foram realizadas em um aparelho Perkin-Elmer LS 55 Luminescence Spectrometer.

2.4 Absorção UV-vis

As espécies químicas: átomos, íons ou moléculas podem existir somente em certos estados quantizados de energia. Quando é alterado o estado eletrônico de alguma espécie, esta absorve ou emite uma quantidade de energia exatamente igual à diferença de energia entre os estados. Essa é uma condição necessária para que a absorção da luz esteja relacionada com o comprimento de onda (λ) através da equação 5:

$$E = E_f - E_o = \frac{hc}{\lambda} \quad [5]$$

onde E_f e E_o são níveis de energia molecular nos estados eletrônicos final e inicial. Os termos c e h são a velocidade da luz no vácuo e a constante de Planck.

A espectroscopia de absorção molecular está baseada na medida da transmitância T ou absorbância A da luz incidente em soluções de analito (equações 6 e 7).

$$T = \frac{P_{\text{solução}}}{P_{\text{solvente}}} = \frac{P}{P_o} \quad [6]$$

$$A = \log \frac{P_{\text{solvente}}}{P_{\text{solução}}} = \log \frac{P_o}{P} \quad [7]$$

P_o e P são as intensidades de luz incidente e transmitida.

A lei de Beer relaciona diretamente a absorbância com a concentração e o caminho ótico. Assim tem-se a equação 8:

$$A = \log \frac{P_o}{P} = \epsilon bc \quad [8]$$

onde c e b são a concentração (mol.L^{-1}) e o caminho ótico (cm); ϵ é a constante de proporcionalidade, conhecida como coeficiente de extinção ou absortividade molar

(L.mol⁻¹.cm⁻¹). A absorbância e o coeficiente de extinção dependem do comprimento de onda da luz, isto é:

$$A(\lambda) = \epsilon bc \quad [9]$$

O coeficiente de extinção (ϵ), que caracteriza o processo de absorção, é uma medida empírica da fração da luz absorvida pela molécula, sendo característico de cada espécie. A absorção de radiações ultravioleta e visível geralmente resulta da excitação de elétrons de ligação em orbitais moleculares ligantes do tipo σ ou π ou de elétrons em orbitais não-compartilhados (designados n). Quatro tipos de transições são possíveis: $\sigma \rightarrow \sigma^*$, geralmente não é observada no espectro de UV-vis devido à alta energia a ela associada; $n \rightarrow \sigma^*$, necessita de menos energia, produzida por radiações entre 150-250 nm. As absorptividades molares associadas a esse tipo de absorção são pequenas, da magnitude intermediária e normalmente estão em torno de 10^{-3} L.cm⁻¹.mol⁻¹.

Para transições $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$, as energias necessárias situam-se em uma região espectral na faixa de 200 a 700nm. As transições $n \rightarrow \pi^*$ apresentam baixa absorptividade molar na faixa de 10 a 100 L.mol⁻¹.cm⁻¹ e as transições $\pi \rightarrow \pi^*$, de 1000 a 10000 L.mol⁻¹.cm⁻¹.

A lei de Beer apresenta desvios quando a concentração da amostra é relativamente alta, o que torna uma lei limite. A concentração do analito deve ser baixa (usualmente <0,01 mol.L⁻¹) (SKOOG, HOLLER, NIEMAN, 2002)

2.5 Determinação da solubilidade do TMP.

Utilizando massas conhecidas de TMP, determinou-se a solubilidade deste fármaco em temperatura ambiente e nos seguintes meios: meio aquoso e nas soluções tampões de acetato e borato. Em cada meio foram efetuadas sucessivas adições de volumes fixos, até a não visualização de partículas de fármaco. Em seguida, os espectros de varredura de absorção no UV foram obtidos na faixa de 200 a 400 nm. Após a obtenção do espectro, diluía-se a solução com o solvente ou com o tampão em estudo e, em seguida, nova varredura era efetuada. O processo de diluição foi repetido,

até que a diminuição da absorbância, em relação à concentração, estivesse de acordo com a lei de Beer (equação 9). (LAZÁRO, 2006)

2.6 Determinação dos parâmetros espectroscópicos (ϵ e $\lambda_{\text{máx}}$) do TMP

A partir de uma solução concentrada do TMP em cada meio: água e nos tampões acetato e borato, foram feitas diluições, e medidas suas absorbâncias para a determinação do ϵ , no comprimento de onda de máxima absorção - $\lambda_{\text{máx}}$. Assim as seguintes concentrações se estabeleceram para cada solução de TMP em tampão borato ($2,2 \times 10^{-5} - 1,4 \times 10^{-5}$) mol. L⁻¹, acetato ($4,0 \times 10^{-5} - 2,4 \times 10^{-4}$) mol.L⁻¹ e em água ($1,0 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-4}$) mol.L⁻¹. Os valores de absorbância no comprimento de onda máximo de absorção nos respectivos tampões e água foram medidos. O ϵ foi obtido utilizando a Lei de Beer (equação 9), onde foram obtidas as curvas de calibração.

2.7 Cinética de formação do complexo TMP/RAMEB

Para avaliação da cinética de formação do complexo, quantidades apropriadas de TMP e RAMEB (razão molar de 1:1) foram misturadas em água, tampão acetato (pH 4) e tampão borato (pH 9), em temperatura ambiente. As amostras ficaram sob análise em um aparelho de UV durante um período de 30 horas, onde a leitura era feita de 10 em 10 minutos, no comprimento de onda de absorção máxima em cada meio até que fosse atingido o equilíbrio. As análises foram feitas em duplicata.

2.8 Estudo da solubilidade de fases a 25°C

O estudo de solubilidade de fases foi feito em meio aquoso e nas soluções tampões. Para isto, um volume total de 10 mL foi agitado com concentrações crescentes de RAMEB (0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 1,0 mM), adicionando-se a essas soluções uma massa fixa do fármaco (80×10^{-2} g). As suspensões resultantes foram submetidas à agitação constante e à temperatura ambiente por 24 h, sendo este tempo estabelecido no ensaio de cinética de complexação, e em seguida, filtradas em membrana de 0,45 μm . As

concentrações de TMP foram determinadas por espectroscopia de absorção no UV utilizando a equação 9. Para tanto, utilizou-se as absorvidades molares (ϵ), determinadas experimentalmente, e as solubilidades intrínsecas (S_0) das moléculas estudadas nos meios estabelecidos. As análises foram feitas em triplicata.

2.9 Determinação da solubilidade de fases a 45°C

A mesma metodologia foi adotada para a realização deste ensaio, porém na temperatura de 45°C.

2.10 Determinação da estequiometria do complexo (Método das Variações Contínuas)

Um meio seguro para a determinação da estequiometria do complexo é o método das variações contínuas (método de Job), que é baseado na variação de alguma propriedade físico-química diretamente dependente da formação do complexo. Para este estudo, foi medida a variação na intensidade de fluorescência, cujo valor máximo deve ser obtido para estequiometria ótima. Para isto, soluções equimolares, $2,2 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹, de TMP e da RAMEB foram preparadas e, a partir de misturas dessas soluções, outras soluções foram feitas mantendo-se um volume final constante de 10 mL, e variando a razão da concentração TMP:RAMEB (0,1;0,3;0,4;0,5;0,6;0,8 e 0,9). A mesma série de diluições foi feita, nas mesmas condições, para o TMP em tampão acetato. As soluções ficaram sob agitação por 24 h em temperatura ambiente, efetuando-se posteriormente a este período de tempo medidas de fluorescência das soluções com excitação em 281 nm. A análise foi realizada em triplicata

2.11 Preparação do complexo de inclusão TMP/RAMEB

O complexo de inclusão foi preparado a partir do método de suspensão. A molécula a ser encapsulada (TMP) foi adicionada, no estado sólido, a uma solução aquosa de RAMEB na proporção molar de 1:1 (TMP/RAMEB) e, em seguida, a mistura

foi agitada magneticamente por 24h, à temperatura ambiente e sob o abrigo da luz. Posteriormente a suspensão foi centrifugada e o sobrenadante filtrado em membrana 0,45 μm . Para a coleta do complexo sólido, este foi liofilizado utilizando-se um liofilizador Terroni.

2.12 Caracterização do complexo TMP/RAMEB no estado sólido

O complexo sólido foi caracterizado pelas seguintes técnicas:

2.13 Análise térmica: as análises termogravimétricas (TG) foram realizadas em um equipamento TA Instruments modelo 2960, com taxa de aquecimento 10°C/mim, sob fluxo de 100 mL/mim de N₂, em porta amostra de platina.

2.14 Difractometria de raios-X: os difratogramas de raios-X foram obtidos em um difratômetro Rigaku, com velocidade de varredura de 2°/minuto em 2 θ , fonte Cu- α (1,5418 Å) em 40kV e 40 mA.

2.15 Espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier: os espectros no infravermelho foram obtidos em um equipamento Perkin Elmer Spectrum BX FTIR System, com resolução de 4 cm⁻¹ na faixa de 4000-400cm⁻¹, pela técnica de pastilha de KBr e 16 acumulações.

2.16 Espectroscopia Ressonância Magnética Nuclear: os espectros de RMN de ¹H foram medidos em um instrumento Varian INOVA 500MHz, com 2s de tempo de relaxação e 2,00 ms *mixing time*. Foi utilizado CD₃OD como solvente e TMS como padrão, bi-dimensionais (NOESY – Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy).

CAPITULO IV

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos. Primeiramente fez-se necessário determinar os parâmetros espectroscópicos do TMP, a estequiometria do complexo TMP/RAMEB, pelas técnicas descritas na metodologia, bem como a eficiência de complexação. Por fim foi realizada a caracterização do complexo.

3.1 Determinação da solubilidade do TMP

O TMP é um fármaco pouco solúvel em água. A solubilidade descrita pela literatura é de 1,4 mM (0,406 mg.mL⁻¹) (LOFTSSON e HREINPÓTTIR, 2006) em água a 25°C. Determinou-se através do método da dissolução direta a solubilidade do TMP em solução aquosa e nos tampões em temperatura ambiente, os dados estão dispostos na Tabela V:

Tabela V - Solubilidade do TMP nos diferentes meios

Meio	S ₀ (mg.mL ⁻¹)	Solubilidade em mM
Água	0,135	0,465
pH 4	0,140	0,482
pH 9	0,089	0,306

Para as condições estudadas, pode-se afirmar que a solubilidade do fármaco TMP em pH 4 aumentou cerca de 4% , comparando com solubilidade em água, o que não foi observado em pH 9 onde a solubilidade reduziu cerca de 34% em relação a

solubilidade da água. Este comportamento evidencia um acréscimo na solubilidade em meio ácido, o que já se previa, uma vez que o TMP é uma base fraca.

3.2 Determinação dos parâmetros espectroscópicos do TMP (ϵ e $\lambda_{\max}$)

A seguir estão dispostos os espectros de absorção no UV do TMP e as respectivas curvas de calibração nos diferentes meios. Na Figura 14 observa-se o espectro de absorção no UV do TMP em água, onde se verifica uma banda de $\lambda_{\max}$ em 277,5 nm.

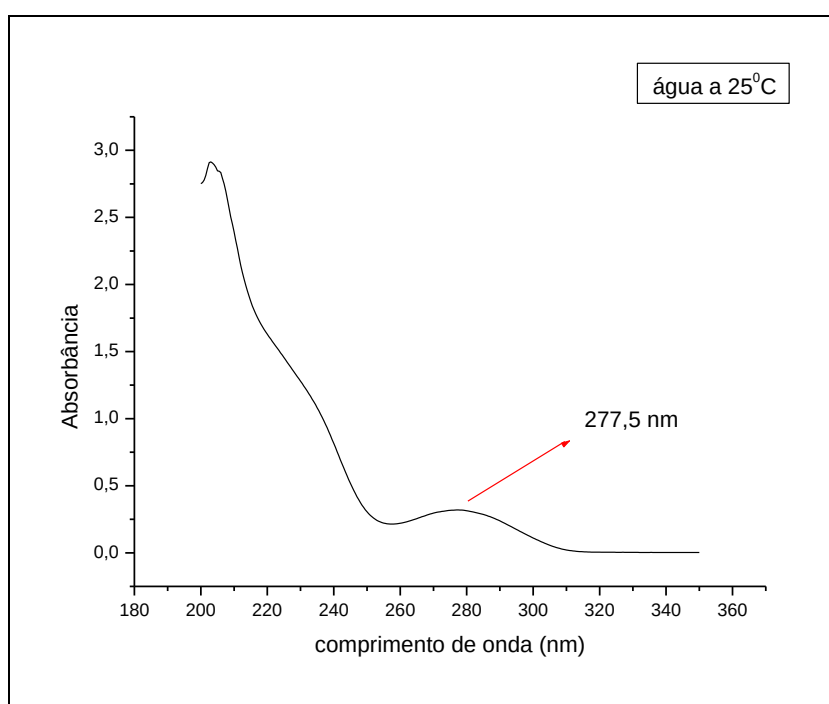


Figura 14- Espectro de absorção no UV do TMP em água.

