UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Obtenção e caracterização de complexos binários e ternários
de sinvastatina e ciclodextrinas

Andrea Ikeda Takahashi

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Assoc. Humberto Gomes Ferraz

São Paulo
2009

Andrea Ikeda Takahashi

Obtenção e caracterização de complexos binários e ternários de
sinvastatina e ciclodextrinas

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Aos meus pais, responsáveis por toda minha educação
e construção do meu conhecimento.
Obrigada pelo apoio e confiança.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz pela oportunidade de fazer o mestrado e orientação.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas pela minha formação.

Ao Prof. Dr. Carlos Paiva e suas alunas Selma e Simone pelas análises de difração de raios-X, interpretação dos resultados e explicações.

À Profa. Dra. Elizabeth Ferreira pela disponibilização do laboratório de modelagem molecular e à pós-doutoranda Kerly Pasqualoto pelas dinâmicas e toda a paciência para explicar tudo sobre a técnica e tirar minhas inúmeras dúvidas.

Aos professores do laboratório Profa. Dra. Vladi Consiglieri, Profa. Dra. Cristina Serra, Profa. Dra. Valéria Velasco, Profa. Dra. Valentina Porta, Profa. Dra. Silvia Storpirts e Prof. Dr. André Baby pelo apoio.

Aos funcionários da faculdade Elizabeth Paiva, Jorge Lima e Elaine Ychico pela dedicação.

Aos colegas do grupo Profa. Dra. Letícia Rodrigues, Patrícia Rivas, Michele Issa, Tércio Martins, Janisse Miranda, George Gualberto, Ana Lúcia Nobusa, Ana Paula Zerbini, Helder de Oliveira, Arthur Lopes Jr. e Roxana Roque pelas valiosas sugestões, por compartilharem o conhecimento, me ajudarem nos momentos difíceis e pela amizade.

Aos estagiários Camila Diaz, Letícia Pessole, Leandro Giorgetti, Patrícia Bosomba, Silmara Macena e Fagner Magalhães por sempre estarem por perto dispostos a ajudar com o que fosse necessário e especialmente para Leilane Oshiro pela contribuição na realização deste trabalho.

À Claudinéia Pinto por todo incentivo e amizade.

Aos colegas do laboratório Marcelo Duque, Rogério Kreidel, Marina de Freitas, André Dezzani, José Eduardo Gonçalves pela convivência, apoio e amizade.

Às minhas amigas do escotismo Ligia e Vivi e do colégio Camila, Bru, Ju, Cris, Kelly e Marisa que mesmo longe, tenho certeza que sempre ficaram torcendo para que tudo desse certo.

Às minhas amigas da faculdade Mitie, Nami e Rê por todas as alegrias durante todos esses anos e por sempre me encorajarem a seguir em frente.

Ao Marcio, que com muito carinho e compreensão, desde o início sempre esteve ao meu lado me incentivando e me apoiando a fazer esse trabalho.

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi obter complexos binários e ternários de sinvastatina (SNV) e ciclodextrinas (CDs) utilizando diferentes tipos de CDs, métodos de secagem e polímeros para selecionar aquele que proporcionam um maior aumento da solubilidade aquosa do fármaco. Inicialmente complexos com diferentes CDs, α , β , γ , e hidroxipropil- β (HP β CD) foram obtidos através da secagem em estufa. Foram empregados os seguintes ensaios para sua caracterização: solubilidade, DSC, TG e difração de raios – X. Adicionalmente, foi realizada a modelagem molecular com simulações de dinâmica molecular. O complexo com γ CD parece ser o mais adequado para a complexação com a SNV, pois, foi o mais estável (menor energia) na modelagem molecular, além de ter apresentado uma nova fase sólida na difração de raios – X. Complexos de SNV, γ CD ou HP β CD foram obtidos por diferentes métodos de secagem (estufa com circulação forçada de ar, coevaporação, liofilização e estufa a vácuo) e a caracterização foi realizada através da solubilidade, DSC, TG e difração de raios – X. Todos os complexos melhoraram a solubilidade da SNV, mas quando comparados às respectivas misturas físicas, o ganho foi baixo. As curvas DSC e a difração de raios – X indicam que, no máximo, pode ter ocorrido uma complexação parcial em alguns casos. O que se verifica é que mesmo o complexo que apresentou maior ganho de solubilidade (HP β CD obtido pela coevaporação), a complexação do não foi total. Complexos ternários de SNV, β CD e diferentes polímeros (polietilenoglicol 1500, polietilenoglicol 4000, povidona, copovidona, crospovidona, maltodextrina e hidroxipropil-metil-celulose) foram preparados utilizando-se a coevaporação. A caracterização dos complexos foi realizada através da solubilidade, DSC e TG. Para todos os complexos houve ganho de solubilidade, mas apenas quando foi utilizado a crospovidona e a maltodextrina, existe diferença significativa entre a solubilidade observada para a mistura física e aquela registrada para o complexo. As curvas DSC indicam que ainda existe fármaco na forma livre até mesmo nos complexos que apresentaram maior solubilidade, dessa forma, nenhum dos polímeros utilizados foi capaz de promover uma complexação total da SNV.

Palavras Chave: Ciclodextrina, sinvastatina, complexos binários, complexos ternários, caracterização de complexos de inclusão.

ABSTRACT

The purpose of this study was to obtain binary and ternary complexes of simvastatin (SV) and cyclodextrins (CDs) using different types of CDs, drying methods and polymers, to select those that offer greater increase in aqueous solubility of the drug. Initially, different complexes with CDs, α , β , γ , and hydroxy-propyl- β (HP β CD), were obtained using oven drying. The following tests were performed for complexes' characterization: solubility, DSC, TG and X-ray diffraction. Additionally, molecular modeling was performed with molecular dynamics simulations. The complex with γ CD seems to be the most suitable for complexation with the SV, since it has been the most stable (lowest energy) in molecular modeling, and has presented a new solid phase in X-ray diffraction. Complex of SV, γ CD or HP β CD were obtained by different drying methods (forced air circulation oven, co-evaporation, freeze drying and vacuum oven) and the characterization was performed by solubility, DSC, TG and X-ray diffraction. All the complexes improved the solubility of SV, but when compared to their physical mixtures, the gain is low. The DSC curves and X-ray diffraction indicates that, at most, a partial complexation may have happened in some cases. It was verified that even the complex that had greater increase in solubility (HP β CD obtained by co-evaporation), the complexation was not total. Ternary complexes of SV, β CD and different polymers (polyethyleneglycol 1500, polyethyleneglycol 4000, povidone, copovidone, crospovidone, maltodextrin and hydroxypropyl-methyl-cellulose) were prepared using the co-evaporation. The characterization of the complexes was performed by solubility, DSC and TG. For all complexes there was a gain of solubility, but only when crospovidone and maltodextrin were used, there was a significant difference between the solubility observed for the physical mixture and the complex. The DSC curves indicate that non complexed drug is still present, even in the complexes that had higher solubility. Thus, none of the polymers was able to promote a total complexation of SV.

Keywords: Cyclodextrin, simvastatin, binary complexes, ternary complexes, characterization of inclusion complexes.

SUMÁRIO

Capítulo 1 - Caracterização de complexos de inclusão com ciclodextrinas.....	10
Resumo.....	11
1. Introdução.....	12
2. Métodos de caracterização e identificação dos complexos de inclusão.....	13
2.1. Solubilidade de fases.....	13
2.2. Análise térmica.....	18
2.2.1. Calorimetria Exploratória de Varredura	18
2.2.2. Termogravimetria.....	22
2.3. Difração de raios-X.....	24
2.4. Espectroscopia no infra vermelho.....	30
2.5. Ressonância Magnética Nuclear.....	34
2.6. Dissolução.....	37
2.7. Microscopia eletrônica de varredura.....	40
3. Comparação entre os métodos empregados na caracterização de complexos fármaco-CDs.....	41
4. Conclusão.....	43
5. Referências bibliográficas.....	43
 Capítulo 2 - Obtenção e caracterização de complexos binários de sinvastatina e ciclodextrinas.....	 54
Resumo.....	55
1. Introdução.....	56
2. Material e Métodos.....	57
2.1. Preparo dos complexos.....	57
2.2. Caracterização dos complexos.....	58
2.2.1. Solubilidade em água.....	58
2.2.2. Calorimetria exploratória diferencial.....	58
2.2.3. Análise termogravimétrica.....	58
2.2.4. Difração de raios-X.....	58
2.2.5. Modelagem molecular.....	59
3. Resultados e Discussão.....	60
4. Conclusão.....	68
5. Referências Bibliográficas.....	68

Capítulo 3 - Caracterização de complexos binários de sinvastatina-γCD e sinvastatina-HPβCD obtidos por diferentes processos.....	70
Resumo.....	71
1. Introdução.....	72
2. Material e Métodos.....	73
2.1. Preparo dos complexos.....	73
2.2. Caracterização dos complexos.....	74
2.2.1. Solubilidade.....	74
2.2.2. Calorimetria exploratória diferencial.....	74
2.2.3. Análise termogravimétrica.....	75
2.2.4. Difração de raios – X.....	75
3. Resultados e Discussão.....	75
4. Conclusão.....	84
5. Agradecimentos.....	84
6. Referências Bibliográficas.....	84

Capítulo 4 - Obtenção e caracterização de complexos ternários sinvastatina-ciclodextrina-polímeros hidrossolúveis.....	87
Resumo.....	88
1. Introdução.....	89
2. Material e Métodos.....	90
2.1. Preparo dos complexos.....	90
2.2. Caracterização dos complexos.....	91
2.2.1. Solubilidade.....	91
2.2.2. Calorimetria exploratória diferencial.....	91
2.2.3. Análise termogravimétrica.....	91
3. Resultados e Discussão.....	92
4. Conclusão.....	98
5. Referências Bibliográficas.....	98

Capítulo 1

Caracterização de complexos de inclusão com ciclodextrinas

Resumo

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos que possuem a cavidade hidrofóbica e a superfície hidrofílica. Essas características permitem o aumento da solubilidade de moléculas lipofílicas através da formação de complexos de inclusão. A caracterização do complexo fármaco-ciclodextrina não é tarefa fácil e um conjunto de técnicas analíticas é necessário para explorar diferentes características do fármaco isolado, da ciclodextrina e do complexo obtido. Dentre estas técnicas destacam-se o diagrama de solubilidade de fases, calorimetria exploratória diferencial, termogravimetria, difração de raios-X, espectroscopia no infra vermelho, ressonância magnética nuclear, dissolução e microscopia eletrônica de varredura.

1. Introdução

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos cuja estrutura é formada geralmente por seis (α CD), sete (β CD) ou oito (γ CD) unidades de glicose, dispostas de maneira que a molécula assuma forma de um cilindro oco com as extremidades abertas. A cavidade das CDs possui caráter hidrofóbico, enquanto a superfície tem caráter hidrofílico. Essa propriedade permite que a solubilidade de moléculas hospedeiras hidrofóbicas seja aumentada através da formação de complexos de inclusão (VEIGA; PECORELLI; RIBEIRO, 2006).

Quando uma molécula hóspede (fármaco), de natureza apolar, ocupa o lugar da água, o sistema torna-se energeticamente mais favorável e, portanto, mais estável do ponto de vista termodinâmico, formando ligações do tipo não covalentes. Fatores como tamanho, geometria e polaridade da estrutura a ser encapsulada são decisivos para a obtenção dos complexos (VALLE, 2004).

Por outro lado, o tipo de CD, o pH do meio, a temperatura, o método de preparo dos complexos, além da adição de polímeros e pareadores iônicos são também fatores de grande importância na complexação de fármacos com CDs (CHALLA, et al., 2005).

As CDs, além de aumentarem a solubilidade em água de moléculas hidrófobas, podem ser utilizadas para mascarar sabor e odor desagradáveis, fixar substâncias voláteis, proteger substâncias sensíveis à luz ou oxigênio, transformar substâncias líquidas em pós, mascarar pigmentos ou cores de substâncias, diminuir a irritação gástrica ou ocular e prevenir interações entre substâncias. Suas aplicações vêm sendo difundidas nas indústrias farmacêutica, cosmética, agrícola e alimentícia (VALLE, 2004; VEIGA; PECORELLI; RIBEIRO, 2006).

A α CD e a γ CD são absorvidas em quantidades muito pequenas quando administrada pela via oral e excretadas através da urina sem sofrer modificações. Estudos mostraram que a β CD pode ser administrada por via oral até 0,8 g/Kg/dia em ratos e 2 g/Kg/dia em cães, porém, quando administrada pela via parenteral, apresenta nefrotoxicidade e hemólise. Em humanos a dose diária aceitável é de 1,4 g para a α CD, 0,35 g para a β CD e 10 g para a γ CD. A hidroxipropil- β CD (HP β CD) é considerada não tóxica em doses baixas e moderadas, sendo encontrada no mercado em medicamentos administrados por via oral em quantidades maiores que 8 mg/dia e 16 mg/dia através da via endovenosa. (BREWSTER; LOFTSSON, 2007).

Para avaliar a formação de complexos de inclusão com as CDs, muitas vezes é necessário utilizar um conjunto de técnicas que evidenciam a complexação. As técnicas mais utilizadas atualmente são a construção do diagrama de solubilidade de fases, análise térmica, difração de raios-X, espectroscopia no infravermelho, ressonância magnética nuclear, dissolução e microscopia eletrônica de varredura.

Como não existem trabalhos que sistematizam as técnicas comumente empregadas na avaliação de complexos fármaco-CDs, o objetivo dessa revisão é abordar as ferramentas analíticas mais utilizadas para caracterizar tais complexos.

2. Métodos de caracterização e identificação dos complexos de inclusão

2.1. Solubilidade de fases

O diagrama de solubilidade de fases é uma das ferramentas mais utilizadas na caracterização de complexos de inclusão com CDs, sendo obtido através de resultados de solubilidade da molécula hóspede em soluções com concentrações crescentes de CDs (VEIGA; PECORELLI; RIBEIRO, 2006).

Conforme o modelo proposto por Higuchi e Connors (1965), os diagramas podem ser do tipo A, quando a solubilidade da molécula hóspede aumenta conforme o aumento da concentração de CD, indicando a formação de complexos solúveis, ou do tipo B, quando o complexo formado é insolúvel e a concentração da molécula hóspede diminui com o aumento da concentração de CD (Figura 1.1).

Os diagramas do tipo A podem, ainda, serem classificados como AL (linear), quando são representados por uma reta; AN (negativo) quando após uma determinada concentração há tendência de queda; e AP (positivo) quando se forma uma reta ascendente que após uma determinada concentração, apresenta um declive mais acentuado.

Nos diagramas AL, o aumento de solubilidade é linear em função da concentração de CD, e se o declive for menor ou igual a um, assume-se uma estequiometria de 1:1. Por outro lado, se o declive for maior que um, há formação de complexos de ordem superior a um em relação à molécula hóspede. Quando o diagrama é do tipo AP, os complexos formados são de ordem maior que um em relação à molécula hospedeira após uma determinada concentração de CD e os diagramas do tipo AN podem ser explicados por alterações do agente solubilizante

em concentrações elevadas ou agregação dos complexos formados (BREWSTER; LOFTSSON, 2007).

Figura 1.1 - Tipos de diagrama de solubilidade de fases obtidos a partir da complexação de fármacos com CDs.

Os diagramas do tipo B podem assumir a conformação BS (solúvel) quando o complexo possui solubilidade limitada. Inicialmente, há um aumento da concentração da molécula hóspede e, ao atingir o limite de solubilidade, ocorre a precipitação, diminuindo a concentração. Os diagramas do tipo BI (insolúvel) são obtidos quando o complexo é insolúvel e há um equilíbrio inicial, porém após uma determinada concentração, ocorre a precipitação do complexo (BREWSTER; LOFTSSON, 2007; VEIGA; PECORELLI; RIBEIRO, 2006).

Quando o diagrama apresenta a conformação do tipo AL, ou seja, quando o aumento de solubilidade é linear com o aumento da concentração de CD, pode-se calcular a constante de estabilidade (K_c) através da equação:

$$K_c = \frac{\text{declive}}{S_0 (1 - \text{declive})}$$

Onde S_0 corresponde à solubilidade intrínseca da molécula hóspede.

O diagrama do tipo AL é o mais comum quando se trata de complexos de inclusão com CDs e o cálculo de K_c é feito para determinar a força da ligação da

molécula hóspede com a hospedeira. Na Tabela 1.1 estão descritos os valores de K_c e força de ligação (CARRIER; MILLER; AHMED, 2007).

Tabela 1.1 - Força da ligação entre a molécula hóspede e a CD conforme o valor de K_c .

Valor de K_c (M^{-1})	Força da ligação
<500	Muito fraca
500-1000	Fraca
1000-5000	Moderada
5000-20000	Forte
>20000	Muito forte

Para moléculas hóspedes pouco solúveis, que apresentam diagrama do tipo AL, podem ocorrer diferenças entre a solubilidade em meio aquoso e a interceptação da reta do diagrama em y, resultando em valores de K_c diferentes. Como alternativa, pode-se calcular o valor de eficiência de complexação (CE) que considera apenas o valor do coeficiente angular da equação da reta do diagrama.

$$CE = \frac{\text{Coeficiente angular}}{(1 - \text{Coeficiente angular})}$$

A partir do valor de CE a razão molécula hóspede:CD e o aumento da massa da formulação com a adição de CD, também podem ser determinados (LOFTSSON; HREINSDÓTTIR; MÁSSON, 2005; LOFTOSSON; HREINSDÓTTIR; MÁSSON, 2007).

$$\text{Molécula hóspede:CD} = \frac{1}{(1 + 1/CE)}$$

$$\text{Aumento da massa da formulação} = \frac{MM_{CD}}{MM_{\text{molécula hóspede}}} (1 + 1/CE)$$

Onde MM_{CD} corresponde à massa molecular da CD e $MM_{\text{molécula hóspede}}$ corresponde à massa molecular da molécula hóspede.

Entretanto, o emprego de CE, não é a forma mais usual de avaliar a complexação de fármacos com CDs, o que pode ser facilmente constatado na

literatura científica, uma vez que são poucos os trabalhos que utilizam este parâmetro (ARAUJO, D.R. et al., 2008; JUG; BECIREVIC-LACAN; BENGEZ, 2009; MELO et al., 2008; TEWES et al., 2008).

Por outro lado, o cálculo de K_c é encontrado em um número muito maior de trabalhos (alguns exemplos são mostrados na Tabela 1.2) o que indica a preferência dos pesquisadores desta área por este parâmetro.

Tabela 1.2 - Alguns exemplos de trabalhos recentes que utilizam o diagrama de solubilidade de fases na caracterização dos complexos de inclusão.

