



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
MESTRADO E M CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PRODUÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DE MEDICAMENTOS

MÔNICA DO AMARAL SILVA ARRAIS

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO COMPLEXO DE
INCLUSÃO DAPSONA: β CD E DAPSONA:SBE β CD PARA INCREMENTO DE
SOLUBILIDADE EM FORMA FARMACÊUTICA**

TERESINA – PIAUÍ

2012

MÔNICA DO AMARAL SILVA ARRAIS

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO COMPLEXO DE
INCLUSÃO DAPSONA: β CD E DAPSONA:SBE β CD PARA INCREMENTO DE
SOLUBILIDADE EM FORMA FARMACÊUTICA**

Dissertação, como requisito complementar, para obter o título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da Universidade Federal do Piauí (UFPI).

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Araújo de Souza

Co-orientador: Prof. Dr. Francisco das Chagas Alves Lima

TERESINA - PIAUÍ

2012

MÔNICA DO AMARAL SILVA ARRAIS

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO COMPLEXO DE
INCLUSÃO DAPSONA: β CD E DAPSONA:SBE β CD PARA INCREMENTO DE
SOLUBILIDADE EM FORMA FARMACÊUTICA**

**Dissertação defendida sob a avaliação da Comissão Examinadora constituída
por:**

Presidente e Examinador Interno: **Prof. Dr. Alexandre Araújo de Souza**
(Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal
do Piauí)

Assinatura: _____

Examinador Interno: **Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes**
(Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal
do Piauí)

Assinatura: _____

Examinador Externo: **Prof. Dr. Reginaldo da Silva Santos**
(Universidade Estadual do Piauí)

Assinatura: _____

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. Luiz de Sousa Santos Júnior

VICE-REITOR

Prof. Dr. Edwar de Alencar Castelo Branco

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Saulo Cunha de Serpa Brandão

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. MSc. Antonio dos Santos Rocha Filho

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. José Guilherme Ferre Pompeu

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS

FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

SUB-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS

FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes

LABORATÓRIOS E INSTITUIÇÕES ENVOLVIDAS

Núcleo de Tecnologia Farmacêutica (NTF) – UFPI

Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

Campus Universitário Ministro Petrônio Portela – Bairro Ininga

Cep: 64049-550 - Teresina-PI – Brasil.

Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos (LTM) - DCFAR - UFPE

Responsável: Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto.

Av. Prof. Arthur de Sá, S/N. Cidade Universitária.

CEP: 50.740-521- Recife-PE – Brasil.

INSTITUTO DE QUÍMICA – UNICAMP

Responsável: Anita Jocelyne Marsaioli

CEP 13083-970 - Caixa Postal 6154 – Campinas, SP

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ

Responsável: Francisco das Chagas Alves Lima

Rua João Cabral, 2231, Pirajá

CEP 13560-970 - Teresina, PI - Brasil

“Nossa maior fraqueza está em desistir. A maneira mais segura de ter sucesso é sempre tentar mais uma vez.”
(Thomas Edison)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, por me permitir cumprir mais essa etapa da minha vida! Agradeço cada momento, as alegrias e tristezas, as derrotas e vitórias. Aprendi muito e mais que isso, cresci!

Ao professor Alexandre que mesmo nos meus momentos de desânimo estava ao meu lado, me dando coragem. Agradeço pela dedicação e pelas palavras.

Ao professor Lamartine e aos demais professores do programa pelos ensinamentos transmitidos.

Aos colegas de mestrado pelos bons momentos vividos, pelas angústias divididas e hoje pelas vitórias conquistadas. Em especial, Ilka, Fernanda e Lina, obrigada por terem me ouvido... muito! Aos colegas IC que passaram para me ajudar BASTANTE: Marcos, Sóstenes e Hellan.

Aos colaboradores, por cederem além dos laboratórios, tempo e paciência! Ao professor Francisco (UESPI) pelos cálculos. No IQ - UNICAMP, agradeço a professora Anita Marsaioli e Lucas Martins. Aos pesquisadores do Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos – LTM - Lariza Darlene Santos Alves, Alexandre Couto Carneiro Vieira, Pedro José Rolim Neto. Ao Departamento de Física da Universidade Federal de Pernambuco pelas análises realizadas.

À UFPI, ao PPGCF, pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

Aos colegas de trabalho do HUT e HEMOPI, por diversas vezes terem ocupado meu lugar quando assim era necessário.

A D. Ana, Clarinha e Marciano, por terem dividido comigo as obrigações quando por várias vezes precisei me ausentar dos cuidados de minha filha. Obrigada pelo amor e cuidado que tem com minha princesa.

Às amigadas...por serem verdadeiras!!!

A minha família! Meu porto seguro! A ela dedico este trabalho! Meu pai que é meu colega, minha inspiração, meu modelo. Minha mãe que é minha maior incentivadora, que me faz ver que dá tudo certo e que eu posso. Meu irmão, que mais que tudo é meu amigo. Minha avó, tias, primos... pelo companheirismo.

E, finalmente, ao meu amor maior, minha princesa **Júlia**, que é quem me dá força e alegria todos os dias, que me estimula a vencer, que me faz querer ser melhor. A ela agradeço a felicidade que me proporciona diariamente e me desculpo pelas vezes que tive que deixá-la por conta deste trabalho.

A todos, que direta ou indiretamente me ajudaram nesse projeto, seja com trabalho ou com o incentivo que recebia diariamente, meu muito obrigada!

ARRAIS, M.A.S. **Caracterização físico-química do complexo de inclusão dapsona:βCD e dapsona:SBEβCD para incremento de solubilidade em forma farmacêutica.** Teresina – PI: UFPI, 2012. (Dissertação – Mestrado em Ciências Farmacêuticas).

RESUMO

O presente trabalho tem por objetivo a caracterização do complexo de inclusão formado entre a β-ciclodextrina (βCD) e o fármaco dapsona (DAP), bem como entre tal fármaco e a sulfobutiléter-β-ciclodextrina (SBEβCD). A dapsona é uma sulfona pertencente à classe II do Sistema de Classificação Biofarmacêutica, sendo a principal droga para o tratamento da hanseníase, mas que, devido a sua baixa solubilidade, pode causar muitos efeitos adversos, levando a dificuldades na terapêutica. As ciclodextrinas são bons solubilizantes para vários fármacos, sendo por isso, incorporadas em formulações farmacêuticas. Os complexos foram preparados por evaporação e foram caracterizados por análises termogravimétricas (TG), análise térmica diferencial (DTA), espectroscopia no infra-vermelho (IV), difração de Raios-X (DRX) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN 1H). A ocorrência de inclusão nos estudos em solução foi evidenciada através do aumento da solubilidade da DAP em presença da βCD e da SBEβCD, descritos pelo diagrama de solubilidade de fases, com um perfil do tipo A_L, obtendo-se um valor de 3748 M⁻¹ e 3777 M⁻¹ para a constante de associação do complexo com βCD e SBEβCD, respectivamente. A estequiometria de 1:1 para os complexos foi sugerida tanto a partir do diagrama de solubilidades quanto pelo método das variações contínuas. Evidências adicionais de inclusão foram obtidas por TG, DRX e IV. Por RMN, foi possível determinar a topologia (ROESY), a estequiometria (“Job plot”) e a constante de associação (DOSY) dos complexos. Um estudo de simulação computacional foi realizado para visualizar a inserção do fármaco nas ciclodextrinas. Por esse estudo fica evidenciado que o fármaco dapsona tem sua solubilidade melhorada quando em complexo com ciclodextrinas, o que leva a perspectivas promissoras do desenvolvimento de uma formulação líquida do fármaco.

Palavras-Chave: ciclodextrinas, βCD, SBEβCD, dapsona, complexo de inclusão

ARRAIS, M.A.S. **Physico-chemical characterization of inclusion complex dapsone- β CD and dapsone-SBE β CD to increase solubility in pharmaceutical form.** Teresina – PI: UFPI, 2012. (Dissertação – Mestrado em Ciências Farmacêuticas).

ABSTRACT

This study aims to characterize the inclusion complex formed between β -cyclodextrin and the drug dapsone, and between this drug and sulfobutylether- β -cyclodextrin. Dapsone is a sulfone belonging to class II of Biopharmaceutics Classification System. The cyclodextrins are good solubilizers for many drugs, so it is incorporated in pharmaceutical formulations. The complexes were prepared by evaporation and were characterized by TG, DTA, IR, XRD and ^1H NMR spectroscopy. The occurrence of inclusion in the studies in solution was evidenced by the increased solubility of DAP in the presence of β CD and SE β CD, described by the solubility phase diagram, with a AL profile. A value of 3748 M⁻¹ and 3777 M⁻¹ for the association constant of the complex with β CD and SBE β CD, respectively. The stoichiometry of 1:1 for both complexes was suggested from the solubility diagram and the method of continuous variations. Additional evidence of inclusion were offered by thermogravimetric analysis, X-Ray Diffraction and Infrared spectroscopy. For nuclear magnetic resonance spectroscopy, it was possible to determine the topology (Roesy), the stoichiometry ("Job plot") and the association constant (DOSY) of the complexes. A computer simulation study was conducted to see the inclusion of the drug in cyclodextrins. For this study it is evident that the drug dapsone has improved its solubility when complexed with cyclodextrins, which leads to promising prospects of developing a liquid formulation of the drug.

Keywords: cyclodextrin, dapsone, β -CD, SBE β -CD, inclusion complex.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1. Blister com medicação para o tratamento da Hanseníase	26
Figura 2. Estrutura molecular da dapsona	27
Figura 3. Representação da estrutura truncada das ciclodextrinas.....	29
Figura 4: Sítios de modificação frequentes na β CD	31
Figura 5: Formação do complexo de inclusão.....	33
Figura 6: Tipos de diagramas de solubilidade de fases obtidos a partir da complexação de fármacos com ciclodextrinas	34

Capítulo 2

Figura 1: Estrutura molecular da Dapsona.....	43
Figura 2: Diagrama de solubilidade para DAP na presença de diferentes concentrações de α -CD, β -CD, γ -CD, HP β CD, RM β CD e SBE β CD	47
Figura 3: Curva de TG das espécies livre DAP, β CD, da mistura física (MF) e do complexo DAP: β CD.....	50
Figura 4: Curvas de TG da DAP, SBE β CD, Mistura física e do complexo DAP:SBE β CD.....	51
Figura 5: Curvas de DTA da DAP, β CD, Mistura física e do complexo DAP: β CD. ..	52
Figura 6: FIGURA 06. Curvas de DTA da DAP, SBE β CD, Mistura física e do complexo DAP:SBE β CD.....	52
Figura 7: Espectros de IV das moléculas livres DAP e β CD, mistura física e complexo DAP: β CD.	54
Figura 8: Espectros de IV das moléculas livres DAP e SBE β CD, mistura física e complexo DAP:SBE β CD.....	55
Figura 9: Difractogramas de Raio-X das moléculas livres DAP e β CD, mistura física e complexo DAP: β CD.	56

Figura 10: Difratoogramas de Raio-X das moléculas livres DAP e SBE β CD, mistura física e complexo DAP:SBE β CD.....	57
--	----

Capítulo 3

Figura 1: Espectros de RMN do complexo DAP: β CD e da DAP, evidenciando as variações nos deslocamentos químicos.....	68
Figura 2. Espectros de RMN do complexo DAP:SBE β CD e da DAP, evidenciando as variações nos deslocamentos químicos.....	69
Figura 3. Variação do deslocamento químico dos hidrogênios Ha da DAP em diferentes frações molares do complexo DAP: β CD(“Job Plot”).....	71
Figura 4. Variação do deslocamento químico dos hidrogênios Ha da DAP em diferentes frações molares do complexo DAP:SBE β CD(“Job Plot”).....	72
Figura 5. Espectros de DOSY (1H, 500MHz, 25 °C) da DAP em solução aquosa (1mM).....	73
Figura 6. Espectros de DOSY (1H, 500MHz, 25 °C) da β -CD em solução aquosa (1mM).....	74
Figura 7. Espectros de DOSY (1H, 500MHz, 25 °C) da SBE β CD em solução aquosa (1mM).....	74
Figura 8. Espectro de DOSY (1H, 500 MHz, 25 °C) do complexo de inclusão DAP: β CD mM em D2O	75
Figura 9. Espectro de DOSY (1H, 500 MHz, 25 °C) do complexo de inclusão DAP:SBE β CD mM em D2O	76
Figura 10. : Espectro de ROESY para o complexo DAP: β CD 1:1.....	78
Figura 11. Espectro de ROESY para o complexo DAP:SBE β CD 1:1.....	79
Figura 12. Estrutura complexo de inclusão DAP: β CD formado, vista lateral.....	81
Figura 13. Estrutura do complexo de inclusão DAP: β CD formado, vista superior. ..	82

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1. Solubilidade e peso molecular de algumas ciclodextrinas naturais e modificadas.....	30
---	----

Capítulo 2

Tabela 1. Constante de estabilidade (K), eficiência de complexação (CE) e razão molar de complexação (dapsona / CD), calculadas a partir do diagrama de solubilidade de fases para o complexo dapsona: CD.....	47
--	----

Tabela 2. Valores de solubilidade da Dapsona e sistemas binário obtidos por co- evaporação expressos em mg/mol, mM e valores de incremento de solubilidade obtido.	48
---	----

Capítulo 3

Tabela 1. Deslocamento químico (δ) em RMN ^1H (400MHz) das moléculas pura (DAP e βCD) e da mistura DAP: βCD	69
---	----

Tabela 2. Deslocamento químico (δ) em RMN ^1H (400MHz) das moléculas pura (DAP e SBE βCD) e da mistura DAP:SBE βCD	70
--	----

Tabela 3. Valores de coeficiente de difusão, fração molar ligada e constante de associação aparente determinados para o sistema DAP: $\beta\text{-CD}$ e DAP:SBE βCD , em D $_2\text{O}$, 25 °C.....	77
--	----

LISTA DE QUADROS

Capítulo 3

Quadro 1. Estrutura química da DAP e representação esquemática das ciclodextrinas, bem como identificação dos hidrogênios de cada uma das moléculas.....	67
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

α	Alfa
B	Beta
δ	Delta
$^{\circ}\text{C}$	grau Celsius
%	Porcentagem
Abs	Absorbância
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
BCS	Sistema de Classificação Biofarmacêutica
CD	Ciclodextrina
DAP	Dapsona
DTA	Análise Térmica Diferencial
DRX	Difração de Raios-X
FDA	Food and Drug Administration
HBγCD	Hidroxiopropil- γ -ciclodextrina
HIV	Human Immunodeficiency Vírus
HPβCD	Hidroxiopropil- β -ciclodextrina
IV	Infravermelho
Kc	Constante de estabilidade
Kg	Kilogramas
MF	Mistura Física
Mg	Miligramas
Min	Minutos

mL	Mililitros
Ng	Nanograma
nOe	Efeito nuclear Overhauser
NTF	Núcleo de Tecnologia Farmacêutica
OMS	Organização Mundial da Saúde
PNCH	Programa Nacional de Controle da Hanseníase
RENAME	Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
rpm	Rotação por minuto
ROESY	One dimensional rotating frame Overhauser Effect
SBEβCD	Sulfobutiléter- β -ciclodextrina
T	Tesla
TG	Termogravimetria
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 Introdução	17
2 Objetivos	20
2. 1 Objetivo Geral.....	20
2. 2 Objetivos Específicos.....	20
3 Revisão da Literatura	
Capítulo 1. Revisão bibliográfica	21
3.1. Hanseníase	
3.1.1 Etiologia e transmissão.....	22
3.1.2 Manifestações clínicas e diagnóstico.....	23
3.1.3 Tratamento	24
3.2 Dapsona.....	27
3.3. Ciclodextrinas e complexos de inclusão	
3.3.1Ciclodextrinas.....	28
3.3.2 Biodisponibilidade e complexos de inclusão	31
3.3.3. Caracterização do complexo de inclusão.....	33
3.3.3.1. Diagrama de solubilidade de fases.....	33
3.3.3.2. Análise térmica.....	34
3.3.3.3. Infravermelho.....	34
3.3.3.4. DRX.....	35
3.3.3.5. RMN.....	35
3.3.3.6. Simulação computacional.....	35
3.4 Referências.....	37
Capítulo 2. Caracterização físico-química do complexo dapsona:βCD e dapsona:SBEβCD no estado sólido	40
4.1 Introdução.....	43

4.2 Materiais e Métodos.....	44
4.3. Resultados e Discussão.....	46
4.4 Conclusão.....	57
4.5 Referências.....	58
5. Caracterização do complexo de inclusão no estado líquido	
Capítulo 3 - Caracterização físico-química do complexo dapsona:βCD e dapsona:SBEβCD no estado líquido.....	61
5.1 Introdução.....	64
5.2 Materiais e Métodos.....	65
5.3. Resultados e Discussão.....	67
5.4 Conclusão.....	82
5.5 Referências.....	84
6. Conclusão.....	86
7. Perspectivas.....	87
Referências.....	88
Apêndices.....	91

1.0 Introdução

A hanseníase, também conhecida como lepra, é uma doença infecciosa crônica, causada pela bactéria *Mycobacterium leprae*. Ela provoca danos severos nos indivíduos, afetando primariamente a pele e o sistema nervoso periférico. A hanseníase é considerada endêmica no Brasil, atingindo patamares muito altos nas regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste. Por ser uma doença negligenciada, tem cabido aos centros de pesquisa públicos, tais como as universidades federais e estaduais, o desenvolvimento de novas formas de tratamento para a hanseníase (BRASIL, 2010).

O tratamento específico da hanseníase, indicado pelo Ministério da Saúde, é a poliquimioterapia padronizada segundo recomendações da Organização Mundial de Saúde (BRASIL, 2002, 2009; DEPS *et al.*, 2007). Este tratamento consiste na associação de três fármacos: dapsona, rifampicina e clofazimina. A dapsona (DAP) é uma substância da classe das sulfonamidas que apresenta ação bacteriostática contra o *Mycobacterium leprae*, devido à sua alta lipofilicidade e à sua baixa dissociação iônica em pH fisiológico (PANICKER, 2006; SCIOR *et al.*, 1997). Essa característica, somada ao baixo custo e ausência de toxicidade, torna a dapsona o fármaco de primeira escolha no tratamento e profilaxia da hanseníase (MARTINDALE, 2007).

A dapsona (4,4'-diaminodifenilssulfona) apresenta-se na forma sólida, como um pó branco, ou levemente amarelado, sem odor característico, fotossensível, muito pouco solúvel em água, mas bastante solúvel em etanol. A massa molar da dapsona ($C_{12}H_{12}N_2O_2S$) é 248,31 g/mol e sua fórmula estrutural está apresentada na Figura 1.

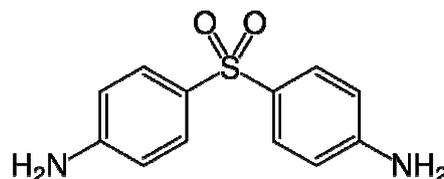


Figura 1. Fórmula estrutural da dapsona.

Quando a dapsona é administrada via oral, ela é absorvida no trato gastrointestinal. Para um fármaco ter uma ótima absorção no organismo, é

necessário ter uma ótima solubilidade em água, mas ao mesmo tempo deve ter um caráter lipofílico para que seja capaz de permear as membranas do organismo. A dissolução do fármaco é fundamental para a absorção e consequente resposta farmacêutica da maioria dos fármacos de administração oral apresentados na forma sólida. A baixa solubilidade da dapsona em água conduz a uma biodisponibilidade prejudicada, sendo necessária uma elevada quantidade de fármaco para obtenção do efeito terapêutico adequado. Lindenbergl e colaboradores (2004) classificaram a dapsona como fármaco pertencente à Classe II do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), ou seja, possui baixa solubilidade e alta permeabilidade, enquanto Cao e colaboradores (2006) sugerem Classe IV, atribuída à baixa solubilidade e baixa permeabilidade.

As ciclodextrinas (CD) têm apresentado um papel importante no desenvolvimento de fármacos pouco solúveis em água, por aumentar a solubilidade dos mesmos, devido à sua propriedade de formar complexos de inclusão, atuando como carreadores hidrofílicos de fármacos. A aplicação farmacêutica mais importante das ciclodextrinas é o aumento da solubilidade, estabilidade segurança e biodisponibilidade de fármacos. As ciclodextrinas naturais são oligossacarídeos cíclicos contendo seis (α CD), sete (β CD) ou oito (γ CD) unidades de α -D-glicopiranosose, formando um anel cuja superfície externa é hidrofílica e o interior constitui uma cavidade central hidrofóbica capaz de acomodar uma variedade de fármacos e outras substâncias lipofílicas. As ciclodextrinas naturais são obtidas a partir da reação de transglicolação intramolecular da degradação do amido, por intermédio da enzima ciclodextrina glucanotransferase (BREWSTER; LOFTSSON, 2007; RASHEED *et al.*, 2008).

Diversos estudos têm sido realizados para caracterizar complexos de inclusão entre fármacos e ciclodextrinas. A beta-ciclodextrina (β CD) é a mais utilizada devido ao seu custo ser baixo e ao tamanho de sua cavidade ser apropriado para acomodar uma grande variedade de fármacos. As técnicas experimentais mais utilizadas têm sido as técnicas de análise térmica, como a calorimetria exploratória diferencial (DSC) e a termogravimetria (TGA), a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e as espectroscopias no ultravioleta-visível e no infravermelho (GRILLO *et al.*, 2007; RAJABI *et al.*, 2007; CALDERINI; PESSINE, 2008; PESCIPELLI *et al.*, 2010; TSAI *et al.*, 2010). Além disso, estudos teóricos, através de

simulações computacionais baseados em métodos da Química Quântica, têm sido bastante utilizados como uma poderosa ferramenta de predição das energias de ligação e estruturas de equilíbrio para os complexos e inclusão. Em geral, os estudos teóricos têm sido realizados em associação com técnicas experimentais, notadamente com a espectroscopia de RMN (JULLIAN *et al.*, 2007; SOUSA *et al.*, 2008; COSCARELLO *et al.*, 2009; MADI *et al.*, 2009; HOLT, 2010;).

Este trabalho apresentou estudos sobre a obtenção e caracterização físico-química de complexos de inclusão dapsona: β -ciclodextrina e dapsona:Sulfobutiléter- β -ciclodextrina por difração de raio-X, infravermelho, análise térmica, espectroscopias de RMN, bem como o estudo teórico por simulações computacionais baseadas na Química Quântica.

2.0 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O trabalho tem como objetivo obter e caracterizar o complexo de inclusão dapsona: β CD e dapsona:SBE β CD, visando melhoria na solubilidade do fármaco.

2.2 Objetivos específicos

- Preparar os complexos de inclusão dapsona: β CD e dapsona:SBE β CD;
- Avaliar o aumento de solubilidade obtido;
- Caracterizar os complexos por TG, IV e DRX;
- Estabelecer a topologia, estequiometria e constante de associação por RMN;
- Realizar a simulação computacional da complexação.

