

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

*ESTUDO DA INCLUSÃO MOLECULAR DE
PRODUTOS DE INTERESSE FARMACOLÓGICO
UTILIZANDO CICLODEXTRINAS*

TESE DE MESTRADO

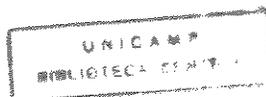
ANTONIO MICARONI $\pi/324$

ORIENTADORA: INÉS JOEKES t

Este exemplar corresponde a redação final da Tese de Mestrado, defendida por Antonio Micaroni, e aprovada pela comissão julgadora.

Joekes

22/11/94



*Dedico este trabalho os meus pais,
Giovanni e Giuseppina que sempre me apoiaram
e a minha esposa Regina que nas horas de
desanimo sempre me incentivou.*

A. Micaroni

Agradeço também,

A minha orientadora, Inés Joeques, que sempre me apoiou, incentivou, orientou e acreditou que "um dia" este trabalho ficaria pronto.

Aos meus co-orientadores, Jonh Collett e Jonh Fell da "University of Manchester - England", que atenciosamente me receberam em seus laboratórios e eficientemente me orientaram. na realização de parte desta tese .

Aos colegas de laboratório em Manchester, Newton, Kate, Heny, Ross, Richard... pelo carinho, e pelas discussões que foram muito úteis para o correto direcionamento deste trabalho.

Aos técnicos, Morice (DSC), Sheila (RMN) e ao colega Newton (SEM), pelas dicas sobre a correta utilização destas técnicas e equipamentos da University of Manchester.

A Maria Regina V. Vaz pela sua orientação.

A Companhia de Desenvolvimento Tecnológico e a Leiner Brasil Gelatinas S.A. pelo incentivo e compreensão sem o qual este trabalho não chegaria ao final.

Ao CNPq que, através da bolsa tipo RHAE, possibilitou a realização de uma especialização no exterior onde foi adquirido o know-how sobre esta técnica.

A todos os amigos que, durante os períodos de desanimo sempre me apoiaram com umas "pints" nos pubs de Manchester.

E a todos que de uma forma ou de outra participaram da elaboração deste trabalho.



ABSTRACT

A STUDY OF THE MOLECULAR INCLUSION OF PHARMACEUTICAL PRODUCTS WITH CYCLODEXTRIN

AUTHOR: ANTONIO MICARONI

ADVISER: Prof^a Dr^a INÉS JOEKES

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - INSTITUTO DE QUÍMICA

C.P. 6154 CEP 13081-970

CAMPINAS - SÃO PAULO BRASIL

Praziquantel is a potent anthelmintic administered orally. It has a low aqueous solubility (40 mg / 100 ml at 25 °C), posing problems in the development of a suitable oral formulation and in the bioavailability of these formulations. In order to solve this difficulties, the microencapsulation with cyclodextrin, named molecular inclusion appeared as a suitable solution as cyclodextrins are now currently being used in laboratory and industry in the microencapsulation of pharmaceutical, aromatic and sensitive substances to control their release and bioavailability and to extend their shelf life.

Praziquantel (PZ) was found to form an inclusion complex with β -cyclodextrin, hydroxypropyl- β -cyclodextrin and γ -cyclodextrin in aqueous solution and in the solid state. Complex formation in aqueous solution was studied using phase solubility, spectral and $^1\text{H-NMR}$ methods, while, in the solid state differential scanning calorimetry and scanning electron microscopy were the preferred methods.

Phase solubility diagrams of praziquantel / cyclodextrin complexes showed no deviation from linearity, indicating the presence of one-to-one complexes between praziquantel and cyclodextrins. Using the spectral method the formation constant for the 1:1 inclusion complexes were determined to be 101.1M^{-1} (β -cyclodextrin), 572.7M^{-1} (hydroxypropyl- β -cyclodextrin) and 1.4M^{-1} (γ -cyclodextrin).

A solid inclusion complex of PZ with β -CD, β -CDHP and γ -CD was prepared using techniques of lyophilization, kneading and co-precipitation. These solid complexes, showed improved dissolution profiles in water compared with the free drug. Dissolution profiles of tablets with and without the drug were also obtained using a rotating basket apparatus.

Thermal and oxidation stability of these tablets were examined using differential scanning calorimetry. No significant differences were observed in the thermograms obtained before and after the test, demonstrating the complex stability under thermic and oxidizing conditions.

Qualitative tests were carried out with two further drugs in order to observe their affinity to cyclodextrin complexation. Chlorambucil, an antineoplastic agent showed good complexation characteristics with hydroxypropyl- β -cyclodextrin while cephradine showed a better complexation characteristic in the γ -cyclodextrin cavity. These observations were made after studying the differential scanning calorimetry thermograms.

RESUMO

ESTUDO DA INCLUSÃO MOLECULAR DE PRODUTOS DE INTERESSE FARMACOLÓGICO UTILIZANDO CICLODEXTRINAS

AUTOR: ANTONIO MICARONI

ORIENTADORA: Prof^ª Dr^ª INÉS JOEKES

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - INSTITUTO DE QUÍMICA

C.P. 6154 CEP 13081-970

CAMPINAS - SÃO PAULO BRASIL

O praziquantel é um potente agente anti-helmíntico administrado por via oral. Sua baixa solubilidade em água (40mg/100ml a 25°C) dificulta o desenvolvimento de uma formulação efetiva assim como sua absorção pelo organismo. Como solução para estes problemas, o microencapsulamento com ciclodextrinas (CD), também chamado de inclusão molecular, surge como solução adequada, uma vez que atualmente as ciclodextrinas são utilizadas em laboratório e na indústria no microencapsulamento de produtos farmacêuticos, aromáticos e de substâncias sensíveis, a fim de controlar sua liberação, aumentar sua biodisponibilidade e prolongar a vida média em prateleira.

Foi determinado que o praziquantel (PZ) forma complexos de inclusão em solução aquosa e em estado sólido com β -ciclodextrina, hidroxipropil- β -ciclodextrina e γ -ciclodextrina. A complexação em solução foi estudada utilizando-se diagramas de solubilidade, métodos espectrais e de ressonância magnética nuclear de prótons, enquanto que no estado sólido, a calorimetria diferencial de varredura e microscopia eletrônica de varredura foram os métodos preferidos.

Os diagramas de solubilidade dos complexos de inclusão praziquantel / ciclodextrinas não apresentaram desvios da linearidade, indicando a presença de complexos formados na proporção droga/CD de 1:1. As constantes de formação destes complexos foram determinadas utilizando-se métodos espectrais e apresentam os seguintes valores: 101,1 M⁻¹ (β -CD), 572,7 M⁻¹ (β -CDHP) e 1,4 M⁻¹ (γ -CD).

Um complexo de inclusão de PZ com ciclodextrinas, no estado sólido, foi preparado utilizando-se técnicas de liofilização, mistura sólida e coprecipitação. Estes complexos sólidos demonstraram bons perfis de dissolução em comparação com a droga livre. Este estudo foi realizado comparando-se os perfis de dissolução de tabletes contendo a droga livre e o complexo de inclusão em um aparelho de cesta rotatória cujo modelo encontra-se indicado na farmacopéia americana USP XXII.

A estabilidade térmica e a resistência a oxidação foram avaliadas analisando-se os termogramas obtidos via calorimetria diferencial de varredura antes e após submeter os complexos sob condições oxidantes e térmicas severas. Nenhuma alteração significativa foi observada demonstrando a estabilidade destes complexos sob condições oxidantes e térmicas.

Testes qualitativos com mais duas drogas foram conduzidos a fim de observar suas afinidades a complexação e se esta técnica é aplicável a outras drogas. Clorambucil, um agente antineoplásico, apresentou boas características a complexação com a β -CDHP enquanto a cefradina, um antibiótico cefalosporânico, mostrou melhores características de complexação na cavidade da γ -CD. Estes estudos foram realizados pela análise dos termogramas obtidos via calorimetria diferencial de varredura.

ÍNDICE

	<u>PÁGINA</u>
Abstract	
Resumo	
1. Introdução	02
1.1 Generalidades	03
1.2 Histórico	04
1.3 Obtenção das Ciclodextrinas	06
1.4 Propriedades Físicas e Químicas	
1.4.1 Estrutura Química	06
1.4.2 Estrutura Cristalina	08
1.4.3 Propriedades em Solução	10
1.4.4 Reatividade Química	11
1.5 Critérios de Pureza para Ciclodextrinas Industriais	12
2. Parte Experimental	
2.1 Reagentes e Materiais	13
2.2 Preparação dos Complexos no Estado Sólido	13
2.3 Estudos de Solubilidade	14
2.4 Estudos de Dissolução em Meio Aquoso	15
2.5 Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (RMN- H^1)	17
2.6 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	17
2.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)	17
2.8 Ensaio de Estabilidade	17
3. Resultados Experimentais	
3.1 Estudos de Solubilidade	18
3.2 Identificação dos Complexos via Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (RMN- H^1)	20
3.3 Caracterização dos Complexos via Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	23
3.4 Estudos de Estabilidade Térmica e Oxidativa dos Complexos de Inclusão	29
3.5 Estudos Morfológicos via Microscopia Eletrônica de Varredura	33
3.6 Testes Qualitativos de Afinidade com Outras Drogas	35
4. Discussão dos Resultados	
4.1 Efeito da Complexação sobre os Diagramas de Solubilidade	39
4.2 Pré-requisitos para Complexação	43
4.3 Estudos de Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (RMN- H^1)	48
4.4 Complexos no Estado Sólido	51
4.5 Estudos de Dissolução	52
4.6 Estudos de Estabilidade Térmica e a Oxidação	54
5. Conclusão	55
6. Referências	56

1. INTRODUÇÃO

Praziquantel (Figura 1.1) é um potente agente anti-helmíntico administrado por via oral que é atualmente utilizado no Brasil no tratamento de teníase e cisticercose. Devido sua baixa solubilidade em água, 40mg / 100ml a 25°C, a formulação atual (suspensão micronizada ou tablete) não apresenta boa eficiência quanto a biodisponibilidade, ou seja, a taxa de absorção pelo organismo.⁽¹⁾

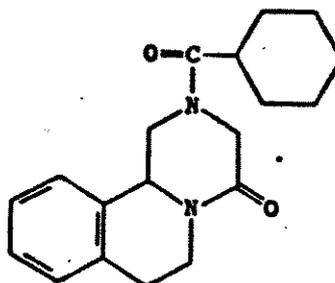


Figura 1.1 Estrutura química do praziquantel⁽¹⁾

A revisão bibliográfica sobre os principais métodos de controle da biodisponibilidade de princípios ativos indica o microencapsulamento como o método mais utilizado atualmente pela indústria farmacêutica. Este processo consiste no confinamento de determinado princípio ativo dentro de uma esfera ou cápsula de material polimérico (tamanho de 20-150 μm), a fim de retardar ou controlar sua biodisponibilidade. Um tipo particular de microencapsulamento é a inclusão molecular, onde o material polimérico utilizado é principalmente a ciclodextrina (CD).

A propriedade mais importante de um complexo de inclusão é que o substrato pode admitir uma molécula hóspede no interior de sua cavidade sem formar ligações covalentes. As ciclodextrinas possuem a superfície externa de sua estrutura hidrofílica (solúveis em água) e, através do microencapsulamento, o perfil de solubilidade da substância encapsulada pode ser melhorado. Zeólitos, grafite e clatratos formados em água são classificados como compostos inorgânicos capazes de formar complexos de inclusão, enquanto hidroquinona, éteres corôa e ciclodextrinas são as substâncias orgânicas mais comuns.

No Brasil, esta técnica ainda é pouco conhecida e explorada não havendo nenhum produto comercializado na forma de complexo de inclusão com ciclodextrina. Apenas um trabalho acadêmico foi encontrado, indicando que ainda existe uma vasta gama de trabalhos a serem exploradas nesta área.⁽¹⁰⁾

Desta forma, a inclusão molecular com ciclodextrinas foi o método escolhido para ser testado em laboratório, a fim de melhorar a biodisponibilidade do praziquantel e aumentar sua resistência à oxidação e à degradação térmica.⁽²⁾

1.1 Generalidades

O encapsulamento molecular com ciclodextrinas altera as características físicoquímicas de uma droga drasticamente. Drogas virtualmente insolúveis tornam-se altamente biodisponíveis, e substâncias químicas sensíveis são estabilizadas. Estes complexos de inclusão são, ao contrário de muitos clatratos, estáveis em solução aquosa. A técnica de inclusão molecular apresenta algumas diferenças básicas quando comparada com o microencapsulamento convencional, as principais características de cada técnica são apresentadas na Tabela 1.1.1

Tabela 1.1.1 Principais características do microencapsulamento convencional e da inclusão molecular.⁽³⁾

	Microencapsulamento	Encapsulamento Molecular
Aplicação industrial	desde 1960	depois de 1982
Essência da tecnologia	aplicação de uma cobertura sólida sobre a superfície externa dos grãos ou gotas de substrato a serem microencapsulada (processo físico)	formação de um complexo de inclusão cristalino baseado em interações moleculares (processo químico)
Composição da cápsula	polímero	ciclodextrina
Porcentagem de substância encapsulada	50 - 95%	5 - 25%
Número de moléculas no interior da cápsula	10^{10} a 10^{13}	0,5 - 2,0 (geralmente 1,0)
Sensibilidade a pressão	microcápsulas contendo líquidos são frágeis	não sensíveis
Interação entre a parede da cápsula e a molécula encapsulada	negligenciável ou inexistente	ciclodextrinas no estado cristalino inibem decomposição do substrato
Efeito na dissolução do substrato encapsulado	retarda/ controla a dissolução	taxa de dissolução e solubilidade são aumentadas
Liberação da substância encapsulada	por difusão, dissolução, degradação enzimática ou quebra da parede da cápsula.	em meio aquoso o equilíbrio de dissolução é alcançado imediatamente
Ação farmacocinética	efeitos colaterais são reduzidos e a absorção pode ser retardada ou controlada	absorção aumenta devido a dispersão no estado molecular

Industrialmente os complexos de inclusão molecular com ciclodextrinas apresentam uma larga gama de aplicações que vão desde ação estabilizante, emulsificante até a redução de volatilidade e toxidez de substâncias. No entanto sua principal aplicação está na indústria farmacêutica, onde são utilizados no aumento da biodisponibilidade de princípios ativos (Tabela 1.1.2).

Tabela 1.1.2 Principais aplicações das ciclodextrinas na indústria farmacêutica.(2,3,4,5)

Função	Substrato / Produto Final
1. Aumento de Solubilidade	prostaglandinas, esteróides, anti-inflamatórios não esteroidais, barbitúricos, ...
2. Estabilizante Químico 2.1 Hidrólise 2.2 Oxidação 2.3 Fotólise 2.4 Desidratação	prostaciclina, aspirina, atropina, ... aldeídos, epinefrina, fenotiazidas, ... vitaminas, ubiquinonas, ... prostaglandinas, ...
3. Aumento de Biodisponibilidade	aspirina, digoxina, barbitúricos, ...
4. Redução de Volatilidade	iodetos, naftaleno, metanol, cânfora, ...
5. Melhorar aroma/sabor	prostaglandinas, alquilparabenos, ...
6. Redução de irritação estomacal	agentes anti-inflamatórios não-esteroidais, ...
7. Reduzir hemólise	fenotiazidas, ácido flufenâmico, álcool benzílico antibióticos

1.2 Histórico(2,6,26,58)

A longa história das ciclodextrinas consta de quatro períodos. No primeiro (de 1891 à ~ 1935) a estrutura e o potencial industrial das ciclodextrinas permaneceu desconhecido. A primeira referência às ciclodextrinas (CDs) foi feita em uma publicação de Villiers⁽⁷⁾ (1891) onde, a partir de uma cultura de *Bacillus amylobacter* em amido, isolou-se uma pequena quantidade de uma substância cristalina. Villiers chamou-a de "cellulosine" devido sua similaridade com a molécula de celulose.

No segundo período (1935 à ~1975), as estruturas das CDs foram elucidadas por Freudenberg⁽⁶⁾ e colaboradores (Figura 1.2.1). Além disso, a sua capacidade de formar complexos de inclusão começou a ser estudada, numerosos derivados foram sintetizados e suas propriedades como modelo enzimático passaram a ser estudadas.

O terceiro período foi caracterizado pela explosão no número de publicações e patentes, estudos toxicológicos e o início da produção industrial de CDs.

O quarto período - que esta apenas começando - está sendo caracterizado pelo aparecimento da 2ª geração de CDs, pela produção e utilização industrial de complexos de inclusão assim como pelo início da síntese de CDs modificadas quimicamente, abrindo campo para novos estudos na área de complexos de inclusão.

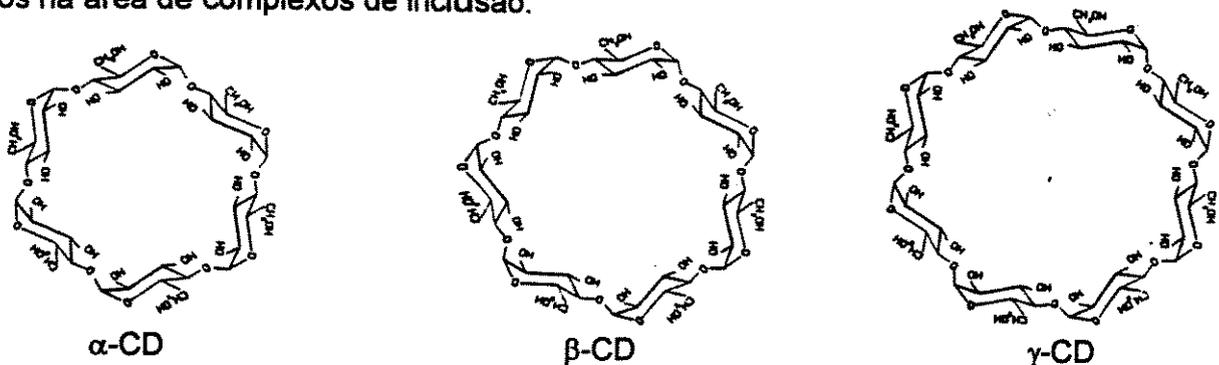


Figura 1.2.1 Estrutura química das principais ciclodextrinas

1.3. Obtenção das ciclodextrinas(2,4,6,11-12,26,28 e29)

Ciclodextrinas podem ser obtidas por degradação enzimática do amido, um polissacarídeo linear que consiste de unidades de glucose unidas por ligações α -(1-4), arranjadas em uma hélice com curso para esquerda, contendo seis unidades de glucose por volta.

Se esta degradação é conduzida por enzimas hidrolíticas, uma longa série de oligômeros lineares, conhecidas como dextrinas, é obtida. Por outro lado, se o amido é degradado por um tipo de amilase conhecido por "ciclodextringlicosiltransferase" (CGTase), como produtos principais são obtidos compostos cíclicos, conhecidos como ciclodextrinas.

A CGTase tem a capacidade de desligar fragmentos da molécula de amido e ligar suas extremidades formando uma estrutura cíclica com ligações α -(1-4). (Figura 1.3.1).

Um procedimento básico para obtenção das CDs consiste das seguintes etapas :

- cultivo de microorganismos que produzem a enzima CGTase.
- separação da enzima do extrato, concentração e purificação
- conversão enzimática do amido pré-hidrolisado à uma mistura de dextrinas cíclicas e acíclicas.
- separação das ciclodextrinas da mistura, purificação e cristalização.

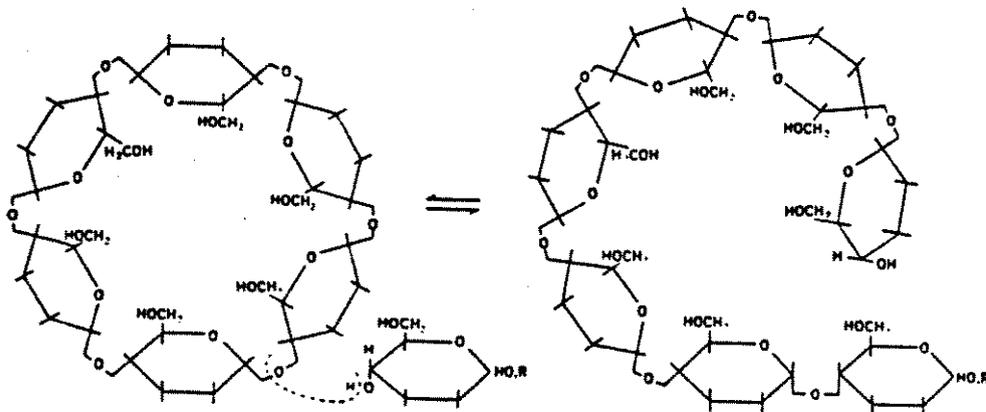


Figura 1.3.1-Ação reversível da CGTase, mostrando esquematicamente a forma que compostos lineares e cíclicos são interconvertidos via reações internas transglicosídicas. Os grupos R representam sequências de amiloses. (26)

Certamente existem muitos organismos que produzem glicosiltransferases, mas somente as enzimas do *Bacillus macerans*, *Bacillus megaterium* (um bacilo alcalino), *Kribsiella pneumoniae* e *Bacillus stercorarius* foram examinados com mais detalhes.

Estas enzimas nunca desligam fragmentos específicos da estrutura do amido, portanto, obtêm-se CDs contendo de 6 a 12 unidades de glicose. Sundararajan e Rao⁽⁸⁾ demonstraram por cálculos de energia conformacional, que CDs com menos de 6 unidades de glicose por anel não podem ser formadas por razões estéricas, enquanto Pulley e French⁽⁹⁾ apresentaram CDs com mais de 9 unidades (δ , ϵ , ζ e η -CD), embora estes compostos ainda não tenham sido caracterizados satisfatoriamente devido a sua grande solubilidade em água e fraca habilidade em formar complexos de inclusão. Estudos mais recentes mostram que os anéis destas CDs devem ser altamente flexíveis. Aumentando-se o diâmetro da cavidade apolar, esta pode acomodar um número crescente de moléculas de água que em solução aquosa, apresentarão uma menor diferença energética das moléculas de água do solvente. Como consequência, a formação de complexos resulta em um ganho de energia e as moléculas de água deslizam facilmente para fora da cavidade, sendo um processo entropicamente dirigido onde moléculas de água com menor entropia saem da cavidade para um estado de maior entropia.

Na síntese enzimática de CDs a fração principal contém α , β e γ -CDs (com 6, 7 e 8 unidades de glucose, respectivamente), e a proporção de cada uma depende da enzima utilizada e pode ser influenciada pela adição de compostos orgânicos .

Atualmente a CGTase mais utilizada industrialmente é a obtida do *Bacillus macerans* nº 38-2 pois é ativa até 80°C e na faixa de pH de 6 à 10. Nestas condições, não se observa degradação por microrganismos e 80% do amido é convertido em β -CD com pequena produção de outras CDs, com a vantagem da não adição de compostos orgânicos (geralmente tóxicos).

1.4 Propriedades físicas e químicas

1.4.1 Estrutura química^(6,14,15,24)

Como consequência da conformação do C₁ das unidades de glicopiranoose, todos os grupos hidroxilas secundários estão situados em uma das bordas da estrutura toroidal do anel das CDs, enquanto as hidroxilas primárias estão situadas na outra extremidade. A cavidade da CD é circundada por átomos de hidrogênio e os átomos de oxigênio das pontes glicosídicas. (Figura 1.4.1).

