



LUCIANA DE SOUZA GUEDES

**ENCAPSULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO FÁRMACO
IMUNOMODULADOR IMIQUIMOD EM β -CICLODEXTRINA**

CAMPINAS

2014



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

LUCIANA DE SOUZA GUEDES

**ENCAPSULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO FÁRMACO
IMUNOMODULADOR IMIQUIMOD EM β -CICLODEXTRINA**

ORIENTADOR: PROF. DR. FRANCISCO BENEDITO TEIXEIRA PESSINE

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA
AO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRA EM
QUÍMICA NA ÁREA DE FÍSICO-QUÍMICA.**

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA
POR LUCIANA DE SOUZA GUEDES E ORIENTADA PELO PROF. DR. FRANCISCO
BENEDITO TEIXEIRA PESSINE.

Assinatura do Orientador

CAMPINAS

2014

Ficha catalográfica Universidade
Estadual de Campinas Biblioteca do
Instituto de Química Danielle Dantas de
Sousa - CRB 8/6490

G935e Guedes, Luciana de Souza, 1975-
Encapsulação e caracterização do fármaco imunomodulador Imiquimod em β -
ciclodextrina / Luciana de Souza Guedes. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Francisco Benedito Teixeira Pessine.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de
Química.

1. Complexo de inclusão. 2. Imiquimod. 3. beta-ciclodextrina. 4.
encapsulação. I. Pessine, Francisco Benedito Teixeira. II. Universidade Estadual
de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Preparation and characterization of Imiquimod/ β -cyclodextrin inclusion complex

Palavras-chave em inglês:

Inclusion complex

Imiquimod

beta-cyclodextrin

complexation

Área de concentração: Físico-Química

Titulação: Mestra em Química na área de Físico-Química

Banca examinadora:

Francisco Benedito Teixeira Pessine [Orientador]

René Alfonso Nome Silva

Laura de Oliveira Nascimento

Data de defesa: 04-09-2014

Programa de Pós-Graduação: Química

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Antonio e Eudália, e à
minha querida irmã Erika pelo apoio.*

O saber deve ser como um rio, cujas águas doces, grossas, copiosas, transbordem do indivíduo, e se espraíem, estancando a sede dos outros. Sem um fim social, o saber será a maior das futilidades.

Gilberto Freyre

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer o professor Francisco Pessine pela oportunidade e confiança.

À minha família pelo apoio e compreensão por não estar presente em todos os momentos.

Aos meus colegas de laboratório Daniela, Ana, Letícia, Marcelo, Andreza, Viviane, Katia, Ester, Francieli e Daniel pela amizade e carinho.

Ao professor Nelson H. Morgon pela generosidade em me supervisionar nos cálculos teóricos. Ao CENAPAD-SP pela infra-estrutura computacional.

Ao professor Claudio Tormena pela disponibilidade em me ajudar com os experimentos de Ressonância Magnética Nuclear. Aos técnicos dos laboratórios que foram sempre muito atenciosos.

À CAPES pela bolsa de mestrado. À EMS S.A pela amostra do Imiquimod e à ISP Technologies pela amostra da β -ciclodextrina.

Aos funcionários do Instituto de Química que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse projeto.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Faço um agradecimento especial à Milene H. Martins por atuar de maneira informal como co-orientadora. Agradeço pela generosidade em compartilhar seu conhecimento e pelas sugestões sempre pertinentes.

CURRICULUM VITAE

Luciana de Souza Guedes

lsouguedes@hotmail.com

Formação Acadêmica

Pós-graduação em Cosmetologia

Faculdades Oswaldo Cruz – São Paulo

Graduação em Engenharia Química

Faculdades Oswaldo Cruz – São Paulo

Atividade Acadêmica

Participação no Programa de Estágio Docente (PED) como PED C da disciplina QF-952 – Físico-Química Experimental sob a supervisão do professor Celso A. Bertran.

RESUMO

Encapsulação e caracterização do fármaco imunomodulador Imiquimod em β -ciclodextrina

O Imiquimod é um fármaco com propriedades imunomodulatórias, disponível na forma de creme para tratamento tópico de certas patologias da pele como carcinoma basocelular e ceratose actínica. O contato direto do medicamento com a pele pode causar desconforto durante o tratamento. Uma das alternativas para minimizar os efeitos adversos é a utilização de sistemas carreadores que evitam o contato direto do agente com a pele. A β -ciclodextrina foi empregada como agente carreador neste estudo e o complexo de inclusão obtido foi caracterizado em solução e no estado sólido. As técnicas espectroscópicas de absorção UV/Vis e ressonância magnética nuclear foram utilizadas para caracterizar o complexo de inclusão em solução. Essas técnicas permitiram obter a constante de equilíbrio de associação (K_c), a estequiometria do complexo formado e evidências de sua geometria. A caracterização do complexo no estado sólido foi realizada por calorimetria diferencial de varredura, termogravimetria, difração de raios X e microscopia eletrônica de varredura. Os resultados indicaram a presença de estrutura amorfa que pode ser atribuída a amorfização dos componentes devido à liofilização do complexo e também à formação do complexo de inclusão. A estrutura tridimensional do complexo obtida por modelagem molecular apresentou concordância com os resultados experimentais observados pela técnica de RMN ^1H ROESY 1D. Os valores baixos de K_c e da eficiência de complexação indicam fraca interação entre o Imiquimod e a β -ciclodextrina. Os resultados demonstram que a β -ciclodextrina não é o sistema carreador mais adequado para aumentar a solubilidade aquosa do Imiquimod.

Palavras-chave: Imiquimod, β -ciclodextrina, encapsulação, complexo de inclusão.

ABSTRACT

Preparation and characterization of Imiquimod/ β -cyclodextrin inclusion complex

Imiquimod, an immune response modifier, is used for topical treatment of basal cell carcinoma and actinic keratosis. Local skin reactions can occur in the treatment area. An alternative to minimize adverse events is to use drug delivery systems which avoid drug skin contact. β -cyclodextrin was used as drug delivery system in this study and the inclusion complex was characterized in solution and in solid state. UV/Vis absorption spectroscopy and nuclear magnetic resonance were employed to study the inclusion complex in solution. Those techniques allowed to obtain the equilibrium constant (K_c), the complex stoichiometry and insight on the geometry. The inclusion complex characterization in solid state was performed by differential scanning calorimetry, thermogravimetry, X-ray diffraction and scanning electron microscopy. The results suggest the presence of amorphous structure which can be attributed not only to components amorphization due to lyophilization but also to complex formation. The complex tridimensional geometry was obtained by molecular modeling and agrees with the experimental results observed by NMR ^1H ROESY 1D experiments. The low values of K_c and complex efficiency suggest weak interaction between Imiquimod and β -cyclodextrin. In addition to those, the results showed that β -cyclodextrin is not the most suitable drug delivery system to improve Imiquimod aqueous solubility.

Keywords: Imiquimod, β -cyclodextrin, complexation, inclusion complex

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	XXIII
LISTA DE TABELAS.....	XXV
LISTA DE FIGURAS	XXIX
LISTA DE ANEXOS.....	XXXIII
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO	3
1.1 – IMIQUIMOD.....	3
1.2 – CICLODEXTRINAS.....	6
1.3 – ÁCIDO CÍTRICO	10
1.4 – CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO EM SOLUÇÃO .	12
1.4.1 – <i>Espectroscopia de Absorção UV/Vis</i>	12
1.4.2 – <i>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</i>	15
1.5 – CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO NO ESTADO SÓLIDO	16
1.5.1 – <i>Análise Térmica</i>	16
1.5.2 – <i>Difratometria de Raios X (DRX)</i>	17
1.5.3 – <i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	18
1.6 – MODELAGEM MOLECULAR.....	18
CAPÍTULO II - OBJETIVOS	21

CAPÍTULO III - MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 – MATERIAIS.....	25
3.1.1 – Reagentes.....	25
3.1.2 – Equipamentos	25
3.2 – MÉTODOS	26
3.2.1 – Espectros de absorção UV/Vis do Imiquimod em diferentes pHs	26
3.2.2 – Determinação do coeficiente de absorvidade molar (ϵ) do Imiquimod	27
3.2.3 – Avaliação do efeito do tampão sobre a solubilidade do Imiquimod na ausência e na presença de β -ciclodextrina	27
3.2.4 – Avaliação da solubilidade do Imiquimod na presença de cossolventes.....	28
3.2.5 – Estudo de solubilidade de fase do Imiquimod em solução de ácido cítrico pH 3,0, solução tampão acetato pH 5,6 e tampão fosfato pH 7,4	30
3.2.6 – Determinação da estequiometria do complexo β CD:IMQ	31
3.2.7 – Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.....	32
3.2.8 – Análises Térmicas	34
3.2.9 – Difratomia de Raios X	34
3.2.10 – Microscopia Eletrônica de Varredura.....	35
3.2.11 – Modelagem Molecular	35
CAPÍTULO IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO	39

4.1 – ESPECTROS DE ABSORÇÃO UV/VIS DO IMIQUIMOD EM DIFERENTES PHs	39
4.2 – DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE ABSORTIVIDADE MOLAR (E) DO IMIQUIMOD	41
4.2.1 – <i>Curva analítica do Imiquimod em solução aquosa</i>	41
4.2.2 – <i>Curva analítica do Imiquimod em tampão acetato pH 5,6</i>	42
4.2.3 – <i>Curva analítica do Imiquimod em tampão fosfato pH 7,4</i>	44
4.2.4 – <i>Curva analítica do Imiquimod em tampão tris pH 9,0</i>	46
4.2.5 – <i>Curva analítica do Imiquimod em solução de ácido cítrico pH 3,0</i>	48
4.3 – AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TAMPÃO SOBRE A SOLUBILIDADE DO IMIQUIMOD NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE B-CICLODEXTRINA	51
4.4 – AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE DO IMIQUIMOD NA PRESENÇA DE COSSOLVENTES	54
4.5 – ESTUDO DE SOLUBILIDADE DE FASE DO IMIQUIMOD EM SOLUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO PH 3,0, SOLUÇÃO TAMPÃO ACETATO PH 5,6 E TAMPÃO FOSFATO PH 7,4.....	55
4.6 – DETERMINAÇÃO DA ESTEQUIOMETRIA DO COMPLEXO BCD:IMQ	69
4.7 – ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	72
4.7.1 – <i>Ressonância Magnética Nuclear de ¹H (RMN ¹H)</i>	72
4.7.2 – <i>Rotating-frame Overhauser Effect Spectroscopy (ROESY 1D)</i>	76
4.7.3 – <i>Diffusion Ordered Spectroscopy (DOSY)</i>	81
4.8 – ANÁLISES TÉRMICAS	88

<i>4.8.1 – Análise Termogravimétrica</i>	88
<i>4.8.2 – Calorimetria Diferencial de Varredura</i>	91
4.9 – DIFRATOMETRIA DE RAIOS X	95
4.10 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	97
4.11 – MODELAGEM MOLECULAR	100
CAPÍTULO V - CONCLUSÃO	105
CAPÍTULO VI - PERSPECTIVAS	111
CAPÍTULO VII - REFERÊNCIAS	115
ANEXOS	123

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Ácido cítrico
α CD	α -ciclodextrina
B	Fármaco em sua forma não protonada
B-CD	Complexo formado com o fármaco não protonado
BH ⁺ -CD	Complexo formado com o fármaco protonado
BH ⁺	Fármaco em sua forma protonada
β CD	β -ciclodextrina
CD	Ciclodextrina
[β CD]	Concentração molar da β -ciclodextrina
[IMQ]	Concentração molar do Imiquimod
[β CD:IMQ]	Concentração molar do complexo
COSY	<i>CO</i> rrelation <i>S</i> pectroscop <i>Y</i>
δ	Deslocamento químico
D _{obs-βCD}	Coeficiente de difusão da β -ciclodextrina
D _{IMQ}	Coeficiente de difusão do Imiquimod livre
D _{obs-IMQ}	Coeficiente de difusão do Imiquimod no complexo
$\Delta E_{\text{ligação}}$	Energia de ligação do complexo
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DOSY	<i>D</i> iffusion <i>O</i> rdere <i>d S</i> pectroscop <i>Y</i>
DRX	Difratometria de raios X
DSC	Calorimetria diferencial de varredura
E.C.	Eficiência de complexação
E(β CD) _{livre}	Energia da geometria otimizada da β -ciclodextrina
E(IMQ) _{livre}	Energia da geometria otimizada do Imiquimod
E(β CD:IMQ)	Energia da geometria otimizada do complexo

ε	Coefficiente de absorvidade molar
γ CD	γ -ciclodextrina
GAMESS	<i>General Atomic and Molecular Electronic Structure System</i>
IMQ	Imiquimod
$K_{1:1}$	Constante de equilíbrio de associação do fármaco não protonado
$K_{1:1}'$	Constante de equilíbrio de associação do fármaco protonado
K_A	Inverso da constante de dissociação do fármaco
K_A'	Inverso da constante de dissociação do fármaco sob forma complexada
K_c	Constante de equilíbrio de associação
λ_{\max}	Comprimento de onda de absorção máxima
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
NaCMC	Carboximetilcelulose de sódio
NOE	<i>Nuclear Overhauser Effect</i>
PEG-400	Polietilenoglicol
pKa	Constante de ionização ácida
PM3	<i>Parametric Method 3</i>
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN ^1H	Ressonância magnética nuclear de próton
ROESY 1D	<i>Rotating-frame Overhauser Effect Spectroscopy</i> monodimensional
TGA	Análise termogravimétrica
$X_{(\beta\text{CD}: \text{IMQ})}$	Fração molar do Imiquimod no complexo
X_{IMQ}	Fração molar do Imiquimod livre

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1.</i> Solubilidade do Imiquimod em alguns solventes orgânicos. Adaptado de (7).	6
<i>Tabela 2.</i> Concentrações do Imiquimod em solução aquosa, valores da absorbância obtidos em 226 e 244 nm, seus valores médios, coeficientes de absorvidade molar e as respectivas equações de reta.....	41
<i>Tabela 3.</i> Concentrações do Imiquimod em tampão acetato pH 5,6, valores da absorbância em 226 e 244 nm, seus valores médios, coeficientes de absorvidade molar e as respectivas equações de reta.	43
<i>Tabela 4.</i> Concentrações do Imiquimod em tampão fosfato pH 7,4, valores da absorbância em 226 e 244 nm, seus valores médios, coeficientes de absorvidade molar e as respectivas equações de reta.	45
<i>Tabela 5.</i> Concentrações do Imiquimod em tampão tris pH 9,0, valores da absorbância em 244 nm, seus valores médios, o coeficiente de absorvidade molar e a equação de reta.....	47
<i>Tabela 6.</i> Concentrações do Imiquimod em solução de ácido cítrico pH 3,0, valores da absorbância em 226 e 244 nm, seus valores médios, coeficientes de absorvidade molar e as respectivas equações de reta.	49
<i>Tabela 7.</i> Valores da absorbância em 226 e 244 nm na presença de quantidades crescentes de β -ciclodextrina.	51
<i>Tabela 8.</i> Solubilidade do Imiquimod a 25 °C em água, tampão acetato pH 5,6, tampão fosfato pH 7,4 e tampão tris 9,0 na ausência e na presença de β -ciclodextrina e incremento relativo (I.R.) ^a na solubilidade.....	52

<i>Tabela 9.</i> Concentrações de β -ciclodextrina usadas no estudo de solubilidade em solução de ácido cítrico pH 3,0 a 25 °C, valores da absorvância em 226 e 244 nm e seus valores médios (desvio padrão entre parênteses).....	56
<i>Tabela 10.</i> Concentrações de β -ciclodextrina usadas no estudo de solubilidade em tampão acetato pH 5,6 a 25 °C, valores da absorvância em 226 e 244 nm e seus valores médios (desvio padrão entre parênteses).....	58
<i>Tabela 11.</i> Concentrações de β -ciclodextrina usadas no estudo de solubilidade em tampão fosfato pH 7,4 a 25 °C, valores da absorvância em 226 e 244 nm e seus valores médios (desvio padrão entre parênteses).....	60
<i>Tabela 12.</i> Solubilidade do Imiquimod (desvio padrão entre parênteses) a 25 °C em solução de ácido cítrico pH 3,0, tampão acetato pH 5,6 e tampão fosfato pH 7,4 na presença de concentrações crescentes de β -ciclodextrina.....	64
<i>Tabela 13.</i> Parâmetros do diagrama de solubilidade de fase do Imiquimod (desvio padrão entre parênteses) em solução de ácido cítrico pH 3,0, tampão acetato pH 5,6 e tampão fosfato pH 7,4 a 25°C.	65
<i>Tabela 14.</i> Solubilidade do Imiquimod a 25 °C em solução de ácido cítrico pH 3,0, tampão acetato pH 5,6 e tampão fosfato pH 7,4 na ausência e na presença de β -ciclodextrina 16 mM, incremento relativo (I.R.) ^a na solubilidade do fármaco, constante de equilíbrio de associação (K_C) e eficiência de complexação (E.C.) ^b . Desvio padrão entre parênteses.....	66
<i>Tabela 15.</i> Fração molar do Imiquimod, volume e concentração das soluções de β -ciclodextrina e Imiquimod em solução de ácido cítrico pH 3,0.	70

<i>Tabela 16.</i> Fração molar do Imiquimod, valores da absorvância, seus valores médios (desvio padrão entre parênteses) e os resultados de $\Delta A \cdot R$ para os comprimentos de onda 226 e 244 nm.	71
<i>Tabela 17.</i> Deslocamentos químicos RMN ^1H da β -ciclodextrina, do Imiquimod e do ácido cítrico em D_2O e DMSO-d_6 , a 25 °C, 400 MHz.....	75
<i>Tabela 18.</i> Concentrações da β -ciclodextrina, coeficientes de difusão (D) do Imiquimod (IMQ), do ácido cítrico (AC), da β -ciclodextrina (βCD), da água (HOD) e fração do Imiquimod presente no complexo. Desvio padrão entre parênteses.....	82
<i>Tabela 19.</i> Intervalo de temperatura (ΔT) e percentual de massa perdida (% m) do ácido cítrico (AC), Imiquimod (IMQ), β -ciclodextrina (βCD), mistura física Imiquimod + β -ciclodextrina, mistura física ácido cítrico + Imiquimod + β -ciclodextrina e complexo $\beta\text{CD}:\text{IMQ}$	90
<i>Tabela 20.</i> Intervalo de temperatura (ΔT) e fluxo de calor (J/g) para ácido cítrico (AC), Imiquimod (IMQ), β -ciclodextrina (βCD), misturas físicas e complexo $\beta\text{CD}:\text{IMQ}$	94
<i>Tabela 21.</i> Principais picos (2θ) observados no difratograma do ácido cítrico, Imiquimod, β -ciclodextrina e mistura física ácido cítrico + β -ciclodextrina + Imiquimod.	97

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.* Fórmula estrutural do Imiquimod {1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina}.5
- Figura 2.* (A) Fórmula estrutural da β -ciclodextrina; (B) Unidade de glicopirranose. Item (B) adaptado de (12).7
- Figura 3.* Estrutura da β -ciclodextrina indicando os grupos hidroxila e os hidrogênios localizados no interior da cavidade. Item (B) adaptado de (14).8
- Figura 4.* Fórmula estrutural do ácido cítrico.10
- Figura 5.* Representação gráfica do perfil de solubilidade de fase dos tipos A e B com seus subtipos (A_P , A_L , A_N e B_S , B_I). Adaptado de (10).13
- Figura 6.* Espectros de absorção na região do UV/Vis do Imiquimod (concentração 0,0588 mM), a 25 °C.40
- Figura 7.* (A) Espectros de absorção na região do UV/Vis do Imiquimod em solução aquosa a 25 °C. (a) 0,0149 mM; (b) 0,0297 mM; (c) 0,0588 mM; (d) 0,0874 mM; (e) 0,1150 mM; (f) 0,1430 mM. (B) Curva analítica do Imiquimod em $\lambda = 226$ nm ($n = 2$).42
- Figura 8.* (A) Espectros de absorção na região do UV/Vis do Imiquimod em tampão acetato pH 5,6, a 25 °C. (a) 0,0075 mM; (b) 0,0149 mM; (c) 0,0297 mM; (d) 0,0443 mM; (e) 0,0588 mM; (f) 0,0732 mM; (g) 0,0874 mM. (B) Curva analítica do Imiquimod em $\lambda = 226$ nm ($n = 2$).44
- Figura 9.* (A) Espectros de absorção na região do UV/Vis do Imiquimod em tampão fosfato pH 7,4, a 25 °C. (a) 0,0149 mM; (b) 0,0297 mM; (c) 0,0443 mM;

(d) 0,0588 mM; (e) 0,0732 mM; (f) 0,0874 mM. (B) Curva analítica do Imiquimod em $\lambda = 226$ nm ($n = 2$).....46

Figura 10. (A) Espectros de absorção na região do UV/Vis do Imiquimod em tampão tris pH 9,0, a 25 °C. (a) 0,0075 mM; (b) 0,0149 mM; (c) 0,0297 mM; (d) 0,0370 mM; (e) 0,0443 mM; (f) 0,0516 mM; (g) 0,0588 mM. (B) Curva analítica do Imiquimod em $\lambda = 244$ nm ($n = 2$).....48

Figura 11. (A) Espectros de absorção na região do UV/Vis do Imiquimod em solução de ácido cítrico pH 3,0, a 25 °C: (a) 0,0082 mM; (b) 0,0097 mM; (c) 0,0149 mM; (d) 0,0208 mM; (e) 0,0266 mM; (f) 0,0326 mM. (B) Curva analítica do Imiquimod em $\lambda = 226$ nm ($n = 2$).....50

Figura 12. (A) Espectros de absorção na região do UV/Vis do Imiquimod em solução de ácido cítrico pH 3,0 na presença de concentrações crescentes de β -ciclodextrina, a 25 °C. (B) Isoterma de solubilidade do Imiquimod em $\lambda = 226$ nm ($n = 2$).....55

Figura 13. (A) Espectros de absorção na região do UV/Vis do Imiquimod em tampão acetato pH 5,6 na presença de concentrações crescentes de β -ciclodextrina, a 25 °C. (B) Isoterma de solubilidade do Imiquimod em $\lambda = 226$ nm ($n = 2$).....57

Figura 14. (A) Espectros de absorção na região do UV/Vis do Imiquimod em tampão fosfato pH 7,4 na presença de concentrações crescentes de β -ciclodextrina, a 25 °C. (B) Isoterma de solubilidade do Imiquimod em $\lambda = 226$ nm ($n = 2$).....59

Figura 15. Espectros de absorção na região do UV/Vis do Imiquimod em solução de ácido cítrico pH 3,0, tampão acetato pH 5,6 e tampão fosfato pH 7,4 na ausência e na presença de β -ciclodextrina 16 mM.....61

Figura 16. Isotermas de solubilidade do Imiquimod, a 25 °C, $\lambda = 226$ nm ($n = 2$).62

<i>Figura 17.</i> Representação esquemática do equilíbrio de associação e dissociação entre o fármaco e a β -ciclodextrina. Adaptado de (10).....	68
<i>Figura 18.</i> Gráfico de Job para a formação do complexo entre o Imiquimod e a β -ciclodextrina, a 25 °C, $\lambda = 226$ nm ($n = 2$).....	69
<i>Figura 19.</i> Espectros de RMN ^1H a 400 MHz, 25 °C e concentração 26 mM.	73
<i>Figura 20.</i> Fórmula estrutural do ácido cítrico, do Imiquimod e da β -ciclodextrina com a numeração para identificar os prótons no espectro de RMN ^1H . Fórmula estrutural da β -ciclodextrina adaptada de (12).....	74
<i>Figura 21.</i> Espectro RMN ^1H ROESY 1D do complexo $\beta\text{CD}:\text{IMQ}$ (concentração 26 mM), a 400 MHz, 25 °C . (A) pulso seletivo nos prótons H3 da β -ciclodextrina; (B) pulso seletivo nos prótons H5 da β -ciclodextrina; (C) pulso seletivo no próton He do Imiquimod.....	77
<i>Figura 22.</i> Espectro RMN ^1H ROESY 1D do complexo $\beta\text{CD}:\text{IMQ}$ (concentração 26 mM), a 400 MHz, 25 °C. (A) pulso seletivo no próton Hd do Imiquimod; (B) pulso seletivo no próton Hc do Imiquimod; (C) pulso seletivo no próton Hb do Imiquimod.	78
<i>Figura 23.</i> Espectro RMN ^1H ROESY 1D do complexo $\beta\text{CD}:\text{IMQ}$ (concentração 26 mM), a 400 MHz, 25 °C. (A) pulso seletivo no próton Ha do Imiquimod; (B) pulso seletivo nos prótons Hh do Imiquimod; (C) pulso seletivo nos prótons Hi e Hj do ácido cítrico.	79
<i>Figura 24.</i> Estrutura tridimensional do complexo $\beta\text{CD}:\text{IMQ}$. Os prótons da β -ciclodextrina estão indicados em vermelho e os do Imiquimod estão indicados em azul.	80

<i>Figura 25.</i> Espectro DOSY (^1H , 400 MHz, 25 °C) do complexo em solução de ácido cítrico em D_2O . Projeção do coeficiente de difusão (D) em F1 e projeção do espectro de RMN ^1H em F2.	83
<i>Figura 26.</i> Espectros de RMN ^1H parcial do ácido cítrico livre e na presença de Imiquimod e β -ciclodextrina.	87
<i>Figura 27.</i> Curvas de TGA obtidas em atmosfera inerte, à taxa de aquecimento de $10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$	89
<i>Figura 28.</i> Gráficos das derivadas das curvas de TGA.	89
<i>Figura 29.</i> Curvas de DSC obtidas em atmosfera inerte, à taxa de aquecimento de $10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$	92
<i>Figura 30.</i> Difrátogramas de raios X do ácido cítrico, do Imiquimod, da β -ciclodextrina, da mistura física ácido cítrico + β -ciclodextrina + Imiquimod, e do complexo.	96
<i>Figura 31.</i> Fotomicrografias de (A) Imiquimod; (B) Ácido cítrico; (C) β -ciclodextrina; (D) Mistura física ácido cítrico + β -ciclodextrina + Imiquimod; (E) e (F) Complexo $\beta\text{CD:IMQ}$. Aumento 100x a 1300x.	98
<i>Figura 32.</i> Estrutura tridimensional do complexo $\beta\text{CD:IMQ}$. (A) Visualização da extremidade maior da β -ciclodextrina; (B) Visualização da lateral da β -ciclodextrina.	101

LISTA DE ANEXOS

<i>Anexo 1.</i> Espectro de RMN ^1H do Imiquimod (concentração 26 mM).	123
<i>Anexo 2.</i> Espectro de RMN ^1H da β -ciclodextrina (concentração 26 mM).	124
<i>Anexo 3.</i> Espectro de RMN ^1H do complexo $\beta\text{CD}:\text{IMQ}$ (concentração 26 mM)..	125
<i>Anexo 4.</i> Mapa de contorno COSY do Imiquimod (concentração 26 mM).	126
<i>Anexo 5.</i> Ampliação do mapa de contorno COSY do Imiquimod com as correlações homonucleares dos prótons do grupo imidazoquinolina.....	127
<i>Anexo 6.</i> Espectro de RMN ^1H ROESY 1D do complexo $\beta\text{CD}:\text{IMQ}$ (concentração 26 mM), a 400 MHz, 25 °C, pulso seletivo nos prótons H3 da β -ciclodextrina....	128
<i>Anexo 7.</i> Espectro de RMN ^1H ROESY 1D do complexo $\beta\text{CD}:\text{IMQ}$ (concentração 26 mM), a 400 MHz, 25 °C, pulso seletivo nos prótons H5 da β -ciclodextrina....	129
<i>Anexo 8.</i> Espectro de RMN ^1H ROESY 1D do complexo $\beta\text{CD}:\text{IMQ}$ (concentração 26 mM), a 400 MHz, 25 °C, pulso seletivo no próton He do Imiquimod.	130
<i>Anexo 9.</i> Espectro de RMN ^1H ROESY 1D do complexo $\beta\text{CD}:\text{IMQ}$ (concentração 26 mM), a 400 MHz, 25 °C, pulso seletivo no próton Hd do Imiquimod.	131
<i>Anexo 10.</i> Espectro de RMN ^1H ROESY 1D do complexo $\beta\text{CD}:\text{IMQ}$ (concentração 26 mM), a 400 MHz, 25 °C, pulso seletivo no próton Hc do Imiquimod.	132
<i>Anexo 11.</i> Espectro de RMN ^1H ROESY 1D do complexo $\beta\text{CD}:\text{IMQ}$ (concentração 26 mM), a 400 MHz, 25 °C, pulso seletivo no próton Hb do Imiquimod.	133
<i>Anexo 12.</i> Espectro de RMN ^1H ROESY 1D do complexo $\beta\text{CD}:\text{IMQ}$ (concentração 26 mM), a 400 MHz, 25 °C, pulso seletivo no próton Ha do Imiquimod.	134

<i>Anexo 13.</i> Espectro de RMN ^1H ROESY 1D do complexo $\beta\text{CD}:\text{IMQ}$ (concentração 26 mM), a 400 MHz, 25 °C, pulso seletivo nos prótons Hh do Imiquimod.....	135
<i>Anexo 14.</i> Espectro de RMN ^1H ROESY 1D do complexo $\beta\text{CD}:\text{IMQ}$ (concentração 26 mM), a 400 MHz, 25 °C, pulso seletivo nos prótons Hi e Hj do ácido cítrico.	136
<i>Anexo 15.</i> Estrutural tridimensional do complexo $\beta\text{CD}:\text{IMQ}$, onde os prótons da β -ciclodextrina estão indicados em vermelho e os prótons do Imiquimod estão indicados em azul. Visualização da extremidade maior da β -ciclodextrina.	137
<i>Anexo 16.</i> Estrutural tridimensional do complexo $\beta\text{CD}:\text{IMQ}$, onde os prótons da β -ciclodextrina estão indicados em vermelho e os prótons do Imiquimod estão indicados em azul. Visualização da extremidade menor da β -ciclodextrina.	138
<i>Anexo 17.</i> Espectro DOSY (^1H , 400 MHz, 25 °C) da β -ciclodextrina em D_2O . Projeção do coeficiente de difusão (D) em F1 e projeção do espectro de RMN ^1H em F2.....	139
<i>Anexo 18.</i> Espectro DOSY (^1H , 400 MHz, 25 °C) do Imiquimod em solução de ácido cítrico pH 3,0 em D_2O . Projeção do coeficiente de difusão (D) em F1 e projeção do espectro de RMN ^1H em F2.	140

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

1.1 – IMIQUIMOD

Imiquimod (IMQ), nome comercial Aldara, fabricado pela 3M Pharmaceuticals, é um fármaco modificador da resposta imune local, disponível na forma de creme para tratamento tópico de certas patologias da pele, como carcinoma basocelular, doença de Bowen, carcinoma superficial de células escamosas, melanomas malignos superficiais, ceratose actínica e verrugas externas da região genital e perianal (1). Também tem sido testado no tratamento de molusco contagioso, neoplasia intra-epitelial vulvar e verrugas comuns resistentes a tratamentos convencionais (2) e (3).

Entretanto, a morbidade e o desconforto no tratamento de algumas dessas patologias podem ser severos. Cada grama de Aldara contém 50 mg de Imiquimod em um creme óleo em água (O/A) consistindo de ácido isoesteárico, álcool cetílico, álcool estearílico, petrolato branco, polisorbato 60, monoestearato de sorbitano, glicerina, goma xantana, água, álcool benzílico, metilparabeno e propil parabeno. Tanto o ingrediente ativo quanto outros componentes (conservantes, acidulantes, emulsificantes) podem causar reações adversas. Alcoóis graxos lineares de cadeia longa como álcool cetílico e estearílico podem causar reações cutâneas locais (dermatite de contato). Os parabenos, como metilparabeno (para-hidroxibenzoato de metila) e propil parabeno (para-hidroxibenzoato de propila), quando usados em concentrações acima do limite de sensibilização (0,5-1,0%), podem causar reações alérgicas retardadas (4). A frequência de aplicação e a duração do tratamento dependem da patologia. Por exemplo, no caso de verrugas o creme deve ser aplicado 3 vezes/semana, durante 8 a 16 semanas, devendo ser deixado em contato com a lesão de 6 a 10 horas.

