

IVANNA HINKE GREBOGI

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS BINÁRIOS
E TERNÁRIOS DE DAPSONA**

**CURITIBA
2009**

IVANNA HINKE GREBOGI

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS BINÁRIOS
E TERNÁRIOS DE DAPSONA**

Dissertação apresentada como
requisito parcial a obtenção do
título de mestre em Ciências
Farmacêuticas, Setor de
Ciências da Saúde,
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof^a. Dra. Letícia
Norma Carpentieri Rodrigues

**CURITIBA
2009**

Greboji, Ivanna Hinke
Obtenção e Caracterização de Complexos Binários e Ternários de
Dapsona / Ivanna Hinke Greboji – Curitiba, 2009.
f.96 ; 30 cm.

Orientadora: Letícia Norma Carpentieri Rodrigues
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor
de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, Área de Insumos, medicamentos e correlatos.

1. Dapsona. 2. Ciclodextrinas. 3. Solubilidade. 4. Sistemas binários. 5.
Sistemas Ternários. 6. Absorção. I. Rodrigues, Letícia Norma Carpentieri.
II. Título. III. Universidade Federal do Paraná.

CDD 615.1

DEDICATÓRIA

Ao meu noivo pela ajuda fundamental e aos meus queridos pais pelo incentivo inesquecível.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a minha orientadora Prof^a. Dra. Letícia Norma Carpentieri Rodrigues, sem ela este trabalho não teria sido realizado.

Ao meu noivo Carlos Francisco, além de ter mudado o rumo da minha vida foi fundamental em todas as etapas deste trabalho.

Ao meu pai Valdir Grebogi, por sempre me incentivar e me apoiar, fundamental na decisão de iniciar um mestrado.

A minha mãe Rosemarie H. Grebogi, por toda ajuda que sempre me deu, até mesmo com meus experimentos.

Ao meu irmão Lucas H. Grebogi, pela grande ajuda principalmente relacionada a softwares e programas matemáticos.

Ao prof. Dr. Andersson Barison e sua aluna Caroline Werner, que nos deram a oportunidade de sua colaboração, para realizar as análises de Ressonância Nuclear Magnética.

Aos professores Dr. Itamar Andreazza e Dra. Mayumi Sato, por todo apoio, coleguismo e disposição do laboratório.

A colega Ana Paula Tíbola, pela grande ajuda na parte experimental deste trabalho.

As professoras Dra. Tânia Bonfim e Dra. Iara Machado, pela disponibilidade de uso dos equipamentos do laboratório de Enzimologia.

Ao prof. Dr. Marco Aurélio da Silva Carvalho Filho e a Cristiane, pela participação e autorização no uso dos equipamentos de análise térmica da Universidade Positivo.

Ao prof. Dr. Aldo Zarbin e sua equipe, por nos ajudar com as análises de Difração de Raios X.

A todos os colaboradores do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

Ao prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz, por sempre nos dar o prazer de sua ajuda, em todas as dificuldades.

A colega Graça, da Central Analítica pela disponibilidade em nos atender.

Aos meus colegas de mestrado, especialmente Adélia, Luciane e Alexandre, que de alguma forma contribuíram muito na minha vida profissional e pessoal.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	03
2.1. A HANSENÍASE.....	03
2.1.1. Etiologia e Transmissão.....	03
2.1.2. Manifestações Clínicas.....	05
2.1.3. Quimioterapia da Hanseníase.....	07
2.1.3.1. A Dapsona.....	08
2.2. ABSORÇÃO E BIODISPONIBILIDADE DE FÁRMACOS.....	11
2.3. CICLODEXTRINAS.....	13
2.3.1. As Ciclodextrinas Naturais.....	13
2.3.2. Ciclodextrinas hidroxialquiladas.....	16
2.3.3. Toxicidade das ciclodextrinas.....	18
2.3.4. Sistemas Multicomponentes.....	21
2.4. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO.....	22
2.4.1. Caracterização dos Complexos de Inclusão em Solução.....	23
2.4.1.1. Ensaio de Solubilidade de Fases.....	23
2.4.1.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.....	25
2.4.2. Caracterização dos Complexos de Inclusão no Estado Sólido.....	26
2.4.2.1. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	27
2.4.2.2. Difração em Raios X.....	28
2.4.2.3. Microscopia eletrônica de varredura.....	29
3. OBJETIVOS.....	31
3.1. OBJETIVO GERAL.....	31
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1. MATERIAL E EQUIPAMENTOS.....	32
4.1.1. Substância química de referência.....	32
4.1.2. Reagentes e Solventes.....	32
4.1.3. Equipamentos.....	32
4.2. MÉTODOS.....	33

4.2.1. Preparo dos Sistemas Binários e Ternários.....	33
4.2.2. Caracterização dos Sistemas Binários e Ternários em Solução.....	33
4.2.2.1. Ensaio de Solubilidade.....	33
4.2.2.2. Ressonância Magnética Nuclear.....	34
4.2.3. Caracterização dos Sistemas Binários e Ternários no Estado Sólido.....	34
4.2.3.1. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	35
4.2.3.2. Difração em Raios X.....	35
4.2.3.3. Microscopia eletrônica de varredura.....	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
5.1. OBTENÇÃO DE CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMAS BINÁRIOS E TERNÁRIOS COM DAPSONA E β - CICLODEXTRINA.....	36
5.1.1. Ensaio de Solubilidade de Fases.....	36
5.1.2. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	46
5.1.3. Difração de Raios-X.....	48
5.1.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	49
5.1.5. Ressonância Magnética Nuclear (RMN de ^1H).....	53
5.2. OBTENÇÃO DE CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMAS BINÁRIOS E TERNÁRIOS COM DAPSONA E HP β CD.....	57
5.2.1. Ensaio de Solubilidade de Fases.....	57
5.2.2. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	63
5.2.3. Difração de Raios-X.....	64
5.2.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	65
5.2.5. Ressonância Magnética Nuclear (RMN de ^1H).....	69
5.3. ESTUDO COMPARATIVO DAS INTERAÇÕES ENTRE DAPSONA: β CD E DAPSONA:HP β CD.....	73
6. CONCLUSÃO.....	75
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

LISTA DE ABREVIATURA, SIGLAS E SÍMBOLOS

α	alfa
β	beta
δ	delta
μg	microgramas
$^{\circ}\text{C}$	grau Celsius
2-HE β CD	2-hidroxietil- β -ciclodextrina
2-HP β CD	2-hidroxipropil- β -ciclodextrina
3-HP β CD	3-hidroxipropil- β -ciclodextrina
2,3-DHP β CD	2,3-dihidroxipropil- β -ciclodextrina
Abs	absorbância
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
BCS	Sistema de Classificação Biofarmacêutica
CME β CD	O-carboximetil-O-etil- β -ciclodextrina
DAP	Dapsona
DDS	4,4'-diaminodifenilssulfona
DE β CD	2,6-di-O-etil- β -ciclodextrina
DM β CD	2,6-di-O-metil- β -ciclodextrina
DMA β CD	2,6-di-O-metil- β -ciclodextrina peracetilada
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
DRX	Difração de Raios-X
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
DTA	Análise Térmica Diferencial
FDA	Food and Drug Administration
G ₁ β CD	glicosil- β -ciclodextrina
G ₂ β CD	Maltosil- β -ciclodextrina
GUG β CD	Glucuronil-glucosil- β -ciclodextrina
HIV	Human Immunodeficiency Vírus
HCl	Ácido Clorídrico
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
kg	kilogramas
Me β CD	β -ciclodextrina metilada
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura

mg	miligramas
min	minutos
ml	mililitros
NaOH	Hidróxido de Sódio
nOe	Efeito nuclear Overhauser
OMS	Organização Mundial da Saúde
PNCH	Programa Nacional de Controle da Hanseníase
PPC	Pneumonia <i>Pneumocystis carinii</i>
PVP-K30	Polivinilpirrolidona
RENAME	Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
ROESY	One dimensional rotating frame Overhauser Effect
SBE4 β CD	d.s.4 do grupo sulfobutil éter β -ciclodextrina
SBE7 β CD	d.s.7 do grupo sulfobutil éter β -ciclodextrina
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
Sulfato β CD	Sulfato de β -ciclodextrina
Sulfato Al β CD	Sulfato de alumínio- β -ciclodextrina
USP	United States Pharmacopeia
TA β CD	per-2,3,6-tri- <i>O</i> -acil- β -ciclodextrina
TB β CD	per-2,3,6-tri- <i>O</i> -butanoil- β -ciclodextrina
TE β CD	per-2,3,6-tri- <i>O</i> -etil- β -ciclodextrina
TV β CD	per-2,3,6-tri- <i>O</i> -valeril- β -ciclodextrina

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO ESPECTRO CLÍNICO DA HANSENÍASE, SUGERINDO A PARTICIPAÇÃO DE CONJUNTOS DIFERENTES DE GENES NO CONTROLE DAS DUAS ETAPAS DA PATOGÊNESE DA DOENÇA.....	04
FIGURA 2 - FÓRMULA ESTRUTURAL DA DAPSONA.....	09
FIGURA 3 - CICLODEXTRINAS NATURAIS.....	13
FIGURA 4 - FORMAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO.....	14
FIGURA 5 - ESTRUTURA DO DERIVADO HP β CD. EM DESTAQUE, AS POSIÇÕES DOS GRUPOS SUBSTITUINTES.....	17
FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO DOS COMPLEXOS FÁRMACO-CD-POLÍMERO EM SOLUÇÃO.....	22
FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS TIPOS DE DIAGRAMAS DE FASES.....	24
FIGURA 8 - MODELO DO EQUIPAMENTO DE CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC) POR FLUXO DE CALOR.....	27
FIGURA 9 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA PARA DAPSONA 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ EM ÁGUA PURIFICADA.....	36
FIGURA 10 - CURVA ANALÍTICA DA DAPSONA EM ÁGUA PURIFICADA (4–40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).....	37
FIGURA 11 - DIAGRAMA DE SOLUBILIDADE DE FASE DA DAPSONA A 37 °C EM PRESENÇA DE β CD.....	38
FIGURA 12 - EFEITO DA ADIÇÃO DE DIFERENTES QUANTIDADES DOS POLÍMEROS PVP-K30 E/OU HPMC SOBRE A SOLUBILIDADE DA DAPSONA.....	39
FIGURA 13 - DIAGRAMAS DE SOLUBILIDADE DE FASES DA DAPSONA EM SOLUÇÃO AQUOSA DE β CD NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE POLÍMEROS PVP-K30 E HPMC A 37 °C.....	40
FIGURA 14 - CURVAS DSC DA DAPSONA, β -CD, PVP-K30, HPMC, MISTURAS FÍSICAS 1:1 E SISTEMAS BINÁRIO E TERNÁRIOS CONTENDO DAPSONA: β CD, DAPSONA: β CD:PVP-K30 E DAPSONA: β CD:HPMC, OBTIDAS SOB ATMOSFERA DINÂMICA DE NITROGÊNIO (100 mL min ⁻¹) E RAZÃO DE AQUECIMENTO DE 10°C min ⁻¹	46
FIGURA 15 - DIFRATOGRAMAS OBTIDOS PARA A DAPSONA (DAP), MISTURA-FÍSICA DAP: β CD 1:1, DAP: β CD:PVP-K30 E DAP: β CD:HPMC, E SISTEMAS BINÁRIO - DAP: β CD – E SISTEMAS TERNÁRIOS - DAP: β CD:PVP-K30 E DAP: β CD:HPMC - OBTIDOS POR COEVAPORAÇÃO OPERANDO A 40 KV E 40 mA, COM VELOCIDADE DE VARREDURA DE 2°C min ⁻¹ (2 THETA).....	48
FIGURA 16 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA DAPSONA (A) e β CD (B),	

OBTIDOS EM MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA JEOL MOD. JSM-6360 LV.....	50
FIGURA 17 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DAS MISTURAS-FÍSICAS DAPSONA:βCD (A), DAPSONA:βCD:PVP-K30 (B) e DAPSONA:βCD:HPMC (C), OBTIDOS EM MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA JEOL MOD. JSM-6360 LV.....	51
FIGURA 18 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DOS SISTEMAS BINÁRIO E TERNÁRIOS DAPSONA:βCD (A), DAPSONA:βCD:PVP-K30 e DAPSONA:βCD:HPMC, OBTIDOS EM MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA JEOL MOD. JSM-6360 LV.....	52
FIGURA 19 - ESPECTROS DE RMN DE ¹ H DO SISTEMA DAPSONA:βCD E DA DAPSONA, MOSTRANDO AS VARIAÇÕES NOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS.....	54
FIGURA 20 - ESPECTROS DE RMN ROESY 1D DO SISTEMA DAPSONA:βCD ATRAVÉS DE IRRADIAÇÃO SELETIVA DE SINAL A 3,84 ppm CORRESPONDENDO AO HIDROGENIO H-3 DA βCD, MOSTRANDO O EFEITO NOE NOS SINAIS DE HIDROGENIO DA DAPSONA, USANDO TEMPO DE MISTURA DE 300 ms.....	54
FIGURA 21 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS HIDROGÊNIOS DA DAPSONA DISPONÍVEIS PARA INTERAÇÃO COM A β-CICLODEXTRINA.....	55
FIGURA 22 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO HIDROGÊNIO H-3 DA UNIDADE DE GLUCOPIRANOSE DA β-CILODEXTRINA.....	55
FIGURA 23 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS INTERAÇÕES DO FÁRMACO DAPSONA NO INTERIOR DA CAVIDADE DA β-CICLODEXTRINA.....	56
FIGURA 24 - DIAGRAMA DE SOLUBILIDADE DE FASE DA DAPSONA A 37 °C EM PRESENÇA DE HPβCD.....	57
FIGURA 25 - DIAGRAMA DE SOLUBILIDADE DE FASES DA DAPSONA NA PRESENÇA DE CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE HPβCD, NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE PVP-K30 E/OU HPMC.....	59
FIGURA 26 - CURVAS DSC DA DAPSONA, HPβ-CD, PVP-K30, HPMC, MISTURAS FÍSICAS 1:1 E SISTEMAS BINÁRIO E TERNÁRIOS CONTENDO DAPSONA:HPβCD, DAPSONA:HPβCD:PVP-K30 E DAPSONA:HPβCD:HPMC, OBTIDAS SOB ATMOSFERA DINÂMICA DE NITROGÊNIO (100 mL min ⁻¹) E RAZÃO DE AQUECIMENTO DE 10°C min ⁻¹	63
FIGURA 27 - DIFRATOGRAMAS OBTIDOS PARA A DAPSONA (DAP), MISTURA-FÍSICA DAP:HPβCD 1:1 E SISTEMAS BINÁRIO - DAP:HPβCD – E SISTEMAS TERNÁRIOS - DAP:HPβCD:PVP-K30 E DAP:HPβCD:HPMC - OBTIDOS POR COEVAPORAÇÃO OPERANDO A 40 KV E 40 mA, COM VELOCIDADE DE VARREDURA DE 2° C min ⁻¹ (2 THETA).....	65
FIGURA 28 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA DAPSONA (A) e HPβCD (B), OBTIDOS EM MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA JEOL MOD. JSM-	

6360 LV.....	66
FIGURA 29 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DAS MISTURAS-FÍSICAS DAPSONA:HP β CD (A), DAPSONA:HP β CD:PVP-K30 (B) e DAPSONA:HP β CD:HPMC (C), OBTIDOS EM MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA JEOL MOD. JSM-6360 LV.....	67
FIGURA 30 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DOS SISTEMAS BINÁRIO - DAP:HP β CD (A) - E TERNÁRIOS - DAP:HP β CD:PVP-K30 (B) E DAP:HP β CD:HPMC (C) OBTIDOS EM MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA JEOL MOD. JSM-6360 LV.....	68
FIGURA 31 - ESPECTROS DE RMN DE ¹ H DO SISTEMA DAPSONA:HP β CD E DA DAPSONA, MOSTRANDO AS VARIAÇÕES NOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS.....	70
FIGURA 32 - ESPECTROS DE RMN ROESY 1D DO SISTEMA DAPSONA:HP β CD ATRAVÉS DE IRRADIAÇÃO SELETIVA DE SINAL A 3,88 ppm CORRESPONDENDO AOS HIDROGÊNIO H-3 E H-5 DA HP β CD, MOSTRANDO O EFEITO NOE NOS SINAIS DE HIDROGÊNIO DA DAPSONA, USANDO TEMPO DE MISTURA DE 300 ms.....	70
FIGURA 33 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS HIDROGÊNIO DA DAPSONA DISPONÍVEIS PARA INTERAÇÃO COM A HP β CD.....	71
FIGURA 34 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO HIDROGÊNIO H-3 E H-5 DA UNIDADE DE GLUCOPIRANOSE DA HP β CD.....	71
FIGURA 35 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS INTERAÇÕES DO FÁRMACO DAPSONA NO INTERIOR DA CAVIDADE DA HP β CD.....	72

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - SOLUBILIDADE E PESO MOLECULAR DE ALGUMAS CICLODEXTRINAS NATURAIS E MODIFICADAS.....	16
TABELA 2 - CICLODEXTRINAS PARA USO FARMACÊUTICO.....	20
TABELA 3 - VALORES DE SOLUBILIDADE INTRÍNSECA (S_0), SOLUBILIDADE DO INTERCEPTO (S_{int}), COEFICIENTE ANGULAR E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO DE PEARSON (r) OBTIDOS A PARTIR DOS DIAGRAMAS DE SOLUBILIDADE DE FASE PARA O SISTEMAS DAPSONA: β CD.....	41
TABELA 4 - CONSTANTE DE ESTABILIDADE ($K_{1:1}$), EFICIÊNCIA DE COMPLEXAÇÃO (CE) E RAZÃO MOLAR DE COMPLEXAÇÃO (DAP:CD) CALCULADAS A PARTIR DOS DIAGRAMAS DE SOLUBILIDADE DE FASE PARA OS SISTEMAS BINÁRIO E TERNÁRIOS CONTENDO DAPSONA, β CD E PVP-K30 E/OU HPMC.....	42
TABELA 5 - VALORES DE SOLUBILIDADE DA DAPSONA E SISTEMAS BINÁRIO E TERNÁRIOS OBTIDOS POR COEVAPORAÇÃO EXPRESSOS EM mg.mL^{-1} , mM E INCREMENTO DE SOLUBILIDADE OBTIDO NOS SISTEMAS BINÁRIOS E TERNÁRIOS.....	45
TABELA 6 - VALORES DE SOLUBILIDADE INTRÍNSECA (S_0), SOLUBILIDADE DO INTERCEPTO (S_{int}), COEFICIENTE ANGULAR E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO DE PEARSON (r) OBTIDOS A PARTIR DOS DIAGRAMAS DE SOLUBILIDADE DE FASE PARA O SISTEMAS DAPSONA:HP β CD.....	60
TABELA 7 - CONSTANTE DE ESTABILIDADE ($K_{1:1}$), EFICIÊNCIA DE COMPLEXAÇÃO (CE) E RAZÃO MOLAR DE COMPLEXAÇÃO (DAP:CD) CALCULADAS A PARTIR DOS DIAGRAMAS DE SOLUBILIDADE DE FASE PARA OS SISTEMAS BINÁRIO E TERNÁRIOS CONTENDO DAPSONA, HP β CD E PVP-K30 E/OU HPMC.....	61
TABELA 8 - VALORES DE SOLUBILIDADE DA DAPSONA E SISTEMAS BINÁRIO E TERNÁRIOS OBTIDOS POR COEVAPORAÇÃO EXPRESSOS EM mg.mL^{-1} , mM E INCREMENTO DE SOLUBILIDADE.....	62

RESUMO

Ciclodextrinas são conhecidas como bons solubilizantes para vários fármacos, melhorando sua biodisponibilidade quando incorporadas em formulações farmacêuticas. O presente trabalho tem por objetivo estudar as interações de dapsona com ciclodextrinas na presença e na ausência de polímeros hidrossolúveis, visando melhorar a solubilidade e biodisponibilidade do fármaco.

Sistemas sólidos DAP/HP β CD, em presença ou ausência de 0,1% (p/p) de PVP K-30 ou 0,3% de HPMC, foram preparados por coevaporação. O estudo de solubilidade de fase foi empregado para investigar as interações entre a DAP e os excipientes em solução aquosa, isolados ou em associação. Os complexos binários e ternários de dapsona e ciclodextrinas (β CD ou HP β CD) obtidos por coevaporação foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura (SEM), calorimetria exploratória diferencial (DSC), difração de raios-X (XRD) e RMN de ^1H .

Os estudos de solubilidade mostraram que os complexos de inclusão dapsona: β CD e dapsona:HP β CD na presença e ausência de polímeros conduzem a um aumento na solubilidade do fármaco, porém a adição dos polímeros – PVP-K30 e/ou HPMC - não teve contribuição representativa na solubilidade dos sistemas. Maior eficiência de complexação foi observada para os sistemas dapsona: β CD:HPMC e dapsona:HP β CD. As curvas DSC, os difratogramas e os ensaios de microscopia eletrônica de varredura indicaram a formação de complexos de inclusão fármaco/CD na presença e/ou ausência de polímeros hidrossolúveis – PVP-K30 e/ou HPMC. Experimentos de RMN ROESY 1D permitiram observar que as interações intermoleculares entre a dapsona com a cavidade da ciclodextrina ocorrem por meio dos hidrogênios H-3 e/ou H-5 das ciclodextrinas.

Palavras-chave: dapsona, ciclodextrinas, complexos de inclusão

ABSTRACT

Cyclodextrins are known as a good solubiliser for several drugs, improving their bioavailability when incorporated in pharmaceutical formulations. The present work aims to study the interactions of cyclodextrins with dapsons in the presence and absence of water soluble polymers, to improve the solubility and bioavailability of the drug.

Solid system DAP/HP β CD, in the presence or absence of 0.1% (w / w) of PVP K-30 or 0.3% of HPMC, were prepared by coevaporation. The study of phase solubility was used for investigate the interactions between DAP and the excipients in aqueous solution, alone or in combination. The binary and ternary complexes of dapsons and cyclodextrin (β CD or HP β CD) obtained by coevaporation were characterized by scanning electron microscopy (SEM), differential scanning calorimetry (DSC), X-ray diffraction (XRD) and NMR-¹H .

The solubility studies showed that the inclusion complex of dapsons: β CD and dapsons:HP β CD in presence and absence of polymers, leads to an increase in drug solubility, but the addition of the polymers - PVP-K30 and/or HPMC - was not a representative contribution in the solubility of the systems. Improved efficiency of complexation was observed for the systems dapsons: β CD:HPMC and dapsons:HP β CD. The DSC curves, the difratograms and the essays of scanning electron microscopy indicated the formation of inclusion complexes of drug/CD in presence and/or absence of water soluble polymers - PVP-K30 and/or HPMC. With the ROESY 1D NMR experiments, it could be observed that the intermolecular interactions between dapsons with the cyclodextrin cavity occur through the hydrogens H-3 and/or H-5 of cyclodextrins.

Key-words: dapsons, cyclodextrin, inclusion complexe

1. INTRODUÇÃO

Biodisponibilidade é a velocidade e o grau com que uma substância ativa ou a sua forma molecular terapeuticamente ativa é absorvida a partir de um medicamento e se torna disponível no local de ação.

Fármacos pouco solúveis apresentam problemas de biodisponibilidade e têm demonstrado serem imprevisíveis e mais lentamente absorvidos se comparados com fármacos de maior solubilidade em água (VEIGA *et al.*, 1996).

A solubilidade aquosa é fator determinante para que novas substâncias químicas tenham sucesso como novos fármacos. Contudo, as novas tecnologias, tal como química combinatória e modelagem molecular, são baseadas no princípio da química medicinal, segundo o qual o método mais adequado para aumentar a potência medicamentosa *in vitro* é a adição de grupo(s) lipofílico(s) à determinada posição da estrutura molecular. Tal fato tem causado um aumento expressivo no número de moléculas de caráter lipofílico, pouco solúveis.

Citada primeiramente por Lipka e Amidon (1999), o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) permitiu classificar os fármacos em quatro grupos baseados na sua habilidade de permear membranas biológicas e na sua solubilidade aquosa (LIPKA e AMIDON, 1999; LOFTSSON, 2002).

A dapsona é uma sulfona ativa contra um amplo espectro de bactérias, nas quais inibe a biossíntese protéica por antagonismo competitivo com o ácido para-aminobenzóico pelo sítio de ação da dihidropteroato sintetase, ou age como inibidor da diidrofolato redutase (GRUNWALD e AMICHAJ, 1996). Seu emprego em patologias de notificação compulsória como a hanseníase, a malária e como tratamento coadjuvante na pneumonia *Pneumocystis carinii* em pacientes portadores de SIDA, coloca a dapsona como fármaco referência na terapêutica clínica incluindo-o na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais – RENAME (ANVISA, 2002; WHO, 2007).

Lindenberg e colaboradores (2004) classificaram a dapsona como fármaco pertencente à Classe II do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), ou seja, possui baixa solubilidade e alta permeabilidade, enquanto Cao e colaboradores (2006) sugerem Classe IV, atribuída à baixa solubilidade e baixa permeabilidade. A baixa solubilidade da dapsona leva a uma biodisponibilidade prejudicada.

Várias técnicas têm sido empregadas para compensar a insolubilidade e, conseqüentemente, a baixa eficiência de dissolução, incluindo o emprego de sólidos amorfos nas formulações, uso de nanopartículas, microemulsões, dispersões sólidas, formação de sais e formação de complexos hidrossolúveis (LOFTSSON, HREINSDOTTIR e MASSON, 2005).

Ciclodextrinas naturais (CDs) são oligossacarídeos cíclicos contendo seis (α -ciclodextrinas), sete (β -ciclodextrinas) ou oito (γ -ciclodextrinas) unidades de α -1,4-glucopironose, contendo uma superfície externa hidrofílica e uma cavidade central hidrofóbica, a qual pode acomodar uma variedade de fármacos lipofílicos (VEIGA *et al.*, 1996). Estes sistemas têm mostrado aumentar a estabilidade (ANDERSEN e BUNDGAARD, 1984; LOFTSSON *et al.*, 1989) solubilidade, velocidade de dissolução (PITHA *et al.*, 1986; BLANCO *et al.*, 1991; LOFTSSON, 2002) e biodisponibilidade (CHOW e KARARA, 1986), além de reduzir efeitos colaterais associados com alguns fármacos (ESPINAR *et al.*, 1991; LIN *et al.*, 1994).

A importância farmacêutica das ciclodextrinas como excipiente, evidenciada pela sua habilidade na otimização de formulações farmacêuticas, particularmente de fármacos poucos solúveis, é reconhecida por várias agências regulatórias (MURA, FAUCCI e BETTINETTI, 2001).

Com base nestes estudos, o presente trabalho tem como objetivo estudar as interações de dapsona com ciclodextrinas na presença e na ausência de polímeros hidrossolúveis, visando melhorar a solubilidade e a velocidade de dissolução do fármaco.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A HANSENÍASE

A Hanseníase, identificada por Gerrhard Hansen (1873) e do qual originou o nome Mal de Hansen ou Hanseníase, também conhecida como Lepra, é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae* que provoca danos severos nos indivíduos, afetando primariamente a pele e o sistema nervoso periférico. Tais manifestações clínicas são características, o que facilita o seu diagnóstico (ARAUJO, 2003).

2.1.1 Etiologia e Transmissão

O *Mycobacterium leprae* é um bacilo álcool-ácido resistente que se aloja em células do sistema retículo-endotelial, especialmente os histiócitos do sistema nervoso periférico – as células de Schann. A agressão ao sistema nervoso causa diminuição e mesmo abolição da sensibilidade térmica, dolorosa e tátil. A evolução da doença causa redução da força muscular e o comprometimento de troncos nervosos periféricos, podendo alcançar a paralisia do segmento afetado (ARAUJO, 2003).

No início do século XX a proporção de aparecimento entre os homens era duas vezes maior que nas mulheres, entretanto, as mudanças de hábitos e costumes, como a maior participação das mulheres no mercado de trabalho, mostrou não haver diferenças de incidência relacionadas ao sexo, mas ao contato entre os indivíduos com portadores da doença (MARANGONI, 1998). Isto ocorre, pois indivíduos portadores da doença não tratados podem liberar bacilos pelo nariz. Portanto, a infecção inicia-se pelo nariz e se espalha para a pele e nervos. O período de incubação pode variar segundo o tipo da doença, sendo de dois a cinco anos na forma tuberculóide e de oito a doze em formas mais severas (LOCKWOOD, 2005).

Na hanseníase, há alguns pacientes que possuem resistência ao bacilo, pois apresentam um pequeno número destes bacilos no organismo, insuficiente para contaminar outros indivíduos. Estes são os casos Paucibacilares. Já nos casos Multibacilares, os pacientes não apresentam essa resistência, permitindo a multiplicação do bacilo no organismo e sua eliminação para o meio exterior,

mantendo a cadeia epidemiológica da doença. Esta classificação criada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) é fundamental para definir a terapia empregada para o tratamento da doença (BRASIL, 2002).

Em 1937 estudou-se a reação de Mitsuda, a qual sugeria a possibilidade de ser um componente genético que controlava a susceptibilidade da doença, sendo que os pacientes que apresentavam esta reação positiva apresentavam um fator natural de resistência. Hoje, segundo Prevedello e Mira (2007), a idéia de que conjuntos diferentes de genes modificam a susceptibilidade da doença é totalmente aceita, tanto na doença independentemente de sua forma clínica, ou seja, a doença *per se*, como na definição das diferentes formas clínicas da doença, assim como é mostrado na Figura 1. O fator genético pode definir se o paciente é paucibacilar ou multibacilar, entretanto, apesar dos avanços, a exata natureza dos componentes genéticos é desconhecida (PREVELLO e MIRA, 2007).