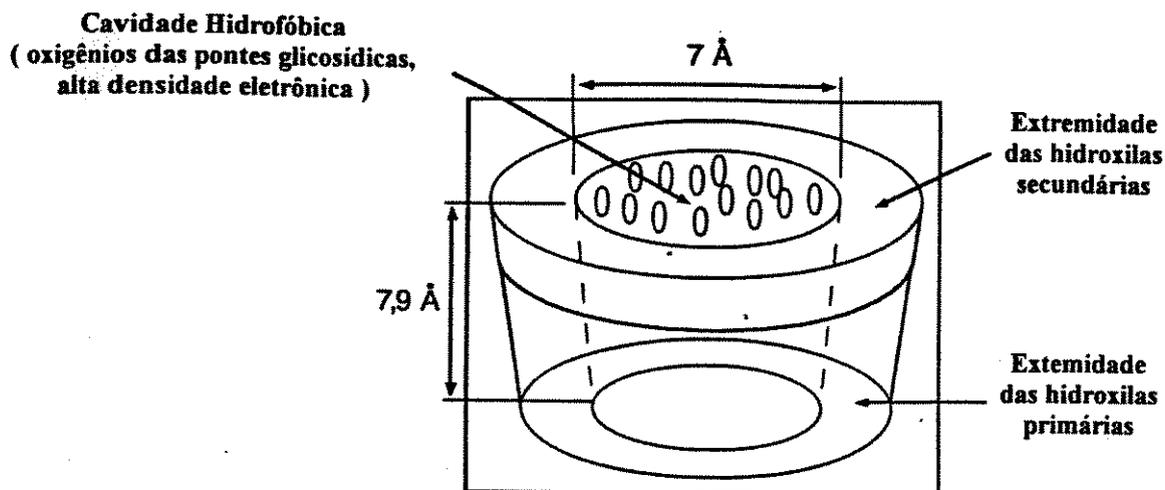


Figura 1.4.1 Estrutura toroidal da α -ciclodextrina, mostrando a posição dos grupos internos à cavidade.⁽³⁰⁾

O par de elétrons livre do oxigênio das ligações glicosídicas está direcionado para o interior da cavidade produzindo uma alta densidade eletrônica e um caracter de base de Lewis.

Os grupos C_2 -OH formam pontes de hidrogênio com os grupos C_3 -OH das unidades de glucopiranosose adjacentes, formando um "cinturão" secundário de pontes de hidrogênio, gerando uma estrutura rígida. Esta é, provavelmente, a melhor explicação para a baixa solubilidade da β -CD, pois este "cinturão eletrônico" é incompleto na molécula de α -CD, formando apenas 4 das 6 pontes de hidrogênio possíveis, distanciando as unidades de glucopiranosose e tornando-a mais solúvel. No caso da γ -CD, sua estrutura não-coplanar mais flexível aumenta ainda mais sua solubilidade.

As constantes de equilíbrio hidrogênio-deutério na hidroxila secundária (0,65 , 0,75 e 0,85 para β , α , e γ -CD respectivamente), indicam a maior força do sistema de pontes de hidrogênio na β -CD. De acordo com mapas de energia de conformação, a formação de pontes de hidrogênio entre as hidroxilas de C_2 e C_3 resulta em um abaixamento de energia da ordem de 83,72 kJ/mol para a α -CD e de 125,58 kJ/mol para β -CD.

Quando as CDs estão envolvidas em complexos de inclusão, sua estrutura pode ser considerada como sendo um cone ao invés de um cilindro. A rotação livre das hidroxilas primárias diminui o diâmetro interno da cavidade no lado onde a complexação ocorre.

A conformação das CDs em solução é quase idêntica à conformação no estado cristalino. Estudos espectroscópicos de RMN e IR (H_2O e DMSO) mostraram que as unidades de glucopiranosose estão na conformação C_1 . Isto indica que as hidroxilas primárias e secundárias apresentam conformações similares, em solução ou em estado sólido.

As principais características físicoquímicas das CDs estão listadas na Tabela 1.4.1.

Tabela 1.4.1 Características físicoquímicas das ciclodextrinas.⁽⁶⁾

Parâmetro	α -ciclodextrina	β -ciclodextrina	γ -ciclodextrina
unidades de glucose	6	7	8
peso molecular (g/mol)	972	1135	1297
solubilidade em água (g/100ml)	14,5	1,85	23,3
rotação ótica (25°C)	150,0±0,5	162,5±0,5	177,4±0,5
diâmetro da cavidade (angs.)	4,7 - 5,3	6,0 - 6,5	7,5 - 8,3
altura do toróide (angs.)	7,9±0,1	7,9±0,1	7,9±0,1
volume da cavidade/mol de CD (angs. ³)	174	262	472
forma cristalina em água	hexagonal	monoparalelograma	prismas quadrados
pK via potenciometria (25°C)	12,3312	12,2020	12,0810
volume molar parcial em solução (ml/mol)	611,4	703,8	801,2
compressibilidade adiabática em água (ml/mol bar 10 ⁴)	7,2	0,4	-5
constante de difusão a 40°C	3,443	3,224	3,000

1.4.2 Estrutura Cristalina^(2,6,19,22,31-33)

Micrografias das ciclodextrinas, (cristais muito finos) obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (aumento de 1,5 milhões), mostram uma estrutura linear com periodicidade de 14,5 Å. Com aumento de 2,0 milhões, unidades estruturais que correspondem aos anéis de ciclodextrinas podem ser observadas.

O pacote de moléculas de CDs que formam a estrutura cristalina pode se arranjar de duas maneiras. Uma delas é a chamada "canal" onde as moléculas estão empilhadas uma sobre as outras formando um canal. O outro tipo de organização é chamado de "prisão" onde a cavidade de uma molécula de CD é bloqueada em ambos os lados por moléculas de CD adjacentes, produzindo uma estrutura tipo zig-zag e outra na forma de tijolos.

As cavidades das CDs cristalizadas em água não estão vazias, mas preenchidas por moléculas de água, assim como sua vizinhança. Dependendo das condições, a mesma CD pode cristalizar em diferentes formas, assim a α -CD possui três formas cristalinas contendo 6, 6 e 7,5 moléculas de água dentro de sua cavidade, todas na forma zig-zag, enquanto a β -CD apresenta três formas, a β -CD.12H₂O, β -CD.11H₂O e a β -CD. 13,3H₂O.

Na α -CD. 6H₂O somente duas moléculas de água estão localizadas dentro da cavidade, enquanto as outras quatro estão no seu exterior. As duas moléculas do interior não estão posicionadas no eixo toroidal, mas deslocados de 0,6Å. (Figura 1.4.2).

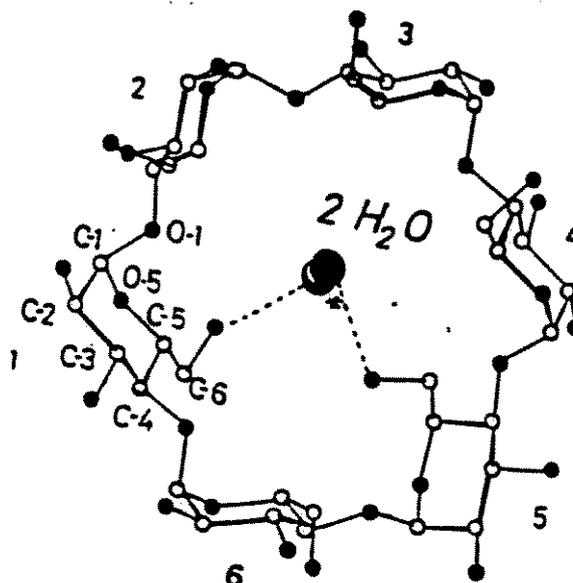


Figura 1.4.2 Estrutura cristalina da α -ciclodextrina hexahidratada. Somente duas moléculas de água estão sendo mostradas. As linhas tracejadas representam pontes de hidrogênio enquanto o asterisco mostra o centro da cavidade. (6, 31)

No caso da β -CD as diferenças estruturais entre as duas formas estão principalmente na distribuição desordenada das moléculas de água dentro da cavidade, além de pequenas variações nos parâmetros da rede cristalina. O undecahidrato é convertido no dodecahidrato por repouso durante algumas semanas.

Na β -CD.11H₂O, as 11 moléculas de água estão distribuídas em 16 posições, oito na cavidade (6,12 moléculas de água) e oito nos interstícios (4,88 moléculas de água). As moléculas situadas no interior da cavidade formam somente duas pontes de hidrogênio com a CD. Suas posições estão mais ordenadas ou fixas do que as moléculas do exterior, isto deve-se provavelmente ao caráter hidrofóbico da cavidade.

Na β -CD.12H₂O a cavidade é ocupada por 6,5 moléculas de água, distribuídas por oito posições e as outras 5,5 moléculas estão localizadas nos interstícios da estrutura cristalina.

A β -CD hidratada possui duas formas cristalinas, uma delas apresenta um pico endotérmico fino nas curvas de DSC e DTA em -46°C , enquanto a outra forma exibe picos entre -70 e -60°C , correspondentes a transições entre estruturas cristalinas.

Ciclodextrinas não possuem faixa de ponto de fusão definido, sofrendo decomposição acima de 200°C . As propriedades termoanalíticas dependem da quantidade de água, estrutura cristalina, taxa de aquecimento e composição atmosférica. Termogramas (DTA) obtidos da α e γ -CD anidras mostram picos exotérmicos à 167°C e 152°C respectivamente, enquanto a β -CD anidra não apresenta picos nesta faixa. Pequenos picos endotérmicos em 230 e 225°C são observados para α e β -CDs anidras, respectivamente. No caso das moléculas hidratadas, os termogramas apresentam largos picos endotérmicos representando a perda de moléculas de água.

Os complexos de inclusão com CDs são formados pela substituição destas moléculas de água por outros compostos apropriados. Esta eliminação de água da estrutura cristalina decresce as reflexões de sua molécula sob Raio-X até um limite onde uma estrutura amorfa é obtida.

1.4.3 Propriedades em solução^(6,18)

A solubilidade em água das CDs ilustra suas propriedades anômalas em solução. Enquanto a solubilidade da β -ciclodextrina (β -CD) é de somente 1,85g /100 ml de água à 25°C; a da α e γ -ciclodextrinas e da hidroxipropil- β -ciclodextrina (β -CDHP)^(58, 59) são muito maiores (14,5 , 23,2 e 50,0g/ 100ml de água respectivamente, determinadas por refratometria). A variação da solubilidade com a temperatura é descrita pelas equações abaixo, cujos parâmetros foram determinados pelo método dos mínimos quadrados utilizando dados de Mollica e Connors⁽⁴⁰⁾.

α -CD

$$C = (112,71 \pm 0,45) e^{-(3530 \pm 31) (1/T - 1/298)}$$

β -CD

$$C = (18,3236 \pm 0,099) e^{-(14137 \pm 31) (1/T - 1/298)}$$

γ -CD

$$C = (219,4 \pm 9,8) e^{-(3187 \pm 320) (1/T - 1/298)}$$

onde C é a concentração da CD em mg/ml e T a temperatura em Kelvin

Quando comparados com outros sacarídeos acíclicos, a baixa solubilidade das CDs é explicada pela entalpia de solução (ΔH°) relativamente desfavorável, parcialmente "encoberta" pela favorável entropia de solução (ΔS°). Quanto às CDs, as diferentes solubilidades podem ser atribuídas a diferenças nas propriedades termodinâmicas, enquanto α e γ -CDs possuem solubilidades próximas, a solubilidade da β -CD é bem menor em consequência do maior valor do ΔH° e do menor valor do ΔS° , condições estas desfavoráveis à solubilização (Tabela 1.4.3).

Tabela 1.4.3 Parâmetros termodinâmicos das ciclodextrinas⁽²³⁾

Parâmetro	α -CD	β -CD	γ -CD
ΔH° (Kcal / mol)	7,67	8,31	7,73
ΔS° (e.u.)	13,8	11,7	14,7

1.4.4 Reatividade Química^(6,27)

As ciclodextrinas não possuem grupos terminais reativos, portanto não sofrem ataque de agentes redutores. A oxidação com periodato não forma formaldeído ou ácido fórmico, confirmando a ausência de grupos terminais reativos.

Sob irradiação gamma, a β e a γ -CD no estado cristalino sofrem quebra, principalmente na ponte 1,4-glicosídica, formando maltohexoses, malonodialdeído e ácido glucônico como produtos principais, além de dióxido e monóxido de carbono e gás hidrogênio. O aumento de teor de água diminui a degradação por radiação das CDs até o limite de, em soluções diluídas, a degradação ocorrer por mecanismo de hidrólise ácida.

A hidrólise ácida parcial das CDs fornece moléculas de glucose e maltossacarídeos acíclicos. Esta série se estende até o oligossacarídeos que contém o mesmo número de unidades de glucose que as CDs originais. A hidrólise ácida das pontes glicosídicas na β -CD tem energia de ativação de 34,2 kcal/mol (143,16 kJ/mol) à 40-100°C com ácido clorídrico 0,01-1,00M. O valor para a dextrina linear correspondente é de 30,5 kcal/mol (127,67 kJ/mol).

As ciclodextrinas podem ser quimicamente modificadas, as principais derivatizações estão descritas abaixo.

- substituição de um ou mais átomos de hidrogênio das hidroxilas primárias e secundárias originando, éteres e glicosil-ciclodextrinas.
 - substituição de um ou mais hidroxilas primárias e secundárias formando deoxi-compostos , halogêno-compostos, aminas, ...
 - oxidação do álcool C_5-CH_2OH formando um ácido carboxílico (C_5-COOH)
 - quebra de uma ou mais ligações C_2-C_3 utilizando oxidação com periodato , conduzindo à dialdeídos , ou, após redução, à éteres-corôa.

A literatura sobre a síntese de derivados de ciclodextrinas é bastante extensa. Dentre os derivados mais importantes citados estão os derivados alquilados (metil, etil, hidroxipropil), acetilados (acetil, benzoil, glutaril), nitrogenados (amino, alquilamino, imidazois), halogenados (bromo, 6-deoxi-6-cloro) e derivados sulfurados (deoxi-mercaptanas), dentre outros. Existe também a possibilidade da formação de polímeros de CDs pela ligação covalente entre duas ou mais moléculas . Estes polímeros são preparados pela ligação cruzada de anéis de CD contendo substituintes bifuncionais ou pela ligação das CDs à outros polímeros.

1.5 Critérios de pureza para ciclodextrinas industriais⁽¹¹⁾

As CDs são fabricadas industrialmente para servir principalmente à indústria farmacêutica e alimentícia, portanto, os critérios de pureza são bastante estreitos.

Existem vários métodos analíticos que determinam a presença de umidade, solventes orgânicos e impurezas como dextrinas acíclicas e outras ciclodextrinas. Um critério de pureza é o índice de refração de uma solução aquosa saturada ($n_D^{20} = 1,33506$ para solução de β -CD). Uma solução 1% deve ser transparente, sem cor e o pH deve estar próximo ao valor neutro.

Outro aspecto importante é a pureza microbiológica, a contagem de germes deve estar abaixo de 1000/g, fungos e esporos menor que 100/g e microorganismos patogênicos não devem estar presentes.

Algumas especificações importantes citadas na literatura são apresentadas na Tabela 1.5.1, onde N e A são os códigos sob os quais as ciclodextrinas são comercializadas.

Característica	CD tipo N	CD tipo A
aparência	cristalina	cristalina
umidade (%)	10-12	3-5
ciclodextrina (%)	>97	45-50
odor	nenhum	nenhum
doçura*	leve	leve
cinzas (%)	<0,15	<0,15
metais pesados	isenta	isenta

* determinado utilizando sacarose como controle a 25°C

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Reagentes e Materiais

O praziquantel (PZ) foi adquirido da Sigma Chemical Company Ltd-UK, enquanto a β -ciclodextrina (β -CD), γ -ciclodextrina (γ -CD) e a hidroxipropil- β -ciclodextrina (β -CDHP) foram fornecidas pela Wacker-Chemie GmbH-Alemanha e foram utilizadas como recebidas. Todos os outros reagentes e solventes foram adquiridos em grau analítico. Água bidestilada foi utilizada durante todos os experimentos.

2.2 Preparação de complexos no estado sólido (6,21,23,25)

Não existe uma técnica padrão para a obtenção de complexos de inclusão com ciclodextrinas, portanto, para cada substância em questão um método particular, que se adapte ao tipo de estrutura molecular, deve ser desenvolvido. Segundo a literatura os métodos mais comuns para a obtenção destes complexos são : liofilização, mistura sólida ou "kneading" e a coprecipitação. Estes métodos foram testados em laboratório.

- Liofilização

Os complexos de inclusão foram preparados pela mistura de quantidades apropriadas de ciclodextrinas e de PZ em água. Estas quantidades foram calculadas a partir da curvas ascendentes dos diagramas de solubilidade. Por exemplo, 14,6g de β -CDHP foram dissolvidos em 100ml de água, após a adição de 1,4g de PZ, esta suspensão foi agitada à $25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 96 horas quando o equilíbrio foi alcançado. A solução obtida foi então liofilizada, isolando-se um sólido que foi conservado em dessecador a vácuo e analisado, a fim de confirmar a presença de um complexo de inclusão verdadeiro.

A liofilização foi conduzida utilizando-se um aparelho de secagem por sublimação a baixa temperatura, MODULYO FREEZE DRYER, sob 10^{-5} atm de pressão e a -40°C .

- Mistura sólida (Kneading)

A uma mistura pastosa contendo β -CDHP, preparada pela adição de 4,0g de β -CDHP em 3ml de água, foram adicionados 390mg de PZ. Esta mistura foi transferida para um almofariz e mascerada durante 20 minutos. Ao final deste período, álcool isopropílico a 1°C foi adicionado, sob agitação, e a suspensão obtida foi filtrada em funil de Büchner, utilizando álcool isopropílico (1°C) para lavagem. O sólido obtido foi então seco em estufa a vácuo (50°C) durante 12 horas, conduzindo, desta forma, a um sólido que foi então analisado.

- Coprecipitação

A uma solução contendo 4,0g de β -CDHP em 10ml de água foram adicionados 390mg de PZ dissolvidos em diclorometano. Esta mistura foi então agitada durante 12 horas a $25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$. A suspensão obtida foi refrigerada a 2°C durante 12 horas em repouso, obtendo-se duas fases, e então filtrada em funil de Büchner, utilizando álcool isopropílico (1°C) para lavagem. O sólido obtido foi seco em estufa a vácuo a 50°C durante 24 horas, conduzindo ao complexo de inclusão.

A quantidade máxima de PZ dissolvida nos complexos preparados pelos métodos acima foi determinada pela agitação de uma quantidade em excesso do complexo em 10ml de água a $25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$. As suspensões obtidas foram filtradas em filtros MILLIPORE ($0,45\mu\text{m}$) e a quantidade de droga dissolvida foi determinada utilizando-se um espectrofotômetro UV/Visível UVIKON 930 e cubetas com 1cm de extensão a uma temperatura de $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

2.3 Estudos de Solubilidade

Os diagramas de solubilidade são essenciais para obtenção de informações sobre a presença de complexos de inclusão verdadeiros, proporção substrato / droga, assim como dados termodinâmicos de estabilidade.

Medidas de solubilidade foram conduzidas de acordo com o método de Higuchi e Connors⁽³⁴⁾. Excesso de PZ foi adicionado em soluções contendo diferentes concentrações de ciclodextrinas, a suspensão obtida foi então agitada a $25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ até que o equilíbrio fosse alcançado (aproximadamente 4 dias).

Aliquotas de 1,0ml foram retiradas, diluídas e analisadas a 271nm, utilizando um espectrofotômetro UV/Visível. Como branco, uma solução contendo ciclodextrina foi utilizada, uma vez que as ciclodextrinas não apresentam absorção neste comprimento de onda, enquanto a adição de quantidades crescentes de CD a uma solução de PZ causa um pequeno aumento na absorbância da solução, como pode ser observado na Tabela 2.3.1.

Tabela 2.3.1 Absorbância de uma solução de concentração $6,624 \times 10^{-4} \text{M}$ em praziquantel, utilizando etanol 60% como solvente, com adição de quantidades crescentes de β -ciclodextrina.

Comprimento de onda (nm)	Absorbância			
	sem β -CD	$+1,21 \times 10^{-3}$ mol β -CD	$+2,52 \times 10^{-3}$ mol β -CD	$+4,54 \times 10^{-3}$ mol β -CD
267	0,2053	0,2125	0,2113	0,2224
268	0,1901	0,1963	0,1967	0,2068
269	0,1835	0,1898	0,1901	0,2006
270	0,2006	0,2071	0,2076	0,2169
271	0,2255	0,2326	0,2318	0,2413
272	0,2046	0,2125	0,2109	0,2202
273	0,1444	0,1512	0,1502	0,1598
274	0,0913	0,0981	0,0976	0,1072
275	0,0587	0,0637	0,0649	0,0745

Os dados acima, obtidos em laboratório, confirmam um pequeno aumento de absorbância de uma solução contendo PZ pela adição de quantidades crescentes de CD.

2.4 Estudos de Dissolução em Meio Aquoso

Os estudos de dissolução de tabletes contendo os complexos de inclusão são indispensáveis para assegurar uma eficiente biodisponibilidade da droga.

Tabletes de 600mg (faces retas 13mm de diâmetro) foram obtidos por compressão direta de determinada quantidade do complexo submetida à 1000Kg/cm^2 de pressão durante 15 segundos em uma prensa hidráulica da marca SHIMADZU. Celulose microcristalina (MCC), amido e estearato de magnésio foram utilizados como aditivos. A composição destes tabletes é mostrada na Tabela 2.4.1.

Tabela 2.4.1 Composição dos tabletes utilizados nos testes de dissolução.

Composto	tablete A (mg)	tablete B (mg)
PZ	----	101,00
PZ/β-CDHP	507,00	----
MCC	61,52	69,12
amido	39,41	42,05
estearato de magnésio	10,73	14,83

O perfil de dissolução de tabletes contendo o complexo de inclusão β -CDHP/PZ e a droga livre foi obtido utilizando-se um equipamento de dissolução tipo USP operado a $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$. O solvente utilizado foi água bidestilada (1000ml) e a velocidade de rotação foi de 100rpm (Figura 2.4.1).

Aliquotas de 5ml de solução foram retiradas em intervalos apropriados, passando-as através de um filtro, e o volume retirado foi imediatamente repostado com água destilada. As amostras foram analisadas para PZ, utilizando um espectrofotômetro UVIKON-930 e comprimento de onda de 271nm.