Estudos mostraram que o tratamento de lesões de ceratose actínica com Imiquimod 5% creme pode causar reações adversas. Lebwohl e colaboradores reportaram em estudo comparativo entre o Imiquimod 5% creme e medicamento semelhante (composição idêntica ao Imiquimod 5% creme com exceção do ingrediente ativo) que 17,7% dos 215 participantes apresentaram eritema severo no local da aplicação durante o tratamento com Imiquimod 5% creme. No grupo de 221 pacientes que foram tratados com medicamento semelhante 2,3% apresentaram as mesmas reações adversas. Do grupo de 215 pacientes, 17 participantes não completaram o tratamento, sendo que no grupo de 221 participantes 13 pacientes desistiram do tratamento (5). Em outro estudo realizado com um grupo menor, 13,76% dos pacientes apresentaram eritema de mínimo a moderado (6).

Os efeitos adversos podem ser reduzidos ou mesmo minimizados pela utilização de novas formas de administração do fármaco, como por exemplo, a encapsulação do mesmo em um veículo carreador como β -ciclodextrina. Além disso, uma formulação aquosa do Imiquimod que não contenha alguns dos componentes que possam causar reações adversas pode resultar em maior adesão ao tratamento.

Imiquimod apresenta características adequadas de polaridade e dimensão para formar complexos de inclusão com ciclodextrinas. É um fármaco hidrofóbico, com ponto de fusão 297-299 °C, fórmula molecular $C_{14}H_{16}N_4$ e massa molar 240,3 g/mol. A fórmula estrutural é mostrada na Figura 1.

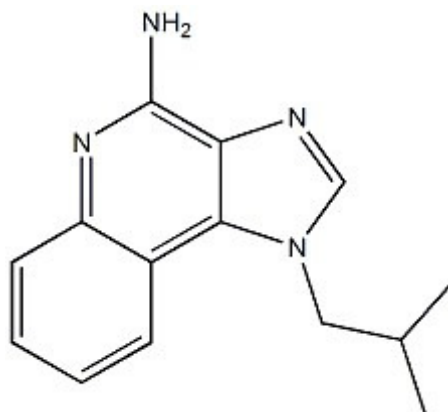


Figura 1. Fórmula estrutural do Imiquimod {1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina}.

O fármaco é praticamente insolúvel em água (0,60 µg/mL) e pouco solúvel na maioria dos solventes orgânicos. A Tabela 1 apresenta a solubilidade do Imiquimod em alguns solventes orgânicos. É uma base fraca, a constante de ionização do ácido conjugado (pKa) é 7,3 (22 °C). Sendo uma base fraca, a solubilidade do Imiquimod aumenta em meio ácido, à medida que o fármaco é convertido na forma salina correspondente. Entretanto, mesmo em solução aquosa extremamente ácida não é possível solubilizar o Imiquimod e obter uma concentração de 5% do fármaco, a mesma da formulação comercial (7) e (8).

Tabela 1. Solubilidade do Imiquimod em alguns solventes orgânicos. Adaptado de (7).

Solvente	Solubilidade (mg/mL)
Acetona	0,12
Propilenoglicol	0,12
Etanol	0,24
PEG 400 monoisoestearato	0,33
Metanol	0,46
Clorofórmio	0,56
Ácido isoesteárico	17

Em vista do exposto, o estudo sobre complexação deste fármaco em agentes encapsuladores que possibilitem aumento de sua solubilidade e redução de efeitos adversos constitui alternativa promissora para obter formulações terapêuticas mais eficientes e menos tóxicas.

1.2 – CICLODEXTRINAS

Ciclodextrinas (CD) são oligossacarídeos cíclicos formados por unidades de glicopiranosose unidas por ligações α -1,4. À temperatura ambiente, são substâncias cristalinas, homogêneas e higroscópicas. Ciclodextrinas formadas por 6, 7 e 8 unidades de glicopiranosose são denominadas α , β e γ -ciclodextrina, respectivamente. Por razões estéricas, ciclodextrinas contendo menos de 6 monômeros não podem ser formadas. Devido à conformação da cadeia das unidades de glicopiranosose as ciclodextrinas têm a forma de cone truncado (9), (10) e (11). A Figura 2 apresenta a fórmula estrutural da β -ciclodextrina.

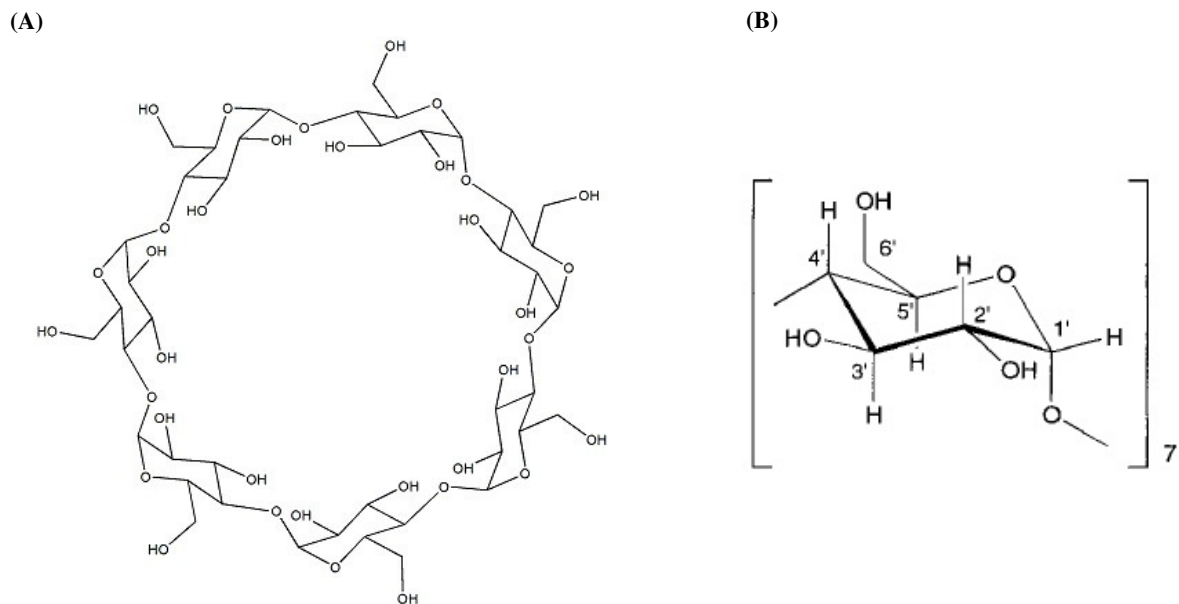


Figura 2. (A) Fórmula estrutural da β -ciclodextrina; (B) Unidade de glicopirranose. Item (B) adaptado de (12).

A disposição espacial das unidades de glicopirranose deixa as hidroxilas secundárias (C2-OH e C3-OH, na borda maior da cavidade) e primárias (C6-OH, na borda menor da cavidade) em extremidades opostas (Figura 3), existindo apenas ligações glicosídicas no interior da cavidade. Esta conformação espacial resulta em ambientes com polaridades químicas diferentes em uma mesma molécula, sendo o interior da cavidade predominantemente hidrofóbico e as extremidades hidrofílicas (9) e (13). A cavidade é delineada pelos átomos de hidrogênio, H3 (próximo à borda maior) e H5 (próximo à borda menor), e pelas pontes de oxigênio glicosídicas. Os pares de elétrons não-ligantes do oxigênio estão direcionados para o interior da cavidade, conferindo alta densidade eletrônica resultando em um ambiente com característica de base de Lewis. A polaridade da cavidade tem sido estimada como sendo similar à de uma solução aquosa etanólica (10). No entanto, não há concordância entre os valores reportados na literatura. Szejtli sugeriu o valor de 32,8, água/etanol (20:80 v/v) (14). Os átomos de hidrogênio H1, H2, H4 e H6

estão voltados para a superfície externa da ciclodextrina. A diferença de polaridade entre o interior e o exterior da cavidade possibilita o uso das ciclodextrinas como agentes encapsuladores de substâncias hidrofóbicas, pois estas ficam retidas na cavidade, por meio de forças de van der Waals (15).

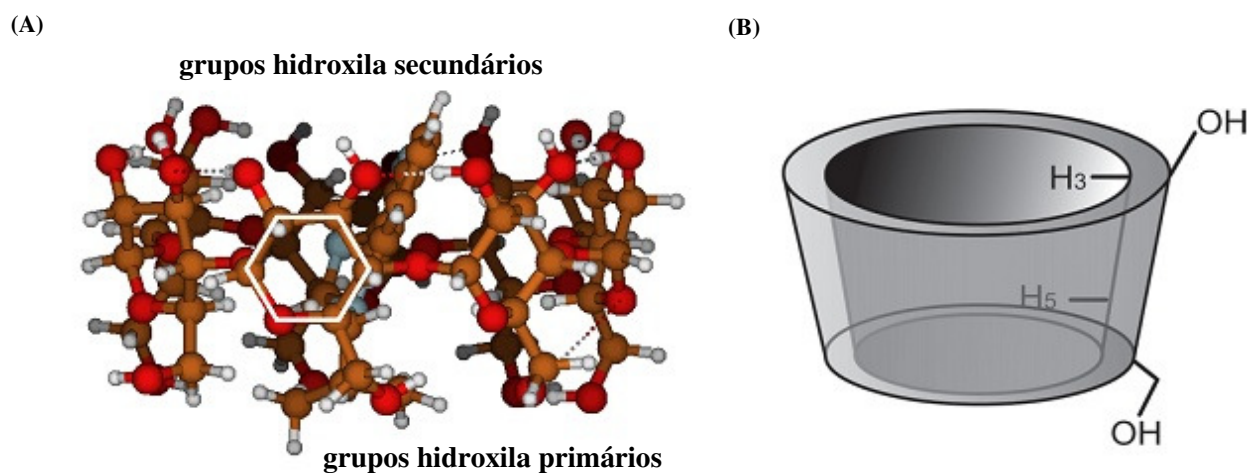


Figura 3. Estrutura da β -ciclodextrina indicando os grupos hidroxila e os hidrogênios localizados no interior da cavidade. Item (B) adaptado de (14).

Ciclodextrinas naturais possuem 18 (α CD), 21 (β CD) e 24 (γ CD) grupos hidroxila, que podem ser quimicamente modificados, resultando na obtenção de derivados. Os grupos hidroxil C6-OH são mais reativos que os C3-OH. Entretanto, a diferença de reatividade não é grande, o que dificulta a obtenção de derivados com alto grau de pureza e com substituição em posições pré-determinadas (9).

A encapsulação de substâncias em ciclodextrinas foi iniciada por volta da década de 1970 ocorrendo, posteriormente, um crescimento exponencial de publicações, passando de 10.000 no final do século 20. As ciclodextrinas se tornaram os agentes de inclusão mais utilizados em pesquisas nessa área. Os motivos para o grande desenvolvimento na tecnologia de produção e utilização de CDs na indústria foram (16):

a) A produção de ciclodextrinas é feita enzimaticamente utilizando amido (fonte renovável de matéria-prima);

b) O aumento de produção diminuiu custos, expandindo a demanda para vários setores como alimentício, farmacêutico e cosmético;

c) A inclusão de compostos em ciclodextrinas altera várias propriedades físico-químicas, como solubilidade, estabilidade e perfil de liberação;

d) A toxicidade apresentada na administração parenteral e ocular pode ser reduzida pelo emprego de seus derivados;

e) Pode ser usada nas rotas mais amigáveis de administração de fármacos (oral e tópica), contribuindo para maior adesão de pacientes a determinados tratamentos;

f) Evita contato direto de fármacos com mucosas, reduzindo a intensidade, número e frequência de efeitos adversos;

g) Constitui importante veículo para administração de fármacos diretamente ao cólon, pois ciclodextrinas não são afetadas pelo suco gástrico e intestinal e são decompostas pela flora bacteriana existente nessa parte do trato intestinal.

Embora predominantemente apolar, a cavidade das ciclodextrinas está preenchida com moléculas de água (9). Entretanto, quando as ciclodextrinas estão em meio aquoso e na presença de moléculas apolares, a formação de complexo de inclusão entre estas moléculas e a ciclodextrina tende a ser termodinamicamente favorecida. A entalpia liberada quando moléculas de água do interior da cavidade são trocadas por molécula mais apolar, juntamente com a variação positiva de entropia é a força-motriz da encapsulação (15) e (17).

A β -ciclodextrina (β CD) é bastante empregada na formação de complexos de inclusão. Apesar da baixa solubilidade em água (1,85 g/100 mL), sua utilização é devida ao baixo custo, disponibilidade e tamanho da cavidade (6,0-6,5 Å) que se apresenta adequada para a maioria das moléculas de interesse farmacêutico (18) e (19). A formação de complexo de inclusão com moléculas hidrofóbicas ocorre

através de interações não-covalentes e altera as propriedades físico-químicas da molécula hóspede, como aumento da solubilidade, taxa de dissolução e da biodisponibilidade (20).

A predição da formação do complexo de inclusão é bastante empírica. No entanto, Loftsson e Brewster observaram que quanto menor a solubilidade em meio aquoso do fármaco, maior era o aumento da solubilidade relativa obtida pela complexação com a ciclodextrina. Fármacos com solubilidade na ordem de μM apresentam aumento maior da mesma do que fármacos com solubilidade maior (21).

A solubilidade de fármacos pouco solúveis em água pode ser aumentada pela utilização simultânea da formação do complexo com ciclodextrina e de sais com ácidos orgânicos. Hidroxi-ácidos são bastante empregados para aumentar a solubilidade de fármacos com solubilidade aquosa reduzida, sendo o ácido cítrico utilizado com frequência. Os complexos resultantes são nomeados complexos multicomponentes (22).

1.3 – ÁCIDO CÍTRICO

Ácido cítrico (AC) é um hidroxi-ácido, com ponto de fusão $153\text{ }^{\circ}\text{C}$, fórmula molecular $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$, massa molar $192,12\text{ g/mol}$ e constantes de ionização $3,13$ ($\text{pK}_{\text{a}1}$), $4,76$ ($\text{pK}_{\text{a}2}$) e $6,40$ ($\text{pK}_{\text{a}3}$) (23). Sua fórmula estrutural está na Figura 4.

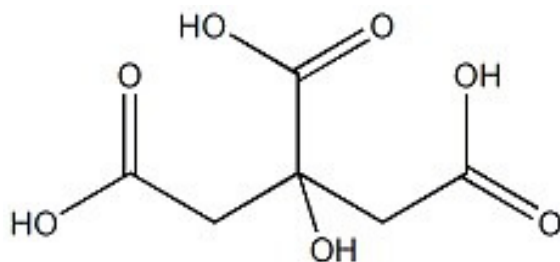


Figura 4. Fórmula estrutural do ácido cítrico.

Quando usado como agente acidificante, o ácido cítrico solubiliza fármacos básicos formando sal e aumentando a solubilidade do ativo (23).

A formação de complexo entre ciclodextrinas e fármacos com grupo amina é favorecida na presença de hidróxi-ácidos. Redenti e colaboradores observaram algumas características desses fármacos que são importantes para obtenção do complexo de inclusão: (a) apresentarem solubilidade aquosa inferior a 0,1 mg/mL; (b) ser observado aumento da solubilidade do fármaco na presença do hidróxi-ácido; (c) o complexo CD-fármaco deve ser estável; (d) o grupo amina do fármaco deve apresentar caráter básico razoável ($pK_a < 5,0$) e estar em uma posição afastada da parte da molécula que é inserida na cavidade da ciclodextrina, de forma que a carga não comprometa a formação do complexo de inclusão e que o hidróxi-ácido possa interagir com os grupos hidroxila da extremidade maior da ciclodextrina (24).

A solubilidade da ciclodextrina também aumenta na presença de hidróxi-ácidos. Este efeito tem sido associado a alterações na rede de ligações de hidrogênio dos grupos hidroxila secundários e/ou alterações das interações com as moléculas de água (22) e (25).

A presença simultânea de hidróxi-ácido e de ciclodextrina apresenta efeito sinérgico na solubilidade de fármacos pouco solúveis. A solubilidade do fármaco na presença desses componentes é maior que o efeito aditivo da presença da ciclodextrina e do hidróxi-ácido observados separadamente (26). Mura e colaboradores observaram que a presença simultânea do hidróxi-ácido e da ciclodextrina foi mais efetiva no aumento da solubilidade do Econazol quando comparada à solubilidade do fármaco na presença de apenas um desses agentes (27).

A formação do complexo de inclusão altera as propriedades físico-químicas da molécula hóspede. Essas alterações podem ser monitoradas por metodologias analíticas que permitem detectar essas variações e conseqüentemente obter

evidências da formação do complexo de inclusão. O complexo formado pode ser caracterizado tanto em solução como no estado sólido (22).

1.4 – CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO EM SOLUÇÃO

1.4.1 – Espectroscopia de Absorção UV/Vis

A abordagem mais utilizada para o estudo de complexos de inclusão é o método *shake-flask* proposto por Higuchi & Connors, sendo considerada a primeira verificação de complexos de inclusão em solução. O estudo permite obter a constante de equilíbrio de associação (K_c) e a estequiometria do complexo a partir do diagrama de solubilidade.

O estudo de solubilidade de fase emprega quantidade em excesso da molécula hóspede com objetivo de manter o equilíbrio termodinâmico entre a molécula hóspede em solução e seu sólido de forma a alcançar o máximo de sua solubilidade. O perfil da solubilidade é construído analisando o efeito de concentrações crescentes de ciclodextrina na solubilidade aparente do fármaco (22), (28) e (29). A Figura 5 apresenta os tipos de diagrama que podem ser obtidos neste estudo.

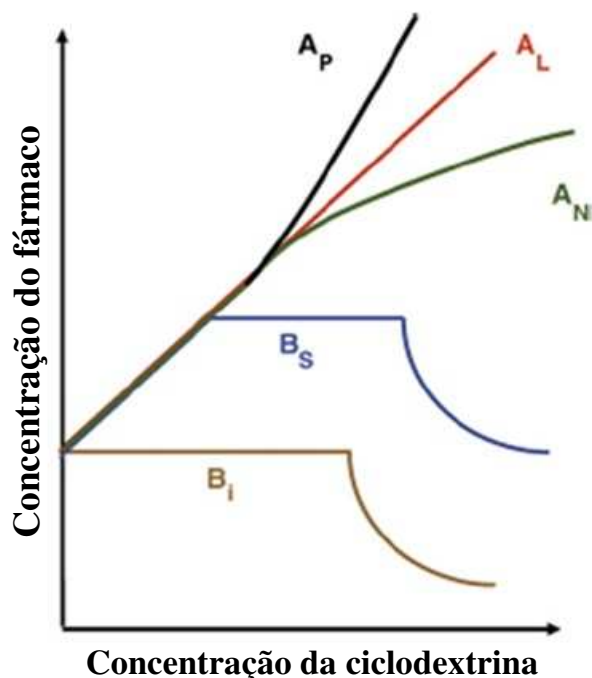


Figura 5. Representação gráfica do perfil de solubilidade de fase dos tipos A e B com seus subtipos (A_P , A_L , A_N e B_S , B_I). Adaptado de (10).

Os diagramas de solubilidade de fase são classificados em tipos A e B. Os do tipo A correspondem à formação de complexos solúveis e apresentam os subtipos A_L , onde a solubilidade da molécula hóspede aumenta linearmente com aumento da concentração da CD, A_P com desvio positivo e A_N com desvio negativo. Os diagramas lineares resultam da formação de complexos de primeira ordem em relação à CD e de ordem 1 ou superior em relação à molécula hóspede. Se a inclinação da reta for inferior a 1, geralmente é assumida estequiometria 1:1, apesar de não se excluir a presença de complexos de ordem superior. Os diagramas do tipo B correspondem à formação de complexos com solubilidade limitada como no tipo B_S ou insolúveis como no tipo B_I (9) e (10).

A partir desse diagrama, a constante de equilíbrio de associação (K_c) é calculada pela equação (1), onde a inclinação é o coeficiente angular da reta e S_0 é o intercepto.

$$K_c = \frac{\textit{inclinação}}{[S_0 (1-\textit{inclinação})]} \quad (1)$$

A constante de equilíbrio de associação é um parâmetro importante na avaliação das interações entre a ciclodextrina e a molécula hóspede e a aplicação prática do complexo de inclusão, onde valores baixos de K_c indicam interação fraca entre os componentes resultando em rápida liberação da molécula hóspede. Por outro lado, valores altos de K_c indicam formação de complexos bastante estáveis e que podem levar a uma liberação lenta ou incompleta da molécula hóspede (22).

A análise dos espectros de absorção na região do UV/Vis obtidos no estudo de solubilidade de fase fornece evidências da formação do complexo de inclusão. A alta densidade eletrônica no interior da cavidade da ciclodextrina acarreta mudanças nas propriedades espectrais da molécula encapsulada. Como a ciclodextrina não absorve radiação UV/Vis, alterações no espectro da molécula hóspede, como deslocamento batocrômico e alargamento da banda de absorção, sugerem interação entre esta e a ciclodextrina (9) e (30).

A estequiometria do complexo de inclusão pode ser confirmada pelo método da variação contínua ou método de *Job*. Este método é baseado na variação de determinada propriedade físico-química da molécula hóspede que é monitorada em função da complexação. Técnicas espectroscópicas sensíveis a esta variação podem ser usadas no estudo. Empregando a espectroscopia de absorção UV/Vis, a variação da concentração da molécula hóspede, mantendo constante a soma das concentrações das espécies presentes na solução, faz com que a absorbância passe por um mínimo ou um máximo. Este mínimo ou máximo corresponde à concentração mais alta do complexo, a fração molar em que ocorre indica a estequiometria do complexo em solução (10).

1.4.2 – Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear tem se tornado o método mais importante na caracterização de complexos de inclusão, pois fornece informação detalhada das interações físico-químicas entre a ciclodextrina e a molécula hóspede e da geometria do complexo de inclusão. Além disso, esta técnica permite obter a população da molécula hóspede presente no complexo e a constante de equilíbrio de associação que pode ser comparada ao valor obtido por outra técnica, possibilitando assim compreensão do sistema supramolecular (31).

No experimento de RMN ^1H , os deslocamentos químicos (δ) dos prótons da molécula hóspede e hospedeira são monitorados. As interações na formação do complexo de inclusão alteram o microambiente dos prótons, devido aos efeitos de proteção ou desproteção, resulta em mudanças nesse parâmetro. Alterações significativas no deslocamento químico dos prótons localizados no interior da cavidade da ciclodextrina, H3 e H5, e dos prótons da molécula hóspede envolvidos nas interações podem ser observadas. Os maiores valores de deslocamento químico indicam a parte da molécula hóspede que está inserida na cavidade da ciclodextrina e em que extensão esta ocorre (29).

Evidências da geometria do complexo de inclusão pelo experimento *Rotating-frame Overhauser Effect Spectroscopy* (RMN ^1H ROESY 1D) podem ser obtidas. O método consiste na detecção do *Nuclear Overhauser Effect* (NOE). Este efeito é um fenômeno comum observado na espectroscopia de RMN e consiste na transferência de polarização de uma população de spin para outra, sendo observado entre prótons que estão próximos espacialmente à distância menor que 5 Å (32) e (33). No experimento de RMN ^1H ROESY 1D são detectadas interações dipolares entre os prótons H3 e H5, localizados no interior da cavidade da ciclodextrina, e os prótons da parte da molécula hóspede que está inserida na cavidade. Dessa forma, o

experimento de RMN ^1H ROESY 1D fornece evidências da formação do complexo de inclusão e da orientação da molécula do fármaco no interior desta cavidade (34).

A técnica *Diffusion Ordered Spectroscopy* (DOSY), baseada na medida do coeficiente de difusão das espécies presentes em solução, é empregada no estudo de complexos supramoleculares, onde os componentes apresentam coeficientes de difusão distintos. Medidas da difusão permitem obter evidências da formação do complexo, pois na presença do agente complexante o coeficiente de difusão da molécula hóspede tende a diminuir como resultado da formação do respectivo complexo. A partir do coeficiente de difusão, a constante de equilíbrio de associação e a população de complexo podem ser obtidas (33) e (35).

1.5 – CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO NO ESTADO SÓLIDO

1.5.1 – Análise Térmica

Os métodos de análise térmica, calorimetria diferencial de varredura (DSC) e análise termogravimétrica (TGA), são ferramentas analíticas bastante empregadas na investigação de complexos de inclusão no estado sólido e complementam os resultados observados por outras técnicas.

A calorimetria diferencial de varredura é utilizada na investigação do perfil térmico dos componentes livres, da mistura física e do complexo de inclusão. Evidências da formação do complexo são obtidas pela comparação dos perfis térmicos, podendo ser observadas alterações nos picos endotérmicos ou exotérmicos e variações na entalpia dos componentes devido à formação do complexo de inclusão (36) e (37). A análise termogravimétrica permite determinar as perdas de massa relacionadas a eventos físicos (mudança de estado de agregação

ou de estrutura cristalina) ou químicos (decomposição, combustão) dos componentes (9).

1.5.2 – Difractometria de Raios X (DRX)

A difratometria de raios X é empregada na investigação da estrutura cristalina dos complexos de inclusão devido à simplicidade e rapidez da técnica. Como nos métodos de análise térmica, a avaliação das alterações do padrão de difração de raios X dos componentes livres, da mistura física e do complexo é feita por comparação. O padrão de difração de raios X do complexo de inclusão pode apresentar redução na intensidade dos picos, desaparecimento de picos, aparecimento de novos picos de difração ou a presença de bandas de dispersão que podem estar relacionadas à amorfização da molécula hóspede e também à formação do complexo de inclusão (22) e (38).

A presença de estrutura amorfa observada na formação do complexo depende do método de preparo do complexo de inclusão, sendo que a liofilização geralmente leva à obtenção de complexo amorfo (39). No entanto, o emprego desse método também leva à amorfização da molécula hóspede. Assim, a técnica não permite diferenciar se a ausência de cristalinidade é devido à formação do complexo de inclusão ou uma mistura homogênea dos componentes no estado amorfo (40). Além disso, o preparo da mistura física sem o devido cuidado, ou seja, macerando os componentes da mesma também pode levar à amorfização da estrutura dos componentes. Portanto, a difratometria de raios X fornece resultados complementares aos obtidos por outras técnicas (22).

1.5.3 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura é usada na observação dos aspectos morfológicos dos componentes livres, da mistura física e do complexo de inclusão (22).

1.6 – MODELAGEM MOLECULAR

Interações entre a ciclodextrina e a molécula hóspede podem ser simuladas mediante uso da Química Computacional. A modelagem molecular permite obter a geometria tridimensional do complexo de inclusão com energia mínima. Métodos semi-empíricos, que mesclam teoria com resultados experimentais, são usados na construção da estrutura do complexo de inclusão devido ao custo computacional relativamente baixo quando comparado aos cálculos *ab-initio* (41) e (42).

A geometria obtida pode ser confrontada com aquela sugerida pelos experimentos de ressonância magnética nuclear fornecendo melhor compreensão das interações entre a ciclodextrina e a molécula hóspede e possibilitam complementar e enriquecer o entendimento do sistema em estudo (43).

CAPÍTULO II
OBJETIVOS

CAPÍTULO II - OBJETIVOS

Este projeto de pesquisa teve como objetivo geral preparar o complexo de inclusão do fármaco imunomodulador Imiquimod em β -ciclodextrina, utilizando o método da liofilização, visando, no futuro, a incorporação do mesmo em uma forma farmacêutica constituindo um sistema alternativo à forma convencional para aplicação tópica. Os objetivos específicos do projeto são:

(a) Caracterizar o complexo de inclusão em solução empregando as técnicas espectroscópicas de ressonância magnética nuclear e espectroscopia de absorção UV/Vis, obtendo assim a constante de equilíbrio de associação, a eficiência de complexação (E.C.), a estequiometria do complexo de inclusão, a fração do Imiquimod encapsulada e evidências da geometria do complexo de inclusão;

(b) Caracterizar o complexo de inclusão no estado sólido utilizando análises térmicas (análise termogravimétrica e calorimetria diferencial de varredura), difratometria de raios X e microscopia eletrônica de varredura. Obter evidências da formação do complexo a partir de alterações observadas no perfil térmico, no padrão de difração de raios X e na estrutura cristalina do complexo formado;

(c) Obter a estrutura tridimensional do complexo de inclusão por modelagem molecular. Comparar a geometria obtida pelo cálculo teórico com os resultados experimentais.

CAPÍTULO III
MATERIAIS E MÉTODOS

CAPÍTULO III - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – MATERIAIS

3.1.1 – Reagentes

- Acetato de sódio anidro P.A., Synth, lote 170761;
- Ácido acético glacial P.A. – A.C.S., Synth, lote 89065;
- Ácido cítrico anidro, Synth, lote 169270;
- Ácido clorídrico, J.T. Baker, lote G08C02;
- Álcool etílico 95% P.A. – A.C.S., Synth, lote 155147;
- β -ciclodextrina, Cavamax W7 Pharma Betadex, ISP Technologies, lote 70P347;
- Carboximetilcelulose de sódio, Ashland, lote 99482;
- Cloreto de sódio, Chemco, lote 012562;
- Fosfato de sódio monobásico anidro P.A., Synth, lote 121966;
- Fosfato dissódico heptahidratado, Ecibra, lote 4844;
- Imiquimod, EMS Sigma Pharma, sem lote;
- Nicotinamida, Fluka BioChemika, lote 72340;
- Polietilenoglicol 400 (Kollisolv), Basf, lote 90967309T0;
- Tris(hidroximetil) amino metano P.A., Vetec, lote 0805008;
- Uréia, CAQ, lote 98091621.

3.1.2 – Equipamentos

- Agitador de tubos Phoenix, modelo AP-22;
- Analisador termogravimétrico TA Instruments, modelo 2050;

- Balança analítica Marte, modelo AW220;
- Balança analítica Shimadzu, modelo AUY220;
- Calorímetro diferencial de varredura TA Instruments, modelo 2910;
- Difratorômetro Shimadzu (DRX-6000);
- Equipamento de desionização de água Milli-Q, modelo Académic A10;
- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear Bruker, modelo Avance 400 MHz;
- Espectrofotômetro UV/Vis Varian, modelo Cary 50 Probe;
- Liofilizador Liotop K105;
- Microscópio Eletrônico de Varredura, modelo JSM-6360 LV;
- pHmetro Micronal, modelo B474;
- Unidade filtrante HV Millex 0,45 μm .

3.2 – MÉTODOS

3.2.1 – Espectros de absorção UV/Vis do Imiquimod em diferentes pHs

O espectro de absorção do Imiquimod foi obtido em água, em solução tampão acetato pH 5,6, tampão fosfato pH 7,4 e tampão tris pH 9,0. Os tampões foram preparados na concentração 50 mM e força iônica 0,1 M. Solução de concentração 1,0 mM de Imiquimod foi preparada em etanol e diluída em 2,0 mL de água ou solução tampão e analisada no espectrofotômetro UV/Vis a 25°C para determinar os comprimentos de onda de absorção máxima (λ_{max}) e a influência do pH no espectro de absorção do fármaco.

