



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS UNIVERSITÁRIO MINISTRO PETRÔNIO PORTELA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Rian Felipe de Melo Araújo

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO DA
RIPARINA D EM HIDROXIPROPIL- β -CICLODEXTRINA.**

Teresina – Piauí

2016

Rian Felipe de Melo Araújo

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO DA
RIPARINA D EM HIDROXIPROPIL- β -CICLODEXTRINA.**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes.

Teresina - Piauí

2016

Universidade Federal do Piauí
Serviço de Processamento Técnico
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde

Araújo, Rian Felipe de Melo.

A658p Preparação e caracterização do complexo de inclusão da riparina D em hidroxipropil- β -ciclodextrina / Rian Felipe de Melo Araújo. -- Teresina, 2016.
138 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2016.

Orientador: Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes.

Bibliografia

1. Riparina. 2. Complexo de inclusão. 3. Hidroxipropil- β -ciclodextrina. I. Título. II. Teresina – Universidade Federal do Piauí.

CDD 615.1

Rian Felipe de Melo Araújo

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO DA
RIPARINA D EM HIDROXIPROPIL- β -CICLODEXTRINA.**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes.

Aprovado em ____ / ____ / ____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes (Orientador)
Curso de Farmácia - UFPI

Prof^a. Dr^a. Hercília Maria Lins Rolim
Curso de Farmácia - UFPI

Prof^a. Dr^a. Hilris Rocha e Silva
Curso de Farmácia - UFPI

Prof. Dr. Danilo César Galindo Bedor
Departamento de Farmácia - UFPE

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. José de Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITOR

Prof.^aDr.^a Nadir do Nascimento Nogueira

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Helder Nunes da Cunha

DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof.^a Dr.^a Regina Ferraz Mendes

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Prof.^a Dr.^a Marcília Pinheiro Costa

“...Tudo posso naquele que me fortalece.”

Filipenses 4:13

Dedico este trabalho à minha mãe, Dinair, pelo carinho, amor e empenho em minha educação; ao meu irmão, Mateus, pela amizade e respeito; ao meu amor, Liviane, pela paciência e por ser meu referencial, como pessoa e profissional.

AGRADECIMENTOS

- À Deus, meu grande protetor, por me dar a vida com saúde, amor e tantos momentos de felicidade;
- Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes, pelos ensinamentos, confiança, apoio, responsabilidade, dedicação e constante incentivo dispensado na realização deste trabalho.
- Ao Prof. Dr. Stanley Juan Chaves Gutierrez, pela ajuda com a síntese do fármaco e, principalmente, pelo incentivo.
- Ao Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados (LIMAV) – UFPI na pessoa do prof. Dr. Edson Cavalcante e ao Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos (LTM) – UFPE, representado pelo prof. Dr. Pedro Rolim, pelos testes de caracterizações realizados;
- Ao Laboratório de Geoquímica Orgânica (LAGO) – UFPI na pessoa do Dr. José de Sousa Lima Neto, pelos treinamento no HPLC e pela ajuda prestada com reagentes.
- Ao Dr. Davyson Moreira pela disponibilidade em colaborar com este estudo.
- Ao prof. Dr. Alexandre Sousa e aos estagiários (Moisés e Stephany) do Laboratório de RMN da UFPI, pela intensa contribuição com a caracterização pelo RMN.
- A todos os integrantes do Laboratório de Pesquisa de Cosméticos e Medicamentos (LAPCOM) e do Grupo de Estudo de Medicamentos (GEUM) pelo companheirismo.
- À coordenação de Farmácia da UFPI, em especial à prof^a Waleska Albuquerque, pela compreensão e apoio.
- A todos os meus colegas de turma da graduação e pós-graduação, pelos momentos descontraídos e de tensão que juntos compartilhamos.
- Aos meus alunos por me incentivarem na carreira de docente.
- À Capes pelo financiamento deste projeto

ARAÚJO, Rian Felipe de Melo. **Preparação e Caracterização do Complexo de Inclusão da Riparina D em Hidroxipropil- β -Ciclodextrina**, 2016, Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, Teresina.

RESUMO

Aniba riparia (Nees) Mez, planta tradicionalmente conhecida como “louro”, destaca-se pelo potencial ansiolítico atribuídos aos alcaloides isolados da espécie. Entre estes, a riparina III serviu como modelo estrutural para a síntese de novos derivados. A riparina D (ripD), um destes derivados, foi escolhida para este estudo por apresentar resultados positivos em testes antioxidantes, fazendo dela um candidato a medicamento. No entanto, a nova entidade química apresenta baixa solubilidade em água, que representa um entrave biofarmacêutico, comprometendo sua eficácia farmacológica. A fim de reverter tal problema, este estudo vem propor uma alternativa tecnológica – a complexação da riparina D com hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD), uma ciclodextrina de baixo custo e alta solubilidade em água. Iniciou-se a pesquisa, realizando uma revisão bibliográfica com o objetivo de identificar o tipo de ciclodextrina que mais se adequava ao propósito pretendido. Em seguida, desenvolveu-se e validou-se uma metodologia analítica para quantificação da riparina D por espectrofotômetro, visto que não há na literatura nenhum registro de metodologias de quantificação, sendo esta de fundamental importância nos estudos posteriores de pré-formulação. Neste sentido, promoveu-se a caracterização da ripD por análise termogravimétrica, análise térmica diferencial, difração de raios-X, espectroscopia no infravermelho e ressonância magnética nuclear (RMN). Antes de realizar os complexos de inclusão, fez-se o diagrama de solubilidade do fármaco em HP β CD, onde se observou um gráfico do tipo A_{LE} estequiometria ideal de 1:1. Os complexos foram preparados pelo método de malaxagem e *spray-drying*, que juntamente com a mistura física foram caracterizados pelas mesmas técnicas utilizadas anteriormente. A melhoria da solubilidade foi confirmada através dos estudos de dissolução. As interações supramoleculares envolvidas no processo de complexação foram estudadas através de diferentes metodologias de RMN de ¹H, tais como Job's *plot*, ROESY 2D, medidas de tempo de relaxação longitudinal (T₁) e DOSY. Observou-se que a fração ligada do fármaco à ciclodextrina foi de 52,83%, com uma constante de associação aparente estimada em 2374 M⁻¹, evidenciando uma forte interação. Concluiu-se que a riparina D é um promissor candidato a medicamento e que é viável seu desenvolvimento farmacotécnico através da complexação com HP β CD.

Palavras-chave: *Aniba riparia*; Riparina; Complexo de inclusão; Ciclodextrina; Hidroxipropil- β -ciclodextrina; Validação.

ARAÚJO, R.F.M. **Preparation and Characterization of Riparin D Inclusion Complex in hydroxypropyl- β -cyclodextrin**, 2016, Dissertation (Master Degree in Pharmaceutical Sciences) – Post-graduation Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Piauí, Teresina.

ABSTRACT

Aniba riparia (Nees) Mez, plant traditionally known as "louro", stands out for its anxiolytic potential attributed to the isolated alkaloids species. Among these, riparin III served as a structural template for the synthesis of new derivatives. The riparin D (ripD), one of the synthetic derivatives of riparin III, was chosen for this study to present positive results in antioxidants tests already published, making it a candidate for medication. However, the new chemical entity has low solubility in water which is an obstacle biopharmaceutical, pharmacological compromising its effectiveness. In order to reverse this problem, this study proposes an alternative technology - complexation of riparin D with hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP β CD) a cyclodextrin low cost and high water solubility. The search began, carrying out a review of the literature in order to identify the type of cyclodextrin that is most suited to the intended purpose. Then, a new analytical method developed and validated to quantify riparin-D by spectrophotometer, as there is in the literature any quantification methodologies record, which is of fundamental importance in later studies of pre-formulation. Accordingly, it promoted the characterization of ripD by thermogravimetric analysis, differential thermal analysis, X-ray diffraction, infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance (NMR). Before performing the inclusion complexes made up of the drug solubility in HP β CD diagram where we observed a graph of type A_L and optimal stoichiometry of 1:1. The complexes were prepared by the kneading method and spray-drying, which together with the physical admixture were characterized by the same techniques used previously. Improved solubility was confirmed by the dissolution studies. The supramolecular interactions involved in the complexation process were studied by different methodologies ¹H NMR, such as Job's plot, 2D ROESY longitudinal relaxation time measurements (T₁) and DOSY. There was the bound fraction of the drug to cyclodextrin was 52.83%, with an estimated apparent association constant of 2374 M⁻¹, indicating a strong interaction. It was concluded that the riparin D is a promising candidate as a medicine and pharmaceuticals is feasible their development by complexation with HP β CD.

Keywords: *Aniba riparia*; riparian D; Inclusion complex; Hydroxypropyl- β -cyclodextrin; Validation.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1: Estrutura molecular da riparina D18

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Figura 1: Estrutura química da riparina III32

Figura 2: Estrutura tronco-cônica característica das ciclodextrinas36

Figura 3: Diagrama de solubilidade das fases.....38

CAPÍTULO 1

Figura 1: Estrutura química tridimensional da α -CD, β -CD e γ -CD.....46

Figura 2: Representação esquemática da formação do complexo de inclusão na taxa de 1:1 entre a CD e a molécula hospedeira.....47

Figura 3: Representação esquemática da reação de esterificação entre a celulose e CDs via BTCA.....57

CAPÍTULO 2

Figura 1: Estrutura química da riparina D e varredura em espectrofotômetro UV-Vis.....75

Figura 2: Varredura espectrofotométrica para avaliação da especificidade do método de quantificação da riparina D.....78

CAPÍTULO 3

Figura 1: Estrutura química da hidroxipropil- β -ciclodextrina.....85

Figura 2: Reação de síntese da riparina D.....86

Figura 3: Cromatograma da solução de riparina D diluída em metanol na concentração de 20 μ g/mL.....91

Figura 4: Cromatograma da solução de riparina D diluída em metanol na concentração de 20 μ g/mL. Eluição em gradiente. ACN:H₂O_{ac} (40:60) até 60 min., seguido de ACN (100%) até 85 min.....91

Figura 5: Espectro de RMN ¹H da riparina D em clorofórmio deuterado, 200 MHz.....92

Figura 6: Expansão do espectro de RMN ¹H da riparina D em CDCl₃ (200 MHz).....93

Figura 7: Espectro de RMN ¹³C da riparina D em CDCl₃, 100 MHz.....94

Figura 8: Expansão do espectro de RMN ¹H da riparina D em CDCl₃ deuterado (200 MHz).....94

Figura 9: Espectro na região de infravermelho da riparina D.....95

Figura 10: Curva de DSC da riparina d obtida na razão 3 °C/min96

Figura 11: Curva de TG/DTA da riparina D obtida na razão de 10 °C/min.....	97
Figura 12: Diagrama de solubilidade da riparina D na presença de concentrações crescentes de HP-β-CD.....	98
Figura 13: Curva de DTA da riparina D e dos complexos obtidos por diferentes métodos, na razão de 10 °C/min.....	99
Figura 14: Curvas de TG da riparina D e dos complexos obtidos por diferentes métodos na razão de 10 °C/min.....	99
Figura 15: Difratoograma de raios X da riparina D, HPβCD e dos complexos de inclusão obtidos por mistura física, malaxagem e <i>spray-dry</i>	101
Figura 16: Espectro de infravermelho da riparina D, HPβCD, mistura física e complexos de inclusão obtidos por malaxagem e <i>spray-drying</i>	102
Figura 17: Perfil de liberação da riparina D, mistura física e complexos de inclusão obtidos por malaxagem e <i>spray-drying</i>	103

CAPÍTULO 4

Figura 1: Estrutura química (A) e representação esquemática (B) da 2-HP-β-CD.....	112
Figura 2: Espectro de RMN ¹ H (400 MHz) da riparina D em metanol-d ₄ e tampão fosfato com D ₂ O, pH = 7.....	117
Figura 3: Espectro de RMN ¹ H (400 MHz) da HPβCD em tampão fosfato com D ₂ O, pH = 7.....	118
Figura 4: Variação de deslocamento químico do H6 e H7' da riparina D em diferentes concentrações do fármaco e da HPβCD.....	119
Figura 5: Figura esquemática da representação molecular do fenômeno de complexação entre molécula de riparina D e HPβCD.....	121
Figura 6: ROESY 2D da amostra de riparina D e HPβCD, trava de spin de 500 (D ₂ O, tampão fosfato pH=7 e 400 MHz para ¹ H).....	121
Figura 7: Variação dos valores de T1 (em segundos) para os hidrogênios da riparina D e ripD:HPβCD (1:1), 25°C, pH = 7.....	123
Figura 8: Representação em 2D do experimento DOSY para riparina D, 25°C, 400 MHz em D ₂ O com tampão fosfato pH = 7,0.....	125
Figura 9: Representação em 2D do experimento DOSY para o complexo ripD/HPβCD, 29°C, 400 MHz em D ₂ O com tampão fosfato pH = 7,0.....	125

LISTA DE TABELAS

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Tabela 1: Sistema de Classificação Biofarmacêutica.....	33
---------------------------------------------------------	----

CAPÍTULO 1

Tabela 1: Propriedades estruturais e físico-químicas de ciclodextrinas de interesse farmacêutico.....	52
-------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Tabela 2: Polímeros usados como componentes ternários em sistemas CD/fármacos.....	54
------------------------------------------------------------------------------------	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1: Sistemas de solventes na preparação da solução padrão, onde a primeira diluição está na concentração de 200 µg/mL e a segunda na concentração de 20 µg/mL.....	71
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Tabela 2: Estabilidade da solução de riparina D em 48 horas após a preparação, através de análise espectrofotométrica.....	74
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Tabela 3: Avaliação da influência da luminosidade no desenvolvimento do método analítico para quantificação de riparina D por espectrofotômetro UV-Vis.....	75
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Tabela 4: Avaliação do tempo de sonicação no desenvolvimento do método analítico para quantificação de riparina D por espectrofotômetro UV-Vis.	76
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

CAPÍTULO 4:

Tabela 1: Concentrações de riparina D e HPβCD em amostras utilizadas para realização do experimento de Job's plot.....	115
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Tabela 2: Deslocamento químico(δ) em RMN (400 MHz) da riparina D isolada e da mistura ripD:HPβCD.....	119
-------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Tabela 3: Valores de tempo de relaxação longitudinal (T1) medidos para riparina D (T _{1rip}) e complexo de inclusão (T _{1compl}) (D ₂ O, tampão fosfato pH=7). Valores em segundos.....	122
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Tabela 4: Valores do coeficiente de difusão, fração molar ligada e constante de associação aparente para as amostras: riparina D; HPβCD e complexo 1:1 de riparinaD:HPβCD, em D ₂ O com tampão fosfato pH = 7,0, 25°C.....	126
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

β CD	β -Ciclodextrina
β CD-EPI	β -Ciclodextrina-Epicloridrina de Ligação Cruzada
Abs	Absorbância
ACN	Acetonitrila
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATR	Reflectância Total Atenuada
BTCA	1,2,3,4-butano-tetracarboxílico
CD	Ciclodextrina
CHCl ₃	Clorofórmio
CDCl ₃	Clorofórmio Deuterado
CGTase	Ciclodextrina-glicosiltransferase
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
D ₂ O	Água deuterada
DOSY	<i>Diffusion-Ordered Spectroscopy</i>
DSC	Calorimetria Diferencial Exploratória
DRX	Difração de Raios-X
DTA	Análise Térmica Diferencial
DTG	Derivada Termogravimétrica
EPH	Epicloridrina
EROs	Espécies Reativas Derivadas do Oxigênio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HP β CD	Hidroxipropil- β -Ciclodextrina
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada

IV-TF	Infravermelho com Transformada de Fourier
LAPCOM	Laboratório de Pesquisa em Cosméticos e Medicamentos
LAPNEX	Laboratório de Pesquisa Neurociência Experimental
LAUREMN	Laboratório de RMN da UFPI
LIMAV	Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados
M β CD	Metil- β Ciclodextrina
MA	Malaxagem
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MeSH	<i>Medical Subject Headings</i>
MF	Mistura Física
NOE	<i>Nuclear Overhauser Effect</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
P&D	Pesquisa e Desenvolvimento
PICO	Paciente, Intervenção, Comparação e Outcomes
RIPD	Riparina D
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio 1
ROESY 2D	<i>Rotating-frame Overhauser Spectroscopy bidimensional</i>
SBC	Sistema de Classificação Biofarmacêutica
SBE- β CD	Sulfobutil- β -Ciclodextrina
SNC	Sistema Nervoso Central
T ₁	Tempo de relaxação longitudinal
TG	Termogravimetria
TGI	Trato Gastrointestinal
TPSA	<i>Topological Polar Surface Area</i>
UFPB	Universidade Federal da Paraíba

UFPI Universidade Federal do Piauí

UV-Vis Ultravioleta-Visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS.....	20
2.1 Objetivo Geral.....	21
2.2 Objetivos Específicos	21
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	22
3.1 O uso terapêutico de plantas medicinais e seus derivados.....	23
3.2 Síntese química e indústria farmacêutica.....	24
3.3 Estudos de pré-formulação.....	25
3.3.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (IV-TF)	26
3.3.2 Espectrofotometria no Ultravioleta/Visível (UV-Vis).....	27
3.3.3 Difração de Raios X (DRX).....	27
3.3.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	28
3.3.5 Análise Térmica.....	29
3.3.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	30
3.4 <i>Aniba riparia</i> e as riparinas	31
3.5 Estudos de avaliação da solubilidade.....	33
3.5.1 Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS).....	33
3.5.2 Testes de Dissolução.....	34
3.5.3 Ciclodextrinas como estratégia para aumentar a solubilidade de fármacos ...	35
3.6 Validação de métodos analíticos	38
3.6.1 Precisão	39
3.6.2 Linearidade.....	39
3.6.3 Limites de Detecção e Quantificação	40
3.6.4 Robustez.....	40
3.6.5 Exatidão	41
CAPÍTULO 1	42
β -CICLODEXTRINAS MODIFICADAS SOLÚVEIS EM ÁGUA: UMA REVISÃO	42
RESUMO:.....	43
INTRODUÇÃO:	45
MATERIAIS E MÉTODOS:	48
RESULTADOS E DISCUSSÃO:	48

CONCLUSÃO:	58
REFERÊNCIAS:	59
CAPÍTULO 2	65
DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DA RIPARINA D POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS	65
RESUMO	66
INTRODUÇÃO	68
MATERIAIS E MÉTODOS	70
RESULTADOS E DISCUSSÃO:	74
CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
CAPÍTULO 3	81
ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO DA RIPARINA D: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO FÁRMACO ISOLADO E DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO COM HP β CD NO ESTADO SÓLIDO	81
RESUMO	82
INTRODUÇÃO:	84
MATERIAIS E MÉTODOS	85
RESULTADOS E DISCUSSÃO:	90
CONCLUSÃO	103
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
CAPÍTULO 4	108
CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL POR RMN DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO DA RIPARINA D COM HIDROXIPROPIL- β -CICLODEXTRINA	108
RESUMO:	109
INTRODUÇÃO:	111
MATERIAIS E MÉTODOS	114
RESULTADOS E DISCUSSÃO:	117
CONCLUSÃO:	127
REFERÊNCIAS:	128
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	130

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O ser humano tem buscado elementos curativos na natureza desde o início da civilização. Durante a Idade Média e o Renascimento, as ervas e especiarias eram os principais compostos utilizados para o tratamento de doenças, assim como as substâncias aromáticas. Com o passar do tempo e a descoberta dos novos continentes, outros complexos vegetais passaram a ser utilizados como medicamentos(GADELHA, 2006).

A partir do século XIX, o estudo da química, mais precisamente da síntese dos compostos orgânicos, provocou uma revolução nas ciências farmacêuticas. O isolamento de compostos como a morfina a partir ópio, a quinina a partir da casca da quineira, e a cocaína a partir da coca acarretaram o melhor entendimento dos efeitos farmacológicos dos agentes terapêuticos(GADELHA, 2006).

Atualmente, há um interesse mundial crescente por produtos derivados da biodiversidade. O Brasil, privilegiado detentor de grande diversidade biológica, conta com inúmeras espécies vegetais com potencial terapêutico. A eficácia e legitimidade da utilização de plantas para o tratamento de doenças é conhecida desde a antiguidade e possui raízes profundas na consciência popular(GADELHA et al., 2003).

As riparinas (I, II e III) foram isoladas da *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae). Tais compostos são alcaloides, do tipo alcalidas, que apresentaram efeitos ansiolíticos e anticonvulsivantes com menos efeitos adversos do que os medicamentos comercialmente utilizados. A família Lauraceae apresenta mais de 2.500 espécies que fornecem mais de 300 alcaloides diferentes para fins medicinais e industriais (CUSTODIO;DA VEIGA JUNIOR, 2014).

A exploração crescente das espécies da família Lauraceae, devido ao uso em produtos naturais bioativos, está provocando a extinção de algumas espécies. Para contornar esta situação, as indústrias farmacêuticas estão optando pela síntese química, permitindo que se estabeleça o farmacóforo e a modulação do perfil biológico. (COSTA, 2009).

A partir da extração e isolamento da riparina III, obteve-se um modelo molecular. Assim, com o objetivo de sintetizar análogos estruturais foram desenvolvidas rotas de síntese no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da UFPB para as riparinas A, B, C, D, E e F.(BARBOSA-FILHO et al., 1987). Além disso, foram realizados testes de triagem farmacológica para as mais variadas atividades (NUNES et al., 2014).

Neste contexto, a 2-hidroxi-*N*-[2-(4-metoxi-fenil)-etil]-benzamida (Figura 1), denominada de riparina D, é uma entidade química sintetizada por uma reação de condensação do éster metílico com a fenetilamina substituída (GUTIERREZ, 2007). Esta apresentou representativa atividade tumoral citotóxica e antioxidante, atraindo a atenção de grupos de pesquisas (NUNES; COSTA *et al.*, 2014).

A riparina D demonstrou baixa solubilidade em água, o que representa, do ponto de vista biofarmacêutico, uma limitação no desenvolvimento de formas farmacêuticas para administração oral (NUNES; COSTA *et al.*, 2014). Uma vez que o fármaco é pouco solúvel, ele apresentará uma absorção limitada pela taxa de dissolução, prejudicando assim a eficácia terapêutica a que se propõem (KAWAKAMI, 2012).

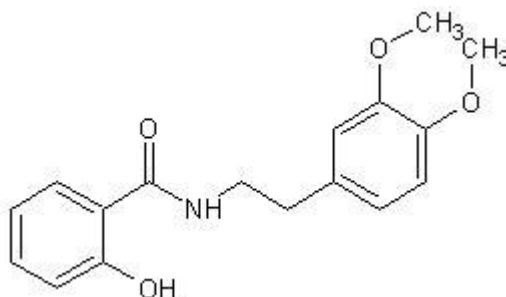


Figura 1: Estrutura molecular da riparina D

Fonte: Gutierrez (2007)

As formas farmacêuticas sólidas são o objetivo farmacotécnico final da grande maioria das novas moléculas sintetizadas. Nestas, a dissolução e absorção são reprodutíveis e adequadas à obtenção de uma biodisponibilidade necessária para os efeitos terapêuticos desejados (AMIDON *et al.*, 1995).

Entretanto, muitas destas novas moléculas são pouco solúveis em água, apresentando uma fraca absorção após administração. Apesar de a lipofilicidade ajudar na permeabilidade, estas somente serão absorvidas na porção superior do intestino delgado. Assim, visando otimizar a biodisponibilidade, estes fármacos terão que ter suas características de dissolução no trato gastrointestinal melhoradas (CARRIER *et al.*, 2007).

Assim, um dos maiores desafios da indústria farmacêutica atualmente consiste em desenvolver estratégias que melhorem a solubilidade de fármacos em água (BREWSTER; LOFTSSON, 2007). Algumas destas já estão sendo utilizadas de forma eficaz no objetivo de aumentar a taxa de dissolução sem reduzir seu potencial

farmacológico. Dentre eles, destacam-se: solubilização com co-solventes, microemulsões, nanopartículas, micronização, dentre outros. Os complexos de inclusão com ciclodextrinas destacam-se como potenciais ferramentas para o incremento da solubilidade de fármacos insolúveis em água(LOFTSSON et al., 2005).

Ciclodextrinas (CDs) são excipientes farmacêuticos compostos de unidades de D-glicopirranose, que formam uma estrutura macromolecular tronco-cônica. A disposição espacial e orientação dos grupos hidroxilas para o exterior conferem a esta estrutura propriedades físico-químicas singulares, sendo capazes de se solubilizarem em meio aquoso e ao mesmo tempo encapsular no interior de sua cavidade hidrofóbica moléculas lipofílicas(LOFTSSON;BREWSTER, 2012). Assim, a complexação da riparina D com CDs demonstra ser uma alternativa viável para melhorar a solubilidade e, conseqüentemente, a biodisponibilidade.

Este trabalho visa à obtenção e caracterização físico-química de complexos de inclusão entre a riparina D e hidroxipropil- β -ciclodextrina, com o foco na melhoria da solubilidade e análise da compatibilidade com este excipiente. Assim, tal estudo servirá de fase inicial para o desenvolvimento de um futuro medicamento antitumoral e antioxidante, seguro e eficaz.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- O trabalho tem como objetivo obter e caracterizar complexos de inclusão entre riparina D:HP β CD, focando na melhoria da solubilidade do fármaco.

2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver e validar um método de quantificação da riparina D por espectrofotometria UV-Vis;
- Caracterizar a riparina D e preparar os complexos de inclusão riparina D:HP β CD no estado sólido além de caracterizar por meios de técnicas analíticas como: infravermelho, análise térmica, difração de raios-X, e perfil de dissolução;
- Caracterizar os complexos de inclusão riparina D:HP β CD em estado líquido por RMN, determinando a estequiometria do complexo, medidas de tempo de relaxação longitudinal, medidas de constante de associação aparente e coeficientes de difusão pela técnica de DOSY.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 O uso terapêutico de plantas medicinais e seus derivados

Planta medicinal é uma espécie vegetal que possui substâncias biologicamente ativas com propriedades terapêuticas ou profiláticas. Estas são utilizadas desde as antigas civilizações para curar enfermidades e aliviar o sofrimento físico (DUBICK, 1986). Em 1.600 a.C, os papiros egípcios já relatavam nomes de plantas medicinais empregadas naquela época, como mirra, cânhamo e ópio. Há relatos também entre os povos babilônios, chineses e assírios que descreviam e identificavam as plantas úteis e as nocivas (FERREIRA et al., 2014).

O Brasil se destaca no cenário mundial pela sua biodiversidade. Atualmente, sua flora possui mais de 50.000 espécies de plantas superiores registradas, que corresponde a 20% do total existente no planeta. Esta grande oferta de variedade vegetal amplia a utilização de plantas medicinais na prática clínica para o tratamento de patologias de forma complementar ou alternativa (TOYANG; VERPOORTE, 2013).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), aproximadamente 80% da população mundial não tem acesso ao atendimento básico de saúde, recorrendo assim a alternativas tradicionais como o uso de plantas medicinais para o alívio de suas enfermidades. A OMS, com ressalvas, estimula o uso da medicina tradicional baseada em plantas medicinais pela população de países em desenvolvimento, conquanto que haja recomendações médicas baseadas em estudos científicos e divulgadas por meio de manuais (YUNES et al., 2001).

As plantas contêm milhares de metabólitos secundários, sendo que apenas aqueles que se apresentam em maiores concentrações são isolados e estudados. A análise completa das substâncias ativas são mais complexas e demoradas, já que os compostos que apresentam melhores efeitos farmacológicos são aqueles em menores quantidades. Assim, torna-se indispensável a cooperação entre químicos e farmacologistas para a obtenção e análise da potência das frações e das substâncias puras. Esta avaliação permite predizer se o principal componente químico responsável pela atividade biológica foi realmente determinado (DE OLIVEIRA et al., 2013).

A maioria das substâncias orgânicas conhecidas provém da natureza, sendo o reino vegetal o principal responsável pela diversidade química conhecida. No entanto,

por se tratar de uma atividade extrativista a disponibilidade destas substâncias nem sempre é constante e na quantidade necessária, inviabilizando a exploração comercial (BARREIRO;BOLZANI, 2009).

Logo, através da síntese e/ou modificação estrutural pode-se otimizar métodos de obtenção de compostos farmacologicamente ativos, ou melhorar a atividade dos princípios ativos naturais.

3.2 Síntese química e indústria farmacêutica

Atualmente, o fator diferencial na competitividade entre empresas é a inovação tecnológica. Inovar para a indústria farmacêutica, um dos setores econômicos mais lucrativos, é essencial. No entanto, este processo caracteriza-se por ser extremamente complexo, longo e dispendioso, pois se levam entre cinco e doze anos para que um novo princípio ativo seja comercializado(DA MOTTA VIEIRA;OHAYON, 2008).

A indústria farmacêutica possui características específicas e diferenciadas, dentre elas o seu processo de inovação. Os medicamentos novos são responsáveis pelos lucros exorbitantes e a conquista de novos mercados, fazendo com que a pesquisa e do desenvolvimento (P&D) assumam um peso específico dentro do planejamento empresarial(GADELHA; QUENTAL *et al.*, 2003).

O objetivo principal da inovação farmacêutica é aplicar o conhecimento científico e tecnológico da pesquisa básica para lançarum novo medicamento. Atualmente, o meio acadêmico participa do processo através da transferência de tecnologia para a cadeia produtiva industrial (PERKMANN;WALSH, 2007). No entanto, no Brasil, devido à tímida infraestrutura científica das universidades, poucas empresas se interessam em participar desse processo(CALIXTO;SIQUEIRA JUNIOR, 2008).

A cadeia de inovação no mercado farmacêutico se inicia com a escolha do alvo terapêutico e vai até o novo protótipo terapêutico, que pode ser uma molécula totalmente nova ou uma baseada em composto natural com atividade farmacológica reconhecida(MILNE, 2003). O desenvolvimento do produto é a chave do processo inovador, pois há uma busca permanente pelo aumento da eficácia, segurança e redução dos efeitos adversos. Assim, através da Química Medicinal, pode-se modificar as características do composto, a fim de atender os requisitos necessários(LIMA, 2007).

Segundo a IUPAC, a Química Medicinal é uma disciplina que envolve aspectos das ciências médicas, biológicas e farmacêuticas, cujo objetivo é o planejamento, descoberta, invenção, identificação e preparação de compostos biologicamente ativos. Além disso, esta disciplina promove o estudo do metabolismo, interpretação de mecanismos de ação e construção das relações entre atividades farmacológicas e estruturas químicas(PRENTIS et al., 1988).

A descoberta de fármacos baseada na modificação estrutural de moléculas conhecidas leva à identificação de novos compostos-protótipos que atuam pelo mesmo mecanismo farmacológico da molécula de origem. Esta estratégia tem sido largamente empregada na indústria farmacêutica para melhoria de medicamentos já comercializados (NIELSEN;SCHREIBER, 2008).

Ao se fazer o planejamento de uma molécula que poderia se tornar um protótipo a fármaco, deve ser escolhido uma molécula modelo com reconhecida propriedade farmacêutica assim como um alvo farmacológico cuja estrutura permite buscar a melhor estratégia para a construção do ligante desejado(PORS et al., 2009).

Nas últimas décadas, a síntese na química orgânica tem evoluído e mostrado ser capaz de preparar compostos complexos semelhantes aos produtos naturais. O aperfeiçoamento de metodologias, o desenvolvimento de técnicas de análise orgânica, aliados aos avanços das técnicas instrumentais, permitem a síntese de moléculas com alto controle de enantiosseletividade(CRAGG et al., 2014).

Assim, o papel da química orgânica desempenhado na indústria farmacêutica continua a ser um dos principais fatores na descoberta de novos medicamentos. A relação sinérgica entre o planejamento e a metodologia da síntese é ainda mais significativa e possui seus efeitos na pesquisa biomédica, tornando-se uma valiosa ferramenta para o tratamento de doenças(MACHADO et al., 2014).

3.3 Estudos de pré-formulação

Pré-formulação é o estudo das propriedades do estado sólido de um candidato a fármaco, como: cristalinidade, morfologia, solubilidade, dissolução, ponto de fusão, densidade, higroscopicidade, estabilidade e compatibilidade (SWAMIVELMANICKAM et al., 2009). Tais estudos começam assim que uma molécula demonstra certa atividade farmacológica em modelos animais. São realizados

durante as fases pré-clínicas e clínicas com o objetivo de acumular o máximo de informações sobre a nova entidade química (GOPINATH, 2011).

A coleta de dados das propriedades físico-químicas na fase de pré-formulação permite a avaliação da compatibilidade do componente ativo com adjuvantes farmacêuticos, fornecendo conhecimentos tanto para o desenvolvimento de novos produtos quanto para a otimização de formulações já existentes (ALVES et al., 2010). Esta coleta pode ser ocorrer por meio da espectroscopia em IV-TF, espectrofotometria por UV-Vis, difração de Raios-X, ressonância magnética nuclear, análises térmicas, cromatografia líquida de alta eficiência, dentre outros.

3.3.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (IV-TF)

A radiação infravermelha, compreendida entre 10.000 cm^{-1} e 100 cm^{-1} , quando absorvida por uma molécula converte-se em energia de vibração molecular, sendo quantificada sobre a forma de um espectro, que evidencia um conjunto de bandas. A frequência ou o comprimento de onda da absorção depende da massa relativa dos átomos, das constantes de forças, do tipo de ligações estabelecidas na molécula e da geometria dos átomos (LIMA et al., 2008).

A radiação infravermelha não possui energia suficiente para produzir transições eletrônicas. Para que uma molécula absorva a radiação, ela deve sofrer uma variação no momento de dipolo durante seu movimento rotacional ou vibracional. Somente sob estas circunstâncias o campo elétrico alternado da radiação pode interagir com a molécula e causar variações na amplitude de um de seus movimentos (DRUY, 2004).