Para a determinação do ϵ foi feita uma solução de concentração $8,9 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ e uma série de diluições desta, medindo-se a absorbância no comprimento de onda 277,7nm. A figura 15 apresenta estes dados.

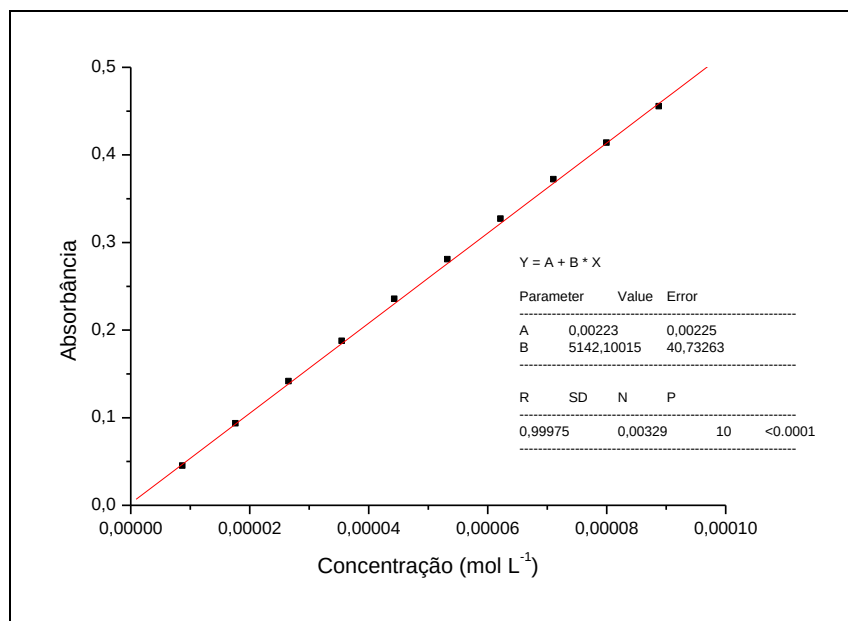


Figura 15 – Curva de calibração do TMP em água

O valor do ϵ obtido foi de $5142 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. O espectro de absorção no UV do TMP em tampão acetato é observado na Figura 16 onde o λ_{max} é de 271 nm.

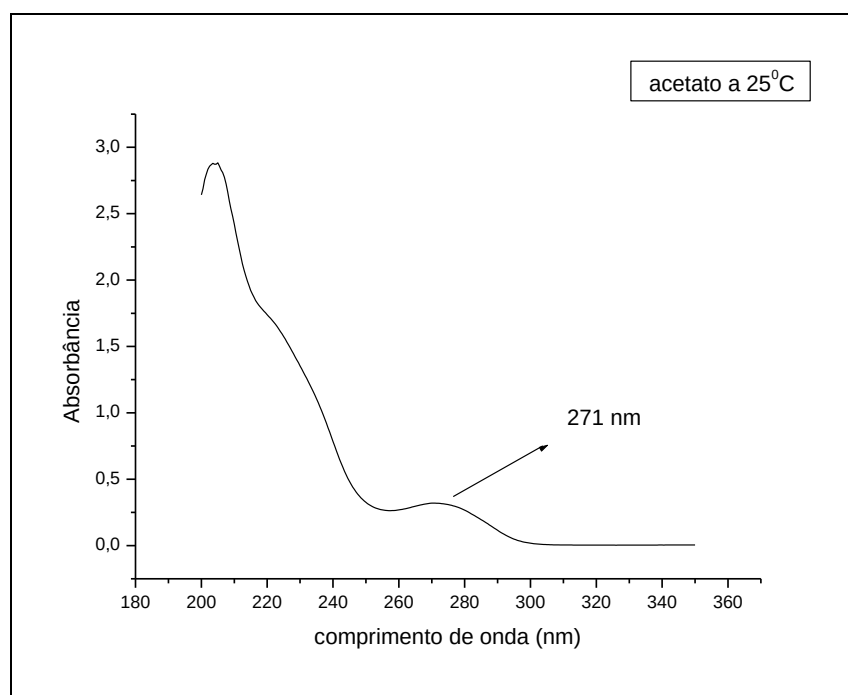


Figura 16 – Espectro de absorção no UV do TMP em tampão acetato.

Para a determinação do ϵ foi feita uma solução de concentração $2,3 \cdot 10^{-4} \text{ mol}$

.L⁻¹ e diluições desta, medindo-se a absorvância no comprimento de onda 271nm. A figura 17 apresenta estes dados.

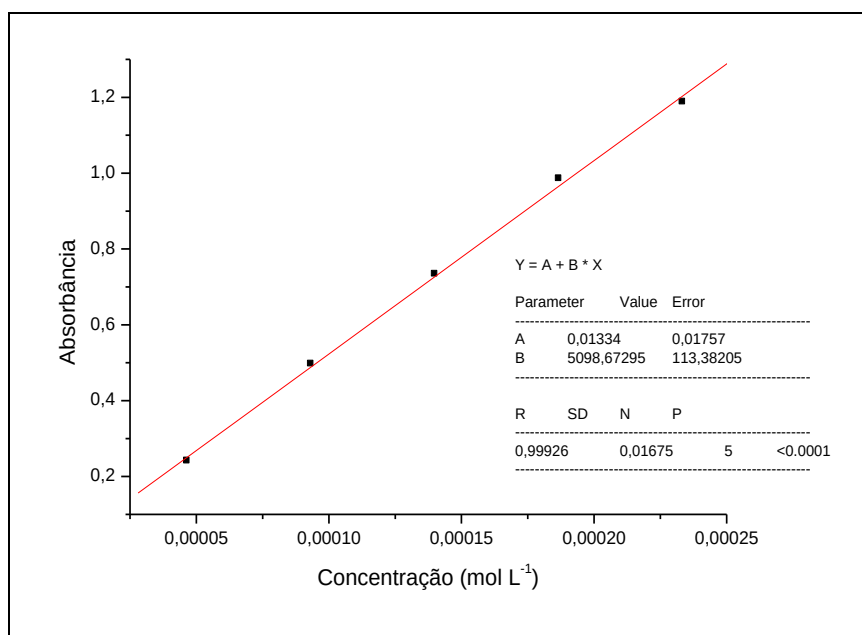


Figura 17 – Curva de calibração do TMP em tampão acetato

O valor do ϵ foi de 5098 L.mol⁻¹.cm⁻¹. O espectro de absorção no UV do TMP em tampão borato está na Figura 18 onde é observado um λ_{max} em 287,5.

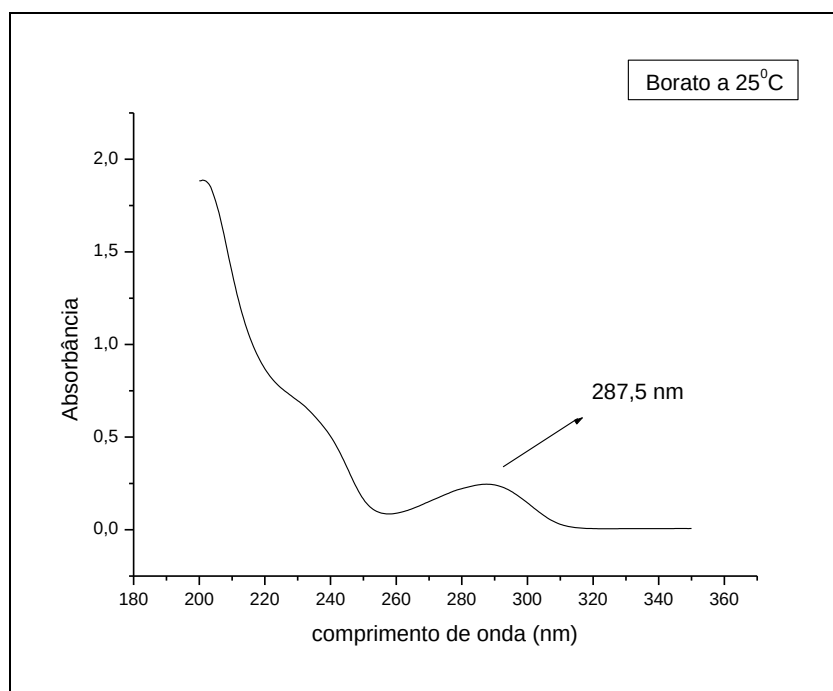


Figura 18 – Espectro de absorção no UV-vis do TMP em tampão borato

Para a determinação do ϵ foi feita uma solução de concentração $1,2 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ e diluições desta, medindo-se a absorbância no comprimento de onda 287,5 nm. A figura 19 apresenta estes dados.

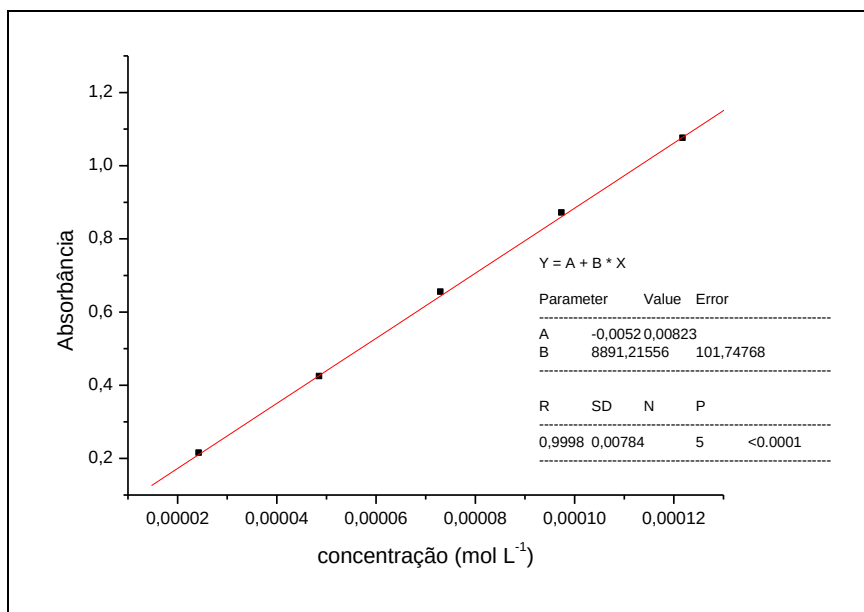


Figura 19 – Curva de calibração do TMP no tampão borato.

O valor de ϵ foi de $8891 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ e a tabela VI resume os parâmetros espectroscópicos do TMP nos diversos meios.

Tabela VI – Parâmetros espectroscópicos e a solubilidade do TMP em água e nas soluções tampões.

Meio	λ_{max} (nm)	ϵ ($\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)	S_0 (mg.mL^{-1})
Água	277,5	$5142 \pm 13,1$	0,135
pH 4	271	$5098 \pm 13,7$	0,140
pH 9	287,5	$8891 \pm 67,14$	0,089

Os espectros do TMP nos diferentes meios apresentam uma banda de absorção bem definida e centrada em 277,5 nm em água, 271 nm em pH 4 e 287,5 nm em pH 9. Esses deslocamentos de banda sugerem efeitos similares causados pela mudança no caráter do solvente, ou seja, deslocamento de aproximadamente 16,5 nm do máximo de absorção do meio ácido para o básico.

Os valores de ϵ calculados a partir da lei de Beer (equação 9) para estes máximos de absorção em solução são valores típicos de coeficientes de absortividade molar para transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$.

3.3 Cinética de formação do complexo TMP/ RAMEB

A cinética de complexação do TMP com a RAMEB foi estudada em meio aquoso e nos tampões acetato e borato. Foi monitorado o λ_{max} em cada meio (Tabela VI), assim a mudança de absorbância foi registrada em função do tempo. As figuras 20, 21 e 22 trazem as curvas obtidas nos três meios para o período de 30 horas.