3.2.2 – Determinação do coeficiente de absorvidade molar (ϵ) do Imiquimod

O coeficiente de absorvidade molar do Imiquimod foi determinado em água, solução tampão acetato pH 5,6, tampão fosfato pH 7,4, tampão tris pH 9,0 e solução de ácido cítrico pH 3,0. Solução de Imiquimod na concentração 3,0 mM em etanol foi usada nas análises. Os tampões foram preparados como descrito no item 3.2.1. As diluições foram realizadas diretamente na cubeta, onde as seguintes faixas de volume da solução de Imiquimod foram empregadas: (a) 10-100 μ L para a solução aquosa; (b) 5-60 μ L para o tampão acetato pH 5,6; (c) 10-60 μ L para o tampão fosfato pH 7,4; (d) 5-40 μ L para o tampão tris pH 9,0; (e) 5,5-22 μ L para a solução de ácido cítrico pH 3,0. A faixa de concentração do Imiquimod em cada meio foi: (a) 0,0149-0,1430 mM para a solução aquosa; (b) 0,0075-0,0874 mM para o tampão acetato pH 5,6; (c) 0,0149-0,0874 mM para o tampão fosfato pH 7,4; (d) 0,0075-0,0588 mM para o tampão tris pH 9,0; (e) 0,0082-0,0326 mM para a solução de ácido cítrico pH 3,0. As medidas foram realizadas em duplicata e o volume total na cubeta foi 2 mL.

3.2.3 – Avaliação do efeito do tampão sobre a solubilidade do Imiquimod na ausência e na presença de β -ciclodextrina

A solubilidade do Imiquimod foi avaliada em água e solução tampão acetato pH 5,6, tampão fosfato pH 7,4 e tampão tris pH 9,0 na presença de quantidades crescentes de β -ciclodextrina. O teste foi realizado para analisar a influência do pH e da presença de β -ciclodextrina na solubilidade do Imiquimod, e também para definir a faixa de concentração da β -ciclodextrina a ser empregada no estudo de

solubilidade de fase do Imiquimod. O experimento foi realizado seguindo o procedimento descrito a seguir.

Quantidade em excesso de Imiquimod (10 mg) foi pesada em tubos de ensaio de 20 mL. Uma solução de β -ciclodextrina foi preparada na concentração de 12 mM e as devidas diluições foram realizadas diretamente nos tubos de ensaio contendo Imiquimod para obter solução com β -ciclodextrina nas concentrações 0 mM, 4 mM, 8 mM e 12 mM. O volume total de cada solução foi de 10 mL. Em seguida, os tubos foram envolvidos em papel alumínio para proteção contra a luz.

As soluções foram deixadas em agitação por 24 h a 25 °C para atingir o estado de equilíbrio. Finalizada a agitação, 6 mL de cada solução foram filtrados em filtro Millex 0,45 μ m. Em seguida, cada amostra filtrada foi analisada no espectrofotômetro UV/Vis para determinar a absorbância do Imiquimod nos comprimentos de onda máximo (λ_{max}) em 226 e 244 nm. As soluções foram diluídas diretamente na cubeta, com exceção das amostras em água e solução tampão tris pH 9,0 que foram analisadas sem diluição, sendo que o volume total na cubeta foi 2 mL. Foi usada a diluição 150 μ L: 1850 μ L para a solução em tampão acetato pH 5,6 e 1000 μ L:1000 μ L, para a solução em tampão fosfato pH 7,4.

Devido à solubilidade limitada do Imiquimod nos meios em estudo, um terceiro componente foi avaliado para aumentar a solubilidade aquosa do fármaco. O método e os compostos testados são apresentados a seguir.

3.2.4 – Avaliação da solubilidade do Imiquimod na presença de cossolventes

Um terceiro componente foi testado para aumentar a solubilidade aquosa do Imiquimod na presença de β -ciclodextrina. Os experimentos foram realizados na razão molar 1:1 (β -ciclodextrina:Imiquimod). Quantidade de 7,6 mg de Imiquimod foi adicionada a um recipiente contendo 36 mg de β -ciclodextrina em 2 mL de água

deionizada. Os experimentos foram realizados empregando essas quantidades em duas condições: (a) sem etanol e sem aquecimento; e (b) com etanol e aquecendo a solução. É mencionada na descrição do experimento quando apenas uma das condições foi empregada ou alteração na condição. A quantidade do terceiro componente é indicada em cada experimento.

A nicotinamida e a uréia são empregadas como agentes hidrotrópicos. Estes possuem a capacidade de aumentar a solubilidade de compostos pouco solúveis em água, de forma que, a solubilidade do Imiquimod na presença de β -ciclodextrina foi avaliada em solução aquosa contendo 6 mg do agente hidrotrópico. Foi adicionado à solução 0,5 mL de etanol e a solução foi aquecida a 45 °C por 30 minutos (44).

Em outro experimento, o efeito sinérgico do polietilenoglicol (PEG-400) e da β -ciclodextrina na solubilidade do Imiquimod foi avaliado. A quantidade de 0,5 mL de PEG-400 foi adicionada à solução contendo Imiquimod e β -ciclodextrina. A solução contendo 0,5 mL de etanol foi aquecida a 45 °C por 30 minutos (45). O efeito combinado da presença do polímero carboximetilcelulose de sódio (NaCMC) e da β -ciclodextrina na solubilidade do fármaco também foi avaliado. A quantidade de 5 mg do polímero foi testada, posteriormente 0,5 mL de etanol foi adicionado à solução e esta foi aquecida a 45 °C por 30 minutos (46) e (47).

O Imiquimod sendo uma base fraca apresenta solubilidade maior em meio ácido (7), de forma que, a solubilidade do fármaco em solução aquosa contendo β -ciclodextrina foi avaliada na presença de solução de ácido cítrico pH 3,0. Foi empregada a razão molar 1:1:1 (β -ciclodextrina:Imiquimod:ácido cítrico) no experimento em um volume de 1,3 mL de água e 3 mL de etanol. Este experimento também foi realizado com a β -ciclodextrina na concentração de 16 mM. O experimento foi repetido sem adição de etanol. Ambos os experimentos foram realizados sem aquecimento.

A solubilidade do Imiquimod foi avaliada também em solução tampão citrato pH 3,0 apenas na condição (a). Outro experimento foi realizado em solução de

10,5 mL de álcool etílico 95% e ácido clorídrico (razão 9,5:1), sem aquecimento (48). Os resultados dos experimentos foram comparados aos resultados do experimento em solução de ácido cítrico pH 3,0.

Após a seleção do ácido cítrico como terceiro componente, estudo da solubilidade do Imiquimod foi realizado em solução de ácido cítrico pH 3,0 e solução tampão acetato pH 5,6 e tampão fosfato pH 7,4.

3.2.5 – Estudo de solubilidade de fase do Imiquimod em solução de ácido cítrico pH 3,0, solução tampão acetato pH 5,6 e tampão fosfato pH 7,4

O estudo de solubilidade de fase é a primeira ferramenta a fornecer evidências da formação do complexo em solução (49). A partir dos resultados obtidos no primeiro teste de solubilidade e na avaliação do terceiro componente, ácido cítrico, as soluções tampão acetato pH 5,6, tampão fosfato pH 7,4 e a solução de ácido cítrico pH 3,0 foram selecionadas para avaliar a solubilidade do Imiquimod na presença de quantidades crescentes de β -ciclodextrina. Neste experimento, a concentração de β -ciclodextrina variou de 0 mM à 16 mM, com incremento de 2 mM entre cada concentração usada. No experimento com solução de ácido cítrico foi usada a razão molar 1:1 (ácido cítrico:Imiquimod). As amostras foram preparadas em duplicata, seguindo o procedimento descrito no primeiro teste. Na leitura da absorbância ($\lambda_{\text{max}} = 226$ e 244 nm) foi utilizada a diluição 10 μL : 2000 μL para a solução de ácido cítrico pH 3,0, 100 μL : 1900 μL para a solução tampão acetato pH 5,6 e 1000 μL :1000 μL para a solução tampão fosfato pH 7,4. Os estudos de solubilidade de fase foram realizados empregando o método previamente reportado por Higuchi & Connors (28). A curva analítica obtida mediante análise espectrofotométrica foi empregada no cálculo da concentração do

Imiquimod. Os valores de absorbância foram convertidos em concentração utilizando o coeficiente de absorvidade molar calculado pela curva analítica. A partir do gráfico da concentração do Imiquimod pela concentração da β -ciclodextrina obteve-se o diagrama de solubilidade e a constante de equilíbrio de associação foi calculada pela equação 1, onde a inclinação é o coeficiente angular da reta e S_0 é o intercepto.

$$K_c = \frac{\textit{inclinação}}{[S_0 (1-\textit{inclinação})]} \quad (1)$$

O diagrama pode ser classificado como do tipo A ou B, onde A corresponde à formação de complexos solúveis e B à formação de complexos insolúveis. Os complexos do tipo A são subdivididos em A_L , A_P e A_N e classificam os diagramas como lineares, com desvio positivo e desvio negativo, respectivamente. Os diagramas lineares resultam da formação de complexo de inclusão de ordem 1 em relação à ciclodextrina e de ordem 1 ou superior em relação à molécula hóspede (22).

3.2.6 – Determinação da estequiometria do complexo β CD:IMQ

A estequiometria do complexo β CD:IMQ foi confirmada pelo método da variação contínua ou método de *Job*, onde quantidades equimolares da solução de Imiquimod e da solução de β -ciclodextrina foram solubilizadas e analisadas por espectrometria de absorção UV/Vis nos comprimentos de onda de absorção máxima (λ_{max}) em 226 e 244 nm, a 25 °C. Solução de Imiquimod na concentração de 3,0 mM foi preparada em etanol, contendo a mesma razão molar de ácido cítrico. O volume de 500 μ L dessa solução foi diluído em água deionizada para

obter 50 mL de uma solução de Imiquimod na concentração de 0,03 mM. Solução de β -ciclodextrina na concentração de 0,03 mM foi preparada em água deionizada. Os volumes de cada solução foram calculados para se ter frações molares do Imiquimod de 0 a 1,0. As leituras da absorbância foram realizadas em duplicata. A estequiometria do complexo β CD:IMQ foi obtida pelo gráfico de *Job*, onde no eixo y foi plotada a diferença da absorbância entre a solução contendo a mistura de β -ciclodextrina e Imiquimod e a solução contendo apenas Imiquimod multiplicada pela fração molar do Imiquimod e no eixo x foi plotada a fração molar do fármaco. A fração molar correspondente ao máximo da curva indica a estequiometria do complexo de inclusão.

3.2.7 – Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

As amostras dos componentes individuais e do complexo β CD:IMQ foram analisadas na concentração de 26 mM em D₂O ou DMSO-d₆. As condições do experimento de RMN de ¹H foram: temperatura 25 °C, tempo de aquisição 1,992 s, tempo de relaxação de 1,000 s e 64 repetições. Os espectros do ácido cítrico, da β -ciclodextrina e do complexo de inclusão foram referenciados pelo deslocamento químico da D₂O (4,71 ppm) e o espectro do Imiquimod foi referenciado pelo deslocamento químico do DMSO-d₆ (2,50 ppm). Os espectros foram processados e analisados no *software TopSpin*.

Os deslocamentos químicos dos prótons do grupo imidazoquinolina do Imiquimod foram atribuídos usando o experimento *COrrrelation Spectroscopy* (COSY). O espectro COSY foi obtido empregando a programação de pulso *cosygpqf*, tempo de relaxação 1,0 s, 1024 pontos na dimensão F2 e 256 pontos na dimensão F1, 2 transientes e 16 *dummy scans*. O espectro foi processado no *software TopSpin*.

A sequência de pulso selrogp.2 foi empregada nos experimentos de RMN ^1H ROESY 1D, realizados a 25 °C com os parâmetros de aquisição TD 32k, tempo de espera de reciclagem (d1) 5 s, tempo de mistura (p15) 400 ms e 512 repetições. Os espectros foram processados com alargamento de linha (lb) 3,0 Hz no *software TopSpin*.

Os experimentos DOSY foram realizados empregando a sequência de pulso *oneshot*, onde foram ajustados os parâmetros: (a) tempo de difusão Δ (d20), 60 ms, (intervalo entre a aplicação dos pulsos de gradiente); (b) tempo de aplicação do gradiente de campo δ (p30), 1500 μs ; (c) tempo de espera para recuperar gradiente (d16), 200 μs ; (d) potência do gradiente de campo g, 10 e 80%, com 16 amplitudes diferentes. Todos os experimentos foram realizados a 25 °C e com 16 repetições. Os espectros foram processados no *software DOSY Toolbox* (50).

Para os experimentos RMN ^1H e RMN ^1H ROESY 1D, o complexo $\beta\text{CD}:\text{IMQ}$ foi preparado na razão molar 1:1:1 (β -ciclodextrina:ácido cítrico:Imiquimod) conforme descrito a seguir. A quantidade de 500 mg de β -ciclodextrina foi adicionada em béquer contendo 92 mL de água deionizada. Após solubilizar a β -ciclodextrina, a quantidade de 85 mg de ácido cítrico foi adicionada à solução. Em seguida, 106 mg do Imiquimod foram adicionados e a solução foi submetida à agitação magnética por 15 minutos. A solução foi filtrada em filtro Millex 0,45 μm . O filtrado foi liofilizado por 72 horas. O complexo liofilizado foi solubilizado em D_2O para realização das medidas. O complexo de inclusão também foi caracterizado no estado sólido por análise termogravimétrica e calorimetria diferencial de varredura, difração de raios X e microscopia eletrônica de varredura.

As amostras para o experimento DOSY foram preparadas em 1 mL de D_2O . Em tubos *ependorf* contendo 5 mg de Imiquimod e 4 mg de ácido cítrico (razão molar 1:1) foram adicionadas quantidades crescentes de β -ciclodextrina. As concentrações de β -ciclodextrina usadas no experimento foram 0 mM, 4 mM, 8 mM, 12 mM e 16 mM. As soluções foram centrifugadas a 14.000 rpm por 5

minutos. Em seguida, as amostras foram transferidas para tubos de ressonância de 5 mm de diâmetro e levadas para análise.

3.2.8 – Análises Térmicas

As curvas de TGA do ácido cítrico, do Imiquimod, da β -ciclodextrina, do complexo β CD:IMQ, da mistura física β -ciclodextrina e Imiquimod e da mistura física ácido cítrico, β -ciclodextrina e Imiquimod foram obtidas no intervalo de temperatura 25-600 °C, à taxa de aquecimento 10 °C min⁻¹ e atmosfera inerte.

As curvas de DSC dos componentes individuais, do complexo β CD:IMQ e das misturas físicas foram obtidas usando quantidades entre 5-10 mg das amostras, em painéis de alumínio, a uma taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹ e atmosfera inerte. As curvas de DSC do Imiquimod, da β -ciclodextrina e da mistura física Imiquimod e β -ciclodextrina foram obtidas no intervalo de temperatura 25-350 °C e as curvas de DSC do ácido cítrico, do complexo β CD:IMQ e da mistura física ácido cítrico, β -ciclodextrina e Imiquimod foi obtida no intervalo de temperatura 25-250 °C.

As misturas físicas foram preparadas empregando razão molar 1:1 (β -ciclodextrina:Imiquimod) ou 1:1:1 (ácido cítrico: β -ciclodextrina:Imiquimod) misturando os componentes por 2 minutos.

3.2.9 – Difractometria de Raios X

O difratograma do Imiquimod, da β -ciclodextrina, do ácido cítrico, do complexo β CD:IMQ e da mistura física foi adquirido usando radiação de Cu-K α (1,5406 Å), voltagem 40 kV, corrente 30 mA e 2θ no intervalo 5-50°.

3.2.10 – Microscopia Eletrônica de Varredura

O ácido cítrico, a β -ciclodextrina, o Imiquimod, a mistura física e o complexo β CD:IMQ foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras foram fixadas em suportes metálicos com fitas de carbono dupla face. Em seguida, as amostras foram cobertas com uma fina camada de ouro sob vácuo. As fotomicrografias foram obtidas com aumento de 100x a 1300x.

3.2.11 – Modelagem Molecular

Interações entre a β -ciclodextrina e o Imiquimod foram simuladas computacionalmente empregando o método semi-empírico *Parametric Method 3* (PM3) e o *software* de modelagem molecular *General Atomic and Molecular Electronic Structure System* (GAMESS). A geometria molecular inicial do Imiquimod foi criada no *software* Molden, a partir dos comprimentos e ângulos de ligação padrão, sendo em seguida otimizada. A estrutura da β -ciclodextrina foi obtida no *DrugBank* (DB03995) e sua geometria também foi otimizada. A geometria do complexo β CD:IMQ foi obtida inserindo a estrutura otimizada do Imiquimod ao longo do eixo que passa através do centro da cavidade da β -ciclodextrina. Os cálculos foram realizados no vácuo e sem restrição de geometria. A orientação da inserção da molécula do Imiquimod no interior da cavidade da β -ciclodextrina teve como base os resultados do experimento RMN ^1H ROESY 1D. Os estudos foram realizados com o Imiquimod em sua forma neutra e também em sua forma ionizada.

CAPÍTULO IV
RESULTADOS E DISCUSSÃO

CAPÍTULO IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Espectros de absorção UV/Vis do Imiquimod em diferentes pHs

Os espectros de absorção do Imiquimod em água, tampão acetato pH 5,6, tampão fosfato pH 7,4 e tampão tris pH 9,0 apresentaram diferenças na intensidade. A Figura 6 mostra os espectros de absorção do Imiquimod (concentração de 0,0588 mM) em meios com acidez diferente, a 25 °C. Ele apresenta quatro bandas de absorção com máximos (λ_{max}) em 226, 244, 305 e 318 nm. Em estudo teórico sobre a estrutura eletrônica do Imiquimod, Zhao e colaboradores verificaram que a absorção em 244 nm é devida à presença do grupo amina que contribui com o sistema π conjugado (51).

Examinando os espectros pode-se observar que em 226 nm a absorbância máxima ocorre em tampão acetato pH 5,6. Em meio básico, a intensidade da banda diminui e o pico de absorção máxima neste comprimento de onda desaparece em tampão tris pH 9,0. Por outro lado, a absorção em 244 nm é observada em solução tampão tris pH 9,0 e a intensidade da banda aumenta com o aumento do pH. A variação da absorbância nesses dois comprimentos de onda indica que o fármaco ionizado contribui para o aumento da intensidade da mesma em 226 nm, sendo que em tampão pH 5,6 98,04% do fármaco está sob a forma ionizada. A intensidade do pico em 244 nm aumenta em meio básico, atingindo valor máximo em tampão tris pH 9,0. Nessas condições 1,96% do fármaco está sob a forma ionizada e 98,04% estão sob a forma neutra, de forma que se pode considerar que o fármaco neutro contribui para o aumento da absorbância neste comprimento de onda.

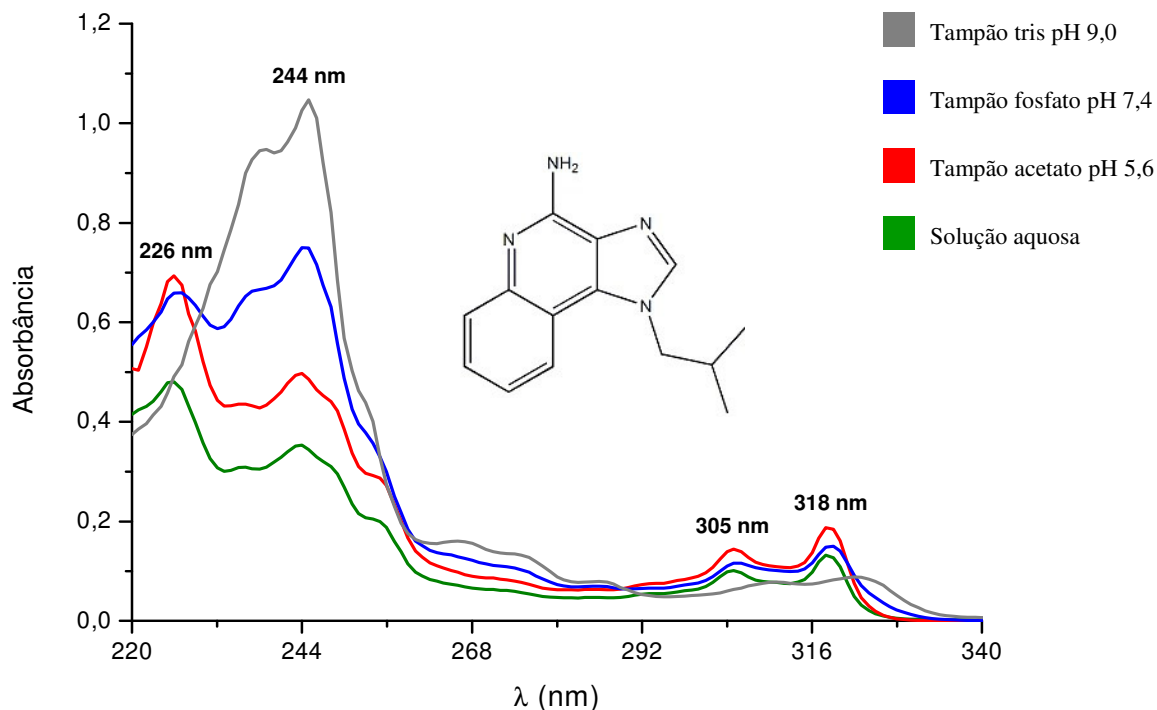


Figura 6. Espectros de absorção na região do UV/Vis do Imiquimod (concentração 0,0588 mM), a 25 °C.

Os comprimentos de onda 226 e 244 nm foram selecionados para quantificar o Imiquimod em meio aquoso, com base nos espectros de absorção (Figura 6) obtidos em água, tampão acetato pH 5,6, tampão fosfato pH 7,4 e tampão tris pH 9,0, pois dependendo da acidez da solução a absorbância máxima ocorre em 226 ou 244 nm.

No próximo item são apresentadas as curvas analíticas do Imiquimod das soluções em estudo, incluindo a curva analítica deste fármaco em solução de ácido cítrico pH 3,0, pois no desenvolvimento deste projeto foi verificado que o Imiquimod apresenta solubilidade maior nessa solução como será descrito no item 4.4.

4.2 – Determinação do coeficiente de absorvidade molar (ϵ) do Imiquimod

4.2.1 – Curva analítica do Imiquimod em solução aquosa

O coeficiente de absorvidade molar (ϵ) do Imiquimod em solução aquosa foi obtido em 226 e 244 nm, a 25 °C. As concentrações do fármaco, as absorbâncias obtidas, seus valores médios, os coeficientes de absorvidade molar e as equações de retas estão na Tabela 2. A curva analítica do Imiquimod relativa ao comprimento de onda 226 nm está na Figura 7. Os valores de \bar{A} apresentados neste item são a média (\pm desvio padrão).

Tabela 2. Concentrações do Imiquimod em solução aquosa, valores da absorbância obtidos em 226 e 244 nm, seus valores médios, coeficientes de absorvidade molar e as respectivas equações de reta.

[IMQ] mM	λ_{\max} (226 nm)			λ_{\max} (244 nm)		
	A ₁	A ₂	\bar{A}	A ₁	A ₂	\bar{A}
0,0149	0,1070	0,0992	0,1031 (\pm 0,0055)	0,0785	0,0727	0,0756 (\pm 0,0041)
0,0297	0,2148	0,2153	0,2150 (\pm 0,0003)	0,1564	0,1587	0,1575 (\pm 0,0017)
0,0588	0,4736	0,4872	0,4804 (\pm 0,0096)	0,3479	0,3585	0,3532 (\pm 0,0075)
0,0874	0,7208	0,7480	0,7344 (\pm 0,0193)	0,5319	0,5505	0,5412 (\pm 0,0132)
0,1150	0,9151	0,9660	0,9406 (\pm 0,0360)	0,6765	0,7123	0,6944 (\pm 0,0254)
0,1430	1,2346	1,2256	1,2301 (\pm 0,0063)	0,9266	0,9194	0,9230 (\pm 0,0051)
$\epsilon = 8.927,39 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ $y = - 0,0500 + 8,9274 x$ $R^2 = 0,9993$				$\epsilon = 6.691,86 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ $y = - 0,0386 + 6,6919 x$ $R^2 = 0,9990$		

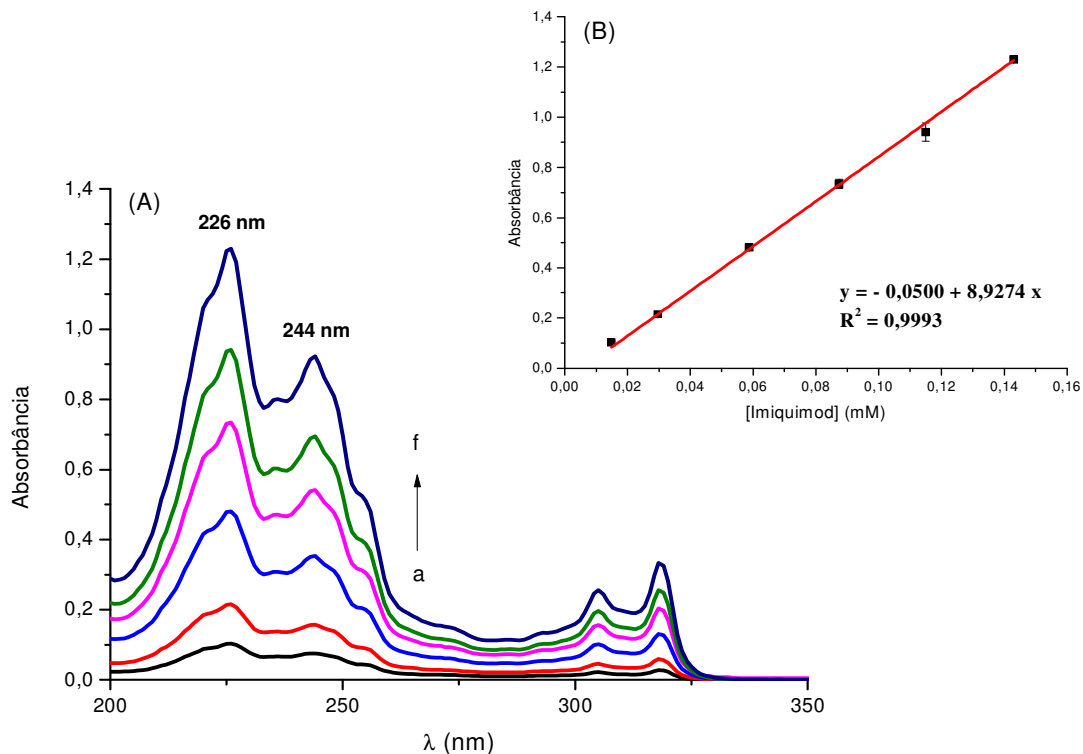


Figura 7. (A) Espectros de absorção na região do UV/Vis do Imiquimod em solução aquosa a 25 °C. (a) 0,0149 mM; (b) 0,0297 mM; (c) 0,0588 mM; (d) 0,0874 mM; (e) 0,1150 mM; (f) 0,1430 mM. (B) Curva analítica do Imiquimod em $\lambda = 226$ nm ($n = 2$).

4.2.2 – Curva analítica do Imiquimod em tampão acetato pH 5,6

O coeficiente de absorvidade molar do Imiquimod em tampão acetato pH 5,6 também foi obtido nos comprimentos de onda 226 e 244 nm a 25 °C. A Tabela 3 contém as concentrações do Imiquimod empregadas na obtenção da curva analítica, os valores das absorvâncias, seus valores médios, os coeficientes de absorvidade molar e as respectivas equações de reta.

Tabela 3. Concentrações do Imiquimod em tampão acetato pH 5,6, valores da absorvância em 226 e 244 nm, seus valores médios, coeficientes de absorvidade molar e as respectivas equações de reta.

[IMQ] mM	λ_{\max} (226 nm)			λ_{\max} (244 nm)		
	A ₁	A ₂	\bar{A}	A ₁	A ₂	\bar{A}
0,0075	0,0804	0,0444	0,0624 ($\pm 0,0255$)	0,0564	0,0560	0,0562 ($\pm 0,0003$)
0,0149	0,1872	0,2075	0,1974 ($\pm 0,0143$)	0,1096	0,1218	0,1157 ($\pm 0,0086$)
0,0297	0,3518	0,3608	0,3563 ($\pm 0,0064$)	0,2402	0,2488	0,2445 ($\pm 0,0061$)
0,0443	0,5208	0,5619	0,5413 ($\pm 0,0291$)	0,3729	0,3962	0,3846 ($\pm 0,0165$)
0,0588	0,6912	0,6963	0,6937 ($\pm 0,0036$)	0,4924	0,5024	0,4974 ($\pm 0,0070$)
0,0732	0,8712	0,8320	0,8516 ($\pm 0,0277$)	0,6347	0,6277	0,6312 ($\pm 0,0050$)
0,0874	1,0488	1,0479	1,0484 ($\pm 0,0007$)	0,7743	0,7729	0,7736 ($\pm 0,0010$)
$\epsilon = 12.102,32 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ $y = - 0,0096 + 12,1023 x$ $R^2 = 0,9994$				$\epsilon = 8.967,63 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ $y = - 0,0110 + 8,9676 x$ $R^2 = 0,9999$		

A curva analítica do Imiquimod para o comprimento de onda 226 nm está na Figura 8.

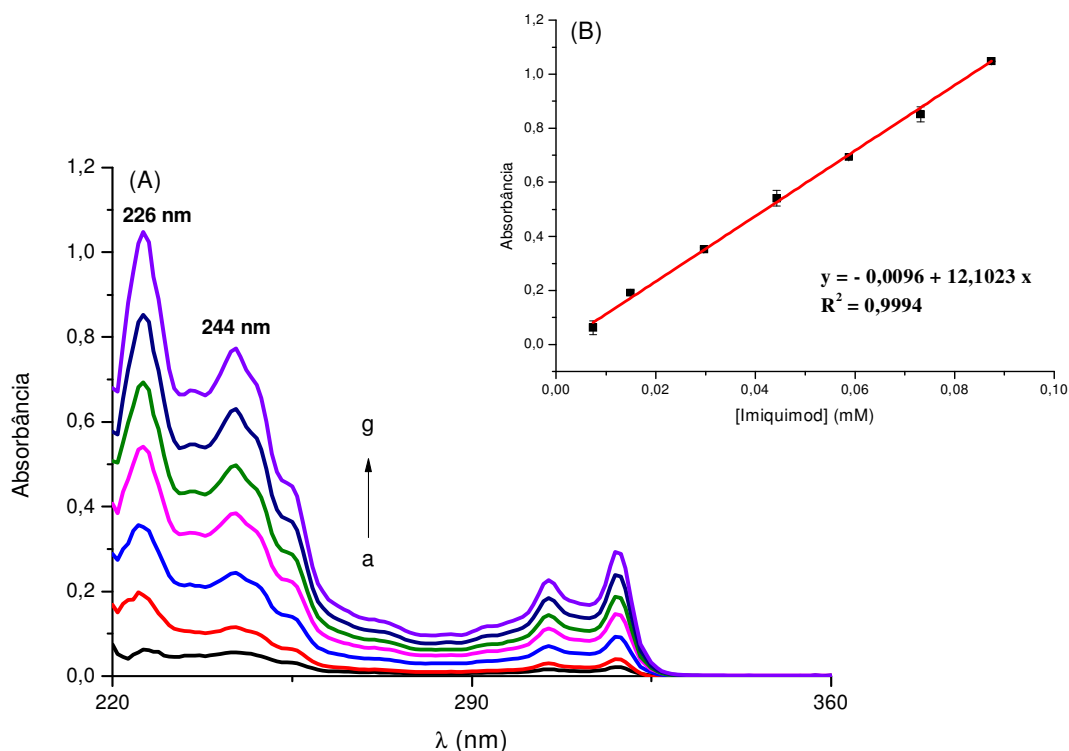


Figura 8. (A) Espectros de absorção na região do UV/Vis do Imiquimod em tampão acetato pH 5,6, a 25 °C. (a) 0,0075 mM; (b) 0,0149 mM; (c) 0,0297 mM; (d) 0,0443 mM; (e) 0,0588 mM; (f) 0,0732 mM; (g) 0,0874 mM. (B) Curva analítica do Imiquimod em $\lambda = 226$ (n = 2).

4.2.3 – Curva analítica do Imiquimod em tampão fosfato pH 7,4

A Tabela 4 mostra as concentrações do Imiquimod empregadas na obtenção da curva analítica, os valores das absorbâncias, seus valores médios, os coeficientes de absorvidade molar e as equações de reta nos comprimentos de onda 226 e 244 nm a 25 °C.