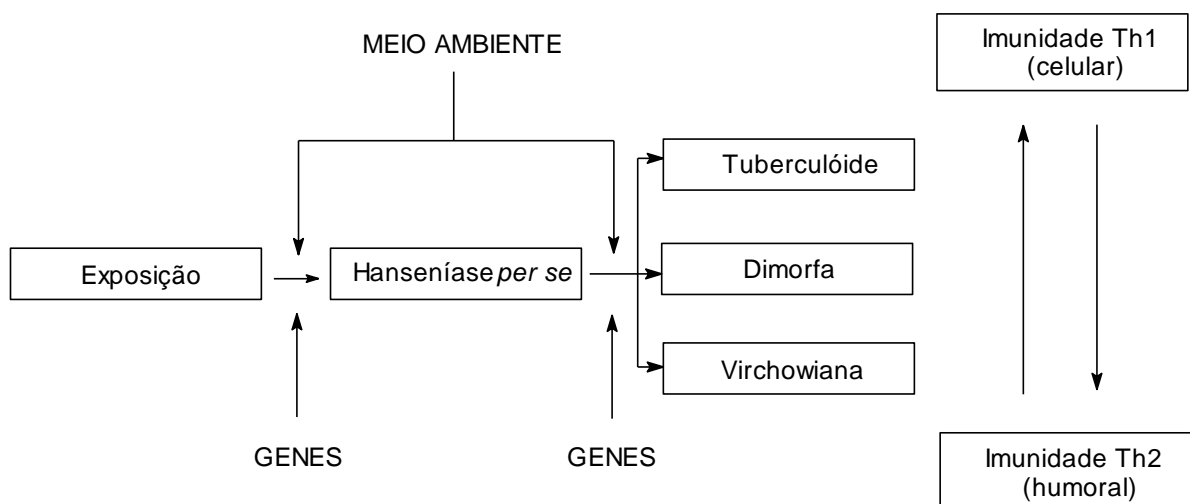


FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO ESPECTRO CLÍNICO DA HANSENÍASE, SUGERINDO A PARTICIPAÇÃO DE CONJUNTOS DIFERENTES DE GENES NO CONTROLE DAS DUAS ETAPAS DA PATOGÊNESE DA DOENÇA

Fonte: (PREVELLO e MIRA, 2007).

A hanseníase é considerada endêmica como Angola, Brasil, República Africana Central, Congo, Índia, Madagascar, Moçambique, Nepal e Tanzânia (WHO, 2007). Na década de 1980, a OMS iniciou programas de orientação para eliminação da hanseníase como problema de saúde pública, entretanto, cerca de 300.000 novos casos foram diagnosticados em 2007 (TALHARI, 1994; PREVELLO e MIRA, 2007).

No Brasil, a hanseníase apresenta tendência de estabilização dos coeficientes de detecção, mas ainda em patamares muito altos nas regiões Norte (21%), Centro-Oeste (17,2%) e Nordeste (38,2%). Dos 43.642 casos registrados em 2007, 55,2% dos casos são do sexo masculino e 48,8% do sexo feminino (BRASIL, 2008).

2.1.2. Manifestações Clínicas

A classificação da doença considera dois pólos opostos estáveis (virchowiano e tuberculóide) e dois grupos instáveis (indeterminado e dimorfo). A baciloscopia é o exame complementar mais útil no diagnóstico (VERONESI, 1997).

A Hanseníase Indeterminada é a forma inicial de todos os tipos de hanseníase. Caracteriza-se pelo aparecimento de uma ou várias máculas hipocrômicas, na maioria das vezes com limites mal definidos, e localiza-se na face, na superfície extensora dos membros ou no tronco. Apresenta alteração da sensibilidade térmica, não há queda de pêlos e a sudorese pode estar alterada. Tende a apresentar cura espontânea, porém pode evoluir para qualquer uma das formas clínicas, dependendo do estado imunológico do paciente. A baciloscopia é negativa e o teste de Mitsuda geralmente é positivo em pacientes com um pequeno número de lesões, mas em casos de numerosas lesões o resultado para o teste de Mitsuda é negativo (TALHARI, 1994; R. VERONESI, 1997).

A Hanseníase Tuberculóide apresenta lesões em placa eritematosa, única ou em número reduzido, são assimétricas, com bordas bem definidas, e verifica-se queda total ou parcial dos pêlos. A perda de sensibilidade é bem evidente e pode ocorrer em qualquer parte do corpo. É comum observar o comprometimento de troncos nervosos periféricos, podendo ser muito intenso e causar deformidades. A baciloscopia é sempre negativa e o teste de Mitsuda sempre positivo (TALHARI, 1994; VERONESI, 1997; MARANGONI, 1998).

A Hanseníase Dimorfa, em inglês *borderline* - no meio de, encontra-se na fronteira com a hanseníase tuberculóide e virchowiana. Esta forma pode ter três variedades: dimorfa tuberculóide, dimorfa dimorfa e dimorfa virchowiana. A primeira apresenta múltiplas lesões do tipo tuberculóide e ocorre acometimento de múltiplos troncos nervosos, apresenta baciloscopia negativa e teste de Mitsuda

positivo. Já a forma dimorfa caracteriza-se pelo aparecimento de placas eritematosas com limites mal definidos, e em alguns casos apresentam aspecto de cura central, com limites internos nítidos, e externos mal definidos. Associadas a essas lesões encontram-se infiltrações e lesões em placa, envolvimento dos troncos nervosos, e podem ocorrer reações graves levando a deformidades. A última forma, a dimorfa virchowiana, na primeira impressão parece ser do tipo virchowiana, porém apresenta lesões com bordas bem definidas e placas do tipo da hanseníase tuberculóide. A baciloscopia é positiva e o teste de Mitsuda é negativo para estas duas últimas formas (TALHARI, 1994; VERONESI, 1997).

A Hanseníase Virchowiana mostra um quadro clínico variável, como máculas hipocrômicas com limites mal definidos, em grande número, ocupando todos segmentos corporais, pode apresentar também pápulas ou placas eritematosas, infiltradas, com limites difusos, em todo corpo e apresentam infiltrações nas orelhas, face e extremidades dos membros superiores e inferiores. Além disso, pode ocorrer infiltrado cutâneo difuso, sem lesões dermatológicas individualizadas, ou ainda nódulos e tubérculos, queda de cílios e supercílios, comprometimento de mucosas e troncos periféricos, sendo a perda de sensibilidade mais tardia do que nas formas tuberculóide e dimorfa, comprometimento dos testículos e da câmara anterior do olho. A simetria das lesões é característica desta forma clínica, a baciloscopia é sempre positiva e o teste de Mitsuda é sempre negativo (TALHARI, 1994; R. VERONESI, 1997).

Em todas as formas clínicas da hanseníase os nervos periféricos são atingidos, entretanto, ainda pode ocorrer uma lesão neural em que não há expressão dermatológica da doença, mesmo aparecendo em um número restrito de casos. A lesão nervosa, que começa com a destruição das terminações sensitivas, evolui para o comprometimento de todo tronco nervoso, com paralisia de grupos musculares, amiotrofias e deformidades, como no nervo facial, nos nervos ulnar e mediano, nervo radial, fibular comum e tibial posterior (MARANGONI, 1998).

Ainda, durante a evolução da doença, podem ocorrer reações independentemente do tratamento utilizado. Estas reações são respostas imunológicas do tipo Th1 (celular), associada com a forma tuberculóide e do tipo Th2 (humoral) associada com a forma virchowiana (TALHARI, 1994; PREVELLO e MIRA, 2007). Segundo Gomes e colaboradores (2007), as ulcerações dos pacientes com hanseníase parecem estar relacionadas à positividade da

baciloscopia. Este sintoma é importante para uma melhoria do diagnóstico precoce, avaliação e serviços de prevenção de incapacidade dos pacientes com hanseníase (GOMES, FRADE e FOSS, 2007).

2.1.3. Quimioterapia da Hanseníase

O tratamento da hanseníase compreende a quimioterapia específica, supressão dos surtos reacionais, prevenção de incapacidades físicas, e reabilitação física e psicossocial.

O tratamento específico indicado pelo Ministério da Saúde é a poliquimioterapia padronizada segundo recomendações da OMS. A poliquimioterapia da lepra é constituída por dapsona, rifampicina e clofazimina, tendo mostrado elevada eficácia. Essa associação tem proporcionado tratamento efetivo, sem aparecimento de resistência, comum quando apenas um desses fármacos é empregado (BRASIL, 2002).

A dapsona apresenta ação bacteriostática contra o *Mycobacterium leprae*, entretanto o baixo custo do fármaco somado a ausência de toxicidade torna-a fármaco de primeira escolha no tratamento e profilaxia da hanseníase (MARTINDALE, 2002). A dapsona, uma sulfona ativa contra um amplo espectro de bactérias, possui um mecanismo de ação através da inibição da síntese protéica por antagonismo competitivo com o ácido para-aminobenzóico (PABA) pelo sítio de ação da dihidropteroato sintetase, ou age como inibidor da diidrofolato redutase (GRUNWALD e AMICHAÏ, 1996).

Apesar do largo uso na terapêutica da hanseníase, o aparecimento de microrganismos resistentes às sulfonas tem reforçado o emprego simultâneo da dapsona com outros hansenostáticos, principalmente rifampicina e a clofazimina. Tem sido estimado que 2-10% de pacientes que trataram a doença somente com dapsona por muito tempo, apresentaram resistência ao medicamento (AMERICAN SOCIETY OF HEALTH-SYSTEM PHARMACISTS, 2006).

Essa resistência do *M. leprae* à dapsona deve ser suspeitada sempre que o paciente não apresente melhora com o tratamento supervisionado (MARTINDALE, 2002).

A rifampicina, um forte indutor de enzimas microssomais (LAU, 1995), possui um mecanismo de ação bactericida contra vários microrganismos, como o

M. leprae, o qual interfere na síntese de ácido nucléico inibindo a RNA polimerase DNA-dependente (MARTINDALE, 2002).

A clofazimina é um derivado da riminofenazina desenvolvido para o tratamento da tuberculose. Por apresentar tanto atividade antimicrobiana como antiinflamatória apresenta usos diversos, inclusive para o tratamento da hanseníase, em associação com os outros fármacos citados (QUEIROZ *et al.*, 2002; SALEM, STEFFAN e DUZGUNES, 2003). Possui atividade bacteriostática e baixa atividade bactericida (MARTINDALE, 2002).

A dose indicada da poliquimioterapia difere segundo o tipo da doença. Para os casos paucibacilares é indicado uma dose mensal supervisionada de 600 mg de rifampicina; uma dose mensal supervisionada e uma dose diária de 100 mg de dapsona. A duração deste tratamento é de seis doses mensais supervisionada de rifampicina. Já para os casos multibacilares, é indicado uma dose mensal supervisionada de 600 mg de rifampicina; uma dose mensal supervisionada e uma dose diária de 100mg de dapsona; e ainda uma dose mensal supervisionada de 300mg e doses diárias de 50mg de clofazimina. A duração deste tratamento é de doze doses mensais supervisionada de rifampicina (OPROSMOLIA, 1991; TALHARI, 1994; BRASIL, 2002).

Venkatesan e colaboradores (1990) estudaram as interações farmacocinéticas entre a dapsona e a clofazimina. Os resultados comprovaram que não há diferença na farmacocinética da dapsona entre pacientes medicados com dapsona e outros medicados com dapsona e clofazimina (VENKATESAN *et al.*, 1990).

2.1.3.1 A Dapsona

A dapsona (Figura 2), também chamada de DADPS, Dapsonum, DDS, diafenilsulfona, 4,4'-diaminodifenilssulfona e sulfonildianilina, apresenta-se como um pó cristalino branco ou levemente amarelado sem odor característico, pouco solúvel em água, coeficiente de partilha óleo/água (Lop P = 1,32), fotossensível, com fórmula molecular $C_{12}H_{12}N_2O_2S$, e peso molecular de 248,3 daltons (BRITISH PHARMACOPOEIA COMMISSION, 2005).

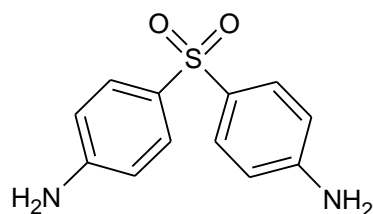


FIGURA 2. FÓRMULA ESTRUTURAL DA DAPSONA

A dose diária usual é de 100 mg/dia para adultos e de 1 a 2 mg/kg /dia em crianças. O emprego associado com a rifampicina é recomendado em todas as formas clínicas da doença, e ambas são associadas à clofazimina nas formas clínicas multibacilares (AMERICAN SOCIETY OF HEALTH-SYSTEM PHARMACISTS, 2006).

A dapsona é solúvel em álcool, metanol, acetona e ácido clorídrico, porém é muito pouco solúvel em água ($0.00999999977648 \text{ mg mL}^{-1}$) (BRITISH PHARMACOPOEIA COMMISSION, 2005).

As características de permeabilidade têm impacto direto no modo de ação do fármaco, pois a parede celular do *Mycobacterium leprae* contém uma grande quantidade de lipídeos (PANICKER, 2006). Devido a esta grande quantidade de lipídios na parede celular do *Mycobacterium leprae*, o bacilo torna-se resistente à maioria dos antibióticos e quimioterápicos. Entretanto, a dapsona é mais lipofílica que todas as outras sulfonamidas, além de estar totalmente não-dissociada em pH fisiológico (<0,01%). Essa combinação de alta lipofilicidade e baixa dissociação iônica favorece o seu potencial contra o *Mycobacterium leprae*. (SCIOR *et al.*, 1997)

A dapsona apresenta duas formas polimórficas - forma I (PF \cong 180°C) e forma II (PF \cong 175°C). Uma forma hidratada também é descrita (YANG e SWARBRICK, 1985; BORKA, 1991; GIRON, 1995).

Scior e colaboradores (1997) compararam a dapsona com outras sulfonamidas mostrando que apesar de suas semelhanças, apenas a dapsona tem atividade farmacológica contra o *Mycobacterium leprae*.

Quando administrada por via oral a dapsona é rápida e quase completamente absorvida no trato gastrointestinal, tem elevada ligação às proteínas (70 a 90%) e biodisponibilidade de 70 a 80%. O tempo de meia-vida é de 10 a 50 horas (~28 horas). Após administração oral, a concentração sérica

máxima ocorre entre 2 a 6 horas (AMERICAN SOCIETY OF HEALTH-SYSTEM PHARMACISTS, 2006).

O fármaco sofre biotransformação hepática, resultando na dapsona monoacetilada e dapsona hidroxilamina, ambas com atividade baixa e que não contribuem para o efeito terapêutico da dapsona. Entretanto, o metabólito hidroxilamina é responsável pela toxicidade do fármaco, contribuindo para os efeitos adversos de hemólise e metahemoglobinemia. A dapsona apresenta eliminação renal (70 a 85%) na forma inalterada e, em menor proporção, nos seus metabólitos – N-glicuronídeo e N-sulfamato. Uma pequena fração do fármaco livre é eliminada pela bile, pela circulação êntero-hepática, o que explica a persistência da dapsona no plasma durante várias semanas após a suspensão do tratamento (GRUNWALD e AMICHAÏ, 1996; MARTINDALE, 2002).

Apesar do seu maior potencial de uso no tratamento das várias formas de hanseníase, outras aplicações para a dapsona são encontradas na literatura, a citar: tratamento da dermatite herpetiforme; na pneumonia causada por *Pneumocystes carinii*, uma das infecções oportunistas mais freqüentes nas pessoas infectadas com SIDA; na profilaxia da toxoplasmose; na malária causada por *P. falsiparum* em portadores cloroquina-resistentes, associada ao clorproguanil (Lapdap[®], Roche) (LANG e GREENWOOD, 2003), na malária causada por *P. vivax*, associada à cloroquina e a pirimetamina; na tuberculose pulmonar; em doenças reumáticas e do tecido conjuntivo; e em doenças de pele (AMERICAN SOCIETY OF HEALTH-SYSTEM PHARMACISTS, 2006; CHARLES F. LACY, 2006).

Para o tratamento da dermatite herpetiforme, a dose depende de cada paciente, mas normalmente começa com 50 mg por dia podendo alcançar 300 mg por dia ou mais se necessário (MARTINDALE, 2002).

Quanto à toxicidade, a hemólise é o efeito tóxico mais comum, incluindo a anemia hemolítica, em pacientes com ou sem deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (GRUNWALD e AMICHAÏ, 1996; AMERICAN SOCIETY OF HEALTH-SYSTEM PHARMACISTS, 2006).

As reações adversas incluem anorexia, náusea, vômito, cefaléia, tontura, taquicardia, nervosismo, confusão mental, desorientações, e insônia. Reações de hipersensibilidade, normalmente mencionada como síndrome da dapsona, desenvolvem-se raramente e tende a ocorrer durante as primeiras seis semanas de terapia. Os sintomas da hipersensibilidade à dapsona incluem febre,

eosinofilia, mononucleose, linfadenopatia, leucopenia, e erupções cutâneas que podem progredir a dermatite esfoliativa e necrose tóxica epidérmica (MARTINDALE, 2002).

O fármaco é contra-indicado para pacientes com alergia às sulfonas, pacientes com anemia grave e com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase, pacientes cardíacos ou com doenças pulmonares, devido aos efeitos de hemólise e metaemoglobinemia, pacientes com deficiência de metaemoglobina-redutase e com insuficiência hepática e renal (GRUNWALD e AMICHAJ, 1996; MARTINDALE, 2002; AMERICAN SOCIETY OF HEALTH-SYSTEM PHARMACISTS, 2006). Segundo Santos e colaboradores (1994), pacientes tratados com dapsona, em sua maioria, apresentam redução de 1g dL^{-1} de hemoglobina o que leva à hemólise, e causa anemia. Isto ocorre provavelmente, pois a dapsona é um fármaco com potencial oxidativo e em doses terapêuticas pode produzir metaemoglobinemia (SANTOS *et al.*, 1994).

2.2. ABSORÇÃO E BIODISPONIBILIDADE DE FÁRMACOS

A disponibilidade sistêmica (biodisponibilidade) representa a quantidade do fármaco que chegou até a circulação sistêmica, enquanto que a absorção representa apenas a etapa de permeação do fármaco na mucosa do trato gastrintestinal, quando este ainda não está disponível na circulação sistêmica (LOBENBERG e AMIDON, 2000).

Para um fármaco ter uma ótima absorção no organismo, é necessário ter uma ótima solubilidade em água, mas ao mesmo tempo deve ter um caráter lipofílico para que seja capaz de permear as membranas do organismo. Isto é bem representado através da primeira Lei de Fick:

$$J = P \cdot C_{\text{aq}} \quad (1)$$

onde, J é o fluxo do fármaco através da biomembrana, P é o coeficiente de permeabilidade da membrana e C_{aq} é a concentração do fármaco no exterior aquosa da membrana.

O coeficiente de permeabilidade da membrana (P) é representado pela razão:

$$P = \frac{D \times K}{h} \quad (2)$$

onde, D é o coeficiente de difusão na membrana, K é o coeficiente de partição do fármaco e h é a espessura da membrana.

Finalmente, o coeficiente de difusão pode ser estimado pela equação de Stokes-Einstein:

$$D = \frac{R \times T}{6 \pi \eta r N} \quad (3)$$

onde, R é o constante molar dos gases, T é a temperatura absoluta, η é a viscosidade da membrana, r é o raio do esfericidade do fármaco permeando a membrana, e N é o número de avogadro (LOFTSSON, 2002).

O processo de absorção de fármacos através do trato gastrintestinal é muito complexo, podendo ser afetado por inúmeros fatores (YU *et al.*, 1996; CONSIGLIERI, STORPIRTIS e FERRAZ, 2000). A dissolução do fármaco é fundamental para absorção e conseqüente resposta terapêutica da maioria dos fármacos de administração oral, apresentados na forma farmacêutica sólida (AMIDON *et al.*, 1995).

Amidon e colaboradores (1995) propuseram um sistema de classificação biofarmacêutica que assume que a solubilidade e a permeabilidade são os parâmetros principais que controlam a absorção dos fármacos. Baseado nestes critérios, os fármacos são divididos em quatro grupos: Classe I: fármacos de alta solubilidade e alta permeabilidade; Classe II: fármacos de baixa solubilidade e alta permeabilidade; Classe III: fármacos de alta solubilidade e baixa permeabilidade; e Classe IV: fármacos de baixa solubilidade e baixa permeabilidade (AMIDON *et al.*, 1995).

A baixa solubilidade da dapsona ($\sim 10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) conduz a uma biodisponibilidade prejudicada, sendo necessária elevada quantidade de fármaco para obtenção de efeito terapêutico adequado.

As ciclodextrinas têm apresentado um papel importante no desenvolvimento de fármacos pouco solúveis por aumentar a solubilidade aparente e/ou dissolução, devido à sua propriedade de formar de complexos de inclusão ou dispersão sólida, atuando como carreadores hidrofílicos de fármacos com características inadequadas para complexação, ou ainda, como promotores da dissolução de comprimidos contendo doses elevadas de fármacos, nos quais o emprego de complexos fármaco/CD é difícil (CHALLA *et al.*, 2005).

2.3. CICLODEXTRINAS

2.3.1. As Ciclodextrinas Naturais

Ciclodextrinas naturais (Figura 3) são oligossacarídeos cíclicos contendo seis, sete ou oito unidades de α -D-glucopirranose, formando um anel cuja superfície externa é hidrofílica e o interior constitui uma cavidade central hidrofóbica, a qual pode acomodar uma variedade de fármacos e outras substâncias lipofílicas (VEIGA *et al.*, 1996).

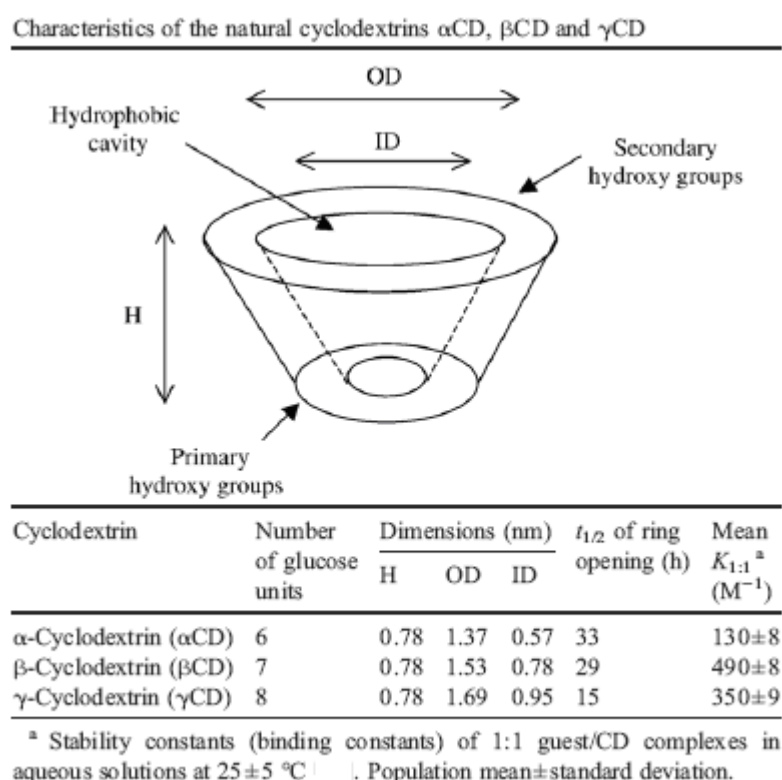


FIGURA 3. CICLODEXTRINAS NATURAIS

FONTE: (LOFTSSON e DUCHENE, 2007)

As ciclodextrinas são produzidas como um resultado da reação de transglicolação intramolecular da degradação do amido, por intermédio da enzima ciclodextrina glucanotransferase (CGTase).

Uma característica importante das ciclodextrinas é a formação de complexos de inclusão tanto no estado líquido quanto no estado sólido, nos quais cada molécula-hóspede é rodeada pelo ambiente hidrofóbico da cavidade, o qual é formado por um esqueleto carbônico e oxigênios na forma de éteres. Isso pode

levar à alteração de propriedades físico-químicas da molécula-hóspede, incluindo sua solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade (LOFTSSON e BREWSTER, 1996).

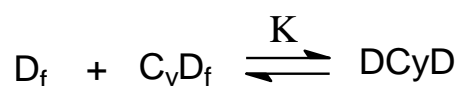
A formação de complexos de inclusão (Figura 4) é um arranjo dimensional entre a cavidade hospedeira e a molécula convidada. A cavidade lipofílica das moléculas de ciclodextrina promove um ambiente no qual as moléculas de tamanho apropriado não-polares podem entrar para formar estes sistemas de inclusão. A principal força é originada pela entalpia das moléculas de água, que são deslocadas pelas moléculas mais hidrofóbicas da substância presente na solução para manter uma associação apolar-apolar e diminuir a força do anel de ciclodextrina resultando em um estado de energia mais baixa (DEL VALLE, 2004).



FIGURA 4. FORMAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO
FONTE: (DEL VALLE, 2004)

As ciclodextrinas têm a capacidade de formar sistemas de inclusão com compostos sólidos, líquidos, ou gasosos, apresentando assim importância na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica. Inúmeras aplicações são atribuídas às ciclodextrinas, tais como melhoria na estabilidade - proteção contra oxidação, calor, perda por volatilidade - ; correção de paladar ou odor desagradável; alterações de características químicas; aumento da solubilidade de fármacos pouco solúveis, entre outras. (CEREDA, 2003)

A complexação de moléculas com ciclodextrinas ocorrem por uma interação não-covalente entre a molécula do fármaco e a cavidade da ciclodextrina. A formação do complexo está em constante equilíbrio e é dependente da força de complexação, representada pela constante de estabilidade do complexo, K:



onde, D_f e $C_y D_f$ são o fármaco e a ciclodextrina livres, respectivamente, interagindo para formar um complexo de inclusão, $DCyD$, fármaco-ciclodextrina, com uma constante K de ligação, ou seja, a constante de equilíbrio do complexo (STELLA *et al.*, 1999).

O termo complexação é utilizado, pois se refere aos complexos de inclusão formados pela interação de substâncias com ciclodextrinas. Nestes complexos de inclusão as ligações envolvidas são fracas, do tipo Van der Waals ou ligações de hidrogênio, não há quebra nem formação de ligações covalentes (STELLA *et al.*, 1999). Entretanto, este termo complexação é diferente daquele utilizado em compostos de coordenação. Compostos de coordenação, também chamados de complexos, se formam da adição de quantidades estequiométricas de dois ou mais compostos estáveis, sendo que a espécie central pode ser um íon ou um átomo e os ligantes podem ser íons ou moléculas neutras. As ligações formadas entre os ligantes e a espécie central do complexo são ligações coordenadas, ou seja, o ligante doa um par de elétrons à espécie central (FERNELIUS, 1965).

Uma das principais utilidades potenciais das ciclodextrinas é solubilização de fármacos. A vantagem do uso de ciclodextrinas frente ao uso de solventes orgânicos está ligada não só ao aspecto toxicológico, como também ao seu desempenho no organismo. Dada a sua capacidade em formar complexos de inclusão, as ciclodextrinas normalmente solubilizam fármacos como uma função linear de sua concentração (BREWSTER e LOFTSSON, 2007).

Muitos derivados de ciclodextrinas naturais sintetizados por meio de aminações, esterificações ou etereificações dos grupos hidroxil primário ou secundário, são descritos na literatura (DEL VALLE, 2004).

Os derivados metilados, hidroxialquilados e *branched* são altamente solúveis em água, sugerindo seu uso como solubilizantes para fármacos fracamente hidrossolúveis complexos (LOFTSSON, FRIORIKSDOTTIR e GUMUNSDOTTIR, 1996).

A Tabela 1 mostra a solubilidade, peso molecular e grau de substituição das ciclodextrinas naturais e ciclodextrinas derivadas mais comumente empregadas.

TABELA 1. SOLUBILIDADE E PESO MOLECULAR DE ALGUMAS CICLODEXTRINAS NATURAIS E MODIFICADAS

Ciclodextrina	Substituição ^a	Peso molecular (Da)	Solubilidade em água (mg.mL ⁻¹) ^b
α-CD	-	972	145
β-CD	-	1135	18,5
HPβCD	0,65	1400	> 600
RMβCD	1,8	1312	> 500
SBEβCD	0,9	2163	> 500
γ CD	-	1297	232
HPγCD	0,6	1576	> 500

FONTE: Loftsson e Duchêne, 2007.

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

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

2.3.2. Ciclodextrinas hidroxialquiladas

Um grupo de derivados das ciclodextrinas muito utilizado hoje na complexação de fármacos é o das CDs hidroxialquiladas. Como exemplos deste tipo de derivados, existem a 2-hidroxietil-β-CD (2-HEβCD), a 2-hidroxipropil-β-CD (2-HPβCD), a 3-hidroxipropil-β-CD (3-HPβCD) e a 2,3-dihidroxipropil-β-CD (2,3-DHPβCD) (Figura 5) (DUCHÊNE e WOUESSIDJEWE, 1990).