Capítulo 1

3.0 Revisão da literatura

Hanseníase: Revisão bibliográfica

3.1. HANSENÍASE

3.1.1 ETIOLOGIA E TRANSMISSÃO

Doenças tropicais negligenciadas representam as mais comuns para as 2,7 bilhões de pessoas que vivem com menos de US\$ 2 por dia. O estigma social, o preconceito, a marginalização, a extrema pobreza de populações afetadas e a baixa mortalidade são vários fatores que contribuem para o abandono dessas doenças. Estas doenças impedem o desenvolvimento econômico, causam complicações crônicas, e prejudicam o desenvolvimento infantil em países pobres, onde são mais prevalentes. Além disso, sua prevalência nas localizações geográficas fora do mundo desenvolvido e sua quota de mercado insignificante para as indústrias farmacêuticas reduz ainda mais o destaque destas doenças perante a saúde pública global (LIESE; ROSENBERG; SCHRATZ, 2010).

A hanseníase é uma doença infecto-contagiosa crônica que apresenta alta infectividade, mas baixa patogenicidade e seu poder imunogênico é responsável pelo alto potencial incapacitante da doença. O agente etiológico da doença é o *Mycobacterium leprae* (bacilo de Hansen), descrito em 1873 pelo norueguês Gerhard Amauer Hansen, tornando-a a primeira doença de uma origem bacteriana. Este microorganismo tem tropismo por macrófagos e células de Schwann, e propriedade única de invasão do sistema nervoso periférico e da pele (JUNQUEIRA, CAIXETA, 2008).

O homem é considerado a única fonte de infecção da hanseníase. O contágio dá-se principalmente através de uma pessoa doente, portadora do bacilo de Hansen, não tratada, que o elimina para o meio exterior, contagiando pessoas susceptíveis. A principal via de eliminação do bacilo, pelo indivíduo doente de hanseníase, e a mais provável porta de entrada no organismo passível de ser infectado são as vias aéreas superiores. No entanto, para que a transmissão do bacilo ocorra, é necessário um contato direto com a pessoa doente não tratada (ARAÚJO, 2003).

A maioria das pessoas infectadas com este microorganismo não desenvolve a doença clínica, embora não haja ferramentas para diagnosticar a infecção subclínica e como o período de incubação da hanseníase é longo, de 2-12 anos, as pessoas

portadoras se mantêm infectadas com um potencial de transmissão e aumento a chances de desenvolver incapacidade. A hanseníase é a principal causa infecciosa de incapacidade e, embora sua prevalência tenha caído substancialmente nos últimos 50 anos, a transmissão continua (SUZUKI et al., 2011, RODRIGUES; LOCKWOOD, 2011).

3.1.2. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E DIAGNÓSTICO

Considerada doença polimorfa, a suscetibilidade de infecção e as manifestações clínicas dependem da relação microorganismo-hospedeiro, como a carga bacilar, fatores genéticos e ambientais, estado nutricional, imunidade do indivíduo e vacinação contra o *Bacillus Calmette Guérin* (BCG). Além das condições que influenciam o risco de adquirir a doença, também vale ressaltar o nível da endemia e as condições socioeconômicas desfavoráveis, como as condições precárias de vida e saúde bem como o elevado número de pessoas convivendo em um mesmo ambiente (OPROMOLLA et al., 2011).

A hanseníase caracteriza-se por manifestações neurológicas e dermatológicas que acarretam, em geral após longa evolução, alterações de sensibilidade, lesões cutâneas diversas e deformidades além de mutilações. Antes, durante ou após o tratamento da doença podem ocorrer episódios inflamatórios agudos ou subagudos, cutâneos e/ou extra-cutâneos, chamados estados ou episódios reacionais, responsáveis em grande parte por morbidade, dano neural, incapacidades e manutenção do estigma (JUNQUEIRA, CAIXETA, 2008).

As principais formas clínicas da doença são: indeterminada, tuberculóide, virchowiana e dimorfa. Em 1966, Ridley e Jopling introduziram um sistema de classificação da doença baseado em achados da histopatologia e no grau de imunidade celular ao microorganismo, que limita a doença a poucas e bem definidas lesões ou troncos nervosos (tuberculóide). Outra forma, virchowiana, caracteriza-se pela ausência de imunidade celular específica, proliferação descontrolada de bacilos, muitas lesões e infiltração na pele e nervos. Muitos pacientes apresentam a forma intermediária (dimorfa), variando desde a imunidade eficaz e baixa carga bacilar até o aumento da carga bacilar e alto título de anticorpos. A forma indeterminada engloba os casos que não se enquadram em nenhum dos grupos (WHO, 2000).

A doença manifesta-se primeiro na descoloração da pele e, em seguida, erupções cutâneas e nódulos. Dependendo da carga bacilar, classifica-se a doença em paucibacilar ou multibacilar. A hanseníase paucibacilar é uma doença menos grave, caracterizada por poucas (até cinco) lesões de pele hipocrômicas (pálidas ou avermelhadas), com perda de sensibilidade. A hanseníase multibacilar está associada a múltiplas (mais de cinco) lesões de pele, nódulos, placas, espessamento da derme ou infiltração cutânea e, em alguns casos, envolvimento da mucosa nasal, causando congestão nasal e epistaxe (WHO, 2000).

Os quatro grandes critérios que definem a classificação da doença são o clínico, bacteriológico, imunológico e histológico. O diagnóstico da hanseníase é feito baseado nos sintomas cardinais, tais como manchas hipocrômicas ou avermelhadas com perda de sensibilidade, nervos periféricos espessados e demonstração do *M. leprae* no esfregaço de linfa ou cortes histológicos de tecidos. As amostras de esfregaço e biópsia são submetido a coloração ácido-resistente, além de diagnóstico histopatológico convencional, a fim de demonstrar a presença do bacilo, no entanto, estes são dificilmente detectados em casos paucibacilares. A presença de inflamação neural é uma característica histológica da hanseníase, que pode diferenciá-la de outras doenças granulomatosas (SUZUKI et al., 2011).

3.1.3. TRATAMENTO

O tratamento da hanseníase compreende: quimioterapia específica, supressão dos surtos reacionais, prevenção de incapacidades físicas, reabilitação física e psicossocial (ARAÚJO, 2003). A introdução da monoterapia com a Dapsona (difenil sulfona) foi eficaz e iniciou-se na década de 1940. A administração ao longo da vida era necessária, até que na década de 1960 foi relatada resistência generalizada. Em 1981, a OMS recomendou que todos os pacientes deveriam receber poliquimioterapia, a qual compreendia rifampicina e dapsona ou rifampicina, dapsona e clofazimina para pacientes com formas multibacilares da doença. Em 1995, o tratamento multidrogas passou a ser fornecido gratuitamente a todos os pacientes de hanseníase em todo o mundo (LOCKWOOD; SUNEETHA, 2005).

O tratamento específico da pessoa com hanseníase, indicado pelo Ministério da Saúde, é a poliquimioterapia padronizada pela Organização Mundial de Saúde, conhecida como PQT, devendo ser realizado nas unidades de saúde. A PQT mata o

bacilo tornando-o inviável, evita a evolução da doença, prevenindo as incapacidades e deformidades causadas por ela, levando à cura. O bacilo morto é incapaz de infectar outras pessoas, rompendo a cadeia epidemiológica da doença. Assim sendo, logo no início do tratamento, a transmissão da doença é interrompida, e, sendo realizado de forma completa e correta, garante a cura da doença. A poliquimioterapia é constituída pelo conjunto dos seguintes medicamentos: rifampicina, dapsona e clofazimina, com administração associada. Essa associação evita a resistência medicamentosa do bacilo que ocorre com frequência quando se utiliza apenas um medicamento, impossibilitando a cura da doença. É administrada através de esquema-padrão, de acordo com a classificação operacional do doente em Pauci ou Multibacilar (Figura 01). Casos Paucibacilares são tratados com 06 blisters de paucibacilar, sendo o tratamento de adulto composto por dose supervisionada com 600 mg de rifampicina e 100 mg de dapsona, a cada 28 dias, num total de 06 doses num período máximo de 9 meses e a dose auto-administrada de 100 mg de dapsona, diárias, num total de 27 comprimidos; o tratamento infantil possui dose supervisionada com 300 a 450 mg de rifampicina, 50 mg de dapsona, a cada 28 dias num total de 06 doses, num período máximo de 9 meses e dose auto-administrada com 50 mg de dapsona, diárias, num total de 27 comprimidos; casos multibacilares adultos são tratados com uma dose mensal supervisionada de 600 mg de rifampicina, uma dose mensal supervisionada de 300 mg e uma diária auto-administrada de clofazimina e uma dose mensal supervisionada e uma diária auto-administrada de 100 mg de dapsona, por um período de 12 meses (BRASIL, 2002).

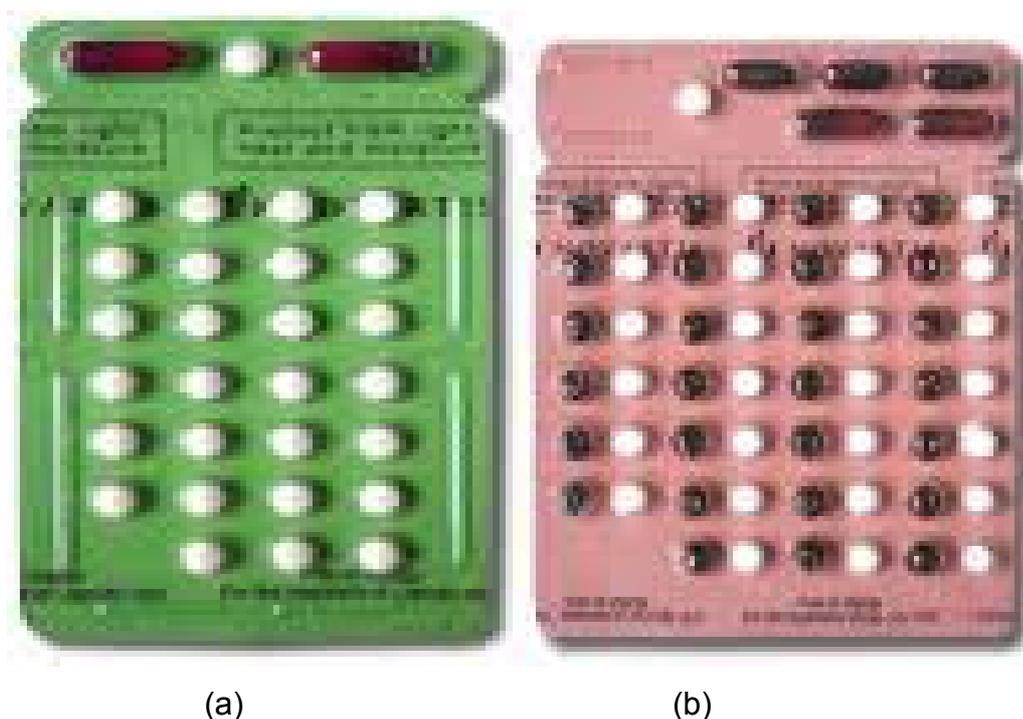


Figura 01. Blister com medicação para o tratamento da Hanseníase (a) Paucibacilar (b) Multibacilar

A informação sobre a classificação do doente é fundamental para se selecionar o esquema de tratamento adequado ao seu caso. Para crianças com hanseníase, a dose dos medicamentos do esquema-padrão é ajustada, de acordo com a sua idade. Já no caso de pessoas com intolerância a um dos medicamentos do esquema-padrão, são indicados esquemas alternativos. A alta por cura é dada após a administração do número de doses preconizadas pelo esquema terapêutico.

A duração recomendada de terapia é de 6 meses para pacientes com paucibacilar da doença e 12 meses para aqueles com formas multibacilares, e estes regimes efetivamente erradicam *M. leprae* na maioria dos pacientes. A rifampicina é um agente bactericida eficaz contra o bacilo. A dapsona é bacteriostático ou fracamente bactericida contra o *M. leprae* e foi o principal tratamento para hanseníase por muitos anos, até o surgimento generalizado de cepas resistentes. Clofazimina liga-se preferencialmente ao DNA das micobactérias e exerce um efeito bactericida lento, inibindo o crescimento das cepas (SUZUKI et al., 2011).

A adesão dos pacientes ao tratamento é problemática em doenças como a hanseníase, porque exigem longos períodos de tratamento. Administrar doses mensais supervisionadas oferece uma oportunidade para observar diretamente o tratamento, bem como educar o paciente sobre a necessidade de tomar as doses

regularmente e concluir o tratamento. Como nenhum novo antibiótico está em desenvolvimento para o tratamento da hanseníase, regimes de tratamento alternativos são necessários. Aumento da capacidade de seleção da droga, a quimioterapia experimental e ensaios clínicos também são necessários para recuperar o conhecimento perdido com o sucesso da poliquimioterapia (LOCKWOOD; SUNEETHA, 2005; RODRIGUES; LOCKWOOD, 2011).

3.2. DAPSONA

As sulfonas foram usadas desde a década de 1940 no tratamento da hanseníase, mas o único representante da classe amplamente utilizado até hoje é a dapsona, um componente importante dos esquemas multidrogas. Seu mecanismo de ação envolve a inibição do metabolismo do folato. À semelhança das sulfonamidas e dapsona também é utilizada para a profilaxia da malária e profilaxia e tratamento da pneumonia (MARTINDALE, 2007).

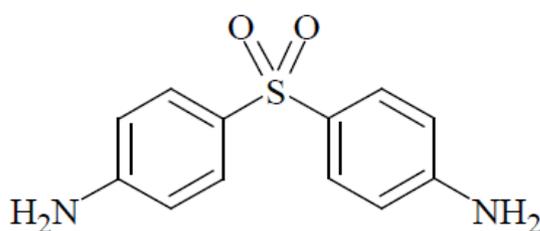


FIGURA 02. Fórmula estrutural da Dapsona.

Conforme a Farmacopéia Brasileira V ed. (2010), a dapsona (Figura 02) é um pó cristalino, branco ou levemente amarelado, inodoro e com leve sabor amargo, praticamente insolúvel em água, facilmente solúvel em acetona e ligeiramente solúvel em etanol, de fórmula molecular $C_{12}H_{12}N_2O_2S$ e peso molecular 248,3 PM.

A dapsona é quase completamente absorvida pelo trato gastrointestinal (86%) com as concentrações plasmáticas máximas atingidas em 2-8 horas após uma dose. Doses de 100 mg por dia fornecem concentrações de 500 ng/mL, que excedem a concentração inibitória mínima para *M. leprae*. Cerca de 70 a 90% da dapsona na circulação está ligada às proteínas plasmáticas e quase 100% do seu metabólito monoacetilado está ligado. Dapsona sofre de circulação entero-hepática, é

amplamente distribuída, está presente no leite materno e saliva, e atravessa a placenta. Dapsona possui intervalos de meia-vida de 10-50 horas, com uma média de 20 a 30 horas, e é principalmente excretada na urina, com apenas 20% do fármaco inalterado (MARTINDALE, 2007; WOZEL, 2010).

A baixa solubilidade da dapsona induz a uma biodisponibilidade prejudicada. Segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica os fármacos são divididos em quatro grupos, de acordo com sua solubilidade e permeabilidade: Classe I com fármacos de alta solubilidade e alta permeabilidade, Classe II com fármacos de baixa solubilidade e alta permeabilidade, Classe III com fármacos de alta solubilidade e baixa permeabilidade e Classe IV com fármacos de baixa solubilidade e baixa permeabilidade (AMIDON *et al*, 1995). A dapsona é um fármaco de Classe II.

Além da aplicação no tratamento da hanseníase, a dapsona isoladamente ou em combinação com outros agentes antibióticos é utilizada para profilaxia da *P. jiroveci* e toxoplasmose em indivíduos infectados com o HIV. Esta sulfona é designada medicamento órfão pelo Food and Drug Administration (FDA) para uso em última condição. Extensa experiência clínica no tratamento de pacientes com dapsona mostra que a sulfona pode suprimir várias dermatoses inflamatórias crônicas. Nestes casos, dapsona é principalmente indicada como monoterapia. Em um segundo grupo de dermatoses, dapsona é usada como tratamento adjuvante, especialmente em pacientes que têm resposta insuficiente aos corticosteróides ou outros agentes de primeira linha, que têm necessidade de reduzir a dosagem do corticosteróide, ou nos quais outros medicamentos de primeira linha são contraindicados ou não tolerados (WOZEL, 2010).

3.3. CICLODEXTRINAS E COMPLEXOS DE INCLUSÃO

3.3.1. CICLODEXTRINAS

As ciclodextrinas (CD's) foram descobertas por Villiers em 1891 (STEJTLI, 1998). Já por volta de 1904 Schardinger descreveu detalhes da sua preparação, caracterização, isolamento e a determinação das suas estruturas. Nos anos posteriores Freudenberg e French ampliaram os conhecimentos das CD's quanto à sua produção enzimática, fracionamento e a caracterização de suas propriedades (CONNORS, 1997).

Quando o amido é degradado por um tipo especial de amilases chamadas glucanotransferases, uma família de oligosacarídeos ciclicamente fechados é obtida. Os mais comuns são compostos de seis a oito unidades α -glucose (monômeros), unidas por ligações glicosídicas α -(1-4), e são chamadas α -, β -, γ -ciclodextrinas (α -CD, β -CD, γ -CD), respectivamente. Uma consequência estrutural dessas ligações glicosídicas α -(1-4), é a formação de uma molécula num formato semicircular tipo cone truncado (Figura 03), garantindo a esta molécula uma cavidade de dimensões apropriadas, o que depende do número de unidades glucose, com grupos hidroxil em suas unidades de α -glucose. Os chamados grupos hidroxil primários (grupos hidroximetil: – CH₂OH) situam-se na abertura mais estreita deste cone, enquanto os grupos hidroxil secundários situam-se na abertura mais larga. Uma característica importante destes grupos hidroxil é seu caráter hidrofílico, promovendo a solubilização das CDs em meio aquoso (BETZE et al., 1984).

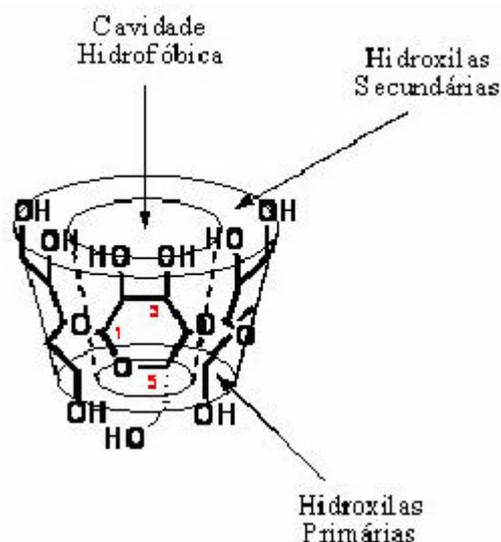


Figura 03. Representação da estrutura troncada das ciclodextrinas.

As ciclodextrinas naturais α -CD e β -CD, ao contrário da γ -CD não podem ser hidrolisadas pela amilase salivar e pancreática humana, embora todas as três sejam submetidas a fermentação pela flora intestinal. Ciclodextrinas hidrofílicas são considerados não-tóxicas em doses orais baixas a moderadas. As ciclodextrinas naturais e seus derivados são usadas em formulações tópicas e orais, mas apenas α -CD e os derivados hidrofílicos de β -CD e γ -CD podem ser usados em formulações parenterais. A γ -CD forma agregados visíveis em solução aquosa e a β -CD, devido à

sua nefrotoxicidade, não são adequadas para formulações parenterais. Derivados lipofílicos de ciclodextrinas, como as formas metiladas, são, até certo ponto absorvidas a partir do trato gastrointestinal para a circulação sistêmica e têm-se mostrado tóxicos após administração parenteral (RASHEED et al., 2008).

Na indústria farmacêutica, as CDs têm sido particularmente usadas devido às suas propriedades complexantes, por aumentar: a solubilidade e dissolução dos fármacos pouco solúveis, sua biodisponibilidade e estabilidade, diminuir a irritação gástrica, dérmica ou ocular causada por determinados fármacos, diminuir ou eliminar odores ou sabores desagradáveis, prevenir interações entre diferentes fármacos ou entre fármacos e excipientes (SZEJTLI, 1994).

Como as ciclodextrinas naturais (α , β e γ – CD's) têm seus usos limitados, por apresentarem propriedades inapropriadas, como baixa solubilidade aquosa e toxicidade, restringe-se a aplicabilidade destas principalmente como carregadores de fármacos. Desta forma, vários derivados de ciclodextrinas têm sido desenvolvidos, principalmente com base na β -CD, a fim de estender as propriedades físico-químicas, em especial ao aumento da solubilidade (BREWSTER e LOFTSSON, 2007). As ciclodextrinas mais comumente empregadas tem suas características físicas representadas na Tabela 01.

Tabela 01. SOLUBILIDADE E PESO MOLECULAR DE ALGUMAS CICLODEXTRINAS NATURAIS E MODIFICADAS

Ciclodextrina	Substituição ^a	Substituinte (R)	Peso molecular (Da)	Solubilidade em água (mg.mL ⁻¹) ^b
α -CD	-	-	972	145
β -CD	-	-	1135	18,5
HP β CD	0,65	-CH ₂ CHOHCH ₃	1400	>600
RM β CD	1,8	-	1312	>500
SBE β CD	0,9	-(CH ₂) ₄ SO ₃ -Na ⁺	2163	>500
γ -CD	-	-	1297	232
HP γ CD	0,6	-CH ₂ CHOHCH ₃	1576	>500

FONTE: Loftsson e Duchêne, 2007; Brewster e Loftsson, 2007

^a Substituição: número médio de substituintes por unidade de glucopiranoose.

^b Solubilidade em água pura a cerca de 25°C.

As modificações na estrutura das ciclodextrinas geralmente são realizadas pela substituição dos grupos hidroxílicos primários e/ou secundários (Figura 04) por diversos grupos funcionais, sendo classificadas em derivados hidrofílicos (grupos metil e hidroxipropil), hidrofóbicos (grupos acetil e etil), anfifílicas (estruturas de micelas) e derivados iônicos (sulfobutilo-éter) (UEKAMA *et al*, 1998; VEIGA *et al*, 2006).