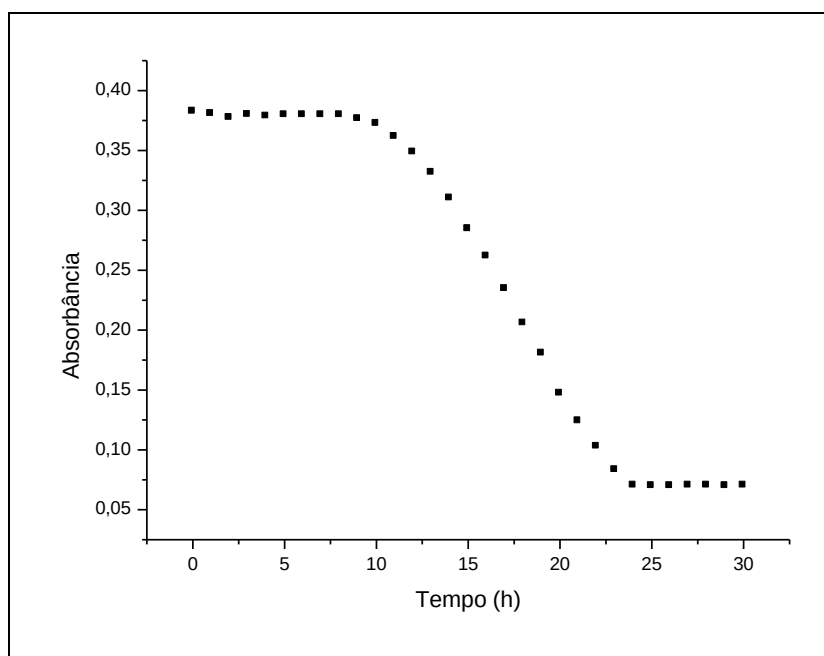


Figura 20 – Curva cinética de complexação do TMP em água

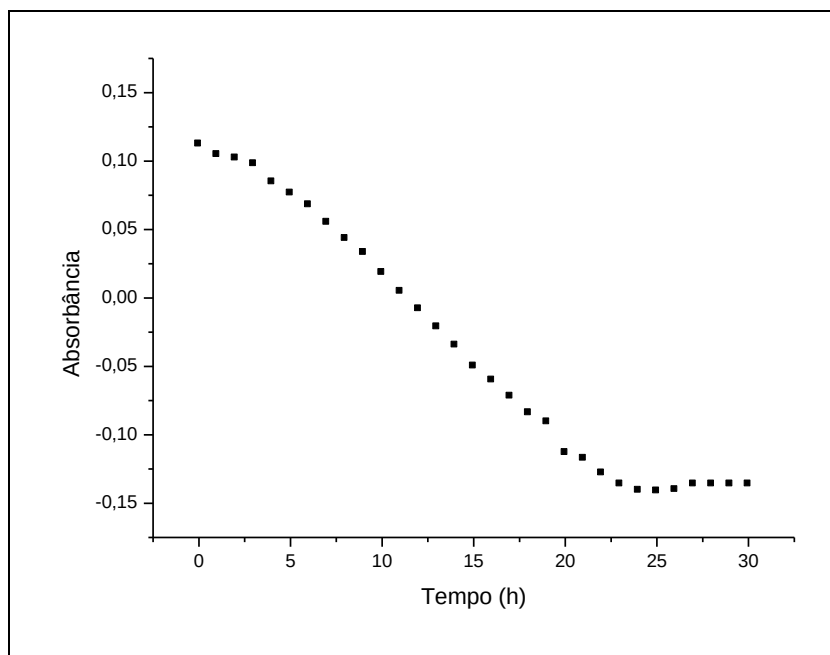


Figura 21 – Curva cinética de complexação do TMP em tampão acetato

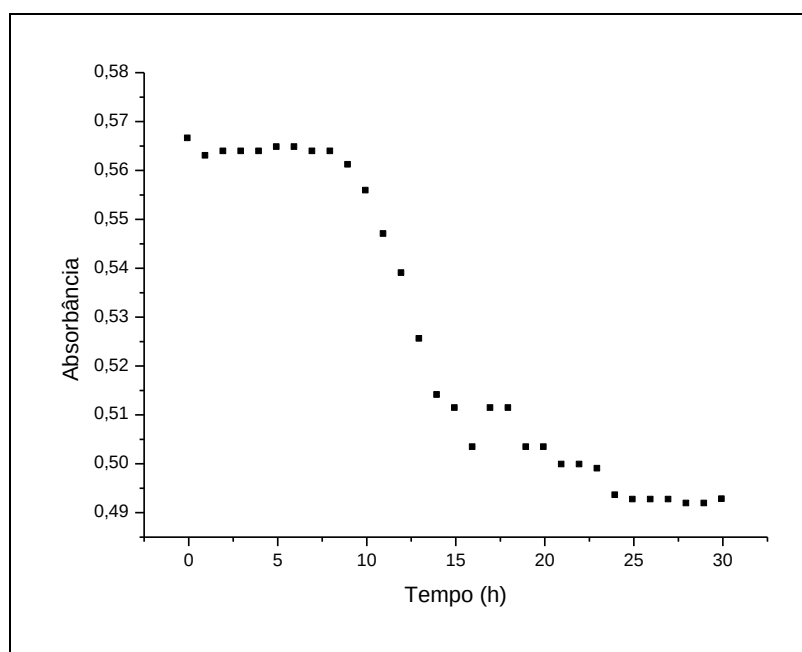


Figura 22 – Curva cinética de complexação do TMP em tampão borato.

Nas três curvas observa-se que durante as primeiras horas do experimento não há muita variação na absorvância do TMP. Após um período de 24 h do início do

ensaio, a absorvância passa a decrescer e depois estabiliza. Isto pode evidenciar que o sistema entrou em equilíbrio e que o complexo de inclusão pode estar formado.

Posteriormente a inclusão com ciclodextrinas, muitos fármacos sofrem mudanças em suas propriedades físico-químicas, estas podem ser detectadas no espectro de absorção de UV, causando modificações nos comprimentos de onda ou aumento/diminuição do $\lambda_{\max}$. Para o complexo estudado não foi observado variação do $\lambda_{\max}$ em cada meio, mas sim mudanças na intensidade máxima de absorção para os $\lambda_{\max}$, ou seja, mudança do ϵ .

3.4 Diagrama de solubilidade a 25°C

O método da solubilidade de fases desenvolvido por Higuchi e Connors (HIGUCHI e CONNORS, 1965) é utilizado como primeira verificação da formação do complexo de inclusão em solução, sendo monitoradas as alterações da solubilidade do fármaco em presença de quantidades crescentes de ciclodextrinas. A partir do tipo de diagrama disposto na Figura 11 foi estabelecida a estequiometria, bem como os valores de K_C . Para a determinação dos valores de K_C foi utilizada a equação 4.

Pela análise da isoterma de solubilidade, o TMP apresenta em água (Figura 23) um diagrama do tipo B_S e um K_C de $1051,9 \text{ L.mol}^{-1}$, o que demonstra que em meio aquoso o TMP na presença da RAMEB tem sua solubilidade limitada, mas uma estabilidade considerável. Para a determinação do valor de K_C utilizou-se o segmento linear do diagrama de solubilidade, pois perante o segmento é assumida a formação de complexos de estequiometria 1:1. A isoterma em pH 9 (Figura 24) apresenta um perfil do tipo A_N , a partir do qual não é possível calcular o valor de K_C devido às interações complexas estabelecidas entre soluto/solvente e soluto/soluto. Porém, observa-se um aumento na solubilidade com o aumento da concentração de CD.

Em pH 4 (Figura 25) o diagrama obtido indica um perfil do tipo A_L , onde há um aumento linear da solubilidade de TMP em concentrações crescentes de CD, neste caso permitindo a inferência de uma estequiometria 1:1 e um valor de K_C $754,9 \text{ L.mol}^{-1}$.

Muitos estudos têm demonstrado um aumento significativo da solubilidade de fármacos pouco solúveis quando na presença da RAMEB. Esses fazem um comparativo da RAMEB com outras ciclodextrinas como no caso do antiinflamatório oxaprozina, onde neste estudo se faz a comparação com as CD' naturais e derivados da β -CD

(MAESTRELLI *et al*, 2008). Em outro estudo, voltado para o acetato de ciproterona, fármaco utilizado no tratamento do câncer de próstata, também se demonstra um aumento da solubilidade deste fármaco quando em presença da RAMEB (HASSONVILLE *et al*, 2002).

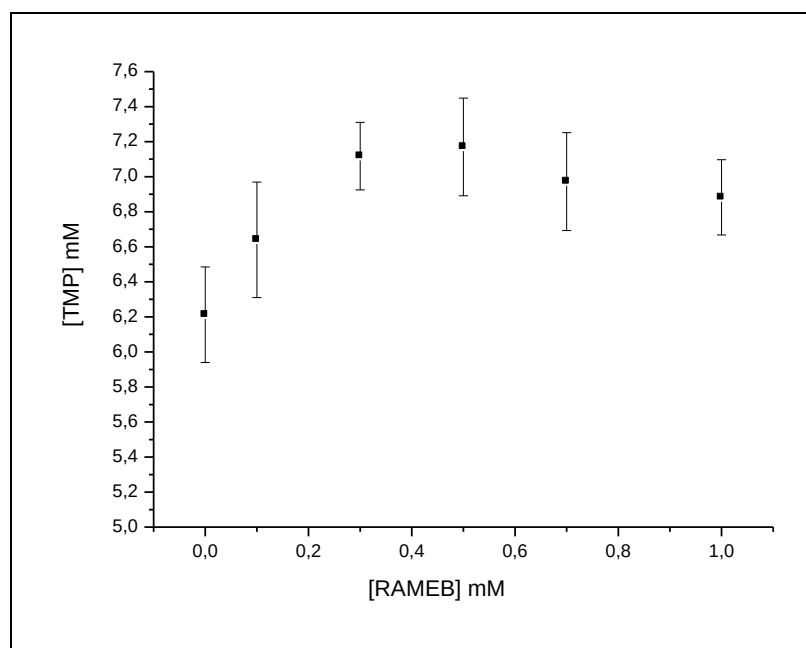


Figura 23 – Isoterma de solubilidade do TMP/RAMEB em água

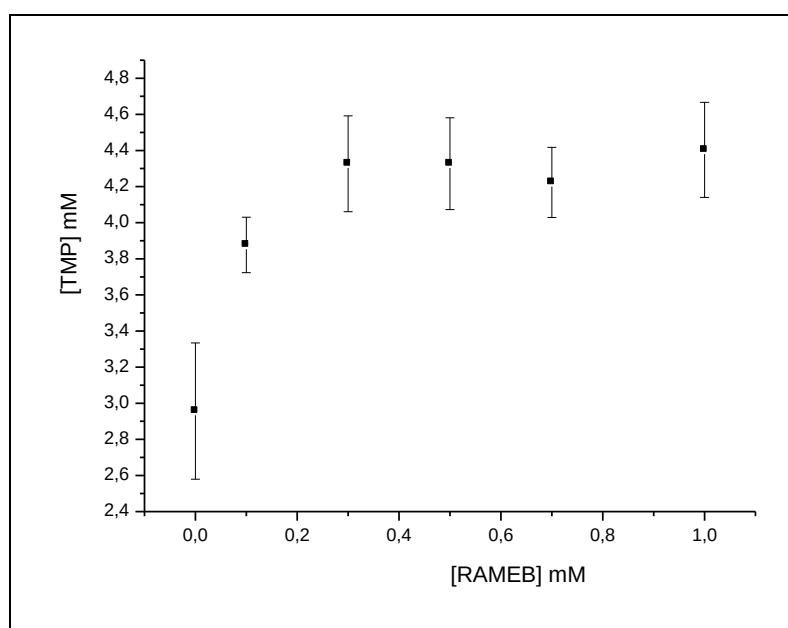


Figura 24 – Isoterma de solubilidade do TMP/RAMEB em pH 9

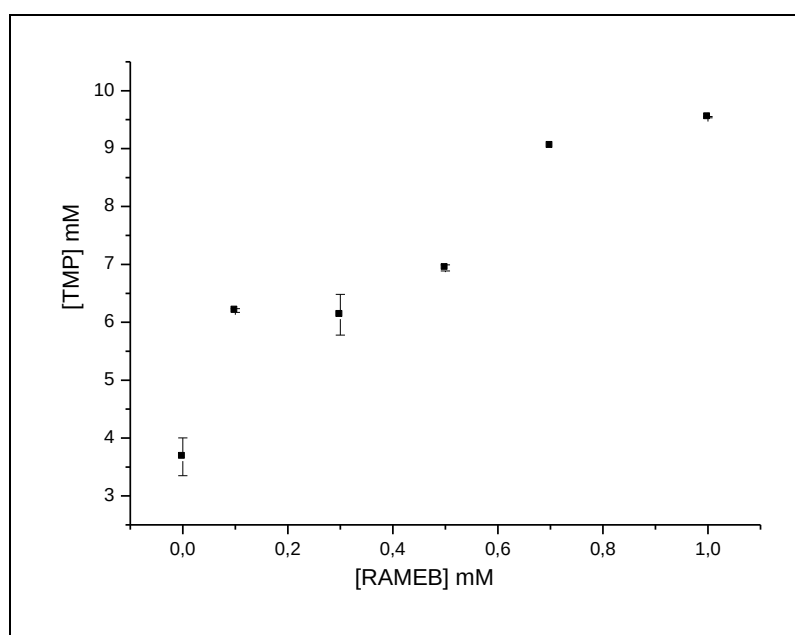


Figura 25 – Isoterma de solubilidade do TMP/RAMEB em pH 4

Tabela VII – Dados referentes à solubilidade do TMP nos diferentes meios, o valor de K_S (M^{-1}), a eficiência de complexação (CE) e o perfil da isoterma, 25°C