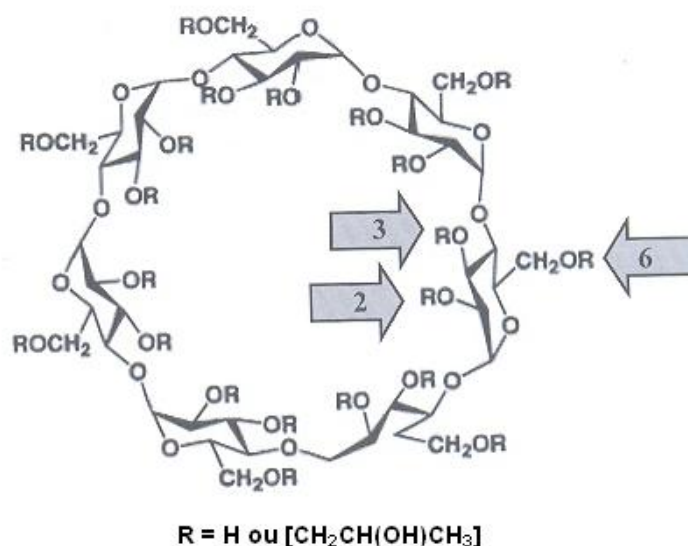


FIGURA 5. ESTRUTURA DO DERIVADO HPβCD. EM DESTAQUE, AS POSIÇÕES DOS GRUPOS SUBSTITUINTES

FONTE: (DUCHÊNE e WOUESSIDJEWE, 1990)

As ciclodextrinas hidroxialquiladas são largamente aplicadas na indústria alimentícia, farmacêutica e de produtos para agricultura. São preparadas por meio da reação de β-ciclodextrina com óxido de propileno em soluções alcalinas. Altas concentrações de álcalis favorecem a alquilação em O-6, enquanto que concentrações baixas favorecem-na em O-2, gerando produtos sempre alquilados randomicamente. Por esta razão, as HPβCDs são misturas amorfas de componentes quimicamente relacionados com diferentes graus de substituição. Esta característica heterogênea previne a cristalização e, com isso, permite que o derivado hidroxialquilado seja bastante solúvel em água e etanol (YUAN, JIN e LI, 2008).

Segundo Uekama, Hirayama e Arima (2006), ciclodextrinas amorfas como as hidroxialquiladas são úteis por inibir transições polimórficas e cristalinização de fármacos de baixa solubilidade durante o seu armazenamento. Este fato pode, conseqüentemente, melhorar as características de dissolução e de biodisponibilidade destes fármacos.

O grau e o padrão de substituição podem afetar a formação e a estabilidade dos complexos de inclusão com estas ciclodextrinas. Segundo Yuan, Jin e Li (2008), HPβCDs com grau de substituição inferior a 8 teriam propriedades de solubilização ótimas para moléculas-hóspede lipossolúveis, e estas preparações poderiam ser transformadas em pós não-higroscópicos.

Quando se administra por via oral um complexo de inclusão de um fármaco com uma ciclodextrina hidroxialquilada, de acordo com os estudos realizados previamente, espera-se que o complexo não sofra qualquer tipo de alteração ao chegar ao estômago. No intestino delgado, os complexos serão continuamente formados e dissociados e haverá competição entre o fármaco e os sais biliares pela complexação com a ciclodextrina. Conseqüentemente, a presença de complexos hidrossolúveis no epitélio intestinal hidratado favorecerá a disponibilidade e absorção do fármaco (LOFTSSON e DUCHENE, 2007). No intestino grosso, as bactérias da flora microbiana realizarão, em pequena extensão, a hidrólise enzimática da HP β CD, sendo que a maior parte da ciclodextrina será eliminada nas fezes na forma intacta (RAMA *et al.*, 2005).

A HP β CD foi a primeira ciclodextrina modificada aprovada pelo FDA (YUAN, JIN e LI, 2008) apresentando monografia descrita na Farmacopéia Européia (BREWSTER e LOFTSSON, 2007).

2.3.3. Toxicidade das ciclodextrinas

A alegada alta toxicidade oral da β CD relatada em 1957 tem sido contestada ao longo dos anos através de estudos detalhados de metabolismo e toxicidade em ratos e cães (SZEJTLI, 1984; IRIE e UEKAMA, 1997) originando uma posição mais receptiva por parte das autoridades oficiais com relação a estes tipos de compostos.

A toxicidade das substâncias está diretamente ligada com sua capacidade de ser absorvida pelo organismo, de interagir com os sistemas enzimáticos, provocando alterações metabólicas ou, ainda, com a capacidade de se depositarem em certos órgãos e tecidos.

A estrutura química das ciclodextrinas, que contém um grande número de aceptores e doadores de hidrogênios, assim como seu alto peso molecular e seu coeficiente de partição octanol/água muito baixo, são características que explicam porque elas são tão pouco absorvidas no trato gastrintestinal, contribuindo, assim, para sua baixa toxicidade (LOFTSSON e DUCHENE, 2007).

Estudos revelaram que as α e β -ciclodextrinas naturais apresentam certo grau de nefrotoxicidade, efeito este vinculado à sua cristalização ou à formação de complexos com o colesterol nos tecidos renais. A utilização de derivados

hidroxipropilados contorna este problema, já que as moléculas apresentam uma solubilidade bem mais elevada em água (IRIE e UEKAMA, 1997).

A atividade hemolítica das ciclodextrinas naturais está relacionada à solubilização de componentes das membranas celulares e segue a seguinte ordem: β -CD > α -CD > γ -CD. Quando a cavidade é modificada por derivatização química, seus efeitos sobre as membranas celulares são bastante diferentes daqueles obtidos com as moléculas originais (IRIE e UEKAMA, 1997).

A β CD está hoje autorizada como ingrediente alimentar em vários países, tais como Suécia, Alemanha, Bélgica, Espanha, França, Holanda, Hungria, Estados Unidos da América e Japão. A monografia da β -CD está incluída na Farmacopéia Americana, Farmacopéia Européia e Farmacopéia Japonesa, entre outras, assim como no “Handbook of Pharmaceutical Excipients” (LOFTSSON e DUCHENE, 2007). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), na Resolução RDC 2 de 15 de janeiro de 2007 aprova o uso de ciclodextrinas como aditivos para aromatizantes (ANVISA, 2007).

A Tabela 2 contém os derivados de β CD que podem ser utilizados pela indústria farmacêutica, classificados como hidrofílicos, hidrofóbicos e iônicos. Conforme a tabela, os derivados hidroxialquilados, como a HP β CD, podem ser utilizados em vias parenteral, oral ou mucosal, como nasal, sublingual, oftálmica, pulmonar, retal e vaginal. (UEKAMA, HIRAYAMA e ARIMA, 2006)

TABELA 2. CICLODEXTRINAS PARA USO FARMACÊUTICO

Derivados de ciclodextrinas	Características	Uso Farmacêutico
<i>Derivados Hidrofílicos</i>		
Metilados		
Me β CD; DM β CD	Solúvel em água resfriada e em solventes orgânicos	Oral, dérmica, mucosal
DMA β CD	Solúvel em água, pouco hemolítica	Parenteral, oral, mucosal
Hidroalquilados		
2-HE β CD; 2-HP β CD; 3-HP β CD; 2,3-DHP β CD	Alta solubilidade em água	Parenteral, oral, mucosal
Ramificadas		
G ₁ β CD; G ₂ β CD; GUG β CD	Alta solubilidade em água e baixa toxicidade	Parenteral, oral, mucosal
<i>Derivados Hidrofóbicos</i>		
Alquilados		
DE β CD; TE β CD	Insolúvel em água, solúveis em solventes orgânicos	Oral, subcutânea (liberação lenta)
Acilados		
TA β CD	Insolúvel em água, solúveis em solventes orgânicos	Oral, parenteral (liberação lenta)
TB β CD	Mucoadesiva	Oral, parenteral (liberação lenta)
TV β CD	Formadora de filme	Oral, parenteral (liberação lenta)
<i>Derivados Ionizáveis</i>		
Aniônicos		
CME β CD	pKa entre 3 e 4, solúvel em pH maior que 4	Oral, dérmica, mucosal (liberação controlada, entérica)
Sulfato- β CD	pKa maior que 1, solúvel em água	Oral, mucosal
SBE4 β CD; SBE7 β CD	Solúvel em água	Parenteral, oral
Sulfato-Al β CD	Insolúvel em água	Parenteral (liberação lenta)

FONTE: (UEKAMA, HIRAYAMA e ARIMA, 2006)

2.3.4. Sistemas Multicomponentes

A eficiência de complexação das ciclodextrinas pode ser aumentada por adição ao meio complexante de uma reduzida quantidade de polímero hidrossolúvel, resultando na formação de um complexo multicomponente fármaco-CD-polímero, também designado por co-complexo (fármaco-CD)-polímero. Este complexo, em geral, apresenta um notável aumento de solubilidade comparativamente ao correspondente complexo binário (LOFTSSON *et al.*, 1994).

O mecanismo pelo qual a eficiência de complexação das ciclodextrinas é aumentada na presença dos polímeros hidrossolúveis não está totalmente esclarecido. Contudo, existe um mecanismo proposto com base na analogia dos aumentos de solubilidade conferidos pelos polímeros nas soluções aquosas de tensoativos. Segundo este pressuposto, o mecanismo de complexação associado à formação dos complexos multicomponentes com polímeros deverá ser semelhante à formação dos complexos tensoativos-polímero (LOFTSSON, 1995).

Em solução aquosa, os polímeros diminuem a mobilidade das ciclodextrinas e aumentam a solubilidade dos complexos formados. Contudo, tal como para os complexos tensoativo-polímero, a estrutura química dos complexos resultantes permanece desconhecida. Sabe-se que, em solução aquosa, os polímeros hidrossolúveis alteram a hidratação das moléculas de ciclodextrina, bem como sua estrutura tridimensional, atuando como co-complexante (LOFTSSON, 1998).

Em conclusão, os polímeros hidrossolúveis interagem com as moléculas de ciclodextrinas ou com os complexos fármaco-CD, formando complexos multicomponentes fármaco-CD-polímero ou co-complexos, isto é, um complexo formado entre vários complexos binários fármaco-CD com uma cadeia linear de polímero [(fármaco-CD)_n-polímero]. Estes agregados apresentam valores de K superiores aos apresentados pelos respectivos complexos fármaco-CD o que está na origem da maior solubilidade dos complexos multicomponentes (CAPPELLO *et al.*, 2001) (Figura 6). Exemplos de complexos de fármacos com ciclodextrinas em que este ganho foi observado são o naproxeno/HPβCD (MURA, FAUCCI e BETTINETTI, 2001); vinpocetina/SBEβCD (RIBEIRO *et al.*, 2003); glimepirida/HPβCD e SBEβCD (AMMAR *et al.*, 2006) e nitroimidazóis, como

metronidazol, tinidazol, ornidazol e secnidazol/HP β CD; β -CD ou M β CD (CHADHA *et al.*, 2007).

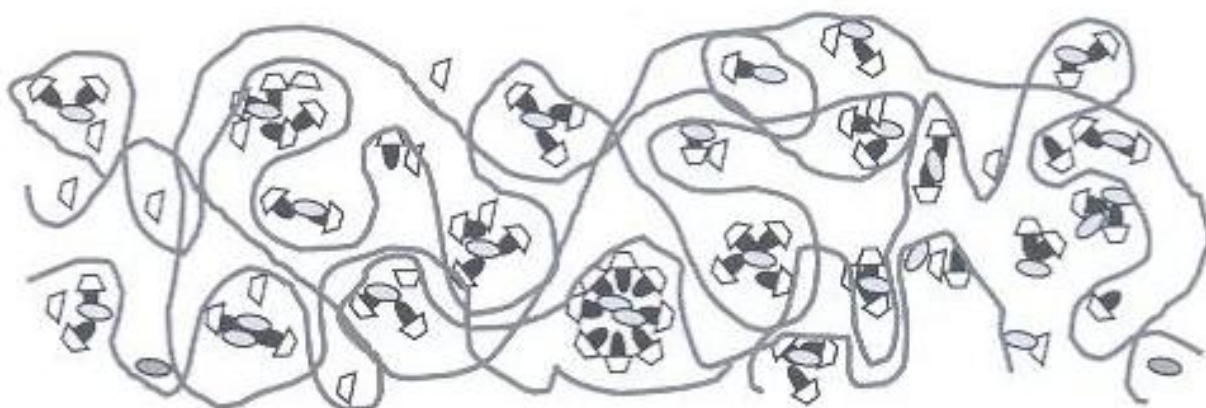


FIGURA 6 REPRESENTAÇÃO DOS COMPLEXOS FÁRMACO-CD-POLÍMERO EM SOLUÇÃO

FONTE: (CAPPELLO *et al.*, 2001).

Savolainen e colaboradores (1998) verificaram um aumento sinérgico da solubilidade da glibenclamida na presença da β -CD, HP β CD ou SBE β CD e do HPMC. A adição de pequenas quantidades do polímero (0,05% HPMC) ao meio de complexação reduziu em 40 a 80% o teor de ciclodextrina nas formulações, sem qualquer prejuízo na biodisponibilidade do fármaco.

Capello e colaboradores (2001) realizaram estudos *in vitro* e *in vivo* de sistemas envolvendo tropicamida e HP β CD, na presença ou ausência de polímeros hidrossolúveis. A adição de 0,25% de CMC e 0,10% de HPMC aos sistemas tropicamida:HP β CD resultou em um incremento da solubilidade superior à solubilidade do sistema binário tropicamida:HP β CD ou quando PVP-K30 (0,25%) foi empregado.

2.4. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO

Uma das principais características das ciclodextrinas é o fato de formarem complexos de inclusão quer em solução, quer no estado sólido, nos quais cada molécula hóspede se encontra envolvida pelo ambiente hidrofóbico da cavidade da ciclodextrina. Desta forma, faz-se necessário lançar mão de diferentes técnicas

para avaliar cada caso específico, levando em conta a natureza do complexo e as características químicas da molécula-hóspede.

Várias técnicas podem ser empregadas para avaliar a formação de complexos entre fármacos e ciclodextrinas. Entre elas, podemos citar a microscopia eletrônica de varredura (RIBEIRO *et al.*, 2003); os métodos termoanalíticos, como a calorimetria exploratória diferencial, e a difração em raios-X. Métodos espectroscópicos, como a espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (RAO *et al.*, 2006) e espectroscopia Raman (VEIGA *et al.*, 1996; PEREIRA *et al.*, 2007), permitem verificar quais grupamentos químicos da molécula hóspede interagiram com a ciclodextrina. A ressonância magnética nuclear é de especial valia, pois a combinação desta técnica com o uso de softwares como o HyperChem 6 ou o GROMACS, permite realizar a modelagem molecular do complexo (OMARI *et al.*, 2006; BÉNI *et al.*, 2007; DRAGAN *et al.*, 2007; FIGUEIRAS *et al.*, 2007).

2.4.1. Caracterização dos Complexos de Inclusão em Solução

2.4.1.1. Ensaio de Solubilidade de Fases

Entre todas as propriedades das moléculas hóspedes que se pretendem alterar por complexação com ciclodextrinas, a solubilidade é sem dúvida aquela que mais interesse apresenta em termos de aplicações farmacêuticas. Por conseguinte, o método de solubilidade de fases, descrito por Higuchi e Connors (1965), é habitualmente utilizado para caracterização da formação de complexos de inclusão em solução.

Os diagramas de solubilidade de fases estão dependentes do modelo de inclusão, estando classificados em dois tipos, A e B, que apresentam por sua vez diferentes subtipos, tal como representado na Figura 7.

Curvas do tipo A indicam a formação de complexos de inclusão solúveis enquanto do tipo B indicam a formação de complexos de inclusão de baixa solubilidade. O diagrama do tipo B pode ainda ser de dois tipos: B_S e B_I. Curva do tipo B_S indica complexos de solubilidade limitada enquanto que B_I indica complexos insolúveis.

Os diagramas do tipo A são os de maior interesse, e se subdividem em: A_L (aumento linear da solubilidade do fármaco, indica 1º ordem), A_P (curva isoterma

com desvio em uma direção positiva da linearidade, normalmente indica ordens maiores) e diagramas A_N (curva isoterma com desvio em uma direção negativa da linearidade, indicando que a ciclodextrina é menos efetiva em maiores concentrações) (DEL VALLE, 2004; BREWSTER e LOFTSSON, 2007).

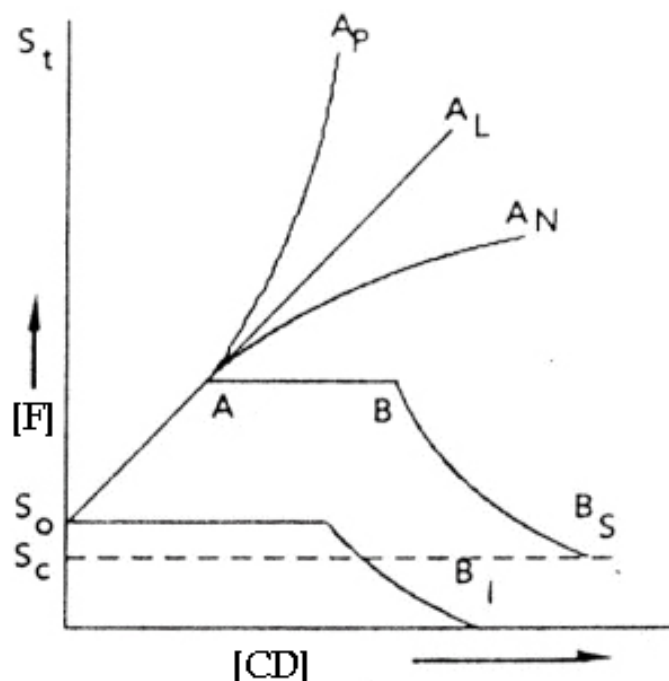


FIGURA 7. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS TIPOS DE DIAGRAMAS DE FASES
 FONTE: (BREWSTER e LOFTSSON, 2007)

A estequiometria, o valor de K_c dos complexos formados e conseqüente eficiência de complexação podem ser facilmente determinados a partir do segmento ascendente linear dos diagramas de solubilidade de fases. Na presença de um segmento linear obtido nestes diagramas é assumida a formação de complexos de estequiometria 1:1, ou seja, de primeira ordem relativamente à ciclodextrina e de ordem 1 relativamente à molécula hóspede.

Assim, a constante de equilíbrio do complexo pode ser facilmente deduzida a partir da declive e ordenada na origem do segmento linear ascendente a partir da equação de Higuchi e Connors (1965):

$$K_{1:1} = \frac{\text{coeficiente angular}}{S_0 (1 - \text{coeficiente angular})}$$

onde, $K_{1:1}$ é a constante de equilíbrio para diagramas de 1º ordem, coeficiente angular é a inclinação da reta e S_0 a solubilidade intrínseca do fármaco (ponto onde intercepta o eixo y).

Valores baixos de K indicam que o complexo tenderá a existir mais na forma dissociada, enquanto que valores altos indicam que a forma complexada será predominante em relação à forma dissociada (DUCHÊNE, WOUESSIDJEWE e POELMAN, 1997).

2.4.1.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma das técnicas mais usadas na investigação da estabilidade, estequiometria e geometria dos complexos de inclusão. As técnicas de RMN de ^1H proporcionam um importante conhecimento acerca da estrutura e interações estabelecidas pelas ciclodextrinas e seus complexos de inclusão (IKEDA *et al.*, 2004; TRAPANI *et al.*, 2007).

A Ressonância Magnética Nuclear é uma forma de espectrometria de absorção, na qual sob condições apropriadas, uma amostra pode absorver radiação eletromagnética em uma frequência referente às características estruturais da amostra. A absorção é em função de determinados núcleos da molécula. Há núcleos com número de spin $\frac{1}{2}$, como ^1_1H , ^3_1H , $^{13}_6\text{C}$, $^{15}_7\text{N}$, $^{19}_9\text{F}$ e $^{31}_{15}\text{P}$, que possuem uma distribuição de carga esférica e uniforme. Os núcleos que apresentam número de spin igual ou maior que um possuem uma distribuição de carga não esférica. Sendo assim, o número de spin determina o número de orientações diferentes que um núcleo pode ter quando está em um campo magnético uniforme. Com isso, os núcleos mais amplamente utilizados na espectrometria de RMN são o ^1H e o ^{13}C (SILVERSTEIN, BASSLER e MORRILL, 1994).

O espectro é registrado como uma série de picos cujas áreas são proporcionais ao número de núcleos que eles representam, como por exemplo, de hidrogênios (SILVERSTEIN, BASSLER e MORRILL, 1994).

A espectrometria de RMN pode ser utilizada como um método quantitativo de caracterização de complexos supramoleculares, como os sistemas binários e ternários desenvolvidos neste trabalho. Com esta técnica, a interação do fármaco com a ciclodextrina pode ser evidenciada. A formação do complexo de inclusão pode ser comprovada através das mudanças das transições químicas do fármaco puro e das ciclodextrinas no espectro de RMN, sendo normalmente mais utilizado

o RMN de ^1H . As transições de sinais dos prótons no interior da cavidade das ciclodextrinas são indicativas que a molécula hospedeira está localizada perto dos prótons no qual a transição é observada (JULLIAN *et al.*, 2007).

Zhang e colaboradores (2008) utilizaram RMN de ^1H e RMN 2D para caracterizar os complexos de inclusão com ácido caféico em hidroxipropil- β -ciclodextrina. Na ressonância magnética nuclear do complexo de inclusão, os cinco tipos de hidrogênio do ácido caféico ficaram com os valores de delta alterados permitindo mostrar que a parte da molécula que é mais hidrofóbica fica dentro da cavidade da HP β CD, e os grupos mais polares da molécula ficam expostos para fora da cavidade.

Numanoglu e colaboradores (2007) utilizaram RMN de ^1H para confirmar a formação do complexo de inclusão dos compostos de fragrâncias, linalol e acetato de benzila, com β CD e com HP β CD, para melhorar a estabilidade e a solubilidade destes compostos.

Lyng e colaboradores (2005) utilizaram RMN de ^1H para confirmar a formação do complexo de inclusão do carotenóide bixina com α -ciclodextrina.

2.4.2. Caracterização dos Complexos de Inclusão no Estado Sólido

A formação dos complexos em solução não garante necessariamente a sua obtenção e isolamento no estado sólido, uma vez que estes são o resultado de um conjunto de equilíbrios químicos. O produto sólido resultante pode ser apenas uma dispersão fina do fármaco no interior da ciclodextrina ou ainda uma mistura constituída pelo complexo de inclusão, fármaco não complexado e ciclodextrina sob a forma hidratada. Assim, a caracterização físico-química dos produtos resultantes no estado sólido, torna-se indispensável.

São muitas as metodologias que podem ser utilizadas para a investigação dos complexos de inclusão no estado sólido, apresentando todas elas características próprias que permitem não só detectar a formação do complexo de inclusão, como também conhecer a sua estrutura química e interações que se estabelecem entre os diferentes componentes que o constituem.

2.4.2.1. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Entre os métodos termoanalíticos, DSC é amplamente utilizada para a caracterização de complexos supramoleculares, como complexos de inclusão entre fármacos e ciclodextrinas.

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) é uma técnica na qual é medida a diferença de energia dentro e fora de uma amostra e da referência em uma atmosfera controlada e sob um gradiente de temperatura. No início da utilização da técnica de DSC, o método mais utilizado era a calorimetria exploratória diferencial com compensação de potência. Atualmente, a calorimetria exploratória diferencial com fluxo de calor é a mais utilizada (GIRON, 1998b; 1998a; IONASHIRO, 2004).

No DSC com compensação de potência a amostra e a referência são mantidas isotermicamente pelo uso de aquecedores individuais, sendo que o parâmetro medido é a diferença na potência de entrada dos aquecedores.

Já na DSC com fluxo de calor, mais utilizada, o parâmetro medido é o fluxo de calor e, a amostra e a referência são mantidas isotermicamente pela aplicação de energia elétrica quando eles são aquecidos ou resfriados a uma razão linear, conforme mostrado na Figura 8. A curva obtida é o registro do fluxo de calor dH/dt em função da temperatura (IONASHIRO, 2004).

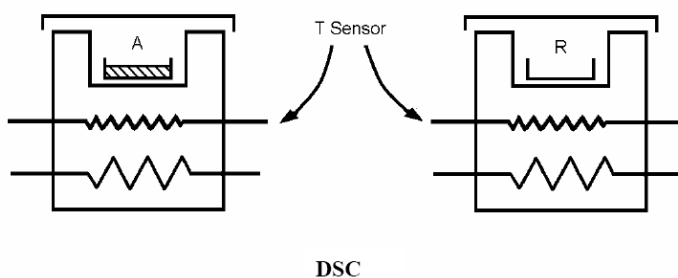


FIGURA 8. MODELO DO EQUIPAMENTO DE CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL POR FLUXO DE CALOR

FONTE: (IONASHIRO, 2004).

A Calorimetria Exploratória Diferencial é muito utilizada para a caracterização de substâncias porque acompanha os efeitos de calor associados a praticamente todas as alterações físicas ou químicas da amostra. Geralmente reações de transições de fase, desidratações, reduções e certas reações de

decomposição produzem efeitos endotérmicos, representados na DSC (fluxo de calor) por um pico descendente, enquanto que cristalizações, oxidações, algumas reações de decomposição produzem efeitos exotérmicos, representados por um pico ascendente (GIRON, 1998a; IONASHIRO, 2004).

As principais vantagens desta técnica sobre a calorimetria clássica são a rapidez nas determinações, a utilização de pouca massa de amostra, a amostra que pode ser sólida ou líquida, a aplicação a processo de resfriamento e medidas sob alta pressão, além de poder estudar diferentes tipos de reações químicas. É importante também ressaltar que nenhuma grande precisão pode ser obtida sem um rígido controle das variáveis que afetam as curvas de DSC, como por exemplo, a razão de aquecimento da célula, a natureza do suporte de amostras, a natureza da substância utilizada como referência, a influência da atmosfera do forno e o tamanho das partículas da amostra e seu grau de cristalinidade (IONASHIRO, 2004).

Araújo e colaboradores, em seus trabalhos, empregaram a técnica de Calorimetria Exploratória Diferencial para caracterização de complexos de inclusão de pirimetamina (DE ARAUJO *et al.*, 2007) e de sulfadiazina (DE ARAUJO *et al.*, 2008) com HP β CD.

Scalia e colaboradores (2006) estudaram a formação de complexos de inclusão com HP β CD com o filtro solar - butil metoxidibenzoilmetano -, seguido da incorporação do sistema formado em lipossomas para conferir estabilidade ao filtro, usando calorimetria exploratória diferencial.

Mura e colaboradores (2001) empregaram DSC para avaliar a influência do polímero PVP na complexação de naproxeno com β -ciclodextrina.

2.4.2.2. Difração em Raios X

A técnica de difratometria de raios-X mede a intensidade de raios-X espalhados em uma amostra sólida sobre diferentes ângulos. A interferência entre as ondas difratadas pode ser construtiva, quando as ondas em fase se somam, ou destrutiva, quando as ondas fora de fase se cancelam. W. H. Bragg e W.L. Bragg contribuíram com o desenvolvimento desta técnica, pois enxergaram os cristais como planos de átomos que se comportavam como planos de reflexão,

para os quais o ângulo de incidência era igual ao ângulo de reflexão. Isso originou a expressão de análise da estrutura do cristal, a Lei de Bragg:

$$n\lambda = 2d \operatorname{sen}\theta,$$

onde λ é o comprimento de onda, n é a ordem da reflexão, d é a família de planos específica e θ é o ângulo de incidência ou reflexão dos planos (HAMMOND, 2000).

Quando os feixes refletidos encontram-se em fase, ou seja, quando há uma interferência construtiva, a Lei de Bragg é satisfeita e assim os raios-X são detectados, originando o difratograma da substância (HAMMOND, 2000).

Algumas ciclodextrinas, no seu estado cristalino, formam ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, as quais estabilizam tanto a conformação da molécula como também a sua estrutura cristalina, gerando um difratograma amorfo, ou seja, sem picos característicos do estado cristalino da molécula (DODZIUK, 2006).

Veiga e colaboradores (1996) utilizaram a difração de raios-X para caracterizar complexos de tolbutamida com β -ciclodextrina e hidroxipropil- β -ciclodextrina. Simeoni e colaboradores (2004) utilizaram a técnica para caracterizar complexos de ciclodextrinas com o filtro solar butilmetoxidibenzoilmetano e Mura e colaboradores (2001) demonstraram a influência do polímero PVP na complexação de naproxeno com β -ciclodextrina através de difração, entre outros.

2.4.2.3. Microscopia eletrônica de varredura

O Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) é muito utilizado para a análise microestrutural de materiais sólidos, fornecendo um resultado com uma imagem de fácil interpretação. O aumento máximo conseguido pelo MEV fica entre o microscópio ótico (MO) e o Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET). A grande vantagem do MEV em relação ao microscópio ótico é sua alta resolução, e em relação ao MET é a facilidade do preparo das amostras.

As análises por Microscopia Eletrônica de Varredura podem ser utilizadas para investigar a morfologia do fármaco puro e modificações na presença de outras substâncias.

Maestrelli e colaboradores (2005) empregaram microscopia eletrônica de varredura para identificar complexos de β CD e HP β CD com quetoprofeno para aplicação em lipossomas. Maestrelli e colaboradores (2008) também mostraram a morfologia por MEV de microesferas para liberação sítio-específica com o complexo de inclusão quetoprofeno e HP β CD. Scalia e colaboradores (2006) utilizaram MEV para demonstrar os complexos de inclusão de butil metoxidibenzoilmetano com HP β CD.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo estudar as interações da dapsona com ciclodextrinas na ausência e presença de polímeros hidrossolúveis, visando melhorar a solubilidade e a biodisponibilidade do fármaco.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A fim de atingir o objetivo geral, foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- Desenvolver sistemas binários de dapsona com ciclodextrinas (β CD e HP β CD)
- Desenvolver sistemas ternários de dapsona, ciclodextrinas (β CD e HP β CD) e polímeros hidrossolúveis (PVP-K30/HPMC).
- Caracterizar os sistemas binários e ternários obtidos, utilizando ensaio de solubilidade, calorimetria exploratória diferencial, difração em Raios-X e microscopia eletrônica de varredura.
- Estudar as interações entre dapsona e ciclodextrinas empregando RMN de ^1H .