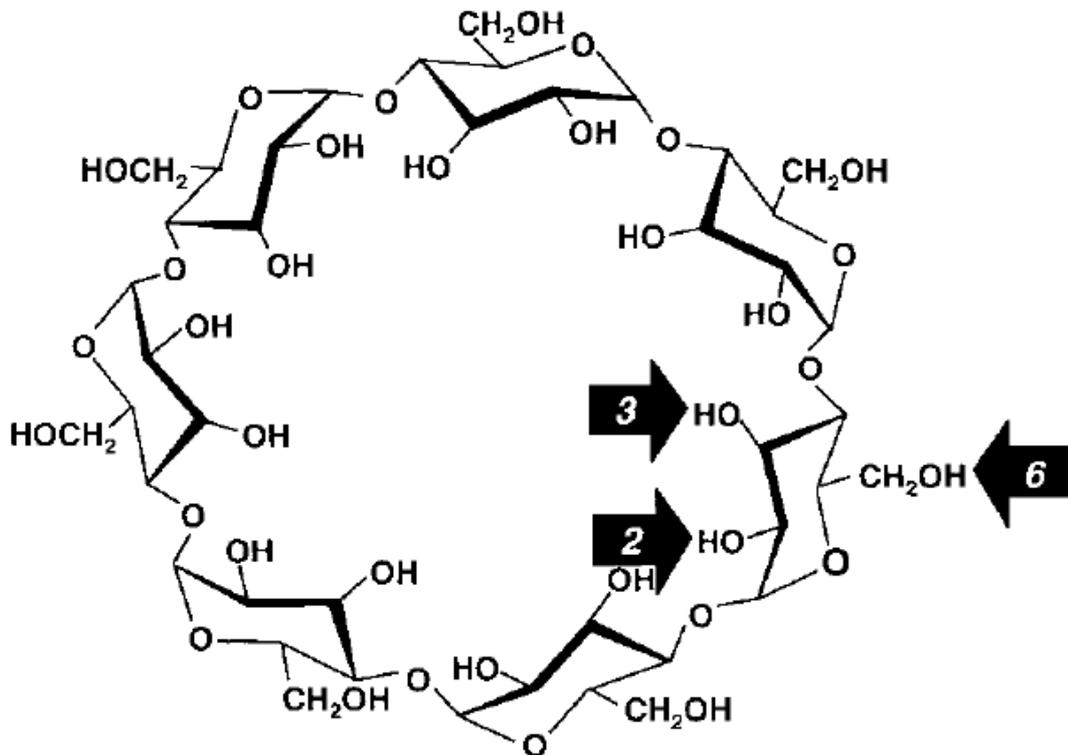


Figura 04 – Sítios de modificação freqüentes na β CD (VEIGA *et al*, 2006).

3.3.2. BIODISPONIBILIDADE E COMPLEXOS DE INCLUSÃO

Biodisponibilidade é o parâmetro que avalia a extensão do fármaco que alcança seu sítio de ação, e para tanto uma série de características físicas e químicas do fármaco interferem neste resultado, mas que podem ser ajustadas de acordo com a formulação. Assim, para uma molécula biologicamente ativa ser efetiva no tratamento da patologia ela deve ser dissolvida nos fluidos biológicos, e em seguida absorvida e interagir com o seu alvo. No estado sólido, formas farmacêuticas devem ser dissolvidas para passar através da membrana biológica do trato gastrointestinal, o que significa que processos como desintegração desagregação e dissolução devem ocorrer a partir da administração do comprimido.

Conseqüentemente, substâncias que são pouco solúveis em água, ou pertencentes à classe II no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (AMIDON et al., 1995), possuem limitações com implicações em sua indicação terapêutica, sendo estas substâncias o principal alvo de estudo em Tecnologia Farmacêutica.

Por volta de 1953 Freudenberg, French e Plieninger obtiveram uma patente, a qual tratava de uma das principais propriedades das ciclodextrinas: a formação de complexos de inclusão. Ela trazia aspectos como o aumento da solubilidade de fármacos pouco solúveis em água, proteção de substâncias que poderiam ser facilmente oxidadas e a redução da volatilidade de algumas substâncias (FERNANDES e VEIGA, 1999). Uma característica importante das ciclodextrinas é a formação de complexos de inclusão tanto no estado líquido quanto no estado sólido, nos quais cada molécula-hóspede é rodeada pelo ambiente hidrofóbico da cavidade, o qual é formado por um esqueleto carbônico e oxigênios na forma de éteres. Isso pode levar à alteração de propriedades físico-químicas da molécula-hóspede, incluindo sua solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade (LOFTSSON e BREWSTER, 1996).

Em solução aquosa, a cavidade hidrofóbica da ciclodextrina é preenchida por moléculas de água. A adição de moléculas hidrofóbicas, como fármacos, promove o deslocamento das moléculas de água, que se encontram originalmente no interior da cavidade da CD. Isto acontece devido ao microambiente termodinamicamente desfavorável (interação polar-apolar) da cavidade, as moléculas de água tendem a sair da cavidade da CD (Figura 05) (SZEJTLI, 1998), contribuindo também para um aumento da entropia. Esse processo leva a encapsulação total ou parcial da molécula hóspede na cavidade da CD, tornando-a solúvel em água. A formação de complexos de inclusão é um arranjo dimensional entre a cavidade hospedeira e a molécula convidada. A cavidade lipofílica das moléculas de ciclodextrina promove um ambiente no qual as moléculas de tamanho apropriado não-polares podem entrar para formar estes sistemas de inclusão.



FIGURA 05. Formação do complexo de inclusão FONTE: (DEL VALLE, 2004)

A extensão da complexação em meio aquoso é caracterizada pela constante de estabilidade K_C do complexo. Essa constante é diretamente proporcional ao grau de associação da molécula hóspede na cavidade da CD. Seu valor deve estar compreendido entre 200 e 5000 mol.L⁻¹, para que os complexos formados tenham aplicação prática, visto que complexos pouco estáveis liberam rapidamente a substância hóspede e os muito estáveis o liberam com dificuldade (PITHA apud VEIGA *et al*, 2006).

3.3.3. Caracterização do complexo de inclusão

Para avaliar a formação de complexos de inclusão com as ciclodextrinas utilizam-se um conjunto de técnicas que evidenciam essa complexação tanto em meio líquido como no estado sólido. As mais utilizadas são o diagrama de solubilidade de fases, análise térmica, espectroscopia no infravermelho, difração de raios X, microscopia eletrônica de varredura e ressonância magnética nuclear. A simulação computacional (química teórica) atua em conjunto com os resultados práticos.

3.3.3.1. Diagrama de solubilidade de fases

O diagrama de solubilidade de fase desenvolvido por Higuchi e Connors (1965) é habitualmente utilizado para a verificação da formação de complexos de inclusão. Este método baseia-se no monitoramento das alterações da solubilidade do substrato pela adição de quantidades crescentes de ciclodextrinas (Figura 06). Experimentalmente, um excesso do substrato é adicionado a soluções de mesmo

volume, mas com concentrações crescentes de CD's (LOFTSSON e BREWSTER, 1997; UEKAMA *et al* 1998; VEIGA *et al*, 2006).

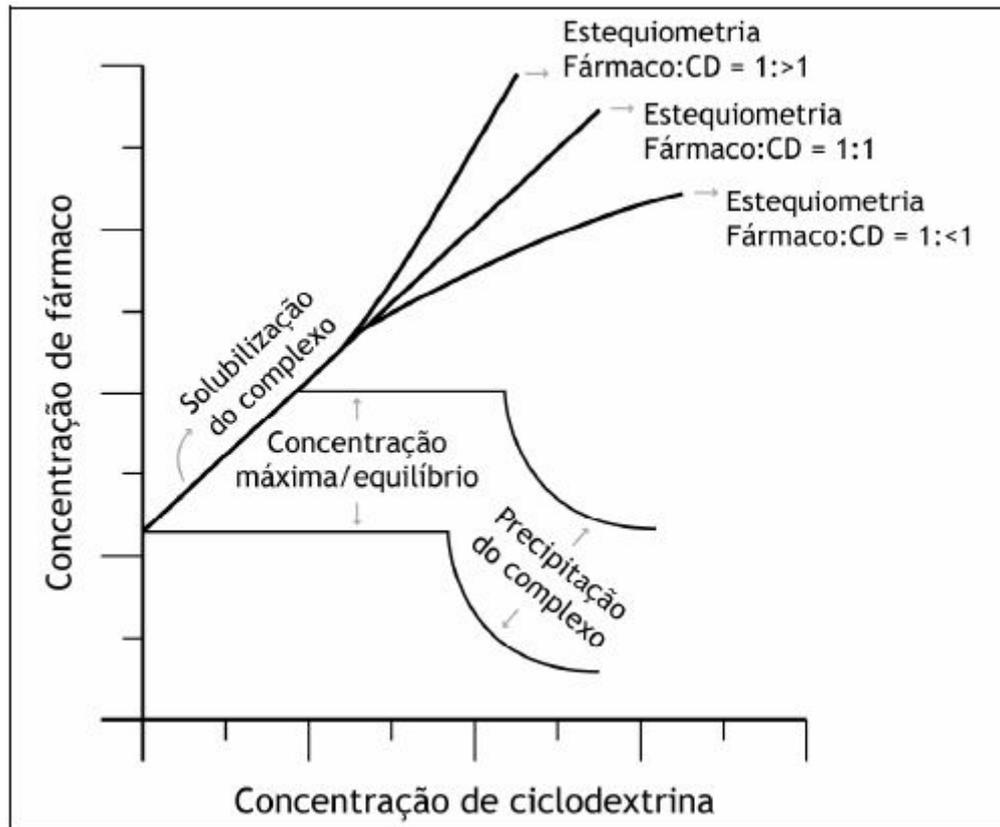


Figura 6. Tipos de diagramas de solubilidade de fases obtidos a partir da complexação de fármacos com ciclodextrinas (TAKAHASHI, 2009).

3.3.3.2. Análise térmica

Geralmente, as análises térmicas são as primeiras observadas no estudo de complexação por serem relativamente simples. (NOVAK *et al*, 2006). As técnicas mais utilizadas são a calorimetria exploratória diferencial e a termogravimetria.

Utilizando-se a TG, a maneira mais comum de se detectar a formação de um complexo de inclusão é comparando a temperatura de início de degradação da molécula hóspede sozinha com a do complexo investigado. Considera-se que, havendo complexação, a degradação da molécula hóspede se dará em temperaturas mais elevadas, em virtude de sua proteção pela CD. (ARAÚJO *et al*, 2007)

3.3.3.3 Infravermelho

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 (SZEJTLI, 1988).

3.3.3.4. Difração de Raios-X

A técnica de difratometria de raios-X mede a intensidade de raios-X difratados por uma amostra sólida sobre diferentes ângulos. Algumas ciclodextrinas, no seu estado cristalino, formam ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, as quais estabilizam tanto a conformação da molécula como também a sua estrutura cristalina, gerando um difratograma amorfo, ou seja, sem picos característicos do estado cristalino da molécula (DODZIUK, 2006). 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 (SZEJTLI, 1988). A observação de um difratograma com características de material amorfo, sem picos bem definidos, pode ser indicativo da ocorrência de complexação (CORTI et al., 2007).

3.3.3.5. Ressonância Magnética Nuclear

A RMN é uma técnica que vem sendo bastante utilizada para determinar a formação dos complexos de inclusão, uma vez que esta possui a vantagem de elucidar a estrutura do complexo identificando a parte da molécula hospedeira que está incluída na cavidade da CD (VEIGA, PECORELLI, RIBEIRO, 2006). Devido à formação de ligações químicas, quando ocorre a complexação, há alterações nos sinais dos espectros da CD e da molécula hóspede (BORODI, et al.).

3.3.3.6. Simulação computacional

Cálculos computacionais são ferramentas valiosas e ocupam uma posição única entre os regimes tradicionais da teoria e dos experimentos em laboratório. A química computacional vem contribuindo de forma significativa para a determinação de estruturas e propriedades físico-químicas de ciclodextrinas e seus complexos de inclusão (BRITO, 2004).

As estruturas moleculares formadas pelos fármacos e as CDs podem ser simuladas através de programas computacionais. No estudo de modelagem molecular analisa-se como se procede a formação dos CIs e a orientação dos fármacos nas cavidades das CDs (ARAÚJO et al., 2009). Estruturas moleculares com energia conformacional mínima podem ser dimensionadas com métodos funcionais da teoria da densidade (DFT) e métodos semi-empíricos, e os cálculos do estado de excitação eletrônica podem ser executados empregando programas específicos (ARAÚJO et al., 2009; AALTONEN et al., 2008).

Referências

AALTONEN, J., GORDON, K.C., STRACHAN C.J., RADES T. **Perspectives in the use of spectroscopy to characterize pharmaceutical solids.** *Int J Pharm.* 2008;34:159-69.

AMIDON, G.L., LENNERNAS, H., SHAH, V.P., CRISON, J.R. **A theoretical basic for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability.** *R. Pharm. Res.* 12(3): 413-420, 1995.

ARAÚJO, M.V.G., MACEDO, F.L.O., NASCIMENTO, C.C., CONEGERO, L.S., BARRETO, L.S., ALMEIDA, L.E., COSTA, N.B., GIMENEZ L.F. **Characterization, phase solubility and molecular modeling of β -cyclodextrin/pyrimethamine inclusion complex.** *Spectrochim Acta* 2009;72:165–70.

ARAÚJO, M.V.G.; VIEIRA, E.K.B.; LÁZARO, G.S.; CONOGERO, L.S.; FERREIRA, O.P.; ALMEIDA, L.E.; BARRETO, L.S.; COSTA-JR, N.B.; GIMENEZ, I.F. **Inclusion complexes of pyrimethamine in 2-hydroxypropyl- β -ciclodextrin: Characterization, phase solubility and molecular modeling.** *Bioorg. Med. Chem.* V. 15, p.5752-5759, 2007.

ARAÚJO, M.G. **Hanseníase no Brasil.** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop;* 36(3). Uberaba, 2003.

BETZE, C., SAENGER, W., HINGERTY, B. E., BROWN. G. M., *Journal of American Chemical Society*, 106, 1984, 7545-7557.

BORODI, G.; BRATU, I.; DRAGAN, F.; PESHAR, R.; HELMHOLDT, R.B.; HERNANZ, A. **Spectroscopy investigations and crystal structure from synchrotron powder data of the inclusion complex of β -cyclodextrin with atenolol.** *Spectrochim. Acta*, part A. v. 70. p. 1041-1048, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Guia para o Controle da hanseníase.** Brasília: *Ministério da Saúde*, 2002.

BRITTO, Marta A. F. O.; NASCIMENTO JR., Clebio S.; SANTOS, Hélio F. dos. **Análise estrutural de ciclodextrinas: um estudo comparativo entre métodos teóricos clássicos e quânticos.** *Quím. Nova*, São Paulo, v. 27, n. 6, Dec. 2004 .

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

CORTI, G.; CAPASSO, G., MAESTRELLI, F.; CIRRI, M.; MURA, P. **Physical-chemical characterization of binary systems of metformin hydrochloride with triacetyl- β -cyclodextrin.** *J Pharm Biomed. Anal.*, v.45, p.480-186, 2007.

DEL VALLE, E. M. M. **Cyclodextrins and their uses: a review.** *Process Biochemistry*, v.39, n.9, May 31, p.1033-1046. 2004.

DODZIUK, H. **Cyclodextrins and their complexes: chemistry, analytical methods, applications.** Germany: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. 2006

Farmacopéia Brasileira, 4th ed. (1988). São Paulo: Atheneu Editora.

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

JÚNIOR-M. A., do CARMOS, F. A., CABRAL, L. M., TAVARES, M. I. B., GOMES, A. S., GRILLO, L. A. M., DORNELAS, C. B. **Preparation and evaluation of polymer-clay nanocomposite as an adjuvant in pharmaceutical formulas of tablets containing drugs with low watersolubility.** *International Research Journal of Pharmacy and Pharmacology.* Vol. 1(4) pp. 055-061, July, 2011

JUNQUEIRA A.V., CAIXETA L.F. **Hanseníase: revisão para o neurologista.** *Rev. bras. neurol* 2008 jul.-set ; 44(3):27-30.

LIESE, B.; ROSENBERG, M.; SCHRATZ, A. **Programmes, partnerships, and governance for elimination and control of neglected tropical diseases.** *The Lancet* - 2 January 2010 (Vol. 375, Issue 9708, Pages 67-76)

LOCKWOOD, D. N.J., SUNEETHA, S. **Leprosy: too complex a disease for a simple elimination paradigm.** *Bulletin of the World Health Organization*, March 2005, 83 (3).

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

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

MARTINDALE. **The Complete Drug Reference.** Grayslake: Pharmaceutical Press. 2007

NOVAK, C.; EHEN, Z.; FODOR, M.; JICSINSZKY, L.; ORGOVANYI, J. **Application of combined thermoanalytical techniques in the investigation of cyclodextrin inclusion complexes.** *J. Therm. Anal. Calorim.* v.84, n.3, p.693-701, 2006

OPROMOLA, P. A.; LAURENTI, R. **Hansen's disease control in the State of São Paulo: a historical analysis** *Rev Saude Publica* 2011;45(1):195-203

RASHEED, A., KUMAS, A. C. K., SRAVANTHI V. S. **Cyclodextrins as Drug Carrier Molecule: A Review.** *Sci Pharm.* 2008; 76: 567–598.

RODRIGUES, L. C., LOCKWOOD, D. N. J. **Leprosy now: epidemiology, progress, challenges, and research gaps.** *Lancet Infect Dis* 2011; 11: 464–70.

SZEJTLI, J. **Medicinal application of ciclodextrins.** *Med. Res. Rev.* 1994. 353-386.

SZEJTLI, J. **Cyclodextrin inclusion complexes.** *Cyclodextrin Technology*, p. 79, 1988.

SUZUKI, K. AKAMA, T., KAWASHIMA, A., YOSHIHARA, A. YOTSU, R., ISHII, N. **Current status of leprosy: Epidemiology, basic science and clinical perspective.** *Journal of Dermatology* 2011; 38: 1–9.

TAKAHASHI, A. I. **Obtenção e caracterização de complexos binários e ternários de sinvastatina e ciclodextrinas.** Dissertação de mestrado, São Paulo, 2009.

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

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

WHO/CDS/CPE/CEE/2000.14. **Guia para eliminação da Hanseníase como problema de saúde pública .** 1 ed. Genebra, 2000.

WOZEL, V.E. G. **Innovative use of dapsone.** *Dermatol Clin* 28 (2010) 599–610.

Capítulo 2

4.0 Caracterização do complexo no estado sólido

Obtenção e caracterização físico-química dos complexos de inclusão DAP: β CD e DAP:SBE β CD no estado sólido

Submetido a *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* - Qualis Capes – B1

Caracterização físico-química dos complexos de inclusão DAP: β -CD e DAP:SBE β -CD no estado sólido

RESUMO

Dapsona (DAP) é uma sulfonamida que tem ação bacteriostática contra o *Mycobacterium leprae*. O uso potencial de ciclodextrinas naturais e derivados sintéticos tem sido extensivamente estudado para melhorar certas propriedades de drogas tais como estabilidade, solubilidade e / ou biodisponibilidade. O complexo dapsona: β CD e dapsona:SBE β CD foram preparadas na relação molar 1:1, utilizando o método de co-precipitação. A possível formação de um complexo de inclusão foi caracterizado por diferentes técnicas físico-químicas, incluindo o diagrama de solubilidade, infra-vermelho (IV), difração de raios X (DRX) e termogravimetria (TG), verificando o aumento de solubilidade obtidos, a fim de desenvolver uma formulação oral líquida. A estequiometria do complexo DAP: β CD e DAP:SBE β CD foi determinada pela técnica de solubilidade e uma relação linear foi obtida entre a quantidade de DAP solubilizada e a concentração de CD em solução, que foi classificado como um AL típico, isto pode ser atribuído a formação de um complexo de inclusão 1:1 entre DAP e CD. Nas curvas TG das espécies livres e complexadas verificou-se que a decomposição térmica do complexo ocorre em uma temperatura intermediária entre as espécies, mostrando um ganho de estabilidade térmica para a droga encapsulada, provavelmente como resultado de interações com a cavidade. Os espectros de infravermelho mostraram que as absorções referentes a S = O desaparecem, este desaparecimento causado pela inserção da droga no interior da CD. A DRX mostrou a amorfização das amostras, indicando a formação dos complexos. Os resultados obtidos por IV, TG e DRX caracterizam a formação do complexo e o diagrama de fases mostra que essa complexação melhora efetivamente a solubilidade da DAP, o que permitiria a formulação da solução líquida.

Palavras-chave: Ciclodextrinas, β -CD, SBE β -CD, Dapsona, Complexo de Inclusão.

Physico-chemical characterization of inclusion complex Dapsone- β CD and dapsone-SBE β CD in solid state

ABSTRACT

Dapsone (DAP) is a poor substance class of sulfonamides which has bacteriostatic action against *Mycobacterium leprae*. The potential use of natural and synthetic derivatives cyclodextrins have been extensively studied to improve certain properties of drugs such as solubility, stability and / or bioavailability. The complex dapsone: β CD and dapsone:SBE β CD were prepared in 1:1 molar ratio, using the evaporation method. The possible formation of an inclusion complex was characterized by different physico-chemical techniques, including its solubility diagram, infra-red (IR), X-ray diffraction (XRD) and thermogravimetry (TG), checking the increase of solubility obtained in order to develop an oral liquid dosage form. The stoichiometry of the complex DAP: β CD and DAP:SBE β CD was determined by the solubility technique and a linear relationship was obtained between the amount of DAP solubilized and the concentration of CD in solution, which was classified as a typical AL, this can be attributed to the formation of a 1:1 inclusion complex between DAP and CD's. In curves of TG species free and complexed it was found that the thermal decomposition of the complex occurs an intermediate temperature between the decomposition species free, shows a gain in thermal stability to the encapsulated drug, probably as a result of interactions with the cavity. The infrared spectrum showed that the S = O absorptions disappeared, this disappearance caused by the insertion of the drug inside the CD. XRD showed the amorphization of the samples, indicando a formação dos complexos. The results obtained by FT-IR, TG, XRD and phase diagram shows that complexation effectively improve the solubility of DAP, which would allow the liquid formulation solution.

Keywords: Cyclodextrins, Dapsone, Inclusion Complex, β -CD, SBE β -CD.

4.1. INTRODUÇÃO

O tratamento específico da hanseníase, indicado pelo Ministério da Saúde, é a poliquimioterapia padronizada segundo recomendações da Organização Mundial de Saúde (BRASIL, 2002). Esta terapia consiste na associação de três fármacos: dapsona, rifampicina e clofazimina. A dapsona (DAP) é uma substância da classe das sulfonamidas que apresenta ação bacteriostática contra o *Mycobacterium leprae*. Devido à sua alta lipofilicidade e à sua baixa dissociação iônica em pH fisiológico (SCIOR et al., 1997; PANICKER, 2006). Essa característica, somada ao baixo custo e ausência de toxicidade, torna a dapsona o fármaco de primeira escolha no tratamento e profilaxia da hanseníase, incluindo-o na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais – RENAME (ANVISA, 2002; MARTINDALE, 2007).

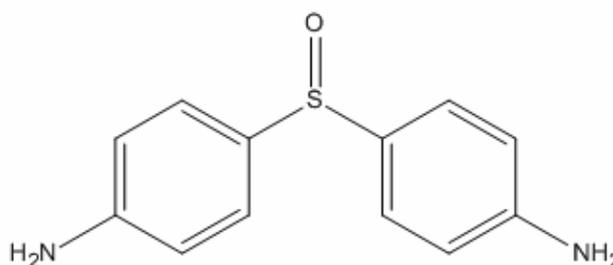


FIGURA 01. Estrutura molecular da Dapsona

Fármacos pouco solúveis apresentam problemas de biodisponibilidade e têm demonstrado serem imprevisíveis e mais lentamente absorvidos se comparados com fármacos de maior solubilidade em água (VEIGA et al., 1996). De acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), a DAP é classificada como fármaco pouco solúvel e permeável (classe IV). Essa classificação auxilia na previsão da absorção *in vivo* e identificar se a biodisponibilidade de determinado produto farmacêutico é sensível a alterações do processo produtivo, dos constituintes da formulação ou da concentração do fármaco (LOFTSSON, 2002).