pH	S_0 ($mg.mL^{-1}$) ^a $.10^{-3}$	S_P ($mg.mL^{-1}$) ^b $.10^{-3}$	K_S ($L.mol^{-1}$)	CE	Perfil
H ₂ O	9,38	9,93	1051,9	0,034	B _S
4.0	19,71	33,96	754,9	0,051	A _L
9.0	8,07	13,18	-	-	A _N

a – solubilidade do TMP na ausência da RAMEB

b – solubilidade do TMP em 1mmol de RAMEB

Os dados apresentados na Tabela VII demonstram um aumento significativo da solubilidade do TMP quando em presença da RAMEB, onde em tampão acetato esta solubilidade foi aumentada em quase 73% da solução que contém a concentração máxima de CD em relação à solução que não contém CD. Tal fato é comprovado pela isoterma de solubilidade que descreve um perfil do tipo A_L, sendo a única isoterma que apresentou este perfil. Em água não foi observado um aumento significativo na solubilidade do TMP quando comparado na ausência e presença de CD, onde a isoterma apresentou-se do tipo B_S. Este perfil retrata uma solubilidade limitada. Em pH 9 houve

um aumento da solubilidade do que em água, isto é evidenciado pelos valores de S_0 e S_p , de $8,07 \times 10^{-3} \text{ mg.mL}^{-1}$ e $13,18 \times 10^{-3} \text{ mg.mL}^{-1}$.

Assim, observado os dados da Tabela VII e pelo que foi descrito anteriormente, pode-se compreender que a complexação do TMP com a RAMEB está associada à variação do pH do meio. Em meio ácido há uma maior solubilidade, pois a forma ionizada do fármaco é predominante, ao passo que em meio básico é predominante a forma neutra, assim a solubilidade sofre um decréscimo. Logo uma alteração do pH que favoreça a ionização do fármaco irá aumentar a solubilidade do mesmo (LI *et al*, 1999).

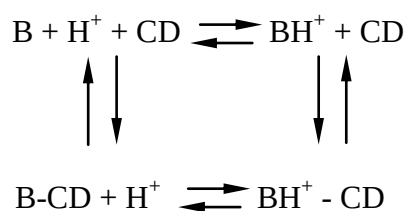
O efeito combinado entre o pH e a complexação para um fármaco ionizado pode ser descrito em função da concentração do fármaco neutro (F_n), concentração do fármaco ionizado (F_i), concentração do complexo fármaco neutro e CD ($F_n\text{-CD}$) e concentração do complexo fármaco ionizado e CD ($F_i\text{-CD}$), sendo a concentração total do fármaco expressa por pela equação 10 (VEIGA *et al*, 2006):

$$[F_{\text{total}}] = [F_n] + [F_i] + [F_n\text{-CD}] + [F_i\text{-CD}] \quad [10]$$

sendo um fármaco básico (equação 11) :

$$[F_{\text{total}}] = [B] + [BH^+] + [B\text{-CD} + H^+] + [BH^+\text{-CD}] \quad [11]$$

O equilíbrio estabelecido está disposto no esquema II:



Esquema II – Equilíbrio de associação e dissociação entre a CD e um fármaco básico

Muitos estudos demonstram que fármacos não-ionizados formam complexos mais estáveis que as suas respectivas formas ionizadas (ZIA *et al*, 2001; CIRRI *et al*, 2006; JUG, *et al*; 2009). Fato observado no complexo TMP/RAMEB, onde em meio ácido ($K_C = 754,9M^{-1}$) o valor de K_C foi inferior ao calculado para a água ($1051,9M^{-1}$).

É também verificado que; com a diminuição do pH, há um aumento da solubilidade do fármaco (S_0) e este fato resulta em uma melhora considerável da solubilidade que compensa a diminuição do valor de K_C .

Quando se seleciona as condições de complexação se torna mais conveniente comparar a eficiência de complexação.

A eficiência de complexação foi calculada de acordo com a equação proposta por Loftsson *et al* (2005) :

$$CE = \frac{\text{inclinação}}{(1 - \text{inclinação})} \quad [12]$$

onde CE é a eficiência de complexação do inglês *complexation efficiency* (CE)

A eficiência de complexação refere-se à capacidade das CD's formarem complexos de inclusão com as moléculas hóspedes apropriadas. Quanto maior a eficiência de complexação, menor a quantidade de CD necessária para solubilizar o fármaco. No caso do complexo TMP/RAMEB a CE foi resultante do ajuste de pH, onde também na forma ionizada do fármaco houve maior valor para o CE (5,1%), uma vez que este é influenciado pelo aumento da solubilidade.

3.5 Diagramas de solubilidade à 45°C

As isotermas de solubilidade do TMP a 45°C (Figuras 26, 27 e 28) nos diferentes meios demonstraram que o complexo formado nesta temperatura é aparentemente mais estável do que a 25°C, fato este comprovado pelos elevados valores de K_C (Tabela VIII).

Um aspecto a ser considerado é o aumento da solubilidade do TMP nos três meios principalmente na água, que teve um grande incremento da solubilidade. Isto pode estar associado ao aumento do valor de K_C , uma vez que a solubilidade aumentou e conseqüentemente a solubilidade do complexo formado.

Outro fato relevante é sobre o perfil da isoterma de solubilidade em água, que a 25°C era de B_S e foi para A_L a 45°C, ou seja, saiu de uma solubilidade limitada para

uma solubilidade crescente em concentrações crescentes de CD, fato que não ocorreu com o TMP em tampão borato que mudou do perfil A_N à 25°C para o B_S a 45°C .

A Tabela VIII traz todos estes dados agrupados.

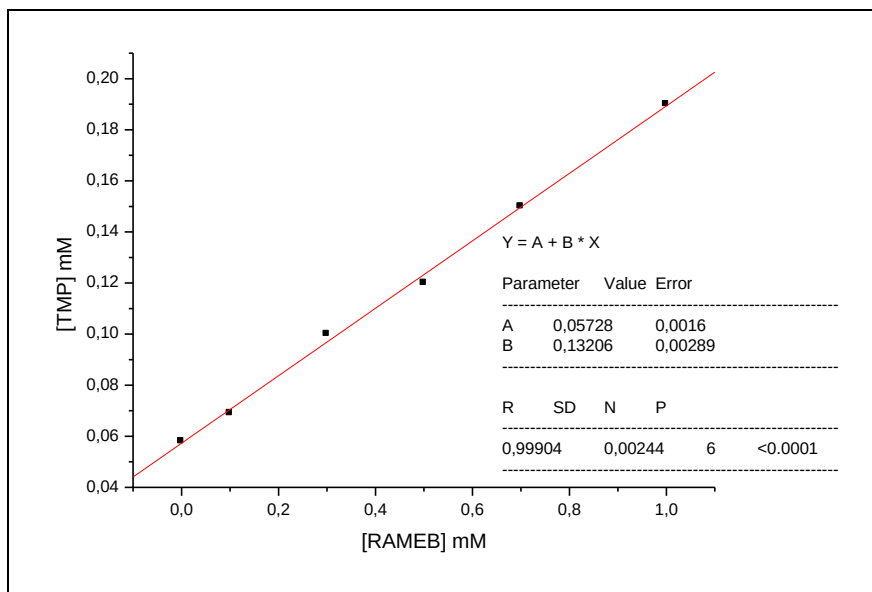


Figura 26 – Isoterma de solubilidade TMP/RAMEB em água 45°C .

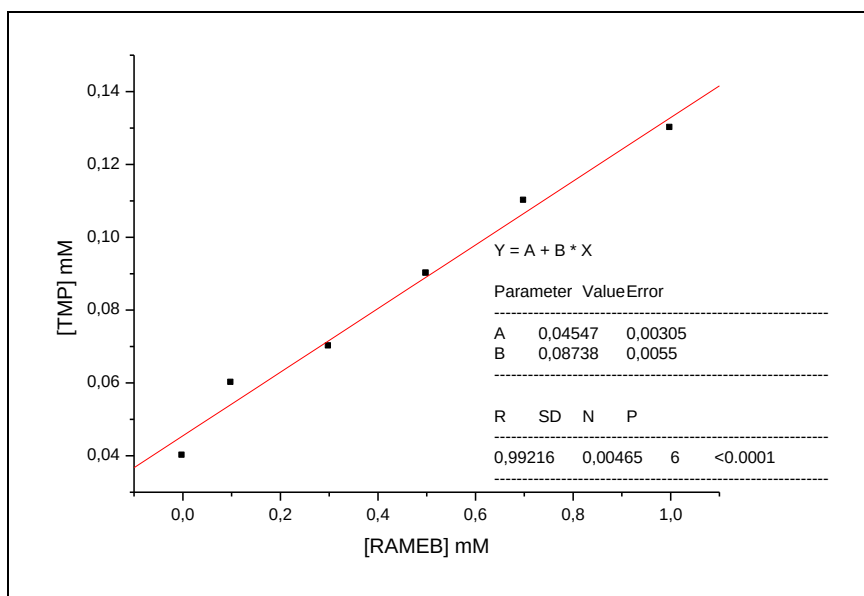


Figura 27 – Isoterma de solubilidade TMP/RAMEB em pH 4 a 45°C

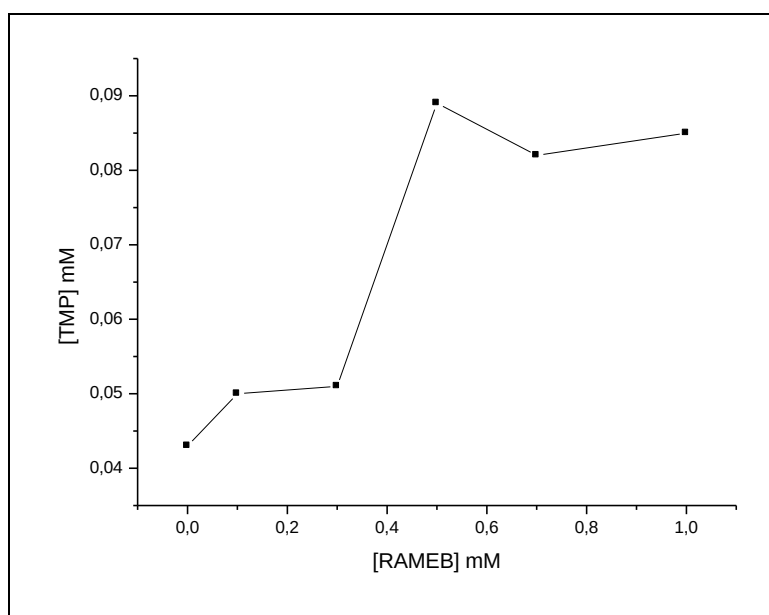


Figura 28 – Isoterma de solubilidade TMP/RAMEB em pH 9 a 45°C

Tabela VIII – Dados referentes à solubilidade do TMP nos diferentes meios, valor de K_S (M^{-1}) e o perfil das isotermas a 45°C.

pH	$S_0(\text{mg.mL}^{-1})^a \cdot 10^{-3}$	$S_P(\text{mg.mL}^{-1})^b \cdot 10^{-3}$	$K_S (\text{L.mol}^{-1})$	Perfil
H ₂ O	16,8	55,1	2623,4	A _L
4.0	11,6	37,7	2393,9	A _L
9.0	12,5	24,65	2129,9	B _S

a – solubilidade do TMP na ausência da RAMEB

b – solubilidade do TMP em 1mmol de RAMEB

3.6 Espectroscopia de Fluorescência

A adição de ciclodextrina a uma solução aquosa freqüentemente resulta em uma melhora significativa do espectro de fluorescência de uma dada espécie fluorescente convidada. A mudança que ocorre com a adição de CD, é semelhante à observada quando o fármaco é dissolvido em solventes menos polares, sugerindo desta forma que este foi transferido de um ambiente polar a um ambiente apolar (cavidade da CD). Portanto, um aumento na intensidade da fluorescência é freqüentemente observado

para as moléculas que são totalmente encapsuladas dentro da cavidade da CD (BUDAL, 2003)

3.6.1 Determinação da estequiometria do complexo (método de JOB)

Pelo método de JOB, a estequiometria do complexo pode ser determinada monitorando alguma propriedade relacionada diretamente com a concentração do complexo, onde se estuda uma série de soluções com misturas de proporções variáveis entre o fármaco e a CD. Em um gráfico da propriedade medida, em função da fração molar de uma das espécies, a variação máxima da propriedade será observada para a fração molar referente à estequiometria do complexo (LOUKAS, 1997). Para o TMP, foi aplicado com base na propriedade de emissão de fluorescência.