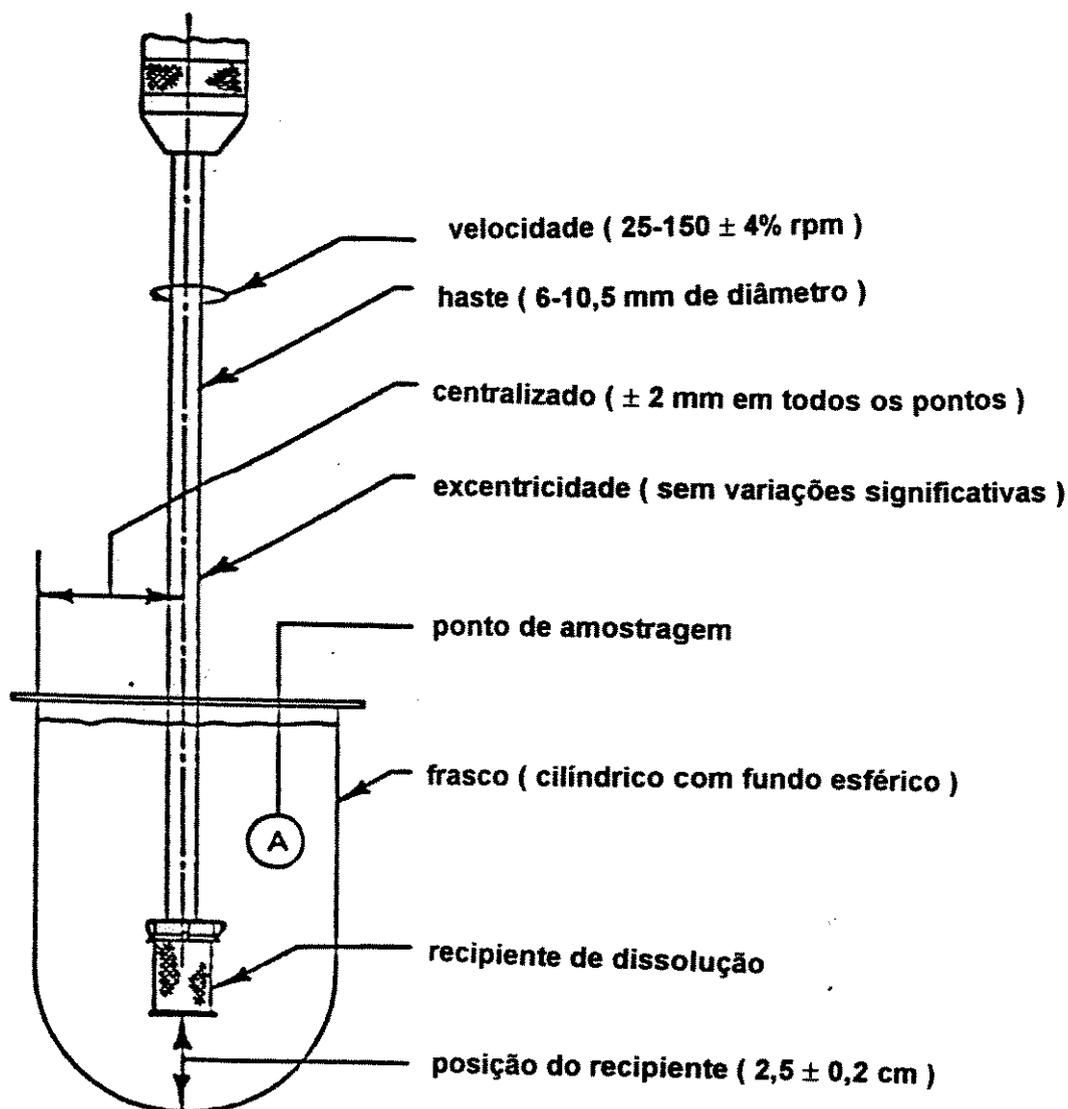


Figura 2.4.1 Representação esquemática do equipamento utilizado nos estudos de dissolução pelo método USP⁽⁴²⁾.

2.5 Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (RMN-H¹)

A Ressonância Magnética Nuclear de Prótons foi utilizada como técnica auxiliar na confirmação da complexação em solução, através da análise do deslocamento dos sinais referentes aos prótons das ciclodextrinas.

Espectros de ressonância magnética nuclear de prótons foram obtidos em um espectrômetro JEOL-EX 270 (FT-NMR System) a $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Referência interna não foi utilizada, uma vez que a possibilidade de complexação com a ciclodextrina não pode ser descartada. Um padrão externo (fosfato de sódio tribásico) dissolvido em água deuterada foi então utilizado. Todas as amostras foram dissolvidas em água deuterada.

2.6 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

No caso do complexo no estado sólido, a calorimetria diferencial de varredura e a microscopia eletrônica de varredura (SEM) foram as técnicas utilizadas na confirmação da presença de um complexo de inclusão verdadeiro.

Análises térmicas das amostras sólidas, aproximadamente 3mg, foram realizadas em um aparelho de calorimetria diferencial de varredura SEIKO DSC 220C, calibrado com Índio e com velocidade de varredura de $10^\circ\text{C} / \text{minuto}$ na faixa de 30 a 290°C .

Vale a pena ressaltar que, segundo Szjetli⁽⁰⁶⁾, as ciclodextrinas não apresentam ponto de fusão definidos, mas acima de 200°C começam a se decompor. As propriedades termoanalíticas observadas dependem do teor de água, da estrutura cristalina, taxa de aquecimento e da composição atmosférica.

2.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)

A morfologia das ciclodextrinas e dos complexos de inclusão foi estudada através da técnica de microscopia eletrônica de varredura (SEM), após metalização das amostras com ouro sob alto vácuo (1,3-13 mPa), utilizando um pulverizador catódico EMScope SC 500. Micrografias das amostras foram obtidas utilizando um microscópio eletrônico de varredura CAMBRIDGE-SEM90.

2.8 Ensaios de Estabilidade.

Ensaios de estabilidade térmica dos complexos obtidos foram realizados via análise de termogramas conduzidos durante 5,6 horas na faixa de $30-200^\circ\text{C}$. A estabilidade dos complexos, sob condições oxidantes, foi avaliada após dissolução em solução aquosa de peróxido de hidrogênio 6%p/v e submetendo-os a luz natural durante 48 horas. Em seguida, esta solução foi liofilizada e os termogramas obtidos analisados.

3. RESULTADOS EXPERIMENTAIS

3.1 Estudos de Solubilidade

A quantidade de droga obtida após reconstituição do complexo β -CDHP/PZ em água esta sumarizada na Tabela 3.1.1

Tabela 3.3.1 Concentração de praziquantel, após reconstituição em água de três lotes de complexo preparados com β -CDHP pelos métodos de kneading, liofilização e coprecipitação, em água a temperatura ambiente.

Método	Solubilidade do praziquantel (mg/ml água)
kneading	15,3
	16,5
	16,8
coprecipitação	35,6
	36,5
	33,4
liofilização	43,0
	43,0
	43,1

Adicionando-se excesso de PZ a soluções contendo ciclodextrinas, diagramas de solubilidade foram obtidos graficando-se a concentração de ciclodextrina *versus* a concentração da droga encontrada em solução (Figura 3.1.1).

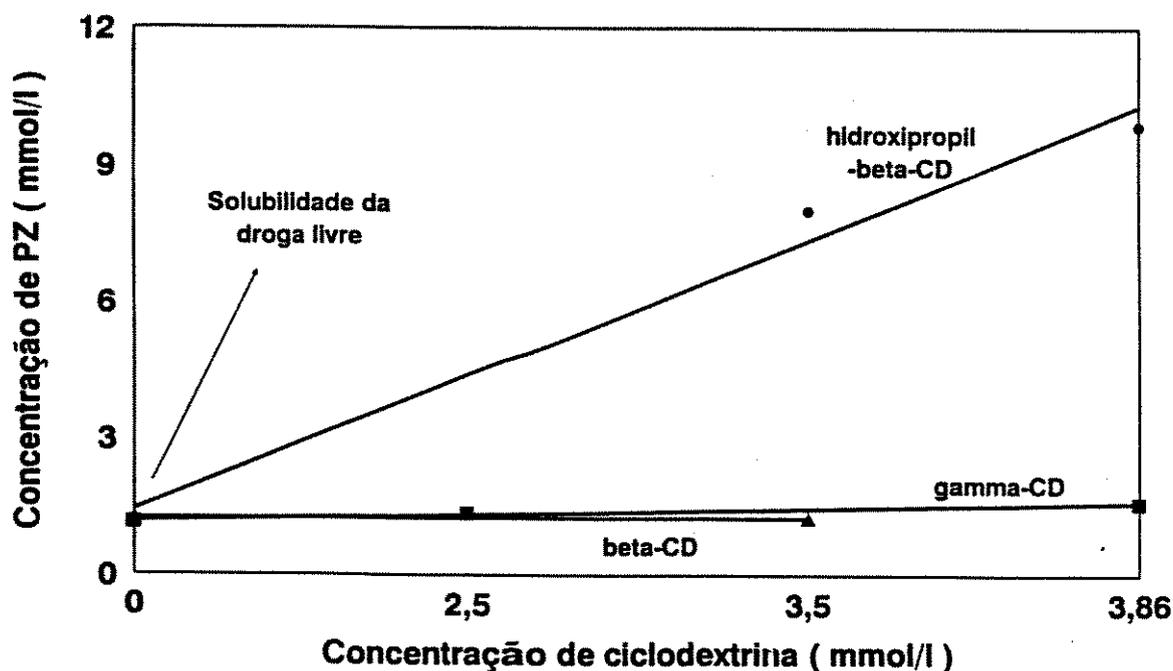


Figura 3.1.1 Solubilidade do praziquantel em função da concentração de β -ciclodextrina, hidroxipropil- β -ciclodextrina e γ -ciclodextrina a 25°C (todos os pontos são a média de três determinações).

A curvas apresentadas acima são os resultados mais importantes obtidos em laboratório, indicando o aumento de solubilidade do praziquantel pela adição de quantidades crescentes de ciclodextrinas. Além disso, as diferentes inclinações das curvas obtidas, indicam as diferentes afinidades da droga pelas CDs.

Tabletes distintos contendo a droga livre e o complexos de inclusão PZ/CD foram dissolvidos em água e os valores da concentração de droga *versus* o tempo de dissolução foram graficados. Estes resultados são apresentados na Figura 3.1.2.

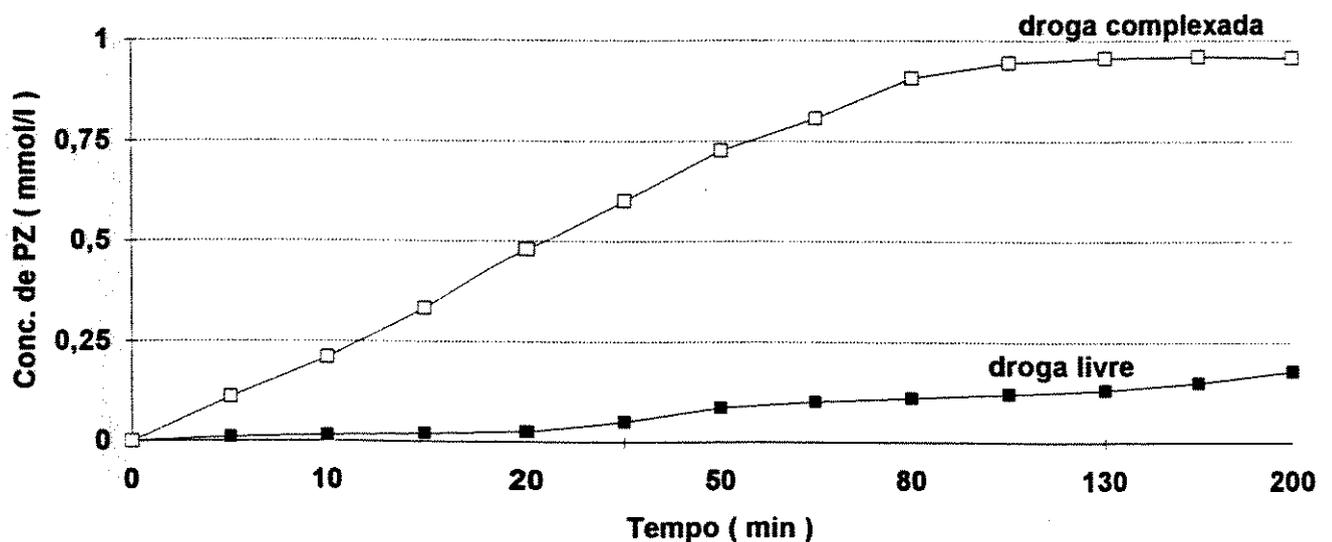


Figura 3.1.2 Perfis de dissolução de tabletes contendo o complexo de inclusão PZ/ β -CDHP e a droga livre, em água a $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$, foram obtidos via método USP (todos os pontos são a média de três determinações).

Os estudos de dissolução mostraram que o perfil de dissolução da droga foi alterado, ou seja, o tablete contendo o complexo de inclusão libera a droga em solução mais rapidamente que o tablete com a droga livre.

3.2 Identificação dos Complexos via Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (RMN- H^1)

A Ressonância Magnética Nuclear de Prótons foi utilizada como técnica auxiliar na confirmação da complexação em solução. Espectros de ressonância magnética nuclear de prótons foram obtidos em um espectrômetro JEOL-EX 270 (FT-NMR System) a $30 \pm 1^\circ\text{C}$.

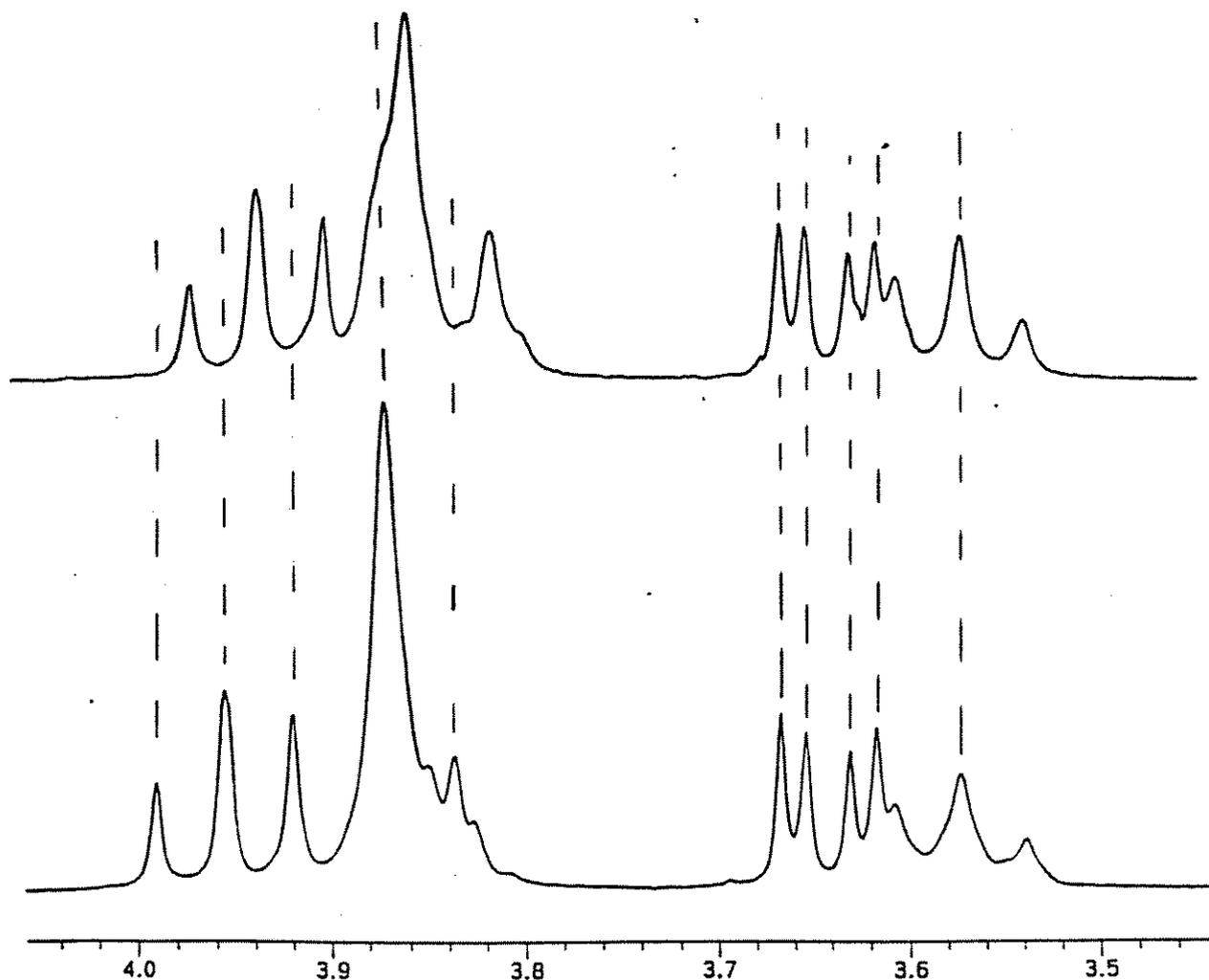


Figura 3.2.1 Espectro de RMN H^1 (270 MHz) da β -ciclodextrina (inferior) e do complexo de inclusão com praziquantel (superior), em D_2O a $30 \pm 1^\circ\text{C}$.

A análise dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Prótons acima indica o deslocamento dos sinais referentes aos prótons do interior da cavidade (triplete $\delta=3,9563$ e multiplete em $\delta=3,8366$) para campos mais altos .

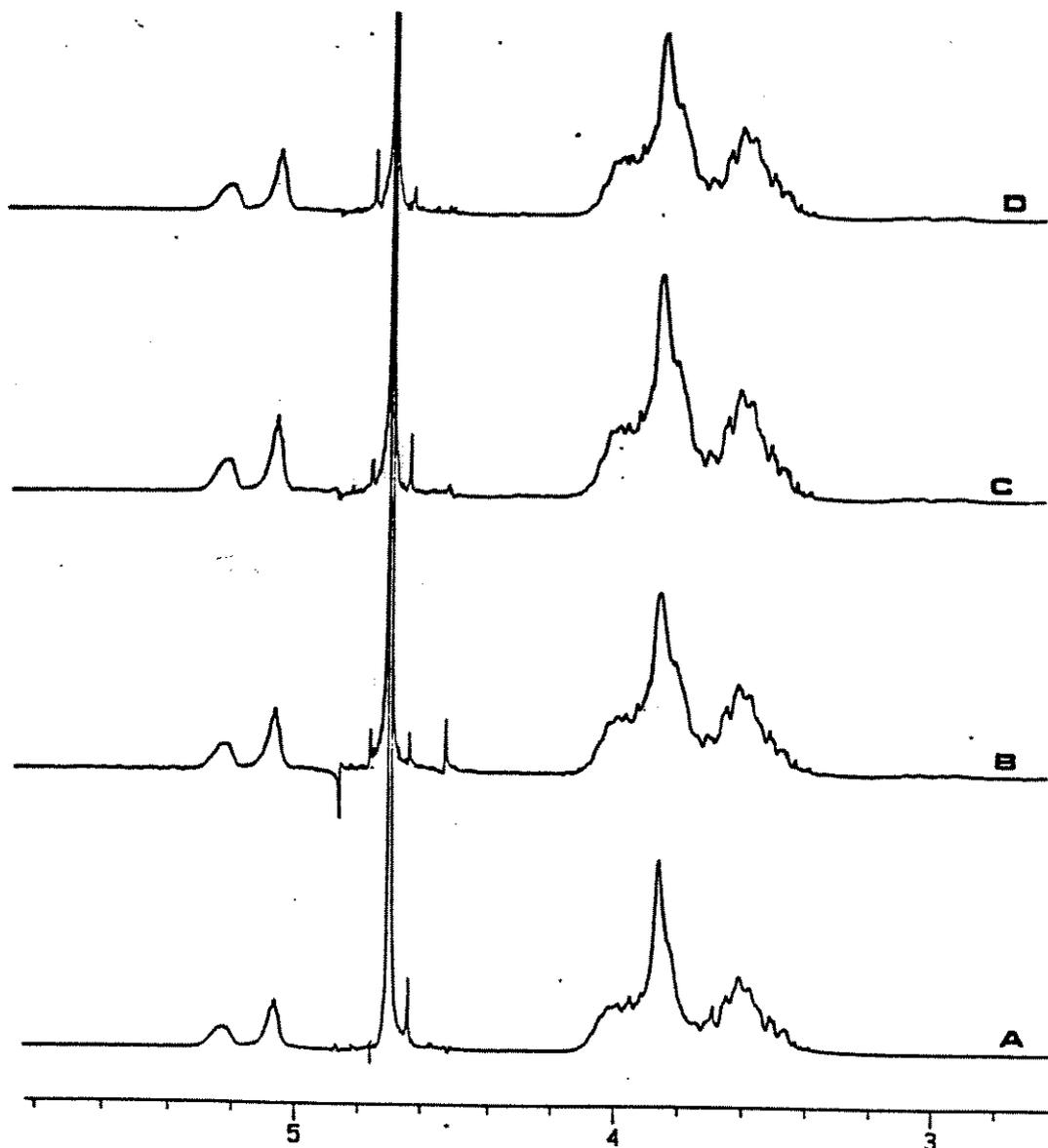


Figura 3.2.2 Espectro de RMN- H^1 (270 MHz) da hidroxipropil- β -ciclodextrina (A) e do complexo de inclusão com praziquantel contendo quantidades crescentes de droga (B, C e D), D_2O a $30 \pm 1^\circ C$.

Os espectros acima são de difícil análise uma vez que apresentam baixa resolução, mas ainda assim é possível observarmos o deslocamento para campos mais altos do sinal referente ao próton H6 ($\delta=3,8623$), assim como o aparecimento de um sinal em $\delta=3,8110$ referente ao próton H-3.

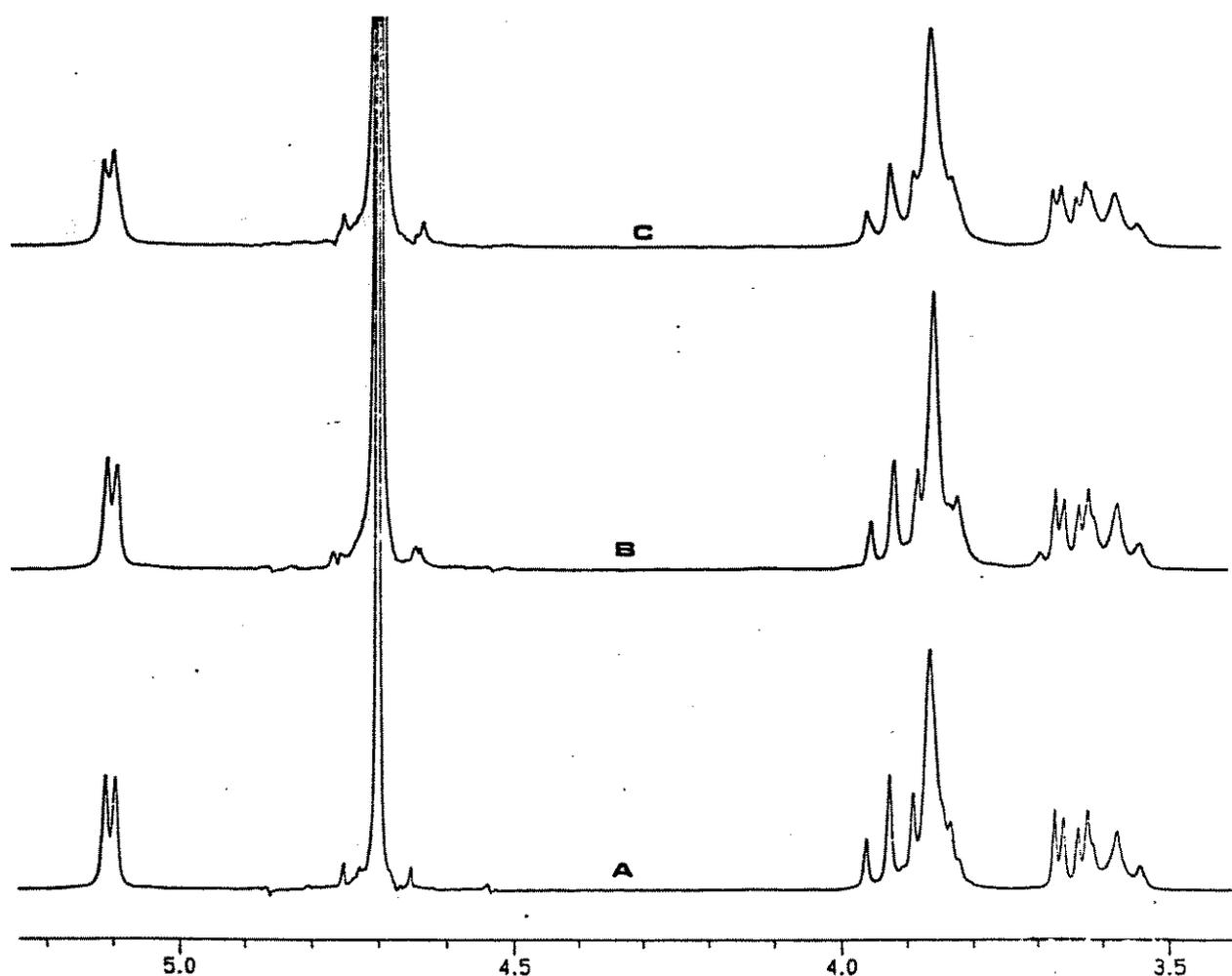


Figura 3.2.3 Espectro de RMN-¹H (270 MHz) da γ -ciclodextrina (A) e do complexo de inclusão com praziquantel contendo quantidades crescentes de droga (B e C) em D₂O a 30 ± 1°C.