Tabela 4. Concentrações do Imiquimod em tampão fosfato pH 7,4, valores da absorvância em 226 e 244 nm, seus valores médios, coeficientes de absorvidade molar e as respectivas equações de reta.

[IMQ] mM	λ_{\max} (226 nm)			λ_{\max} (244 nm)		
	A ₁	A ₂	\bar{A}	A ₁	A ₂	\bar{A}
0,0149	0,1479	0,1689	0,1584 (\pm 0,0148)	0,1655	0,1875	0,1765 (\pm 0,0156)
0,0297	0,3167	0,3457	0,3312 (\pm 0,0205)	0,3548	0,3880	0,3714 (\pm 0,0235)
0,0443	0,4874	0,5122	0,4998 (\pm 0,0175)	0,5523	0,5776	0,5650 (\pm 0,0179)
0,0588	0,6660	0,6523	0,6592 (\pm 0,0097)	0,7594	0,7402	0,7498 (\pm 0,0135)
0,0732	0,8225	0,8326	0,8276 (\pm 0,0072)	0,9458	0,9557	0,9508 (\pm 0,0070)
0,0874	0,9628	1,0043	0,9836 (\pm 0,0294)	1,1111	1,1611	1,1361 (\pm 0,0353)
$\epsilon = 11.475,25 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ $y = - 0,0117 + 11,4752 x$ $R^2 = 0,9999$				$\epsilon = 13.315,02 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ $y = - 0,0246 + 13,3150 x$ $R^2 = 0,9998$		

A curva analítica do Imiquimod em 226 nm está na Figura 9.

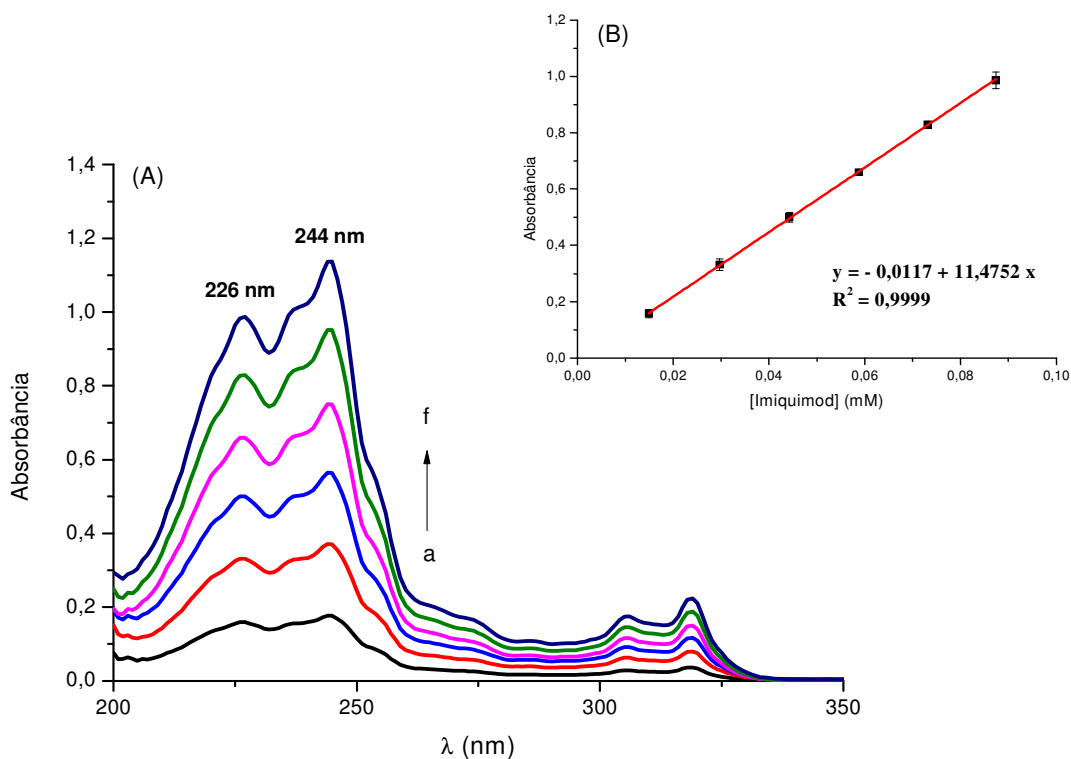


Figura 9. (A) Espectros de absorção na região do UV/Vis do Imiquimod em tampão fosfato pH 7,4, a 25 °C. (a) 0,0149 mM; (b) 0,0297 mM; (c) 0,0443 mM; (d) 0,0588 mM; (e) 0,0732 mM; (f) 0,0874 mM. (B) Curva analítica do Imiquimod em $\lambda = 226$ nm ($n = 2$).

4.2.4 – Curva analítica do Imiquimod em tampão tris pH 9,0

O coeficiente de absorvidade molar do Imiquimod em solução aquosa foi obtido em 244 nm, a 25 °C. As concentrações do fármaco usadas, as absorbâncias, seus valores médios, o coeficiente de absorvidade molar e a equação de reta estão na Tabela 5.

Tabela 5. Concentrações do Imiquimod em tampão tris pH 9,0, valores da absorvância em 244 nm, seus valores médios, o coeficiente de absorvidade molar e a equação de reta.

λ_{\max} (244 nm)			
[IMQ] mM	A ₁	A ₂	\bar{A}
0,0075	0,1385	0,1485	0,1435 (\pm 0,0070)
0,0149	0,2561	0,2580	0,2570 (\pm 0,0014)
0,0297	0,5087	0,5315	0,5201 (\pm 0,0161)
0,0370	0,6354	0,6710	0,6532 (\pm 0,0252)
0,0443	0,7762	0,7988	0,7875 (\pm 0,0160)
0,0516	0,9199	0,9291	0,9245 (\pm 0,0065)
0,0588	1,0366	1,0580	1,0473 (\pm 0,0151)

$\epsilon = 18.041,97 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
 $y = - 0,0110 + 18,0420 x$
 $R^2 = 0,9993$

A curva analítica do Imiquimod em 244 nm está na Figura 10.

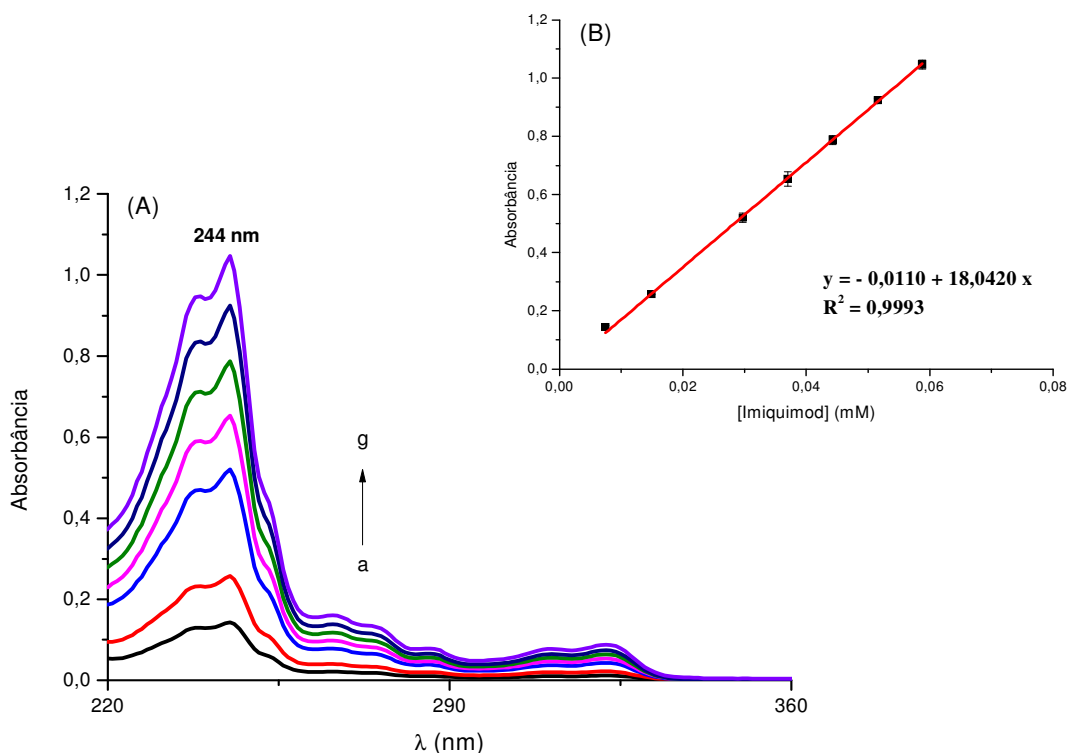


Figura 10. (A) Espectros de absorção na região do UV/Vis do Imiquimod em tampão tris pH 9,0, a 25 °C. (a) 0,0075 mM; (b) 0,0149 mM; (c) 0,0297 mM; (d) 0,0370 mM; (e) 0,0443 mM; (f) 0,0516 mM; (g) 0,0588 mM. (B) Curva analítica do Imiquimod em $\lambda = 244$ nm ($n = 2$).

4.2.5 – Curva analítica do Imiquimod em solução de ácido cítrico pH 3,0

O coeficiente de absorvidade molar do Imiquimod em solução de ácido cítrico pH 3,0 foi obtido em 226 e 244 nm a 25 °C. A Tabela 6 apresenta as concentrações do Imiquimod empregadas na obtenção da curva analítica, os valores das absorbâncias obtidos, seus valores médios, os coeficientes de absorvidade molar e as respectivas equações de reta.

Tabela 6. Concentrações do Imiquimod em solução de ácido cítrico pH 3,0, valores da absorbância em 226 e 244 nm, seus valores médios, coeficientes de absorvidade molar e as respectivas equações de reta.

[IMQ] mM	λ_{\max} (226 nm)			λ_{\max} (244 nm)		
	A ₁	A ₂	\bar{A}	A ₁	A ₂	\bar{A}
0,0082	0,2232	0,2165	0,2199 ($\pm 0,0048$)	0,1671	0,1647	0,1659 ($\pm 0,0017$)
0,0097	0,2712	0,2914	0,2813 ($\pm 0,0143$)	0,2033	0,2164	0,2101 ($\pm 0,0096$)
0,0149	0,5215	0,4787	0,5001 ($\pm 0,0303$)	0,3829	0,3470	0,3649 ($\pm 0,0254$)
0,0208	0,7647	0,7750	0,7698 ($\pm 0,0073$)	0,5356	0,5589	0,5473 ($\pm 0,0165$)
0,0266	0,9932	1,0619	1,0276 ($\pm 0,0485$)	0,7123	0,7577	0,7350 ($\pm 0,0321$)
0,0326	1,2328	1,3198	1,2763 ($\pm 0,0615$)	0,8834	0,9566	0,9200 ($\pm 0,0518$)
$\epsilon = 43.740,19 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ $y = - 0,1405 + 43,7402 x$ $R^2 = 0,9999$				$\epsilon = 30.584,42 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ $y = - 0,0859 + 30,5844 x$ $R^2 = 0,9998$		

A curva analítica do Imiquimod em 226 nm está mostrada na Figura 11.

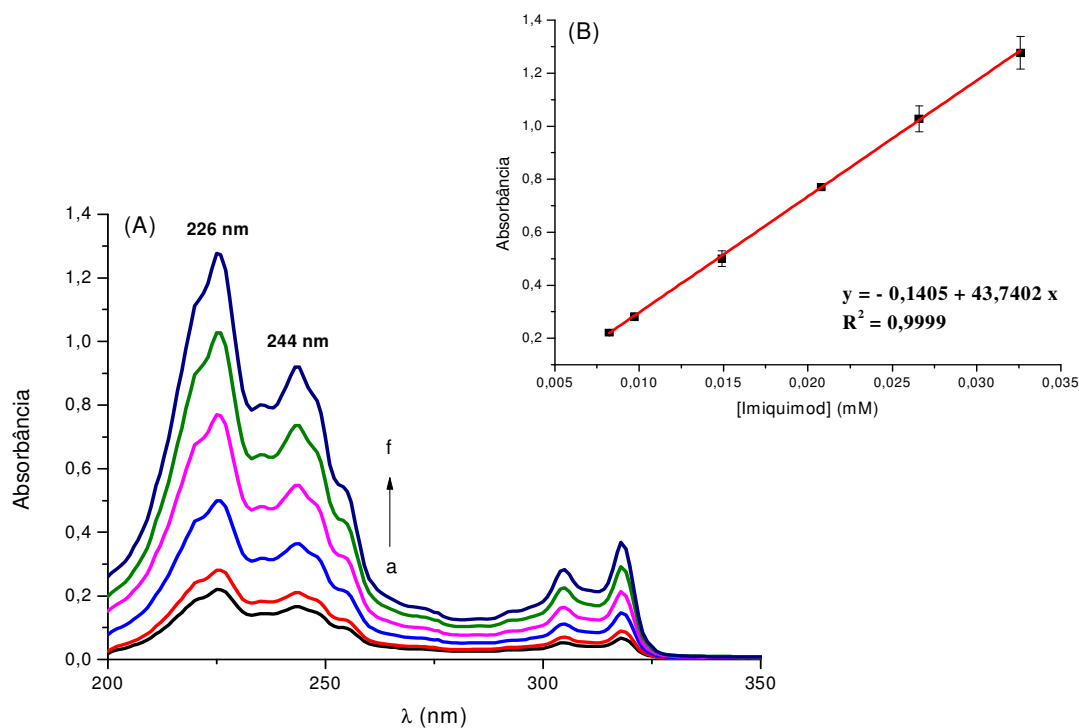


Figura 11. (A) Espectros de absorção na região do UV/Vis do Imiquimod em solução de ácido cítrico pH 3,0, a 25 °C: (a) 0,0082 mM; (b) 0,0097 mM; (c) 0,0149 mM; (d) 0,0208 mM; (e) 0,0266 mM; (f) 0,0326 mM. (B) Curva analítica do Imiquimod em $\lambda = 226$ nm ($n = 2$).

Estudo da solubilidade do Imiquimod em diferentes condições de pH foi realizado por Chollet e colaboradores que observaram baixa solubilidade do fármaco em solução aquosa (0,60 $\mu\text{g/mL}$). Em pH maior que 5 o Imiquimod apresenta perfil típico de base fraca. Em meio ácido, a solubilidade do Imiquimod aumentou à medida que o fármaco foi sendo convertido em sua forma ionizada. Entretanto, mesmo em solução extremamente ácida não foi possível solubilizar o Imiquimod em meio aquoso e obter concentração de 5% do fármaco (7). O perfil pH dependente da solubilidade do Imiquimod foi examinado na presença de quantidades crescentes de β -ciclodextrina. Os resultados são apresentados no próximo item.

4.3 – Avaliação do efeito do tampão sobre a solubilidade do Imiquimod na ausência e na presença de β -ciclodextrina

A avaliação da solubilidade do Imiquimod em água, tampão acetato pH 5,6, tampão fosfato pH 7,4 e tampão tris pH 9,0 na presença de quantidades crescentes de β -ciclodextrina mostrou diferença na solubilidade. A Tabela 7 contém os valores da absorbância obtidos na ausência e na presença de β -ciclodextrina nos meios em estudo.

Tabela 7. Valores da absorbância em 226 e 244 nm na presença de quantidades crescentes de β -ciclodextrina.

A ($\lambda_{\max} = 226 \text{ nm}$)				
[βCD] mM	Solução aquosa	Tampão acetato pH 5,6	Tampão fosfato pH 7,4	Tampão tris pH 9,0
0	0,4717	0,5647	0,1292	-
4	0,6647	0,6812	0,1892	-
8	0,7235	0,7821	0,2151	-
12	0,7346	0,9350	0,2677	-
A ($\lambda_{\max} = 244 \text{ nm}$)				
[βCD] mM	Solução aquosa	Tampão acetato pH 5,6	Tampão fosfato pH 7,4	Tampão tris pH 9,0
0	0,4438	0,3988	0,1497	0,2453
4	0,6553	0,4813	0,2061	0,2685
8	0,6639	0,5521	0,2362	0,2935
12	0,7539	0,6621	0,2969	0,3733

A Tabela 8 reporta a solubilidade do Imiquimod a 25 °C na ausência e na presença de β -ciclodextrina, em 226 e 244 nm.

Tabela 8. Solubilidade do Imiquimod a 25 °C em água, tampão acetato pH 5,6, tampão fosfato pH 7,4 e tampão tris 9,0 na ausência e na presença de β -ciclodextrina e incremento relativo (I.R.)^a na solubilidade.

λ_{\max} (226 nm)					
[β CD] mM	0	4	8	12	
	IMQ ^b	β CD:IMQ ^c	β CD:IMQ ^c	β CD:IMQ ^c	I.R. ^a
	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	
Solução aquosa	0,0127	0,0179	0,0195	0,0198	1,6
Tampão acetato pH 5,6	0,1495	0,1804	0,2071	0,2476	1,6
Tampão fosfato pH 7,4	0,0054	0,0079	0,0090	0,0112	2,1
Tampão tris pH 9,0	-	-	-	-	-
λ_{\max} (244 nm)					
[β CD] mM	0	4	8	12	
	IMQ ^b	β CD:IMQ ^c	β CD:IMQ ^c	β CD:IMQ ^c	I.R. ^a
	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	
Solução aquosa	0,0159	0,0235	0,0238	0,0271	1,7
Tampão acetato pH 5,6	0,1425	0,1720	0,1973	0,2366	1,7
Tampão fosfato pH 7,4	0,0054	0,0074	0,0085	0,0107	2,0
Tampão tris pH 9,0	0,0033	0,0036	0,0039	0,0049	1,5

^a I.R. = razão entre a solubilidade do Imiquimod na presença de β -ciclodextrina 12 mM e a solubilidade do fármaco livre.

^b IMQ = solubilidade do fármaco livre.

^c β CD:IMQ = solubilidade do fármaco na presença de β -ciclodextrina.

Na ausência de β -ciclodextrina o Imiquimod apresentou maior solubilidade em tampão acetato pH 5,6. Por outro lado, a solubilidade do fármaco foi menor em tampão fosfato pH 7,4 e tampão tris pH 9,0 quando comparada em tampão acetato pH 5,6 e solução aquosa. Analisando os resultados para o comprimento de onda em 244 nm, a solubilidade do Imiquimod em tampão acetato pH 5,6 foi 9 vezes maior que em solução aquosa. A solubilidade do fármaco em tampão acetato pH 5,6 foi 26 vezes maior se comparada à solubilidade em tampão fosfato pH 7,4 e 43 vezes maior se comparada à solubilidade em tampão tris pH 9,0.

Na presença de β -ciclodextrina a solubilidade do fármaco também foi maior em tampão acetato pH 5,6 e menor em tampão fosfato pH 7,4 e tampão tris pH 9,0 quando comparada à solubilidade em tampão acetato pH 5,6, seguindo a tendência observada na ausência de β -ciclodextrina. Avaliando o incremento relativo da solubilidade do fármaco nesses solventes, as soluções tampão acetato pH 5,6 e tampão fosfato pH 7,4 foram selecionadas para estudo mais detalhado da solubilidade do Imiquimod na presença de quantidades crescentes de β -ciclodextrina. Nessas duas soluções, o fármaco apresentou maior incremento relativo na solubilidade.

Entretanto, na preparação do complexo no estado sólido não foi possível obter quantidade suficiente do mesmo nesses dois meios que permitisse sua caracterização por ressonância magnética nuclear. Os fatores limitantes na obtenção do complexo no estado sólido foram o grande volume de etanol necessário no preparo da solução e o aquecimento a 70 °C por 30 minutos para solubilizar o Imiquimod, o qual causava a degradação do fármaco. Assim, um terceiro componente foi testado com objetivo de aumentar a solubilidade do Imiquimod, reduzir o volume de etanol e a necessidade de aquecimento.

4.4 – Avaliação da solubilidade do Imiquimod na presença de cossolventes

A solubilidade do Imiquimod foi avaliada na presença de um terceiro componente e os experimentos foram realizados em solução aquosa e na presença de β -ciclodextrina 16 mM.

No experimento com a nicotinamida o Imiquimod não solubilizou a 25 °C. Foi adicionado etanol e a solução foi aquecida a 45 °C durante 30 minutos, mas não foi observada a solubilização completa do fármaco.

A solubilidade do Imiquimod foi examinada na presença de uréia. O teste foi realizado na ausência e na presença de etanol e não houve aumento significativo na solubilidade do fármaco, mesmo quando a solução foi aquecida a 45 °C por 30 minutos.

Empregando PEG 400 e NaCMC como terceiro componente, a solubilidade do Imiquimod foi avaliada na presença de cada composto, não sendo observada solubilização completa em nenhuma solução, com e sem etanol.

O Imiquimod não solubilizou em solução tampão citrato pH 3,0. A quantidade de 25 mg do Imiquimod foi solubilizada em solução de álcool etílico 95% e ácido clorídrico. No entanto, o emprego de ácido cítrico como terceiro componente apresentou os melhores resultados, sendo solubilizado completamente o fármaco com emprego de etanol e sem aquecimento. Posteriormente, o complexo de inclusão com ácido cítrico foi preparado sem etanol e quantidade suficiente do complexo de inclusão foi obtida, sendo possível caracterizá-lo por ressonância magnética nuclear. Assim, o método de preparo do complexo de inclusão sem adição de etanol foi definido para obter o complexo β CD:IMQ.

Foi investigada a solubilidade do Imiquimod em solução aquosa, tendo como terceiro componente o ácido cítrico e na presença de quantidades crescentes de β -

ciclodextrina. Os resultados são apresentados no próximo item juntamente com os resultados do estudo realizado em tampão acetato pH 5,6 e tampão fosfato pH 7,4.

4.5 – Estudo de solubilidade de fase do Imiquimod em solução de ácido cítrico pH 3,0, solução tampão acetato pH 5,6 e tampão fosfato pH 7,4

A Figura 12 exhibe os espectros de absorção do Imiquimod em solução de ácido cítrico pH 3,0 a 25 °C na presença de quantidades crescentes de β -ciclodextrina e a isoterma de solubilidade. A Tabela 9 apresenta as concentrações de β -ciclodextrina usadas neste estudo, os valores da absorbância em 226 e 244 nm e seus valores médios.

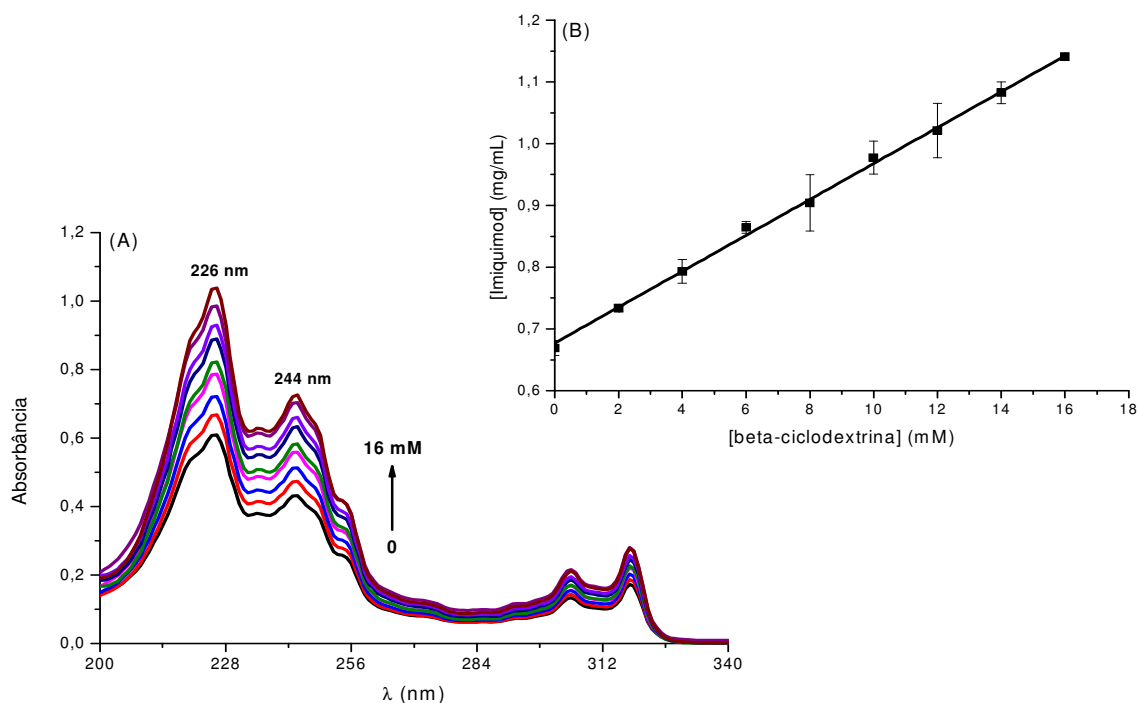


Figura 12. (A) Espectros de absorção na região do UV/Vis do Imiquimod em solução de ácido cítrico pH 3,0 na presença de concentrações crescentes de β -ciclodextrina, a 25 °C. (B) Isotherma de solubilidade do Imiquimod em $\lambda = 226$ nm ($n = 2$).

Tabela 9. Concentrações de β -ciclodextrina usadas no estudo de solubilidade em solução de ácido cítrico pH 3,0 a 25 °C, valores da absorvância em 226 e 244 nm e seus valores médios (desvio padrão entre parênteses).

[β CD] mM	λ_{\max} (226 nm)			λ_{\max} (244 nm)		
	A ₁	A ₂	\bar{A}	A ₁	A ₂	\bar{A}
0	0,6166	0,6009	0,6088 (\pm 0,0110)	0,4372	0,4268	0,4320 (\pm 0,0074)
2	0,6635	0,6719	0,6677 (\pm 0,0059)	0,4692	0,4782	0,4737 (\pm 0,0066)
4	0,7345	0,7095	0,7220 (\pm 0,0177)	0,5215	0,5038	0,5127 (\pm 0,0125)
6	0,7806	0,7932	0,7869 (\pm 0,0089)	0,5546	0,5620	0,5583 (\pm 0,0052)
8	0,8702	0,7574	0,8138 (\pm 0,0798)	0,6194	0,5393	0,5794 (\pm 0,0566)
10	0,9596	0,9213	0,9404 (\pm 0,0270)	0,6840	0,6559	0,6699 (\pm 0,0199)
12	0,9854	0,9522	0,9688 (\pm 0,0235)	0,7008	0,6783	0,6896 (\pm 0,0159)
14	0,9968	0,9740	0,9854 (\pm 0,0162)	0,7093	0,6964	0,7029 (\pm 0,0091)
16	0,9726	1,0920	1,0323 (\pm 0,0845)	0,6935	0,7792	0,7364 (\pm 0,0606)

Os espectros de absorção do Imiquimod em tampão acetato pH 5,6 a 25 °C na presença de quantidades crescentes de β -ciclodextrina e a isoterma de solubilidade do fármaco estão na Figura 13. A Tabela 10 mostra as concentrações de β -ciclodextrina usadas no estudo de solubilidade, os valores da absorvância em 226 e 244 nm e seus valores médios.

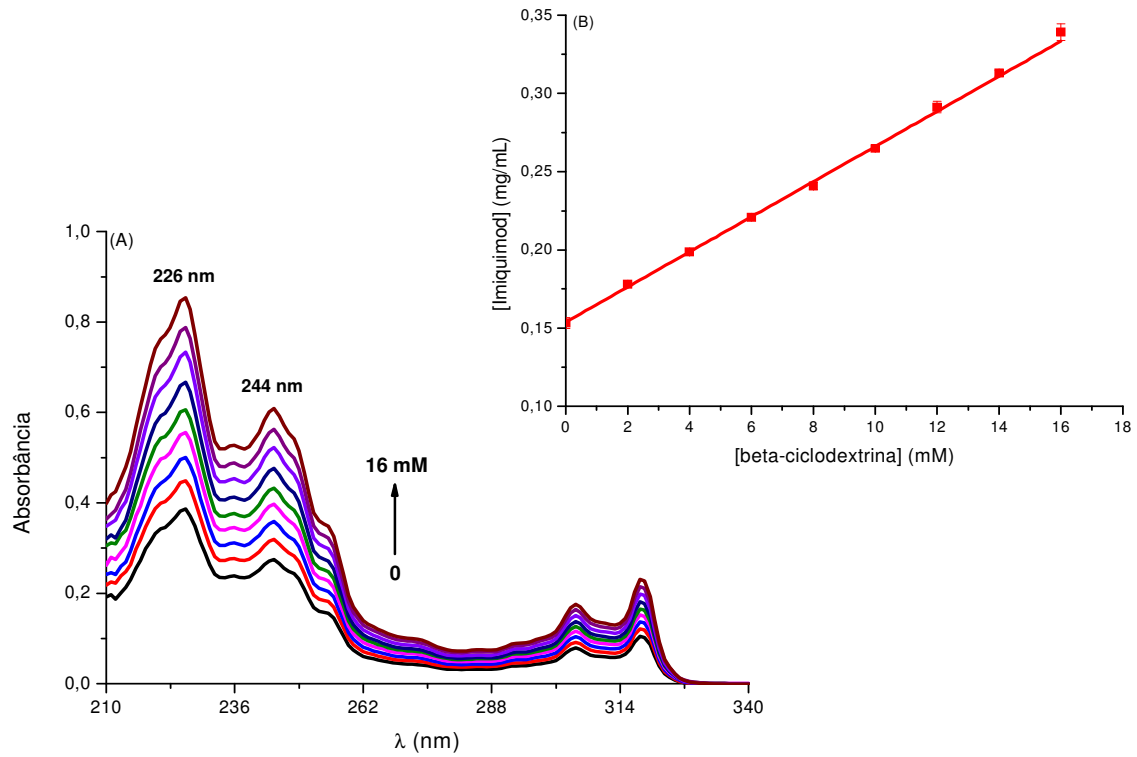


Figura 13. (A) Espectros de absorção na região do UV/Vis do Imiquimod em tampão acetato pH 5,6 na presença de concentrações crescentes de β -ciclodextrina, a 25 °C. (B) Isotherma de solubilidade do Imiquimod em $\lambda = 226$ nm ($n = 2$).

Tabela 10. Concentrações de β -ciclodextrina usadas no estudo de solubilidade em tampão acetato pH 5,6 a 25 °C, valores da absorbância em 226 e 244 nm e seus valores médios (desvio padrão entre parênteses).

[β CD] mM	λ_{max} (226 nm)			λ_{max} (244 nm)		
	A ₁	A ₂	\bar{A}	A ₁	A ₂	\bar{A}
0	0,3921	0,3796	0,3859 (\pm 0,0088)	0,2786	0,2709	0,2748 (\pm 0,0054)
2	0,4513	0,4456	0,4484 (\pm 0,0041)	0,3210	0,3173	0,3191 (\pm 0,0026)
4	0,4990	0,5020	0,5005 (\pm 0,0022)	0,3581	0,3595	0,3588 (\pm 0,0010)
6	0,5592	0,5526	0,5559 (\pm 0,0047)	0,4000	0,3946	0,3974 (\pm 0,0038)
8	0,6101	0,6025	0,6063 (\pm 0,0054)	0,4364	0,4298	0,4331 (\pm 0,0047)
10	0,6645	0,6690	0,6668 (\pm 0,0032)	0,4744	0,4780	0,4762 (\pm 0,0026)
12	0,7266	0,7400	0,7333 (\pm 0,0095)	0,5189	0,5266	0,5227 (\pm 0,0054)
14	0,7843	0,7915	0,7879 (\pm 0,0051)	0,5599	0,5664	0,5632 (\pm 0,0046)
16	0,8447	0,8632	0,8539 (\pm 0,0131)	0,6020	0,6169	0,6095 (\pm 0,0105)

A Figura 14 apresenta os espectros de absorção do Imiquimod em tampão fosfato pH 7,4 a 25 °C na presença de quantidades crescentes de β -ciclodextrina e a isoterma de solubilidade. A Tabela 10 contém as concentrações de β -ciclodextrina usadas no estudo de solubilidade, os valores da absorbância em 226 e 244 nm e seus valores médios.