Várias técnicas como emulsificação, complexos de inclusão e conjugação com polímeros solúveis em água ou ciclodextrinas tem sido desenvolvidas para melhorar a solubilidade de vários fármacos. O potencial uso das ciclodextrinas naturais e seus derivados sintéticos tem sido extensivamente estudados para aumentar certas propriedades de fármacos, como solubilidade, estabilidade e/ou biodisponibilidade (SOARES-SOBRINHO, 2010). A propriedade de melhora da solubilidade pode ser explicada pela formação de complexos de inclusão solúveis em água, no qual o interior apolar da ciclodextrina encapsula as moléculas hidrofóbicas. Em contraste, o exterior, região hidrofílica da CD, promove a solubilização através de interações com moléculas de água. No entanto, as ciclodextrinas naturais tem limitada solubilidade em água. A fim de obter um significativo incremento na solubilidade em água, alguns derivados químicos tem sido sintetizados por derivação de grupos hidroxilas livres das ciclodextrinas com grupos alquil e sulfobutil. O resultado é a formação de derivados hidroxil, metil e sulfobutil com maior solubilidade em água (FUKUDA, 2008).

O objetivo desse estudo é a caracterização dos complexos de inclusão da dapsona e β CD/ SBE β CD, verificando o incremento de solubilidade obtido, visando o desenvolvimento de uma forma farmacêutica oral líquida. A possível formação de um complexo de inclusão foi caracterizada por diferentes técnicas físico-químicas, incluindo seu diagrama de solubilidade, infra-vermelho (IV), difração de Raio X (DRX), TG e DTA.

4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

Matérias primas e Reagentes

A dapsona (DAP), α -ciclodextrina (α -CD), β -ciclodextrina (β -CD), γ -ciclodextrina (γ -CD), sulfobutileter- β -ciclodextrina (SBE β CD), hidroxipropil- β -

Ciclodextrina (HP β CD) e RM β CD foram cedidas pelo Núcleo de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal do Piauí.

Para a preparação das soluções utilizou-se água destilada e membranas filtrantes de porosidade de 0,22 μ m Millipore[®] (Millipore Corp, Billerica, MA). Todos os solventes utilizados foram de grau analítico.

Preparação dos complexos de inclusão no estado sólido

Os complexos dapsona: β CD e dapsona:SBE β CD foram preparados na razão molar 1:1, utilizando o método de co-precipitação. Inicialmente para a solubilização da dapsona utilizou-se acetona e água. Nesta etapa, foram utilizadas quantidades mínimas dos solventes. Após a dissolução completa de cada componente individualmente, verteu-se a solução de dapsona na solução da CDs, correspondente ao complexo a ser obtido, realizando-se em seguida vigorosa homogeneização. O solvente orgânico foi retirado inicialmente em rotaevaporador (Evaporador rotativo Marconi[®]), sob temperatura controlada (50 ± 5 °C) e pressão reduzida (-900 ± 20 mbar) com agitação contínua de 90 ± 3 rpm. Posteriormente, as amostras resultantes foram congeladas a -40 °C por 4 dias, e posteriormente foram liofilizadas (pressão de 80 a 150 mmHg; vácuo 220 ± 2 Vca).

Após a secagem os complexos foram pulverizados, misturados em gral de porcelana com auxílio de pistilo e tamisadas em malha de 250 μ m. Os produtos foram acondicionados em frascos ampola hermeticamente fechados e armazenados em dessecador de vidro sob vácuo.

Preparação de Misturas Físicas (MFs)

As MFs foram obtidas por homogeneização durante 20 min em gral de porcelana com auxílio de pistilo na proporção 1:1 (mol:mol). Posteriormente os produtos foram tamisados em malha de 250 μ m e acondicionados em frascos ampola hermeticamente fechados e armazenados em dessecador de vidro sob vácuo.

Caracterização dos complexos de inclusão no estado sólido

Termogravimetria (TG)

A caracterização termoanalítica através de TG foi realizada em duplicata por meio de termobalança, modelo TGA Q50, em atmosfera de nitrogênio em fluxo de 50 mL/min, sendo a massa da amostra equivalente a cerca de 2,0 mg ($\pm 0,2$), acondicionadas em cadinho de alumina e analisadas na faixa de temperatura entre 25 °C e 600 °C na taxa de aquecimento de 10 °C/min. Antes dos ensaios, verificou-se a calibração do instrumento empregando-se uma amostra de alumínio e zinco.

Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF)

O espectro de infravermelho foi obtido utilizando o equipamento PerkinElmer® (Spectrum 400) com dispositivo de reflectância total atenuada (ATR) (Miracle ATR, Pike Technologies Spectroscopic Creativity) com cristal de selênio. As amostras a serem analisadas foram transferidas diretamente para o compartimento do dispositivo de ATR.

Difração de Raios-X (DRX)

Os difratogramas dos produtos isolados e binários foram obtidos no difratômetro SIEMENS (X-Ray Diffractometer, D-5000), equipado com anodo de cobre. As amostras foram analisadas no intervalo de ângulo 2θ de 2-60 a uma velocidade de digitalização de 0,02° /s. As amostras foram preparadas em suportes de vidro com uma fina camada de material do pó sem solvente.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diagrama de solubilidade

O valor de 291 nm foi selecionado para a quantificação das amostras nos ensaios de solubilidade.

O diagrama de solubilidade de fases foi construído com as ciclodextrinas naturais e algumas modificadas, para verificação do comportamento da dapsona na complexação com estas. O perfil para cada CD está representado na Figura 02.

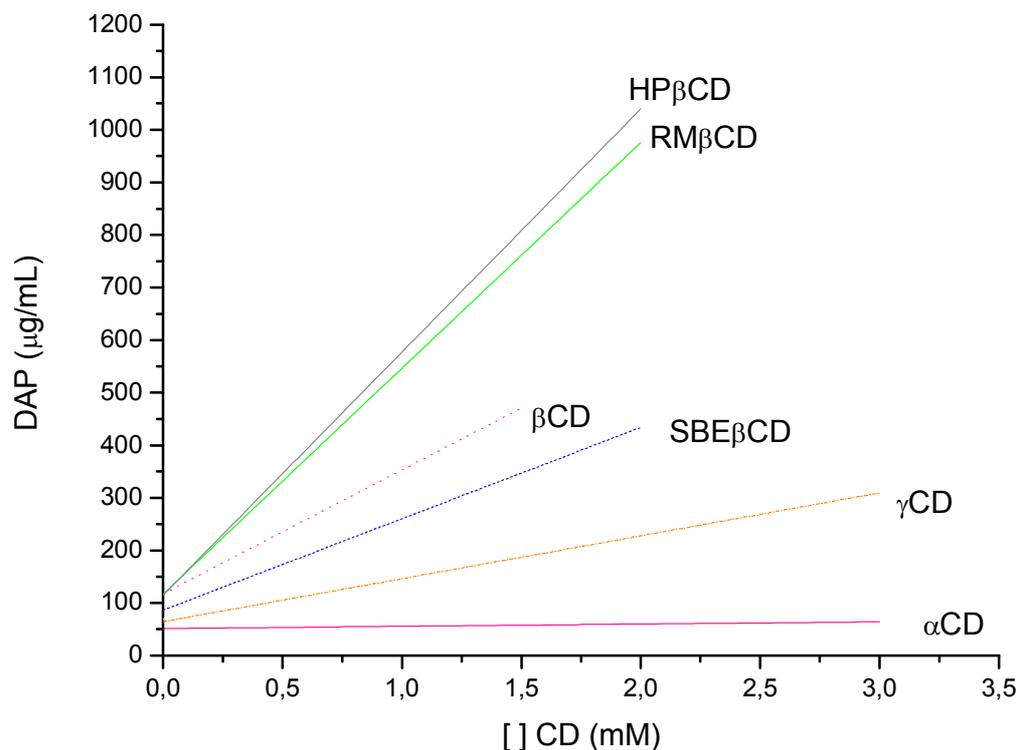


FIGURA 02. Diagrama de solubilidade para DAP na presença de diferentes concentrações de α -CD, β -CD, γ -CD, HP β CD, RM β CD e SBE β CD.

Apesar de os melhores resultados quanto ao incremento de solubilidade da dapsona terem sido obtidos para HP β CD e RM β CD (Tabela 02), os complexos escolhidos para caracterização neste trabalho foram DAP: β CD e DAP:SBE β CD. Ambas as CD tem sua toxicidade via oral descrita no Handbook of Pharmaceutical Excipients (2010).

Tabela 01. Constante de estabilidade (K), eficiência de complexação (CE) e razão molar de complexação (dapsona / CD), calculadas a partir do diagrama de solubilidade de fases para o complexo dapsona: CD.

Ciclodextrina	K (mol.L ⁻¹)	CE	RM (DAP:CD)
γ CD	3798,5	1,025	1:1,97
α CD	4582,84	1,234	1:1,81
β CD	3748,04	1,01	1:1,99
SB β CD	3777,67	1,019	1:1,98

HP β CD	4938,58	1,33	1:1,75
2	3937,04	1,06	1:1,00

FONTE: LAFEPE, 2011

Tabela 02. Valores de solubilidade da Dapsona e sistemas binário obtidos por co-precipitação expressos em $\mu\text{g/mol}$, mM e valores de incremento de solubilidade obtido.

Ciclodextrina	Solubilidade DAP ($\mu\text{g/mL}$)	Solubilidade DAP (mM)	Incremento solubilidade
DAP	68,13	0,27	-
DAP: β CD	514	2,07	7,6
DAP: α Cd	70,33	0,28	1
DAP: γ CD	288,5	1,16	4,3
DAP:SBE β CD	426,67	1,71	6,3
DAP:RM β CD	870	3,50	13
DAP:HP β CD	956	3,85	14,26

FONTE: LAFEPE, 2011

A estequiometria do complexo DAP: β CD e DAP:SBE β CD foi determinada pela técnica de solubilidade. Uma relação linear foi obtida entre a quantidade de DAP solubilizada e a concentração de CD na solução, a qual foi classificada com um típico A_L . De acordo com a teoria de Higuchi e Connor's (Higuchi e Connor's, 1965), isto pode ser atribuído a formação de um complexo de inclusão 1:1 entre DAP e CD. A constante de estabilidade aparente calculada dos complexos DAP:CD estão representadas em tabela e indicam interações fortes entre a DAP e as CD's (TABELA 01).

Análises de TG/DTA

A maneira mais comum de se detectar a formação de complexos de inclusão utilizando TG consiste em comparar a temperatura de início de degradação da

molécula hóspede com a do suposto complexo. Caso haja a complexação, a degradação da molécula hóspede ocorrerá a temperaturas mais elevadas, pois estará protegida pela ciclodextrina (ARAÚJO et al, 2007).

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

Nas curvas de TG das espécies livres e complexadas verifica-se que a decomposição térmica do complexo ocorre em 321°C para DAP:βCD e 315°C para DAP:SBEβCD, uma temperatura intermediária entre a decomposição das espécies livres, onde a DAP apresenta temperatura de decomposição de 372°C e a βCD de 325°C e a SBEβCD 296°C. Isto evidencia um ganho de estabilidade térmica para o fármaco encapsulado, provavelmente como resultado de interações com a cavidade (FIGURA 03, 04)

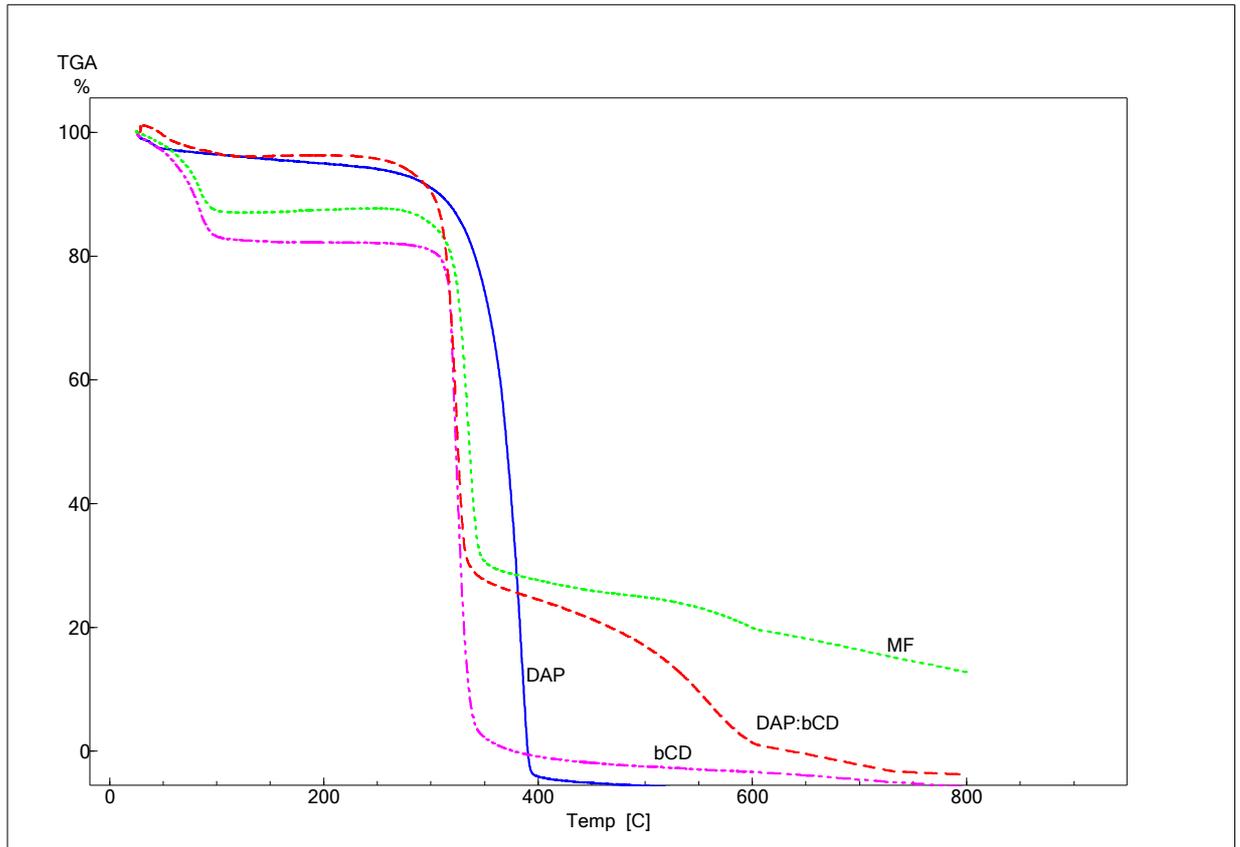


FIGURA 03. Curva de TG das espécies livre DAP, β CD, da mistura física (MF) e do complexo DAP: β CD.

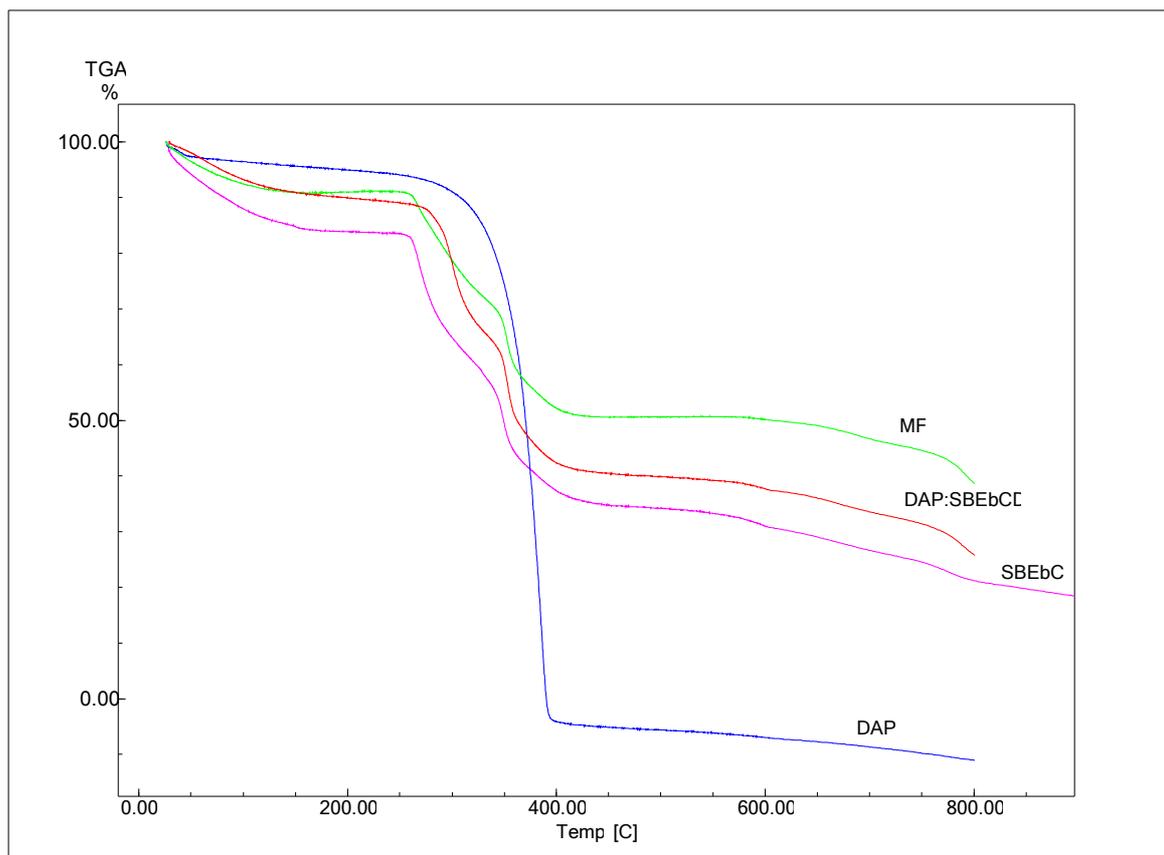


FIGURA 04. Curvas de TG da DAP, SBE β CD, Mistura física e do complexo DAP:SBE β CD.

A DTA é uma técnica térmica em que se mede a diferença de fluxo de calor entre a amostra e uma referência inerte, quando ambas são submetidas a um programa controlado de temperatura, aquecimento ou resfriamento. Mudanças de temperatura da amostra são ocasionadas pelas transições ou reações entálpicas de correntes de mudanças de fase, fusão, desidratação, oxidações ou outras reações químicas (MOTHÉ, AZEVEDO, 2009).

Nas curvas de DTA (Figura 5, Figura 6), verifica-se que um evento endotérmico associado à fusão do DAP em 179,69°C, não se manifesta na curva dos complexos, o que é normalmente associado a uma evidência indireta de formação do complexo. Isto é interpretado com base no fato de que, quando moléculas de DAP se encontram no interior da cavidade da β CD ou da SBE β CD, estas não mais interagem entre si no estado sólido, pois são essas interações que teriam que ser rompidas para se iniciar a fusão do fármaco propriamente dito.

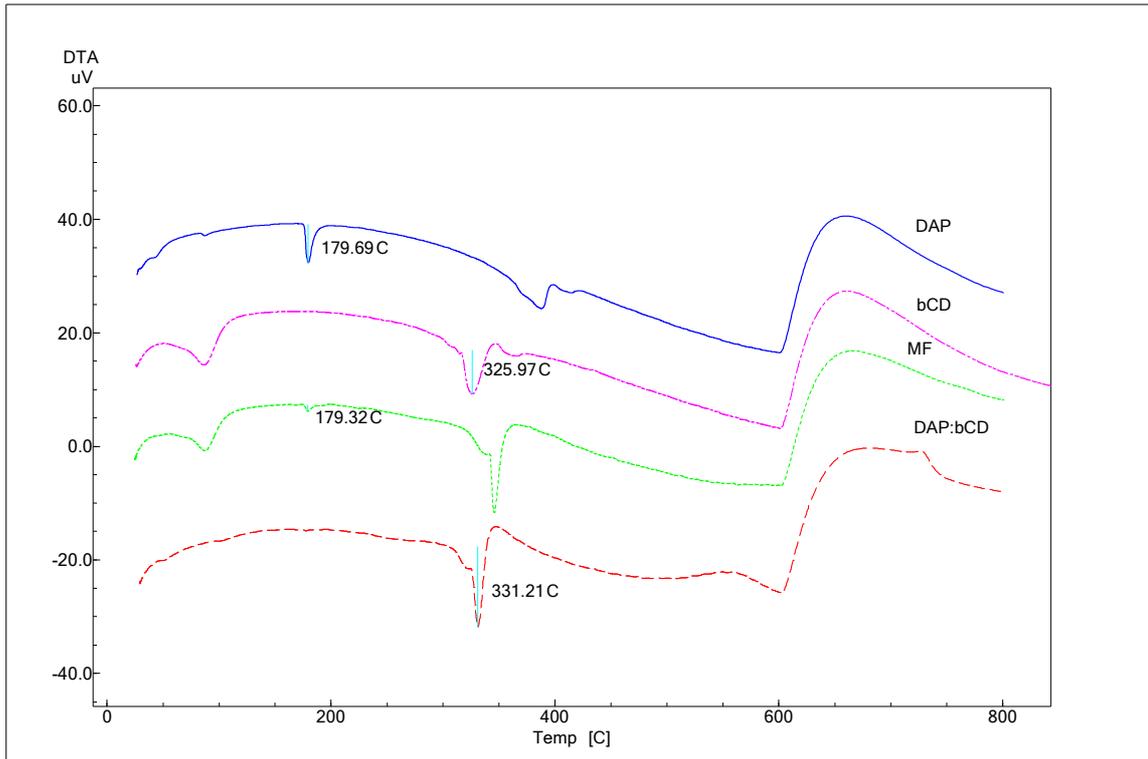


FIGURA 05. Curvas de DAT da DAP, β CD, Mistura física e do complexo DAP: β CD.

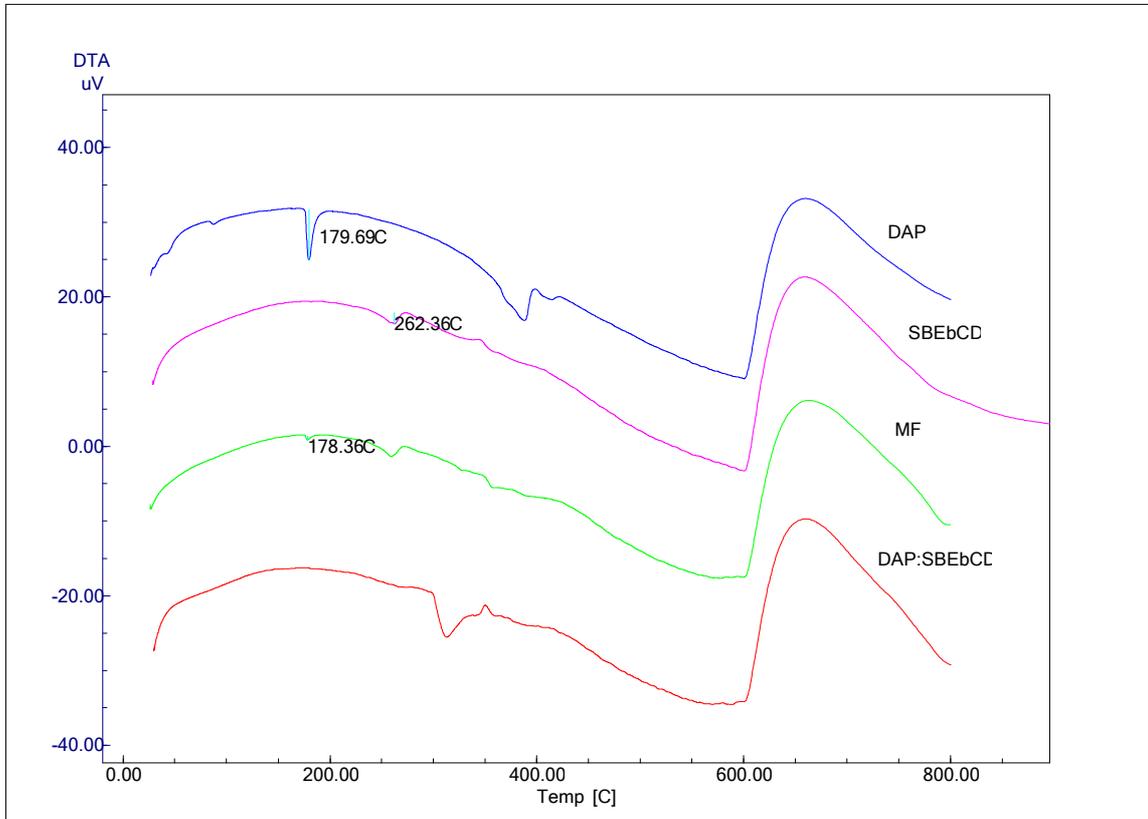


FIGURA 06. Curvas de DAT da DAP, SBE β CD, Mistura física e do complexo DAP:SBE β CD.

Infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF)

A espectroscopia de infravermelho é uma metodologia analítica que pode ser utilizada para a avaliação da ocorrência de interações entre diferentes moléculas no estado sólido (MACEDO, L, F, O; 2010). A análise dos espectros de IV pode ser feita comparando-se as bandas da molécula hóspede, da ciclodextrina e da mistura física com as do complexo. Geralmente, o espectro da mistura física corresponde à sobreposição dos espectros da molécula hóspede e da CD, porém com as bandas da molécula hóspede menos evidente, devido a sua menor concentração. Quando ocorre a complexação, as bandas podem mudar de posição, diminuir ou até mesmo desaparecer (CORTI et al, 2007). Devido a isto os dados discutidos a seguir são do possível complexo formado e não da mistura física.

O espectro de IV da DAP apresenta bandas de absorção de estiramento assimétrico (forte) em 1275 cm^{-1} e estiramento simétrico (forte) em $1141,78\text{ cm}^{-1}$ características de S=O. Outra banda importante no espectro da DAP é a banda de absorção de NH, que ocorrem entre $3500\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$. Estas são as principais bandas que se deve analisar para se poder inferir sobre a complexação do fármaco. No espectro da β CD há uma banda bem característica de OH em $3291,34\text{ cm}^{-1}$ que é indicativo de hidroxila de álcool. Esses valores apresentam-se um pouco abaixo do esperado, $3400\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$, possivelmente por interações intermoleculares entre as moléculas de β CD e o fármaco, interações estas do tipo ligações de hidrogênio (MACEDO, O. F. L, 2010), que diminuem a força da ligação O-H fazendo-a vibrar em um número de onda menor. Observando-se o espectro da MF DAP/ β CD, pode-se perceber que não houve deslocamento das bandas de S=O, o que se percebe é apenas uma diminuição da intensidade destas causada pela vizinhança química diferenciada, assim também, como pela menor proporção de fármaco em comparação com a CD. O mesmo ocorre com a banda de absorção de NH, que sofrem apenas uma diminuição de intensidade. Já no complexo DAP: β CD as bandas de S=O apresentam-se deslocado para a esquerda (1278 cm^{-1} e 1146 cm^{-1} respectivamente), e as de NH apresentam-se deslocadas para a direita evidenciando uma interação fármaco/CD (FIGURA 07).

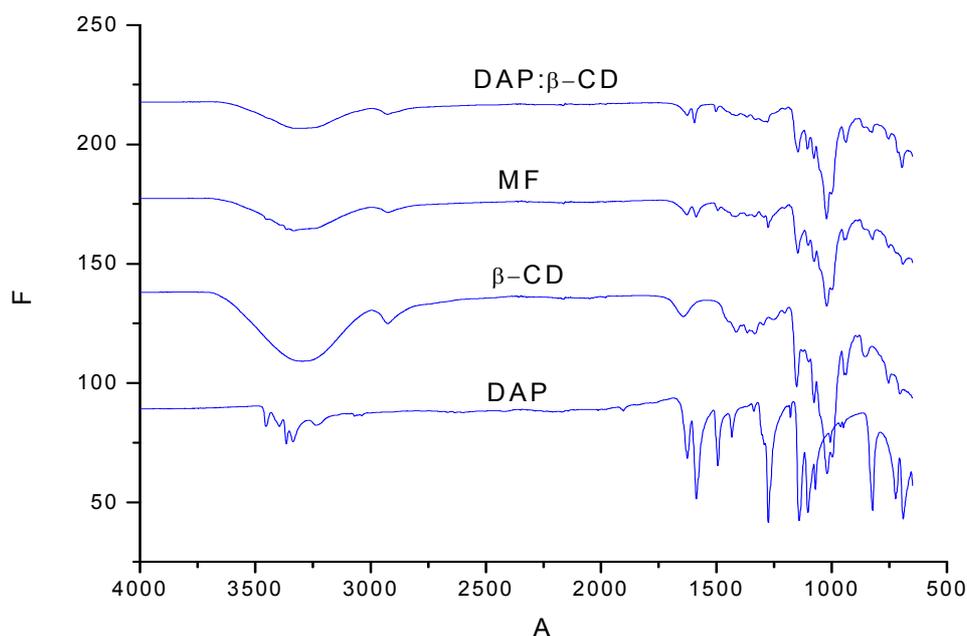


FIGURA 07. Espectros de IV das moléculas livres DAP e βCD, mistura física e complexo DAP:βCD.

No entanto, os melhores resultados foram obtidos no complexo DAP/SbβCD, neste as absorções de S=O desapareceram, desaparecimento este causado pela inserção do fármaco no interior da CD e a possível formação de ligações de hidrogênio entre o S=O e os hidrogênios da cavidade hidrofóbica. Similarmente, a banda de NH desaparece e a banda na região de 3000-3500cm⁻¹ praticamente assume a forma de OH da SbβCD devido o encobrimento NH pelo OH, causada pela encapsulação da DAP na cavidade hidrofóbica da CD (FIGURA 08).

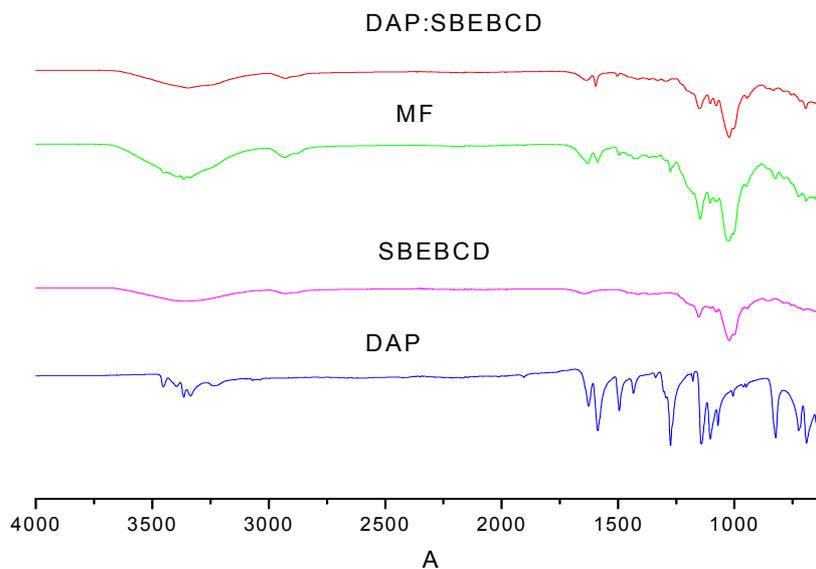


FIGURA 08. Espectros de IV das moléculas livres DAP e SBE β CD, mistura física e complexo DAP:SBE β CD.

Difração de RX

A difração de raio X (DRX) determina a natureza cristalina dos sólidos e é uma das melhores técnicas para a caracterização de complexos de inclusão (VEIGA, PERCORELI, RIBEIRO, 2006). Entre as técnicas cristalográficas, a difração de raios-X é muito empregada devido a sua simplicidade e rapidez. Nesta análise, faz-se a comparação dos difratogramas das espécies puras com o do complexo (CAO et al, 2005). A obtenção de um difratograma com características de um material amorfo, ou seja, sem picos finos bem definidos, pode ser um indicativo da ocorrência de complexação (CORTI et al, 2007).

No difratograma da DAP aparecem picos de difração que demonstram um ordenamento estrutural típico de um sólido cristalino, enquanto no difratograma da β CD (FIGURA 9) e da SBE β CD (FIGURA 10) observa-se ausência de picos e um comportamento típico de substância amorfa. No difratograma das misturas físicas, verifica-se a sobreposição dos padrões de cristalinidade da DAP e de substância amorfa da β CD e da SBE β CD, respectivamente. Os picos fortes indicam a retenção da estrutura cristalina da DAP na mistura física. Contudo, o complexo de inclusão

DAP: β CD e DAP: SBE β CD tem um fundo amplo sob os picos cristalino, assemelhando-se ao padrão amorfo da CD, não apresentando os picos característicos da DAP, indicando a formação de uma quantidade significativa de material amorfo.

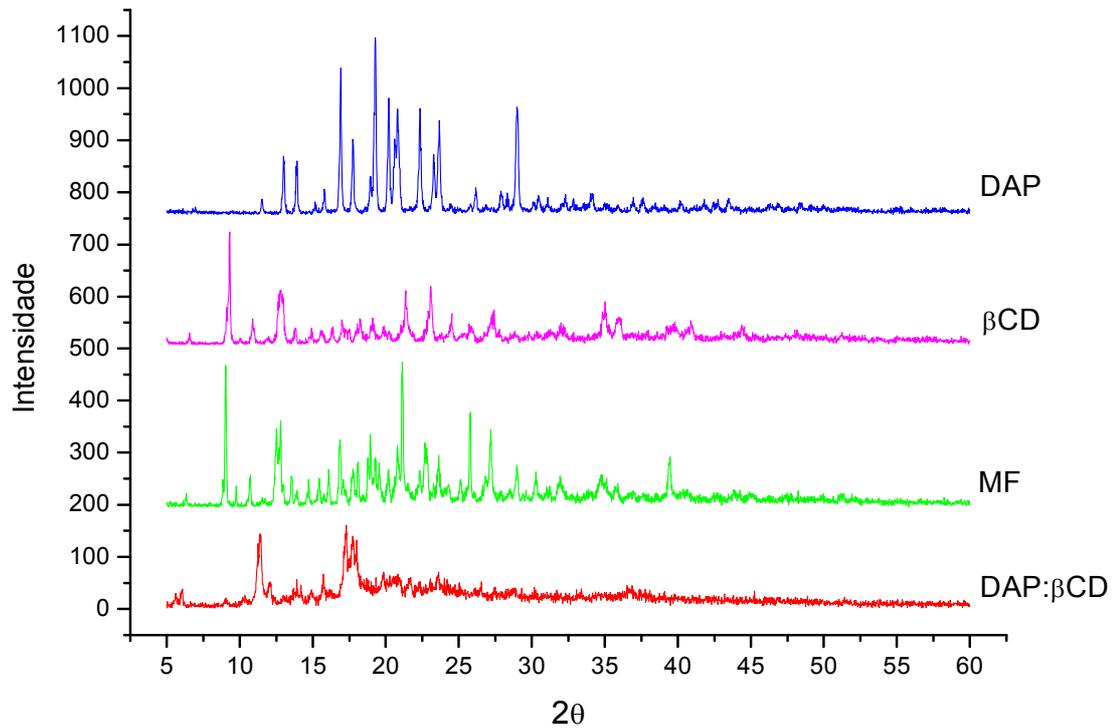


FIGURA 09. Difratoogramas de Raio-X das moléculas livres DAP e β CD, mistura física e complexo DAP: β CD.

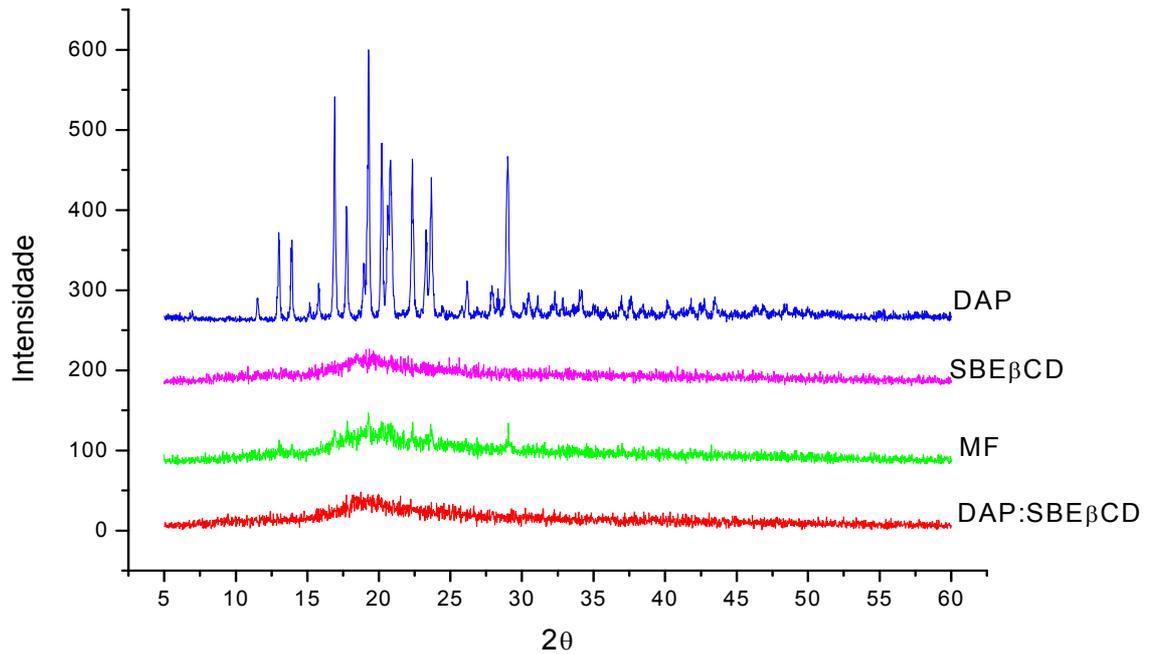


FIGURA 10. Difratomogramas de Raio-X das moléculas livres DAP e SBEβCD, mistura física e complexo DAP:SBEβCD.

4.4. CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados sugerem formação de complexos de inclusão por co-precipitação. Os resultados obtidos por IV, TG, DRX e diagrama de fases mostram que ocorre a complexação, podendo haver melhora efetiva na solubilidade da DAP, o que tornaria possível a formulação líquida solução.

4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. Portaria nº 1.587, de 3 de setembro de 2002: **Diário Oficial da União** 2002.

ARAÚJO, MVG; VIEIRA, EKB; LÁZARO, GS; CONEGERO, FS; FERREIRA, OP, ALMEIDA, LE, BARRETO, LS, COSTA-JR, NB; GIMENEZ IF. Sulfadiazine/hydroxypropyl- β -cyclodextrin host-guest system: Characterization, phase-solubility and molecular modeling. **Bioorg. Med. Chem.** V.16 p. 5788 – 5794, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Guia para o Controle da hanseníase**. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigilância em Saúde: Situação Epidemiológica da Hanseníase no Brasil**, 2008.

BRASIL. Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal, Governo do Distrito Federal. **Hanseníase: Protocolo de Atendimento** – Brasília: Subsecretaria de Vigilância à Saúde, 2007.

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

CORTÉS, S.L, RODRIGUEZ, G. Leprosy in children: association between clinical and pathological aspects. **J Trop Pediatr.** 2004;50(1):12-5.

CORTI, G; CAPASSO, G; MAESTRELLI, F; CIRRI, M; MURA, P. Physicochemical characterization of binary systems of metformin hydrochloride with triacetyl- β -cyclodextrin. **J. Pharm. Biomed. Anal.** V. 45, p. 480-486, 2007

FERNANDES C.M., VIEIRA, T.M., VEIGA, F.J.B. Physicochemical characterization and in vitro dissolution behavior of nicardipine–cyclodextrins inclusion compounds. **Eur J Pharm Sci.** 2002;15:79–88.

FIGUEIRAS, A., CARVALHO R.A., RIBEIRO, L., TORRES-LABANDEIRA, J.J., VEIGA, F.J.B. Solid-state characterization and dissolution profiles of the inclusion complexes of omeprazole with native and chemically modified b-cyclodextrin. **Eur J Pharm Biopharm.** 2007;67: 531–9.

FUKUDA, M, MILLER, D A, PEPPAS, N A, MCGINITY, J W. Influence of sulfobutyl ether β -cyclodextrin (Captisol®) on the dissolution properties of a poorly soluble drug from extrudates prepared by hot-melt extrusion. **International Journal of Pharmaceutics** 350 (2008) 188–196

ROWE, R.C.; SHESKEY, P.J.; OWEN, S.C. Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association. **Handbook of pharmaceutical excipients.** 5th ed. London: Pharmaceutical Press, 2006.

HIGUCHI, T. e CONNORS, K. A. **Advances in analytical chemistry instrumentation.** New York: Wiley-Interscience, v.IV. 1965. 117 p.

LOCKWOOD, S.F., O'MALLEY, S., MOSHER, G.L., 2003. Improved aqueous solubility of crystalline astaxanthin (3,3'-dihydroxy- β , β -carotene-4,4'-dione) by captisol® (sulfobutyl ether β -cyclodextrin). **J. Pharm. Sci.** 92, 922–926.

LOFTSSON, T., BREWSTER, M.E., MASSON, M. Role of cyclodextrins in improving oral drug delivery. **Am. J. Drug Deliv.** 2, 1–15.

LOFTSSON, T. Cyclodextrins and the Biopharmaceutics classification system of drugs. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry.** V. 44, n. 1-4, Dec, p. 63-67. 2002.

MACEDO, L, F, O. **Preparação e Caracterização de complexo de inclusão entre trimetoprim e 2- Hidroxipropil- Gama- Ciclodextrina.** Sergipe 2010. p 39-39. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Sergipe

MARTINDALE. **The Complete Drug Reference**. Grayslake: Pharmaceutical Press. 2007

MOTHÉ, C. G; AZEVEDO, A.D. **Análise térmica de materiais**. Ed. Líber. p 125.

NAGASE, Y., HIRTA, M., ARIMA, H., TAJIRI, S., NISHIMOTO, Y., HIRAYAMA, F., IRIE, T., UEKAMA, K., 2002. Protective effect of sulfobutyl ether β -cyclodextrin on DY-9760e-induced hemolysis *in vitro*. **J. Pharm. Sci.** 91, 2382–2389.

PANICKER, L. Influence of leprosy drug, dapsona on the model membrane dipalmitoyl phosphatidylethanolamine. **Thermochimica Acta**, v.447, May, p.123-30. 2006.

SCIOR, T., *et al.* Molecular modeling study on dapsona and sulfonamides comparing structures and properties with respect to anti-leprosy activity. **Journal of Molecular Modeling**, v.3, n.8, p.332-337. 1997.

SOARES-SOBRINHO, J L; SOARES, M F LR; Rolim-Neto, P J. Physicochemical study of solid-state benzimidazole–cyclodextrin Complexes. **J Therm Anal Calorim.** Published on line: 17 December 2010.

VEIGA, F J B; PECORELLI, CCMF; RIBEIRO, LSS. **As ciclodextrinas na tecnologia farmacêutica**. Minerva Coimbra Editora. 2006.

Capítulo 3

5.0 Caracterização do complexo no estado líquido

**Caracterização físico-química dos complexos de inclusão
DAP: β CD e DAP:SBE β CD no estado líquido**

Caracterização físico-química dos complexos de inclusão DAP: β CD e DAP:SBE β CD no estado líquido

RESUMO

A dapsona, um componente importante dos esquemas multidrogas para tratamento da hanseníase, é um fármaco de baixa solubilidade, disponível apenas como comprimidos. Na indústria farmacêutica, as CDs têm sido particularmente usadas devido às suas propriedades complexantes, por aumentar: a solubilidade e dissolução dos fármacos pouco solúveis. O principal objetivo deste trabalho foi estudar a complexação da Dapsona com β CD e SBE β CD em meio líquido por RMN através de experimentos para a determinação da estequiometria do complexo (Job's plot), medidas de constante de associação por experimentos de difusão (DOSY) e a estequiometria de complexação foi determinada como 1:1 para ambos os complexos, a constante foi de 2780 M^{-1} e 1219 M^{-1} , para DAP: β CD e DAP:SBE β CD, respectivamente. Os experimentos de ROESY indicam uma maior interferência no ambiente de Ha da DAP, possibilitando inferir sobre a inserção do fármaco na ciclodextrina. Essa inserção foi simulada por técnicas de química computacional

Palavras-Chave: RMN, Dapsona, Ciclodextrina, DOSY, ROESY.

Physico-chemical characterization of inclusion complex dapson- β CD and dapson-SBE β CD in liquid state

ABSTRACT

Dapsone, an important component of multidrug regimens for treatment of leprosy, is a drug of low solubility, only available as tablets. In the pharmaceutical industry, particularly the CDs have been used due to their complexing properties, to increase the solubility and dissolution of poorly soluble drugs. The main objective of this work was to study the complexation of β CD and SBE β CD with dapsone in a liquid medium by means of NMR experiments to determine the stoichiometry of the complex (Job's plot), measure association constants by diffusion experiments (DOSY). The stoichiometry of complexation was determined as 1:1 for both complexes, the constant was 2780 M^{-1} and 1219 M^{-1} for DAP: β CD and DAP:SBE β CD, respectively. The ROESY experiments indicate a greater interference in the environment of Ha DAP providing information about the inclusion of the drug in cyclodextrin. This insertion was simulated by computational chemistry techniques.

Keywords: NMR, Dapsone, Cyclodextrin, DOSY, ROESY.

5.1 Introdução

As sulfonas foram usadas desde a década de 1940 no tratamento da hanseníase, mas o único representante da classe amplamente utilizado até hoje é a dapsona, um componente importante dos esquemas multidroga. Seu mecanismo de ação envolve a inibição do metabolismo do folato. À semelhança das sulfonamidas e dapsona também é utilizada para a profilaxia da malária e profilaxia e tratamento da pneumonia (MARTINDALE, 2007).

Na indústria farmacêutica, as CDs têm sido particularmente usadas devido às suas propriedades complexantes, por aumentar: a solubilidade e dissolução dos fármacos pouco solúveis, sua biodisponibilidade e estabilidade, diminuir a irritação gástrica, dérmica ou ocular causada por determinados fármacos, diminuir ou eliminar odores ou sabores desagradáveis, prevenir interações entre diferentes fármacos ou entre fármacos e excipientes (SZEJTLI, 1994).