Os espectros obtidos para a γ -CD e dos complexos de inclusão com PZ não indicam deslocamentos significativos dos sinais.

3.3 Caracterização dos Complexos via Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

Análises térmicas das amostras sólidas obtidas via liofilização, aproximadamente 3mg, foram realizadas em um aparelho de calorimetria diferencial de varredura SEIKO DSC 220C, a fim de auxiliar na confirmação da presença de um complexo de inclusão verdadeiro.

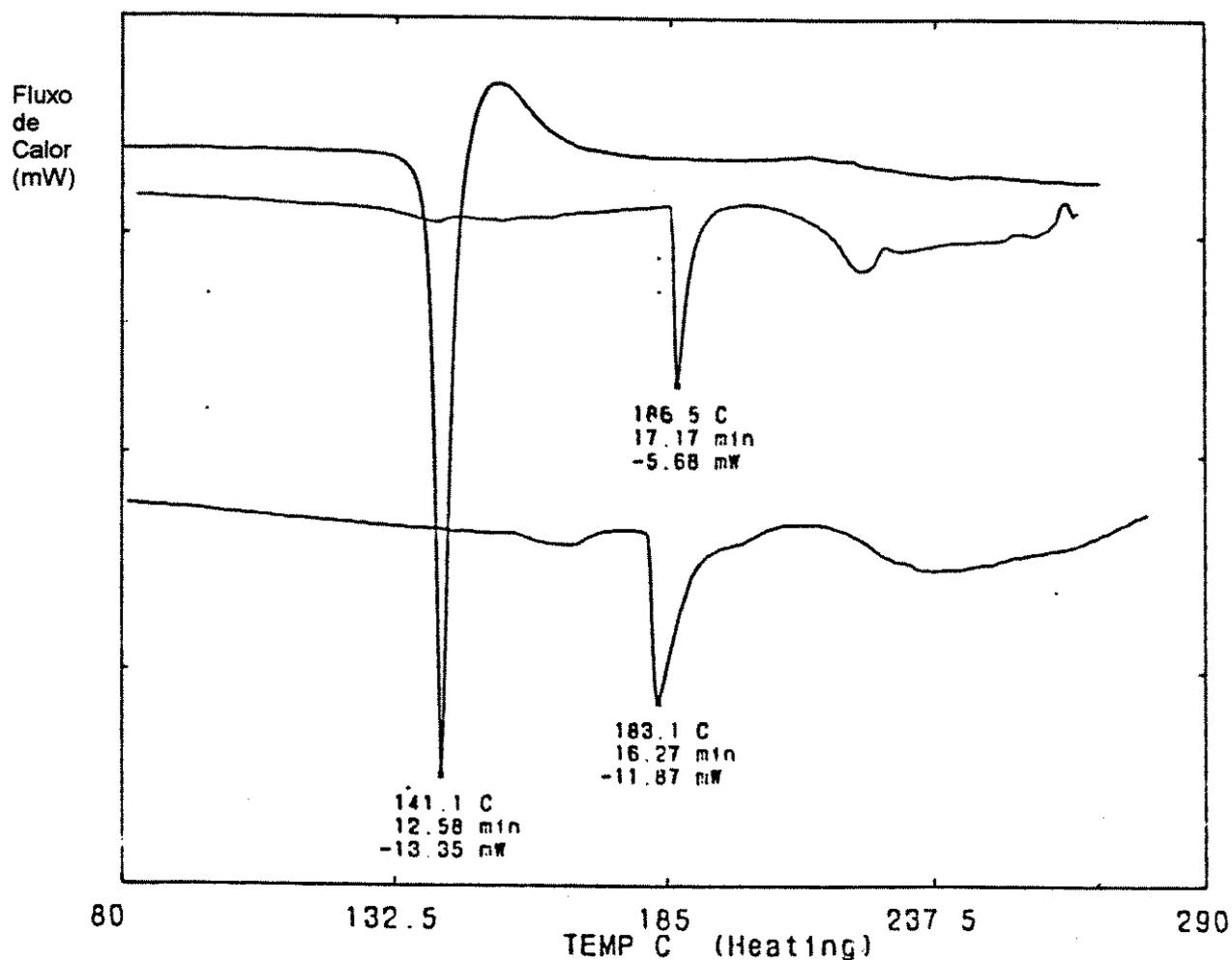


Figura 3.3.1 Termogramas do praziquantel (superior), β -ciclodextrina (intermediário) e do complexo de inclusão (inferior), obtidos via calorimetria diferencial de varredura.

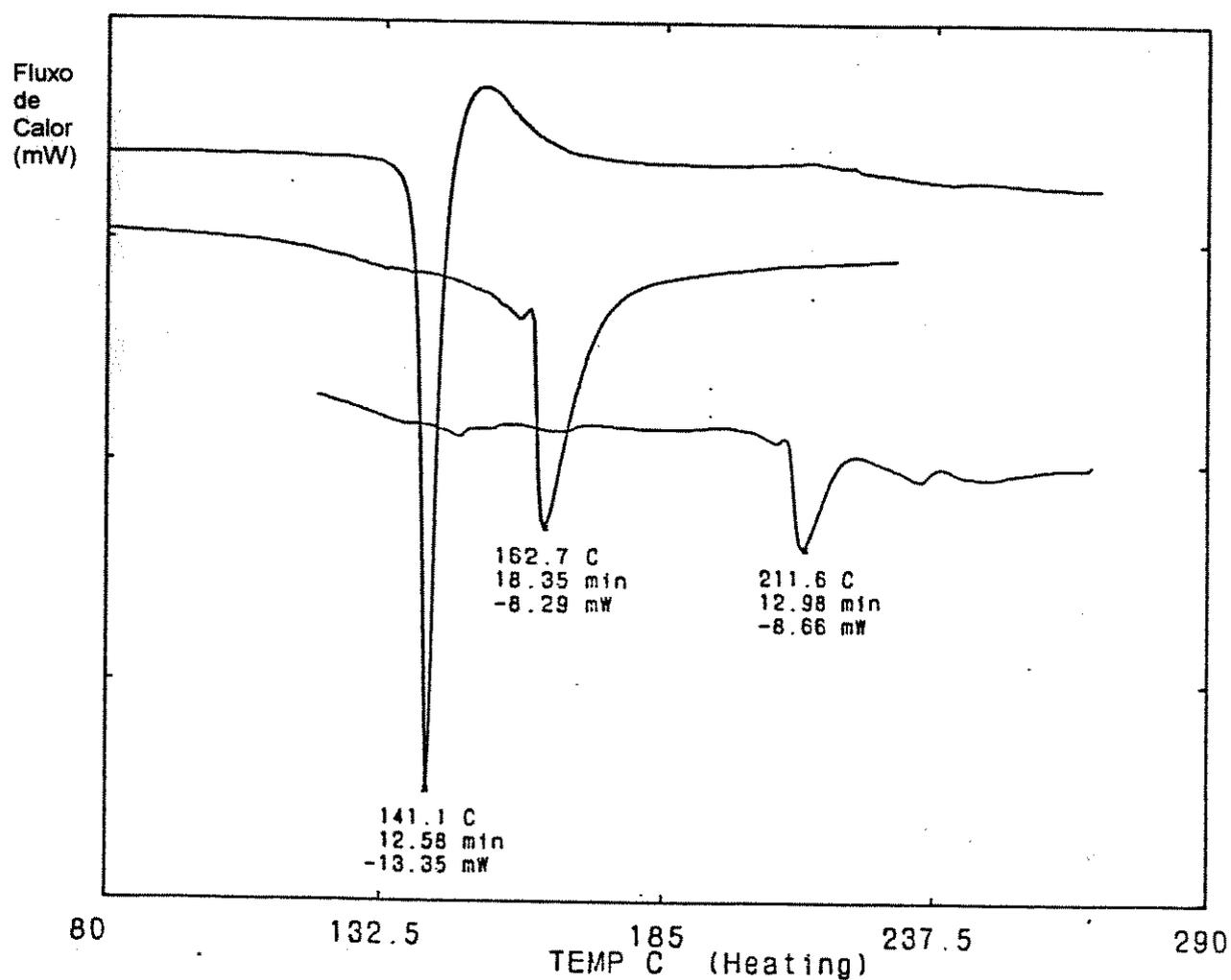


Figura 3.3.2 Termogramas do praziquantel (superior), γ -ciclodextrina (intermediário) e do complexo de inclusão (inferior), obtidos via calorimetria diferencial de varredura.

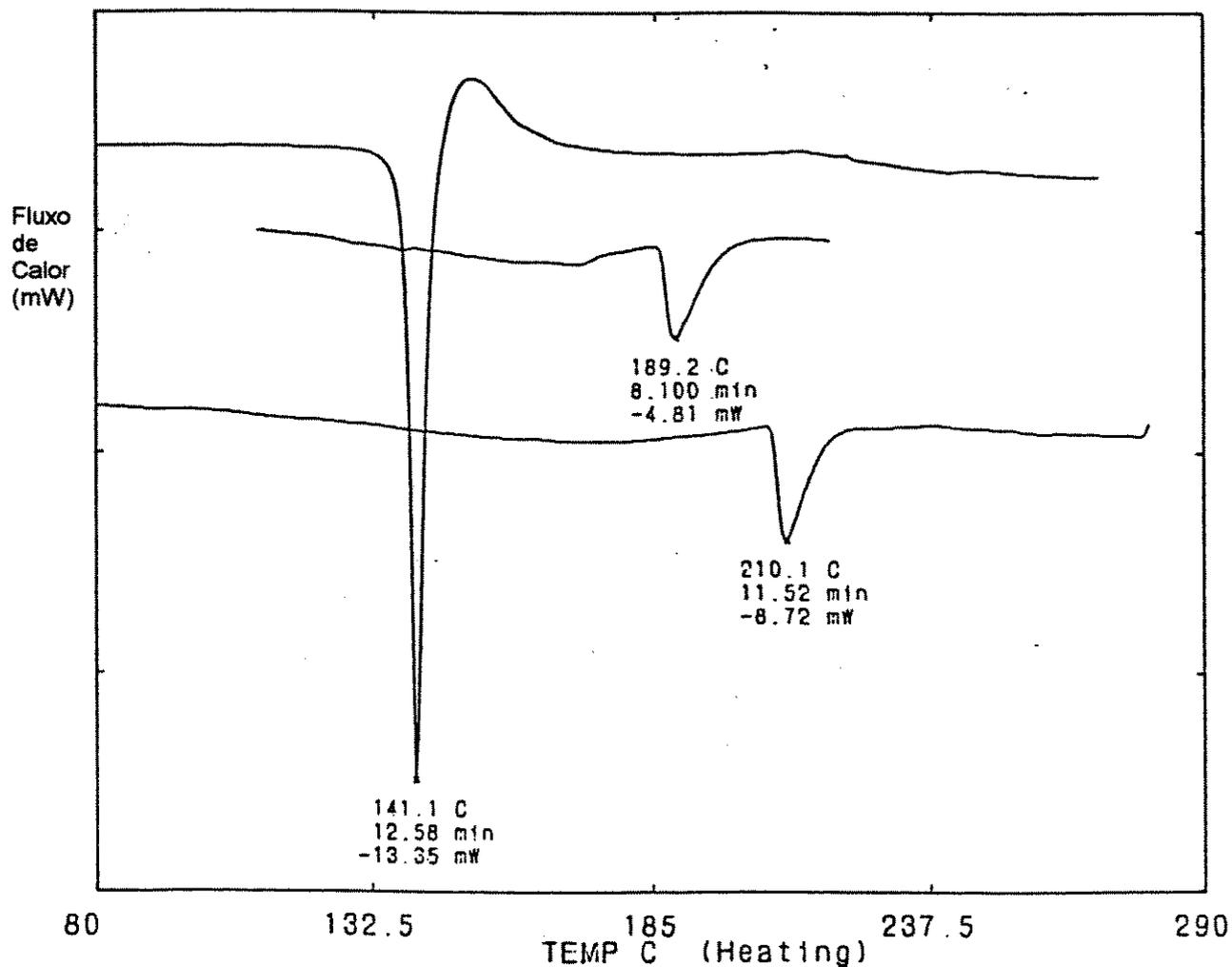


Figura 3.3.3 Termogramas do praziquantel (superior), hidroxipropil-β-ciclodextrina (intermediário) e do complexo de inclusão (inferior), obtidos via calorimetria diferencial de varredura.

A análise destes termogramas indica o desaparecimento dos picos endotérmicos referentes a droga livre nos supostos complexos de inclusão.

Uma mistura física entre o praziquantel e a β -ciclodextrina foi obtida a fim de comparar seu termograma com o do complexo de inclusão.

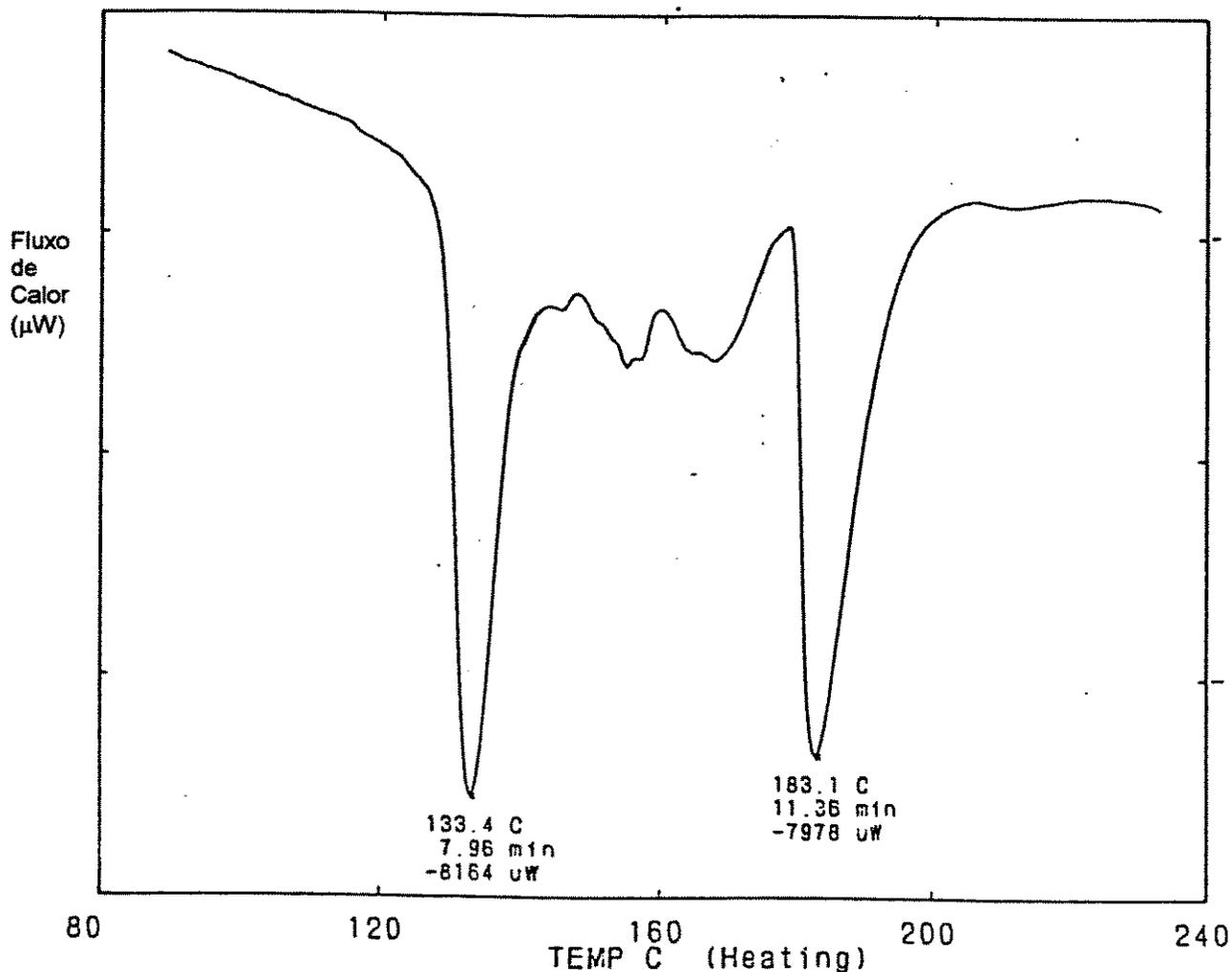


Figura 3.3.4 Termograma da mistura física praziquantel / β -ciclodextrina, obtido via calorimetria diferencial de varredura.

O termograma da mistura física droga / CD indica a presença dos picos endotérmicos referentes a droga e a CD livres.

O termograma do PZ e da β -CD livres, após o processo de liofilização, foram obtidos a fim de observarmos alterações nas estruturas cristalinas.

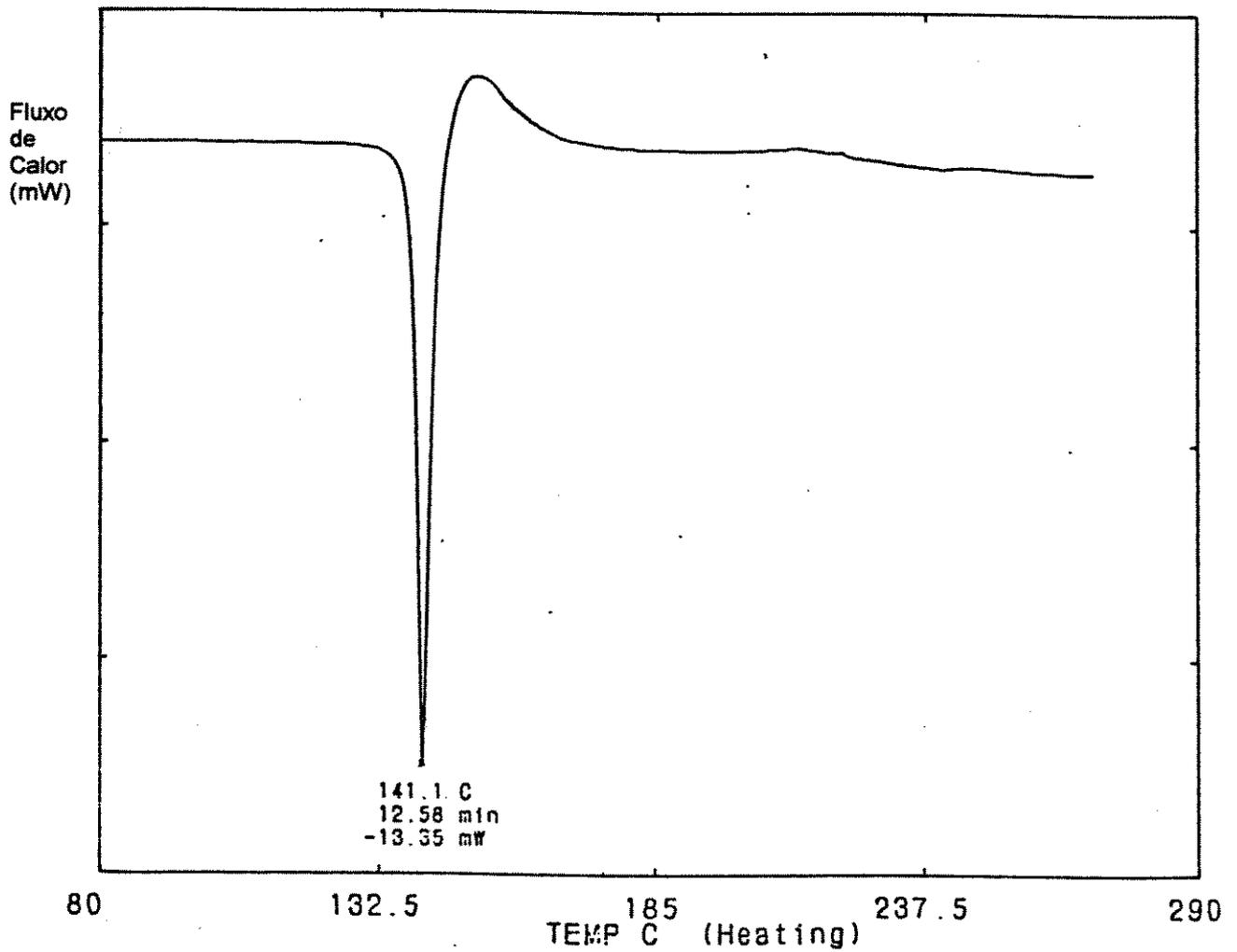


Figura 3.3.5 Termograma do praziquantel após liofilização, obtido via calorimetria diferencial de varredura.

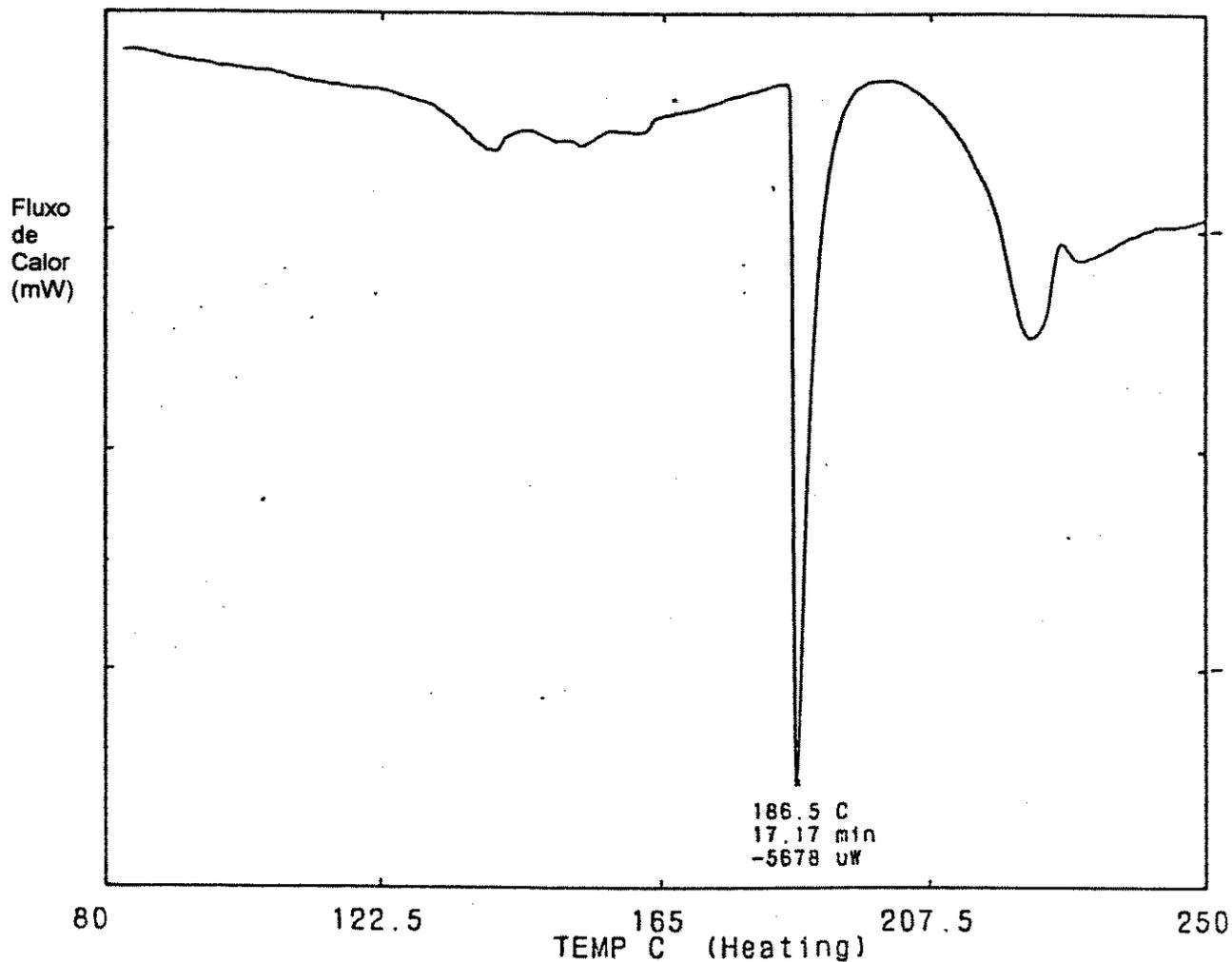


Figura 3.3.6 Termograma da β -ciclodextrina após liofilização, obtido via calorimetria diferencial de varredura.