O momento de dipolo é determinado pela magnitude da diferença de carga e a distância entre dois centros de cargas. Assim, este método detecta a capacidade das ligações vibrarem ao serem irradiadas por frequências de 4.000 cm^{-1} a 650 cm^{-1} , tais vibrações então produzem bandas características para cada ligação (LIMA et al., 2009).

A análise por IV-TF permite a identificação da estrutura molecular do material. A utilização da transformada de Fourier, juntamente com o desenvolvimento de microprocessadores digitais e técnicas computacionais avançada permite a análise de misturas complexas, tais como fármacos sem a necessidade prévia de separação (SOUZA; FERRÃO, 2006). A preparação da amostra a ser analisada por IV-TF é feita

pelo dispositivo de reflectância total atenuada (ATR), o qual permite uma boa qualidade do espectro em um curto espaço de tempo (SWARBRICK, 2007).

3.3.2 Espectrofotometria no Ultravioleta/Visível (UV-Vis)

A espectrofotometria de Ultravioleta/Visível (UV 200-400 nm: Vis 400-800 nm) baseia-se nas transições eletrônicas que ocorrem devido à absorção de radiação por ligações ou grupos funcionais específicos na molécula. O comprimento de onda referente à absorção é uma medida da energia necessária para a referida transição, enquanto que a intensidade é função da probabilidade da ocorrência da transição. Ou seja, obtêm-se bandas de absorção correspondentes às transições eletrônicas do estado fundamental a um estado excitado (TAKAHASHI et al., 2012).

Quando um feixe de luz atravessa ou é refletido por uma amostra, a quantidade de luz absorvida (I_a) será a diferença entre a radiação incidente (I_0) e a radiação transmitida (I). Essa quantidade de luz absorvida pode ser definida em forma de transmitância ou absorvância (ALBUQUERQUE et al., 2005).

O espectro de absorção óptica de uma amostra é o registro obtido da intensidade da luz absorvida em função do comprimento de onda. Em geral, em vez da intensidade da luz absorvida, o que se registra no espectro é o logaritmo da relação entre a intensidade da luz incidente I_0 e a intensidade da luz transmitida I . Tal grandeza é chamada de absorvância (Abs) ou densidade óptica (KARABACAK et al., 2012).

3.3.3 Difração de Raios X (DRX)

A difratometria de raios X corresponde a uma das principais técnicas de caracterização microestrutural de materiais cristalinos. Os raios X ao atingirem um material podem ser espalhados elasticamente, sem perda de energia pelos elétrons de um átomo (dispersão ou espalhamento coerente). O fóton de raios X após a colisão com o elétron muda sua trajetória, mantendo, porém na mesma fase e energia do fóton incidente. Sob o ponto de vista da física ondulatória, pode-se dizer que a onda eletromagnética é instantaneamente absorvida pelo elétron e reemitida; cada elétron atua, portanto, como centro de emissão de raios X (GAO et al., 2015).

Assim, a intensidade difratada, entre outros fatores, é dependente do número de elétrons no átomo. Adicionalmente, os átomos são distribuídos no espaço, de tal forma que os vários planos de uma estrutura cristalina possuem diferentes densidades de

átomos e elétrons, fazendo com que as estruturas difratadas sejam, por consequência, distinta para os diversos planos cristalinos(AL-FUTAISI et al., 2007).

Ao analisar um material em pó, utiliza-se uma “*plotagem*” da intensidade contra o ângulo de 2θ . O gráfico obtido equivale a uma impressão digital da estrutura cristalina, podendo ser utilizada para comparar com um padrão cristalográfico. Quando o material for cristalino, haverá picos específicos indicativos das reflexões dos planos atômicos, enquanto que uma amostra amorfa exibirá uma protuberância larga, chamado de halo amorfo(GROOM;ALLEN, 2014).

Dentre as várias técnicas de caracterização de materiais, a técnica de difração de raios X é a mais indicada na determinação das fases cristalinas. Isto é possível porque na maior parte dos sólidos (cristais), os átomos se ordenam em planos cristalinos separados entre si por distâncias da mesma ordem de grandeza dos comprimentos de onda dos raios X(TAKAHASHI; VEIGA *et al.*, 2012).

A DRX é considerada o padrão-ouro dentre as várias técnicas de identificação de formas sólidas. Isto se deve ao fato desta técnica fornecer informação sobre a estrutura do material subjacente, podendo ele exibir ordem de amplo alcance como em materiais cristalinos ou baixo alcance em materiais amorfos ou vítreos, sendo essa informação única para cada amostra(TAKAHASHI; VEIGA *et al.*, 2012).

3.3.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A RMN é uma técnica analítica utilizada para obter informações estruturais e dinâmicas das amostras, tendo como princípio a detecção das propriedades magnéticas dos núcleos. Esta técnica instrumental é rotineiramente utilizada para elucidação estrutural, determinação da quiralidade ou correlações estrutura-atividade (NEWMAN;BYRN, 2003).

A técnica de Ressonância Magnética Nuclear vem sendo utilizada também para avaliar a formação de complexos de inclusão entre fármacos e ciclodextrinas (CDs). A vantagem seria em elucidar a estrutura do complexo, identificando a parte da molécula hospedeira que está no interior da cavidade da CD. Quando há a formação de complexos, observam-se alterações nos sinais do espectro tanto da CD quanto do fármaco analisado (VEIGA et al., 2006).

3.3.5 Análise Térmica

Definida como um grupo de técnicas onde as propriedades físicas e químicas de uma substância ou mistura é avaliada em função da temperatura, em um programa de aquecimento controlado e sob uma atmosfera específica (DA SILVA et al., 2007).

Dentre as técnicas termoanalíticas mais utilizadas para a avaliação do processo de complexação, destacam-se a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e a Termogravimetria (TG).

3.3.5.1 Análise Termogravimétrica

Todas as transformações, sejam químicas ou físicas, são acompanhadas pela perda ou absorção de energia. O calor é uma forma de energia que pode acompanhar, promover, acelerar ou desacelerar processos, conforme sua intensidade e trânsito entre o sistema reagente e o ambiente. Algumas transformações envolvem ainda a variação da massa, das propriedades elétricas e mecânicas do material. Além disso, a observação de como essas variáveis se comportam a medida que a amostra é submetida ao aquecimento ou arrefecimento constitui o objeto da termoanálise (HAINES, 2012).

Há muito tempo tem-se buscado o conhecimento a respeito da estabilidade térmica das substâncias, seja para evitar sua decomposição, seja, ao contrário, com o propósito de provocá-la. Ao longo do século XIX e início do século XX, pesquisadores construía, ponto a ponto, gráficos de perdas de massa de uma amostra que se operavam em função da temperatura. As pesagens eram feitas em balanças analíticas comuns após o resfriamento, e as curvas assim obtidas eram denominadas termogramas. Atualmente, as curvas termogravimétricas (“curvas TG”) são obtidas com ajuda de termobalanças que permitem registrar diretamente a alteração de massa em função da temperatura ou do tempo (MACHADO; MATOS, 2004).

O caráter específico de uma sequência de reações físico-químicas que ocorrem em certas condições de temperatura, e em dada velocidade, são características de um determinado composto ou sistema, dando assim origem a termogramas particulares. As variações de massa podem ocorrer graças à ruptura ou formação de ligações, liberação ou absorção de produtos voláteis, pirólise ou formação de produtos mais pesados. Por este motivo, as curvas termogravimétricas fornecem dados valiosos para o estudo da termodinâmica e da cinética de transformações (GIRON, 2002).

3.3.5.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A DSC mede a diferença de energia fornecida à substância e a um material de referência (termicamente estável) durante um programa controlado de aquecimento. Existem duas configurações possíveis para os equipamentos de DSC: com compensação de potência e com fluxo de calor(LI et al., 2009).

A amostra, durante o processo de aquecimento ou resfriamento, costuma sofrer alterações derivadas de eventos endotérmicos ou exotérmicos. Nessa técnica, o calor diferencial necessário para manter a amostra na mesma temperatura da referência é registrado. Esta diferença de temperatura ocorre devido a fenômenos químicos (decomposição/combustão) ou físicos (mudanças de estado ou transições cristalinas). Assim, consegue-se saber a variação de entalpia de determinado evento, através da análise da área sob a curva (ATTIA et al., 2013).

A DSC encontra diversas aplicações nos setores farmacêuticos, dentre estas destaca-se a determinação de pureza das matérias primas. Tal técnica possui as vantagens de não necessitar de um padrão de referência correspondente, rápida análise e quantidade mínima de amostra(CHIENG et al., 2011).

3.3.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*) é um método de separação automatizado que utiliza colunas recheadas de material com polaridade conhecida (fase estacionária), e pela qual passam os solventes (fase móvel) em altas pressões(GUILLARME;DONG, 2013). A separação e análise quantitativa e qualitativa são feita de forma rápida e precisa, podendo ser analisados uma grande quantidade de compostos com alta resolução, eficiência e sensibilidade.Assim, a CLAE é considerada um dos métodos de escolha por ser precisa e rápida, além de permitir o doseamento de pequenas quantidades do material(AHUJA;DONG, 2005).

A grande vantagem frente a outras técnicas analíticas instrumentais é sua versatilidade, pois pode ser aplicada tanto em compostos orgânicos quanto inorgânicos. Também poderão ser analisados por esta técnica amostras sólidas ou líquidas, iônicas ou covalentes(SISTLA et al., 2005).Além disso, para obter uma separação adequada, há a

necessidade do equilíbrio adequado das forças intermoleculares entre a fase móvel, soluto e estacionária, sendo esta a responsável pela combinação com o soluto e aquela pela eluição do mesmo (GUILLARME;DONG, 2013).

A CLAE pode utilizar diferentes tipos de detectores específicos, sendo que os mais utilizados são os espectrofotométricos (UV/Vis). Estes detectam compostos com grupos cromóforos e podem apresentar comprimento de onda fixo, múltiplo ou variável. Aqueles operam em um único valor, geralmente 254 nm, enquanto estes contêm uma fonte contínua de emissão, como uma lâmpada de deutério ou xenônio e geram radiação monocromática a um valor selecionado pelo operador, podendo ainda ser programados para alterar o comprimento de onda durante o desenvolvimento da análise. Já os múltiplos medem, simultaneamente, a absorvância em dois ou mais comprimentos de onda, sendo denominados detectores de arranjo de diodos (DAD). Além desses, o cromatógrafo líquido de alta eficiência pode ser acoplado a detectores de índice de refração, fluorimétricos, eletroquímicos, de espectrometria de massa e de condutividade (GUPTA et al., 2012).

3.4 *Aniba ripariae* as riparinas

A *Aniba riparia* (Ness) Mez é da família das Lauraceae, considerada uma das mais primitivas. Destaca-se pela importância econômica, pois algumas espécies são utilizadas na medicina popular e indústrias química e cosmética, principalmente o extrato dos frutos que já demonstraram efeitos terapêuticos (BARBOSA-FILHO, 1997).

Popularmente conhecida como “louro”, esta planta está amplamente distribuída no Brasil, podendo ser encontrada desde a Amazônia até os pampas do sul do país. O interesse pelo estudo dessa espécie vem aumentando por se observar alguns efeitos farmacológicos descritos na literatura. Dentre estes, destacam-se: antidepressivo; anti-inflamatório; antimicrobiano; antinociceptivo; miorelaxante e ansiolítico. Assim a *A. riparia* demonstra um potencial terapêutico para futuras formulações (GUTIERREZ, 2007).

A riparina provém da *A. riparia*, que do ponto de vista fitoquímico apresenta uma classe predominante de alcaloides com função alcaloide. O (O-metil)-N-(2-hidroxi-benzil)-tiramina, composto isolado desta espécie, é biogeneticamente resultado da condensação do éter metílico da tiramina, que apresenta atividade

simpaticomimética, e o ácido salicílico, conhecido agente queratolítico e antimicótico(CUSTODIO;DA VEIGA JUNIOR, 2014).

Na natureza encontram-se as riparinas I, II e III, no entanto em quantidades limitadas para suprir os estudos e futura produção de medicamentos. Em vista disso, o Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da UFPB encarregou-se de sintetizar análogos estruturais, assim como testar suas atividades farmacológicas. Dentre os compostos sintetizados, o (O-metil)-*N*-(2,6-dihidroxibenzoil)-tiramina, conhecido por riparina III (Figura 1), foi o que demonstrou maiores atividades(GUTIERREZ, 2007).

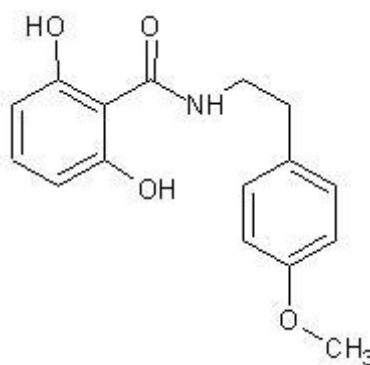


Figura 1: Estrutura Química da Riparina III

Fonte: Gutierrez (2007)

As riparinas são alcaloides. Estes se caracterizam pela presença de bases nitrogenadas e constituem 20% das substâncias naturais descritas na literatura (TAIZ;ZEIGER, 2006). Classificam-se de acordo com o núcleo químico em: piridínicos, piperidínicos, quinolínicos, isoquinolínicos, pirrolizidínicos, pirrolidínicos, tropânicos, indólicos, imidazólicos, xantinas, mistos betalaínas, terpênicos e esteroidais (SIMOES, 2001).

Os alcaloides são utilizados pela medicina tradicional desde as civilizações antigas na forma de chás. As principais atividades farmacológicas relacionadas com esse grupo fitoquímico são: anti-hipertensivos, antitumorais, hipnoanalgésicos, estimulantes SNC, simpaticomiméticos, antimalárico, antitussígenos, antivirais, antimicrobianos (KOTHAKONDA;BOSE, 2004).

Em vista disso, avaliaram-se as propriedades biológicas das riparinas sintetizadas na UFPB, que demonstraram resultados positivos em testes de citotoxicidade, antitrombótico, antimicrobiano, antihemíntico e antioxidantes. No entanto, os estudos preliminares de solubilidade demonstraram os compostos sintéticos

são insolúveis em água, dificultando o desenvolvimento futuro de formulações medicamentosas.

3.5 Estudos de avaliação da solubilidade

3.5.1 Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS)

Para desempenhar ação farmacológica, o fármaco precisa atingir o local de ação na concentração adequada. Assim, a absorção do fármaco é fundamental para o efeito terapêutico, em especial nas administrações via oral (HUSSAIN et al., 1999).

Muitos fatores determinam a biodisponibilidade, dentre eles destaca-se a dissolução, caracterizada pelo processo no qual o fármaco é liberado de sua forma farmacêutica, tornando-se disponível para absorção pelo organismo. Assim, a taxa de absorção, via de regra, é determinada pela dissolução juntamente com o efeito subsequente de primeira passagem hepática, além do transporte pelas membranas intestinais (ROY et al., 2001).

Estes dois aspectos supracitados são a base do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS), proposto inicialmente pela *Food and Drug Administration* (FDA). Tal sistema divide os fármacos em 4 classes (Tabela 1) de acordo com a solubilidade e permeabilidade gastrointestinal. Logo, a classificação do fármaco segundo estes critérios tem por objetivo prever o comportamento farmacocinético *in vivo*, através de testes *in vitro* de solubilidade e permeabilidade (YAZDANIAN et al., 2004).

Tabela 1: Sistema de Classificação Biofarmacêutica

Classe	Dissolução em meio aquoso	Permeabilidade (membrana intestinal)
I	Rápida	Rápida
II	Lenta	Rápida
III	Rápida	Lenta
IV	Lenta	Lenta

Fonte: Farmacopeia Brasileira 5ª edição, 2010.

Os fármacos que pertencem à classe I caracterizam-se por rápida dissolução e são rapidamente transportados pelas membranas intestinais, logo não se faz necessário a utilização de técnicas para melhoria da biodisponibilidade. Enquanto que na classe II, os fármacos apresentam a taxa de dissolução como um fator crítico, sendo que a absorção *in vivo* pode ser afetada por flutuações fisiológicas, tais como volume e pH dos líquidos intestinais, a presença de sais biliares, comidas, enzimas, bactérias e a mobilidade e viscosidade do lúmen intestinal. Uma das estratégias utilizadas para otimizar os parâmetros dessa classe de fármacos é aumentar a quantidade de moléculas no local de absorção. No entanto, deve-se avaliar se não existe limitações à permeabilidade, como por exemplo um transportador ativo que pode sofrer saturação(RADER, 2013).

Para os fármacos da classe III, observa-se uma limitação na permeabilidade, logo estudos de dissolução não poderão prever a absorção *in vivo*. O mesmo é observado na classe IV e neste caso o objetivo é melhorar a correlação *in vitro/in vivo*. Isto ajuda a diminuir a variabilidade entre os pacientes e melhorar a previsibilidade e biodisponibilidade de parâmetros farmacocinéticos. Para esta última classe de fármacos, visando a melhoria dos parâmetros, opta-se por estratégias que aumentam a solubilidade das substâncias ativas(RADER, 2013).

3.5.2 Testes de Dissolução

Testes de dissolução são indispensáveis nas etapas de produção de medicamentos, identificação de variáveis críticas, controle de qualidade e estabelecimento de correlação entre estudos *in vitro/in vivo*. O objetivo principal é determinar de forma mais eficaz o comportamento de formas farmacêuticas *in vivo*, levando-se em consideração a redução dos custos de trabalho de desenvolvimento da forma farmacêutica e a otimização do número e tamanho dos estudos clínicos requeridos(SINGHVI;SINGH, 2011).

Os ensaios de dissolução são um importante meio de caracterização da qualidade biofarmacêutica das formas sólidas, possibilitando o controle de qualidade dos medicamentos. Logo, a definição, em breves termos, é o processo pelo qual uma substância entra no solvente para formar uma solução, sendo mais do que a simples medição da solubilidade e caracterizando-se pela liberação do fármaco em uma determinada área numa determinada quantidade e tempo correto(GUERRA et al., 2012).

A velocidade de dissolução é caracterizada pela rapidez com que um soluto se dissolve em um líquido solvente, em determinadas condições de agitação e temperatura. Logo, está intimamente relacionada com a solubilidade, embora significando um conceito diferente: a solubilidade é um conceito estático, que se refere a um estado de equilíbrio termodinâmico, representando a quantidade ou concentração de fármaco que se dissolve por unidade de tempo. Assim, através da alteração da velocidade de dissolução de uma substância mediante fatores tecnológicos e de formulação, é possível modular o perfil de liberação de um fármaco, o que resulta em grande importância biofarmacêutica (ANAND et al., 2011).

O perfil de dissolução mostra quanto do fármaco se dissolve em intervalos de tempos determinados. Assim, fornece informações sobre a velocidade e a porcentagem máxima dissolvida. Além disso, pode-se calcular a eficiência de dissolução, parâmetro bastante útil quando se deseja comparar formulações e/ou produtos diferentes (WEN; PARK, 2011).

3.5.3 Ciclodextrinas como estratégia para aumentar a solubilidade de fármacos

Ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos compostos de unidades de D-glicopiranosose (D-glicose) através de ligações α -1,4 glicosídicas. São obtidas a partir da hidrólise do amido ou seus derivados com posterior ciclização dos fragmentos, promovido pela enzima ciclodextrina-glicosil-transferase. As mais conhecidas são a α , β e γ -ciclodextrinas, que contém respectivamente 6, 7 e 8 unidades de glicose (DAVIS; BREWSTER, 2004).

Estruturalmente, estas macromoléculas assumem uma conformação de “cones truncados” devido à ausência de rotação livre das ligações glicosídicas e da conformação em cadeira apresentada pelas moléculas de glicose (Figura 2). Nesta estrutura, o lado mais largo apresenta hidroxilas secundárias em C-2 e C-3 enquanto que a face mais estreita é constituída por hidroxilas primárias ligadas em C-6 (LOFTSSON; BREWSTER, 2012).

Os grupamentos -CH ligados aos H-1, H-2 e H-4 encontram-se no exterior da molécula e as hidroxilas orientam-se para o exterior do cone, tornando a superfície externa das CDs hidrofílica. Por sua vez, o revestimento da cavidade interna da CD é delineado por dois anéis de grupos -CH, aos quais estão ligados aos H-4 e H-5, e por pontes de éteres glicosídicos. Os pares de elétrons livres dos átomos de oxigênio

envolvidos nas pontes glicosídicas estão dirigidos para o interior da cavidade, produzindo um ambiente de elevada densidade eletrônica, que conseqüentemente confere à superfície interna da molécula de CD um caráter extremamente hidrofóbico(VEIGA; PECORELLI et al., 2006).

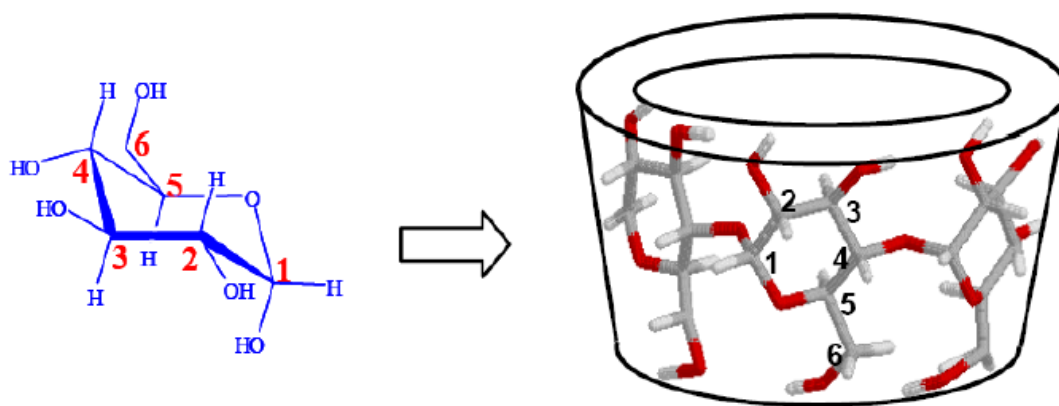


Figura 2: Estrutura tronco-cônica característica das ciclodextrinas

Fonte: Adaptado de LYRA et al., 2010

As CDs, nova classe de excipientes farmacêuticos, são usadas para modificar as propriedades físico-químicas e biológicas de fármacos através do processo de complexação. Os objetivos principais são: otimização; estabilização e proteção contra reações oxidativas, hidrolíticas e fotolíticas; redução da volatilidade e diminuição dos efeitos desagradáveis de fármacos(ALVES et al., 2012).

Para melhorar a solubilidade de fármacos insolúveis, os grupos hidrofóbicos destas moléculas, também denominadas de moléculas hóspedes, penetram na cavidade da CD que possui uma superfície externa hidrofílica, tornando o complexo como um todo solúvel. As modificações químicas das hidroxilas externas das CDs naturais potencializam ainda mais a solubilidade do complexo(AGUIARA et al., 2014).

Quando o objetivo da complexação for proteger o fármaco de reações oxidativas hidrolíticas e fotolíticas, os grupamentos susceptíveis a tais reações da molécula hóspede serão incluídos na cavidade da ciclodextrina. No entanto, as CDs podem exercer um efeito acelerador na reatividade de algumas moléculas hóspedes, normalmente associados a uma desprotonação dos grupamentos hidroxilas da CD e da orientação do substrato na cavidade da mesma(SOARES-SOBRINHO et al., 2012).

Compostos voláteis complexados com CDs apresentam menores taxas de evaporação e degradação quando submetidos a elevadas temperaturas(DE LIMA et al.,

2012). Além disso, quando o fármaco está complexado, a molécula fica protegida do contato com membranas do corpo que antecedem o processo de dissolução. Logo, os efeitos secundários indesejáveis, tais como irritação da mucosa ou sabores desagradáveis ficariam diminuídos(ZHANG et al., 2010).

As propriedades físico-químicas do fármaco isolado, das CDs e dos complexos são diferentes e podem ser caracterizadas por técnicas como a construção de diagramas de solubilidade, análise térmica, DRX, infravermelho, dissolução, RMN e MEV. Tais técnicas devem possuir sensibilidade suficiente para avaliar as diferenças das características dos compostos de forma isolada e em complexos, permitindo avaliar a eficácia do processo de complexação(TAKAHASHI; VEIGA *et al.*, 2012).

3.5.3.1 Diagramas de solubilidade de fases

A aplicação das ciclodextrinas na área farmacêutica que mais se destaca é o aumento da solubilidade de fármacos em meio aquoso. O diagrama de solubilidade de fase, desenvolvido por Higuchi e Connors (1965), é habitualmente utilizado para avaliar a formação de complexos de inclusão(HIGUCHI;CONNORS, 1965). Este método baseia-se no monitoramento das alterações da solubilidade do substrato pela adição de quantidades crescentes de ciclodextrinas. Experimentalmente, um excesso do substrato é adicionado a soluções de mesmo volume, mas com concentrações crescentes de CDs(VEIGA; PECORELLI *et al.*, 2006)

O diagrama de solubilidade consiste em um gráfico, onde é apresentado a solubilidade do fármaco em função da concentração crescente de CD. Logo, observam-se dois tipos de perfis: A e B (Figura 3).

Diagramas do tipo A correspondem aos complexos solúveis e podem ser de três tipos. A_L: diagrama linear, onde a solubilidade do fármaco aumenta linearmente com o aumento da concentração da CD; A_P: diagrama com desvio positivo da linearidade, em que o complexo formado é de primeira ordem em relação ao fármaco e de segunda ou superior em relação à CD;NA: diagrama com o desvio negativo, que não possui interpretação generalizada, devido a interações complexas entre soluto-soluto e soluto-solvente, que dependem de cada caso(CUNHA-FILHO;SÁ-BARRETO, 2009).

Os diagramas do tipo B correspondem à formação de complexos com solubilidade limitada, observado frequentemente nos complexos com a β -CD, podendo ser de dois tipos: B_S, onde são observados três pontos - primeiro existe um aumento da

solubilidade, depois uma região de platô que é considerada a máxima solubilidade, e na terceira tem-se a precipitação do complexo insolúvel com o aumento da CD; B_i , que são complexos tão insolúveis que a possibilidade de aumento inicial na concentração do fármaco não é detectável (CUNHA-FILHO; SÁ-BARRETO, 2009).

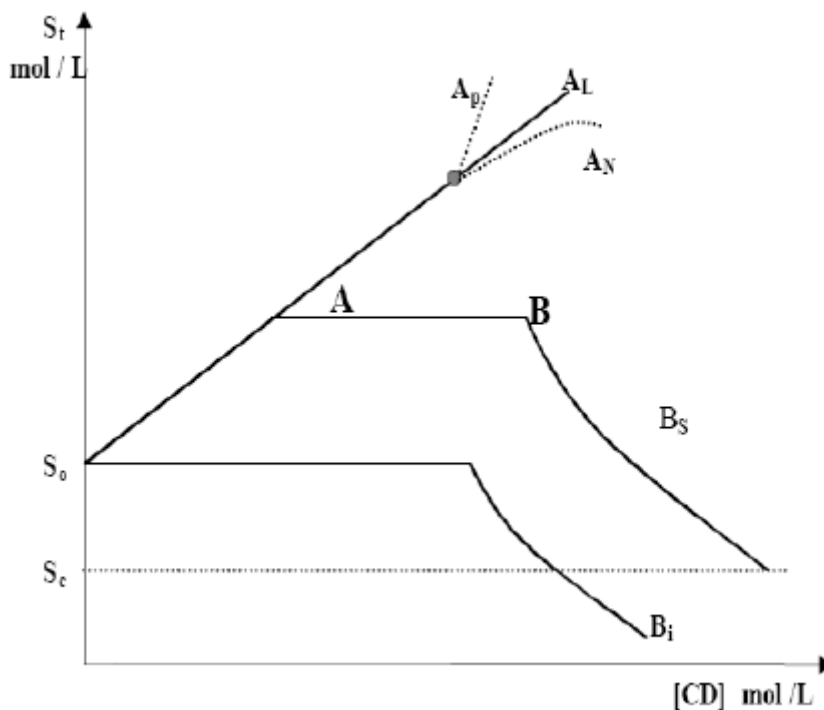


Figura 3: Diagrama de solubilidade das fases

Fonte: CUNHA-FILHO & SÁ-BARRETO (2009)

3.6 Validação de métodos analíticos

Atualmente, existe uma necessidade crescente de demonstrar a qualidade de medições químicas, utilizando a comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade. A fim de garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis, interpretáveis e reproduzíveis, ele deve sofrer uma avaliação denominada de validação. Assim, as decisões equivocadas baseadas em resultados não confiáveis serão reduzidas, levando a uma diminuição dos prejuízos financeiros irreparáveis (ARAGÃO et al., 2009).

O objetivo da validação de metodologia analítica é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade proposta, baseando-se na determinação qualitativa, semi-

quantitativa e/ou qualitativa do fármaco e outras substâncias em produtos farmacêuticos, devendo conter informações de apoio apropriadas aos procedimentos analíticos utilizados(ICH, 2005)

Segundo Ribani, na validação de métodos analíticos, os parâmetros analíticos normalmente determinados são: seletividade; linearidade; precisão; exatidão; faixa linear; robustez; limite de detecção e limite de quantificação. Estes termos são conhecidos como parâmetros de desempenho analítico, características de desempenho e, algumas vezes, como figuras analíticas de mérito(RIBANI et al., 2004).

3.6.1 Precisão

A precisão é o grau de concordância entre resultados independentes em torno de um valor central, efetuadas várias vezes em uma amostra homogênea, sob condições pré-estabelecidas(BRITO et al., 2003).

Pode ser avaliada em três níveis: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade, sendo facultada a realização de dois níveis. A repetitividade corresponde à precisão intraensaio que consiste na determinação de repetidas vezes de uma amostra sob as mesmas condições de teste em um curto intervalo de tempo. A reprodutibilidade refere-se à precisão entre laboratórios. Enquanto, a precisão intermediária expressa a precisão intralaboratório observando as variações em diferentes dias e analistas(RIBANI; BOTTOLI *et al.*, 2004).

3.6.2 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação. Essa relação matemática, muitas vezes, pode ser expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica. Embora somente dois pontos definam uma reta, na prática as linhas devem ser definidas por no mínimo cinco pontos(RIBANI; BOTTOLI *et al.*, 2004).

3.6.3 Limites de Detecção e Quantificação

O limite de detecção de um método representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada com um certo limite de confiabilidade. Pode ser calculado na prática como a concentração que produz um sinal três vezes maior que o nível de ruído médio medido com o branco ou solução controle (DE BARROS, 2002).

O limite de detecção (LD) é calculado pela divisão do desvio padrão dos coeficientes lineares das três curvas de calibração dos ensaios de linearidade, pelas médias dos coeficientes angulares das respectivas curvas multiplicado por 3 de acordo com a equação seguinte (DE BARROS, 2002):

$$LD = \frac{3DP}{\bar{a}}$$

Onde:

DP = Desvio Padrão médio da menor concentração

\bar{a} = Médias dos coeficientes angulares.

O limite de quantificação (LQ) corresponde à menor concentração da substância em exame que pode ser medida com precisão e exatidão. Para se realizar o LD e LQ é considerado o desvio padrão da reta com relação à absorvância do primeiro nível de concentração nas três curvas de calibração e seus coeficientes angulares (inclinação da reta). É considerada a razão de 10 vezes da linha da base, de acordo com a equação abaixo:

$$LQ = \frac{10DP}{\bar{a}}$$

Onde:

DP = Desvio Padrão médio da menor concentração.

\bar{a} = Médias dos coeficientes angulares

3.6.4 Robustez

Robustez é a capacidade do método de não ser afetado por uma pequena e deliberada modificação em seus parâmetros, indica a sua confiabilidade durante o seu

uso, podendo assim, avaliar a resistência que um método analítico tem à mudança de resposta quando se introduzem pequenas variações (ICH, 2005).

As mudanças introduzidas refletem as alterações que podem ocorrer quando um método é transferido para outros laboratórios, analistas ou equipamentos dentre eles podemos citar: marca de solvente, tipo e tempo de agitação, solventes, presença ou ausência de luz, estabilidade da amostra em relação ao tempo de preparação, entre outros (RIBANI; BOTTOLI *et al.*, 2004).

3.6.5 Exatidão

A exatidão do método representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um aceito como referência. Sempre é considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança (ou seja, aparece sempre associada a valores de precisão). Estes limites podem ser estreitos em níveis de concentração elevados e mais amplos em níveis de traços. O número de ensaios varia segundo a legislação ou diretriz adotada e também com as características da pesquisa. A ICH estabelece que um mínimo de nove determinações envolvendo um mínimo de três diferentes níveis de concentração deve ser obedecido. Por exemplo, ensaios em triplicata para três níveis de concentração. Esta recomendação é também adotada pela ANVISA (RIBANI; BOTTOLI *et al.*, 2004).

A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente de acordo com a equação abaixo:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração Média}}{\text{Concentração Teórica}} \times 100 \%$$

Em outras palavras, a exatidão expressa o quanto a média dos resultados está o mais próxima possível do real.