Quando o amido é degradado por um tipo especial de amilases chamadas glucanotransferases, uma família de oligossacarídeos ciclicamente fechados é obtida. Os mais comuns são compostos de seis a oito unidades α -glucose (monômeros), unidas por ligações glicosídicas α -(1-4), e são chamadas α -, β -, γ -ciclodextrinas (α -CD, β -CD, γ -CD), respectivamente. Uma consequência estrutural dessas ligações glicosídicas α -(1-4), é a formação de uma molécula num formato semicircular tipo cone truncado (Figura 2), garantindo a esta molécula uma cavidade de dimensões apropriadas, o que depende do número de unidades glucose, com grupos hidroxil em suas unidades de α -glucose. Os chamados grupos hidroxil primários (grupos hidroximetil: -CH₂OH) situam-se na abertura mais estreita deste cone, enquanto os grupos hidroxil secundários situam-se na abertura mais larga. Uma característica importante destes grupos hidroxil é seu caráter hidrofílico, promovendo a solubilização das CDs em meio aquoso (BETZE et al., 1984).

β CD é um oligossacarídeo cíclico contendo sete unidades de D-(+)-glicopirranose. A SBE β CD é um derivado amorfo, aniônico da β CD, capaz de formar complexos não-covalentes com muitos tipos de compostos, podendo ser usados em preparações orais sólidas e líquidas (KAUKONEN, 1998; LEFEUVRE, 1999). Ambos tem sua toxicidade estudada, sendo bem toleradas quando administrado por via oral (ROWE, 2009)

A Ressonância magnética nuclear (RMN) tem sido a técnica que evidencia mais diretamente a formação do complexo de inclusão, portanto uma das mais importantes para a detecção do complexo (CONNORS, 1996). As alterações ocorrem principalmente no H3 e H5, às vezes também em H6, dependendo da profundidade que a molécula hóspede entra na cavidade da CD (PINTO, 2005). Esta técnica também fornece informações sobre a topologia da interação entre a molécula hóspede e a CD, fornecendo informações não apenas sobre a estrutura do complexo de inclusão, mas também a estequiometria e a constante de associação do complexo (FIELDING, 2000).

O principal objetivo deste trabalho foi estudar a complexação da Dapsona com β CD e SBE β CD em meio líquido por RMN através de experimentos para a determinação da estequiometria do complexo (Job's plot), medidas de tempo de relaxação longitudinal e medidas de constante de associação por experimentos de difusão. Para um melhor entendimento da estrutura do complexo de inclusão obtido, estes estudos foram complementados com simulação computacional.

5.2. Materiais e métodos

Material

A DAP, β CD e SBE β CD foram doadas pela UFPI.

Experimentos de RMN

Amostras de DAP, β CD, SBE β CD e complexos DAP: β CD e DAP:SBE β CD foram preparadas em 14% de acetona deuterada, com tampão fosfato pH 7,0, para aquisição dos espectros e atribuição dos hidrogênios pertencentes a cada molécula. Alíquotas de 700 μ L foram levadas ao espectrômetro de ressonância nuclear em tubos de 5mm de diâmetro. Os experimentos foram conduzidos a 25°C, usando-se como referência o pico de água residual. Os experimentos de RMN de hidrogênio (1 H-RMN) foram conduzidos no espectrômetro Bruker 400, operando em um campo de 9T em frequência para hidrogênio de 400MHz, equipamento este pertencente ao Instituto de Química– UNICAMP. Em todos os experimentos a supressão da água

residual foi feita pela técnica de pré-saturação. Os dados foram processados utilizando-se o programa do espectrômetro.

A estequiometria de complexação foi determinada a partir de soluções equimolares de DAP e β CD, bem como de DAP e SBE β CD, de forma que a concentração total permaneça constante (2mM), variando-se a fração molar das espécies entre 0 e 1. O parâmetro físico-químico analisado foi o deslocamento químico (δ) na ausência (δ_0) e na presença de DAP (ou CD). A análise dos dados foi realizada construindo-se um gráfico $\Delta\delta.r$ em função de r ($r = \frac{[DAP]_{total}}{[DAP]_{total} + [CD]_{total}}$), onde para um dado valor de r , a concentração do complexo fármaco:ciclodextrina atingirá um máximo, que é a razão estequiométrica (JOB, 1925).

Os experimentos de difusão (DOSY) foram realizados para DAP (2mM), β CD, SBE β CD, 1:1 DAP: β CD e 1:1 DAP SBE β CD. A duração total do gradiente de pulso foi de 2ms, o tempo de espera de difusão foi de 0,05 s e a força de gradiente mínima foi de 0,3 Gauss/cm. Para todos os experimentos foram coletados 30 espectros.

Os experimentos de ROESY foram obtidos nos seguintes parâmetros: $t_{at} = 1.0s$; largura de varredura (sw) = 4 KHz; $d_1 = 3,0 s$; $nt = 512-1024 scans$; alargamento de linha (lb) = 1,0 Hz. As amostras não foram desgaseificadas. Os espectros foram obtidos subtraindo os FIDs e aplicando uma sequência de pulsos $180^\circ_{sel.} - 90^\circ_{n\tilde{a}o\ sel.} -$ trancagem de spin - FID, com tempo de mistura de 500ms, de FIDs adquiridos através da sequência de pulsos $90^\circ_{n\tilde{a}o\ sel.} -$ trancagem de spin-FID. Um modulador gerou os pulsos seletivos e atenuou a potência e duração do pulso.

Estudos de modelagem molecular

Os estudos de modelagem molecular foram feitos usando o software Gaussian 03 e GaussView. Inicialmente realizaram-se cálculos teóricos de otimização da geometria de equilíbrio da dapsona no vácuo, através do método da Teoria do Funcional da Densidade (DFT), usando o funcional híbrido B3LYP combinado com o conjunto de base 6-31G(d). Após esta etapa foi realizada outra otimização, utilizando o mesmo funcional, mas com o conjunto de base 6-311+G(d,p). Cálculos de frequências vibracionais e determinação dos

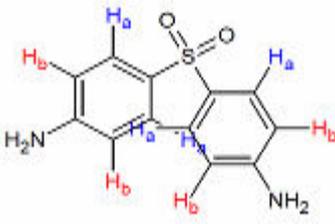
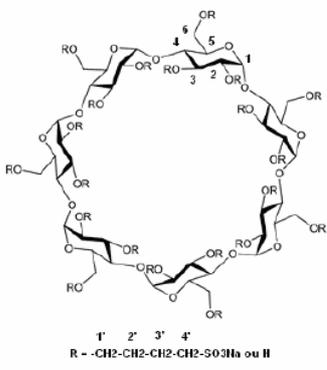
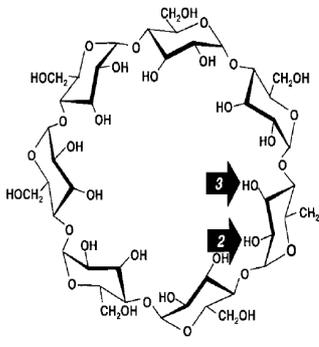
parâmetros geométricos foram realizados, pelos mesmos métodos, para verificar se a estrutura otimizada correspondia ao mínimo global de energia molecular.

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN de ^1H)

Realizou-se a análise dos espectros de RMN de ^1H obtidos para a DAP, ciclodextrinas (β -CD e SBE β CD) e complexos (Figuras 01 e 02), a fim de se atribuir os sinais de RMN de ^1H das moléculas em estudo, bem como observar possíveis alterações nos ambientes químicos dos hidrogênios das mesmas, quando na forma de complexo. O deslocamento químico dos hidrogênios das moléculas estão representados na Tabela 1 (β CD) e Tabela 2 (SBE β CD). A sulfobutileter- β -ciclodextrina (SBE β CD, Quadro 1) é composta pela mistura de β -ciclodextrinas com diferentes números de substituintes nas posições 2,3 e 6 dos monômeros que compõem o macro-ciclo. Isso resulta em significativas superposições de sinais nos espectros de RMN de ^1H . Esse fator impede a realização da atribuição refinada dos sinais de RMN de ^1H da SBE- β -CD. Neste contexto, uma atribuição grosseira foi realizada, destacando apenas as regiões do espectro de RMN onde os sinais apareceram, sem especificação exata do deslocamento químico de cada hidrogênio ou carbono da molécula.

Quadro 1. Estrutura química da DAP e representação esquemática das ciclodextrinas, bem como identificação dos hidrogênios de cada uma das moléculas.

Dapsona	SBE β CD	β CD
 <p>The structure shows a central 1,3,5-triazine ring with a sulfonamide group (-SO₂NH₂) at position 4. Protons are labeled: H_a (blue) at positions 2 and 6, and H_b (red) at positions 4 and 5.</p>	 <p>The structure shows a β-cyclodextrin ring with RO groups at positions 2, 3, and 6. Carbons are numbered 1 through 6. A legend below indicates: R - -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-SO₃Na ou H.</p>	 <p>The structure shows a β-cyclodextrin ring with CH₂OH groups at positions 2, 3, and 6. Carbons are numbered 1 through 6. Protons at positions 2 and 3 are highlighted with black boxes and arrows.</p>

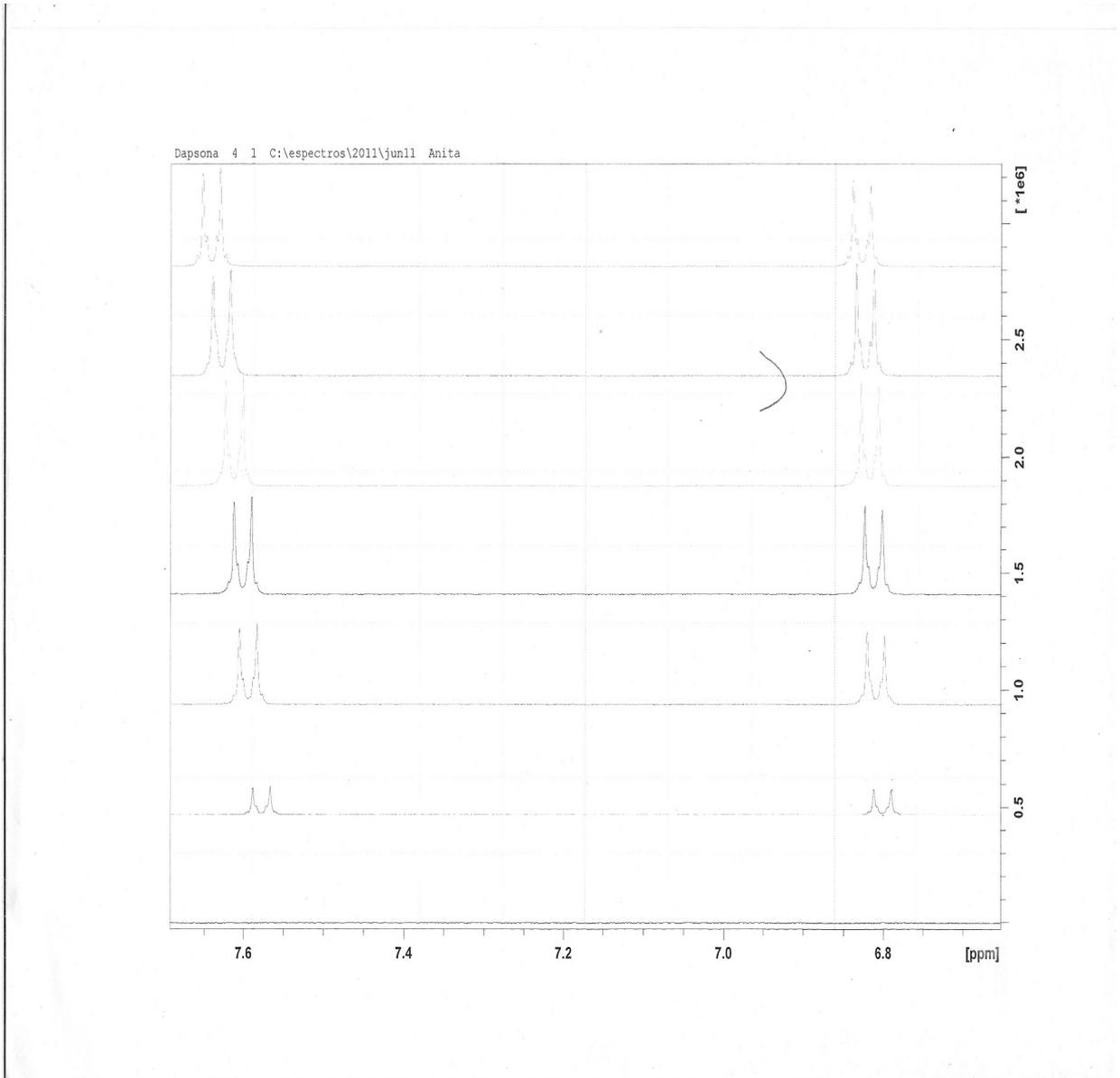


Figura 01. Espectros de RMN do complexo DAP:βCD e da DAP, evidenciando as variações nos deslocamentos químicos.

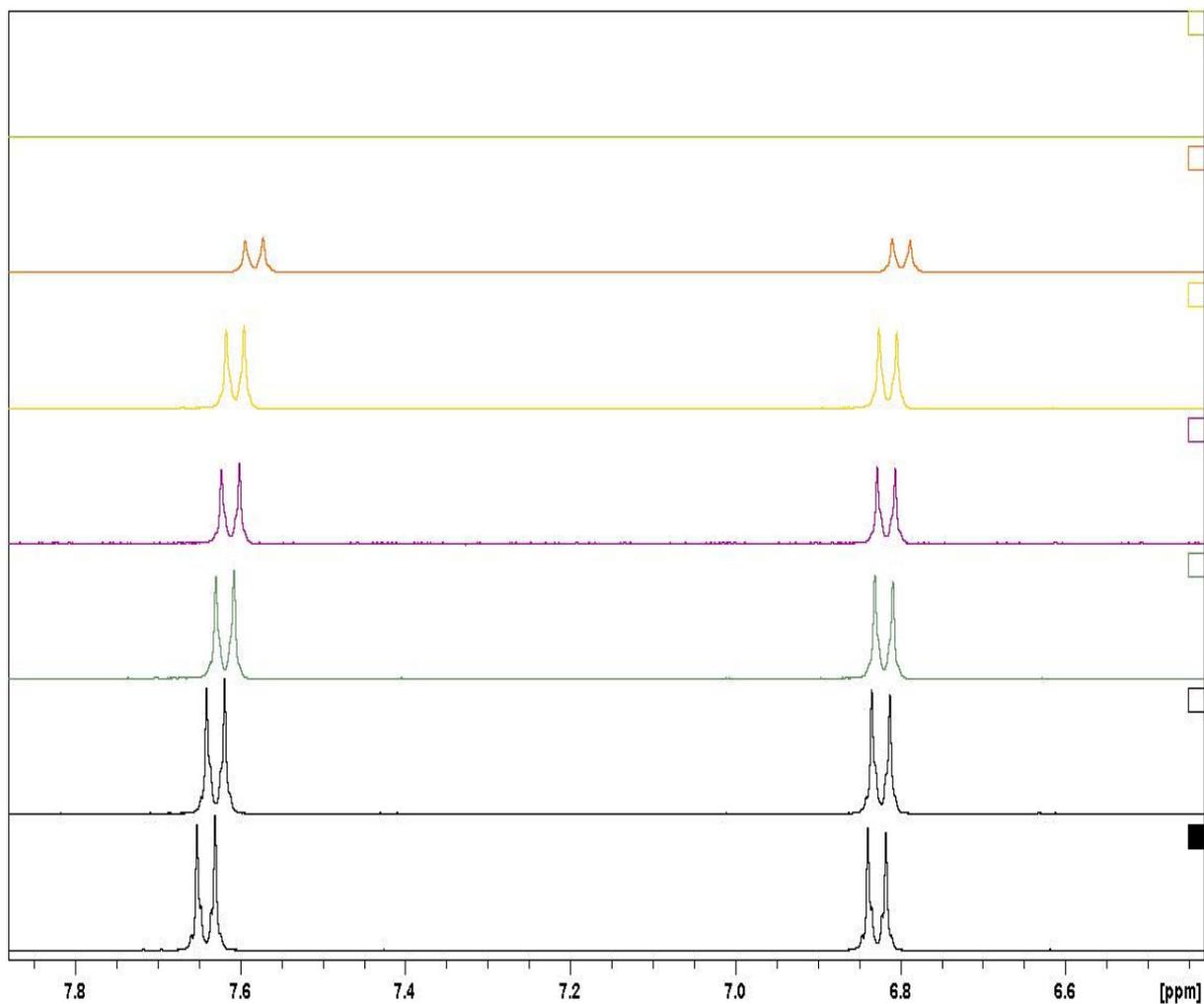


Figura 02. Espectros de RMN do complexo DAP:SBE β CD e da DAP, evidenciando as variações nos deslocamentos químicos.

Tabela 1. Deslocamento químico (δ) em RMN 1H (400MHz) das moléculas pura (DAP e β CD) e da mistura DAP: β CD.

Amostra	H1	H2	H3	H4	H5	H6	Ha	Hb
β CD 2mM	5,0557	3,6378	3,8778	3,5754	3,7532	3,8647	-	-
DAP 1mM: β CD 1mM	5,0607	3,6481	3,8963	3,5884	3,7055	3,8540	7,6011	6,8126
DAP 2mM	-	-	-	-	-	-	0,6413	0,8283
$\Delta\delta$	0,005	0,0103	0,0185	0,013	-0,0477	-0,0107	-0,0402	-0,0157

Tabela 2. Deslocamento químico (δ) em RMN 1H (400MHz) das moléculas pura (DAP e SBE β CD) e da mistura DAP:SBE β CD.

Amostra	H1	H1 [§]	H2	H3	H4	H5	H6	H1'	H2'	H3'	H4'	H _a	H _b
SBE β CD 2mM	5,2	5,08	3,46- 4,09*	3,46 – 4,09*	3,46- 4,09*	3,46-4,09*	3,88	2,95	1,80	1,80	2,95	-	-
DAP 1mM:SBE β CD 1mM	5,2	5,06	3,596 – 3,711*	3,596 – 3,711*	3,596- 3,711*	3,5963- 3,7110*	3,8538	2,9542	1,805	1,805	2,9542	7,6011	6,8126
DAP 2mM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,6413	6,8283
$\Delta\delta$	0	-0,02	0,136 – 0,379	0,136 – -0,379	0,1363 – -0,379	0,1363 – -0,379	-0,0262	0,0042	0,005	0,005	0,0042	-0,0402	-0,0157

* faixa de deslocamento químico onde os sinais são encontrados

§ segundo sinal correspondente a H e C anoméricos.

A partir dos dados obtidos das análises dos espectros de RMN de 1H foi possível observar o efeito da complexação no deslocamento químico dos hidrogênios da molécula de DAP, quando em presença de ciclodextrinas, e vice-versa. A análise dos dados mostra que os hidrogênios Ha do anel aromático da molécula de dapsona sofreram as maiores variações de $\Delta\delta$ quando complexada com a β CD. Quando avaliamos a variação dos deslocamentos provocados pela complexação de DAP com SBE- β CD, podemos verificar que para a DAP a variação maior se dá também no Ha, aromático.

Método da Variação Contínua (“Job plot”)

Para determinar a estequiometria dos complexos, utilizou-se o método da variação contínua (Job plot), que é baseado na variação de alguma propriedade físico-química diretamente dependente da formação do complexo, no caso, a variação do deslocamento químico. A concentração total das espécies foi mantida constante a 2 mM, tanto para β CD quanto para a SBE β CD. A fração molar r variou de 0,2 – 0,8.

O resultado obtido pelo método de variação contínua (Job Plot) para Ha da DAP, está apresentado nas Figuras 3 e 4, para β CD e SBE β CD, respectivamente.

A posição do máximo, tanto para o complexo com β CD quanto para o complexo com SBE β CD, no “Job plot” é $r = 0,5$, indicando uma complexação 1:1, o que está de acordo com o obtido para o estudo do diagrama de solubilidade.

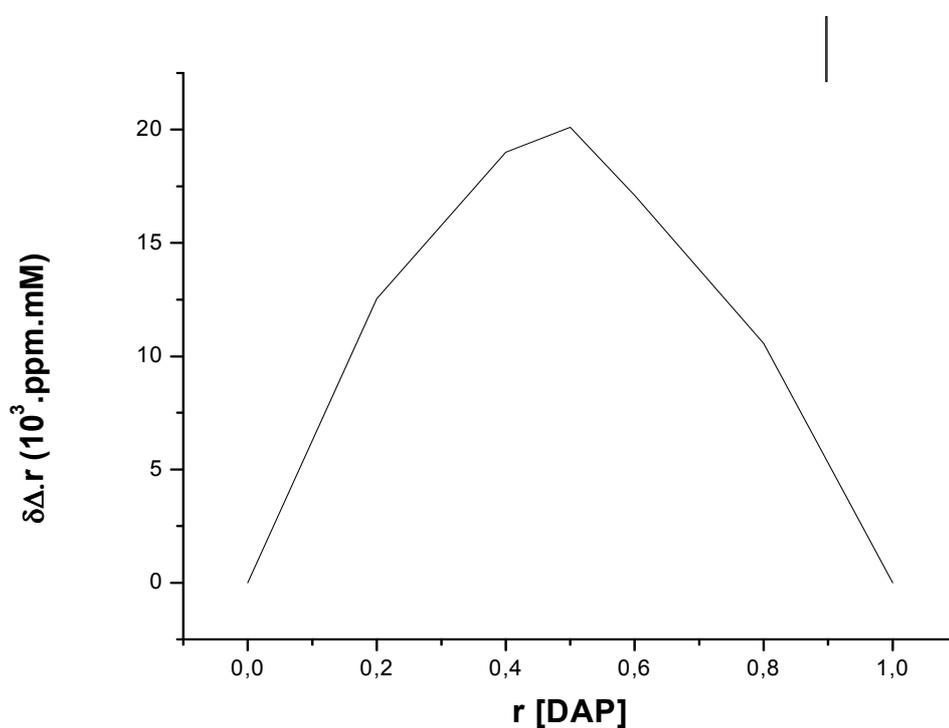


Figura 03. Variação do deslocamento químico dos hidrogênios Ha da DAP em diferentes frações molares do complexo DAP: β CD (“Job Plot”).

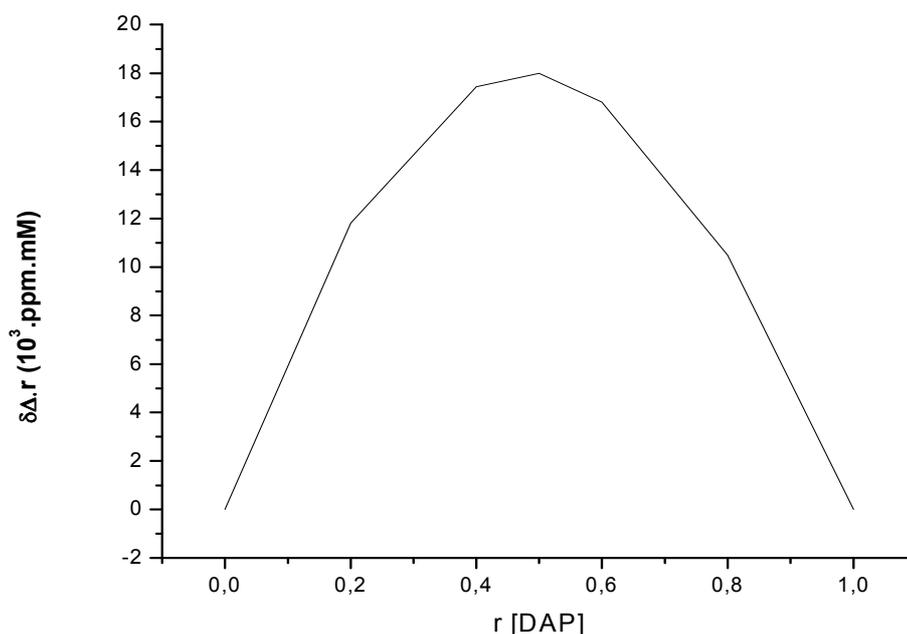


Figura 04. Variação do deslocamento químico dos hidrogênios Ha da DAP em diferentes frações molares do complexo DAP:SBE β CD (“Job Plot”).