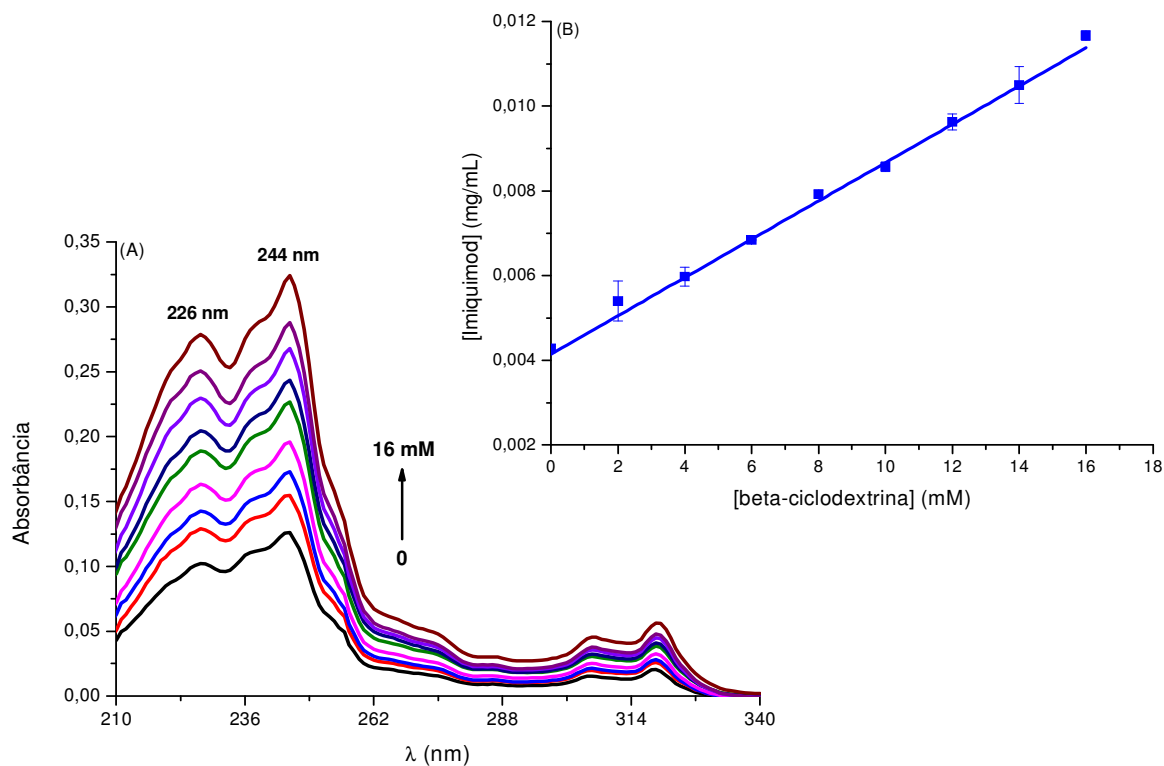


Figura 14. (A) Espectros de absorção na região do UV/Vis do Imiquimod em tampão fosfato pH 7,4 na presença de concentrações crescentes de β -ciclodextrina, a 25 °C. (B) Isotherma de solubilidade do Imiquimod em $\lambda = 226$ nm ($n = 2$).

Tabela 11. Concentrações de β -ciclodextrina usadas no estudo de solubilidade em tampão fosfato pH 7,4 a 25 °C, valores da absorbância em 226 e 244 nm e seus valores médios (desvio padrão entre parênteses).

[β CD] mM	λ_{max} (226 nm)			λ_{max} (244 nm)		
	A ₁	A ₂	\bar{A}	A ₁	A ₂	\bar{A}
0	0,1011	0,1031	0,1021 (\pm 0,0014)	0,1221	0,1298	0,1260 (\pm 0,0054)
2	0,1210	0,1370	0,1290 (\pm 0,0113)	0,1448	0,1648	0,1548 (\pm 0,0141)
4	0,1389	0,1464	0,1426 (\pm 0,0053)	0,1690	0,1767	0,1728 (\pm 0,0054)
6	0,1636	0,1631	0,1634 (\pm 0,0004)	0,1973	0,1946	0,1960 (\pm 0,0020)
8	0,1907	0,1876	0,1891 (\pm 0,0022)	0,2272	0,2262	0,2267 (\pm 0,0007)
10	0,2027	0,2065	0,2046 (\pm 0,0027)	0,2388	0,2482	0,2435 (\pm 0,0066)
12	0,2267	0,2331	0,2299 (\pm 0,0045)	0,2664	0,2693	0,2679 (\pm 0,0021)
14	0,2434	0,2581	0,2507 (\pm 0,0104)	0,2858	0,2900	0,2879 (\pm 0,0030)
16	0,2805	0,2766	0,2785 (\pm 0,0028)	0,3261	0,3220	0,3240 (\pm 0,0029)

Analisando os espectros de absorção do Imiquimod na região do UV/Vis em solução de ácido cítrico pH 3,0, tampão acetato pH 5,6 e tampão fosfato pH 7,4 (Figuras 12 à 14) pode-se observar que o aumento da concentração da β -ciclodextrina resultou no aumento a absorbância sem deslocamento dos comprimentos de onda 226 e 244 nm. Estas alterações podem ser consideradas como evidência de que o fármaco está sendo transferido de um meio polar para a cavidade apolar da β -ciclodextrina e resultam da perturbação da densidade eletrônica da molécula do fármaco devido à interação com a β -ciclodextrina, pela exclusão das moléculas de água da cavidade da β -ciclodextrina ou pelos dois fatores combinados (22).

A Figura 15 apresenta os espectros de absorção do Imiquimod em solução de ácido cítrico pH 3,0, tampão acetato pH 5,6 e tampão fosfato pH 7,4 na ausência e na presença de β -ciclodextrina 16 mM.

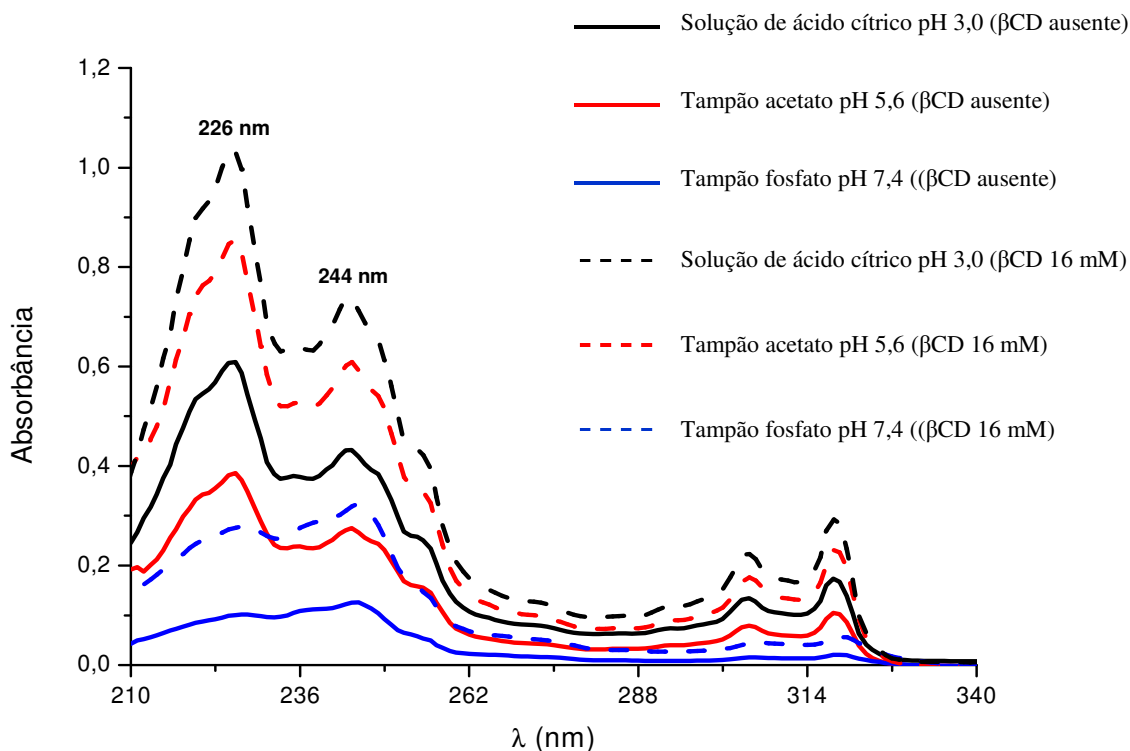


Figura 15. Espectros de absorção na região do UV/Vis do Imiquimod em solução de ácido cítrico pH 3,0, tampão acetato pH 5,6 e tampão fosfato pH 7,4 na ausência e na presença de β -ciclodextrina 16 mM.

As intensidades dos picos de absorção em 226 e 244 nm foi maior em solução de ácido cítrico pH 3,0 tanto na ausência quanto na presença de β -ciclodextrina 16 mM. Por outro lado, os menores valores de absorbância foram observados em tampão pH 7,4. Em solução de ácido cítrico pH 3,0 a absorbância aumentou 1,7 vezes na presença de β -ciclodextrina 16 mM e um aumento de 2,2 vezes foi observado em tampão pH 5,6.

O diagrama de solubilidade de fase do Imiquimod em solução de ácido cítrico pH 3,0, tampão acetato pH 5,6 e tampão fosfato pH 7,4 (Figuras 16) mostra

que a solubilidade do fármaco aumentou linearmente em função da concentração da β -ciclodextrina e no intervalo de concentração da β -ciclodextrina estudado, o diagrama de solubilidade pode ser classificado como do tipo A_L sugerindo que o complexo formado tem estequiometria 1:1 (22).

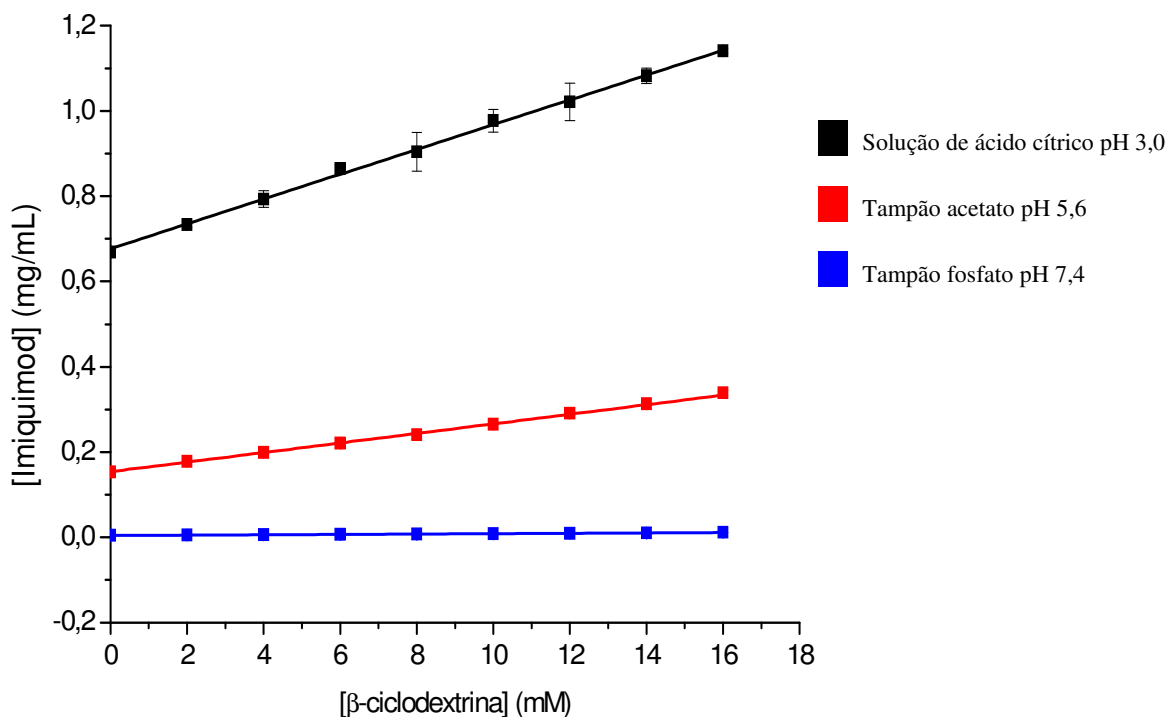


Figura 16. Isotermas de solubilidade do Imiquimod, a 25 °C, $\lambda = 226$ nm ($n = 2$).

Pode-se observar que a solubilidade do Imiquimod em solução de ácido cítrico pH 3,0 aumentou 4 vezes em relação à solubilidade em tampão acetato pH 5,6 e 156 vezes em relação à solubilidade em tampão fosfato pH 7,4. A solubilidade de uma base fraca (como Imiquimod cujo pKa é 7,3) aumenta exponencialmente com a diminuição do pH abaixo do seu pKa (22).

A formação simultânea do complexo com a ciclodextrina e do sal é empregada para melhorar a solubilidade de fármacos pouco solúveis (23) e (52). A adição de hidroxácidos, como o ácido cítrico, aumenta o efeito solubilizante da

ciclodextrina sobre fármacos básicos como resultado da formação de sal e da formação do complexo (18). Os resultados do estudo de solubilidade sugerem que o ácido cítrico e a β -ciclodextrina tem efeito sinérgico na solubilidade do Imiquimod e demonstram que a solubilidade do complexo de inclusão obtido é superior à do complexo obtido apenas pelo ajuste do pH (53). Quando presentes em concentrações elevadas, os hidroxiácidos aumentam a solubilidade aquosa da β -ciclodextrina e conseqüentemente aumentam a solubilidade da molécula hóspede. O aumento na solubilidade da β -ciclodextrina pode ser associado às alterações nas ligações de hidrogênio intramolecular envolvendo os grupos hidroxilas secundários da β -ciclodextrina e também às alterações das interações com as moléculas de água circundantes (22).

A Tabela 12 reporta a solubilidade do Imiquimod em solução de ácido cítrico pH 3,0, tampão acetato pH 5,6 e tampão fosfato pH 7,4 na presença de concentrações crescentes de β -ciclodextrina.

Tabela 12. Solubilidade do Imiquimod (desvio padrão entre parênteses) a 25 °C em solução de ácido cítrico pH 3,0, tampão acetato pH 5,6 e tampão fosfato pH 7,4 na presença de concentrações crescentes de β -ciclodextrina.

Solução	λ_{\max} (226 nm)			λ_{\max} (244 nm)		
	Ácido cítrico pH 3,0	Tampão acetato pH 5,6	Tampão fosfato pH 7,4	Ácido cítrico pH 3,0	Tampão acetato pH 5,6	Tampão fosfato pH 7,4
[β CD] mM	[IMQ] mg/mL	[IMQ] mg/mL	[IMQ] mg/mL	[IMQ] mg/mL	[IMQ] mg/mL	[IMQ] mg/mL
0	0,6689 (\pm 0,0121)	0,1532 (\pm 0,0035)	0,0043 (\pm 0,0001)	0,6788 (\pm 0,0116)	0,1473 (\pm 0,0029)	0,0046 (\pm 0,0002)
2	0,7337 (\pm 0,0065)	0,1781 (\pm 0,0016)	0,0054 (\pm 0,0005)	0,7444 (\pm 0,0100)	0,1710 (\pm 0,0014)	0,0056 (\pm 0,0005)
4	0,7933 (\pm 0,0194)	0,1988 (\pm 0,0008)	0,0060 (\pm 0,0002)	0,8056 (\pm 0,0196)	0,1923 (\pm 0,0004)	0,0062 (\pm 0,0002)
6	0,8646 (\pm 0,0098)	0,2208 (\pm 0,0019)	0,0068 (\pm 0,0001)	0,8774 (\pm 0,0082)	0,2130 (\pm 0,0020)	0,0071 (\pm 0,0001)
8	0,9040 (\pm 0,0456)	0,2408 (\pm 0,0021)	0,0079 (\pm 0,0001)	0,9165 (\pm 0,0471)	0,2321 (\pm 0,0025)	0,0082 (\pm 0,0001)
10	0,9774 (\pm 0,0267)	0,2648 (\pm 0,0013)	0,0086 (\pm 0,0001)	0,9953 (\pm 0,0302)	0,2552 (\pm 0,0014)	0,0088 (\pm 0,0002)
12	1,0213 (\pm 0,0443)	0,2912 (\pm 0,0038)	0,0096 (\pm 0,0002)	1,0378 (\pm 0,0467)	0,2802 (\pm 0,0029)	0,0097 (\pm 0,0001)
14	1,0827 (\pm 0,0178)	0,3129 (\pm 0,0020)	0,0105 (\pm 0,0004)	1,1045 (\pm 0,0144)	0,3018 (\pm 0,0024)	0,0104 (\pm 0,0001)
16	1,1409 (\pm 0,0057)	0,3391 (\pm 0,0052)	0,0117 (\pm 0,0001)	1,1406 (\pm 0,0050)	0,3266 (\pm 0,0056)	0,0117 (\pm 0,0001)

A Tabela 13 contém os parâmetros do diagrama de solubilidade. Valores da inclinação menores que 1 sugerem formação de complexo em solução com estequiometria 1:1 (49). As constantes de equilíbrio de associação (K_c) foram obtidas para os três meios em estudo empregando a equação 1, onde S_0 é o intercepto e a inclinação é o coeficiente angular da reta.

$$K_c = \frac{\text{inclinação}}{[S_0 (1 - \text{inclinação})]} \quad (1)$$

Tabela 13. Parâmetros do diagrama de solubilidade de fase do Imiquimod (desvio padrão entre parênteses) em solução de ácido cítrico pH 3,0, tampão acetato pH 5,6 e tampão fosfato pH 7,4 a 25°C.

λ_{\max} (226 nm)			
Solução	Intercepto (S_0)	Inclinação	R^2
Ácido cítrico pH 3,0	0,6771 (\pm 0,0035)	0,0291 (\pm 0,0003)	0,9990
Tampão acetato pH 5,6	0,1538 (\pm 0,0010)	0,0112 (\pm 0,0001)	0,9987
Tampão fosfato pH 7,4	0,0042 (\pm 0,0001)	0,0004 (\pm 0,0001)	0,9956
λ_{\max} (244 nm)			
Solução	Intercepto (S_0)	Inclinação	R^2
Ácido cítrico pH 3,0	0,6884 (\pm 0,0067)	0,0292 (\pm 0,0007)	0,9954
Tampão acetato pH 5,6	0,1470 (\pm 0,0013)	0,0111 (\pm 0,0001)	0,9989
Tampão fosfato pH 7,4	0,0046 (\pm 0,0001)	0,0004 (\pm 0,0001)	0,9956

A Tabela 14 apresenta a solubilidade do Imiquimod em solução de ácido cítrico pH 3,0, tampão acetato pH 5,6 e tampão fosfato pH 7,4 na ausência e na presença de β -ciclodextrina 16 mM, o incremento relativo na solubilidade do fármaco, a constante de equilíbrio de associação (K_c), e a eficiência de complexação (E.C.) em 226 e 244 nm.

Tabela 14. Solubilidade do Imiquimod a 25 °C em solução de ácido cítrico pH 3,0, tampão acetato pH 5,6 e tampão fosfato pH 7,4 na ausência e na presença de β -ciclodextrina 16 mM, incremento relativo (I.R.)^a na solubilidade do fármaco, constante de equilíbrio de associação (K_C) e eficiência de complexação (E.C.)^b. Desvio padrão entre parênteses.

Solução	IMQ ^c	IMQ:BCD ^d	I.R. ^a	K_C	E.C. ^b
	mg/mL	mg/mL		M ⁻¹	
$\lambda_{\max} = 226 \text{ nm}$					
Ácido cítrico	0,6689 (±0,0121)	1,1409 (± 0,0057)	1,7	50,66 (± 1,13)	0,141
Tampão acetato pH 5,6	0,1532 (± 0,0035)	0,3391 (± 0,0052)	2,2	76,54 (± 1,11)	0,048
Tampão fosfato pH 7,4	0,0043 (± 0,0001)	0,0117 (± 0,0001)	2,7	109,13 (± 0,03)	0,002
$\lambda_{\max} = 244 \text{ nm}$					
Ácido cítrico	0,6788 (±0,0116)	1,1406 (± 0,0050)	1,7	51,09 (± 1,10)	0,144
Tampão acetato pH 5,6	0,1473 (± 0,0029)	0,3266 (± 0,0056)	2,2	75,76 (± 0,96)	0,046
Tampão fosfato pH 7,4	0,0046 (± 0,0002)	0,0117 (± 0,0001)	2,5	90,01 (± 0,01)	0,002

^a I.R. = razão entre a solubilidade do Imiquimod na presença de β -ciclodextrina e a solubilidade do fármaco livre.

^b E.C. = $K_C S_0$, onde S_0 em M.

^c IMQ = solubilidade do fármaco livre.

^d IMQ:BCD = solubilidade do fármaco na presença de β -ciclodextrina.

Analisando os resultados obtidos em 226 nm, em solução de ácido cítrico pH 3,0, a solubilidade do fármaco aumentou 1,7 vezes na presença de β -ciclodextrina. Aumento de 2,2 e 2,7 vezes na solubilidade do fármaco foi observado em tampão acetato pH 5,6 e tampão fosfato pH 7,4 respectivamente. O incremento menor na solubilidade do Imiquimod em solução de ácido cítrico pH 3,0 na presença de β -ciclodextrina 16 mM pode ser explicado pelo aumento da solubilidade do fármaco livre, maior que nos outros meios.

Os valores da constante de equilíbrio de associação (K_C) podem ser analisados considerando a presença do fármaco neutro e sua forma ionizada em solução. O valor do pKa do Imiquimod reportado na literatura por Chollet e colaboradores é 7,3 (7).

A Figura 17 é a representação esquemática do equilíbrio de associação e dissociação estabelecido na presença de β -ciclodextrina admitindo estequiometria 1:1, onde B e BH^+ indica fármaco em sua forma não protonada e protonada, respectivamente, CD ciclodextrina, B-CD o complexo formado com o fármaco não protonado, BH^+ -CD o complexo formado com o fármaco protonado, $K_{1:1}$ constante de equilíbrio de associação do fármaco com β -ciclodextrina, $K_{1:1}'$ constante de associação do fármaco protonado, K_A é o inverso da constante de dissociação do fármaco e K_A' é o inverso da constante de dissociação do fármaco sob forma complexada (10) e (22).

Segundo Zia e colaboradores a ionização aumenta a solubilidade do fármaco, sendo acompanhado por diminuição do valor da constante de associação com a ciclodextrina. Esta redução muitas vezes é compensada pelo aumento da solubilidade e conseqüentemente, a eficiência de complexação aumenta (54). Essa tendência foi observada na formação do complexo β CD:IMQ. Em meio ácido, o Imiquimod é ionizado e sua afinidade pela cavidade da ciclodextrina diminui, reduzindo o valor da constante de associação em solução de ácido cítrico pH 3,0. No entanto, a eficiência de complexação em solução de ácido cítrico pH 3,0

aumentou se comparada aos valores obtidos em tampão acetato pH 5,6 e tampão fosfato pH 7,4.

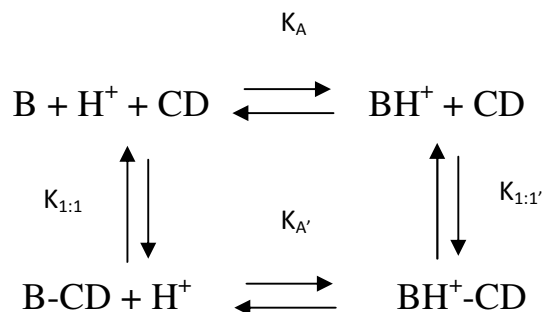


Figura 17. Representação esquemática do equilíbrio de associação e dissociação entre o fármaco e a β -ciclodextrina. Adaptado de (10).

A solubilidade do Imiquimod em solução de ácido cítrico pH 3,0 foi comparada à solubilidade em água (item 4.3), sendo os valores obtidos em 226 nm na ausência e na presença de β -ciclodextrina 12 mM. A solubilidade obtida em água, água e β -ciclodextrina, solução de ácido cítrico pH 3,0 e solução de ácido cítrico pH 3,0 e β -ciclodextrina foi 0,0127, 0,0198, 0,6788 e 1,0378 mg/mL respectivamente. Em solução de ácido cítrico pH 3,0, a solubilidade do Imiquimod aumentou 53 vezes em relação à solubilidade em água e aumento da mesma ordem de grandeza foi observado na presença de β -ciclodextrina. Mura e colaboradores verificaram efeito sinérgico devido à presença do ácido cítrico e da β -ciclodextrina na solubilidade do Econazol e concluíram que os complexos obtidos na presença de hidroxiácidos são mais efetivos que os complexos binários correspondentes (27). A solubilidade do Imiquimod aumentou na presença de ácido cítrico e β -ciclodextrina, sendo o valor obtido maior que em solução aquosa e β -ciclodextrina, podendo-se considerar que o efeito sinérgico devido à presença do ácido e da ciclodextrina favoreceu a solubilidade do fármaco sendo, portanto, o complexo de inclusão obtido na presença do hidroxiácido mais efetivo que o complexo binário.

4.6 – Determinação da estequiometria do complexo β CD:IMQ

A estequiometria do complexo β CD:IMQ foi determinada pelo método da variação contínua (método de *Job*), onde soluções com concentrações equimolares de β -ciclodextrina e Imiquimod, 0,03 mM, em solução de ácido cítrico pH 3,0 foram analisadas por espectroscopia de absorção UV/Vis, a 25 °C. A Figura 18 mostra o gráfico correspondente.

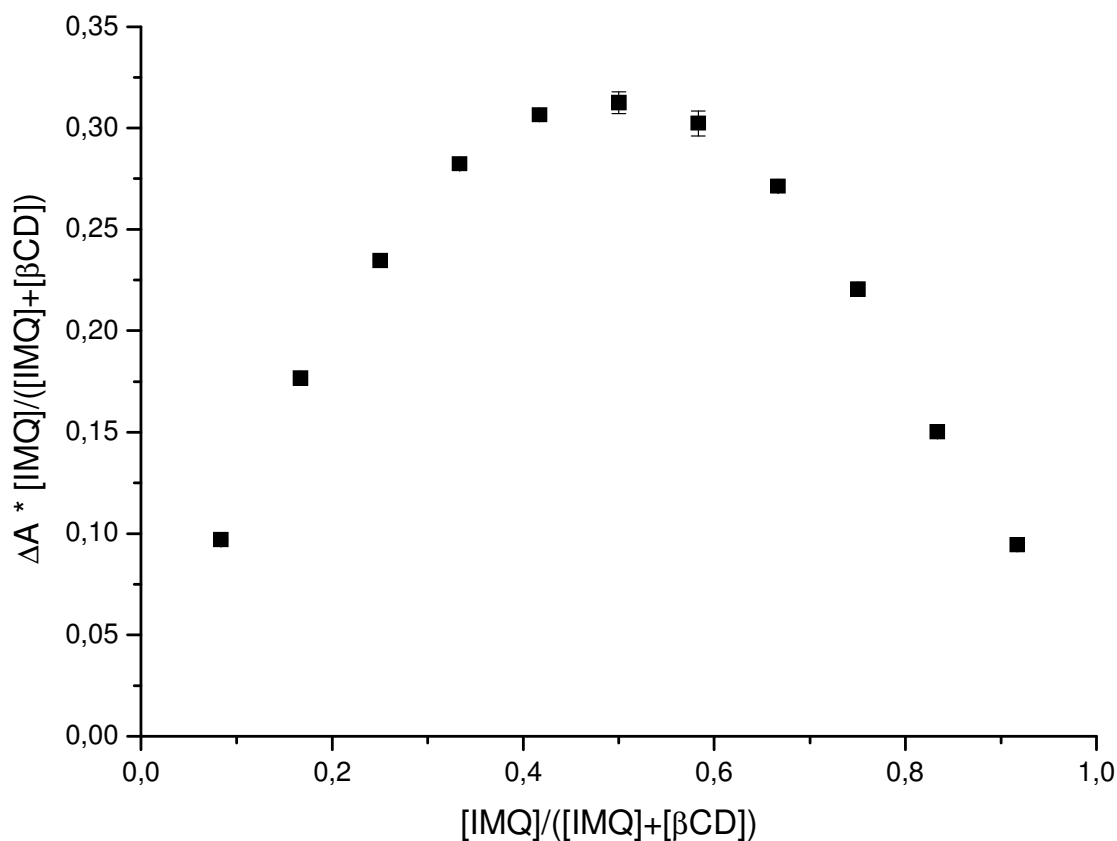


Figura 18. Gráfico de Job para a formação do complexo entre o Imiquimod e a β -ciclodextrina, a 25 °C, $\lambda = 226$ nm ($n = 2$).

A Tabela 15 reporta as frações molares de Imiquimod, os volumes e as concentrações das soluções de Imiquimod e β -ciclodextrina empregadas nesta parte do trabalho.

Tabela 15. Fração molar do Imiquimod, volume e concentração das soluções de β -ciclodextrina e Imiquimod em solução de ácido cítrico pH 3,0.

R^a	Volume (βCD) mL	Volume (IMQ) mL	[βCD] x 10⁻⁵ M	[IMQ] x 10⁻⁵ M
0,08	2,75	0,25	2,75	0,25
0,17	2,50	0,50	2,50	0,50
0,25	2,25	0,75	2,25	0,75
0,33	2,00	1,00	2,00	1,00
0,42	1,75	1,25	1,75	1,25
0,50	1,50	1,50	1,50	1,50
0,58	1,25	1,75	1,25	1,75
0,67	1,00	2,00	1,00	2,00
0,75	0,75	2,25	0,75	2,25
0,83	0,50	2,50	0,50	2,50
0,92	0,25	2,75	0,25	2,75
1,00	0,00	3,00	0,00	3,00

$$^a R = [IMQ]/([IMQ]+[\beta CD])$$

A Tabela 16 exhibe os valores da absorvância, seus valores médios e os resultados de $\Delta A \cdot R$, onde ΔA é a diferença da absorvância do Imiquimod na ausência e na presença de β -ciclodextrina e R é a fração molar do Imiquimod, obtidos em 226 e 244 nm.

Tabela 16. Fração molar do Imiquimod, valores da absorvância, seus valores médios (desvio padrão entre parênteses) e os resultados de ΔA^*R para os comprimentos de onda 226 e 244 nm.

R	$\lambda_{\max} = 226 \text{ nm}$				$\lambda_{\max} = 244 \text{ nm}$			
	A₁	A₂	\bar{A}	ΔA^*R	A₁	A₂	\bar{A}	ΔA^*R
0,08	0,0733	0,0792	0,0762 ($\pm 0,0042$)	0,0969	0,0681	0,0739	0,0710 ($\pm 0,0041$)	0,0686
0,17	0,1739	0,1837	0,1788 ($\pm 0,0069$)	0,1768	0,1412	0,1488	0,1450 ($\pm 0,0054$)	0,1249
0,25	0,2988	0,3025	0,3007 ($\pm 0,0026$)	0,2347	0,2154	0,2187	0,2171 ($\pm 0,0023$)	0,1694
0,33	0,3889	0,3959	0,3924 ($\pm 0,0050$)	0,2823	0,2934	0,2988	0,2961 ($\pm 0,0038$)	0,1995
0,42	0,5025	0,5048	0,5036 ($\pm 0,0016$)	0,3065	0,3747	0,3766	0,3757 ($\pm 0,0014$)	0,2162
0,50	0,6200	0,6082	0,6141 ($\pm 0,0082$)	0,3126	0,4568	0,4486	0,4527 ($\pm 0,0058$)	0,2210
0,58	0,7118	0,7303	0,7210 ($\pm 0,0138$)	0,3023	0,5221	0,5344	0,5283 ($\pm 0,0087$)	0,2137
0,67	0,8334	0,8314	0,8324 ($\pm 0,0014$)	0,2713	0,5931	0,5907	0,5919 ($\pm 0,0017$)	0,2018
0,75	0,9458	0,9449	0,9453 ($\pm 0,0005$)	0,2205	0,6870	0,6864	0,6867 ($\pm 0,0005$)	0,1559
0,83	1,0397	1,0393	1,0404 ($\pm 0,0003$)	0,1501	0,7528	0,7525	0,7526 ($\pm 0,0002$)	0,1187
0,92	1,1367	1,1360	1,1368 ($\pm 0,0014$)	0,0944	0,8202	0,8220	0,8211 ($\pm 0,0013$)	0,0674

O gráfico de *Job* (Figura 18) mostra que o máximo foi atingido para a fração molar do Imiquimod, $R = 0,5$, indicando que a estequiometria do complexo β CD:IMQ é 1:1.