CAPÍTULO 1

β -CICLODEXTRINAS MODIFICADAS SOLÚVEIS EM ÁGUA: UMA REVISÃO

β-CICLODEXTRINAS MODIFICADAS SOLÚVEIS EM ÁGUA: UMA REVISÃO

Rian Felipe de Melo Araújo¹; Edson Cavalcanti da Silva Filho²; José Lamartine Soares Sobrinho³; Lívio César Cunha Nunes¹;

¹Departamento de Farmácia – UFPI, Teresina, Piauí, Brasil

²Departamento de Engenharia de Materiais – UFPI, Teresina, Piauí, Brasil

³Departamento de Ciências Farmacêuticas – UFPE, Teresina, Piauí, Brasil

RESUMO:

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos que possuem a capacidade de formar complexos de inclusão com moléculas lipofílicas, melhorando sua solubilidade em água. As ciclodextrinas naturais (α , β e γ) possuem uma solubilidade aquosa reduzida, podendo originar a precipitação de complexos de inclusão formados em meio aquoso, o que limitaria a função destas moléculas como veículos de fármacos. O objetivo desta revisão é epilogar as diferentes β -ciclodextrinas modificadas estruturalmente para reverter esse entrave da solubilidade, assim comodiscutir suas aplicações em diferentes áreas, em especial na liberação de fármacos. O artigo realça as β -ciclodextrinas modificadas quimicamente através da substituição das hidroxilas pelos mais variados radicais, além dos polímeros criados, utilizando a epicloridrina como agente de ligação cruzada. Por fim, algumas considerações importantes sobre ciclodextrinas contendo dextran e celulose também são feitas.

Palavras-chave: Ciclodextrina; ciclodextrinas modificadas; dextran; celulose; epicloridrina

ABSTRACT:

Cyclodextrins are cyclic oligosaccharides which have the ability to form inclusion complexes with lipophilic molecules, improving its water solubility. Natural cyclodextrins (α , β and γ) have a low aqueous solubility which can cause precipitation of inclusion complexes formed in an aqueous medium, which limits the function of these molecules as drug carriers. The objective of this review is to explore different structurally modified β -cyclodextrins to reverse this impairment of solubility, as well as discuss their applications in different areas, especially in drug delivery. The article highlights the chemically modified β -cyclodextrins by replacing the hydroxyl groups by various radicals in addition of polymers created with cyclodextrin, using epichlorohydrin as a crosslinking agent. Finally, some important considerations on cyclodextrins containing dextran and cellulose are also made.

Key-words: cyclodextrin; modified cyclodextrins; dextran; cellulose; epichlorohydrin

INTRODUÇÃO:

Ciclodextrinas (CDs) são ferramentas multifuncionais de inigualável importância que têm sido extensamente utilizadas pela indústria farmacêutica (GIDWANI;VYAS, 2014). Classificam-se como oligossacarídeos com seis a oito unidades de glicose unidas por ligações α -1,4-glicosídicas. A cavidade interna hidrofóbica favorece a complexação de um grande número de moléculas (SZEJTLI, 1998).

As CDs podem ser produzidas através da degradação enzimática do amido derivado da batata, milho, arroz, ou outras fontes(ALEXANIAN et al., 2008). Este processo foi descoberto ocasionalmente pelo cientista francês Villiers em 1981, que então isolou o produto cristalino obtido a partir do processo enzimático bacteriano. Tal produto foi chamado de “cellulosine” devido ao comportamento químico similar ao da celulose, sendo resistente à hidrólise e não possuindo poder redutor. Passados 10 anos, o microbiologista austríaco Schardinger mostrou que a bactéria *Bacillus macerans* seria o responsável pela produção de dois subtipos de CDs (α e β). Além disso, ele identificou a “cellulosine” como sendo a β -ciclodextrina (VAN DE MANAKKER et al., 2009).

Nas décadas seguintes, mais subtipos de ciclodextrinas foram descobertas e suas estruturas químicas elucidadas. Na década de 1970, avanços na biotecnologia foram responsáveis por melhorar a produção de CDs (BIWER et al., 2002). Técnicas de engenharia genética foram responsáveis pela síntese e isolamento de enzimas específicas, como a ciclodextrina-glicosiltransferase (CGTase), que produzem os diferentes subtipos de CDs (PLOU et al., 2002). Atualmente, o uso dessas enzimas bem como o progresso nos processos de purificação têm sido responsáveis pela produção em larga escala e pelo nível de pureza dos mais diferentes subtipos de ciclodextrinas (LI et al., 2007).

Devido a fatores estéricos, não existem ciclodextrinas com menos de seis unidades de glicose. As mais comumente usadas são os subtipos α CD, β CD e γ CD (Figura 1), que consistem em 6, 7 e 8 unidades de glicose, respectivamente (ARIMA et al., 2011). Suas estruturas tridimensionais assemelham-se a cones-truncados. Os grupos hidroxilas das ciclodextrinas estão localizados em sua superfície externa, isto é, as hidroxilas primárias na extremidade mais estreita enquanto as hidroxilas secundárias na extremidade oposta, mais larga (ALVIRA et al., 1997). Tal característica torna a superfície externa das CDs solúvel em água, mas simultaneamente gera uma cavidade

interna que é relativamente hidrofóbica. Por causa disso, as CDs podem, parcialmente ou totalmente, acomodar moléculas lipofílicas de tamanho adequado e peso molecular baixo, ou até mesmo polímeros. (LOFTSSON;DUCHENE, 2007).

A principal força motriz responsável pela formação dos complexos de inclusão, onde um composto hospeda em seu interior outro composto, são as interações hidrofóbicas e de Van der Waals, embora outros fatores também influenciem como a tensão superficial do solvente e as ligações de hidrogênio das hidroxilas presentes (HEMBURY et al., 2000). Além de complexos unitários entre uma molécula de ciclodextrina e uma molécula hóspede (Figura 2), outras estequiometrias têm sido identificadas, ou seja, uma molécula hóspede encapsulada em mais de uma molécula de ciclodextrina (hóspede/CD – 1:2) ou ordens mais baixas, onde uma de CD interage com múltiplas moléculas hóspedes (LOFTSSON et al., 2004).

As ciclodextrinas possuem uma habilidade especial de complexar-se com fármacos, permitindo o aumento da solubilidade destes, assim como diminuindo o gosto desagradável, aumentando a estabilidade e diminuindo a toxicidade. Uma das aplicações mais comuns das ciclodextrinas citadas na literatura é o aumento da biodisponibilidade de fármacos insolúveis em água (CARRIER et al., 2007).

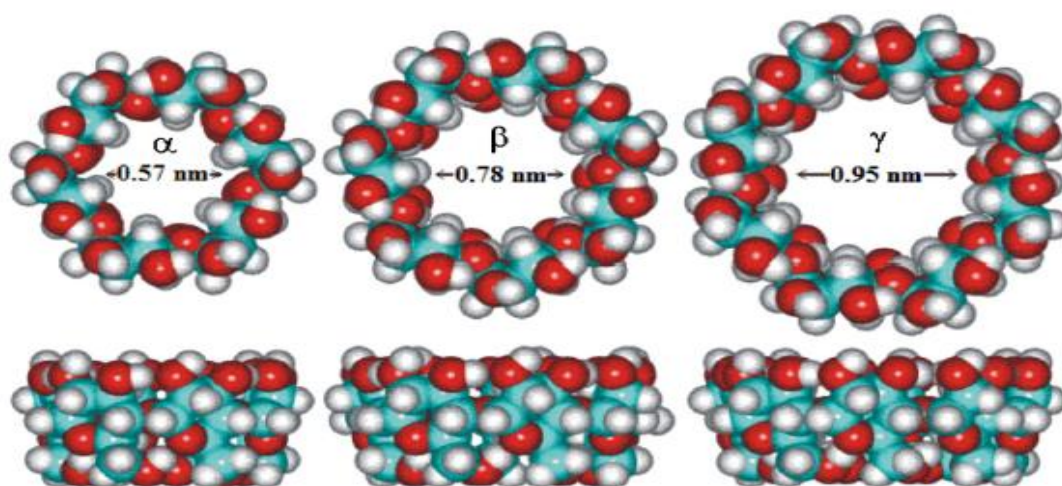


Figura 1: Estrutura química tridimensional da α -CD, β -CD e γ -CD

Fonte: STALIN et al., 2014

Na atual situação de desenvolvimento de fármacos, o alto rendimento obtido por técnicas de rastreamento usadas na identificação de componentes ativos permite

observar que a grande maioria das potenciais moléculas possui alta lipofilicidade, baixa solubilidade aquosa e baixa taxa de dissolução (GRIBBON;ANDREAS, 2005).

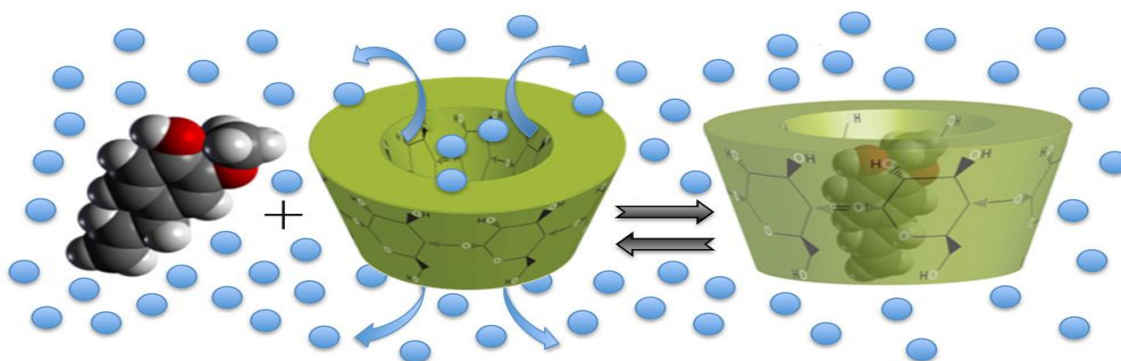


Figura 2: Representação esquemática da formação do complexo de inclusão na taxa de 1:1 entre a CD e a molécula hospedeira

Fonte: MURA, 2014

Há muitas décadas, as CDs são usadas como carreadores de fármacos para o aumentada solubilidade, estabilidade e taxa de dissolução, além da diminuição dos efeitos adversos (HEDGES, 1998). Entretanto, tanto a baixa solubilidade quanto a toxicidade das CDs limitam sua aplicação em formulações farmacêuticas. A citotoxicidade *in vivo* das CDs, e em particular da β -CDs, ocorre devido à ligação e extração do colesterol presente em membranas celulares, alterando assim as propriedades de permeabilidade e provocando processos de hemólise (LI et al., 2004).

Para contornar estas limitações, vários derivados das CDs têm sido desenvolvidos. Entre elas, destacam-se as CDs metiladas, hidroxialquiladas e iônicas. Os complexos macromoleculares com outros polímeros merecem destaque especial por promoverem a melhora da solubilidade aquosa através da quebra das ligações de hidrogênio intermoleculares presentes nas hidroxilas secundárias das CDs originais. Tais ligações são as principais responsáveis pela baixa solubilidade das ciclodextrinas básicas (α , β e γ)(SANGWAI;VAVIA, 2013).

O objetivo desta revisão é fornecer uma visão geral das principais alterações feitas nas ciclodextrinas que aumentam sua solubilidade, assim como seus méritos e desvantagens. Além disso, os exemplos de cada ciclodextrina modificada serão ilustrados por meio de exemplos específicos da literatura.

MATERIAIS E MÉTODOS:

Como método para definir os elementos fundamentais da questão da pesquisa e da construção da pergunta para a busca bibliográfica de evidências, fez-se uso da estratégia PICO (Paciente, Intervenção, Comparação e *Outcomes*).

Para ser incluído na análise, o estudo deve avaliar a aplicação da β -ciclodextrina em formulação oral para melhorar sua solubilidade em água e, conseqüentemente, melhorar a biodisponibilidade oral do fármaco administrado. Além disso, foram considerados apenas aqueles cuja publicação ocorreu entre os anos de 2004 e 2014. Estudos foram excluídos nos casos de duplicidade em outra base de dados, se o título e/ou resumo não tratarem sobre o tópico pesquisado. Também foram excluídas as notas ou cartas de editores, livros, dissertações ou teses, além de artigos cujo e-mail para contato não estivesse disponível.

A revisão sistemática foi realizada por meio de uma ampla pesquisa nas bases de dados eletrônicas PubMed, *Web of Science* e Scopus. Os termos usados " *β -cyclodextrin*" e "*inclusion complex*" e "*water soluble*" e se basearam nos descritores MeSH. Estes foram interconectados com operador de pesquisa "*AND*". A organização dos resultados obtidos foi realizada através do software de gerenciamento de referências EndNote-X5.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Um total de artigos 137 foram obtidos do Pubmed, 8 do *Web of Science* e 322 do Scopus. Após a exclusão das duplicatas, 174 puderam ser integrados na uma revisão sistemática. Após uma reavaliação, aplicando os critérios de inclusão e exclusão, o número de estudos elegíveis que integram a revisão sistemática diminuiu para artigos 112.

3.1 Artigos:

3.1.1 Ciclodextrinas modificadas quimicamente:

As ciclodextrinas naturais, devido à rigidez de suas moléculas e limitações do tamanho da cavidade, assim como a presença de grupos funcionais, são alvos de intensas pesquisas que visam sua modificação molecular (FUKUDOME et al., 2005).

A ciclodextrina natural mais utilizada é o β -ciclodextrina devido ao seu grande número de grupos de hidroxilas (sete na cavidade primário e catorze na secundária), que são pontos onde as reações podem ocorrer, permitindo produzir mudanças estruturais na funcionalização dos anéis macrocíclicos (SALTÃO;VEIGA, 2001)

As modificações se dão preferencialmente e de forma seletiva nas hidroxilas presentes nos C-2, C-3 e C-6 das unidades de glicose, sendo que a hidroxila da posição 6 situa-se na abertura estreita do cone enquanto que as hidroxilas 2 e 3 na abertura mais larga (GIAMMONA et al., 2006). Assim, as CDs possuem três hidroxilas livres em cada molécula de glicose mesmo após a formação das ligações glicosídicas α -(1-4), conferindo características nucleofílicas a estas moléculas. Isso se deve à pré-disposição a formar alcóóxido e pelo grande número de hidroxilas presentes em cada macrociclo (DODZIUK, 2002).

A variedade de hidroxilas presentes nas ciclodextrinas oferece aos pesquisadores diferentes sítios de modificação, permitindo assim alterar diferentes características e propriedades, que vão desde o ajuste da solubilidade até a mimetização de enzimas (ALLABASHI et al., 2007). No entanto, estas diferentes hidroxilas competem com o reagente, tornando difícil o processo de modificação seletiva, além da possibilidade de complexação com próprio reagente (YAMAMOTO et al., 1989).

Para contornar tal situação, deve-se observar que as reações de derivatização são determinadas tanto por fatores estereoquímicos quanto por estatísticos (DODZIUK, 2002). As hidroxilas da posição 6 são as mais básicas, logo é também as mais nucleofílicas, enquanto que as da posição 2 são as mais eletrofílicas e portanto, as mais ácidas. A hidroxila da posição 3 é a mais inacessível (ALLABASHI; ARKAS *et al.*, 2007).

Com as modificações realizadas nas ciclodextrinas, as propriedades físicas, químicas e biológicas podem ser alteradas. A hidroxialquilação ou a metilação da β -CD, por exemplo, são usadas para aumentar a solubilidade em água e em solventes polares. Isso se deve à formação de uma mistura de produtos quimicamente relacionados e que apresentam diferentes graus de substituição. Além disso, a presença de substituintes nas hidroxilas previne sua cristalização, tornando o produto mais solúvel, devido à menor interação intermolecular entre os grupos OH^- vizinhos (SABADINI et al., 2008).

Um aspecto interessante que deve ser ressaltado é a relação entre a modificação realizada e sua dissolução dependente da temperatura. A 2,6-dimetil- β -CD apresenta,

por exemplo, uma dissolução exotérmica em água, onde o aumento da temperatura causa diminuição da solubilidade. Além disso, apresentam também pontos de turbidez, se assemelhando a surfactantes não iônicos(JANSOOK;LOFTSSON, 2009).

Um dos aspectos mais importantes e que devem ser minuciosamente controlado é o grau de substituição, pois poderá ser responsável pelo aumento da solubilidade, ou pela diminuição da capacidade de complexação devido ao impedimento estérico (MIYAUCHI;HARADA, 2004).

As características de inclusão das ciclodextrinas naturais podem ser alteradas através da introdução de substituintes nos grupamentos hidroxilas presentes. A dimetil- β -ciclodextrina geralmente apresenta melhores propriedades de complexação devido ao tamanho da cavidade polar ser mais adequado do que a da β -ciclodextrina (DUCHÊNE et al., 1999)

A solubilidade aquosa das CDs naturais é muito mais baixa do que a das dextrinas acíclicas comparáveis. Isto se deve à forte ligação de hidrogênio intramolecular na rede cristalina (BREWSTER;LOFTSSON, 2007). A fim de reverter esta limitação, algumas CDs modificadas solúveis em água já estão disponíveis no mercado farmacêutico, como por exemplo: derivados metilados de β -CD; 2-hidroxipropil- β -CD; e β -CD sulfobutiladas ramificadas (glucosil - e maltosil- β -ciclodextrina; β -CD acetiladas e CDs sulfatados), dentre outras (MACHÍN et al., 2012).

A inserção de substituintes nas hidroxilas das ciclodextrinas naturais leva ao rompimento da estabilidade do sistema, através da quebra das ligações de hidrogênio, levando a um aumento da solubilidade aquosa. Seria de se supor que a substituição de átomos de hidrogênio das hidroxilas por grupamentos metilas, lipofílicos, não aumentaria a solubilidade em água e sua hidrofilicidade. Entretanto, ocorre exatamente o contrário a solubilidade após a metilação aumenta consideravelmente(BREWSTER;LOFTSSON, 2007).

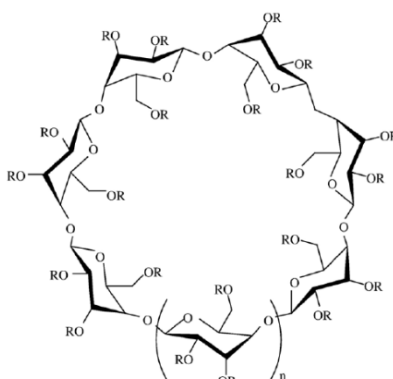
Esta reação de metilação de ciclodextrinas pode acontecer em 2 ou 3 grupamentos hidroxilas disponíveis. No caso da dimetil- β CD (DM β CD) a metilação ocorre em todos os grupos de hidroxilas primários e secundários da posição C-2 (ALEXANIAN; PAPADEMOU *et al.*, 2008). Já no caso da trimetil- β CD, a metilação ocorre também nas hidroxilas secundárias da posição C-3. No entanto, o que ocorre de forma mais comum é uma metilação aleatória com um grau de substituição médio por unidade de glicopiranoose de 1,8 (SZENTE;SZEJTLI, 1999).

A derivação com grupos hidroxipropil ocorre de uma forma puramente aleatória nas hidroxilas primárias ou secundárias, originando uma mistura amorfa, sendo a 2-HP- β -CD a mais utilizada. Quanto às CDs sulfobutiladas, a sulfobutileter- β -ciclodextrina (SBE- β -CD) com um grau de substituição de aproximadamente 6,8 predomina entre a preferência dos pesquisadores, pois possui aproximadamente 7 grupos carregados negativamente, contrabalançados pelos íons sódio, que contribuem para um aumento da sua solubilidade (ZIA et al., 2001).

Os métodos de modificação seletiva podem ser divididos em três categorias: o método “inteligente”, onde a estrutura química da CD é explorada a fim de se obter o produto desejado pela menor rota de síntese; o método “longo”, onde uma série de etapas de proteção e desproteção devem ocorrer para se atingir seletivamente as posições desejadas de modificação; e o método “*sledgehammer*” (“marreta” em português), onde as ciclodextrinas reagem indiscriminadamente, formando misturas de produtos e em seguida a separação por métodos cromatográficos (KHAN et al., 1998).

A síntese do 2-tosil- β -ciclodextrina, utilizando ciclodextrina e tosilato de m-nitrofenil, exemplifica a primeira categoria. Neste, a propriedade de complexação da ciclodextrina é aproveitada para direcionar o grupo tosil para a cavidade secundária, assim evita-se a complexação com o lado primário. Como exemplo da segunda categoria, tem-se o processo de alquilação da ciclodextrina, que requer: (1) a proteção do lado primário com o grupo silanol, (2) proteção do lado secundário com o grupo acetil, (3) desilanição do lado primário, (4) reação de uma hidroxila primária com um haleto de alquila, e finalmente (5) a desproteção do lado secundário para se chegar ao produto desejado. Nesta estratégia, cada reação é cuidadosamente planejada para se obter um rendimento elevado e separar facilmente os produtos. A terceira categoria pode ser exemplificada pela reação de ditosilação do lado secundário da ciclodextrina. Neste exemplo, o cloridrato de tosilato reage com a ciclodextrina para gerar uma mistura de produtos, que poderão ser separados por HPLC de fase reversa (KHAN; FORGO *et al.*, 1998). Assim, considerando as três categorias, a primeira estratégia é a mais produtiva e mais indicada para uma reação de derivatização das ciclodextrinas. As diferentes ciclodextrinas modificadas encontradas comercialmente podem ser observadas na Tabela 1.

Tabela 1: Propriedades estruturais e físico-químicas de β -ciclodextrinas de interesse farmacêutico.



Ciclodextrinas	R=H ou	P.M ^b (Da)	Solubilidade em água (mg/mL)
β-Ciclodextrina (βCD)	H	1135	18,5
Metil β-ciclodextrina (MeβCD)	$^-CH_3$	1312	>500
Dimetil β-ciclodextrina (DMβCD)	$-CH_3$	1331	>500
Trimetil β-ciclodextrina (TMβCD)	$-CH_3$	1430	310
Dietil β-ciclodextrina (DEβCD)	$-CH_3CH_2$	1527	0,05
Trietil β-ciclodextrina (TEβCD)	$-CH_3CH_2CH_2$	1723	0,018
2-Hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPβCD);	$^-CH_2CHOHCH_3$	1400	>600
Sulfobutíler β-ciclodextrin sódico (SBEβCD)	$^-(CH_2)_4SO_3^- Na^+$	2163	>500
Glicosil β-ciclodextrina (G₁βCD)	Glicosil ⁻	1297	>900
Diglicosil β-ciclodextrina ((G₁)₂βCD)	Glicosil ⁻	1459	1400
Maltosil β-ciclodextrin (G₂βCD)	Maltosil ⁻	1459	>500
Dimaltosil β-ciclodextrin (G₂)₂βCD)	Maltosil ⁻	1789	>500

^bP.M: Peso Molecular

^cSolubilidade em água em aproximadamente 25 °C.

Fonte: Adaptado de BREWSTER;LOFTSSON, 2007

3.1.2 Polímeros de ciclodextrinas

Durante o século XIX, o uso de β -CD era limitado devido a sua reduzida solubilidade. Ao longo do século XXI, e de forma mais intensa, estudos de modificação das ciclodextrinas, visando o aumento da solubilidade aquosa, permitiram sua maior aplicação na área farmacêutica e biomédica (DEVESWARAN et al., 2012).

Os polímeros são utilizados como componentes ternários em sistemas CD/fármaco (LOFTSSON; BREWSTER, 2012). A modificação com polímeros, em geral, leva a diminuição da cristalinidade, melhorando a solubilidade das CDs. Os polímeros mais utilizados na modificação estão exemplificados na Tabela 2.

As ciclodextrinas podem se ligar covalentemente a vários polímeros para modificar suas propriedades físico-químicas, a fim de melhorar a biocompatibilidade, capacidade de liberação de fármacos e solubilidade intrínseca. A literatura mostra que várias modificações já foram realizadas com polímeros lineares, ramificados e dendríticos. Tais polímeros foram utilizados para desenvolver componentes supramoleculares em escalas nano, micro e macro (ZHANG; MA, 2013).

Normalmente, duas abordagens são as mais utilizadas para sintetizar polímeros ligados à CD. A primeira é a polimerização direta dos monômeros contendo CDs ou a copolimerização com outros monômeros utilizados para sintetizar polímeros de acrilato-CDs (MUNTEANU et al., 2008). A segunda estratégia refere-se ao acoplamento de CDs funcionalizadas como alvos para proteínas e seus derivados, que normalmente apresentam grupos funcionais (CHARLOT; AUZÉLY-VELTY, 2007).

As primeiras ciclodextrinas modificadas com polímeros a serem desenvolvidas utilizavam reações de ligação cruzada com epícloridrina (EPH). Esse tipo de ligação ocorre de forma aleatória e origina polímeros mais solúveis em água, como por exemplo, a β CD-EPH de ligação cruzada, que possui solubilidade aquosa superior à β -CD (DAVIS; BREWSTER, 2004)

A utilização da EPH como agente de ligação cruzada para produzir CDs modificadas ocorre há mais de 50 anos e é fácil de realização. A epícloridrina (1-cloro-2,3-epoxipropano) é o agente de ligação cruzada usado na química de polissacarídeos mais comum. Isso ocorre devido aos dois grupos funcionais ativos, um grupo epóxido e um grupo cloroalquila, que podem formar ligações com as hidroxilas das β CDs (CRINI; PEINDY, 2006).

Tabela 2: Polímeros usados como componentes ternários em sistemas CD/fármacos.

Polímero	Fármaco	Tipo de ciclodextrina	Referência
Quitosana	Finasterida	HP β CD	(ZOELLER et al., 2012)
Hidroxiopropilmetil-celulose (CMC)	Nimesulida	HP β CD β CD M β CD	(ALEXANIAN; PAPADEMOU <i>et al.</i> , 2008) (JANSOOK ;LOFTSSON, 2009) (SAMI et al., 2010)
Plasdone	Itraconazol Gemfibrozila	β CD	(KUMARI et al., 2010)
Polietilenoglicol	Ácido Salicílico Nimesulida	β CD HP β CD	(HIGASHI et al., 2011) (ALEXANIAN; PAPADEMOU <i>et al.</i> , 2008)
Polivinilpirrolidona	Gemfibrozila Finasterida Nimesulida	β CD HP β CD β CD	(SAMI; PHILIP <i>et al.</i> , 2010) (ALEXANIAN; PAPADEMOU <i>et al.</i> , 2008)
Carboximetil-celulose	Nimesulida	β CD HP β CD	(ALEXANIAN; PAPADEMOU <i>et al.</i> , 2008)

A reação de polimerização para formar o composto β CD-EPH pode ocorrer através de uma única etapa de condensação. Normalmente, o meio em que ocorre esta reação é alcalino, resultando em produtos que contém espécies monoméricas e porções poliméricas (DEVESWARAN; PUPPALA et al., 2012). Em um reator termostático do

tipo *vessel*, uma mistura de β -CD (aproximadamente 20g) com uma solução de NaOH a 50% (32 mL) é agitada por 24 horas à 25°C. A mistura é então aquecida a 30°C e 24 mL de EPH é adicionado rapidamente e agitado vigorosamente com agitador magnético por 6h na temperatura de 30°C. Finalmente, a reação é interrompida com a adição de acetona. Em seguida, a solução é neutralizada com ácido clorídrico 6N e filtrado para eliminar o sal e componentes de baixo peso molecular que ainda podem estar presentes. O processo pode ser afetado pela mudança na quantidade e concentração de hidróxido de sódio, ciclodextrina e epicloridrina. A solução é evaporada e precipitada pela adição de álcool desidratado. O produto obtido é então seco, macerado e finalmente granulado em partículas do tamanho de 1 a 2 mm de diâmetro(VAN DE MANAKKER; VERMONDEN et al., 2009).

Os efeitos positivos da β CD-EPH na solubilidade e biodisponibilidade já foram demonstrados em inúmeros estudos (LOFTSSON et al., 1994; DUCHÊNE; PONCHEL et al., 1999; SZENTE; SZEJTLI, 1999). Nie e colaboradores (2011) avaliaram o potencial uso da β CD-EPH para aumentar as taxas de dissolução e biodisponibilidade da glipizida, fármaco hipoglicemiante utilizado no tratamento de diabetes mellitus tipo II. A baixa solubilidade era o principal fator limitador da absorção no TGI. Quando comparado com a complexação entre glipizida e β -CD, ao complexar com β CD-EPH houve um aumento de 36,65 vezes, enquanto que a solubilidade aumentou apenas 20,87 vezes com a complexação com HP β CD (NIE et al., 2011). Em outro estudo conduzido por Daveswaran e colaboradores (2012), observou-se aumento da solubilidade do aceclofenaco, utilizando β CD-EPI, quando comparado com β -CD (DEVESWARAN; PUPPALA et al., 2012).

O aumento da solubilidade em água, redução da toxicidade, aumento das taxas de complexação do fármaco têm sido obtidas, de forma otimizada, através da ligação cruzada entre EPH e CDs na presença de compostos catiônicos ou aniônicos. Em estudo desenvolvido por Li e colaboradores (2004), observou-se que polímeros formados pela ligação cruzada entre CDs e EPH na presença de cargas positivas diminuíram a toxicidade do complexo de inclusão formado com naproxeno e melhoraram sua aplicação como carreador de fármacos (LI; XIAO et al., 2004).

3.1.3 Ciclodextrinas contendo celulose

Celulose é o polímero mais abundante do planeta, além de ser considerada uma matéria-prima não-tóxica, biocompatível e com ampla e promissora aplicação industrial (LINDMAN et al., 2010). Celulose e suas modificações têm sido consideradas polímeros-hóspedes para o delineamento de novos complexos de inclusão (GUO et al., 2013). Mais recentemente, observou-se que a metilcelulose, devido ao seu caráter hidrofóbico, foi capaz de penetrar na cavidade hidrofóbica de β CDs hospedeiras formando polímeros supramoleculares anfifílicos (DU et al., 2012).

Em estudo desenvolvido por Guo e colaboradores (2013), observou-se que carbamatos de ciclodextrinas, sintetizadas a partir da ciclodextrina e da uréia, podiam formar micelas com derivados da celulose. Essas estruturas supramoleculares foram caracterizadas e avaliadas, utilizando acetato de prednisona. Concluiu-se assim que a solubilidade aquosa do complexo aumentou consideravelmente (GUO; JIA et al., 2013).

Uma importante questão com os derivados da celulose é a sua solubilidade. É de se esperar que com a incorporação na CD, a solubilidade aquosa de ambas aumente devido ao aumento da área hidrofílica e a diminuição da associação entre moléculas de celulose por impedimento estérico (LINDMAN; KARLSTRÖM et al., 2010).

Medronho, Andrade e colaboradores (2013) desenvolveram macromoléculas resultantes da associação entre α -celulose e β -ciclodextrinas. Para isto, os pesquisadores procederam imergindo α -celulose em uma mistura de β -ciclodextrinas e ácido 1,2,3,4-butano-tetracarboxílico (BTCA) em condições ácidas. A reação ocorreu a 180°C durante 30 minutos e em seguida, procedeu-se com as etapas de lavagem até a obtenção da pureza desejada (Figura 3). Observou-se que a estrutura da macromolécula final depende das concentrações da celulose e da ciclodextrina, porém não depende do BTCA por causa da sua baixa massa molecular. Como conclusão, foi observado um aumento da solubilidade do composto macromolecular quando comparado com os componentes de forma isolada (MEDRONHO et al., 2013).

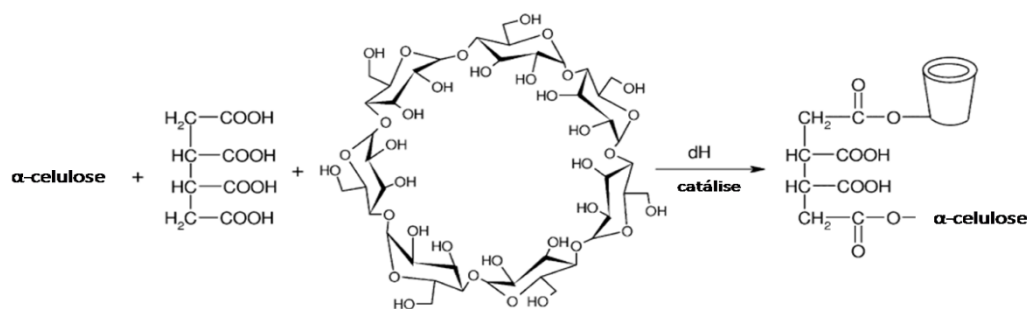


Figura 3: Representação esquemática da reação de esterificação entre a celulose e CDs via BTCA

Fonte: Adaptado de MEDRONHO, ANDRADE et al. (2013)

3.1.4 Ciclodextrina contendo dextrana

Como já mencionado, embora as β CDs sejam hidrofílicas, assim como seus complexos, sua solubilidade aquosa é limitada. A razão para esse fato está associada a alta energia de rede cristalina, bem como a formação de ligações de hidrogênio intermolecular que comprometem a interação com moléculas de água (LOFTSSON; BREWSTER, 2010).

Além disso, a presença de uma pequena quantidade de polímeros hidrofílicos, como a dextrana, ou de sais específicos (p.ex: acetato ou salicilato de sódio) juntos com a β CDs demonstrou estabilizar o complexo fármaco/CD através do aumento da interação ou pela formação de agregados solúveis em água (LOFTSSON; BREWSTER, 2012). Também tem sido descrito que polímeros hidrofílicos podem induzir estados de super saturação - aumento da concentração do fármaco molecularmente dissolvida (DI CAGNO; LUPPI, 2013).

Dextrana é um polímero de cadeia linear que consiste de ligações α -1,6-glicosídicas entre moléculas de glicose com as ramificações através de ligações α -1,3. Possuem alto peso molecular (70 kDa) e podem ser utilizados em soluções parenterais assim como formulações oftálmicas (WINTGENS et al., 2011)

De acordo com Layre, Volet e colaboradores (2009), dextranas podem ser utilizados para modificar as ciclodextrinas, através de ligações entre os grupamentos

azida e ligações 1,3-ciclo-adição. O produto obtido foi consideravelmente mais solúvel do que a CD originária (LAYRE et al., 2009).

As propriedades e capacidades de agregação dos complexos macromoleculares formados entre ciclodextrinas e dextrana também foram examinadas por Nielsen e Steffensen (2009). Observou-se que as formas nano-particuladas originadas da poli-inclusão de complexos apresentam-se mais solúveis em água (NIELSEN et al., 2009).

