

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

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXO DE
INCLUSÃO ENTRE TRIMETOPRIM E 2-HIDROXIPROPIL-GAMA-
CICLODEXTRINA

OSMIR FABIANO LOPES DE MACEDO

SÃO CRISTÓVÃO – SE
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXO
DE INCLUSÃO ENTRE TRIMETOPRIM E 2-
HIDROXIPROPIL-GAMA-CICLODEXTRINA

OSMIR FABIANO LOPES DE MACEDO

Dissertação de mestrado apresentada ao Núcleo de Pós Graduação em Química da Universidade Federal de Sergipe como requisito para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Luis Eduardo Almeida

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Iara de Fátima Gimenez

SÃO CRISTÓVÃO – SE

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

M141p Macedo, Osmir Fabiano Lopes de
Preparação e caracterização de complexo de inclusão entre trimetoprim e 2-hidroxiopropil-gama-ciclodextrina / Osmir Fabiano Lopes de Macedo. – São Cristóvão, 2010.
60 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Química) – Núcleo de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de Sergipe, 2009.

Orientador: Prof. Dr. Luis Eduardo Almeida.
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Iara de Fátima Gimenez

1. Química física. 2. Solução aquosa. 3. Infecções - Tratamento. 4. Trimetoprim. 5. Hidroxiopropil-gama-ciclodextrina. 6. Complexo de inclusão. I. Título.

CDU 54-145.2

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

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado de Osmir Fabiano Lopes de Macedo apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Sergipe, em 22/02/2010.

Iara de Fátima Gimenez

**Profa. Dr^a Iara de Fátima Gimenez
DQI, UFS**

Carlos Alberto Montanari

**Prof. Dr. Carlos Alberto Montanari
Instituto de Química de São Carlos, USP**

Rogéria de Souza Nunes

**Prof.^a Dr^a Rogéria de Souza Nunes
DFS, UFS**

*Dedico este trabalho a duas pessoas Nilda e Osmir,
que não mediram esforços para realização dos meus
sonhos, que me guiaram pelos caminhos corretos, me
ensinaram a fazer as melhores escolhas, me mostraram
que a honestidade e o respeito são essenciais à vida.
A eles devo a pessoa que me tornei, sou extremamente
feliz e tenho muito orgulho por chamá-los de pai e mãe.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser meu refúgio e minha fortaleza, socorro bem presente nos momentos de angústia, e que há dois anos conheci verdadeiramente como meu salvador e redentor.

Aos meus pais Nilda e Osmir pelo amor ágape (incondicional) e aos meus irmãos Fabrício e Fabíola.

À minha namorada (noiva) Lia que sempre presente, acreditou em mim e me deu forças para prosseguir.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luis Eduardo Almeida pela oportunidade de conhecer o campo da ciência, aos conselhos, as broncas (poucas) e à paciência de me orientar.

À Prof^a. Dr^a. Iara de Fátima Gimenez que me “adotou” como seu orientando, pela confiança e sugestões muito valiosas para este trabalho, além de ser a “confidente” em alguns momentos.

Aos companheiros de laboratório Thiago, Paula, Cristiane, George, Danilo, Daniela e Liliane.

Aos amigos Danielle Barros, Juliana, Ricardo e Alberto, e aos que se tornaram também de mestrado Wesley “pastor” e Débora.

Aos professores do DQI/UFS, aos técnicos sempre de mãos estendidas, Dona Elisa, Dona Edinalva, Jane e Ismael.

Agradeço ainda à Dra. Leila S. Conegero, ao Prof. Dr. Italo O. Mazali pelas medidas realizadas no IQ-Unicamp e à Genelane C. Santana pela grande ajuda.

A Capes e ao CNPQ pelo apoio financeiro.

"Tristes tempos os nossos, é mais fácil desintegrar um átomo que um preconceito".
Albert Einstein

CURRICULLUM VITAE

1 - Formação Acadêmica:

Mestrado em Química pela Universidade Federal de Sergipe.

Título: Preparação e Caracterização de Complexo de Inclusão entre Trimetoprim e 2-hidroxiopropil-gama-ciclodextrina, sob orientação do Prof. Dr. Luis Eduardo Almeida.

Palavras-chave: ciclodextrina, Trimetoprim, complexo de inclusão, Sistemas de Transporte de Fármacos.

Graduação em Química Licenciatura pela Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão/SE, 2007.

Título: Contextualização no ensino de Química: As propriedades específicas da matéria através do tema água, sob orientação da ProfMsc. Ângelo F. Pitanga.

2 - Resumos Apresentados em Congressos Internacionais: 1

3 - Resumos Apresentados em Congressos Nacionais: 3

4 – Artigos Publicados: 2

- Experiência Profissional:

Universidade Federal de Sergipe.

Função: Professor Substituto

Disciplinas: Química I (2008/1-2008/2-2009/1), Química Inorgânica (2009/1)

SUMÁRIO

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| LISTA DE FIGURAS..... | i |
| LISTA DE TABELAS..... | v |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS..... | vi |
| RESUMO..... | vii |
| ABSTRACT..... | viii |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O USO DE SISTEMAS CARREADORES DE FÁRMACOS..... | 1 |
| 1.2. CICLODEXTRINAS..... | 3 |
| 1.3. HISTÓRICO..... | 4 |
| 1.4. PROPRIEDADES DAS CICLODEXTRINAS..... | 4 |
| 1.5. MODIFICAÇÕES QUÍMICAS NAS ESTRUTURAS DAS CDS..... | 8 |
| 1.6. COMPLEXOS DE INCLUSÃO..... | 10 |
| 1.7. MECANISMO DE COMPLEXAÇÃO..... | 11 |
| 2. TÉCNICAS PARA PREPARAR COMPLEXOS DE INCLUSÃO..... | 13 |
| 3. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS..... | 13 |
| 4. TÉCNICAS PARA DETECÇÃO DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO..... | 14 |
| 5. TRIMETOPRIM..... | 16 |
| 5.1. PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS..... | 16 |
| 6. OBJETIVOS..... | 18 |
| 6.1. OBJETIVOS GERAIS..... | 18 |
| 6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 18 |
| 7. PARTE EXPERIMENTAL..... | 19 |
| 7.1. MATERIAIS..... | 19 |
| 7.2. DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE DO TMP..... | 19 |
| 7.3. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS ESPECTROCÓPICOS (ϵ e λ MÁX) DO TMP..... | 19 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 7.4.DETERMINAÇÃO DO VALOR DE pKa..... | 20 |
| 7.5.CINÉTICA DE FORMAÇÃO DO COMPLEXO HP- γ -CD/TMP..... | 20 |
| 7.6. ESTUDO DA SOLUBILIDADE DE FASES – COMPLEXO: HP- γ - CD/TMP..... | 21 |
| 7.7. DETERMINAÇÃO DA ESTEQUIOMETRIA DOS COMPLEXOS (MÉTODO DAS VARIAÇÕES CONTÍNUAS)..... | 21 |
| 7.8. CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO POR ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIE (FTIR)..... | 22 |
| 7.9. CARACTERIZAÇÃO POR ANÁLISE TÉRMICA..... | 22 |
| 7.10.CARACTERIZAÇÃO POR DIFRATOMETRIA DE RAIOS-X..... | 22 |
| 7.11.CARACTERIZAÇÃO POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)..... | 22 |
| 8. RESULTADOS E DISCUSSÕES..... | 23 |
| 8.1. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS ESPECTROSCÓPICOS DO TMP..... | 23 |
| 8.2. DETERMINAÇÃO DO pKa DO TMP..... | 27 |
| 8.3. CINÉTICA DE FORMAÇÃO DO COMPLEXO HP- γ -CD/TMP..... | 29 |
| 8.4. CÁLCULO DA CONSTANTE DE ASSOCIAÇÃO DO COMPLEXO HP- γ - CD/TMP UTILIZANDO ISOTERMAS DE SOLUBILIDADE..... | 30 |
| 8.5. ESTUDOS DA ESTEQUIOMETRIA DO COMPLEXO (MÉTODO DAS VARIAÇÕES CONTÍNUAS)..... | 36 |
| 9. CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO..... | 38 |
| 9.1. CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS EM SOLUÇÃO..... | 38 |
| 9.2. ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO (IV)..... | 39 |
| 9.3. ANÁLISES TÉRMICAS..... | 43 |
| 9.3.1. ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)..... | 43 |
| 9.3.2. CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)..... | 46 |
| 9.4. DIFRATOMETRIA DE RAIOS-X..... | 49 |
| 9.5. ESPECTROSCOPIA RMN ¹ H..... | 52 |
| 10. CONCLUSÕES..... | 57 |
| 11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 59 |

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Molécula da α -D-glucopiranosose na conformação cadeira com as posições 1 e 4 indicadas pelas setas.

Figura 2: Estruturas: a) α -ciclodextrina, b) β -ciclodextrina c) γ -ciclodextrina.

Figura 3: Representação da α -ciclodextrina em forma de cone oco, truncado, com os grupos hidroxilas localizados nas aberturas do cone.

Figura 4: Representação dos diâmetros internos e altura dos cones das Ciclodextrinas.

Figura 5: Sítios de modificação mais freqüentes na γ -ciclodextrina.

Figura 6: Estruturas da 2-hidroxiopropil-gama-ciclodextrina (n=6 e R=-CH₂CHOHCH₃).

Figura 7: Exemplo da inclusão de uma molécula de (p-xileno) na CD em meio aquoso.

Figura 8: Estrutura molecular plana do TMP.

Figura 9: Espectros de absorção óptica do TMP em solução aquosa a diferentes valores de pH.

Figura 10: Curvas de calibração do TMP obtidas através da espectroscopia de absorção. (★) água $\lambda = 278$ nm e R = 0,99975.

Figura 11: Curva de calibração do TMP obtidas através da espectroscopia de absorção. (■) pH 4,0, $\lambda = 271$ nm e R = 0,99926.

Figura 12: Curvas de calibração do TMP obtidas através da espectroscopia de absorção. pH 7,0, $\lambda = 280$ nm e $R = 0,99916$.

Figura 13: Curvas de calibração do TMP obtidas através da espectroscopia de absorção. pH 9,0, $\lambda = 287,5$ nm e $R = 0,99976$.

Figura 14: Dependência da absorção em 287,5 nm do TMP ($4,5 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹) em função do pH.

Figura 15: Curva cinética de complexação HP- γ -CD/TMP.

Figura 16: Diagramas de solubilidade tipos A e B.

Figura 17: Diagrama de solubilidade em água obtidas através da espectroscopia de absorção. (■) 20°C $R = 0,99661$.

Figura 18: Diagrama de solubilidade em água obtidas através da espectroscopia de absorção. (●) 25°C $R = 0,99843$.

Figura 19: Diagrama de solubilidade em água obtidas através da espectroscopia de absorção. (▲) 35 °C.

Figura 20: Diagramas de solubilidade em meio tamponado obtido através da espectroscopia de absorção. (■) pH 4,0, $\lambda = 271$ nm e $R = 0,99883$.

Figura 21: Diagramas de solubilidade em meio tamponado obtido através da espectroscopia de absorção. (●) pH 7,0, $\lambda = 280$ nm e $R = 0,98409$.

Figura 22: Diagramas de solubilidade em meio tamponado obtido através da espectroscopia de absorção. (▲) pH 9,0, $\lambda = 287,5$ nm e $R = 0,99122$.

Figura 23: Gráfico obtido pelo método das variações contínuas (JOB'S PLOT) do complexo HP- γ -CD)/TMP.

Figura 24: Espectro de Absorção na região do UV para uma solução de TMP em água (---) e para o complexo HP- γ -CD/TMP em água (---)

Figura 25: Espectro de fluorescência para uma solução de TMP em água (---) e para o complexo HP- γ -CD/TMP em água (---)

Figura 26: Espectro infravermelho do fármaco TMP.

Figura 27: Espectro infravermelho da HP- γ -CD.

Figura 28: Espectro infravermelho do complexo de inclusão HP- γ -CD/TMP liofilizado.

Figura 29: Espectro infravermelho do TMP comparado com o espectro do complexo de inclusão HP- γ -CD/TMP liofilizado.

Figura 30: Curvas de TGA do TMP (---) Perda de Massa (%) versus Temperatura ($^{\circ}$ C) e (---) Derivada da Massa ($\%/^{\circ}$ C) versus Temperatura ($^{\circ}$ C).

Figura 31: Curvas de TGA do TMP; HP- γ -CD; Complexo HP- γ -CD/TMP obtido por liofilização (a) Massa (%) versus Temperatura ($^{\circ}$ C).

Figura 32: Curvas de TGA do TMP; HP- γ -CD; Complexo HP- γ -CD/TMP obtido por liofilização; Derivada da massa ($\%/^{\circ}$ C) versus Temperatura ($^{\circ}$ C).

Figura 33: Curva de DSC do fármaco TMP.

Figura 34: Curva de DSC da HP- γ -CD liofilizada.

Figura 35: Curva de DSC do complexo HP- γ -CD/TMP obtido por Liofilização.

Figura 36: Curvas de DSC do TMP e do complexo HP- γ -CD/TMP obtido por Liofilização.

Figura 37: Difratoformas de Raios-X do TMP.

Figura 38: Difratoformas de Raios-X da HP- γ -CD.

Figura 39: Difratoformas de Raios-X do complexo HP- γ -CD/TMP obtido por Liofilização.

Figura 40: Difratoformas de Raios-X do TMP e do complexo de inclusão HP- γ -CD/TMP obtido por Liofilização.

Figura 41: Espectro ^1H RMN unidimensional do TMP.

Figura 42: Espectro ^1H RMN unidimensional do HP- γ -CD.

Figura 43: Espectro ^1H RMN unidimensional do Complexo HP- γ -CD/TMP liofilizado.

Figura 44: Espectro ROESY ^1H RMN do Complexo HP- γ -CD/TMP.

Figura 45: Ampliação da região demarcada na figura 44.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dimensões das CDs.

Tabela 2: Coeficiente de absorvidade molar das soluções de TMP em água e nas soluções tampão pH 4,0, 7,0 e 9,0.

Tabela 3: Valores médios das concentrações utilizadas para construção do diagrama de solubilidade em meio aquoso.

Tabela 4: Valores médios das concentrações utilizadas para construção do diagrama de solubilidade em meio tamponado.

Tabela 5: Valores de número de onda e atribuições de bandas nos espectros FTIR para o sistema HP- γ -CD /TMP.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CD - Ciclodextrina

CGtase - Enzima ciclodextrina glicosiltransferase

α -CD - Alfa Ciclodextrina

β -CD - Beta Ciclodextrina

γ -CD - Gama Ciclodextrina

CDs - Ciclodextrinas

HP- γ -CD -2-hidroxiopropil-gama-ciclodextrina

UV/vis- Região espectral desde o ultra-violeta ao visível

RMN- Ressonância Magnética Nuclear

IV- infravermelho

TMP- Trimetoprim

UV- Ultravioleta

FTIR- Infravermelho com transformada de Fourier

TG- Análise termogravimétrica

DSC- Calorimetria diferencial de varredura

HP- γ -CD/TMP- Complexo de inclusão do Trimetoprim em 2-Hidroxiopropil-gama-Ciclodextrina

RESUMO

Este trabalho envolveu a preparação e caracterização de complexo de inclusão entre Trimetoprim (TMP), substância utilizada no tratamento de infecções, em hidroxipropil- γ -ciclodextrina (HP- γ -CD), objetivando o aumento da solubilidade aquosa do convidado. A baixa solubilidade do TMP torna necessário o uso de altas dosagens, causando diversos efeitos colaterais, que em testes futuros poderão ser reduzidos pelo aumento da solubilidade do mesmo. Determinaram-se, inicialmente, alguns parâmetros físico-químicos do fármaco e, posteriormente, preparou-se o complexo do mesmo em HP- γ -CD pelo método da suspensão. A ocorrência de inclusão foi evidenciada através do aumento da solubilidade do convidado em presença de HP- γ -CD, nos estudos do diagrama de solubilidade de fases em diferentes temperaturas e pH. Obteve-se, ainda a partir destes estudos, valores de $220,7 \text{ M}^{-1}$ a 20°C e $144,7 \text{ M}^{-1}$ a 25°C e 55410 M^{-1} para pH 4,0; 2188 M^{-1} para pH 7,0 e 123 M^{-1} para pH 9,0 para a constante de associação do complexo, demonstrando interações relativamente fortes. A estequiometria 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 calorimetria diferencial de varredura (DSC), que sugeriu que o TMP não se encontra como um sólido isolado. As análises dos difratogramas obtidos mostraram perda do padrão de ordenamento cristalino do TMP quando comparado ao difratograma do complexo, o que pode também ter resultado do processo de liofilização. A partir da análise por espectroscopia infravermelho, observou-se a presença de bandas de ambas as espécies (hospedeiro e convidado) no espectro da amostra HP- γ -CD/TMP coletada por liofilização. Contudo, diferenças observadas quanto a intensidades relativas e mascaramento de bandas não evidenciam diretamente a formação do complexo, porém não excluem tal possibilidade. De acordo com os resultados de espectroscopia de RMN ^1H - ^1H bidimensional (ROESY), ficou evidenciada a inclusão do TMP na cavidade da HP- γ -CD, mostrando adicionalmente que a entrada na cavidade se dá através do grupo trimetoxifenila.

ABSTRACT

This work involved the preparation and characterization of an inclusion complex of Trimethoprim (TMP) –a drug used in the treatment of infections– and hydroxypropyl-gamma-cyclodextrin (HP- γ -CD). Owing to the low aqueous solubility of this drug, high dosages are required to provide a satisfactory therapeutic effect, although this also brings severe side effects to some patients. Thus here we aimed to increase the TMP aqueous solubility in order to potentially reduce the side effects by complexation in a CD derivative. Prior to the inclusion study, some relevant physicochemical parameters of the drug such as pKa, solubility in several pH values as well as absorption coefficient were determined. The inclusion complex has been prepared by the suspension method and collected by lyophilization. Primary evidence of the inclusion of TMP in HP- γ -CD was provided by the increase of the solubility in presence of HP - γ - CD, from the phase-solubility diagram obtained at different temperatures and pH values. The apparent stability constants $K_{1:1}$ for the complex formed at different temperatures and pH values were found strongly depend on the conditions, being higher at low pH. A 1:1 stoichiometry was suggested for the complex both from the phase-solubility diagram and from the continuous variation method. Additional evidences of the inclusion were provided by thermal analysis (DSC), which suggested that TMP is not present in the sample as an isolated crystalline solid. The XRD analysis evidenced the loss of the TMP crystalline character in the complex, which is commonly observed for CD complexes but may be also a consequence of the lyophilization process. The presence of bands characteristic of both species was observed in the infrared spectrum of the complex. Although differences observed in the relative intensities cannot directly evidence complex formation, they don't exclude this possibility. Direct evidence of TMP inclusion in the CD cavities were given from ^1H - ^1H bidimensional ROESY spectrum, which also showed that the inclusion mode involves penetration of the trimethoxyphenyl group in HP- γ -CD.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais sobre o uso de sistemas carreadores de fármacos.

Os princípios ativos dos medicamentos correspondem apenas a uma fração do arsenal terapêutico existente e à disposição da classe médica para o tratamento de doenças. Teoricamente, os fármacos deveriam ser administrados especificamente apenas nos locais onde são necessários, na dosagem e no tempo correto. [1]

A ciência e a tecnologia envolvidas na obtenção de novos fármacos, sejam sintéticos ou de fontes naturais, para o tratamento de várias doenças, tiveram grande desenvolvimento e continuam em evolução. Porém, além dos custos cada vez maiores relacionados ao desenvolvimento de fármacos, principalmente às rotas sintéticas, a sua forma de administração aos pacientes tem sido mantida inalterada ao longo dos anos, sendo pouco eficiente e produzindo, em muitos casos, efeitos colaterais indesejáveis e danosos ao organismo. [1]

Em geral, todos os fármacos apresentam certo grau de toxicidade exigindo que a quantidade a ser administrada seja mínima, para não causar danos ainda maiores ao organismo e, ao mesmo tempo, suficiente para atingir as células alvo, após serem absorvidos por outros tecidos ou órgãos, metabolizados, diluídos no sangue ou excretados. [1]

Sendo assim, um dos objetivos básicos da química terapêutica é enviar a substância medicinal específica e eficientemente ao local da doença ou distúrbio. Algumas vezes, isto pode ser alcançado pela administração do fármaco em forma pura ou livre mediante via oral (comprimidos, cápsulas, emulsões, suspensões, soluções, etc.), nasal, ocular, retal, intramuscular, endovenosa, subcutânea, etc. Porém em muitos casos, sua eficácia pode ser melhorada encapsulando-o em algum tipo de carreador. [2]

Teoricamente, este deverá disponibilizar o fármaco em concentração adequada, no tempo correto e apenas no local onde é necessário, reduzindo a quantidade a ser administrada, sua perda, degradação e a ocorrência de efeitos adversos. Deve ser acrescentado a estes fatos que, do ponto de vista dos pacientes, é mais conveniente, por exemplo, dispor de um medicamento cuja posologia seja a menor possível. Os sistemas para liberação sustentada/prolongada de fármacos oferecem várias vantagens em relação às maneiras convencionais de administração. Tendo em vista que a grande maioria dos

fármacos apresenta um intervalo estreito de concentração terapêutica, acima do qual é tóxico e abaixo do qual é ineficaz, isto é preocupante caso a dose que possibilita um tratamento eficiente esteja próxima à dose tóxica. Assim, o objetivo de um sistema projetado para fazer a liberação sustentada/prolongada de fármacos é manter sua concentração entre esses dois níveis por um tempo longo, sendo administrado, se possível, em apenas uma dosagem. [2]

Por estas razões, a encapsulação de fármacos em veículos que possam atuar como carreadores minimizando os efeitos colaterais é de grande interesse científico, medicinal e comercial. A escolha adequada do carreador oferece a possibilidade de alterar sua biodistribuição nos tecidos doentes. O alcance desses alvos pode ser facilitado pela associação do fármaco com carreadores específicos, abrindo caminho para uma melhora qualitativa e quantitativa da química terapêutica. Ao lado de lipossomas, micro/nanoesferas e micro/nanocapsulas, as ciclodextrinas (CDs) constituem um dos tipos de carreadores importantes para a encapsulação e liberação sustentada de fármacos *in vivo*. [1]

A utilização das CDs naturais e de seus derivados sintéticos vem sendo extensivamente estudada visando a melhoraria das propriedades de alguns fármacos, como solubilidade, estabilidade química e/ou biodisponibilidade. A intensificação da atividade do fármaco, a transferência seletiva e a redução dos efeitos colaterais têm sido atribuídas à formação de complexos de inclusão entre as moléculas do fármaco e as moléculas de ciclodextrina. [1-3] Além disso, a combinação adequada da encapsulação molecular em CDs naturais ou sinteticamente funcionalizadas, com outros sistemas carreadores (como os lipossomas) constitui outra ferramenta eficaz no aperfeiçoamento desses sistemas. [1-2]

Sob o aspecto de produção e comercialização, a complexação com CDs possibilita, também, o desenvolvimento de formulações mais simples e o aumento do tempo de validade do produto. Estes benefícios podem ser observados na quantidade crescente de medicamentos cujas formulações são baseadas em CDs. [1-2]

1.2 Ciclodextrinas

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos de origem natural, também conhecidas como cicloamilose ou cicloglucanos, formados por moléculas de D-glicose unidas através de ligações glicosídicas α (1,4) (Figura 1) e obtidos pela degradação enzimática do amido pelo microorganismo *Bacillus macerans*.

A enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) catalisa vários tipos de reações e normalmente produz uma mistura de CDs com números diferentes de unidades de glicose, as mais comuns e importantes sendo as CDs que apresentam seis (α -CD), sete (β -CD) e oito (γ -CD) unidades formando os macrociclos demonstrados na Figura 2.[4]

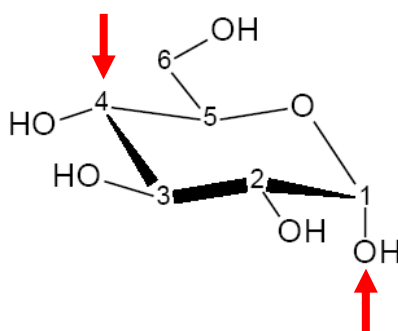


Figura 1- Molécula da α -D-glicopiranosose na conformação cadeira com as posições 1 e 4 indicadas pelas setas.[4]

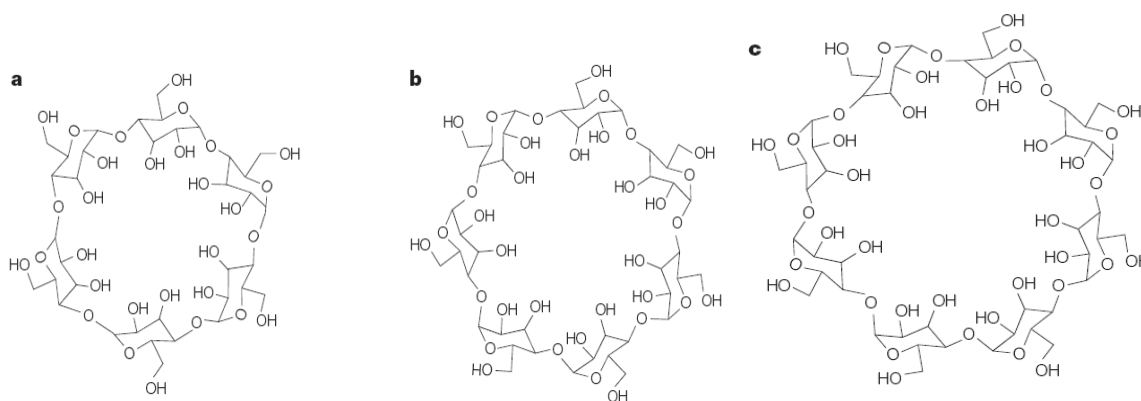


Figura 2 - Estruturas: a) α -ciclodextrina, b) β -ciclodextrina c) γ -ciclodextrina.[4]

1.3 Histórico

As Ciclodextrinas foram isoladas pela primeira vez por Villiers em 1891 como produtos da degradação de amido por *Bacillus macerans*, cultivados em meio rico em amilose. Todo o preparo, o isolamento, a caracterização e a determinação das estruturas dessas substâncias foram realizadas por Schardinger (1903-1911), como oligossacarídeos cíclicos contendo um mínimo de 6 e um máximo de 12 unidades de glicose (em conformação de cadeira) unidas via ligação α -1,4. Os compostos foram chamados de “açúcares de Schardinger”. [5] Após três décadas sem avanços significativos, Freudenberg e colaboradores as descreveram como compostos macrocíclicos constituídos de unidades glicopiranosídeas conectadas através de ligação glicosídica α -(1,4). [5-6]

Em meados dos anos 50, French e Freudenberg ampliaram os conhecimentos a respeito das CDs no que diz respeito a sua produção enzimática, fracionamento e a caracterização de suas propriedades. [5, 6] Cramer, Saenger e outros enfatizaram os estudos na formação de complexos de inclusão entre as CDs e moléculas hóspedes. [5]

Na metade da década de 70, as ciclodextrinas naturais já tinham sido caracterizadas estrutural e quimicamente e muitos complexos tinham sido estudados. Devido à capacidade de complexação, ao baixo custo e as inúmeras vantagens que as CDs apresentam, houve um grande progresso no desenvolvimento de novas tecnologias para sua produção e aplicação.

1.4 Propriedades das Ciclodextrinas

As CDs são cristalinas, não-higroscópicas e apresentam estrutura relativamente rígida em formato de rolha oca (figura 3). As unidades glicopiranosídeas apresentam a conformação C1, estando os grupos hidroxilas ligados aos átomos de carbono C2 e C3 localizados ao redor da abertura maior e os grupos hidroxilas mais reativos (ligados aos carbonos C6), ao redor da abertura menor e opostos aos grupos hidroxilas anteriormente mencionados. A cavidade é delineada pelos átomos de hidrogênio e pelas pontes de oxigênio glicosídicas. Os pares de elétrons não-ligantes do oxigênio estão direcionados para o interior da cavidade, produzindo alta densidade eletrônica e resultando num ambiente com característica de base de Lewis. [4]

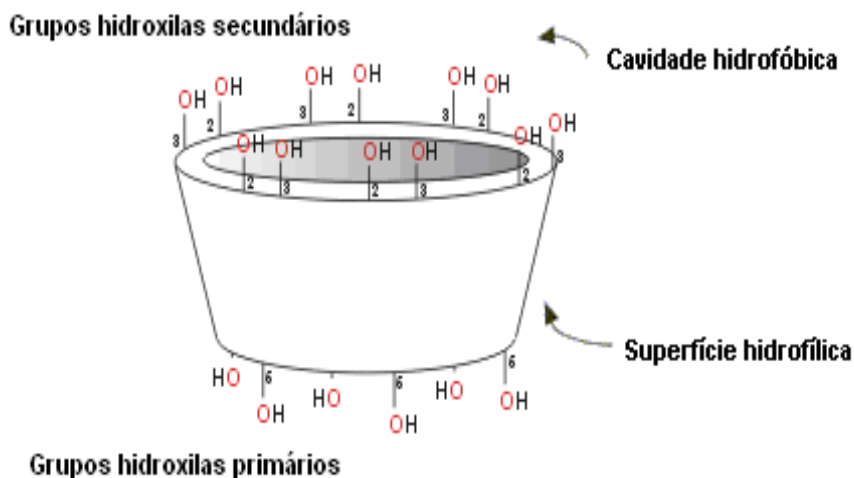


Figura 3 – Representação da α -ciclodextrina em forma de cone oco, truncado, com os grupos hidroxilas localizados nas aberturas do cone. [1]

Bergeron [7] e Saenger [8] estudaram a possibilidade de formação de pontes de hidrogênio entre os grupos OH ligados aos átomos de carbono C2 e C3 e verificaram que a liberdade conformacional do anel macrocíclico é restrita contribuindo para a rigidez do mesmo, seja no estado sólido, seja em solução. Este arranjo força as ligações, das quais participam os átomos de oxigênio, para o interior da cavidade, fazendo com que esta apresente um ambiente hidrofóbico, enquanto a superfície externa é hidrofílica.

Os parâmetros dimensionais das cavidades das ciclodextrinas podem ser observados na Figura 4 e os respectivos valores para α -CD, β -CD e γ -CD estão listados na Tabela I.

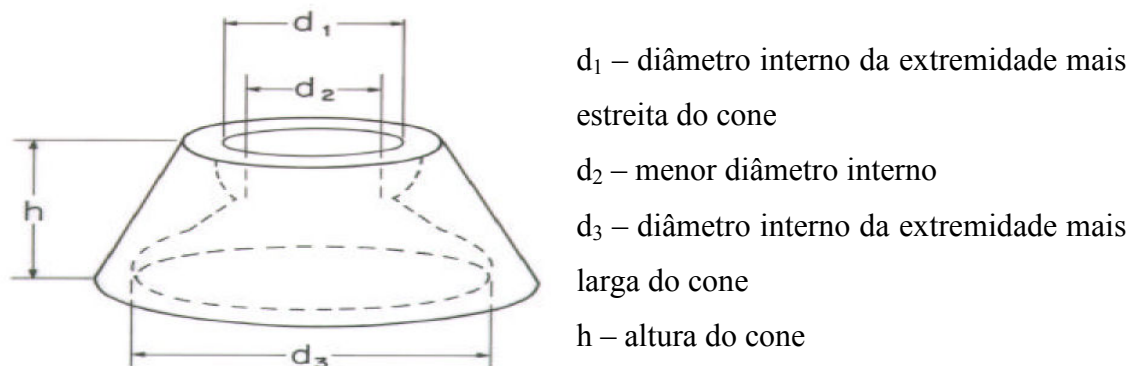


Figura 4 - Representação dos diâmetros internos e altura dos cones das Ciclodextrinas.[9]

Tabela I: Dimensões das CDs. [9]

| CD | d ₁ (Å) | d ₂ (Å) | d ₃ (Å) | h (Å) | Solubilidade / (g/100mL) |
|----------|--------------------|--------------------|--------------------|-------|--------------------------|
| α | 5,6 | 4,2 | 8,8 | 6,7 | 14,5 |
| β | 6,8 | 5,6 | 10,8 | 7,0 | 1,85 |
| γ | 8,0 | 6,8 | 12,0 | 7,0 | 23,2 |

O tamanho da cavidade aumenta com o número de unidades de glicose, porém a altura permanece constante em 6,7-7,0 Å. Apesar desta aparente tendência no aumento de tamanho na série de α -CD, β -CD e γ -CD, a solubilidade não segue esta tendência. A β -CD é consideravelmente menos solúvel em água comparada com as outras CDs. Essa baixa solubilidade provavelmente é causada pela formação de ligações de hidrogênio entre os grupos OH ligados aos átomos de carbono C2 e C3 levando à rigidez da estrutura. Na molécula de α -CD, como uma unidade glicose está numa posição distorcida, somente 4 das 6 possíveis ligações de hidrogênio são estabelecidas. Por outro lado, as unidades de glicose na molécula de γ -CD não são coplanares, a estrutura da γ -CD é mais flexível e, portanto, esta é a mais solúvel das três. [4]

O tamanho da cavidade constitui o fator determinante através do quais as CDs são utilizadas para complexar outras moléculas. Se a espécie a ser investigada tiver dimensões maiores que as da cavidade, ela não consegue entrar completamente na mesma e, se tiver dimensão muito pequena, ela acaba por passar pela cavidade sem ser complexada. O hóspede e o hospedeiro podem se associar sem quaisquer interações específicas, sendo o processo determinado pela forma, isto é, pela estrutura e pelo tamanho da molécula convidada. A molécula de α -CD apresenta menor cavidade sendo, em consequência, incapaz de acomodar moléculas grandes, ao contrário do que ocorre com a β -CD e γ -CD. A β -CD possui cavidade com tamanho adequado para conter uma ou duas moléculas de um grande número de substâncias com atividades farmacológicas,

razão pela qual ela é uma das CDs mais utilizadas no processo de encapsulação de fármacos.

As vantagens de utilização das CDs para entrega de fármacos são: [1]

- a) aumenta a biodisponibilidade;
- b) aumenta a solubilidade;
- c) aumenta a estabilidade através da encapsulação;
- d) aumenta a eficácia e índice terapêutico;
- e) reduz a toxicidade;
- f) diminui os efeitos colaterais e adversos;
- g) melhora os efeitos farmacocinéticos.

Vários fatores determinam o tipo e a natureza da CD necessária para um tratamento terapêutico específico, ou seja, para cada fármaco é possível utilizar uma CD mais adequada. Os fatores que auxiliam nessa escolha são:

- a) natureza química do fármaco;
- b) tamanho da cavidade;
- c) solubilidade;
- d) facilidade de preparação;
- e) possibilidade de co-encapsulação;
- f) eficiência de encapsulação.

1.5 Modificações Químicas nas Estruturas das CDs

As ciclodextrinas naturais apresentam algumas limitações quer devido à sua baixa solubilidade aquosa e em solventes orgânicos, quer devido à toxicidade que apresentam quando utilizadas em preparações parenterais. As características de inclusão das ciclodextrinas naturais podem ser alteradas pela introdução de substituintes nas hidroxilas disponíveis.[10]

O uso de derivados lipofílicos permite que moléculas hidrofílicas possam ser incluídas na cavidade das ciclodextrinas a partir de solventes menos polares do que o interior da cavidade.[11]

As modificações químicas de CDs geralmente são realizadas através da substituição dos grupos hidroxilas por outros grupos na face primária e/ou na face secundária da CD ou da substituição do átomo de hidrogênio dos grupos hidroxilas por exemplo.[12-13] Devido à nucleoficidade dos grupos hidroxilas, as reações que se processam nestes sítios ocorrem predominantemente por ataque eletrofílico. Se o reagente eletrofílico formar um complexo com a CD, então a orientação do reagente dentro do complexo é um fator adicional na determinação da formação do produto. É importante ressaltar que os solventes também influenciam na determinação da força e da orientação do complexo entre o reagente e a CD.[14] Na Figura 5 pode se observar os sítios de modificação mais freqüentes nas hidroxilas das ciclodextrinas, que são os carbonos 2, 3 e 6 de cada unidade de glicose que compõe as CDs. As modificações partindo das CDs naturais originaram as chamadas CDs de segunda geração.

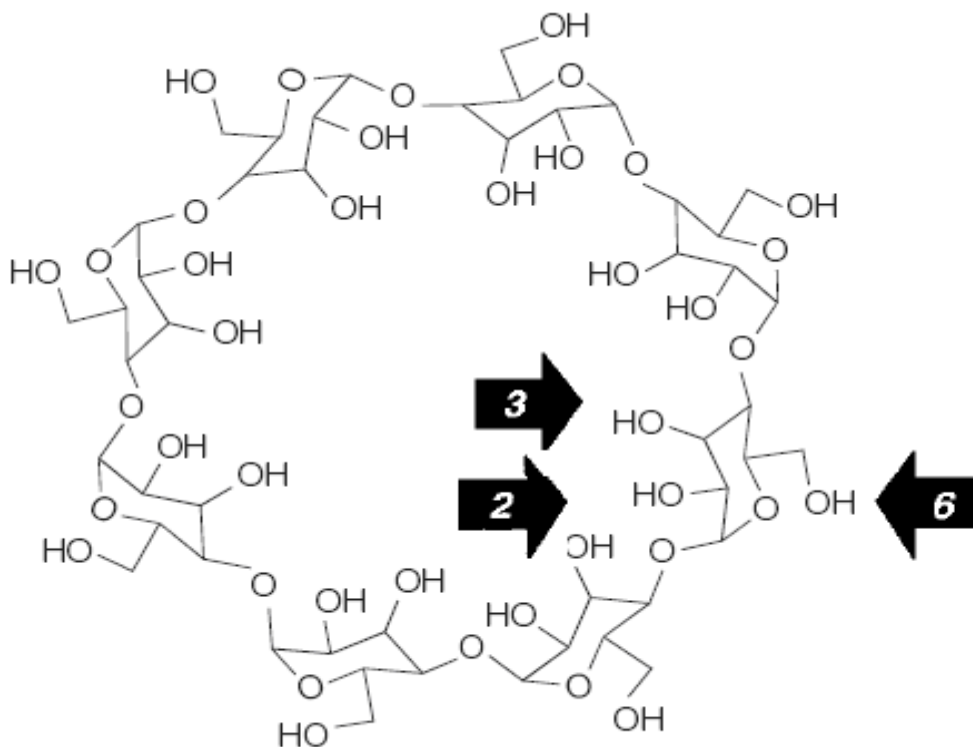


Figura 5 - Sítios de modificação mais frequentes na γ -ciclodextrina. [4]

As hidroxilas da posição 2 são as mais ácidas, aquelas na posição 3 são as mais impedidas espacialmente e as hidroxilas na posição 6 são as mais susceptíveis ao ataque por parte de reagentes eletrofílicos. [1] Neste contexto, vale destacar que dependendo da reatividade do reagente eletrofílico, essa substituição pode ocorrer nas duas faces da CD: um reagente muito reativo não irá discriminar as hidroxilas, enquanto que aqueles menos reativos somente atacam as hidroxilas mais reativas.

A 2-hidroxipropil-gama-ciclodextrina – HP- γ -CD (Figura 6) é um derivado hidroxialquilado da γ -ciclodextrina, que equilibra a habilidade de encapsulamento com uma elevada solubilidade em água ($> 500 \text{ mg.mL}^{-1}$), provavelmente atribuída à sua estrutura não-cristalina.[15] A 2-hidroxipropil-gama-ciclodextrina é produzida industrialmente e é usada como agente complexante em formulações oftálmicas [16] e em entrega de fármaco mediante via oral, aumentando a biodisponibilidade, a solubilidade e diminuindo a toxicidade do fármaco.[16] Alguns dos produtos farmacêuticos comercializados contendo em suas formulações 2-hidroxipropil-gama-ciclodextrina são: diclofenaco sódico (Voltaren) e o Tc-99 Teboroxime (CardioTec).[15]

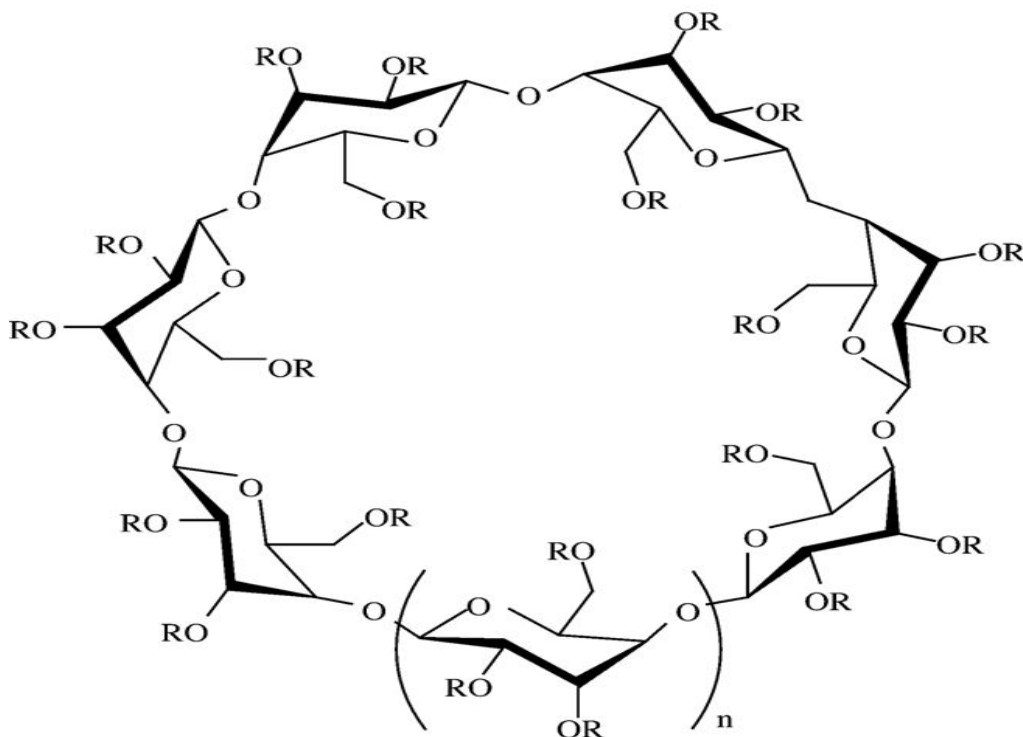


Figura 6: Estruturas da 2-hidroxi-propil-gama-ciclodextrina (n=6 e



Os derivados hidroxi-alkilados de CD são poderosos solubilizadores de fármacos e não formam, nos rins, os precipitados de complexos cristalinos observados quando as CDs naturais são utilizadas.[17]

1.6 Complexos de inclusão

As ligações intermoleculares em meio líquido podem ser divididas em vários tipos, tais como: eletrostáticas, de indução e dispersão. Ligações de hidrogênio, forças de Van der Waals e forças de London são exemplos dessas ligações fracas. Essas ligações são responsáveis pela interação das substâncias resultando na formação de complexos de inclusão.[18]

As CDs fazem parte de um grupo de substâncias que formam os chamados complexos de inclusão molecular, resultado da interação de moléculas (em sua grande maioria pequenas) com a cavidade de um composto macrocíclico. [20] Como característica principal, os complexos moleculares possuem o caráter dinâmico na sua formação, ou seja, a entrada e a saída da molécula hóspede da sua cavidade.[18] O fator mais importante para a formação do complexo é a compatibilidade geométrica, isto é, o

tamanho e a geometria da molécula a ser incluída na CD devem ser adequados à cavidade apolar, e, de acordo com a CD usada, a cavidade pode ser pequena ou grande demais para a acomodação da molécula hóspede.

A constante de estabilidade ou associação (K_s) é diretamente proporcional à associação da molécula hóspede no interior da CD. [4-21] Segundo Pitha [22], só os complexos com K_s entre 200 e 5000 M^{-1} podem apresentar aplicações práticas, visto que, complexos pouco estáveis liberam rapidamente a substância hóspede e os muito estáveis liberam com dificuldade. Porém a relação de K_s com a capacidade de liberação dos fármacos não é tão estreita.

A polaridade da molécula deve ser adequada para que a complexação ocorra, com inclusão total ou parcial no interior da cavidade da CD. Para que a associação com a CD seja predominante, a molécula deve estar em solução e deve possuir certo grau de hidrofobicidade.[4-21]

1.7 Mecanismo de Complexação.

A cavidade hidrofóbica das CDs, quando em solução aquosa, está preenchida por moléculas de água através de interação fraca e energeticamente desfavorável (interação polar-apolar) o que facilita a inclusão de moléculas menos polares que a água como mostrado no esquema abaixo (figura 7). Ao adicionar a esse meio uma espécie menos polar que a água (por exemplo um fármaco apolar), de modo geral, as interações hidrofóbicas irão governar o sistema de complexação fármaco/CD, porém, a interação hidrofóbica não é o único fenômeno a ocorrer. Contribuem ainda para a complexação a formação de interações de Van der Waals, interações dipolo-dipolo induzidas e forças de London, além da formação de pontes de hidrogênio entre a CD e a molécula hóspede. [4] A presença de água é crucial na formação dos complexos, pois a hidratação do complexo de CD é energeticamente favorável se comparado com a hidratação dos componentes separados.