Molécula hóspede	CD	Tipo de diagrama	Referência
5-nitroindazol	DM β CD ^a	AL	JULLIAN et al., 2008
Aceclofenaco	HP β CD	AL	DAHIYA; PATHAK, 2007
AG11	HP β CD	AL	STANCANELLI et al., 2008
Bicalutamida	β CD	AL	PATIL et al., 2008
Carvedilol	M β CD ^b	AL	HIRLEKAR; KADAM, 2009a
Cefdinir	β CD e HP β CD	AL	ALEEM et al., 2008
Celecoxib	HP β CD	AL	CAPPELLO et al., 2007
Dipiridamol	β CD	AL	AL OMARI et al., 2009
Efavirenz	β CD, HP β CD e RM β CD	AL e AP	SATHIGARI et al., 2009
Etodolac	β CD, HP β CD e γ CD	AL e BS	CAPPELLO et al., 2009
Etoricoxib	HP β CD	AL	SHAH et al., 2009
Finasterida	HP β CD	AL	ASBAHR et al., 2009
Flavonoides	β CD	AL	DIAS; NIKOLAU; GIOVANI, 2008
Fluorofenidona	β CD e HP β CD	AL	WANG; DING; YAO, 2009
Flurbiprofeno	HP β CD	AL	KIM et al., 2009
Gliburida	β CD e HP β CD	AL	CIRRI et al., 2009
Hidroximetilnitrofurazona	HP β CD	AL	GRILLO et al., 2008

Imatinib	β CD e RM β CD ^c	AL	BÉNI et al., 2007
Iprodiona	β CD	AL	ZHU et al., 2007
Irbesartana	β CD	AL	HIRLEKAR; KADAM, 2009b
Itraconazol	HP β CD e SBE β CD ^d	AP e AL	BREWSTER et al., 2008
Lamotrigina	β CD	AL	SHINDE et al., 2008
Lidocaina	β CD	AN	TATAI et al., 2007
Loratadina	α CD, β CD, HP β CD e γ CD	AP e AL	OMAR et al., 2007
Loratadina	Heptakis - DM β CD ^e	AL	NACSA et al., 2009
Meloxicam	β CD	AL	OBAIDAT; KHANFAR;
Miconazol	β CD	AL	WANG; CAI, 2008
Nefopam	β CD e derivados	AL e AN	BRUN et al., 2006
Omeprazol	M β CD ^f	AL	FIGUEIRAS et al., 2007
Oxaprozina	β CD, DM β CD e RM β CD	AL	MAESTRELLI et al., 2009
Prednisona	α CD, β CD, HP β CD e γ CD	AL e BS	GHUZLAAN; AL OMARI; AL-
Pirimetamina	α CD	AL	ARAUJO et al., 2009
Sinvastatina	α CD e β CD	AL e AP	WEN; LIU; ZHU, 2005
Espironolactona	HP β CD	AL	RAJABI et al., 2008
Sulfadiazina	HP β CD	AL	ARAÚJO, M.V.G. et al., 2008
TG44	β CD	AL	ANZAI et al., 2007
Zaleplona	β CD	AL	DOIPHODE et al., 2008

^aDM β CD: Dimetil- β CD

^bM β CD: Metil- β CD

^cRM β CD: Randomicamente-metilada- β CD

^dSBE β CD: Sulfobutileter- β CD

^eHeptakis -DM β CD: heptakis-(2,6-di-O-metil)- β CD

^fM β CD: Dimetil- β CD

2.2. Análise térmica

As técnicas termoanalíticas mais utilizadas para a avaliação da formação de complexos de inclusão com CDs são a calorimetria exploratória diferencial e a termogravimetria. Geralmente são as primeiras a serem consideradas na investigação de formação de complexos por serem relativamente simples e demandarem pouco tempo (NOVÁK et al., 2006).

2.2.1. Calorimetria Exploratória de Varredura

As curvas DSC das CDs são características por apresentarem eventos endotérmicos que correspondem à sua desidratação. Assim, a α CD apresenta dois ou três eventos, dependendo da forma cristalina que se encontra, já a β CD e a γ CD apresentam um pico largo por volta de 120 e 150°C respectivamente (GIORDANO; NOVÁK; MOYANO, 2001).

A análise da formação de complexos pode ser feita comparando-se a curva DSC do complexo com a da CD utilizada, da molécula hóspede e da mistura física (CD e molécula hóspede) preparada na mesma proporção que os complexos. A molécula hóspede geralmente apresenta-se na forma cristalina e sua curva é representada por um pico estreito, bem definido, que corresponde ao ponto de fusão. A curva da mistura física é a soma do evento de desidratação da CD com o pico de fusão da molécula hóspede. Quando ocorre a formação do complexo, espera-se que o pico da fusão desapareça devido à perda da estrutura cristalina causada pela encapsulação (Figura 1.2).

Figura 1.2 - Modelo hipotético da análise por DSC de um fármaco puro (A), CD (B), mistura física (C) e o respectivo complexo (D).

Quando a complexação é parcial, espera-se que o pico da fusão do complexo diminua em relação ao da mistura física, sugerindo uma interação do fármaco com a CD, mas que, no entanto, ainda apresenta molécula hóspede livre (AL-MARZOUQI et al., 2007).

Em alguns casos a mistura física pode não apresentar o evento característico de fusão da molécula hóspede, pois o aquecimento e a água da CD podem causar uma amorfização da molécula hóspede (MURA et al., 2002). Em outra situação o pico pode apresentar-se mais largo e deslocado devido às interações fracas entre a molécula hóspede e a CD (LI et al., 2005).

O evento característico da desidratação da CD na curva DSC do complexo pode apresentar um deslocamento devido à substituição de moléculas de água na cavidade por moléculas hóspedes, o que resulta em alteração do estado energético (LI et al., 2005).

A Tabela 1.3 apresenta alguns trabalhos que utilizam DSC como técnica de caracterização dos complexos.

Tabela 1.3 - Alguns exemplos de trabalhos recentes que utilizam DSC na caracterização dos complexos de inclusão.

Molécula hóspede	CD	Indicativo de complexação	Referência
Aceclofenaco	HP β CD	Desaparecimento do pico de fusão	DAHIYA; PATHAK, 2007
Aciclovir	β CD	Desaparecimento do pico de fusão	BENCINI et al., 2008
Ácido ascórbico	HP β CD	Desaparecimento do pico de fusão	GARNERO; LONGHI, 2007
Atenolol	RM β CD	Desaparecimento do pico de fusão	JUG; BECIREVIC-LACAN; BENGEZ, 2009
Benzocaína	β CD	Desaparecimento ou redução do pico de fusão	AL-MARZOUQI et al., 2006
Celecoxib	β CD	Redução do pico de fusão	NAGARSENKER; JOSHI, 2005
Carvedilol	M β CD	Deslocamento do pico de fusão	HIRLEKAR; KADAM, 2009 ^a
Celecoxib	HP β CD	Desaparecimento ou redução do pico de fusão	CAPPELLO et al., 2007
Cladribina	HP β CD	Desaparecimento do pico de fusão	CASTELLI et al., 2008
Clotrimazol	γ CD e DM β CD	Desaparecimento do pico de fusão	TANERI et al., 2004
Dipiridamol	β CD	Desaparecimento do pico de fusão	AL OMARI et al., 2009
Efavirenz	β CD, HP β CD e RM β CD	Desaparecimento do pico de fusão	SATHIGARI et al., 2009
Etodolac	β CD, HP β CD e γ CD	Desaparecimento do pico de fusão	CAPPELLO et al., 2009
Finasterida	HP β CD	Desaparecimento do pico de fusão	ASBAHR et al., 2009
Fexofenadina	α CD, β CD, γ CD e HP β CD	Desaparecimento do pico de fusão	AL OMARI et al., 2007

Flurbiprofeno	HP β CD	Desaparecimento do pico de fusão	KIM et al., 2009
Gliburida	β CD e HP β CD	Desaparecimento ou redução do pico de fusão	CIRRI et al., 2009
Loratadina	α CD, β CD, HP β CD e γ CD	Desaparecimento do pico de fusão	OMAR et al., 2007
Loratadina	Heptakis - DM β CD	Desaparecimento do pico de fusão	NACSA et al., 2008
Loratadina	Heptakis - DM β CD	Desaparecimento do pico de fusão	NACSA et al., 2009
Lorazepam	HP β CD	Desaparecimento do pico de fusão	JUG; BECIREVIC-LACAN, 2008
Irbesartana	β CD	Alargamento do pico de fusão	HIRLEKAR; KADAM, 2009b
Itraconazol, econazol and fluconazol	β CD	Desaparecimento ou redução do pico de fusão	AL-MARZOUQI et al., 2009
Itraconazol	HP β CD	Desaparecimento ou redução do pico de fusão	LEE et al., 2008
Meloxicam	β CD	Desaparecimento do pico de fusão	OBAIDAT; KHANFAR; KHAWAM, 2009
Miconazol	β CD	Desaparecimento do pico de fusão	WANG; CAI, 2008
Naproxeno	HP β CD	Desaparecimento ou redução do pico de fusão	MURA et al., 2005
Oridonina	HP β CD	Desaparecimento do pico de fusão	YAN et al., 2008
Oxaprozina	β CD, DM β CD e RM β CD	Desaparecimento ou redução do pico de fusão	MAESTRELLI et al., 2009
Paclitaxel	6-O-CAPRO- β -CD ^a	Desaparecimento do pico de fusão	BILENSOY et al., 2008
Paclitaxel	bis (β CD)s	Desaparecimento do pico de fusão	LIU et al., 2004

Piroxicam	HP β CD	Desaparecimento ou redução do pico de fusão	ZHANG et al., 2009
Prednisona	α CD, β CD, HP β CD e γ CD	Desaparecimento do pico de fusão	GHUZLAAN; AL OMARI; AL-SOU'OD, 2009
Pirimetamina	α CD	Desaparecimento do pico de fusão	ARAUJO et al., 2009
Sericoside	β CD e γ CD	Desaparecimento ou redução do pico de fusão	RODE et al., 2003
Sildenafil	α CD, β CD, γ CD, HP β CD	Redução do pico de fusão	AL OMARI et al., 2006;
Valproato de sódio	α CD	Desaparecimento do pico de fusão	TEIXEIRA et al., 2006
Espironolactona	HP β CD	Desaparecimento do pico de fusão	RAJABI et al., 2008
Zaleplona	β CD	Deslocamento ou redução do pico de fusão	DOIPHODE et al., 2008

^a6-O-CAPRO- β -CD: Derivado anfifílico da β CD

2.2.2. Termogravimetria

As CDs naturais, quando analisadas por TG sob atmosfera de nitrogênio, apresentam uma primeira perda de massa correspondente à evaporação da água adsorvida e de cristalização e uma segunda correspondente à degradação que ocorre de 250 a 400 °C, onde há diminuição de 70 a 80% da massa (TROTТА; ZANETTI; CAMINO, 2000).

A maneira mais comum de se detectar a formação de complexos de inclusão utilizando-se a TG consiste em comparar a temperatura de início da degradação da molécula hóspede sozinha com o suposto complexo (Figura 1.3). Parte-se do princípio que se houve complexação, a degradação da molécula hóspede ocorrerá em temperaturas mais elevadas, pois estará protegida pela CD (ARAÚJO et al., 2007).

Figura 1.3 - Modelo hipotético da análise por TG da complexação de um fármaco com CDs.

A comparação da porcentagem de massa perdida do complexo em relação à mistura física é também um indicativo da formação de complexos fármaco-CD (Figura 1.3). A perda de massa em questão corresponde à saída de água da cavidade da CD pela sua evaporação, o que ocorre em temperaturas de até, no máximo, 150° C. Quando se verifica a diminuição de massa perdida correspondente à água no complexo em comparação à mistura física, é possível concluir que a molécula hóspede está ocupando o lugar da água na cavidade e, portanto houve a formação de complexos de inclusão. Entretanto, na hipótese de não formação de complexos, a perda de água do complexo é igual a da mistura física (AMMAR et al., 2005).

Na Tabela 1.4 são apresentados trabalhos recentes que utilizam TG para avaliar a formação de complexos de inclusão.

Tabela 1.4 - Alguns exemplos de trabalhos recentes que utilizam TG na caracterização dos complexos de inclusão.

Molécula hóspede	CD	Indicativo de complexação	Referência
Astaxantina	HP β CD	Temperatura de degradação mais elevada.	YUAN et al., 2008
Citronelol e acetato de citronilil	α CD, β CD e γ CD	Temperatura de degradação mais elevada	NOVÁK et al., 2006

Cladribina	HP β CD	Temperatura de degradação mais elevada	CASTELLI et al., 2008
Óleo essencial de <i>Lippia gracilis</i>	HP β CD	Temperatura de degradação mais elevada	MARRETO et al., 2009
Flavonoides	β CD	Temperatura de degradação mais elevada	DIAS; NIKOLAU; GIOVANI, 2008
Gliperimida	β CD, HP β CD e SBE β CD	Diminuição da perda de água	AMMAR et al., 2005
Oxifenbutazona	β CD e γ CD	Diminuição da perda de água	VEIGA; MERINO, 2002
Pirimetamina	HP β CD	Temperatura de degradação mais elevada	ARAÚJO et al., 2007
Valproato de sódio	α CD	Diminuição da perda de água	TEIXEIRA et al., 2006
Sulfluramida	β CD	Temperatura de degradação mais elevada	BERGAMASCO; ZANIN; MORAES, 2005

2.3. Difração de raios-X

A difração de raios-X (DRX) determina a natureza cristalina de sólidos e é uma das melhores técnicas para caracterização de complexos de inclusão (VEIGA; PECORELLI; RIBEIRO, 2006).

Dependendo da forma cristalina da molécula hóspede, haverá formação de picos característicos no difratograma. Assim, a complexação será avaliada por alterações nos picos característicos da molécula hóspede e da ciclodextrina com o complexo.

A obtenção de um difratograma com características de um material amorfo, ou seja, sem picos finos bem definidos, pode ser um indicativo da ocorrência de complexação (CORTI et al., 2007), como ilustrado na Figura 1.4.

Figura 1.4 - Modelo hipotético da análise por difração de raios –X do fármaco puro (A), CD (B), mistura física (C) e complexo (D). Em X estão representados picos bem definidos de um material cristalino, Y é a sobreposição dos picos do fármaco e da CD e Z é uma região sem picos, característico de um material amorfo.

Do mesmo modo, é possível avaliar a formação de complexos de inclusão pela comparação do tamanho dos picos característicos da molécula hospedeira com o tamanho que aparecem no complexo. A diminuição dos picos pode representar uma complexação parcial, uma vez que o material não complexado permanece na forma cristalina (PATEL et al., 2007).

Por outro lado, o padrão de difração da mistura física é, em geral, a sobreposição dos padrões da molécula hóspede e da CD com picos de menor intensidade, porém, quando comparado ao padrão dos complexos, apresentam maior cristalinidade (MURA et al., 2005).

Para quantificar a formação de complexos, pode-se utilizar o grau de cristalinidade relativa (RDC, da sigla em inglês Relative Degree of Crystallinity), dado pela equação:

$$RDC = \frac{I_{sam}}{I_{ref}}$$

Onde I_{sam} representa a altura do pico da amostra e I_{ref} a altura do pico no mesmo ângulo na amostra referência. A molécula hóspede sozinha muitas vezes é considerada como sendo a amostra referência (ALEEM et al., 2008).

Um valor baixo de RDC indica um menor grau de cristalinidade e, ainda, é possível concluir que a complexação foi mais eficiente. Entretanto, em função do processo empregado, a obtenção de um material amorfo é uma possibilidade, o que leva ao desaparecimento dos picos correspondentes, mesmo que a complexação do fármaco não tenha acontecido (RIBEIRO; FERREIRA; VEIGA, 2003; ZHANG et al., 2007).

Além das alterações nos picos característicos da molécula hóspede, quando ocorre a formação de complexos de inclusão pode-se observar a formação de novos picos, que indicam uma nova fase sólida, que corresponde ao complexo fármaco-CD (TOROPAINEN et al., 2006).

Na Tabela 1.5 são apresentados trabalhos recentes que utilizam DRX para avaliar a formação de complexos de inclusão.

Tabela 1.5 - Alguns exemplos de trabalhos recentes que utilizam DRX na caracterização dos complexos de inclusão.

Molécula hóspede	CD	Indicativo de complexação	Referência
Ácido felúrico	γ CD	Desaparecimento dos picos / formação de nova fase sólida	ANSELM I et al., 2006
Benzocaína	β CD	Redução dos picos / formação de nova fase sólida	AL-MARZOUQ I et al., 2007
Bicalutamida	β CD	Cálculo de RDC	PATIL et al., 2008
Budesonida	γ CD	Desaparecimento dos picos / formação de nova fase sólida	TOROPAINEN et al., 2006
Budesonida e Salmeterol	β CD e HP β CD	Desaparecimento dos picos / material amorfo	WANG et al., 2006
Carvedilol	M β CD	Redução dos picos	HIRLEKAR; KADAM, 2009a

Cefdinir	β CD e HP β CD	Cálculo de RDC	ALEEM et al., 2008
Celecoxib	β CD	Desaparecimento dos picos / formação de nova fase sólida	SINHA, et al., 2007
Cetoprofeno	HP β CD	Desaparecimento dos picos / material amorfo	MAESTRELLI et al., 2008
Clotrimazol	γ CD e DM β CD	Desaparecimento dos picos / formação de nova fase sólida	TANERI et al., 2004
Danazol	HP β CD	Diminuição ou desaparecimento dos picos / material amorfo	ROGERS et al., 2002
Dipiridamol	β CD	Desaparecimento dos picos / formação de nova fase sólida	AL OMARI et al., 2009
Etodolac	β CD, HP β CD e γ CD	Desaparecimento dos picos / formação de nova fase sólida	CAPPELLO et al., 2009
Etoricoxib	β CD	Diminuição ou desaparecimento dos picos / material amorfo	PATEL et al., 2007
Etoricoxib	HP β CD	Cálculo de RDC	SHAH et al., 2009
Finasterida	HP β CD	Desaparecimento dos picos	ASBAHR et al., 2009
Fexofenadina	α CD, β CD, γ CD e HP β CD	Diminuição ou desaparecimento dos picos / material amorfo	AL OMARI et al., 2007
Fluorofenidona	β CD e HP β CD	Diminuição ou desaparecimento dos picos / material amorfo	WANG; DING; YAO, 2009
Glimepirida	β CD e HP β CD	Cálculo de RDC	AMMAR et al., 2006
Gliburida	β CD e HP β CD	Diminuição ou desaparecimento dos picos / material amorfo	CIRRI et al., 2009
Halofantrina	HP β CD	Cálculo de RDC	ONYEJI; OMORUYI; OLADIMEJI, 2007
Ibuprofeno	β CD	Redução dos picos formação / de nova fase sólida	HUSSEIN; TÜRK; WAHL, 2007

Ibuproxam	β CD e derivados	Desaparecimento dos picos / material amorfo	MURA et al., 2002
Iprodiona	β CD	Desaparecimento dos picos / formação de nova fase sólida	ZHU et al., 2007
Irbesartana	β CD	Desaparecimento dos picos	HIRLEKAR; KADAM, 2009b
Itraconazol, econazol and fluconazol	β CD	Redução dos picos formação / de nova fase sólida	AL-MARZOUQI et al., 2009
Itraconazol	HP β CD	Desaparecimento dos picos / material amorfo	LEE et al., 2008
Lamotrigina	β CD	Cálculo de RDC	SHINDE et al., 2008
Óleo essencia de Lippia gracilis	HP β CD	Material amorfo	MARRETO et al., 2009
Lovastatina	HP β CD	Desaparecimento dos picos / material amorfo	PATEL; PATEL, 2007
Meloxicam	β CD	Diminuição ou desaparecimento dos picos	OBAIDAT; KHANFAR; KHAWAM, 2009
Metformina	Triacetil- β CD	Desaparecimento dos picos / material amorfo	CORTI et al., 2007
Miconazol	β CD	Desaparecimento dos picos	WANG; CAI, 2008
Naproxeno	HP β CD	Redução dos picos formação de nova fase sólida	MURA et al., 2005
Omeprazol	M β CD	Cálculo de RDC	FIGUEIRAS et al., 2007
Oridonina	HP β CD	Desaparecimento dos picos / material amorfo	YAN et al., 2008
Oxaprozina	β CD, DM β CD e RM β CD	Material amorfo	MAESTRELLI et al., 2009
Oxafenbutasona	β CD e γ CD	Desaparecimento dos picos / formação de nova fase sólida	VEIGA; MERINO, 2002

Paclitaxel	bis (β CD)s	Desaparecimento dos picos / formação de nova fase sólida	LIU et al., 2004
Piroxicam	HP β CD	Material amorfo	ZHANG et al., 2009
Prednisona	α CD, β CD, HP β CD e γ CD	Diminuição ou desaparecimento dos picos / material amorfo	GHUZLAAN; AL OMARI; AL-SOU'OD, 2009
Pirimetamina	HP β CD	Desaparecimento dos picos / material amorfo	ARAÚJO et al., 2007
Ropivacaina	HP β CD	Diminuição ou desaparecimento dos picos / material amorfo	ARAUJO, D.R. et al., 2008
Rutina e quercetina	β CD e HP β CD	Diminuição ou desaparecimento dos picos / material amorfo	SRI et al., 2007
Sericoside	β CD e γ CD	Desaparecimento dos picos / material amorfo	RODE et al., 2003
Sertaconazol	HP β CD	Desaparecimento dos picos / material amorfo	RODRIGUEZ-PEREZ et al., 2006
Sildenafil	α CD, β CD, γ CD e HP β CD	Diminuição ou desaparecimento dos picos / material amorfo	AL OMARI et al., 2006
Sinvastatina	HP β CD	Diminuição ou desaparecimento dos picos / material amorfo	JUN et al., 2007
Valproato de sódio	α CD	Desaparecimento dos picos / formação de nova fase sólida	TEIXEIRA et al., 2006
Sulfadiazina	HP β CD	Desaparecimento dos picos / material amorfo	ARAÚJO, M.V.G. et al., 2008
TG44	β CD	Diminuição ou desaparecimento dos picos / material amorfo	ANZAI et al., 2007
Trimetoprima	β CD	Cálculo de RDC	LI et al., 2005
Zaleplona	β CD	Cálculo de RDC	DOIPHODE et al., 2008

2.4. Espectroscopia no infra vermelho

A análise dos espectros de IV pode ser feita comparando-se as bandas da molécula hóspede, da CD e da mistura física com a do complexo. Geralmente o espectro da mistura física corresponde à sobreposição dos espectros da molécula hóspede e da CD, porém com as bandas da molécula hóspede menos evidentes, devido a sua menor concentração. Quando ocorre a complexação, as bandas podem mudar de posição, diminuir ou até mesmo desaparecer (CORTI et al., 2007), como ilustrado na Figura 1.5.

