



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

GUILHERME VASCONCELOS RAMOS

**AVALIAÇÃO DA INCORPORAÇÃO DO BORNEOL EM COMPLEXOS DE
INCLUSÃO COM A 2-HIDROXIPROPIL- β -CICLODEXTRINA (2HP- β -CD)**

JOÃO PESSOA

2020

GUILHERME VASCONCELOS RAMOS

**AVALIAÇÃO DA INCORPORAÇÃO DO BORNEOL EM COMPLEXOS DE
INCLUSÃO COM A 2-HIDROXIPROPIL- β -CICLODEXTRINA (2HP- β -CD)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Biotecnologia da Universidade Federal
da Paraíba, como requisito parcial para obtenção
do Grau de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Elisângela Afonso de
Moura Kretzschmar.

JOÃO PESSOA

2020

Catálogo na publicação
Divisão de Processos Técnicos

R175a Ramos, Guilherme Vasconcelos.
Avaliação da incorporação do borneol em complexos de inclusão com a 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina (2HP- β -CD) / Guilherme Vasconcelos Ramos. - João Pessoa, 2020.
47 f. : il.

Orientação: Elisângela Afonso de Moura Kretschmar.
Monografia (Graduação) – UFPB/CBIOTEC.

1. Biotecnologia. 2. Borneol. 3. Ciclodextrina. 4. Hidroxipropil. 5. 2HP-B-CD. 6. RMN. I. Kretschmar, Elisângela Afonso de Moura. II. Título.

UFPB/BC

CDU 60

Elaborado por Larissa Silva Oliveira de Mesquita - CRB-15/746



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA (UFPB)
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA (CBiotec)
CAMPUS I – JOÃO PESSOA/PB
Coordenação do Curso de Bacharelado em
Biotecnologia



João Pessoa, 23 de novembro de 2020.

ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos vinte e três dias do mês de novembro de 2020, às 10:00h, em sessão pública realizada de forma remota, na Plataforma Google Meet, em atendimento à Portaria N°232/GR/REITORIA/UFPB, de 16 de outubro de 2020 e a Resolução Consepe N° 19/2020, na presença da Banca Examinadora presidida pelo(a) Professor(a) Dr(a). Elisângela Afonso de M. Kretzschmar (DB/CBIOTEC/UFPB) e composta pelo(a)s avaliadore(a)s: 1. Prof(a). Dr(a). Luis Cezar Rodrigues (DB/CBIOTEC/UFPB); 2. Bela. Joyce Cordeiro Borges (PPGBCM/CCEN/UFPB), o(a) discente Guilherme Vasconcelos Ramos, matrícula 11507495, apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: “**Avaliação da Incorporação do Borneol em Complexos de Inclusão com a 2-Hidroxiopropil-b-ciclodextrina (HP-b-CD)**”, como requisito curricular indispensável para a integralização do Curso de Graduação em Biotecnologia. Após reunião em sessão reservada, a Banca Examinadora deliberou e decidiu pela **Aprovado** do referido trabalho, divulgando o resultado formalmente a(ao) discente e demais presentes e eu, Elisângela Afonso de M. Kretzschmar, na qualidade de Presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelo(a)s demais avaliadore(a)s e pelo(a) discente.

Elisângela A. de M. Kretzschmar

Presidente da Banca Examinadora

Avaliador(a) 1

Guilherme Vasconcelos Ramos

Discente

Joyce Cordeiro Borges

Avaliador(a) 2

Dedico este trabalho aos meus pais por todo amor, incentivo as minhas decisões e por todo apoio ao longo desses 26 anos de vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, por toda sua bondade e misericórdia, dando coragem e força para enfrentar os momentos difíceis desta jornada.

Aos meus pais, Jerusa e José Carlos, por todo seu amor e dedicação, pelas noites em claro que tiveram de ficar, por abandonar seus sonhos para tornar os meus realidade. Por tudo que investiram na minha educação e na minha vida, vocês foram peças essenciais para a realização desse trabalho.

A minha companheira de vida, Ive, por todo seu amor, incentivo, por estar sempre ao meu lado nos momentos bons e ruins e me entender tão bem.

A minha família por todo apoio e amor a distância, em especial ao meu padrinho José Benedito, as minhas tias Cleny, Vanessa e aos meus avós Jerosina e Clovis.

A professora Dra. Elisângela A. de Moura Kretzschmar (orientadora) por todos esses anos de trabalho em conjunto, por ter confiado a mim diversos projetos, de Extensão, Iniciação Científica, estágios e por este trabalho. Pelo incentivo, apoio e amizade oferecidos durante todos estes anos.

Aos professores e colegas do Centro de Biotecnologia que tive a oportunidade de dividir diversos momentos. Aos amigos que pude fazer durante a graduação, em especial a Mickael, Emmely, Clara, Amanda, Thaísy.

Aos amigos que me acompanham desde o ensino médio e tiveram a coragem de vir comigo para João Pessoa, Anderson, Rodrigo e Carlos, pelo apoio, amizade e convivência. E a Wendel, que não pôde vir, mas sempre esteve por perto.

Aos meus colegas do LANNI, por toda colaboração, parceria nos projetos e incentivo.
À Universidade Federal da Paraíba pelo apoio institucional.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

“... Deus nos concede, a cada dia, uma página de vida nova no livro do tempo. Aquilo que colocarmos nela, corre por nossa conta”. – Chico Xavier.

RESUMO

Cada vez mais novos fármacos com potencial terapêutico estão sendo descobertos, porém uma grande parte possui baixa solubilidade em água, o que dificulta a sua aplicação. O Borneol é um álcool monoterpreno bicíclico encontrado em óleos essenciais de várias plantas medicinais. Possui uma ampla utilização na área de alimentos, cosméticos e na farmacêutica, recentes estudos, constataam que o borneol possui atividades anti-inflamatórias, antioxidantes e ansiolíticas, o que é de grande interesse farmacológico, entretanto possui uma baixa solubilidade em fluídos biológicos. O objetivo deste estudo foi preparar e caracterizar o complexo de inclusão entre a 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina e o borneol. O complexo de inclusão foi preparado pelo método de liofilização, *freeze-drying*, e caracterizado através do estudo de solubilidade de fases e da técnica de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (^1H -RMN). As curvas de solubilidade determinadas para o borneol mostraram perfis do tipo A_L , a constante de associação (K_c) obtida foi de $112,21 \text{ M}^{-1}$. A formação do complexo de inclusão proporcionou um aumento de 11,5 vezes a solubilidade, passando de $8,7 \cdot 10^{-3} \text{ mM}$ para $110,1 \cdot 10^{-3} \text{ mM}$. A eficiência da complexação (CE) também foi estimada, o CE do sistema foi de 0,9762. Alterações sofridas na molécula 2HP- β -CD, observadas pelas análises de espectroscopia de ressonância magnética nuclear, evidenciam a complexação com o borneol e uma possível interação de forças de van der Waals, interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio.

Palavras-chave: borneol; ciclodextrina, hidroxipropil, 2HP- β -CD, RMN.

ABSTRACT

More and more new drugs with therapeutic potential are being discovered, but a large part has low solubility in water, which makes its application difficult. Borneol is a bicyclic monoterpene alcohol found in essential oils from various medicinal plants. It has a wide use in the area of food, cosmetics and pharmaceuticals, recent studies have found that borneol has anti-inflammatory, antioxidant and anxiolytic activities, which is of great pharmacological interest, however it has a low solubility in biological fluids. The aim of this study was to prepare and characterize the inclusion complex between 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and borneol. The inclusion complex was prepared by the freeze-drying method, and characterized by studying the phase solubility and the Nuclear Magnetic Resonance technique of ^1H ($^1\text{H-NMR}$). Solubility curves determined for borneol showed profiles of the type AL, the apparent stability constant (KC) obtained was 112,21 M^{-1} . The formation of the inclusion complex provided an increase of 11.5 times the solubility, from $8,7 \cdot 10^{-3}\text{mM}$ to $110,1 \cdot 10^{-3}\text{mM}$. The efficiency of complexation (EC) was also estimated, EC of the system was 0,9762. Changes in the 2HP- β -CD molecule observed by nuclear magnetic resonance spectroscopy analyses, show the complexation with borneol and a possible interaction of van der Waals forces, electrostatic interactions and hydrogen bonds.

Keywords: borneol, cyclodextrin, hydroxypropyl, 2HP- β -CD, NMR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -Estrutura plana do isopreno, estrutura básica para a formação da classe dos terpenos.	17
Figura 2 -Estrutura Molecular do Borneol	19
Figura 3 -Estrutura das ciclodextrinas (α , β e γ -CD) e conformações do anel de glicopiranosose	21
Figura 4 - Forma cone truncado da ciclodextrina.	22
Figura 5 -Estrutura química da β -Ciclodextrina.....	24
Figura 6 -Estrutura 2D da 2-hidroxi-propil- β -ciclodextrina.....	26
Figura 7 -Formação de um complexo de inclusão de ciclodextrina em solução aquosa.....	28
Figura 8 -Perfis de solubilidade segundo Higuchi e Connors.	31
Figura 9 -Ilustração do esquema de preparação o complexo de inclusão Borneol/ 2HP- β -CD.	34
Figura 10 - Estudo de Solubilidade de Fases: agitação no rocking mixer	34
Figura 11 - Curva de calibração	37
Figura 12 - Diagrama de solubilidade de fases do Borneol e da 2HP- β -CD.....	38
Figura 13 - Espectros de ^1H -RMN da 2HP- β CD e do complexo X2	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Propriedades das ciclodextrinas naturais.....	23
Tabela 2- Alguns produtos farmacêuticos comercializados que contêm ciclodextrinas	25
Tabela 3- Deslocamento químico do hidrogênio (ppm).....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CD	Ciclodextrina;
CDs	Ciclodextrinas;
α-CD	Alfa ciclodextrina
β-CD	Beta ciclodextrina
γ-CD	Gama ciclodextrina
HP-β-CD	Hidroxipropil- β -ciclodextrina;
2HP-β-CD	2-hidroxipropil- β -ciclodextrina
Complexo X2	Complexo de inclusão 2
CE	Eficiência de complexação
K_c	Constante de Estabilidade
RMN	Ressonância Magnética Nuclear;
¹H-RMN	Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H
S₀	Solubilidade intrínseca do borneol
D2O	Água Deuterium Oxide
NUCAL	Núcleo Multiusuário de Caracterização e Análise
LANNI	Laboratório de Nanociência e Nabitecnologia Industrial
Cbiotec	Centro de Biotecnologia
UFPB	Universidade Federal da Paraíba