A identificação das forças que levam à formação dos complexos de inclusão com ciclodextrinas é fundamental na compreensão do comportamento da complexação. Apesar dos inúmeros esforços para compreender a formação de complexo, o processo ainda não está totalmente esclarecido. São sugeridas diversas forças responsáveis pela formação dos complexos. [6]

A interação eletrostática ocorre quando duas moléculas com carga oposta interagem. Três tipos de interações eletrostáticas são mencionados freqüentemente: interações íon-íon, íon-dipolo e dipolo-dipolo. Como todas as CDs são basicamente neutras, nenhuma interação íon-íon ou íon-dipolo é envolvida durante a complexação, com exceção das CDs substituídas ou se o convidado possuir carga. [23] Porém, sabe-se que a interação dipolo-dipolo apresenta um papel importante na formação de complexos. Ácidos benzóicos substituídos na posição *para* aumentam a ligação devido a essa interação. [26]

As associações entre moléculas eletricamente neutras, conhecidas como *forças de Van der Waals*, originam-se das interações eletrostáticas entre dipolos permanente e/ou dipolos induzidos. As forças de dispersão de London que resultam de uma “flutuação” rápida dos elétrons são extremamente fracas. Elas são significativas apenas para grupos que se contatam. As interações por *ligação de hidrogênio* são predominantemente eletrostáticas e ocorrem entre grupos doadores fracos (D) e átomos aceptores (A) que possuam pelo menos um par de elétrons não-compartilhados. Em sistemas biológicos D e A podem ser átomos altamente eletronegativos como N e O e raramente S. A grande diferença com as forças de van de Waals é que as ligações de hidrogênio são muito mais direcionais. [20]

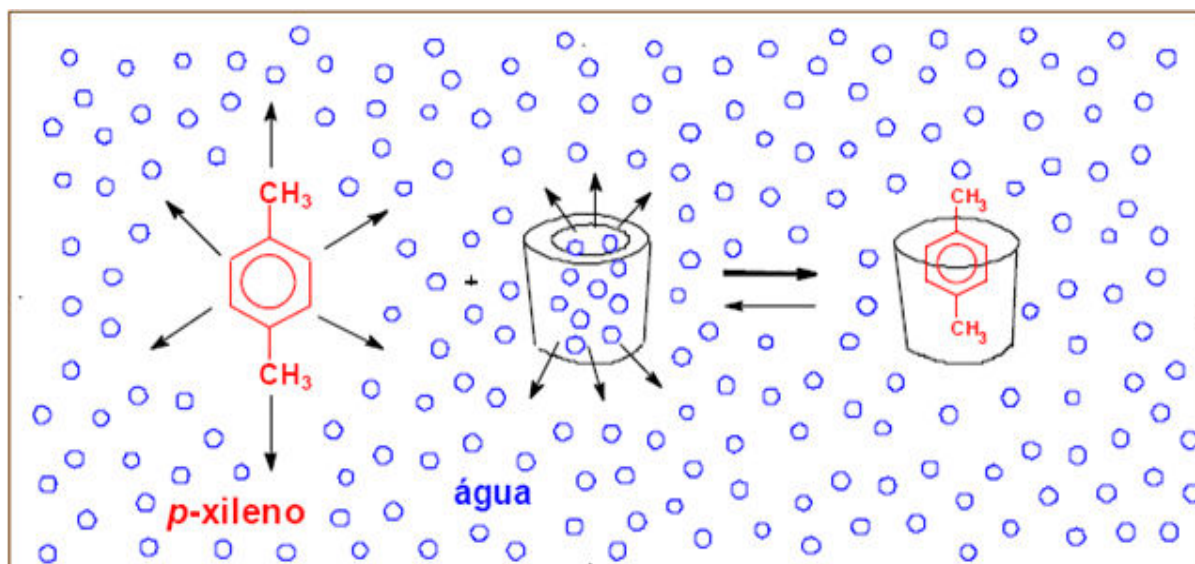


Figura 7 - Exemplo da inclusão de uma molécula de (p-xileno) na CD em meio aquoso. [4]

2. TÉCNICAS PARA PREPARAR COMPLEXOS DE INCLUSÃO

Para obter os complexos de inclusão com CDs são utilizados vários métodos, pois cada substância a ser encapsulada tem suas características, que devem ser observadas para definir o método ideal. A preparação de complexos de inclusão é bastante simples. O procedimento mais comum é agitar ou misturar a ciclodextrina numa solução aquosa (fria ou quente, neutra, alcalina ou ácida), contendo moléculas do hóspede. [4]

Os métodos mais utilizados para obter o complexo de inclusão com CDs são: [1]

a) Co-precipitação – adiciona-se uma solução do convidado a uma solução aquosa de CD. Se for preciso utilizar um solvente diferente da água para solubilizar o 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 liofilização.

b) Suspensão – o convidado sólido é adicionado a uma solução aquosa de CD formando uma suspensão que é agitada vigorosamente e filtrada. O complexo solubilizado na solução obtida (filtrado) é coletado também por evaporação à vácuo ou liofilização.

c) Empastagem (*Kneading*) – assim como na suspensão, o convidado sólido é adicionado a uma mistura de CD com água. Contudo é utilizado apenas 0,5 parte de água por parte de CD. O complexo sólido pode ser removido sob vácuo ou aquecimento.

d) Moagem conjunta (*Grinding*) – mistura-se a CD e o convidado no estado sólido, os quais são triturados vigorosamente por um determinado tempo na presença de uma pequena quantidade de água até que a mistura se torne pó.

3. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS.

A caracterização dos complexos de inclusão de CDs pode ser realizada de acordo o método utilizado na preparação do complexo. Para complexos obtidos em fase líquida, os métodos mais empregados são a espectroscopia na região do UV/Visível, a espectroscopia de RMN e a espectroscopia de fluorescência. Para complexos em fase

sólida a difração de Raios-X, a espectroscopia de infravermelho e a análise térmica.[21,28-29]

4. TÉCNICAS PARA DETECÇÃO DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO.

Vários métodos têm sido usados para detectar a formação de complexos de inclusão. No estado sólido, os compostos de inclusão se comportam como espécies estáveis, com estequiometria bem definida. Nestes casos, os métodos de detecção e caracterização mais comumente utilizados são a análise térmica, difração de raios-X, espectroscopia infravermelho e ressonância magnética nuclear. [30-32] O método de análise através da difração de raios-X pode ser empregado para a detecção dos compostos de inclusão cristalinos, devido a que os padrões de difração dos complexos obtidos são claramente diferentes dos obtidos a partir dos componentes individuais. O emprego desta técnica se baseia na comparação dos difratogramas das substâncias puras e do complexo. [31-32]

A análise térmica também é utilizada no estudo destes compostos. [33] Em alguns casos, nenhum pico de fusão dos hóspedes é observado após a formação dos complexos, indicando a amorfização do complexo. A ausência de picos de fusão também pode indicar que o fármaco puro como sólido não está mais presente. Quanto à decomposição térmica dos compostos de inclusão, observou-se que a decomposição do complexo ocorre acima da temperatura de decomposição da molécula não complexada. Este comportamento térmico de decomposição dos compostos de inclusão em ciclodextrina e o aumento da estabilidade do hóspede quando complexado é usado em várias aplicações. [29-34]

A espectroscopia no infravermelho (IV) é um método indispensável para a caracterização de compostos orgânicos, pois permite detectar grupos funcionais, cuja presença pode ser difícil através de outros métodos. Quando se forma o complexo, pequenos deslocamentos das bandas das ciclodextrinas poderão mascarar a do hóspede, se este último estiver presente em pequenas quantidades. No entanto, se o hóspede apresentar grupos funcionais característicos, como no caso do grupo carbonila, a banda será significativamente encoberta e algumas vezes pode ser deslocada após complexação por ciclodextrina.[32]

A caracterização de complexos em solução se baseia na investigação da interação molecular entre a ciclodextrina e o hóspede, na determinação da constante de estabilidade e da estequiometria do complexo. São utilizadas as determinações relacionadas com mudanças espectrais, como no caso da Ressonância Magnética Nuclear (RMN), espectroscopia por ultravioleta e fluorescência, além de estudos de solubilidade e métodos cinéticos.[30-31-32] A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é muito utilizada para a caracterização dos complexos de inclusão, através da observação das mudanças que ocorrem com os sinais de próton (^1H) ou de carbono (^{13}C) pertencentes à molécula da ciclodextrina ou ao hóspede, ao estarem complexados. [35]

As mudanças que ocorrem no espectro de UV, devido à formação do complexo, são deslocamentos do máximo de absorção no UV, pelo efeito da formação do complexo. Já no espectro de fluorescência, a adição de ciclodextrina a uma solução aquosa, provoca uma mudança na intensidade da fluorescência. [31]

5. TRIMETOPRIM

Trimetoprim (TMP: 5-[(3,4,5-trimetoxifenil)metil]-2,4-pirimidinodiamina) é uma substância cristalina, branca, inodora, com ponto de fusão 199 – 203°C [36] sofrendo decomposição a 315°C, pouco solúvel em água (1,35 mg.L⁻¹ a 25°C) e com maior solubilidade em outros solventes etanol: 6,8 mg.L⁻¹; metanol: 10,0 mg.L⁻¹; DMSO: 6,5 mg.L⁻¹; acetonitrila: 5,5 mg.L⁻¹. Sua fórmula molecular é C₁₄H₁₈N₄O₃ (massa molar = 290,32 g.mol⁻¹).

A Figura 8 mostra a fórmula estrutural molecular dessa substância:

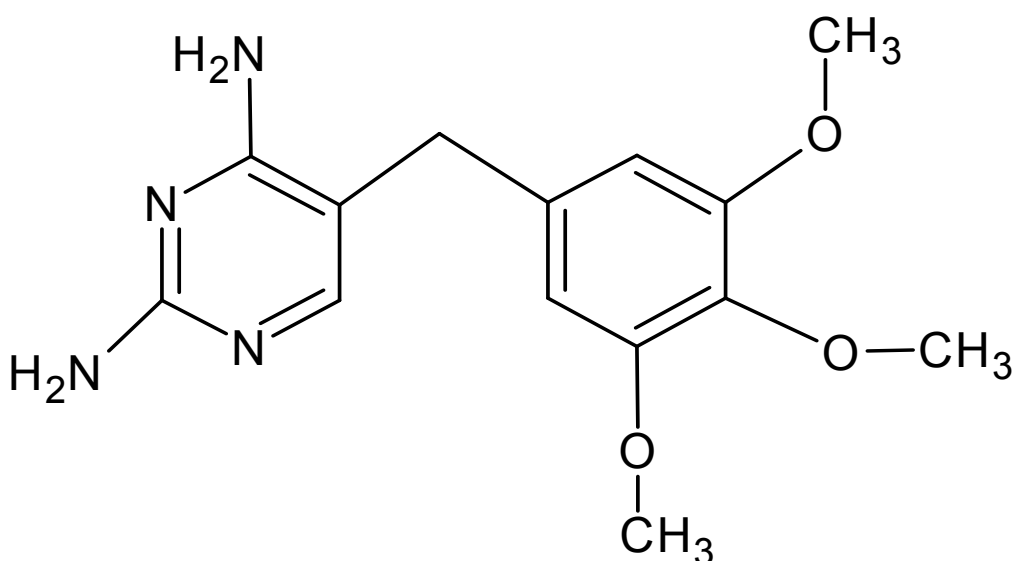


Figura 8 – Estrutura molecular plana do TMP [37]

5.1 Propriedades Farmacológicas

O TMP é um antibiótico usado no tratamento de infecções. É um análogo do ácido fólico e toma o seu lugar na enzima (dihidrofolato redutase) bacteriana que o sintetiza. A diidrofolato redutase está presente tanto nos mamíferos como nas bactérias; entretanto, a afinidade do trimetoprim pela enzima bacteriana é de aproximadamente 20 a 60 mil vezes maior do que pela dos mamíferos. Portanto o TMP é um quimioterápico bastante seguro. Como mencionado, o TMP é um antagonista do ácido fólico, inibindo a sua formação pela bactéria. O ácido fólico é essencial para a replicação das bactérias, já que é usado na duplicação do DNA. Ele não mata as bactérias mas inibe a sua multiplicação, permitindo ao sistema imune eliminá-las facilmente. O TMP é ativo

contra a maioria dos patógenos bacterianos comuns, e também é bacteriostático. Ele é, às vezes, usado em uma mistura com sulfametoxazol, em uma combinação chamada de co-trimoxazol. Como as sulfonamidas inibem a mesma via metabólica bacteriana, porém acima do local de ação da diidrofolato redutase, elas podem potencializar a ação do TMP. No Reino Unido, seu uso está geralmente restrito ao tratamento da pneumonia pelo *Pneumocystis carinii*, toxoplasmose e nocardiose. [36-37]

Uso de TMP é contra-indicado durante a gravidez, especialmente no primeiro trimestre, e para pessoas que sofrem de determinadas doenças sanguíneas. [37]

A inclusão de TMP em α , β e γ -CD foi descrita primeiramente por Emara e col. [38] que verificaram que o valor da constante de estabilidade obedece à ordem $\gamma > \beta > \alpha$. A caracterização mais detalhada do comportamento físico-químico e da estrutura do complexo formado entre o TMP e a β -CD foi descrita posteriormente por Wu e col.[39] e por Zhang e col. [40]

Finalmente, Jacobson e Pourmokhtar [41] estudaram o complexo de inclusão do TMP com 2 hidroxipropil-beta-ciclodextrina, com resultados promissores. Em virtude disto e ao antecedente de que o uso de derivados da γ -CD pode ser interessante, propõem-se, neste trabalho, estudar o complexo do TMP com a HP- γ -CD.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivos Gerais

O principal objetivo desta dissertação consistiu na preparação, caracterização físico-química do complexo de inclusão do fármaco Trimetoprim (TMP) em 2 hidroxipropil-gama-ciclodextrina (HP- γ -CD).

6.2 Objetivos Específicos

- a) Estabelecer parâmetros físico-químicos do fármaco Trimetoprim (TMP).
- b) Determinar a cinética de formação do complexo HP- γ -CD/TMP
- c) Preparar, pelo método de suspensão, complexo de inclusão de TMP em HP- γ -CD.
- d) Estudar a variação da solubilidade da molécula convidada em presença de HP- γ -CD pela construção dos diagramas de solubilidade de fases.
- e) Calcular as constantes de estabilidade usando o diagrama de solubilidade de fases.
- f) Caracterizar as estruturas supramoleculares preparadas, através do uso de técnicas físico-químicas;

7. PARTE EXPERIMENTAL

7.1 Materiais

Utilizou-se o fármaco Trimetoprim 5-[(3,4,5-trimetoxifenil)metil]-2,4-pirimidinodiamina (Sigma) 99,8% sendo sua massa molecular igual a 290,7 g.mol⁻¹. Utilizou-se ainda 2-Hidroxiopropil-gama-ciclodextrina (Sigma) 99,8% possuindo massa molecular média de 1580 Dalton. As soluções foram preparadas com água ultra pura (Purificador Aquapur, Permutation). Os sais aqui utilizados, sais acetato de sódio trihidratado (VETEC) 99,0%, fosfato de sódio dibásico (ISO FAR) 98,0% e tetraborato de sódio decahidratado (CROMOLINE) 99,5% foram todos PA.

7.2 Determinação da solubilidade do TMP.

Utilizando massas conhecidas de TMP, foi determinada a solubilidade deste fármaco em meio aquoso. 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/Visível foram obtidos na faixa de 220 a 400 nm.

7.3 Determinação dos parâmetros espectrocópicos (ϵ e λ máx) do TMP.

Para a determinação do ϵ , no comprimento de onda de máxima absorção, foram preparadas soluções de concentrações distintas de TMP em água, tampão acetato de sódio (pH: 4,0) com concentração variando entre $4,0 \times 10^{-5} - 2,4 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹, fosfato de sódio (pH: 7,0) com concentração entre $2,0 \times 10^{-5} - 1,7 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹ e tampão borato de sódio (pH: 9,0) com concentração entre $2,2 \times 10^{-5} - 1,4 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹. Os valores de absorbância no comprimento de onda máximo de absorção nos respectivos tampões foram medidos. O ϵ foi obtido utilizando a Lei de Lambert- Beer:

$$A(\lambda) = \epsilon \cdot b \cdot c \quad \text{equação 1}$$

O coeficiente de extinção ou de absorvidade molar (ϵ), que caracteriza o processo de absorção, é uma medida empírica da fração da luz absorvida pela molécula e depende do comprimento de onda. A concentração (c) é medida em mol.L⁻¹ e o

caminho da radiação na amostra **(b)** é medido em cm, de modo que o coeficiente de extinção tem dimensão $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$.

7.4 Determinação do valor de pK_a .

O valor de pK_a do TMP foi determinado por meio do ajuste da curva experimental obtida através da medida de absorbância em diferentes valores de pH. O TMP foi preparado em tampão triplo: fosfato, borato e acetato de sódio (concentração total dos sais $30 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$), na concentração de $8,0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot L^{-1}$ de TMP. Em seguida foram feitas titulações espectrofotométricas desta solução, variando-se o pH na faixa de 12,0 a 2,0, uma vez que o TMP é mais solúvel em meio ácido. No sentido de evitar o efeito de diluição dos fármacos, as concentrações dos titulantes (HCl e NaOH) foram elevadas. O valor de pK_a foi obtido através de uma curva que melhor se ajustasse aos dados experimentais, utilizando o gráfico da absorbância versus pH, através da equação (4).[42]

$$A = \frac{A^+ 10^{pKa} + A^0 10^{pH}}{10^{pKa} + 10^{pH}} \quad \text{equação 2}$$

Sendo:

A Leitura de absorbância

A^0 Absorbância do fármaco desprotonada

A^+ Absorbância do fármaco protonada

pK_a Constante de equilíbrio de protonação

pH Potencial hidrogeniônico

7.5 Cinética de formação do complexo HP- γ -CD/TMP

Para a avaliação da cinética de formação dos complexos foram realizados testes para determinar o tempo necessário para que houvesse incorporação da molécula de TMP à cavidade da HP- γ -CD. Misturou-se quantidades equimolares de solução de TMP e HP- γ -CD ($3,0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot L^{-1}$) a $25^{\circ}C$. Posteriormente foram feitas leituras no espectrofotômetro de 10 em 10 minutos no comprimento de onda máximo da solução

até que fosse atingido o equilíbrio. Tal procedimento está de acordo com estudos descritos previamente na literatura.[17]

7.6 Estudo da solubilidade de fases – complexo: HP- γ -CD/TMP

O estudo de solubilidade de fases, como descrito por Higuchi e Connors [18], foi feito agitando-se 10 mL de soluções aquosas e de soluções tampão acetato de sódio (pH: 4,0), fosfato de sódio (pH: 7,0) e borato de sódio (pH: 9,0) de HP- γ -CD com concentrações crescentes (0 ; $2,0 \times 10^{-3}$; $4,0 \times 10^{-3}$; $6,0 \times 10^{-3}$; $8,0 \times 10^{-3}$; $10,0 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹), adicionando-se a essas soluções uma massa fixa do fármaco (em excesso de 5 vezes em relação a quantidade de matéria de HP- γ -CD na solução mais concentrada). As suspensões resultantes foram submetidas à agitação nas temperaturas de 20, 25 e 35 °C no caso de soluções aquosas e à temperatura ambiente para as soluções tampão por 8 h, sendo em seguida filtradas em membrana de 0,45 μ m. As concentrações de TMP foram determinadas por espectroscopia de absorção no UV-VIS. Para tanto, utilizou-se as absorvidades molares (ϵ) e as solubilidades intrínsecas (S_0) das moléculas estudadas a vários pH, determinadas nos estudos espectroscópicos do presente estudo.

7.7 Determinação da estequiometria dos complexos (Método das Variações Contínuas)

Um método seguro para determinação da estequiometria do complexo é o método das variações contínuas (método de Job) [43] que se baseia na variação de alguma propriedade diretamente dependente da formação do complexo (intensidade de fluorescência, deslocamento químico de prótons etc.), cujo valor máximo deve ser obtido para a estequiometria ótima. Para isto, soluções equimolares, $1,0 \times 10^{-5}$ mol/L, de TMP e da HP γ CD foram preparadas e, em seguida, misturou-se volumes variados das duas soluções: partiu-se de 2 mL de TMP + 8 mL HP- γ -CD sendo que essa variação ocorreu até a mistura de 8 mL de TMP + 2 mL HP- γ -CD, mantendo-se o volume total constante, fazendo com que a soma das concentrações das duas espécies também seja

constante. A mesma série de diluições foi feita, nas mesmas condições, para TMP e água destilada. Após agitação por 8 horas, efetuaram-se medidas de fluorescência das soluções com excitação em 348 nm.

7.8 Caracterização do complexo por espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros infravermelhos foram obtidos em um equipamento Perkin Elmer Spectrum BX FT-IR System, com resolução de 4 cm^{-1} na faixa de $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$, pela técnica de pastilha de KBr e 256 acumulações.

7.9 Caracterização por Análise Térmica

As análises termogravimétricas (TG) foram realizadas em um equipamento TA Instruments modelo 2960, com taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, sob fluxo de N_2 (100 mL/min), usando porta amostra de alumina. As curvas de calorimetria diferencial de varredura (DSC) foram obtidas em um equipamento TA Instruments modelo 2010, sob fluxo de N_2 (100 mL/min), com taxa de aquecimento $10^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$, utilizando-se porta-amostras de alumínio.

7.10 Caracterização por Difratomia de raios-X

Os difratogramas de raios-X das amostras, na forma de pó, foram obtidos em um difratômetro Rigaku, com velocidade de varredura de $2^{\circ}/\text{minuto}$ em 2θ , fonte $\text{Cu-}\kappa\alpha$ ($1,5418\text{ \AA}$) em 40 kV e 40 mA.

7.11 Caracterização por Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

Espectros RMN ^1H usando CD_3OD como solvente e TMS como padrão, uni e bi-dimensionais (ROESY – Rotating-Frame Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy), foram medidos em um instrumento Varian INOVA 500 MHz, neste último caso com $2,0\text{ s relaxation delay}$ e $2,00\text{ ms mixing time}$.

8. RESULTADOS E DISCUSSÕES

8.1 Determinação dos parâmetros espectroscópicos do TMP.

Através das análises verificou-se que o TMP é pouco solúvel em água. A solubilidade em água utilizando o método proposto por Meylan e colaboradores [25] aqui obtido é de $135,33 \text{ mg.L}^{-1}$, $140,65 \text{ mg.L}^{-1}$ para o TMP em solução tamponada pH = 4,0, de $90,68 \text{ mg.L}^{-1}$ em pH = 7,0 e de $89,32 \text{ mg.L}^{-1}$ em pH = 9,0. Os espectros de absorção óptica em solução aquosa e em soluções tamponadas (pH = 4,0, 7,0 e 9,0) são mostrados na Figura 9.

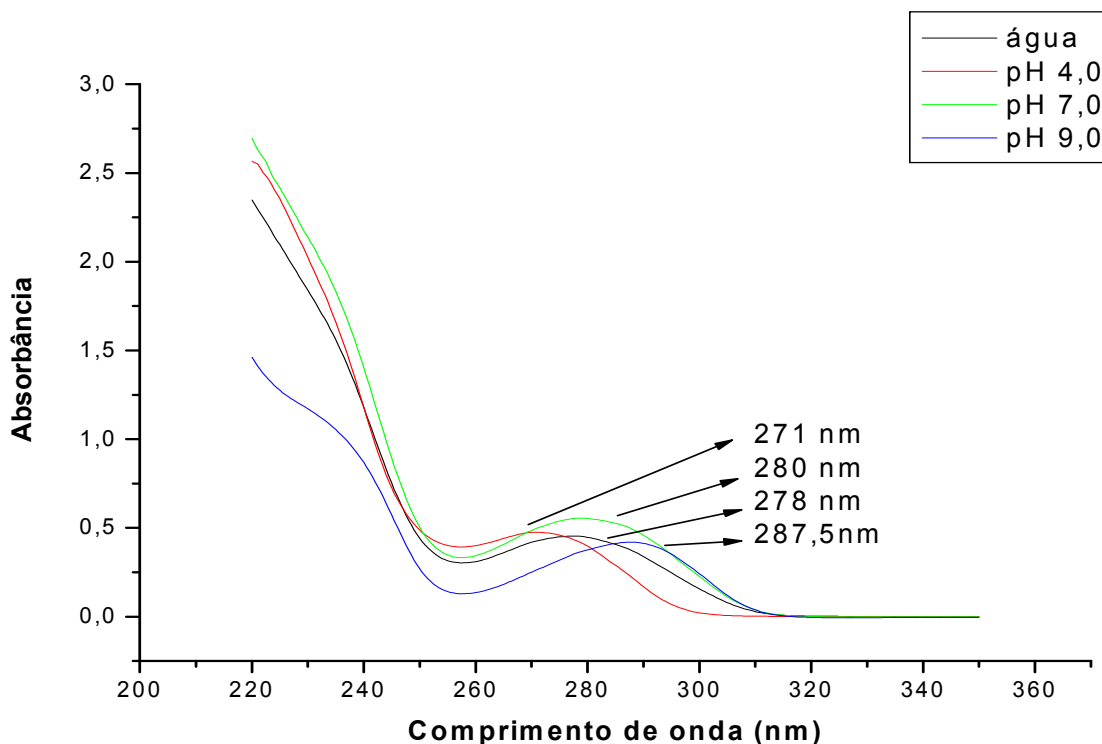


Figura 9 - Espectros de absorção óptica do TMP em solução aquosa a diferentes valores de pH.