A Figura 29 mostra o gráfico obtido aplicando o método de JOB nas condições específicas, para o sistema TMP/RAMEB. No gráfico observa-se que o máximo da variação da intensidade de fluorescência encontra-se na fração molar 0,5. Assim a estequiometria de formação do complexo é de 1:1, o que concorda com o resultado obtido com o estudo de solubilidade de fases.

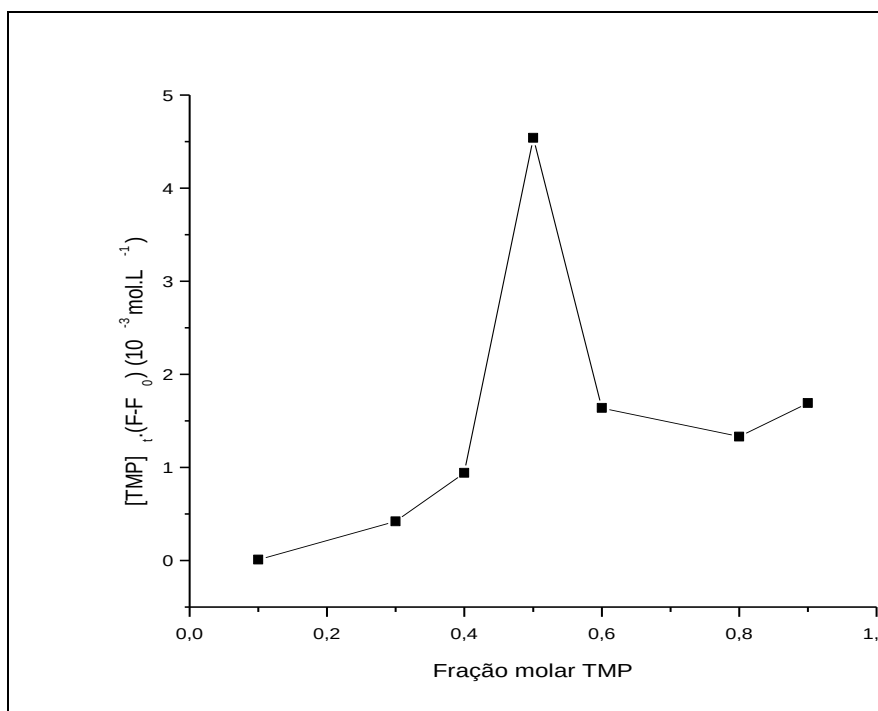


Figura 29 – Gráfico obtido pelo método de JOB do complexo TMP/RAMEB.

CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO EM ESTADO SÓLIDO

3.7 Determinação das análises térmicas

Os métodos de análise térmica são bastante utilizados na caracterização de sistemas com mais de um componente, como no caso dos complexos de inclusão. A análise é feita por comparação entre os comportamentos térmicos dos componentes sozinhos e o complexo de inclusão. Praticamente não é realizada análise quanto aos aspectos quantitativos.

3.7.1 Análise Termogravimétrica (TGA)

Na análise termogravimétrica, a massa de uma amostra está sob atmosfera de gás inerte ou oxidante, sendo monitorada continuamente em função da temperatura em uma rampa de aquecimento. As curvas obtidas são duas, uma delas relacionada ao percentual de massa (Massa%) e à outra derivada, com relação à temperatura, do percentual de massa (Derivada da Massa %/°C). Esta última permite a determinação exata da temperatura em que ocorre determinada perda de massa da amostra.

Nas curvas de TG (Figura 30) e DTG (Figura 31) das espécies livres e complexadas verifica-se que: a decomposição térmica do complexo ocorre em 323°C, uma temperatura intermediária entre a decomposição das espécies livres, onde o TMP apresenta temperatura de decomposição de 302°C e a RAMEB de 364°C. Isto evidencia um ganho de estabilidade térmica para o fármaco encapsulado, provavelmente como resultado de interações com a cavidade.

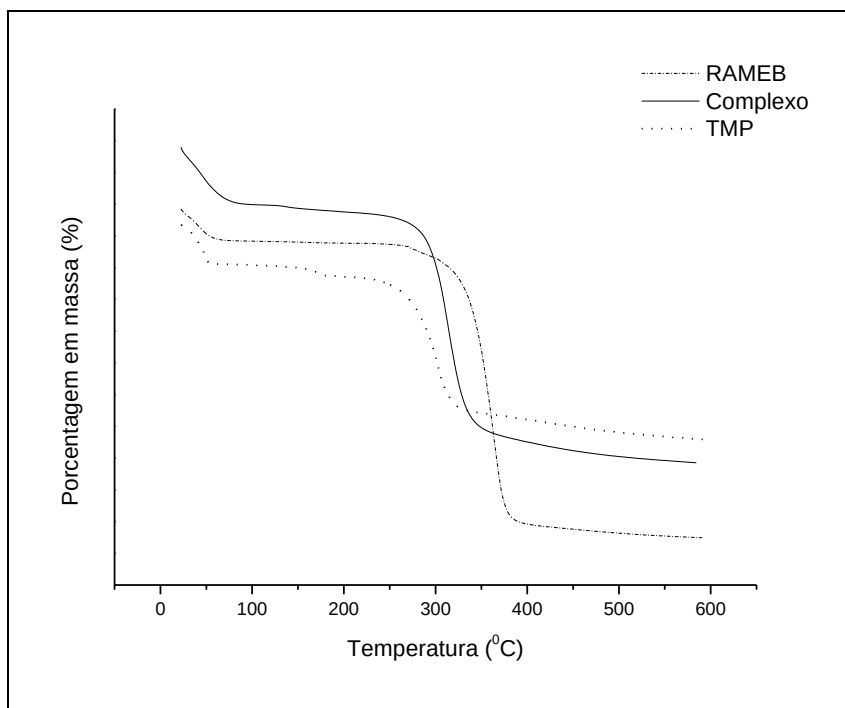


Figura 30 – Curva Termogravimétrica (TG) das espécies livres e do complexo

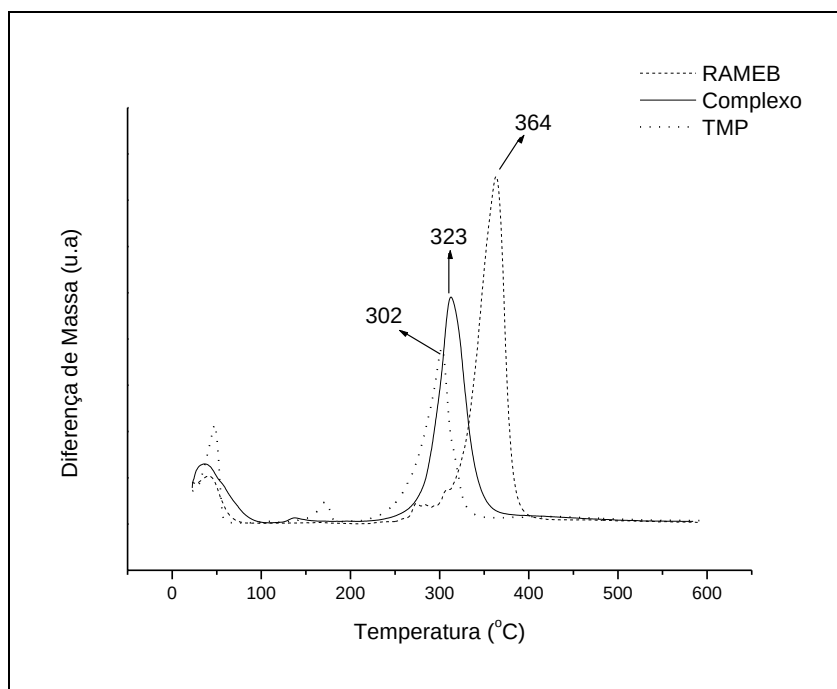


Figura 31 – Curva DTG das espécies livres e do complexo

3.7.2 Análise Térmica Diferencial (DTA)

Nas curvas de DTA (Figura 32), verifica-se que um evento endotérmico associado à fusão do TMP em 200°C, não se manifesta na curva do complexo, o que é normalmente associado a uma evidência indireta de formação do complexo. Isto é interpretado com base no fato de que, quando moléculas de TMP se encontram no interior da cavidade, estas não mais interagem entre si no estado sólido, pois são essas interações que teriam que ser rompidas para se iniciar a fusão do fármaco propriamente dito.

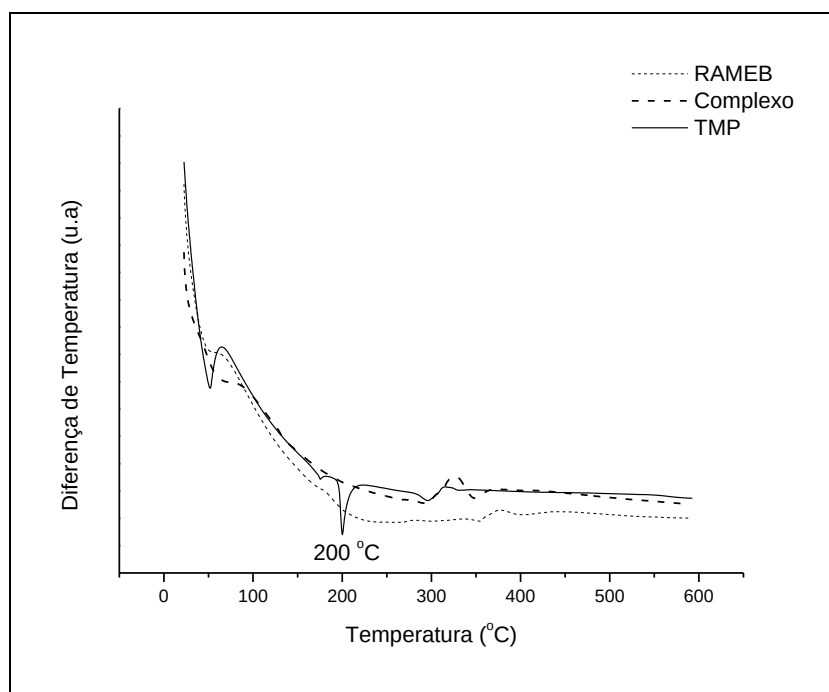


Figura 32 – Curvas de DTA das espécies livres e do complexo

3.8 Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros, na região do infravermelho, de espécies moleculares têm origem na absorção de energia causada por transições de um estado vibracional para outro, pois as radiações nesta parte do espectro não têm energia suficiente para causar transições eletrônicas (CALDERINE, 2003).

Todavia, esta técnica não é muito adequada para confirmar a formação do complexo de inclusão, uma vez que as ligações estabelecidas são intermoleculares as quais não alteram de maneira considerável o espectro.

A Figura 33 mostra o espectro, de FTIR do complexo e das respectivas formas livres do TMP e da RAMEB.