LISTA DE SÍMBOLOS

nm	Nanômetros
mM	Milimolar
M⁻¹	Mol
°C	Graus celsius
C₁₀H₁₈O	Endo- (1R,S) -1,7,7-trimetilbicyclo [2.2.1] heptan-2-ol
g	Gramas
ml	Mililitros
%	Porcentagem
μg	Microgramas
δ	Deslocamento químico (ppm)
Δδ	Varição do deslocamento químico observado
R²	Coefficiente de determinação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	17
2.1 TERPENOS.....	17
2.2 BORNEOL.....	18
2.3 NANOTECNOLOGIA	20
2.4 CICLODEXTRINA	21
2.4.1 <i>β-Ciclodextrina</i>	24
2.4.2 <i>A 2-Hidroxiopropil-β-ciclodextrina (2HPβCD)</i>	26
2.5 COMPLEXO DE INCLUSÃO	27
2.5.1 <i>Métodos de obtenção de complexos de Inclusão</i>	28
2.5.2 <i>Caracterização dos complexos de inclusão</i>	30
2.5.2.1 Diagrama de solubilidade de fase.....	30
2.5.2.2 Ressonância magnética nuclear	31
3 OBJETIVO	32
3.1 OBJETIVO GERAL	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4 METODOLOGIA.....	33
4.1 SUBSTÂNCIA TESTE.....	33
4.2 CURVA DE CALIBRAÇÃO	33
4.3 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO BORNEOL/2-HP-B-CD	33
4.3.1 <i>Obtenção do Complexo de Inclusão BORNEOL/2-HP-β-CD</i>	33
4.3.2 <i>Estudo de Solubilidade de Fases</i>	34
4.3.3 <i>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</i>	35
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 OBTENÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO BORNEOL/2HP-B-CD.....	37
5.2 CURVA DE CALIBRAÇÃO	37
5.3 ESTUDO DE SOLUBILIDADE DE FASES	38
5.3 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).....	39
6 CONCLUSÃO.....	42
7 REFERENCIAS	43
GLOSSÁRIO	49

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da biotecnologia em paralelo com a tecnologia farmacêutica tem fornecido informações extremamente úteis para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas (FIGUEIRO, et., al, 2012). O Borneol (C₁₀H₁₈O), um álcool monoterpênóide bicíclico, tem sido amplamente utilizado nas indústrias de alimentos e medicamentos, especialmente na medicina popular da China e da Índia, é considerado um dos valiosos materiais médicos, especiarias aromáticas e material químico (SU et. al., 2012). Além disso, o borneol é um ingrediente de fragrância usado em cosméticos decorativos, fragrâncias finas, xampus, sabonetes, e outros produtos de higiene pessoal, bem como em produtos não-cosméticos, tais como produtos de limpeza e detergentes domésticos (AMEIDA et. al, 2013).

O Borneol está inserido em preparações farmacêuticas para tratar condições dolorosas e inflamatórias, (AMEIDA et. al, 2013) sendo alvo de diversas pesquisas na formulação de fármacos eficientes. Entretanto, devido a sua hidrofobicidade, a sua eficiência é um fator limitante. Fármacos que possuem pouca ou nenhuma solubilidade em água, apresentam problemas de biodisponibilidade, pois a dissolução é um fator de extrema importância para a absorção dos mesmos. A solubilidade de um fármaco e seu comportamento em água é uma importante característica, porque a água é o principal constituinte de toda matéria viva (MELO, et. al, 2007).

Estima-se que em torno de 40% das substâncias ativas recentemente descobertas apresentam baixa solubilidade em água, ou seja, concentrações menores do que 10 µM em solução (LACEDA; LIONZO, 2011). A biodisponibilidade de um fármaco pode ser influenciada por diversos fatores como o tamanho da partícula, solubilidade de saturação, velocidade de dissolução, área superficial, lipofilicidade, entre outros (JUNGHANNS; MULLER, 2008).

Uma abordagem alternativa para melhorar a hidrossolubilidade de drogas envolve o uso de ciclodextrina (CD), que pode formar inclusão solúvel em água complexa com moléculas hidrofóbicas (MCCORMACK; GREGORIADIS, 1997). Também conhecidas como cicloamiloses, ciclomaltoses ou dextrinas de Schardinger, as CDs foram descobertas por Villiers em 1891 (CARVALHO, 2014). Ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos possuindo seis, sete ou oito α (1–4) unidades de glicopiranosose ligadas designadas α, β, γ, respectivamente (figura 2) (MCCORMACK; GREGORIADIS, 1997).

As CDs são oligossacarídeos cíclicos formados por moléculas de D-glicose unidas por meio de ligações glicosídicas, obtidas a partir da degradação enzimática do amido (enzima ciclodextrina glicosiltransferase) de espécies como a mandioca, batata, milho, trigo, etc (CARVALHO, 2014). As CDs possuem uma forma de cone truncado com orientação espacial, no qual as hidroxilas são orientadas para o exterior do cone, e a cavidade central é revestida por carbonos esqueléticos e etéreo oxigênicos, que lhe conferem um caráter lipofílico (LOFTSSON; MASSON, 2001).

Apesar da importância da utilização das ciclodextrinas na área farmacêutica, é escasso o conhecimento das vantagens quanto à utilização destes complexos moleculares (BUDAL, 2013). A estrutura espacial cônica e a orientação dos grupos hidroxílicos para o exterior conferem a estes açúcares cíclicos propriedades físico-químicas únicas, sendo capazes de solubilizar-se em meio aquoso e ao mesmo tempo encapsular no interior da sua cavidade moléculas hidrofóbicas. (CUNHA-FILHO; SÁ-BARRETO, 2007). A habilidade das CDs de formarem complexos de inclusão depende essencialmente da compatibilidade estérica e dos critérios de polaridade existentes com a droga (CARVALHO, 2014).

O presente trabalho propõe avaliar o incremento da solubilidade do borneol complexado com a 2-Hidroxiopropil- β -ciclodextrina (2HP β CD), através do estudo de solubilidade de fases e da técnica de $^1\text{H-RMN}$.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

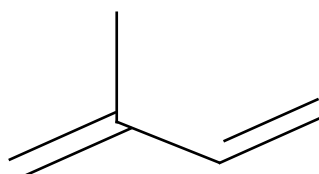
2.1 TERPENOS

A descoberta de novos fármacos de origem natural está sendo cada vez mais difundida e produzido em larga escala pelas indústrias farmacêuticas. Dentre os produtos naturais com atividades farmacológicas comprovada, destaca-se a classe dos terpenos.

Terpenos, também conhecidos como terpenóides ou isoprenóides, são componentes essenciais de todos os organismos vivos (LOHR et. Al, 2012). Os terpenos são um dos maiores grupos de compostos químicos e constituem mais de 50.000 estruturas naturais encontrados principalmente em óleos essenciais. O termo terpeno refere-se apenas aos hidrocarbonetos insaturados (alcenos), mas pode ocorrer a adição de um ou mais átomos de oxigênio na forma de grupo funcionais álcoois, aldeídos, cetonas e ácidos na molécula terpênica, preservando a sua estrutura isopropênica, e passando a se chamar terpenóide (SANTOS, 2014).

A classe dos terpenos é caracterizada pela combinação de unidades de isopreno (C_5H_8), sendo assim, os monoterpenos têm duas unidades de isopreno (C_{10}), os sesquiterpenos têm três (C_{15}) e os diterpenos têm quatro (C_{20}), etc. (SAPRA et al., 2008). Os terpenos também podem ser classificados como acíclicos, lineares, monocíclicos e bicíclicos (SAPRA; et. al 2008). Monoterpenos e sesquiterpenos são os principais componentes dos óleos essenciais, enquanto os outros terpenos são componentes de bálsamos, resinas, ceras e borrachas (BOHLMANN et al., 2014).

Figura 1-Estrutura plana do isopreno, estrutura básica para a formação da classe dos terpenos.



ISOPRENO

Fonte: (AUTOR, 2020)

Diversas propriedades biológicas para os terpenos são descritas na literatura, entre estas inúmeras se destacam a ação antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e antifúngica, sendo uma fonte valiosa na área da terapêutica, além disso possui aplicações na agropecuária e na indústria de alimentos. Por exemplo, os carotenoides têm muitas aplicações nas indústrias de alimentos (exemplo, β -caroteno), ração animal (astaxantina), e na área de cosméticos (os tocoferóis) (KIRBY; KEASLING, 2009).