Figura 1.5 - Modelo hipotético da análise por espectroscopia no IV do fármaco puro (A), CD (B), mistura física (C) e complexo (D).

A modificação de algumas das bandas características da molécula hóspede é indicativo de que apenas parte da molécula foi encapsulada pela CD. A porção não complexada é responsável pela presença de bandas inalteradas (YANG et al., 2008).

Entretanto, é importante destacar que quando ocorre a complexação, as bandas da CD não são alteradas e, se a molécula hóspede não apresentar uma banda bastante característica, suas alterações podem ser imperceptíveis (VEIGA; PECORELLI; RIBEIRO, 2006). Há autores que relatam a dificuldade de interpretação dos resultados pela falta de uma banda da molécula hóspede que apresente

alterações perceptíveis (BEIJNEN et al., 2008; YAN et al., 2008; YUAN et al., 2008) e ainda outros que obtiveram resultados inconclusivos (LEE et al., 2006; NAGARSENKER; JOSHI, 2005).

Na Tabela 1.6 são apresentados trabalhos recentes que utilizam IV para avaliar a formação de complexos de inclusão.

Tabela 1.6 - Alguns exemplos de trabalhos recentes que utilizam IV na caracterização dos complexos de inclusão.

Molécula hóspede	CD	Indicativo de complexação	Referência
Aceclofenaco	HP β CD	Desaparecimento e deslocamento das bandas	DAHIYA; PATHAK, 2007
Acetazolamida	HP β CD	Desaparecimento parcial das bandas	GRANERO, et al., 2008
Ácido ascórbico	HP β CD	Desaparecimento e deslocamento das bandas	GARNERO; LONGHI, 2007
Atenolol	RM β CD	Desaparecimento parcial e deslocamento das bandas	JUG; BECIREVIC-LACAN; BENGEZ, 2009
Benzocaína	β CD	Desaparecimento e deslocamento das bandas	AL-MARZOUQI et al., 2007
Bicalutamida	β CD	Desaparecimento e deslocamento das bandas	PATIL et al., 2008
Budesonida e Salmeterol	β CD e HP β CD	Desaparecimento e deslocamento das bandas	WANG et al., 2006
Carvedilol	M β CD	Desaparecimento das bandas	HIRLEKAR; KADAM, 2009a
Cefdinir	β CD e HP β CD	Desaparecimento parcial das bandas	ALEEM et al., 2008
Celecoxib	HP β CD	Deslocamento das bandas	CAPPELLO et al., 2007
Cladribina	HP β CD	Desaparecimento das bandas	CASTELLI et al., 2008

Clotrimazol	γ CD e DM β CD	Desaparecimento e deslocamento das bandas	TANERI et al., 2004
Danazol	HP β CD	Desaparecimento e deslocamento das bandas	ROGERS et al., 2008
Etodolac	β CD, HP β CD e γ CD	Desaparecimento parcial e deslocamento das bandas	CAPPELLO et al., 2009
Etoricoxib	β CD	Desaparecimento parcial das bandas	PATEL et al., 2007
Etoricoxib	HP β CD	Desaparecimento e deslocamento das bandas	SHAH et al., 2009
Flavonóides	β CD	Deslocamento das bandas	DIAS; NIKOLAU; GIOVANI, 2008
Flavonóides	α CD, β CD e γ CD	Desaparecimento e deslocamento das bandas	BERGONZI et al., 2007
Flurbiprofeno	HP β CD	Desaparecimento das bandas	KIM et al., 2009
Gliburida	β CD e HP β CD	Deslocamento das bandas	CIRRI et al., 2009
Ibuprofeno	β CD	Desaparecimento parcial das bandas	HUSSEIN; TÜRK; WAHL, 2007
Ibuproxam	β CD e derivados	Desaparecimento e deslocamento das bandas	MURA et al., 2002
Irbesartana	β CD	Deslocamento das bandas	HIRLEKAR; KADAM, 2009b
Itraconazol, econazol e fluconazol	β CD	Desaparecimento e deslocamento das bandas	AL-MARZOUQI et al., 2009
Lamotrigina	β CD	Desaparecimento parcial das bandas	SHINDE et al., 2008
Loratadina	Heptakis - DM β CD	Deslocamento das bandas	NACSA et al., 2008
Loratadina	Heptakis - DM β CD	Deslocamento das bandas	NACSA et al., 2009

Lovastatina	HP β CD	Desaparecimento parcial das bandas	PATEL; PATEL, 2007
Lorazepam	HP β CD	Desaparecimento e deslocamento das bandas	JUG; BECIREVIC-LACAN, 2008
Metformina	Triacetil- β CD	Desaparecimento e deslocamento das bandas	CORTI et al., 2007
Miconazol	β CD	Desaparecimento dos picos	WANG; CAI, 2008
Naproxeno	HP β CD	Desaparecimento e deslocamento das bandas	MURA et al., 2005
Nefopam	β CD e derivados	Deslocamento das bandas	BRUN et al., 2006
Nimodipino	HP β CD	Desaparecimento parcial das bandas	YANG et al., 2008
Omeprazol	β CD e M β CD	Desaparecimento parcial das bandas	FIGUEIRAS et al., 2007
Paclitaxel	6-O-CAPRO- β CD	Desaparecimento parcial das bandas	BILENSOY et al., 2008
Oxaprozina	β CD, DM β CD e RM β CD	Deslocamento das bandas	MAESTRELLI et al., 2009
Paclitaxel	bis (β CD)s	Desaparecimento parcial e deslocamento das bandas	LIU et al., 2004
Piroxicam	HP β CD	Desaparecimento das bandas	ZHANG et al., 2009
Rutina e quercetina	β CD e HP β CD	Desaparecimento e deslocamento das bandas	SRI et al., 2007
Sinvastatina	HP β CD	Desaparecimento parcial das bandas	JUN et al., 2007
Espironolactona	HP β CD	Desaparecimento das bandas	RAJABI et al., 2008
Trazodona	HP β CD	Desaparecimento das bandas	MISIUK; ZALEWSKA, 2009

Vimpocetina	β CD e SBE β CD	Desaparecimento e deslocamento das bandas	RIBEIRO; FERREIRA; VEIGA, 2003
Zaleplona	β CD	Desaparecimento e deslocamento das bandas	DOIPHODE et al., 2008

2.5. Ressonância Magnética Nuclear

A ressonância magnética nuclear é uma técnica que vem sendo bastante utilizada para determinar a formação dos complexos de inclusão uma vez que esta possui a vantagem de elucidar a estrutura do complexo identificando a parte da molécula hospedeira que está incluída na cavidade da CD (VEIGA; PECORELLI; RIBEIRO, 2006).

Existem seis prótons nas CDs que podem ser utilizados na análise dos espectros de RMN de hidrogênio (HRMN): três localizados na superfície externa (H1, H2 e H4), dois na cavidade (H3 e H5), sendo H3 próximo à saída mais larga e H5 próximo ao lado estreito e o último próton (H6) encontra-se na saída mais estreita da cavidade. As alterações que ocorrem na CD são geralmente em H3 e H5 e às vezes em H6, dependendo da profundidade que a molécula hóspede entra na cavidade da CD (FIGUEIRAS et al., 2007; PINTO et al., 2005), como ilustrado na Figura 1.6.

Figura 1.6 - Modelo hipotético da análise por HRMN da CD (A) e complexo (B).

Devido à formação de ligações químicas, quando ocorre a complexação, há alterações nos sinais dos espectros da CD e da molécula hóspede (BORODI et al., 2008 ;NAGARSENKER; JOSHI, 2005).

Outra técnica utilizada na caracterização de complexos com CDs é a RMN de carbono 13 (C13RMN). Os resultados são para elucidar a parte da molécula hóspede que foi encapsulada pela CD, complementando as informações de HRMN (GARNERO; LONGHI, 2007).

Na Tabela 1.7 são apresentados trabalhos recentes que utilizam RMN para avaliar a formação de complexos de inclusão.

Tabela 1.7 - Alguns exemplos de trabalhos recentes que utilizam RMN na caracterização dos complexos de inclusão.

Molécula hóspede	CD	Indicativo de complexação	Referência
Ácido ascórbico	HP β CD	C13RMN	GARNERO; LONGHI, 2007
Ácido ferulico	γ CD	HRMN	ANSELM I et al., 2006
Ácidos maleico, fumarico e L-tartarico	β CD	HRMN	BARILLARO et al., 2008
Benzocaína	β CD	HRMN	PINTO et al., 2005
Bisfenol A	β CD	HRMN	YANG; CHEN; LIU, 2008
Celecoxib	HP β CD	HNMR, C13NMR	CAPPELLO et al., 2007
Celecoxib	β CD	HRMN	SINHA et al., 2007
Cladribina	HP β CD	HNMR	CASTELLI et al., 2008
Clomipramina	β CD e HP β CD	HNMR, C13NMR	MISIUK, ZALEWSKA, 2008
Coumestrol	β CD	HNMR	FRANCO et al., 2009
Di(8-hidroxi-quinolona) de magnésio	HP β CD	HRMN	HE; DENG; YANG, 2008
Diclofenaco	α CD, β CD, γ CD e HP β CD	HRMN	MEHTA; BHASIN; DHAM, 2008
Dipiridamol	β CD	HNMR	AL OMARI et al., 2009
Doxepina	β CD	HNMR	CRUZ et al., 2008

Enalapril	β CD	HRMN	ZOPPI; QUEVEDO; LONGHI, 2008
Etoricoxib	HP β CD	HNMR	SHAH et al., 2009
Fenotiazina	β CD	HRMN	GUERRERO- MARTÍNEZ et al., 2008
Finasterida	HP β CD	HNMR	ASBAHR et al., 2009
Flavonóides	β CD	C13RMN	DIAS; NIKOLAU; GIOVANI, 2008
Fluoxetina	β CD	HRMN	SOUSA et al., 2008
Hidroxi-metil- nitrofurazona	HP β CD	HRMN	GRILLO et al., 2008
Imatinib	β CD e RM β CD	HNMR	BÉNI et al., 2007
Irbesartana	β CD	HNMR	HIRLEKAR; KADAM, 2009b
Midazolam	β CD	HNMR	ALI, UPADHYAY, 2008
Nefopam	β CD e derivados	HNMR, C13NMR	BRUN et al., 2006
Nitroindazol	β CD e DM β CD	HRMN	JULLIAN et al., 2008
N-octil β -D- glucopiranosídeo	α CD	HRMN	BERNAT et al., 2008
Norfloxacino	M β CD	HNMR	LI; ZHAO; CHAO, 2008
Omeprazol	β CD e M β CD	HRMN	FIGUEIRAS et al., 2007
Oridonina	HP β CD	HRMN	YAN et al., 2008
Paclitaxel	bis (β CD)s	HNMR	LIU et al., 2004
Paclitaxel	6-O-CAPRO- β CD	HRMN	BILENSOY et al., 2008
Piroxicam	HP β CD	HNMR	ZHANG et al., 2009
Pirimetamina	α CD	HNMR	ARAUJO et al., 2009
Pirimetamina	HP β CD	HRMN	ARAÚJO et al., 2007
Pró-fármaco de A-007	α CD, β CD e γ CD	HRMN, C13RMN	SAGIRAJU; JURSIĆ, 2008
Quinuclidina	α CD	C13RMN	ASKI; KOWALEWSKI, 2008
Sildenafil	α CD, β CD, γ CD e HP β CD	HRMN	AL OMARI et al., 2006

Sulfadiazina	HP β CD	HRMN	ARAÚJO, M.V.G. et al., 2008
Valproato de sódio	α CD	HNMR	TEIXEIRA et al., 2006
TG44	β CD	HRMN	ANZAI et al., 2007
Trazodona	HP β CD	HNMR, C13NMR	MISIUK; ZALEWSKA, 2009

2.6. Dissolução

O ensaio de dissolução é utilizado para avaliar a ocorrência de complexação, quando o objetivo de se formar o complexo é aumentar a solubilidade aquosa de fármacos pouco solúveis. Em alguns trabalhos o perfil de dissolução é feito utilizando-se comprimidos do fármaco, mistura física ou complexo acrescidos de outros excipientes (DAHIYA et al., 2007) e em outros o perfil de dissolução é obtido a partir dos pós, sem compressão (HUSSEI; TÜRK; WAHL, 2007).

A avaliação da complexação é feita através da comparação da quantidade de fármaco dissolvida e da eficiência de dissolução (Figura 1.7). Quando ocorre a formação do complexo espera-se que a eficiência de dissolução seja mais elevada que a do fármaco e da mistura física devido ao aumento de solubilidade proporcionado pela complexação do fármaco (JUN et al., 2007).

Figura 1.7 - Modelo hipotético da análise por dissolução do complexo de inclusão (A), mistura física (B) e fármaco não complexado (C).

Na Tabela 1.8 são apresentados trabalhos recentes que utilizam perfil de dissolução para avaliar a formação de complexos de inclusão.

Tabela 1.8 - Alguns exemplos de trabalhos recentes que utilizam o perfil de dissolução na caracterização dos complexos de inclusão.

Molécula hóspede	CD	Indicativo de complexação	Referência
Aceclofenaco	HP β CD	Eficiência de dissolução em 10 minutos	DAHIYA; PATHAK, 2007
Bicalutamida	β CD	Tempo necessário para liberar 90%	PATIL et al., 2008
Budesonida	γ CD	Porcentagem dissolvida em 15 minutos	TOROPAINÉ N et al., 2006
Carvedilol	M β CD	Taxa de dissolução	HIRLEKAR; KADAM, 2009a
Cefdinir	β CD e HP β CD	Porcentagem dissolvida em 5, 10, 30 e 60 minutos	ALLEM et al., 2008
Celecoxib	HP β CD	Porcentagem dissolvida em 10 minutos	CAPPELLO et al., 2007
Celecoxib	β CD	Tempo necessário para liberar 50%	SINHA et al., 2007
Claritromicina	β CD	Taxa de dissolução	ZHANG et al., 2008
Danazol	HP β CD	Porcentagem dissolvida	ROGERS et al., 2002
Efavirenz	β CD, HP β CD e RM β CD	Eficiência de dissolução em 30 e 180 minutos	SATHIGARI et al., 2009
Etodolac	β CD, HP β CD e γ CD	Porcentagem dissolvida em 5 minutos	CAPPELLO et al., 2009
Etoricoxib	HP β CD	Porcentagem dissolvida em 2, 15 e 30 minutos e eficiência de dissolução em 45 minutos	SHAH et al., 2009
Finasterida	HP β CD	Taxa de dissolução	ASBAHR et al., 2009

Fluorofenidona	β CD e HP β CD	Porcentagem dissolvida em 2 minutos	WANG; DING; YAO, 2009
Gliburida	β CD e HP β CD	Porcentagem dissolvida em 10 e 60 minutos	CIRRI et al., 2009
Halofantrina	HP β CD	Porcentagem dissolvida em 60 e 180 minutos	ONYEJI; OMORUYI; OLADIMIJI, HUSSEI; TÜRK; WAHL, 2007
Ibuprofeno	β CD	Porcentagem dissolvida em 15 e 75 minutos	TÜRK; WAHL, 2007
Lamotrigina	β CD	Porcentagem dissolvida em 15 minutos	SHINDE et al., 2008
Irbesartana	β CD	Taxa de dissolução	HIRLEKAR; KADAM, 2009b
Itraconazol	HP β CD	Porcentagem dissolvida	LEE et al., 2008
Loratadina	α CD, β CD, HP β CD e γ CD	Porcentagem dissolvida em 5 minutos	OMAR et al., 2007
Loratadina	Heptakis – DM β CD	Porcentagem dissolvida em 120 minutos	NACSA et al., 2008
Lovastatina	HP β CD	Porcentagem dissolvida em 30 minutos e tempo para liberar 50%	PATEL; PATEL, 2007
Metformina	Triacetil- β CD	Tempo para liberar 50%	CORTI et al., 2007
Naproxeno	HP β CD	Porcentagem dissolvida em 10 e 30 minutos, eficiência de dissolução em 1 hora e razão de dissolução relativa em 5 minutos	MURA et al., 2005
Omeprazol	β CD e M β CD	Porcentagem dissolvida em 6 minutos e eficiência de dissolução em 1 hora	FIGUEIRAS et al., 2007
Oxaprozina	β CD, DM β CD e RM β CD	Taxa de dissolução	MAESTRELLI et al., 2009
Piroxicam	HP β CD	Porcentagem dissolvida em 10 e 60 minutos	ZHANG et al., 2009
Zaleplona	β CD	Tempo para liberar 90%	DOIPHODE et al., 2008

2.7. Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura é uma técnica utilizada para definir qualitativamente a formação dos complexos de inclusão. A análise é feita através da comparação morfológica do fármaco, da CD e da mistura física com o complexo. Quando ocorre a formação do complexo de inclusão a imagem, diferente da mistura física, deixa de apresentar dois componentes distintos, passando a ter apenas um componente diferente da forma original (FIGUEIRAS et al., 2007).

Na Tabela 1.9 são apresentados trabalhos recentes que utilizam microscopia eletrônica de varredura para avaliar a formação de complexos de inclusão.

Tabela 1.9 - Alguns exemplos de trabalhos recentes que utilizam microscopia eletrônica de varredura na caracterização dos complexos de inclusão.