4.7 – Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

4.7.1 – Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (RMN ^1H)

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton é usada para investigar a intensidade da interação entre a molécula hóspede e o hospedeiro e obter evidências da geometria do complexo de inclusão em solução, observando o deslocamento químico dos prótons da ciclodextrina, principalmente os localizados no seu interior (H3 e H5) que sofrem desvio significativo para valores de campo mais alto. Por outro lado, os prótons localizados no exterior da ciclodextrina (H1, H2, H4 e H6) apresentam pequeno desvio deste deslocamento. Na formação do complexo de inclusão ocorre alteração no ambiente químico dos prótons que é refletida na variação do deslocamento químico para campo mais alto (22).

Os espectros de RMN ^1H do ácido cítrico, do Imiquimod, da β -ciclodextrina e do complexo β CD:IMQ estão na Figura 19. A fórmula estrutural do ácido cítrico, do Imiquimod e da β -ciclodextrina com a numeração para identificação dos prótons no espectro de RMN ^1H está na Figura 20. Os hidrogênios do anel aromático do Imiquimod foram atribuídos com base no resultado do experimento COSY. Os espectros com suas ampliações, o mapa de contorno do experimento COSY e os parâmetros de aquisição estão nos Anexos 01 a 05. Os hidrogênios da β -ciclodextrina foram atribuídos de acordo com dados da literatura (55). Os deslocamentos químicos observados no espectro do Imiquimod apresentam concordância com valores reportados na literatura (56).

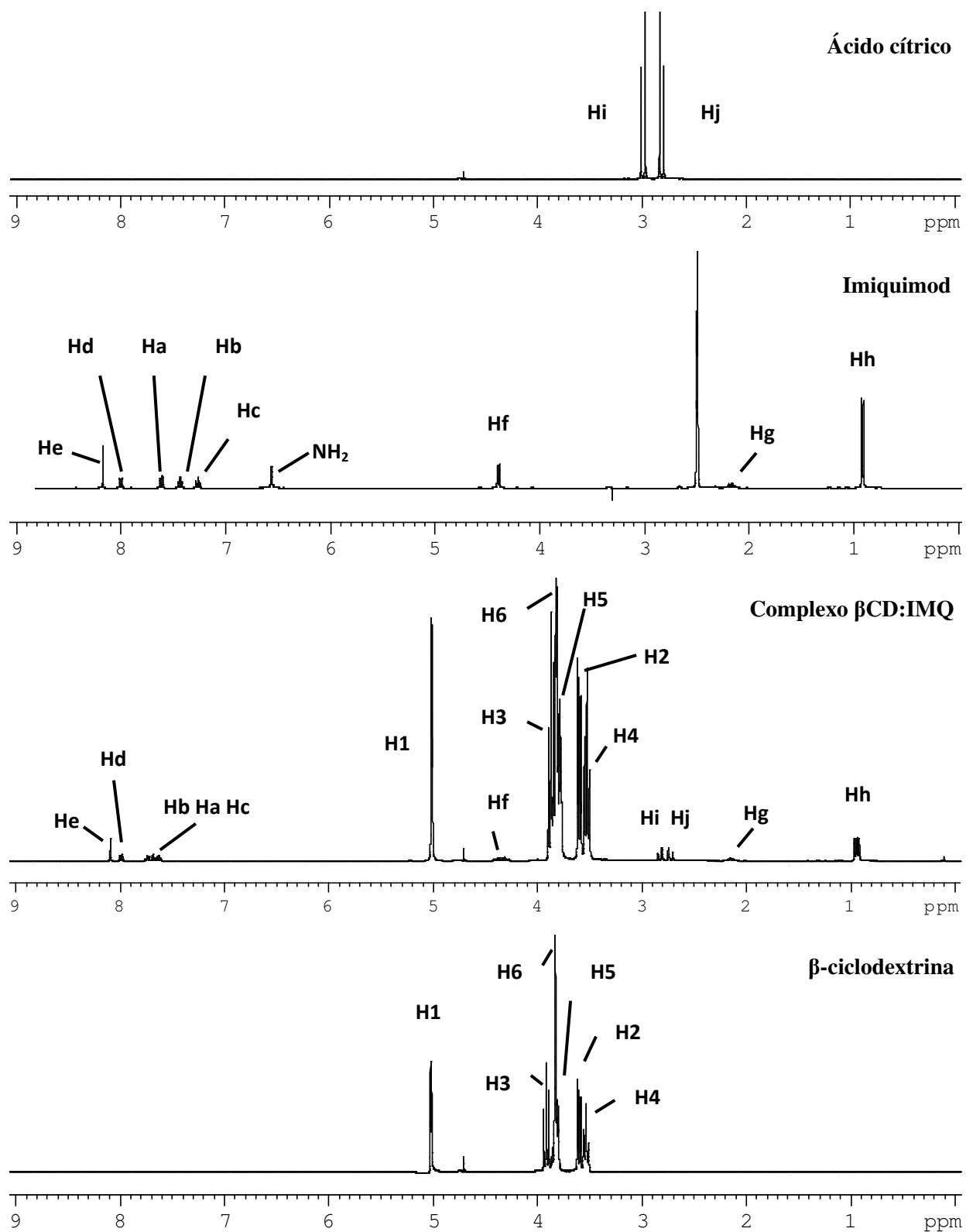
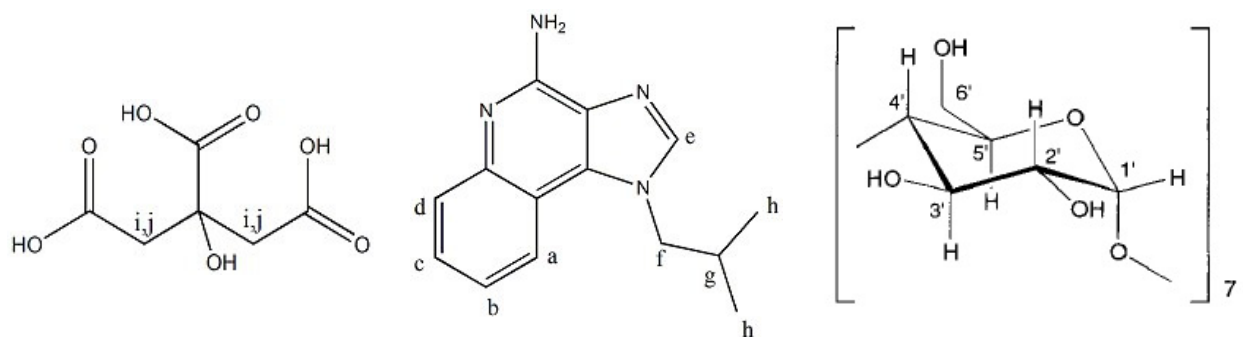


Figura 19. Espectros de RMN ¹H a 400 MHz, 25 °C e concentração 26 mM.



Ácido cítrico

Imiquimod

β-ciclodextrina

Figura 20. Fórmula estrutural do ácido cítrico, do Imiquimod e da β-ciclodextrina com a numeração para identificar os prótons no espectro de RMN ¹H. Fórmula estrutural da β-ciclodextrina adaptada de (12).

Os valores dos deslocamentos químicos dos prótons são reportados na Tabela 17. Analisando estes valores pode-se observar que os prótons H3 e H5 da β-ciclodextrina apresentam as maiores variações para campo mais alto e os prótons localizados na superfície externa da β-ciclodextrina apresentaram as menores variações. Greatbanks e colaboradores observaram que quando $\Delta\delta \text{ H3} > \Delta\delta \text{ H5}$ a molécula hóspede está parcialmente inserida na cavidade da ciclodextrina. Por outro lado, quando $\Delta\delta \text{ H3} \leq \Delta\delta \text{ H5}$ a molécula está mais inserida na cavidade da ciclodextrina (57). Os prótons He, Hf e Hg do Imiquimod apresentaram maior deslocamento químico para campo mais alto.

Tabela 17. Deslocamentos químicos RMN ^1H da β -ciclodextrina, do Imiquimod e do ácido cítrico em D_2O e DMSO-d_6 , a $25\text{ }^\circ\text{C}$, 400 MHz.

β-ciclodextrina			
^1H	Em D_2O (ppm)	Com IMQ e AC (ppm)	Δ (ppm) ^a
H1	5,0243	5,0152	- 0,0091
H3	3,9189	3,8740	- 0,0449
H6	3,8320	3,8256	- 0,0064
H5	3,8075	3,7846	- 0,0229
H2	3,6042	3,6010	- 0,0032
H4	3,5376	3,5276	- 0,0100
Imiquimod			
^1H	Em DMSO-d_6 (ppm)	Com βCD e AC (ppm)	Δ (ppm) ^a
He	8,1722	8,0959	- 0,0763
Hd	8,0002	7,9917	- 0,0085
Há	7,6144	7,6776	0,0632
Hb	7,4343	7,7443	0,3100
Hc	7,2640	7,6324	0,3684
NH_2	6,5613	nd ^b	-
Hf	4,3994	4,3519	- 0,0475
Hg	2,1768	2,1545	- 0,0223
Hh	0,9194	0,9408	0,0214
Ácido cítrico			
^1H	Em D_2O (ppm)	Com IMQ e βCD (ppm)	Δ (ppm) ^a
Hi	2,9878	2,8288	- 0,1590
Hj	2,8094	2,7279	- 0,0815

^a Δ (ppm) = $\delta_{\text{complexo}} - \delta_{\text{livre}}$; ^b nd = não detectado

4.7.2 – *Rotating-frame Overhauser Effect Spectroscopy* (ROESY 1D)

Com objetivo de obter informações mais detalhadas sobre a geometria do complexo β CD:IMQ foram realizados experimentos de ROESY 1D. Esta técnica fornece evidências da proximidade espacial entre prótons das espécies presentes, mediante observação do efeito NOE entre os prótons e indica interação entre núcleos a uma distância $\leq 5 \text{ \AA}$ (58).

Foram irradiados os prótons H3 e H5 da β -ciclodextrina, os prótons do grupo imidazoquinolina e as metilas (Hh) do Imiquimod e as interações observadas são apresentadas nas Figuras 21 a 23. Os espectros ROESY 1D e os parâmetros de aquisição estão nos Anexos 06 a 14. Analisando o espectro ROESY 1D dos prótons H3 da β -ciclodextrina (Figura 21A) pode-se observar interação dos mesmos com os prótons He, Hd, Hc e as metilas (Hh) do Imiquimod. Por outro lado, o espectro ROESY 1D dos prótons H5 da β -ciclodextrina (Figura 21B) mostra a interação desses prótons com os prótons das metilas (Hh), mas não foi observada interação com os prótons do grupo imidazoquinolina (He, Hd, Hc, Hb e Ha) do Imiquimod.

Os resultados do experimento ROESY 1D indicaram interação entre o próton He do Imiquimod e os prótons H3 localizado no interior da cavidade da β -ciclodextrina (Figura 21C). É interessante observar que apenas os prótons Hd e Hc do grupo quinolina interagem com os prótons H3 da β -ciclodextrina (Figuras 22A e B). Não foi observada interação entre os prótons Hb e Ha do grupo quinolina com os prótons H3 e H5 localizados no interior da cavidade da β -ciclodextrina (Figura 22C e 23A). O espectro ROESY 1D dos prótons Hh das metilas do Imiquimod indicaram interação das mesmas com os prótons H3 e H5 do interior da cavidade da β -ciclodextrina (Figura 23B).

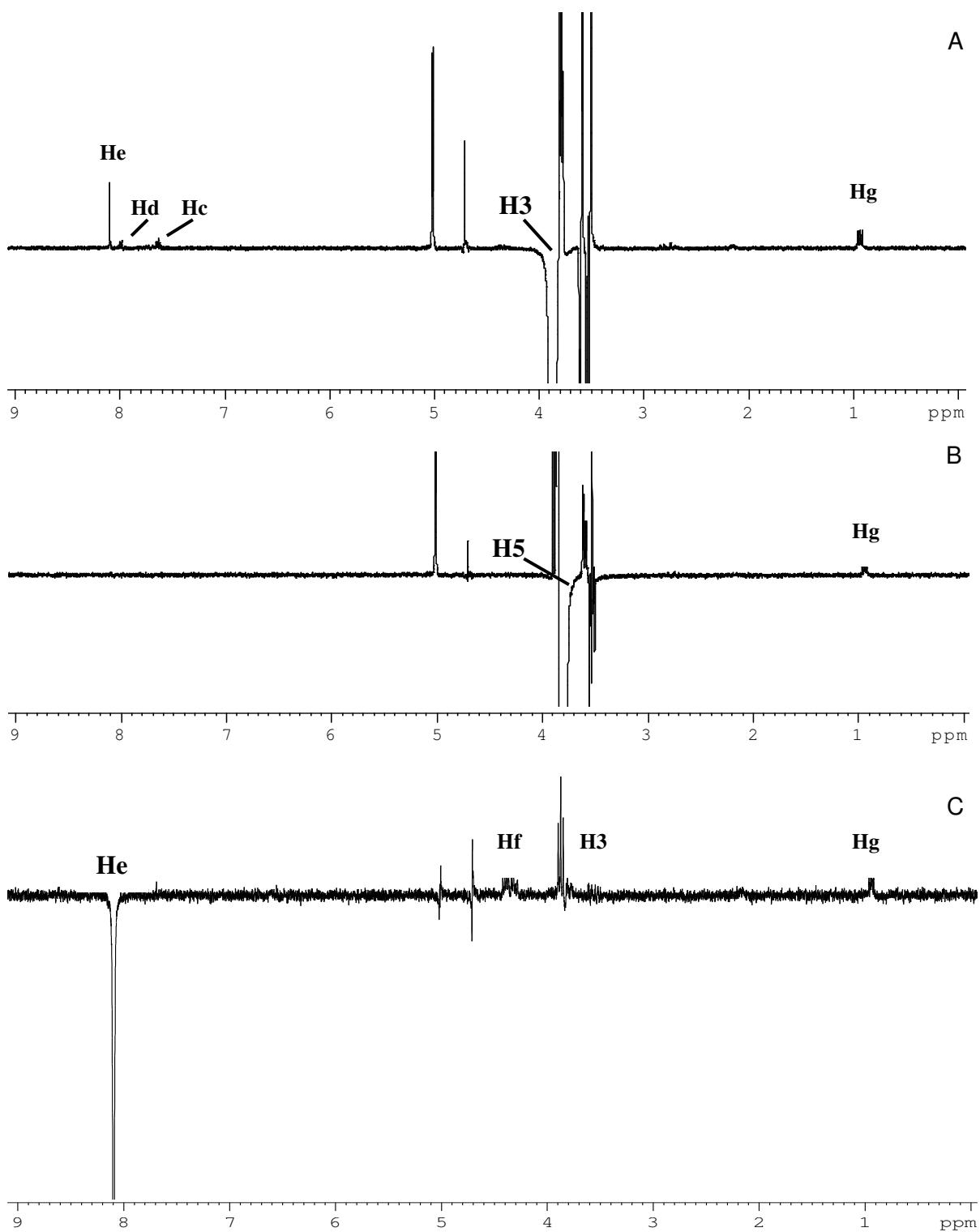


Figura 21. Espectro RMN ^1H ROESY 1D do complexo β CD:IMQ (concentração 26 mM), a 400 MHz, 25 $^\circ\text{C}$. (A) pulso seletivo nos prótons H3 da β -ciclodextrina; (B) pulso seletivo nos prótons H5 da β -ciclodextrina; (C) pulso seletivo no próton He do Imiquimod.

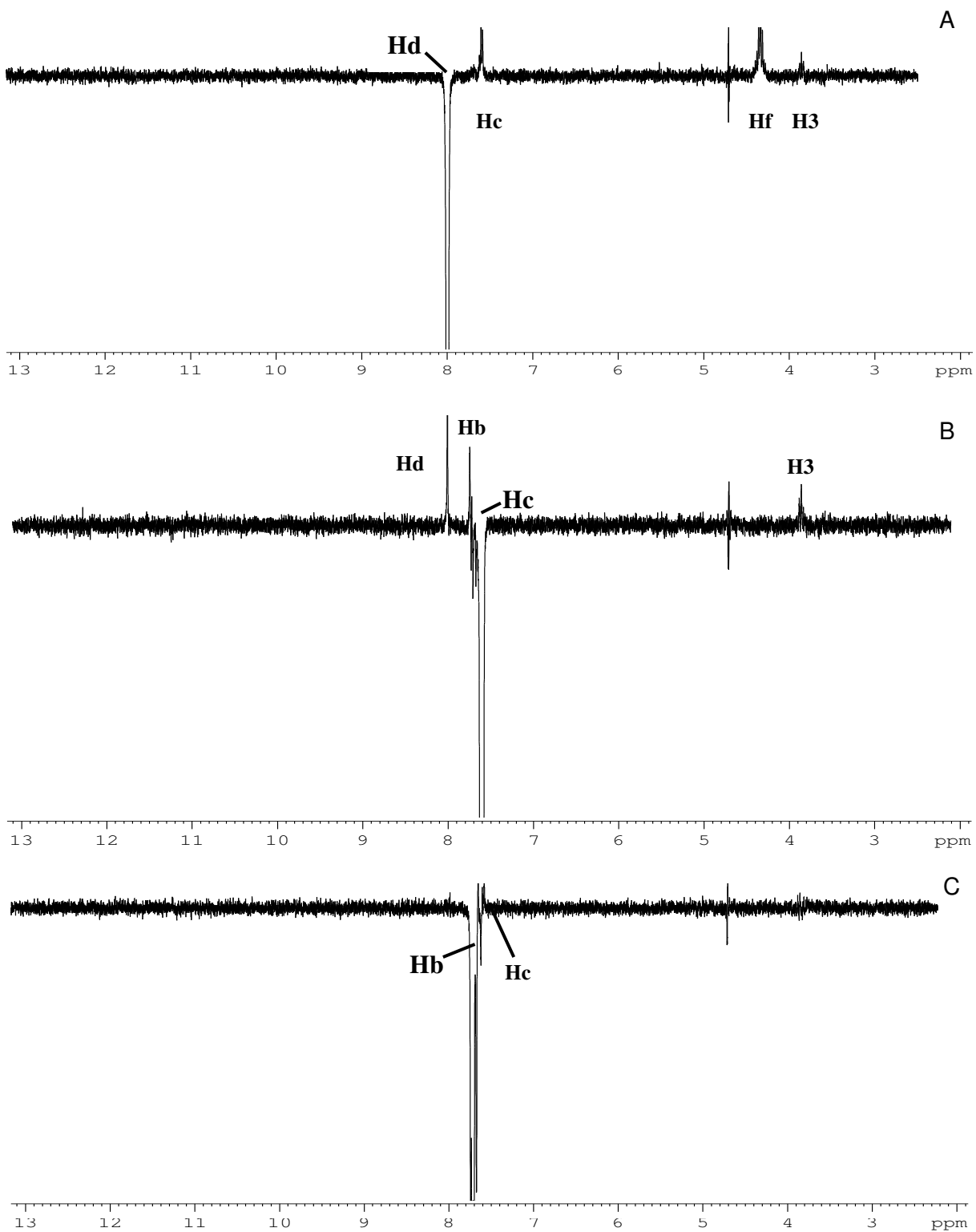


Figura 22. Espectro RMN ^1H ROESY 1D do complexo $\beta\text{CD}:\text{IMQ}$ (concentração 26 mM), a 400 MHz, 25 °C. (A) pulso seletivo no próton Hd do Imiquimod; (B) pulso seletivo no próton Hc do Imiquimod; (C) pulso seletivo no próton Hb do Imiquimod.

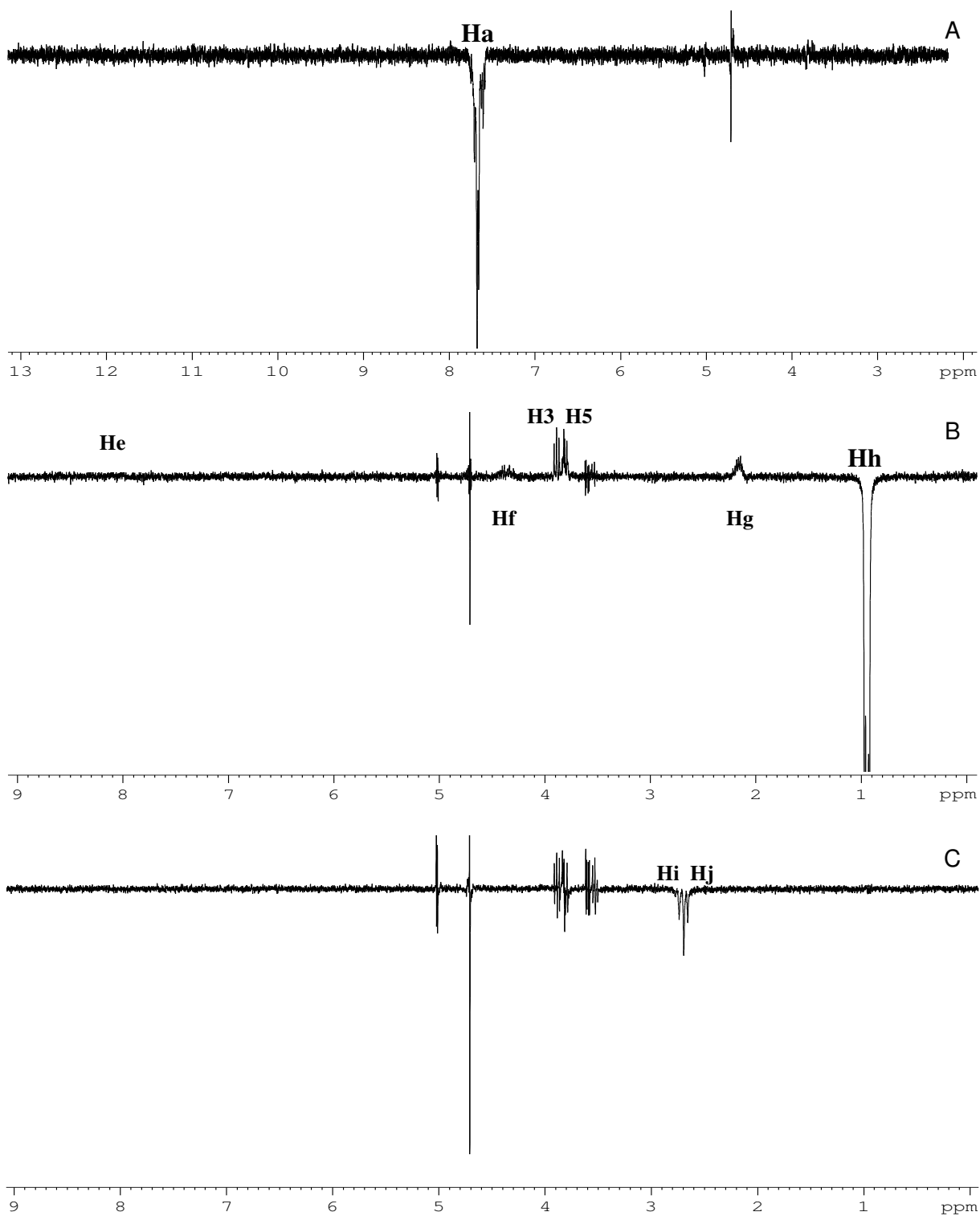


Figura 23. Espectro RMN ^1H ROESY 1D do complexo $\beta\text{CD}:\text{IMQ}$ (concentração 26 mM), a 400 MHz, 25 °C. (A) pulso seletivo no próton Ha do Imiquimod; (B) pulso seletivo nos prótons Hh do Imiquimod; (C) pulso seletivo nos prótons Hi e Hj do ácido cítrico.

Os resultados do experimento ROESY 1D indicam que o Imiquimod penetra a cavidade da β -ciclodextrina com o grupo isobutil voltado para a extremidade menor da mesma, onde estão localizados os prótons H5. O grupo quinolina fica voltado para a extremidade maior da β -ciclodextrina, onde os prótons Hd e Hc interagem com os prótons H3. A Figura 24 mostra a estrutura tridimensional do complexo β CD:IMQ com base nos resultados dos experimentos de RMN ^1H e ROESY 1D. A estrutura tridimensional desse complexo com a visualização das duas extremidades da β -ciclodextrina está nos Anexos 15 e 16.

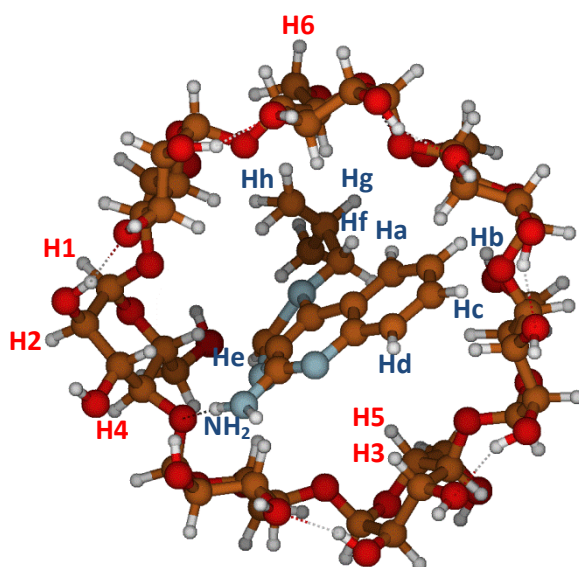


Figura 24. Estrutura tridimensional do complexo β CD:IMQ. Os prótons da β -ciclodextrina estão indicados em vermelho e os do Imiquimod estão indicados em azul.

Os experimentos ROESY 1D forneceram também outro resultado bastante relevante para compreender a dinâmica de formação do complexo β CD:IMQ. A irradiação dos prótons do ácido cítrico, Hj e Hi, (Figura 23C) mostrou que esses prótons não interagem com os prótons H3 e H5 localizados no interior da cavidade da β -ciclodextrina, sugerindo que o ácido cítrico não compete com o Imiquimod por essa cavidade. No entanto, a variação dos deslocamentos químicos dos prótons

H_j e H_i observada no experimento de RMN ¹H (Tabela 17) indica haver interação entre esses prótons e os do complexo. Entretanto, os resultados dos experimentos ROESY 1D não possibilitaram determinar o tipo de interação entre os prótons do ácido cítrico e os prótons da β-ciclodextrina e do Imiquimod.

4.7.3 – *Diffusion Ordered Spectroscopy* (DOSY)

A técnica DOSY é bastante empregada no estudo da dinâmica de complexos de inclusão. Ela tem como base a determinação dos coeficientes de difusão da molécula hóspede, na ausência e na presença do agente complexante. Os coeficientes de difusão são usados para determinar a fração do soluto complexada e a constante de equilíbrio de associação (K_c) do complexo formado (59).

Os coeficientes de difusão dos compostos livres e na presença de concentrações crescentes de β-ciclodextrina estão na Tabela 18. O valor do coeficiente de difusão é a média dos coeficientes obtidos no experimento DOSY. O Imiquimod, o ácido cítrico, a β-ciclodextrina e a água apresentam coeficientes de difusão distintos. Os valores dos coeficientes de difusão observados são condizentes com o tamanho das moléculas das espécies presentes, visto que o coeficiente e as propriedades estruturais de uma molécula estão relacionados devido à dependência do mesmo com a geometria e o tamanho molecular (60). Os resultados mostram que o coeficiente de difusão do Imiquimod diminui gradativamente à medida que a concentração de β-ciclodextrina aumenta, apesar de não ser reduzido ao coeficiente de difusão desta molécula. Foi observada apenas pequena variação no coeficiente de difusão da β-ciclodextrina e da água.

Tabela 18. Concentrações da β -ciclodextrina, coeficientes de difusão (D) do Imiquimod (IMQ), do ácido cítrico (AC), da β -ciclodextrina (β CD), da água (HOD) e fração do Imiquimod presente no complexo. Desvio padrão entre parênteses.

[β CD]	D _(IMQ)	D _(AC)	D _(βCD)	D _(HOD)	X _(βCD: IMQ)
mM	$\times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$				%
0	5,342 ($\pm 0,027$)	6,132 ($\pm 0,003$)	-	23,851	-
4	4,879 ($\pm 0,052$)	6,113 ($\pm 0,014$)	2,864 ($\pm 0,020$)	23,391	18,69 ($\pm 0,01$)
8	4,742 ($\pm 0,256$)	6,089 ($\pm 0,009$)	2,900 ($\pm 0,017$)	23,585	24,22 ($\pm 0,09$)
12	4,656 ($\pm 0,034$)	5,921 ($\pm 0,010$)	2,855 ($\pm 0,015$)	23,282	27,59 ($< 0,01$)
16	4,454 ($\pm 0,062$)	5,853 ($\pm 0,010$)	2,872 ($\pm 0,016$)	23,635	35,96 ($\pm 0,02$)
16	-	-	2,856 ($\pm 0,015$)	23,573	-

A redução do valor do coeficiente de difusão do Imiquimod na presença de β -ciclodextrina em relação ao valor do coeficiente do fármaco livre demonstra que os coeficientes de difusão são sensíveis aos fenômenos de associação e os resultados sugerem interação entre a β -ciclodextrina e Imiquimod. Da mesma forma, pode-se considerar que o ácido cítrico interage com o complexo devido à diminuição de seu coeficiente de difusão. No entanto, como foi mencionado no item 4.7.2 não foi possível determinar o tipo de interação que está ocorrendo.

O espectro DOSY do complexo β CD:IMQ em solução de ácido cítrico pH 3,0 está na Figura 25. O espectro da β -ciclodextrina em água deuterada e do

Imiquimod em solução de ácido cítrico pH 3,0 são apresentados nos Anexos 17 e 18 respectivamente. O espectro DOSY mostra uma separação bastante distinta dos coeficientes de difusão da β -ciclodextrina, do Imiquimod e do ácido cítrico.