Resultados de análises termodinâmicas evidenciam que a ligação da cadeia de dextrana com moléculas de CDs aumentam a capacidade da macromolécula de se solubilizar e solubilizar fármacos poucos solúveis e não afetam a estabilidade do complexo, permitindo assim que o polímero dextrana- β CDs seja uma interessante alternativa para a administração local e sistêmica de fármacos poucos solúveis (DI CAGNO et al., 2014).

A auto-associação de ciclodextrinas naturais tem sido observada e caracterizada, embora as informações sobre seus derivados solúveis em água ainda sejam um pouco limitadas (GONZALEZ-GAITANO et al., 2002; MESSNER; KURKOV; BREWSTER; et al., 2011). Complexos de inclusão de CDs derivadas hidrofílicas com fármacos hidrofóbicos também se auto-associam para formar nanopartículas que podem ser utilizadas no transporte e liberação de fármacos (LOFTSSON et al., 2002; MESSNER; KURKOV; FLAVIÀ-PIERA; et al., 2011).

Entretanto, é sabido que soluções aquosas dessas nanopartículas estão em equilíbrio dinâmico com formas não agregadas, onde existem CD e fármacos livres, e que eles podem prejudicar a diluição e filtração. É também conhecido que certos polímeros podem estabilizar os efeitos da auto-associação de nanopartículas mas a estabilização é insuficiente para a maioria dos propósitos (MESSNER; KURKOV; FLAVIÀ-PIERA et al., 2011)

Polímeros baseados em CDs, nanogéis, e nanoesponjas também têm sido sintetizadas e avaliadas como sistemas de liberação de fármacos (ZHANG;MA, 2010; ANSARI et al., 2011;MOYA-ORTEGA et al., 2012).

CONCLUSÃO:

Ciclodextrinas despontam no cenário farmacêutico atual como um excipiente de potencial aplicação na melhoria das propriedades terapêuticas dos medicamentos. No

entanto, a baixa solubilidade aquosa observada na β CD, a mais utilizada, limita sua utilização como carreador de fármacos.

Visando contornar esta limitação, muitos estudos têm sido desenvolvidos para a modificação da estrutura química das CD. Observou-se que tais modificações ocorrem principalmente nas hidroxilas presentes e podem ser caracterizadas pela adição de grupamentos mais hidrofílicos ou pela conjugação com outros polímeros que melhorarão essa característica físico-química.

REFERÊNCIAS:

ALEXANIAN, C. et al. Effect of pH and water-soluble polymers on the aqueous solubility of nimesulide in the absence and presence of β -cyclodextrin derivatives. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 60, n. 11, p. 1433-1439, 2008.

ALLABASHI, R. et al. Removal of some organic pollutants in water employing ceramic membranes impregnated with cross-linked silylated dendritic and cyclodextrin polymers. **Water research**, v. 41, n. 2, p. 476-486, 2007.

ALVIRA, E. et al. Molecular modelling study of β -cyclodextrin inclusion complexes. **Chemical physics letters**, v. 271, n. 1, p. 178-184, 1997.

ANSARI, K. et al. Paclitaxel loaded nanospheres: in-vitro characterization and cytotoxicity study on MCF-7 cell line culture. **Current drug delivery**, v. 8, n. 2, p. 194-202, 2011.

ARIMA, H. et al. Recent findings on safety profiles of cyclodextrins, cyclodextrin conjugates, and polypseudorotaxanes. **Cyclodextrins in Pharmaceuticals, Cosmetics, and Biomedicine: Current and Future Industrial Applications**, p. 91-122, 2011.

BIWER, A. et al. Enzymatic production of cyclodextrins. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, n. 6, p. 609-617, 2002.

BREWSTER, M.E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Advanced drug delivery reviews**, v. 59, n. 7, p. 645-666, 2007.

CARRIER, R.L. et al. The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. **Journal of Controlled Release**, v. 123, n. 2, p. 78-99, 2007.

CHARLOT, A.; AUZÉLY-VELTY, R. Synthesis of novel supramolecular assemblies based on hyaluronic acid derivatives bearing bivalent β -cyclodextrin and adamantane moieties. **Macromolecules**, v. 40, n. 4, p. 1147-1158, 2007.

CRINI, G.; PEINDY, H.N. Adsorption of CI Basic Blue 9 on cyclodextrin-based material containing carboxylic groups. **Dyes and pigments**, v. 70, n. 3, p. 204-211, 2006.

DAVIS, M.E.; BREWSTER, M.E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 12, p. 1023-1035, 2004.

DEVESWARAN, R. et al. Development of a novel water-soluble β -cyclodextrin epichlorohydrin polymer complex to improve aqueous solubility. **Journal of Chemical Biological and Physical Science**, v. 2, p. 325-330, 2012.

DI CAGNO, M.; LUPPI, B. Drug “supersaturation” states induced by polymeric micelles and liposomes: a mechanistic investigation into permeability enhancements. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 4, p. 775-780, 2013.

DI CAGNO, M. et al. β -Cyclodextrin-dextran polymers for the solubilization of poorly soluble drugs. **International journal of pharmaceuticals**, v. 468, n. 1, p. 258-263, 2014.

DODZIUK, H. Rigidity versus flexibility. A review of experimental and theoretical studies pertaining to the cyclodextrin nonrigidity. **Journal of molecular structure**, v. 614, n. 1, p. 33-45, 2002.

DU, J. et al. Biopolymer-based supramolecular micelles from β -cyclodextrin and methylcellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 1, p. 569-574, 2012.

DUCHÊNE, D. et al. Cyclodextrins in targeting: application to nanoparticles. **Advanced drug delivery reviews**, v. 36, n. 1, p. 29-40, 1999.

FUKUDOME, M. et al. Synthesis of a Cycloallin Derivative from β -Cyclodextrin: Heptakis (2, 3-dideoxy-2, 3-epithio)- β -cycloallin. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 44, n. 27, p. 4201-4204, 2005.

GIAMMONA, G. et al. Synthesis and characterisation of novel chemical conjugates based on α , β -polyaspartylhydrazide and β -cyclodextrins. **European Polymer Journal**, v. 42, n. 10, p. 2715-2729, 2006.

GIDWANI, B.; VYAS, A. Synthesis, characterization and application of Epichlorohydrin- β -cyclodextrin polymer. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 114, p. 130-137, 2014.

GONZALEZ-GAITANO, G. et al. The aggregation of cyclodextrins as studied by photon correlation spectroscopy. **Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry**, v. 44, n. 1-4, p. 101-105, 2002.

GRIBBON, P.; ANDREAS, S. High-throughput drug discovery: what can we expect from HTS? **Drug discovery today**, v. 10, n. 1, p. 17-22, 2005.

GUO, X. et al. Host-guest chemistry of cyclodextrin carbamates and cellulose derivatives in aqueous solution. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 1, p. 982-987, 2013.

HARADA, A. et al. Structures of polyrotaxane models. **Carbohydrate research**, v. 305, n. 2, p. 127-129, 1997.

HEDGES, A.R. Industrial applications of cyclodextrins. **Chemical reviews**, v. 98, n. 5, p. 2035-2044, 1998.

HEMBURY, G. et al. Direct correlation between complex conformation and chiral discrimination upon inclusion of amino acid derivatives by β - and γ -cyclodextrins. **Organic letters**, v. 2, n. 21, p. 3257-3260, 2000.

HIGASHI, K. et al. Structural evaluation of crystalline ternary γ -cyclodextrin complex. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 100, n. 1, p. 325-333, 2011.

JANSOOK, P.; LOFTSSON, T. CDs as solubilizers: effects of excipients and competing drugs. **International journal of pharmaceutics**, v. 379, n. 1, p. 32-40, 2009.

KHAN, A.R. et al. Methods for selective modifications of cyclodextrins. **Chemical reviews**, v. 98, n. 5, p. 1977-1996, 1998.

KUMARI, K. et al. Preparation and evaluation of binary and ternary inclusion complex of Itraconazole. **Pharmacist's Letter**, v. 2, p. 144-155, 2010.

LAYRE, A.-M. et al. Associative network based on cyclodextrin polymer: a model system for drug delivery. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 12, p. 3283-3289, 2009.

LI, J. et al. Drug carrier systems based on water-soluble cationic β -cyclodextrin polymers. **International journal of pharmaceutics**, v. 278, n. 2, p. 329-342, 2004.

LI, Z. et al. γ -Cyclodextrin: a review on enzymatic production and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, n. 2, p. 245-255, 2007.

LINDMAN, B. et al. On the mechanism of dissolution of cellulose. **Journal of molecular liquids**, v. 156, n. 1, p. 76-81, 2010.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M.E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 62, n. 11, p. 1607-1621, 2010.

_____. Cyclodextrins as functional excipients: methods to enhance complexation efficiency. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 101, n. 9, p. 3019-3032, 2012.

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

LOFTSSON, T. et al. The effect of water-soluble polymers on drug-cyclodextrin complexation. **International journal of pharmaceutics**, v. 110, n. 2, p. 169-177, 1994.

LOFTSSON, T. et al. Self-association of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 93, n. 5, p. 1091-1099, 2004.

LOFTSSON, T. et al. Cyclodextrins and drug permeability through semi-permeable cellophane membranes. **International journal of pharmaceutics**, v. 232, n. 1, p. 35-43, 2002.

MACHÍN, R. et al. β -Cyclodextrin hydrogels as potential drug delivery systems. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 3, p. 2024-2030, 2012.

MEDRONHO, B. et al. Cyclodextrin-grafted cellulose: Physico-chemical characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 93, n. 1, p. 324-330, 2013.

MESSNER, M. et al. Self-assembly of cyclodextrin complexes: aggregation of hydrocortisone/cyclodextrin complexes. **International journal of pharmaceutics**, v. 407, n. 1, p. 174-183, 2011.

MESSNER, M. et al. Self-assembly of cyclodextrins: the effect of the guest molecule. **International journal of pharmaceutics**, v. 408, n. 1, p. 235-247, 2011.

MIYAUCHI, M.; HARADA, A. Construction of supramolecular polymers with alternating α -, β -cyclodextrin units using conformational change induced by competitive guests. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 37, p. 11418-11419, 2004.

MOYA-ORTEGA, M.D. et al. Cyclodextrin-based nanogels for pharmaceutical and biomedical applications. **International journal of pharmaceutics**, v. 428, n. 1, p. 152-163, 2012.

MUNTEANU, M. et al. Cyclodextrin methacrylate via microwave-assisted click reaction. **Macromolecules**, v. 41, n. 24, p. 9619-9623, 2008.

MURA, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, 2014.

NIE, S. et al. In vitro and in vivo studies on the complexes of glipizide with water-soluble β -cyclodextrin-epichlorohydrin polymers. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 37, n. 5, p. 606-612, 2011.

NIELSEN, A.L. et al. Self-assembling microparticles with controllable disruption properties based on cyclodextrin interactions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 73, n. 2, p. 267-275, 2009.

PLOU, F.J. et al. Glucosyltransferases acting on starch or sucrose for the synthesis of oligosaccharides. **Canadian journal of chemistry**, v. 80, n. 6, p. 743-752, 2002.

SABADINI, E. et al. Use of water spin-spin relaxation rate to probe the solvation of cyclodextrins in aqueous solutions. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 112, n. 11, p. 3328-3332, 2008.

SALTÃO, R.; VEIGA, F. Ciclodextrinas em novos sistemas terapêuticos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 1, 2001.

SAMI, F. et al. Effect of auxiliary substances on complexation efficiency and intrinsic dissolution rate of gemfibrozil- β -CD complexes. **Aaps Pharmscitech**, v. 11, n. 1, p. 27-35, 2010.

SANGWAI, M.; VAVIA, P. Amorphous ternary cyclodextrin nanocomposites of telmisartan for oral drug delivery: Improved solubility and reduced pharmacokinetic variability. **International journal of pharmaceutics**, v. 453, n. 2, p. 423-432, 2013.

STALIN, T. et al. Preparation and characterizations of solid/aqueous phases inclusion complex of 2, 4-dinitroaniline with β -cyclodextrin. **Carbohydrate polymers**, v. 107, p. 72-84, 2014.

SZEJTLI, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. **Chemical reviews**, v. 98, n. 5, p. 1743-1754, 1998.

SZENTE, L.; SZEJTLI, J. Highly soluble cyclodextrin derivatives: chemistry, properties, and trends in development. **Advanced drug delivery reviews**, v. 36, n. 1, p. 17-28, 1999.

VAN DE MANAKKER, F. et al. Cyclodextrin-based polymeric materials: synthesis, properties, and pharmaceutical/biomedical applications. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 12, p. 3157-3175, 2009.

WINTGENS, V. et al. Size-Controlled Nanoassemblies Based on Cyclodextrin-Modified Dextrans. **Macromolecular bioscience**, v. 11, n. 9, p. 1254-1263, 2011.

YAMAMOTO, M. et al. Some physicochemical properties of branched β -cyclodextrins and their inclusion characteristics. **International journal of pharmaceutics**, v. 49, n. 2, p. 163-171, 1989.

ZHANG, J.; MA, P.X. Host-guest interactions mediated nano-assemblies using cyclodextrin-containing hydrophilic polymers and their biomedical applications. **Nano Today**, v. 5, n. 4, p. 337-350, 2010.

_____. Cyclodextrin-based supramolecular systems for drug delivery: recent progress and future perspective. **Advanced drug delivery reviews**, v. 65, n. 9, p. 1215-1233, 2013.

ZIA, V. et al. Effect of cyclodextrin charge on complexation of neutral and charged substrates: comparison of (SBE) 7M- β -CD to HP- β -CD. **Pharmaceutical research**, v. 18, n. 5, p. 667-673, 2001.

ZOELLER, T. et al. Application of a ternary HP- β -CD-complex approach to improve the dissolution performance of a poorly soluble weak acid under biorelevant conditions. **International journal of pharmaceutics**, v. 430, n. 1, p. 176-183, 2012.

CAPÍTULO 2

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DA RIPARINA D POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS

Capítulo II

Desenvolvimento e validação de um método de quantificação da riparina D por espectrofotometria UV-Vis

Rian Felipe de Melo Araújo¹; Stanley Juan Chavez Gutierrez¹; José Lamartine Soares Sobrinho²; Lívio César Cunha Nunes¹

¹*Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêutica - Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, Brasil.*

²*Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Brasil*

RESUMO

A riparina D (ripD) tem demonstrado importante atividade antioxidante e citotóxica, sendo considerada um fármaco com potencial a se tornar medicamento no futuro. Caracteriza-se por ser uma molécula sintetizada, utilizando como modelo estrutural alcaloides extraídos do fruto verde da *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae). No entanto, observa-se não haver na literatura nenhum registro de metodologia analítica de quantificação, necessárias para os estudos de pré-formulação. Em vista disto, o objetivo desse trabalho foi desenvolver e validar um método de quantificação por espectrofotometria UV-Vis para quantificação da riparina D. Os parâmetros utilizados foram linearidade, precisão, exatidão, robustez, limites de quantificação e detecção, seguindo a padronização proposta pela RE nº 899/03 e compêndios internacionais. O método desenvolvido utiliza etanol, atóxico e baixo custo, como solvente de diluição e comprimento de onda em 284 nm. Logo, após observar que todos os resultados estavam dentro dos limites recomendados, conclui-se que o método proposto é seletivo, linear, preciso, exato e robusto, além de apresentar a vantagem da facilidade operacional e do baixo custo de análise.

Palavras-chave: Riparina D, espectrofotometria UV-Vis, validação.

ABSTRACT:

The riparin D (ripD) has demonstrated significant antioxidant activity and is considered a drug with the potential to become drug in the future. It is characterized for being a synthesized chemical entity from the riparin III, alkaloid extracted from the green fruit of the *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae). However, due to recent findings related to this compound, there is no literature in analytical methodology registration quantification necessary for pre-formulation studies. In view of this, the aim of this study was to develop and validate a method of quantification by UV-Vis spectrophotometry to quantify the riparin D. The parameters used were linearity, precision, accuracy, robustness, limits of quantification and detection, following the standardization proposed by RE n ° 899/03 and international compendia. The developed method uses ethanol, nontoxic and low cost, as a solvent for dilution and wavelength 284 nm. Soon after observing that all results were within recommended limits, it is concluded that the proposed method is selective, linear, precise, accurate and robust, and have the advantage of operating ease and low cost of analysis.

Key-words: Riparin D, UV-vis, validation.

INTRODUÇÃO

As riparinas I, II, III são alcaloides extraídos do fruto verde da *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae). Estes compostos apresentaram atividade biológica representativa em testes pré-clínicos, destacando-se a eficácia ansiolítica, antidepressiva e anticonvulsivante, além de efeitos antimicrobianos contra cepas de *Staphylococcus aureus* (NUNES et al., 2014).

A partir da riparina III, sintetizou-se novos derivados análogos, denominados de riparinas A, B, C, D, E e F. Estes foram obtidos visando a exploração comercial pela indústria farmacêutica, visto a limitação da concentração do extrato obtido por fontes naturais (NUNES; COSTA *et al.*, 2014).

A riparina D possui amplo potencial terapêutico, destacando-se os efeitos positivos em testes de citotoxicidade e de atividade antioxidante (NUNES; COSTA *et al.*, 2014). Logo, este fármaco possui grande potencial a se tornar medicamento, podendo ser utilizado futuramente como preventivo de diversas doenças degenerativas e contra o câncer.

Vários métodos analíticos instrumentais podem ser utilizados para a quantificação de fármacos nas etapas de desenvolvimento de um novo medicamento, como cromatografia líquida, eletroforese, potenciometria, espectrofotometria, dentre outros. Quando tais métodos são validados eles podem ser inseridos nos compêndios oficiais para que outros pesquisadores ou analistas técnicos utilizem posteriormente (ARAÚJO et al., 2012).

A espectrofotometria no ultravioleta/visível apresenta vantagens frente a outras técnicas. Dentre essas, destacam-se a facilidade operacional, rapidez, baixo custo, resultados de fácil interpretação e ampla utilização pelos mais diversos laboratórios de controle de qualidade de produtos farmacêuticos (BARI et al., 2007).

Apesar de não específica, quando a espectrofotometria UV-Vis é aplicada com a finalidade correta torna-se uma excelente e confiável ferramenta de análise, não necessitando de outras técnicas para complementar. O método analítico descrito é destinado ao doseamento simples do fármaco, não sendo aplicável para a quantificação simultânea de impurezas oriundas da síntese e/ou produtos de degradação. Para isto, o método deve provar sua especificidade ao fármaco que contém tais impurezas, garantindo que estas não interfiram na quantificação do composto químico desejado (SOARES et al., 2008).

Ao efetuar uma medição química faz-se necessário assegurar que o método utilizado é adequado para a aplicação pretendida. Tal comprovação poderá ser feita através da validação, onde se comprovará que os resultados são confiáveis e reprodutíveis, demonstrando a qualidade da medição. Os guias oficiais estabelecem as especificações dos parâmetros analíticos que devem ser avaliados durante a validação de acordo com o tipo de amostra a ser analisada.

Portanto, o objetivo deste presente trabalho é desenvolver e validar um método analítico para a quantificação da riparina D, de forma que atenda às exigências da *International Conference on Harmonization* (ICH) (ICH, 2005) e a resolução da ANVISA (RE n° 899 de 2003) (BRASIL, 2003), conferindo baixo custo, rapidez analítica, especificidade adequada e qualidade metrológica dos resultados.

MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Matéria-prima e reagentes:

A riparina D foi sintetizada pelo Laboratório de Pesquisa de Medicamentos e Cosméticos da Universidade Federal do Piauí, na forma de um cristal levemente amarelado, com rendimento 33,68%. Para a execução do processo de validação, utilizou-se álcool etílico (Vetec[®] lote: 0903453 e Dinâmica[®] lote: 14365), metanol (Vetec[®] lote: 1304563), clorofórmio (Dinâmica[®] lote: 23345) e água purificada obtida por osmose reversa (Tecnal[®], TE-400/10)

2.2 Equipamentos:

Os equipamentos utilizados foram balança analítica (Bel Engineering[®]), espectrofotômetro UV-Vis (Shimatzu[®] UVmini-1240 e Varian[®] modelo Cary 30), ultrassom (Cleaner Ultra Unique 800). Para a especificidade, foi utilizado cromatógrafo líquido de alta eficiência equipado com bomba quaternária (LC-20AT) (Shimatzu[®]) com coluna CLC-ODS Shim-Pack[®] (250mm x 4,6mm x 5 µm I.D.)

2.3 Desenvolvimento do método analítico:

Primeiramente, avaliou-se a solubilidade da riparina D em diferentes solventes (água, álcool etílico, metanol, clorofórmio e ácido clorídrico 0,1M) e misturas destes com o objetivo de avaliar o comportamento do fármaco e definir a melhor solução diluente para o método analítico desenvolvido (Tabela 1). Para isto, levou-se em consideração o custo e toxicidade dos solventes e a possibilidade de futuros estudos de complexação com ciclodextrinas (ROCHA;TEIXEIRA, 2004).

Em seguida, realizou-se uma varredura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 180 a 700 nm a fim de determinar qual comprimento de onda apresenta valores maiores de absorbância. O sinal analítico desejável para uma concentração padrão deve estar entre 0,1 e 0,8. Além disso, compararam-se os resultados obtidos entre amostras que sofreram agitação por 5, 10 e 15 min, a fim de delinear as melhores condições de preparo da amostra. Por fim, avaliou-se a influência da luminosidade na solução preparada. Para isto, a absorbância foi medida em amostras que estavam expostas à luz por 2 horas e aquelas protegidas.

Tabela 1: Sistemas de solventes na preparação da solução padrão, onde a primeira diluição está na concentração de 200 µg/mL e a segunda na concentração de 20 µg/mL.

1º diluição	2º diluição
Álcool etílico	Álcool etílico
Álcool etílico	Solução (álcool etílico:água purificada, 60:40, v/v)
Metanol	Metanol
Metanol	Álcool Etílico
Metanol	Solução (álcool etílico:água purificada, 60:40, v/v)
Clorofórmio	Álcool Etílico

2.4 Preparo da amostra

Pesou-se 10 mg de riparina D em balança analítica e transferiu para balão volumétrico de 50 mL, devidamente calibrado. Promoveu-se a diluição em álcool etílico (Vetec[®] - Lote: DCBC0006), sendo essa solução submetida à agitação por ultrassom durante 10 minutos. Assim, obteve-se a primeira diluição com concentração de 200 µg/mL. A partir desta, transferiu-se uma alíquota de 1 mL para balão de 10 mL, diluindo em solução de álcool etílico:água purificada (60:40, v/v) e obtendo a segunda diluição com concentração padrão de 100% de 20 µg/mL. As amostras foram preparadas em triplicatas e analisadas no comprimento de onda de 284 nm.

2.5 Validação do método analítico

De acordo com as normas estabelecidas pela RE n° 899/03 e pelo ICH, o processo de validação de metodologias analíticas consiste em avaliar os seguintes parâmetros: linearidade, limites de quantificação e detecção, robustez, precisão, exatidão e especificidade (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

A confiabilidade dos parâmetros avaliados é observada através do coeficiente de variação (CV%) abaixo de 5% e através do tratamento estatístico por Análise de Variância (ANOVA) *One-Way* e teste de *t* de *Student* com nível de significância de 95% (BRASIL, 2003).

Linearidade: Para determinar a linearidade, fez-se em triplicata curvas com 7 concentrações distintas: 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130%, que correspondem respectivamente a 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 $\mu\text{g/mL}$. A análise estatística realizada foi o cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. Para o cálculo dos limites de quantificação e detecção, utilizou-se o desvio padrão da reta com relação à absorbância do primeiro nível de concentração de riparina D das três curvas de calibração.

Robustez: Para o ensaio de robustez, realizou-se a variação dos seguintes parâmetros: marca do álcool etílico utilizado nas duas diluições (Vetec[®] e Dinâmica[®]), tempo de agitação por ultrassom (9, 10 e 11 minutos), e a influência da luminosidade (presença e ausência de luz).

Precisão: Este parâmetro precisa ser avaliado em dois níveis: repetitividade (precisão intracorridas), precisão intermediária (precisão intercorridas) e reprodutibilidade (interlaboratorial). Naquele foram analisadas 6 amostras na concentração de 100% do fármaco na mesma condição analítica, desde a pesagem até a leitura no equipamento, e pelo mesmo analista. Nesse foram analisados em triplicata amostras de 100%, variando-se os dias e o analista. Neste também foram analisados amostras de 100% variando-se os laboratórios, para isto utilizou-se o equipamento do modelo Varian[®] (Cary 30) do Laboratório de Pesquisa Neurociência Experimental (LAPNEX).

Exatidão: A exatidão foi avaliada através de cinco análises nas concentrações de 80, 100, 120% da concentração teórica, que corresponde respectivamente a (16, 20 e 24 $\mu\text{g/mL}$).

Especificidade: Para determinar a seletividade do método desenvolvido contaminou-se a solução de 200 $\mu\text{g/mL}$ com 10 mg de salicilato de metila, reagente utilizado na reação de síntese da riparina D, visto que traços destes podem estar presentes no produto final. Em seguida, promoveu-se uma diluição a fim de se obter uma concentração final de 20 $\mu\text{g/mL}$. Em paralelo, preparou-se uma amostra não contaminada e outra contendo apenas 1 $\mu\text{g/mL}$ do reagente de partida, correspondendo à concentração final deste fármaco na solução contaminada. As varreduras espectrofotométricas foram obtidas para avaliar se os reagentes de partida absorvem no comprimento de onda escolhido para riparina D.

2.6 Determinação da absorvidade molar:

A absorvidade molar (ξ) é a grandeza analisada nas medições espectrofotométrica e utiliza como base matemática a lei de Lambert-Beer. Tal grandeza é característica da amostra nos estados sólido, líquido ou gasoso, cuja magnitude depende do comprimento de onda da radiação incidente, seja ela no ultravioleta, visível ou infravermelho (ALVES et al., 2010). Para o cálculo da absorvidade molar nos solventes de interesse, metanol e água purificada, foi utilizada a técnica descrita anteriormente e o mesmo comprimento de onda. Além disso, aplicaram-se as equações de molaridade (equação 1) e absorvidade (equação 2).

Equação 1: $M = m / \text{mol} \times V$, onde a M a molaridade, mol é a massa molar e V o volume da solução

Equação 2: $\xi = \text{Abs}/M$, onde ξ é a absorvidade e M a molaridade da solução.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

3.1 Desenvolvimento do método analítico

Observou-se, através do estudo de solubilidade, que a riparina D é insolúvel em água e em ácido clorídrico 0,1 M, pouco solúvel em etanol, e facilmente solúvel em metanol e clorofórmio, segundo a classificação da Farmacopeia brasileira (Farmacopéia Brasileira, 2003).

Estes resultados fundamentaram a escolha dos sistemas de solventes utilizados para a completa diluição da riparina D, levando em conta a estabilidade da solução e os valores de concentrações de saturação. Além disso, considerou-se também a toxicidade do solvente, pois como observado, o fármaco apresentou maior solubilidade no metanol, contudo este solvente é altamente tóxico, provocando prejuízos ambientais e ocupacionais.

O etanol foi escolhido dentre os demais solventes devido as suas características positivas de toxicidade e concentração de saturação. Além disso, a solução permaneceu estável em 48 horas de análise, conforme Tabela 2. Logo, a primeira diluição foi realizada com álcool etílico e a segunda, ao final, com uma solução de álcool etílico e água na proporção de 60/40. O experimento foi realizado em triplicata.

Tabela 2: Estabilidade da solução de riparina D em 48 horas após a preparação, através de análise espectrofotométrica.

Tempo (horas)	Média	DP	CV%
0	0,379	0,003	0,79
24	0,375	0,002	0,55
48	0,373	0,002	0,61

F calculado = 0,375 e F tabelado = 5,1432

Através da varredura espectrofotométrica UV-vis, observou-se dois picos de absorção, um em 284 e outro em 300 nm. Escolheu-se o primeiro valor, por apresentar maior absorbância (Figura 1).

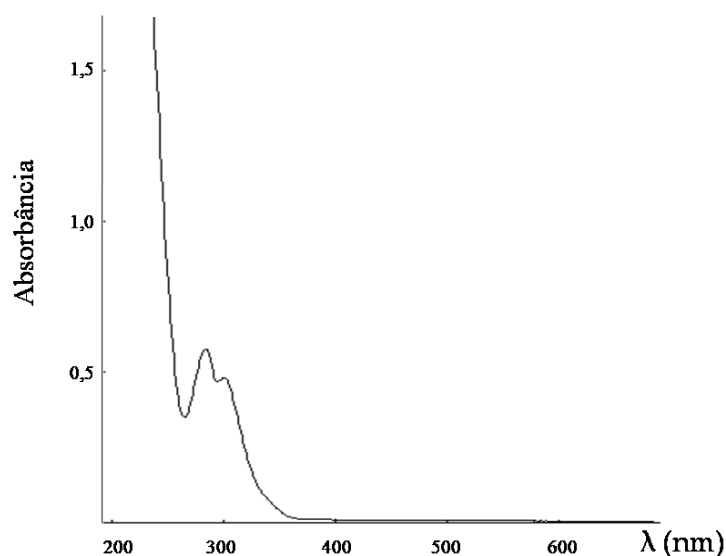


Figura 1: Varredura em espectrofotômetro UV-Vis da riparina D.

Fonte: Arquivo pessoal

Além disso, observou-se que a presença de luz não influencia na estabilidade da amostra podendo assim as análises serem realizadas sem proteção de luz (Tabela 3). Por fim, estabeleceu-se o tempo de sonicação em 10 minutos, por não apresentar diferenças significativas entre os tempos analisados (Tabela 4).

Tabela 3: Avaliação da influência da luminosidade no desenvolvimento do método analítico para quantificação de riparina D por espectrofotômetro UV-Vis.

Presença de Luz	Média	DP	CV%
Presente	100,9867	0,517333	0,512278
Ausente	101,3267	0,391195	0,386073

F calculado = 0,8244 e F tabelado = 7,7086

Tabela 4: Avaliação do tempo de sonicação no desenvolvimento do método analítico para quantificação de riparina D por espectrofotômetro UV-Vis.

Tempo Sonicação (min)	Média	DP	CV%
5	0,356	0,008	2,28
10	0,373	0,001	0,41
15	0,375	0,004	1,11

F calculado = 11,236 e F tabelado = 5,1432

3.2 Validação do método analítico

Linearidade:

A linearidade foi realizada com 7 concentrações crescentes (14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 µg/mL) e equação da reta obtida foi $y = 0,019x - 0,003$. A análise de regressão linear dos mínimos quadrados apresentou um coeficiente de correlação de 0,99956, demonstrando ser linear dentro dos limites de concentrações estudadas. Além disso, foi realizada o tratamento estatístico pelo ANOVA *One Way*, onde foi obtido o valor de F (2,5308) menor que o F crítico (7,9315).

O Limite de Detecção (LD) encontrado para a curva foi de 0,2 µg/mL, enquanto que o Limite de Quantificação (LQ) foi de 1,05 µg/mL. Os coeficientes angular (*Slope*) e linear (*Intercept*) foram, respectivamente, 0,01901 e -0,00374.

Robustez:

O método demonstrou ser robusto quanto à variação da marca do fabricante do álcool etílico (Vetec[®] e Dinâmica[®]), tempo de agitação por ultrassom (9, 10 e 11 minutos). Para a variação da marca, observou-se um F calculado de 0,0722 inferior ao F crítico de 7,7086, sendo o CV de 0,11% para Vetec[®] e 0,16% para Dinâmica[®].

Para o tempo de agitação por ultrassom que foram alterados em pequena proporção e de forma deliberada, obteve-se um F calculado de 1,028 inferior ao F crítico de 5,1432, demonstrando que não houve diferença significativa entre os tempos escolhidos.

Precisão:

Os três níveis avaliados do método demonstraram serem precisos. Para a repetitividade os resultados apresentaram média de 100,12% de absorbância e CV% de 1,54%. Na precisão intermediária, o método demonstrou ser preciso para a análise

realizada por analistas diferentes em dias diferentes. O tratamento estatístico por ANOVA *One Way*, apresentou F calculado de 2,2895 para dias diferentes e 0,3001 para analistas diferentes, sendo estes menores do que o F tabelado de 18,5128 para analistas diferentes.

O método também mostrou ser reprodutível quando avaliado em laboratórios diferentes e utilizando equipamentos e vidrarias diferentes. Para este, o F calculado foi de 0,0041, sendo menor que o F crítico de 7,7086.

Exatidão:

O método demonstrou exatidão através da análise de três concentrações distintas (80, 100 e 120%). O tratamento estatístico aplicado foi o teste *t Student*, que demonstrou que o *t* calculado para cada concentração foi de 0,8215 (80%); 1,0032 (100%) e 0,8492 (120%), sendo menor que o *t* tabelado 2,7764, comprovando que não houve diferenças significativas entre as médias das três concentrações analisadas.

Especificidade:

A solução de referência que contém a concentração padrão de riparina D foi contaminada propositalmente com o reagente de partida utilizado na síntese do fármaco, visto que traços deles podem estar presentes na amostra estudada. As amostras foram preparadas nas mesmas condições. Observou-se então, que não houve interferência dos contaminantes na absorção da riparina no comprimento em estudo (Figura 2).