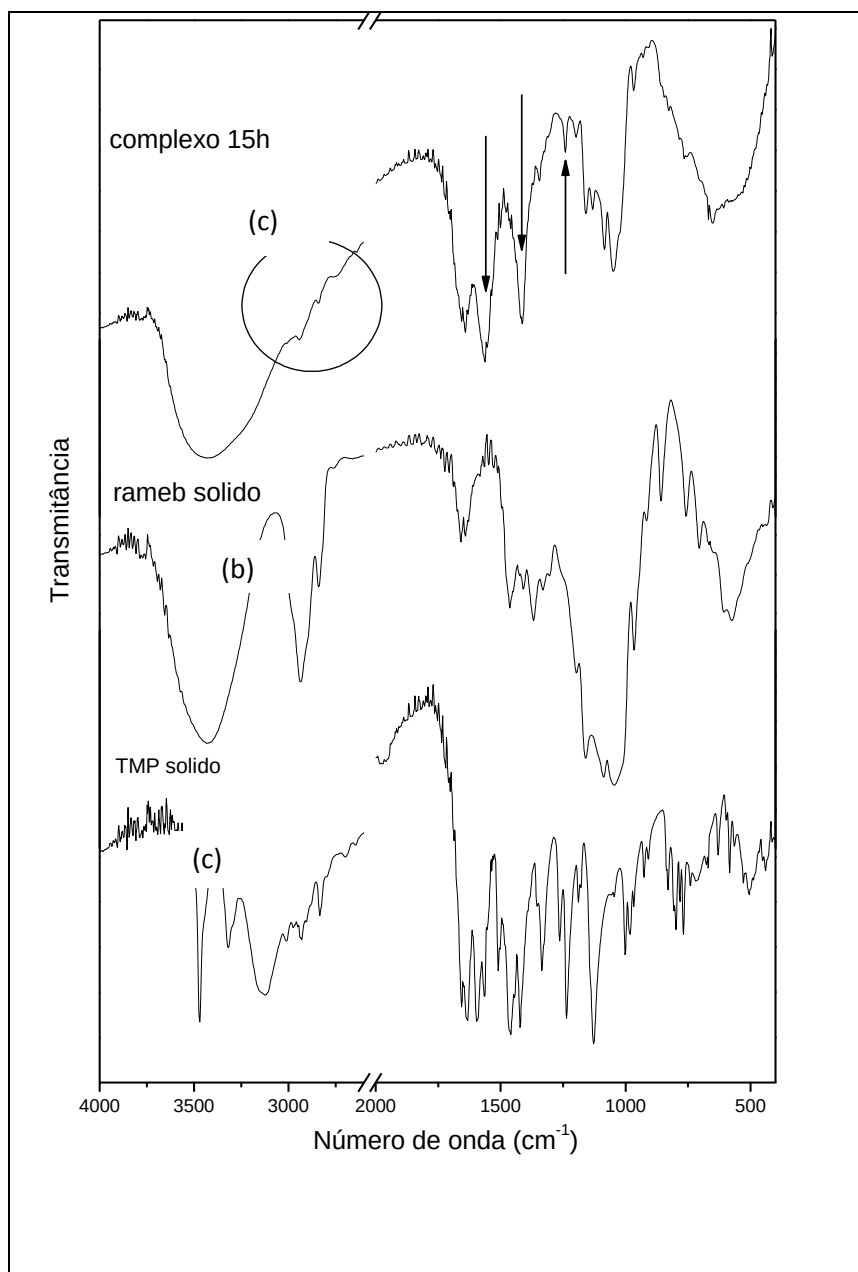


Figura 33 – Espectros de FTIR (a) RAMEB, (b) complexo, (c) TMP liofilizados.

No espectro de FTIR da RAMEB é possível observar bandas associadas a estiramentos OH no intervalo entre 3000 – 3600 cm^{-1} , bandas de estiramento C-H do esqueleto do anel da ciclodextrina e das metilas no intervalo de 2940 e 2840 cm^{-1} . As bandas abaixo de 1500 cm^{-1} são associadas aos acopamentos de modos do anel, que foram atribuídos por Egyed (1990).

O espectro do TMP apresentou um número elevado de bandas abaixo de 1600 cm^{-1} atribuídas a estiramento devido à presença de anel aromático. Merece destaque as bandas dos grupos NH_2 em 3470 cm^{-1} , bandas dos estiramentos C-H na região de 3000-2800 cm^{-1} e próximas a 1000 cm^{-1} , atribuídas às ligações C-O dos grupos metoxi. Na análise do espectro do complexo é possível observar a presença simultânea de bandas do TMP e RAMEB, sendo as mais evidentes marcadas com setas na Figura 34. Estas regiões marcadas apresentam-se como somas dos espectros de ambas as espécies, merecendo destaque a região marcada com um círculo, na qual observamos um mascaramento das bandas da RAMEB pelas bandas do TMP, intensas nesta região. Contudo, não é seguro atribuir inequivocamente as bandas a esta ou aquela espécie nestas regiões, pois o deslocamento das bandas originais pode ter ocorrido.

3.9 Difração de raios-X (DRX)

Entre as técnicas cristalográficas, a difração de raios-X é a mais empregada devido a sua simplicidade e rapidez. Nesta análise, faz-se a comparação dos difratogramas das espécies puras com o do complexo (CAO *et al*, 2005). Desta forma, diferenças nas amostras tratadas, como surgimento ou desaparecimento de picos ou mudanças nas intensidades relativas, constituem indícios de formação do complexo. Na detecção dos complexos de fármacos com CD's esta técnica está baseada no princípio de que o fenômeno de complexação está frequentemente associado ao aumento do grau de amorfização das substâncias envolvidas na formação do complexo no estado sólido (RIBEIRO *et al*, 2003).

No difratograma do TMP (Figura 34c) aparecem picos de difração que demonstram um ordenamento estrutural típico de um sólido cristalino, enquanto no difratograma da RAMEB (Figura 34a) observa-se ausência de picos e um comportamento típico de substância amorfa. No difratograma do complexo (Figura 34b) verifica-se uma mistura dos difratogramas das espécies puras, no qual os picos mais

intensos do TMP se sobressaem sobre o halo amorfo típico da RAMEB. Portanto, a ausência de picos adicionais indica que o complexo formado não se comporta como um cristal distinto, o que na realidade é comum para complexos isolados por liofilização. Neste processo, congela-se a solução e sublima-se o solvente. Logo, o complexo terá uma tendência a manter a estrutura de soluto, não havendo a possibilidade das difusões necessárias para a formação de um cristal. Por fim, os picos do TMP observados podem ser explicados considerando-se que, na etapa de resfriamento da solução, necessária ao congelamento, ocorre à precipitação de TMP não complexado, como um efeito da diminuição de sua solubilidade com o abaixamento da temperatura. Portanto, o DXR observado é consistente com o complexo amorfo misturado com TMP cristalino livre.

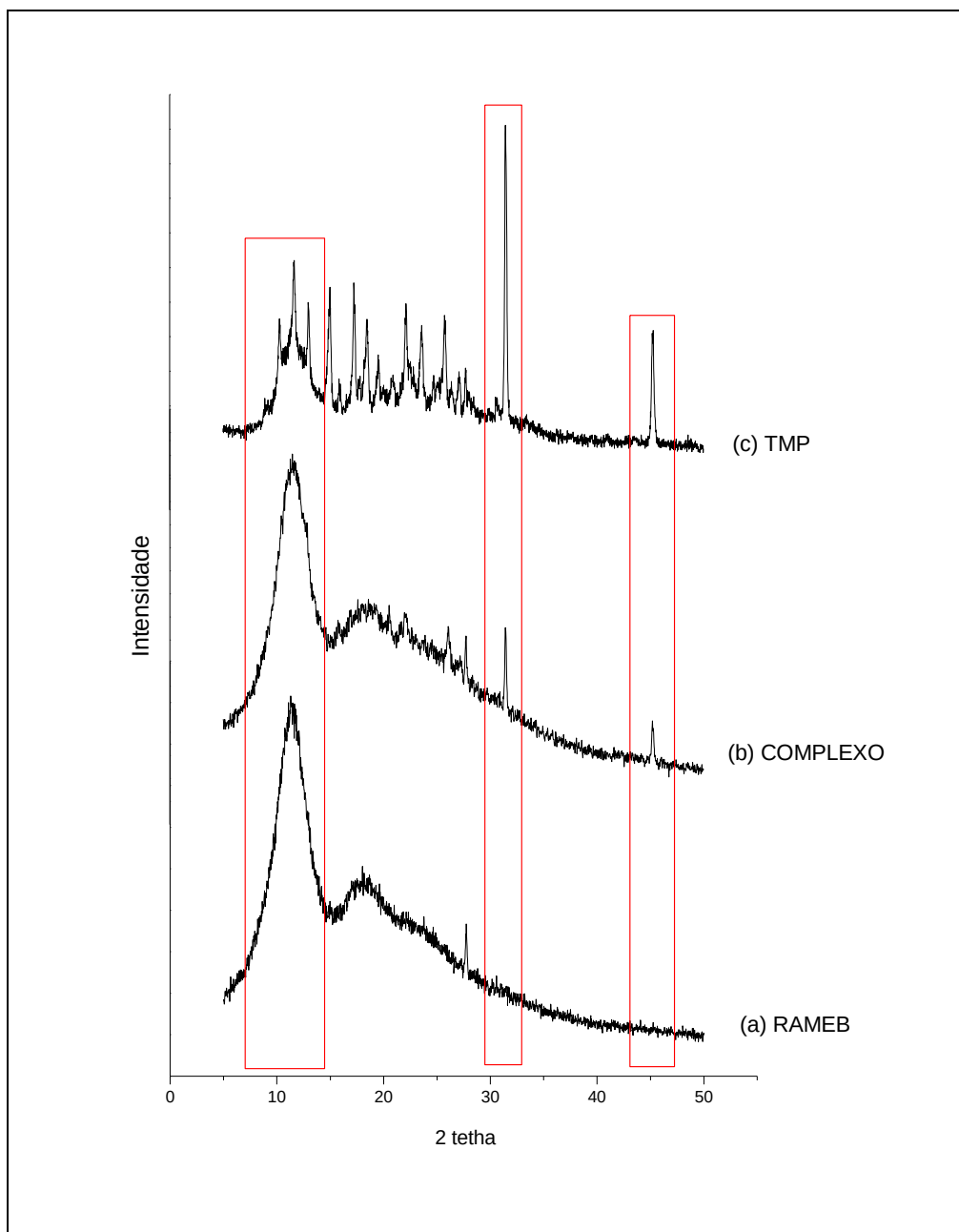


Figura 34 – Difratoogramas de raios-X: (a) RAMEB, (b) complexo, (c) TMP liofilizados.

3.10 Espectroscopia RMN ^1H

A espectroscopia RMN ^1H foi utilizada para a caracterização do modo de inclusão, sendo que as medidas bidimensionais do tipo ROESY e/ou NOESY são

consideradas como evidências mais conclusivas da presença de um complexo de inclusão. Inicialmente foram obtidos os espectros unidimensionais para a atribuição dos sinais das espécies individuais.

No espectro do TMP (obtido neste trabalho em CD₃OD) (Figura 35) temos sinais que estão de acordo com a literatura (obtido em DMSO-d₆) (Figura 36).

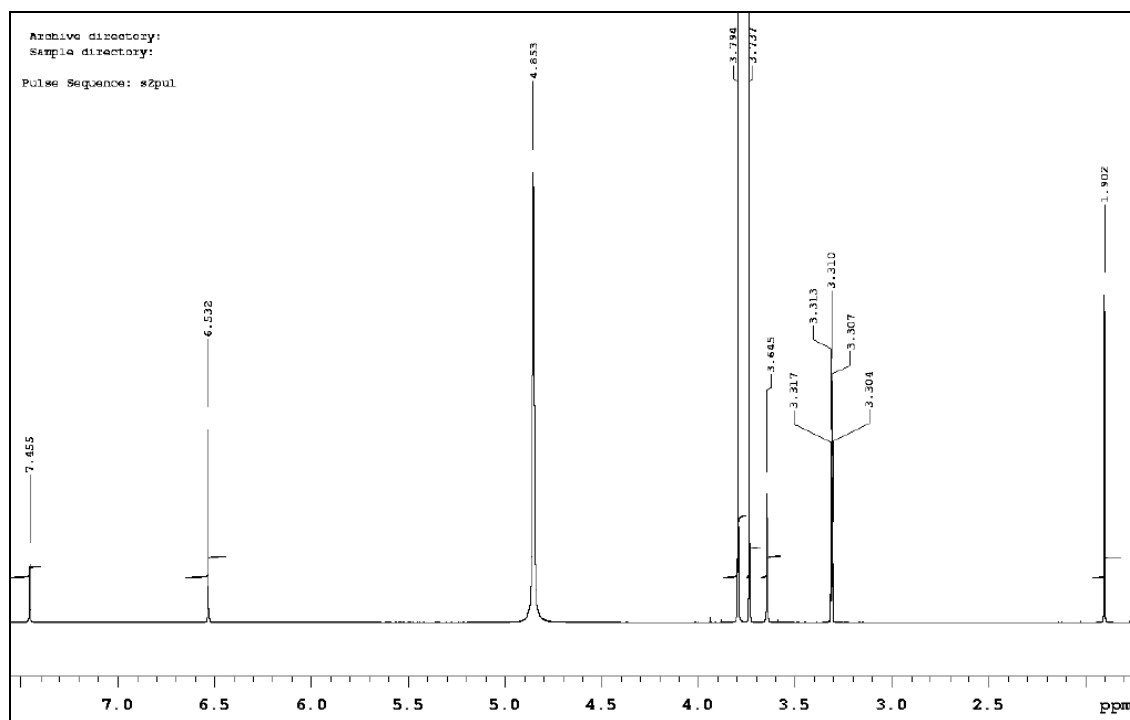
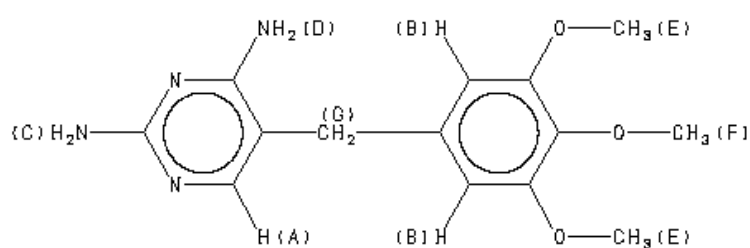


Figura 35 – Espectro de RMN ¹H do TMP em CD₃OD.