Os termogramas do PZ e da CD livres, após processo de liofilização, indicam a presença dos picos endotérmicos referentes ao PZ e a CD cristalinas, não indicando sinais de amorfização das amostras.

3.4 Estudos de Estabilidade Térmica e Oxidativa dos Complexos de Inclusão

Estudos de estabilidade térmica e oxidativa do complexo no estado sólido foram conduzidos submetendo-se as amostras a um programa crescente de temperatura, de 30 a 200°C, com velocidade de varredura de 0,5°C/min, correspondendo a um tempo total de varredura de 5,6 horas. Os termogramas obtidos estão apresentados a seguir.

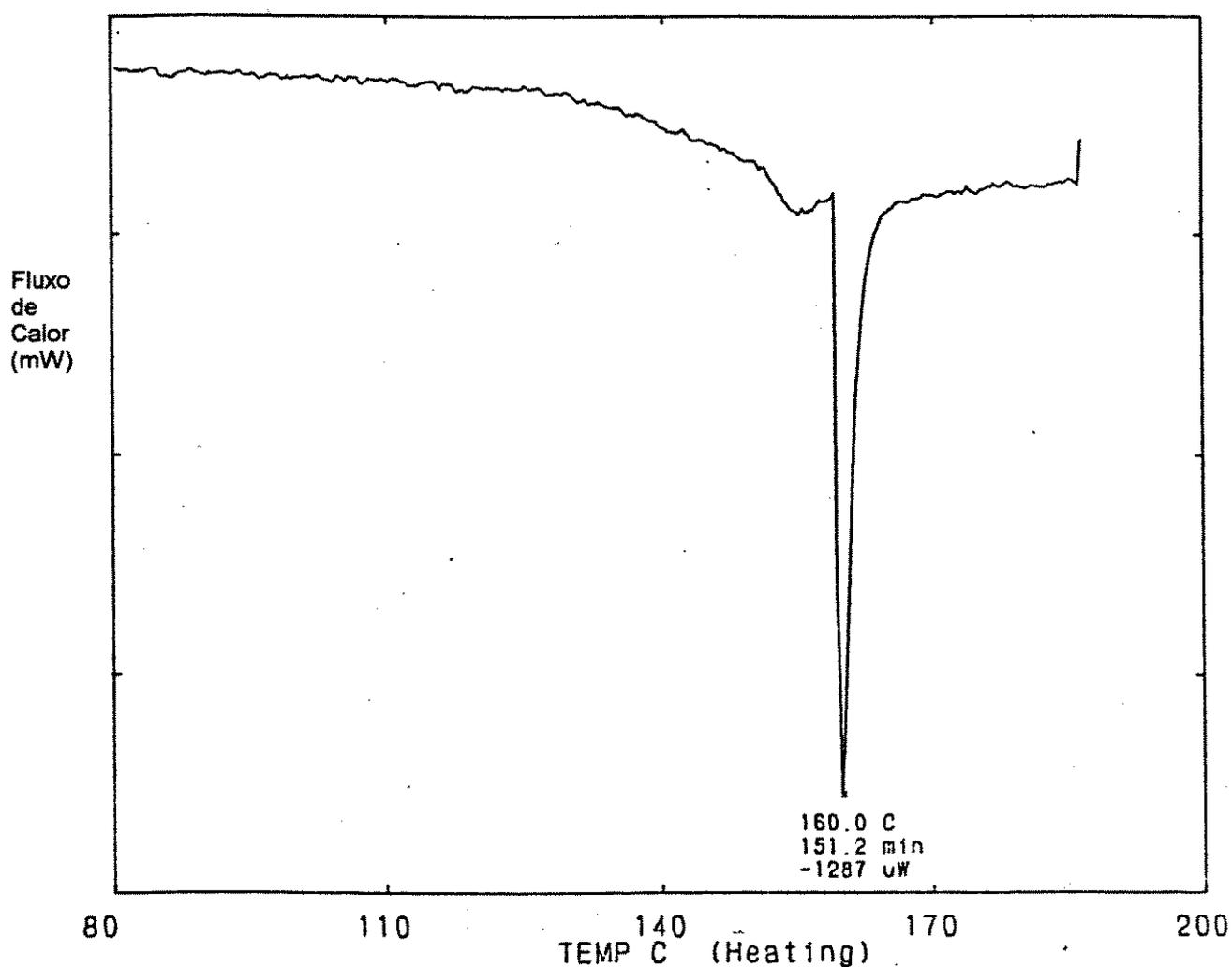


Figura 3.4.1 Termograma do complexo de inclusão β -CD/PZ, obtido via calorimetria diferencial de varredura (tempo de varredura de 5,6 horas).

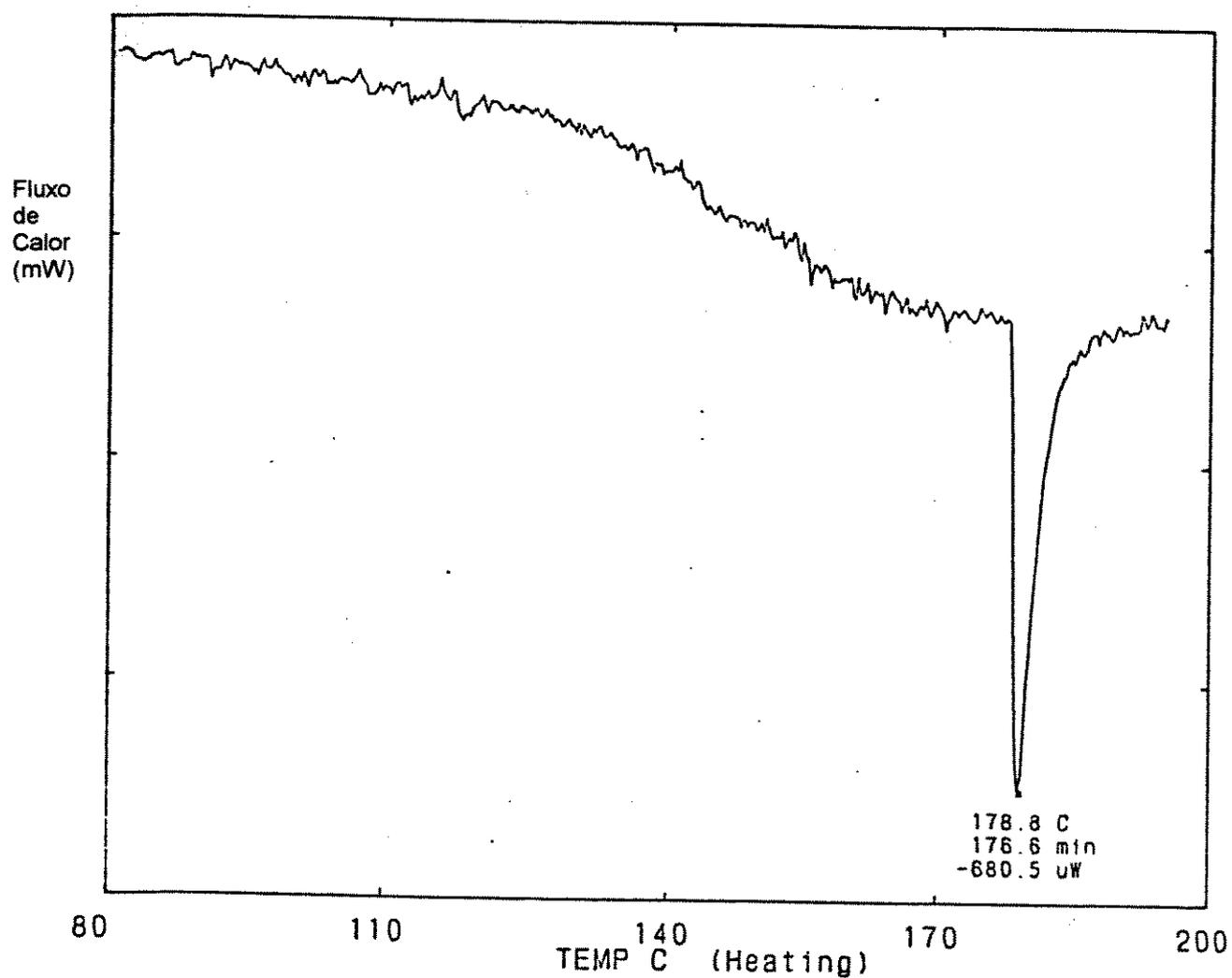


Figura 3.4.2 Termograma do complexo de inclusão β -CDHP/PZ, obtido via calorimetria diferencial de varredura (tempo de varredura de 5,6 horas).

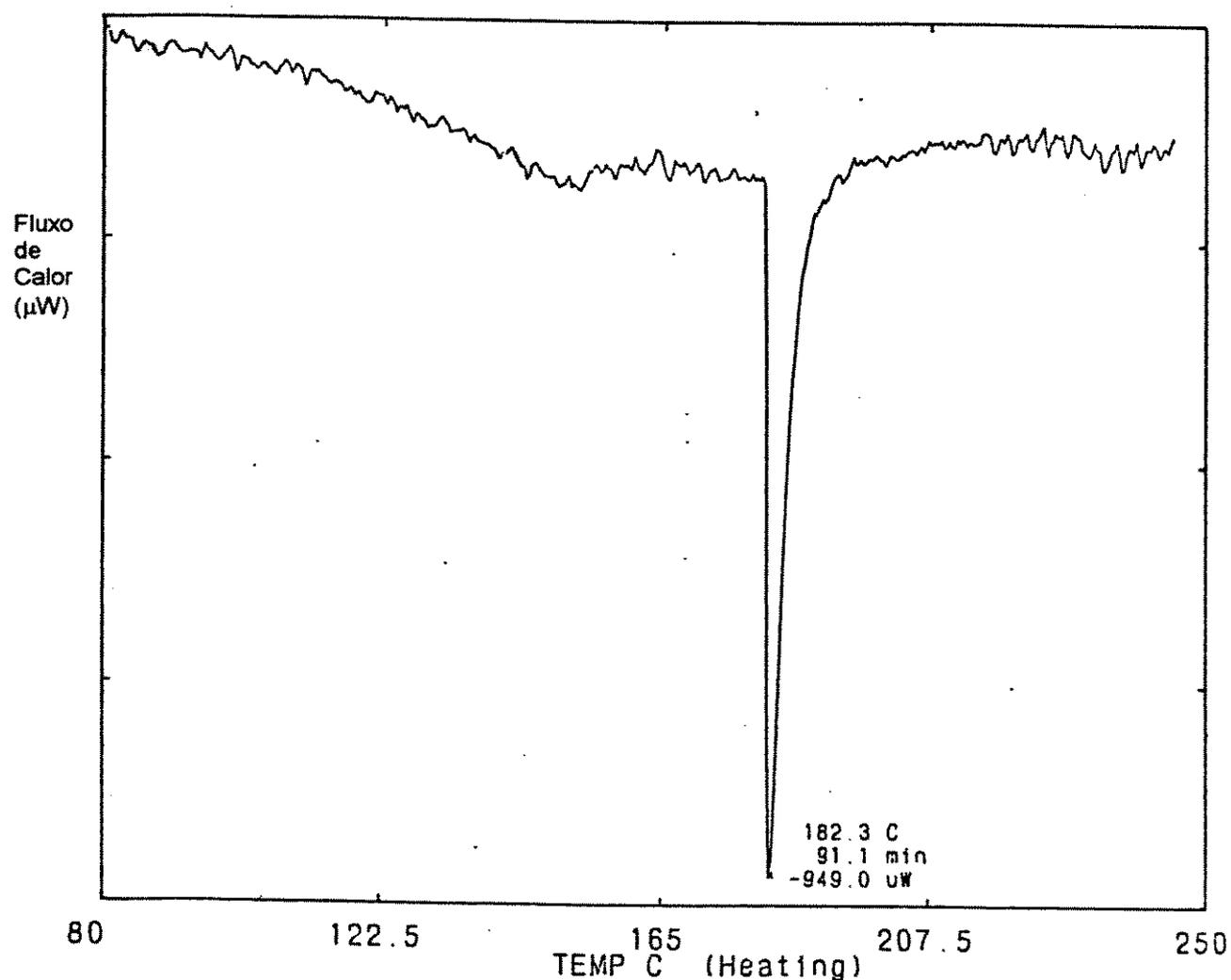


Figura 3.4.3 Termograma do complexo de inclusão γ -CD/PZ obtido via calorimetria diferencial de varredura (tempo de varredura de 5,6 horas).

A análise dos termogramas dos complexos CD/droga submetidos a um programa de temperatura não evidenciou sinais de decomposição térmica das amostras, indicando a estabilidade térmica dos mesmos.

Um teste de resistência à oxidação foi realizado com o complexo de inclusão da β -CDHP/PZ sendo submetido a condições oxidantes. Utilizou-se peróxido de hidrogênio 6% p/v, durante um período de 48 horas e, simultânea exposição a luz. O termograma do sólido obtido após liofilização esta apresentado abaixo.

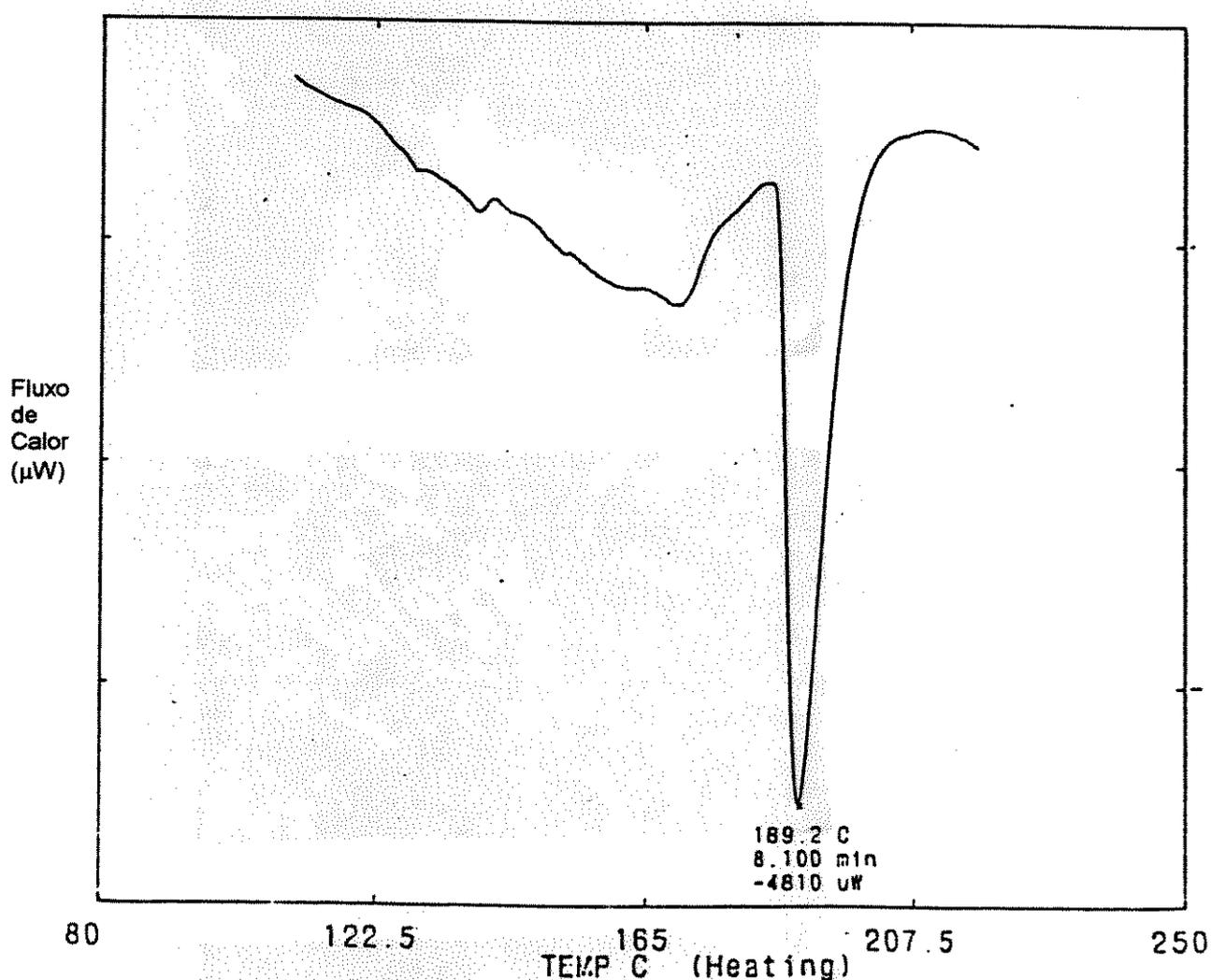


Figura 3.4.4 Termograma do complexo de inclusão da β -CDHP/PZ obtido após teste de resistência à oxidação, obtido via calorimetria diferencial de varredura.

A análise do termograma do complexo de inclusão droga / CD submetido a condições oxidantes não indicou alterações significativas.

3.5 Estudos Morfológicos via Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)

A morfologia das ciclodextrinas e dos complexos de inclusão foi estudada através da técnica de microscopia eletrônica de varredura (SEM). Além disso, esta técnica auxiliou na confirmação da inclusão no estado sólido.

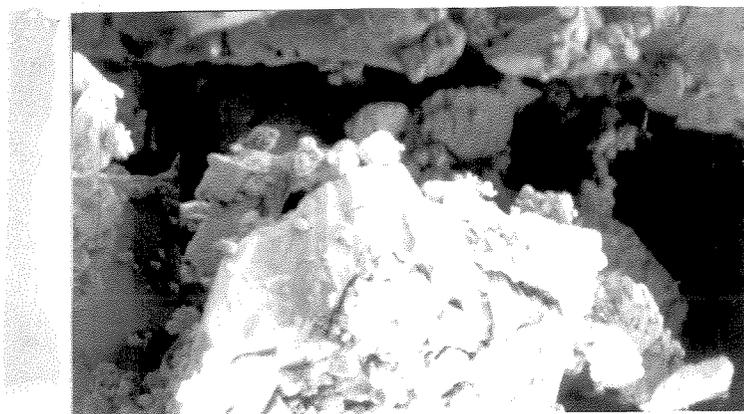


Figura 3.5.1 Micrografia eletrônica de varredura da β -CD, aumento de 500 vezes.

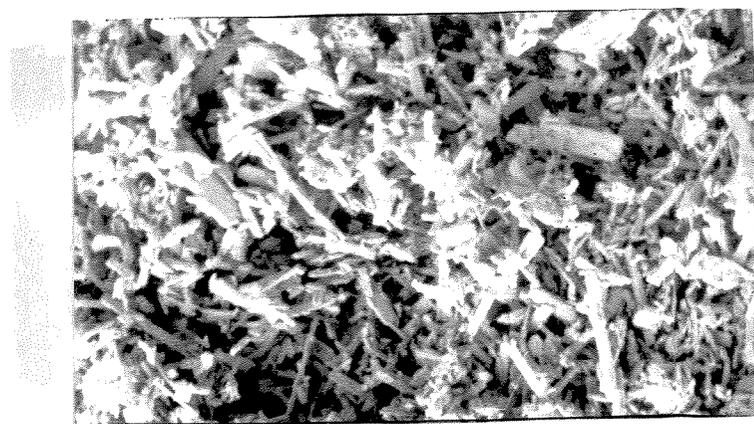


Figura 3.5.2 Micrografia eletrônica de varredura do praziquantel, aumento de 500 vezes.

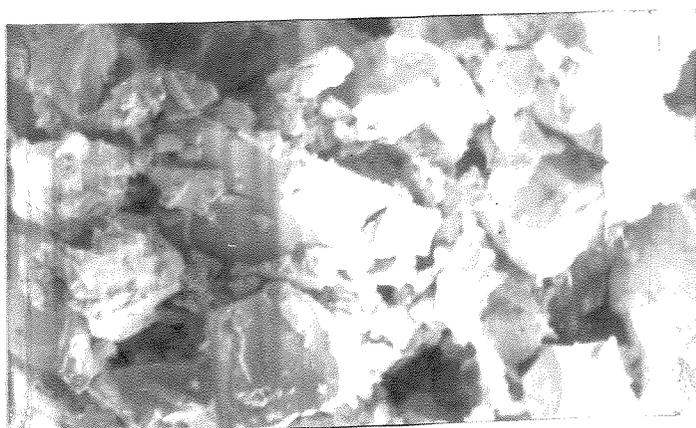


Figura 3.5.3 Micrografia eletrônica de varredura do complexo de inclusão β -ciclodextrina / praziquantel, aumento de 500 vezes.

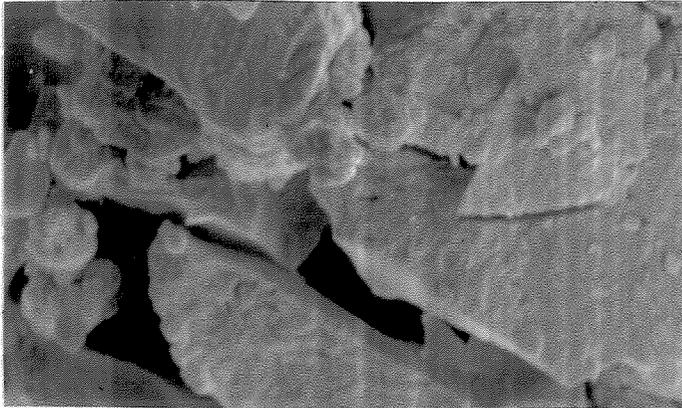


Figura 3.5.4 Micrografia eletrônica de varredura da β -CD, aumento de 2500 vezes.

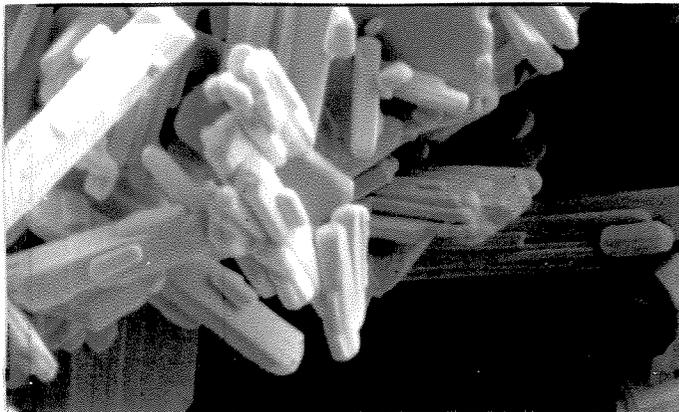


Figura 3.5.5 Micrografia eletrônica de varredura do praziquantel, aumento de 2500 vezes.