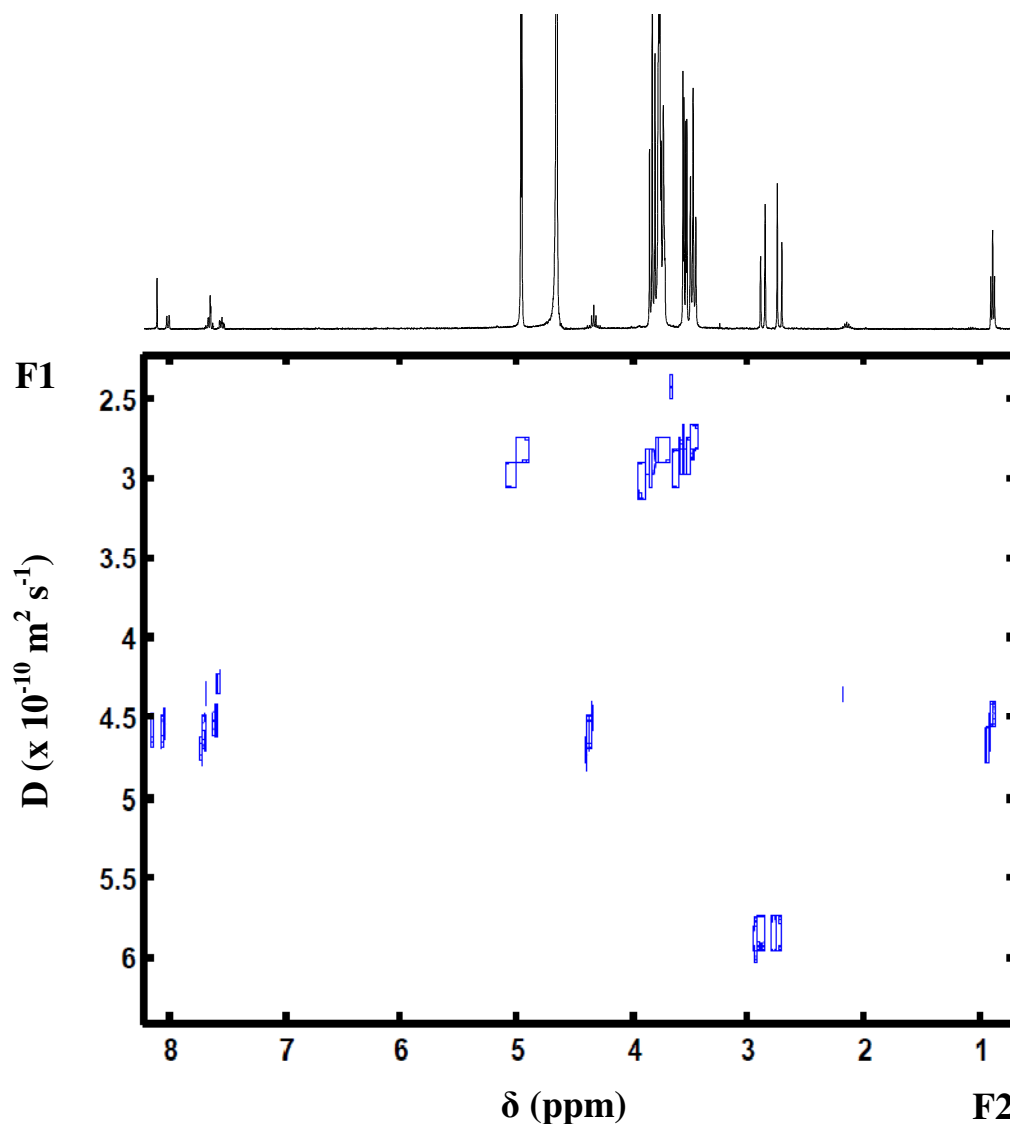


Figura 25. Espectro DOSY (^1H , 400 MHz, 25 °C) do complexo em solução de ácido cítrico em D_2O . Projeção do coeficiente de difusão (D) em F1 e projeção do espectro de RMN ^1H em F2.

A fração do Imiquimod no complexo pode ser obtida a partir dos coeficientes de difusão das espécies na forma livre e complexada empregando as seguintes equações:

$$D_{obs-IMQ} = x_{IMQ} D_{IMQ} + x_{\beta CD:IMQ} D_{\beta CD:IMQ} \quad (2)$$

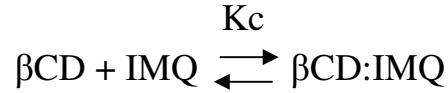
$$x_{IMQ} + x_{\beta CD:IMQ} = 1 \quad (3)$$

substituindo a equação (3) na equação (2) obtém-se a equação (4)

$$x_{IMQ} = \frac{D_{obs-IMQ} - D_{obs-\beta CD}}{D_{IMQ} - D_{obs-\beta CD}} \quad (4)$$

onde x_{IMQ} é a fração molar do Imiquimod livre, $x_{\beta CD:IMQ}$ é a fração do Imiquimod no complexo, $D_{obs-IMQ}$ o coeficiente de difusão do Imiquimod na presença de β -ciclodextrina, $D_{obs-\beta CD}$ o coeficiente de difusão da β -ciclodextrina e D_{IMQ} o coeficiente de difusão do Imiquimod livre. Considerando que a associação entre uma molécula hóspede pequena e uma macromolécula na formação do complexo de inclusão provoca alteração desprezível no coeficiente de difusão da macromolécula assume-se que os coeficientes de difusão do complexo $\beta CD:IMQ$ e da β -ciclodextrina no estado de equilíbrio são praticamente iguais, $D_{\beta CD:IMQ} \approx D_{obs-\beta CD}$ (61). A fração molar do Imiquimod no complexo é indicada na Tabela 18.

A constante de equilíbrio de associação (K_c) do complexo pode ser determinada assumindo que a formação do complexo de inclusão com estequiometria 1:1 pode ser representada pelo equilíbrio: (61)



sendo o valor de K_c obtido pela equação:

$$K_c = \frac{[\beta\text{CD:IMQ}]}{[\beta\text{CD}][\text{IMQ}]} \quad (5)$$

onde $[\beta\text{CD:IMQ}]$, $[\beta\text{CD}]$ e $[\text{IMQ}]$ são as concentrações molares do complexo $\beta\text{CD:IMQ}$, da β -ciclodextrina e do Imiquimod respectivamente no equilíbrio. Portanto:

$$K_c = \frac{[\beta\text{CD:IMQ}]}{([\beta\text{CD}]_0 - [\beta\text{CD:IMQ}]) \times ([\text{IMQ}]_0 - [\beta\text{CD:IMQ}])} \quad (6)$$

Onde $[\beta\text{CD}]_0$ e $[\text{IMQ}]_0$ são as concentrações iniciais de β -ciclodextrina e Imiquimod. Relacionando $[\beta\text{CD:IMQ}]$ à $[\text{IMQ}]_0$ tem-se a equação 7

$$[\beta\text{CD:IMQ}] = (1 - x_{\text{IMQ}}) [\text{IMQ}]_0 \quad (7)$$

substituindo (7) em (6) obtém-se a equação 8

$$K_c = \frac{1 - x_{\text{IMQ}}}{x_{\text{IMQ}} \times ([\beta\text{CD}]_0 - [\text{IMQ}]_0 + x_{\text{IMQ}} \times [\text{IMQ}]_0)} \quad (8)$$

A constante K_c do complexo β CD:IMQ obtida na presença de β -ciclodextrina 16 mM foi:

$$K_c = 66,30 \pm 7,07 M^{-1}$$

O valor relativamente pequeno de K_c indica fraca interação entre o Imiquimod e a β -ciclodextrina. Resultado similar foi observado no estudo de solubilidade de fase (item 4.5), onde o valor de K_c em solução de ácido cítrico pH 3,0 foi $50,66 \pm 1,13 M^{-1}$. Os valores de K_c obtidos mediante o diagrama de solubilidade e por ressonância magnética nuclear são concordantes e sugerem que o complexo é termodinamicamente pouco estável.

Os resultados do experimento DOSY forneceram também evidências da interação entre o ácido cítrico, o Imiquimod e a β -ciclodextrina. A Figura 26 ilustra o espectro de RMN 1H parcial do ácido cítrico, na ausência e na presença do Imiquimod e da β -ciclodextrina. O espectro do ácido cítrico na presença do fármaco apresenta variação bastante significativa no deslocamento químico dos prótons para campo mais alto, sugerindo interação entre o ácido cítrico e o Imiquimod. A presença de β -ciclodextrina nas concentrações de 4 a 12 mM causa variação muito sutil no deslocamento químico dos prótons do ácido cítrico. No entanto, variação pronunciada, principalmente no deslocamento químico do próton H_i do ácido cítrico, é observada na presença de β -ciclodextrina 16 mM. Kurkov e Loftsson sugerem que as interações entre o hidroxiácido e o complexo de inclusão envolvem formação de par iônico entre o hidroxiácido e a molécula hóspede e a interação com a ciclodextrina através da formação de ligações de hidrogênio com os grupos hidroxilas localizados nas extremidades da ciclodextrina (25).

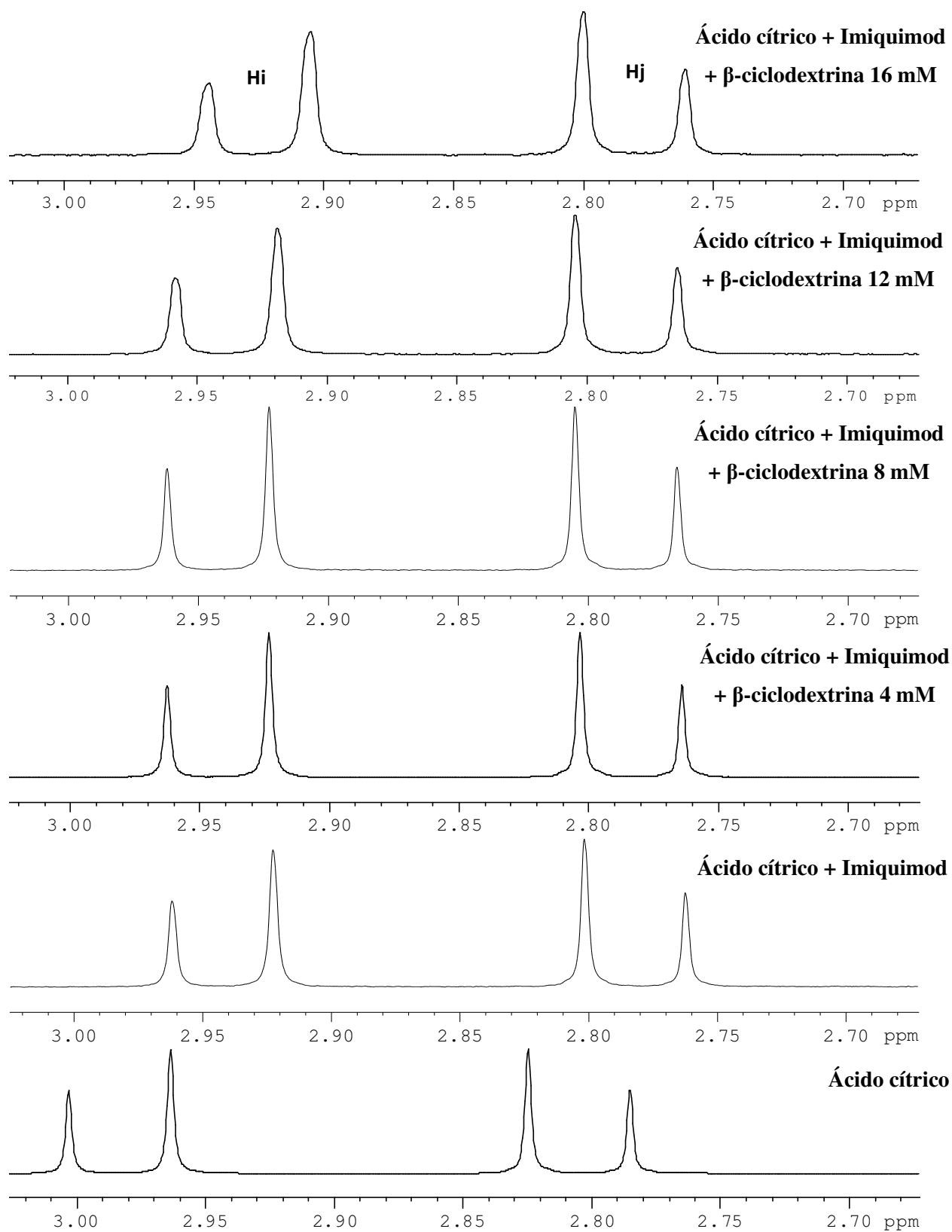


Figura 26. Espectros de RMN ^1H parcial do ácido cítrico livre e na presença de Imiquimod e β -ciclodextrina.

4.8 – Análises Térmicas

Os métodos térmicos são amplamente usados na caracterização de complexos de inclusão no estado sólido. A análise termogravimétrica (TGA) fornece informação sobre a composição e a estabilidade térmica da amostra. O gráfico da primeira derivada (DTG) da curva de TGA permite obter a variação de massa correspondente a um determinado evento físico (mudança de estado ou de estrutura) ou químico (decomposição, combustão). A calorimetria diferencial de varredura (DSC) permite identificar eventos endotérmicos ou exotérmicos que promovem as variações de temperatura observadas durante o experimento, bem como obter a variação de entalpia (ΔH) correspondente ao evento (9). Em conjunto, ambos os métodos permitem obter evidências da formação do complexo de inclusão através da comparação das curvas de TGA e DSC dos componentes livres, da mistura física e do complexo de inclusão.

4.8.1 – Análise Termogravimétrica

O ácido cítrico, o Imiquimod, a β -ciclodextrina, a mistura física Imiquimod + β -ciclodextrina, a mistura física ácido cítrico + Imiquimod + β -ciclodextrina, e o complexo foram caracterizados por análise termogravimétrica. Os gráficos de TGA estão na Figura 27 e os da derivada na Figura 28. A Tabela 19 apresenta o intervalo de temperatura dos eventos observados e o percentual de massa perdida. Os resultados da análise termogravimétrica permitem verificar se o hóspede sofre mudanças antes da degradação térmica da ciclodextrina (250-300 °C). Esta mudança pode ser evaporação, decomposição, oxidação, fusão ou transição polimórfica (53).

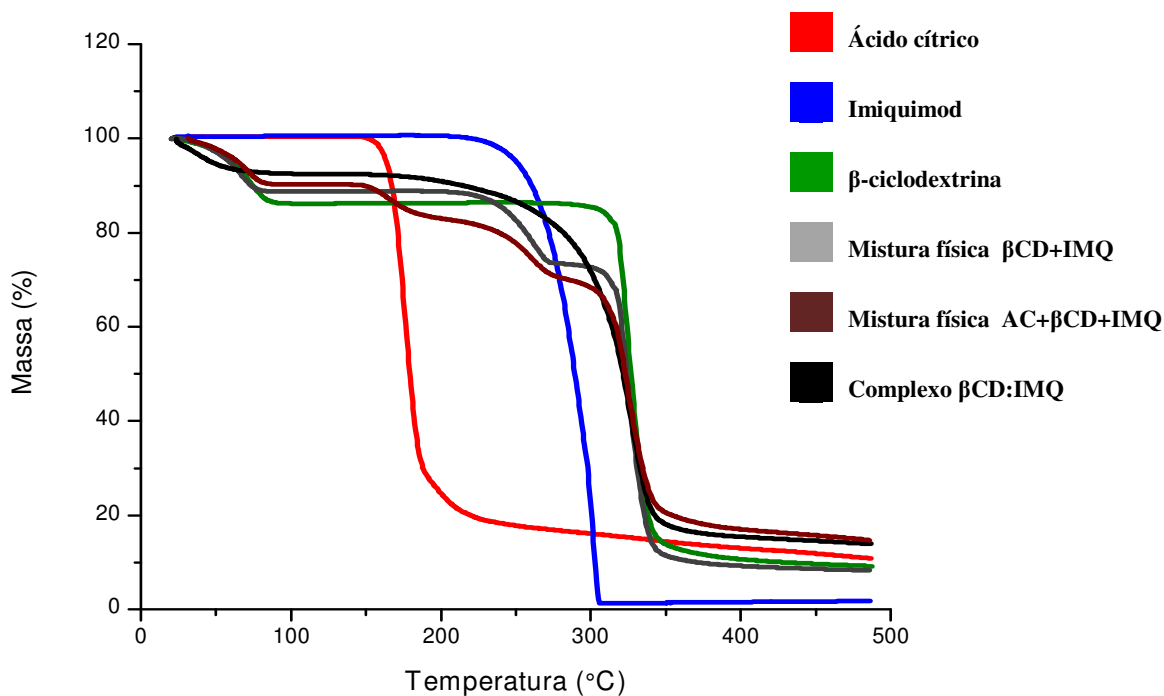


Figura 27. Curvas de TGA obtidas em atmosfera inerte, à taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

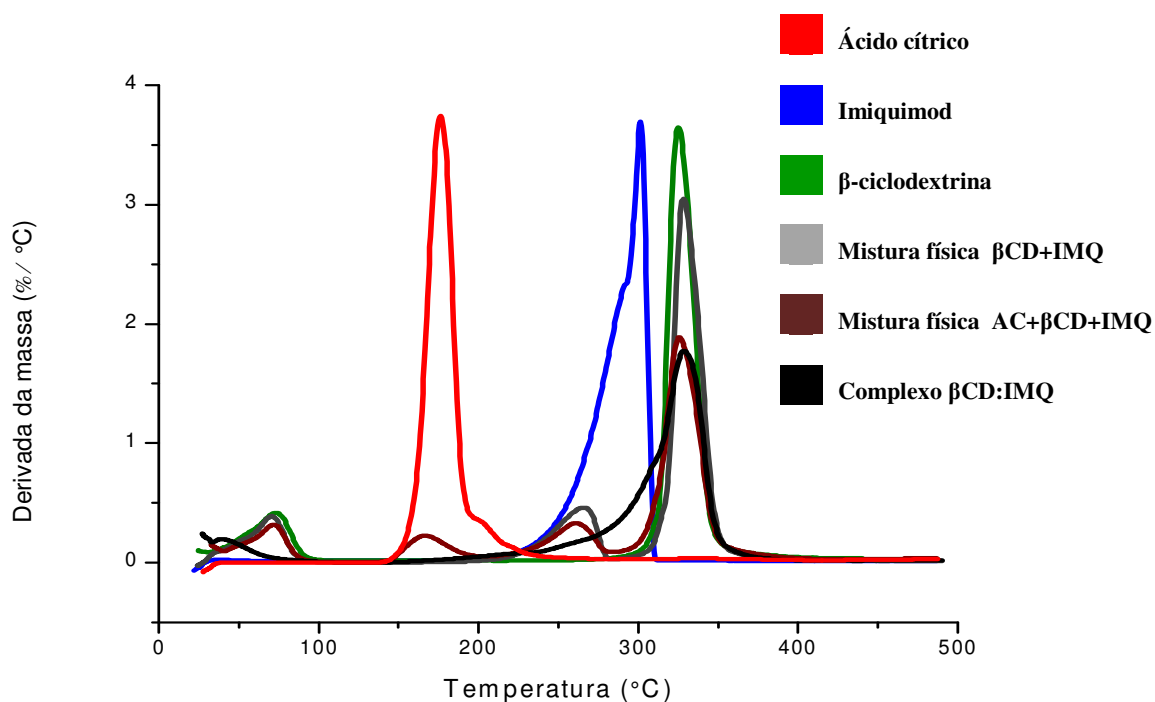


Figura 28. Gráficos das derivadas das curvas de TGA.

A curva de TGA do ácido cítrico mostra sua decomposição no intervalo de temperatura de 166-187 °C. A do Imiquimod indica que a decomposição do fármaco ocorre entre 282 e 306 °C e não apresenta outras transições. Analisando a curva de TGA da β -ciclodextrina, das misturas físicas e do complexo β CD:IMQ pode-se observar que durante o aquecimento ocorre perda gradual de moléculas de água, sendo que a curva de TGA das misturas físicas pode ser considerada como sobreposição das curvas dos componentes livres, apresentando perda de massa no intervalo de temperatura que corresponde a cada componente. A ausência de degrau no termograma do complexo de inclusão pode ser considerada como evidência da formação do complexo.

Tabela 19. Intervalo de temperatura (ΔT) e percentual de massa perdida (% m) do ácido cítrico (AC), Imiquimod (IMQ), β -ciclodextrina (β CD), mistura física Imiquimod + β -ciclodextrina, mistura física ácido cítrico + Imiquimod + β -ciclodextrina e complexo β CD:IMQ.

Amostra	AC	IMQ	β CD	Mistura Física		Complexo β CD:IMQ
				IMQ+ β CD	AC+IMQ + β CD	
ΔT_1 (°C)			56 – 84	51 – 77	61 – 81	35 – 59
% m			13,62	11,30	9,67	6,83
ΔT_2 (°C)	166 – 187				153 – 181	
% m	89,41				7,37	
ΔT_3 (°C)		282 – 306		238 – 268	242 – 271	
% m		98,48		16,01	12,61	
ΔT_4 (°C)			317 – 337	318 – 338	316 – 340	298 – 340
% m			77,04	65,29	55,90	78,56

As curvas de DTG da mistura física IMQ+ β CD, da mistura física AC+IMQ+ β CD e do complexo β CD:IMQ apresentam um pequeno pico entre 50 e 100 °C que corresponde à perda de moléculas de água. Este pico é deslocado para temperatura menor quando comparado ao pico observado na curva de DTG da β CD. As curvas de DTG das misturas físicas apresentam redução bastante significativa na intensidade dos picos correspondentes ao ácido cítrico e ao Imiquimod. Na curva de DTG do complexo, esses picos não são observados e redução na intensidade do pico correspondente à degradação da β CD também é observada. O início da degradação térmica do complexo ocorre em temperatura maior quando comparada ao início da degradação do Imiquimod livre, indicando que o fármaco apresenta maior estabilidade térmica na presença de β -ciclodextrina. O desaparecimento dos picos correspondentes ao ponto de fusão do ácido cítrico, do Imiquimod e a diminuição do pico correspondente à degradação da β -ciclodextrina na curva de DTG do complexo sugerem interação entre a β -ciclodextrina e o Imiquimod e fornece evidências da formação do complexo de inclusão.

4.8.2 – Calorimetria Diferencial de Varredura

A calorimetria diferencial de varredura é bastante empregada na análise de complexos de inclusão no estado sólido, em conjunto com a análise termogravimétrica e a difração de raios X. O ácido cítrico, o Imiquimod, a β -ciclodextrina, a mistura física β -ciclodextrina + Imiquimod, a mistura física ácido cítrico + β -ciclodextrina + Imiquimod e o complexo β CD:IMQ também foram caracterizados por calorimetria diferencial de varredura. As curvas de DSC dos componentes livres, das misturas físicas e do complexo β CD:IMQ estão na Figura 29.

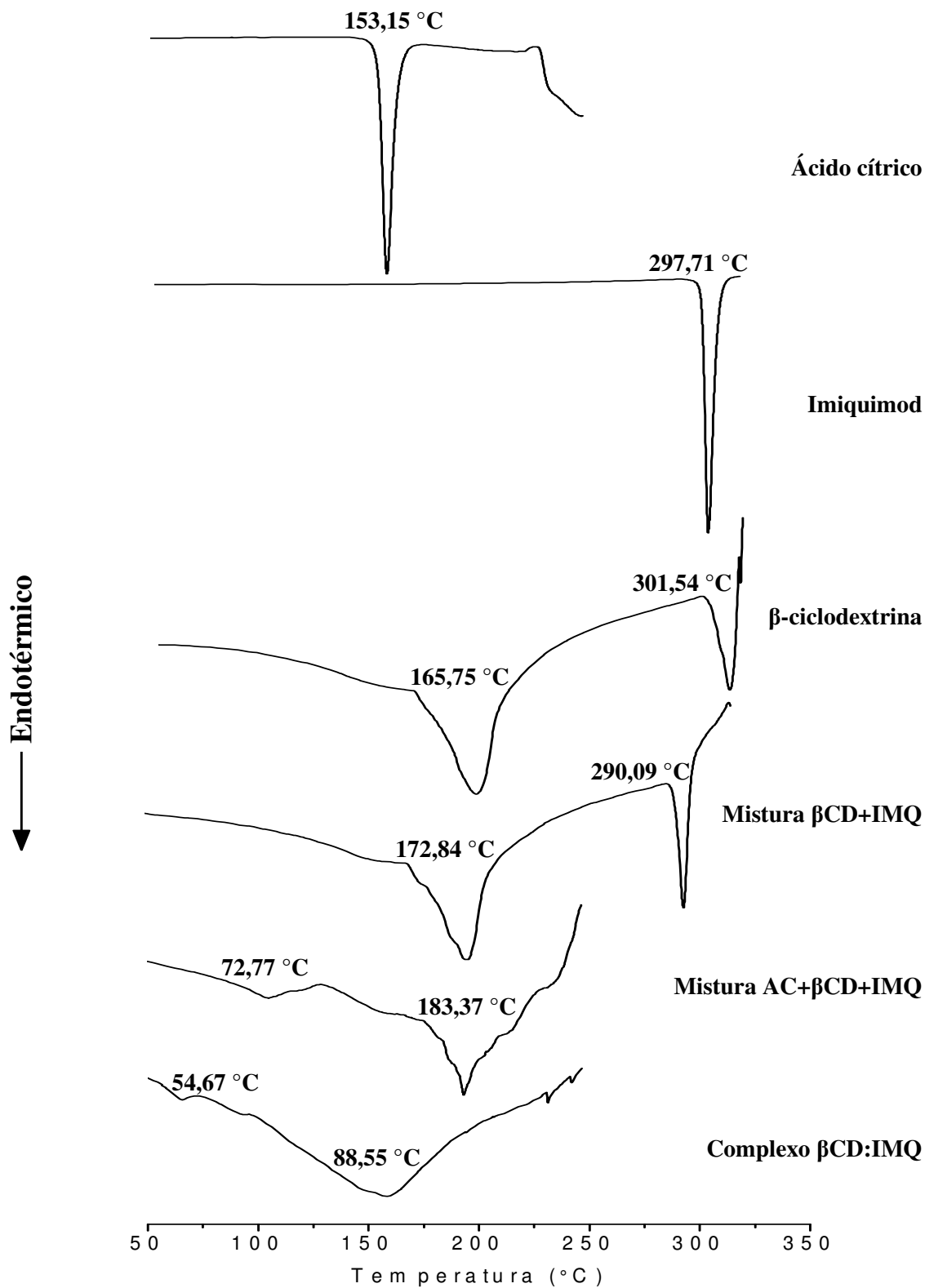


Figura 29. Curvas de DSC obtidas em atmosfera inerte, à taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

As curvas de DSC do ácido cítrico, da mistura física ácido cítrico + β -ciclodextrina + Imiquimod e do complexo foram obtidas entre 25 e 250 °C. O início da degradação do ácido cítrico foi observado a partir de 250 °C e o experimento foi interrompido nesta temperatura. No caso da mistura física ácido cítrico + β -ciclodextrina + Imiquimod, e do complexo foi observado aumento da pressão interna do recipiente da amostra e o experimento foi interrompido em 250 °C. As curvas de DSC da β -ciclodextrina, do Imiquimod e da mistura física β -ciclodextrina + Imiquimod foram obtidas entre 25 e 350 °C.

A curva de DSC do ácido cítrico apresenta um pico endotérmico em 153,15 °C que corresponde ao ponto de fusão do ácido. Um pico endotérmico agudo em 297,71 °C é observado na curva de DSC do Imiquimod e corresponde ao ponto de fusão do fármaco. Na curva de DSC da β -ciclodextrina são observados dois picos endotérmicos, sendo o primeiro em 165,75 °C e o segundo em 301,54 °C que corresponde à perda de água e à degradação térmica da β -ciclodextrina, respectivamente. A curva de DSC da mistura física β -ciclodextrina + Imiquimod apresenta dois picos endotérmicos, sendo que o pico a 172,84 °C corresponde à desidratação da β -ciclodextrina e o pico a 290,09 °C corresponde à sobreposição do ponto de fusão do Imiquimod e à degradação térmica da β -ciclodextrina. Esta curva consiste da sobreposição do perfil térmico da β -ciclodextrina e do Imiquimod sem alteração significativa na temperatura de desidratação da β -ciclodextrina, do ponto de fusão do Imiquimod e da temperatura de degradação da β -ciclodextrina, exceto por um deslocamento de 7 °C, para menor temperatura do ponto de fusão do Imiquimod e da temperatura de degradação da β -ciclodextrina que aparecem como um único pico endotérmico, sugerindo pouca interação entre a β CD e IMQ. Analisando a curva de DSC da mistura física ácido cítrico + β -ciclodextrina + Imiquimod pode-se observar dois picos endotérmicos alargados a 72,77 e 183,37 °C que corresponde ao ponto de fusão do ácido cítrico e à desidratação da β -ciclodextrina respectivamente. Houve redução significativa no tamanho do pico

que corresponde ao ponto de fusão do ácido cítrico e também foi observado deslocamento do pico para menor temperatura. Não foi possível verificar se houve alteração na temperatura de fusão do Imiquimod, pois o experimento teve que ser interrompido antes de atingir 350 °C. Na curva de DSC do complexo dois picos são observados: o primeiro, endotérmico, a 54,67 °C que corresponde ao ponto de fusão do ácido cítrico e outro, endotérmico, alargado, a 88,55 °C, indicando presença de estrutura amorfa. Entretanto, não é possível confirmar a formação do complexo, pois o experimento teve que ser interrompido antes de atingir a temperatura de fusão do Imiquimod de forma que alteração no pico endotérmico que corresponde ao ponto de fusão do fármaco não pode ser observada. A Tabela 20 apresenta a faixa de temperatura e o fluxo de calor dos eventos observados nas curvas de DSC.

Tabela 20. Intervalo de temperatura (ΔT) e fluxo de calor (J/g) para ácido cítrico (AC), Imiquimod (IMQ), β -ciclodextrina (β CD), misturas físicas e complexo β CD:IMQ.

Amostra	AC	IMQ	β CD	Mistura física		Complexo β CD:IMQ
				IMQ+ β CD	AC+IMQ + β CD	
ΔT_1 (°C)	153 – 157				73 – 104	55 – 63
J/g	314,3				45,95	3,2
ΔT_2 (°C)			166 – 194	173 - 197	183 – 193	88 – 158
J/g			512,1	252,9	207,4	221,8
ΔT_3 (°C)		298 – 300	301 – 309	290 – 294		
J/g		314,2	45,48	52,28		

4.9 – Difractometria de raios X

A difratometria de raios X foi empregada para investigar a cristalinidade do complexo de inclusão via comparação dos difratogramas do complexo, dos componentes livres e da mistura física ácido cítrico + β -ciclodextrina + Imiquimod. Os difratogramas (Figura 30) do ácido cítrico, do Imiquimod e da β -ciclodextrina apresentam picos intensos e finos indicando estrutura cristalina dos componentes livres. O difratograma da mistura física mostra perda da cristalinidade com redução significativa da intensidade dos picos. A diminuição da intensidade dos picos pode ser atribuída à redução do tamanho de partícula e à dispersão dos componentes cristalinos puros na mistura física (40). O difratograma do complexo mostra padrão de difração completamente diferente daquele observado para os componentes livres e sugere presença de estrutura amorfa. A formação do complexo normalmente é associada à amorfização (redução da cristalinidade), mas a liofilização também leva a obtenção do fármaco no estado amorfo. Para um fármaco cristalino com pouca solubilidade aquosa, a formação do complexo estabiliza o fármaco na fase amorfa, sendo que o alto estado energético da fase amorfa geralmente leva a um aumento significativo da solubilidade e conseqüentemente aumenta a biodisponibilidade do fármaco (62) e (63). Os resultados obtidos por difratometria de raios X evidenciam a formação do complexo, mas não são por si só, conclusivos (22).

Os principais picos (2θ) observados nos difratogramas do ácido cítrico, do Imiquimod, da β -ciclodextrina e da mistura física ácido cítrico + β -ciclodextrina + Imiquimod estão na Tabela 21. Observa-se que o difratograma da mistura física apresenta picos que correspondem aos observados nos difratogramas dos componentes livres. Os picos observados no difratograma do Imiquimod apresentam concordância com dados reportados na literatura (64).