Molécula hóspede	CD	Indicativo da complexação	Referência
Aceclofenaco	HP β CD	Formação de uma única fase	DAHIYA; PATHAK, 2007
Celecoxib	β CD	Formação de uma única fase	SINHA et al., 2007
Claritromicina	β CD	Formação de uma única fase	ZHANG et al., 2007
Coumestrol	β CD	Perda da forma original e formação de uma única fase	FRANCO et al., 2009
Dipiridamol	β CD	Formação de uma única fase	AL OMARI et al., 2009
Efavirenz	β CD, HP β CD e RM β CD	Perda da forma original e formação de uma única fase	SATHIGARI et al., 2009
Ibuprofeno	β CD	Perda da forma original	HUSSEI; TÜRK; WAHL, 2007
Irbesartan	β CD	Perda da forma original	HIRLEKAR; KADAM, 2009b

Itraconazol	HP β CD	Perda da forma original	LEE et al., 2008
Metformina	Triacetil- β CD	Perda da forma original e formação de uma única fase	CORTI et al., 2007
Omeprazol	β CD e M β CD	Perda da forma original e formação de uma única fase	FIGUEIRAS et al., 2007
Oxaprozina	β CD, DM β CD e RM β CD	Perda da forma original e formação de uma única fase	MAESTRELLI et al., 2009
Paclitaxel	bis (β CD)s	Perda da forma original	LIU et al., 2004
Piroxicam	HP β CD	Perda da forma original	ZHANG et al., 2009
Prednisona	α CD, β CD, HP β CD e γ CD	Perda da forma original e formação de uma única fase	GHUZLAAN; AL OMARI; AL-SOU'OD, 2009
Ropivacaina	HP β CD	Formação de uma única fase	ARAÚJO, D.R. et al. 2008
Sinvastatina	HP β CD	Perda da forma original	JUN et al., 2007
Vimpocetina	β CD e SBE β CD	Perda da forma original e formação de uma única fase	RIBEIRO; FERREIRA; VEIGA, 2003

3. Comparação entre os métodos empregados na caracterização de complexos fármaco-CDs

A Tabela 1.10 faz uma comparação entre os diferentes métodos empregados na caracterização de complexos de inclusão, trazendo as vantagens e desvantagens de cada um além do indicativo de complexação.

Tabela 1.10 - Quadro comparativo dos métodos utilizados na caracterização de complexos de inclusão.

Método	Indicativo de complexação	Vantagens	Desvantagens
Solubilidade de fases	- Valores de Kc e CE	- Permite prever a estequiometria fármaco:CD. - Fornece dados quantitativos a cerca da formação dos	
DSC	- Desaparecimento ou redução do pico de fusão do fármaco	- Fácil execução - Análises rápidas	- Apresenta dados apenas qualitativos, não quantitativos em relação à formação dos complexos de inclusão
TG	- Aumento da temperatura de degradação - Diminuição da perda de água	- Fácil execução - Análises rápidas	- Apresenta dados apenas qualitativos, não quantitativos em relação à formação dos complexos de inclusão
Difração de raios -X	- Desaparecimento ou redução dos picos - Cálculo de RDC - Formação de uma nova fase sólida	- Traz informações em relação à estrutura dos complexos	- Quando o resultado do processo é um material amorfo, a técnica não pode ser utilizada
Espectroscopia no IV	- Desaparecimento, redução ou deslocamento das bandas	- Traz informações em relação à estrutura dos complexos	- É necessário que a molécula hóspede tenha uma banda bastante característica
RMN	- Alterações nos sinais de H3, H5 e H6 no HRMN	- Traz informações em relação à estrutura dos complexos	- Apresenta dados apenas qualitativos, não quantitativos em relação à formação dos complexos de inclusão
Dissolução	- Comparação da porcentagem dissolvida ou eficiência de dissolução	- Ensaio in vitro que permite prever o comportamento in vivo do medicamento	- Apresenta dados apenas qualitativos, não quantitativos em relação à formação dos complexos de inclusão

MEV	- Perda da forma original - Formação de uma única fase	- Fácil execução	- Apresenta dados apenas qualitativos, não quantitativos em relação à formação dos complexos de inclusão
-----	---	------------------	--

4. Conclusão

A caracterização de complexos do tipo fármaco-CDs não é uma tarefa simples e requer o emprego de diversos métodos analíticos, cuja interpretação foi discutida nesse trabalho. Tais análises devem ser executadas em conjunto, uma vez que cada método explora uma característica do complexo de inclusão e, assim, decidir acerca da complexação.

5. Referências Bibliográficas

ALEEM, O.; KUCHEKAR, B.; PORE, Y.; LATE, S. Effect of β -cyclodextrin and hydroxypropyl β -cyclodextrin complexation on physicochemical properties and antimicrobial activity of cefdinir. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 47, p. 535-540, 2008.

ALI, S.M.; UPADHYAY, S.K. Complexation study of midazolam hydrochloride with β -cyclodextrin: NMR spectroscopic study in solution. *Magn. Reson. Chem.*, v. 46, p. 676-679, 2008.

AL-MARZOUQI, A.H.; ELWY, H.M.; SHEHADI, I.; ADEM, A. Physicochemical properties of antifungal drug-cyclodextrin complexes prepared by supercritical carbon dioxide and by conventional techniques. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 49, p. 227-233, 2009.

AL-MARZOUQI, A.H.; JOBE, B.; DOWAIDAR, A.; MAESTRELLI, F.; MURA, P. Evaluation of supercritical fluid technology as preparative technique of benzocaine - cyclodextrin complexes – Comparison with conventional methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 43, p. 566-574, 2007.

AL OMARI, M.M.; BADWAN, A.A.; ZUGHUL, M.B.; DAVIES, J.E.D. Fexofenadine/cyclodextrin inclusion complexation: phase solubility, thermodynamic, physicochemical and computational analysis. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, v. 33, p. 1205-1215, 2007.

AL OMARI, M.M.; EL-BARGHOUTH, M.I.; ZUGHUL, M.B.; DAVIES, J.E.D. Dipyrindamole/ β -cyclodextrin complexation: Effect of buffer species, thermodynamics, and guest-host interactions probed by ^1H -NMR and molecular modeling studies. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, v. 64, p. 305–315, 2009.

AL OMARI, M.M.; ZUGHUL, M.B.; DAVIES, J.E.D.; BADWAN, A.A. Sildenafil/cyclodextrin complexation: Stability constants, thermodynamics, and guest-host interactions probed by ^1H NMR and molecular modeling studies. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 41, p. 857-865, 2006.

AMMAR, H.O.; SALAMA, H.A.; GHORAB, M.; MAHMOUD, A.A. Formulation and biological evaluation of glimepiride-cyclodextrin-polymer systems. *Int. J. Pharm.*, v. 309, p. 129-138, 2006.

ANSELMINI, C.; CENTINI, M.; RICCI, M.; BUONOCORE, A.; GRANATA, P.; TSUNO, T.; FACINO, R.M. Analytical characterization of a ferulic acid/ γ -cyclodextrin inclusion complex. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 40, p. 875-881, 2006.

ANZAI, K.; MIZOGUCHI, J.; YANAGI, T.; HIRAYAMA, F.; ARIMA, H.; UEKAMA, K. Improvement of dissolution properties of a new *Helicobacter pylori* eradicating agent (TG44) by inclusion complexation with β -cyclodextrin. *Chem. Pharm. Bull.*, v. 55, p. 1466-1470, 2007.

ARAUJO, D.R.; TSUNEDA, S.S.; CEREDA, C.M.S.; CARVALHO, F.D.G.F.; PRÉTÉ, P.S.C.; FERNANDES, S.A.; YOKAICHIYA, F.; FRANCO, M.K.K.D.; MAZZARO, I.; FRACETO, L.F.; BRAGA, A.F.A.; PAULA, E. Development and pharmacological evaluation of ropivacaine-2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex. *Eur. J. Pharm. Sci.*, v.33, p. 60-71, 2008.

ARAUJO, M.V.G.; MACEDO O.F.L.; NASCIMENTO C.C.; CONEGERO, L.S.; BARRETO, L.S.; ALMEIDA, L.E.; COSTA-JR, N.B.; GIMENEZ, I.F. Characterization, phase solubility and molecular modeling of α -cyclodextrin/pyrimethamine inclusion complex. *Spectrochim. Acta, Part A*, v. 72, p. 165-170, 2009.

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

ARAÚJO, M.V.G.; VIEIRA, E.K.B.; LÁZARO, G.S.; CONEGERO, L.S.; FERREIRA, O.P.; ALMEIDA, L.E.; BARRETO, L.S.; COSTA-JR. N.B.; GIMENEZ, I.F. Sulfadiazine/hydroxypropyl- β -cyclodextrin host-guest system: Characterization, phase-solubility and molecular modeling. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 16, p. 5788-5794, 2008.

ASKI, S.N.; KOWALEWSKI, J. Quinuclidine complex with α -cyclodextrin: A diffusion and ^{13}C NMR relaxation study. *Magn. Reson. Chem.*, v. 46, p. 261-267, 2008.

ASBAHR, A.C.C.; FRANCO, L.; BARISON, A.; SILVA, C.W.P.; FERRAZ, H.G.; RODRIGUES, L.N.C. Binary and ternary inclusion complexes of finasteride in

HP β CD and polymers: Preparation and characterization. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 17, p. 2718-2723, 2009.

BARILLARO, V.; DIVE, G.; BERTHOLET, P.; EVRARD, B.; DELATTRE, L.; FREDERICH, M.; ZIÉMONS, E.; PIEL, G. Theoretical and experimental investigations of organic acids/cyclodextrin complexes and their consequences upon the formation of miconazole/cyclodextrin/acid ternary inclusion complexes. *Int. J. Pharm.*, v.347, p. 62-70, 2008.

BEIJNEN, J.H.; SCHOOT, S.C.; NUIJEN, B.; FLESCH, F.M.; GORE, A.; MIREJOVSKY, D.; LENAŽ, L. Complexation study of the anticancer agent EO-9 with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, v. 34, p. 1130-1139, 2008.

BENCINI, M.; RANUCCI, E.; FERRUTI, P.; TROTTA, F.; DONALISIO, M.; CORNAGLIA, M.; LEMBO, D.; CAVALLI, R. Preparation and in vitro evaluation of the antiviral activity of the acyclovir complex of a β -cyclodextrin/poly (amidoamine) copolymer. *J. Controlled Release*, v. 126, p. 17-25, 2008.

BENI, S.; SZAKÁCS, Z.; CSERNÁK, O.; BARCZA, L., NOSZÁL B. Cyclodextrin/imatinib complexation: Binding mode and charge dependent stabilities. *Eur. J. Pharm. Sci.*, v. 30, p. 167-174, 2007.

BERNAT, V.; RINGARD-LEFEBVRE, C.; LE BAS, G.; PERLY, B.; DJEDAÏNI-PILARD, F.; LESIEUR, S. Inclusion complex of n-octyl β -D-glucopyranoside and α -cyclodextrin in aqueous solutions: thermodynamic and structural characterization, *Langmuir*, v. 24, p. 3140-3149, 2008.

BERGAMASCO, R.C.; ZANIN, G.M.; MORAES, F.F. Sulfluramid volatility reduction by β -cyclodextrin. *J. Agric. Food Chem.*, v. 53, p. 1139-1143, 2005.

BERGONZI, M.C.; BILIA, A.R.; BARI, L.; MAZZI, G.; VINCIERI, F.F. Studies on the interactions between some flavonols and cyclodextrins. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, v.17, p. 5744-5748, 2007.

BILENSOY, E.; GÜRKAYNAK, O.; ERTAN, M.; SEN, M.; HINCAL, A.A. Development of nanoparticles loaded with anticancer drug paclitaxel. *J. Pharm. Sci.*, v.97, p. 1519-1529, 2008.

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

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

BREWSTER, M.E.; VANDECRUYS, R.; PEETERS, J.; NEESKENS, P.; VERRECK, G.; LOFTSSON, T. Comparative interaction of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and sulfobutylether- β -cyclodextrin with itraconazole: Phase-solubility behavior and

stabilization of supersaturated drug solutions. *Eur. J. Pharm. Sci.*, v. 34, p. 94-103, 2008.

BRUN, H.; PAUL, M.; RAZZOUQ, N.; BINHAS, M.; GIBAUD, S.; ASTIER, A. Cyclodextrin inclusion complexes of the central analgesic drug nefopam. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, v. 32, p. 1123-1134, 2006.

CAPELLO, B.; DI MAIO, C.; IERVOLINO, M.; MIRO, A. Combined effect of hydroxypropyl methylcellulose and hydroxypropyl- β -cyclodextrin on physicochemical and dissolution properties of celecoxib. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, v. 59, p. 237-244, 2007.

CAPPELLO, B.; DI MAIO, C.; IERVOLINO, M.; MIRO, A.; CALIGNANO, A. Etodolac/cyclodextrin formulations: Physicochemical characterization and in vivo pharmacological studies. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, v. 35, p. 877-886, 2009.

CARRIER, R.L.; MILLER, L.A.; AHMED, I. The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. *J. Controlled Release*, v. 123, p. 78-99, 2007.

CASTELLI, V.V.A.; TRIVIERI, G.; ZUCCHELLI, I.; BRAMBILLA, L.; BARBUZZI, T.; CASTIGLIONI, C.; PACI, M.; ZERBI, G.; ZANOL, M. Characterization of an inclusion complex between cladribine and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *J. Pharm. Sci.*, v. 97, p. 3897-3906, 2008.

CHALLA, R.; AHUJA, A.; ALI, J.; KHAR, R.K. Cyclodextrin in drug delivery: An update review. *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, v. 6, p. E329-E357, 2005.

CIRRI, M.; RIGHI, M.F.; MAESTRELLI, F.; MURA, P.; VALLERI, M. Development of glyburide fast-dissolving tablets based on the combined use of cyclodextrins and polymers. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, v. 35, p.73-82, 2009.

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

CRUZ, J.R.; BECKER, B.A.; MORRIS, K.F.; LARIVE, C.K. NMR characterization of the host-guest inclusion complex between β -cyclodextrin and doxepin. *Magn. Reson. Chem.*, v. 46, p. 838-845, 2008.

DAHIYA, S.; PATHAK, K.; Influence of amorphous cyclodextrin derivatives on aceclofenac release from directly compressible tablets. *Pharmazie*, v. 62, p. 278-283, 2007.

DIAS, K.; NIKOLAU, S.; DE GIOVANI, W.F. Synthesis and spectral investigation of Al(III) catechin/ β -cyclodextrin and Al(III) quercetin/ β -cyclodextrin inclusion compounds. *Spectrochim. Acta, Part A*, v.70, p. 154-161, 2008.

DOIPHODE, D.; GAIKWAD, S.; PORE, Y.; KUCHEKAR, B.; LATE, S. Effect of β -cyclodextrin complexation on physicochemical properties of zaleplon. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, v. 62, p. 43–50, 2008.

FIGUEIRAS, A.; SARRAGUÇA, J.M.G.; CARVALHO, R.A.; PAIS, A.A.C.C.; VEIGA, F.J.B. Interaction of omeprazole with a methylated derivative of β -cyclodextrin: Phase solubility, NMR spectroscopy and molecular simulation. *Pharm. Res.*, v. 24, p. 377-389, 2007.

FIGUEIRAS, A.; CARVALHO, R.A.; RIBEIRO, L.; TORRES-LABANDEIRA, J.J.; VEIGA, F.J.B. Solid-state characterization and dissolution profiles of the inclusion complexes of omeprazole with native and chemically modified β -cyclodextrin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v.67, p. 531-539, 2007.

FRANCO, C.; SCHWINGEL, L.; LULA, I.; SINISTERRA, R.D.; KOESTER, L.S.; BASSANI, V.L. Studies on coumestrol/ β -cyclodextrin association: Inclusion complex characterization. *Int. J. Pharm.*, v. 369, p. 5-11, 2009.

GARNERO, C.; LONGHI, M. Study of ascorbic acid interaction with hydroxypropyl- β -cyclodextrin and triethanolamine, separately and in combination. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 45, p. 536-545, 2007.

GHUZLAAN, A.; AL OMARI, M.M.; AL-SOU'OD K.A. Prednisone/cyclodextrin inclusion complexation: phase solubility, thermodynamic, physicochemical and computational analysis. *J. Solution Chem.*, v. 38, p. 83-94, 2009.

GRANERO, G.E.; MAITRE, M.M.; GARNERO, C.; LONGHI, M.R. Synthesis, characterization and in vitro release studies of a new acetazolamide-HP- β -CD-TEA inclusion complex. *Eur. J. Med. Chem.*, v.43, p. 464-470, 2008.

GIORDANO, F.; NOVAK, C.; MOYANO, J.R. Thermal analysis of cyclodextrin and their inclusion compounds. *Thermochim. Acta*, v. 380, p.123-151, 2001.

GRILLO, R.; MELO, N.F.S.; MORAES, C.M.; LIMA, R.; MENEZES, C.M.S.; FERREIRA, E.I.; ROSA, A.H.; FRACETO, L.F.; Study of the interaction between hydroxymethylnitrofurazone and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 47, p. 295-302, 2008.

GUERRERO-MARTÍNEZ, A.; MONTORO, T.; VIÑAS, M.H.; TARDAJOS, G. Complexation and Chiral Drug Recognition of an Amphiphilic Phenothiazine Derivative with β -Cyclodextrin. *J. Pharm. Sci.*, v.97, p. 1485-1498, 2008.

HE, J.; DENG, L.; YANG, S. Synthesis and characterization of β -cyclodextrin inclusion complex containing di(8-hydroxyquinoline)magnesium. *Spectrochim. Acta, Part A*, v.70, p. 878-883, 2008.

HIGUCHI, T.; CONNORS, A.K. Phase-solubility techniques. *Adv. Anal. Chem. Instrum.*, v. 4, p. 117-212, 1965.

HIRLEKAR, R.; KADAM, V. Preformulation Study of the Inclusion Complex Irbesartan- β -Cyclodextrin. *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, v. 10, p. 276-281, 2009a.

HIRLEKAR, R.; KADAM, V. Preparation and characterization of inclusion complexes of carvedilol with methyl- β -cyclodextrin. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, v. 63, p. 219-224, 2009b.

HUSSEI, K.; TÜRKE, M.; WAHL, M.A. Comparative evaluation of ibuprofen/ β -cyclodextrin complexes obtained by supercritical carbon dioxide and other conventional methods. *Pharm. Res.*, v. 24, p. 585-592, 2007.

JUG, M.; BECIREVIC-LACAN, M. Development of a cyclodextrin-based nasal delivery system for lorazepam. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, v. 34, p. 817-826, 2008.

JUG, M.; BECIREVIC-LACAN, M.; BENGEEZ, S. Novel cyclodextrin-based film formulation intended for buccal delivery of atenolol. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, v. 35, p. 796-807, 2009.

JULLIAN, C.; MORALES-MONTECINOS, J.; ZAPATA-TORRES, G.; AGUILERA, B.; RODRIGUEZ, J.; ARÁN, V.; OLEA-AZAR, C. Characterization, phase-solubility, and molecular modeling of inclusion complex of 5-nitroindazole derivative with cyclodextrins. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 16, p. 5078-5084, 2008.

JUN, S.W.; KIM, M.S.; KIM, J.S.; PARK, H.J.; LEE, S.; WOO, J.S.; HWANG, S.J. Preparation and characterization of simvastatin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex using supercritical antisolvent (SAS) process. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v.66, p. 413-421, 2007.

KIM, J.K.; KIM, M.S.; PARK, J.S.; KIM, C.K. Thermo-reversible flurbiprofen liquid suppository with HP- β -CD as a solubility enhancer: improvement of rectal bioavailability. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, v. 64, p. 265-272, 2009.

LEE, P.S.; HAN, J.Y.; SONG, T.W.; SUNG, J.H.; KWON, O.S.; SONG, S.; CHUNG, Y.B. Physicochemical characteristics and bioavailability of a novel intestinal metabolite of ginseng saponin (IH901) complexed with β -cyclodextrin. *Int. J. Pharm.*, v. 316, p.29-36, 2006.

LEE, S.Y.; JUNG, I.I.; KIM, J.K.; LIM, G.B.; RYU, J.H. Preparation of itraconazole/HP- β -CD inclusion complexes using supercritical aerosol solvent extraction system and their dissolution characteristics. *J. Supercrit. Fluids.*, v. 44, p. 400-408, 2008.