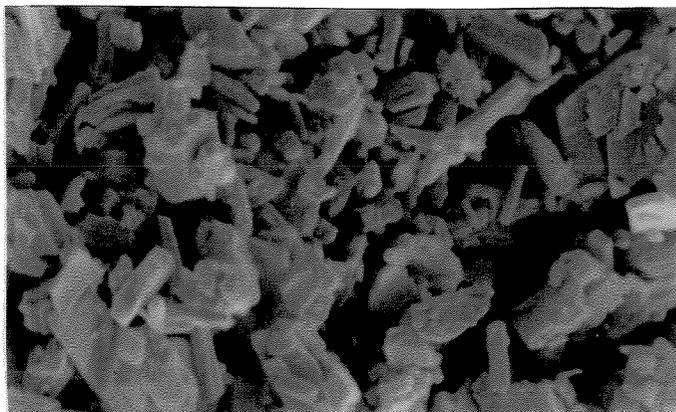


Figura 3.5.6 Micrografia eletrônica de varredura do complexo de inclusão β -ciclodextrina / praziquantel, aumento de 2500 vezes.

As micrografias eletrônicas de varredura obtidas mostram, no caso da β -CD, uma estrutura lamelar bem definida, enquanto que, para o PZ, esta apresenta uma distribuição estreita de estruturas em forma de agulhas.

No suposto complexo de inclusão, a morfologia apresenta-se muito semelhante a da ciclodextrina livre, sugerindo que a complexão da droga realmente ocorreu, uma vez que os cristais de PZ não estão visíveis.

3.6 Testes Qualitativos de Afinidade

Testes qualitativos de complexação foram conduzidos com outras duas drogas: clorambucil e cefradina, a fim de observar suas afinidades com as ciclodextrinas.

O clorambucil (Figura 3.6.1) é um agente anticâncer praticamente insolúvel em água⁽¹⁾.



Figura 3.6.1 Estrutura química do clorambucil⁽¹⁾.

O clorambucil apresentou boas características de complexação com hidroxipropil- β -ciclodextrina, confirmadas pelos termogramas obtidos por calorimetria diferencial de varredura. O pico endotérmico, próximo a 65°C, relativo ao clorambucil livre não é observado no suposto complexo de inclusão, enquanto é observado na mistura física, confirmando a presença de um complexo de inclusão verdadeiro (Figura 3.6.2 e 3).

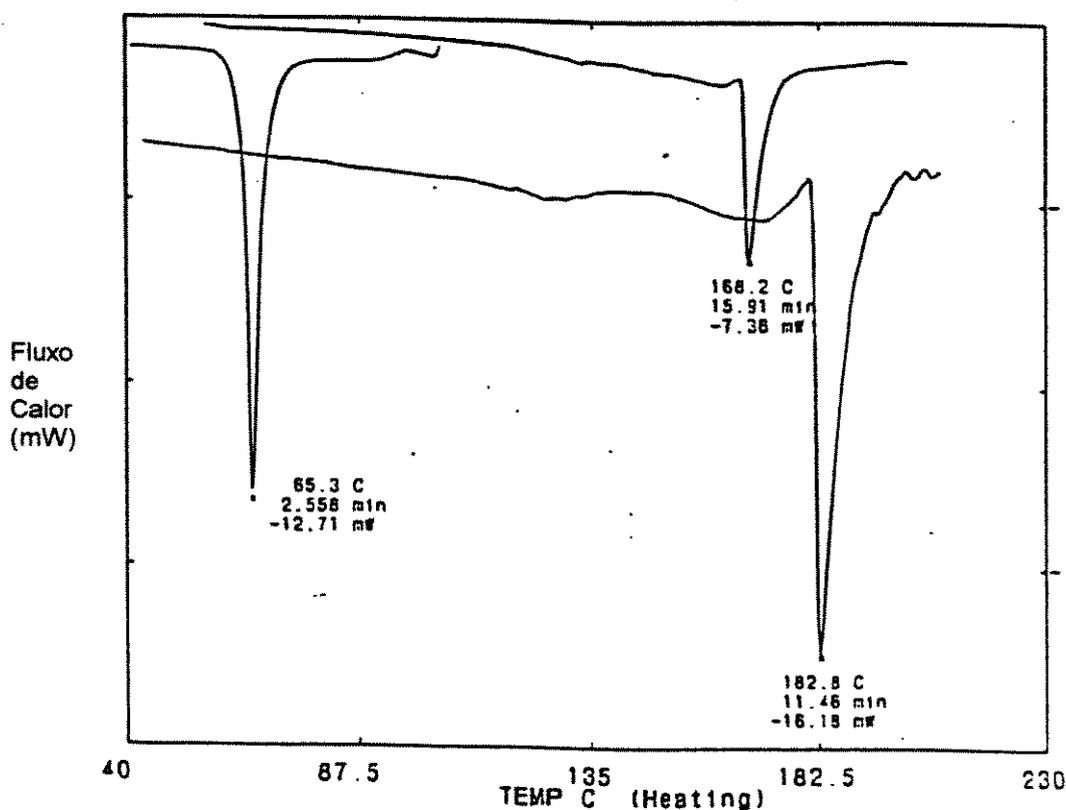


Figura 3.6.2 Termograma da β -CDHP (inferior), clorambucil (intermediário) e do complexo de inclusão (superior), obtidos via calorimetria diferencial de varredura.

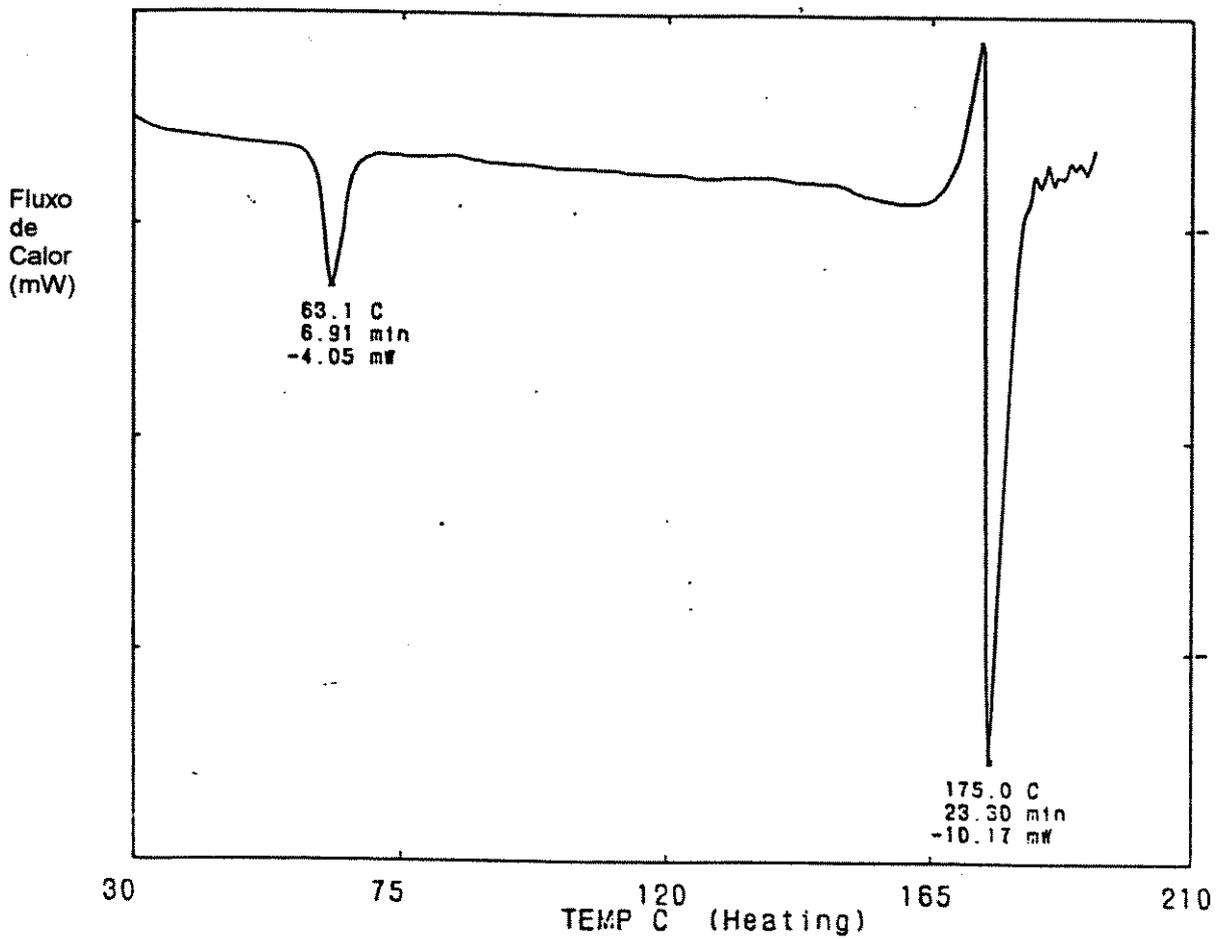


Figura 3.6.3 Termograma da mistura física de clorambucil e β -CDHP, obtidos via calorimetria diferencial de varredura.

Esta característica do clorambucil pode ser utilizada em formulações contendo o complexo de inclusão, ao invés da droga livre, aumentando, desta forma, a biodisponibilidade da droga e sua vida de prateleira (vida média de prateleira do clorambucil a 25°C é de 3 meses)

A cefradina (Figura 3.6.4) é um antibiótico semi-sintético, parcialmente solúvel em água e comercializado em muitos países em formulações para uso oral e parenteral (1).

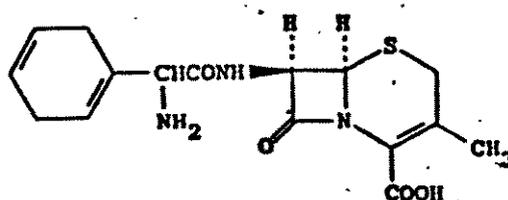


Figura 3.6.4 Estrutura química da cefradina(1).

Como pode ser observado nas Figuras 3.6.5 e 3.6.6, a cefradina mostrou que pode ser complexada tanto com a γ -ciclodextrina, como com a β -CDHP. No termograma do suposto complexo de inclusão com a γ -CD, o pico endotérmico relativo a cefradina livre, próximo a 142°C , não é observado. Já no termograma da β -CDHP, o pico endotérmico do complexo apresenta-se, largo indicando a possível presença da droga livre. Este efeito com a β -CDHP pode ser explicado por um efeito de baixa concentração de CD ou pouca afinidade com a droga.

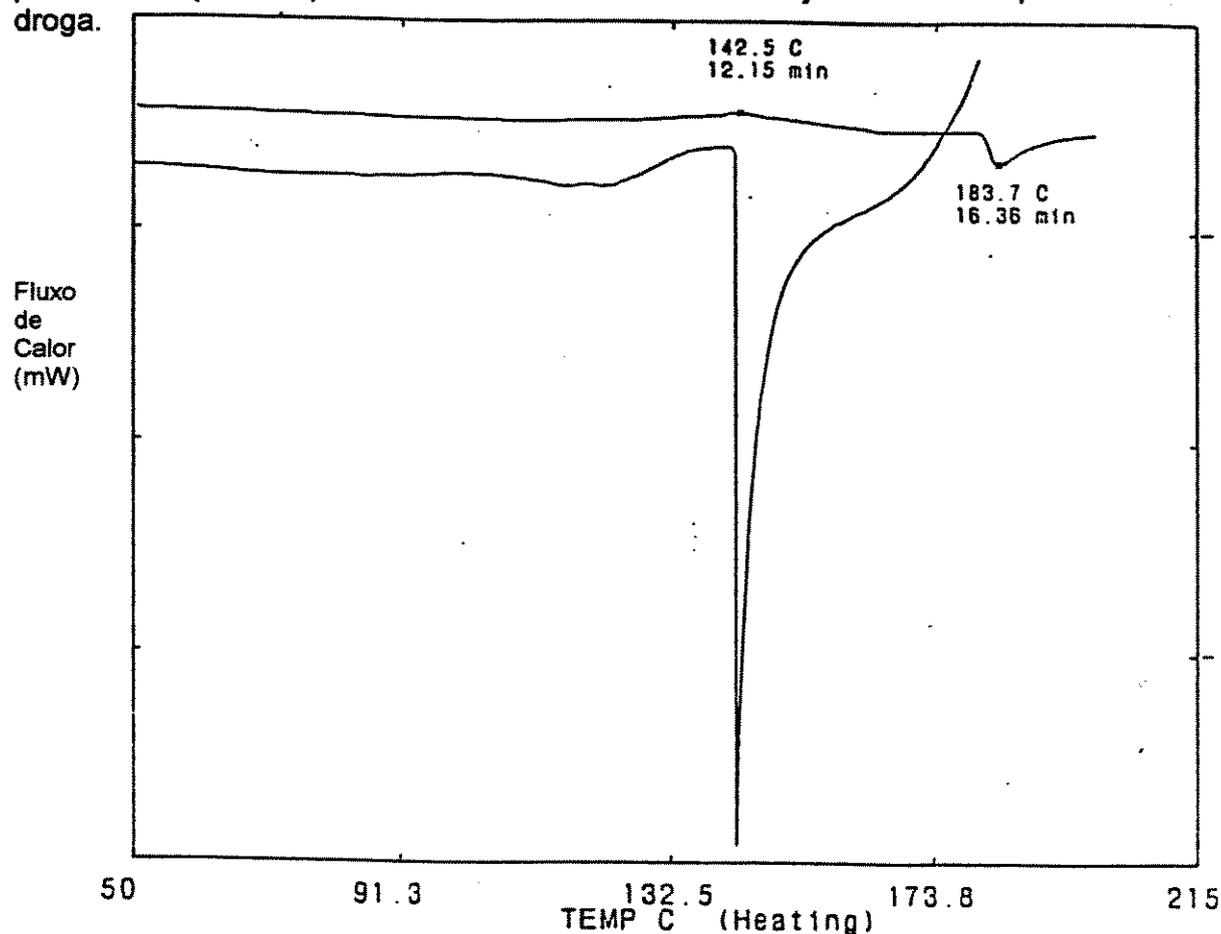


Figura 3.6.5 Termograma da cefradina (inferior) e do complexo de inclusão de cefradina com γ -CD (superior), obtido via calorimetria diferencial de varredura.

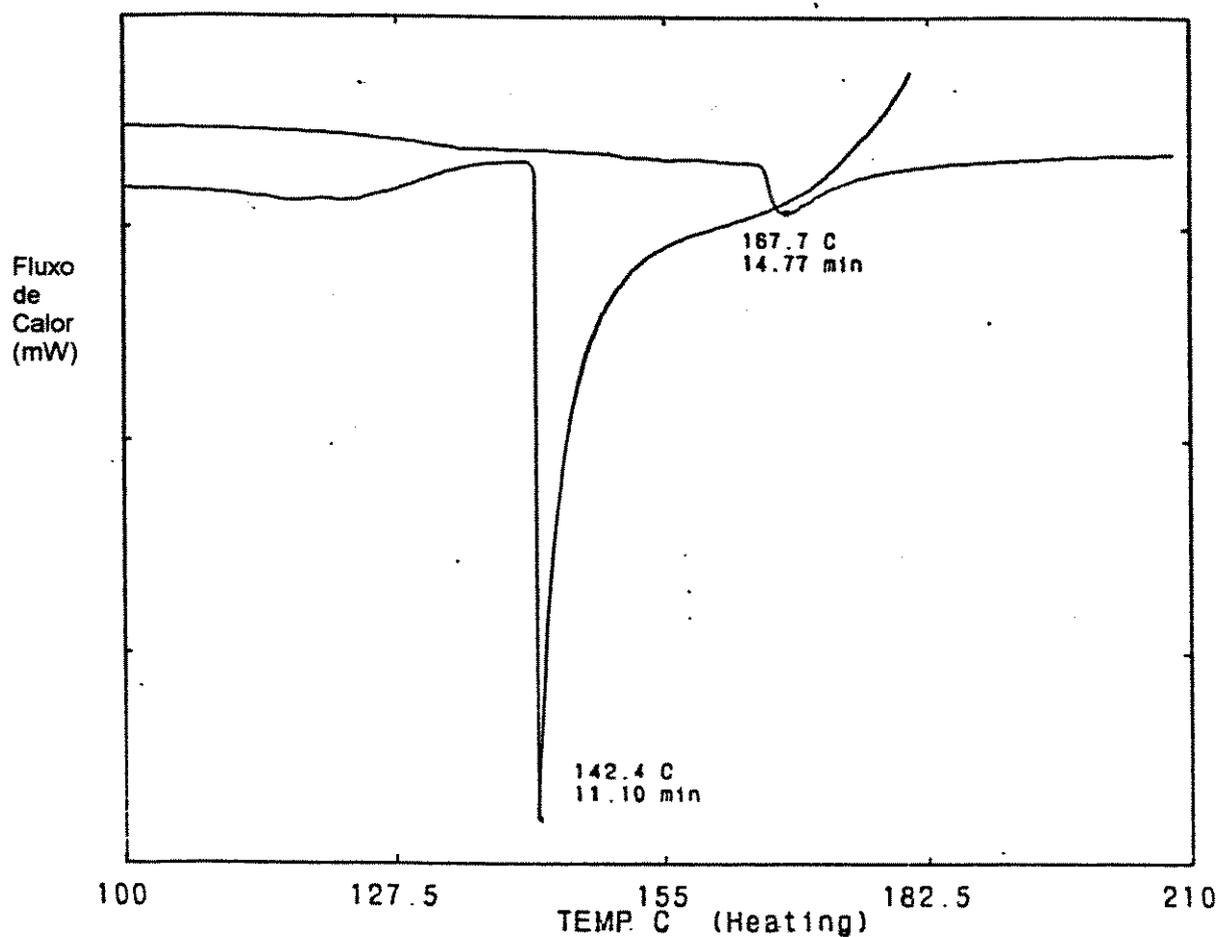


Figura 3.6.6 Termograma da cefradina (inferior) e do complexo de inclusão de cefradina com β -CDHP (superior), obtidos via calorimetria diferencial de varredura.

Este comportamento, onde a cefradina apresenta melhores características de complexação com a γ -CD em comparação com a β -CDHP, pode ser explicado, uma vez que a molécula de cefradina, sendo maior que a do clorambucil, "encaixaria" mais facilmente na cavidade maior da γ -CD.

4. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

4.1 Efeito da Complexação sobre os Diagramas de Solubilidade.

- Complexos em Solução.^(34 - 40, 60)

O conceito de formação de complexos é adotado como um dos fatores que explica o comportamento não aditivo das propriedades físicoquímicas de soluções contendo duas ou mais espécies. A partir desta hipótese, é possível utilizar medidas quantitativas destas propriedades para investigar a natureza e a extensão das interações entre as espécies presentes e/ou complexos.

O equilíbrio de solubilidade de uma determinada substância química em um solvente, a uma dada temperatura e pressão, é uma quantidade característica da substância e, portanto, pode ser utilizada como critério de pureza e identificação. Esta análise pode ser conduzida em sistemas onde existe ou não interação entre os componentes.

Técnicas convencionais de análise de dados de solubilidade requerem que as solubilidades sejam aditivas, ou seja, que a solubilidade de cada componente em uma mistura não seja influenciada pela presença do outro. Muitos sistemas não exibem este comportamento ideal e, portanto, desvios são introduzidos nas medidas. Deste ponto de vista, estas interações, responsáveis pela não aditividade das solubilidades, são fenômenos indesejáveis. A fim de fornecer subsídios para entender o comportamento de sistemas onde interações moleculares são detectadas, HIGUCHI e CONNORS⁽³⁴⁾ desenvolveram trabalhos nesta área.

Um procedimento básico adotado foi o de adicionar quantidades iguais (excesso) de um componente pouco solúvel (substrato) em frascos contendo volumes contantes de solvente e quantidades crescentes de um agente complexante solúvel neste solvente (ligante). Estes frascos foram submetidos à agitação e temperatura constante até alcançarem o equilíbrio. Após filtração do excesso de substrato, as fases obtidas foram então analisadas, a fim de checar a concentração do substrato. Um diagrama de fases foi contruído, plotando-se no eixo vertical a concentração molar total do substrato encontrada em solução, *versus* a concentração molar do ligante adicionado ao sistema. A partir dos diagramas obtidos, observou-se que eles apresentavam duas classes principais :

- Diagramas do Tipo-A, onde existe a formação de complexos solúveis.
- Diagramas do Tipo-B, onde existe a formação de complexos insolúveis.

A Figura 4.1.1 mostra um diagrama do Tipo-A, onde S_t representa a concentração molar total dissolvida do substrato e L_t a concentração molar do ligante adicionado ao sistema.

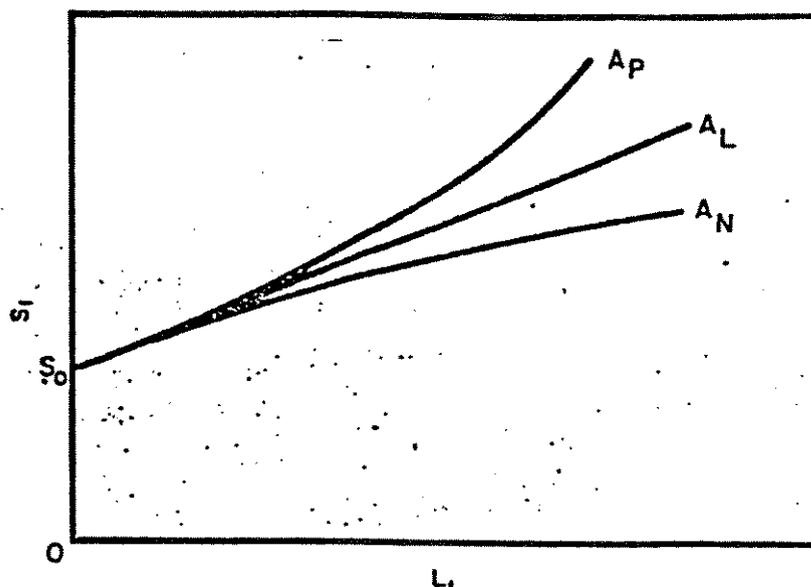


Figura 4.1.1 Digramas de solubilidade de sistemas do Tipo-A mostrando o aparente aumento de solubilidade do substrato (S) causado pela presença do ligante (L)⁽³⁴⁾.

Um aumento linear da solubilidade é representado pela curva A_L , enquanto as curvas A_P e A_N apresentam desvios positivos e negativos, respectivamente.

Neste tipo de diagrama, assume-se que o aumento de solubilidade é devido a uma ou mais interações moleculares entre S e L, formando espécies químicas distintas, chamadas de "complexos". A formação destes complexos solúveis entre S e L aumenta a concentração de S em solução. É preciso salientar que a fase sólida presente nestes sistemas é composta de S puro e, portanto, a atividade termodinâmica de S dissolvido é constante, uma vez que a fase líquida está em equilíbrio com a fase sólida.

No caso do sistema ciclodextrina / praziquantel, diagramas de solubilidade foram construídos graficando-se a concentração molar total de PZ encontrada em solução *versus* a concentração de ligante CD. Neste caso, as curvas encontradas indicaram a presença de um sistema tipo A_L , onde as inclinações positivas sugerem a formação de complexos solúveis, via processo de primeira ordem em relação ao ligante, sendo considerados processos químicos reversíveis em equilíbrio.

Algumas considerações podem ser feitas sobre a origem dos diagramas do Tipo-A:

1. Se todos os complexos formados são de primeira ordem em relação à L (SL , S_2L , S_3L , ..., S_mL), então um diagrama do Tipo-A é obtido, embora o contrário não é considerado como regra geral.
2. Se os complexos presentes forem de ordem superior à 1 em relação à L (SL_2 , SL_3 , ..., SL_n), então diagramas do tipo A_p são obtidos.

3. A origem dos diagramas do tipo A_N ainda é incerta. Eles podem ser associados com uma alteração na natureza do solvente na presença de grandes concentrações de L, conduzindo a alterações na constante de formação dos complexos. Outra possibilidade é a auto-associação de L à altas concentrações, afetando o grau de complexação.