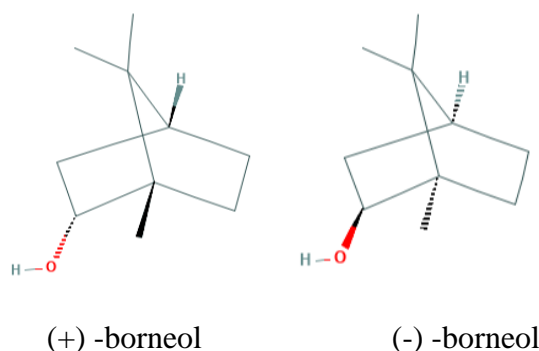
Em estudos *ex vivo* foi avaliada a atividade antioxidante, bem como as atividades anticâncer, anti-inflamatória e antibacteriana do óleo essencial de semente de *Nigella sativa* e seus terpenos, foi comprovado o potencial de alguns terpenos como princípios antioxidantes (timoquinona), anti-inflamatórios (carvacrol, p-cimeno, γ -terpineno, β -pineno e longifolene), anticâncer e antibacteriano (longifolene) com potencial para uso em produtos farmacêuticos (BOURGOU et al., 2009).

Em outro estudo foi demonstrado que os óleos essenciais de lavanda, cravo e eucalipto apresentaram propriedades antifúngicas contra fungos de origem vegetal, sendo o óleo de cravo o agente antifúngico mais eficaz e de amplo aspecto (SCHRODER et al., 2018).

2.2 BORNEOL

Borneol, 1,7,7-trimetilbicyclo [2.2.1] heptanol-2, um álcool monoterpênico bicíclico, tem sido usado em alimentos e também na medicina popular na China e na Índia há milhares de anos (CHEN et. al, 2011). Borneol (C₁₀H₁₈O), está presente nos óleos essenciais de numerosas plantas medicinais das famílias da Dipterocarpaceae (*Dipterocarpus turbinatus*), Lamiaceae (*Rosmarinus officinalis* e *Salvia officinalis*), Valerianaceae (*Valeriana officinalis*) e Asteraceae (*Matricaria chamomilla*), entre outras (HORVATHOVA et al., 2009).

De acordo com a Farmacopeia da República Popular da China (2005), o borneol é um ingrediente importante entre cerca de 63 produtos à base de plantas (CHEN et. al, 2011). Segundo o PubChem, 2020, o borneol é um sólido granuloso de cor branca, possuindo baixo peso molecular (154.25 g/mol) com densidade de 1.10 g/cm³ a 20°C e é ligeiramente solúvel em água.

Figura 2-Estrutura Molecular do Borneol

Fonte: (PubChem, 2020)

Existem dois tipos de fonte de borneol, o natural e o sintético. Uma forma natural de borneol é borneol dextrogiro (endo- (1R) -1,7,7-trimetilbicyclo [2.2.1] heptan-2-ol, (+) -borneol) que tradicionalmente se originou no sudeste da Ásia. Outra forma natural de borneol é o levogiro (endo- (1S) -1,7,7-trimetilbicyclo [2.2.1] heptan-2-ol, (-) – borneol) extraído de plantas da China (ZHANG et al., 2017). Já o borneol sintético, é uma mistura de (+) -borneol e isoborneol, em que o teor de (+) -borneol não deve ser inferior a 55,0% (CHEN et. al, 2011).

Na medicina oriental, o borneol é amplamente utilizado como anestésicos e analgésicos, usado no alívio de dores abdominais, reumáticas, queimaduras, entre outros. O borneol natural tem sido amplamente utilizado em aromaterapia e em produtos naturais e cosméticos devido à sua baixa toxicidade em comparação com o borneol sintético, cuja toxicidade é relativamente alta (ZHANG et al., 2017). Um estudo farmacológico investigou diversos terpenos, dentre eles o borneol, e comprovou os seus efeitos antimicrobiano em vários microrganismos Gram negativos Gr (-) e positivos Gr (+) e a sua atividade antifúngica (KNOBLOCH et al., 1998). Tabanca et al, 2001, relatou que os óleos essenciais contendo ambos os enantiômeros do borneol, se mostraram eficazes na inibição sobre o microrganismo patogênico Gr (-) e Gr (+), sendo o (-)-borneol possuiu mais atividade contra vários microrganismos.

A dose letal mediana (DL50) é a dose de um agente tóxico suficiente para matar 50% de uma população de animais. DL50 oral de borneol é em torno de 300-5800 mg / kg em roedores (ZHANG et al., 2017). O borneol (25 e 50 mg / kg) mostrou efeitos analgésicos e anti-inflamatório em ratos, medindo a algisia por ácido acético, placa quente e testes de força de preensão e a inflamação induzida por carragenina (ALMEIDA et al., 2013).

Diversos estudos tem apresentado a viabilidade farmacológica e toxicológica do borneol frente a uma infinidade de patologias. Entretanto, devido a sua baixa solubilidade em água a

sua eficiência é um fator limitante. Fármacos que possuem pouca ou nenhuma solubilidade em água, apresentam problemas de biodisponibilidade.

2.3 NANOTECNOLOGIA

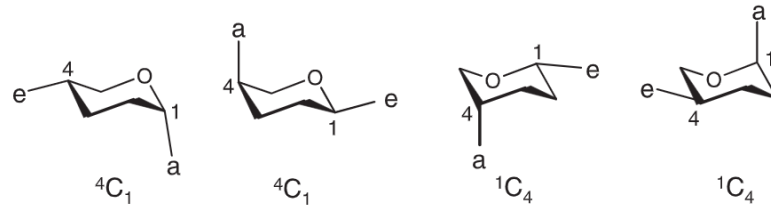
A Nanotecnologia é a engenharia e fabricação de materiais em escala atômica e molecular. Em sua definição, nanotecnologia se refere a estruturas aproximadamente no regime de tamanho de 1 a 100 nm em pelo menos uma dimensão (FAROKHZAD; LANGER. 2009). O conceito geral de nanotecnologia foi introduzido pela primeira vez em 1959, pelo físico Richard Feynman em uma palestra, na qual foi sugerida a manipulação de objetos em dimensões atômicas (APOLINARIO et al., 2020). Décadas depois, a aplicação da nanotecnologia na área médica mudou o cenário da indústria farmacêutica dando uma nova perspectiva para o futuro dos fármacos.

O potencial de aplicação da nanotecnologia é vasto, incluindo administração de drogas, diagnóstico por imagem, diagnósticos clínicos, nanomedicina e o uso de nanomateriais em dispositivos médicos (HOBSON, 2009). Os sistemas nanoestruturados mais utilizados na área da terapêutica podem ser classificados em nanopartículas lipídicas sólidas, nanocápsulas, nanoesferas, nano e microemulsões, lipossomas e ciclodextrinas, esta última será explicado com mais detalhes na próxima seção.

Com a utilização de nanoestruturas é possível conseguir (1) uma melhor distribuição de drogas pouco solúveis em água; (2) distribuição direcionada de drogas de uma maneira específica para células ou tecidos; (3) entrega de macromoléculas para locais de ação intracelulares (FAROKHZAD; LANGER. 2009) entre outros. As nanoestruturas permitem a entrega não apenas de drogas pequenas, mas também de ácidos nucleicos e proteínas. A entrega dessas moléculas a áreas específicas do corpo pode ser alcançada, o que reduzirá os efeitos colaterais sistêmicos e permitirá o uso mais eficiente da droga (HUGHES, 2004).

As características anatômicas, como a barreira hematoencefálica, as vias de ramificação do sistema pulmonar e as estreitas junções epiteliais da pele tornam difícil para os medicamentos atingirem muitos alvos fisiológicos desejados (HUGHES, 2004). A presença de ligantes de direcionamento em sistemas nanoestruturados pode aumentar a interação do sistema de distribuição de drogas com um subconjunto de células no tecido-alvo, o que pode potencialmente aumentar a captação celular (FAROKHZAD; LANGER. 2009). Essas e outras

b)

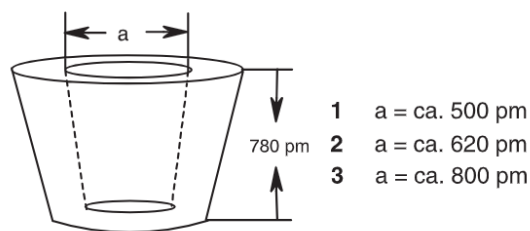


Fonte: (DODZIUK, 2006)

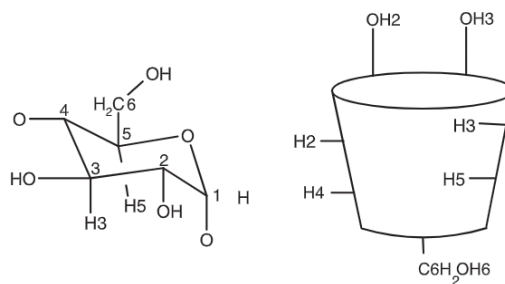
Devido à formação de cadeira das unidades de D-glicopiranosose, as moléculas de ciclodextrina têm a forma de um cone truncado em vez de um cilindro perfeito (LOFTSSON; MANSSON, 2001), a maioria das conformações das unidades de glicopiranosose é 4C_1 (fig.3b). Os grupos hidroxilas secundários OH(2) e OH(3) estão em posição equatorial, porém com o OH(2) apontando para o interior e o OH(3) para o exterior da cavidade, bem como a hidroxila primária OH(6) (BUDAL, 2003). A cavidade interna é revestida por prótons H3 e H5 e pares solitários de átomos de oxigênio glicosídicos, conferindo assim à cavidade um caráter hidrofóbico, enquanto as bases formadas pelos grupos OH primários e secundários conferem um caráter hidrofílico (fig. 4) (DODZIUK, 2006).