As características observadas nos espectros de absorção das soluções aquosas são, também, identificadas nas soluções orgânicas.

O Espectro do TMP, em solução aquosa, apresenta uma banda de absorção bem definida e centrada em torno de 278 nm, em solução tampão, 271 nm (pH = 4,0), 280

nm (pH = 7,0) e 287,5 nm (pH = 9,0). O deslocamento de aproximadamente 16,5 nm no máximo de absorção do TMP, quando se passa de um meio ácido para um básico, sugere que a banda em 271 nm (pH = 4,0) se deve a transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$. Outra evidência que corrobora esta afirmativa é o ϵ encontrado para estes máximos de absorção em soluções tampão, cujos valores são típicos de coeficientes de absorvidade molar para transições desse tipo [42] (tabela II).

Para as radiações monocromáticas, a absorvância (A) é diretamente proporcional ao comprimento do caminho óptico (b), a concentração das espécies absorventes (c) e a constante de proporcionalidade (ϵ) denominada de absorvidade molar (ver equação 1), Lei de Lambert-Beer.

Utilizando este princípio, determinou-se o coeficiente de absorvidade no comprimento de onda de máxima absorção correspondente ao meio ácido, neutro e básico (Tabela II), seguida das curvas de calibração da água e dos tampões (figuras 10, 11, 12 e 13).

Tabela II: Coeficiente de absorvidade molar das soluções de TMP em água e nas soluções tampão pH 4,0, 7,0 e 9,0.

| | λ (nm) | ϵ (L.mol ⁻¹ .s ⁻¹) |
|--------|----------------|----------------------------------------------------|
| Água | 278 | 5142 ± 13,1 |
| pH 4,0 | 271 | 5096 ± 13,7 |
| pH 7,0 | 280 | 7097,5 ± 52,5 |
| pH 9,0 | 287,5 | 8848 ± 67,14 |

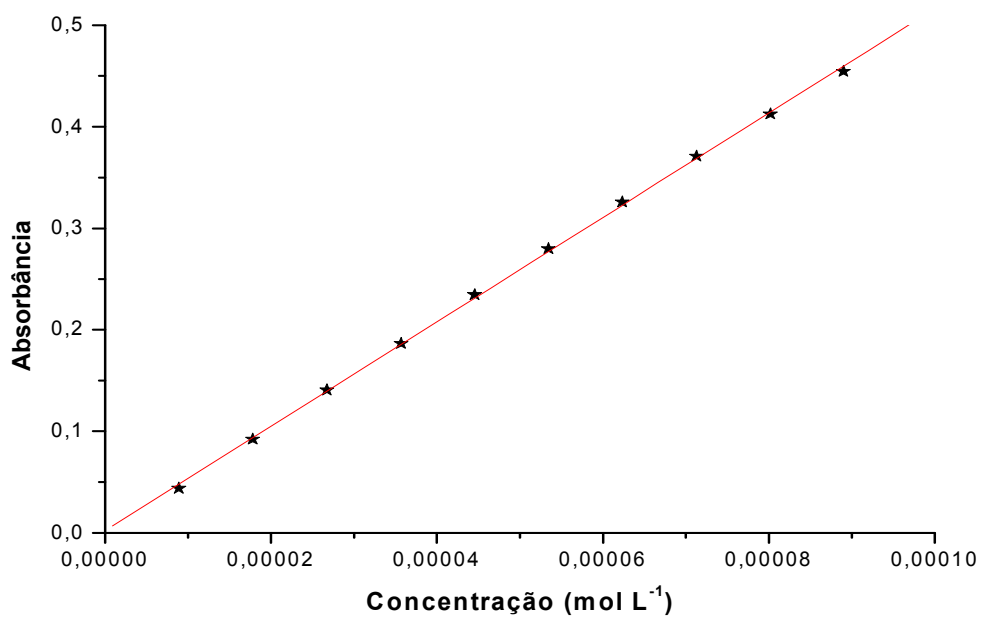


Figura 10 - Curvas de calibração do TMP obtidas através da espectroscopia de absorção. (★) água $\lambda = 278$ nm e $R = 0,99975$

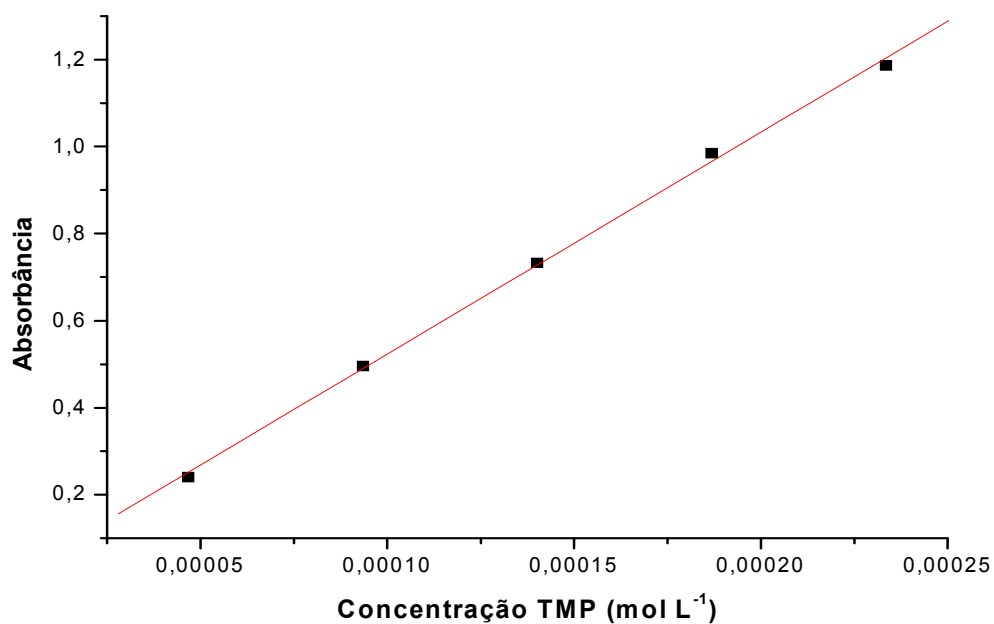


Figura 11 - Curva de calibração do TMP obtidas através da espectroscopia de absorção. (■) pH 4,0, $\lambda = 271$ nm e $R = 0,99926$

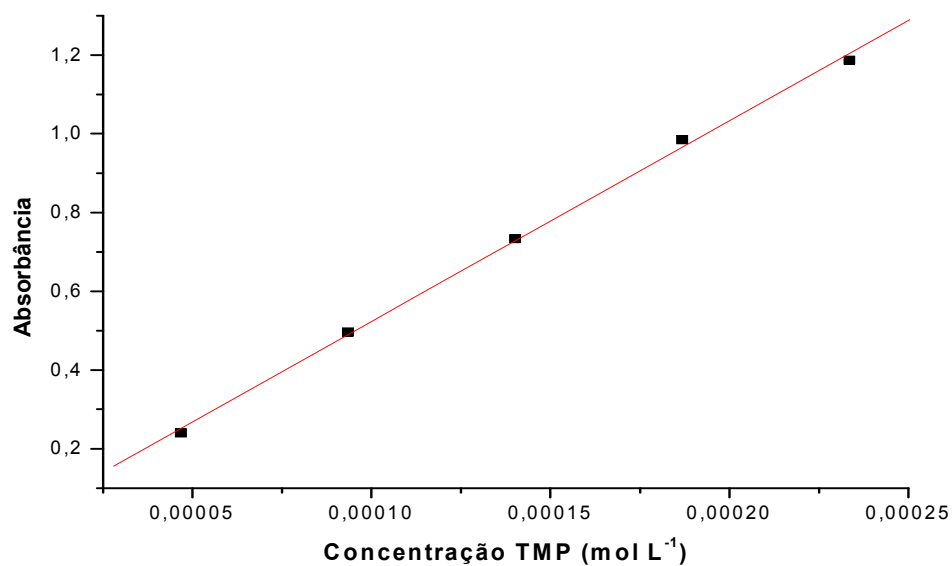


Figura 12 - Curvas de calibração do TMP obtidas através da espectroscopia de absorção. pH 7,0, $\lambda = 280$ nm e $R = 0,99916$

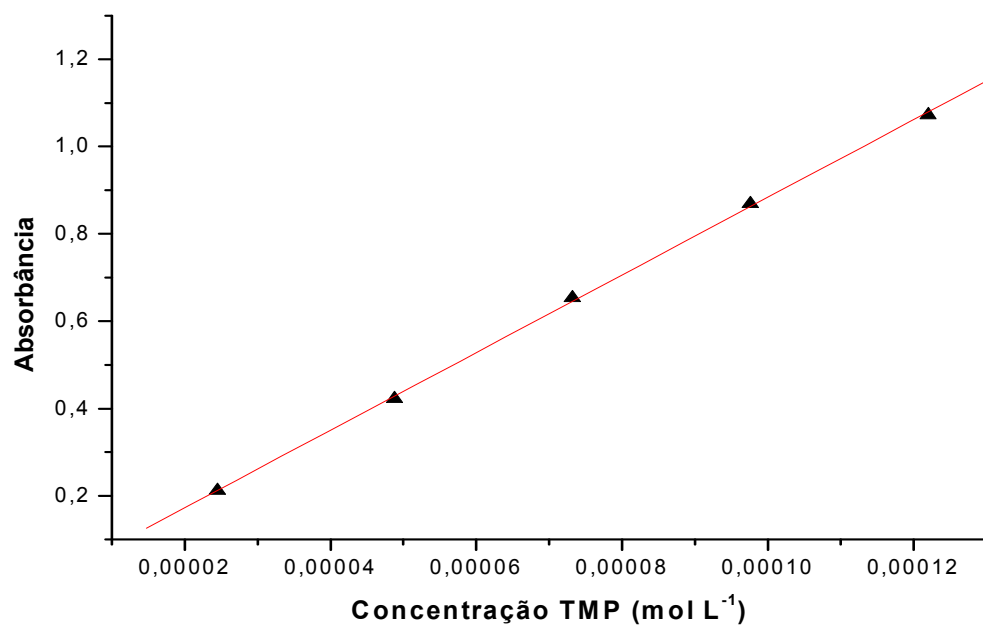


Figura 13 - Curvas de calibração do TMP obtidas através da espectroscopia de absorção. pH 9,0, $\lambda = 287,5$ nm e $R = 0,99976$.

8.2 Determinação do pKa do TMP

A estrutura química de muitos fármacos envolve a participação de anéis aromáticos e ou heteroaromáticos, responsáveis pelas propriedades de absorção óptica e fluorescência na região do UV-Vis, as quais variam com o estado de protonação do fármaco e o meio na qual se encontra. [44] A determinação do pKa é de fundamental importância, pois a constante de ionização de um fármaco é capaz de expressar, dependendo da sua natureza química e do pH do meio, a contribuição percentual relativa das espécies ionizadas e não-ionizadas e o comportamento farmacocinético das substâncias nos principais compartimentos biológicos com pH definidos (por exemplo, mucosa gástrica, pH 1; mucosa intestinal, pH 5 e plasma, pH 7,4) pode ser avaliado antes da administração do fármaco. [26]

Tomando por base o fato de que a absorbância do TMP se altera após sua protonação, a dependência do valor da absorbância, em dado comprimento de onda, em função do pH, foi utilizada para a determinação do pKa. A Figura 14 apresenta a variação da absorbância em função do pH para o TMP. Titulações efetuadas em 287,5 nm.

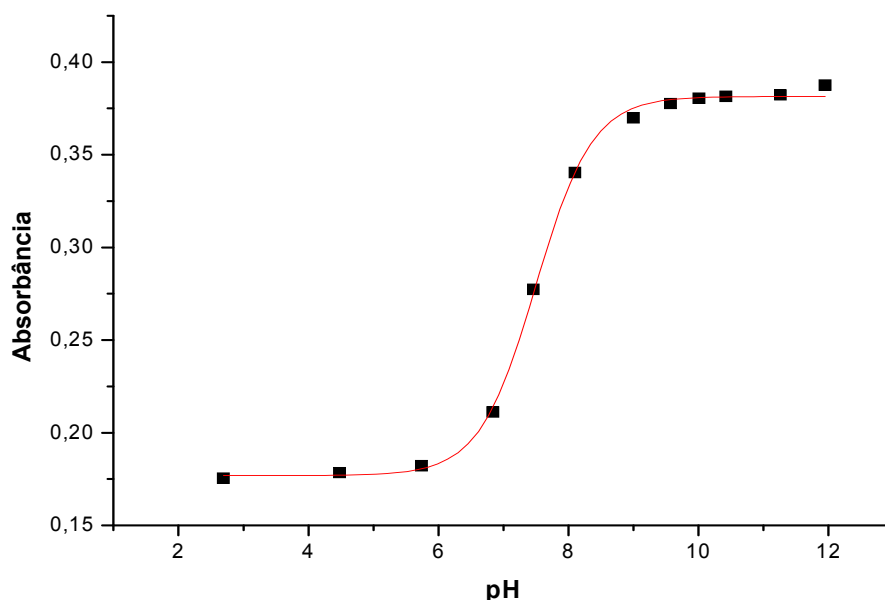


Figura 14 - Dependência da absorção em 287,5 nm do TMP ($4,5 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹) em função do pH.

Os dados experimentais foram tratados de acordo com a equação de Henderson-Hasselbach [26,42] para determinar o pKa. Considerando-se a expressão:

$$pH = pka + \log\left(\frac{\alpha}{1-\alpha}\right) \quad \text{equação 3a}$$

Sendo α e $(1 - \alpha)$ as frações molares do fármaco nas formas neutra e carregada, respectivamente, a absorvância total em um dado comprimento de onda da droga submetida ao equilíbrio ácido-base, pode ser considerado como sendo a soma das intensidades das espécies protonadas (A^+) e neutra (A^0):

$$A = \alpha A^0 + (1 - \alpha) A^+ \quad \text{equação 3b}$$

Substituindo a equação b em a:

$$pH = pKa + \log\left(\frac{A - A^+}{A^0 - A}\right) \quad \text{equação 3c}$$

Esta equação pode ser submetida a um rearranjo e fornecer a expressão abaixo, a qual pode ser utilizada para obter a melhor curva que se ajuste aos valores experimentais:

$$A = \frac{A^+ 10^{pKa} + A^0 10^{pH}}{10^{pKa} + 10^{pH}} \quad \text{equação 3d}$$

Desta maneira o valor de pKa encontrado para o TMP foi de $7,496 \pm 0,0763$.

Vale ressaltar que como há mais de um tipo de átomo de nitrogênio, existe a possibilidade de haver mais de um pKa com valores próximos. Em trabalhos anteriores [45], cálculos teóricos das energias de interação de um átomo H^+ com os diferentes nitrogênios mostraram valores próximos, explicando a observação de um único pKa.

8.3 Cinética de formação do complexo HP- γ -CD/TMP

A cinética de complexação do TMP em HP- γ -CD foi estudada pelo acompanhamento da variação no pico de absorção em 278 nm da molécula de TMP em função do tempo, até que não se observasse variações (equilíbrio). A curva de cinética de complexação obtida para o TMP pode ser observada na Figura 16. Os valores de absorvância foram normalizados ($A_{\text{Normalizada}} = A_t/A_o$, onde A_t = absorvância em um determinado tempo e A_o = absorvância no tempo zero). A análise dos dados cinéticos foi realizada a partir do ajuste obtido através da exponencial simples descrita na equação 4:

$$A = A_o + a(1 - e^{-t/k}) \quad \text{equação 4}$$

Onde A representa a absorvância normalizada, A_o representa a absorvância inicial, t o tempo em horas, a é coeficiente da equação e k a constante cinética.

A partir da análise dos dados da Figura 15, observa-se que a cinética de complexação do TMP com HP- γ -CD apresenta-se de primeira ordem (ajuste monoexponencial), ou seja, a complexação depende principalmente da concentração de uma das espécies, sendo o valor da constante cinética determinada de 30000 s ou 8,3h \pm 1,4 h. O valor da constante cinética foi importante para a realização dos demais experimentos, pois indicou em que momento o sistema atingiu o equilíbrio.

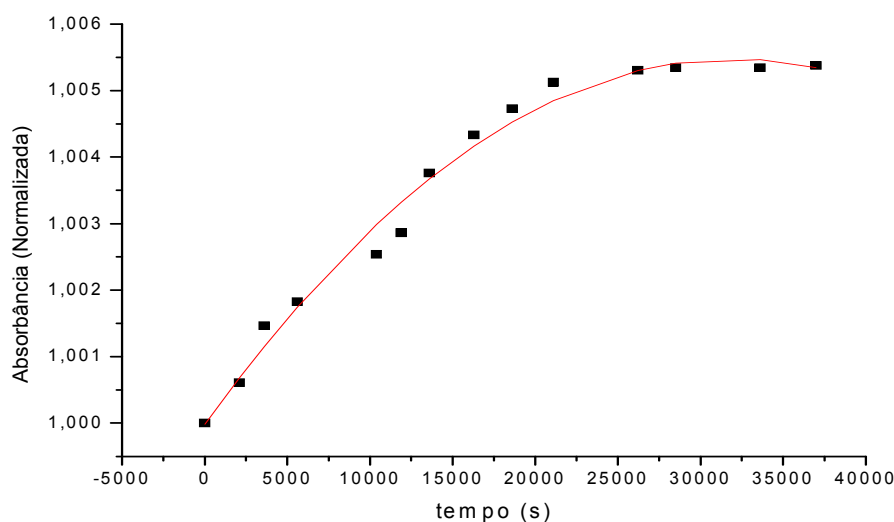


Figura 15 – Curva cinética de complexação HP- γ -CD/TMP

8.4 Cálculo da constante de estabilidade do complexo HP- γ -CD/TMP utilizando isotermas de solubilidade.

De acordo com Higuchi e Connors [18], um diagrama de solubilidade é construído colocando na ordenada a concentração total molar do fármaco e na abscissa a concentração total molar da CD. Estes diagramas de fase são classificados em dois tipos, com algumas variações, como mostra a Figura 16. [18]

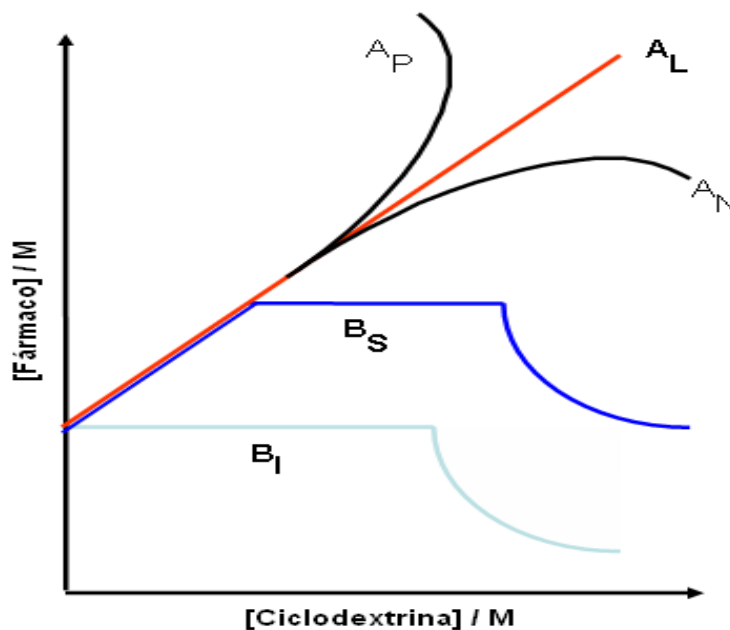


Figura 16 - Diagramas de solubilidade tipos A e B.[18]

Os diagramas do tipo A mostram aumento da solubilidade do fármaco com a adição da CD, indicando uma ou mais interações moleculares entre o fármaco e a CD. Um aumento linear na solubilidade, representado pela linha AL, corresponde a complexos com estequiometria 1:1. Uma curvatura positiva indicada por AP e associada a formação de complexos com estequiometria maior que 1 em relação a CD, mas o significado físico da curva AN ainda não é conhecido.

Se o complexo formado é 1:1, sua constante de estabilidade ($K_{s\ 1:1}$) pode ser calculada pela Equação 4, onde m é o coeficiente angular e a é o intercepto da linha com a ordenada:

$$K_s = \frac{m}{[a(1-m)]}$$

equação 5

As curvas do tipo B são observadas quando são formados complexos insolúveis. A curva BS inicialmente é semelhante a A; porém, quando o limite de solubilidade é alcançado, a adição de mais CD resulta em precipitação do complexo. A curva BI corresponde a um complexo tão insolúvel que o aumento inicial na concentração do fármaco não é detectado. A tabela III apresenta os valores médios das concentrações utilizadas para a construção do diagrama de solubilidade para solução aquosa nas temperaturas de 20, 25 e 35°C respectivamente e em seguida (figuras 17, 18 e 19) os diagramas de solubilidade são apresentados.