LI, J.; ZHAO, C.; CHAO, J. Investigation on the inclusion behavior of norfloxacin with 2-methyl- β -cyclodextrin. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, v. 62, p. 325-331, 2008.

LI, N.; ZHANG, Y.H.; WU, Y.N.; XIONG X.L.; ZHANG, Y.H. Inclusion complex of trimethoprim with β -cyclodextrin. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 39, p. 824-829, 2005.

LOFTSSON, T.; HREINSDÓTTIR, D.; MÁSSON, M. Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs. *Int. J. Pharm.*, v. 302, p.18-28, 2005.

LOFTSSON, T.; HREINSDÓTTIR, D.; MÁSSON, M. The complexation efficiency. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, v. 57, p.545-542, 2007.

MAESTRELLI, F.; CECCHI, M.; CIRRI, M.; CAPASSO, G.; MENNINI, N.; MURA, P. Comparative study of oxaprozin complexation with natural and chemically-modified cyclodextrins in solution and in the solid state. *J. Incl. Phenom. Macrocycl.*, v. 63, p. 17-25, 2009.

MAESTRELLI, F.; ZERROUK, N.; CIRRI, M.; MENNINI, N.; MURA, P. Microspheres for colonic delivery of ketoprofen-hydroxypropyl- β -cyclodextrin complex. *Eur. J. Pharm. Sci.*, v.34, p. 1-11, 2008.

MARRETO, R.N.; ALMEIDA, E.E.C.V.; ALVES, P.B.; NICULAU, E.S.; NUNES, RS, MATOS CRS, ARAÚJO AAS. Thermal analysis and gas chromatography coupled mass spectrometry analyses of hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex containing *Lippia gracilis* essential oil. *Thermochim. Acta*, v. 475, p. 53-58, 2008.

MEHTA; S.K.; BHASIN, K.K.; DHAM, S. Energetically favorable interactions between diclofenac sodium and cyclodextrin molecules in aqueous media. *J. Colloid Interface Sci.*, v. 326, p.374-381, 2008.

MELO, N.F.S.; GRILLO, R.; ROSA, A.H.; FRACETO, L.F. Interaction between nitroheterocyclic compounds with β -cyclodextrins: Phase solubility and HPLC studies *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 47, p. 865-869, 2008.

MISIUK, W.; ZALEWSKA, M. Study on the inclusion interactions of β -cyclodextrin and its derivatives with clomipramine by spectroscopy and its analytic application. *Anal. Lett.*, v. 41, p. 543-560, 2008.

MISIUK, W.; ZALEWSKA, M. Investigation of inclusion complex of trazodone hydrochloride with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Carbohydr. Polym.*, v. 77, p. 482-488, 2009.

MURA, P.; BETTINETTI, G.P.; CIRRI, M.; MAESTRELLI, F.; SORRENTI, M.; CATENACCI, L. Solid-state characterization and dissolution properties of Naproxen-Arginine-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin ternary system. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v.59, p. 99-106, 2005.

MURA, P.; ZERROUK, N.; FAUCCI, M.T.; MAESTRELLI, F.; CHEMTOB, C. Comparative study of ibuprofen complexation with amorphous β -cyclodextrin derivatives in solution and in solid state. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v.54, p. 181-191, 2002.

NACSA, A.; AMBRUS, R.; BERKESI, O.; SZABÓ-RÉVÉZ, P.; AIGNER, Z. Water-soluble loratadine inclusion complex: Analytical control of the preparation by microwave irradiation. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 48, p. 1020-1023, 2008.

NACSA, A.; BERKESI, O.; SZABÓ-RÉVÉSZ, P.; AIGNER, Z. Achievement of pH-independence of poorly-soluble, ionizable loratadine by inclusion complex formation

with dimethyl- β -cyclodextrin. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, v. 64, p. 249–254, 2009.

NAGARSENKER, M.S.; JOSHI, M.S. Celecoxib-cyclodextrin systems: characterization and evaluation of in vitro and in vivo advantage. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, v. 31, p. 169-178, 2005.

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

OBAIDAT, A.A.; KHANFAR, R.A.; KHAWAM, M.N. The effect of β -cyclodextrin on the solubility and dissolution rate of meloxicam and investigation of the driving force for complexation using molecular modeling. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, v. 63, p. 273–279, 2009.

OMAR, L.; EL-BARGHOUTH, M.I.; MASOUD, N.A.; ABDOH, A.A.; AL-OMARI, M.M.; ZUGHUL, M.B.; BADWAN, A.A. Inclusion complexation of loratadine with natural and modified cyclodextrins :phase solubility and thermodynamic studies. *J. Solution Chem.*, v. 36, p. 605-616, 2007.

ONYEJI, C.O.; OMORUYI, S.I.; OLADIMEJI, F.A. Dissolution properties and characterization of halofantrine-2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin binary systems. *Pharmazie*, v. 62, p. 858-863, 2007.

PATEL, H.M.; SUHAGIA, B.N.; SHAH, S.A.; RATHOD, I.S.; PARMAR, V.K. Preparation and characterization of etoricoxib- β -cyclodextrin complexes prepared by the kneading method. *Acta Pharm.*, v. 57, p. 351-359, 2007.

PATEL, R.P.; PATEL, M.M. Solid-state characterization and dissolution properties of lovastatin hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex. *Pharm. Tech.*, v. 31, p. 72-82, 2007.

PATIL, A.L.; PORE, Y.V.; KUCHEKAR, B.S.; LATE, S.G. Solid-state characterization and dissolution properties of bicalutamide- β -cyclodextrin inclusion complex. *Pharmazie*, v. 63, p. 282-285, 2008.

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

RAJABI, O.; TAYYARI, F.; SALARI, R.; TAYYARI, S.F. Study of interaction of spironolactone with hydroxypropyl- β -cyclodextrin in aqueous solution and in solid state. *J. Mol. Struct.*, v. 878, p. 78-83, 2008.

RIBEIRO, L.S.S.; FERREIRA, D.C.; VEIGA, F.J.B. Physicochemical investigation of the effects of water-soluble polymers on vinpocetine complexation with β -cyclodextrin and its sulfobutyl ether derivate in solution and solid state. *Eur. J. Pharm. Sci.*, v. 20, p. 253-266, 2003.

RODE, T.; FRAUEN, M.; MÜLER, B.W.; DÜSING, H.J.; SCHONROCK, U.; MUNDT, C.; WENCK, H. Complex formation of sericoside with hydrophilic cyclodextrins: improvement of solubility and skin penetration in topical emulsion based formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v.55, p. 191-198, 2003.

RODRIGUEZ-PEREZ, A.I.; RODRIGUEZ-TENREIRO, C.; ALVAREZ-LORENZO, C.; TABOADA, P.; CONCEIRO, A.; TORRES-LABANDEIRA, J.J. Sertaconazole / hydroxypropyl- β -cyclodextrin complexation: isothermal titration calorimetry and solubility approaches. *J. Pharm. Sci.*, v.95, p. 1751-1762, 2006.

ROGERS, T.L.; NELSEN, A.C.; HU, J.; BROWN, J.N.; SARKARI, M.; YOUNG, T.J.; JOHNSTON, K.P.; WILLIAMS III, R.O. A novel particle engineering technology to enhance dissolution of poorly water soluble drugs: spray-freezing into liquid. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v.54, p. 271-280, 2002.

SAGIRAJU, S.; JURISIC, B. NMR spectroscopic study of cyclodextrin inclusion complexes with A-007 prodrugs. *Carbohydr. Res.*, v.343, p. 1180-1190, 2008.

SATHIGARI, S.; CHADHA, G.; LEE, Y.H.P.; WRIGHT, N.; PARSONS, D.L.; RANGARI, V.K.; FASINA, O.; BABU, R.J. Physicochemical characterization of efavirenz-cyclodextrin inclusion complexes. *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, v. 10, p. 81:7, 2009.

SHAH, M.; KAREKAR, P.; SANCHETI, P.; VYAS, V.; PORE, Y. Effect of PVP K30 and/or L-Arginine on Stability Constant of Etoricoxib-HP β CD Inclusion Complex: Preparation and Characterization of Etoricoxib-HP β CD Binary System. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, v. 35, p. 118-129, 2009.

SHINDE, V.R.; SHELAKHE, M.R.; SHETTY, S.S.; CHAVAN-PATIL, A.B.; PORE, Y.V.; LATE, S.G. Enhanced solubility and dissolution rate of lamotrigine by inclusion complexation and solid dispersion technique. *J. Pharm. Pharmacol.*, v. 60, p. 1121-1129, 2008.

SINHA, V.R.; ANITHA, R.; GHOSH, S.; AMITA; KUMRIA, R.; BHINGE, J.R.; KUMAR, M. Physicochemical characterization and in vitro dissolution behaviour of celecoxib- β -cyclodextrin inclusion complexes. *Acta Pharm.*, v. 57, p. 47-60, 2007.

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

SRI, K.V.; KONDAIAH, A.; RATNA, J.V.; ANNAPURNA, A. Preparation and characterization of quercetin and rutin cyclodextrin inclusion complexes. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, v. 33, p. 245-253, 2007.

STANCANELLI, R.; FICARRA, R.; CANNAVÀ, GUARDO, M.; CALABRÒ, M.L.; FICARRA, P.; OTTANÀ, R.; MACCARI, R.; CRUPI, V.; MAJOLINO, D.; VENUTI, V. UV-vis and FTIR-ATR characterization of 9-fluorenon-2-carboxyester/ (2-

hydroxypropyl)- β -cyclodextrin inclusion complex. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 47, p. 704-709, 2008.

TATAI, A.; AIGNER, Z.; EROS, I.; KATA, M. Preparation and investigation of mixtures containing lidocaine base and β -cyclodextrin. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, v. 59, p. 105–113, 2007.

TANERI, F.; GÜNERI, T.; AIGNER, Z.; BERKESI, O.; KATA, M. Thermoanalytical studies on complexes of clotrimazole with cyclodextrins. *J. Therm. Anal. Calorim.*, v. 76, p. 471-9, 2004.

TEIXEIRA, L.R.; SINISTERRA, R.D.; VIEIRA, R.P.; SCARLATELLI-LIMA, A.; MORAES, M.F.D.; DORETTO, M.C.; DENADAI, A.M.; BERALDO, H. An inclusion compound of the anticonvulsant sodium valproate into α -cyclodextrin: Physico-chemical characterization. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, v. 54, p. 133–138, 2006.

TEWES, F.; BRILLAULT, J.; COUET, W.; OLIVIER, J.C. Formulation of rifampicin–cyclodextrin complexes for lung nebulization. *J. Controlled Release*, v. 129, p. 93-99, 2008.

TOROPAINEN, T.; VELAGA, S.; HEIKKILÄ, T.; MATILAINEN, L.; JARHO, P.; CARLFORS, J.; LEHTO, V.P.; JÄRVINEN, T.; JÄRVINEM, K. Preparation of budesonide/ γ -cyclodextrin complexes in supercritical fluids with a novel SEDS method. emulsion based formulations. *J. Pharm. Sci.*, v.95, p. 2235-2245, 2006.

TROTTA, F.; ZANETTI, M.; CAMINO, G.; Thermal degradation of cyclodextrins. *Polym. Degrad. Stab.*, v. 69, p. 373-379, 2000.

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

VEIGA, F.J.B.; PECORELLI, C.C.M.F.; RIBEIRO, L.S.S. *As ciclodextrinas na tecnologia farmacêutica*. Minerva Coimbra Editora. 2006.

VEIGA, M.D.; MERINO, M. Interactions of oxyphenbutazone with different cyclodextrins in aqueous medium and in the solid state. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 28, p. 973-982, 2002.

WANG, J.; CAI, Z. Investigation of inclusion complex of miconazole nitrate with β -cyclodextrin. *Carbohydr. Polym.*, v. 72, p. 255-260, 2008.

WANG, S.; DING, Y.; YAO, Y. Inclusion complexes of fluorofenidone with β - cyclodextrin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, v. 35, p. 808-13, 2009.

WANG, Z.; DENG, Y.; SUN, S.; ZHANG, X. Preparation of hydrophobic drugs cyclodextrin complex by lyophilization monophasic solution. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, v. 32, p. 73-83, 2006.

WEN, X.; LIU, Z.; ZHU, T. Mass spectrometry and molecular modeling studies on the inclusion complexes between α , β -cyclodextrins and simvastatin. *Chem. Phys. Lett.*, v. 405, p. 114-117, 2005.

YAN, Z.; XU, W.; SUN, J.; LIU, X.; ZHAO, Y.; SUN, Y.; ZHANG, T.; HE, Z. Characterization and in vivo evaluation of an inclusion complex of oridonin and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, v. 34, p. 632-641, 2008.

YANG, X.; KE, W.; ZI, P.; LIU, F.; YU, L. Detecting and identifying the complexation of nimodipine with hydroxypropyl- β -cyclodextrin present in tablets by Raman spectroscopy. *J. Pharm. Sci.*, v. 97, p. 2702-2719, 2008.

YANG, Z.X.; CHEN, Y.; LIU, Y. Inclusion complexes of bisphenol A with cyclomaltoheptaose (β -cyclodextrin): solubilization and structure. *Carbohydr. Res.*, v. 343, p. 2439-2442, 2008.

YUAN, C.; JIN, Z.; XU, X.; ZHUANG, H.; SHEN, W. Preparation and stability of the inclusion complex of astaxanthin with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Food Chem.*, v. 109, p. 264-268, 2008.

ZHANG, X.; ZHANG, Y.; ZHONG, D.; CHEN, Y.; LI, S. Investigation and Physicochemical characterization of clarithromycin-citric acid-cyclodextrins ternary complexes. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, v. 33, p. 163-171, 2007.

ZHANG, X.; WU, D.; LAI, J.; LU, Y.; YIN, Z.; WU, W. Piroxicam/2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin Inclusion Complex Prepared by a New Fluid-Bed Coating Technique. *J. Pharm. Sci.*, v. 98, p. 665-675, 2009.

ZHANG, X.; ZOU, M.; LI, S.; CHEN, X.; ZHONG, D. Bioavailability of clarithromycin cyclodextrin ternary complexes upon oral administration to healthy beagle dogs. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, v. 34, p. 163-71, 2008.

ZHU, X.L.; WANG, H.B.; CHEN, Q.; YANG, W.C.; YANG, G.F. Preparation and characterization of inclusion complex of iprodione and β -cyclodextrin to improve fungicidal activity. *J. Agric. Food Chem.*, v. 55, p. 3535-3539, 2007.

ZOPPI, A.; QUEVEDO, M.A.; LONGHI, M.R. Specific binding capacity of β -cyclodextrin with cis and trans enalapril: Physicochemical characterization and structural studies by molecular modeling. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 16, p. 8403-8412, 2008.

Capítulo 2

Obtenção e caracterização de complexos binários de sinvastatina e ciclodextrinas

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi obter complexos de sinvastatina a partir da α , β , γ , e hidroxipropil- β ciclodextrinas (CDs), com a finalidade de aumentar a solubilidade do fármaco e selecionar a CD mais adequada para este fim. Para tanto, após o preparo dos complexos, utilizando-se, para secagem, estufa com circulação forçada de ar, foram empregados os seguintes ensaios para sua caracterização: solubilidade, DSC, TG e difração de raios – X. Adicionalmente, foi realizada a modelagem molecular com simulações de dinâmica molecular e o principal critério adotado para a análise da formação de complexos de inclusão, foi a energia total do sistema. O complexo com γ CD parece ser o mais adequado para a complexação com a sinvastatina, pois, mostrou-se com menor energia na modelagem molecular, ou seja, o com maior estabilidade, além de ter apresentado uma nova fase sólida na difração de raios – X, indicando uma possível complexação.

1. Introdução

Para que um fármaco seja absorvido, é necessário que ocorra sua dissolução no trato gastrointestinal e, dessa forma, a absorção de fármacos pouco solúveis pode ser lenta e incompleta, prejudicando sua biodisponibilidade. Atualmente algumas técnicas estão sendo utilizadas com o objetivo de melhorar a solubilidade dos fármacos, dentre as quais se destacam a adição de agentes solubilizantes, microemulsões, dispersões sólidas e a complexação com ciclodextrinas (STEGEMANN et al., 2007, CARRIER; MILLER; AHMED, 2007).

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos cuja estrutura é formada por seis (α -ciclodextrina), sete (β -ciclodextrina) ou oito (γ -ciclodextrina) unidades de glicose, dispostas de maneira que a molécula assuma forma de um cilindro. A cavidade das ciclodextrinas possui caráter hidrofóbico, enquanto a sua superfície tem caráter hidrofílico. Essa propriedade permite que a solubilidade de moléculas hospedeiras hidrofóbicas seja aumentada através da formação de complexos de inclusão (VEIGA; PICORELLI; RIBEIRO, 2006; VALLE, 2004).

Os complexos de inclusão podem ser obtidos por diferentes métodos tais como coprecipitação, coevaporação, neutralização, liofilização, *spray drying*, malaxagem, moagem e mediante o emprego da tecnologia de fluido supercrítico. A formação dos complexos se dá por intermédio de ligações de van der Waals ou de hidrogênio e os principais fatores limitantes para a formação dos complexos são a compatibilidade do tamanho, geometria e polaridade da ciclodextrina com a molécula hóspede (VEIGA; PICORELLI; RIBEIRO, 2006).

Por outro lado, as estatinas são amplamente utilizadas devido à sua segurança e eficácia no tratamento de hipercolesterolemia, uma vez que estas moléculas atuam inibindo a HMG-CoA (3hidroxi-3metilglutaril coenzima A), limitando a biossíntese do colesterol. Além de serem utilizadas como antilipêmicas, as estatinas previnem doenças cardiovasculares, modificam a resposta inflamatória, reduzem proliferação celular do músculo liso e acúmulo de colesterol (SCHACHTER, 2004).

A sinvastatina ($C_{25}H_{38}O_5$) é um fármaco de peso molecular 418,57, com ponto de fusão de 135 a 138° C e praticamente insolúvel em água (0,03 mg/mL) (MERCK index, 2006). É administrada na forma de um pró-fármaco que é hidrolisado por

enzimas, formando seu hidróxi-ácido ativo. Sua biodisponibilidade é de 5% e liga-se a proteínas plasmáticas de 95 a 98% (SCHACHTER, 2004).

Muito embora já existam estudos onde a sinvastatina foi complexada com ciclodextrinas na tentativa de melhorar a biodisponibilidade e estabilidade do fármaco (WEN; LIU; ZHU, 2005 e JUN et al., 2007), não existem relatos acerca da utilização de várias ciclodextrinas para escolha da mais adequada para complexação com este fármaco em especial.

Deste modo, o presente trabalho tem como objetivo obter complexos de sinvastatina a partir da α , β , γ e hidróxi-propil- β -ciclodextrina, com a finalidade de melhorar a solubilidade aquosa do fármaco e estabelecer a ciclodextrina mais adequada para tal propósito.

2. Material e Métodos

2.1. Preparo dos complexos

Foram utilizadas a α -ciclodextrina (α CD) – Cavamax W6, β -ciclodextrina (β CD) - Cavamax W7, γ -ciclodextrina (γ CD) - Cavamax W8 (ISP Technologies INC, Waterford, MI, EUA), hidróxi-propil- β -ciclodextrina (HP β CD) (Chemunion Química LTDA., Sorocaba, SP, Brasil) e sinvastatina (SNV) (Biocon, Bangalore, Índia).

Os complexos foram obtidos utilizando-se 1 g de SNV e 2,322 g de α CD; 2,712 g de β CD; 3,099g de γ CD ou 3,345g de HP β CD. A quantidade de ciclodextrina foi calculada considerando-se a proporção estequiométrica de 1:1. O fármaco e a ciclodextrina foram suspensos, respectivamente, em 10 e 15 mL de água e, em seguida, as suspensões foram reunidas em um mesmo recipiente e submetidas à agitação por 48 horas. A secagem dos complexos foi realizada em estufa com circulação forçada de ar (Fabbe-Primar Industrial LTDA., São Paulo, SP, Brasil) a 40° C por 24 horas.