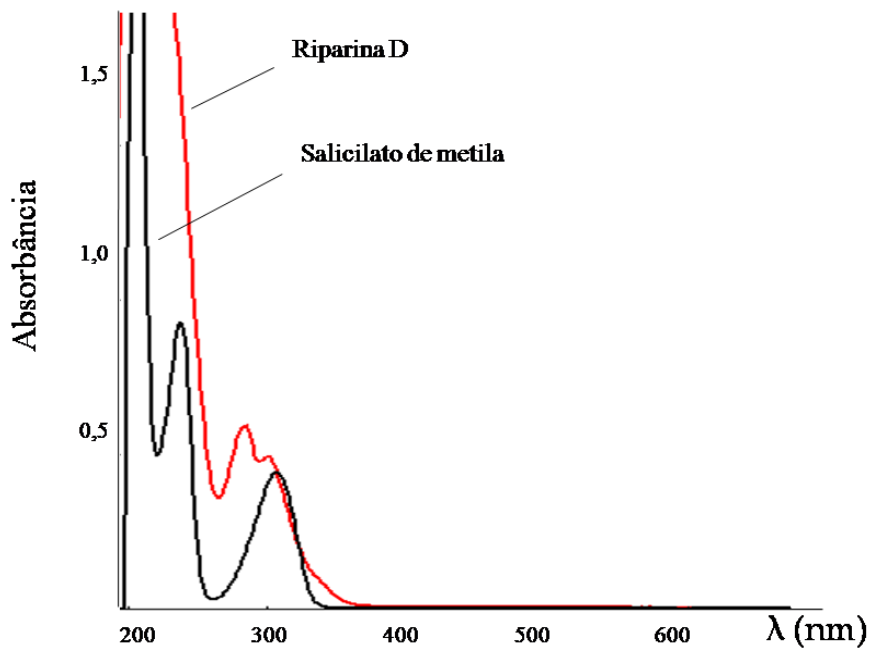


Figura 2: Varredura espectrofotométrica para avaliação da especificidade do método de quantificação da riparina D.

Fonte: Arquivo pessoal

3.3 Absortividade Molar

Para avaliação da absortividade molar, observaram-se as absorbâncias da concentração teórica de 20 $\mu\text{g/mL}$, que corresponde a 100%, das soluções preparadas em metanol e água purificada. Para este o valor encontrado foi de 0,392, enquanto para aquele foi de 0,253. Sabendo que a massa molar da riparina D é de 301,3 g/mol, concluiu-se que a molaridade das soluções é $6,64 \times 10^{-5}$ mol/L. Aplicando-se a equação da molaridade, calculou-se a absortividade molar da riparina D em água purificada ($3,81 \times 10^3$) e em metanol ($5,903 \times 10^3$). Assim, com os valores da absortividade molar para determinado solvente, pode-se descobrir a concentração molar de amostras dissolvidas nos solventes em questão, bastando aplicar a fórmula.

CONCLUSÃO

A escolha de uma metodologia de quantificação da riparina D é de fundamental importância para estudos posteriores de desenvolvimento de formas farmacêuticas, visto o grande potencial que esse fármaco possui em se tornar um medicamento futuramente. Logo, observou-se através dos parâmetros avaliados, a segurança, rapidez e baixo custo do método analítico desenvolvidos, traduzidos em resultados confiáveis para a rotina laboratorial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, L.D.S. et al. Desenvolvimento de método analítico para quantificação do efavirenz por espectrofotometria no UV-Vis. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1967-1972, 2010.

ARAUJO, R.F.M. et al. New alternative analytical to quantify the anti-leprosy drug dapsone by UV spectrophotometry. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 31, 2012.

BARI, S.B. et al. Impurity profile: significance in active pharmaceutical ingredient. **Eurasian journal of analytical chemistry**, v. 2, n. 1, p. 32-53, 2007.

BRASIL, R.E. nº 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos**, 2003.

Farmacopéia Brasileira. 4 ed. ed.: São Paulo: Atheneu, 2003.

ICH. International Conference on Harmonization. Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use. **Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)**, 2005.

NUNES, G.B.L. et al. Prospecção científica e tecnológica da *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae). **Cadernos de Prospecção**, v. 6, n. 4, p. 447, 2014.

ROCHA, F.R.P.; TEIXEIRA, L.S.G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. **Química nova**, v. 27, p. 807-812, 2004.

SOARES, M.F.L.R. et al. Métodos de determinação do ornidazol em comprimidos revestidos: desenvolvimento, validação e comparação estatística. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 5, p. 688-94, 2008.

CAPÍTULO 3

**ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO DA RIPARINA D:
CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO FÁRMACO
ISOLADO E DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO COM
HP β CD NO ESTADO SÓLIDO**

Capítulo III

Estudos de pré-formulação da riparina D: caracterização físico-química do fármaco isolado e dos complexos de inclusão com HP- β -CD no estado sólido

Rian Felipe de Melo Araújo¹; Stanley Juan Chavez Gutierrez¹; Sean Telles Pereira¹; Bartolomeu Cruz Viana Neto²; Edson Cavalcanti²; José de Sousa Lima Neto³; Salvana Priscylla Manso Costa⁴; José Lamartine Soares Sobrinho⁴; Lívio César Cunha Nunes¹.

¹*Programa de Pós graduação em Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, Brasil*

²*Programa de Pós-graduação em Ciências dos Materiais – Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, Brasil.*

³*Laboratório de Geoquímica Orgânica - Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, Brasil.*

⁴*Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica – Universidade Federal de Pernambuco, (UFPE), Recife, Brasil*

RESUMO

2-hidroxi-*N*-[2-(4-metoxi-fenil)-etil]-benzamida, conhecida por riparina D (ripD), é um composto sintetizado a partir da riparina III, alcaloide extraído do fruto verde da *Aniba riparia*(Nees) Mez (Lauraceae). Esta entidade química apresentou, através de estudos prévios, grande potencial antioxidante, tornando-se um promissor candidato a futuro medicamento. A riparina D foi sintetizada a partir da reação entre o salicilato de metila e o 3,4-dimetoxifenetilamina, por não haver disponibilidade comercial. Em seguida, o produto obtido foi caracterizado pelas técnicas de HPLC, RMN, IV-TF, TG/DSC para confirmar o sucesso da reação. Uma vez sintetizado, realizou-se o diagrama de solubilidade entre a ripD e HP β CD, onde a estequiometria apropriada para a formação do complexo foi de 1:1. Os complexos de inclusão com HP β CD foram obtidos pelas técnicas de *spray-drying* e malaxagem, além da realização da mistura física. Estes foram caracterizados por DRX, IV-TF, TG/DSC, além da determinação do perfil de dissolução para comprovar a eficácia do complexo. O método por *spray-drying* o mais efetivo no objetivo proposto.

Palavras-chave: Ciclodextrina; HP β CD; complexos de inclusão; riparina D

ABSTRACT:

2-hydroxy-N- [2- (4-methoxy-phenyl) -ethyl] -benzamide, known as D riparina (ripd) is a compound synthesized from riparina III alkaloid extracted from the green fruit of *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae). This chemical entity presented by previous studies, extensive antioxidant potential, making it a promising candidate for future medicine. The riparina D was synthesized from the reaction between methyl salicylate and 3,4 dimethoxyphenethylamine, because there is no commercial availability. Then the product obtained was characterized by HPLC techniques, NMR, FT-IR, TG / DSC to confirm the success of the reaction. Once synthesized, held diagram solubility between ripd HP β CD and, where appropriate stoichiometry for the formation of the complex was 1: 1. The inclusion complexes with HP β CD were obtained by kneading and spray-drying techniques, in addition to performing the physical mixture. These were characterized by XRD, IR-TF, TG / DSC, besides determination of the dissolution profile to prove the efficacy of the complex. The most effective method for spray-drying the objective.

Keywords: cyclodextrin; HP β CD; Inclusion complexes; riparina D

INTRODUÇÃO:

A transformação de plantas medicinais em medicamentos representa atualmente um grande desafio. Atualmente, a síntese de análogos estruturais de produtos naturais é uma das opções viáveis para a produção em larga escala de um novo fármaco com potencial terapêutico. A partir da *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae), foram isolados os alcaloides: riparinas I, II e III, que demonstraram atividades farmacológicas em estudos pré-clínicos, especialmente a riparina III (BARBOSA-FILHO, 1997).

Esta alcalamida (riparina III) serviu de modelo molecular para a síntese de análogos também denominados riparinas (A, B, C, D, E e F), assim a viabilidade comercial pela indústria farmacêutica foi facilitada. Isto se deve, principalmente, à disponibilidade da substância independente da sua concentração em fontes naturais (BARBOSA-FILHO, 1997; GUTIERREZ, 2007).

O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre mecanismos intracelulares de pró-oxidação e sistemas antioxidantes. As funções celulares, quando presentes em ambientes aeróbicos, estão susceptíveis ao ataque das espécies reativas derivadas do oxigênio (EROs). Estes são produzidos de forma endógena e podem resultar em graves danos ao DNA, proteínas e lipídios (AVERY, 2011). As células já possuem um sistema antioxidante para minimizar os efeitos dos EROs, porém quando a produção destes supera a capacidade antioxidante, ocorre então o estresse oxidativo, responsável por inúmeras doenças degenerativas (SURMEIER et al., 2011).

A investigação das propriedades físico-químicas de uma nova molécula constitui a fase de pré-formulação (LAU, 2001). Esta é essencial na transição da descoberta de um candidato a fármaco ao medicamento. Nesta etapa de desenvolvimento de um novo medicamento, fazem-se estudos de caracterização do composto isolado assim como a compatibilidade com possíveis excipientes (SOARES et al., 2011).

A hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD) é uma derivada hidroxialquil da β CD (Figura 1), desenvolvida com o propósito de contornar a limitada solubilidade das CDs em água. Foi a primeira CD derivada a ser aprovada pelo FDA e caracteriza-se por ser um excipiente seguro e eficaz para a solubilização de fármacos. Atualmente, a HP β CD possui aplicações industriais no campo alimentício, agrícola e farmacêutica (YUAN et al., 2014).

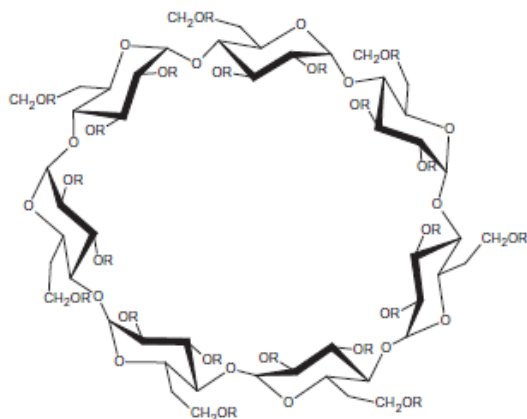


Figura 1: Estrutura química da hidroxipropil- β -ciclodextrina.

Fonte: Adaptado de YUAN, et al., 2014

O objetivo deste estudo foi caracterizar a riparina D, devido a potencial atividade antioxidante e citotóxica *in vitro* observado em estudos anteriores (NUNES et al., 2014). Além disso, este trabalho visou à obtenção e caracterização de complexos de inclusão da riparina D com HP β CD, verificando o incremento da solubilidade obtida pelo fármaco.

MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção da riparina D

A riparina D, 2-hidroxi-*N*-[2-(4-metoxi-fenil)-etil]-benzamida, foi preparada a partir de 3,3 mmol de salicilato de metila com 6,5 mmol de 3,4-dimetoxifenetilamina, sob agitação magnética e temperatura ambiente durante 6 horas (Figura 2). A reação foi feita no Laboratório de Pesquisa em Cosméticos e Medicamentos da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.

A fim de confirmar a presença do alcaloide, submeteu-se o produto obtido ao teste com reagente *Dragendoff*, revelando uma mancha de cor laranja, indicativo de reação positiva.

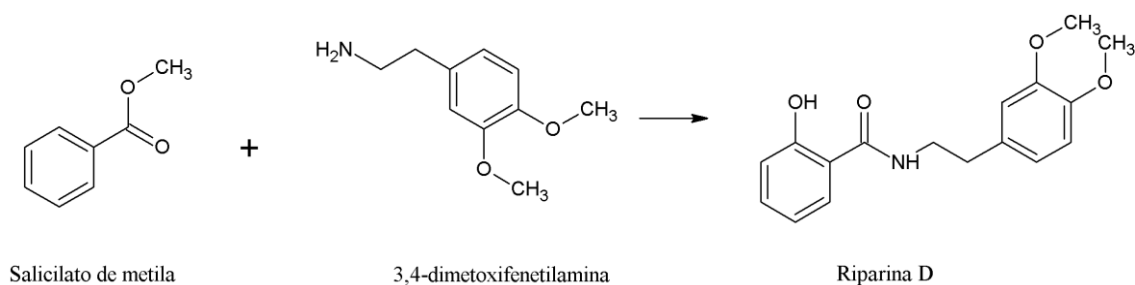


Figura 2: Reação de síntese da riparina D

Fonte: Arquivo pessoal

2.2 Diagrama de Solubilidade de Fases

Para a realização do diagrama de solubilidade de fases, preconizado em estudos por Higuchi e Conors (1965), adicionou-se quantidades em excesso de riparina D em soluções de concentração crescente de HP β CD (0,25%; 0,5%; 1%; 1,25%; 1,5%). Tais amostras foram deixadas sob agitação em banho-maria por 72 horas e à temperatura de 28 °C. Em seguida, foram filtradas em membranas de 0,22 μ m e analisadas em espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu[®] (UVmini – 1240) no comprimento de onda de 284 nm, utilizando a água purificada como branco. Realizou-se os experimentos em triplicata e a constante de associação fármaco-ciclodextrina ($K_{1:1}$) foi calculada para a porção linear do diagrama assumindo uma estequiometria 1:1, utilizando a equação:

$$K_{1:1} = \frac{\text{Slope}}{S_0 \times (1 - \text{Slope})} \quad (S_0: \text{solubilidade da ripD na ausência de CD})$$

2.3 Obtenção dos complexos de inclusão em fase sólida

Os complexos de inclusão binários entre a riparina D e hidroxipropil- β -ciclodextrinas foram preparados na proporção molar de 1:1. Para a preparação das misturas físicas promoveu-se homogeneização por 20 minutos em gral de porcelana com auxílio de pistilo nos pesos correspondentes à proporção molar estabelecida. Em

seguida, a amostra foi tamisada em malha de 250 μm e armazenada em dessecador de vidro sob vácuo(SOBRINHO et al., 2011).

A malaxagem consistiu em homogeneizar, nas mesmas condições descritas na mistura física, riparina D e HP β CD com adição de uma mistura de álcool etílico 57,76% (m/m) e água, na proporção de 1:1. Uma vez obtida massa de consistência pastosa, esta foi levada à estufa por 2 horas na temperatura de 50 °C, a fim de que o solvente evaporasse(SOBRINHO; SOARES *et al.*, 2011).

Os complexos binários de ripD:HP β CD por *spray-drying* foi obtido dissolvendo a mistura em solução etanol:água (2:8), seguida de pulverização em *spray-dry* (Mini Spray Dryer B290 – Büchi[®]), com temperatura de entrada de 140 °C e de saída de 89 °C, além da pressão de ar de pulverização que foi de 55 mmHg(FORTES, 2012).

2.4 Caracterização da riparina D e dos complexos de inclusão ripD-HP β CD obtidos

2.4.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para avaliar a pureza do fármaco sintetizado, fez-se uma corrida cromatográfica em cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu[®]. A fase móvel utilizada foi uma combinação de água acidificada com ácido acético glacial (pH = 4,0) e acetonitrila (Sigma-Aldrich[®], Lote: SHBD2117V), na proporção de 20:80, respectivamente. A água utilizada foi purificada em purificador de água Millipore[®](Synergy - Ultrapura). O fluxo de injeção da amostra foi de 0,7 mL/min e a coluna utilizada foi CLC-ODS Shim-Pack[®] (250 mm x 4,6 mm x 5 μm I.D.). O ensaio foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Medicamentos e Cosméticos (LAPCOM) da Universidade Federal do Piauí, Teresina.

2.4.2 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF)

Os espectros no infravermelho foram obtidos em equipamento PerkinElmer[®] (Spectrum 400) com dispositivo de reflectância total atenuada – ATR (Miracle ATR, Pike Technologies Spectroscopic Creativity) com cristal de selênio,pertencente ao Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos (LTM) da Universidade Federal do Pernambuco, Recife. A resolução utilizada foi de 4 cm^{-1} na faixa de 4000 – 500 cm^{-1} , pela técnica de pastilhas de KBr.

2.4.3 Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear da riparina D foram obtidos em equipamento Varian[®] INOVA, modelo 400, operando a 400 MHz com núcleo de hidrogênio – 1 (H^1) e 100 MHz para núcleo de carbono – 13 (C^{13}). As amostras foram dissolvidas em clorofórmio 99,5% D, com TMS Merck[®] (lote: 093428). Os ensaios foram realizados no Laboratório de RMN (LAUREMN) da Universidade Federal do Piauí, Teresina.

2.4.4 Análise Térmica

A análise térmica foi realizada através da caracterização tanto do fármaco quanto dos complexos de inclusão pelas técnicas de termogravimetria (TG) e calorimetria diferencial exploratória (DSC). O TG foi realizado em equipamento Shimadzu[®], modelo TGA Q60, em atmosfera inerte de nitrogênio e fluxo de 50 mL/min. A massa da amostra utilizada foi de 6,0 mg ($\pm 0,2$) para a riparina e 3,0 mg ($\pm 0,2$) para os complexos e mistura física, acondicionadas em cadinho de alumina, utilizando o programa de aquecimento que vai da temperatura de 30 a 600 °C na razão de aquecimento de 10 °C/min. Antes dos ensaios, a calibração do equipamento foi verificada através da análise de amostras de oxalato de cálcio.

A DSC foi analisada em equipamento Shimadzu[®], modelo DSC-60, com atmosfera inerte de nitrogênio em fluxo de 50 mL/min e programa de aquecimento com razão de 3 °C/min, na faixa de temperatura de 30 - 600 °C.

As análises foram realizadas no Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos da Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

Difratograma em Raios X

A difração em raios-X foi obtida em difratômetro Shimadzu[®], modelo XRD-6000, equipado com ânodo de cobre, usando voltagem de 40 KV e corrente de 30 mA. A amostra foi analisada no intervalo de ângulo 2θ de 5 – 75° a uma velocidade de digitalização de 2°/min. Utilizaram-se suportes de vidro com fina camada de material em pó sem solvente. A análise foi realizada no Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados (LIMAV) da Universidade Federal do Piauí, Teresina.

Estudos de dissolução

As especificações da *Food and Drug Administration* foram utilizadas para os estudos de dissolução de fármacos pouco solúveis (DRESSMAN et al., 1998). Utilizou-se aparato pá a 50 rpm e temperatura de $37 \pm 0,5$ °C. O meio do ensaio foi 900 mL de ácido clorídrico, a fim de simular o suco gástrico e as condições *sink* do método. As amostras analisadas foram encapsuladas com o equivalente a 10 mg de riparina D e os tempos de análise foram de 5, 10, 15, 20, 30, 45 e 60 minutos. Após filtração, as concentrações das amostras, em triplicata, foram determinadas por espectrofotometria UV-Vis no comprimento de onda de 284 nm. Utilizou-se também a eficiência de dissolução nos tempos de 15 e 20 minutos como parâmetro de avaliação (SOBRINHO; SOARES *et al.*, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

3.1 Caracterização da molécula de riparina D

A riparina D é uma molécula nova e por isso não há no mercado padrão comercial, que poderia auxiliar no controle de qualidade em testes quali e quantitativos, assim como em testes analíticos. Logo, para garantir a pureza do fármaco desenvolveu-se e utilizou-se a técnica de CLAE, a fim de identificar possíveis contaminantes. Para elucidação da molécula e identificação do composto, foram feitas análises de RMN e IV-TF. As análises térmicas por TG/DTA e DSC vieram a complementar o estudo e subsidiar com mais informações a caracterização da molécula.

Testes iniciais no desenvolvimento de metodologia analítica por CLAE para a análise quali/quantitativa foram realizados em utilizando acetonitrila, metanol e água acidificada. Como os picos da ripD se apresentaram largos e irregulares, retirou-se o metanol e testou-se diferentes proporções de acetonitrila e água acidificada com ácido acético glacial (pH = 4,0): 80:20; 60:40; 40:60.

A condição de fase móvel que mostrou ser mais eficaz na identificação e quantificação da riparina D foi a proporção de 60:40 (v:v), vazão da fase móvel de 0,7 mL/min, eluição isocrática e volume de injeção de 20 µL. Nesta, o pico apresentou-se simétrico e praticamente sem ruído na base (Figura 3).

Além disso, fez-se uma corrida cromatográfica de 30 minutos para avaliar a possível presença de contaminantes que teriam um tempo de retenção maior. Estes não foram verificados, podendo optar posteriormente por corridas com tempo de 12 minutos, visto que o tempo de retenção da riparina foi 9,084 minutos com uma área de 2671226 que corresponde a 100% da amostra.

Com o objetivo de verificar se não houve coeluição ou se possíveis impurezas não estavam retidas na coluna, fez-se uma análise em gradiente de limpeza, onde até 60 minutos a fase móvel foi acetonitrila (40): água acidificada (60), seguida de uma lavagem com 100% de acetonitrila entre 65 e 80 minutos. Assim, pode-se observar que traços de reagentes utilizados na reação de síntese e outros contaminantes estão presentes na amostra em pequena quantidade (Figura 4).

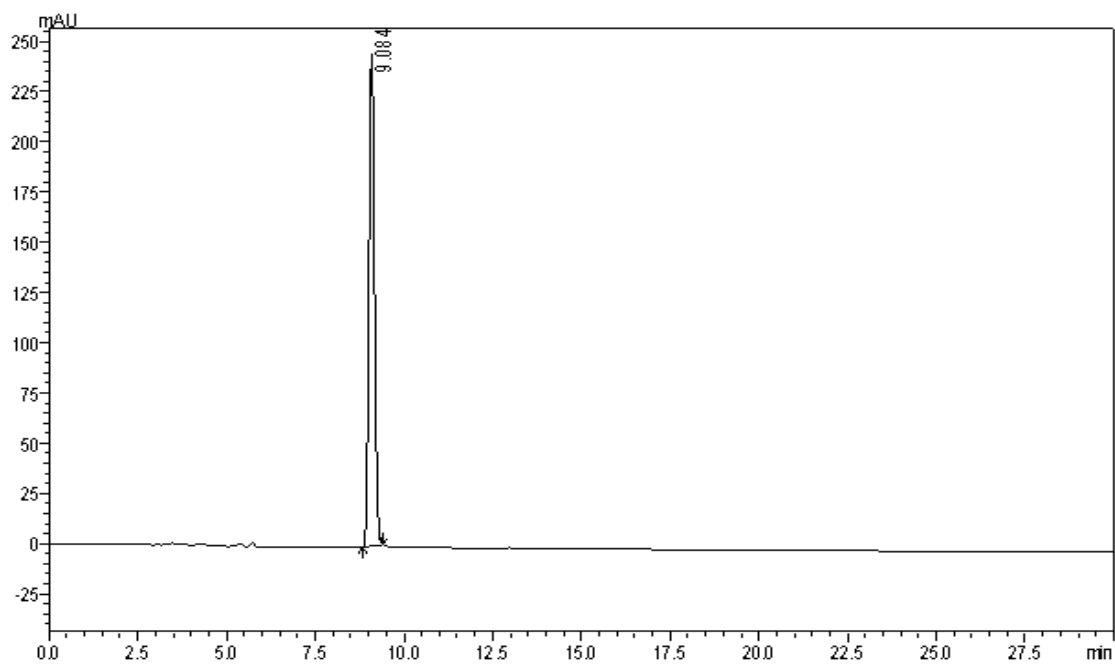


Figura 3: Cromatograma da solução de riparina D diluída em metanol na concentração de 20 µg/mL. Fase móvel: acetonitrila e água acidificada em pH 4,0 (60:40, v/v). $\lambda = 284$ nm.

Fonte: Arquivo pessoal

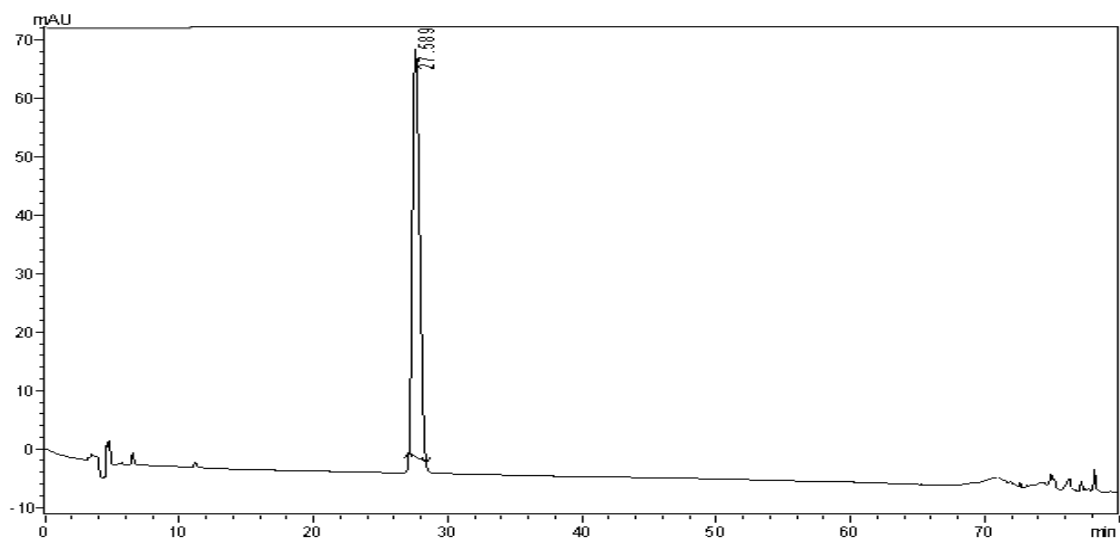


Figura 4: Cromatograma da solução de riparina D diluída em metanol na concentração de 20 µg/mL. Eluição em gradiente. ACN:H₂O_{ac} (40:60) até 60 min., seguido de ACN (100%) até 85 min. $\lambda = 284$ nm.

Fonte: Arquivo pessoal

No espectro de RMN ^1H da riparina D em clorofórmio deuterado (Figuras 5 e 6) observa-se em 2,85 ppm um triplete referente ao hidrogênio da posição 7'. A presença de simpleto em 3,69 ppm indica a presença das metilas em 3' e 4'. Em 12,33 ppm observa-se um simpleto largo caracterizado como o hidrogênio da hidroxila ligada na posição 2. O hidrogênio da posição 6' está representado pelo duplo duplete em 6,73 ppm, enquanto que o quarteto em 3,63 ppm caracteriza os hidrogênios da posição 8'. Por fim, os sinais entre 6,93 e 7,23 ppm referem-se aos hidrogênios aromáticos.

A descrição do RMN ^{13}C da riparina D em clorofórmio deuterado (100 MHz) δ ppm 114,22 (C, C-1); 161,59 (C, C-2); 118,66 (CH, C-3); 134,18 (CH, C-4); 118,66 (CH, C-5); 130,92 (CH, C-6); 134,18 (C, C-1'); 114,22 (CH, C-2'); 149,16 (CH, C-3'); 147,84 (CH, C-4'); 111,89 (CH, C-5'); 120,65 (CH, C-6'); 35,10 (CH₂, C-7'); 40,55 (CH₂, C-8'); 55,92 (OCH₃, C-4'); 55,84 (OCH₃, C-4'); 169,61 (C=O). Os picos característicos desta molécula são encontrados em 55,92 e 55,84 que representam os carbonos substituintes nas posições 3' e 4' respectivamente (Figuras 7 e 8).

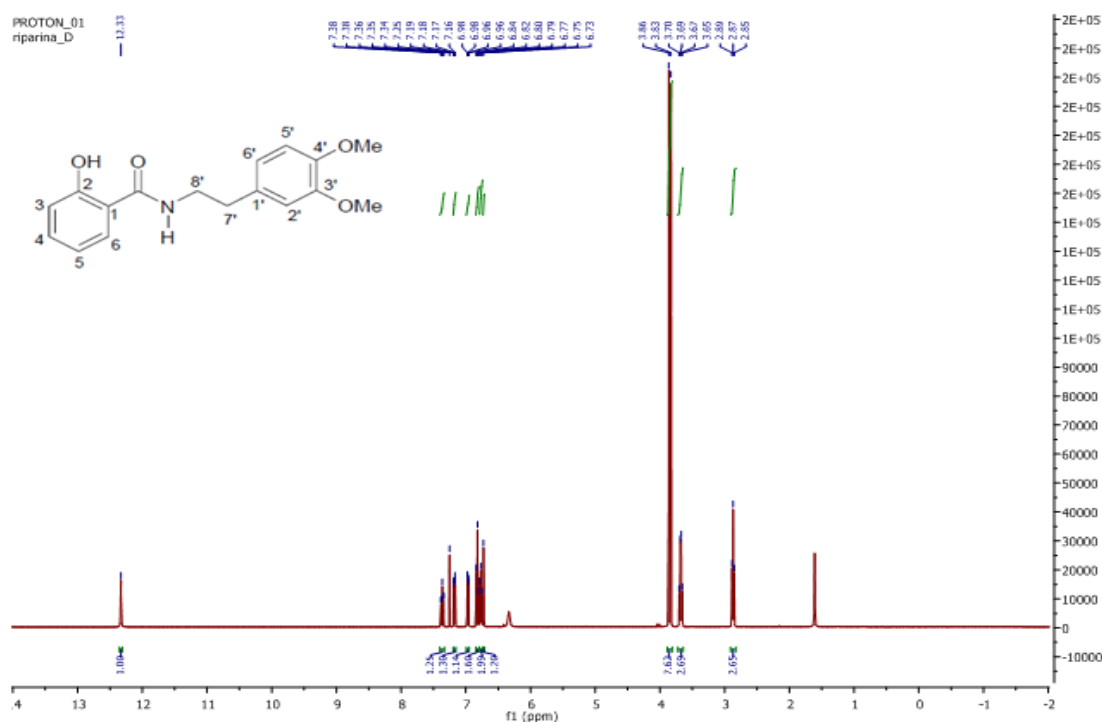


Figura 5: Espectro de RMN ^1H da riparina D em clorofórmio deuterado, 400 MHz.

Fonte: Arquivo pessoal

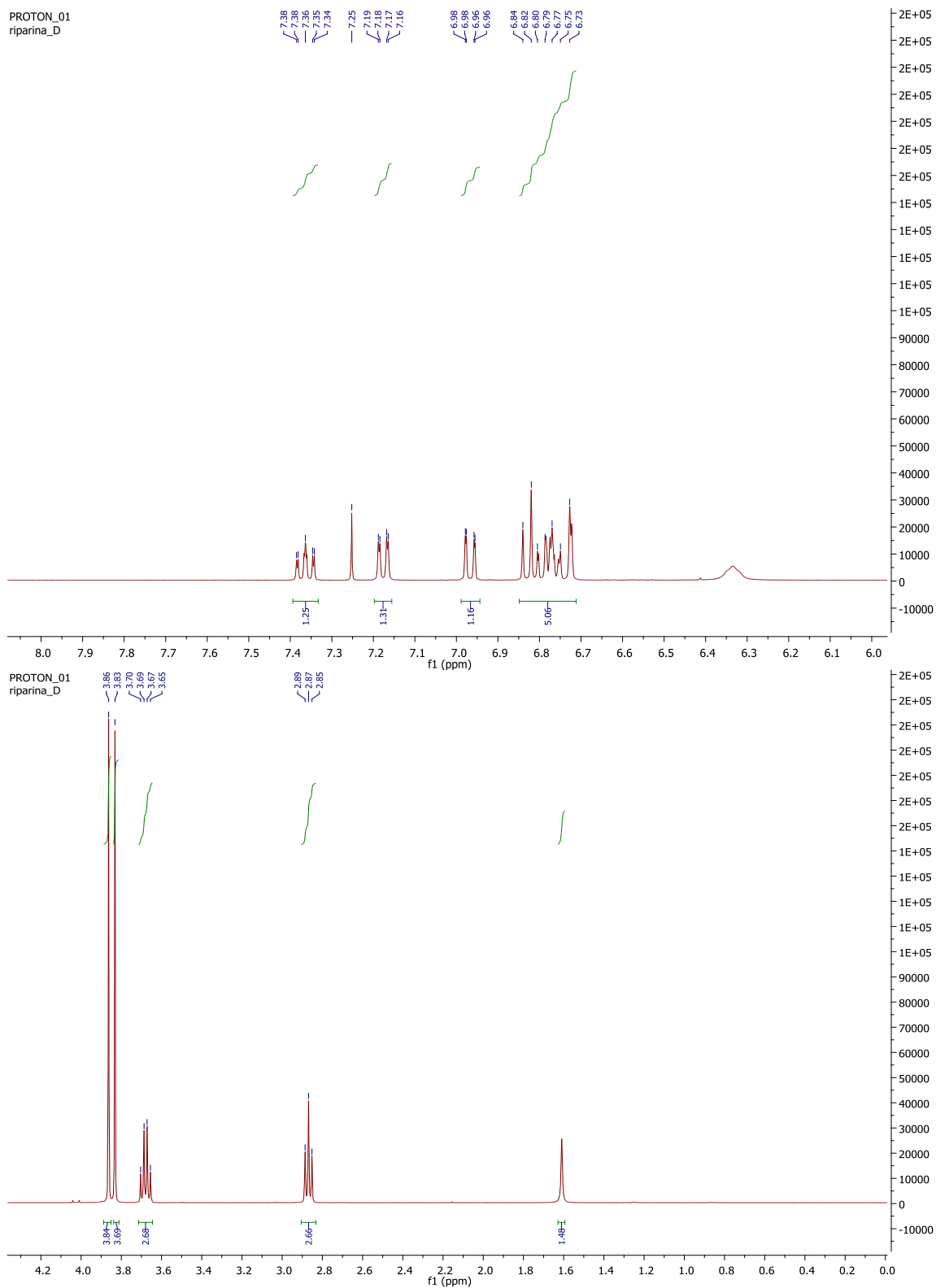


Figura 6: Expansão do espectro de RMN ^1H da riparina D em CDCl_3 (400 MHz).