Assign.	Shift (ppm)
A	7.529
B	6.559
C	*1 6.14
D	*1 5.76
E	3.725
F	3.620
G	3.533

Figura 36 – Deslocamentos do TMP no espectro RMN ¹H do TMP em DMSO-d₆ (Spectral Database for Organic Compounds, 2009).

No espectro da RAMEB (Figura 38), observam-se sinais referentes aos hidrogênios das unidades de glicopiranosose (Figura 37), que formam a estrutura básica da ciclodextrina.

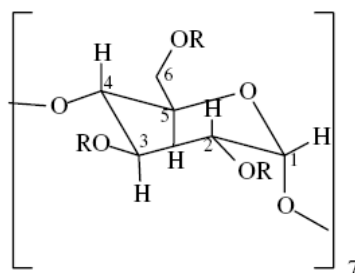


Figura 37 – Estrutura da unidade de glicopiranosose.

De acordo com a literatura (SCHNEIDER, HACKET e RUDIGER, 1998), As atribuições dos sinais de ciclodextrinas metiladas são as seguintes: H1: 5,34 ppm; H2: 3,41 ppm; H3: 3,74 ppm; H4: 3,81 ppm, H5: 3,92 ppm; H6: 3,70 ppm. Os sinais mais relevantes para o estudo do processo de inclusão são os dos H3 e H5, pois estes hidrogênios ficam orientados para o interior da cavidade (Figura 39).

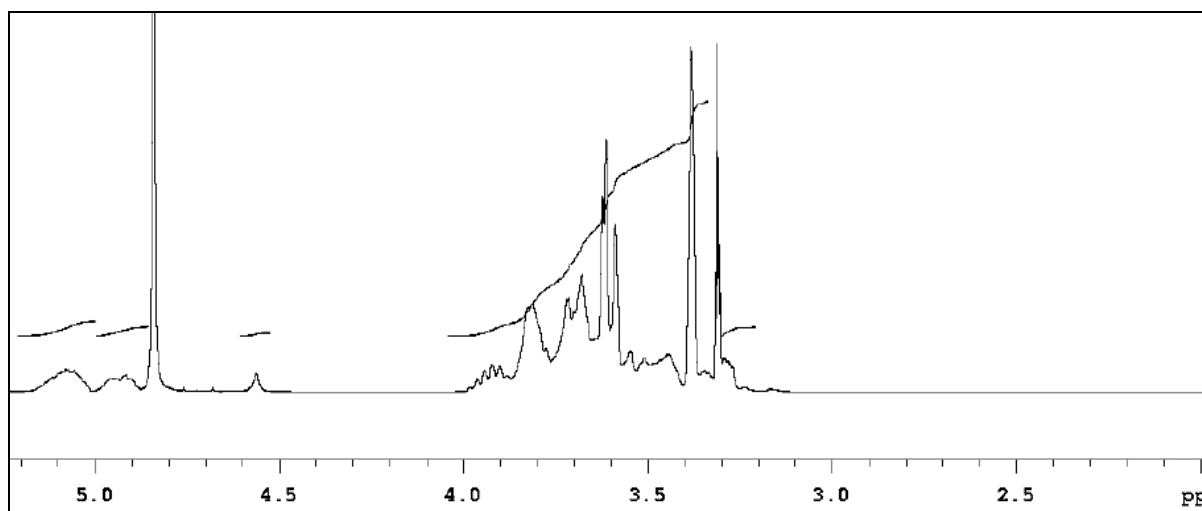


Figura 38 – Espectro de RMN ^1H da RAMEB em CD_3OD

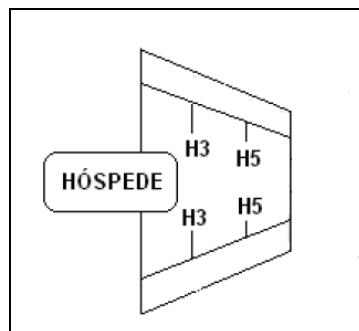


Figura 39 – Disposição dos H3 e H5 no interior da cavidade da CD (CALDERINE, 2006).

Em estudo realizado por Hazekamp e Verpoorte (2006) com a RAMEB e o tetrahydrocannabinol pela técnica de NOESY (em D₂O), a RAMEB apresenta dois sinais bem característicos, que podem ser claramente identificados: das posições das metilas Me2 e Me6, com o aparecimento desses sinais no espectro de RMN ¹H também é possível elucidar a formação do complexo. Estas metilas estão posicionadas no interior da cavidade maior da CD (Me2) e na parte de fora da cavidade menor da CD (Me6). A Figura 40 dispõe estas posições.

No estudo do TMP/RAMEB foi possível verificar a presença das Me2 e Me6 no espectro da RAMEB, o que afirma a sua presença quando comparado ao espectro do complexo. Porém, não permite verificar a interação destas com o TMP, pois existem muitos sinais próximos do TMP com os sinais destas metilas, o que impossibilita a afirmação.

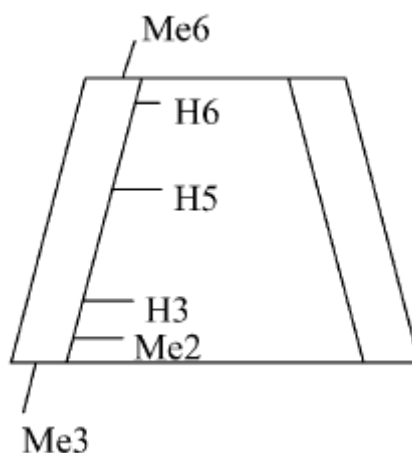


Figura 40 – Disposição das metilas Me2 e Me6 e H3 e H5 (HAZEKAMP *et al*, 2006).

Os espectros bidimensionais do tipo ROESY e NOESY são espectros ^1H - ^1H , ou seja, apresentam o mesmo espectro nas duas dimensões. Adicionalmente, por meio dos sinais fora da diagonal, permitem identificar núcleos de hidrogênio situados a uma distância menor de 5 Å entre si. Deste modo, caso haja picos cruzados no espectro do complexo entre hidrogênios do fármaco e os hidrogênios do interior da cavidade da CD, podemos concluir que o fármaco está incluído na cavidade, propondo inclusive qual grupamento se encontra encapsulado.

O espectro NOESY do complexo (Figura 41) mostra sinais fora da diagonal entre picos dos hidrogênios do anel metoxi do TMP (em 6,532 ppm) e dos prótons da cavidade, tanto H3 (próximo à borda secundária, com abertura maior) quanto H5 (próximo à borda primária, com abertura menor), sendo aparentemente mais pronunciados para H3. Estas observações sugerem a entrada do TMP na cavidade através de seu grupo metoxi pela borda secundária. Estas proposições serão sujeitas à confirmação por modelagem molecular com métodos computacionais semiempíricos.

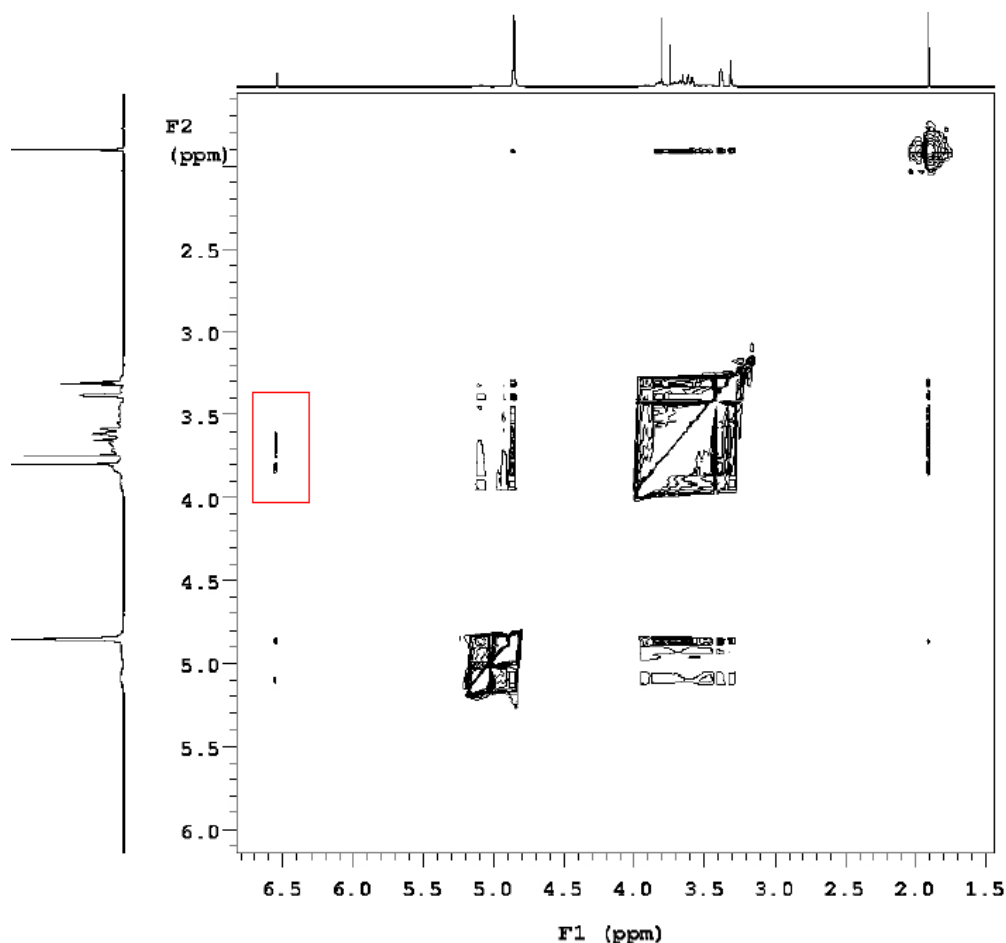


Figura 41 – Espectro RMN ^1H do complexo liofilizado.

CAPITULO V

4 CONCLUSÃO

Como principais conclusões deste trabalho, destacam-se:

O método de suspensão foi eficiente para a preparação do complexo de inclusão do TMP/RAMEB, bem como a cinética de complexação, que ajudou na determinação do tempo necessário para a formação do complexo.

Através dos estudos em solução, pelo método da solubilidade de fases, pôde-se observar um aumento significativo da solubilidade do TMP em presença da RAMEB e verificar que a mudança de pH contribui ainda mais para o incremento da solubilidade. No que concerne, ainda sobre a mudança de pH esta tem efeito sobre os valores da constante de estabilidade do complexo, sendo este valor menor para o meio ácido do que em água. Contudo esta diminuição do valor de K_C foi acompanhada pelo aumento da solubilidade do TMP, isto resulta em uma maior eficiência de complexação o que traz um resultado positivo para o complexo formado.

A variação da temperatura também demonstrou mudanças nos valores de K_C , onde em 45°C o complexo formado apresenta maior estabilidade devido aos valores de K_C serem mais elevados comparados com os valores referentes à temperatura ambiente. Outra informação também observada é a mudança dos perfis das isotermas de solubilidade

A estequiometria de 1:1 do complexo foi estabelecida pela isoterma de solubilidade (perfil A_L em tampão acetato) e pelo método de JOB.

Diante dos resultados expostos o melhor meio para a formação do complexo de inclusão foi o em tampão acetato e em temperatura ambiente.