Para efeito de comparação, foram, ainda, preparadas misturas físicas (MFs) na proporção estequiométrica fármaco:ciclodextrina de 1:1.

2.2. Caracterização dos complexos

2.2.1. Solubilidade em água

Um excesso de complexo foi colocado em 20 mL de água em recipientes de plástico com tampa rosqueada e mantidos sob agitação por 72 horas, em um agitador tipo orbital Tecnal TE – 420 (Piracicaba, SP, Brasil), com velocidade de agitação de 150 rpm e a temperatura de 37°C. Após o período de agitação, as amostras foram filtradas com filtros Millex HV (HPDF) de 0,45 microns (Millipore, Carrigtwohill, Irlanda), diluídas adequadamente, e quantificadas através de espectrofotômetro Cary 50 UV-Vis (Varian, Cary, NC, EUA), em cubeta de quartzo de 1,0 cm e λ de 240 nm.

2.2.2. Calorimetria exploratória diferencial

A caracterização por calorimetria exploratória diferencial (DSC) foi realizada empregando-se equipamento TA-2920 (TA-Instruments®, New Castle, DE, EUA) no intervalo de temperatura de 25 a 300° C, utilizando-se cápsula de alumínio selada, com massa de amostra de aproximadamente 3,0 mg, razão de aquecimento de 10° C min⁻¹ e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL min⁻¹.

2.2.3. Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica (TG) foi realizada em equipamento TA-2950 (TA-Instruments®, New Castle, DE, EUA) na faixa de 25 a 500° C, utilizando-se cadinho de platina, massa de amostra de aproximadamente 15,0 mg, razão de aquecimento de 10° C min⁻¹ e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 100 mL min⁻¹.

2.2.4. Difração de raios-X

Os padrões de difração de raios-X (DRX) da SNV, ciclodextrinas e complexos foram obtidos no equipamento Rigaku RINT2000 (Tóquio, Japão) com voltagem de 42kV, corrente de 120 mA, monocromador curvo de grafite no feixe divergente, anodo de cobre nos comprimentos de onda $K\alpha_1 = 1.55056 \text{ \AA}$ e $K\alpha_2 = 1.5444 \text{ \AA}$ e

$I\alpha_2/I\alpha_1$ de 0,5. As análises foram realizadas à temperatura ambiente e varredura passo a passo com $\Delta 2\theta$ de $0,02^\circ$, na faixa entre 3° e 30° , com as fendas de divergência e espalhamento ajustadas com 0,25 graus, com abertura horizontal de divergência de 5 mm e recepção de 0,3 mm.

2.2.5. Modelagem molecular

Os modelos tridimensionais da α CD, β CD e γ CD foram construídos no módulo *Build* do programa HyperChem 7.5 (Hypercube, Inc., 2003) e foram consideradas como geometrias de referência as coordenadas cartesianas das estruturas cristalografadas depositadas no *Protein Data Bank* (PDB) sob os códigos de entrada 2zym (resolução 1,80 Å) (MATSUMOTO et al, 2009), 1dmb (resolução 1,80 Å) (SHARFF, RODSETH, QUIOCHO, 1993) e 1d3c (resolução 1,80 Å) (UITDEHAAG et al., 1999), respectivamente.

O modelo tridimensional da HP β CD foi construído a partir da estrutura tridimensional da β CD (1dmb) (SHARFF, RODSETH, QUIOCHO, 1993). O modelo tridimensional do fármaco sinvastatina foi construído a partir da geometria do fármaco no complexo 1hw9 (resolução 2,33 Å) (ISTVAN & DEISENHOFER, 2001) depositado no PDB.

As geometrias de cada CD e do fármaco, separadamente, foram otimizadas em campo de força empírico MM+ implementado no HyperChem 7.5 (Hypercube, Inc., 2003), sem quaisquer restrições. As cargas atômicas parciais foram calculadas com método semi-empírico PM3 (*Parameterized Model number 3*) (STEWART, 1989). Neste estudo, apenas uma molécula de SNV foi ancorada em cada modelo de CD em apenas uma orientação, descrita por Wen e colaboradores (2005).

Os modelos dos complexos fármaco-CD foram otimizados em campo de força MM+ (HyperChem 7.5, Hypercube, Inc., 2003) e as cargas atômicas parciais calculadas em método quântico semi-empírico PM3 (STEWART, 1989). O programa MOLSIM 3.2 (DOHERTY, 2000; The Chem21 Group, Inc.) foi empregado para minimização de energia e simulações de dinâmica molecular (DM).

Os métodos de minimização de energia ou otimização de geometria utilizados com o programa MOLSIM 3.2 foram o de declive máximo, com 500 iterações e o de gradientes conjugados com 20.000 iterações. O critério de convergência foi de 0,01

kcal/mol. As simulações de DM foram desenvolvidas em 1.000 passos, cada passo de 0,03 ps. Arquivos trajetória foram salvos a cada 100 passos, resultando em um perfil de amostragem conformacional de 10 confômeros para cada complexo fármaco-CD.

A constante dielétrica utilizada foi de 3,5, que simula o ambiente estrutural e dinâmico de membranas biológicas. O esquema de temperatura de simulação utilizado foi de 298 K (25 °C) e 313 K (40 °C).

Os confômeros de menor energia mínima foram selecionados de cada simulação de DM e, foram calculadas ainda, as contribuições de energia de solvatação e de ligações de H.

A energia total do sistema (E_{total}) indica a estabilidade termodinâmica do complexo fármaco-CD. Esta energia corresponde à soma das seguintes contribuições de energia calculadas nas simulações de DM: deformação axial ou de estiramento (E_{stretch}), deformação angular (E_{bend}), deformação torsional (E_{tors}), eletrostática (E_{charge}), van der Waals (E_{vdW}), Lennard-Jones ou tipo 1-4 ($E_{1,4}$), solvatação (E_{solv}), ligação H (E_{Hb}) e as contribuições intermoleculares de van der Waals (E_{intervdW}) e eletrostática ($E_{\text{intercharge}}$).

Neste estudo preliminar, onde apenas uma molécula de fármaco em uma orientação no complexo com as diferentes CDs foi considerada, a energia total do sistema foi o principal critério na análise do complexo energeticamente mais favorável.

3. Resultados e Discussão

A solubilidade aquosa do fármaco foi incrementada na presença das CDs, tanto na forma de misturas físicas, quanto na forma supostamente complexada, conforme demonstrado na Figura 2.1. O melhor valor de solubilidade foi registrado para o complexo com γ CD (0,0186 mg mL⁻¹), próximo ao valor da mistura física (0,0181 mg mL⁻¹) o que representa um aumento de cerca de 3,5 vezes na solubilidade da SNV.

Figura 2.1 - Solubilidade em água (mg mL^{-1}) da SNV, complexos e misturas físicas. As barras verticais indicam os respectivos valores de desvio padrão.

Assim, o aumento da solubilidade da SNV observado pode ser resultado do efeito solubilizante atribuído às CDs, que, de acordo com Loftsson, Masson e Brewster (2004), são capazes de se unirem na forma de agregados, assumindo a estrutura micelar e, deste modo, atuando sobre moléculas hidrofóbicas. Tal efeito pode justificar o aumento da solubilidade das misturas físicas e dos complexos de β CD, γ CD e HP β CD.

Do mesmo modo, as curvas de DSC obtidas para os complexos (Figura 2.2) apresentaram pico de fusão do fármaco semelhante ao da mistura física (Tabela 2.2), o que, adicionalmente parece indicar que não ocorreu a formação de complexos de inclusão, uma vez que não houve desaparecimento ou redução do pico. Tal resultado está de acordo com os valores de solubilidade onde os complexos não se apresentaram mais solúveis que a mistura física.

Figura 2.2 - Curvas DSC da SNV, ciclodextrinas, misturas físicas e complexos obtidas utilizando-se cápsula de alumínio selada, com massa de amostra de aproximadamente 3,0 mg, razão de aquecimento de $10^{\circ} \text{C min}^{-1}$ e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL min^{-1} .

Tabela 2.2 - Valores de temperatura ($^{\circ}\text{C}$) referentes à desidratação das CDs e fusão do fármaco obtidas a partir das respectivas curvas DSC.

Amostra	Desidratação da CD	Fusão do fármaco
SNV	---	140,19
α CD	75,38; 106,65; 132,98	---
β CD	104,55	---
γ CD	105,08	---
HP β CD	88,23	---
MF (α CD+SNV)	78,33; 109,28	139,69
MF (β CD+SNV)	101,13	141,09
MF (γ CD+SNV)	90,22	140,72
MF (HP β CD+SNV)	97,87	139,56
Complexo α CD-SNV	82,01; 108,07; 132,89	139,47
Complexo β CD-SNV	116,12	139,59
Complexo γ CD-SNV	98,47	140,21
Complexo HP β CD-SNV	81,20	139,70

Observando-se a curva TG (Figura 2.3) da SNV, a perda de massa iniciou-se em 246,89° C e as curvas dos complexos apresentaram o início da degradação em temperaturas mais elevadas (Tabela 2.3), o que parece ser um indicativo da formação de complexos de inclusão.

Figura 2.3 - Curvas TG da SNV, ciclodextrinas, misturas físicas e complexos obtidas utilizando-se cadinho de platina, com massa de amostra de aproximadamente 15,0 mg, razão de aquecimento de 10° C min⁻¹ e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 100 mL min⁻¹.

Tabela 2.3 - Valores de temperatura (°C) de início de degradação, perda de massa de umidade (%) e perda de massa na degradação (%) da SNV, ciclodextrinas, MFs e complexos obtidos a partir das curvas TG.

Amostra	Início da degradação	1ª perda de massa (Umidade)	2ª perda de massa (Degradação)
SNV	236,55	---	81,44
αCD	302,33	10,08	74,22
βCD	322,66	13,36	73,97
γCD	310,16	8,629	76,74
HPβCD	311,06	10,32	81,09
MF (αCD+SNV)	296,40	7,079	79,14

MF (β CD+SNV)	316,61	10,52	68,09
MF (γ CD+SNV)	261,62	7,337	75,55
MF (HP β CD+SNV)	243,80	4,328	84,52
Complexo α CD-SNV	278,48	8,858	77,97
Complexo β CD-SNV	265,07	10,99	72,31
Complexo γ CD-SNV	268,12	11,08	72,63
Complexo HP β CD-SNV	257,44	6,477	79,49

Na Figura 2.4 estão representados os padrões de difração de raios-x da SNV, das CDs e dos complexos.

Figura 2.4 - Difratomogramas da SNV, CDs e complexos obtidos à temperatura ambiente, varredura passo a passo com $\Delta 2\theta$ de $0,02^\circ$, na faixa entre 3° e 30° . (A) α CD, (B) β CD, (C) γ CD e (D) HP β CD.

Os difratogramas dos complexos preparados com β CD e HP β CD apresentam picos característicos das ciclodextrinas e do, indicando que ambos encontram-se na amostra. Além disso, fármaco não ocorre a formação de novos picos que representariam uma nova fase sólida, o que, mais uma vez é indicativo de que não há formação de complexos de inclusão.

Nos difratogramas dos complexos preparados com α CD e γ CD, houve a formação de novos picos (Figura 2.5). No caso dos complexos com a α CD, devido à alta sobreposição dos picos, não é possível concluir se uma nova fase está se formando ou se os picos são resultado de orientação preferencial da α CD no complexo ou na amostra pura.

Nos complexos com γ CD, aparecem alguns picos de alta intensidade que não correspondem àqueles observados para a CD e SNV, o que indica a formação de uma nova estrutura. Entretanto, como ainda é possível visualizar os picos do fármaco, pode ter ocorrido uma complexação parcial, ou seja, parte do fármaco foi complexada e aparece como uma nova fase sólida, mas existe, ainda, fármaco e CD livres no sistema.

Figura 2.5 - Difratograma ampliado da SNV, ciclodextrinas e complexos. As setas indicam a possível formação de uma nova fase sólida.

A estabilização dos complexos SNV-CD parece ocorrer por meio de interações hidrofóbicas (interior da CD, estrutura carbônica) e ligações de H (WEN, LIU, ZHU, 2005). De acordo com os confôrmeros de menor energia mínima dos complexos SNV-CDs selecionados nas simulações de DM de 30 ps a 298 K (Figura 2.6) há um incremento de ligações de H nos complexos com a β CD e HP β CD (2 ligações H) em relação à α CD (1 ligação H). Quando a cavidade é maior, como no caso da γ CD, há maior dificuldade de se estabelecer ligações de H entre o fármaco e a CD devido à acomodação da conformação da SNV no interior da CD (mais distante). As ligações de H são interações ou forças intermoleculares fracas (cerca

de $1\text{-}10\text{ kcal.mol}^{-1}$) e, portanto, para que um sistema se estabilize com ligações H há necessidade que muitas delas se estabeleçam.

Figura 2.6 - Confôrmeros de menor energia mínima provenientes das simulações de DM de 30 ps à 298 K dos possíveis complexos de SNV com (A) α CD, (B) β CD, (C) γ CD e (D) HP β CD. As setas indicam as ligações de hidrogênio formadas entre a SNV e a CD.

Tabela 2.4 - Contribuições de energia provenientes das simulações de DM à temperatura de 298 K para cada complexo SNV-CD.

	Complexo α CD-SNV (kcal.mol ⁻¹)	Complexo β CD-SNV (kcal.mol ⁻¹)	Complexo γ CD-SNV (kcal.mol ⁻¹)	Complexo HP β CD-SNV (kcal.mol ⁻¹)
E_{stretch}	11,90	12,85	16,40	14,30
E_{bend}	54,85	58,71	74,75	64,60
E_{torsion}	33,98	40,21	41,16	41,39
E_{intervdW}	-18,49	-26,98	-27,36	-27,15
E_{vdW}	-58,20	-72,68	-83,51	-91,01
$E_{1,4}$	132,14	151,52	173,57	151,45
E_{charge}	-31,48	-36,75	-41,89	-53,63
$E_{\text{intercharge}}$	-0,07	-6,20	12,01	-8,07
E_{Hb}	-502,31	-555,23	-867,14	-572,92
E_{solv}	-11,75	-11,29	-20,91	-2,34
E_{total}	-389,43	-445,84	-722,91	-483,38

E_{stretch} = contribuição de energia intramolecular de deformação axial ou de estiramento;

E_{bend} = contribuição de energia intramolecular de deformação angular;

E_{torsion} = contribuição de energia intramolecular de deformação torsional;

E_{intervdW} = contribuição de energia intermolecular de van der Waals;

E_{vdW} = contribuição de energia intramolecular de van der Waals;

$E_{1,4}$ = contribuição de energia intramolecular do tipo 1-4;

E_{charge} = contribuição de energia intramolecular eletrostática;

$E_{\text{intercharge}}$ = contribuição de energia eletrostática intermolecular;

E_{Hb} = contribuição de energia intramolecular de ligação de H;

E_{solv} = contribuição de energia intramolecular de solvatação;

E_{total} = energia total do sistema.

Cabe ressaltar, que embora os complexos tenham se mantido estruturalmente nas simulações de DM de 30 ps (Figura 2.6), quando simulações maiores foram desenvolvidas (100 ps, por exemplo) os sistemas “explodiram”, ou seja, não mantiveram a integridade estrutural como complexos.

Os resultados da Tabela 2.4 indicam que o complexo mais favorável energeticamente nas simulações de 30 ps é o SNV- γ CD, que apresentou menor valor de E_{total} . Isto indica que esse complexo seria estabilizado principalmente por interações hidrofóbicas, pois a distância entre o fármaco e a estrutura da CD é maior

devido ao maior diâmetro do orifício da γ CD, dificultando mais a formação de ligações H.

4. Conclusão

A partir dos resultados obtidos, o que se verifica é que as diferentes CDs são capazes de incrementar a solubilidade aquosa da SNV, mas esta melhora não se deve à formação de complexos de inclusão, conforme demonstrado nos ensaios de DSC, TG, DRX e sim ao efeito solubilizante das CDs sobre estruturas de natureza lipofílica. A modelagem molecular mostrou que é possível a formar os complexos de inclusão, mas que, no entanto, estes complexos não são estáveis. Os espectros de DRX do complexo SNV- γ CD indicam uma possível complexação e a energia total deste sistema também foi a mais baixa na modelagem molecular, isto pode justificar o melhor resultado de solubilidade obtido para este caso específico.

5. Referências Bibliográficas

CARRIER, R.L.; MILLER, L.A.; AHMED, I. The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. *J. Controlled Release*, v. 123, p. 78-99, 2007.

DOHERTY, D. *MOLSIM: Molecular Mechanics and Dynamics Simulation Software, User's Guide*; version 3,2; Chem21 Group: Lake Forest, IL, 2000.

HyperChem Program Release 7.5 for Windows; Hybercube Inc.: Gainesville, FL, 2003.

ISTVAN, E.S.; DEISENHOFER, J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Sci.*, v. 292, p.1160-1164, 2001.

JUN, S.W.; KIM, M.S.; KIM, J.S.; PARK, H.J.; LEE, S., WOO, J.S.; HWANG, S.J. Preparation and characterization of simvastatin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex using supercritical antisolvent (SAS) process. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v.66, p. 413-421, 2007.

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

MATSUMOTO, M.; YAMADA M.; KURAKATA, Y.; YOSHIDA H.; KAMITORI, S.; NISHIKAWA A.; TONOZUKA, T. Crystal structures of open and closed forms of cyclo/maltodextrin-binding protein. *Febs J.*, v. 276, p. 3008-3019, 2009.

MERCK index. 14.ed. Withehouse Station, 2006.p.1471-1472.

SCHACHTER, M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, v. 19, p. 117-125, 2004.

SHARFF, A.J.; RODSETH, L.E.; QUIOCHO, F.A. Refined 1.8-A structure reveals the mode of binding of beta-cyclodextrin to the maltodextrin binding protein. *Biochem.* v.32, p.10553-10559,1993.

STEGEMANN, S.; LEVEILLER, F.; FRANCHI, D.; DE JONG, H.; LINDÉN, H. When poor solubility becomes an issue: From early stage to proof of concept. *Eur. J. Pharm. Sci.*, v. 31, p. 249-261, 2007.

STEWART, J. J. P. *J. Comput. Chem.*, v. 10, p. 221-264, 1989.

UITDEHAAG, J.C.; KALK K.H.; VAN DER VEEN, B.A.; DIJKHUIZEN L.; DIJKSTRA, B.W. The cyclization mechanism of cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) as revealed by a gamma-cyclodextrin-CGTase complex at 1.8-A resolution. *J. BIOL. CHEM.* v. 274, p. 34868-34876, 1999.

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

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

WEN, X.; LIU, Z.; ZHU, T. Mass spectrometry and molecular modeling studies on the inclusion complexes between α , β -cyclodextrins and simvastatin. *Chem. Phys. Lett.*, v. 405, p. 114-117, 2005.

Capítulo 3

Caracterização de complexos binários de sinvastatina- γ CD e sinvastatina-HP β CD obtidos por diferentes processos

Resumo

O presente trabalho teve como finalidade obter complexos de sinvastatina a partir da γ CD (γ -ciclodextrina) e HP β CD (Hidroxi-propil- β -ciclodextrina) por diferentes métodos, selecionando aqueles que permitam um maior aumento na solubilidade aquosa do fármaco. Após o preparo dos complexos, utilizando-se para secagem a estufa com circulação forçada de ar, coevaporação, liofilização e estufa a vácuo, os complexos foram caracterizados através da solubilidade, DSC, TG e difração de raios – X. Todos os complexos melhoraram a solubilidade da sinvastatina, mas quando comparados às respectivas misturas físicas, o ganho de solubilidade foi baixo. As curvas DSC indicam que, no máximo, pode ter ocorrido uma complexação parcial em alguns casos, assim como a difração de raios – X, que apesar de apresentar novos picos para alguns complexos de γ CD, ainda apresentou picos característicos do fármaco. O que se verifica é que mesmo o complexo de HP β CD obtido pela coevaporação, que apresentou maior ganho de solubilidade, a complexação do fármaco não foi total.