Figura 4- Forma cone truncado da ciclodextrina.

a)



b)



(a) vista esquemática do anel de D- glicopirranose com numeração de átomos e tamanhos das CDs; (b) a orientação média dos átomos e grupos OH mais importantes

Fonte: (DODZIUK, 2006)

Esta conformação permite a inclusão de moléculas polares ou partes de moléculas dentro da cavidade da CD, conferindo novas características físico-químicas entre as quais a solubilidade em água aparente da molécula hospede é aumentada (DUCHENE; BOCHOT, 2016). Por possuir essas vantagens, as CDs possuem uma diversificada aplicação. Na área de alimentos por exemplo, são utilizadas para reduzir odores, sabores desagradáveis e toxicidade. Na indústria cosmética, para obter ação prolongada, diminuir a irritação local e reduzir odores desagradáveis (LOFTSSON; DUCHENE, 2007). Já na indústria farmacêutica as ciclodextrinas são mais utilizadas para aumentar a biodisponibilidade de fármacos, diminuição de toxicidade, proteção contra luz, calor, oxidação e aumento do tempo de vida útil.

A aplicação de CD não apenas melhorar as propriedades de um produto comercializado, mas, em consonância com as tendências modernas, também têm como objetivo a criação de novas necessidades, produzindo novos tipos de produtos com propriedades inéditas (DODZIUK, 2006). Cada estrutura de ciclodextrina possui diferentes propriedades, como solubilidade em água, tamanho de cavidade (tabela 1) entre outros.

Tabela 1- Propriedades das ciclodextrinas naturais

	α -CD	β -CD	γ -CD
Número de unidades de glicose	6	7	8
Peso Molecular (g/mol)	972	1134	1296
Diâmetro aproximado da cavidade interna (pm)	500	620	800
Diâmetro externo aproximado (pm)	1460	1540	1750
Volume aproximado da cavidade (10^6pm^3)	174	262	427
Solubilidade em água (g/100ml)	14,5	1,85	23,2
Molécula de água na cavidade	6	11	17

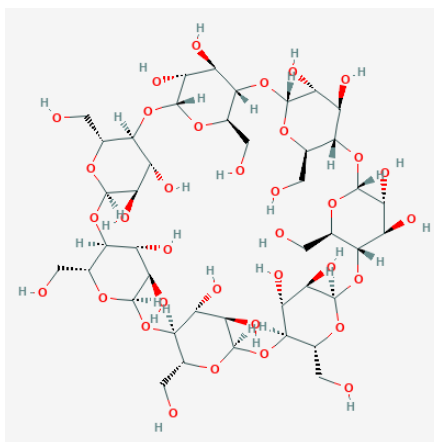
Fonte: Tabela modificada com base em (DODZIUK, 2006)

2.4.1 β -Ciclodextrina

A β -ciclodextrina é um carboidrato cíclico composto por sete unidades de D-glicopirranose, sendo produzido a partir de amido parcialmente hidrolisado através de um processo enzimático, é a CD mais utilizada na indústria farmacêutica, devido à relativa facilidade de síntese, baixo preço e também ao tamanho de sua cavidade interna, na qual é possível hospedar moléculas de diversos tamanhos. (VALENTE; SODERMAN, 2013).

TOYODA, et. al., estudaram a toxicidade da β -Ciclodextrina em ratos F344 mostrando que há baixo potencial carcinogênico. O estudo foi realizado aplicando-se doses de β -CD, de 2016 mg /kg /dia para machos e 2344 mg/ kg/dia para fêmeas, isso equivale a 340-400 vezes maior que a ingestão humana diária. A β -CD não apresentou potencial carcinogênico em ratos F344 mesmo administrada continuamente em altas doses na dieta por 104 semanas.

Figura 5-Estrutura química da β -Ciclodextrina.



Fonte: (PubChem, 2020)

Na área farmacêutica, é utilizado na formulação de medicamentos de aplicação oral e tópica para aumentar a solubilidade em água e melhorar a estabilidade física e química, além de reduzir a incidência de efeitos colaterais (TOYODA, et al., 1997). O primeiro produto farmacêutico a conter uma ciclodextrina foi derivado da β -CD, comercializado no Japão em 1976 na forma de um comprimido sublingual de prostaglandina E2, com nome comercial Prostarmon E (tabela 2) (LOFTSSON; BREWSTER, 2010).

Tabela 2- Alguns produtos farmacêuticos comercializados que contêm ciclodextrinas

Fármaco/Ciclodextrina	Nome comercial	Administração	Empresa (país)
<i>α-Cyclodextrin (αCD)</i>			
Alprostadil	Caverject Dual	Solução intravenosa	Pfizer (Europa)
Limaprost	Opalmon	Comprimido	Ono (Japão)
Cefotiam-hexetil HCl	Pansporin T	Comprimido	Takeda (Japão)
<i>β-Ciclodextrina (βCD)</i>			
Benexate HCl	Ulgut, Lonmiel	Cápsula	Teikoku, Shionogi (Japão);
PGE2	Prostarmon E	Comprimido	Ono (Japão)
Piroxicam	Brexin, Flogene, Cicladon	Comprimido, supositório	Chiesi (Europa); Aché (Brasil)
<i>2-Hidroxiopropil-β-ciclodextrina (2HPβCD)</i>			
Cisapride	Propulsid	Supositório	Janssen (Europa)
Mitomycin	Mitozytrex	Solução intravenosa	
Indometacin	Indocid	Solução de Colírio	Chauvin (Europa)

Fonte: Tabela modificada baseada em (LOFTSSON e BREWSTER, 2010)

Mesmo com todas essas particularidades a β -CD possui um fator limitante, baixa solubilidade em água, as CDs quando complexadas com o substrato tem a capacidade de modificar as propriedades espectrais tornando-o hidrofílico. Essa baixa solubilidade da β -CD (1,85g/100ml a 25°C) se deve à ligação relativamente forte das moléculas de CD no estado cristalino (isto é, energia de rede cristalina relativamente elevada) (LOFTSSON; BREWSTER, 2010). O grupo OH(C2) de uma unidade de glicopiranosose pode formar pontes de hidrogênio com o -OH(C3) da unidade adjacente. No caso da β -ciclodextrina, estas ligações formam um cinturão secundário completo, o que lhe confere uma estrutura bastante rígida (BUDAL, 2003). Essa estruturação é a possível explicação para a menor solubilidade da β -CD.

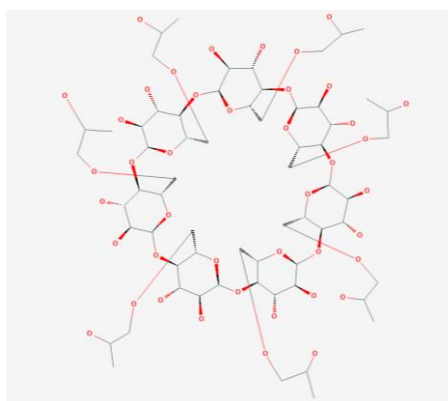
A substituição aleatória dos grupos hidroxí, mesmo por frações hidrofóbicas como funções metoxi, resultará em melhorias em sua solubilidade (LOFTSSON; BREWSTER, 2010). Para aumentar a solubilidade e explorar melhor o seu potencial, é utilizado derivados de β -ciclodextrina na área farmacêutica, um exemplo é a 2-Hidroxiopropil- β -ciclodextrina.

2.4.2 A 2-Hidroxipropil- β -ciclodextrina (2HP β CD)

As principais razões para a modificação química das CD naturais são as alterações de propriedades físico-químicas indesejáveis e a redução da toxicidade para estender suas aplicações farmacêuticas. E isso é de particular importância para as β -ciclodextrinas (ALBERS; MULLER, 1995). As hidroxipropil ciclodextrinas são altamente solúveis em água, não apenas devido à sua natureza química, mas também devido à sua estrutura amorfa. Sua dissolução é endotérmica, então não há diminuição da solubilidade com o aumento da temperatura (DUCHENE; WOUESSIDJEW, 1990).

A 2-hidroxilpropil- β -ciclodextrina é um dos derivados para a β -ciclodextrina, com melhor solubilidade em água e com menor toxicidade (GOULD; SCOTT, 2005). O principal interesse das hidroxipropil ciclodextrinas está na administração parenteral, pois apresentam menor atividade hemolítica do que as ciclodextrinas naturais (DUCHENE; WOUESSIDJEW, 1990). A biodisponibilidade oral do 2HP β CD em humanos está entre 0,5 e 3,3% com 50–65% da dose oral excretada intacta nas fezes e o restante sendo metabolizado principalmente por bactérias no cólon (LOFTSSON; BREWSTER, 2010).

Figura 6-Estrutura 2D da 2-hidroxilpropil- β -ciclodextrina



Fonte: (PubChem, 2020)

Estudos de (GOULD; SCOTT, 2005), analisaram a toxicidade do 2HP β CD usando informações da literatura, e como resultados a 2HP β CD é bem tolerado na maioria das espécies estudadas (ratos, macacos e cães), particularmente se administrado oralmente e apresenta

toxicidade limitada, dependendo da dosagem e da via de administração. O 2HP β CD também é tolerado em humanos, apresentando como principal efeito adverso a diarreia. A 2HP β CD tem um pequeno volume de distribuição e uma meia-vida curta ($t_{1/2} \approx 1,7$ h), sendo excretado principalmente na forma inalterada na urina após administração parenteral em humanos (LOFTSSON; BREWSTER, 2010).

2.5 COMPLEXO DE INCLUSÃO

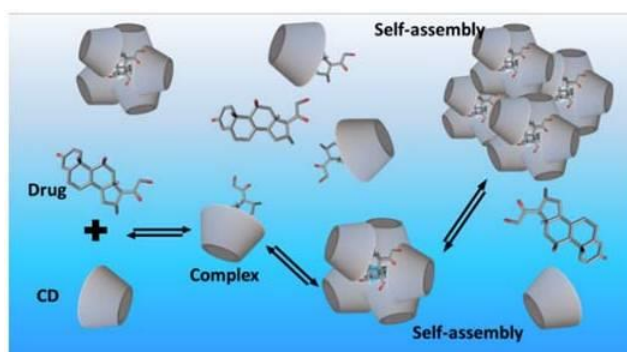
As ciclodextrinas podem formar um complexo de inclusão com moléculas de drogas lipofílicas incorporando a droga na cavidade lipofílica interior, formando ligações não covalentes, como interações de Van der Waals, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas (CHAUDHARI, et. al., 2019). A formação do complexo de inclusão é o principal mecanismo dos efeitos solubilizantes e estabilizadores das CDs (SAOKHAM; LOFTSSON, 2016). A complexação de moléculas de ciclodextrinas ocorre, com algumas exceções, por meio de uma interação não covalente entre o fármaco (hospede) e a cavidade da CD (hospedeiro). Este é um processo dinâmico, pelo qual a molécula hospede continuamente se associa e se dissocia (STELLA, et. al., 1999).