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL E EQUIPAMENTOS

4.1.1. Substância química de referência

Dapsona matéria-prima foi obtida da Farnos[®] Distribuidora de Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, lote nº 20051104, teor de pureza 99,15%.

4.1.2. Reagentes e Solventes

β -Ciclodextrina (Glycosan[®]) (P.M. 1135 g/mol) e Hidroxipropil- β -ciclodextrina (Glycosan[®] HP β CD) (P.M. 1400 g/mol e grau de substituição de 0,58 a 0,73) foram gentilmente cedidas pela Chemyunion – Indústrias Químicas Ltda.

Foram empregados metanol (Merck[®] Grau HPLC) e água purificada.

Os polímeros hidrossolúveis utilizados foram o PVP-K30 (BASF[®] The Chemical Company Ltda) com peso molecular de 50.000 g/mol, o qual é livremente solúvel em ácidos e água, e hidroxipropilmetilcelulose (Galena[®] Quimica e Farmacêutica Ltda), com peso molecular de 86.000 g/mol, solúvel em água fria.

4.1.3. Equipamentos

Os complexos binários e ternários de dapsona foram obtidos empregando balança eletrônica analítica AG200 Gehaka[®], agitador magnético TE-085 Tecnal[®], estufa de secagem e esterilização mod. TE 394/1 Tecnal[®] e liofilizador Edwards[®].

A caracterização da formação dos complexos no estado sólidos foi realizada empregando Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL[®] mod. JSM 6360 LV, sistema de Calorimetria Exploratória Diferencial TA Instruments DSC 2910, e sistema de Difractometria de Raios-X Shimadzu modelo XD-6000.

Os ensaios de solubilidade foram realizados usando câmara incubadora com agitação orbital Marconi[®] MA-420.

Os ensaios de ressonância magnética nuclear foram realizados empregando espectrômetro Bruker AVANCE 400 NMR operando em 9.4 Tesla, observando ^1H a 400,13 MHz.

A quantificação dos fármacos foi realizada por meio de espectrofotometro UV-Vis Shimadzu, mod. UVPC v3.9 usando cubetas de quartzo com 3 mL de caminho ótico.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Preparo dos Sistemas Binários e Ternários

Os sistemas binários e ternários foram obtidos empregando o método da coevaporação (SCALIA *et al.*, 2002; SIMEONI, SCALIA e BENSON, 2004; SCALIA *et al.*, 2006).

Quantidades equimolares de dapsona e HP β CD ou β CD foram pesadas e dispersas em metanol grau farmacêutico e água purificada, respectivamente. As dispersões obtidas foram misturadas e homogeneizadas em agitador magnético TE-085 Tecnal[®], por 24 horas. A dispersão obtida foi evaporada em estufa de ar circulante Tecnal[®] TE 394/1 a 40°C por 56 horas.

Para o preparo dos sistemas ternários, quantidades equimolares de dapsona e HP β CD ou β CD foram dispersos em água purificada e adicionados de 0,25 % (p/v) de PVP-K30 ou 0,15 % (p/v) de HPMC. A dispersão resultante foi submetida à mesma metodologia empregada para obtenção dos sistemas binários.

4.2.2. Caracterização dos Sistemas Binários e Ternários em Solução

4.2.2.1. Ensaio de Solubilidade

Os ensaios de solubilidade foram realizados de acordo com o descrito por Higuchi e Connors (1965): um excesso de dapsona (~1g) foi adicionado a soluções aquosas contendo concentrações crescentes de PVP-K30 (0-0,3%), HPMC (0-0,3%), HP β CD (0 a 40 mmol/L) ou β CD (0 a 40 mmol/L), na presença ou ausência de uma quantidade fixa de polímeros (0,25 % PVP-K30 ou 0,15 % HPMC). As suspensões obtidas foram mantidas sob agitação em câmara

incubadora com agitação orbital Marconi[®] MA-420 por 72 horas, a temperatura de 37°C, filtradas em cartuchos de tamanho de poro de 0,45 µm, e quantificadas em comprimento de onda de 290 nm, segundo a equação da reta $Abs = 0,03469 + 0,03285 \times C$ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) ($r = 0,99726$).

4.2.2.2. Ressonância Magnética Nuclear

A formação dos complexos de inclusão de dapsona:βCD e dapsona:HPβCD foi investigada passo a passo através da técnica de Ressonância Magnética Nuclear. Para isso, experimentos em RMN de ¹H e ROESY 1D foram realizados a 293 K em um espectrômetro RMN Bruker AVANCE 400 operando em 9,4 Tesla, observando ¹H a 400,13 MHz. As análises do fármaco dapsona, HPβCD e o sistema dapsona:HPβCD foram feitas em MeOD-*d*₄, enquanto que o da βCD e do sistema dapsona:βCD foi feito em D₂O (a análise da dapsona foi feita uma única vez e utilizada para ambos os sistemas). O espectrômetro foi equipado com uma sonda de detecção direta multinuclear de 5 mm com z-gradiente. O espectro de RMN de ¹H foi adquirido com a largura espectral de 3306,88 Hz (\cong 8.3 ppm) e número de pontos 64K, promovendo uma resolução digital de 0,05 Hz. Os experimentos ROESY 1D foram obtidos com sequência de pulso *selrogp*, usando tempo de mistura de 200 ou 300 ms. O espectro foi adquirido com a mesma largura espectral do RMN de ¹H e 64K pontos, dando uma resolução espectral de 0,05Hz. Os espectros de RMN de ¹H e ROESY 1D foram processados aplicando transformada de Fourier com 64K pontos e através de uma multiplicação exponencial do FIDs por um fator de 0,3 e 1,0 Hz para o RMN de ¹H e ROESY 1D, respectivamente. O deslocamento químico nos espectros de RMN são dados em ppm e calibrados em relação ao sinal do TMS em 0,00 ppm como referência interna e todos programas de pulso foram fornecidos pela Bruker BioSpin.

4.2.3. Caracterização dos Sistemas Binários e Ternários no Estado Sólido

A caracterização da formação dos sistemas – dapsona:HP β CD ou dapsona: β CD foi realizada por meio de calorimetria exploratória diferencial (DSC), difração de raios-X e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

4.2.3.1. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas DSC do fármaco, da mistura-física (1:1) e sistemas binários e ternários foram obtidas por meio de célula TA Instruments DSC 2910, sob as seguintes condições experimentais: atmosfera dinâmica de nitrogênio (100 mL.min.⁻¹); razão de aquecimento de 10°C.min.⁻¹ em cápsula de alumínio selada, massa de amostra de 5,0 mg; e rampa de aquecimento de 40 – 300°C. A célula de DSC deve ser previamente calibrada após a utilização de uma amostra de índio metálico com pureza de 99,99% a partir da $T_{\text{fusão}}$ (156,4°C) e $\Delta H_{\text{fusão}}$ (28,5 J.g⁻¹) deste material.

4.2.3.2. Difração em Raios X

Os difratogramas de raios-x do fármaco, da mistura-física (1:1) e sistemas binários e ternários foram obtidos em um difratômetro Shimadzu modelo XD-6000, operando a 40 KV e 40 mA, com velocidade de varredura de 2°/minuto (em 2 theta), usando silício (Si) policristalino como padrão.

4.2.3.3. Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia do fármaco, da mistura-física (1:1) e sistemas binários e ternários foram analisadas usando microscópio eletrônico de varredura JEOL mod. JSM-6360 LV. As amostras foram fixadas em um suporte metálico com auxílio de uma fita dupla-face de cobre e submetidas à metalização sob vácuo, a fim de torná-las eletricamente condutivas. A visualização foi realizada em aumentos de 300 a 1000 vezes, com uma voltagem de excitação de 10 a 15 kV.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. OBTENÇÃO DE CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMAS BINÁRIOS E TERNÁRIOS COM DAPSONA E β - CICLODEXTRINA.

5.1.1. Ensaio de Solubilidade de Fases

Para a quantificação do fármaco nos ensaios de solubilidade, uma solução de dapsona na concentração de $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em água purificada foi traçada para determinação do melhor comprimento de onda (Figura 9), sendo o valor de 290 nm selecionado para a quantificação das amostras nos ensaios de solubilidade. Uma curva analítica foi construída em água purificada e submetida à análise de regressão linear. Relações lineares foram obtidas no intervalo de concentração de 4 a $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($r = 0,99726$), segundo a equação $\text{Abs} = 0,03469 + 0,03285 \times C$ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$), como mostra a Figura 10.

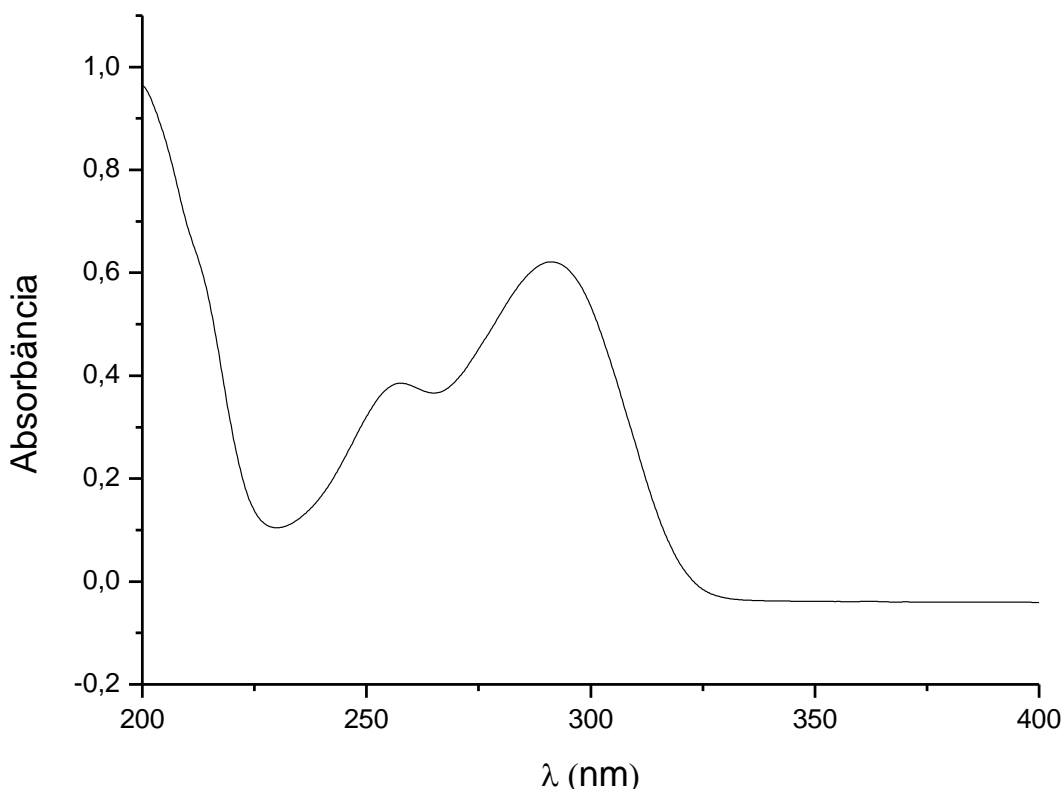


FIGURA 9. ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA PARA DAPSONA $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ EM ÁGUA PURIFICADA

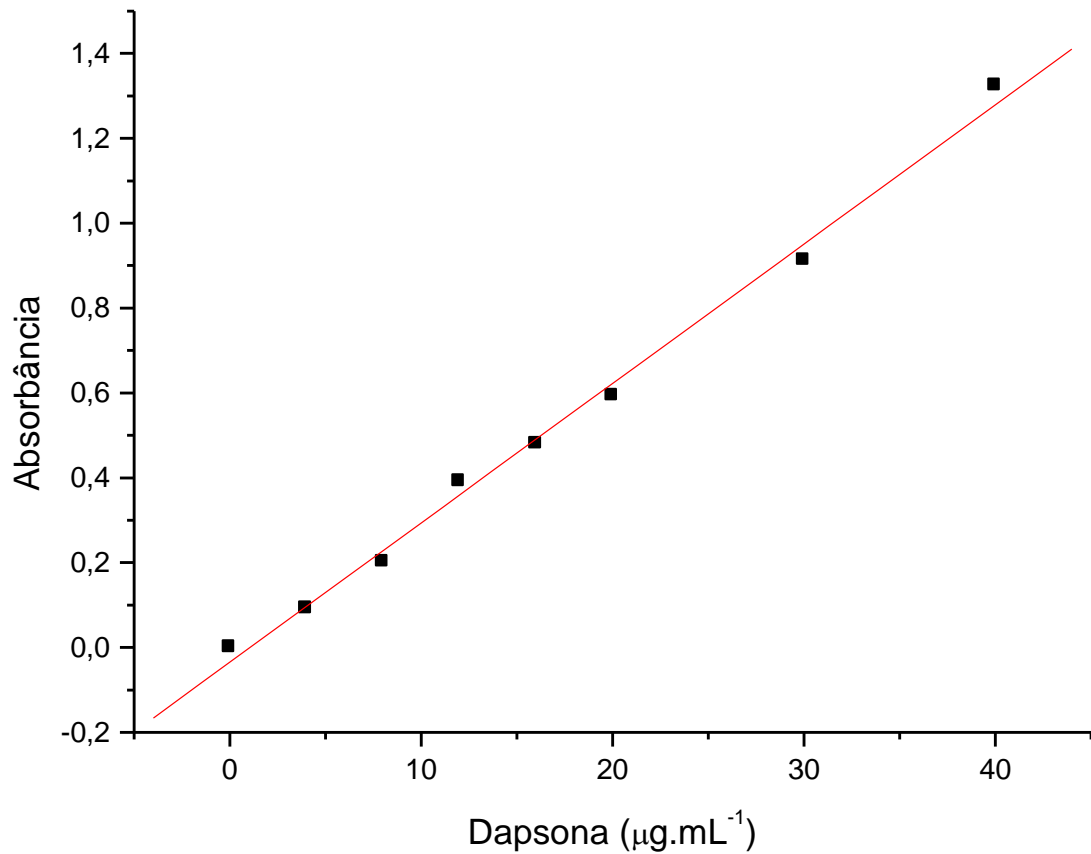


FIGURA 10. CURVA ANALÍTICA DA DAPSONA EM ÁGUA PURIFICADA (4 – 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)

O ensaio de solubilidade foi empregado para evidenciar o efeito da adição de β -CD, e/ou polímeros sobre a solubilidade intrínseca do fármaco dapsona.

A Figura 11 mostra o diagrama de solubilidade de fases para dapsona pela adição de concentrações crescentes de β CD.

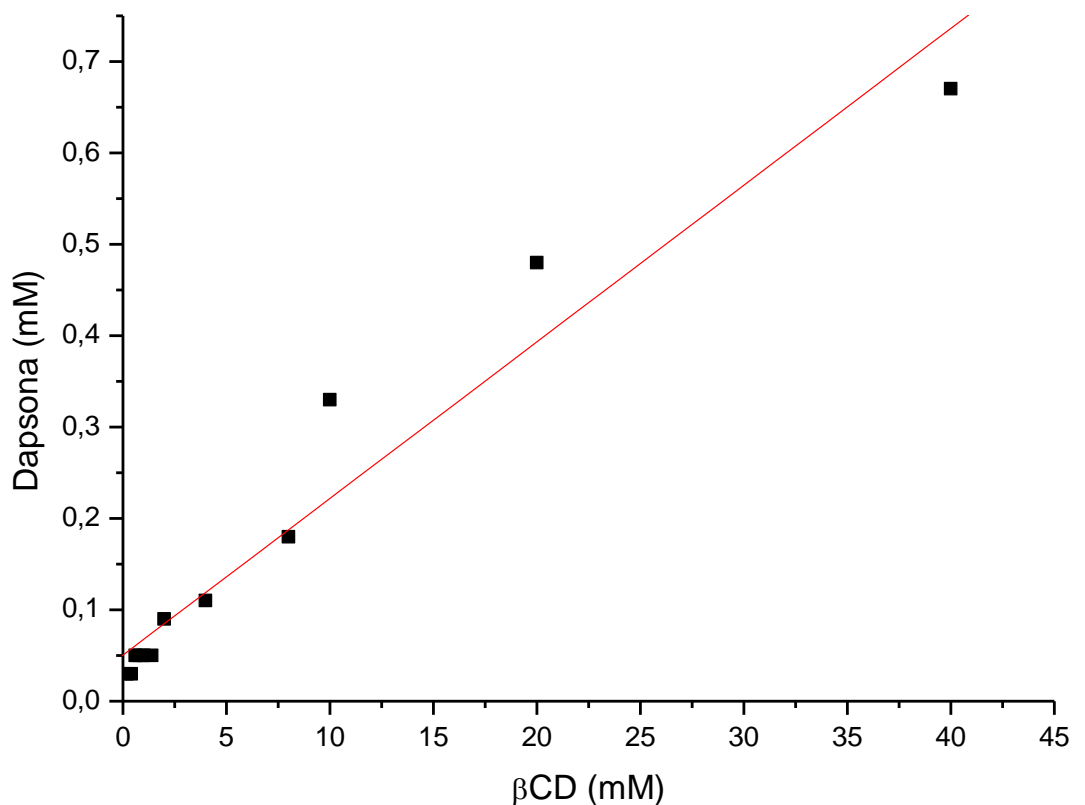


FIGURA 11. DIAGRAMA DE SOLUBILIDADE DE FASE DA DAPSONA A 37 °C EM PRESENÇA DE β CD

A curva obtida apresentou um aumento linear da solubilidade da dapsona em função do aumento da concentração da ciclodextrina e, portanto, exibiu diagrama de solubilidade de fases do tipo A_L para o sistema binário resultante (dapsona: β CD), sugerindo a formação de complexos solúveis.

A adição de polímeros hidrossolúveis a uma solução aquosa de CD e fármaco muitas vezes associada ao aumento da constante de estabilidade do complexo (K_c) e à melhoria da eficiência de complexação, resulta na diminuição da quantidade de ciclodextrina necessária para a incorporação de uma determinada quantidade de fármaco (LOFTSSON, MÁSSON e SIGURJÓNSDÓTTIR, 1999).

Vários autores demonstraram a possibilidade dos polímeros formarem complexos com diversos fármacos, aumentando a sua solubilidade (BETTINETTI e MURA, 1994; LOFTSSON, FRIORIKSDOTTIR e GUMUNDSOTTIR, 1996), entretanto, a quantidade de polímero adicionada deverá ser tal que o efeito

solubilizante, estabilizante e complexante seja maximizado, mas insuficiente para causar um aumento significativo da viscosidade.

A Figura 12 mostra o efeito da adição dos polímeros - PVP-K30 e/ou HPMC - sobre a solubilidade da dapsona.

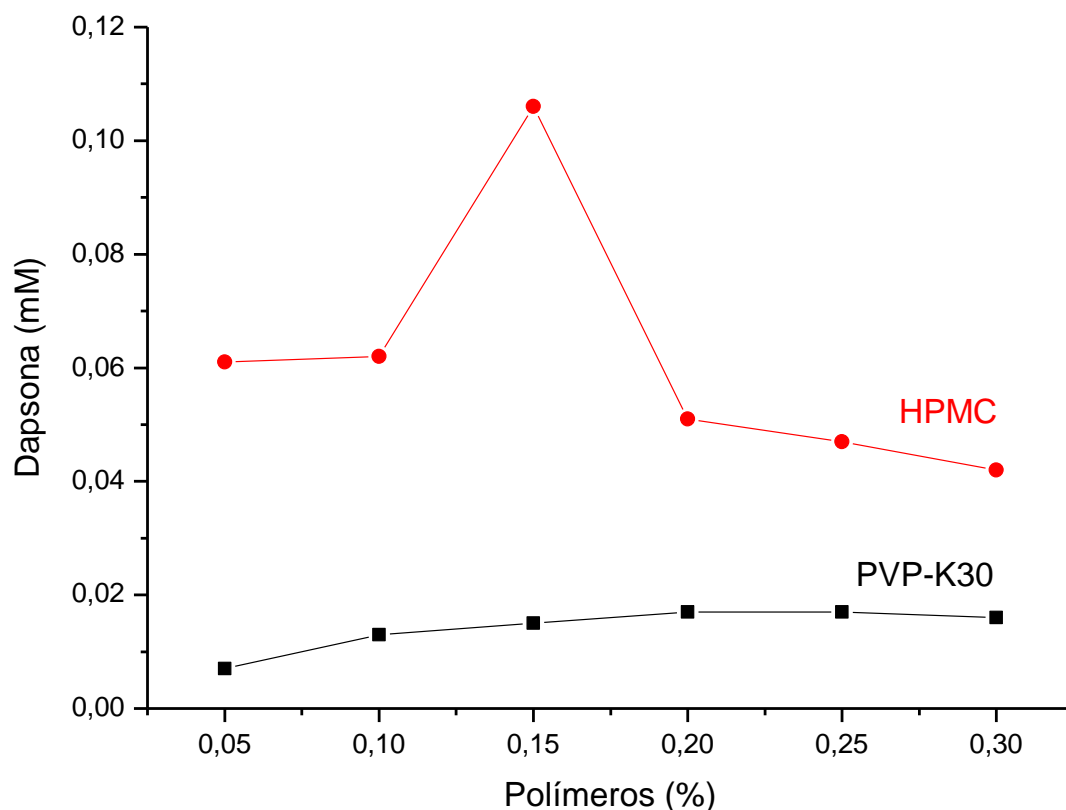


FIGURA 12. EFEITO DA ADIÇÃO DE DIFERENTES QUANTIDADES DOS POLÍMEROS PVP-K30 E/OU HPMC SOBRE A SOLUBILIDADE DA DAPSONA

A solubilidade intrínseca da dapsona obtida por meio do ensaio de solubilidade foi de $5,77 \text{ mg.mL}^{-1}$ ($0,0233 \text{ mM}$). Valores de solubilidade de $4,264 \text{ mg.mL}^{-1}$ ($0,017 \text{ mM}$) e $26,413 \text{ mg.mL}^{-1}$ ($0,106 \text{ mM}$) quando 0,25% (p/v) de PVP-K30 e 0,15% (p/v) de HPMC foram adicionados, respectivamente.

Baseando-se nesses estudos, o ensaio de solubilidade foi realizado empregando as concentrações de fixas dos polímeros - 0,25% (p/v) de PVP-K30 ou 0,15% (p/v) de HPMC - e concentrações crescentes de β CD (Figura 13).

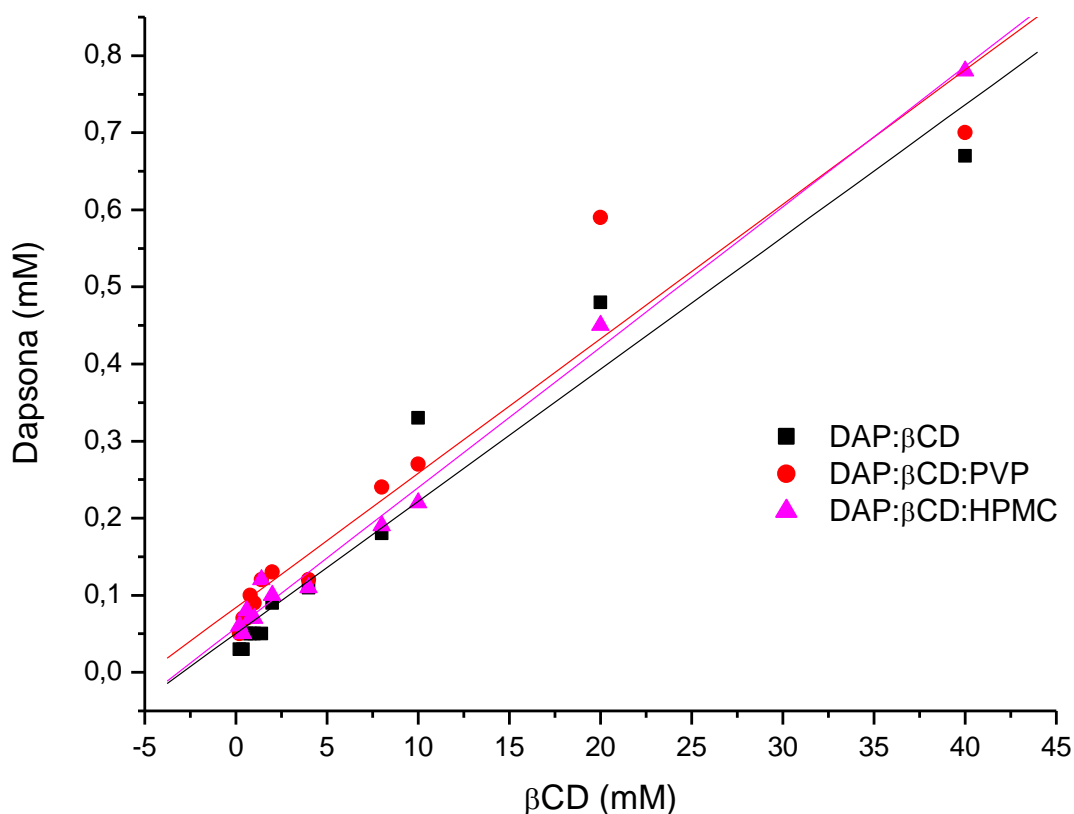


FIGURA 13. DIAGRAMAS DE SOLUBILIDADE DE FASES DA DAPSONA EM SOLUÇÃO AQUOSA DE β CD NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE POLÍMEROS PVP-K30 E HPMC A 37 °C

As curvas de solubilidade apresentaram um aumento crescente da solubilidade da dapsona em função da adição da β CD, caracterizando-se por comportamento do tipo A_L , ou seja, aumento linear na solubilidade do fármaco em função do aumento da concentração de β CD. Efeito semelhante foi observado quando PVP-K30 ou HPMC foram adicionados, entretanto não houve contribuição representativa na solubilidade da dapsona na presença dos polímeros hidrossolúveis.

Tendo por base a informação resultante dos diagramas de solubilidade de fases, a estequiometria, o valor da constante de estabilidade (K_c) dos complexos formados e a eficiência de complexação (CE) podem ser facilmente determinados a partir do segmento ascendente linear dos diagramas.

A Tabela 3 apresenta os valores de solubilidade intrínseca (S_0) e solubilidade do intercepto (S_{int}), coeficiente angular e coeficiente de correlação de Pearson (r) para os sistemas binário e ternários contendo dapsona e β CD.

TABELA 3. VALORES DE SOLUBILIDADE INTRÍNSECA (S_0), SOLUBILIDADE DO INTERCEPTO (S_{int}), COEFICIENTE ANGULAR E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO DE PEARSON (r) OBTIDOS A PARTIR DOS DIAGRAMAS DE SOLUBILIDADE DE FASE PARA O SISTEMAS DAPSONA: β CD.

Sistema	S_0 (mM)	S_{int} (mM)	Coeficiente Angular	r
DAP: β CD	0,0233	0,0485	0,0171	0,9444
DAP: β CD:PVP-K30	0,0233	0,0831	0,0174	0,9310
DAP: β CD:HPMC	0,0233	0,0577	0,0181	0,9935

Os valores de coeficiente angular obtidos a partir da regressão linear dos diagramas de solubilidade de fases para os sistemas binário e ternários estudados foram inferiores a 1, assumindo estequiometria 1:1.

Assumindo a formação de um complexo de estequiometria 1:1, ou seja, de primeira ordem relativamente a ciclodextrina ($n = 1$) e de ordem 1 relativamente à dapsona ($m = 1$), ter-se-á a situação representada pelo equilíbrio químico:



sendo o valor de K_C determinado a partir da equação de Higuchi e Connors (1965):

$$K_{1:1} = \frac{\text{coeficiente angular}}{S_0 (1 - \text{coeficiente angular})}$$

onde S_0 é a solubilidade intrínseca da molécula hóspede.

De acordo com Loftsson, Hreinsdóttir e Másson (2005), teoricamente, para fármacos com solubilidade superior a 1 mM, os valores de solubilidade intrínseca (S_0) devem ser iguais aos valores de solubilidade do intercepto (S_{int}) definido pela equação da reta. Entretanto, para fármacos com solubilidade intrínseca inferior a 0,1 mM um desvio negativo da solubilidade intrínseca é observado.

A fim de não agregar possíveis erros advindos da construção da reta e da determinação de sua equação, o valor de S_0 obtido experimentalmente foi empregado para o cálculo da constante de estabilidade do complexo ($K_{1:1}$).

Loftsson, Hreinsdóttir e Másson (2005) propuseram um método de cálculo da eficiência de complexação - CE - que é calculada a partir do coeficiente angular do diagrama de solubilidade de fase e é independente dos valores de solubilidade intrínseca:

$$CE = \frac{\text{coeficiente angular}}{1 - \text{coeficiente angular}}$$

A partir do valor de CE é possível determinar a relação fármaco/ciclodextrina obtida na complexação e o acréscimo de massa na forma farmacêutica. As razões molares para os sistemas binários e ternários podem ser calculadas, através da relação:

$$RM = 1: \left(1 + \frac{1}{CE} \right)$$

onde, RM é a razão molar do complexo de inclusão e CE é a eficiência de complexação.

A Tabela 4 apresenta os valores de constante de estabilidade ($K_{1:1}$), eficiência de complexação (CE), razão molar de complexação (DAP:CD), calculadas a partir dos diagramas de solubilidade de fase para os sistemas binário e ternários contendo dapsona.