Tabela III: Valores médios das concentrações utilizadas para construção do diagrama de solubilidade em meio aquoso.

| Temperatura (°C) | 20 | 25 | 35 |
|---------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| [HP- γ -CD] (10^{-3} mol.L $^{-1}$) | (C $_1$ \pm dp) (10^{-4} mol.L $^{-1}$) | (C $_2$ \pm dp) (10^{-4} mol.L $^{-1}$) | (C $_3$ \pm dp) (10^{-3} mol.L $^{-1}$) |
| 0 | 3,72 \pm 0,038 | 4,66 \pm 0,028 | 8,36 \pm 0,050 |
| 2 | 3,82 \pm 0,068 | 4,91 \pm 0,040 | 8,70 \pm 0,030 |
| 4 | 4,08 \pm 0,05 | 4,86 \pm 0,035 | 9,14 \pm 0,023 |
| 6 | 4,12 \pm 0,025 | 4,93 \pm 0,033 | 9,90 \pm 0,034 |
| 8 | 4,38 \pm 0,029 | 5,06 \pm 0,045 | 9,72 \pm 0,045 |
| 10 | 4,57 \pm 0,080 | 5,22 \pm 0,060 | 9,365 \pm 0,047 |

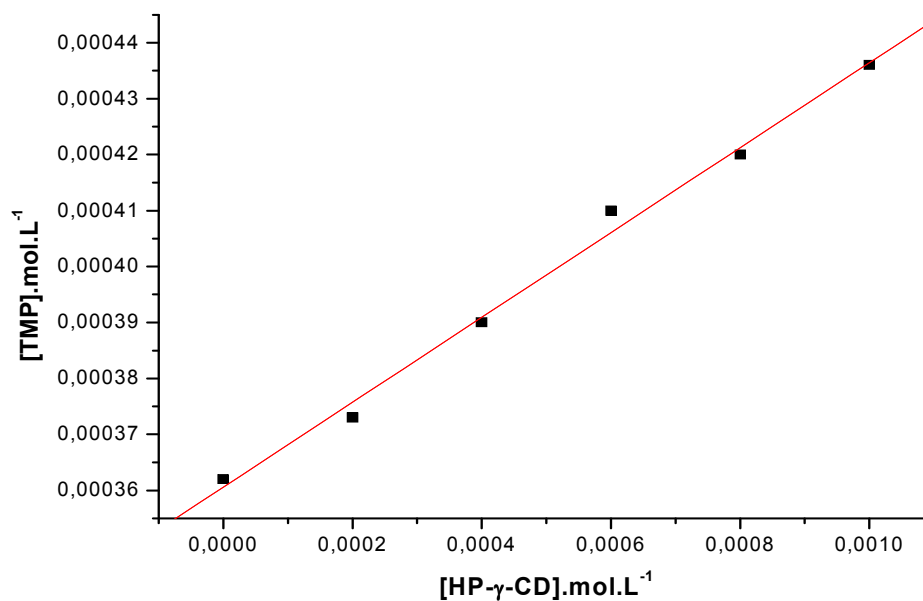


Figura 17 – Diagrama de solubilidade em água obtidas através da espectroscopia de absorção. (■) 20°C R = 0,99661

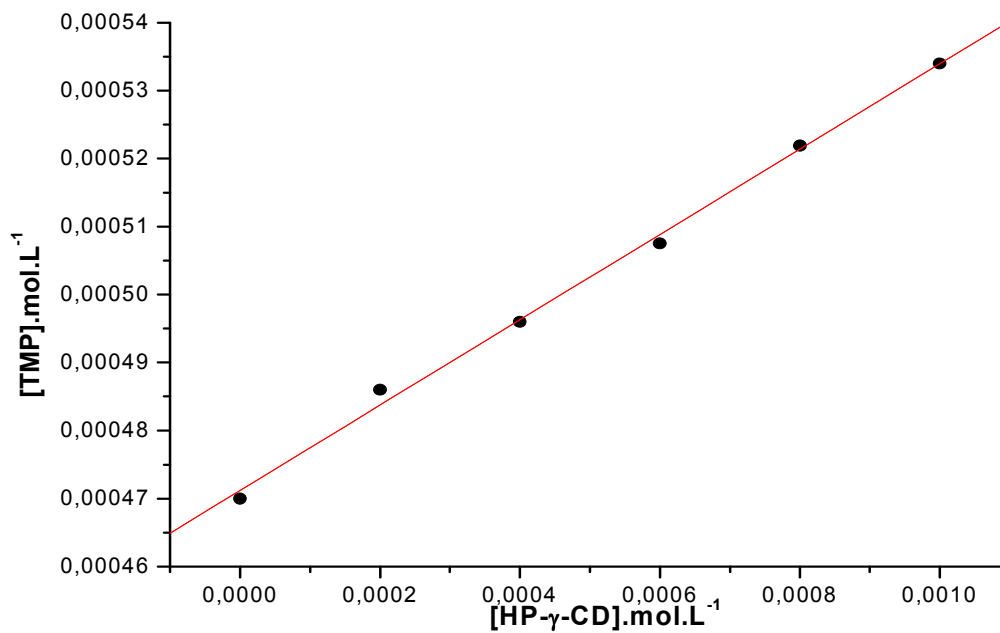


Figura 18 – Diagrama de solubilidade em água obtidas através da espectroscopia de absorção. (●) 25°C R = 0,99843

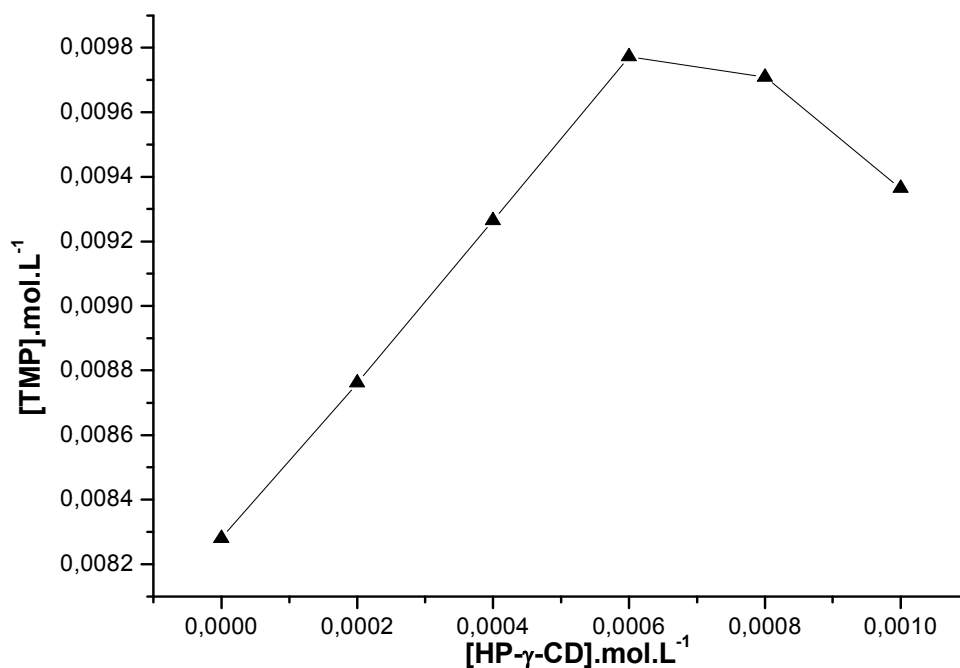


Figura 19 – Diagrama de solubilidade em água obtidas através da espectroscopia de absorção. (▲) 35 °C

Observou-se um aumento linear na solubilidade do TMP com o aumento da concentração de HP-γ-CD a 20 e 25 °C, indicando que houve formação do complexo. Porém à 35 °C verificou-se que a complexação entre TMP e HP-γ-CD apresenta uma relação não-linear deixando de ser do Tipo A e passando a ser do Tipo B, ou seja, a solubilidade do TMP deixa de aumentar a partir de $[HP-\gamma-CD] = 5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, passando a decrescer. [19] Os valores de constante de estabilidade nas diferentes temperaturas foram: $220,7 \text{ M}^{-1}$ a 20°C e $144,7 \text{ M}^{-1}$ a 25°C.

Realizou-se também o estudo de solubilidade em meio tamponado (pH 4,0; 7,0 e 9,0). A tabela IV apresenta os valores médios das concentrações utilizadas para a construção do diagrama de solubilidade seguido dos respectivos diagramas de solubilidade (figuras 20, 21 e 22).

Tabela IV: Valores médios das concentrações utilizadas para construção do diagrama de solubilidade em meio tamponado.

| pH | 4,0 | 7,0 | 9,0 |
|---------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| [HP- γ -CD] (10^{-3} mol.L $^{-1}$) | (C $_1$ \pm dp) (10^{-4} mol.L $^{-1}$) | (C $_2$ \pm dp) (10^{-4} mol.L $^{-1}$) | (C $_3$ \pm dp) (10^{-4} mol.L $^{-1}$) |
| 0 | 4,85 \pm 0,035 | 3,13 \pm 0,067 | 3,08 \pm 0,012 |
| 2 | 6,30 \pm 0,045 | 4,85 \pm 0,046 | 3,30 \pm 0,032 |
| 4 | 8,63 \pm 0,080 | 5,57 \pm 0,087 | 3,34 \pm 0,054 |
| 6 | 10,4 \pm 0,023 | 6,20 \pm 0,043 | 3,43 \pm 0,034 |
| 8 | 12,3 \pm 0,043 | 6,87 \pm 0,076 | 3,50 \pm 0,043 |
| 10 | 14,4 \pm 0,065 | 6,32 \pm 0,032 | 3,53 \pm 0,067 |

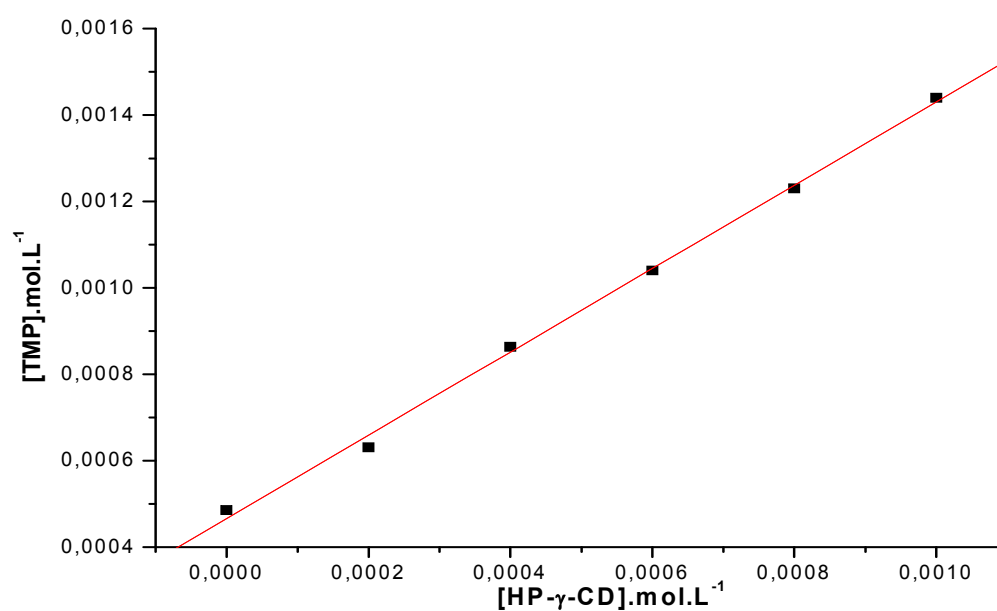


Figura 20 – Diagramas de solubilidade em meio tamponado obtido através da espectroscopia de absorção. (■) pH 4,0, λ = 271 nm e R = 0,99883

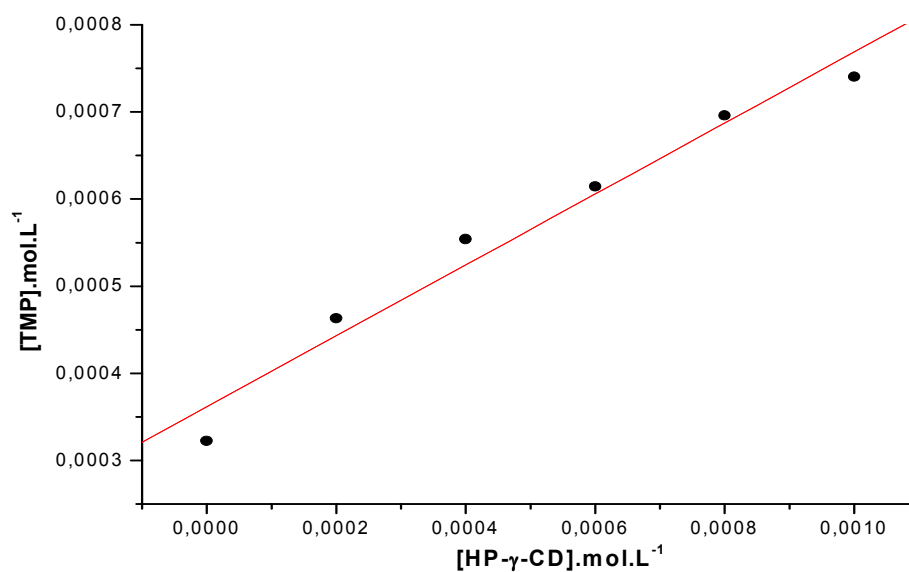


Figura 21 – Diagramas de solubilidade em meio tamponado obtido através da espectroscopia de absorção. (●) pH 7,0, $\lambda = 280$ nm e R = 0,98409

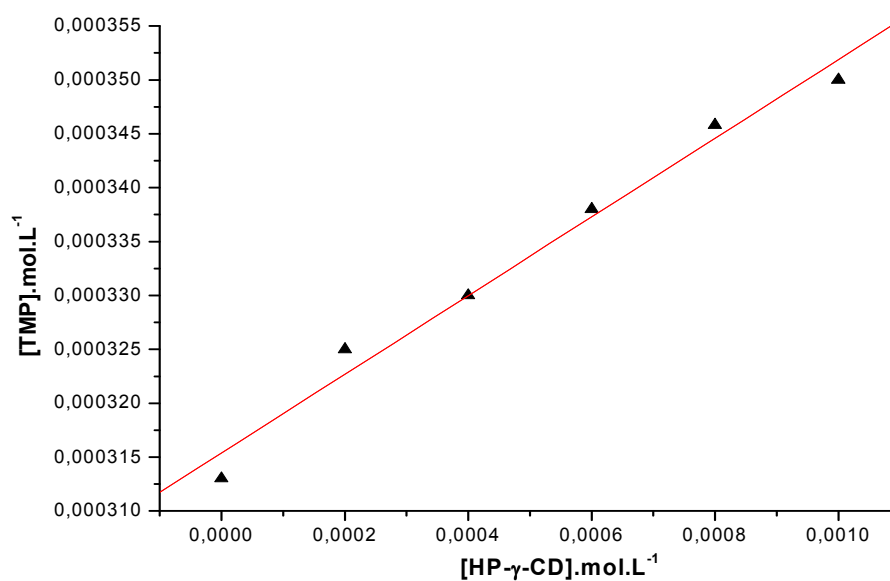


Figura 22 – Diagramas de solubilidade em meio tamponado obtido através da espectroscopia de absorção. (▲) pH 9,0, $\lambda = 287,5$ nm e R = 0,99122.

Em meio tamponado (pH 4,0, 7,0 e 9,0) observou-se um aumento linear na solubilidade do TMP em função das concentrações crescentes de HP- γ -CD, sugerindo também que os complexos formados têm estequiometria de 1:1.

Os valores de K_s obtidos para a interação entre TMP e HP- γ -CD nos diferentes pH foram: 55410 M^{-1} para pH 4,0, valor este fora da faixa proposta por Pitha [22]; 2188 M^{-1} para pH 7,0 e 123 M^{-1} para pH 9,0. Aqui vale ressaltar o aumento dos valores da constante de associação conforme o abaixamento do pH indicando uma forte associação em meio ácido.

8.5 Estudos da Estequiometria do complexo (Método das variações contínuas)

De acordo com o método das variações contínuas [43], a estequiometria de complexos pode ser determinada monitorando-se alguma propriedade relacionada diretamente com a concentração do complexo, para uma série de misturas com proporções variáveis entre as espécies formadoras do complexo. 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. Para o TMP, o método das variações contínuas foi aplicado com base na propriedade de emissão de fluorescência deste convidado.

A figura 23 mostra o gráfico obtido aplicando o método das variações contínuas nas condições especificadas, para o sistema HP- γ -CD/TMP (gráfico de Job). Verificou-se que o máximo de variação da intensidade de fluorescência encontra-se na fração molar 0,5, concluindo assim que a estequiometria de formação do composto de inclusão é 1:1. Esta observação está em concordância com o resultado obtido no estudo de solubilidade de fases.

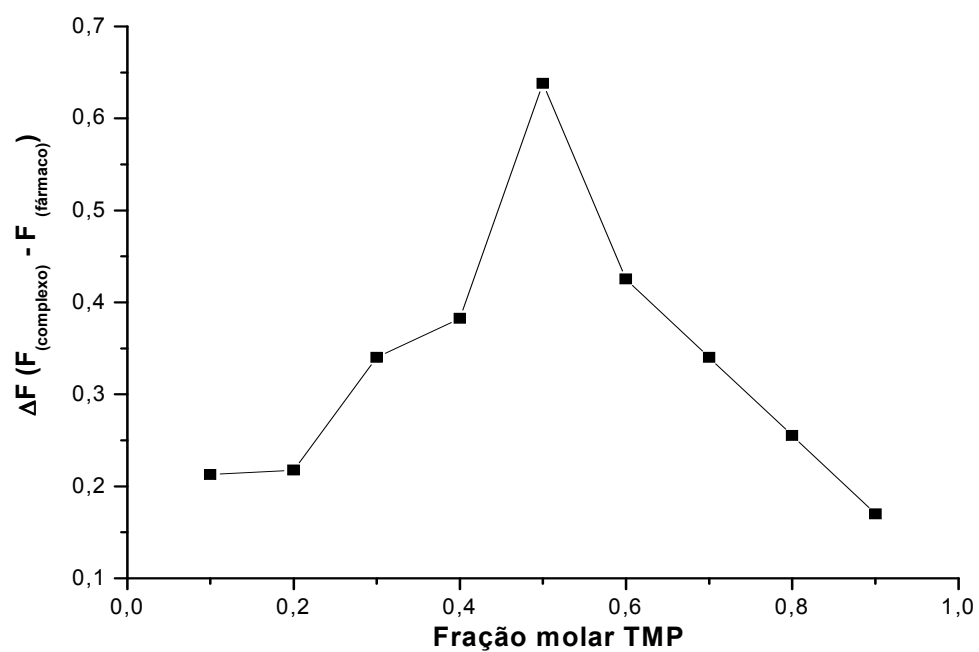


Figura 23 - Gráfico obtido pelo método das variações contínuas (JOB'S PLOT) do complexo HP- γ -CD)/TMP

9.0 CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO

9.1 Caracterização de complexos em solução

As mudanças que ocorrem no espectro de UV, devido à formação do complexo, são geralmente deslocamentos batocrômicos e/ou alargamento das bandas. A figura 24 mostra o deslocamento de 7,5 nm do máximo de absorção na região do UV de duas soluções: uma contendo apenas TMP dissolvido em água e outra solução contendo o complexo HP γ CD/TMP. Esse deslocamento pode ser explicado através da proteção parcial dos elétrons excitáveis e cromóforos presentes na cavidade da ciclodextrina. [31]

A adição de ciclodextrina a uma solução aquosa contendo fármaco, freqüentemente vai resultar em uma melhora significativa do espectro de fluorescência. Portanto, um aumento na intensidade da fluorescência é freqüentemente observado para as moléculas que são encapsuladas dentro da cavidade da ciclodextrina. [32] Fato este verificado na figura 25.

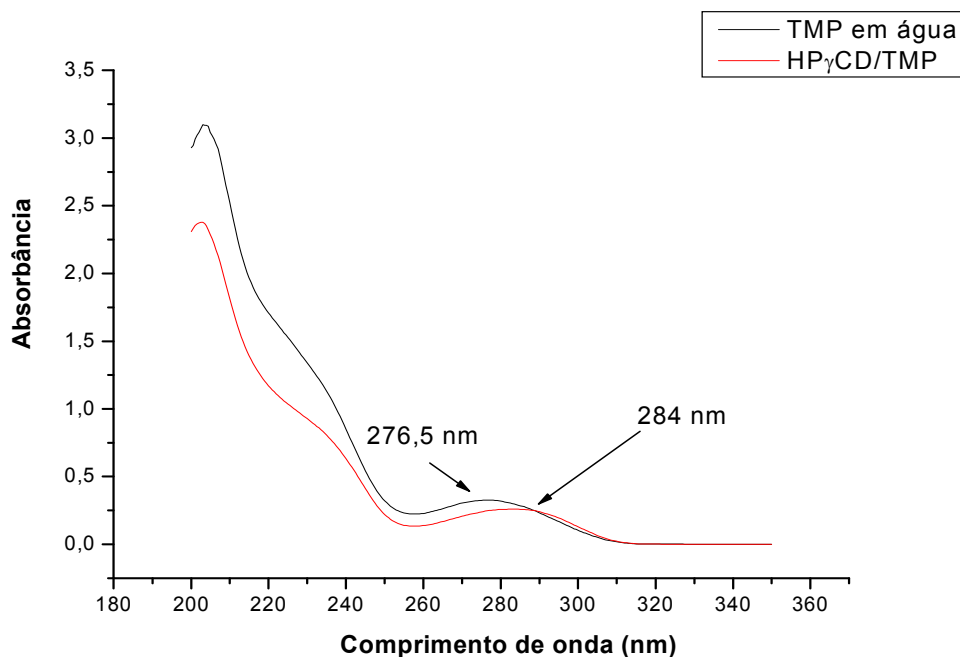


Figura 24 – Espectro de Absorção na região do UV para uma solução de TMP em água (---) e para o complexo HP- γ -CD/TMP em água (---)

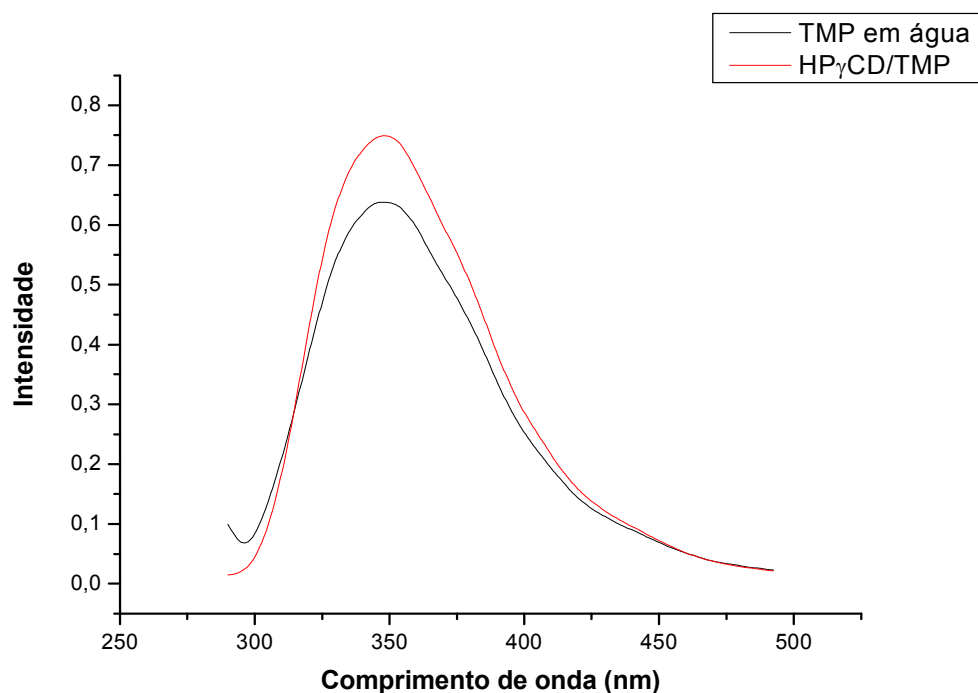


Figura 25 – Espectro de fluorescência para uma solução de TMP em água (---) e para o complexo HP- γ -CD/TMP em água (—)

9.2 Espectroscopia de absorção no Infravermelho (IV)

Os espectros, na região do infravermelho, de espécies moleculares têm origem na absorção de energia causada por transições de um estado vibracional ou rotacional para outro, pois as radiações nesta parte do espectro não tem energia suficiente para causar transições eletrônicas. [42]

Contudo, a caracterização do complexo de inclusão em ciclodextrinas por FTIR tem suas limitações inerentes, visto que as bandas vibracionais das ciclodextrinas não apresentam mudanças significativas quando são formados os complexos, pois a encapsulação de moléculas na cavidade de CDs é devida principalmente às forças de Van der Waals e interações hidrofóbicas. Assim, como não há formação de verdadeiras ligações químicas entre as moléculas do hospede e do hospedeiro nestes complexos de inclusão, não devem ocorrer alterações significativas nesses espectros. [4]

Entretanto, dependendo do sistema, a comparação cuidadosa dos espectros pode fornecer evidências complementares de complexação. Ao contrário da estrutura cristalina do convidado, que é perdida na formação do complexo de inclusão, a estrutura

molecular é preservada de tal forma que as ligações químicas podem ser detectadas nos espectros infravermelhos.