A formação de um complexo de inclusão de CD/fármaco pode aumentar a solubilidade aquosa do fármaco, aumentar a sua estabilidade química e física e melhorar a distribuição do fármaco através de membranas biológicas (SAOKHAM, et. al., 2018). A capacidade de uma molécula hóspede de entrar na cavidade da CD depende das dimensões da cavidade, das forças de ligação envolvidas e da composição do meio aquoso de complexação (SAOKHAM; LOFTSSON, 2016). Já em relação a liberação do fármaco a partir de complexos de CD, possui a cinética do mecanismo proposto da seguinte maneira, (1) a ligação droga-proteína; (2) partição direta do fármaco e (3) ligação competitiva que contribui para a liberação rápida do fármaco dos complexos (CHAUDHARI, et. al., 2019).

Uma ou mais moléculas de droga podem formar um complexo com uma molécula de CD e uma ou mais moléculas de CD podem formar um complexo com uma molécula de droga. No entanto, mais comumente, uma molécula de fármaco forma um complexo com uma molécula de CD (SAOKHAM, et. al., 2018). A molécula hóspede vai estar localizada, inteira ou parcialmente, dentro da cavidade da ciclodextrina, estando o complexo solvatado ou rodeado por moléculas do solvente, geralmente a água (BUDAL, 2003). A maioria dos esquemas de

complexação retrata o complexo como uma entidade única, só que o complexo é mais realisticamente composto por uma família de CD (fig.7) (STELLA, et. al., 1999). No estado cristalino, a molécula hóspede pode estar localizada, não somente dentro da cavidade da ciclodextrina, mas também nos espaços intersticiais formados pela rede cristalina do complexo (BUDAL, 2003).

Figura 7-Formação de um complexo de inclusão de ciclodextrina em solução aquosa



Fonte: (SAOKHAM, et al., 2018)

As ciclodextrinas formam complexos de inclusão com substâncias que possuem tamanho, polaridade e forma geométrica compatíveis com a dimensão de sua cavidade (BUDAL, 2003). Para moléculas pequenas é mais fácil formar complexos com α e β -CD devido à compatibilidade do volume do substrato e da CD. Já no caso da γ -CD, se o substrato for muito pequeno o encaixe torna-se desfavorável devido ao tamanho muito maior da cavidade desta CD (VENTURINI, et. al., 2008). A formação de complexos com moléculas maiores leva a uma formação estequiométrica diferente do habitual, 1:1, ciclodextrina/fármaco respectivamente.

2.5.1 Métodos de obtenção de complexos de Inclusão

Para a grande maioria dos substratos, as técnicas de complexação utilizada são procedimentos simples e a escolha do método experimental, depende fundamentalmente das

características do substrato que se está trabalhando e, se é preparado em escala laboratorial ou industrial (BUDAL, 2003).

Os métodos mais utilizados na preparação dos complexos de inclusão são descritos a seguir baseados em (BUDAL, 2003; CUNHA-FILHO; SA-BARRETO, 2007; SHIMPI, et. al., 2005). O método escolhido para nossa pesquisa foi a Liofilização, visto que após o processo as estruturas do complexo permanecem inalterada.

Complexo em solução aquosa: Um procedimento rápido e simples de se obter, é feito através da dissolução da molécula hóspede e a ciclodextrina em um solvente comum, água ou solução tampão (a adição de um cosolvente, em muitos casos, diminui a capacidade de encapsulação do fármaco devido a competição pela cavidade hidrofóbica da CD), permanecendo a temperatura constante, sob agitação em um intervalo de tempo entre 24 á 48 horas.

Complexo em estado sólido: Nesse processo, a quantidade de água, grau e tempo de mistura, temperatura e tempo de aquecimento são necessários para uma melhor otimização do processo. A presença da água nesse processo solubiliza os componentes e favorece uma melhor interação hidrofóbica entre a molécula hóspede e a CD. Não existe técnica geral para esse tipo de procedimento, pois as condições são influenciadas e definidas pelo tipo da molécula hospede.

Mistura física: Baseado na simples mistura dos componentes sem adição de água ou soluções tampões. Possui baixa eficiência e em muitos casos são necessários vários dias para detectar-se a formação de complexos de inclusão.

Malaxagem: Uma pequena quantidade de água é adicionada a mistura em pó do fármaco/CD suficiente para umedecer, formando uma pasta, a mistura pode ocorrer de duas formas, em escala laboratorial a mistura é feita por almofariz e pilão. Já em escala industrial, a mistura ocorre por um equipamento chamado malaxadora. O complexo resultante é seco em uma estufa ou na própria malaxadora.

Coprecipitação: A molécula hospede é adicionada em excesso a uma solução saturada de ciclodextrina, através de mudanças bruscas de temperatura, levando à formação do complexo de inclusão, em muitos casos utiliza-se agitação. Este método é bastante utilizado em escala laboratorial, mas possui a desvantagem no aumento de escala, o que torna menos atrativo em escala industrial.

Liofilização: Esse método consiste na extração de solvente dos sistemas em solução, através de um prévio congelamento em nitrogênio e posterior secagem a pressões reduzidas. As condições de congelamento as quais o complexo é induzido é um fator determinante na formação do produto final. Se aplicado um rápido congelamento, pode favorecer a formação de produtos amorfos, enquanto que um congelamento mais lento leva a produtos cristalinos.

2.5.2 Caracterização dos complexos de inclusão

Após a obtenção do complexo de inclusão não é certo que o produto final, o pó cristalino, seja o complexo de interesse. Muitos compostos não podem ser complexados, outros formam complexos de inclusão em solução, mas não no estado sólido. O produto sólido final pode ser uma mistura de hóspede e hospedeiro, hóspede não complexado e ciclodextrina hidratada (BUDAL, 2003).

As propriedades físico-químicas do fármaco e da CD livre são relativamente diferentes das que possuem esses compostos quando estão complexados. Partindo deste conceito, qualquer metodologia que tenha sensibilidade de medir essas diferenças pode ser utilizada (CUNHA-FILHO; SA-BARRETO, 2007). Diversas metodologias têm sido empregadas para caracterizar a formação do complexo, desde estudos de solubilidade de fases à espectroscopia de fluorescência e a ressonância magnética nuclear.

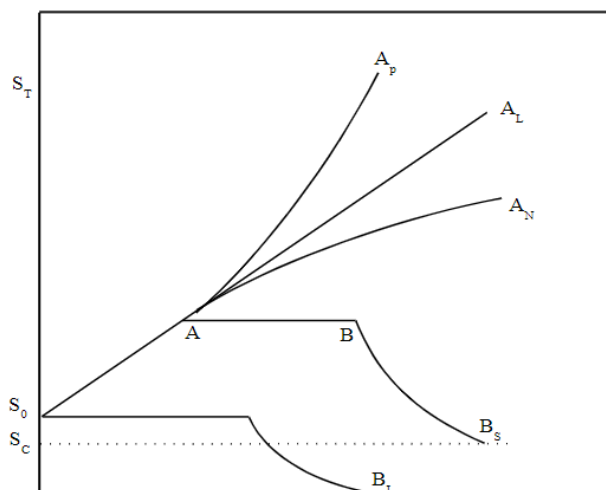
2.5.2.1 Diagrama de solubilidade de fase

O diagrama de solubilidade de fase é o método mais comumente usados para avaliar o efeito da ciclodextrina na solubilidade aquosa de uma droga (ELEAMEN, et al., 2017). Em 1965 foi proposto por Higuchi e Connors uma teoria que se baseia na determinação das mudanças que ocorrem na solubilidade do substrato quando na presença de diferentes concentrações de ciclodextrina. Mediante este procedimento, é possível determinar a formação do complexo de inclusão, tipo de complexo e calcular sua constante (BUDAL, 2003).

De acordo com o complexo de inclusão formado, a solubilidade pode apresentar diversos tipos de isotermas (fig. 8), uma vez que pode haver um aumento ou diminuição na solubilidade (CARVALHO, 2014). Quando a solubilidade do substrato aumenta linearmente com o acréscimo de ciclodextrina, temos uma curva de perfil tipo **A** (suas isotermas A_L , A_P , A_N), ao final do perfil a solubilidade do complexo alcança o seu limite. Uma vez que todo o substrato sólido foi consumido, com a adição de maior quantidade de ciclodextrina, ocorre diminuição da concentração do substrato não complexado em solução, por formação do

complexo e precipitação concomitante de complexo insolúvel (BUDAL, 2003), apresentando um comportamento de perfil tipo **B** (suas isotermas B_s , B_i).

Figura 8-Perfis de solubilidade segundo Higuchi e Connors.



A solubilidade da molécula hóspede (substrato) se apresenta no eixo vertical, enquanto a concentração da molécula hospedeira (ciclodextrina), se apresenta no eixo horizontal. S_T é o soluto dissolvido (livre + complexado); S_0 é a solubilidade do soluto na ausência de CD; S_c é a solubilidade limite do complexo pouco solúvel.