TABELA 4. CONSTANTE DE ESTABILIDADE ($K_{1:1}$), EFICIÊNCIA DE COMPLEXAÇÃO (CE) E RAZÃO MOLAR DE COMPLEXAÇÃO (DAP:CD) CALCULADAS A PARTIR DOS DIAGRAMAS DE SOLUBILIDADE DE FASE PARA OS SISTEMAS BINÁRIO E TERNÁRIOS CONTENDO DAPSONA, β CD E PVP-K30 E/OU HPMC

Sistema	$K_{1:1}$ (mol.L ⁻¹)	CE	Razão molar (DAP: β CD)
DAP: β CD	753	0,0174	1:58
DAP: β CD:PVP-K30	761	0,0177	1:58
DAP: β CD:HPMC	793	0,0185	1:55

$K_{1:1}$ = constante de estabilidade

CE = eficiência de complexação (LOFTSSON, HREINSDOTTIR e MASSON, 2005)

Razão molar = razão DAP: β CD calculada segundo Loftsson, Hreinsdóttir e Másson, 2005.

Segundo Pitha e colaboradores (1983) apenas os complexos com constantes de estabilidade (K_c) compreendidas entre 200 e 5000 M^{-1} parecem ter aplicações práticas, dado que os complexos lábeis levam à liberação prematura do fármaco e os complexos muito estáveis originam liberação retardada ou incompleta do fármaco no organismo.

Rama e colaboradores (2005) consideram adequadas constantes de estabilidade com valores entre 100 e 1000 M^{-1} . A constante de estabilidade dos complexos de inclusão (K_c) indica a afinidade do fármaco pela ciclodextrina em questão. Portanto, quanto maior a constante de estabilidade, maior será a facilidade da formação do complexo de inclusão. Maior valor de $K_{1:1}$ foi observado para o sistema ternário DAP: β CD:HPMC.

Cirri e colaboradores (2006) estudaram o efeito da variação do pH sobre a constante de estabilidade dos complexos de inclusão naproxeno com β -ciclodextrina. O pH ácido favoreceu a formação do complexo de inclusão do naproxeno: β CD.

Zhang e colaboradores (2008) estudaram o efeito da variação do pH sobre a constante de estabilidade dos complexos de inclusão ácido cafeico:HP β CD. Em pH básico a presença da forma iônica do fármaco é favorecida enquanto o pH ácido favorece a forma molecular, mais hidrofóbica. Tendo em vista o caráter hidrofóbico da cavidade interna das CDs, o pH ácido favorece a formação do complexo de inclusão.

No presente trabalho os complexos foram obtidos em pH próximo a neutralidade já que pequena dissociação da dapsona é observada neste pH (< 0,01%), condições favoráveis a inclusão do fármaco no interior da cavidade da ciclodextrina.

Considerando que o valor de $K_{1:1}$ para um mesmo fármaco e uma mesma ciclodextrina pode variar segundo o método de determinação, o valor de constante de estabilidade (K_c) é apenas aparente.

A adição dos polímeros hidrossolúveis aos sistemas tem a finalidade de aumentar a constante de estabilidade do complexo como também a sua eficiência de complexação. Para os sistemas demonstrados na Tabela 4, o sistema ternário com HPMC foi o que demonstrou a melhor constante de estabilidade e eficiência de complexação, entretanto este aumento foi pequeno.

Mura e colaboradores (2001) estudaram a formação de complexos naproxeno:HP β CD na presença e ausência de polímeros hidrossolúveis. Aumento

de 65% na constante de estabilidade do complexo (K_c) foi observado quando 0,10% de PVP-K30 foi adicionado.

Portanto, segundo a literatura, a adição de polímeros hidrossolúveis pode levar a um grande incremento do K_c e do CE, o que não ocorreu nos resultados apresentados na Tabela 4. A solubilidade do PVP-K30 em água é maior que 100 mg/mL, já o HPMC é solúvel em água gelada, pois quando aquecido leva a formação de gel, ou seja, sua solubilidade varia de acordo com sua viscosidade. O pequeno incremento na eficiência de complexação com a adição dos polímeros pode estar correlacionado com as concentrações utilizadas, as quais podem ter gerado sistemas coesos dificultando a interação do fármaco com a ciclodextrina.

Segundo Loftsson e colaboradores (2005), se o CE for igual a 0,0100 significa que apenas uma de cada cem moléculas de ciclodextrinas tem a capacidade de formar um complexo de inclusão.

Os valores de CE encontrados foram bastante baixos e a razão molar indicou que, em média, para cada 57 moléculas de ciclodextrina presente no meio, apenas uma encontra-se complexada com a dapsona.

Stancanelli e colaboradores (2008) discutiram a eficiência de complexação e a constante de estabilidade do complexo de inclusão do receptor AMPA com a β -ciclodextrina. Este composto apresenta seus enantiômeros (R)-1 e (S)-1, sendo que o (R)-1 é a forma mais ativa, e a mistura racêmica (R,S)-1, a qual é muito pouco solúvel em água. Maior valor de K_c foi observado para os complexos da mistura racêmica (R,S)-1: β CD. Os valores de CE encontrados foram 0,0075 para (R,S)-1: β CD e 0,039 para (R)-1: β CD. O enantiômero (S)-1 não obteve um incremento da solubilidade, pois não formou complexo de inclusão com a β CD, dados confirmados através de modelagem molecular.

Apesar da baixa eficiência de complexação, um considerável incremento de solubilidade foi observado para dapsona nos sistemas binário e ternários obtidos (Tabela 5).

TABELA 5. VALORES DE SOLUBILIDADE DA DAPSONA E SISTEMAS BINÁRIO E TERNÁRIOS OBTIDOS POR COEVAPORAÇÃO EXPRESSOS EM mg.mL^{-1} , mM E VALORES DE INCREMENTO DE SOLUBILIDADE OBTIDO NOS SISTEMAS BINÁRIO E TERNÁRIOS

	Solubilidade da Dapsona		Incremento da Solubilidade
	(mg.mL^{-1})	(mM)	
DAP	5,77	0,0233	-
DAP: β CD	88,06	0,3546	15 vezes
DAP: β CD:PVP-K30	51,99	0,2094	9 vezes
DAP: β CD:HPMC	77,89	0,3137	13 vezes

Embora seja a mais comum, além da forma clássica de complexação em que a molécula-hóspede se situa dentro da cavidade hidrofóbica da ciclodextrina, podem ocorrer outras formas de associação entre as ciclodextrinas e outras moléculas, de forma análoga ao que ocorre com oligossacarídeos e polissacarídeos não-cíclicos (BREWSTER e LOFTSSON, 2007). Os grupos hidroxila presentes na superfície externa do anel podem formar pontes de hidrogênio com outras moléculas. Tanto as ciclodextrinas sozinhas quanto os complexos podem formar agregados que, por sua vez, também são capazes de melhorar a solubilidade em água de moléculas hidrofóbicas por um mecanismo semelhante à formação de micelas (LOFTSSON, HREINSDOTTIR e MASSON, 2005).

5.1.2. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas DSC do fármaco puro, β CD, PVP-K30 e HPMC, misturas-físicas 1:1 e sistemas binários e ternários dapsona: β CD, dapsona: β CD:PVP-K30 e dapsona: β CD:HPMC são apresentadas na Figura 14.

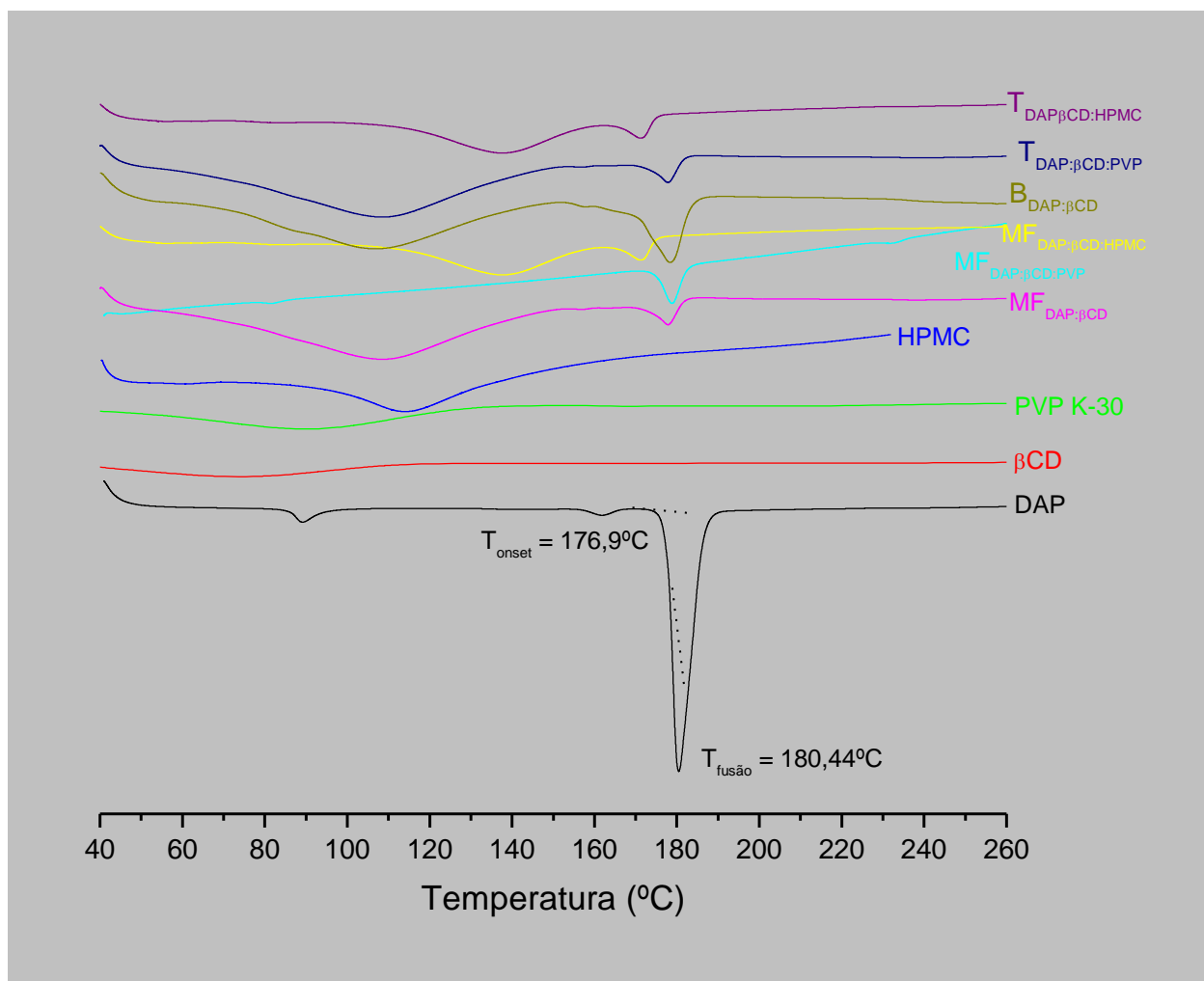


FIGURA 14. CURVAS DSC DA DAPSONA, β -CD, PVP-K30, HPMC, MISTURAS FÍSICAS 1:1 E SISTEMAS BINÁRIO E TERNÁRIOS CONTENDO DAPSONA: β CD, DAPSONA: β CD:PVP-K30 E DAPSONA: β CD:HPMC, OBTIDAS SOB ATMOSFERA DINÂMICA DE NITROGÊNIO (100 mL min^{-1}) E RAZÃO DE AQUECIMENTO DE $10^{\circ}C \text{ min}^{-1}$

A curva DSC da dapsona mostrou um evento endotérmico em $180,44^{\circ}C$ referente à fusão do fármaco e um evento endotérmico em $83-84^{\circ}C$ referentes às suas formas polimórficas.

Segundo Bernabei e colaboradores (1982) a curva DSC da dapsona mostra um evento endotérmico de transição vítrea em 83-84°C relativa à transição da forma I (PF \cong 180°C) para forma II (PF \cong 175°C). Esta interconversão é rápida e quantitativamente reversível. A forma I funde-se a 180°C sendo estável a temperatura ambiente.

A curva DSC da β CD mostrou um evento endotérmico entre 50 e 130°C característico da gelatinização do amido, sendo que, acima desta temperatura, o mesmo apresenta-se termodinamicamente estável em toda a faixa de temperatura estudada.

Derycke e colaboradores (2005) estudaram complexos cristalinos amilose-lipídeos obtidos do processo de cozimento do arroz por DSC. A temperatura de gelatinização do amido é totalmente dependente do seu conteúdo de hidratação. A curva DSC para o amido com 40% de conteúdo de hidratação possui um evento endotérmico entre 50 e 130°C.

As curvas DSC do PVP-K30 e HPMC apresentaram comportamento semelhante ao da ciclodextrina, mostrando evento endotérmico entre 54 e 130°C, e 79 e 137°C, mantendo-se termodinamicamente estáveis a partir destas temperaturas.

A curva DSC da misturas-física 1:1 Dapsona: β CD mostrou um evento endotérmico entre 60 e 140° C, seguida de fusão em 180°C. A mistura física Dapsona: β CD:PVP-K30 apresentou um evento térmico em 180°C, relativo a fusão do fármaco. A curva DSC da misturas-física 1:1 Dapsona: β CD:HPMC mostrou um evento endotérmico entre 100 e 150° C, seguida de fusão em 175°C. As curvas DSC dos sistemas binário e ternário Dapsona: β CD, Dapsona: β CD:PVP-K30 e Dapsona: β CD:HPMC apresentaram comportamento semelhante, caracterizados por evento endotérmico entre 60 e 140° C, seguida de fusão do fármaco em 179,8°C, 180°C e 169,8°C, respectivamente. A presença do evento térmico de fusão referente ao fármaco indica que há fármaco livre presente no meio, sem interação com a β -ciclodextrina.

5.1.3 Difração de Raios-X

A Figura 15 mostra os difratogramas da dapsona, misturas-físicas DAP: β CD na presença e ausência dos polímeros – PVP-K30 ou HPMC – e para os sistemas binário - DAP: β CD - e sistemas ternários - DAP: β CD:PVP-K30 e DAP: β CD:HPMC.

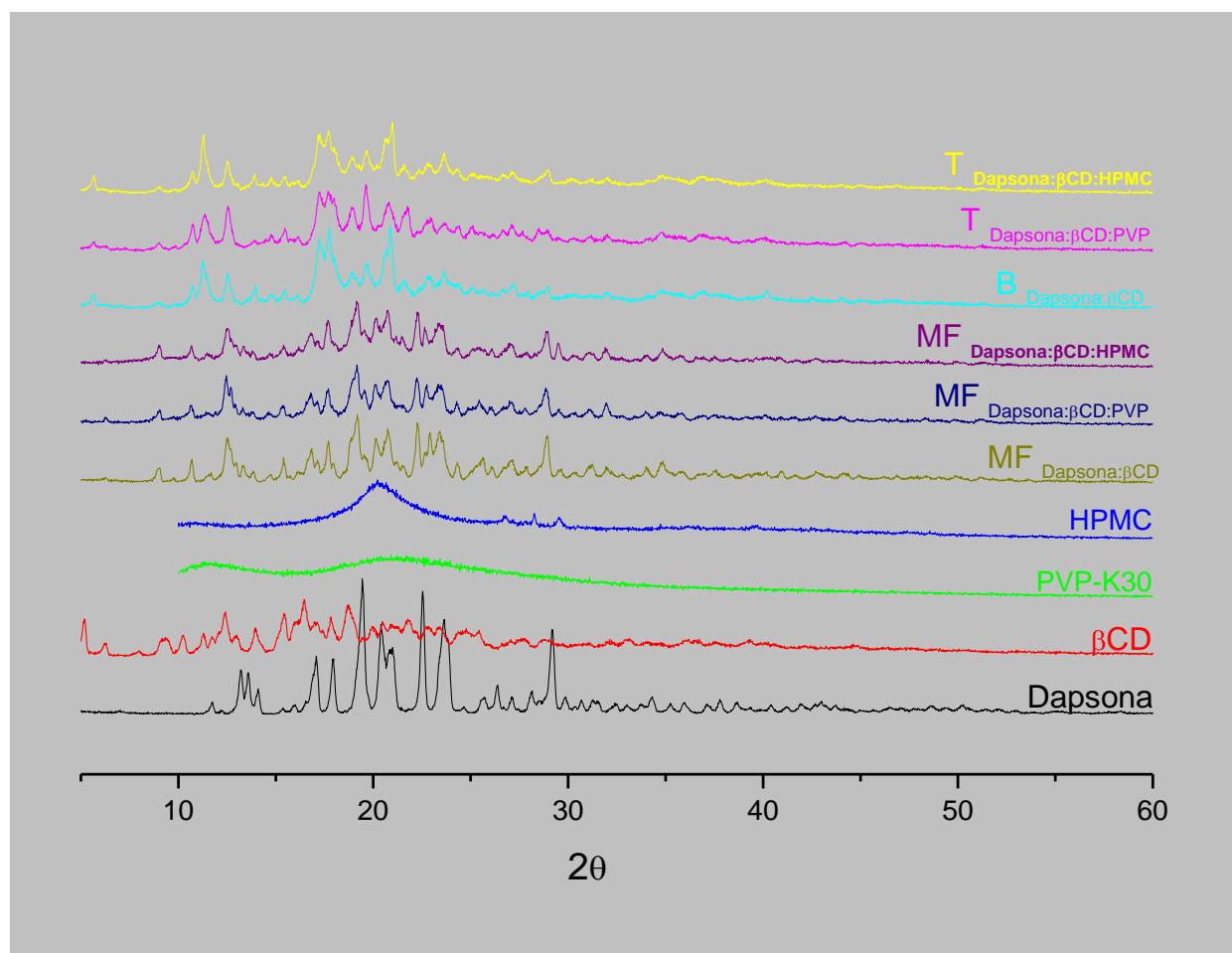


FIGURA 15. DIFRATOGRAMAS OBTIDOS PARA A DAPSONA (DAP), MISTURA-FÍSICA DAP: β CD 1:1, DAP: β CD:PVP-K30 E DAP: β CD:HPMC, E SISTEMAS BINÁRIO - DAP: β CD – E SISTEMAS TERNÁRIOS - DAP: β CD:PVP-K30 E DAP: β CD:HPMC - OBTIDOS POR COEVAPORAÇÃO OPERANDO A 40 KV E 40 mA, COM VELOCIDADE DE VARREDURA DE 2 GRAUS/MINUTO (2 THETA)

O difratograma da dapsona mostrou reflexões intensas em 19,5°, 20,7°, 22,5°, 23,8° e 29,2° (2θ) características da cristalinidade do fármaco. A β CD mostrou difratograma com reflexões de igual intensidade na faixa de 10° a 30°,

enquanto PVP-K30 e HPMC apresentam difratogramas característicos de substância amorfa.

Apesar da dificuldade na interpretação dos resultados, devido à cristalinidade do fármaco e da β CD, os difratogramas das misturas físicas mostraram redução da cristalinidade, entretanto algumas reflexões características do fármaco estão presentes. Os difratogramas dos sistemas binários dapsona: β -ciclodextrina e sistemas ternários dapsona: β -ciclodextrina:polímeros apresentaram comportamento semelhante, mostrando reflexões características da β CD, com algumas reflexões características do fármaco cristalino. A presença das reflexões características do fármaco nos sistemas binário e ternários indica que há fármaco livre presente no meio, sem interação com a β -ciclodextrina.

5.1.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os resultados dos ensaios usando microscopia eletrônica de varredura para a dapsona e β CD estão representados na Figura 16. A Figura 17 mostra as fotomicrografias das misturas-físicas DAP: β CD 1:1 (p/p) na presença e ausência de polímeros – PVP-K30 e HPMC.

A análise das fotomicrografias obtidas mostra que o fármaco dapsona (Figura 16a) é composto por cristais irregulares de formato ortorrômbico, enquanto a fotomicrografia da β CD (Figura 16b) mostra partículas uniformes. As fotomicrografias das misturas-físicas DAP: β CD (Figura 17A), DAP: β CD:PVP-k30 (Figura 17B) e DAP: β CD:PVP-k30 (Figura 17C) apresentaram comportamento semelhante, com a presença de cristais do fármaco e partículas uniformes características das ciclodextrinas, entretanto a presença dos polímeros para favorecer a formação dos complexos.

A interpretação destas microscopias é dificultada devido à característica cristalina da β CD, entretanto esta apresenta uma estrutura maior e mais uniforme que o fármaco. Sendo assim, as fotomicrografias dos sistemas binários e ternários apresentaram morfologia semelhante às misturas-físicas, com partículas uniformes e estruturas cristalinas (Figura 18).

Segundo (RIBEIRO *et al.*, 2003) nos estudos de microscopia eletrônica de varredura (SEM), a alteração das características morfológicas da substância pura

sugere a formação de complexos de inclusão fármaco/ciclodextrina. (RIBEIRO *et al.*, 2003)

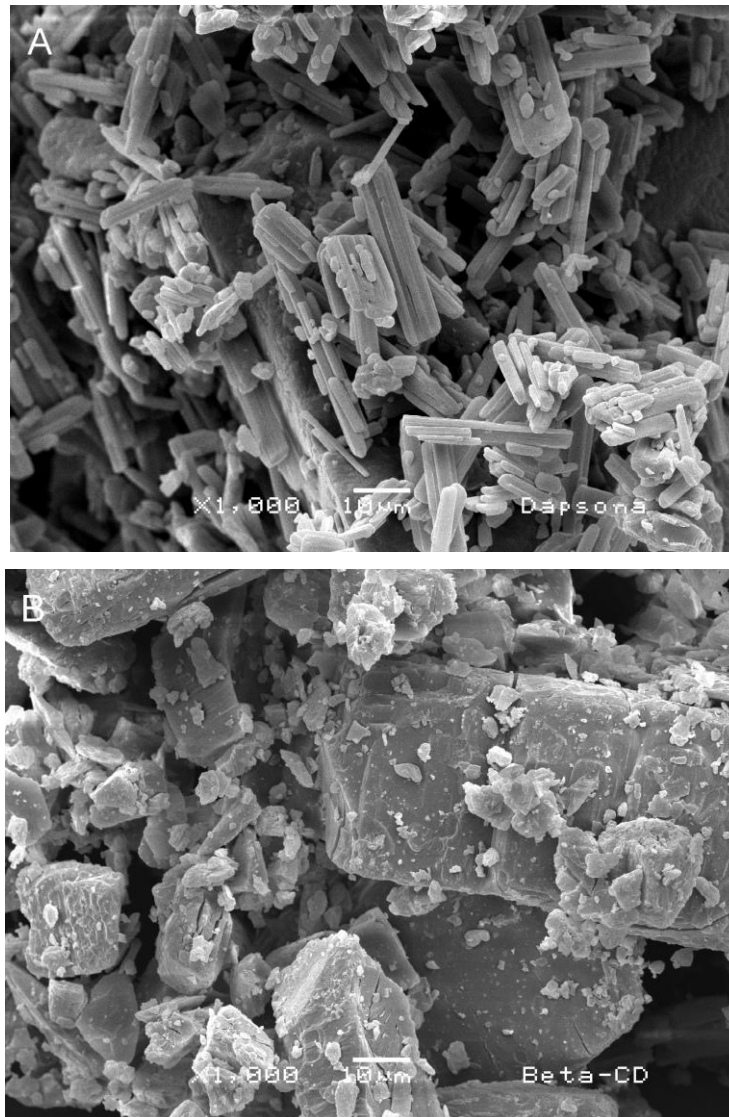


FIGURA 16. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA DAPSONA (A) e β CD (B), OBTIDOS EM MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA JEOL MOD. JSM-6360 LV

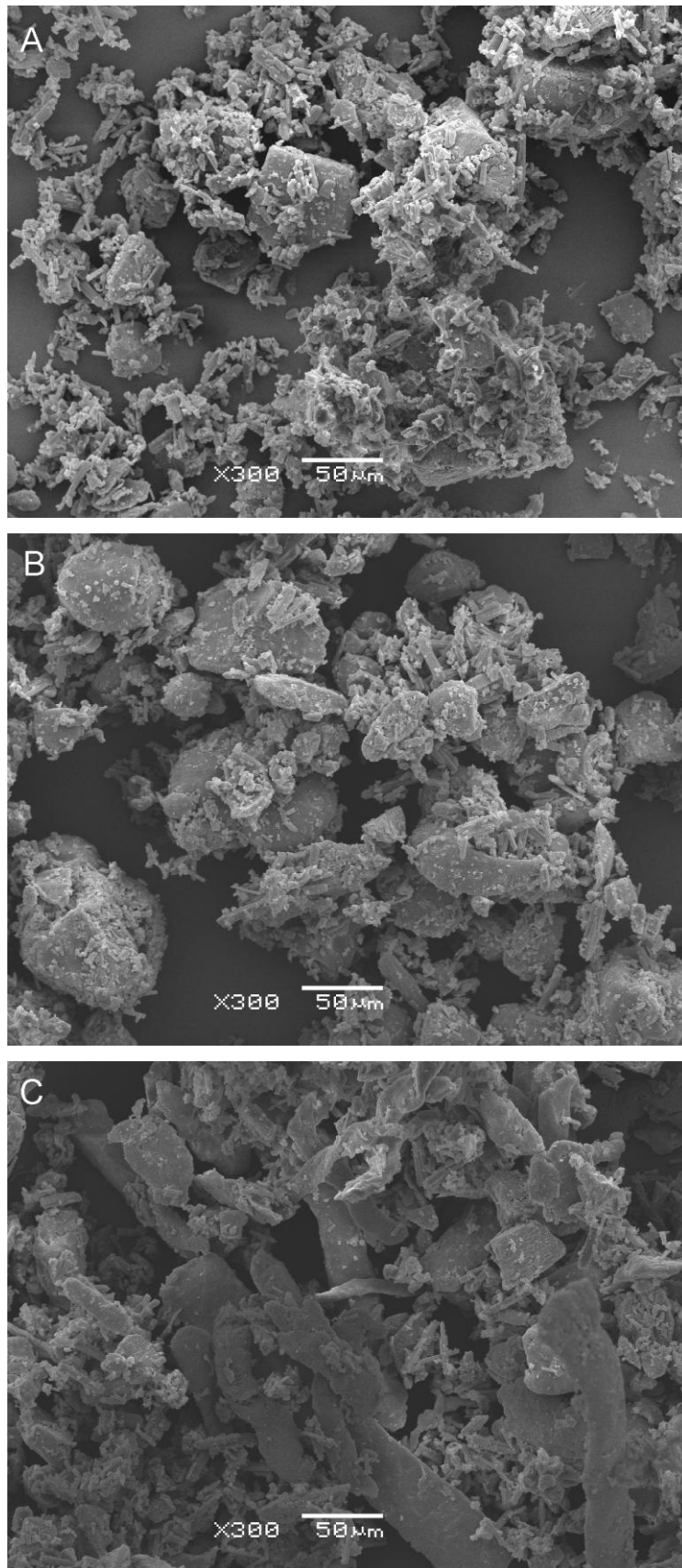


FIGURA 17. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DAS MISTURAS-FISICAS DAPSONA: β CD (A), DAPSONA: β CD:PVP-K30 (B) e DAPSONA: β CD:HPMC (C), OBTIDOS EM MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA JEOL MOD. JSM-6360 LV

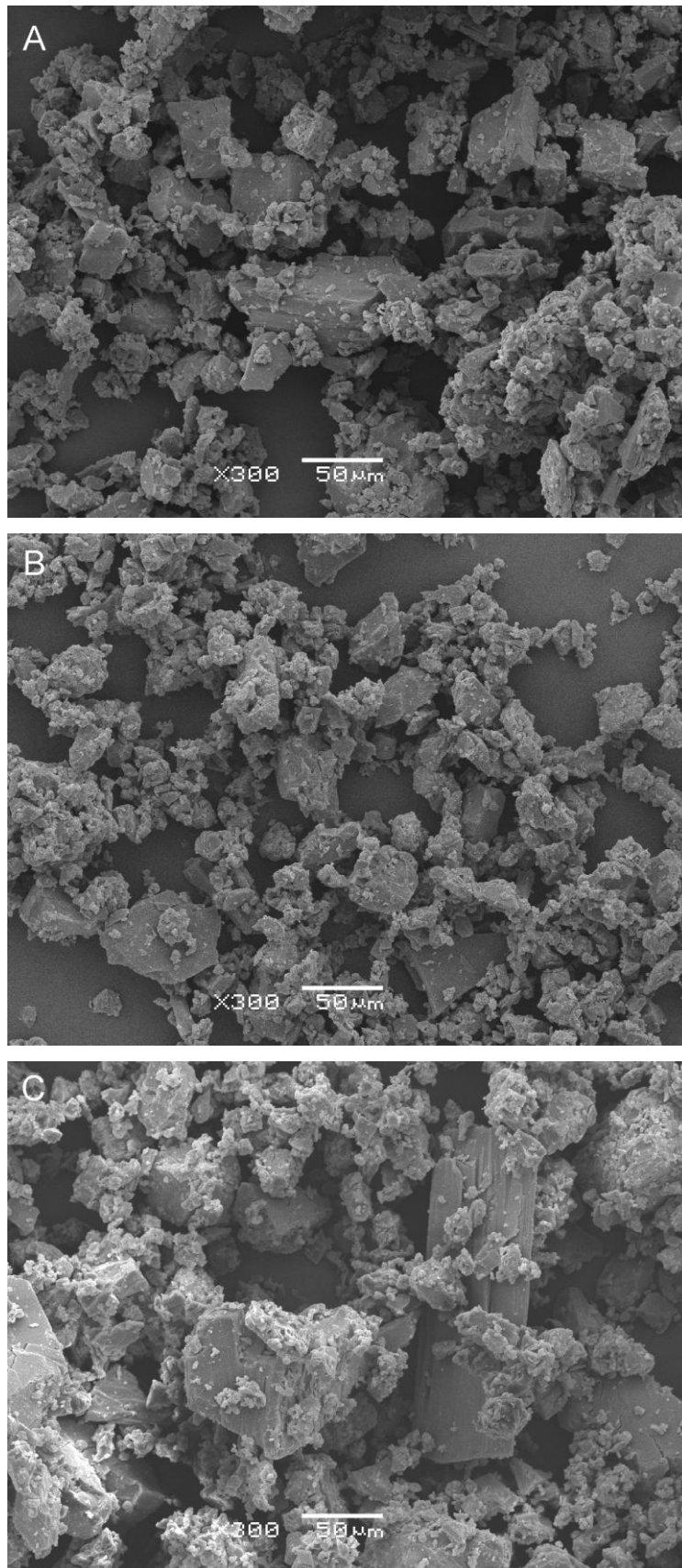


FIGURA 18. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DOS SISTEMAS BINÁRIO E TERNÁRIOS DAPSONA:βCD (A), DAPSONA:βCD:PVP-K30 e DAPSONA:βCD:HPMC, OBTIDOS EM MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA JEOL MOD. JSM-6360 LV

5.1.5. Ressonância Magnética Nuclear (RMN de ^1H)

A espectroscopia de RMN é uma das técnicas mais informativas para o estudo de complexos de ciclodextrinas com fármacos, pois fornece evidências diretas da formação dos complexos. A razão para isso é que a presença da molécula hóspede, quando inserida na cavidade interna das ciclodextrinas, causa mudanças no ambiente químico dos hidrogênios internos (H_3 e H_5), mas não nos hidrogênios externos (H_1 , H_2 e H_4). Em adição, a interação da molécula hospedeira com a cavidade da ciclodextrina pode causar variação no deslocamento químico dos hidrogênios da molécula incorporada na cavidade.