As figuras 26, 27 e 28 apresentam os espectros infravermelhos do TMP, da HP- γ -CD e do complexo de inclusão HP- γ -CD/TMP, cujas atribuições podem ser observadas na Tabela V.

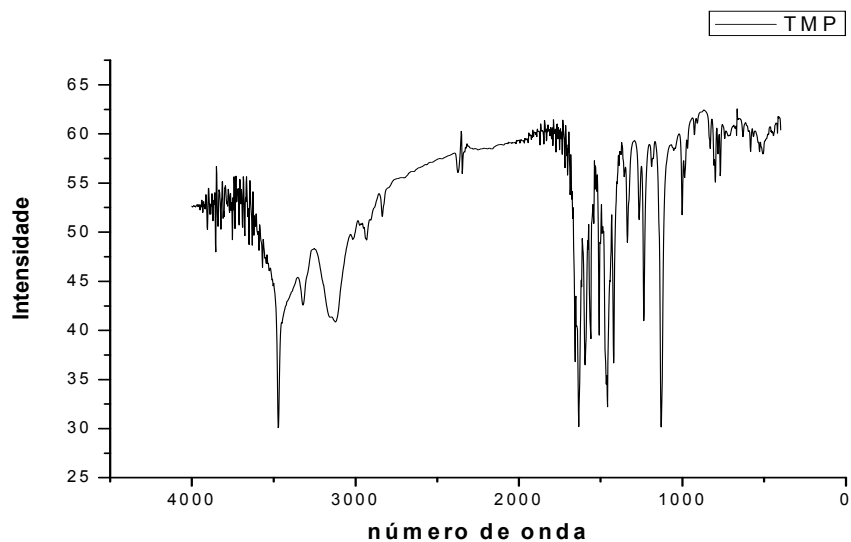


Figura 26 - Espectro infravermelho do fármaco TMP

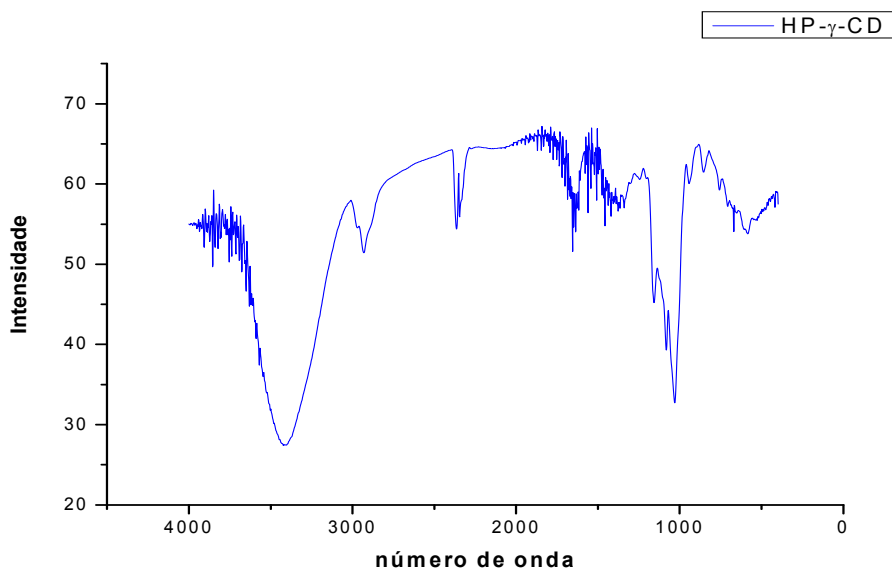


Figura 27 - Espectro infravermelho da HP- γ -CD

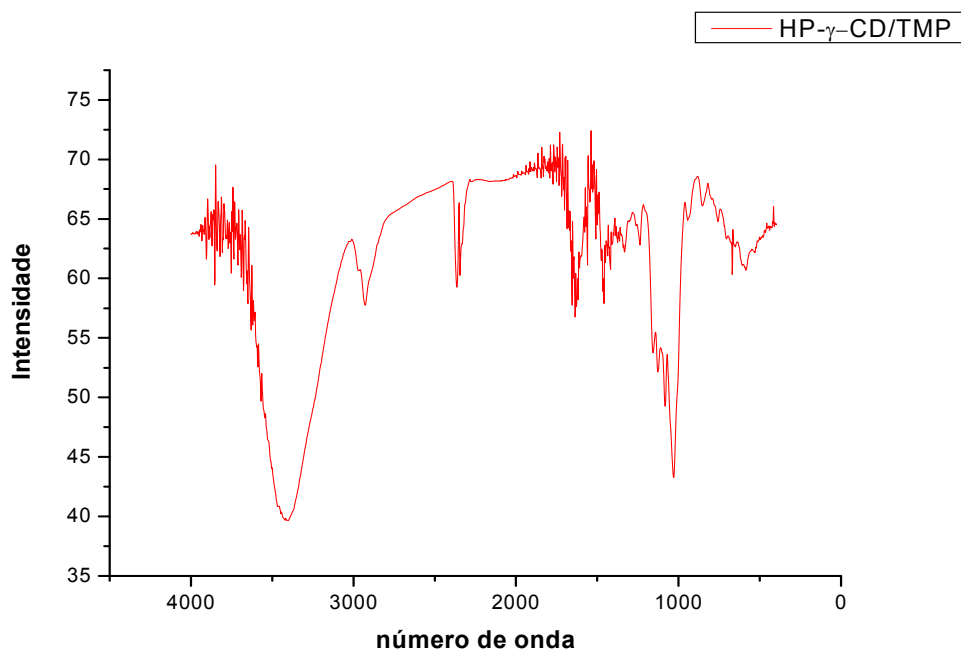


Figura 28 - Espectro infravermelho do complexo de inclusão HP- γ -CD/TMP liofilizado.

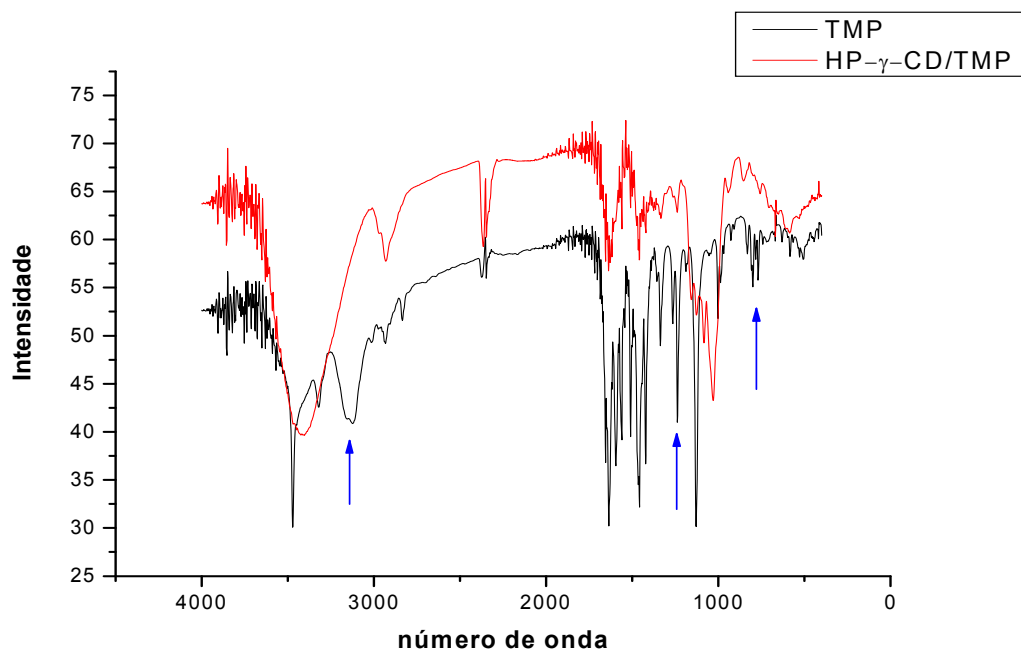


Figura 29 - Espectro infravermelho do TMP comparado com o espectro do complexo de inclusão HP- γ -CD/TMP liofilizado.

Tabela V: Valores de número de onda e atribuições de bandas nos espectros FTIR para o sistema HP- γ -CD /TMP.

| TMP | HP- γ -CD |
|---------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3472 e 3316: $\nu_{\text{asym/sym}}(\text{H-N-H})$ de NH_2 | 3416: ν (O-H) |
| 3128: ν (C-H) de anel aromático | 2966 e 2934: ν (C-H) |
| 1656-1400: ν (C=C) de anel aromático | 1370: δ (C-H) de CH_3 |
| 1340: δ (C-H) de CH_3 | 1342: acoplamento $\delta(\text{C-C-H})$, $\delta(\text{C-O-H})$, $\delta(\text{H-C-H})$ |
| 1130-1100: $\delta(\text{C-H})$ (no plano) de anel aromático | 1026: acoplamento $\nu(\text{C-C})$, $\delta(\text{O-C-H})$, $\delta(\text{C-C-H})$, $\delta(\text{C-C-O})$ |
| 798: $\delta(\text{C-H})$ (fora do plano) de anel aromático | 948: vibrações do esqueleto envolvendo as ligações α -1,4 |
| 514: $\delta(\text{C=C})$ (fora do plano) de anel aromático | 850: acoplamento $\delta(\text{C-C-H})$, $\nu(\text{C-O})$, $\nu(\text{C-C})$ de anel aromático |

ν : estiramento; δ = deformação

O espectro do complexo de inclusão HP- γ -CD/TMP (figura 29) é praticamente dominado por bandas de HP- γ -CD, pois na maioria das regiões as bandas da HP γ CD mascaram as do TMP. Resultado este também observado outros trabalhos [6]. Verifica-se claramente o desaparecimento dos picos do TMP em 798 cm^{-1} , 1130 cm^{-1} e 3126 cm^{-1} , marcadas pelas setas. Observa-se ainda a diminuição da intensidade das bandas indicando que há interações entre o fármaco e a CD.

9.3 Análises Térmicas

Os métodos de análise térmica são muito utilizados na caracterização de sistemas com mais de um componente, tais quais os complexos de inclusão. A análise é feita comparando-se os comportamentos térmicos dos componentes isolados e dos possíveis complexos de inclusão. As ciclodextrinas são caracterizadas como hidratos e apresentam diferentes quantidades de moléculas de água, dependendo do seu processo de preparação e das condições de estocagem. O comportamento das CDs é similar, apresentando algumas diferenças quanto à quantidade de moléculas de água, perda de massa a certas temperaturas e devido ao tipo de degradação termal.

9.3.1 Análise Termogravimétrica (TGA)

Na análise termogravimétrica (TGA), a massa de uma amostra, sob atmosfera de gás inerte é monitorada continuamente em função da temperatura ou do tempo à medida que a temperatura da amostra aumenta (temperatura essa pré-programada), sendo obtidas duas curvas (chamadas curvas de TGA) em função da temperatura: uma delas relacionada ao percentual da massa (Massa %) e outra a derivada, com relação à temperatura, do percentual da massa (Derivada da Massa %/°C). [6] Esta permite a determinação precisa da temperatura em que ocorre determinada perda de massa da amostra. A informação obtida através da TGA é mais limitada do que a obtida por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), porque na TGA a variação de temperatura deve ser suficientemente elevada para provocar alteração na massa da amostra analisada. Portanto, os métodos termogravimétricos são mais adequados ao estudo de sistemas em que o aumento de temperatura acarreta alteração na massa do sistema investigado, como ocorre nas reações de decomposição e de oxidação e em processos físicos como vaporização, sublimação e desorção. [33]

A curva de TGA para o TMP (Figura 30) mostra que sua decomposição se inicia em $\approx 194^{\circ}\text{C}$ e termina em $\approx 364^{\circ}\text{C}$.

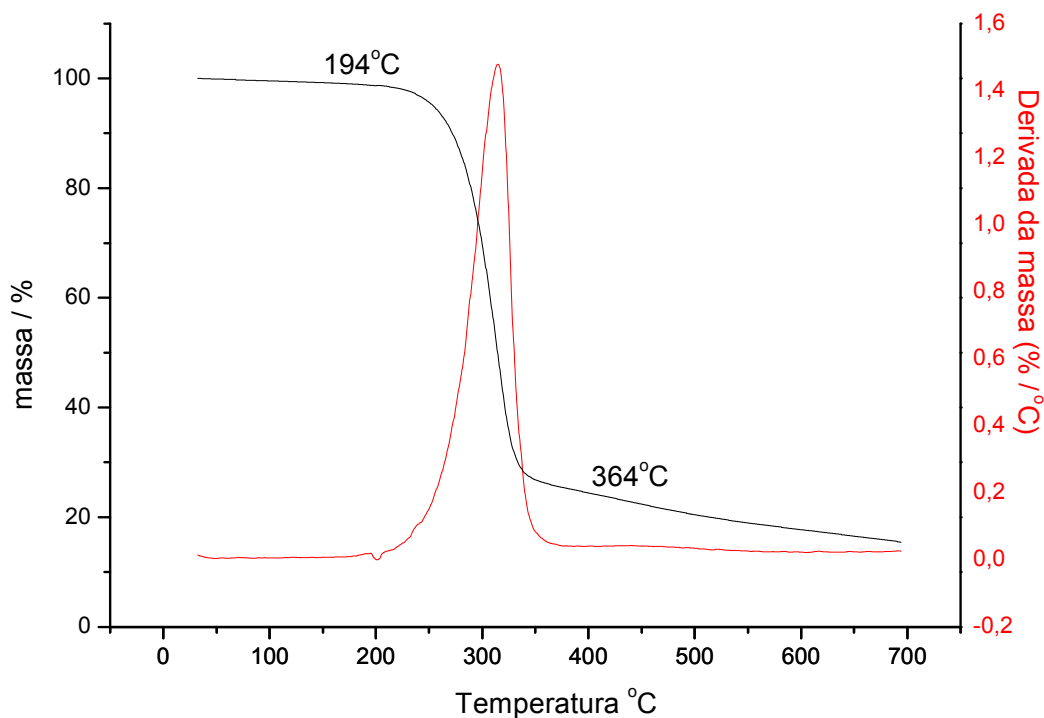


Figura 30: Curvas de TGA do TMP (---) Perda de Massa (%) versus Temperatura (°C) e (---) Derivada da Massa (%/°C) versus Temperatura (°C).

A figura 31 mostra uma comparação das curvas de TGA para o TMP, HP- γ -CD e o complexo, e a figura 32 apresenta a comparação das derivadas de perda de massa. Verifica-se inicialmente uma notável diferença entre as curvas de massa e da derivada de massa do TMP e da HP- γ -CD. O pico mostrado na Figura 32 para a HP- γ -CD é um pouco mais larga e ocorre em maiores temperaturas, indicando que com o aumento de temperatura, a perda de massa ocorre em intervalos de temperatura maiores para a HP- γ -CD, quando comparada ao TMP.

Além disso, a HP- γ -CD apresenta dois intervalos de temperatura nos quais ocorre perda de massa, os quais são: o primeiro entre 44 °C e 55 °C, provavelmente devido à perda de moléculas de água que interagem mais fracamente com os grupos hidroxila na parte externa da molécula de CD; o segundo e o mais intenso, entre 282 °C e 400 °C, correspondente a decomposição da amostra.

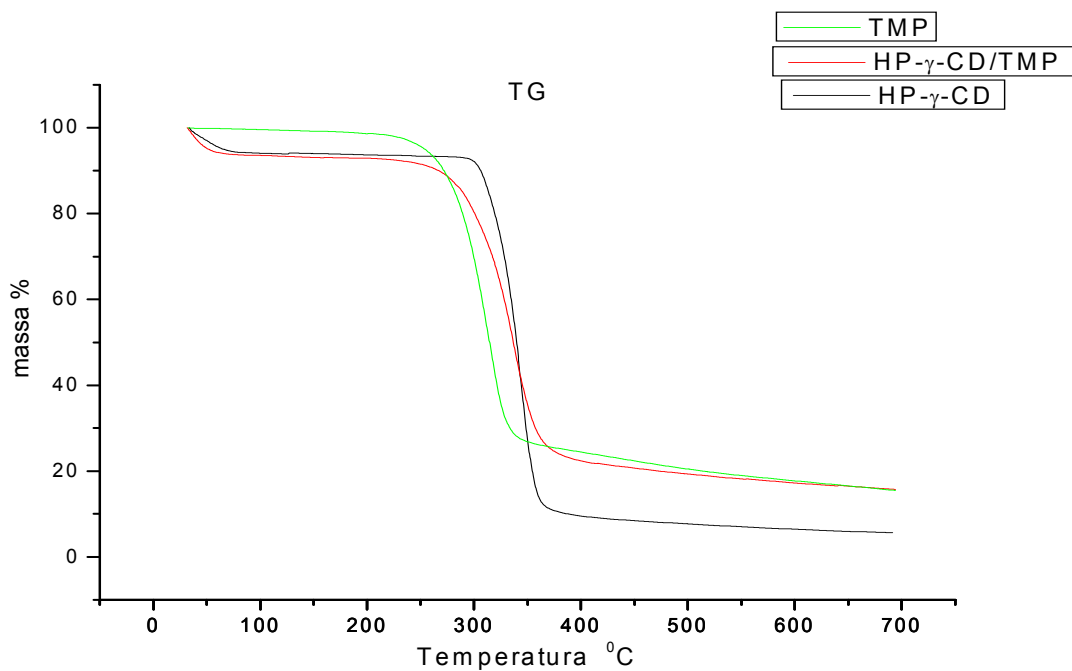


Figura 31: Curvas de TGA do TMP; HP- γ -CD; Complexo HP- γ -CD/TMP obtido por liofilização (a) Massa (%) versus Temperatura (°C).

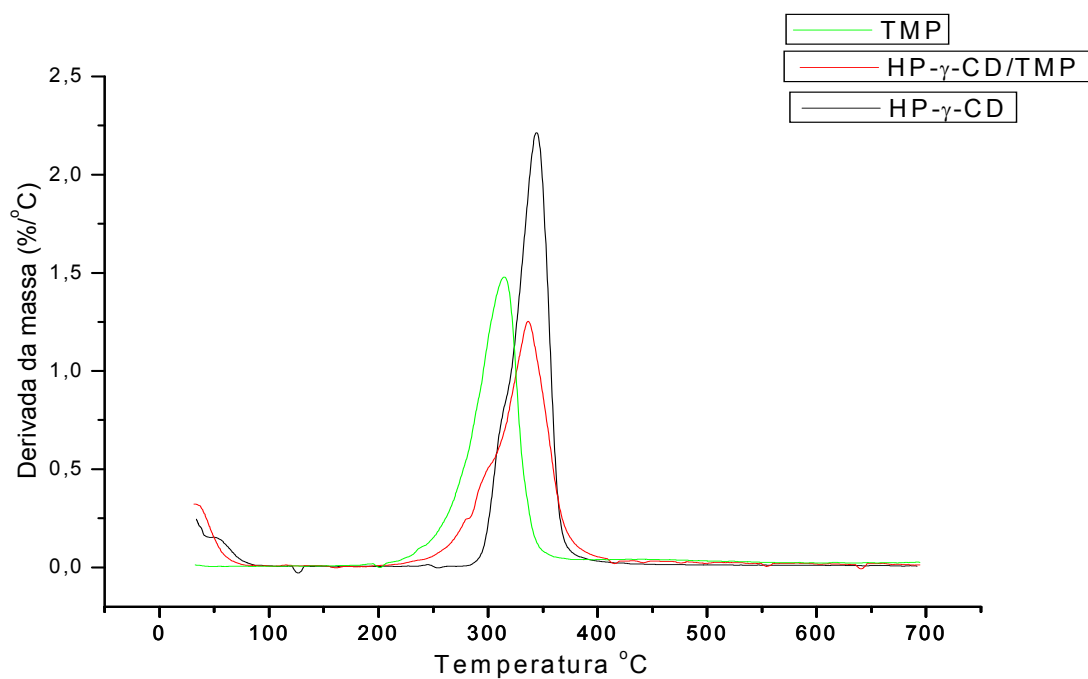


Figura 32: Curvas de TGA do TMP; HP- γ -CD; Complexo HP- γ -CD/TMP obtido por liofilização; Derivada da massa (%/°C) versus Temperatura (°C).

9.3.2 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

Foram obtidas as curvas calorimétricas de DSC para o TMP, HP- γ -CD e para o complexo obtido pelo método de Liofilização, a fim auxiliar a confirmação da presença de um complexo entre este fármaco e a CD. A inclusão do fármaco na cavidade das CDs geralmente leva a perda de propriedades macroscópicas, como pontos de fusão e de ebulição. [33]

Assim, a ausência do pico endotérmico correspondente a fusão do fármaco quando este é misturado com a CD geralmente é tomada como indicativo de formação de complexo. A análise geralmente é limitada à comparação qualitativa das curvas de DSC obtidas para as misturas físicas e as dos complexos.

A curva de DSC obtida para o TMP está na Figura 33, na qual se observa um pico endotérmico em 200°C, correspondente a sua temperatura de fusão.

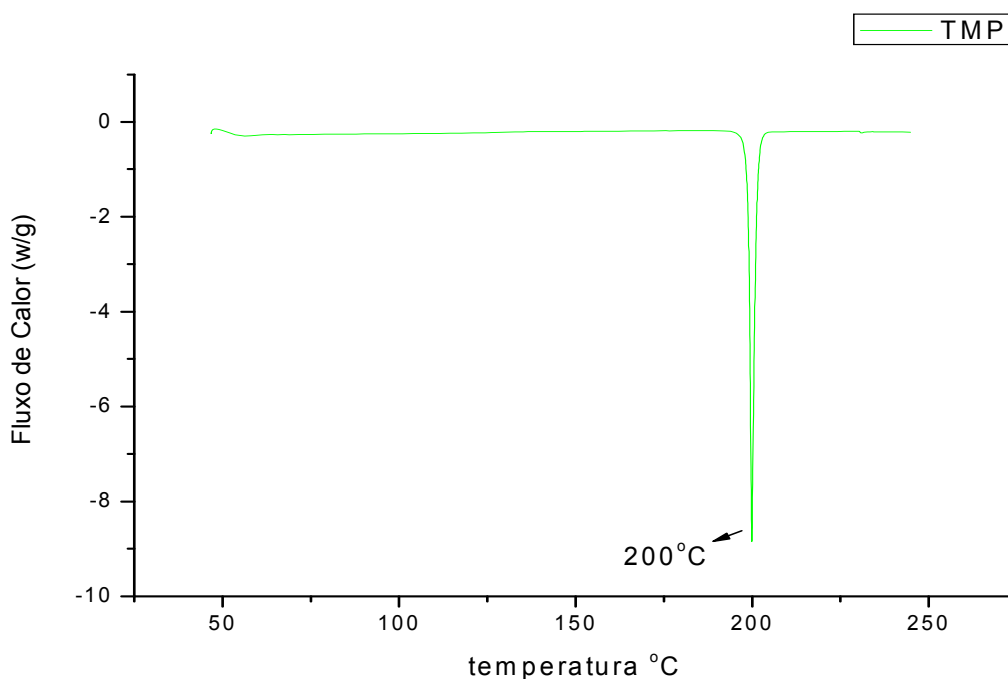


Figura 33: Curva de DSC do fármaco TMP.