1. Introdução

As doenças coronarianas são de grande relevância devido ao elevado número de mortes que podem causar, além dos elevados gastos na saúde pública decorrentes de suas complicações. Sabe-se que a maioria dessas doenças são causadas pela aterosclerose, que por sua vez, está relacionada com o acúmulo de lipídios no interior dos vasos sanguíneos (BOUSHRA; MUNTAZAR, 2006).

As estatinas são o tratamento de escolha para a hipercolesterolemia e também conhecidamente eficazes na prevenção de doenças cardiovasculares. Apesar de seus efeitos colaterais incluírem miopatias, são consideradas seguras e por isso, são amplamente utilizadas. As estatinas atuam na inibição da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A, limitando a biossíntese do colesterol (SCHACHTER, 2004; SHITARA, SUGIYAMA, 2006).

Dentre as estatinas está a sinvastatina (SNV), um pró-fármaco que é hidrolisado por enzimas, formando seu hidróxi-ácido ativo. Sua biodisponibilidade é de 5% e liga-se a proteínas plasmáticas de 95 a 98% (SCHACHTER, 2004). A SNV ($C_{25}H_{38}O_5$) possui peso molecular 418,57, faixa de fusão de 135 a 138° C e é praticamente insolúvel em água (MERCK index, 2006).

Por outro lado, tendo em vista a importância da solubilidade de fármacos em meios aquosos para uma absorção adequada e consequente concentração plasmática eficaz, algumas técnicas como a complexação com ciclodextrinas, estão sendo utilizadas para melhorar a solubilidade aquosa de fármacos pouco solúveis (STEGEMANN et al., 2007).

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos formados por seis (α CD), sete (β CD) ou oito (γ CD) unidades de glicose, dispostas na forma de um cilindro. Uma vez que a cavidade da CD possui caráter hidrofóbico e a superfície caráter hidrofílico, a solubilidade aquosa de moléculas hidrofóbicas pode ser aumentada com a formação de complexos de inclusão (VALLE, 2004).

Os complexos de inclusão são formados através de ligações de Van der Waals ou de hidrogênio e podem ser obtidos por diferentes métodos tais como coprecipitação, co-evaporação, neutralização, liofilização, secagem por pulverização, malaxagem, moagem e fluido supercrítico (VEIGA; PICORELLI; RIBEIRO, 2006).

O método empregado é determinante para o sucesso da complexação, e, além disso, pode interferir no tamanho de partícula e grau de cristalinidade do material. Essas características, em conjunto, influenciam na solubilidade final dos fármacos e, conseqüentemente, no aumento de biodisponibilidade (CARRIER; MILLER; AHMED, 2007).

Em um trabalho de Jun et al. (2007) foi realizada a complexação da SNV com a HP β CD utilizando a tecnologia de fluido super crítico. Nesse trabalho os autores relatam um aumento de solubilidade aquosa da SNV de 12,17 vezes em relação ao fármaco puro, mostrando a eficiência do método. No entanto, outros processos para a obtenção dos complexos ainda não foram testados.

Deste modo, o presente trabalho tem como finalidade caracterizar complexos de SNV, γ CD e HP β CD (Hidroxi-propil- β -ciclodextrina) obtidos por diferentes métodos, selecionando-se aqueles que permitam um maior aumento na solubilidade aquosa do fármaco.

2. Material e Métodos

2.1. Preparo dos complexos

Foram utilizadas γ CD - Cavamax W8®, (ISP Technologies INC, Waterford, MI, EUA), HP β CD (Chemunion Química LTDA., Sorocaba, SP, Brasil) e SNV (Biocon, Bangalore, Índia)

Os complexos binários foram obtidos a partir da suspensão de 1 g do fármaco em 10 mL de água ou metanol (no caso dos complexos obtidos pela co-evaporação), e da CD em 15 mL de água. As suspensões foram reunidas em um mesmo recipiente e submetidas à agitação por 48 horas.

A secagem dos complexos foi realizada em estufa, por co-evaporação, liofilização ou vácuo. No primeiro caso, os complexos foram colocados diretamente na estufa com circulação forçada de ar (Fabbe-Primar Industrial LTDA., São Paulo, SP, Brasil) a 40° C por 24 horas.

Pelo processo da coevaporação, as soluções foram colocadas no rotaevaporador TE 210 (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil), a 50° C por 30 minutos, para retirada do solvente orgânico e depois transferidas para estufa com circulação

forçada de ar (Fabbe-Primar Industrial LTDA., São Paulo, SP, Brasil) a 40° C por 24 horas.

A liofilização foi realizada congelando-se as soluções por imersão em etanol com gelo seco e em seguida colocando-as no liofilizador modelo SuperModulyo (Thermo Scientific Corporation, Milford, MA, EUA) a -40° C por 24 horas.

A secagem a vácuo foi realizada colocando-se o material por 48 horas em estufa a vácuo (Nova Ética Prods. Equip. Científicos LTDA., Vargem Grande Paulista, SP, Brasil) a 40° C.

Para efeito de comparação, foram, ainda, preparadas misturas físicas (MFs) na proporção estequiométrica fármaco:ciclodextrina de 1:1.

2.2. Caracterização dos complexos

2.2.1. Solubilidade

A solubilidade em água foi determinada adicionando-se excesso de complexo em 20 mL de água em recipientes de plástico com tampa rosqueada e mantidos sob agitação por 72 horas, em um agitador tipo orbital Tecnal TE – 420 (Piracicaba, SP, Brasil), com velocidade de agitação de 150 rpm e a temperatura de 37°C. Após o período de agitação, as amostras foram filtradas com filtros Millex HV (HPDF) de 0,45 microns (Millipore, Carrigtwohill, Irlanda), diluídas adequadamente, e quantificadas através de espectrofotômetro Cary 50 UV-Vis (Varian, Cary, NC, EUA), em cubeta de quartzo de 1,0 cm e λ de 240 nm.

2.2.2. Calorimetria exploratória diferencial

A caracterização por calorimetria exploratória diferencial (DSC) foi realizada empregando-se equipamento TA-2920 (TA-Instruments®, New Castle, DE, EUA) no intervalo de temperatura de 25 a 300° C, utilizando-se cápsula de alumínio selada, com massa de amostra de aproximadamente 3,0 mg, razão de aquecimento de 10° C min⁻¹ e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL min⁻¹.

2.2.3. Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica (TG) foi realizada em equipamento TA-2950 (TA-Instruments®, New Castle, DE, EUA) na faixa de 25 a 500° C, utilizando-se cadinho de platina, massa de amostra de aproximadamente 15,0 mg, razão de aquecimento de 10° C min⁻¹ e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 100 mL min⁻¹.

2.2.4. Difração de raios – x

Os padrões de difração de raios-X (DRX) da SNV, ciclodextrinas e complexos foram obtidos no equipamento Rigaku RINT2000 (Tóquio, Japão) com voltagem de 42kV, corrente de 120 mA, monocromador curvo de grafite no feixe divergente, anodo de cobre nos comprimentos de onda $K\alpha_1 = 1.55056 \text{ \AA}$ e $K\alpha_2 = 1.5444 \text{ \AA}$ e $I_{\alpha_2}/I_{\alpha_1}$ de 0,5.

As análises foram realizadas à temperatura ambiente e varredura passo a passo com $\Delta 2\theta$ de 0,02°, na faixa entre 3° e 30°, com as fendas de divergência e espalhamento foram ajustadas com 0,25 graus, abertura horizontal de divergência de 5mm e recepção de 0,3 mm.

Os complexos que apresentaram melhor solubilidade também foram caracterizados na linha D10B XPD do Laboratório Nacional de Luz Sincrotron-LNLS (Campinas, São Paulo), com $\lambda = 1,23398 \text{ \AA}$, passo de 0,005° e tempo de medida por ponto definida pela contagem do monitor de feixe direto.

3. Resultados e Discussão

A solubilidade em água observada para todos os complexos (Figura 3.1) foi sempre mais elevada, quando comparada àquela registrada para o fármaco não complexado (0,0053 mg mL⁻¹). Observa-se que quando é utilizada a γ CD, o método que proporcionou um maior ganho de solubilidade foi o a secagem em estufa (0,0186 mg mL⁻¹) e no caso da HP β CD, a coevaporação (0,0190 mg mL⁻¹).

Figura 3.1 - Solubilidade em água (mg mL^{-1}) para SNV, complexos e misturas físicas. As barras indicam os respectivos valores de desvio padrão.

O aumento da solubilidade aquosa do fármaco após complexação, em relação ao fármaco puro ou em simples mistura física com a CD correspondente, é forte indício de que houve sucesso na complexação. Assim, o que se verifica a partir dos resultados de solubilidade aqui obtidos é que o ganho de solubilidade em relação ao fármaco puro é de 3,0 (para o complexo obtido co-evaporação com γ CD) a 3,58 vezes (complexo também obtido por co-evaporação utilizando a HP β CD).

Tais resultados parecem promissores, mas quando comparados às respectivas misturas físicas, o ganho de solubilidade passa a ser de apenas 1,13 vezes para o complexo SNV-HP β CD e negativo para SNV- γ CD. Portanto, o que se verifica é que, no máximo, pode ter ocorrido uma complexação parcial em alguns casos e, por outro lado, o efeito solubilizante das CDs, mesmo na forma não complexada fica aqui evidenciado (LOFTSSON; MASSON; BREWSTER, 2004).

As curvas DSC das CDs são características por apresentarem eventos endotérmicos que correspondem à sua desidratação (GIORDANO; NOVAK; MOYANO, 2001). A γ CD (Figura 3.2) apresentou esse pico em $105,08^\circ \text{C}$ e a HP β CD (Figura 3.3) em $88,23^\circ \text{C}$. A curva da SNV foi característica de um material cristalino, com um evento endotérmico bem definido que corresponde à sua fusão em

140,19° C. As misturas físicas correspondem à sobreposição dos resultados obtidos para a ciclodextrina e para o fármaco.

Quando ocorre a formação de complexos de inclusão, espera-se que o evento de fusão do fármaco desapareça (AL OMARI et al., 2009; ARAUJO et al., 2009) ou que diminua, no caso de uma complexação parcial (AL-MARZOUQI et al., 2007). Nas curvas DSC obtidas para os complexos (Figura 3.2 e 3.3) o evento de fusão do fármaco é visível (Tabela 3.1), o que indica a presença de fármaco na forma livre.

Figura 3.2 - Curvas DSC da SNV, γ CD, mistura física e complexos obtidas utilizando-se cápsula de alumínio selada, com massa de amostra de aproximadamente 3,0 mg, razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL min^{-1} .

Figura 3.3 - Curvas DSC da SNV, HP β CD, mistura física e complexos obtidas utilizando-se cápsula de alumínio selada, com massa de amostra de aproximadamente 3,0 mg, razão de aquecimento de 10^o C min⁻¹ e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL min⁻¹.

Tabela 3.1 - Valores dos picos de DSC das temperaturas de desidratção das ciclodextrinas e temperatura de fusão do fármaco.

Amostra	Desidratação da CD (°C)	Fusão do fármaco (°C)
SNV	---	140,19
γ CD	105,08	---
HP β CD	88,23	---
MF (SNV+ γ CD)	101,13	141,09
MF (SNV+ HP β CD)	90,22	140,72
γ CD estufa	98,47	140,21
γ CD co-evaporado	121,04	139,02
γ CD liofilizado	96,44	139,84
γ CD vácuo	123,51	138,56
HP β CD estufa	81,20	139,70
HP β CD co-evaporado	83,71	140,78
HP β CD liofilizado	101,73	139,42
HP β CD vácuo	91,06	139,30

As CDs quando analisadas por TG apresentam uma primeira perda de massa correspondente à evaporação da água adsorvida e de cristalização e uma segunda correspondente à degradação (TROTТА; ZANETTI; CAMINO, 2000). A γ CD apresentou uma perda de umidade de 8,629% e a degradação iniciou-se em 310,16° C, com perda de massa de 76,74% e a HP β CD perdeu 10,32% de água e 81,09% na degradação que iniciou-se em 311,06° C. A SNV apresentou perda de massa apenas resultante de degradação, que iniciou-se em 236,55° C e as misturas físicas correspondem à sobreposição das curvas das CDs e do fármaco.

Na análise das curvas TG (Figuras 3.4 e 3.5), espera-se que a temperatura de início da degradação dos complexos seja mais elevada, quando comparada com o fármaco não complexado (NOVAK et al., 2006; YUAN et al., 2008). As curvas correspondentes aos complexos apresentaram o início da degradação em temperaturas mais elevadas que o fármaco sozinho, com destaque para aqueles obtidos pelo processo de co-evaporação conforme indicado na Tabela 3.2.

Figura 3.4 - Curvas TG da SNV, γ CD, mistura física e complexos obtidas utilizando-se cadinho de platina, com massa de amostra de aproximadamente 15,0 mg, razão de aquecimento de 10° C min⁻¹ e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 100 mL min⁻¹.

Figura 3.5 - Curvas TG da SNV, HP β CD, mistura física e complexos obtidas utilizando-se cadinho de platina, com massa de amostra de aproximadamente 15,0 mg, razão de aquecimento de 10° C min⁻¹ e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 100 mL min⁻¹.

Tabela 3.2 - Valores de temperatura obtidos a partir das curvas TG de início de degradação, perda de massa de umidade e perda de massa na degradação da SNV, ciclodextrinas, MFs e complexos.

Amostra	Início da degradação (°C)	1ª perda de massa Umidade (%)	2ª perda de massa Degradação (%)
SNV	236,55	---	81,44
γ CD	310,16	8,629	76,74
HP β CD	311,06	10,32	81,09
MF (SNV+ γ CD)	261,62	7,337	75,55
MF (SNV+ HP β CD)	243,80	4,328	84,52
γ CD estufa	268,12	11,08	72,63
γ CD co-evaporado	280,14	11,14	73,44
γ CD liofilizado	257,42	5,963	79,88
γ CD vácuo	257,69	11,69	74,36
HP β CD estufa	257,44	6,477	79,49
HP β CD co-evaporado	267,98	7,867	78,65

HP β CD liofilizado	239,69	3,903	83,96
HP β CD vácuo	260,12	6,715	84,51

Nos difratogramas dos complexos preparados com γ CD pela secagem em estufa, coevaporação e estufa a vácuo (Figura 3.6), observa-se a formação de novos picos diferentes da mistura física, da SNV e γ CD. Essa nova fase sólida indica que houve a formação de um cristal diferente do fármaco e da CD, podendo ser indicativo de uma possível complexação (CAPPELLO et al., 2009; SINHA, et al., 2007). Por outro lado, como ainda existem picos característicos do fármaco nos difratogramas do complexo, ainda há SNV livre no sistema.

No caso do complexo preparado com γ CD por liofilização, houve uma redução dos picos, ou seja, diminuição do grau de cristalinidade do material, que não está necessariamente relacionada com o fenômeno da complexação, uma vez que, não houve um aumento significativo da solubilidade aquosa do fármaco.

Os complexos de HP β CD (Figura 3.7), em todos os casos, apresentaram padrão de difração igual à mistura física, ou seja, a sobreposição dos picos da SNV com a banda de CD, o que parece indicar que não houve formação de complexos de inclusão.

Figura 3.6 - Difratograma da SNV, γ CD, MF e complexos obtidos à temperatura ambiente, varredura passo a passo com $\Delta 2\theta$ de $0,02^\circ$, na faixa entre 5° e 30° . As setas indicam a nova fase sólida dos complexos.

Figura 3.7 - Difratoograma da SNV, HP β CD, MF e complexos obtidos à temperatura ambiente, varredura passo a passo com $\Delta 2\theta$ de 0,02°, na faixa entre 5° e 30°.v

Os difratogramas dos complexos com γ CD (secagem em estufa) e HP β CD (co-evaporação), ou seja, aqueles que apresentaram melhor solubilidade, obtidos na linha D10B XPD do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, confirmam os resultados de DRX obtidos anteriormente. O equipamento de alta resolução também revelou a presença de uma nova fase sólida no complexo com γ CD e, no caso do complexo com HP β CD, a semelhança com a mistura física (Figura 3.8).

Figura 3.8 - Difratomogramas das CDs, SNV, MF obtidos na linha D10B XPD do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, com $\lambda = 1,23398 \text{ \AA}$, passo de $0,005^\circ$ e tempo de medida por ponto definida pela contagem do monitor de feixe direto. As setas indicam a nova fase sólida presente no complexo com γ CD.

O que se verifica pelas análises dos complexos de SNV preparados com γ CD ou HP β CD pela secagem em estufa, co-evaporação, liofilização e estufa a vácuo é

que as CDs foram capazes de aumentar a solubilidade aquosa do fármaco, mas que as análises de DSC, TG e DRX mostram que em todos os casos no máximo uma complexação parcial pode ter ocorrido e que o fármaco na forma livre ainda está presente nas amostras.

4. Conclusão

Os resultados aqui obtidos indicam que na presença da γ CD e HP β CD, a solubilidade aquosa da SNV é aumentada em cerca de três vezes, porém, em relação à simples mistura física, o ganho de solubilidade é de apenas 1,13 vezes. Assim, conforme indicado também pela análise térmica e DRX, é provável que ocorra apenas uma complexação parcial do fármaco. Em relação ao método de obtenção dos complexos, os melhores resultados foram obtidos para o complexo contendo HP β CD preparado por coevaporação, cuja solubilidade alcançou 3,58 vezes em relação ao fármaco puro, porém, mesmo nesse caso, o que se verifica é que nem toda SNV foi complexada.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron / Ministério da Ciência e Tecnologia (LNLS / MCT) pela disponibilização da linha D10B XPD para os experimentos de DRX.

6. Referências Bibliográficas

AL-MARZOUQI, A.H.; JOBE, B.; DOWAIDAR, A.; MAESTRELLI, F.; MURA, P. Evaluation of supercritical fluid technology as preparative technique of benzocaine - cyclodextrin complexes – Comparison with conventional methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 43, p. 566-574, 2007.

AL OMARI, M.M.; EL-BARGHOUTH, M.I.; ZUGHUL, M.B.; DAVIES, J.E.D. Dipyrindamole/ β -cyclodextrin complexation: Effect of buffer species, thermodynamics, and guest-host interactions probed by ^1H -NMR and molecular modeling studies. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, v. 64, p. 305–315, 2009.

ARAUJO, M.V.G.; MACEDO O.F.L.; NASCIMENTO C.C.; CONEGERO, L.S.; BARRETO, L.S.; ALMEIDA, L.E.; COSTA-JR, N.B.; GIMENEZ, I.F. Characterization, phase solubility and molecular modeling of α -cyclodextrin/pyrimethamine inclusion complex. *Spectrochim. Acta, Part A*, v. 72, p. 165-170, 2009.

BOUSHRA, N.N.; MUNTAZAR, M. Review article: The role of statins in reducing perioperative cardiac risk: physiologic and clinical perspectives. *Can. J. Anesth.*, v. 53, p. 1126-1147, 2006.

CAPPELLO, B.; DI MAIO, C.; IERVOLINO, M.; MIRO, A.; CALIGNANO, A. Etodolac/cyclodextrin formulations: Physicochemical characterization and in vivo pharmacological studies. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, v. 35, p. 877-886, 2009.

CARRIER, R.L.; MILLER, L.A.; AHMED, I. The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. *J. Controlled Release*, v. 123, p. 78-99, 2007.