Ocasionalmente os diagramas de solubilidade do Tipo-A podem exibir um patamar, onde um aumento na concentração de L não aumenta a concentração de S em solução. Este comportamento pode ser devido à completa solubilização de S, ou representa a saturação do meio em relação à L (Figura 4.1.2).

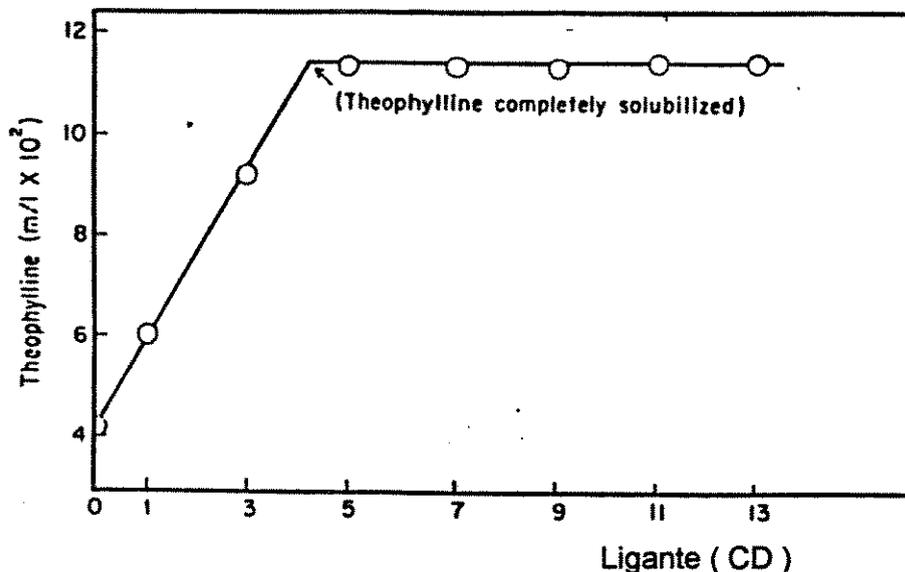


Figura 4.1.2 Diagrama do Tipo-A, ilustrando a formação de um patamar devido ao desaparecimento do substrato sólido S (teofilina)⁽³⁴⁾.

Os diagramas do Tipo-B (Figura 4.1.3) são observados quando complexos insolúveis são formados.

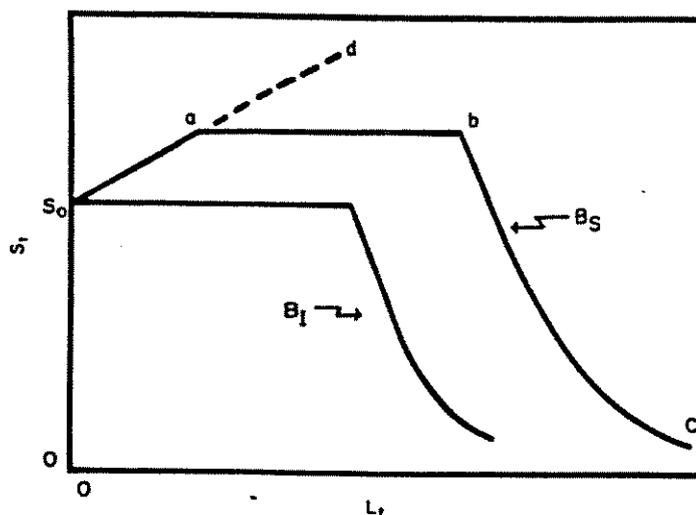


Figura 4.1.3 Diagramas de solubilidade do Tipo-B⁽³⁴⁾.

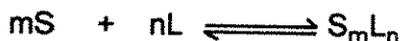
Considerando a curva B_s , a faixa de S_o até a é similar a dos diagramas do Tipo-A. No ponto a , embora a solubilidade limite do complexo seja alcançada, a adição de mais L resulta na formação de mais complexo o qual precipita. A concentração de S não-complexado é mantida constante pela dissolução de S sólido.

No ponto b , todo o sólido S foi consumido e a adição de mais S resulta na diminuição da concentração de S em solução, através da formação de complexos e da concomitante precipitação deste complexo insolúvel. O segmento tracejado $a-d$ do diagrama representa a super-saturação da solução em relação ao complexo inicialmente formado.

A curva B_L é interpretada da mesma forma, com a diferença que o complexo formado é insolúvel a tal ponto que o aumento inicial da concentração de S em solução não é detectado.

No caso do praziquantel (PZ), o aumento da solubilidade em função da concentração de ciclodextrina não apresentou desvios da linearidade e as curvas de solubilidade podem ser classificadas, segundo Higuchi e Connors, como do tipo A_L . Nestes sistemas o aumento de solubilidade é devido a interações moleculares entre PZ e CD, formando espécies químicas distintas, chamadas "complexos de inclusão".

A estabilidade destes complexos é especificada em termos da constante de estabilidade, de associação ou de formação. Em geral, se a solução contém somente um complexo, S_mL_n , a formação deste complexo pode ser expressa pela equação⁽⁴⁰⁾:



e a constante de formação deste complexo pode ser expressa por,

$$K_{mn} = \frac{[S_mL_n]}{[S]^m [L]^n} \quad (\text{Eq. 01})$$

A concentração do complexo em qualquer ponto pode ser expressa pelas equações abaixo, uma vez que a concentração de S na forma livre é mantida constante pela presença de substrato no estado sólido.

$$[S] = S_o$$

$$[S_mL_n] = (S_t - S_o) / m$$

$$[L] = L_t - n [S_mL_n] \quad (\text{Eq. 02})$$

onde S é a molécula de substrato (PZ), L a molécula de ligante (CD), S_mL_n é a fórmula geral do complexo de inclusão, S_t a concentração total formal do substrato, L_t a concentração total formal do ligante e S_o a solubilidade molar do substrato no equilíbrio, na ausência do ligante.

Considerando o caso onde $m=n=1$, então a Equação 1 para $K_{1:1}$ pode ser combinada com a Equação 2 fornecendo:

$$S_t = \frac{K_{1:1} S_o L_t}{1 + K_{1:1} S_o} + S_o \quad (\text{Eq. 03})$$

A equação 03 mostra que a curva de S_t versus L_t é uma linha reta, com intersecção S_o no eixo vertical, e a inclinação desta reta é $K_{1:1} S_o / (1 + K_{1:1} S_o)$, conduzindo à :

$$K_{1:1} = \frac{\text{inclinação}}{S_o (1 - \text{inclinação})}$$

Nestes casos, a constante de solubilidade aparente 1:1 é avaliada através das medidas de solubilidade, por meio da equação abaixo, assumindo que somente um complexo 1:1 está presente.

$$K_{1:1} = \frac{\text{inclinação}}{\text{intersecção} (1 - \text{inclinação})} \quad (\text{Eq. 04})$$

Para o caso do sistema PZ / CD, diagramas de solubilidade foram construídos (Figura 3.1.1) e a constante de solubilidade aparente calculada para cada sistema. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.3.1 e sugerem diagramas do Tipo-A para este sistema.

Tabela 4.3.1 Constante de solubilidade aparente (supondo a formação de complexos de proporção 1:1 entre CD/PZ), obtida experimentalmente, para o sistema PZ/CD.

Sistema	Valor de K (1/mol)
β -CD / PZ	101,1
β -CDHP / PZ	572,7
γ -CD / CD	1,4

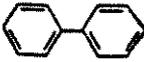
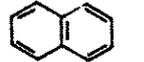
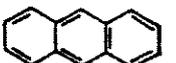
Estes valores sugerem a maior afinidade da droga com a β -CDHP, indicando que sua molécula encaixa melhor na cavidade desta ciclodextrina, formando um complexo mais estável termodinamicamente.

4.2 Pré-requisitos para a complexação

- Compatibilidade geométrica^(6,45 e 46).

As CDs são capazes de formar complexos de inclusão com compostos que possuam dimensões compatíveis com a da sua cavidade, desta forma , o fator geométrico (mais do que o químico) é decisivo na escolha de que tipo de molécula pode penetrar na cavidade da CD. A α , β e a γ -CD com diferentes diâmetros internos são capazes de acomodar moléculas com diferentes tamanhos (Tabela 4.2.2).

Tabela 4.2.2 Capacidade complexante das CDs com várias moléculas hóspede⁽⁶⁾

Composto		α -CD	β -CD	γ -CD
ácido propiônico	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-COOH}$	+	-	-
ácido butírico	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$	+	+	-
bifenila		+	+	+
ciclohexano		+	+	+
naftaleno		-	+	+
antraceno		-	-	+
cloro		+	-	-
bromo		+	+	-
iodo		+	+	+

As estruturas dos complexos de inclusão diferem significativamente em solução e no estado sólido. Em solução a molécula "hóspede" está situada dentro da cavidade da CD, ao mesmo tempo que o complexo está solvatado por moléculas do solvente. No estado cristalino, a molécula hóspede pode estar acomodada não só dentro da cavidade, mas também no espaço intermolecular formado pela rede cristalina. Além disso, algumas moléculas de CD podem estar desocupadas ou ocupadas por moléculas de água.

As substâncias inclusas são, normalmente, orientadas de forma a alcançar o contato máximo entre a parte hidrofóbica do hóspede e a cavidade apolar da CD, enquanto a parte hidrofílica permanece o mais distante possível, na parte exterior da cavidade.

A complexação com moléculas significativamente maiores que o diâmetro da cavidade também é possível pela inserção parcial de alguns grupos ou cadeias laterais da molécula dentro da cavidade do carbohidrato (Figura 4.2.1).

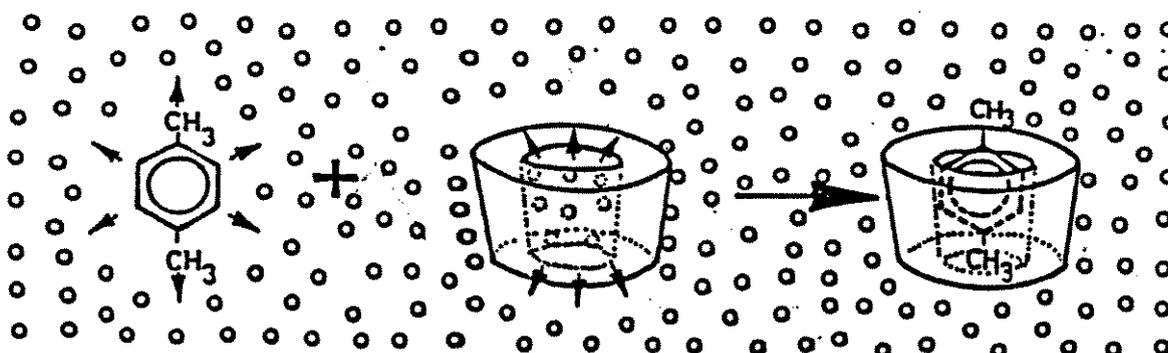


Figura 4.2.1 Representação esquemática da inclusão molecular do p-xileno pela β -ciclodextrina ("o" representam moléculas de água)⁽³⁰⁾.

Um aumento da solubilidade de substâncias pouco solúveis com o aumento da concentração de CD indica a formação de complexos de inclusão. Este efeito pode ser observado pela inclinação da isoterma de solubilidade da droga em função da concentração de CD em solução aquosa (Tabela 4.2.3). Um valor alto indica a possível complexação, enquanto um valor baixo para a inclinação é sinal da baixa interação droga-CD.

Tabela 4.2.3 Inclinações das isotermas de solubilidade em solução de β -ciclodextrina⁽⁶⁾.

Droga	Fórmula Estrutural	Declividade
antazolina		1,25
adifenina		0,68
testosterona		0,44
lidocaina		0,3
morfina		0,24
acetato de cortisona		0,15
reserpina		0,001

No caso de moléculas de morfina ou cortisona, estas não podem penetrar na cavidade da β -CD totalmente, mas sua solubilidade aumenta com o aumento da concentração de CD. Isto pode ser explicado pela presença de grupos funcionais que podem penetrar na cavidade e formar complexos estáveis. Para o acetato de cortisona e a testosterona, ambos possuem estruturas comuns portanto, afinidades semelhantes seriam esperadas com a β -CD, mas na prática o que ocorre é uma preferência pela molécula de testosterona (Tabela 4.2.3). A estrutura da testosterona apresenta a 17-hidroxila posicionada de forma relativamente livre, enquanto que para a cortisona esta hidroxila está encoberta por uma cadeia lateral. Isto comprova que a formação de um complexo é o resultado da ação de vários fatores físicos e químicos.

Para o sistema PZ / CD, as inclinações positivas das curvas de solubilidade (Tabela 4.2.4) indicam a provável formação de um complexo de inclusão 1:1. Além disso, o valor mais elevado para o sistema β -CDHP indica a maior afinidade da droga por esta CD.

Figura 4.2.4 Inclinações das isotermas de solubilidade do sistema PZ/CD, obtidos experimentalmente.

Sistema	PZ/ β -CD	PZ/ β -CDHP	PZ/ γ -CD
Valor da inclinação	0,1056	0,4113	0,0017

- Carga e polaridade^(6,45,46 e 51)

A extensão da complexação depende também da polaridade da molécula "hóspede". Moléculas fortemente hidrofílicas (muito solúveis em água), hidratadas e com presença de grupos ionizáveis são pouco ou não complexáveis, somente moléculas menos polares tendem a formar complexos de inclusão com ciclodextrinas.

A estabilidade de um complexo é proporcional ao carácter hidrofóbico dos substituintes de uma molécula, grupos metila e etila posicionados apropriadamente podem aumentar a solubilidade de uma molécula. Um grupo metila em posição orto em relação a uma carbonila exerce um efeito de blindagem na carbonila hidrofílica aumentando, desta forma, o carácter hidrofóbico da molécula.

No caso do grupo amino, é importante observar se este encontra-se na forma de base livre ou ionizado, pois as espécies iônicas são usualmente desfavoráveis para a formação de complexos de inclusão.

Forças coesivas muito intensas entre moléculas impedem sua separação, o que é uma pré-condição para a inclusão. Uma boa medida destas forças coesivas em sistemas cristalinos, é o ponto de fusão, pois valores acima de 250°C indicam que complexos estáveis com CDs não podem ser formados.

- Presença de solvente^(6,43 - 46,52)

A presença de um solvente não é condição necessária para a formação de um complexo de inclusão. A mistura de β -CD em pó com ácido salicílico leva à formação de complexos na proporção 1:1, após alguns meses, à temperatura ambiente. Este processo pode ser monitorado acompanhando-se o padrão de Raio-X. Na prática, este processo é conduzido em meio aquoso facilitando o contato entre as moléculas e tomando o processo mais rápido e reprodutivo. Geralmente, a presença de compostos orgânicos não é desejável, embora em muitos casos, seja inevitável, pois substâncias apolares pouco solúveis só são complexadas em concentrações aceitáveis na presença de solventes orgânicos. A formação de complexos de inclusão em fase sólida é termodinamicamente espontânea, enquanto sua estabilidade é maior em solução.

A magnitude dos valores de K para o sistema praziquantel/ciclodextrina, calculados à partir dos diagramas de solubilidade, é crescente na seguinte ordem: γ -CD ($1,4M^{-1}$), β -CD ($101,1M^{-1}$) e β -CDHP ($572,7M^{-1}$). Estes valores confirmam que fatores estéricos como tamanho da cavidade são críticos nestas interações, indicando que a molécula de PZ "encaixa" mais facilmente na cavidade da β -CD do que na γ -CD, onde as forças intermoleculares são muito fracas. Além disso, o aumento na solubilidade de PZ em solução aquosa indica que a complexação com ciclodextrinas realmente ocorre.

As forças envolvidas na complexação ainda são alvo de constantes publicações, investigações e controversias. Ligações hidrofóbicas entre substrato e ligante possuem a base mais sólida obtida experimentalmente, onde um aumento do poder hidrofóbico da cavidade da CD aumenta a força da ligação com o substrato, enquanto a importância das pontes de hidrogênio é muito questionada uma vez que, não é observado uma queda drástica na força da ligação substrato/CD em CDs modificadas quimicamente, incapazes de formar pontes de hidrogênio.

A hipótese de um processo termodinâmico associado a forças de van der Waals apresenta-se como uma teoria válida na elucidação do processo de complexação. Esta teoria sugere que o processo de inclusão é um processo composto que pode ser entendido termodinamicamente, onde a estabilização do complexo de inclusão pode ser avaliada como a soma das alterações na energia livre de quatro processos, assumindo que:

a) A β -CD em água inclui 6,12 moléculas de água na sua cavidade, ligadas uma as outras e a CD através de pontes de hidrogênio. Estas moléculas de água não possuem liberdade rotacional nem translacional e a saída destas moléculas de água da cavidade é o primeiro passo para a complexação. Esta etapa é acompanhada pela perda de interações de van der Waals e pontes de hidrogênio e ganho de liberdade motriz, translacional e rotação tridimensional e uma alteração na energia conformacional da CD. A liberdade vibracional das moléculas de água e dos substratos é assumido como constante.

b) A segunda etapa é a passagem das moléculas gasosas de água extrudadas para a fase líquida.

c) Um soluto apolar (substrato) é transferido da água para um estado gasoso ideal deixando uma estrutura em forma de cavidade que em seguida colapsa, redistribuindo as moléculas de água.

d) A última etapa da complexação é acompanhada pela estabilização de van der Waals e alteração na energia conformacional da ciclodextrina. Após a complexação, apenas rotação unidimensional é permitida ao complexo de inclusão e esta complexação é acompanhada por variação de entalpia e entropia (Figura 4.2.2).

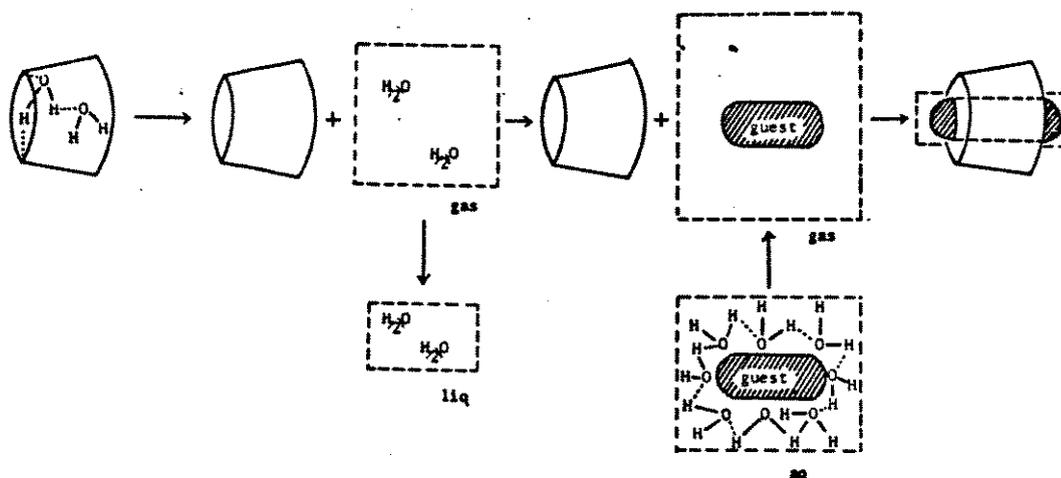


Figura 4.2.2 Representação esquemática do processo de inclusão de moléculas orgânicas por ciclodextrina em solução aquosa⁽⁴⁵⁾.

4.3 Estudos de Ressonância Magnética Nuclear de Prótons^(47 - 51,55,56,61)

Devido ao campo magnético gerado pelas estruturas aromáticas os complexos de inclusão CD/droga são particularmente suscetíveis à detecção por Ressonância Magnética Nuclear de Prótons. Esta característica foi utilizada como técnica auxiliar na determinação da presença de um complexo de inclusão verdadeiro em solução aquosa.

A β -CD possui grupos hidroxilas primários e secundários nas regiões terminais da estrutura toroidal. Os prótons H-3 e H-5 são direcionados para o interior da cavidade enquanto H-1, H-2 e H-4 estão localizados no seu exterior (Figura 4.3.1). Desta forma, é esperado que, se a inclusão realmente ocorrer os prótons localizados no interior da cavidade, (H-3 e H-5) ou próximo à ela (H-6) devam ser blindados. Alternativamente se a associação se der no exterior da estrutura toroidal, H-1, H-2 ou H-4 devem ser afetados.

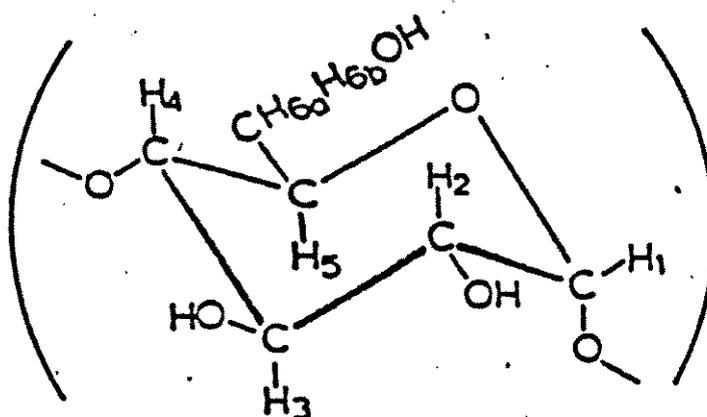


Figura 4.3.1 Estrutura da β -ciclodextrina indicando os vários prótons.

O efeito, no espectro de RMN- H^1 de alta resolução da β -CD em D_2O , pela adição de PZ é evidente. Neste espectro, o triplete em campo baixo, atribuído ao próton H-3 (em $\delta = 3,9209$, $3,9563$ e $3,9903$), é deslocado para campos mais altos na presença da droga. Além disso, o sinal de H-5, cuja multiplicidade não é diretamente observável, é deslocado da sua posição inicial ($\delta = 3,8366$) para campo mais alto ($\delta = 3,8183$). O sinal do próton H-6 ($\delta = 3,8720$), posicionado próximo à cavidade, sofre um pequeno deslocamento para campos mais altos ($\delta = 3,8611$). Os sinais restantes, H-2 e H-4 ($\delta \sim 3,6$), não sofrem deslocamentos significativos, assim como H-1 ($\delta = 5,0700$).

A estrutura química da molécula de PZ e o comportamento do deslocamento químico descrito acima sugerem que o anel aromático é a parte da molécula de PZ que está posicionada no interior da cavidade da ciclodextrina, e a nuvem aromática π é a responsável pela blindagem dos prótons (Figura 4.3.2). Além disso, o fato de que somente um sinal é observado para H-3, independente das concentrações molares de β -CD e PZ em solução indica que : a) a associação reversível entre as espécies ciclodextrina livre e associada em solução é rápida, na escala de tempo do RMN, caso contrário sinais diferentes seriam observados, b) cada vez que a molécula da droga (ou parte dela) entra na cavidade da ciclodextrina, ela assume uma orientação diferente sobre o eixo paralelo à cavidade e/ou possui rotação rápida ao redor deste eixo.

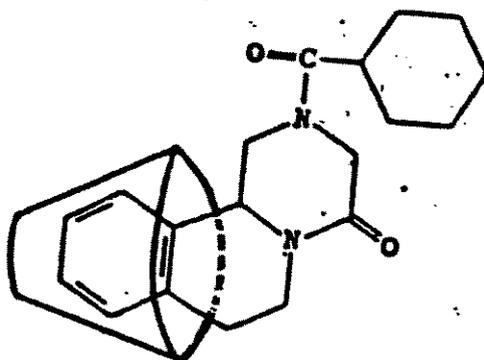


Figura 4.3.2 Provável estrutura do complexo de inclusão praziquantel / β -ciclodextrina.

O mesmo comportamento deveria ser observado com os complexos com hidroxipropil- β -ciclodextrina, mas isto tornou-se difícil devido à baixa resolução dos espectros de RMN- ^1H obtidos. A partir destes espectros só foi possível observar o deslocamento para campos mais altos do sinal referente ao próton H-6 (de $\delta= 3,8623$ para $3,8549$). Da mesma forma, o aparecimento de um sinal em $\delta= 3,8110$, atribuído ao próton H-3, confirma a presença de um complexo de inclusão verdadeiro.