Fonte: (CARVALHO, 2014)

2.5.2.2 Ressonância magnética nuclear

A espectroscopia de RMN é atualmente o método mais importante para a elucidação de estruturas orgânicas e é extensivamente empregado na maioria dos estudos envolvendo CDs e seus complexos de inclusão (CARVALHO, 2014). Informações importantes relacionadas à inclusão de um composto na cavidade da ciclodextrina podem ser obtidas a partir de espectros de RMN, por variações dos deslocamentos químicos (LIMA, 2010). A maioria das investigações por RMN normalmente começam com a análise do espectro de prótons da amostra de interesse, com a análise habitual dos deslocamentos químicos, as constantes de acoplamento e as intensidades relativas dos sinais (CARVALHO, 2014).

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Incorporar o borneol em complexos de inclusão borneol-2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Preparar complexos de inclusão borneol-2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina
- II. Realizar estudo de solubilidade de fases do borneol em ciclodextrinas;
- III. Caracterizar os complexos de inclusão borneol-2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina:
 - a. Curva de Calibração
 - b. Diagrama de solubilidade de fases
 - c. ^1H -RMN

4 METODOLOGIA

4.1 SUBSTÂNCIA TESTE

O - (-) borneol foi cedido pelo Laboratório de Controle Neural da Circulação e Hipertensão Arterial da Prof^a. Dr^a. Maria do Socorro de França Falcão, pertencente ao Departamento de Biologia Molecular, do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba. Ciclodextrina foi adquirida pela Sigma-Aldrich® (Brasil).

4.2 CURVA DE CALIBRAÇÃO

A avaliação da curva de calibração foi realizada na faixa de 2 a 10 mg/ml (borneol/água), de uma solução mãe preparada de 10mg Borneol diluída em 10ml de água. Em seguida a absorbância foi analisada em um espectrofotômetro, no comprimento de onda de 222nm.

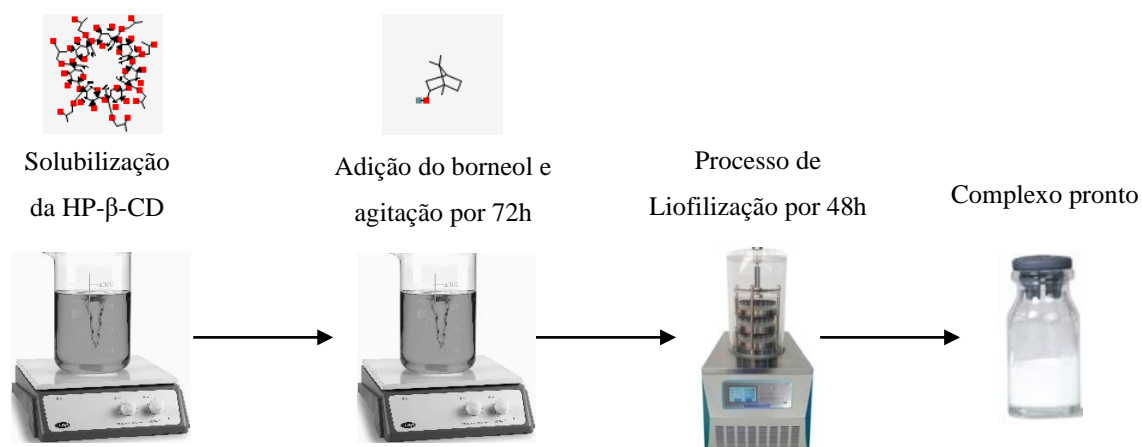
4.3 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO BORNEOL/2-HP-B-CD

4.3.1 Obtenção do Complexo de Inclusão BORNEOL/2-HP- β -CD

Os complexos foram preparados pelo método de liofilização, que consiste na remoção de solvente dos sistemas em solução, através de um congelamento em nitrogênio e posterior secagem a pressões reduzidas (passando pelo processo de sublimação, retirando toda a água e mantendo a estrutura física do produto). A Hidroxipropil - β -Ciclodextrina foi solubilizada em água destilada com posterior adição da molécula de borneol. As amostras foram deixadas sob agitação, no agitador magnético, durante 72 horas a temperatura ambiente. Após completa

agitação, a solução final foi armazenada no freezer, a -80°C , e posteriormente liofilizada durante 48 horas.

Figura 9- Ilustração do esquema de preparação o complexo de inclusão Borneol/ 2HP- β -CD.



Fonte: Adaptado de (ARRUDA, 2017)

4.3.2 Estudo de Solubilidade de Fases

Os estudos de solubilidade de fases foram realizados de acordo com os métodos descritos na literatura por Higuchi e Connors. Adicionou-se excesso de borneol a uma sequência de eppendorf e acrescentou-se concentrações crescentes de 2HP- β -CD. As amostras foram submetidas a agitação no rocking mixer por 72h a temperatura ambiente. Alíquotas das amostras foram retiradas e a determinação da quantidade de borneol foi realizada em espectrofotômetro no mesmo comprimento de onda na qual foi obtida a curva de calibração.

Figura 10- Estudo de Solubilidade de Fases: agitação no rocking mixer



Fonte: (AUTOR, 2020)

De acordo com Brewster e Loftsson (2007), com base na forma das relações de solubilidade de fases geradas no complexo formado, diversos comportamentos podem ser identificados conforme o aumento ou diminuição na solubilidade, podendo o diagrama de solubilidade ser enquadrado em dois tipos, A e B (fig. 8). A partir dos dados obtidos, a constante de estabilidade (K_c) do fármaco em ciclodextrina foi calculada, conforme a Equação 1, e suas isotermas obtidas:

(Equação 1)

$$K_{1:1} = \frac{Slope}{S_0 (1 - Slope)}$$

Onde S_0 corresponde a solubilidade intrínseca do borneol

Também foi possível obter a eficiência de complexação (CE) do complexo, conforme a Equação 2:

$$CE = \frac{Slope}{1 - Slope}$$

4.3.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Amostras do borneol, ciclodextrina, complexo e mistura borneol/2HP- β -CD foram solubilizadas em tubos de RMN de 5 mm em água deuterada (D_2O). As soluções foram caracterizadas utilizando o equipamento espectrômetro Bruker DRX-200 do Núcleo

Multiusuário de Caracterização e Análises (NUCAL) da UFPB, para a aquisição de espectros em 1D e 2D, para atribuição dos hidrogênios pertencentes a cada molécula.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

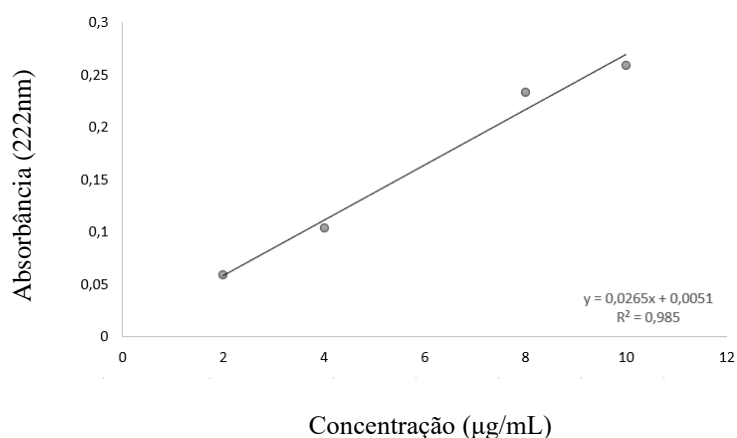
5.1 OBTENÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO BORNEOL/2HP-B-CD

O complexo de inclusão borneol/2-Hidroxipropil- β -CD preparado pelo método de liofilização obtiveram um rendimento médio de 93,5%. O resultado está em concordância aos achados na literatura, SU et al., 2012 encontrou valores similares ao nosso, com um rendimento total de 89,18%.

5.2 CURVA DE CALIBRAÇÃO

A partir de uma solução mãe Borneol/água (10mg/ml), foram feitas diluições, a fim de encontrar o perfil da curva de calibração do fármaco. Baseando-se na concentração do fármaco na solução e a absorbância no espectrofotômetro no comprimento de onda de 222nm, com os valores de absorbância versus concentração do borneol, obtém-se a seguinte curva de calibração, sendo a absorbância (y) $0,0265x + 0,0051$ e o coeficiente de correlação (R^2) 0,985.

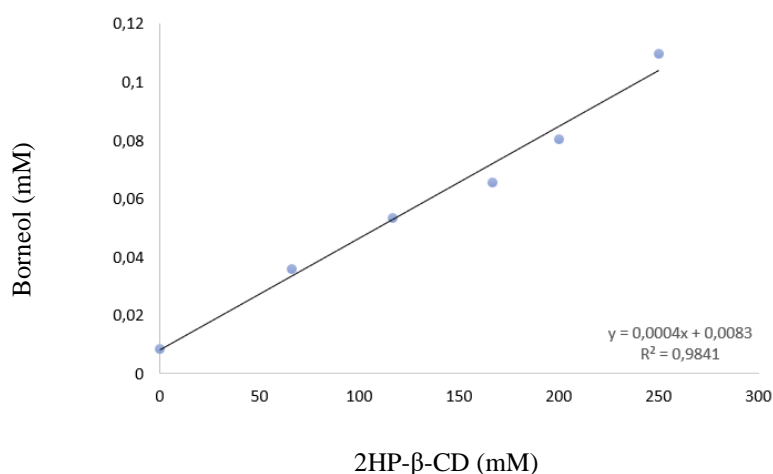
Figura 11- Curva de calibração



5.3 ESTUDO DE SOLUBILIDADE DE FASES

A Figura 12 mostra o diagrama de solubilidade de fases para o borneol em presença da 2HP- β -CD. Pode-se observar que conforme a concentração de 2HP- β -CD aumenta, a concentração de do borneol na água também aumenta, evidenciando uma curva do tipo A_L , sendo, portanto, um complexo solúvel em água. Isso indica a formação de 1:1, ou seja, de primeira ordem em relação estequiométrica do Borneol e da 2HP- β -CD, no qual indica um aumento linear da solubilidade do borneol relacionada com as concentrações crescentes da 2HP- β -CD.