A formação do complexo de inclusão dapsona: βCD foi primeiramente evidenciada através da comparação dos espectros RMN de ^1H da dapsona e do sistema dapsona: βCD , o que revelou uma interação significativa entre a βCD e a dapsona. Desta maneira, variações e ampliações nos deslocamentos químicos do RMN de ^1H dos hidrogênios aromáticos da dapsona (dubleto em 6,65 e 7,52 ppm) foram observados (Figura 19). Porém, a variação na intensidade do dubleto em 6,65 ppm da dapsona quando comparado ao sistema dapsona: βCD pode ser devido à diferença de solvente, uma vez que para o espectro RMN de ^1H da dapsona foi utilizado $\text{MeOD-}d_4$ e para o sistema dapsona: βCD foi feito em D_2O .

Esta interação específica foi suportada através da técnica de RMN ROESY 1D (one dimensional rotating frame Overhauser effect), a qual é normalmente adequada para medir nOe no complexo de inclusão. O efeito nuclear Overhauser (nOe) é a mudança na intensidade do sinal do RMN de um spin nuclear quando o equilíbrio termodinâmico de outro spin nuclear interagindo com este fornecido, é perturbado. Particularmente, a ocorrência de nOe entre os prótons H-3 e H-5 das ciclodextrinas com os prótons da molécula hóspede é um indicador da formação do complexo de inclusão (EJCHART e KOZMINSKI, 2006).

A técnica de RMN ROESY 1D obtida por excitação seletiva do hidrogênio H-3 em 3,84 ppm na βCD causa a intensificação dos sinais correspondentes aos hidrogênios aromáticos (dubleto em 6,65 e 7,52 ppm) por efeito nOe, sendo mais forte nos hidrogênios em posição *orto* ao grupo SO_2 (dubleto em 7,52 ppm), como mostra na Figura 20.

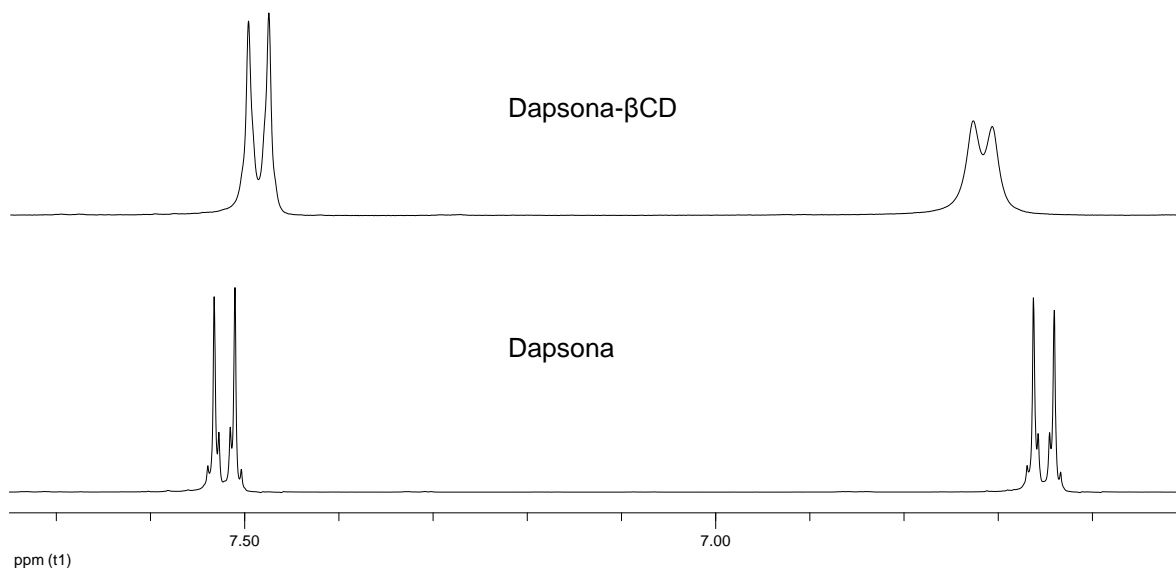


FIGURA 19. ESPECTROS DE RMN DE ^1H DO SISTEMA DAPSONA: β CD E DA DAPSONA, MOSTRANDO AS VARIAÇÕES NOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS

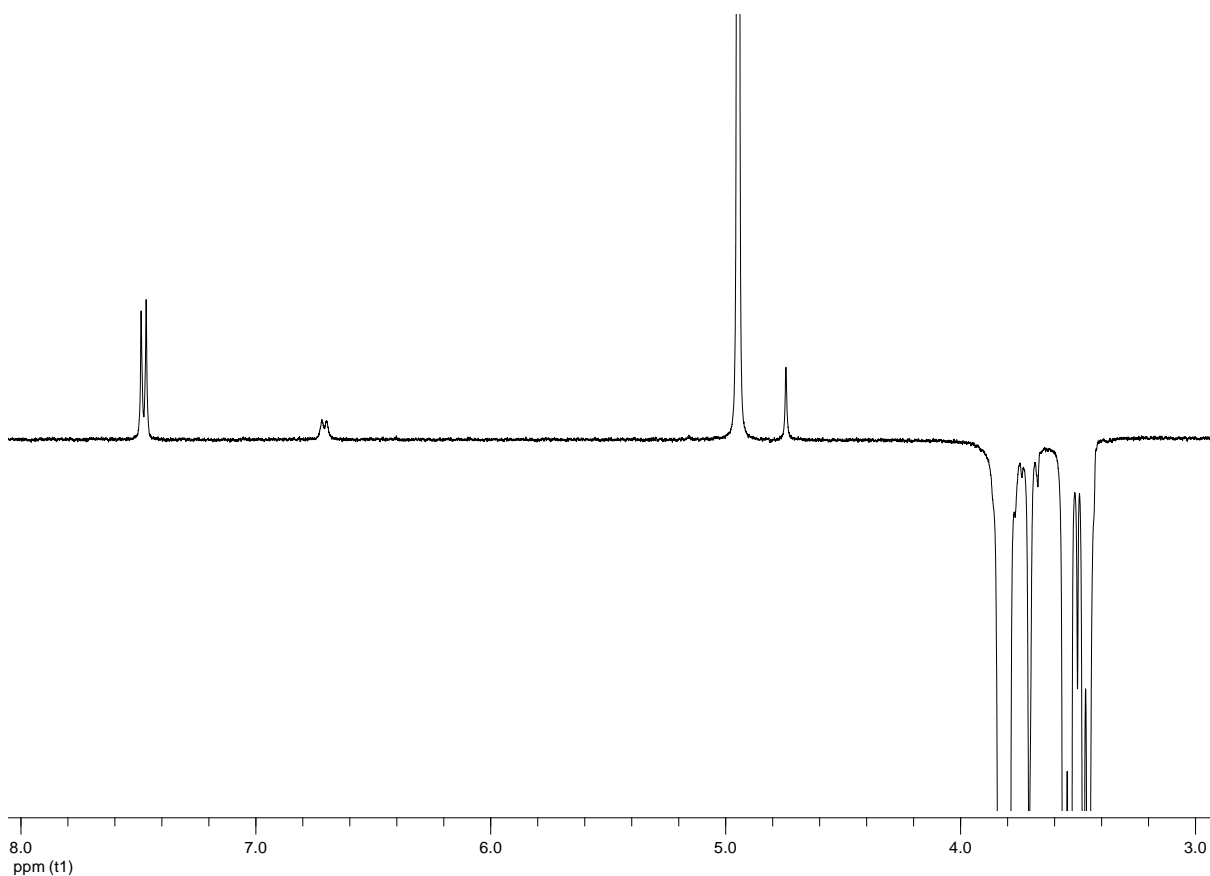


FIGURA 20. ESPECTROS DE RMN ROESY 1D DO SISTEMA DAPSONA: β CD ATRAVÉS DE IRRADIAÇÃO SELETIVA DE SINAL A 3,84 ppm CORRESPONDENDO AO HIDROGENIO H-3 DA β CD, MOSTRANDO O EFEITO NOE NOS SINAIS DE HIDROGENIO DA DAPSONA, USANDO TEMPO DE MISTURA DE 300 ms

O aparecimento dos sinais referentes aos hidrogênios aromáticos característicos do fármaco dapsona no espectro de ROESY 1D, ao realizar a excitação seletiva do hidrogênio H-3 da β CD, revela um complexo de inclusão específico da estrutura da dapsona no interior da cavidade da β CD. Isto significa que os hidrogênios do fármaco, denominados de H_a (dubleto em 7,52 ppm) e H_b (dubleto em 6,65 ppm) na Figura 21 estão interagindo com os hidrogênios H-3 da ciclodextrina (Figura 22). Os hidrogênios da dapsona são denominados de H_a ou de H_b , pois cada denominação refere-se a hidrogênios quimicamente equivalentes, ou seja, que estão em mesmo ambiente químico devido à simetria da molécula. O maior deslocamento químico de H_a é devido à proximidade ao grupo SO_2 , grupo retirador de elétrons e que, portanto, desblinda mais fortemente os hidrogênios vizinhos do que o grupo NH_2 .

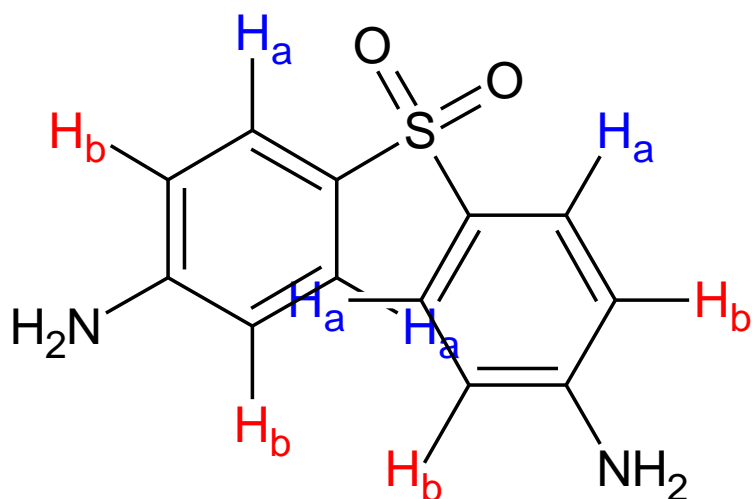


FIGURA 21. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS HIDROGÊNIOS DA DAPSONA DISPONÍVEIS PARA INTERAÇÃO COM A β -CICLODEXTRINA

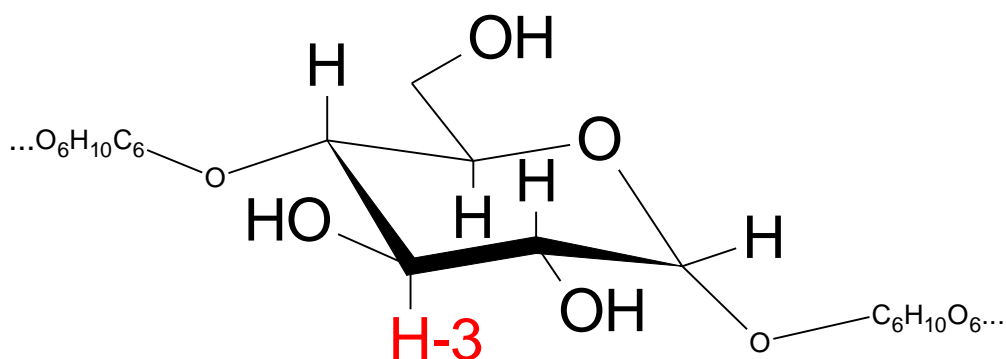


FIGURA 22. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO HIDROGÊNIO H-3 DA UNIDADE DE GLUCOPIRANOSE DA β -CICLODEXTRINA

Sendo assim, há uma indicação de que o fármaco dapsona encontra-se no interior da cavidade da β CD, como mostra na Figura 23. No entanto, a intensidade dos sinais nos espectros de RMN ROESY 1D não foram muito fortes, o que confirma os resultados das outras análises que indicam que este sistema possui uma interação mais fraca.

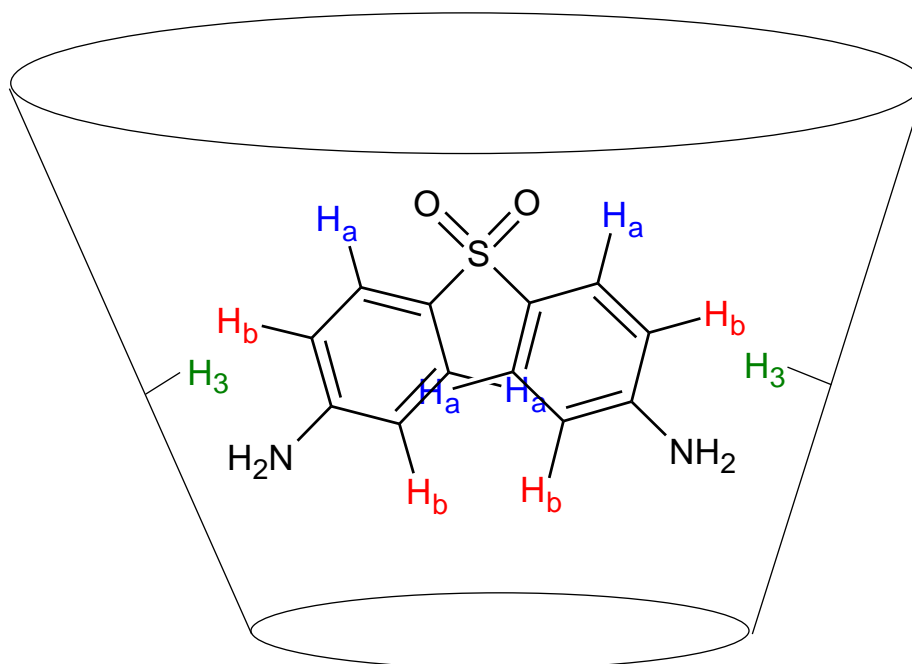


FIGURA 23. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS INTERAÇÕES DO FÁRMACO DAPSONA NO INTERIOR DA CAVIDADE DA β -CICLODEXTRINA

5.2. OBTENÇÃO DE CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMAS BINÁRIO E TERNÁRIOS COM DAPSONA E HP β CD

5.2.1. Ensaio de Solubilidade de Fases

A quantificação da dapsona nos ensaios de solubilidade seguiu metodologia descrita no item 5.1.1.

O ensaio de solubilidade foi empregado para evidenciar o efeito da adição de HP β CD, e/ou polímeros sobre a solubilidade intrínseca do fármaco dapsona.

A Figura 24 mostra o diagrama de solubilidade de fases para dapsona pela adição de concentrações crescentes de HP β CD.

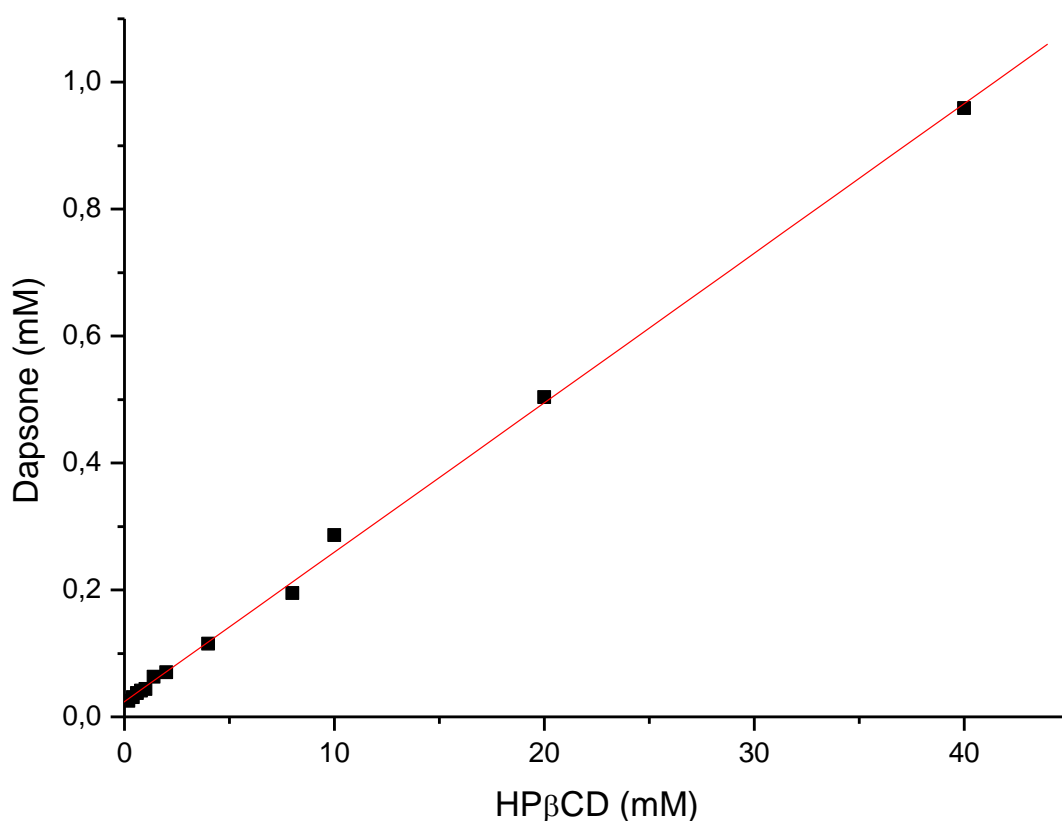


FIGURA 24. DIAGRAMA DE SOLUBILIDADE DE FASE DA DAPSONA A 37 °C EM PRESENÇA DE HP β CD

A curva obtida apresentou um aumento linear da solubilidade da dapsona em função do aumento da concentração da ciclodextrina e, portanto, exibe diagrama de solubilidade de fases do tipo A_L para o sistema binário resultante (dapsona:HP β CD), sugerindo a formação de complexos solúveis.

A adição de polímeros hidrossolúveis aos sistemas podem levar ao aumento da constante de estabilidade do complexo (K_c) e à melhoria da eficiência de complexação (LOFTSSON, MÁSSON e SIGURJÓNSDÓTTIR, 1999).

Vários autores demonstraram a possibilidade dos polímeros formarem complexos com diversos fármacos, aumentando a sua solubilidade (BETTINETTI e MURA, 1994; LOFTSSON, FRIORIKSDOTTIR e GUMUNDSOTTIR, 1996), entretanto, a quantidade de polímero adicionada deverá ser tal que o efeito solubilizante, estabilizante e complexante seja maximizado, mas insuficiente para causar um aumento significativo da viscosidade.

A solubilidade intrínseca da dapsona obtida por meio do ensaio de solubilidade foi de $5,77 \text{ mg.mL}^{-1}$ ($0,0233 \text{ mM}$).

Baseando-se nos resultados obtidos a partir da adição de concentrações crescentes dos polímeros - PVP-K30 e/ou HPMC - sobre a solubilidade da dapsona (Figura 12), o ensaio de solubilidade foi realizado empregando concentrações de fixas dos polímeros - 0,15% (p/v) de HPMC ou 0,25% (p/v) de PVP-K30 - e concentrações crescentes de HP β CD (Figura 25).

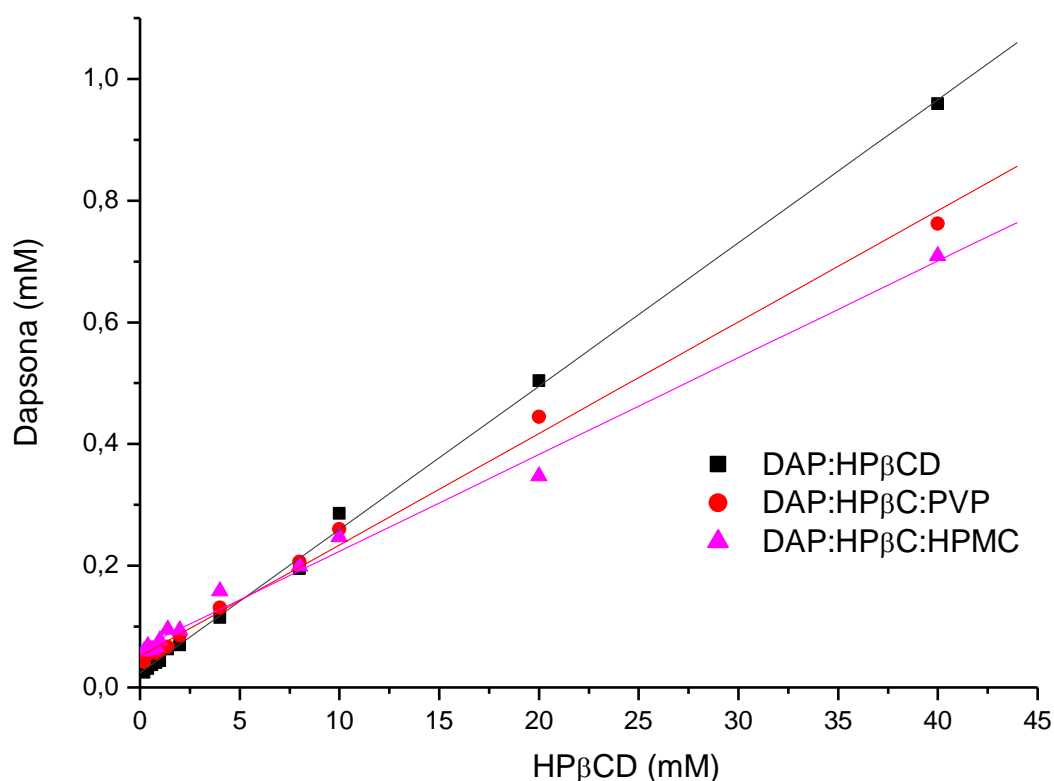


FIGURA 25. DIAGRAMA DE SOLUBILIDADE DE FASES DA DAPSONA NA PRESENÇA DE CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE HPβCD, NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE PVP-K30 E/OU HPMC

A Figura 25 permite observar um aumento crescente da solubilidade da dapsona em função da adição da HPβCD, caracterizando-se por comportamento do tipo A_L , ou seja, aumento linear na solubilidade do fármaco em função do aumento da concentração de HPβCD. Efeito semelhante foi observado quando para os sistemas ternários dapsona:HPβCD:PVP-K30 ou dapsona:HPβCD:HPMC, entretanto inferior àquele obtido para o sistema binário dapsona:HPβCD.

Tendo por base a informação resultante dos diagramas de solubilidade de fases, a estequiometria, o valor da constante de estabilidade (K_c) dos complexos formados e a eficiência de complexação (CE) podem ser facilmente determinados a partir do segmento ascendente linear dos diagramas.

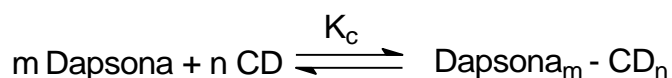
A Tabela 6 apresenta os valores de solubilidade intrínseca (S_0) e solubilidade do intercepto (S_{int}), coeficiente angular e coeficiente de correlação de Pearson (r) para os sistemas binário e ternários contendo dapsona e HPβCD.

TABELA 6. VALORES DE SOLUBILIDADE INTRÍNSECA (S_0), SOLUBILIDADE DO INTERCEPTO (S_{int}), COEFICIENTE ANGULAR E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO DE PEARSON (r) OBTIDOS A PARTIR DOS DIAGRAMAS DE SOLUBILIDADE DE FASE PARA O SISTEMAS DAPSONA:HP β CD

Sistema	S_0 (mmol.L ⁻¹)	S_{int} (mmol.L ⁻¹)	Coefficiente Angular	r
DAP:HP β CD	0,0233	0,0241	0,0235	0,0999
DAP:HP β CD:PVP-K30	0,0233	0,0512	0,0183	0,9953
DAP:HP β CD:HPMC	0,0233	0,0644	0,0159	0,9915

Os valores de coeficiente angular obtidos a partir da regressão linear dos diagramas de solubilidade de fases para os sistemas binário e ternários estudados foram inferiores a 1, assumindo estequiometria 1:1.

Assumindo a formação de um complexo de estequiometria 1:1, ou seja, de primeira ordem relativamente à hidroxipropil- β -ciclodextrina ($n = 1$) e de ordem 1 relativamente à dapsona ($m = 1$), ter-se-á a situação representada pelo equilíbrio químico:



Através das relações já apresentadas no item 5.1.1, pg 41 e 42, a constante de estabilidade do complexo (K_c), a eficiência de complexação (CE) e as razões molares para os sistemas puderam ser calculadas.

A fim de não agregar possíveis erros advindos da construção da reta e da determinação de sua equação, o valor de S_0 obtido experimentalmente foi empregado para o cálculo da constante de estabilidade do complexo ($K_{1:1}$).

A Tabela 7 apresenta os valores de constante de estabilidade ($K_{1:1}$), eficiência de complexação (CE) e razão molar de complexação (DAP:CD), calculadas a partir dos diagramas de solubilidade de fase para os sistemas binário e ternários contendo dapsona.

TABELA 7. CONSTANTE DE ESTABILIDADE ($K_{1:1}$), EFICIÊNCIA DE COMPLEXAÇÃO (CE) E RAZÃO MOLAR DE COMPLEXAÇÃO (DAP:CD) CALCULADAS A PARTIR DOS DIAGRAMAS DE SOLUBILIDADE DE FASE PARA OS SISTEMAS BINÁRIO E TERNÁRIOS CONTENDO DAPSONA, HP β CD E PVP-K30 E/OU HPMC

Sistema	$K_{1:1}$ (mol.L ⁻¹)	CE	Razão molar (DAP:HP β CD)
DAP:HP β CD	1035	0,0241	1:43
DAP:HP β CD:PVP-K30	802	0,0186	1:55
DAP:HP β CD:HPMC	695	0,0162	1:63

$K_{1:1}$ = constante de estabilidade

CE = eficiência de complexação (LOFTSSON, HREINSDOTTIR e MASSON, 2005)

Razão molar = razão DAP:HP β CD calculada segundo Loftsson, Hreinsdóttir e Másson, 2005.

Quanto maior a constante de estabilidade, maior será a facilidade da formação do complexo de inclusão. Maior valor de $K_{1:1}$ foi observado para o sistema binário DAP:HP β CD. Sendo assim, a adição de polímeros hidrossolúveis não aumentou a constante de estabilidade do complexo e a eficiência de complexação.

Loftsson, Hreinsdóttir e Másson (2005), estudaram a formação de complexos de inclusão entre a finasterida e várias ciclodextrinas, a citar: HP β CD, SBE β CD e RM β CD. Os resultados mostraram que a presença de polímeros tem pequena influência sobre os valores de constantes de estabilidade dos complexos, sendo que HPMC e CMC promoveram uma ligeira redução dos valores de $K_{1:1}$.

Os valores de CE encontrados foram bastante baixos e a razão molar indicaram que, em média, para cada 53 moléculas de ciclodextrina presente no meio, apenas uma encontra-se complexada com a dapsona.

Os valores de K_c , CE e RM obtidos para os sistemas de HP β CD (Tabela 7) apresentaram maior afinidade do fármaco pela ciclodextrina quando comparados com os de β CD (Tabela 4). Esta melhor afinidade é indicada pelos valores de K_c e CE, os quais são maiores para os sistemas com HP β CD e a razão molar indica que são necessárias menos moléculas de CD para formar um complexo de inclusão que com o sistema DAP: β CD.

Apesar da baixa eficiência de complexação, um considerável incremento de solubilidade foi observado para dapsona nos sistemas binário e ternários obtidos (Tabela 8).

TABELA 8. VALORES DE SOLUBILIDADE DA DAPSONA E SISTEMAS BINÁRIO E TERNÁRIOS OBTIDOS POR COEVAPORAÇÃO EXPRESSOS EM mg.mL^{-1} , mM E INCREMENTO DE SOLUBILIDADE

	Solubilidade da Dapsona		Incremento da Solubilidade
	(mg.mL^{-1})	(mM)	
DAP	5,77	0,0233	-
DAP:HP β CD	242,12	0,9751	42 vezes
DAP:HP β CD:PVP-K30	88,75	0,3574	15 vezes
DAP:HP β CD:HPMC	61,30	0,2469	11 vezes

5.2.2. Calorimetria Exploratória Diferencial

As curvas DSC do fármaco puro, HP β CD, PVP-K30 e HPMC, misturas físicas 1:1 e sistemas binários e ternários dapsona:HP β CD, dapsona:HP β CD:PVP-K30 e dapsona:HP β CD:HPMC são apresentadas na Figura 26.