O estudo do complexo em fase sólida permitiu concluir que houve encapsulamento do TMP na RAMEB. Através das técnicas de análise térmica, observou-se um aumento da estabilidade térmica do fármaco quando complexado, este fato evidencia de maneira indireta a formação do complexo. Pela análise do DRX onde

se percebeu uma amorfização do TMP quando encapsulado, como efeito do método de isolamento.

O espectro de RMN foi conclusivo para a verificação da formação do complexo, pois sugerem o encapsulamento do fármaco pela cavidade mais larga da CD, e a entrada do TMP pelos grupos metoxis, sendo um encapsulamento de forma parcial.

VI BIBLIOGRAFIA

ABSBAHR, A, C, C. Obtenção e caracterização de complexos binários e ternários de finasterida. Curitiba, 2008. Dissertação de mestrado. Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Paraná.

ALUAS, M; SOICA,C; GYÉRESI, Á; DEHELEAN, C *et al.* Physico-Chemical Analysis of Binary complexes of furosemide and randomly methylated β cyclodextrin. **Rev. Chim.** 58, p. 891-894, 2007.

AMIDON, G, L; LENNERNAS, H; SHAH, V,D *et al.* A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification; the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical Research.** 12, p. 413-420, 1995.

ARAÚJO, M,V,G. Química supramolecular: complexos de inclusão de fármacos anti-toxoplasmose em derivado de ciclodextrina. São Cristóvão, 2007. Dissertação de mestrado. Departamento de Química. Universidade Federal de Sergipe.

ATKINS, P; PAULA, J. Físico-Química. Vol3, LTC. Ed.S.A, 2004.

BEKERS, O; UITENDAAL, E; BEIJNEN, J, H *et al.* Cyclodextrins in the pharmaceutical Field. **Drug Development and Industrial Pharmacy.**17, p. 1503-1549, 1991.

BRAMANTI, G; SORRENTI, M. Interations of ketoprofen and ibuprofen with β CD in solution and in the solid stade. **Int. J. Pharm.** 166, p.189-203, 1998.

BREWSTER, M, E ; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical excipients. **Pharm. technol. Eur.** 5, p. 26-34, 1997.

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

BUDAL, R, M. Estudos de formação de complexos de inclusão em ciclodextrinas. Santa Catarina, 2003. Tese de Doutorado. Instituto de Química. Universidade Federal de Santa Catarina.

CALDERINI, A. Encapsulação e caracterização físico-química do fármaco vasodilatador minoxidil em ciclodextrinas. Campinas, 2006. Dissertação de mestrado. Instituto de Química, UNICAMP.

CAO, F; GUO, J; PING, Q. The physicochemical characteristics of freeze-dried scutellarin-cyclodextrin tetracomponent complexes. **Drug. Dev. Ind. Pharm.** 31, p. 747-756, 2005.

CLINICA MÉDICA. Sulfonamidas e Trimetoprim. Disponível em: <<www.clinicamedica.com.br>> acessado em 25/08/2009.

CONNORS, K, A. Measurement of cyclodextrin complex stability constants. **Comprehensive supramolecular chemistry (part II)**. 3, p. 205-241, 1996.

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

CORDEIRO, G, A. Desenvolvimento de metodologias espectroscópicas multivariadas. Disponível em: <www.ccs.ufsc.br/farmacia/tccgenerica/sulfametoxazol> acessado em 15/07/2009.

DAVIS, M,E; BREWSTER,M,E. Cyclodextrin-based pharmaceutis: past, present and future. **Nat. Rev. Drug Discov**, 3, p.1023-1035, 2004.

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

EGYED, O. Spectroscopic Studies on beta-cyclodextrin , Vibrat. **Spectrosc.** 1,225, 1990.

FERNANDES, C, M; VEIGA, F. As ciclodextrinas na tecnologia farmacêutica I, produção, estrutura e propriedades. **Rev. Cienc. Farm.** 20, p. 335-351, 1999.

FLORES, E, M, M *et al.* Simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in Power transform infrared and multivariate calibration. **J. Pharm. Bio. Analysis.** 49, p. 800-805, 2009.

FRACETO, L, F *et al.* Propriedades e caracterização de complexos de inclusão entre anestésicos locais e HP β CD. **Quim Nova.** 30, p. 777-784, 2007.

FROMMING, K, H; SZETLEI, J. Preparation and characterization on of cyclodextrin complexes. **Cyclodextrins in Pharmacy.** 5, p. 83, 1994.

HIGUCHI, T; CONOORS, K. Phase-solubility techniques. **Adv. Ana. Chem. Inst.** p. 117-212, 1965.

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

INOUE, Y; HAKUSHI, T; TENH, L, H. **J. AM. Chem. Soc.** p. 115-475, 1993.

JESUS, M, B; PINTO, L, FRACETO, L, F *et al.* **J.Pharm. Biom.**41, p.1428, 2006.

JUG,M; KOS, T; LACÁM, B, M. The pH dependent complexation between risperidone and HP β CD. **J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.** 64, p. 163-171, 2009.

KITAGAWA, M *et al.* A molecular orbital study of cyclodextrin complexes I. The calculation of the dipole moments of α -cyclodextrin-aromatic guest complexes bull. **Chem. Soc. Jpn.** 61, p. 4225-4229, 1988.

LAZÁRO, G, S. Estudo espectroscópico da interação de Pirimetamina e Sulfadiazina com sistemas modelos. São Cristóvão, 2006. Dissertação de mestrado, Departamento de Química, Universidade Federal de Sergipe.

LI, N *et al.* Inclusion complexo f trimethoprim with β -cyclodextrin. **J. Pham. Bio. Anal.** 39, p. 824-829, 2005.

LI, N *et al.* . Study of the physicochemical proprieties of trimethoprim with β -cyclodextrin in solution. **J. Pharm. Bio. Anal.** 38, p. 370-374, 2005.

LI, N *et al.* . Solubilization of flavoperidol by pH control combined with cosolvents, surfactans or complexants. **J. Pham. Sci.** 88, p. 945-947, 1999.

LOFTSSON, T. Effects of cyclodextrins on the chemical stability of drugs in aqueous solutions. **Drug stability.** 1, p. 22-33, 1995.

LOFTSSON, T; BREWSTER, M, E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. Drug solubilization and stabilization. 85, p.1017-25, 1996.

LOFTSSON ,T; MÁSSON, M; BREWSTER, M.E. Self-association of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. **J. Pharm. Sci.** 93, p.1091-1099, 2004.

LOFTSSON,T; BREWSTER, M, E. Role of cyclodextrin in improving oral drug delivery. **Am. J. Drug. Delivery.** 2, p. 1-15, 2004.

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

LOFTSSON, T; HREINPÓTTIR, D. Determination of aqueous solubility by heating and equilibration. **A tech. Note. AAPS. Pharm. Sci. Tech.** 7, article 4, 2006.

LOFTSSON,T; DUCHERE, D. Cyclodextrin na their pharmaceutical applications. **In J. Pharm.** 329, p.1-11, 2007.

LOUKAS, Y, L. Multiple Complex Formation of Unstable Compounds with Cyclodextrins: Efficient Determination and Evaluation of the Binding Constant with Improved Kinetic Studies. **Analyst.** 122, p. 377-381, 1997.

LOUKAS, Y, L . Evaluation oh the methods for the determination of stability Constant of cyclodextrin-chlorambucil inclusion complexes. **J. Phamaceutical and biomedical Analysis**. 16, p. 275-280, 1997.

MAESTRELLI, F; CECCHI, M; CIRRI,M *et al*. Comparative study of oxaprozin complexation with natural and chemically – modified cyclodextrins in solution and in the solid stade. **J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem**. 63, p. 17-25, 2009.

MANOLIKAR, N, K; SAWANT, M, R. Study of isoproturon by its complexation with β CD. **Chemosphere**. 51, p. 811-816, 2003.

MARTINS, F. Estudo do processo de encapsulação do bioma de gorgonzola em β -ciclodextrina em lipossomas. Campinas, 2003. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP.

MELO,N,F,S; GRILLO, R; MORAIS, C, M *et al*. Preparação e caracterização inicial do complexo de inclusão entre a nitrofurazona e 2HP β CD. **Rev. Farm. Básica e Apli**. 28, p.35-44, 2007.

MONTEIRO, J, L; CAMPOS, S, B; SEGURO, A, C. Efeitos renais do trimetoprim e sulfametoxazol. **Rev. Bras. Nefrol**. 19, p. 276-279, 1997.

MURA, P; MAESTRELLI, F; CIRRI, M. Ternary systems of naproxin with HP β CD and amonoacids. **J. Pharm. Sci**. 260, p. 293-302, 2003.

MURA, P *et al*. Diferencial scanning calorimetry as analytical tool in the study of drug-cyclodextrin interactions.73, p. 635-646, 2003.

QUINLIVAN, E, P *et al*. Mechamism of the antimicrobial drug trimethoprim revisited. **FASED, J**. 14, p. 2519-2524, 1999.

RAMA,A,C; RIBEIRO,C; VEIGA,F *et al*. Biopharmaceutical aspects of drug formulation for neonatology: rational for indomethacins complexation with HP β CD to treat patent ductus arteriosus. **Rev. Bras. Cienc. Farm**. 41, p. 281-299, 2005.

RAMA, A, C,R; VEIGA, F; FIGUEIREDO, I,V *et al.*Complexos de inclusão de indometacina com HP β CD. Estudos de dissolução e coeficiente de partição. **Ver. Bras. Cienc. Farmaceuticas.** 42, 2006.

REKHARSKY, M, V; INOUE, Y. **Chem. Rev.** 98, p. 1875, 1998.

RIBEIRO, A. O. Interação entre α -ciclodextrina e compostos de terras raras luminescentes. Ribeirão Preto, 2002. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto.

RIBEIRO, A. O. Estudo da interação entre sistemas luminescentes e α e β - ciclodextrina em solução aquosa. Ribeirão Preto, 2004. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto.

RIBEIRO,L; LOFTSSON, T; FERREIRA, D *et al.*Investigation and physicochemical characterization of vinpocetine-sulfobutyleter- β -CD binary and ternary complexes. **Chem. Pharm. Bulletin.** 51, p. 914-922, 2003.

SAENGER, W; LINDNER, K. Crystal and molecular struture of cyclohepta – amylose dodecahydrate. **Carbohydrate Research.** 99, p. 103-115, 1982.

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

SHIMPI, S *et al.* Cyclodextrins: Applications in different routes of drug administration. **Acta. Pharm.** 55, p. 139-156, 2005.

SILVA, N. P. J. Avaliação de processos para obtenção de comprimidos de β -ciclodextrina paracetamol. Araraquara, 2006. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. UNESP.

SKOOG, A,S; HOLLLER, F, J; NIEMAN, T, A. Princípio de Análise Instrumental. Porto Alegre; Bookman, 2002.

SILVA, F, E, B; SABIM, G, P; MULLER, E, I. Otimização de método multivariada para quantificação de sulfametoxazol e trimetoprima em medicamentos. **Rev. Produção**. Disponível em:<<www.producaoonline.ufsc.br>> acessado em 30/08/2010.

Spectral Database for Organic Compounds, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Japan, (File 14017) SDBS Disponível em: http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre_index.cgi?lang=eng.

STEJTLEI, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. **Chem. Rev.** P. 1743-1753, 1998.

STEJTLEI, J. Cyclodextrin complexed generic drugs are generally not bio – equivalent with the reference products: therefore the increase in number of marketed drug. **J. Incl. Phenom. Macroc. Chem.** 52, p. 1-11, 2005.

UEKAMA, K; OTAGARINI, M. Cyclodextrin in drug Carrier systems. **Drug Carrier Syst.** 3, p. 140, 1987.

UEKAMA, K; HIRAYAMA, F; IRIE, I. Cyclodextrin drug Carrier systems. **Chem. Rev.** 98, p. 2045-2076, 1998.

VEIGA, F; PECORELLI, C; RIBEIRO, L. As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica. **Minerva Coimbra**, 2006.

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

VETTER, D; THORN, W. Direct enzymes synthesis of linear and branched glucoamitosaccharides, using cyclodextrin-gluconosyltransferase. **Carbohydrate Rev.** 223, p. 61-69, 1992.

ZAMORA, P, P *et al.* Determinação de misturas de sulfametoxazol e trimetoprima por espectroscopia eletrônica multivariada. **Quim Nova.** 31, p. 254-260, 2008.

ZIA, V *et al.* Effect of cyclodextrin charge on complexation of neutral and charged substrates: comparison of sulfobutylether β CD to HP β CD. **Pharm. Rev.** 18, p. 668-673, 2001.