Outras considerações poderiam ser feitas atribuindo o deslocamento dos sinais referentes aos prótons do interior da cavidade à efeitos de distorção da estrutura toroidal, devido à presença da droga dentro ou próxima à cavidade. Desta forma, a Ressonância Magnética Nuclear de Prótons e os estudos de solubilidade são técnicas que se completam na determinação da complexação da ciclodextrina com praziquantel.

A γ -ciclodextrina e seu complexo com PZ não apresentaram deslocamentos significativos. Este comportamento era esperado, pois a cavidade da γ -CD é grande demais para admitir a molécula de PZ inteira ou parcialmente, conduzindo à interações intermoleculares fracas entre os prótons da cavidade da CD e os prótons aromáticos do PZ.

4.4 Complexos no estado sólido^(53 e 54)

O objetivo principal nesta etapa foi o de desenvolver um processo que poderia ser utilizado para a preparação de complexos de inclusão em larga escala. Além disso, baseado na dosagem requerida, o complexo deveria fornecer, após reconstituição em água, uma concentração entre 40-45mg/ml de praziquantel. Desta forma, técnicas como kneading, coprecipitação e liofilização foram testadas em laboratório com o objetivo de fornecer complexos de inclusão.

Testes iniciais utilizando a técnica de "kneading" indicaram que este processo é inadequado para a preparação de complexos sólidos em larga escala devido à baixa reprodutibilidade desta técnica (Tabela 3.1.1). A quantidade máxima de praziquantel obtida em solução, após reconstituição em água, mostrou forte dependência de parâmetros como tempo e intensidade do processo, tornando de difícil seu uso comercial.

Utilizando o método de coprecipitação, várias proporções entre PZ e CD foram testadas para alcançar a solubilidade de PZ desejada, encontrando-se a proporção 1:10 como a ideal. É evidente pelos dados da Tabela 3.1.1, que o processo de coprecipitação fornece uma solubilidade duas vezes maior que o de kneading, embora ainda seja observada variação na solubilidade máxima de PZ alcançada em solução. Além disso, a solubilidade original do praziquantel em água (0,40 mg/ml) foi aumentada aproximadamente em 100 vezes, no caso da complexação com β -CDHP.

Parece evidente que a técnica de coprecipitação fornece um complexo sólido cuja composição é de difícil reprodução. Desta forma, este método também mostrou-se inadequado para o uso em larga escala.

Durante os estudos de liofilização, observou-se que um complexo com proporção de 1:10 de PZ e CD fornecia, após reconstituição em água, uma solução de concentração 40-45mg/ml de PZ. A liofilização de uma solução de complexo 1:10 PZ/ β -CDHP forneceu um sólido que, após reconstituição em água, forneceu 43mg/ml de PZ em solução.

A estabilidade química do complexo sólido foi monitorada durante um período de 8 semanas, via DSC, a temperatura ambiente e a 40°C, e não foi observada perda significativa de potência nas duas temperaturas conseqüentemente o processo de liofilização aparece como o que oferece maior potencial para utilização em larga escala.

Evidências que o sólido obtido após liofilização é um verdadeiro complexo de inclusão e não apenas uma mistura física foram obtidas através da análise dos termogramas dos supostos complexos de inclusão e da mistura física, assim como do estudo de suas morfologias via microscopia eletrônica.

Os termogramas dos supostos complexos de inclusão não apresentam o pico endotérmico relativo ao praziquantel (141°C) enquanto este pico é encontrado na mistura física, indicando a presença de um complexo de inclusão verdadeiro.

Os estudos da morfologia do suposto complexo de inclusão do praziquantel e da β -CD mostraram que os cristais de β -CD são bem definidos, com estruturas lamelares contendo pequenos fragmentos de cristais aderidos. A investigação da morfologia da γ -CD tomou-se difícil, pois as amostras de γ -CD apresentaram-se eletrostaticamente carregadas como consequência da irradiação eletrônica.

Os cristais de praziquantel livre apresentam uma estrutura cristalina em forma de agulhas bem definidas com uma distribuição estreita de tamanho. A análise da morfologia do complexo de inclusão PZ/CD indicou a presença de estruturas lamelares semelhantes as obtidas para a ciclodextrina livre, sugerindo que a complexação realmente ocorreu, uma vez que os cristais em forma de agulhas, característicos do PZ, não são observados.

4.5 Estudos de dissolução^(53,54 e 57)

A liberação de uma droga de uma matriz primária e sua subsequente disponibilidade no organismo é governada pela taxa de dissolução da partícula. Testes de dissolução de produtos farmacêuticos na forma de tabletes, quando conduzidos apropriadamente, asseguram a qualidade do produto final.

A dissolução é definida como o processo pelo qual o solvente penetra na estrutura sólida formando uma solução. Fundamentalmente, este processo é governado pela afinidade entre solvente e a substância sólida e a taxa de dissolução é determinada pela facilidade com que as forças coesivas solvente-soluto sobrepõem-se as forças presentes no sólido.

O esquema abaixo ilustra o processo envolvido na dissolução de dosagens sólidas.

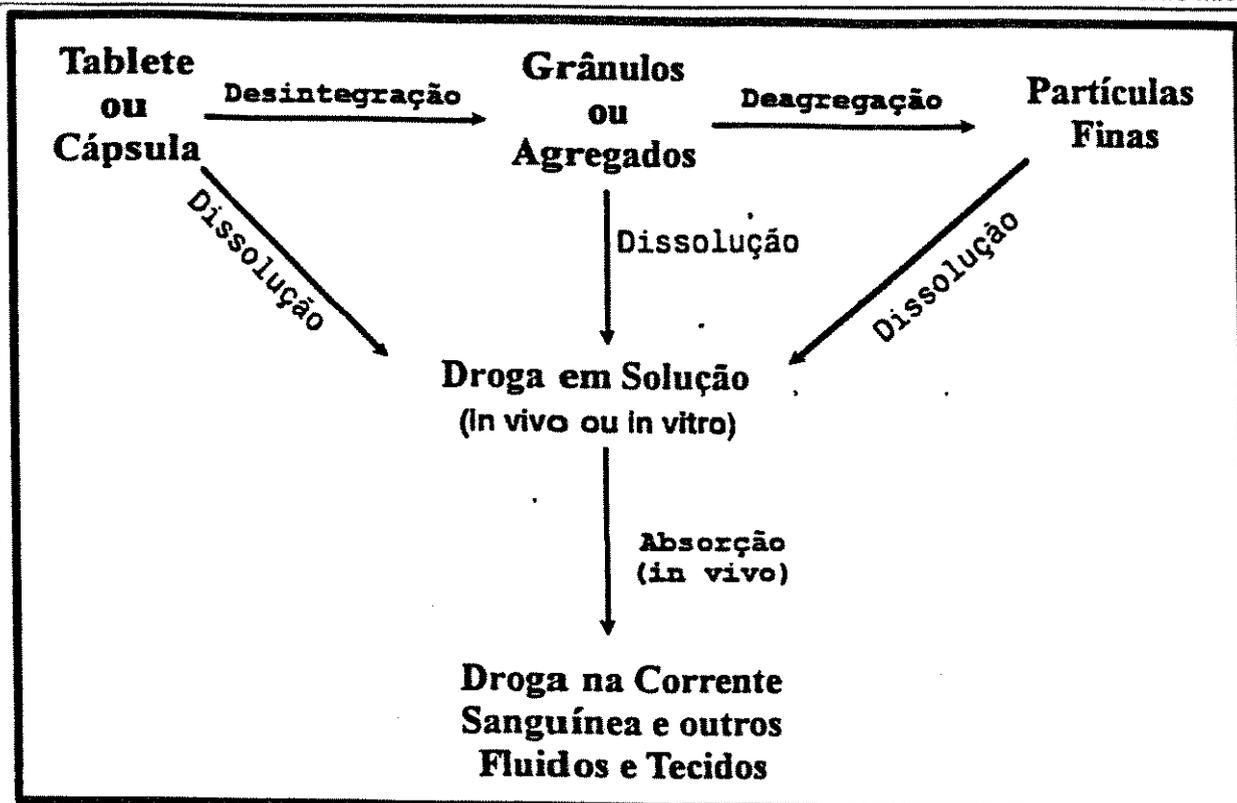


Figura 4.5.1 Representação esquemática do processo de dissolução de dosagens sólidas.

O praziquantel foi estudado como droga modelo pois, além da sua utilidade prática, possui baixa solubilidade em água (40mg/100ml a 25°C). Os perfis de dissolução a $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ foram obtidos de tabletes contendo a droga livre e o complexo de inclusão PZ/ β -CDHP, utilizando o método USP. O complexo de PZ/ β -CDHP foi escolhido para estes testes, uma vez que este apresenta uma solubilidade maior em relação ao formado entre PZ/ β -CD e PZ/ γ -CD.

Tabletes contendo 82% de complexo (16% do qual corresponde a PZ) e tabletes com 44% de PZ livre foram obtidos utilizando celulose microcristalina (MCC) como substância ligante, amido como desintegrante e estearato de magnésio como lubrificante. A composição de cada tablete está descrita na Tabela 4.5.1.

A partir das curvas de solubilidade, obtidas plotando-se a concentração de PZ em solução *versus* o tempo (Figura 3.1.2), é evidente que o tablete contendo o complexo de inclusão dissolve muito mais rapidamente do que o que contém a droga livre, provavelmente devido ao aumento na solubilidade e/ou o aumento na área superficial da droga causada pela complexação. Este aumento na solubilidade do PZ devido a complexação favorecerá uma rápida biodisponibilidade da droga no corpo.

4.6 Estudos de Estabilidade Térmica e a Oxidação

Estudos de estabilidade foram realizados submetendo-se os complexos de inclusão a condições térmicas e oxidantes.

A estabilidade térmica dos complexos foi estudada utilizando a técnica de calorimetria diferencial de varredura, onde o complexo foi submetido a um programa de temperatura de 30 a 200 °C com velocidade de varredura de 0,5°C/min, com tempo total de varredura de 5,6 horas. Nestes termogramas não se observa sinais claros de decomposição dos complexos, aparecendo apenas o pico endotérmico relativo ao complexo de inclusão.

Quanto a estabilidade a oxidação, testes foram conduzidos com o complexo de inclusão da hidroxipropil- β -ciclodextrina com praziquantel submetido a condições oxidantes em solução de peróxido de hidrogênio 6% p/v durante um período de 48 horas e simultaneamente exposto a luz natural. Nenhuma alteração significativa foi observada neste termograma, demonstrando a estabilidade deste complexo.

Desta forma, é esperado que os complexos de inclusão obtidos a partir de ciclodextrinas e praziquantel apresentem uma vida em prateleira mais longa do que a droga livre, sem apresentar alteração significativas em suas características físico-químicas.

5. Conclusão

Um estudo da inclusão molecular do praziquantel com ciclodextrinas foi realizado a fim de solucionar problemas de biodisponibilidade desta droga.

Desta forma, a primeira etapa deste trabalho constou da obtenção do complexo de inclusão utilizando os métodos mais comuns citados na literatura. A adição de PZ sobre uma solução aquosa de CD, seguida de agitação até o equilíbrio, foi o método que apresentou resultados mais reprodutivos na obtenção do complexo em solução, em termos de quantidade de droga encapsulada. Enquanto, a liofilização foi o método preferido no isolamento do complexo no estado sólido.

Obtidos os complexos, estes foram caracterizados em solução utilizando-se diagramas de solubilidade e métodos espectroscópicos. O aumento da solubilidade do PZ em solução aquosa, confirmado pelos diagramas de solubilidade, indica a inclusão molecular do PZ. Além disso, as diferentes inclinações das curvas de solubilidade mostram as diferentes afinidades da molécula de PZ pelas CDs, com preferência para a β -CDHP.

A análise dos espectros de RMN-H1 confirmou a complexação da droga pelo deslocamento para campos mais altos dos picos referentes aos prótons do interior da cavidade das CDs.

No caso dos complexos no estado sólido, a análise dos termogramas, obtidos via DSC, indica a possível complexação pelo desaparecimento do pico endotérmico, referente a droga livre, nos termogramas dos supostos complexos de inclusão.

Estudos morfológicos foram realizados utilizando-se a técnica de microscopia eletrônica de varredura, onde mudanças nas estruturas cristalinas sugerem a inclusão molecular da droga.

Perfis de dissolução e estudos de estabilidade térmica e a oxidação foram conduzidos a fim de determinar o potencial para utilização industrial destes complexos. A análise dos termogramas dos complexos expostos a condições térmicas e oxidantes não revelou sinais significativos de decomposição, indicando que estes complexos podem ser utilizados para aumentar o tempo de vida de prateleira da droga.

Os estudos de dissolução, comparando-se tabletes contendo a droga livre e complexada, confirmam que a complexação favorece uma rápida biodisponibilidade da droga.

Testes qualitativos, com outras duas drogas, foram realizados a fim de verificar suas afinidades de complexação com CDs. O clorambucil, um agente antineoplásico de cadeia linear, apresentou maior afinidade pela cavidade da β -CDHP enquanto, a cefradina, um antibiótico cefalosporânico com uma grande cadeia lateral, encaixou-se melhor na cavidade da γ -CD.

Desta forma, o objetivo inicial deste trabalho foi alcançado, uma vez que um complexo estável do praziquantel com CD foi obtido. A relevância científica deste trabalho deve-se ao fato de que estabelecidas técnicas de complexação, estas servirão para o uso das ciclodextrinas como compostos modelos, permitindo a investigação do processo de complexação de quase todos os tipos de moléculas. Além disso, este trabalho mostra potencial para novas investigações com particular ênfase na obtenção de parâmetros fisicoquímicos, como ΔG° e ΔH° de formação do complexo, a fim de melhor elucidar os mecanismos de operam durante a complexação, assim como trabalhos de verificação da biodisponibilidade da droga *in vivo*.

6. Referências

1. The Merck Index, *An Encyclopedia of Chemicals Drugs and Biologicals*, The Merck Co., 10^a Ed., nº 7609 (1983).
2. Szejtli J., *Cyclodextrin and Their Inclusion Complexes*, Akademiai Kiado, Budapeste, 368 (1982).
3. Saenger W., *Cyclodextrin Inclusion Compounds in Research and Industry*, Angew. Chem. Int. Edt. Engl., 19, 344 (1980).
4. Korpela T., et al, *Cyclodextrin: Production, Properties and Applications in Food Chemistry*, Food Biotech., 2(2), 199-200 (1988-89).
5. Pajington J. S., *β -cyclodextrin: the Success of Molecular Inclusion*, Chem. in Britain, may, 455 (1987).
6. Szejtli J., *Cyclodextrin Technology*, Kluwer Academic Publishers, 1, 8, 12, 13, 20, 34, 48 e 80 (1988).
7. Villiers A., *Cellulose Derivatives*, Compt. Rend, 112, 536 (1891).
8. Sundararajan P.R. and Rao V. S. R., *Conformational Calculation of Glucose Rings*, Carbohydrate Res., 13, 351 (1970).
9. Pulley A. O. and French D. Biochem. *Cyclodextrins Rings With more than Six Glucose Units*, Biophys. Res. Commun., 5, 11 (1961).
10. Fonseca S.F., Alves O.L., *RMN-¹³C de Complexos de Inclusão da β -ciclodextrina com ácido fenilpropílico e ácidos cinâmicos*, Química Nova, 13(1), 69 (1990).
11. Horikoshi K., *Production and Industrial Application of β -cyclodextrin*, Process Bioch., 14(5), 26 (1979).
12. Starnes R.L., *Industrial Potential of Cyclodextrin glycosyltransferases*, Cereal Foods World, 35(11), 1094 (1990).
13. Hall S. E. and Ache H. J., *Study of Forces Responsible for Binding of Polar Substrates in the Cyclohexaamilose Cavity*, J. Phys. Chem., 83 (14), 1805 (1979).
14. Bergeron R.J., *Cycloamyloses*, J Chem. Educ., 54(4), 204 (1977).
15. *Water-Soluble Complexes part I*, The Source (the latest technical and product news from Sigma Cell Culture), 7(3), 1 (1991).
16. Hirsch W. et al, *Determination of Cyclodextrin-Guest Association Constant by Competition with Indicator Dyes*, Analytical Letters, 22 (13-14) 2861 (1989).

17. Kondo H., et al, *Interaction of Cyclodextrins with Fluorescent Probes and its Application to Kinetic Studies of Amylase*, J. Biochem., 79, 393 (1976).
18. Hardee G. E. and Otagiri M., *Microcalorimetric Investigation of Pharmaceutical Complexes*, Acta Pharm. Suec., 15, 188 (1978).
19. Saenger W., Hingerty B., *Topography of Cyclodextrin Inclusion Complexes. Crystal and Molecular Structure of methanol-pentahydrate Complex*, J Am. Chem. Soc., 98, 3357 (1976).
20. Formoso C., *The Interaction of β -cyclodextrin with Dinucleoside Phosphates*, Biopolymers, 13, 909 (1974)
21. Coutel-Egros A., *Nouvelles Compositions à Base d'Imipramine*, Europ. Pat. 0 399 903, 24/05/ 1989.
22. Hódi K., et al, *Electron Microscopy Study of Products Containing β -cyclodextrin*, Starch, 41(10), 392 (1989).
23. Pitha J., *Pharmaceutical Preparations Containing Cyclodextrins Derivatives*, US Pat. 4,727,064, 29/05/1985.
24. Rees D. A., *Conformational Analysis of Polysaccharides, Par V*, J. Chem. Soc. (B), 877 (1970).
25. Komiyama M., Bender M. L., *Importance of Apolar Binding in Complex Formation of Cyclodextrin with Adamantanecarboxylate*, J. Am. Chem. Soc., 100, 2259 (1978).
26. French D., *The Schardinger Dextrins*, Adv. Carb. Chem., 12, 189 (1957).
27. Yoshida A., et al, *Utility of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin in an Intramuscular Injetable Preparation of Nimodipine*, Chem Pharm. Bull., 38(1), 176 (1990).
28. Bender H., *Production, Characterization and Application of Cyclodextrin*, Adv. Biotec. Proc., 6, 31-71 (1986).
29. Korpela T., et al, *Process for isolation and purification of cyclodextrins*, US Pat. Applic. 932721 (1990).
30. Information Bulletin RINGDEX, Cyclodextrin, Paris (1991).
31. Harata K., *The structure of cyclodextrin complex III, The cristal structure of the α -cyclodextrin sodium benzenesulfonate Complex*, Bull. Chem. Soc. Japan, 49, 2066 (1976).
32. Harata K., *The Structure of the Cyclodextrin Complex IX, The Cristal Structure of the α -CD-*m*-nitroaniline (1:1) hexahidrate Complex*, Bull. Chem. Soc. Japan, 53, 2782 (1980).
33. Hybl A., et al, *The Cristal and Molecular Structure of the cyclohexaamilose-potassium acetate Complex*, J. Am. Chem. Soc., 87(13), 2779 (1965).

34. Higushi T., Connors K. A., *Phase-Solubility Techniques*, Adv. Anal. Chem. Instrum., 4, 117 (1965).
35. Behr J. P., Lehn J. M., *Molecular Dynamics of the α -cyclodextrin Inclusion Complexes*, J. Am. Chem. Soc., 98, 1743 (1976).
36. Gelb R. I., et al, *Binding Mechanisms in Cyclohexamilose Complex*, J. Am. Chem. Soc., 103, 1750 (1981).
37. Saenger W., Cramer F., *Inclusion Compounds XIX, The Formation of Inclusion Compounds of α -Cyclodextrin in Aqueous Solution, Thermodynamics and Kinetics*, J. Am. Chem. Soc., 89(1), 14 (1967)
38. Lewis E. A., *Thermodynamics of Binding of Guest Molecules to α and β -Cyclodextrins*, J. Chem. Soc. Perkin Trans., II, 2081 (1973).
39. Rosanske T. W., Connors K. A., *Stoichiometric Model of α -Cyclodextrin Complex Formation*, J. Pharm. Sci., 69(5), 564 (1980).
40. Connors K., Mollica J. A., *Theoretical Analysis of Comparative Studies of Complex Formation*, J. Pharm. Sci., 5(8), 772 (1966).
41. Referencia 06, página 80.
42. The United States Pharmacopeia, XX Ed., 1243 (1985).
43. Wojcik J. F., *Binding to Cyclodextrin: An Interpretative Model*, Bioorgan. Chem., 12, 130 (1984).
44. Bergeron R. J., et al, *Disposition Requirements for Binding in Aqueous Solution of Polar Substrats in the Cyclodextrin Cavity*, J. Am. Chem. Soc., 99(15), 5146 (1977).
45. Tabushi I., et al, *Approach to the Aspects of Driving Force of Inclusion in α -Cyclodextrin*, J. Am. Chem. Soc., 100(3), 916 (1978).
46. Saenger W., et al, *Induced Fit-Type Complex Formation of the Model Enzyme with α -Cyclodextrin*, Bioorgan. Chem., 5, 187 (1976).
47. Demarco P. V., et al, *Cycloheptaamilose Inclusion Complex. A Proton Magnetic Resonance Study*, Chem Commun. pag. 02 (1970).
48. Wood D. J., *$^1\text{H-NMR}$ Study of the Inclusion of Aromatic Molecules in Cyclodextrin*, J. Am. Soc., 99(6), 1735 (1977).
49. Djedaine F., Pery B., *Anthraquinone Sulphonate as a General Purpose Shift Reagent for the NMR Analysis of Cyclodextrins*, Magn. Reson. Chem., 28, 372 (1990).

50. Gelb R. I., et al, *Complexation of 4-biphenylcarboxilate by Cyclohexaamilose. A Conductometric and ^{13}C -NMR Spectrometric Analysis*. J. Am. Chem. Soc., 100(11), 3553 (1978).
51. Bergeron R. J., et al, *Dependence of Cycloamilose-Substrate Binding on Charge*, J. Am. Chem. Soc., 100(9), 2878 (1978).
52. Bergeron R. J., et al, *Thermodynamics of Cycloamylose Substrate Complexation*, Bioorg. Chem., 7, 263 (1978).
53. Otagiri M., et al, *Inclusion Complex Formation of the Antiinflammatory Drug Flurbiprofen With Cyclodextrin in Aqueous Solution and in Solid State.*, Acta Pharm. Suec., 20, 11 (1983).
54. Kurozumi M., et al, *Inclusion Compounds of non-Steroidal Antiinflammatory and other Slightly Water Soluble Drugs with α and β -cyclodextrin in Powdered Form*, Chem. Pharm. Bull., 23(12), 3062 (1975).
55. Regiani M., et al, *Hydrogen Bonding and Conformation of glucose and polyglucoses in dimethyl-sulphoxide Solution*, Tetrahedron, 22, 3061 (1966).
56. Green A. R., et al, *Physical Properties of the Complex Formed Between heptakis-(2,6-di-O-methyl)- β -cyclodextrin and chlorambucil*, J. Pharm. Sci., 80(2), 186 (1991).
57. Pitha J., et al, *Hydroxypropyl- β -cyclodextrin: Preparation and Characterization; Effects on Solubility of Drugs*, Inter. J. Pharm., 29, 73 (1986).
58. JANSSEN Biotech. N. V., *Drug Delivery System Information Report* (1990).
59. Szejtly J., *Highly Soluble β -cyclodextrin Derivatives*, Starch, 36(12), 429 (1984).
60. Toan T., *Solid Consumer Product Composition Containing Small Particle cyclodextrin Complex*, European Patent Appl. 0392 608.
61. Thakkar A. L., et al, *Cycloheptaamilose Inclusion Complex of Barbiturates: Correlation Between Proton Magnetic Resonance and Solubility Studies*, J. Pharm. Sci., 60(4), 652 (1974).