CHALLA, R.; AHUJA, A.; ALI, J.; KHAR, R.K. Cyclodextrin in drug delivery: an update review. *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, v. 6, p. E329-E357, 2005.

GIORDANO, F.; NOVAK, C.; MOYANO, J.R. Thermal analysis of cyclodextrin and their inclusion compounds. *Thermochim. Acta*, v. 380, p.123-151, 2001.

JUN, S.W.; KIM, M.S.; KIM, J.S.; PARK, H.J.; LEE, S., WOO, J.S.; HWANG, S.J. Preparation and characterization of simvastatin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex using supercritical antisolvent (SAS) process. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v.66, p. 413-421, 2007.

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

MERCK index. 14.ed. Withehouse Station, 2006.p.1471-1472.

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

SCHACHTER, M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, v. 19, p. 117-125, 2004.

SHITARA, Y.; SUGIYAMA, Y. Pharmacokinetic and pharmacodynamic alterations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors: Drug–drug interactions and interindividual differences in transporter and metabolic enzyme functions. *Pharmacol. Ther.*, v. 112, p. 71-105, 2006.

SINHA, V.R.; ANITHA, R.; GHOSH, S.; AMITA; KUMRIA, R.; BHINGE, J.R.; KUMAR, M. Physicochemical characterization and in vitro dissolution behaviour of celecoxib- β -cyclodextrin inclusion complexes. *Acta Pharm.*, v. 57, p. 47-60, 2007.

STEGEMANN, S.; LEVEILLER, F.; FRANCHI, D.; de JONG, H.; LINDÉN, H. When poor solubility becomes a issue: From early stage to proof of concept. *Eur. J. Pharm. Sci.* v.31, p. 249-261, 2007.

TROTTA, F.; ZANETTI, M.; CAMINO, G.; Thermal degradation of cyclodextrins. *Polym. Degrad. Stab.*, v. 69, p. 373-379, 2000.

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

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

YUAN, C.; JIN, Z., XU, X.; ZHUANG, H.; SHEN, W. Preparation and stability of the inclusion complex of astaxanthin with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Food Chem.*, v. 109, p.264-268, 2008.

Capítulo 4

Obtenção e caracterização de complexos ternários sinvastatina- ciclodextrina-polímeros hidrossolúveis

Resumo

O presente trabalho teve como finalidade obter e caracterizar complexos ternários de sinvastatina, β CD (β -ciclodextrina) e diferentes polímeros, selecionando aqueles que permitam um maior aumento na solubilidade da sinvastatina. Os complexos foram preparados utilizando-se a coevaporação e os polímeros utilizados foram o polietilenoglicol 1500, polietilenoglicol 4000, povidona, copovidona, crospovidona, maltodextrina e hidroxipropil-metil-celulose. A caracterização dos complexos foi realizada através da solubilidade, DSC e TG. Para todos os complexos preparados com a β CD e os diferentes polímeros houve ganho de solubilidade, mas apenas quando foi utilizado a crospovidona e a maltodextrina, existe diferença significativa entre a solubilidade observada para a mistura física e aquela registrada para o complexo. As curvas DSC indicam que ainda existe fármaco na forma livre até mesmo nos complexos que apresentaram maior solubilidade, dessa forma, nenhum dos polímeros utilizados foi capaz de promover uma complexação total da sinvastatina.

1. Introdução

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos formados por seis (α CD), sete (β CD) ou oito (γ CD) unidades de glicose, dispostas na forma de um cilindro e que podem aumentar a solubilidade aquosa de moléculas hidrofóbicas através da formação de complexos de inclusão, pois a cavidade das CDs possui caráter hidrofóbico, enquanto a superfície tem caráter hidrofílico (VALLE, 2004).

Dentre as CDs, a β CD é a de maior aplicação no campo farmacêutico devido, sobretudo às dimensões adequadas de sua cavidade e pelo fato de que ela pode ser obtida em escala industrial com elevado rendimento e qualidade (VEIGA; PICORELLI; RIBEIRO, 2006).

Os complexos de inclusão são formados através de ligações de Van der Waals ou pontes de hidrogênio e podem ser obtidos por diferentes métodos tais como co-precipitação, co-evaporação, neutralização, liofilização, secagem por pulverização, malaxagem, moagem e fluido supercrítico (VEIGA; PICORELLI; RIBEIRO, 2006).

Dentre os fatores que podem influenciar na formação dos complexos destacam-se o tipo de CD (o tamanho da cavidade deve ser compatível com a molécula hóspede), o pH do meio (a forma iônica dos fármacos geralmente possui menor afinidade pela cavidade hidrofóbica da CD que a forma neutra), a temperatura (pode influenciar a constante de estabilidade), o método de preparo (geralmente a liofilização e a secagem por pulverização são mais eficientes), dentre outros (CHALLA, et al., 2005).

Em alguns casos a eficiência de complexação é baixa, exigindo uma grande quantidade de CD. Nesses casos, a adição de polímeros hidrossolúveis pode aumentar a eficiência de complexação através da formação de complexos ternários (fármaco-ciclodextrina-polímero) e, conseqüentemente, diminuir a massa de CD necessária, reduzindo, conseqüentemente, o volume da forma farmacêutica obtida (RIBEIRO; FERREIRA; VEIGA, 2003; CARRIER; MILLER; AHMED, 2007).

Por outro lado, as estatinas são amplamente utilizadas na terapêutica devido à segurança e eficácia, principalmente para o tratamento de hipercolesterolemia. Atuam inibindo a HMG-CoA (3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A), limitando a biossíntese do colesterol. Além de serem utilizadas como antilipêmicas, as estatinas previnem doenças cardiovasculares, modificam a resposta inflamatória, reduzem a proliferação celular do músculo liso e acúmulo de colesterol (SCHACHTER, 2004).

A sinvastatina (SNV), de fórmula $C_{25}H_{38}O_5$, é um fármaco de peso molecular 418,57, com ponto de fusão de 135 a 138 °C e praticamente insolúvel em água (0,03 mg/mL) (MERCK index, 2006). É administrada na forma de um pró-fármaco que é hidrolisado por enzimas, formando seu hidroxí-ácido ativo. Sua biodisponibilidade é de 5% e liga-se a proteínas plasmáticas de 95 a 98% (SCHACHTER,2004).

Estudos anteriores relatam a tentativa de complexação da SNV com ciclodextrinas, com a finalidade de melhorar a solubilidade e estabilidade (WEN; LIU; ZHU, 2005 e JUN *et al.*, 2007). Entretanto, não existem relatos da utilização de complexos ternários para melhorar a solubilidade do fármaco.

Deste modo, o presente trabalho tem como finalidade obter e caracterizar complexos ternários de SNV, β CD e diferentes polímeros, selecionando aqueles que permitam um maior aumento na solubilidade do fármaco.

2. Material e Métodos

2.1. Preparo dos complexos

Foram utilizadas β CD - Cavamax W7®, (ISP Technologies INC, Waterford, MI, EUA), SNV (Biocon, Bangalore, Índia) polietilenoglicol 1500 (PEG1500), polietilenoglicol 4000 (PEG4000) (Labsynth, Diadema, SP, Brasil), povidona – Kollidon® 30 (PVP-K30), copovidona – Kollidon® VA64 (PVP VA-64), crospovidona – Kollidon® CLM (BASF, São Bernardo do Campo, SP, Brasil), Maltodextrina Globe® 1805 (Corn Products Brasil, Conchal, SP, Brasil), hidroxipropil-metil-celulose (HPMC) Methocel® K100 (Colorcon do Brasil LTDA., Cotia, SP, Brasil).

Os complexos ternários foram obtidos dissolvendo-se separadamente 1 g do fármaco em 10 mL de metanol e 2,712 g de β CD em 15 mL de água, seguindo a proporção estequiométrica fármaco:CD de 1:1. O polímero (PEG1500, PEG4000, HPMC, PVP-K30, PVP-VA64, crospovidona ou maltodextrina) foi adicionado à 5 mL de água e a quantidade utilizada foi de 1% da massa. As suspensões e a solução de polímero foram reunidas em um mesmo recipiente e submetidas à agitação por 48 horas.

A secagem dos complexos foi realizada por coevaporação, utilizando-se rotaevaporador TE 210 (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil), a 50° C por 30 minutos, para retirada do solvente orgânico. As soluções resultantes foram transferidas para estufa

com circulação forçada de ar (Fabbe-Primar Industrial LTDA., São Paulo, SP, Brasil) onde permaneceram a 40° C por 24 horas.

Para efeito de comparação, foram, ainda, preparadas misturas físicas (MFs) na proporção estequiométrica fármaco:ciclodextrina de 1:1 e mais 1% do polímero.

2.2. Caracterização dos complexos

2.2.1. Solubilidade

A solubilidade em água foi determinada adicionando-se excesso de complexo em 20 mL de água em recipientes de plástico com tampa rosqueada e mantidos sob agitação por 72 horas, em um agitador tipo orbital Tecnal TE – 420 (Piracicaba, SP, Brasil), com velocidade de agitação de 150 rpm e a temperatura de 37°C. Após o período de agitação, as amostras foram filtradas com filtros Millex HV (HPDF) de 0,45 microns (Millipore, Carrigtwohill, Irlanda), diluídas adequadamente, e quantificadas através de espectrofotômetro Cary 50 UV-Vis (Varian, Cary, NC, EUA), em cubeta de quartzo de 1,0 cm e λ de 240 nm.

Os resultados de solubilidade foram tratados estatisticamente empregando-se a análise de variância (ANOVA) calculando-se os valores de F e P e α foi considerado como sendo igual a 0,05 e F crítico 7,71.

2.2.2. Calorimetria exploratória diferencial

A caracterização por calorimetria exploratória diferencial (DSC) foi realizada empregando-se equipamento TA-2920 (TA-Instruments®, New Castle, DE, EUA) no intervalo de temperatura de 25 a 300° C, utilizando-se cápsula de alumínio selada, com massa de amostra de aproximadamente 3,0 mg, razão de aquecimento de 10° C min⁻¹ e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL min⁻¹.

2.2.3. Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica (TG) foi realizada em equipamento TA-2950 (TA-Instruments®, New Castle, DE, EUA) na faixa de 25 a 500° C, utilizando-se cadinho

de platina, massa de amostra de aproximadamente 15,0 mg, razão de aquecimento de $10^{\circ} \text{C min}^{-1}$ e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 100 mL min^{-1} .

3. Resultados e Discussão

A solubilidade em água de todos os complexos obtidos foi maior do que aquela observada para o fármaco não complexado ($0,0053 \text{ mg mL}^{-1}$), em todos os casos (Figura 4.1). Estes resultados foram, ainda, submetidos à ANOVA conforme indicado na Tabela 4.1.

Figura 4.1 - Solubilidade em água (mg mL^{-1}) da SNV, complexos e misturas físicas. As barras indicam os respectivos valores de desvio padrão.

Tabela 4.1 - Valores de F e P para a solubilidade da SNV a partir das misturas físicas e complexos de cada ciclodextrina utilizada, considerando-se $\alpha = 0,05$ e $F_{\text{crítico}} = 7,71$

Complexo	F	Valor P
SNV+βCD+PEG1500	7,03	0,057
SNV+βCD+PEG4000	0,141	0,726
SNV+βCD+HPMC	0,588	0,486
SNV+βCD+PVP-K30	0,328	0,598
SNV+βCD+PVP-VA64	1,13	0,347
SNV+βCD+Crospovidona	35,7	0,004
SNV+βCD+Maltodextrina	17,9	0,013

Os resultados da análise de variância indicam que quando os complexos são preparados com PEG1500, PEG4000, HPMC, PVP-K30 e PVP-VA64 as diferenças de solubilidade em água dos complexos com as respectivas misturas físicas não são significativas, o que parece indicar que não há formação de complexos de inclusão nestes casos.

No entanto, quando foi utilizado a crospovidona e a maltodextrina, existe diferença significativa entre a solubilidade observada para a mistura física e aquela registrada para o complexo. Quando foi utilizado a crospovidona o ganho de solubilidade foi de 3,45 vezes e com a maltodextrina de 3,40 vezes, indicando que pode ter ocorrido a formação de complexos de inclusão.

A complexação pode ser avaliada, também, comparando-se a curva DSC do complexo com a da ciclodextrina utilizada, da molécula hóspede e da mistura física. O fármaco apresenta a curva com um pico bem definido, que corresponde ao ponto de fusão. A curva da mistura física é a sobreposição do evento de desidratação da ciclodextrina com o pico de fusão da molécula hóspede. Quando ocorre a complexação, espera-se que o pico da fusão desapareça devido à perda da estrutura cristalina causada pela encapsulação (GIORDANO; NOVAK; MOYANO, 2001).

As curvas de DSC obtidas para os complexos apresentaram pico de fusão do fármaco semelhante ao da mistura física, o que parece indicar que a molécula hóspede não foi complexada. No caso dos complexos com crospovidona e maltodextrina, como a solubilidade em água aumentou e o pico de fusão do fármaco continua evidente, pode ter ocorrido apenas uma complexação parcial (Figura 4.2 e Tabela 4.2).

Figura 4.2 - Curvas DSC da SNV, ciclodextrinas, polímeros, misturas físicas e complexos obtidas utilizando-se cápsula de alumínio selada, com massa de amostra de aproximadamente 3,0 mg, razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL min^{-1} .

Tabela 4.2 - Valores dos picos de DSC das temperaturas de desidratção das ciclodextrinas e temperatura de fusão do polímero e do fármaco.

Amostra	Desidratação da CD (°C)	Fusão do polímero (°C)	Fusão do fármaco (°C)
SNV	---	---	140,19
βCD	104,55	---	---
PEG1500	---	49,75	---
PEG4000	---	61,13	---
HPMC	---	87,21	---
PVP-K30	---	94,93	---
PVP-VA64	---	71,41	---
Crospovidona	---	87,93	---
Maltodextrina	---	89,98	---
MF (SNV+ βCD+PEG1500)	115,80	---	140,38
MF (SNV+ βCD+PEG4000)	118,71	---	142,26
MF (SNV+ βCD+HPMC)	114,05	---	140,68
MF (SNV+ βCD+PVP-K30)	118,45	---	140,67
MF (SNV+ βCD+PVP-VA64)	123,57	---	140,33
MF (SNV+ βCD+Crospovidona)	123,92	---	140,05
MF (SNV+ βCD+Maltodextrina)	121,68	---	140,47
Complexo (SNV+ βCD+PEG1500)	120,91	---	140,77
Complexo (SNV+ βCD+PEG4000)	122,10	---	140,16
Complexo (SNV+ βCD+HPMC)	110,89	---	140,94
Complexo (SNV+ βCD+PVP-K30)	99,28	---	139,88
Complexo (SNV+ βCD+PVP-VA64)	101,80	---	140,41
Complexo (SNV+ βCD+Crospovidona)	118,85	---	140,96
Complexo (SNV+ βCD+Maltodextrina)	117,56	---	140,98

Na análise das curvas TG (Figura 4.3), espera-se que a temperatura do início da degradação dos complexos seja mais elevada quando comparada com o fármaco não complexado (NOVAK et al., 2006). Observando-se a curva TG da sinvastatina, a perda de massa iniciou-se em 236,55° C e as curvas dos complexos apresentaram o início da degradação em temperaturas mais elevadas, sendo o complexo que apresentou maior estabilidade térmica foi o com crospovidona que iniciou a degradação do fármaco em 262,69 ° C (Tabela 4.3).

Figura 4.3 - Curvas TG da SNV, ciclodextrinas, polímeros, misturas físicas e complexos obtidas utilizando-se cadinho de platina, com massa de amostra de aproximadamente 15,0 mg, razão de aquecimento de $10^{\circ} \text{C min}^{-1}$ e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 100 mL min^{-1} .

Tabela 4.3 - Valores de temperatura obtidos a partir das curvas TG de início de degradação, perda de massa de umidade e perda de massa na degradação da SNV, ciclodextrinas, MFs e complexos.

Amostra	Início da degradação (°C)	1ª perda de massa Umidade (%)	2ª perda de massa Degradação (%)
SNV	236,55	---	81,44
β CD	322,66	13,36	73,97
PEG1500	398,36	1,474	97,51
PEG4000	415,15	5,815	98,14
HPMC	357,33	7,044	82,34
PVP-K30	419,24	8,145	88,24
PVP-VA64	311,03	3,825	93,45
Crospovidona	426,90	9,647	85,55
Maltodextrina	301,04	6,783	75,28
MF (SNV+ β CD+PEG1500)	259,31	9,895	76,54
MF (SNV+ β CD+PEG4000)	259,59	9,828	74,96
MF (SNV+ β CD+HPMC)	262,61	9,869	73,88
MF (SNV+ β CD+PVP-K30)	248,56	10,94	74,93
MF (SNV+ β CD+PVP-VA64)	261,81	9,610	77,40
MF (SNV+ β CD+Crospovidona)	250,86	11,09	69,28
MF (SNV+ β CD+Maltodextrina)	257,04	10,30	78,09
Complexo (SNV+ β CD+PEG1500)	247,76	9,322	75,58
Complexo (SNV+ β CD+PEG4000)	262,60	9,302	76,51
Complexo (SNV+ β CD+HPMC)	252,62	10,18	70,61
Complexo (SNV+ β CD+PVP-K30)	247,47	9,355	75,68
Complexo (SNV+ β CD+PVP-VA64)	244,06	9,350	78,08
Complexo (SNV+ β CD+Crospovidona)	262,69	10,07	74,27
Complexo (SNV+ β CD+Maltodextrina)	241,54	9,945	70,55

Assim, apesar das curvas TG mostrarem um aumento da temperatura de início de degradação, o ganho de solubilidade em água foi significativo apenas quando foram utilizados os polímeros crospovidona e maltodextrina. Por outro lado, as curvas DSC indicam que houve formação de complexos de inclusão apenas com parte da SNV, uma vez que ainda há fármaco livre no sistema.

4. Conclusão

Os resultados de solubilidade em água mostraram que apenas a crospovidona e a maltodextrina proporcionaram acréscimo significativo na solubilidade da SNV. No entanto, a análise térmica evidencia a presença de fármaco livre nas amostras e que apenas uma complexação parcial pode ter ocorrido, indicando que estes polímeros hidrossolúveis não são capazes de promover uma complexação total da SNV, muito embora tenham se mostrado eficazes para melhorar a solubilidade do fármaco.

5. Referências Bibliográficas

CARRIER, R.L.; MILLER, L.A.; AHMED, I. The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. *J. Controlled Release*, v. 123, p. 78-99, 2007.

CHALLA, R.; AHUJA, A.; ALI, J.; KHAR, R.K. Cyclodextrin in drug delivery: an update review. *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, v. 6, p. E329-E357, 2005.

GIORDANO, F.; NOVAK, C.; MOYANO, J.R. Thermal analysis of cyclodextrin and their inclusion compounds. *Thermochim. Acta*, v. 380, p.123-151, 2001.

JUN, S.W.; KIM, M.S.; KIM, J.S.; PARK, H.J.; LEE, S., WOO, J.S.; HWANG, S.J. Preparation and characterization of simvastatin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex using supercritical antisolvent (SAS) process. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v.66, p. 413-421, 2007.

MERCK index. 14.ed. Withehouse Station, 2006.p.1471-1472.

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

RIBEIRO, L.S.S.; FERREIRA, D.C.; VEIGA, F.J.B. Phisicochemical investigation of the effects of water-soluble polymers on vinpocetine complexation with β -cyclodextrin and its sulfobutyl ether derivate is solution and solid state. *Eur. J. Pharm. Sci.*, v. 20, p. 253-266, 2003.

SCHACHTER, M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, v. 19, p. 117-125, 2004.

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

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

WEN, X.; LIU, Z.; ZHU, T. Mass spectrometry and molecular modeling studies on the inclusion complexes between α , β -cyclodextrins and simvastatin. *Chem. Phys. Lett.*, v. 405, p. 114-117, 2005.