A partir dessas evidências de formação de complexo, deu-se início a investigação da interação do complexo de inclusão DAP: β CD e DAP:SBE β CD através de outras medidas de RMN como medidas de difusão (DOSY) e correlações intermoleculares (ROESY), como descrito a seguir.

DOSY

A técnica de DOSY permite determinar, de forma não invasiva, o coeficiente de difusão de moléculas em solução. Ela foi desenvolvida por Morris e Johnson em 1992 e vem sendo aprimorada desde então. Esta técnica pode ser utilizada para resolver misturas de substâncias, desde que estas possuam núcleos ativos para RMN. Diversos trabalhos mostram como isso é possível devido à clara relação entre a massa molecular e o coeficiente de difusão da molécula em solução. Uma outra interessante aplicação do DOSY é a quantificação de partição ou interação de solutos com compostos macromoleculares como micelas, vesículas, proteínas e ciclodextrinas (SOUZA & LAVERDE JR., 2002).

Em um espectro bidimensional de DOSY temos no eixo da abscissa os deslocamentos químicos das moléculas (em ppm) e, no eixo da ordenada, encontramos o coeficiente de difusão da molécula (em $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$).

No espectro da DAP, em ausência de β CD (Figura 05), os picos referentes a DAP alinham-se em um coeficiente médio de difusão de $D_{\text{OBSERVADO}} = 4,393 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Também é possível notar um pico que é referente à água residual que, devido ao seu menor raio hidrodinâmico, apresenta um alto coeficiente de difusão $D_{\text{D2O}} = 16,174 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

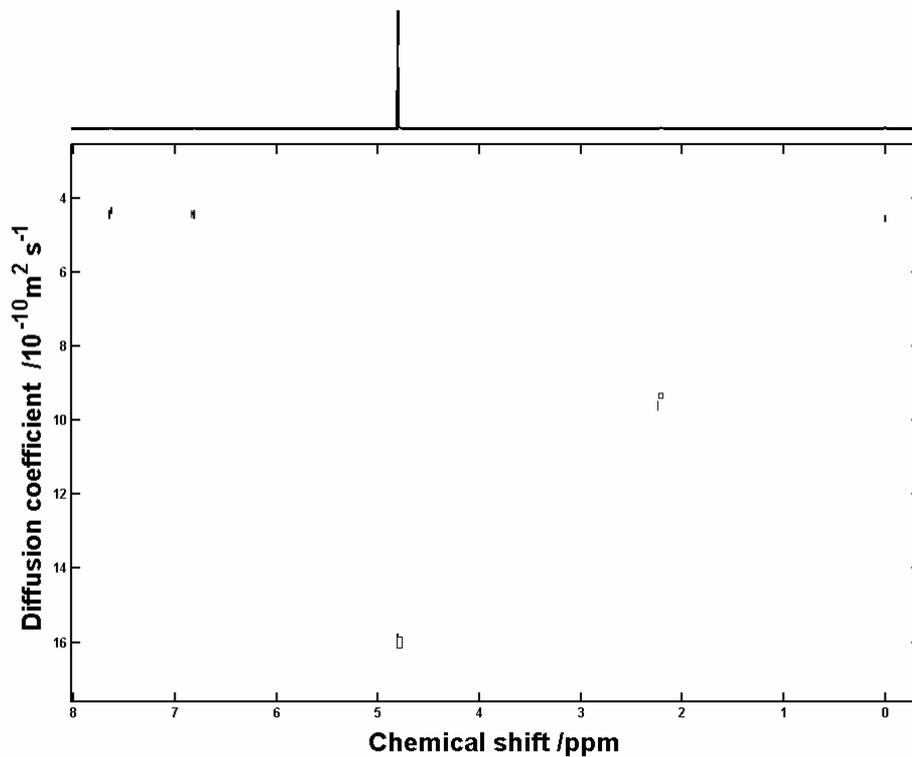


Figura 05 - Espectros de DOSY (1H, 500MHz, BPPSTE, 25 °C) da DAP em solução aquosa (1mM).

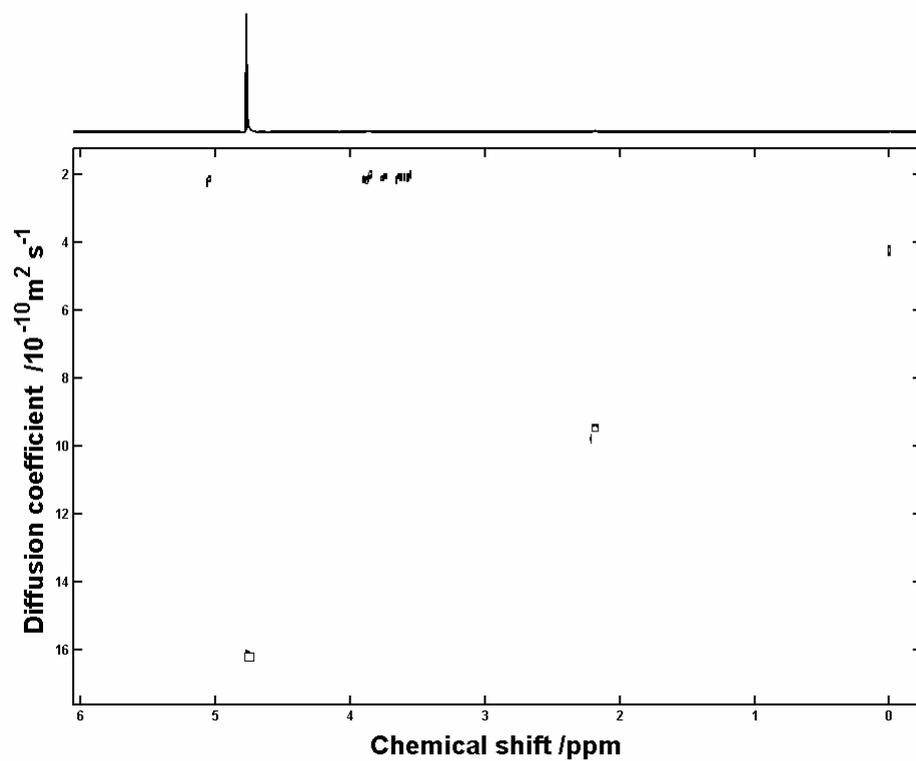


Figura 06 - Espectros de DOSY (1H, 500MHz, 25 °C) da β CD em solução aquosa (1mM).

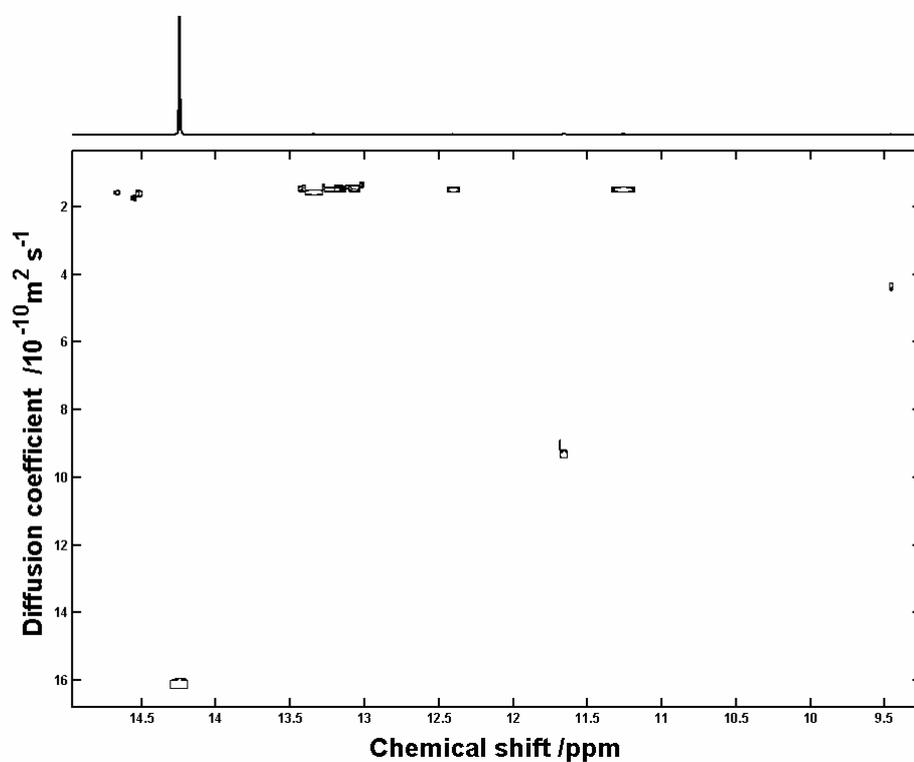


Figura 07 - Espectros de DOSY (1H, 500MHz, 25 °C) da SBE β CD em solução aquosa (1mM).

No espectro do complexo de inclusão são notados três padrões de difusão. O primeiro, com um menor coeficiente de difusão, é referente à CD, devido a sua elevada massa molar e, por conseqüência, um grande raio hidrodinâmico; o segundo referente a DAP e, por fim, um pico de alta difusão referente à água residual, como discutido anteriormente. Para o complexo DAP:CD, o valor obtido para a DAP (Dobservada) é resultante de uma fração que está ligada a CD (Dligada), e outra referente a DAP livre em solução (Dlivre). A fração de DAP (Dligada) que está interagindo com a cavidade da CD causa uma diminuição no coeficiente médio de difusão da DAP, pelo fato de a DAP em complexo comportar-se agora como uma molécula com um raio hidrodinâmico maior do que DAP livre, tendo menor difusão e fazendo com que o valor do seu coeficiente de difusão torne-se mais próximo aos valores do coeficiente de difusão da β CD.

Neste sentido, as Figuras 08 e 09, apresentam os espectros de DOSY da DAP em presença de β CD e SBE β CD, respectivamente, a partir dos quais foi possível medir os valores de coeficientes de difusão das moléculas em solução.

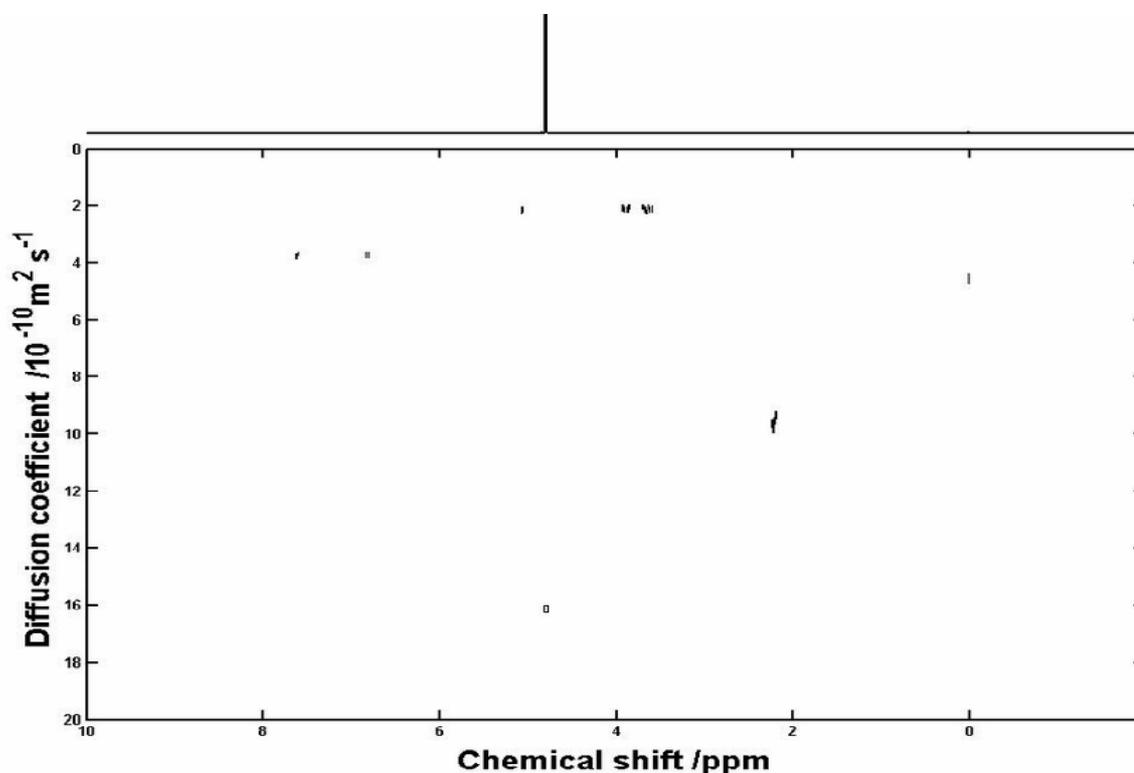


Figura 08- Espectro de DOSY (1H, 500 MHz, 25 °C) do complexo de inclusão DAP: β CD mM em D2O

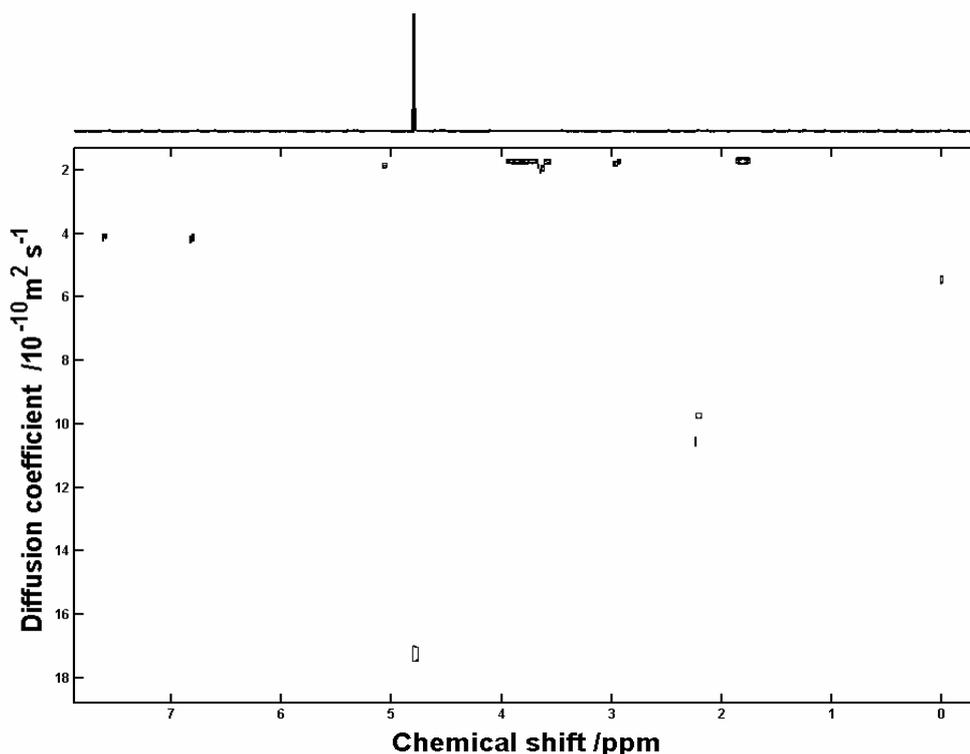


Figura 09- Espectro de DOSY (1H, 500 MHz, 25 °C) do complexo de inclusão DAP:SBEβCD mM em D2O

Para obter a fração do fármaco complexada, bem como a constante de associação (K) entre DAP:βCD e DAP:SBEβCD. Os valores dos coeficientes de difusão obtidos estão apresentados na Tabela 03. Esses resultados foram aplicados às fórmulas de Johnson Jr e colaboradores. (JOHNSON, 1999):

$$(1) D_{\text{OBSERVADA}} = (1 - \gamma_{\text{LIGADA}}) \cdot D_{\text{LIVRE}} + \gamma_{\text{LIGADA}} \cdot D_{\text{LIGADA}}$$

$$(2) \gamma_{\text{LIVRE}} + \gamma_{\text{LIGADA}} = 1$$

$$(3) \gamma_{\text{LIGADA}} = (D_{\text{LIVRE}} - D_{\text{OBSERVADA}}) \cdot (D_{\text{LIVRE}} - D_{\text{LIGADA}})^{-1}$$

Sendo, γ_{LIGADA} = fração de DAP complexada à CD; γ_{LIVRE} = fração de DAP sem complexar; D_{LIVRE} = coeficiente de difusão da DAP em solução; $D_{\text{OBSERVADA}}$ = coeficiente de difusão da DAP em presença de CD; D_{LIGADA} = coeficiente de difusão da DAP 100% ligada à CD.

Por dedução, a constante de equilíbrio foi calculada a partir da equação abaixo

$$(4) K = \frac{\gamma_{LIGADA}}{(1 - \gamma_{LIGADA}) \cdot ([DAP] - \gamma_{LIGADA} \cdot [CD])}$$

Sendo γ_{LIGADA} = fração de DAP complexada, $[DAP]$ = concentração inicial de DAP (M); $[CD]$ = concentração inicial de CD (M).

Tabela 3: Valores de coeficiente de difusão, fração molar ligada e constante de associação aparente determinados para o sistema DAP: β -CD e DAP:SBE β CD, em D2O, 25 °C

Complexo	Composto	D ($10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$)	Fração Ligada (%)	K (M^{-1})
	β CD	2,095		
	SBE β CD	1,636		
	DAP	4,393		
DAP: β CD		3,737	29	2780
DAP:SBE β CD		4,120	10	1219

A partir dos valores obtidos pode-se determinar o coeficiente de difusão da molécula de DAP em solução ($4,393 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$) e sua diminuição na presença de β CD e SBE β CD, as quais apresentam uma menor mobilidade em solução (coeficientes de difusão = 2,095 e $1,636 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, respectivamente). Os valores determinados estão apresentados na Tabela 3, onde observa-se um $K_a = 2780 \text{ M}^{-1}$, para DAP: β CD e de 1219 M^{-1} para o complexo DAP:SBE β CD. Esses valores evidenciam ainda uma forte interação da DAP com estas CDs.

ROESY

O Efeito Nuclear de Overhauser (NOE) é uma medida de grande utilidade para confirmar a formação de complexos de inclusão, pois é capaz de fornecer informações geométricas, da proximidade espacial (não escalar) entre átomos de moléculas distintas, por exemplo, no interior da cavidade da CD (DE PAULA *et al.*, 2009; GUNTHER, 1994). O Hidrogênio H3 da cavidade interna da β CD foi irradiado, a fim de observar quais hidrogênios da DAP estariam em sua vizinhança. No caso

da SBE β CD, foram irradiados o Ha e Hb (não demonstrado) da DAP, sendo visível maior interferência na molécula quando irradiado o Ha. Os espectros obtidos estão apresentados nas Figuras 10 e 11.

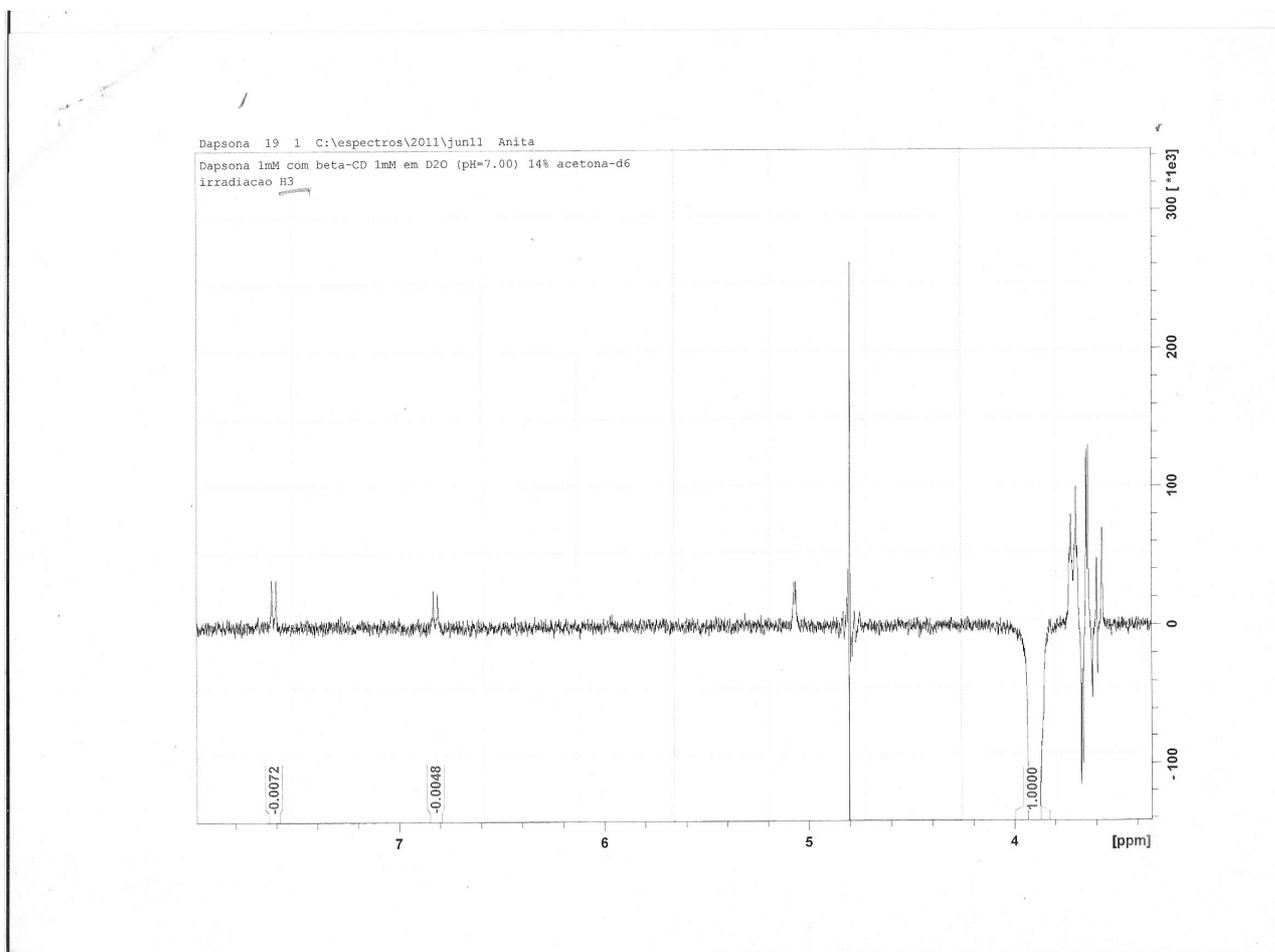


Figura 10: Espectro de ROESY para o complexo DAP: β CD 1:1

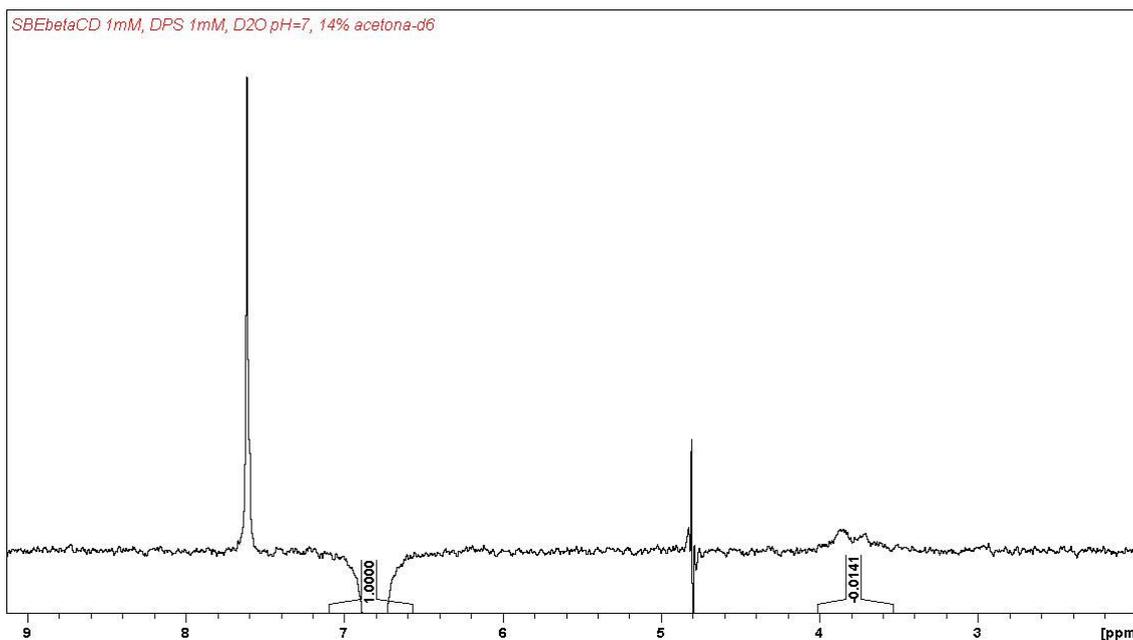


Figura 11: Espectro de ROESY para o complexo DAP:SBE β CD 1:1

A análise das Figuras 10 e 11 revela o pico irradiado com sinal negativo e os picos com sinais positivos, revelando interação por proximidade espacial, com os hidrogênios H3. Na Figura 10, evidencia-se a maior interferência no Ha da dapsona. Na figura 11, o Ha quando irradiado demonstrou maior interferência nos hidrogênios das ciclodextrinas que o Hb (não representado aqui). Essa proximidade espacial evidenciada está em conformidade com os resultados de variação do deslocamento químico. (Tabelas 1 e 2).