Fonte: Arquivo pessoal

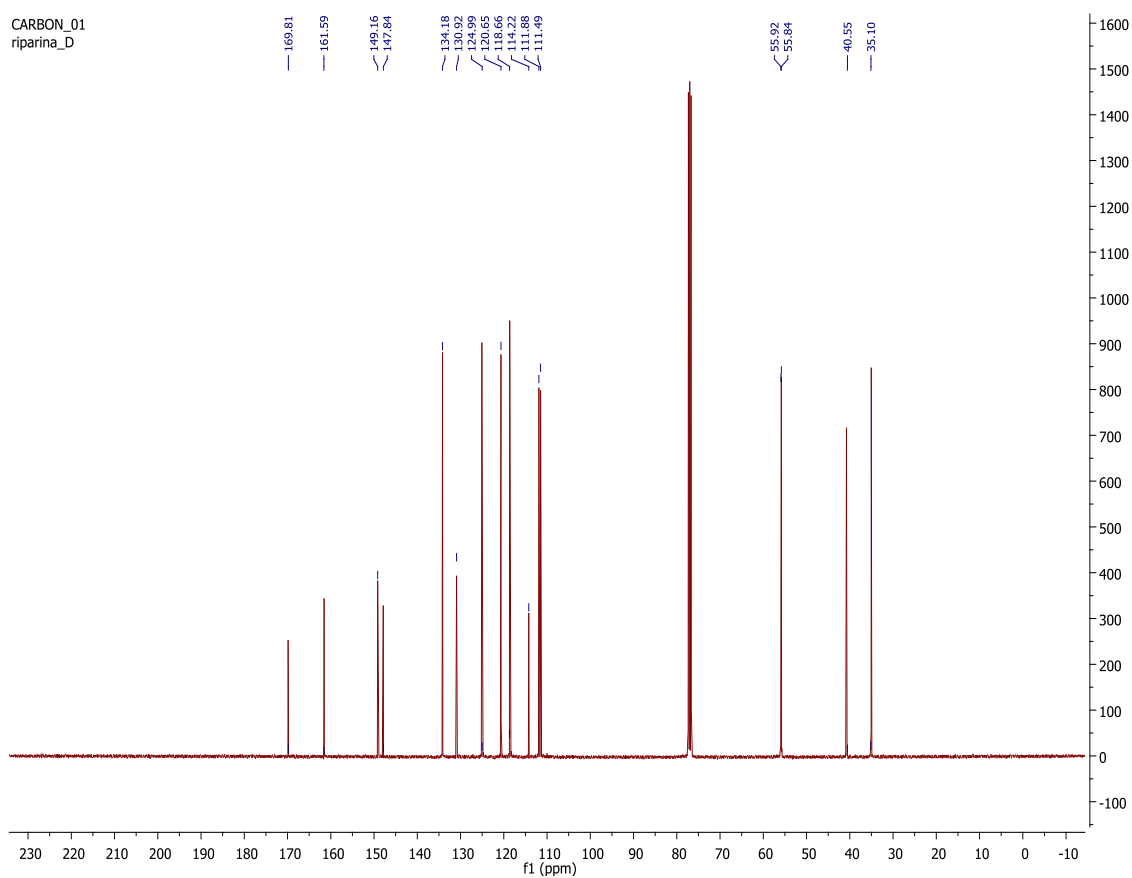


Figura 7: Espectro de RMN ^{13}C da riparina D em CDCl_3 , 200 MHz.

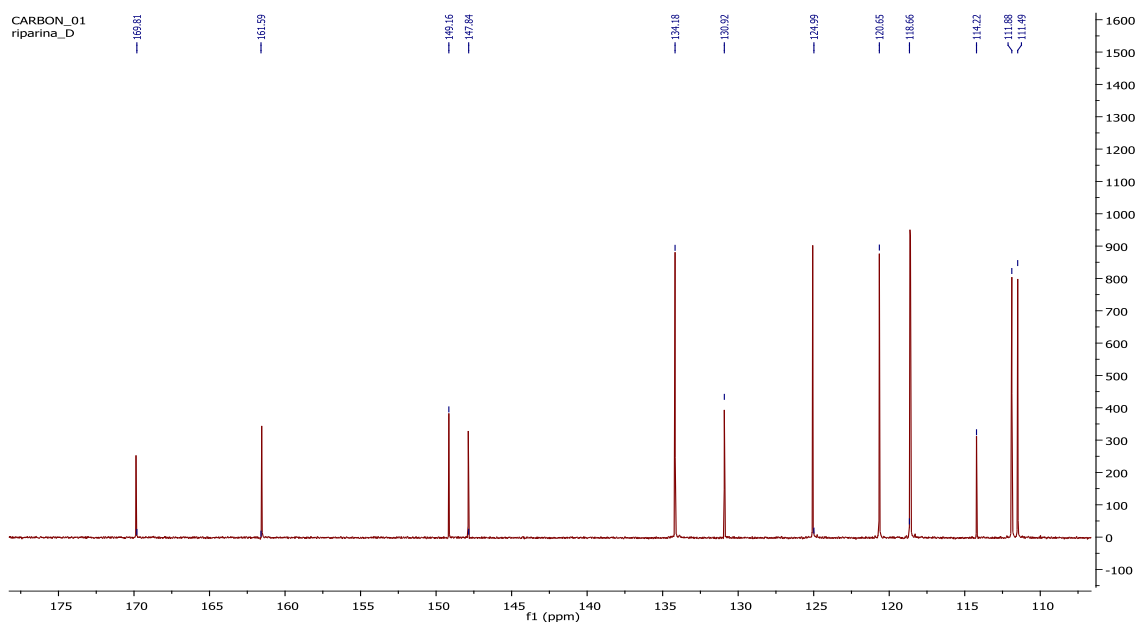


Figura 8: Expansão do espectro de RMN ^{13}C da riparina D em CDCl_3 deuterado (200 MHz)

O espectro de infravermelho da riparina D (Figura 9) apresenta o estiramento em 1636 cm^{-1} correspondente à ligação C=O e estiramentos que vão de 1025 a 1283 cm^{-1} que indicam a presença de grupamentos aril-alquil-éter característico da molécula. Além disso, chama atenção no espectro o estiramento em 3376 cm^{-1} da amina primária e os estiramentos médios observados 2900 e 3100 cm^{-1} característicos de grupos aromáticos (LOPES;FASCIO, 2004).

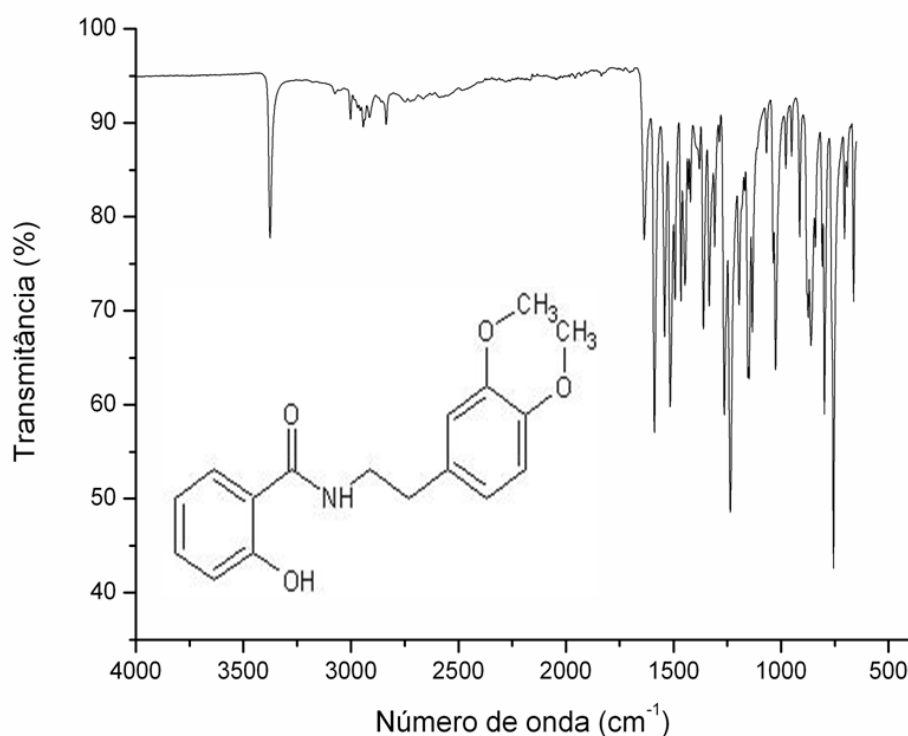


Figura 9: Espectro na região de infravermelho da riparina D.

Fonte: Arquivo pessoal

Na caracterização térmica, verifica-se que ocorre um evento endotérmico ($T_{\text{pico}} = 114,1\text{ }^{\circ}\text{C}$) que corresponde à fusão da única forma cristalina observada (Figura 10), sendo que a esta temperatura não está associada nenhuma perda de massa, conforme observado na Figura 11. Logo, a análise térmica da riparina D permitiu concluir que não há a presença de diferentes formas polimórficas.

O polimorfismo é definido como a habilidade de uma substância em existir no estado sólido com, no mínimo, duas estruturas cristalinas diferentes. Por consequência,

cada polimorfo é uma fase cristalina distinta(GAVEZZOTTI, 2007).

A princípio, todos os fármacos apresentam a capacidade de se cristalizar em estruturas cristalinas diferentes, portanto, todos os fármacos podem apresentar o fenômeno do polimorfismo. Entretanto, em função de barreiras cinéticas e termodinâmicas, isso nem sempre é observado(GRANT;BYRN, 2004).

Algumas propriedades físico-químicas variam quando a estrutura cristalina é alterada. Propriedades elétricas e ópticas, dureza, ponto de fusão, pressão de vapor, solubilidade, densidade, grau de higroscopicidade, reatividade no estado sólido, estabilidade física, estabilidade química e comportamento térmico são exemplos de características que podem apresentar divergências em formas cristalinas diferentes de um mesmo composto. Como consequência, muitas das propriedades importantes para o fármaco podem ser afetadas, dentre elas, destacam-se: a velocidade de dissolução (que pode acarretar em desvios na biodisponibilidade), a densidade aparente e verdadeira, a morfologia do cristal, a compactação e o escoamento do pó, além da estabilidade química e física(ARAUJO et al., 2012)

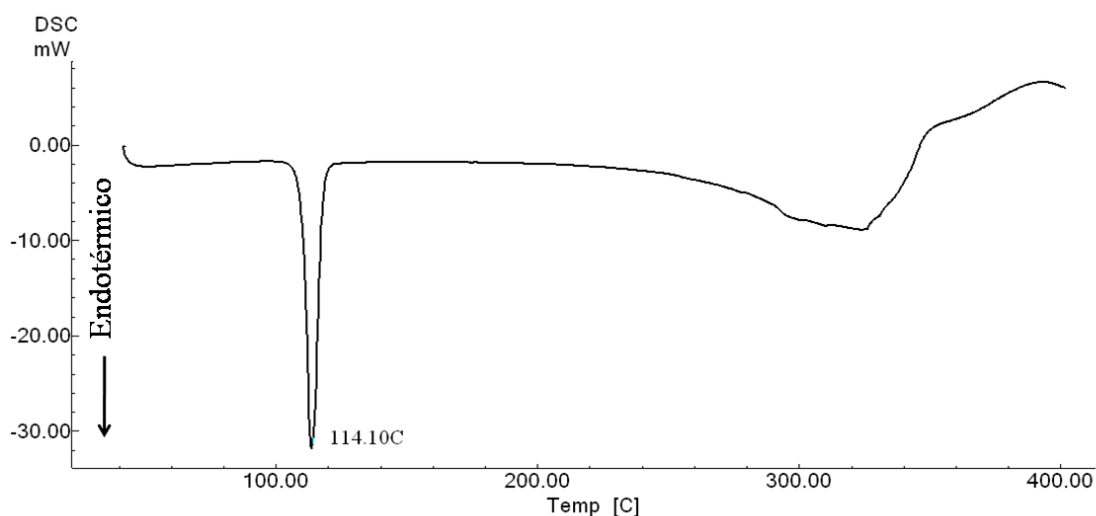


Figura 10: Curva de DSC da riparina D obtida na razão 3 °C/min.

Fonte: Arquivo pessoal

Na análise termogravimétrica (Figura 11), observou-se que a degradação ocorreu na faixa de temperatura 200 a 330 °C, apresentando uma reação completa e em fase única. Através da análise do DTA observa-se a presença de um pico em 114,71 °C, corroborando com a temperatura de fusão observada no DSC.

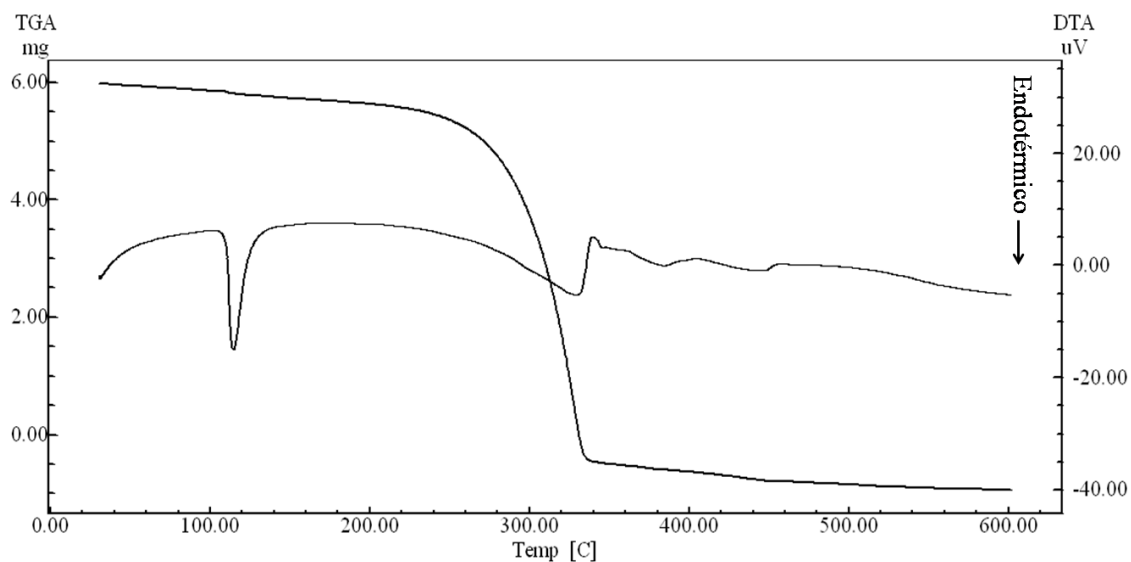


Figura 11: Curva de TG/DTA da riparina D obtida na razão de 10 °C/min

Fonte: Arquivo pessoal

3.2 Diagrama de Solubilidade

Foi realizado o estudo de variação da solubilidade da ripD em presença de diferentes concentrações de HP β CD, com os dados obtidos construiu-se o diagrama de solubilidade de fases (Figura 12). O diagrama sugere o aumento da solubilidade em água da ripD na presença da HP β CD, sendo que o perfil observado pode ser classificado como do tipo A_L , que indica uma estequiometria molar de 1:1 entre as duas entidades químicas. A solubilidade intrínseca (S_0) apresentada pelo fármaco foi de 9,43 μ g/mL. Logo, o incremento de solubilidade máximo foi de 540,8%, passando para 51 μ g/mL.

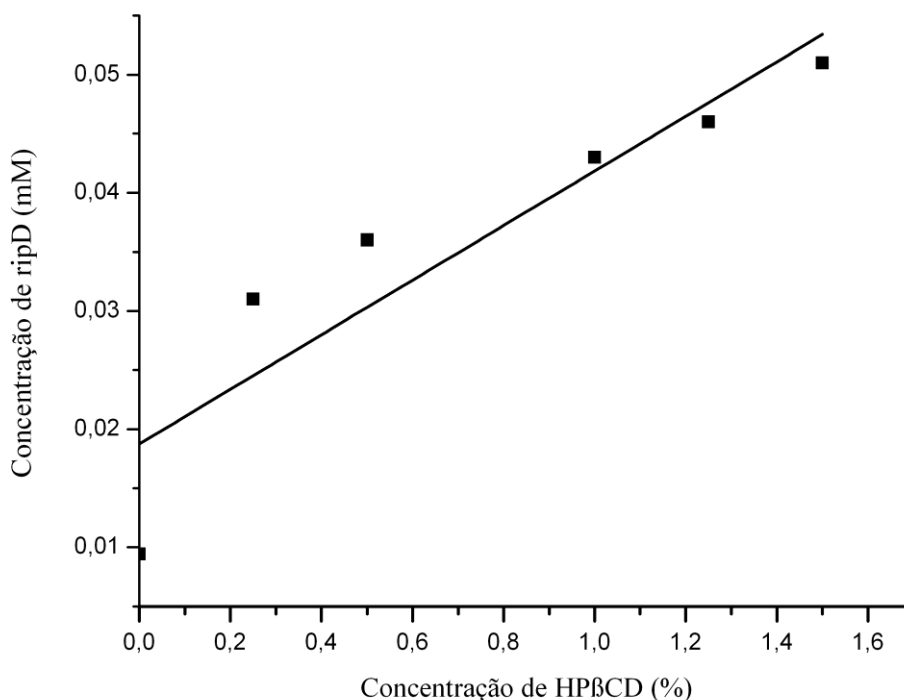


Figura 12: Diagrama de solubilidade da riparina D na presença de concentrações crescentes de HP-β-CD.

Fonte: Arquivo pessoal

3.3 Caracterização dos complexos de inclusão obtidos por diferentes métodos.

A termogravimetria e a calorimetria diferencial exploratória são amplamente utilizadas na caracterização de processos de complexação entre fármacos e ciclodextrinas, pois a ausência de alguns eventos térmicos, tais como: fusão, sublimação, evaporação e degradação pode indicar que a molécula hóspede se complexou (ÉHEN et al., 2005). As curvas de TG/DTA representadas na Figura 13 mostram que houve a complexação, devido à ausência ou redução dos picos relativos à fusão da riparina. No entanto, somente a análise térmica não é suficiente para afirmar o sucesso deste processo, visto que em alguns casos pode-se obter apenas uma mistura de moléculas hospedeiras complexadas e não complexadas. Assim, faz-se necessário a utilização de outras técnicas analíticas, como: infravermelho, DRX e ensaios de dissolução.

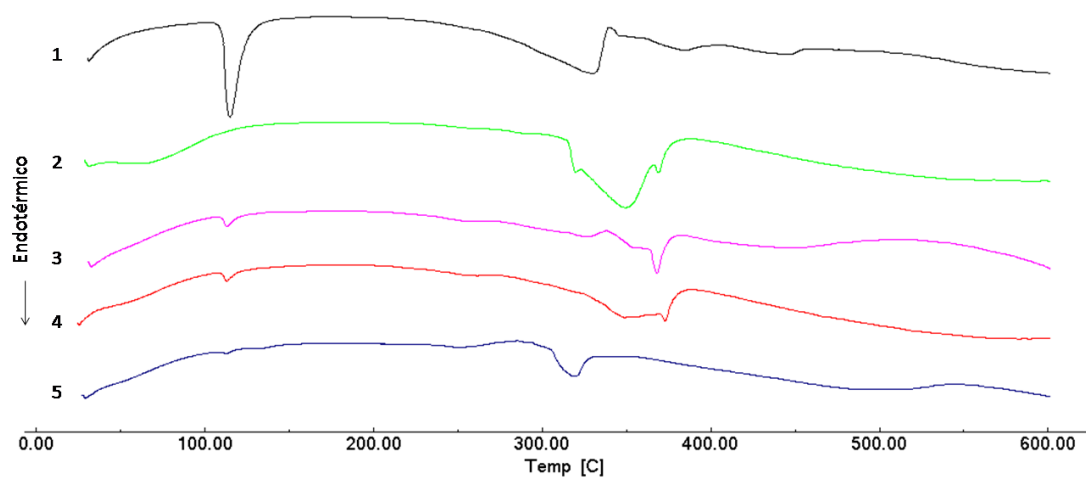


Figura 13: Curva de DTA da riparina D e dos complexos obtidos por diferentes métodos, na razão de 10 °C/min. (1) riparina D; (2) HP β CD; (3) Mistura física; (4) Malaxagem; (5) *Spray-drying*

Fonte: Arquivo pessoal

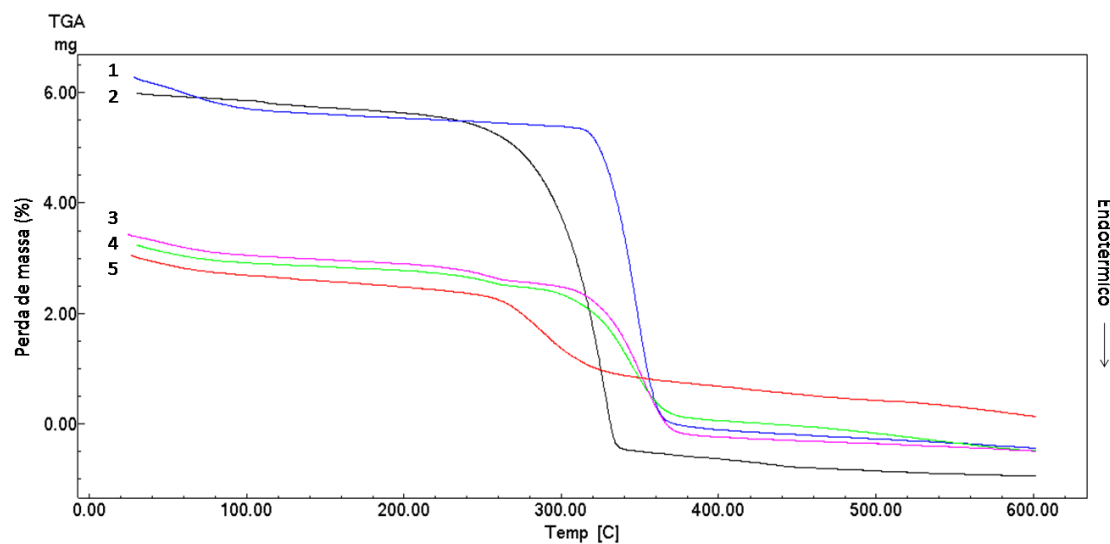


Figura 14: Curvas de TG da riparina D e dos complexos obtidos por diferentes métodos na razão de 10 °C/min. (1) HP β CD; (2) riparina D; (3) Mistura física; (4) Malaxagem; (5) *Spray-drying*.

Fonte: Arquivo pessoal

Observa-se na Figura 14, curvas de TG, que os processos de decomposição dos complexos e mistura física ocorrem em temperaturas intermediárias à decomposição da riparina D isolada e da HP β CD, representando um ganho de estabilidade térmica. Além disso, o fato de que nenhum complexo ou mistura física ter sua temperatura de fusão antecipada também representa uma evidência de compatibilidade dos compostos (FORTES, 2012).

De forma geral, as interações entre o fármaco e a ciclodextrina desempenham um papel fundamental no perfil e controle de liberação. Entretanto, a razão de liberação de fármacos incorporados em sistemas com estrutura cristalina dependerá do grau e do tipo desta estrutura, assim como das características físico-químicas do fármaco (GABBOUN et al., 2001). Logo, a complexação poderá ser avaliada por mudanças nos picos característicos do complexo em relação às moléculas isoladas, quando analisadas por difração de raios X (TAKAHASHI et al., 2012).

Observam-se na Figura 15 os difratogramas da riparina D, da HP β CD e dos complexos de inclusão obtidos por mistura física, malaxagem e *spray-drying*. Quanto ao fármaco, os picos de alta intensidade observados nos diferentes ângulos de difração, tendo os mais acentuados em $2\theta = 15,44; 22,9$ e $25,02$ indicam uma estrutura cristalina. Já a ausência de picos observado no difratograma da HP β CD indica uma estrutura de natureza amorfa.

A interpretação do processo de complexação por DRX segue o mesmo princípio da análise térmica, avaliando o desaparecimento ou mudança dos picos característicos (FREITAS et al., 2012). A mistura física e malaxagem exibem picos característicos da difração da rip D sobrepostos ao perfil amorfo da HP β CD, enquanto que o complexo obtido por *spray-drying* apresentou tais picos de forma reduzida ou quase inexistentes, indicando que o processo de complexação neste último tenha sido mais efetivo (Figura 15). No entanto, há a necessidade da utilização de outras técnicas analíticas para uma investigação mais aprofundada.

A análise dos espectros de infravermelho pode ser feita comparando as bandas da molécula hóspede, da HP β CD e dos complexos. Normalmente, o espectro da mistura física se dá através da sobreposição dos espectros do fármaco e da ciclodextrina com as bandas da molécula hóspede menos intensas devido a sua menor concentração. A complexação pode ser avaliada pela mudança de posição das bandas, assim como pela sua diminuição ou mesmo desaparecimento (CORTI et al., 2007).

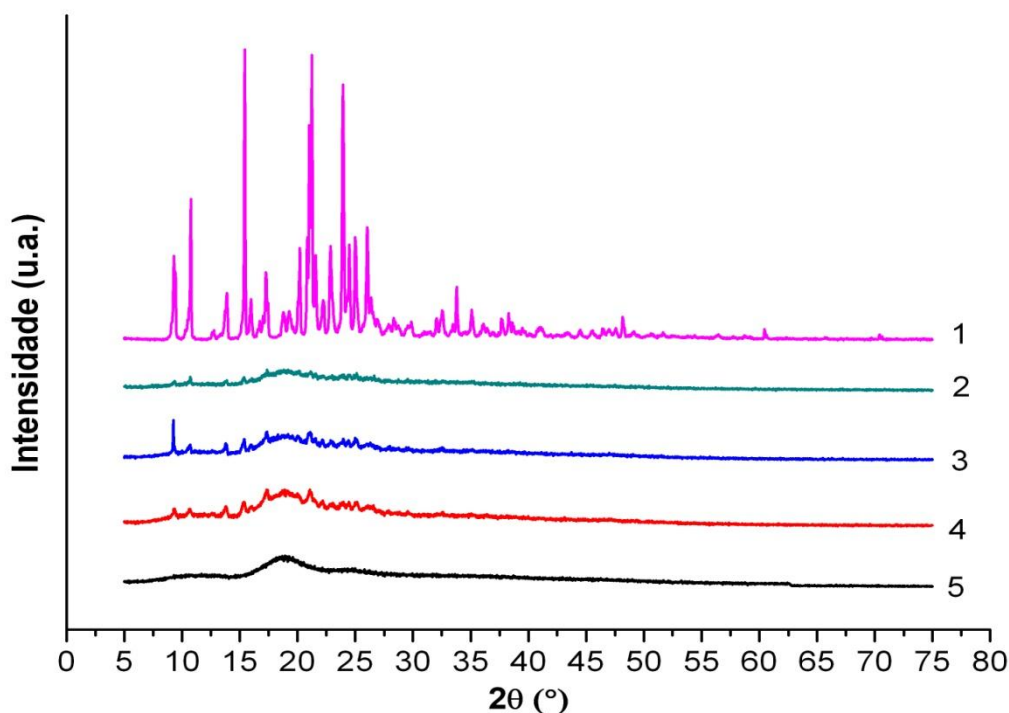


Figura 15: Difratoograma de raios X da riparina D, HP β CD e dos complexos de inclusão obtidos por mistura física, malaxagem e *spray-dry*. (1) Riparina D; (2) *Spray drying* da rip D e HP β CD; (3) Mistura física entre rip D e HP β CD; (4) Malaxagem entre rip D e HP β CD; (5) Hidroxipropil- β -ciclodextrina

Fonte: Arquivo pessoal

A modificação de algumas bandas características da molécula hóspede é indicativo de que apenas parte da molécula foi complexada à ciclodextrina, sendo que as bandas relativas à parte não complexada permanecem inalteradas (YANG et al., 2008). No entanto, é importante ressaltar que quando ocorre a complexação, as bandas das CD não são alteradas e se a molécula não apresentar bandas características, suas alterações podem ser imperceptíveis (VEIGA ;MERINO, 2002).

A Figura 16 mostra os espectros infravermelhos da riparina D, HP β CD, mistura física e complexos de inclusão obtidos por malaxagem e *spray-drying*. Para avaliar o processo de complexação por FTIR deve-se observar e comparar as bandas da molécula hóspede, da HP β CD, dos complexos e da mistura física. Quando há complexação, as bandas correspondentes ao fármaco no complexo encontram-se diminuídas (TAKAHASHI; VEIGA et al., 2012).

Para avaliar, selecionou-se as principais bandas da ripD que não aparece na ciclodextrina. Logo, a investigação comparativa selecionou o estiramento N-H (3376 cm^{-1}), onde se observa uma diminuição no pico nos complexos por malaxagem e mistura física e a total ausência no complexo por *spray-drying*.

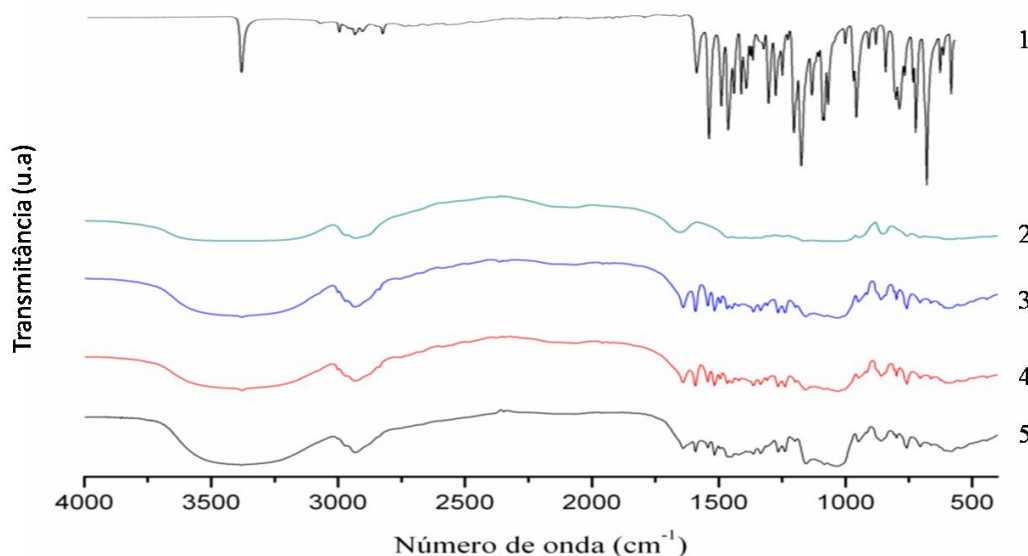


Figura 16: Espectro de infravermelho da riparina D, HP β CD, mistura física e complexos de inclusão obtidos por malaxagem e *spray-drying*. (1)riparina D; (2) HP β CD; (3) Mistura física; (4) Malaxagem; (5) Spray-drying

Fonte: Arquivo pessoal

Os ensaios de dissolução permitem prever o comportamento “*in vivo*” de uma formulação em desenvolvimento. Para isto, devem-se utilizar meios de dissolução que se assemelhem às condições fisiológicas, levando em consideração a condição *sink*, presença de tensoativos e a influência no padrão de motilidade no processo. A velocidade de dissolução é também influenciada pelo tamanho da partícula, forma do cristal, polimorfismo, molhabilidade, adsorção aos excipientes, tempo de desintegração e natureza do revestimento (PANCHAGNULA ;THOMAS, 2000).

Outro fator a ponderar é o tempo de duração do teste de dissolução. A escolha deve levar em consideração não só os locais onde o fármaco irá ser absorvido, mas também, a hora do dia em que este é administrado. Assim, para que ocorra a absorção de um fármaco no intestino delgado por um período de 1 – 2 hora, a dissolução deve estar completa, sob condições gástricas, em 15 a 30 minutos. Nestas circunstâncias, é

razoável que a utilização de critérios de 85% de fármaco dissolvido após 15 minutos no meio simulado com pH gástrico (SOARES-SOBRINHO et al., 2010).

Observa-se na Figura 17 que após 10 minutos a concentração de riparina D em solução atinge seu limite máximo, sendo a porcentagem dissolvida de 9,7%. Diferentemente, quando se analisa o perfil de dissolução da mistura física verifica-se que após os 10 minutos iniciais a concentração de riparina D em solução é de 38,7%, permanecendo nesse nível ao longo da análise. Este aumento pode ser explicado pela redução da tensão interfacial entre o fármaco e o meio de dissolução devido à mistura com a HP β CD (FERNANDES et al., 2008).