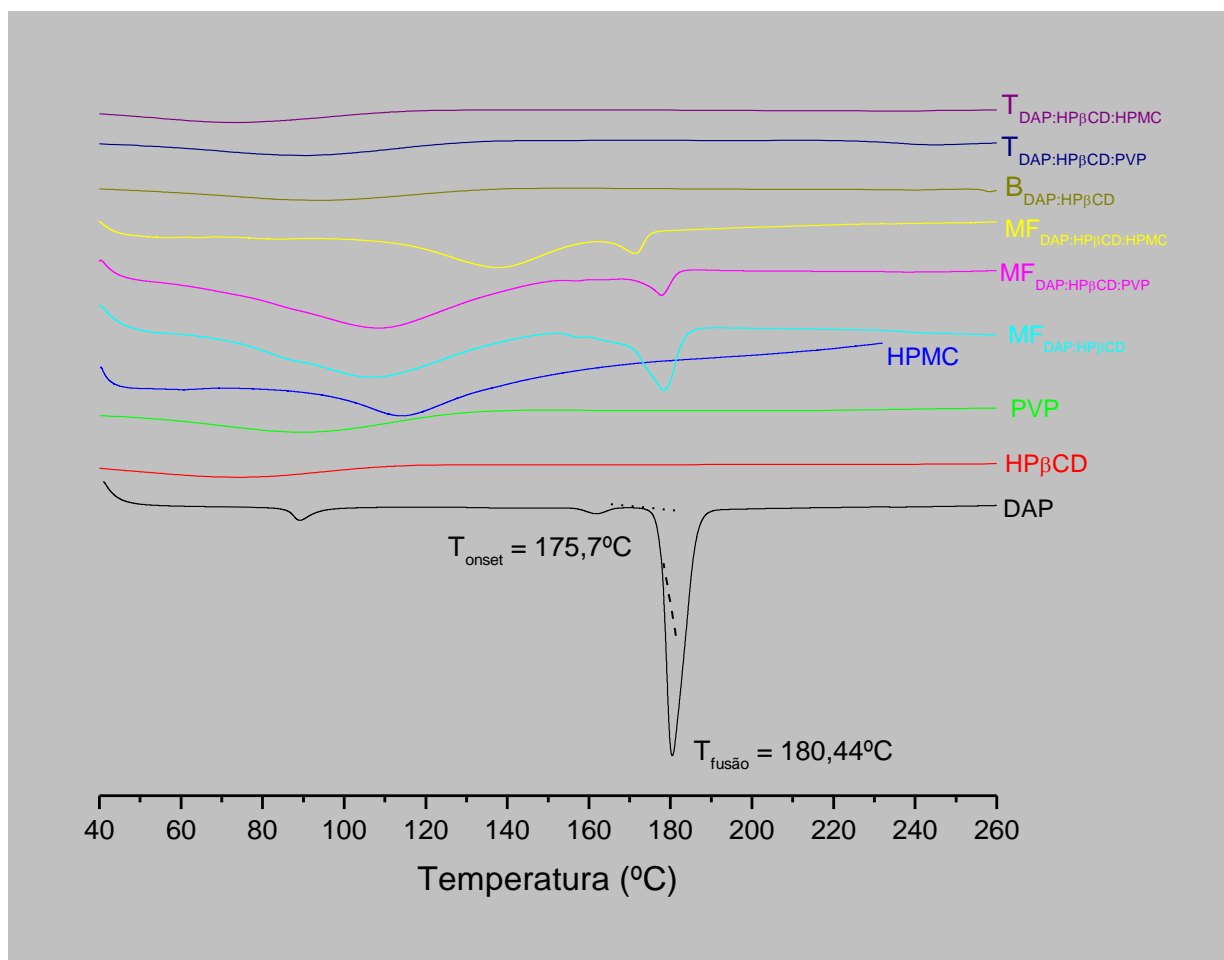


FIGURA 26. CURVAS DSC DA DAPSONA, HP β CD, PVP-K30, HPMC, MISTURAS FÍSICAS 1:1 E SISTEMAS BINÁRIO E TERNÁRIOS CONTENDO DAPSONA:HP β CD, DAPSONA:HP β CD:PVP-K30 E DAPSONA:HP β CD:HPMC, OBTIDAS SOB ATMOSFERA DINÂMICA DE NITROGÊNIO (100 mL min^{-1}) E RAZÃO DE AQUECIMENTO DE $10^{\circ}C \text{ min}^{-1}$

A mesma curva DSC da dapsona, já apresentada anteriormente, mostrou o evento endotérmico em $180,44^{\circ}C$ referente à fusão do fármaco e o evento endotérmico em $83-84^{\circ}C$ referentes às suas formas polimórficas.

A curva DSC da HP β CD apresentou-se termodinamicamente estável em toda a faixa de temperatura estudada.

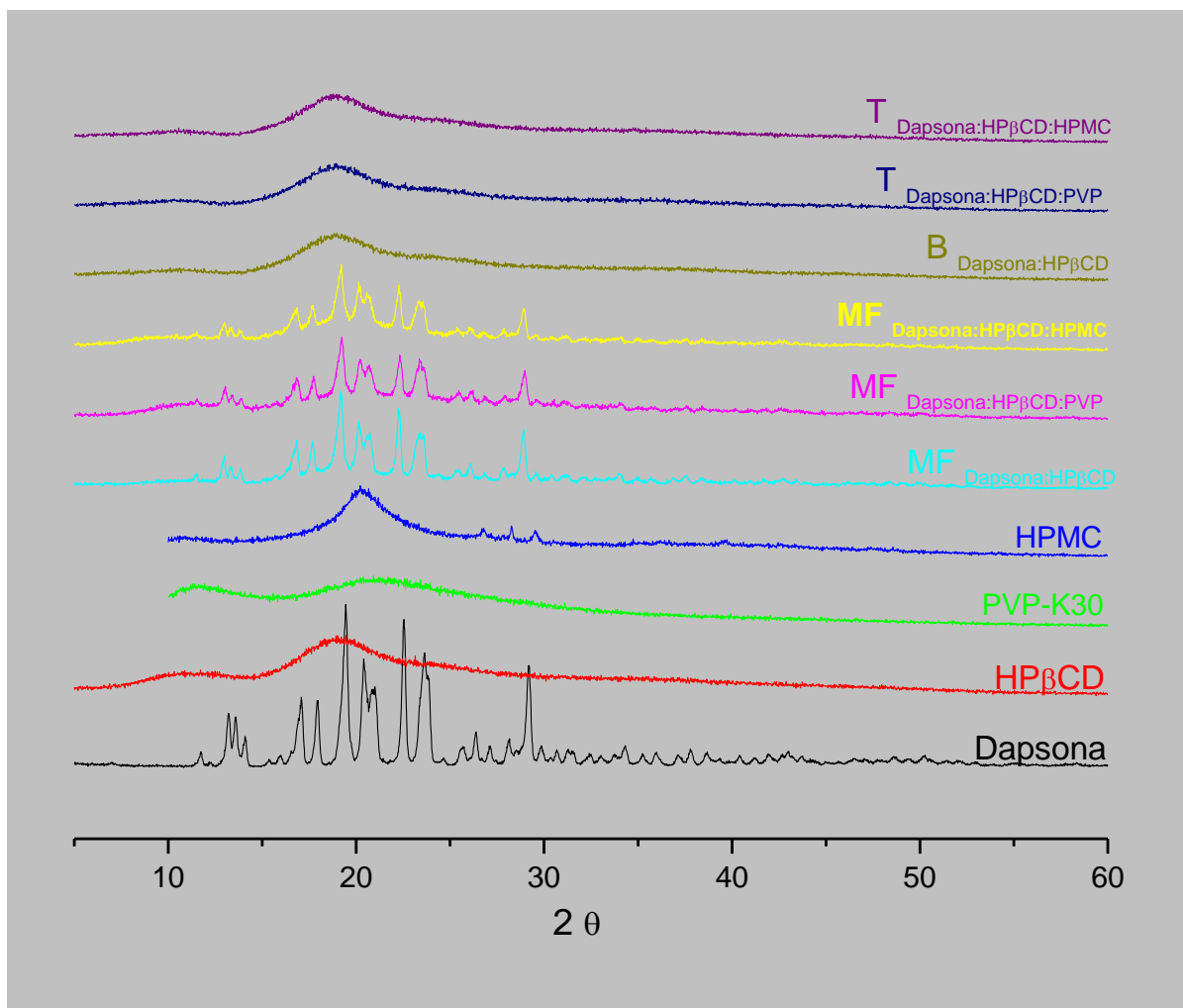
As curvas DSC do PVP-K30 e HPMC apresentaram comportamento térmico semelhante, mostrando evento endotérmico entre 54 e 130°C, e 79 e 137°C, mantendo-se termodinamicamente estáveis a partir destas temperaturas.

As curvas DSC das misturas-físicas 1:1 dapsona:HP β CD, dapsona:HP β CD:PVP-K30 e Dapsona:HP β CD:HPMC mostraram evento endotérmico característico da gelatinização do amido, indicando a presença da ciclodextrina, entre 80 e 120 °C, seguido do evento endotérmico característico de fusão do fármaco nos valores de 178,73 °C, 177,77 °C e 172,25°C, respectivamente. As curvas DSC para os sistemas binário - dapsona:HP β CD –, e ternários - Dapsona:HP β CD:PVP-K30 e Dapsona:HP β CD:HPMC – mostraram-se termodinamicamente estável em toda a faixa de temperatura estudada. A supressão do evento térmico de fusão referente ao fármaco nos sistemas binário e ternários conclui que houve a formação de complexos de inclusão entre a dapsona e HP β CD nesses sistemas.

5.2.3. Difração de Raios-X (DRX)

A Figura 27 mostra os difratogramas da dapsona, misturas-físicas DAP:HP β CD na presença e ausência dos polímeros – PVP-K30 ou HPMC – e, para os sistemas binário – DAP:HP β CD - e ternários - DAP:HP β CD:PVP-K30 - e DAP:HP β CD:HPMC obtidos por coevaporação.

O difratograma da dapsona mostrou reflexões intensas em 19,5°, 20,7°, 22,5°, 23,8° e 29,2° (2 θ) características da cristalinidade do fármaco, enquanto no difratograma da HP β CD observa-se comportamento típico de substância amorfa. Nos difratogramas correspondentes às misturas-físicas é possível visualizar ainda alguns picos, que demonstram a presença do fármaco cristalino não-complexado. Os difratogramas referentes aos sistemas binários e ternários mostraram amorfização dos sistemas, o que sugere a formação de complexos de inclusão entre a dapsona e a HP β CD na presença ou ausência dos polímeros PVP-K30 ou HPMC, com interações supramoleculares.



/

FIGURA 27. DIFRATOGRAMAS OBTIDOS PARA A DAPSONA (DAP), MISTURA-FÍSICA DAP:HPβCD 1:1 E SISTEMAS BINÁRIO - DAP:HPβCD – E SISTEMAS TERNÁRIOS - DAP:HPβCD:PVP-K30 E DAP:HPβCD:HPMC - OBTIDOS POR COEVAPORAÇÃO OPERANDO A 40 KV E 40 mA, COM VELOCIDADE DE VARREDURA DE 2°.min⁻¹ (2 THETA)

5.2.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Figura 28 mostra as fotomicrografias da dapsona, HPβCD. A análise das fotomicrografias obtidas mostra que o fármaco dapsona (Figura 28A) é composto por cristais irregulares de formato ortorrômbico. A HPβCD (Figura 28B), por outro lado, é composta por partículas esféricas regulares.

Nas fotomicrografias das misturas-físicas DAP:HPβCD (Figura 29A), DAP:HPβCD:PVP-K30 (Figura 29B) e DAP:HPβCD:HPMC (Figura 29C), observa-

se a presença dos dois tipos de partículas, com morfologia semelhantes às substâncias isoladas.

A Figura 30 mostra as fotomicrografias dos sistemas binário - DAP:HP β CD – e sistemas ternários - DAP:HP β CD:PVP-K30 e DAP:HP β CD:HPMC – obtidos por coevaporação.

As fotomicrografias dos sistemas binários e ternários apresentaram morfologia semelhante, com formação de partículas esféricas bem definidas, sugerindo uma interação entre o fármaco e a HP β CD.

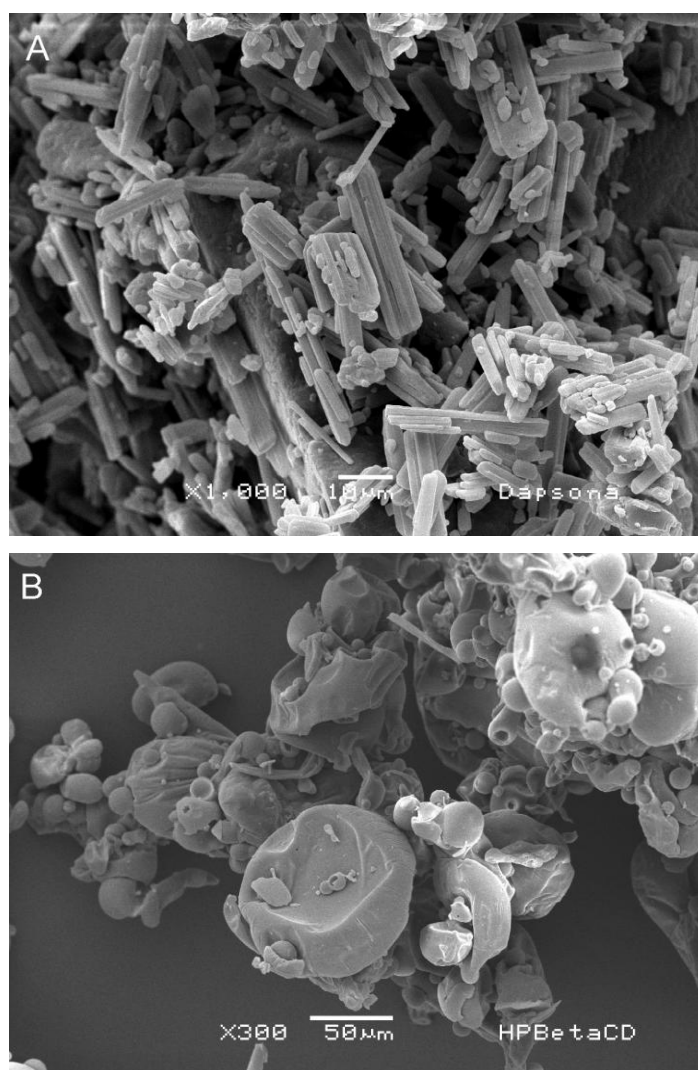


FIGURA 28. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA DAPSONA (A) e HP β CD (B), OBTIDOS EM MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA JEOL MOD. JSM-6360 LV

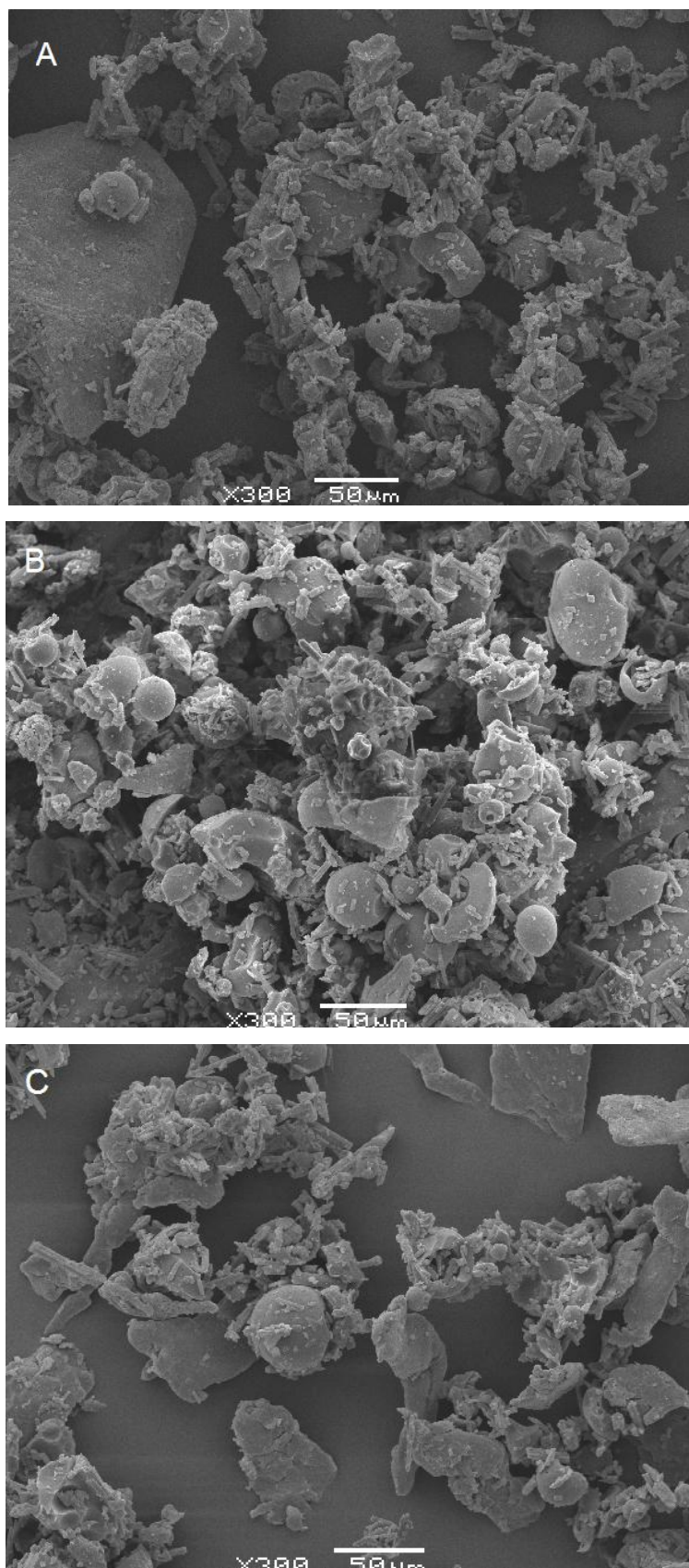


FIGURA 29. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DAS MISTURAS-FÍSICAS DAPSONA:HPβCD (A), DAPSONA:HPβCD:PVP-K30 (B) e DAPSONA:HPβCD:HPMC (C), OBTIDOS EM MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA JEOL MOD. JSM-6360 LV

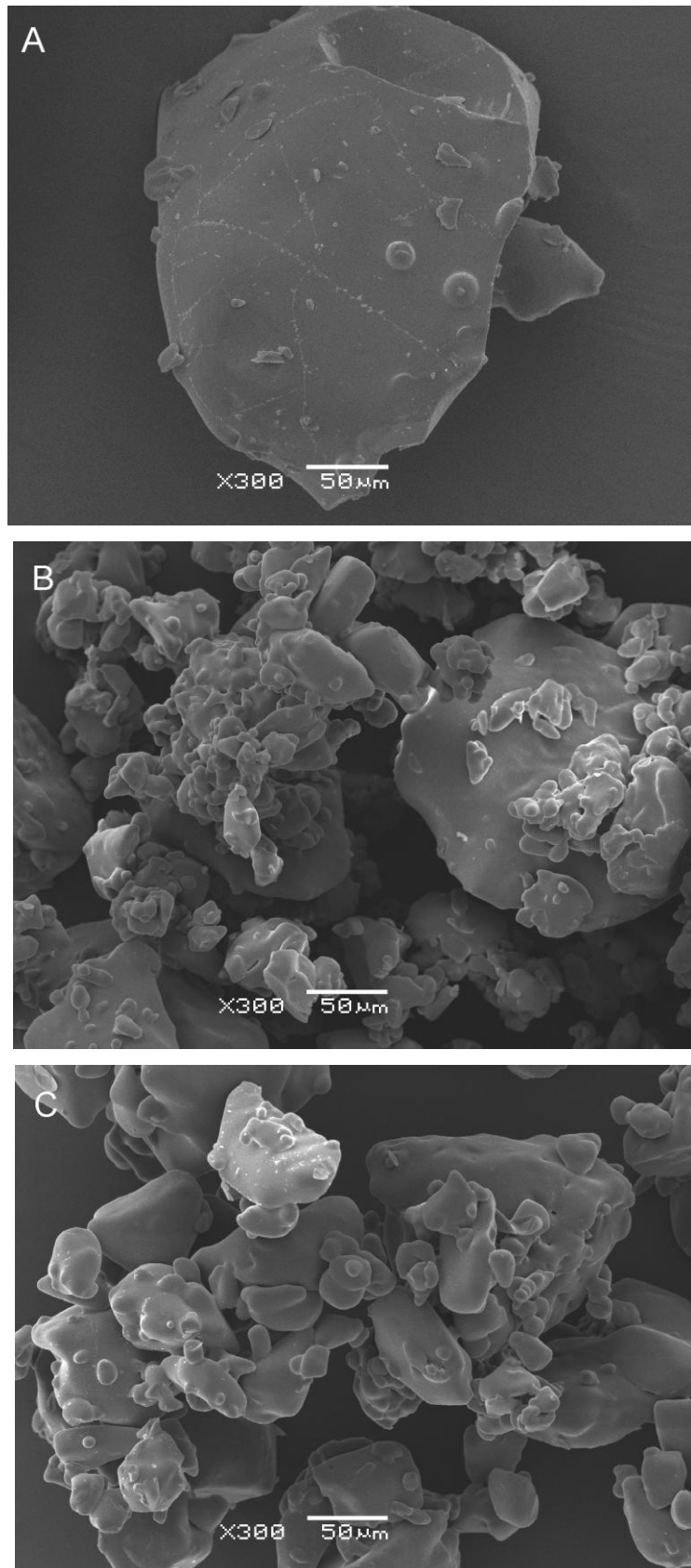


FIGURA 30. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DOS SISTEMAS BINÁRIO - DAP:HP β CD (A) - E TERNÁRIOS - DAP:HP β CD:PVP-K30 (B) E DAP:HP β CD:HPMC (C) OBTIDOS EM MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA JEOL MOD. JSM-6360 LV

5.2.5. Ressonância Magnética Nuclear (RMN de ^1H)

A formação do complexo de inclusão dapsona:HP β CD foi primeiramente evidenciada através da comparação dos espectros RMN de ^1H da dapsona e do sistema dapsona:HP β CD, sob as mesmas condições, revelando uma interação significativa entre a HP β CD e a dapsona. Desta maneira, variações e ampliações nos deslocamentos químicos do RMN de ^1H dos hidrogênios aromáticos da dapsona (dubleto em 6,65 e 7,52) foram observados (Figura 31).

Esta interação específica foi suportada através da técnica de RMN ROESY 1D (one dimensional rotating frame Overhauser effect), a qual é normalmente adequada para medir nOe no complexo de inclusão. Como já foi mencionado, a ocorrência de nOe entre os prótons H-3 e H-5 das ciclodextrinas com os prótons da molécula hóspede é um indicador da formação do complexo de inclusão (EJCHART e KOZMINSKI, 2006).

A técnica de RMN ROESY 1D obtida por excitação seletiva do hidrogênio H-3 e H-5 em 3,88 ppm na HP β CD causou o aumento da intensidade dos hidrogênios aromáticos (dubleto em 6,65 e 7,52 ppm) por efeito nOe, mostrados na Figura 32.

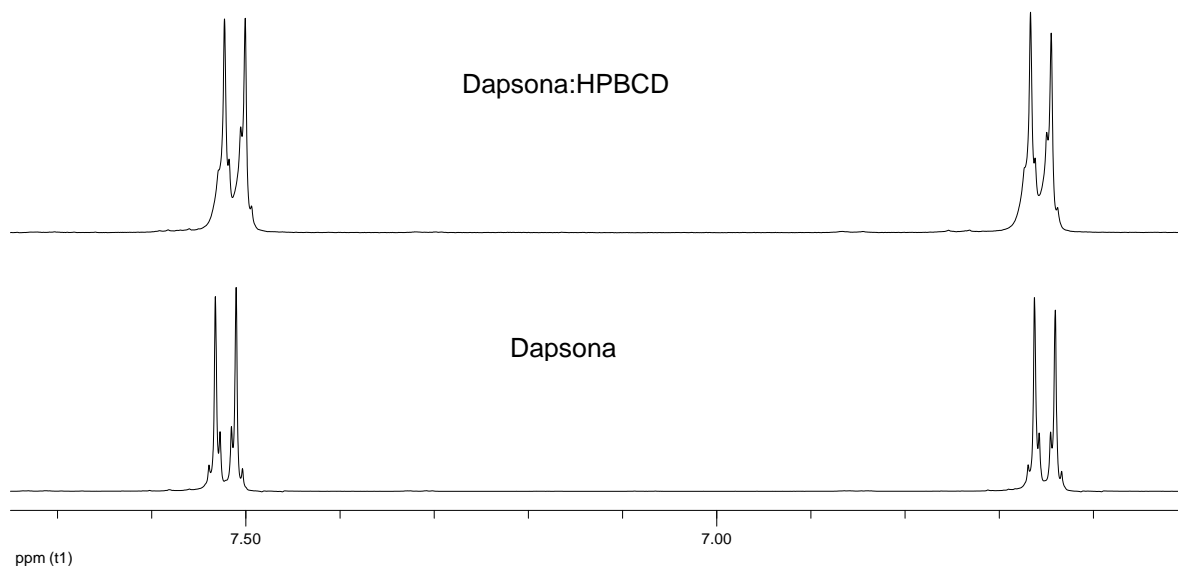


FIGURA 31. ESPECTROS DE RMN DE ^1H DO SISTEMA DAPSONA:HP β CD E DA DAPSONA, MOSTRANDO AS VARIAÇÕES NOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS

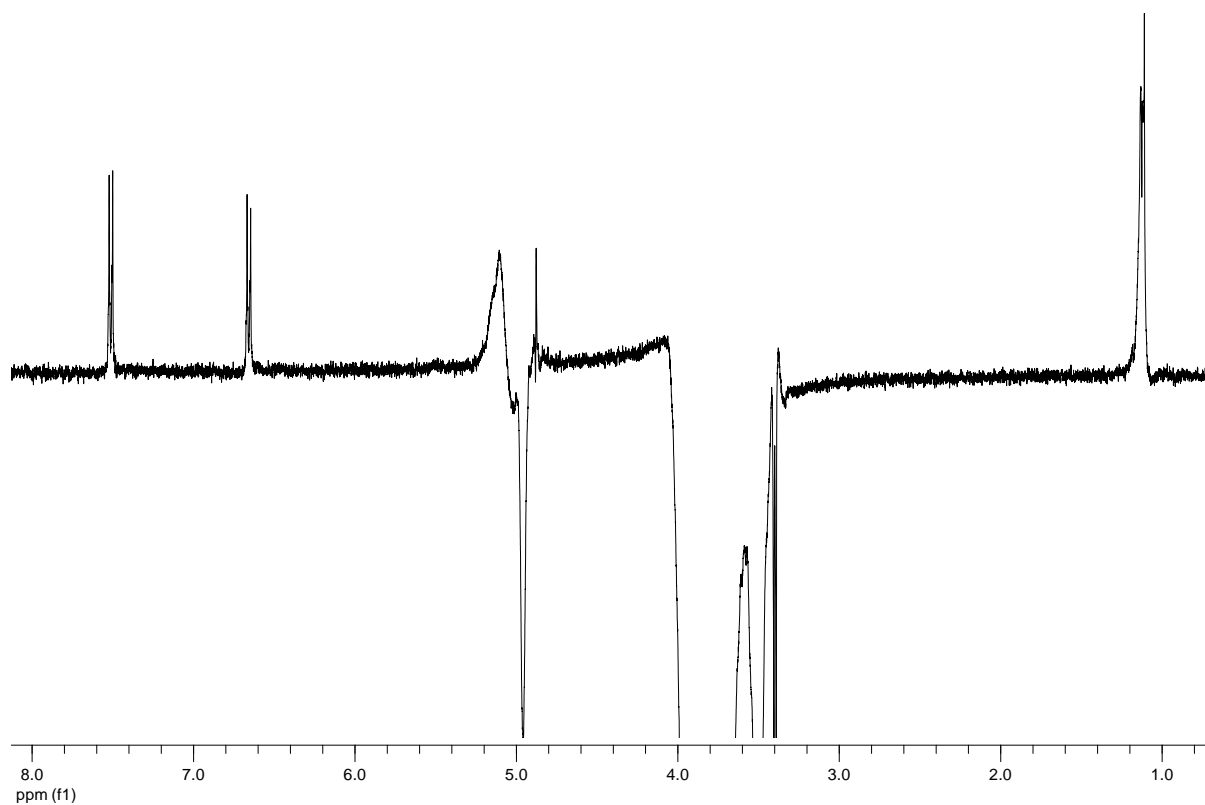


FIGURA 32. ESPECTROS DE RMN ROESY 1D DO SISTEMA DAPSONA:HP β CD ATRAVÉS DE IRRADIAÇÃO SELETIVA DE SINAL A 3,88 ppm CORRESPONDENDO AOS HIDROGENIOS H-3 E H-5 DA HP β CD, MOSTRANDO O EFEITO NOE NOS SINAIS DE HIDROGENIO DA DAPSONA, USANDO TEMPO DE MISTURA DE 300 ms

O aparecimento dos sinais característicos do fármaco dapsona no espectro de ROESY 1D, ao realizar a excitação seletiva dos hidrogênios H-3 e H-5 da HP β CD, revela um complexo de inclusão específico da estrutura da dapsona no interior da cavidade da HP β CD. Isto significa que os hidrogênios do fármaco, denominados de H_a e H_b na Figura 33 estão interagindo com os hidrogênios H-3 e H-5 da ciclodextrina (Figura 34).