Simulação Computacional

Estudos teóricos, através de simulações computacionais baseados em métodos da Química Quântica, têm sido bastante utilizados como uma poderosa ferramenta de predição das energias de ligação e estruturas de equilíbrio para os complexos e inclusão. Em geral, os estudos teóricos têm sido realizados em associação com técnicas experimentais, notadamente com a espectroscopia de RMN (JULLIAN *et al.*, 2007; COSCARELLO *et al.*, 2009)

Um ponto forte a ser observado são as ligações de hidrogênio que se formam no complexo. As interações existentes entre o grupo amino da dapsona com éter da betacicloxextrina são mais fortes que a interação existente entre o grupo SO₂ da dapsona com o grupo éter da dapsona, respectivamente 2,3 angstroms e 4,3 angstroms. De acordo com os parâmetros geométricos obtidos pelo software gaussian 03 observou se que o comprimento médio da cavidade da beta

ciclodextrina é 12,87 angstroms e o comprimento médio da dapsona:6,94 angstroms. Como o comprimento da dapsona mostrou se menor que a cavidade da beta ciclodextrina logo, estericamente torna se possível à inclusão da dapsona no anel.

Observou se também ao comprimento das ligações de hidrogênio em torno de 3,035 angstroms no complexo formado, o que de certa forma influi na forma estrutural que a dapsona se encontra inclusa no processo, quanto á distancia e ângulos da molécula, ângulo observado foi de 10609'. Por fim no estudo do complexo de inclusão foi obtido a energia de interação do complexo aproximadamente 143,Kcal/mol e por este resultado mostrou se favorável a formação do complexo.

Após as realizações de cálculos observou-se que as estruturas de conformação mais estável foram apresentadas nas figuras 1, onde corrobora com a estrutura teórica do artigo citado. Os resultados de frequências vibracionais teóricos estão em boa concordância com os valores teóricos obtidos na literatura, os estiramentos simétricos e assimétricos N-H é observado teoricamente na região de 3340-3500 cm^{-1} .e experimentalmente 2580-3690 cm^{-1} como a maior diferença observada. Os parâmetros geométricos o comprimento da ligação O-S teórico 1.44 Å e experimental 1,47Å, ângulos O-S-O teóricos e experimentais foram respectivamente: 118° e 121°. Como o comprimento da dapsona mostrou se menor que a cavidade da beta ciclodextrina logo, estericamente torna se possível à inclusão da dapsona no anel. Por fim no estudo do complexo de inclusão foi obtido a energia de interação do complexo aproximadamente 143,Kcal/mol o que é uma energia de ligação favorável a formação do complexo. Desta forma, o modelo teórico proposto para o trabalho demonstrou ser adequado para realização do projeto.

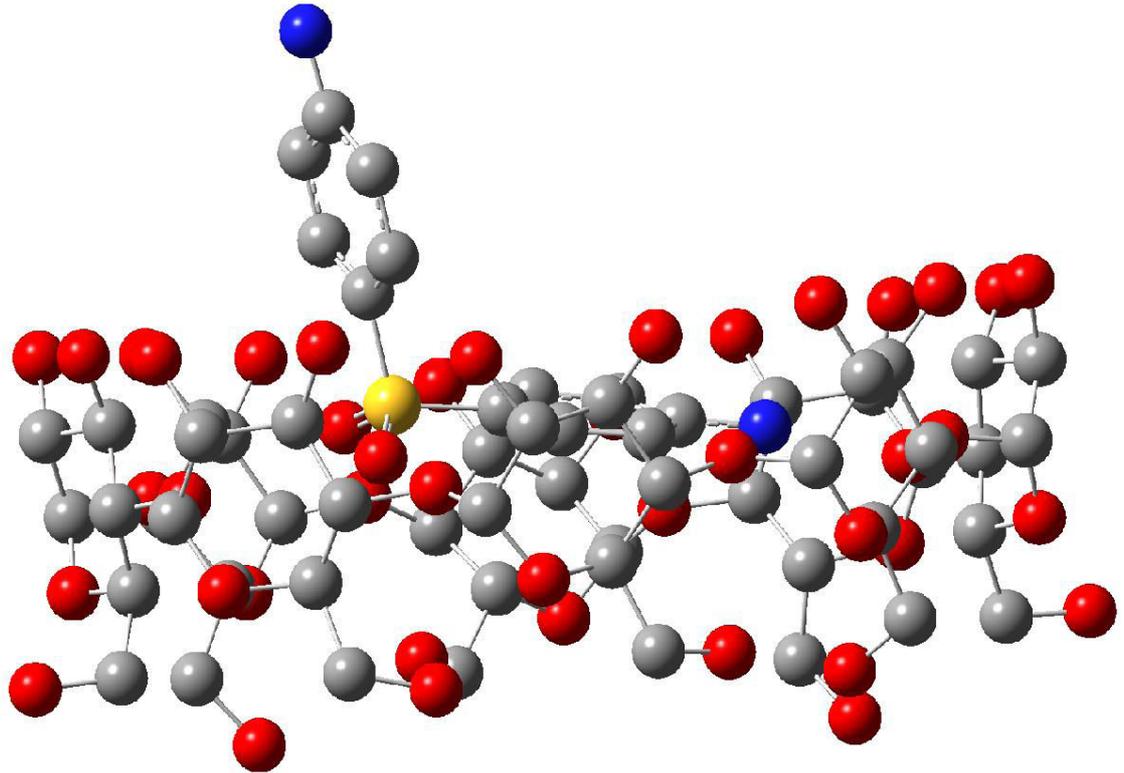


Fig. 12 Estrutura complexo de inclusão DAP:βCD formado, vista lateral.

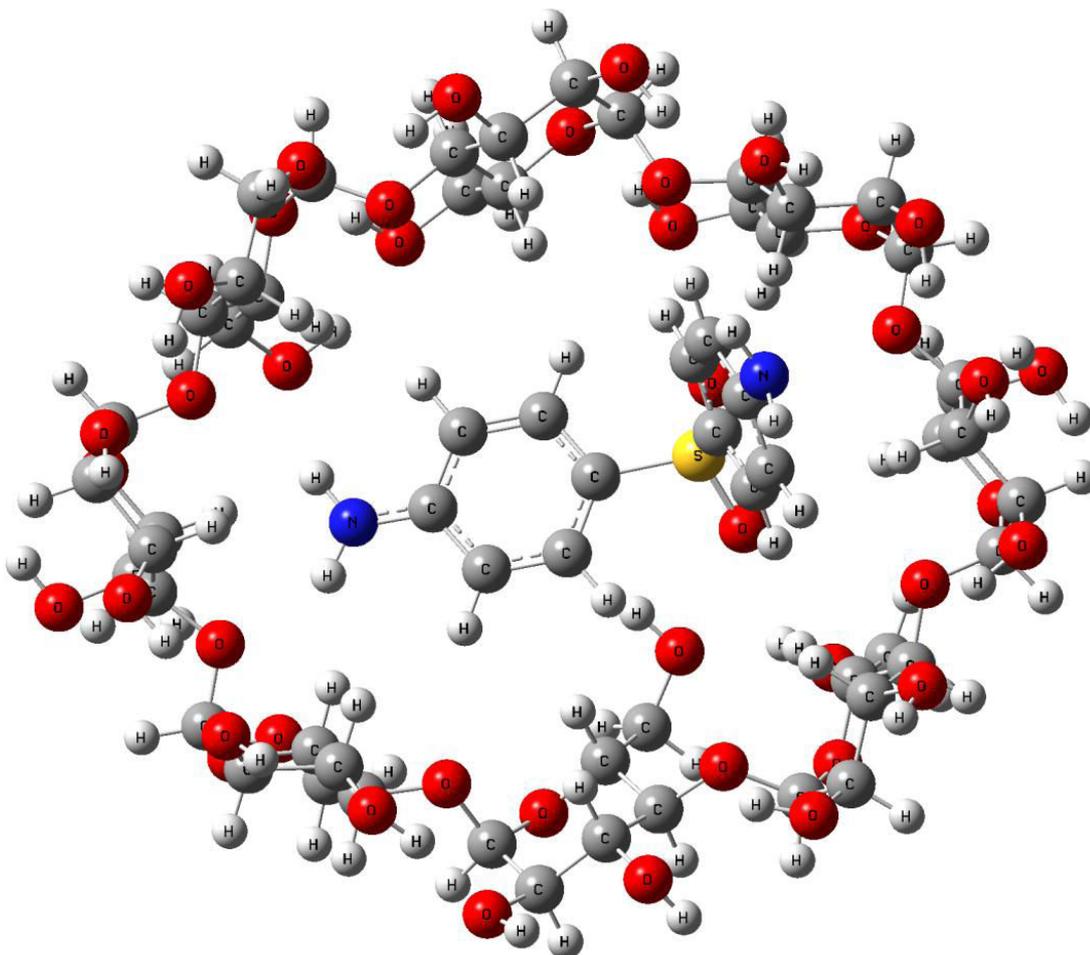


Fig. 13 Estrutura do complexo de inclusão DAP:βCD formado, vista superior.

5.4. CONCLUSÃO

O estudo do deslocamento químico demonstra alterações que indicam a complexação do fármaco tanto com βCD quanto com a SBEβCD.

A estequiometria de ambos os complexos foi determinada pela técnica de Job como 1:1.

Medidas de difusão por RMN de ^1H permitiram a determinação da constante de associação dos complexos de inclusão, sendo os valores obtidos para ambos os complexos indicativos da ocorrência de forte interação entre a DAP e as

ciclodextrinas, suficiente para promover alterações das propriedades físico-químicas da DAP.

Os dados de RMN (ROESY) revelaram interações intermoleculares entre a DAP (principalmente entre os hidrogênios Ha) e a cavidade hidrofóbica das ciclodextrinas, evidenciando a formação dos complexos de inclusão DAP: β CD e DAP:SBE β CD.

Esses resultados permitem propor que os complexos DAP: β CD e DAP:SBE β CD possam ser utilizados como futuras formas farmacêuticas, sugestivamente oral líquida.

5.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BETZE, C., SAENGER, W., HINGERTY, B. E., BROWN, G. M. **Journal of American Chemical Society**, 106, 25. 1984.

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

COSCARELLO, E. N.; BARBIRIC, D. A.; CASTRO, E. A.; VICO, R. V.; BUJÁN, E. I.; ROSSI, R. H. **Comparative analysis of complexation of pesticides (fenitrothion, methylparathion, parathion) and their carboxylic Ester analogues by β -cyclodextrin. Theoretical semiempirical calculation. Journal of Structural Chemistry**, v.50, p. 671-679, 2009.

DE PAULA, E.; SCHREIER, S. **Use of a novel method for determination of partition coefficient to compare the effect of local anesthetics on membrane structure. Biophys. Acta**. 1240: 25-33. 1995

SOUZA, A. A. de, & LAVERDE Jr., A. **Aplicação da espectroscopia de ressonância magnética nuclear para estudos de difusão molecular em líquidos: a técnica DOSY. Química Nova**, 25(6a), 1022-1026. 2002.

FIELDING, L. **Determination of association constant (Ka) from solution NMR data. Tetrahedron**. 56:6151-6170. 2000

GUNTHER, H. **NMR spectroscopy basic principles, concepts, and applications in chemistry. John Wiley & Sons**. New York. 1994

JOB, P. **Formation and stability of inorganic complexes in solution. Ann Chim**. 1925, 9:113-125.

JOHNSON-Jr, C.S. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 1999, 34, 203.

JULLIAN, C.; MIRANDA, S.; ZAPATA-TORRES, G.; MENDIZÁBAL, F.; OLEA-AZAR, C. **Studies of inclusion complexes of natural and modified cyclodextrin with (+)catechin by NMR and molecular modeling. Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 3217-3224, 2007.

KAUKONEN, A.M. *et al.* **Water-soluble beta-cyclodextrins in paediatric oral solutions of spironolactone: preclinical evaluation of spironolactone bioavailability from solutions of beta-cyclodextrin derivatives in rats.** *J Pharm Pharmacol* 1998;50(6):611-619

LEFEUVRE, C. *et al.* **Biopharmaceutics and pharmacokinetics of 5-phenyl-1,2-dithiole-3-thione complexed with sulfobutyl ether-7-beta-cyclodextrin in rabbits.** *J Pharm Sci* 1999;88(10):1016-1020

MADI, F.; KHATMI, D.; DHAOUI, N.; BOUZITOUNA, A.; ABDAOUI, M.; BOUCEKKINE, A. **Molecular model of CENS piperidine β -CD inclusion complex: DFT study.** *Comptes Rendus Chimie*, v. 12, p. 1305-1312, 2009.

MARTINDALE. **The Complete Drug Reference.** Grayslake: Pharmaceutical Press. 2007

PINTO, LMA; FRACETO, L.F., SANTANA, M.H.A.; PERTINHEZ, T.A.; OYAMA-JR, S.; DE PAULA, E. **Physico-chemical characterization of benzocaine- β -cyclodextrin inclusion complexes.** *J Pharm. Biomed. Anal.* V.39, p. 956-963, 2005.

ROWE, R. C., SHESKEY, P. J., QUINN, M. E. **Handbook of Pharmaceutical Excipients.** Sixth Edition, 2009.

SZEJTLI, J. **Medicinal application of cyclodextrins.** *Med. Res. Rev.* 1994. 353-386.

6.0 Conclusão

Como principais conclusões deste trabalho, destacam-se:

O método de co-precipitação foi eficiente para a preparação do complexo de inclusão dapsona: β CD e dapsona:SBE β CD.

Através dos estudos em solução, pelo método da solubilidade de fases, pôde-se observar um aumento significativo da solubilidade da DAP na presença das ciclodextrinas estudadas.

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

O estudo do complexo em fase sólida permitiu concluir que houve a inclusão da DAP nas ciclodextrinas. Pelas técnicas de análise térmica, observou-se um aumento da estabilidade térmica do fármaco quando complexado; através do IV, verificou-se o desaparecimento de bandas características do fármaco; pela análise da DRX percebeu-se uma amorfização da DAP. Essas observações evidenciam a formação do complexo.

O espectro de RMN foi conclusivo para a verificação da formação do complexo, sugerindo o encapsulamento do fármaco, com interferência maior no ambiente do Ha da DAP. A inserção foi vista de maneira mais clara pelas técnicas de química computacional.

7.0 Perspectivas

- Realização da caracterização físico-química da formulação líquida de dapsona com ciclodextrinas;
- Estudo de estabilidade das formas farmacêuticas a serem obtidas;

Referências

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Portaria Conjunta nº 125, de 26 de março de 2009. Define ações de controle da hanseníase. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs/2009/poc0125_26_03_2009.html>. Acesso em 17/05/2010.

BRASIL. PORTAL DA SAÚDE. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Hanseníase**, 2010. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/area.cfm?id_area=1466>. Acesso em 17/05/2010.

BRASIL. PORTAL DA SAÚDE. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Guia de controle Hanseníase**, Brasília-DF, 2002. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_de_hanseniose.pdf>. Acesso em 17/05/2010.

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

CALDERINI, A.; PESSINE, F. B. T. Synthesis and characterization of inclusion complex of the vasodilator drug minoxidil with β -cyclodextrine. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 60, p. 369-377, 2008.

CAO, X., *et al.* Why is it challenging to predict intestinal drug absorption and oral bioavailability in human using rat model. **Pharmaceutical Research**, v.23, n.8, Aug, p.1675-86. 2006.

COSCARELLO, E. N.; BARBIRIC, D. A.; CASTRO, E. A.; VICO, R. V.; BUJÁN, E. I.; ROSSI, R. H. Comparative analysis of complexation of pesticides (fenitrothion, methylparathion, parathion) and their carboxylic Ester analogues by β -cyclodextrin. Theoretical semiempirical calculation. **Journal of Structural Chemistry**, v.50, p. 671-679, 2009.

DEPS, P.D.; NASSER, S.; GUERRA, P.; SIMON, M.; BIRSHNER, R.C.; RODRIGUES, L.C. Adverse effects from multi-drug therapy in leprosy: a Brazilian study. **Leprosy Review**, v.78, p. 216-222, 2007.

GRILLO, R.; MELO, N. F. S.; MORAES, C. M.; ROSA, A. H.; ROVEDA, J. A. F.; MENEZES, C. M. S.; FERREIRA, E. I.; FRACETO, L. F. Hydroxymethylnitrofurazone: dimethyl- β -cyclodextrin inclusion complex: a physical-chemistry characterization. **Journal of Biological physics**, v. 33, p. 445-453, 2007.

HOLT, J. S. Structural characterization of the Brooker's merocyanine/ β -cyclodextrin complex using NMR spectroscopy and molecular modeling. **Journal of Molecular Structure**, v. 965, p. 31-38, 2010.

JULLIAN; C.; MIRANDA, S.; ZAPATA-TORRES, G.; MENDIZÁBAL, F.; OLEA-AZAR, C. Studies of inclusion complexes of natural and modified cyclodextrin with (+)catechin by NMR and molecular modeling. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 3217–3224, 2007.

LINDENBERG, M., KOPP, S. e DRESSMAN, J. B. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.58, n.2, Sep, p.265-78. 2004

.MADI, F.; KHATMI, D.; DHAOUI, N.; BOUZITOUNA, A.; ABDAOUI, M.; BOUCEKKINE, A. Molecular model of CENS piperidine β -CD inclusion complex: DFT study. **Comptes Rendus Chimie**, v. 12, p. 1305-1312, 2009.

MARTINDALE. **The complete drug reference**, 35. ed., Pharmaceutical Press, 2007. 3335 p.

PANICKER, L. Influence of leprosy drug, dapson on the model membrane dipalmitoyl phosphatidylethanolamine. **Thermochimica Acta**, v. 447, p. 123-130, 2006.

PESCITELLI, G.; BILIA, A. R.; BERGONZI, M; C.; VINCIERI, F. F.; DI BARI, L. Cyclodextrins as carriers for kavalactones in aqueous media: spectroscopic characterization of (S)-7,8-dihydrokavain and β -cyclodextrine inclusion complex. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 52, p. 479-483, 2010.

RAJABI, O.; TAYYARI, F.; SALARI, R.; TAYYARI, S. F. Study of interaction of spironolactone with hydroxypropyl- β -cyclodextrin in aqueous solution and in solid state. **Journal of Molecular Structure**, v. 878, p. 78-83, 2007.

RASHEED, A.; KUMAR, A.; SRAVANTHI, V. V. N. S. S. Cyclodextrins as drug carrier molecule: a review. **Scientia Pharmaceutica**, v. 76, p. 567-598, 2008.

SCIOR, T.; RADDATZ, G.; FIGUEROA, R.; ROTH H.J.; BISSWANGER, H. A. Molecular modeling study on dapsone and sulfonamides comparing structures and properties with respect to anti-leprosy activity. **Journal of Molecular Modeling**, v.3, p.332-337, 1997.

SOUSA F. B.; DENADAI, A. M. L.; LULA, I. S.; LOPES, J. F.; SANTOS, H. F.; ALMEIDA, W. B.; SINISTERRA, R. D.. Supramolecular complex of fluoxetine with β -cyclodextrin: An experimental and theoretical study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 353, p. 160-169, 2008.

TSAI, Y.; TSAI, H.; WU, C.; TSAI, F. Preparation, characterization and activity of the inclusion complex of paenol with β -cyclodextrine. **Food Chemistry**, v. 120, p. 837-841, 2010.

Apêndices

APÊNDICE A – Apresentação de resumo no 8^o International Congress of Pharmaceutical Sciences - 2011

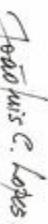


We certify that the abstract entitled "INFLUENCE OF NATURAL CYCLODEXTRINS FOR IMPROVING THE AQUEOUS SOLUBILITY OF DAPSONE." by authors: "ARRAS, M.A.S., MEBELLES, L.M.A., SOARES, M.F.L.R., ALVES, L.D.S., VIEIRA, A.C.C., SOUZA, A.A., ROLIM-NETO, P.J., SOARES-SOBINHO, J.L." was presented in the poster session of the 8th International Congress of Pharmaceutical Sciences – CIFARP 2011, held on August 21-24, 2011 in the Convention Center of Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, Sp, Brazil.

Ribeirão Preto, Brazil, August 24th, 2011


 Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque
 Dean of FCFRP-USP




 Prof. Dr. João Luis Callegari Lopes
 Organizing Committee