As curvas de DSC da HP- γ -CD e do complexo HP- γ -CD/TMP estão nas figuras 34 e 35 respectivamente. A evaporação da água contida na CD ocorre em duas temperaturas 50 °C e 61°C, indicando que existem moléculas de água mais fracamente ligadas (como água de cristalização). A curva de DSC para o complexo liofilizado

mostra que pico de fusão do TMP não é mais observado, indicando que ocorreu interação entre o fármaco e a CD. Quando o fármaco é um sólido cristalino “puro”, a fusão corresponde à quebra das forças que mantêm o cristal coeso: forças intermoleculares fármaco-fármaco. No complexo, cada fármaco está dentro de uma cavidade CD. Neste caso as forças são totalmente diferentes das descritas anteriormente e, não há qualquer razão para o rompimento das forças fármaco-CD requererem a mesma energia que no caso fármaco-fármaco. Por isso também não faz sentido esperar o mesmo pico; quando ele é observado, indica que a amostra de complexo está contaminada com cristais do fármaco livre. Essa evidência é mostrada na figura 36.

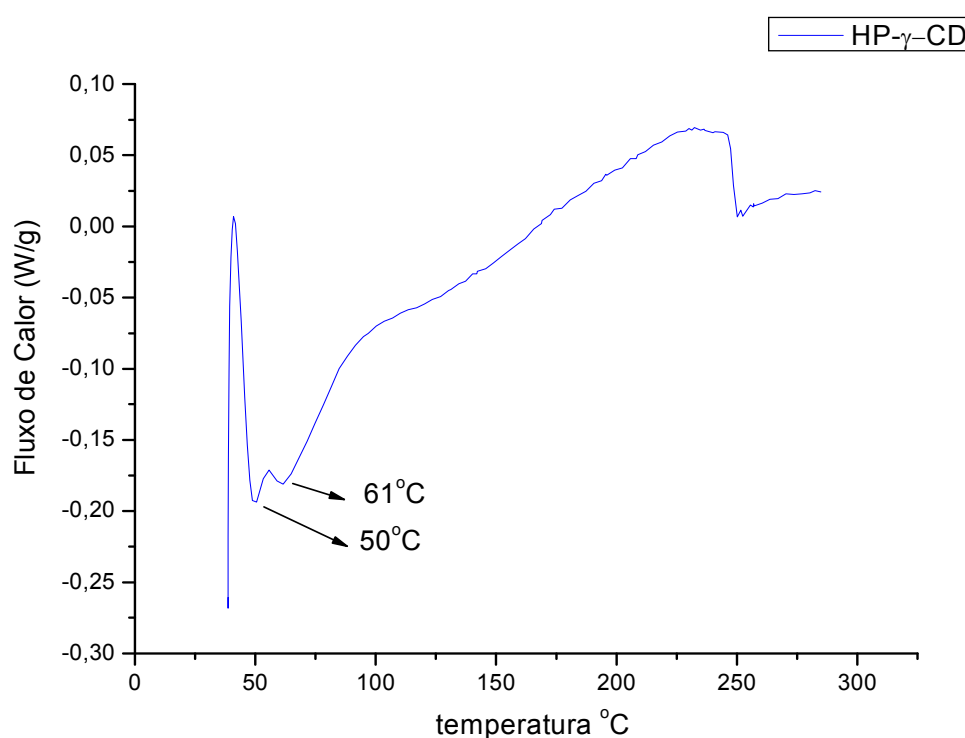


Figura 34: Curva de DSC da HP-γ-CD liofilizada.

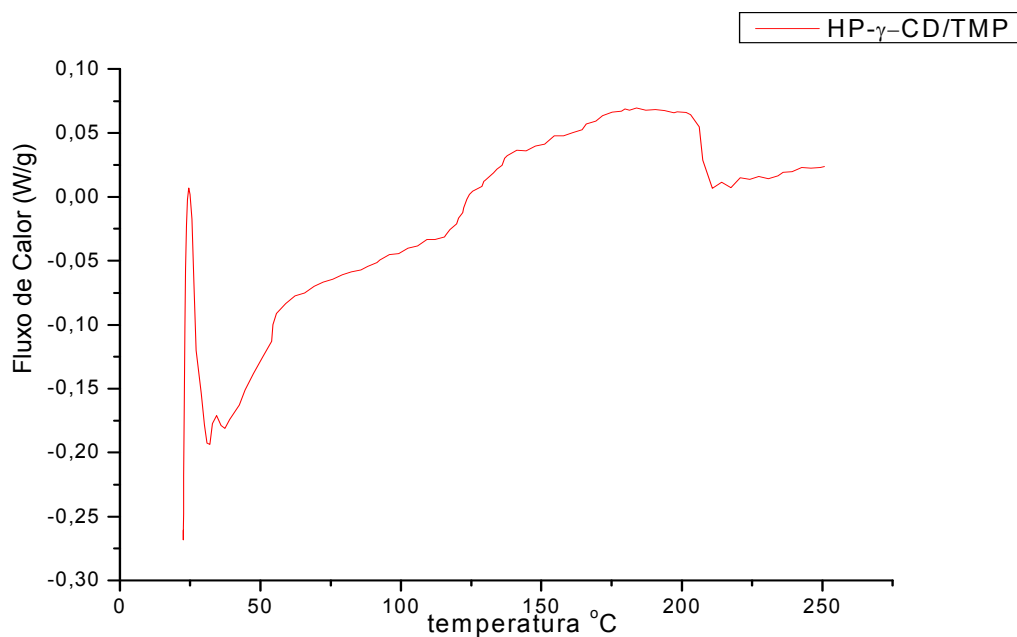


Figura 35: Curva de DSC do complexo HP- γ -CD/TMP obtido por Liofilização.

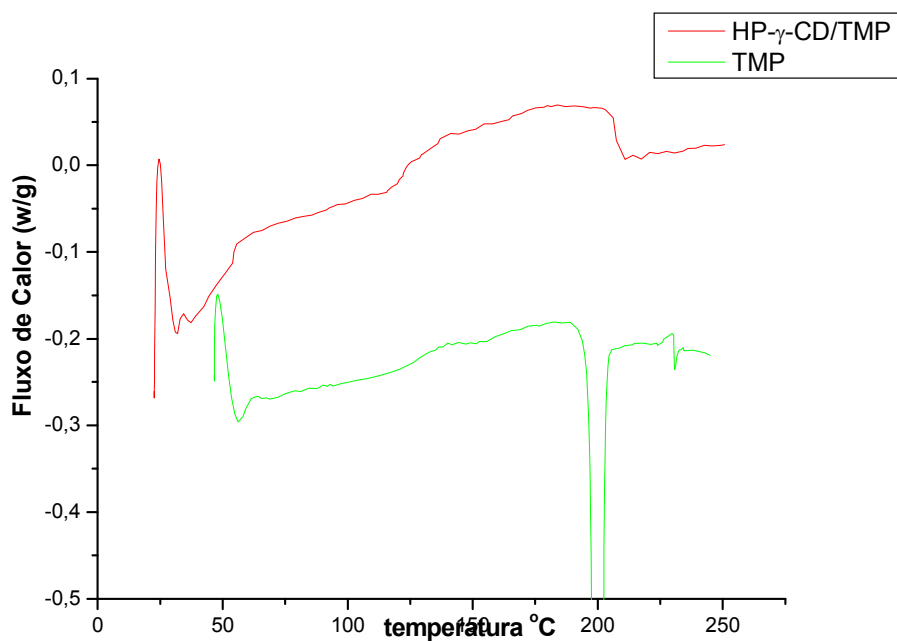


Figura 36: Curvas de DSC do TMP e do complexo HP- γ -CD/TMP obtido por Liofilização.

9.4 Difractometria de Raios-X

Informações complementares sobre a estrutura do complexo de inclusão foram obtidas por Difractometria de Raio-X das amostras na forma de pó. As Figuras 37, 38 e 39 apresentam os difratogramas de raios-X do TMP, da HP- γ -CD e do complexo de inclusão HP- γ -CD/TMP liofilizado.

A formação de complexos de inclusão geralmente resulta em mudanças bem visíveis nos padrões de difração de raios-X das ciclodextrinas e da molécula hóspede, como a amorfização (redução do grau de cristalinidade) dos padrões de difração, o desaparecimento de picos característicos das ciclodextrinas individuais e, em alguns casos o aparecimento de novos picos. Essa técnica é uma prova indireta da formação de complexos. [4]

Foi feita a comparação entre os difratogramas do complexo liofilizado com os difratogramas do fármaco e da ciclodextrina. A formação dos complexos de inclusão HP- γ -CD/TMP pode ser confirmada por essa técnica e os difratogramas de Raios-X estão listados abaixo. Observa-se que o TMP (figura 37) apresenta estrutura mais cristalina quando comparada a ciclodextrina e ao complexo. Os picos de difração da HP- γ -CD são relativamente mais largos que os picos do TMP (figura 38). Para o complexo (figura 39 e 40), verifica-se que os picos de difração do TMP desaparecem ou ocorrem grandes reduções da sua intensidade. Cabe aqui ressaltar que a liofilização tende a gerar sólidos não-cristalinos, pois nela congela-se a solução e sublima-se o solvente. Logo, o soluto (congelado nesta forma) não pode sofrer as difusões e reorientações necessárias à formação do cristal. Alguns picos que são observados se devem ao soluto que precipita durante o resfriamento da solução até seu congelamento, uma vez que a solubilidade diminui com a diminuição da temperatura.

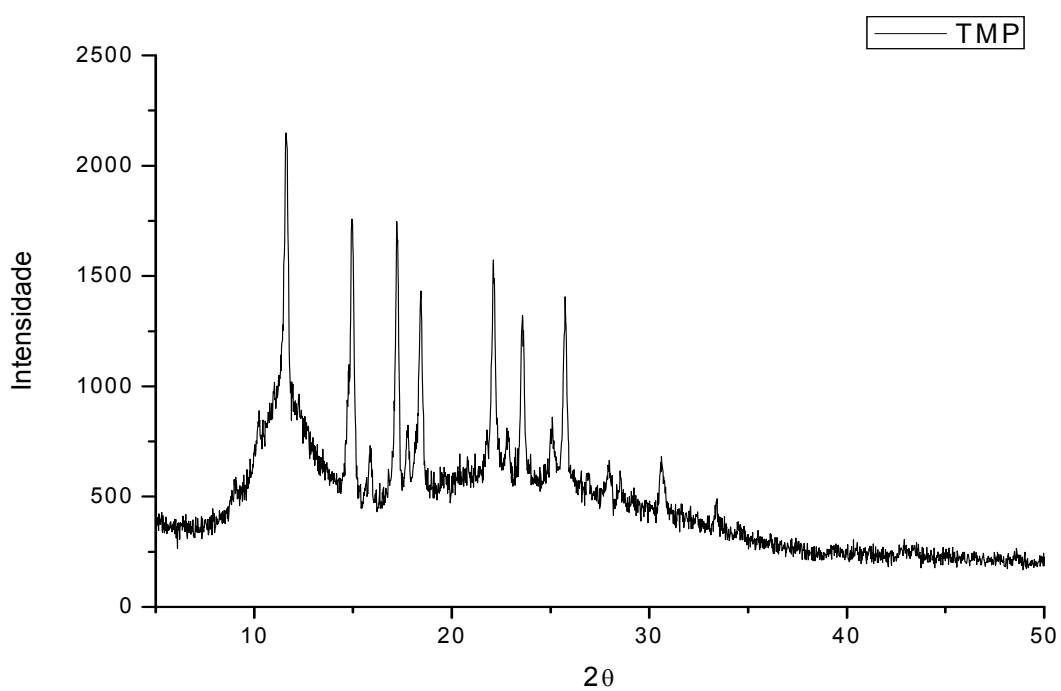


Figura 37: Difratomogramas de Raios-X do TMP

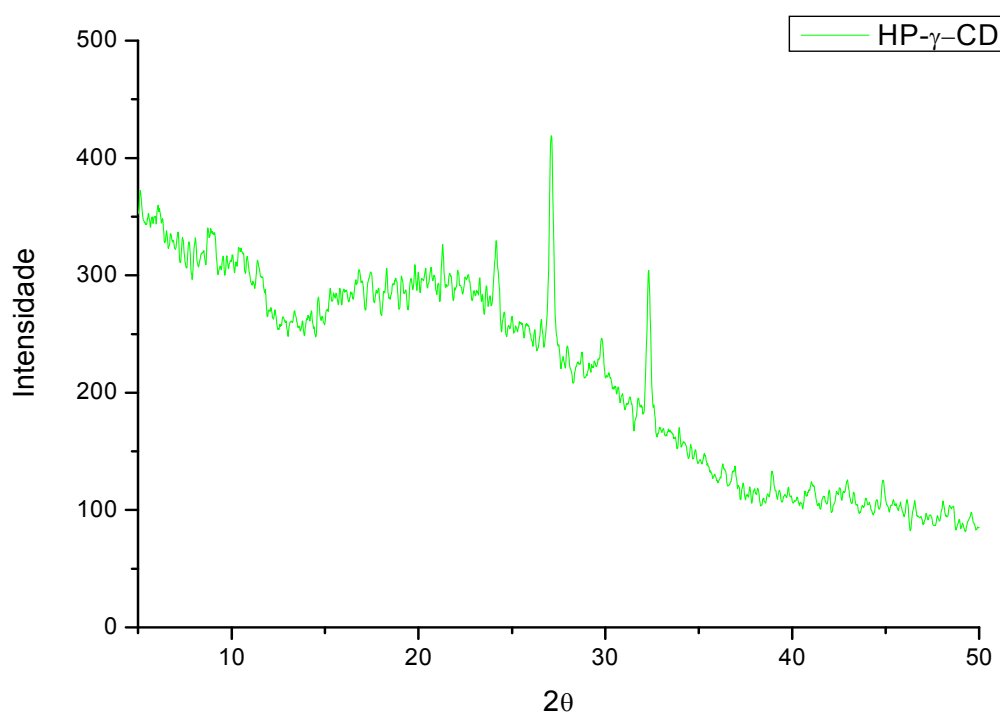


Figura 38: Difratomogramas de Raios-X da HP- γ -CD

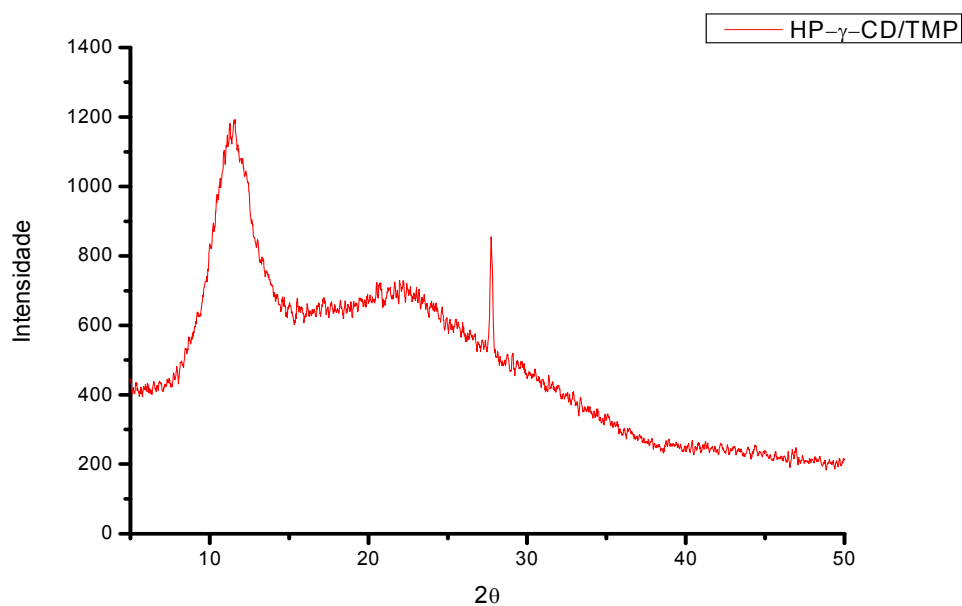


Figura 39: Difratoformas de Raios-X do complexo HP- γ -CD/TMP obtido por Liofilização.

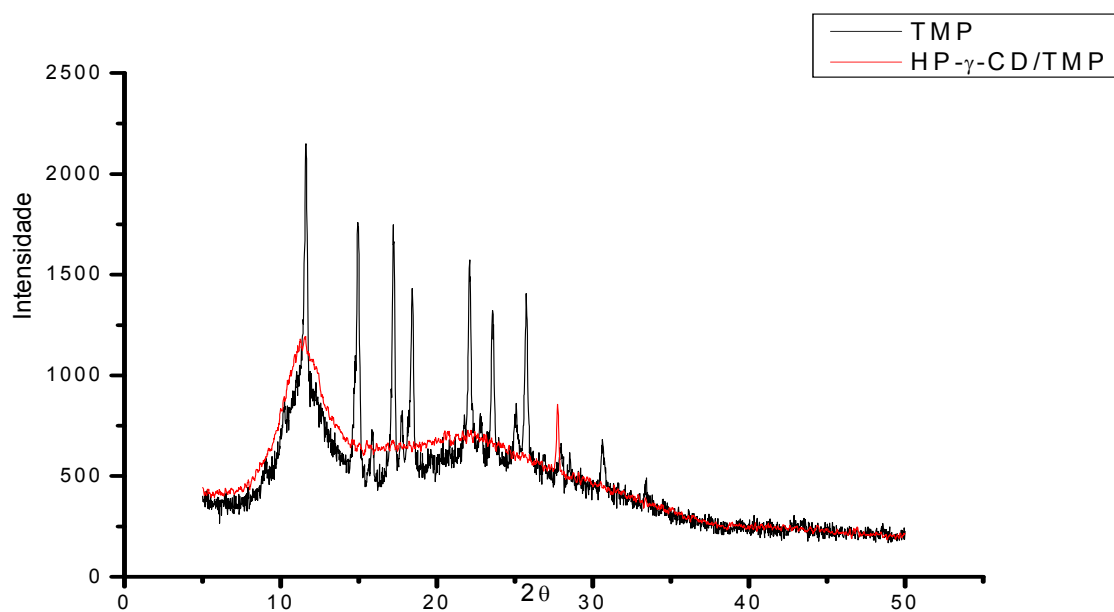


Figura 40: Difratoformas de Raios-X do TMP e do complexo de inclusão HP- γ -CD/TMP obtido por Liofilização.

9.5 Espectroscopia RMN ^1H

A espectroscopia RMN ^1H foi utilizada para a caracterização do modo de inclusão, considerando-se que as medidas bidimensionais do tipo ROESY e/ou NOESY são consideradas como evidências diretas 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 (figura 41) (obtido neste trabalho em CD_3OD) temos sinais que estão de acordo com a literatura (obtido em DMSO-d_6), mostrados abaixo do espectro.

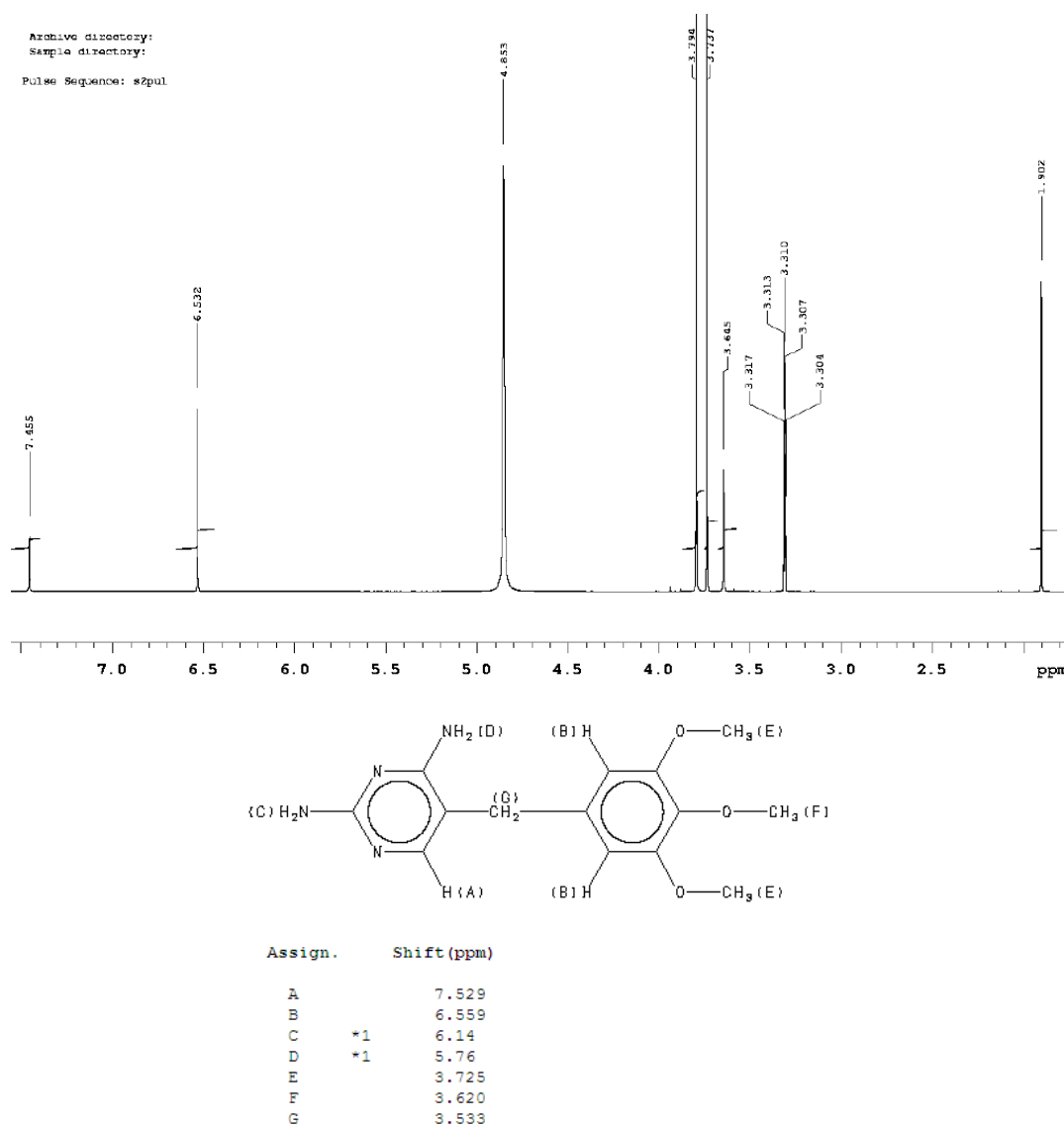
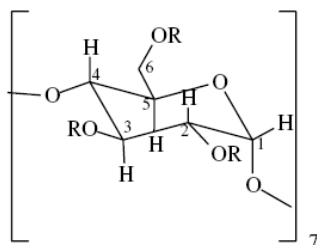


Figura 41: Espectro ^1H RMN unidimensional do TMP. [42]

Com relação ao espectro da HP- γ -CD, os sinais podem ser atribuídos com segurança satisfatória tomando-se como base o espectro da HP- β -CD, estudada mais amplamente.[47] Os sinais observados são referentes aos hidrogênios das unidades glicopirranose, que formam a estrutura básica da ciclodextrina:



Para estes sinais, os valores de deslocamento obtidos neste trabalho (figura 42) foram: H1: 5,182 ppm, H2: 3,484 ppm, H3: 3,866 ppm, H4: 3,574 ppm, H5: 3,785 ppm e H5: 3,768 ppm, o que está de acordo com dados prévios da literatura para a HP β -CD [49].