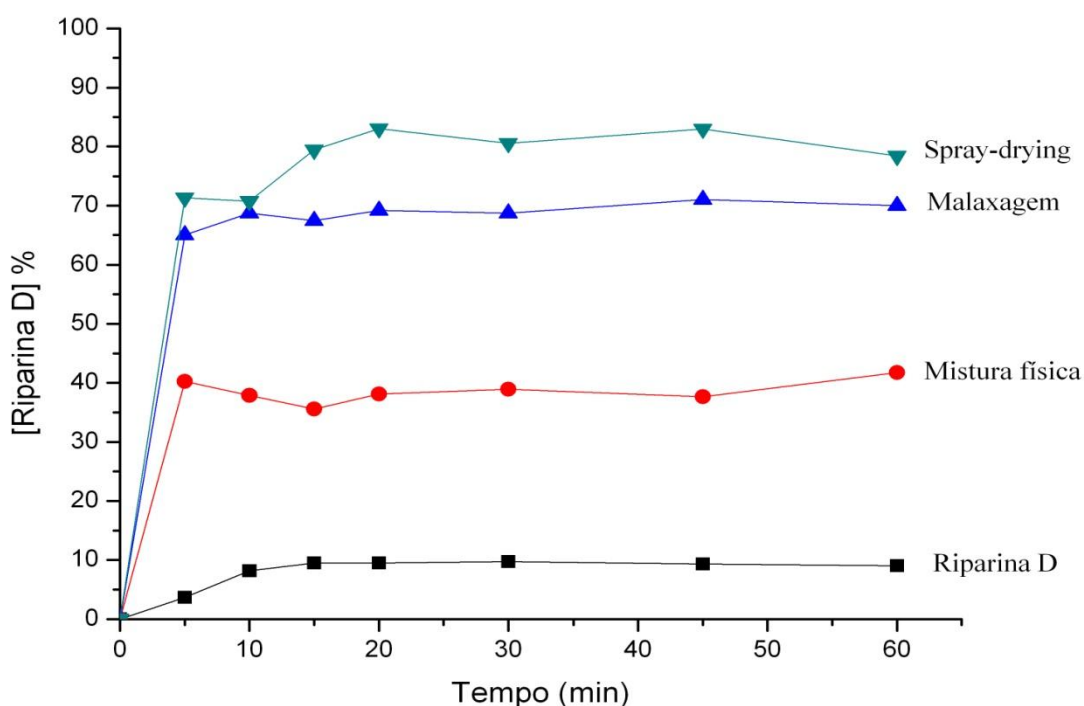


Figura 17: Perfil de liberação da riparina D, mistura física e complexos de inclusão obtidos por malaxagem e *spray-drying*.

Fonte: Arquivo pessoal

CONCLUSÃO

A riparina D é um fármaco com potencial a se tornar medicamento no futuro, devido aos seus bons resultados em ensaios farmacológicos de ação antioxidante. No entanto, observou-se um entrave biofarmacêutico – a baixa solubilidade em água. Para reverter isto, o estudo aqui detalhado apresentou uma alternativa viável, a complexação

com HP β CD, uma ciclodextrina de baixo custo e com solubilidade aquosa elevada. Nos resultados, podemos observar que o complexo obtido pelo método de *spray-drying* foi o mais efetivo, aumentando a solubilidade do fármaco em estudos de dissolução *in vitro*, sendo corroborado também pela caracterização instrumental. Em suma, o trabalho realizado potencializa e viabiliza estudos futuros necessários na trajetória deste potencial medicamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, G.L.B.D. et al. Polimorfismo na produção de medicamentos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 1, p. 27-36, 2012.

EVERY, S. Molecular targets of oxidative stress. **Biochemical Journal**, v. 434, p. 201-210, 2011.

BARBOSA-FILHO, J.M. Quimiodiversidade e potencialidade farmacológica da flora paraibana. **Cadernos de Farmácia**, v. 13, n. 2, p. 85-102, 1997.

CHALLA, R. et al. Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. **Aaps Pharmscitech**, v. 6, n. 2, p. E329-E357, 2005.

CORTI, G. et al. Physical–chemical characterization of binary systems of metformin hydrochloride with triacetyl- β -cyclodextrin. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 45, n. 3, p. 480-486, 2007.

DRESSMAN, J.B. et al. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms. **Pharmaceutical research**, v. 15, n. 1, p. 11-22, 1998.

ÉHEN, Z. et al. Thermal characterization of natural and modified cyclodextrins using TG-MS combined technique. **Journal of thermal analysis and calorimetry**, v. 80, n. 2, p. 419-424, 2005.

FERNANDES, L. et al. Solid state studies on molecular inclusions of Lippia sidoides essential oil obtained by spray drying. **Journal of thermal analysis and calorimetry**, v. 95, n. 3, p. 855-863, 2008.

FORTES, A.C. **Avaliação psicofarmacológica e estudo de pré-formulação do protótipo a fármaco ansiolítico 2-[(2,6-diclorobenzilideno) amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta[b]tiofeno-3- carbonitrila, 5TIO1**. (2012). - Tese (Doutorado), UFPI/CCS Teresina, Brazil, 2012.

FREITAS, M.R. et al. Inclusion complex of methyl- β -cyclodextrin and olanzapine as potential drug delivery system for schizophrenia. **Carbohydrate polymers**, v. 89, n. 4, p. 1095-1100, 2012.

GABBOUN, N.H. et al. Release of salicylic acid, diclofenac acid and diclofenac acid salts from isotropic and anisotropic nonionic surfactant systems across rat skin. **International journal of pharmaceutics**, v. 212, n. 1, p. 73-80, 2001.

GAVEZZOTTI, A. A solid-state chemist's view of the crystal polymorphism of organic compounds. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 96, n. 9, p. 2232-2241, 2007.

GRANT, D.J.W.; BYRN, S.R. A timely re-examination of drug polymorphism in pharmaceutical development and regulation. **Advanced drug delivery reviews**, v. 56, n. 3, p. 237-239, 2004.

GUTIERREZ, S.J.C. **Síntese do Bowdenol, um Dihidrobenzofuranoide Isolado de Bowdichia Virgilioides e Preparação de Derivados da Riparina Isolada de Aniba Riparia com Potencial Atividade Biológica.** (2007). - Tese (Doutorado), UFPB/CCS João Pessoa, Brazil, 2007.

LAU, E. Preformulation studies. **Handbook of modern pharmaceutical analysis**, v. 3, p. 173-224, 2001.

LI, H. et al. Structure-based in silico model profiles the binding constant of poorly soluble drugs with β -cyclodextrin. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 1, p. 55-64, 2011.

LOPES, W.A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 670-673, 2004.

NUNES, G.B.L. et al. Prospecção científica e tecnológica da *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae). **Cadernos de Prospecção**, v. 6, n. 4, p. 447, 2014.

PANCHAGNULA, R.; THOMAS, N.S. Biopharmaceutics and pharmacokinetics in drug research. **International journal of pharmaceutics**, v. 201, n. 2, p. 131-150, 2000.

SOARES-SOBRINHO, J.L. et al. A preformulation study of a new medicine for Chagas disease treatment: physicochemical characterization, thermal stability, and compatibility of benznidazole. **Aaps Pharmscitech**, v. 11, n. 3, p. 1391-1396, 2010.

SOARES, M.F.D.L.R. et al. Thermal characterization of antimicrobial drug ornidazole and its compatibility in a solid pharmaceutical product. **Journal of thermal analysis and calorimetry**, v. 104, n. 1, p. 307-313, 2011.

SOBRINHO, J.L.S. et al. Improving the solubility of the antichagasic drug benznidazole through formation of inclusion complexes with cyclodextrins. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1534-1538, 2011.

SURMEIER, D.J. et al. The role of calcium and mitochondrial oxidant stress in the loss of substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons in Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 198, p. 221-231, 2011.

TAKAHASHI, A.I. et al. A literature review of cyclodextrins inclusion complexes characterization—part II: X-Ray diffraction, infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance. **International Journal of Pharmaceutical Science** v. 12, n. 1, p. 8-15, 2012.

VEIGA, M.D.; MERINO, M. Interactions of oxyphenbutazone with different cyclodextrins in aqueous medium and in the solid state. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 28, n. 5, p. 973-982, 2002.

YANG, X. et al. Detecting and identifying the complexation of nimodipine with hydroxypropyl- β -cyclodextrin present in tablets by raman spectroscopy. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 97, n. 7, p. 2702-2719, 2008.

YUAN, C. et al. Characterization of an inclusion complex of ethyl benzoate with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **Food chemistry**, v. 152, p. 140-145, 2014.

CAPÍTULO 4

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL POR RMN DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO DA RIPARINA D COM HIDROXIPROPIL- β -CICLODEXTRINA

Capítulo IV

Caracterização estrutural por RMN de complexos de inclusão da Riparina D com HP- β CD

Rian Felipe de Melo Araújo¹; Alexandre Araújo de Souza²; Stanley Juan Chavez Gutierrez¹; José Lamartine Soares Sobrinho³; Lívio César Cunha Nunes¹

¹*Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil*

²*Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil*

³*Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.*

RESUMO:

A formação do complexo de inclusão da riparina D, fármaco com atividade antitumoral citotóxica e antioxidante, com hidroxipropil- β -ciclodextrina foi estudada utilizando a espectroscopia de RMN. Os resultados mostraram que a estequiometria adequada para a preparação do complexo é de 1:1. A inclusão do anel aromático, que possui carbonilas ligadas a ele, no interior da HP β CD foi confirmada através de espectros bidimensionais de ROESY, assim como com a avaliação das medidas de tempo de relaxação longitudinal (T_1). Através da avaliação dos coeficientes de difusão, pela técnica de DOSY, observou-se que a fração ligada do fármaco à ciclodextrina foi de 52,83%, com uma constante de associação aparente estimada em 2374 M^{-1} , evidenciando uma forte interação.

Palavras-chave: Riparina D, hidroxipropil- β -ciclodextrina, RMN

ABSTRACT:

The formation of the inclusion complex of riparina D cytotoxic drug with antitumor activity, with hydroxypropyl- β -cyclodextrin has been studied using NMR spectroscopy. The results showed that proper stoichiometry for the preparation of the complex is 1: 1. The inclusion of the aromatic ring having carbonyl groups attached to it, within the HP β CD was confirmed by two-dimensional ROESY spectra, as well as the assessment of the longitudinal relaxation time measurements (T1). Through evaluation of the diffusion coefficients by DOSY technique, it was observed that the bound fraction of the drug to cyclodextrin was 52.83%, with an estimated apparent association constant of 2374 M⁻¹, indicating a strong interaction.

Key-words: Riparin D, hidroxypropil- β -cyclodextrin, NMR

INTRODUÇÃO:

A biodisponibilidade dos fármacos, capacidade que a molécula tem de atingir os sítios farmacológicos, está diretamente relacionado com a eficiência terapêutica. Vários fatores influenciam a biodisponibilidade, dentre todos, destacam-se a solubilidade, estabilidade e capacidade de serem absorvidos (CHAUDHARY et al., 2012). Logo, muitos candidatos a fármacos que apresentam baixa solubilidade em água necessitam de uma intervenção farmacotécnica durante a formulação farmacêutica. Dentre estas, destaca-se a utilização de complexos supramoleculares de autoagrupamento do tipo hóspede-hospedeiro (MURA, 2015).

As ciclodextrinas (CDs) são macromoléculas formadas por unidades de glicose unidas através de ligações glicosídicas α (1 \rightarrow 4), classificadas assim como oligossacarídeos cíclicos. Existem diferentes tipos de CDs com diferentes características físico-químicas, dependendo do número de unidades de glicose e do radical ligado a estes. Estas moléculas, devido à sua cavidade central, são capazes de hospedar moléculas menores apolares, e isto se deve a ligações hidrofóbicas presentes na superfície interior. Em contrapartida, a superfície externa da macromolécula possui hidroxilas primárias e secundárias que garantem uma boa solubilidade em água, tornando esta classe de composto alvo para vários estudos de encapsulação de fármacos insolúveis (CRINI, 2014).

As hidroxilas primárias e secundárias presentes na β -CD são grupamentos que permitem modificações químicas da estrutura, substituindo os hidrogênios por uma variedade de diferentes radicais (LOFTSSON; BREWSTER, 2012). Exemplo destes derivados, destaca-se a 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina (2-HP- β -CD) que apresenta solubilidade aquosa superior ao da β -CD (Figura 1).

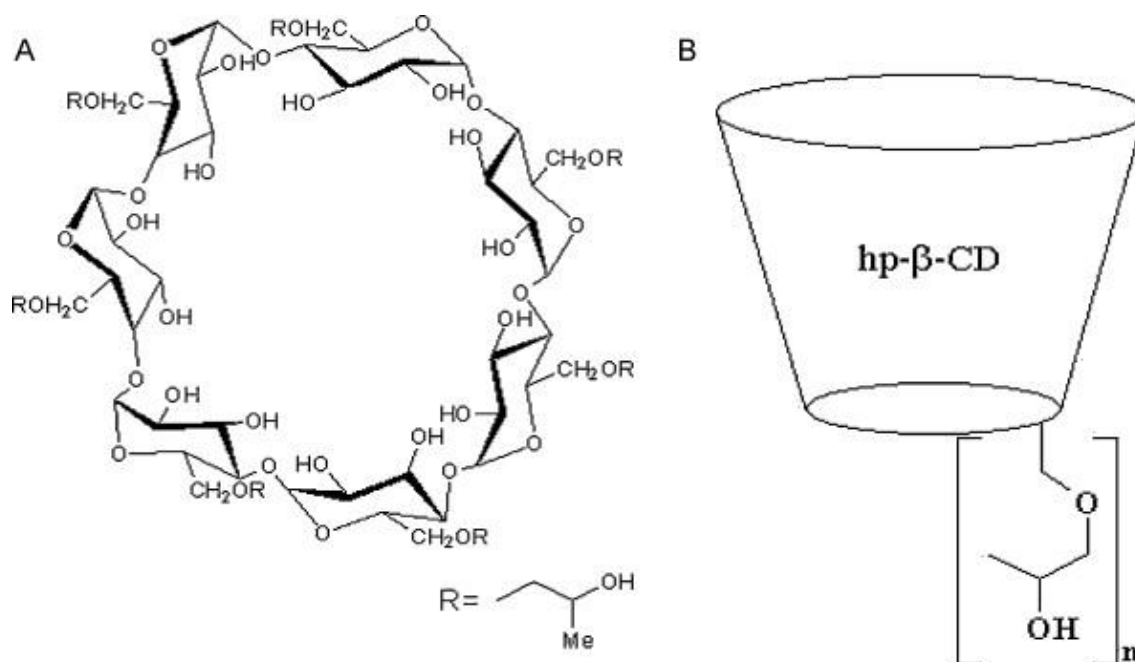


Figura 1: Estrutura química (A) e representação esquemática (B) da 2-HP-β-CD

Fonte: Adaptado de EL-KOSASY et al., 2011.

A riparina D (ripD), 2-hidroxi-*N*-[2-(4-metoxi-fenil)-etil]-benzamida, derivado sintético dos alcaloides extraídos da *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae), apresentou em estudos prévios potencial atividade antitumoral citotóxica. No entanto, do ponto de vista biofarmacêutico, a riparina D apresentou baixa solubilidade em água, representando uma limitação significativa ao desenvolvimento de formas farmacêuticas orais (NUNES et al., 2014).

A ressonância magnética nuclear (RMN) é uma das técnicas espectroscópicas mais utilizadas na investigação de complexos supramoleculares. Isto se deve às informações únicas e precisas sobre a estrutura e a dinâmica das interações entre os complexos e as moléculas hospedeiras no nível atômico (DUFOUR et al., 2015).

Em virtude da abundância natural (99,98%) e da alta razão magnetogírica (γ), grande parte das metodologias de RMN aplicadas à investigação de complexos macromoleculares se dá com a observação do núcleo de hidrogênio (^1H). Quando ocorre a complexação do tipo hóspede-hospedeiro, observa-se uma variação no deslocamento químico da molécula hóspede devido à modificação da esfera de solvatação de seus hidrogênios. A análise de fenômenos como o tempo de correlação (τ_c), difusão molecular e relaxação dos *spins* nucleares fornecem importantes indícios a respeito de como as interações ocorre (LIS-CIEPLAK et al., 2014).

O objetivo deste trabalho foi estudar as interações supramoleculares do complexo de inclusão formado entre a riparina D e HP β CD em meio líquido pela técnica de RMN. Para isto, realizaram-se experimentos de *Job's plot* para determinação e corroboração da estequiometria do complexo, medidas de tempo de relaxação longitudinal e medidas de constantes de associação por experimentos de difusão.

MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Preparação das amostras:

A riparina D utilizada no estudo foi sintetizada e purificada no Núcleo de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal do Piauí, enquanto que a 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina foi obtida comercialmente pela Roquette[®]. Os sais fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) e dibásico (Na_2HPO_4) são provenientes da Vetec[®] e os solventes deuterados, metanol e D_2O , foram adquiridos da Cambridge Isotope Laboratories, Inc[®].

2.1.1 Preparação do tampão fosfato:

A solução tampão de fosfato foi preparada a partir de duas soluções estoques de Na_2HPO_4 e NaH_2PO_4 em água deuterada (D_2O). A solução de Na_2HPO_4 estava na concentração de 61 mmol L^{-1} e a de NaH_2PO_4 com 39 mmol L^{-1} , totalizando 100 mmol L^{-1} de sais após a mistura. Para a averiguação do pH da solução preparada utilizou-se o pHmetro da Phtek[®] equipado com eletrodo de Ag/AgCl previamente calibrado. Esta solução tampão foi utilizada para preparação de todas as amostras deste estudo descrito.

2.1.2 Preparação dos complexos de inclusão:

Os complexos binários de riparina D e HP β CD foram obtidos pela técnica de *spray-drying*. Inicialmente, dissolveu-se a mistura nas proporções de 1:1 molar em solução etanol:água (2:8) seguida da pulverização em *spray-dry* (Mini Spray Dryer B290 - Büchi[®]), com temperatura de entrada de $140 \text{ }^\circ\text{C}$ e de saída de $89 \text{ }^\circ\text{C}$ e pressão de ar de pulverização de 55 mmHg .

2.2 Técnicas de RMN

Os experimentos foram realizados em espectrômetro de RMN Varian[®] INOVA, modelo 400, operando a 400 MHz ($9,4 \text{ T}$) com núcleo de hidrogênio – 1 (H^1) equipado com sonda de 5 mm para detecção inversa, com gradiente de campo pulsado (PH TBI 600S3 H/C-BB-D-05 Z). O núcleo de Deutério (D) foi utilizado como referência para o

lock(trava do campo) e para o ajuste do *Shimming* (homogeneidade do campo magnético local). Todos os experimentos foram realizados a 25°C.

2.2.1 Job's plot

O experimento de Job permite determinar a estequiometria do complexo de inclusão ripD:HP β CD. Para tal, prepararam-se soluções estoques de riparina D e HP β CD a 2 mmol L⁻¹ cada (D₂O, 100 mmol L⁻¹ de tampão fosfato pH = 7,0, 10% de metanol-d₄ e TPSA como referência interna). Em seguida, a partir das soluções estoques, foram preparadas cinco soluções em concentrações variáveis de riparina D e HP β CD, no qual a concentração final permaneceu de 2 mmol L⁻¹ (Tabela 1).

Tabela 1: Concentrações de riparina D e HP β CD em amostras utilizadas para realização do experimento de Job's plot.

Solução	Concentração de rip D (mmol L ⁻¹)	Concentração de HP β CD (mmol L ⁻¹)
1	0,4	1,6
2	0,8	1,2
3	1,0	1,0
4	1,2	0,8
5	1,6	0,4

2.2.2 Experimento de ROESY 2D

A análise de RMN do tipo ROESY 2D foi realizada em amostra do complexo de inclusão formado pela riparina D e HP β CD, na proporção molar de 1:1. Para dissolução, utilizou-se tampão fosfato (pH = 7) preparado em D₂O. Configurou-se o equipamento para *mixing time* de 500 ms após o travamento de spin (*spin lock*). O experimento foi realizado em temperatura constante de 25°C.

2.2.3 Medidas de tempo de relaxação longitudinal (T_1)

Os estudos de medição do tempo de relaxação longitudinal foram feitos utilizando o método da inversão-recuperação. Foram utilizados os seguintes parâmetros: D₁("delay") de 6 s, pulso de 90° entre 10 – 15 μ s, número de *scans* igual a 32 e

utilização de 32 valores de tempo de recuperação. Foram realizadas medidas para a riparina D e para o complexo 1:1 da ripD com HP β CD.

2.2.4 Experimento de DOSY

Os experimentos de difusão foram realizados para a riparina D e para o complexo na proporção de 1:1, ambos na concentração de 2 mmol L⁻¹. 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 resultados obtidos foram processados utilizando o programa DOSYtoolbox[®]. Os experimentos de medidas de coeficientes de difusão não foram realizados em duplicata e, portanto, não há desvio padrão para ser apresentado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Com o objetivo de observar as alterações de ambiente químico dos hidrogênios das moléculas hóspedes, realizou-se a análise dos espectros de RMN de ^1H para a riparina D e para a HP β CD.

A descrição do RMN de ^1H (400 MHz) para a riparina D em metanol- d_4 e tampão fosfato com D_2O , pH = 7, observada na Figura 2, é: 12,43 ppm (s-OH2); 6,95 ppm (t-H3 e H4); 7,69 (d-H5); 7,39 ppm (t-H6); 8,43 ppm (s-NH); 3,63 ppm (q-H8'); 2,87 ppm (t-H7'); 6,85 ppm (dd-H6'); 6,87 ppm (d-H2' e H5'); 3,79 ppm (s-H3' e H4').

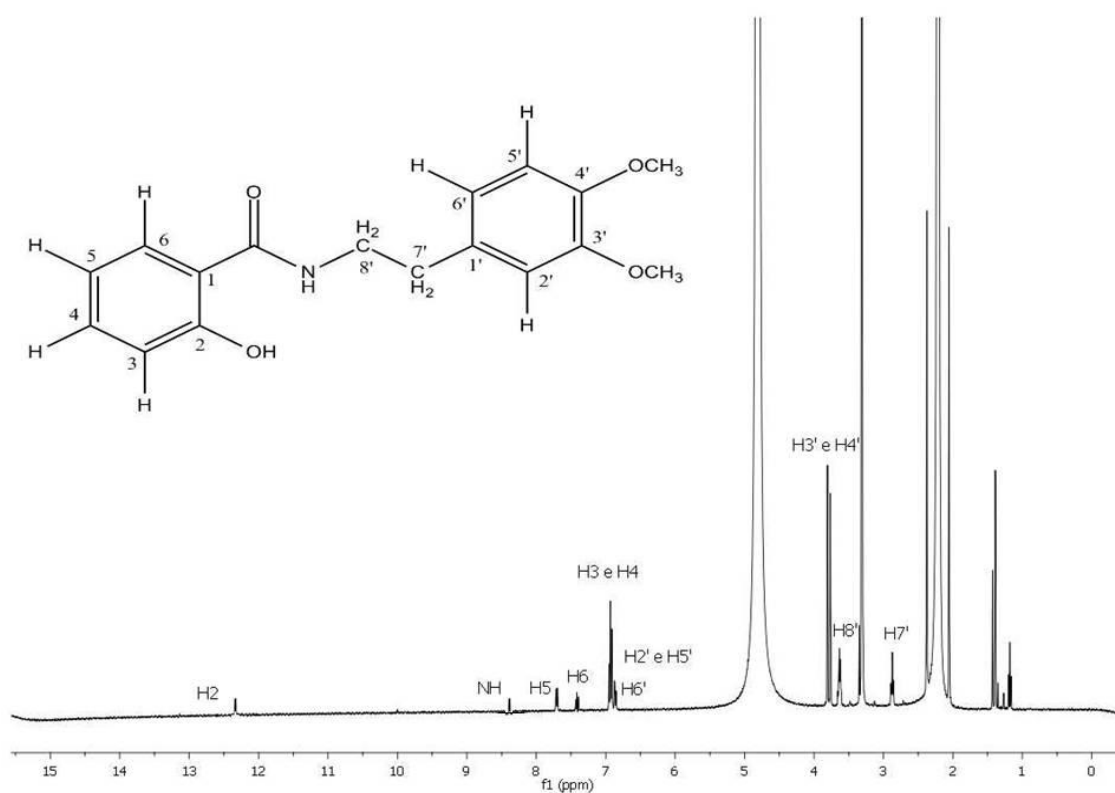


Figura 2: Espectro de RMN ^1H (400 MHz) da riparina D em metanol- d_4 e tampão fosfato com D_2O , pH = 7.

Fonte: Arquivo pessoal

A descrição do RMN de ^1H (400 MHz) para HP β CD em metanol- d_4 e tampão fosfato com D_2O , pH = 7, observada na Figura 3, é: 5,11 ppm (H1); 3,75 ppm (H2); 3,56 ppm (H3); 3,47 ppm (H4); 3,89 ppm (H5); 3,97 ppm (H7); 5,21 ppm (H8); 3,68 ppm (H9).

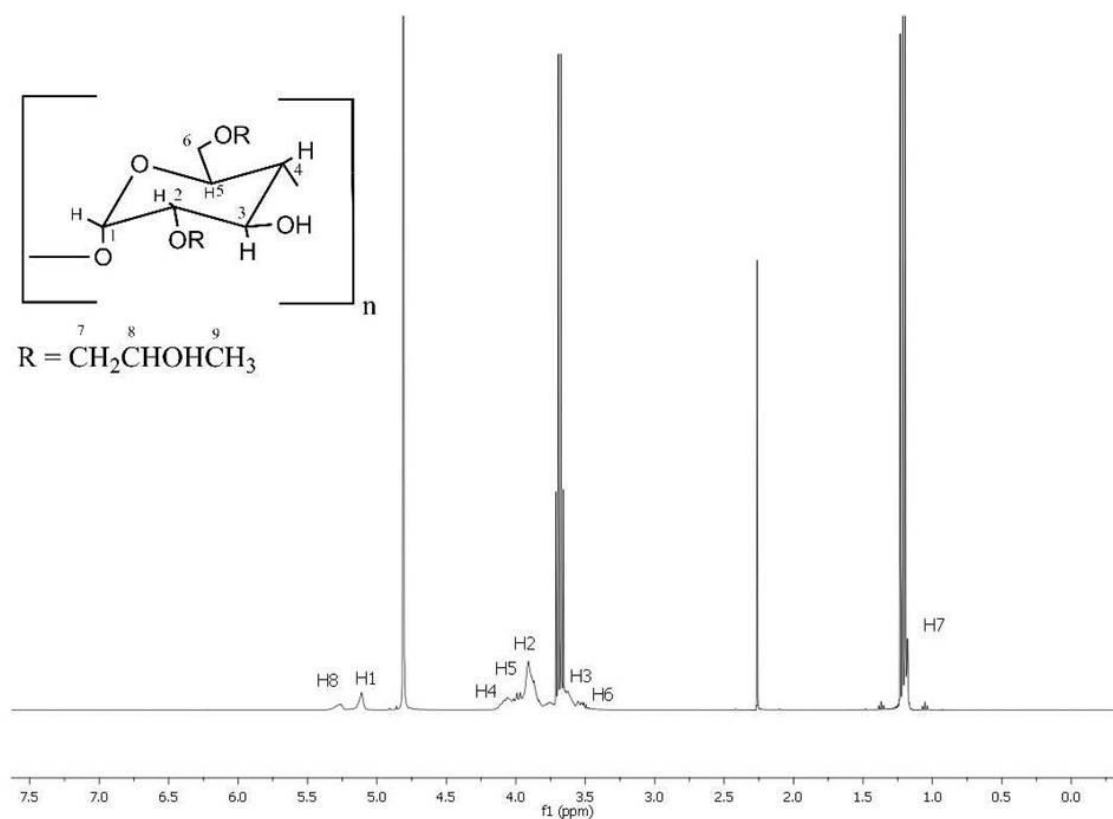


Figura 3: Espectro de RMN ^1H (400 MHz) da HP β CD em tampão fosfato com D_2O , pH = 7.

Fonte: Arquivo pessoal

A Tabela 2 representa o deslocamento químico (δ) dos hidrogênios da ripD isolada e na presença do complexo. Excluiu-se desta análise os H3', H4' e H8' pois os picos se confundem com aqueles observados na HP β CD, dificultando a análise detalhada. Além disso, os picos NH, H2', H5' e H6' se confundem com o ruído quando utilizado a menor concentração de ripD ($0,4 \text{ mmol L}^{-1}$), logo seus deslocamentos também não foram analisados. Assim, observa-se o efeito da complexação evidenciado nos deslocamentos químicos dos hidrogênios, sendo o H6 e H7' aqueles que apresentaram maiores valores para $\Delta\delta$.

Dentre as várias metodologias de determinação da estequiometria de complexos de inclusão, destaca-se o método de Job realizado em RMN como um dos mais simples e consistentes que pode ser realizado. Este consiste na avaliação da variação de deslocamento químico dos ligantes frente à variação da razão ligante/macromolécula em um sistema de concentração total constante (ZHANG et al., 2013).

A variação do deslocamento químico de soluções de ripD e HP β CD em várias concentrações diferentes permitiu concluir que a estequiometria do complexo é de 1:1, visto que o ponto máximo do gráfico foi em $x = 0,5$ (Figura 4).

Tabela 2: Deslocamento químico(δ) em RMN (400 MHz) da riparina D isolada e da mistura ripD:HP β CD.

Amostra	2-OH	H3 e H4	H5	H6	H7'
Riparina D 2 mmol	12,4307	6,9552	7,6965	7,3919	2,8766
RipD:HPβCD 1:1 mmol	12,4366	6,990	7,6902	7,3007	2,9304
$\Delta\delta$	-0,0059	-0,035	-0,0063	-0,0912	0,0538

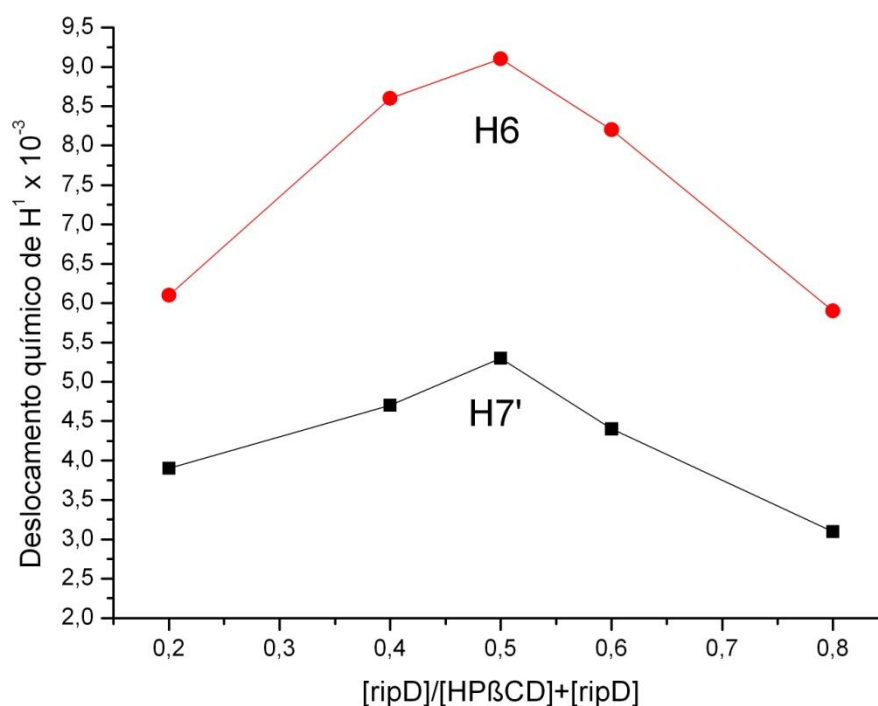


Figura 4: Variação de deslocamento químico do H6 e H7' da riparina D em diferentes concentrações do fármaco e da HP β CD.

Fonte: Arquivo pessoal

O efeito *Overhouser* nuclear (NOE, abreviação de *Nuclear Overhouser Effect*) é um fenômeno detectado por RMN que depende da distância entre os hidrogênios da

molécula hóspede e hospedeira, sendo do ponto de vista estrutural, uma ótima ferramenta de elucidação da arquitetura de um complexo macromolecular (NGUYEN et al., 2013).

Existem várias técnicas utilizadas em RMN ^1H para determinar o NOE, dependendo sua escolha da estrutura do sistema a ser estudado. Para avaliação de complexos de inclusão com ciclodextrinas é preferível utilizar a técnica de *Rotating-frame Overhouser Effect Spectroscopy* (2D-ROESY) que possui boa sensibilidade e é indicada para moléculas de peso molecular mediano (SRINIVASAN ;STALIN, 2014).

A Figura 5 apresenta um espectro de ROESY 2D para o sistema ripD e HP β CD. Observam-se, fora do eixo da diagonal, duas interações significativas destacadas na figura. A primeira delas relaciona o próton referente ao H1 da HP β CD com o próton H8' da riparina D, enquanto que a segunda refere-se ao H5 da HP β CD com os prótons H2' e H5' da HP β CD. Faz-se importante destacar que, ao dividir a figura em quadrantes, estas interações destacadas apresentam seus correspondentes no quadrante inverso, demonstrando a confiabilidade do resultado observado. Tais interações intermoleculares ocorrem quando os prótons estão suficientemente próximos, logo, esta técnica analítica bidimensional avançada permite o detalhamento da formação do complexo de inclusão, indicando que parte da molécula se encontra no interior da cavidade da ciclodextrina (Figura 6).

Outra forma de avaliar o processo de complexação é através das medidas de tempo de relaxação longitudinal (T_1). Desta forma o processo de relaxação magnética nuclear está relacionado ao restabelecimento do equilíbrio da magnetização dos núcleos que sofreram uma excitação mediante aplicação de energia, na região da radiofrequência, e este processo é dependente das condições das vizinhanças. Desta forma, mudanças nos valores de T_1 podem dar indícios sobre a interação entre os sistemas hóspede-hospedeiro evidenciando os possíveis sítios de interação entre essas moléculas uma vez que o processo de relaxação dos núcleos depende diretamente dos movimentos nucleares afetados pela complexação (JULLIAN et al., 2007).

A Tabela 3 mostra a variação dos valores de T_1 sobre os núcleos de hidrogênio da molécula de riparina D. Esta tabela também foi representada na Figura 7, através da qual, pode-se observar as regiões da molécula que sofreram maiores variações foram às do anel aromático com a carbonila e a ligação química correspondente à amina.