Figura 12- Diagrama de solubilidade de fases do Borneol e da 2HP- β -CD.



Com base nos resultados foi calculada a constante de estabilidade (K_c). Os valores K_c são bons indicadores para estimar a força de ligação entre o ligante e o hospedeiro (ELEAMEN, et. al. 2017). A constante de estabilidade foi calculada pela Equação (1). O Complexo de Inclusão formado entre o borneol e a 2HP- β -CD apresentou um valor do $K_{1:1}$ de $112,21 \text{ M}^{-1}$. Segundo (Eleamen et al, 2017), um baixo valor da K_c indica uma interação fraca de ligante livre, enquanto o valor K_c grande indica a formação de um complexo estável, esse valor corrobora com os valores encontrados na literatura, SU et al., 2012, demonstraram valores similares ao nosso no qual a constante de estabilidade $K_{1:1}$ foi obtida em $136,58 \text{ M}^{-1}$. A equação da reta possibilitou calcular e confirmar o acréscimo da solubilidade do borneol mediante a formação de complexo com a 2HP- β -CD, apresentando um aumento de 11,5 vezes, passando de $8,7 \cdot 10^{-3} \text{ mM}$ para $110,1 \cdot 10^{-3} \text{ mM}$.

A eficiência da complexação (CE) também foi estimada a partir da linha da reta obtida no diagrama de solubilidade de fase, o CE do sistema foi de 0,9762. A eficiência de complexação refere-se à capacidade das CDs formarem complexos de inclusão com as moléculas hóspedes apropriadas. Quanto maior a eficiência de complexação, menor a quantidade de CD necessária para solubilizar o fármaco (KUBOTA, 2010). O CE de um fármaco lipofílico fracamente solúvel pode variar de zero, quando não se observa complexação, ao infinito, quando cada molécula de ciclodextrina presente em solução forma um complexo com o fármaco (LOFTSSON; BREWSTER, 2012). Os resultados referentes ao diagrama de solubilidade em fases demonstraram que ocorreu a formação do complexo de inclusão entre Borneol e 2HP- β -CD, apresentando ótimos valores de Kc e CE.

5.3 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

Afim de monitorar se algum próton do borneol está dentro da ciclodextrina, as mudanças de deslocamentos químicos foram avaliadas através da comparação entre os espectros da 2HPBCD e complexo de inclusão 2 (X2). A tabela 3 contém os desvios de hidrogênios para 2HP- β -CD e o complexo formado. Para o hospedeiro, deslocamentos são notados para H₂, H₃ e H₅ enquanto H₁, H₄ e H₆ não há mudanças significativas.

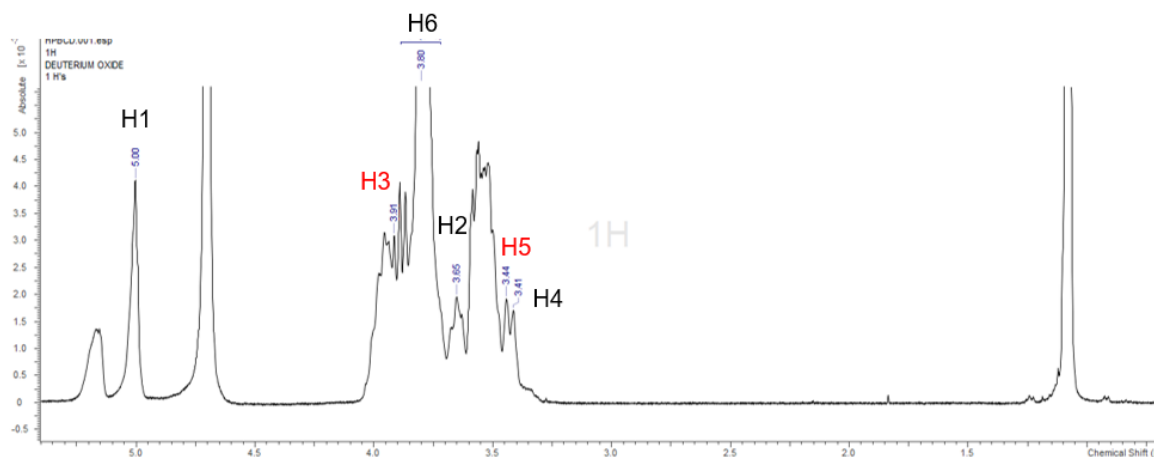
Tabela 3- Deslocamento químico do hidrogênio (ppm).

	2HP-βCD	Complexo X2	
	δ /ppm	δ /ppm	$\Delta\delta$ /ppm
H1	5,00	5,00	*
H2	3,65	3,71	0,06
H3	3,91	3,98	0,07
H4	3,41	*	*
H5	3,44	3,55	0,11
H6	3,80	3,81	0,01

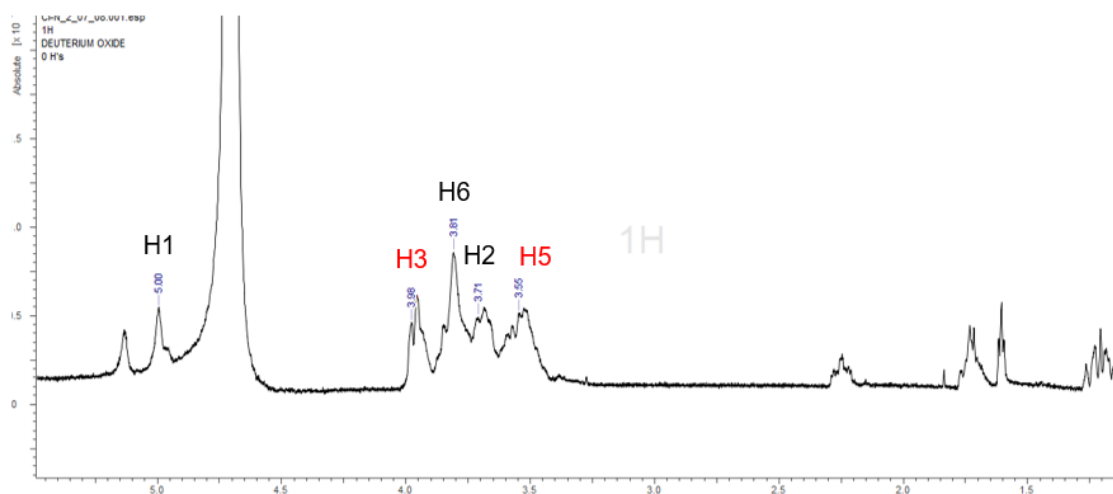
Conforme visto na figura 13a, o deslocamento de ^1H da 2HP- β CD mostra dois sinais mais intensos, δ 3,91 e 3,43, respectivamente H₃ e H₅. Depois que o borneol se liga à ciclodextrina os dois sinais da ressonância aumentam para δ 3,97 e 3,55, respectivamente H₃ e H₅ (fig. 13b). O que pode ser atribuído à formação da ligação de hidrogênio entre o borneol e a 2HP- β CD, bem como as alterações de campo magnético induzido pela cavidade hidrofóbica da ciclodextrina. Os deslocamentos dos hidrogênios na posição 3 e 5, no complexo X2 em relação a 2HP- β CD podem indicar que houve a formação do complexo de inclusão com o Borneol. Segundo (Bratu; Vallejo; Hernanz, 2005), o processo de inclusão de uma molécula hóspede pode produzir deslocamentos ascendentes ou decrescentes. Geralmente deslocamentos ascendentes para dos prótons H₃ e H₅ de CD é devido quando um próton está localizado dentro da cavidade da CD, e isso se dá através de interações fracas com os átomos de hidrogênio (forças de van der Waals, interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio). Os espectros de hidrogênio foram obtidos no programa ACD Labs – Specturs Processor.

Figura 13- Espectros de ^1H -RMN da 2HP- β CD e do complexo X2

a) 2HP- β CD



b) Complexo X2



6 CONCLUSÃO

Nos estudos referentes a avaliação da incorporação do borneol a 2HP- β -CD, conclui-se que:

- A complexação formada foi preparada com sucesso pelo método de liofilização, *freeze-drying*, sendo capaz de aumentar a solubilidade aquosa do borneol, o que pode aumentar a biodisponibilidade, pois apresentou tal resultado.
- Segundo os estudos de Higuchi e Connors, o perfil de solubilidade encontrado para o complexo de inclusão foi do tipo A_L. Os valores da constante de associação e a eficiência de complexação foi em torno de 112,21 M⁻¹, e 0,9762 respectivamente, o que pode concluir que o borneol está complexado a 2HP- β -CD e que possui uma estabilidade adequada.
- As análises de RMN mostraram as alterações sofridas pela 2HP- β -CD, evidenciando a complexação com o borneol e uma possível interação de forças de van der Waals, interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio.
- Para melhor evidenciar estes fatos são necessários estudos posteriores, como espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier, microscopia eletrônica de varredura e difração de raios-X.
- E como perspectivas: Encapsular o complexo de inclusão em nanopartículas e avaliar o aumento da biodisponibilidade *in vivo* e *in vitro*.

7 REFERENCIAS

ALBERS, E; MULLER, B. W. Cyclodextrin derivatives in pharmaceuticals. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, vol. 12. 1995.

ALMEIDA, J. R. G. S; SOUZA. G. R; SILVA, J. C; SARAIVA, S. R. G. L; JUNIOR, R. G. O; QUINTANS, J. S. S; BARRETO, S. S; BONJARDIM, L. R; CAVALCANTE, S. C. H; JUNIOR, L. J. Q. Borneol, a Bicyclic Monoterpene Alcohol, Reduces Nociceptive Behavior and Inflammatory Response in Mice. **The Scientific World Journal**. 2013.