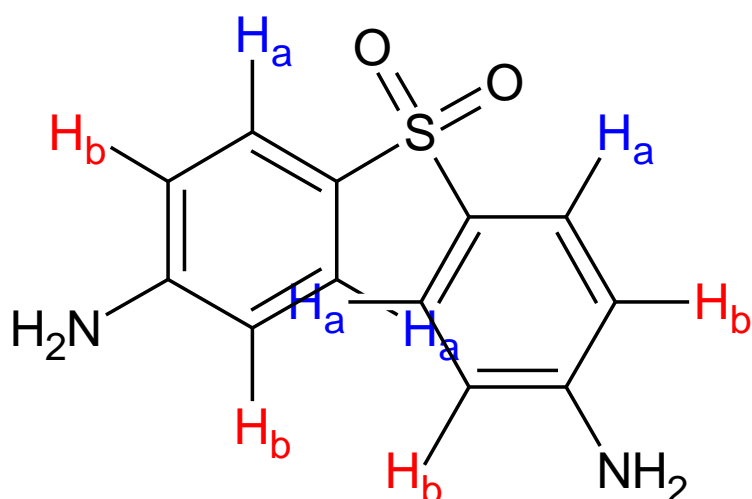


FIGURA 33. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS HIDROGÊNIOS DA DAPSONA DISPONÍVEIS PARA INTERAÇÃO COM A HP β CD

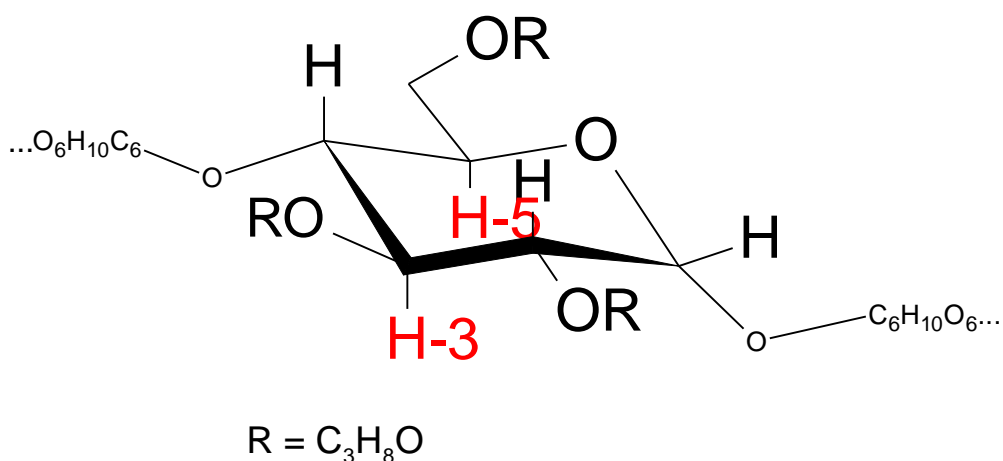


FIGURA 34. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS HIDROGÊNIOS H-3 E H-5 DA UNIDADE DE GLUCOPIRANOSE DA HP β CD

Sendo assim, os resultados do RMN indicam que o fármaco dapsona encontra-se totalmente no interior da cavidade da HP β CD, representada pela

Figura 35. A intensidade dos sinais nos espectros de RMN ROESY 1D do sistema dapsona:HP β CD foi mais forte que para o sistema dapsona: β CD, confirmando que os complexos de inclusão com a HP β CD apresentam uma interação mais forte com o fármaco dapsona do que com a β CD.

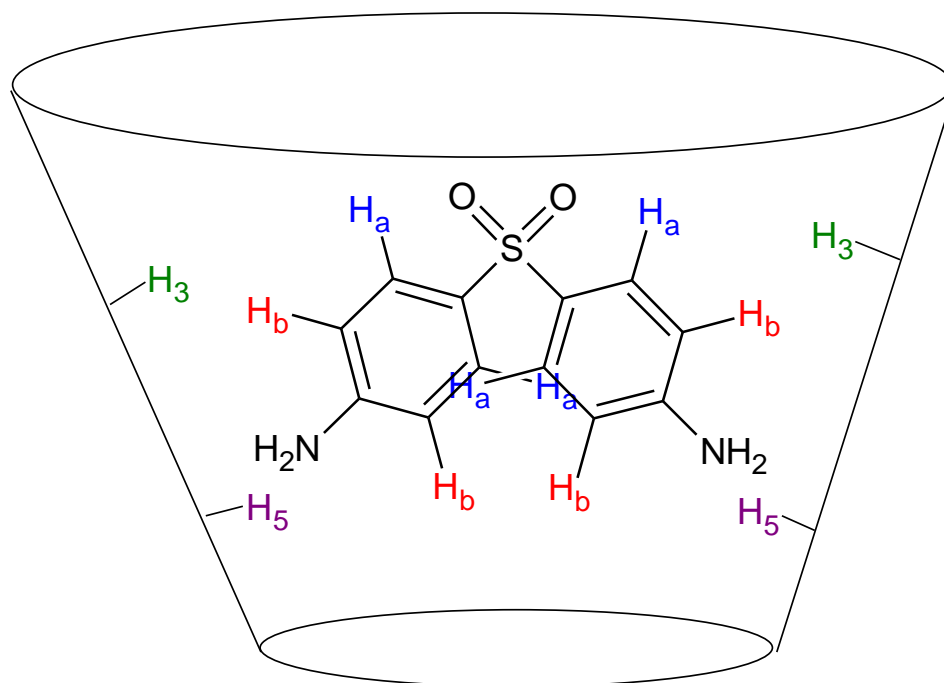


FIGURA 35. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS INTERAÇÕES DO FÁRMACO DAPSONA NO INTERIOR DA CAVIDADE DA HP β CD

5.3. ESTUDO COMPARATIVO DAS INTERAÇÕES ENTRE DAPSONA: β CD E DAPSONA:HP β CD

O valor de constante de estabilidade do complexo (K_c) obtido para os sistema binário Dapsona:HP β CD foi superior àquele apresentado pelo sistema binário Dapsona: β CD. Os estudos usando RMN indicaram que as interações entre dapsona:HP β CD foram mais intensas que às observadas para os complexos dapsona: β CD.

A adição de polímeros resultou em pequeno incremento nos valores da constante de estabilidade (K_c) e solubilidade dos complexos quando a β CD foi empregada. Ao contrário, a adição de polímeros não favoreceu a formação de complexos de inclusão quando a HP β CD foi utilizada.

O incremento de solubilidade obtido para o complexo binário Dapsona:HP β CD foi muito superior àqueles obtidos para todos os demais sistemas estudados.

Lu e colaboradores (2009) realizaram estudos para a formação de complexos de inclusão do antioxidante resveratrol (P.M. 228,24 g/mol) com ciclodextrinas (β CD e HP β CD), com o objetivo de melhorar sua solubilidade. A constante de estabilidade (K_c) observada para o sistema resveratrol:HP β CD foi maior que para o sistema resveratrol: β CD, sugerindo que a HP β CD possui uma habilidade de inclusão mais forte que a β CD. Segundo os pesquisadores, este fato implica que a cavidade da ciclodextrina modificada fornece um melhor microambiente para o resveratrol. Isto provavelmente ocorre, pois as substituições com o radical hidroxipropil ampliam a abertura da β CD original e destroem as ligações de hidrogênio intramoleculares, permitindo o acesso da molécula hóspede à cavidade da HP β CD mais facilmente e, portanto apresentando uma maior constante de estabilidade.

Jullian e colaboradores (2008) obtiveram um aumento da solubilidade do flavonóide morina (P.M. 302,24 g/mol) com a formação de complexos de inclusão com β CD, HP β CD e DM β CD. No diagrama de solubilidade de fases realizado pelo método de Higuchi e Connors, a solubilidade da morina aumentou de forma linear em função da concentração das CDs, indicando diagramas do tipo A_L e estequiometria 1:1. Maior incremento da solubilidade observado com a HP β CD > DM β CD > β CD.

Aleem e colaboradores (2008) estudaram a formação de complexos de inclusão de cefdinir (P.M. 395,42 g/mol) com β CD e HP β CD. Maior valor da constante de estabilidade dos complexos (K_c) foi obtido para complexos cefdinir: β CD. Os pesquisadores sugerem que a maior afinidade do fármaco pela β CD é devido a algum impedimento estérico do grupo hidroxipropil da HP β CD, o qual pode restringir a entrada da molécula hóspede em sua cavidade.

Portanto, de acordo com a literatura, a afinidade do fármaco varia conforme o tipo de ciclodextrina. O melhor desempenho obtido com o complexo de inclusão DAP:HP β CD pode estar relacionado ao peso molecular da dapsona, o qual é próximo dos fármacos citados com melhor afinidade pela HP β CD. Este fato também pode ser justificado através da estereoquímica da molécula no interior da HP β CD.

6. CONCLUSÃO

Os estudos de solubilidade mostraram que os complexos de inclusão dapsona: β CD e dapsona:HP β CD na presença e ausência de polímeros conduzem a um aumento na solubilidade do fármaco, porém a adição de polímeros não teve contribuição representativa na solubilidade dos sistemas.

As curvas DSC, os difratogramas e os ensaios de microscopia eletrônica de varredura indicaram a formação de complexos de inclusão fármaco/CD na presença e/ou ausência de polímeros hidrossolúveis – PVP-K30 e/ou HPMC. Maior eficiência de complexação foi observada para os sistemas dapsona: β CD:HPMC e dapsona:HP β CD.

Experimentos de RMN ROESY 1D permitiram observar as interações intermoleculares entre a dapsona com a cavidade da ciclodextrina, por meio dos hidrogênios H-3 ou H-3 e H-5 da β CD e da HP β CD, respectivamente, conferindo a formação de complexos de inclusão. As interações entre dapsona:HP β CD foram mais intensas que às observadas para os complexos dapsona: β CD.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEEM, O., *et al.* Effect of beta-cyclodextrin and hydroxypropyl beta-cyclodextrin complexation on physicochemical properties and antimicrobial activity of cefdinir. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.47, n.3, Jul 15, p.535-540. 2008.

AMERICAN SOCIETY OF HEALTH-SYSTEM PHARMACISTS. **AHFS Drug Information**. Bethesda: ASHP. 2006

AMIDON, G. L., *et al.* A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification - the Correlation of in-Vitro Drug Product Dissolution and in-Vivo Bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v.12, n.3, Mar, p.413-420. 1995.

AMMAR, H. O., *et al.* Formulation and biological evaluation of glimepiride-cyclodextrin-polymer systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v.309, n.1-2, Feb 17, p.129-38. 2006.

ANDERSEN, F. M. e BUNDGAARD, H. Inclusion Complexation of Metronidazole Benzoate with Beta-Cyclodextrin and Its Depression of Anhydrate Hydrate Transition in Aqueous Suspensions. **International Journal of Pharmaceutics**, v.19, n.2, p.189-197. 1984.

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

ANVISA. Resolução nº 2, de 15 de janeiro de 2007
Diário Oficial da União 2007.

ARAUJO, M. G. [Leprosy in Brazil]. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n.3, May-Jun, p.373-82. 2003.

BÉNI, S., *et al.* Cyclodextrin/imatinib complexation: binding mode and charge dependent stabilities. . **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.30, p.167-174. 2007.

BERNABEI, M. T., *et al.* [Dapsone: forme cristalline in relazione alla loro biodisponibilità]. **Il Farmaco**, v.37, n.2, p.55-64. 1982.

BETTINETTI, G. P. e MURA, P. Dissolution properties of naproxen in combinations with polyvinylpyrrolidone. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.20, p.1353-1366. 1994.

BLANCO, J., *et al.* Influence of Method of Preparation on Inclusion Complexes of Naproxen with Different Cyclodextrins. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.17, n.7, p.943-957. 1991.

BORKA, L. Review on crystal polymorphism of substances in the European pharmacopoeia. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v.66, n.1, p.16-22. 1991.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Guia para o Controle da hanseníase**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=21643> Acesso em: 25/09/2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigilância em Saúde: Situação Epidemiológica da Hanseníase no Brasil, 2008**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_novembro.pdf> Acesso em: 15/02/2009.

BREWSTER, M. E. e LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Advance Drug Delivery Reviews**, v.59, n.7, Jul 30, p.645-66. 2007.

BRITISH PHARMACOPOEIA COMMISSION. **British Pharmacopoeia**. London: The Stationery Office, v.1. 2005

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

CAPPELLO, B., *et al.* Solubilization of tropicamide by hydroxypropyl-beta-cyclodextrin and water-soluble polymers: in vitro/in vivo studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v.213, n.1-2, Feb 1, p.75-81. 2001.

CEREDA, M. P. Ciclodextrinas: características e aplicações. In: CARGILL, F. (Ed.). Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas Latino Americanas, v.3, 2003. Ciclodextrinas: características e aplicações, p.475-498. (CULTURAS DE TUBEROSAS AMILÁCEAS LATINO AMERICANAS)

CHADHA, R., *et al.* Binding constants of inclusion complexes of nitroimidazoles with β -cyclodextrins in absence and presence of PVP. **Thermochimica Acta**, v.459, p.111-115. 2007.

CHALLA, R., *et al.* Cyclodextrins in drug delivery: An updated review. **AAPS PharmSciTech**, v.6, n.2, p.-. 2005.

CHOW, D. D. e KARARA, A. H. Characterization, Dissolution and Bioavailability in Rats of Ibuprofen - Beta-Cyclodextrin Complex System. **International Journal of Pharmaceutics**, v.28, n.2-3, Feb, p.95-101. 1986.

CIRRI, M., *et al.* Simultaneous effect of cyclodextrin complexation, pH, and hydrophilic polymers on naproxen solubilization. **Journal of Pharmaceutical Biomedical Analyses**, v.42, n.1, Sep 11, p.126-31. 2006.

CONSIGLIERI, V. O., STORPIRTIS, S. e FERRAZ, H. G. Aspectos farmacotécnicos relacionados à biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.21, n.1, p.23-41. 2000.

DE ARAUJO, M. V., *et al.* Inclusion complexes of pyrimethamine in 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin: characterization, phase solubility and molecular modelling. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.15, n.17, Sep 1, p.5752-9. 2007.

DE ARAUJO, M. V., *et al.* Sulfadiazine/hydroxypropyl-beta-cyclodextrin host-guest system: Characterization, phase-solubility and molecular modeling. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.16, n.10, May 15, p.5788-94. 2008.

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

DERYCKE, V., *et al.* Starch gelatinization and amylose-lipid interactions during rice parboiling investigated by temperature resolved wide angle X-ray scattering and differential scanning calorimetry. **Journal of Cereal Science**, v.42, p.334-343. 2005.

DODZIUK, H. **Cyclodextrins and their complexes: chemistry, analytical methods, applications**. Germany: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. 2006 (Crystallographic Study of Cyclodextrins and Their Inclusion Complexes)

DRAGAN, F., *et al.* Spectroscopic investigation of β -cyclodextrin-metoprolol tartrate inclusion complexes. . **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v.59, p.125-130. 2007.

DUCHÊNE, D. e WOUESSIDJEWE, D. Pharmaceutical uses of cyclodextrins and derivatives. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.16, p.2487-2499. 1990.

DUCHÊNE, D., WOUESSIDJEWE, D. e POELMAN, M. C. Les cyclodextrines dans les préparations pour usage dermique. In: (Ed.). Formes pharmaceutiques pour application locale. Paris: Tec & Doc, 1997. Les cyclodextrines dans les préparations pour usage dermique, p.481-499

EJCHART, A. e KOZMINSKI, W. NMR of Cyclodextrins and Their Complexes. In: DODZIUK, H. (Ed.). Cyclodextrins and their complexes: chemistry, analytical methods, applications. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006. NMR of Cyclodextrins and Their Complexes

ESPINAR, F. J. O., *et al.* Reduction in the Ulcerogenicity of Naproxen by Complexation with Beta-Cyclodextrin. **International Journal of Pharmaceutics**, v.70, n.1-2, Mar 31, p.35-41. 1991.

FERNELIUS, W. C. Nomenclature of Coordination Compounds. **Journal of Chemical Documentation**, p.200-205. 1965.

FIGUEIRAS, A., *et al.* Interaction of Omeprazole with a Methylated Derivative of β -Cyclodextrin: Phase Solubility, NMR Spectroscopy and Molecular Simulation. **Pharmaceutical Research**, v.24, n.2, p.377-389. 2007.

GIRON, D. Thermal-Analysis and Calorimetric Methods in the Characterization of Polymorphs and Solvates. **Thermochemica Acta**, v.248, Jan 2, p.1-59. 1995.

GIRON, D. Contribution of thermal methods and related techniques to the rational development of pharmaceuticals - Part 1. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v.1, n.5, Aug, p.191-199. 1998a.

GIRON, D. Contribution of thermal methods and related techniques to the rational development of pharmaceuticals - Part 2. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v.1, n.6, Sep, p.262-268. 1998b.

GOMES, F. G., FRADE, M. A. C. e FOSS, N. T. Skin ulcers in leprosy: clinical and epidemiological characteristics of patients. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.82, n.5, p.433-437. 2007.

GRUNWALD, M. H. e AMICHAJ, B. Dapsone - The treatment of infectious and inflammatory diseases in dermatology. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.7, n.3, Aug, p.187-192. 1996.

HAMMOND, C. **International Union of Crystallography Texts: The Basics of Crystallography and Diffraction**. New York: Oxford University Press Inc., v.3. 2000

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

IKEDA, Y., *et al.* NMR spectroscopic characterization of metoprolol/cyclodextrin complexes in aqueous solution: Cavity size dependency. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.93, n.7, p.1659-1671. 2004.

IONASHIRO, M. **Giolito - Fundamentos da Termogravimetria/ Análise Térmica Diferencial/ Calorimetria Exploratória Diferencial**. Araraquara: Giz Editorial. 2004

IRIE, T. e UEKAMA, K. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. **Journal of Pharmaceutical Science**, v.86, n.2, Feb, p.147-62. 1997.

JULLIAN, C., *et al.* Studies of inclusion complexes of natural and modified cyclodextrin with (+)catechin by NMR and molecular modeling. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.15, n.9, May 1, p.3217-3224. 2007.

JULLIAN, C., *et al.* Complexation of morin with three kinds of cyclodextrin. A thermodynamic and reactivity study. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.71, n.1, Nov 1, p.269-75. 2008.

LACY C. F., GOLDMAN, M. P. e LANCE, L. L.. **Drug Information Handbook International**. Ohio: Lexi-comp. 2006

LANG, T. e GREENWOOD, B. The development of Lapdap, an affordable new treatment for malaria. **Lancet Infect Disease**, v.3, n.3, Mar, p.162-8. 2003.

LAU, G. A fatal case of drug-induced multi-organ damage in a patient with Hansen's disease: dapsone syndrome or rifampicin toxicity? **Forensic Science International**, v.73, n.2, May 22, p.109-15. 1995.

LIN, S. Z., *et al.* In-Vivo Evaluation of Indomethacin/Cyclodextrin Complexes - Gastrointestinal Tolerance and Dermal Antiinflammatory Activity. **International Journal of Pharmaceutics**, v.106, n.1, May 16, p.63-67. 1994.

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

LIPKA, E. e AMIDON, G. L. Setting bioequivalence requirements for drug development based on preclinical data: optimizing oral drug delivery systems. **Journal Control Release**, v.62, n.1-2, Nov 1, p.41-9. 1999.

LOBENBERG, R. e AMIDON, G. L. Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.50, n.1, Jul, p.3-12. 2000.

LOCKWOOD, D. N. J. Leprosy. **Medicine**, v.33, n.7, p.26-29. 2005.

LOFTSSON, T. Cyclodextrins complexation. . **United States Patent**, v.5, n.472, p.954. 1995.

LOFTSSON, T. Increasing the cyclodextrin complexation of drugs and drug bioavailability through addition of water-soluble polymers. **Pharmazie**, v.53, n.11, Nov, p.733-40. 1998.

- LOFTSSON, T. Cyclodextrins and the Biopharmaceutics classification system of drugs. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v.44, n.1-4, Dec, p.63-67. 2002.
- LOFTSSON, T., *et al.* The Effects of 2-Hydroxypropyl-Beta-Cyclodextrin on the Solubility and Stability of Chlorambucil and Melphalan in Aqueous-Solution. **International Journal of Pharmaceutics**, v.57, n.1, Dec 15, p.63-72. 1989.
- LOFTSSON, T. e BREWSTER, M. E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins .1. Drug solubilization and stabilization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.85, n.10, Oct, p.1017-1025. 1996.
- LOFTSSON, T. e DUCHENE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications **International Journal of Pharmaceutics**, v.329, n.1-2, Feb 1, p.1-11. 2007.
- LOFTSSON, T., FRIORIKSDOTTIR, H. e GUMUNDSOTTIR, T. K. The effect of water-soluble polymers on aqueous solubility of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v.127, p.293-296. 1996.
- LOFTSSON, T., *et al.* The Effect of Water-Soluble Polymers on Drug-Cyclodextrin Complexation. **International Journal of Pharmaceutics**, v.110, n.2, p.169-177. 1994.
- LOFTSSON, T., HREINSDOTTIR, D. e MASSON, M. Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v.302, n.1-2, Sep 30, p.18-28. 2005.
- LOFTSSON, T., MÁSSON, M. e SIGURJÓNSDÓTTIR, J. F. Methods to enhance the complexation efficiency of cyclodextrins. **S.T.P. Pharma Sciences**, v.9, n.3, p.237-242. 1999.
- LU, Z., *et al.* Complexation of resveratrol with cyclodextrins: Solubility and antioxidant activity. **Food Chemistry**, v.113, n.1, Mar 1, p.17-20. 2009.
- LYNG, S. M., PASSOS, M. e FONTANA, J. D. Bixin and alpha-cyclodextrin inclusion complex and stability tests. **Process Biochemistry**, v.40, n.2, Feb, p.865-872. 2005.
- MAESTRELLI, F., *et al.* Preparation and characterisation of liposomes encapsulating ketoprofen-cyclodextrin complexes for transdermal drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v.298, n.1, Jul 14, p.55-67. 2005.
- MAESTRELLI, F., *et al.* Microspheres for colonic delivery of ketoprofen-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin complex. **The European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.34, n.1, May 10, p.1-11. 2008.
- MARANGONI, D. V. **Doenças Infecciosas: conduta diagnóstica e terapêutica**. São Paulo: Guanabara Koogan. 1998
- MARTINDALE. **The Complete Drug Reference**. Grayslake: Pharmaceutical Press. 2002
- MURA, P., FAUCCI, M. T. e BETTINETTI, G. P. The influence of polyvinylpyrrolidone on naproxen complexation with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. **The European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.13, n.2, May, p.187-94. 2001.
- NUMANOGLU, U., *et al.* Use of cyclodextrins as a cosmetic delivery system for fragrance materials: linalool and benzyl acetate. **AAPS PharmSciTech**, v.8, n.4, p.E85. 2007.

- OMARI, M. M. A., *et al.* Sildenafil/cyclodextrin complexation: Stability constants, thermodynamics, and guest–host interactions probed by ¹H NMR and molecular modeling studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.41, p.857-865. 2006.
- OPROSMOLIA, D. V. Multidrug therapy. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.65, n.1, p.37-40. 1991.
- PANICKER, L. Influence of leprosy drug, dapsone on the model membrane dipalmitoyl phosphatidylethanolamine. **Thermochemica Acta**, v.447, May, p.123-30. 2006.
- PEREIRA, C. C. L., *et al.* A Combined Theoretical-Experimental Study of the Inclusion of Niobocene Dichloride in Native and Permethylated δ -cyclodextrins. **Organometallics**, v.26, p.4220-4228. 2007.
- PITHA, J., *et al.* Hydroxypropyl-b-cyclodextrin: preparation and characterization: effects on solubility of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v.29, p.73-82. 1986.
- PITHA, J., *et al.* Hydroxypropyl-Beta-Cyclodextrin - Preparation and Characterization - Effects on Solubility of Drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v.29, n.1, Mar, p.73-82. 1986.
- PITHA, J., SZENTE, L. e GREENBERG, J. Poly-L-methionine sulfoxide: A biologically inert analogue of dimethyl sulfoxide with solubilizing potency. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.72, n.6, p.665-668. 1983.
- PREVELLO, F. C. e MIRA, M. T. Leprosy: a genetic disease? **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.82, n.5, p.451-459. 2007.
- QUEIROZ, R. H. C., *et al.* Biochemical and hematological side effects of clofazimine in leprosy patients. **Pharmacological Research**, v.46, n.2, Aug, p.191-194. 2002.
- R. VERONESI, R. F. **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Atheneu. 1997 (Hanseníase)
- RAMA, A. C. R., *et al.* Aspectos biofarmacêuticos da formulação de medicamentos para neonatos. Fundamentos da complexação de indometacina com hidroxipropil- β -ciclodextrina para tratamento oral do fechamento do canal arterial. . **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.41, n.3, p.281-299. 2005.
- RAO, B. P., *et al.* Caracterización físico química de los complejos de hidroxietil- β -ciclodextrina y β -ciclodextrina de rifampicina. **Ars Pharmaceutica**, v.47, n.1, p.37-59. 2006.
- RIBEIRO, L., *et al.* Investigation and Physicochemical Characterization of Vinpocetine-Sulfobutyl ether b-cyclodextrin binary and ternary complexes. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v.51, n.8, p.914-922. 2003.
- SALEM, II, STEFFAN, G. e DUZGUNES, N. Efficacy of clofazimine-modified cyclodextrin against Mycobacterium avium complex in human macrophages. **International Journal of Pharmaceutics**, v.260, n.1, Jul 9, p.105-14. 2003.
- SANTOS, S. N. M. B., *et al.* Variação da concentração da hemoglobina em doentes de hansenise tratados com sulfona. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.69, n.4, jul/ago, p.281-284. 1994.
- SAVOLAINEN, J., *et al.* Co-administration of a water-soluble polymer increases the usefulness of cyclodextrins in solid oral dosage forms. **Pharmaceutical Research**, v.15, n.11, Nov, p.1696-701. 1998.

SCALIA, S., *et al.* Comparative studies of the influence of cyclodextrins on the stability of the sunscreen agent, 2-ethylhexyl-p-methoxycinnamate. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.30, n.4, Nov 7, p.1181-9. 2002.

SCALIA, S., *et al.* Encapsulation in lipospheres of the complex between butyl methoxydibenzoylmethane and hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. **International Journal of Pharmaceutics**, v.320, n.1-2, Aug 31, p.79-85. 2006.

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

SILVERSTEIN, R. M., BASSLER, G. C. e MORRILL, T. C. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1994

SIMEONI, S., SCALIA, S. e BENSON, H. A. Influence of cyclodextrins on in vitro human skin absorption of the sunscreen, butyl-methoxydibenzoylmethane. **International Journal of Pharmaceutics**, v.280, n.1-2, Aug 6, p.163-71. 2004.

STANCANELLI, R., *et al.* Improvement of water solubility of non-competitive AMPA receptor antagonists by complexation with beta-cyclodextrin. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.16, n.18, Sep 15, p.8706-12. 2008.

STELLA, V. J., *et al.* Mechanisms of drug release from cyclodextrin complexes. **Advance Drug Delivery Reviews**, v.36, n.1, Mar 1, p.3-16. 1999.

SZEJTLI, L. Limits of cyclodextrins application in oral drug preparations. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v.2, p.487-501. 1984.

TALHARI, S. Hanseníase: situação atual. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.69, n.3, maio/jun, p.209-215. 1994.

TRAPANI, A., *et al.* Eudragit RS 100 microparticles containing 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and glutathione: Physicochemical characterization, drug release and transport studies. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.30, p.64-74. 2007.

UEKAMA, K., HIRAYAMA, F. e ARIMA, H. Pharmaceutical applications of Cyclodextrins and Their Derivatives. In: DODZIUK, H. (Ed.). Cyclodextrins and their Complexes. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006. Pharmaceutical applications of Cyclodextrins and Their Derivatives, p.381-422

VEIGA, F., *et al.* Inclusion complexation of tolbutamide with beta-cyclodextrin and hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. **International Journal of Pharmaceutics**, v.129, n.1-2, Mar 8, p.63-71. 1996.

VENKATESAN, K., *et al.* Pharmacokinetic Interactions between Clofazimine and Dapsone. **European Journal of Pharmacology**, v.183, n.6, Jul, p.2398-2398. 1990.

WHO. World Health Organization. **Leprosy Today**. Disponível em: <<http://www.who.int/lep/en/>> Acesso em: 27/09/2007.

YANG, T. T. e SWARBRICK, J. Sustained-Release Delivery Systems, I: Phase Diagram Studies of Dapsone and Selected Derivatives. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.75, n.1, p.53-56. 1985.

YU, L. X., *et al.* Transport approaches to the biopharmaceutical design of oral drug delivery systems: Prediction of intestinal absorption. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.19, n.3, Jun 12, p.359-376. 1996.

YUAN, C., JIN, Z. e LI, X. Evaluation of complex forming ability of hydroxypropyl- β -cyclodextrins. **Food Chemistry**, v.106, p.50-55. 2008.

ZHANG, M., *et al.* Preparation and spectral investigation of inclusion complex of caffeic acid with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.71, n.5, Jan, p.1891-1895. 2009.