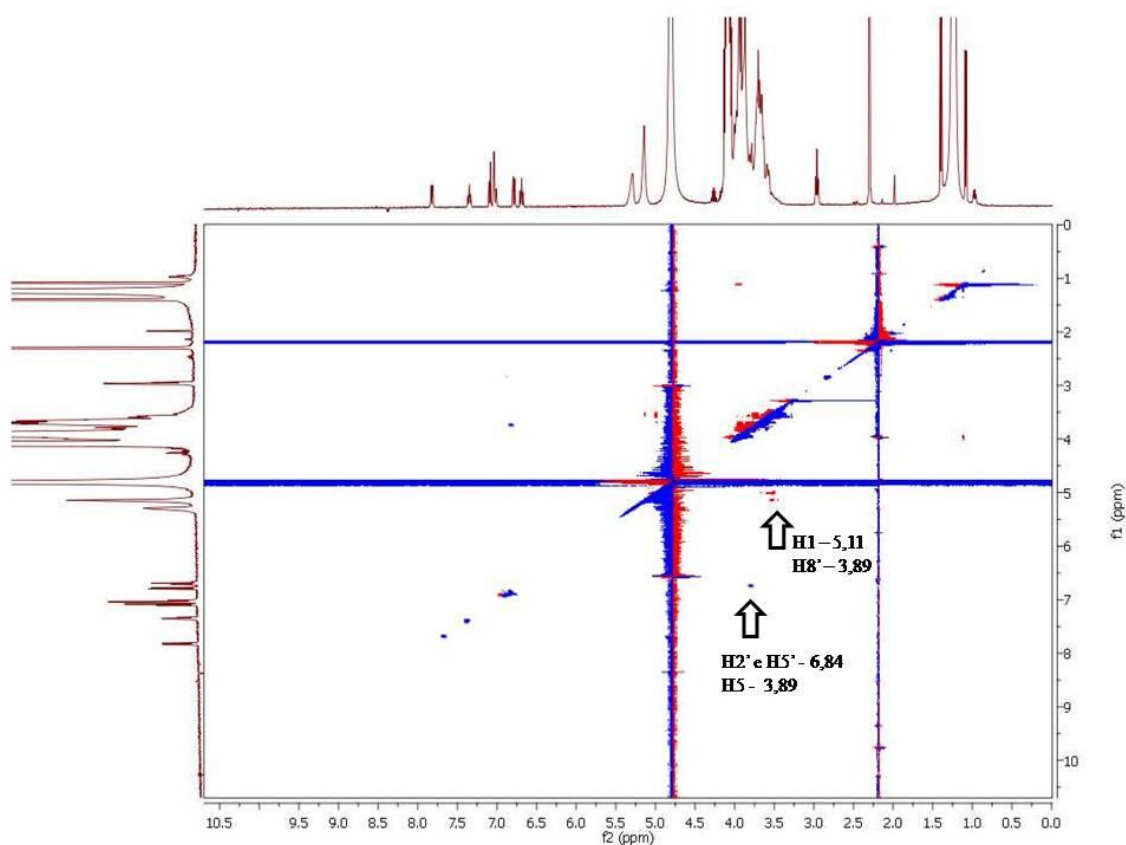


Figura 5: ROESY 2D da amostra de riparina D e HP β CD, trava de spin de 500 (D₂O, tampão fosfato pH=7 e 400 MHz para ¹H).

Fonte: Arquivo pessoal

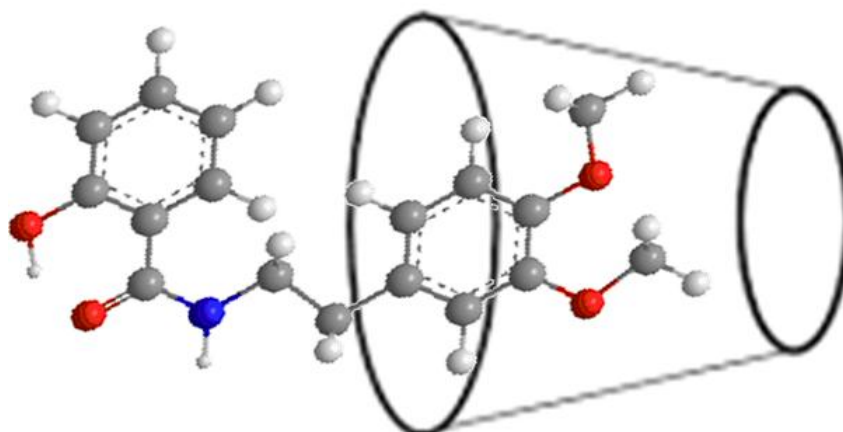


Figura 6: Figura esquemática da representação molecular do fenômeno de complexação entre molécula de Riparina D e HP β CD.

Fonte: Arquivo pessoal

Para moléculas orgânicas o processo de relaxação ocorre principalmente pelo mecanismo de relaxação dipolar e desta forma, os valores de T_1 estão diretamente relacionados com o coeficiente de difusão rotacional (VOGT; STROHMEIER, 2012). Assim, a região do sistema supramolecular ripD/HP β CD que estaria inserida na cavidade interna da ciclodextrina seria o anel aromático ligado às carbonilas por demonstrar uma gradual redução no valor de T_1 . Os maiores valores de ΔT_1 significam diminuições nas propriedades dinâmicas, através de uma restrição na mobilidade dos núcleos de hidrogênio da riparina D na presença da HP β CD, corroborando as demais medidas de RMN obtidas.

Tabela 3: Valores de tempo de relaxação longitudinal (T_1) medidos para riparina D (T_{1rip}) e complexo de inclusão (T_{1compl}) (D_2O , tampão fosfato pH=7). Valores em segundos.

Hidrogênio	(T_{1rip})	(T_{1compl})	/ ΔT_1 /
OH	2,138	2,084	0,054
H3 e H4	1,971	1,391	0,58
H5	2,227	2,142	0,085
H6	0,452	0,335	0,117
NH	1,754	1,576	0,178
H8'	1,222	2,044	0,822
H7'	0,85	0,453	0,397
H6'	1,423	1,393	0,03
H2' e H5'	1,924	1,401	0,523
H3' e H4'	1,375	1,857	0,486

A difusão molecular é o movimento das moléculas em determinado fluido resultante do movimento térmico de todos os componentes do meio analisado. Logo, sua determinação depende da viscosidade do meio, da temperatura e do tamanho das moléculas (raio hidrodinâmico) (SOUZA; LAVERDE JR, 2002).

O coeficiente de difusão de uma molécula de fármaco, considerada pequena, varia quando está associada a uma molécula hospedeira, como no caso de uma ciclodextrina, ou quando participa de agrupamentos supramoleculares, como em micelas ou lipossomas (JULLIAN; MIRANDA *et al.*, 2007).

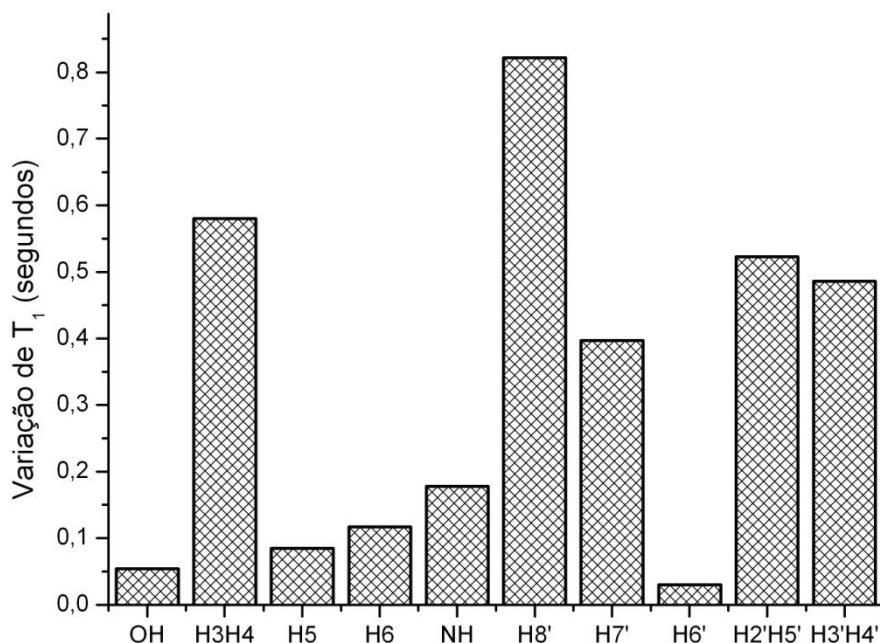


Figura 7: Variação dos valores de T₁ (em segundos) para os hidrogênios da riparina D e ripD:HPβCD (1:1), 25°C, pH = 7.

Fonte: Arquivo pessoal

Observa-se no espectro de DOSY da riparina D livre (Figura 8), os picos referentes ao anel aromático, que individualizam a riparina frente à presença da HPβCD, alinham-se em um coeficiente médio de difusão de $D_{\text{livre}} = 2,89 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

Quando se observa o espectro do complexo de inclusão, destacam-se dois diferentes padrões de difusão (Figura 9). O primeiro, com um menor coeficiente de difusão, é referente à riparina D contida no complexo. O segundo, com maior coeficiente, trata-se da ciclodextrina que devido a sua elevada massa molar, e por consequência, um grande raio hidrodinâmico.

O valor do coeficiente de difusão obtido para a riparina D (D_{obs}) resulta de uma fração livre em solução (D_{livre}), juntamente com outra que está ligada à HPβCD (D_{compl}). Esta fração que está complexada à macromolécula provoca uma diminuição no coeficiente médio de difusão da riparina D, pelo fato de o fármaco em complexo se comportar como uma molécula de raio hidrodinâmico maior, logo apresentará menor difusão, fazendo com que o valor de seu coeficiente se aproxime do coeficiente de

difusão da HP β CD. Os resultados obtidos foram aplicados às fórmulas de Jhonson Jr e colaboradores (JOHNSON, 1999).

$$D_{obs} = f_{livre}D_{livre} + f_{compl}D_{compl} \quad (1)$$

$$f_{livre} = 1 - f_{compl} \quad (2)$$

$$D_{obs} = (1 - f_{compl})D_{livre} + f_{compl}D_{compl} \quad (3)$$

Como os raios hidrodinâmicos do complexo e da macromolécula são similares, temos que $D_{compl} \approx D_M$, onde D_{compl} e D_M são os coeficientes de difusão do complexo e da HP β CD, respectivamente. Assim, considerando a equação 2, obtemos o valor da fração complexada (f_{compl}), conforme observado na equação 4.

$$f_{compl} = (D_{livre} - D_{obs}) / (D_{livre} - D_{compl}) \quad (4)$$

Onde, f_{compl} = fração de ripD complexada à HP β CD; f_{livre} = fração de ripD sem complexar; D_{livre} = coeficiente de difusão da ripD em solução; D_{obs} = coeficiente de difusão da ripD na presença da HP β CD; D_{compl} = coeficiente de difusão da ripD 100% ligada à HP β CD.

Para a determinação dos valores da constante de associação (K_a) utilizou-se os valores da difusão, pois indiretamente fornecem as frações de complexo em equilíbrio, logo $[ML]$ corresponde a f_{compl} enquanto $[L] = 1 - f_{compl}$ (Equação 2). Nos complexos de estequiometria 1:1, como o observado no estudo realizado, $[M] = [M]_i - [L]_i f_{compl}$, onde $[M]_i$ e $[L]_i$ são as concentrações iniciais de macromolécula e ligante, respectivamente. A inserção de todas essas considerações resulta na equação 5, que possibilita correlacionar o K_a com f_{compl} .

$$K_a = f_{compl} / (1 - f_{compl})([M]_i - [L]_i f_{compl}) \quad (5)$$

Observa-se que a variação de coeficientes de difusão da riparina D é muito superior a variação de coeficiente de difusão da HP β CD. Isso indica que a variação de D ocorre devido à complexação e não a qualquer efeito de obstrução que possa ocorrer na amostra.

Para o complexo ripD:HP β CD, o valor obtido para a ripD ($D_{observada}$) é resultante de uma fração que está ligada a HP β CD (D_{ligada}), e outra referente a ripD livre em solução (D_{livre}). A fração de ripD (D_{ligada}) que está interagindo com a cavidade da

HP β CD causa uma diminuição no coeficiente médio de difusão da ripD, pelo fato de a ripD em complexo comportar-se agora como uma molécula com um raio hidrodinâmico maior do que a ripD 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 HP β CD.

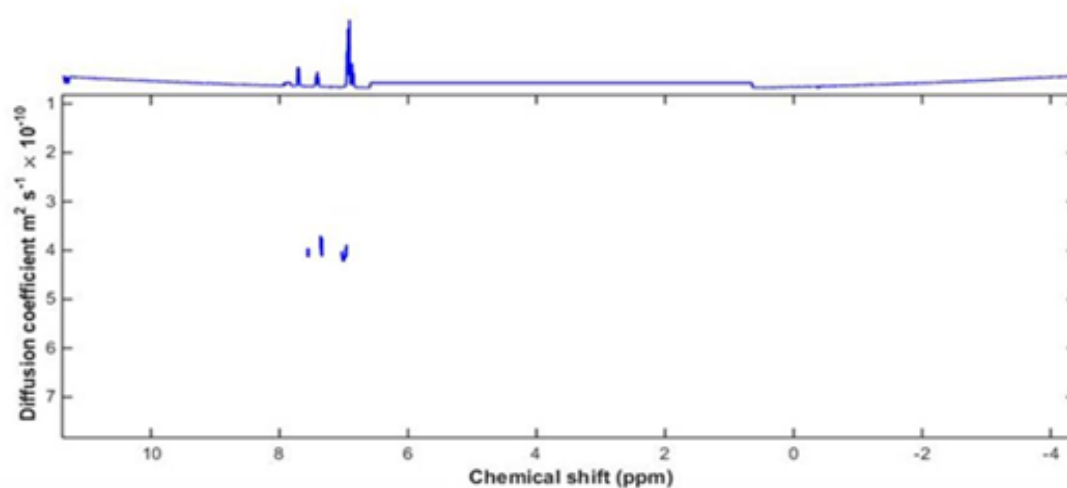


Figura 8: Representação em 2D do experimento DOSY para riparina D, 25°C, 400 MHz em D₂O com tampão fosfato pH = 7,0

Fonte: Arquivo pessoal

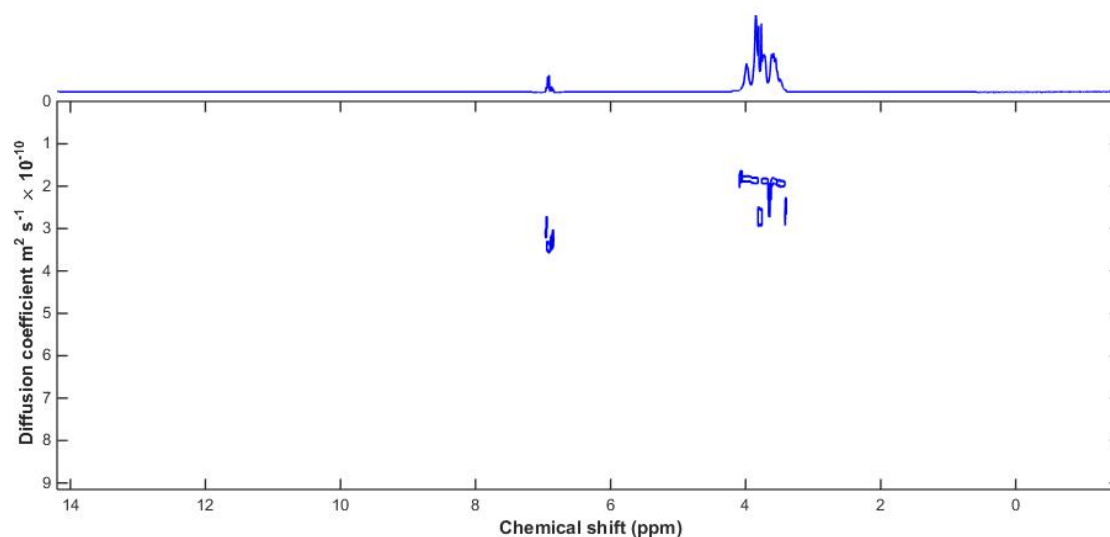


Figura 9: Representação em 2D do experimento DOSY para o complexo ripD/HP β CD, 29°C, 400 MHz em D₂O com tampão fosfato pH = 7,0.

Fonte: Arquivo pessoal

A partir dos resultados observados, pode-se determinar que o coeficiente de difusão da riparina D em solução ($3,971 \times 10^{-10} \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) diminui na presença de HP β CD, apresentando uma menor mobilidade ($2,89 \times 10^{-10} \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$). O valor obtido para a constante de associação aparente (2374M^{-1}), juntamente com a fração de fármaco complexado (52,83%) evidencia uma forte interação entre o fármaco e a macromolécula (Tabela 4).

Tabela 4: Valores do coeficiente de difusão, fração molar ligada e constante de associação aparente para as amostras: riparina D; HP β CD e complexo 1:1 de riparinaD:HP β CD, em D₂O com tampão fosfato pH = 7,0, 25°C.

Amostra	Coeficiente de Difusão ($10^{-10} \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	Fração ligada	Constante de associação aparente (M^{-1})
Riparina D	3,971		
HPβCD	1,925	52,83%	2374
ripD: HPβCD	2,89		

CONCLUSÃO:

Através dos resultados observados, conclui-se que houve a complexação binária da riparina D com a 2-hidroxi-propil- β -ciclodextrina. Foi possível corroborar experimentos anteriormente realizados, através do diagrama de solubilidade, que a estequiometria do complexo é de 1:1 molar. Além disso, os experimentos de ROESY 1D e DOSY foram ferramentas de capacidade única para revelar a nível atômico as arquiteturas dos complexos desenvolvidos e na determinação das constantes de associação. Os resultados obtidos com o estudo de simulação computacional contribuíram para a elucidação da geometria do complexo assim como para determinação teórica das energias envolvidas.

REFERÊNCIAS:

CHAUDHARY, A. et al. Enhancement of solubilization and bioavailability of poorly soluble drugs by physical and chemical modifications: A recent review. **Journal fo Advanced Pharmaceutical Education Research**, v. 2, n. 1, p. 32-67, 2012.

CRINI, G.G. Review: a history of cyclodextrins. **Chemical reviews**, v. 114, n. 21, p. 10940-10975, 2014.

DUFOUR, G. et al. Rapid quantification of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin in liquid pharmaceutical formulations by ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 73, p. 20-28, 2015.

EL-KOSASY, A.M. et al. Comparative study of 2-hydroxy propyl beta cyclodextrin and calixarene as ionophores in potentiometric ion-selective electrodes for neostigmine bromide. **Talanta**, v. 85, n. 2, p. 913-918, 2011.

JOHNSON, C.S. Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: principles and applications. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 34, n. 3, p. 203-256, 1999.

JULLIAN, C. et al. Studies of inclusion complexes of natural and modified cyclodextrin with (+) catechin by NMR and molecular modeling. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 15, n. 9, p. 3217-3224, 2007.

LIS-CIEPLAK, A. et al. Comparative Proton Nuclear Magnetic Resonance Studies of Amantadine Complexes Formed in Aqueous Solutions with Three Major Cyclodextrins. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 103, n. 1, p. 274-282, 2014.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M.E. Cyclodextrins as functional excipients: methods to enhance complexation efficiency. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 101, n. 9, p. 3019-3032, 2012.

MURA, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in the solid state: A review. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, 2015.

NGUYEN, T.A. et al. An investigation into the supramolecular structure, solubility, stability and antioxidant activity of rutin/cyclodextrin inclusion complex. **Food chemistry**, v. 136, n. 1, p. 186-192, 2013.

NUNES, G.B.L. et al. PROSPECÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DA Aniba riparia (Nees) Mez (Lauraceae). **Cadernos de Prospecção**, v. 6, n. 4, p. 447, 2014.

SOUZA, A.A.D.; LAVERDE JR, A. Aplicação da espectroscopia de ressonância magnética nuclear para estudos de difusão molecular em líquidos: a técnica DOSY. **Química Nova**, v. 25, n. 6a, p. 1022-1026, 2002.

SRINIVASAN, K.; STALIN, T. Study of inclusion complex between 2, 6-dinitrobenzoic acid and β -cyclodextrin by ^1H NMR, 2D ^1H NMR (ROESY), FT-IR, XRD, SEM and photophysical methods. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 130, p. 105-115, 2014.

VOGT, F.G.; STROHMEIER, M. 2D solid-state NMR analysis of inclusion in drug-cyclodextrin complexes. **Molecular pharmaceutics**, v. 9, n. 11, p. 3357-3374, 2012.

ZHANG, W. et al. Investigation of water-soluble inclusion complex of hypericin with β -cyclodextrin polymer. **Carbohydrate polymers**, v. 95, n. 1, p. 366-370, 2013.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

AGUIARA, U.N. et al. Preparação e caracterização do complexo de inclusão do óleo essencial de Croton zehntneri com β -ciclodextrina. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p. 50-55, 2014.

AHUJA, S.; DONG, M. **Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC**. Elsevier, 2005.

AL-FUTAISI, A. et al. Adsorption capacity and mineralogical and physico-chemical characteristics of Shuwaymiyah palygorskite (Oman). **Environmental geology**, v. 51, n. 8, p. 1317-1327, 2007.

ALBUQUERQUE, M.L.S. et al. Characterization of Buriti (*Mauritia flexuosa* L.) oil by absorption and emission spectroscopies. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6A, p. 1113-1117, 2005.

ALVES, L.D.S. et al. Avanços, propriedades e aplicações de dispersões sólidas no desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 1, p. 17-25, 2012.

ALVES, L.D.S. et al. Desenvolvimento de método analítico para quantificação do efavirenz por espectrofotometria no UV-Vis. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1967-1972, 2010.

AMIDON, G.L. et al. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical research**, v. 12, n. 3, p. 413-420, 1995.

ANAND, O.M. et al. Dissolution testing for generic drugs: an FDA perspective. **The AAPS journal**, v. 13, n. 3, p. 328-335, 2011.

ARAGÃO, N.M.D. et al. Validação de métodos cromatográficos de análise—um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da “química verde” na determinação de metilxantinas em bebidas. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2476-2481, 2009.

ATTIA, A.K. et al. Thermal analysis of some antidiabetic pharmaceutical compounds. **Advanced pharmaceutical bulletin**, v. 3, n. 2, p. 419, 2013.

BARBOSA-FILHO, J.M. Quimiodiversidade e potencialidade farmacológica da flora paraibana. **Caderno de Farmácia**, v. 13, n. 2, p. 85-102, 1997.

- BARBOSA-FILHO, J.M. et al. Benzoyl esters and amides, styrylpyrones and neolignans from the fruits of *Aniba riparia*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 9, p. 2615-2617, 1987.
- BARREIRO, E.J.; BOLZANI, V.D.S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.
- BREWSTER, M.E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Advanced drug delivery reviews**, v. 59, n. 7, p. 645-666, 2007.
- BRITO, N.M. et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, 2003.
- CALIXTO, J.B.; SIQUEIRA JUNIOR, J.M. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: desafios. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 78, n. 1, 2008.
- CARRIER, R.L. et al. The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. **Journal of Controlled Release**, v. 123, n. 2, p. 78-99, 2007.
- CHIENG, N. et al. An overview of recent studies on the analysis of pharmaceutical polymorphs. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 55, n. 4, p. 618-644, 2011.
- COSTA, P.R.R. Produtos naturais como ponto de partida para a descoberta de novas substâncias bioativas: Candidatos a fármacos com ação antiofídica, anticâncer e antiparasitária. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 1, p. 58-66, 2009.
- CRAGG, G.M. et al. New horizons for old drugs and drug leads. **Journal of natural products**, v. 77, n. 3, p. 703-723, 2014.
- CUNHA-FILHO, M.S.S.; SÁ-BARRETO, L.C.L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 1, p. 1-9, 2009.
- CUSTODIO, D.L.; DA VEIGA JUNIOR, V.F. Lauraceae alkaloids. **RSC Advances**, v. 4, n. 42, p. 21864-21890, 2014.
- DA MOTTA VIEIRA, V.M.; OHAYON, P. Inovação em fármacos e medicamentos: estado-da-arte no Brasil e políticas de P&D. **Revista Economia & Gestão**, v. 6, n. 13, 2008.
- DA SILVA, E.C. et al. Análise térmica aplicada à cosmetologia. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 3, 2007.
- DAVIS, M.E.; BREWSTER, M.E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 12, p. 1023-1035, 2004.
- DE BARROS, C.B. Validação de métodos analíticos. **Biológico São Paulo**, v. 64, n. 2, p. 175-177, 2002.

DE LIMA, J.R. et al. Complexos de inclusão como estratégia para veiculação de óleos essenciais. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 93, n. 4, p. 397-402, 2012.

DE OLIVEIRA, L.G. et al. Explorando Produtos Naturais Microbianos Nas Fronteiras Da Química E Da Biologia. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1577-1586, 2013.

DRUY, M.A. Applications of Mid-IR Spectroscopy to the Pharmaceutical Process Environment. **Spectroscopy-Springfield then Eugente Then Duluth**, v. 19, n. 2, p. 60-60, 2004.

DUBICK, M.A. Historical perspectives on the use of herbal preparations to promote health. **The Journal of nutrition**, v. 116, n. 7, p. 1348-1354, 1986.

FERREIRA, T.S. et al. Phytotherapy: an introduction to its history, use and application. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 290-298, 2014.

GADELHA, C.A.G. Desenvolvimento, complexo industrial da saúde e política industrial. **Revista de Saúde Pública**, v. 40, n. sSuppl, 2006.

GADELHA, C.A.G. et al. Saúde e inovação: uma abordagem sistêmica das indústrias da saúde Health and innovation: a systemic approach in health industries. **Caderno de Saúde Pública**, v. 19, n. 1, p. 47-59, 2003.

GAO, R. et al. Study of stability and drug-excipient compatibility of estradiol and pharmaceutical excipients. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 120, n. 1, p. 839-845, 2015.

GIRON, D. Applications of thermal analysis and coupled techniques in pharmaceutical industry. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 68, n. 2, p. 335-357, 2002.

GOPINATH, R. Pharmaceutical preformulation studies—current review. **International Journal of Pharmaceutical & Biological Archive**, v. 2, n. 5, 2011.

GROOM, C.R.; ALLEN, F.H. The Cambridge Structural Database in retrospect and prospect. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 53, n. 3, p. 662-671, 2014.

GUERRA, A. et al. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. **Trends in biotechnology**, v. 30, n. 11, p. 591-600, 2012.

GUILLARME, D.; DONG, M.W. Newer developments in HPLC impacting pharmaceutical analysis: a brief review. **American Pharmaceutical Review**, v. 16, n. 4, p. 36-43, 2013.

GUPTA, V. et al. A review: development & validation of HPLC method for the determination of Esomeprazole in pharmaceuticals. **Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 2, p. 191-196, 2012.

GUTIERREZ, S.J.C. **Síntese do Bowdenol, um Dihidrobenzofuranoide Isolado de Bowdichia Virgilioides e Preparação de Derivados da Riparina Isolada de Aniba**

Riparia com Potencial Atividade Biológica. (2007). - Tese (Doutorado), UFPB/CCS João Pessoa, Brazil, 2007.

HAINES, P.J. **Thermal methods of analysis: principles, applications and problems.** Springer Science & Business Media, 2012.

HIGUCHI, T.; CONNORS, K.A. Advances in analytical chemistry and instrumentation. **Interscience, New York**, v. 4, p. 117-212, 1965.

HUSSAIN, A.S. et al. The biopharmaceutics classification system: Highlights of the FDA's draft guidance. **Dissolution Technologic**, v. 6, n. 2, p. 5-9, 1999.

ICH. Validation of analytical procedures: text and methodology. **Q2 (R1). International Conference on Harmonization**, v. 1, 2005.

KARABACAK, M. et al. FT-IR, FT-Raman, NMR and UV-vis spectra, vibrational assignments and DFT calculations of 4-butyl benzoic acid. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 85, n. 1, p. 179-189, 2012.

KAWAKAMI, K. Modification of physicochemical characteristics of active pharmaceutical ingredients and application of supersaturatable dosage forms for improving bioavailability of poorly absorbed drugs. **Advanced drug delivery reviews**, v. 64, n. 6, p. 480-495, 2012.

KOTHAKONDA, K.K.; BOSE, D.S. Synthesis of a novel tetrahydroisoquinolino [2, 1-c][1, 4] benzodiazepine ring system with DNA recognition potential. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 14, n. 17, p. 4371-4373, 2004.

LI, H. et al. Multiple approaches to pharmaceutical polymorphism investigation—A case study. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 5, p. 426-432, 2009.

LIMA, A.A.N. et al. Alternative technologies to improve solubility of poorly water soluble drugs. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 5, p. 789-97, 2008.

LIMA, K.M.G. et al. Sensores ópticos com detecção no infravermelho próximo e médio. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1635-1643, 2009.

LIMA, L.M. Química Medicinal Moderna: desafios e contribuição brasileira. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1456, 2007.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M.E. Cyclodextrins as functional excipients: methods to enhance complexation efficiency. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 101, n. 9, p. 3019-3032, 2012.

LOFTSSON, T. et al. Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs. **International journal of pharmaceutics**, v. 302, n. 1, p. 18-28, 2005.

- LYRA, M.A. et al. Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n. 2, p. 117-124, 2010.
- MACHADO, A.H.L. et al. Micro Reatores: Novas Oportunidades em Síntese Química. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 4, p. 1076-1085, 2014.
- MACHADO, L.D.B.; MATOS, J.D.R. Análise térmica diferencial e calorimetria exploratória diferencial. **Técnicas de caracterização de polímeros**, p. 229-261, 2004.
- MILNE, G.M. . Pharmaceutical productivity—the imperative for new paradigms. **Annual Reports in Medicinal Chemistry**, v. 38, p. 383-396, 2003.
- NEWMAN, A.W.; BYRN, S.R. Solid-state analysis of the active pharmaceutical ingredient in drug products. **Drug discovery today**, v. 8, n. 19, p. 898-905, 2003.
- NICHOLS, G. Applications of cathodoluminescence spectroscopy and imaging in the characterisation of pharmaceutical materials. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 1, p. 19-42, 2012.
- NIELSEN, T.E.; SCHREIBER, S.L. Towards the optimal screening collection: a synthesis strategy. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 47, n. 1, p. 48-56, 2008.
- NUNES, G.B.L. et al. Prospecção tecnológica da *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae). **Cadernos de Prospecção**, v. 6, n. 4, p. 447, 2014.
- PERKMANN, M.; WALSH, K. University–industry relationships and open innovation: Towards a research agenda. **International Journal of Management Reviews**, v. 9, n. 4, p. 259-280, 2007.
- PORS, K. et al. The changing landscape of cancer drug discovery: a challenge to the medicinal chemist of tomorrow. **Drug discovery today**, v. 14, n. 21, p. 1045-1050, 2009.
- PRENTIS, R.A. et al. Pharmaceutical innovation by the seven UK-owned pharmaceutical companies (1964-1985). **British journal of clinical pharmacology**, v. 25, n. 3, p. 387-396, 1988.
- RADER, R.A. FDA biopharmaceutical product approvals and trends in 2012. **BioProcess International**, v. 11, n. 3, p. 18-27, 2013.
- RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.
- ROY, D. et al. Determination of the aqueous solubility of drugs using a convenient 96-well plate-based assay. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 27, n. 1, p. 107-109, 2001.

SIMOES, C.M.O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2001.

SINGHVI, G.; SINGH, M. Review: in-vitro drug release characterization models. **International Journal of Pharmaceutical Science and Research**, v. 2, n. 1, p. 77-84, 2011.

SISTLA, R. et al. Development and validation of a reversed-phase HPLC method for the determination of ezetimibe in pharmaceutical dosage forms. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 39, n. 3, p. 517-522, 2005.

SOARES-SOBRINHO, J.L. et al. Benzimidazole drug delivery by binary and multicomponent inclusion complexes using cyclodextrins and polymers. **Carbohydrate polymers**, v. 89, n. 2, p. 323-330, 2012.

SOUZA, J.S.; FERRÃO, M.F. Aplicações da espectroscopia no infravermelho no controle de qualidade de medicamentos contendo diclofenaco de potássio. Parte I: Dosagem por regressão multivariada. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, 2006.

SWAMIVELMANICKAM, M. et al. Preformulation studies for amoxicillin trihydrate and dicloxacillin sodium as mouth dissolve tablets. **International Journal of ChemTech Research**, v. 1, n. 4, p. 1032-5, 2009.

SWARBRICK, B. Process analytical technology: A strategy for keeping manufacturing viable in Australia. **Vibrational spectroscopy**, v. 44, n. 1, p. 171-178, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal.**Universitat Jaume I, 2006.

TAKAHASHI, A.I. et al. A literature review of cyclodextrins inclusion complexes characterization—part II: X-Ray diffraction, infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance. **International Journal of Pharmaceutical Science and Research**, v. 12, n. 1, p. 8-15, 2012.

TOYANG, N.J.; VERPOORTE, R. A review of the medicinal potentials of plants of the genus Vernonia (Asteraceae). **Journal of ethnopharmacology**, v. 146, n. 3, p. 681-723, 2013.

VEIGA, F. et al. As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica. **Minerva Coimbra: Coimbra**, 2006.

WEN, H.; PARK, K. **Oral controlled release formulation design and drug delivery: theory to practice.** John Wiley & Sons, 2011.

YAZDANIAN, M. et al. The “high solubility” definition of the current FDA guidance on biopharmaceutical classification system may be too strict for acidic drugs. **Pharmaceutical research**, v. 21, n. 2, p. 293-299, 2004.

YUNES, R.A. et al. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.

ZHANG, N. et al. Effective protection and controlled release of insulin by cationic β -cyclodextrin polymers from alginate/chitosan nanoparticles. **International journal of pharmaceutics**, v. 393, n. 1, p. 213-219, 2010.