APOLINARIO, A. C; SALATA G, C; BIANCO, A. F. R; FUKOMORI, C; BIAGINI, L. Abrindo a caixa de pandora dos nanomedicamentos: há realmente muito mais ‘espaço lá embaixo’. **Quim. Nova**, Vol. 43. 2020.

ARRUDA, R. R. A. Preparação e caracterização de nanocápsulas contendo 2-nitrato-1,3-di-isobutoxipropano (NDIBP) e complexos de inclusão NDIBP/ciclodextrina. Dissertação (Bacharelado em Biotecnologia), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017.

BREWSTER, M. E; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. 59. 2007.

BOHLMANN, J; GAUEN, G. M; CROTEAU, R. Plant terpenoid synthases: Molecular biology and phylogenetic analysis. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, 1998.

BOURGOU, S; PICHETTE, A; MARZOUK, B; LEGAULT, J. Bioactivities of black cumin essential oil and its main terpenes from Tunisia. **South African Journal of Botany** 210–216. 2010.

BRATU, I; VALLEJO, J. M. G; HERNANZ, A. ¹H-NMR Study of the Inclusion Processes for α - and γ -Cyclodextrin with Fenbufen. **Wiley InterScience**, 2005.

BUDAL, R. M. Estudos de formação de complexos de inclusão em ciclodextrinas. Dissertação (Doutor em Química Orgânica), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

CARVALHO, L. B. Uso de ciclodextrina na formação de complexos de inclusão com o hormônio masculinizante 17α -metiltestosterona. Dissertação (Mestre em Agroquímica), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

CHAUDHARI, P; GHATE, V. M; LEWIS, S. A. Supramolecular cyclodextrin complex: Diversity, safety, and applications in ocular therapeutics. **Experimental Eye Research**. 2019.

CHEN, L; SU, J; LI, L; LI, B; LI, W. A new source of natural D-borneol and its characteristic. **Journal of Medicinal Plants Research** Vol. 5. 2011.

CUNHA-FILHO; SA-BARRETO. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, vol. 28. 2007

DODZIUK, Helena. Cyclodextrins and Their Complexes: chemistry, analytical methods, applications. **Weinheim: Wiley-VCH**, 2006.

DUCHENE, D; BOCHOT, A. Thirty years with cyclodextrins. **International Journal of Pharmaceutics** 514. 2016.

DUCHENE, D; WOUESSIDJEW, D. Pharmaceutical uses of cyclodextrins and derivatives. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, 16. 1990.

ELEAMEN, G. R. A; COSTA, S. C; NETO, R G. L; NEVES, R. P; ROLIM, L. A; NETO, P. J. R; MOURA, R. O; AQUINO, T. M; BENTO, E. S; SCOTTI, M. T; JUNIOR, F. J. B. M; MENDONÇA, E. A. M; OLIVEIRA, E. E. Improvement of Solubility and Antifungal Activity of a New Aminothiophene Derivative by Complexation with 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, vol. 28. 2017.

FAROKHZAD, O. C; LANGER, R. Impact of Nanotechnology on Drug Delivery. **ACSNANO**, Vol. 3. 2009.

FIGUEIRO, J. F; MARQUES, I. R; SEVERINO, P; SANTANA, M. H. A; SOUTO, E. B. Desenvolvimento, produção e caracterização de nanocristais de fármacos pouco solúveis. **Química Nova**, vol. 35. 2012.

GOULD, S; SCOTT, R. C. 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD): A toxicology review. **Food and Chemical Toxicology** **43**. 2005.

HOBSON, D. W. Commercialization of nanotechnology. **Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanotechnology**. 2009.

HORVATHOVA, E; SLAMENOVA, D; MARSALKOVA, L; SRAMKOVA, M; WSOLAVA, L. Effects of borneol on the level of DNA damage induced in primary rat hepatocytes and testicular cells by hydrogen peroxide. **Food and Chemical Toxicology** **47**. 2009.

HUGHES, G. A. Nanostructure-mediated drug delivery. **Elsevier Inc**. 2004.

JUNGHANNS, J. U. A. H; MULLER, R, H. Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications. **International Journal of Nanomedicine**. 2008.

KIRBY, J; KEASLING, J. D. Biosynthesis of Plant isoprenoids: Perspectives for microbial engineering. **Review of Plant Biology**. 2009.

KUBOTA, D. Estudo físico-químico do complexo de inclusão do fármaco trimetoprim com a β ciclodextrina aleatoriamente metilada. Dissertação (Mestre em Química), Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão. 2010.

LACEDA, D. S; LIOZON, M. Aspectos atuais da biodisponibilidade de fármacos com baixa solubilidade: um enfoque sobre a sinvastatina. **Infarma**, vol. 24. 2011.

LIMA, R. A. F. Avaliação de formulações anestésicas de tetracaína em beta-ciclodextrina e hidroxipropil beta-ciclodextrina. Dissertação (Mestre em Biologia Funcional e Molecular), Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2010.

LOFTSSON, T; BEWSTER. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development. **Pharm Pharmacol**. 2010.

LOFTSSON, T; BREWSTER, M. Cyclodextrins as Functional Excipients: Methods to Enhance Complexation Efficiency. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. 2012.

LOFTSSON, T; DUCHENE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics** 329. 2007.

LOFTSSON, T; MANSSON, M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. **International Journal of Pharmaceutics** 225. 2001.

LOHR, M; SCHWENDER, J; POLLE, J. E. W. Isoprenoid biosynthesis in eukaryotic phototrophs: A spotlight on algae. **Plant Science**, v. 185–186, p. 9–22. 2012.

MCCORMACK, B; GREGORIADIS, G. Drugs-in-cyclodextrins-in-liposomes: an approach to controlling the fate of water insoluble drugs in vivo. **International Journal of Pharmaceutics**. 1997.

MELO, N.F.S.; GRILLO, R.; MORAES, C.M.; BRITO, C.L.; TROSSINI, G.H.G.; MENEZES, C.M.S.; FERREIRA, E.I.; ROSA, A.H.; FRACETO, L.F. Preparação e caracterização inicial de complexo de inclusão entre nitrofurazona e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, 2007.

SANTOS, Polliana. B. R. Preparação e caracterização físico-química de complexos de inclusão de limoneno em α e β -ciclodextrina. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Sergipe, São Cristovão, 2014.

SAOKHAM, P; MUANKAEW, C. JANSOOK, P; LOFTSSON, T. Solubility of Cyclodextrins and Drug/Cyclodextrin Complexes. **Molecules**. 2018.

SAOKHAM, P; LOFTSSON, T. γ -Cyclodextrin. **International Journal of Pharmaceutics**. 2016.

SAPRA, B; JAIN, S. TIMARY, A. K. Percutaneous permeation enhancement by terpenes: Mechanistic view. **The AAPS Journal**. 2008.

SCHRODER, T; GASKIN, S; ROSS, K; WHILEY, H. Antifungal activity of essential oils against fungi isolated from air. **International Journal Occup Environ Health**. 2017.

SHIMPI, S; CHAUHAN, B; SHIMPI, P. Cyclodextrins: Application in different routes of drug administration. **Acta Pharm**. Vol. 55. 2005.

STELLA, V. J; RAO, V. M; ZANNOU, E. A; ZIA, V. Mechanisms of drug release from cyclodextrin complexes. **Advanced Drug Delivery Reviews** 36. 1999.

SU, J; CHEN, J; LI, L; LI, B. SHI, L; ZHANG, H; DING, X. Preparation of natural borneol/2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex and its effect on the absorption of tetramethylpyrazine phosphate in mouse. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, vol. 60. 2012.

TABANCA, N; KIRIMER, N; DEMIRCI, B; DEMIRCI, F; BASER, H. C. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Micromeria cristata subsp. Phrygia* and the enantiomeric distribution of borneol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 49. 2001.

TIAN, B; XIAO, D; HEI, T; PING, R.; HUA, S; LIU, J. The application and prospects of cyclodextrin inclusion complexes and polymers in the food industry: a review. **Society of Chemical Industry**. 2020.

TOYODA, K; SHODA, T; UNEYAMA, C; TAKADA, K; TAKAHASHI, M. Carcinogenicity Study of β -Cyclodextrin in F344 Rats. **Food and Chemical Toxicology** 35. 1997.

VALENTE, A. J. M; SODERMAN, O. The formation of host–guest complexes between surfactants and cyclodextrins. **Advances in Colloid and Interface Science**. 2013.

VENTURINI, C. G; NICOLINI, J; MACHADO, C; MACHADO, V. G. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Química Nova** vol. 31. 2008.

ZHANG, Q. L; FU, B. M; ZHANG, Z. J. Borneol, a novel agent that improves central nervous system drug delivery by enhancing blood–brain barrier permeability. **Drug Delivery**. 2017.

GLOSSÁRIO

Dextrina	É uma classe de polissacarídeos de baixo peso molecular. As dextrinas são misturas de polímeros de D-glucose (α -1,4).
Celulosina	Estrutura semelhante a celulose, primeira nomenclatura para as ciclodextrinas.
D ₂ O	Chamada de água deuterada, é quimicamente semelhante à água normal (H ₂ O,) porém com átomos de hidrogênios mais pesados.
Slope	Conhecido também como declive, é a medida da inclinação de uma reta face ao eixo horizontal.
Freeze-drying	Também conhecido como liofilização a seco, é um processo de secagem no qual a substância congelada é submetida a uma alta pressão e a maior parte do solvente é removido por meio da sublimação.
Freeze -80	Possui nitrogênio líquido, sendo usado para congelar produtos líquidos para facilitar o armazenamento e a manipulação.