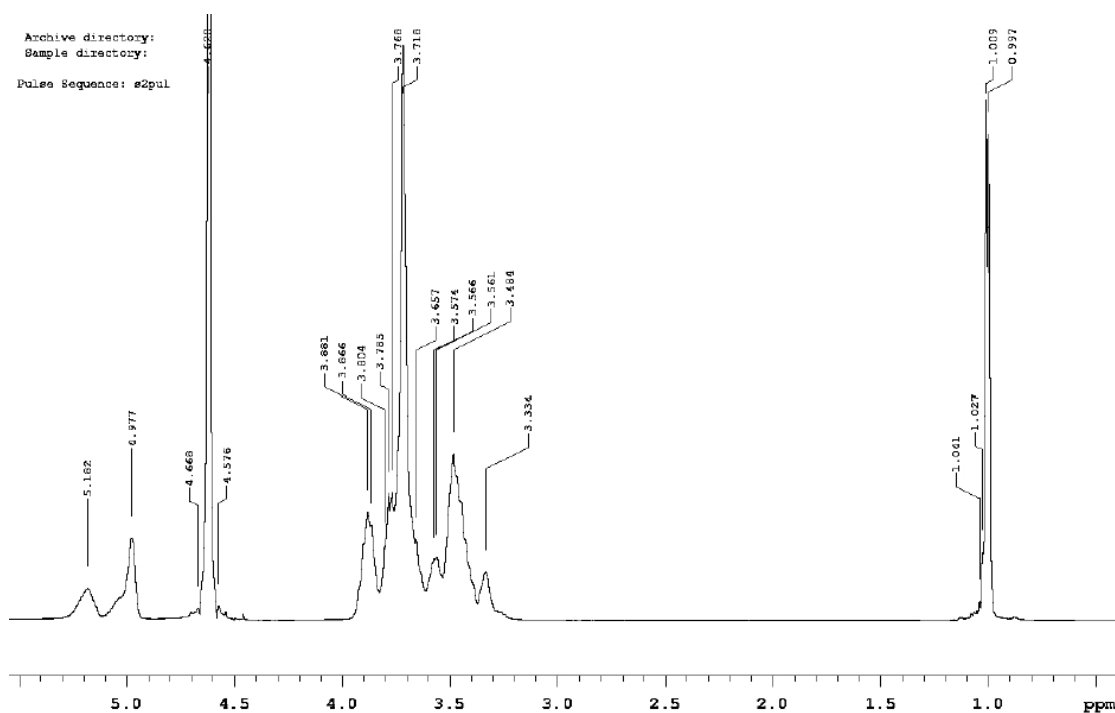


Figura 42: Espectro ^1H RMN unidimensional do HP- γ -CD

No espectro do complexo (figura 43), observam-se simultaneamente sinais do hospedeiro e do convidado, mostrando que a amostra de complexo apresenta ambas as espécies. Geralmente, deslocamentos dos sinais da ciclodextrina podem ser

interpretados como causados por interações envolvidas na formação do complexo, porém, no presente caso, sobreposições na região de 3-4 ppm dificultam uma discussão segura.

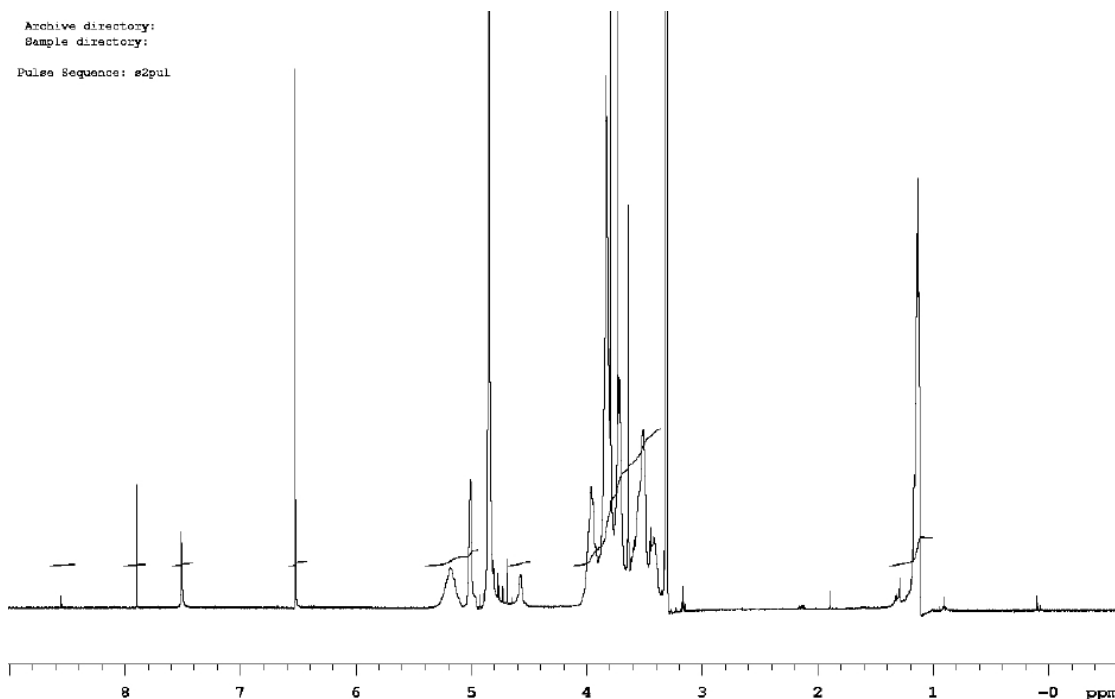


Figura 43: Espectro ^1H RMN unidimensional do Complexo HP- γ -CD/TMP liofilizado

Para uma evidência direta e uma caracterização mais detalhada do modo de inclusão do convidado na cavidade da ciclodextrina, os espectros bidimensionais do tipo ROESY, que apresentam correlações do tipo ^1H - ^1H , são considerados mais adequados [49]. Nestes, de um modo geral, pode-se identificar núcleos de hidrogênio situados a uma distância menor de 0,4 nm entre si, por meio dos sinais fora da diagonal. 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. Os sinais mais relevantes para o estudo de processos de inclusão são os de H3 e H5 que, pela conformação da molécula, ficam orientados para o interior da cavidade. O espectro ROESY do complexo mostra sinais fora da diagonal entre picos dos hidrogênios do anel metoxi do TMP (em 6,532 ppm) e prótons da ciclodextrina, como pode ser observado na região destacada na figura 44. Uma ampliação desta região, figura 45, permite uma análise mais detalhada.

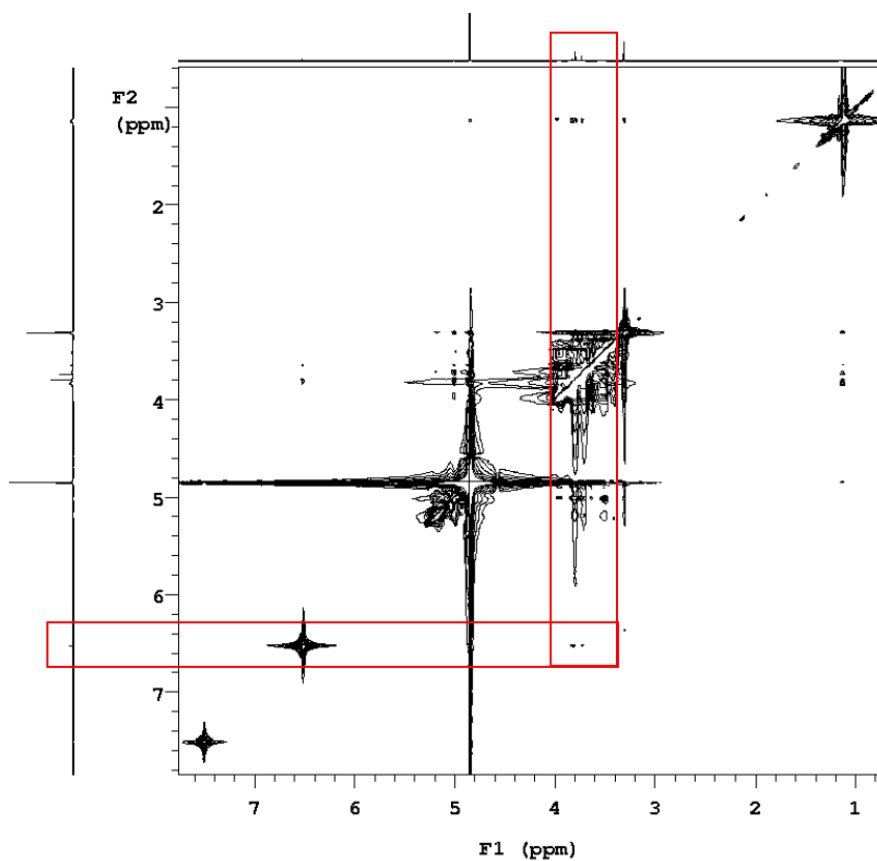


Figura 44: Espectro ROESY ^1H RMN do Complexo HP- γ -CD/TMP

Podemos observar correlações dos prótons da cavidade, tanto H3 (próximo à borda secundária, com abertura maior) quanto H5 (próximo à borda primária, com abertura menor), sendo mais aparentemente mais pronunciados para H3. Estas observações sugerem a entrada do TMP na cavidade através de seu grupo metoxi pela borda secundária. Estas proposições estão sendo submetidas à confirmação por modelagem molecular com métodos computacionais semiempíricos.

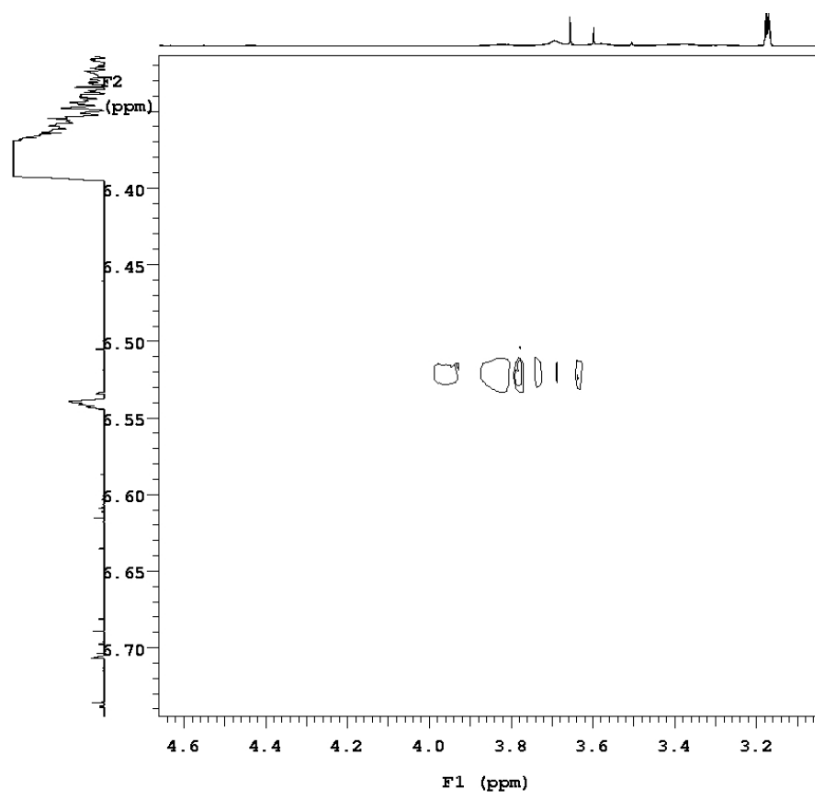


Figura 45: Ampliação da região demarcada na figura 44.

10. CONCLUSÕES

O estudo preliminar das características do fármaco TMP mostrou de forma enriquecedora que o mesmo apresenta uma baixa solubilidade em água e um espectro de absorção óptica com uma banda centrada em torno de 275 nm (meio neutro e ácido), deslocada para 287,5 nm em meio básico;

Os coeficientes de absorvidades molares estão centrados em valores típicos das transições de baixa energia do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$. Verificou-se também que o TMP possui um único valor de pK_a ;

O método de suspensão foi eficiente para a preparação dos complexos de inclusão HP- γ -CD/TMP com estequiometria 1:1 para o complexo e constantes de estabilidade indicativas de interações relativamente fortes;

Através de encapsulamento com HP- γ -CD, foi possível aumentar a solubilidade aquosa do TMP, sendo este aumento da solubilidade crescente em função da concentração de HP- γ -CD a temperaturas abaixo de 25°C;

Verificou-se ainda que o aumento da solubilidade do TMP foi crescente em função da concentração de HP- γ -CD em meio tamponado, e que a constante de associação foi crescente com a diminuição do pH;

O gráfico obtido aplicando o método das variações contínuas (Job's Plot) demonstrou que a estequiometria do complexo HP- γ -CD/TMP é de 1:1;

Verificou-se mudanças no espectro de UV e no espectro Fluorimétrico, indicando a formação do complexo;

Na análise por IV, observou-se a diminuição da intensidade das bandas do complexo HP- γ -CD/TMP indicando que há alguma interação entre o hóspede e o hospedeiro e verificou-se ainda que alguns picos oriundos do espectro do TMP sumiram quando em comparação com o espectro do complexo, indicando mais uma vez a interação das espécies;

De acordo com estudos do comportamento térmico, pode-se afirmar que o fármaco na forma complexada em HP- γ -CD apresentou maior estabilidade térmica do que em suas formas cristalinas, além de um comportamento consistente com a formação de uma espécie química distinta;

As análises dos difratogramas obtidas mostraram perda do padrão de ordenamento do cristal de TMP quando comparado ao difratograma do complexo;

Na espectroscopia de RMN, os resultados foram bem coerentes, os quais demonstraram a inclusão do TMP na cavidade da HP- γ -CD;

Os resultados da caracterização do sistema HP- γ -CD/TMP mostraram evidências de inclusão na cavidade do hospedeiro;

A HP- γ -CD pode ser utilizada para aumentar a solubilidade do fármaco TMP, com o intuito de diminuir os efeitos adversos de sua administração.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. UEKAMA, K.; HIRAYAMA, F.; IRIE, T. Cyclodextrin drug carrier system *Chemical Reviews*. 98, p. 2045-2076, 1998.
2. STEED, J. W; ATWOOD J. L. Supramolecular Chemistry: A concise introduction, John Wiley, 2000.
3. KUROSUMI, M.; NAMBU, N.; NAGAI, T. Inclusion compounds of non-steroidal anti-inflammatory and other slightly water soluble drugs with α and β -cyclodextrins in powdered form. *Chemical Pharmaceutics Bulletin*. 23, p. 3062, 1975.
4. SZEJTLI, J. Introduction and General overview of cyclodextrin chemistry. *Chemical Reviews*. p. 1743-1753, 1998.
5. WENZ, G. Cyclodextrins as building-blocks for supramolecular structures and functional units. *Chemie Internationala Edition in Englishl*. 33, p. 803, 1994.
6. CALDERINI. A. *Encapsulação e Caracterização Físico-Química do Fármaco Vasodilatador Minoxidil em Ciclodextrinas*. 2006. 196 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2006.
7. BERGERON, R.J. Development of a Hypusine Reagent for Peptide Synthesis *Journal of Chemical Education*. 54, p. 204, 1977.
8. SAENGER, W. Cyclodextrin inclusion-compounds in research and industry. *Angewandte Chemie International Edition*. 19, p. 343-361, 1980.
9. RIBEIRO, A.O. *Interação entre α -CD e compostos de terras raras luminescentes*. 2000. 60 f. Dissertação (Mestrado em Química), Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Ribeirão Preto, São Paulo, 2000.
10. SALTÃO, R.; VEIGA, F. Ciclodextrinas em novos sistemas terapêuticos. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 37, 2001
11. UEKAMA, K., IRIE, T. New perspectives in cyclodextrin pharmaceutical applications cyclodextrin derivatives as new drug carriers. *Drug Investigation*. 2, p. 22-28, 1990.

12. A. R. KHAN.; P. FORGO.; K. J. STINE.; V. T. D'SOUZA. Methods for selective modifications of cyclodextrins, *Chemical Reviews*. 98, p. 1977-1996, 1998.
13. LI, S.; PURDY, W. C. Cyclodextrins and their applications in Analytical Chemistry, *Chemical Reviews*, 92, p. 1457-1470, 1992.
14. QUINONES, H. J.C. *Ciclodextrinas: naturaleza, propiedades y aplicaciones*. Departamento de Madera, Celulosa Y Papel, Universidad Guadalajara, México, 2001.
15. BREWSTER, M, E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59, p. 645–666, 2007.
16. BLUM, W.; AICHHOLZ, R.; RAMSTEIN, P.; FETZ, A.; RASCHDORF, F. Determination of 2-hydroxypropyl- γ -cyclodextrin in plasma of cynomolgus monkeys after oral administration by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography*. p. 171–178, 1998.
17. MORAES, C, M.; ABRAMI, P.; GONÇALVES, M, M.; FILHO, N, A. Preparação e Caracterização físico-química de complexos de inclusão entre anestésicos locais e hidroxipropil- β -ciclodextrina. *Química Nova*, 30, p. 777-784, 2007.
18. HIGUCHI, T.; CONNORS, K. A. *Advances Analysis Chemistry Instruments*. 4, p. 117-212, 1965.
19. MÁSSON M, LOFTSSON T, MÁSSON G, STEFÁNSSON E. Cyclodextrins as permeation enhancers: some theoretical evaluations and in vitro testing. *Journal Control Release*, p. 107-18, 1999.
20. MONTANARI, M. L. C.; MONTANARI, C. A.; PILO-VELOSO, D.; BEEZER, A. E.; MITCHELL, J. C. Drug Delivery Systems. *Química Nova*, 21, p. 470-476, 1998.
21. LOFTSSON, T.; BREWSTER, M. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *Journal Pharmaceutical Sciences*. 85, p. 1017-1025, 1996.

22. PITHA, J.; SZENTE, L.; SZEJTLI, J. Molecular encapsulation of drugs by cyclodextrin and congeners. *Controlled drug delivery*. p. 125-148, 1983.
23. HEELON MW, WHITE M. "Disulfiram-cotrimoxazole reaction". *Journal Pharmacotherapy* 18, p. 869, 1998.
24. CAETANO, W.; TABAK, M. Interaction of chlorpromazine and trifluoperazine with ionic micelles: electronic absorption spectroscopy studies. *Spectrochimica Acta Part A, Brazil*, 55, p. 2513-2528, 1999.
25. MEYLAN, W. M., HOWARD, P. H., BOETHLING, R. S.; *Environmental Toxicology. Chemistry*. 15, p.100-106, 1996.
26. BARREIRO, E. J., FRAGA, C. A. M., *Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos*, Porto Alegre, Artmed, 2001, Cap 1.
27. DOTSIKAS, Y.; LOUKAS, Y. Efficient determination and evaluation of model cyclodextrin complex binding constants by electrospray mass spectrometry. *Journal American Society for Mass Spectrometry*.14, p. 1123-1129, 2003.
28. MOYANO, J.; ARIAS-BLANCO, M. J.; GINÉS, J. M.; GIORDANO, F. Solid-state Characterization and Dissolution Characteristics of Glicazide- β -cyclodextrin inclusion Complexes. *International Journal of Pharmaceutics*.148, p. 211-217, 1997.
29. JIAO, H.; GOH, S. H.; VALIYAVEETTIL, S. *Macromolecules*. 35, p. 1399-1402, 2002.
30. LOFTSSON, T. Effects of cyclodextrins on the chemical stability of drugs in aqueous solutions. *Drug Stability*, 1, p.22-33, 1995.
31. SZEJTLI, J. Cyclodextrin inclusion complexes. *Cyclodextrin Technology*, p. 79, 1988.
32. FRÖMMING, K. H.; SZEJTLI, J. Preparation and Characterization of Cyclodextrin Complexes. *Cyclodextrins in Pharmacy*. 5, p. 83, 1994.
33. GIORDANO, F.; NOVAK, C.; MOYANO, J. R. Thermal analysis of cyclodextrins and their inclusion compounds. *Thermochemica Acta*. 380, p. 123-151, 2001.

34. NOVAK, C.; FODOR, M.; POKOL, G.; IZVEKOV, V.; SZTATISZ, J.; ARIAS, M. J.; GINES, J.M. *Journal Thermal Analysis*. 51, p. 1039, 1998.
35. CONNORS, K. A. Measurement of Cyclodextrin Complex Stability Constants. *Comprehensive Supramolecular Chemistry*. 3, 205-241, 1996.
36. BRUMFITT W, HAMILTON-MILLER J.M.; Limitations of and indications for the use of co-trimoxazole. *Journal of Chemotherapy*. 6, p. 3-11, 1994.
37. BRUMFITT W, HAMILTON-MILLER JM. Reassessment of the rationale for the combinations of sulphonamides with diaminopyrimidines. *Journal of Chemotherapy*. 5, p. 465, 1993.
38. H.O. Ammar, S. A. El-Nahhas, L. H. Emara, Improvement of some pharmaceutical properties of drugs by cyclodextrin complexation. 7. Trimethoprim. *Pharmazie*, 52, p. 376-379, 1997.
39. Li N, Zhang Y.H, Xiong X.L, Li Z.G, Jin X.H, Wu Y.N; Study of the physicochemical properties of trimethoprim with beta-cyclodextrin in solution. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 38. p. 370-374, 2005.
40. Li N, Zhang YH, Wu YN, Xiong XL, Zhang YH; Inclusion complex of trimethoprim with beta-cyclodextrin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 39, 824-829, 2005.
41. M.POURMOKHTAR, G. A. JACOBSON. Enhanced stability of sulfamethoxazole and trimethoprim against oxidation using hydroxypropyl- β -cyclodextrin, *Pharmazie*, 60. 837-839, 2005]
42. SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. *Princípios de Análise Instrumental*, Ed.Bookman, Porto Alegre, 5^a ed., 2002.
43. LOUKAS, Y, L.; Multiple Complex Formation of Fluorescent Compounds with Cyclodextrins: Efficient Determination and Evaluation of the Binding Constant with Improved Fluorometric Studies. *Journal of Physical Chemistry*. 101, p. 4863-4866, 1997.

44. LOURO, S.R.W., NASCIMENTO, O.R., TABAK,M.; Charge and pH-dependent binding sites fro dibucaine in ionic micelles:a fluorescence study. *Biochimica Biophysica. Acta.*1190, p.319, 1994.
45. LÁZARO. G. S. *Estudo Espectroscópico da interação de Pirimetamina e Sulfadiazina com Sistemas modelos de membranas biológicas.*2006. 87 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, 2006.
46. Spectral Database for Organic Compounds, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Japan, (File 14017) SDBS
47. YANG, B; LIN, J; CHEN, Y; LIU, Y.; Artemether/hydroxypropyl- β -cyclodextrin host-guest system: characterization, phase-solubility and inclusion mode. *Bioorganic Medicinal Chemistry.* 17, p. 6311-6317, 2009.
48. ARAÚJO, M. V. G; VIEIRA, E. K. B; LAZARO, G. S; CONEGERO, L. S; FERREIRA, O. P; ALMEIDA, L. E; BARRETO, L. S; JR, N. B. C; GIMENEZ, I. F.; Inclusion complexes of pyrimethamine in 2-hydroxypropyl-b-cyclodextrin: Characterization, phase solubility and molecular modelling, *Bioorganic Medicinal Chemistry.* 15, p. 5752-5759, 2007.
49. SCHNEIDER, H. J; HACKET, F; RÜDIGER, V.; NMR Studies of Cyclodextrins and Cyclodextrin Complexes, *Chemical Reviews*, 98, p. 1755-1785, 1998.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)