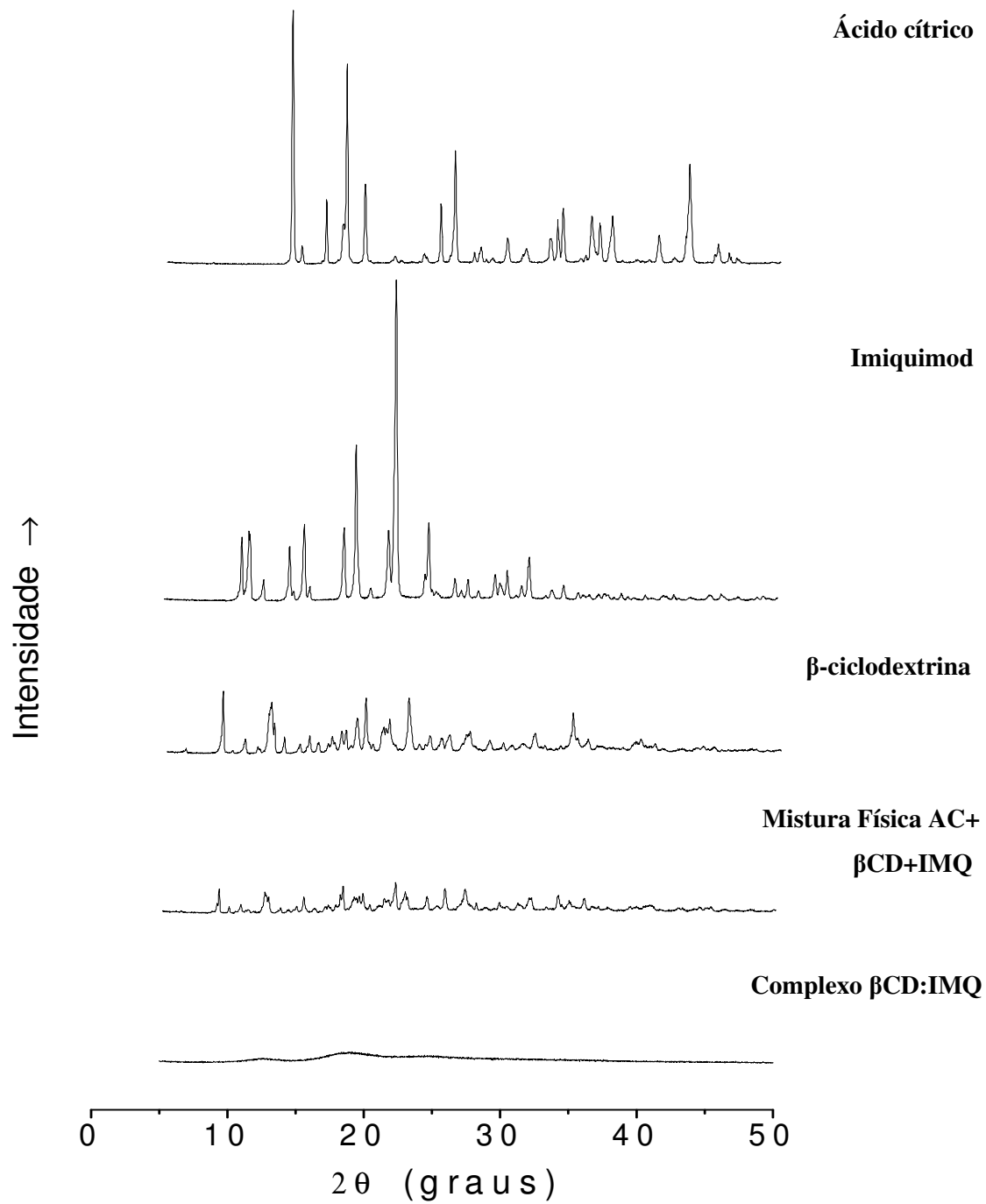


Figura 30. Difrátogramas de raios X do ácido cítrico, do Imiquimod, da β-ciclodextrina, da mistura física ácido cítrico + β-ciclodextrina + Imiquimod, e do complexo.

Tabela 21. Principais picos (2 θ) observados no difratograma do ácido cítrico, Imiquimod, β -ciclodextrina e mistura física ácido cítrico + β -ciclodextrina + Imiquimod.

Componente	Principais Picos (2θ)
Ácido cítrico	14,2 / 18,2 / 19,52 / 25,08 / 26,14 / 34,02 / 43,32
Imiquimod	10,72 / 11,22 / 12,3 / 14,2 / 15,3 / 18,2 / 19,08 / 21,46 / 22,02 / 24,12 / 24,40 / 29,26 / 31,76
β -ciclodextrina	9,08 / 12,58 / 12,66 / 12,86 / 15,44 / 18,12 / 19,58 / 22,74 / 24,24 / 25,74 / 27,22 / 34,76
Mistura Física AC+ β CD+IMQ	9,16 / 12,52 / 12,78 / 15,36 / 18,26 / 19,04 / 19,7 / 22,04 / 22,1 / 22,8 / 24,38 / 25,7 / 27,18 / 33,98 / 34,02

4.10 – Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura foi usada para analisar os aspectos morfológicos microscópicos do complexo. Em conjunto com a difratometria de raios X, a microscopia eletrônica de varredura permite observar alterações na morfologia do complexo de inclusão e fornece evidências da existência de nova fase sólida (22). A Figura 31 ilustra as fotomicrografias do Imiquimod, do ácido cítrico, da β -ciclodextrina, da mistura física ácido cítrico + Imiquimod + β -ciclodextrina e do complexo.

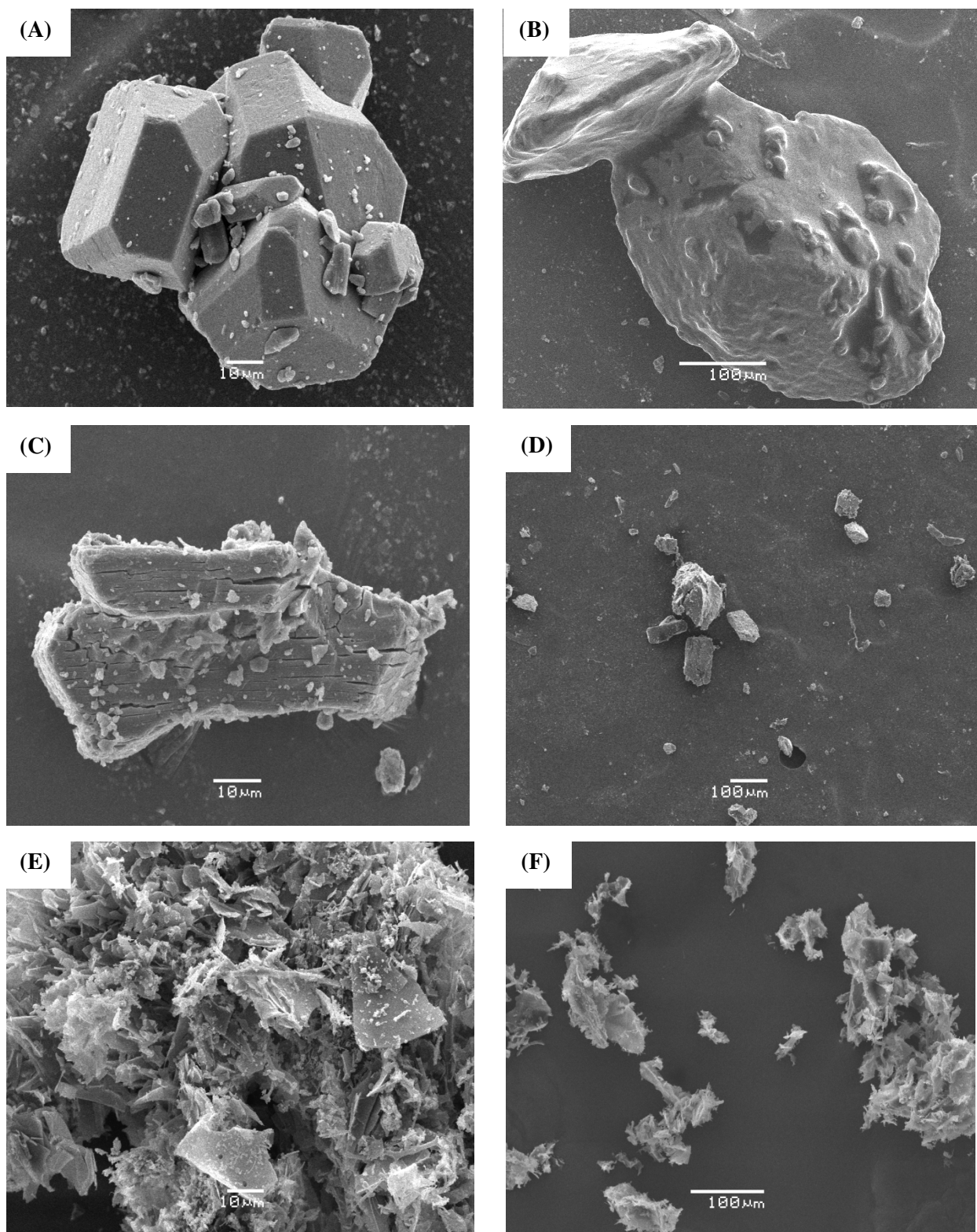


Figura 31. Fotomicrografias de (A) Imiquimod; (B) Ácido cítrico; (C) β -ciclodextrina; (D) Mistura física ácido cítrico + β -ciclodextrina + Imiquimod; (E) e (F) Complexo β CD:IMQ. Aumento 100x a 1300x.

Estas micrografias mostram que os cristais do Imiquimod (Figura 31A) apresentam faces bem definidas e distribuição de tamanho homogêneo. O Imiquimod cristaliza no sistema ortorrômbico, onde as moléculas estão unidas por fortes ligações de hidrogênio entre o grupo amino e o anel imidazol, que conseqüentemente contribuem para a alta estabilidade térmica do fármaco, cujo ponto de fusão é 297-299 °C (51) e (65). A Figura 31B mostra o cristal do ácido cítrico cuja estrutura cristalina apresenta forma bastante irregular, enquanto que a fotomicrografia 31C mostra os cristais da β -ciclodextrina cujas partículas apresentam ampla distribuição de tamanho. A Figura 31D apresenta a fotomicrografia da mistura física. Observa-se ausência de interação entre os componentes pela presença de cristais dos componentes individuais. Por outro lado, uma alteração notável na estrutura cristalina do complexo β CD:IMQ é observada (Figuras 31E e F). Nota-se alteração na forma e tamanho dos cristais não sendo possível diferenciar os cristais do ácido cítrico, da β -ciclodextrina e do Imiquimod. Observa-se também a formação de agregados. No entanto, como foi mencionado no item 4.9, esta nova forma sólida pode ser tanto devido à amorfização dos componentes em virtude da formação do complexo como devido à sua liofilização. Portanto, os resultados da microscopia eletrônica de varredura em conjunto com os resultados obtidos pelas outras técnicas podem ser considerados como evidências da formação do complexo β CD:IMQ.

4.11 – Modelagem Molecular

Cálculos quantum-mecânicos fornecem informações sobre as características estruturais dos complexos de inclusão e a representação da estrutura tridimensional do complexo formado (66). O método semi-empírico PM3 foi empregado nos cálculos para otimizar a geometria do complexo. Os estudos foram realizados com o Imiquimod em sua forma neutra e também na sua forma ionizada. A estrutura inicial do complexo de inclusão foi criada com base nos resultados dos experimentos de RMN ROESY ^1H 1D, os quais indicam que o fármaco penetra a cavidade da β -ciclodextrina com o grupo isobutil voltado para extremidade menor da mesma, sendo observada interação dos prótons da metila com os prótons H5 localizados nesta extremidade, enquanto o anel benzênico está voltado para a extremidade maior da β -ciclodextrina, onde os prótons do anel aromático interagem com os prótons H3. A otimização da estrutura molecular do complexo reforça a evidência experimental, sendo que a estrutura tridimensional do complexo obtida pela modelagem molecular apresenta esta orientação. Foi observado que a estrutura do complexo com o anel aromático do Imiquimod voltado para a extremidade menor da β -ciclodextrina não apresenta um mínimo de energia, de modo que, os cálculos foram realizados considerando apenas a geometria sugerida pelos resultados dos experimentos de RMN ^1H ROESY 1D. A estrutura do complexo mais favorecida energeticamente está na Figura 32.

A energia de ligação do complexo ($\Delta E_{\text{ligação}}$) foi calculada de acordo com a equação (9), onde $E(\beta\text{CD:IMQ})$ corresponde à energia da geometria otimizada do complexo, $E(\text{IMQ})_{\text{livre}}$ e $E(\beta\text{CD})_{\text{livre}}$ correspondem às energias das geometrias otimizadas dos componentes livres.

$$\Delta E_{\text{ligação}} = E(\beta\text{CD:IMQ}) - [E(\text{IMQ})_{\text{livre}} + E(\beta\text{CD})_{\text{livre}}] \quad (9)$$

A energia de ligação do complexo com o fármaco na sua forma neutra foi – 0,085 kJ/mol e a do complexo com o fármaco na forma ionizada foi – 0,126 kJ/mol. Estes valores apontam fraca interação entre a β -ciclodextrina e o Imiquimod e suportam os resultados experimentais, sugerindo que o Imiquimod interage com a cavidade da β -ciclodextrina com os grupos metilas voltados para a extremidade menor da mesma. Para identificação dos prótons da β -ciclodextrina e do Imiquimod ver Anexos 15 e 16.

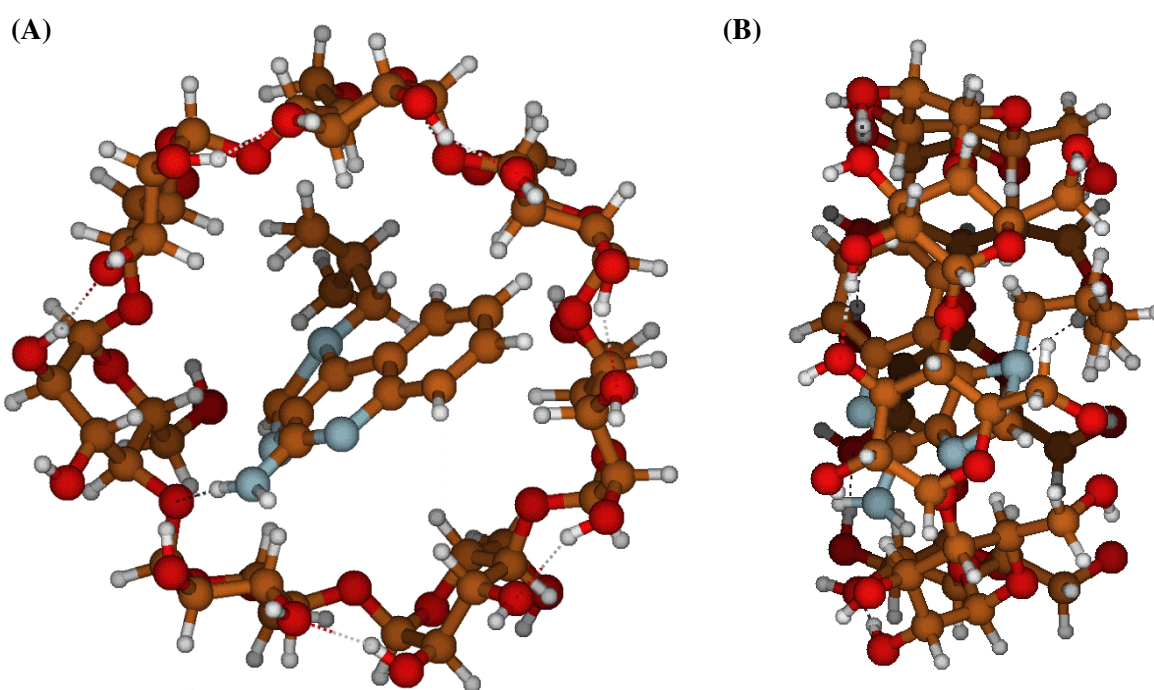


Figura 32. Estrutura tridimensional do complexo β CD:IMQ. (A) Visualização da extremidade maior da β -ciclodextrina; (B) Visualização da lateral da β -ciclodextrina.

CAPÍTULO V
CONCLUSÃO

CAPÍTULO V - CONCLUSÃO

Os resultados dessa dissertação demonstraram que o fármaco imunomodulador Imiquimod forma complexos de inclusão com β -ciclodextrina. O complexo β CD:IMQ foi caracterizado em solução pelas técnicas espectroscópicas que forneceram evidências da formação do complexo de inclusão. A técnica ressonância magnética nuclear é de fundamental importância na caracterização de complexos de inclusão, pois além de fornecer evidências da formação do complexo pela análise dos deslocamentos químicos, também permite obter informação sobre a geometria e a fração de fármaco complexado.

As constantes de equilíbrio de associação obtidas pelas duas técnicas indicam fraca interação entre a β -ciclodextrina e o Imiquimod. Os valores de K_c obtidos por espectroscopia de absorção UV/Vis mostraram que o valor dessa constante em solução de ácido cítrico pH 3,0 foi menor do que os valores observados para tampão acetato pH 5,6 e tampão fosfato pH 7,4. Os resultados indicam que o valor de K_c diminui à medida que o grau de ionização do fármaco aumenta. No entanto, aumento na eficiência de complexação foi observado em solução de ácido cítrico pH 3,0. Assim, a redução no valor da constante de equilíbrio de associação foi compensada pelo aumento da eficiência de complexação. Os valores obtidos para a eficiência de complexação foram extremamente baixos apesar da solubilidade do Imiquimod em ácido cítrico e na presença de β -ciclodextrina ter aumentado 53 vezes em relação à solubilidade aquosa. Os valores baixos da eficiência de complexação podem ser atribuídos a pouca solubilidade do fármaco tanto em solução aquosa como na presença de cossolventes.

Os resultados do estudo de solubilidade de fase indicaram que o complexo formado tem estequiometria 1:1 (β -ciclodextrina:Imiquimod), sendo esta estequiometria confirmada pelo método da variação contínua.

Os experimentos de RMN ^1H ROESY 1D permitiram obter evidências da formação do complexo através da análise das interações entre os prótons da β -ciclodextrina e do Imiquimod. Os resultados sugerem que o fármaco penetra a cavidade da β -ciclodextrina com o grupo isobutil voltado para a extremidade menor da macromolécula. Os resultados dos experimentos DOSY possibilitaram obter a fração de Imiquimod no complexo de inclusão e indicaram que a fração do fármaco presente no complexo aumenta com aumento da concentração da β -ciclodextrina. Os resultados dos experimentos DOSY mostraram também que o ácido cítrico interage com o complexo $\beta\text{CD}:\text{IMQ}$, pois foi observada alteração no deslocamento químico dos prótons do ácido cítrico, principalmente dos prótons H_i . No entanto, não foi possível determinar o tipo de interação.

O complexo também foi caracterizado no estado sólido por termogravimetria e calorimetria diferencial de varredura, difratometria de raios X e microscopia eletrônica de varredura. Os resultados da análise térmica e da difração de raios X indicaram a presença de estrutura amorfa que pode ser resultado da liofilização do complexo e também da formação do mesmo. As alterações no perfil térmico e no padrão de difração de raios X do complexo de inclusão são bastante significativas quando comparadas às dos componentes livres e podem ser consideradas como evidências de sua formação. Os resultados obtidos por microscopia eletrônica de varredura mostraram uma alteração notável na morfologia do complexo quando comparada à morfologia dos componentes individuais. As três técnicas permitiram verificar alterações na estrutura cristalina e na morfologia do complexo, sendo que essas alterações podem ser consideradas como indicativos de sua formação.

Os resultados da modelagem molecular apresentaram concordância com os resultados observados experimentalmente. Os experimentos de RMN ^1H ROESY 1D indicaram que o Imiquimod penetra a cavidade da β -ciclodextrina com o grupo isobutil voltado para a extremidade menor da mesma. A estrutura tridimensional mais energeticamente estável obtida na modelagem molecular também apresenta

esta orientação. Os cálculos teóricos possibilitaram complementar e enriquecer a compreensão dos dados experimentais.

Em conjunto, a caracterização em solução e a caracterização no estado sólido mostraram que o Imiquimod forma complexo de inclusão com a β -ciclodextrina. No entanto, os valores baixos da constante de equilíbrio de associação e da eficiência de complexação indicam que a interação entre Imiquimod e a β -ciclodextrina é fraca. Considerando as condições empregadas no estudo, os resultados indicam que a β -ciclodextrina não é o sistema carreador mais adequado para aumentar a solubilidade aquosa do Imiquimod o que leva a novas possibilidades de pesquisa para este fármaco.

CAPÍTULO VI
PERSPECTIVAS

CAPÍTULO VI - PERSPECTIVAS

Este estudo permitiu avaliar a solubilidade aquosa do Imiquimod na presença de β -ciclodextrina e ácido cítrico. Os resultados dessa dissertação levam a novas possibilidades de pesquisa com o fármaco. Como sugestão para trabalhos futuros pode-se considerar:

(a) Experimentos de RMN em solvente apolar, como por exemplo, DMSO- d_6 , para verificar a interação entre o ácido cítrico e o complexo de inclusão;

(b) Preparação do complexo β CD:IMQ na presença de outro hidroxí-ácido (ácido ascórbico, láctico, málico ou tartárico) e avaliação da variação da razão molar β CD:hidroxí-ácido na solubilidade do Imiquimod;

(c) Emprego da sulfobutil-éter β -ciclodextrina, derivado aniônico da β -ciclodextrina, que é mais solúvel do que a ciclodextrina natural e forma complexo mais estável com moléculas ionizadas;

(d) A incorporação do complexo β CD:IMQ em uma forma farmacêutica (creme ou gel-creme) e posteriormente, a realização de teste *in vivo* e estudo comparativo com a formulação comercial;

(e) Uso de sistemas lipídicos, como por exemplo, nanopartículas lipídicas sólidas ou nanoemulsões, visto que o Imiquimod é mais solúvel em meio oleoso.

CAPÍTULO VII
REFERÊNCIAS

CAPÍTULO VII - REFERÊNCIAS

1. Van Egmond S, et al. Successful treatment of perianal Bowen's disease with imiquimod. *International Journal of Dermatology* 2007;46(3):318-9.
2. Buck HW, Guth KJ. Treatment of vaginal intraepithelial neoplasia (primarily low grade) with imiquimod 5% cream. *Journal of Lower Genital Tract Disease* 2003;7(4):290-3.
3. Van Seters M, et al. Treatment of vulvar intraepithelial neoplasia with topical imiquimod. *New England Journal of Medicine* 2008;358(14):1465-73.
4. Brandão FM, et al. Topical drugs. In: Frosch PJ, Menné T, Lepoittevin J-P, editors. *Contact dermatitis*: Springer Berlin Heidelberg; 2006. p. 623-52.
5. Lebwohl M, et al. Imiquimod 5% cream for the treatment of actinic keratosis: results from two phase III, randomized, double-blind, parallel group, vehicle-controlled trials. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2004;50(5):714-21.
6. Persaud A, Lebwohl M. Imiquimod cream in the treatment of actinic keratoses. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2002;47(4):S236-S9.
7. Chollet J, et al. Development of a topically active imiquimod formulation. *Pharmaceutical Development and Technology* 1999;4(1):35-43.
8. Vidal D, Alomar A. Mode of action and clinical use of imiquimod. *Expert Review of Dermatology* 2008;3(2):151-9.
9. Frömring KH, Szejtli J. Cyclodextrins in pharmacy. Davies JED, editor. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1994. 224 p.
10. Brewster ME, Loftsson T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2007;59(7):645-66.
11. Loftsson T, Brewster ME. Cyclodextrins as functional excipients: Methods to enhance complexation efficiency. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2012;101(9):3019-32.
12. Redenti E, et al. Experimental and theoretical analysis of the interaction of (\pm)-cis-ketoconazole with β -cyclodextrin in the presence of (+)-l-tartaric acid. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1999;88(6):599-607.

13. Loftsson T, Masson M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. *International Journal of Pharmaceutics* 2001;225(1–2):15-30.
14. Franco De Lima RA, et al. Improvement of tetracaine antinociceptive effect by inclusion in cyclodextrins. *Journal of Drug Targeting* 2012;20(1):85-96.
15. Szejtli J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chemical Reviews* 1998;98(5):1743-54.
16. Szejtli J. Past, present, and future of cyclodextrin research. *Pure Applied Chemistry* 2004;76(10):1825-45.
17. Rekharsky MV, Inoue Y. Complexation thermodynamics of cyclodextrins. *Chemical Reviews* 1998;98(5):1875-918.
18. Zhang X, et al. Investigation and physicochemical characterization of clarithromycin–citric acid–cyclodextrins ternary complexes. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 2007;33(2):163-71.
19. Zoeller T, et al. Application of a ternary HP- β -CD-complex approach to improve the dissolution performance of a poorly soluble weak acid under biorelevant conditions. *International Journal of Pharmaceutics* 2012;430(1-2):176-83.
20. Kompany-Zareh M, et al. Spectrophotometric thermodynamic study of orientational isomers formed by inclusion of methyl orange into β -cyclodextrin nanocavity. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 2012;118(0):230-8.
21. Loftsson T, Brewster ME. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1996;85(10):1017-25.
22. Veiga F, et al. As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica: MinervaCoimbra; 2006. 228 p.
23. Barillaro V, et al. Effect of acidic ternary compounds on the formation of miconazole/cyclodextrin inclusion complexes b means of supercritical carbon dioxide. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2004; 7(3):378-88.
24. Redenti E, et al. Drug/cyclodextrin/hydroxy acid multicomponent systems. Properties and pharmaceutical applications. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2000;89(1):1-8.

25. Kurkov SV, Loftsson T. Cyclodextrins. *International Journal of Pharmaceutics* 2013;453(1):167-80.
26. Piel G, et al. Development of a non-surfactant parenteral formulation of miconazole by the use of cyclodextrins. *International Journal of Pharmaceutics* 1998;169(1):15-22.
27. Mura P, et al. Multicomponent systems of econazole with hydroxyacids and cyclodextrins. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 2001;39(1-2):131-8.
28. Higuchi T, Connors KA. Phase-solubility techniques advanced in analytical chemistry and instrumentation. Reill CN, editor. New York: Wiley-Intersciences; 1965. 117-212 p.
29. Figueiras A, et al. Interaction of omeprazole with a methylated derivative of β -cyclodextrin: phase solubility, NMR spectroscopy and molecular simulation. *Pharmaceutical Research* 2007;24(2):377-89.
30. Al-Rawashdeh NAF, et al. Inclusion complexes of sunscreen agents with β -cyclodextrin: spectroscopic and molecular modeling studies. *Journal of Spectroscopy* 2013:1-11.
31. Calderini A, et al. Host-guest interactions between dapsone and β -cyclodextrin (part I): study of the inclusion compound by nuclear magnetic resonance techniques. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 2013;75(1-2):77-86.
32. Faucci MT, et al. ^1H -NMR and molecular modelling techniques for the investigation of the inclusion complex of econazole with α -cyclodextrin in the presence of malic acid. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2000;23(1):25-31.
33. Mura P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2014.
34. Anselmi C, et al. Analytical characterization of a ferulic acid/ γ -cyclodextrin inclusion complex. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2006;40(4):875-81.
35. Johnson CS. Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: principles and applications. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 1999;34(3):203-56.

36. Giordano F, et al. Thermal analysis of cyclodextrins and their inclusion compounds. *Thermochimica Acta* 2001;380(2):123-51.
37. Ribeiro A, et al. Preparation and solid-state characterization of inclusion complexes formed between miconazole and methyl- β -cyclodextrin. *AAPS PharmSciTech* 2008;9(4):1102-9.
38. Al-Marzouqi AH, et al. Physicochemical properties of antifungal drug-cyclodextrin complexes prepared by supercritical carbon dioxide and by conventional techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2009;49(2):227-33.
39. Ribeiro LSS, et al. Physicochemical investigation of the effects of water-soluble polymers on vinpocetine complexation with β -cyclodextrin and its sulfobutyl ether derivative in solution and solid state. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2003;20(3):253-66.
40. Badr-Eldin SM, et al. Inclusion complexes of tadalafil with natural and chemically modified β -cyclodextrins. I: Preparation and in-vitro evaluation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2008;70(3):819-27.
41. Lewars E. Computational chemistry: Introduction to the theory and applications of molecular and quantum mechanics. Boston: Kluwer Academic Publishers; 2003. 471 p.
42. Morgon NH, Coutinho K. Métodos de química teórica e modelagem molecular. São Paulo: Editora Livraria da Física; 2007.539 p.
43. Lipkowitz KB. Applications of computational chemistry to the study of cyclodextrins. *Chemical Reviews* 1998;98(5):1829-74.
44. Müller BW, Albers E. Effect of hydrotropic substances on the complexation of sparingly soluble drugs with cyclodextrin derivatives and the influence of cyclodextrin complexation on the pharmacokinetics of the drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1991;80(6):599-604.
45. Nandi I, et al. Synergistic effect of PEG-400 and cyclodextrin to enhance solubility of progesterone. *AAPS PharmSciTech* 2003;4(1):1-5.
46. Faucci MT, Mura P. Effect of water-soluble polymers on naproxen complexation with natural and chemically modified beta-cyclodextrins. *Drug Development And Industrial Pharmacy* 2001;27(9):909-17.

47. Cirri M, et al. Simultaneous effect of cyclodextrin complexation, pH, and hydrophilic polymers on naproxen solubilization. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2006;42(1):126-31.
48. Taupitz T, et al. Cyclodextrin-water soluble polymer ternary complexes enhance the solubility and dissolution behaviour of poorly soluble drugs. Case example: Itraconazole. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2013;83(3):378-87.
49. Figueiras A, et al. Evaluation of host-guest complex formation between a benzimidazolic derivative and cyclodextrins by UV-VIS spectrophotometry and differential scanning calorimetry. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 2007;57(1-4):531-5.
50. Nilsson M. The DOSY Toolbox: A new tool for processing PFG NMR diffusion data. *Journal of Magnetic Resonance* 2009;200(2):296-302.
51. Zhao B, et al. Experimental and theoretical study on the structure and electronic spectra of imiquimod and its synthetic intermediates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2007;17(17):4942-6.
52. Pokharkar V, et al. Ternary complexation of carvedilol, β -cyclodextrin and citric acid for mouth dissolving tablet formulation. *Acta Pharmaceutica* 2009;59:121-32.
53. Calsavara LPV, et al. Enrofloxacin inclusion complexes with cyclodextrins. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 2012;73(1-4):219-24.
54. Zia V, et al. Effect of cyclodextrin charge on complexation of neutral and charged substrates: comparison of (SBE)7M-BCD to HP-BCD. *Pharmaceutical Research* 2001;18(5):667-73.
55. Chen M, et al. Study of inclusion complex of β -cyclodextrin and nitrobenzene. *Chemosphere* 2006;63(3):522-9.
56. Gerster JF, et al. Synthesis and structure-activity-relationships of 1H-imidazo[4,5-c]quinolines that induce interferon production. *Journal of Medicinal Chemistry* 2005;48(10):3481-91.
57. Greatbanks D, Pickford R. Cyclodextrins as chiral complexing agents in water, and their application to optical purity measurements. *Magnetic Resonance in Chemistry* 1987;25(3):208-15.

58. Folch-Cano C, et al. NMR and molecular fluorescence spectroscopic study of the structure and thermodynamic parameters of EGCG/ β -cyclodextrin inclusion complexes with potential antioxidant activity. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 2014;78(1-4):287-98.
59. Fernandes A, et al. Structural characterization of inclusion complexes between cyanidin-3-O-glucoside and β -cyclodextrin. *Carbohydrate Polymers* 2014;102(0):269-77.
60. Brand T, et al. Intermolecular interaction as investigated by NOE and diffusion studies. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 2005;46(4):159-96.
61. Lis-Cieplak A, et al. Comparative proton nuclear magnetic resonance studies of amantadine complexes formed in aqueous solutions with three major cyclodextrins. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2014;103(1):274-82.
62. Hancock BC, Zografi G. Characteristics and significance of the amorphous state in pharmaceutical systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1997;86(1):1-12.
63. Kaushal AM, et al. Amorphous drug delivery system: molecular aspects, design and performance. *Critical ReviewsTM Therapeutic Drug Carrier Systems* 2004;21(3):133-93.
64. Lakshmi Kumar T, et al. Salts of hydrates of imiquimod, an immune response modifier. *Crystal Growth & Design* 2009;9(11):4822-9.
65. Cheng J, et al. 1-(2-methylpropyl)-1H-imidazo[4,5-c]-quinolin-4-amine. *Acta Crystallographica Section E: Structure Reports Online* [Internet]. 2005; E61:[o2638–o9 pp.].
66. Sancho MI, et al. Inclusion complex of 2-chlorobenzophenone with cyclomaltoheptaose (β -cyclodextrin): temperature, solvent effects and molecular modeling. *Carbohydrate Research* 2011;346(13):1978-84.

ANEXOS

ANEXOS



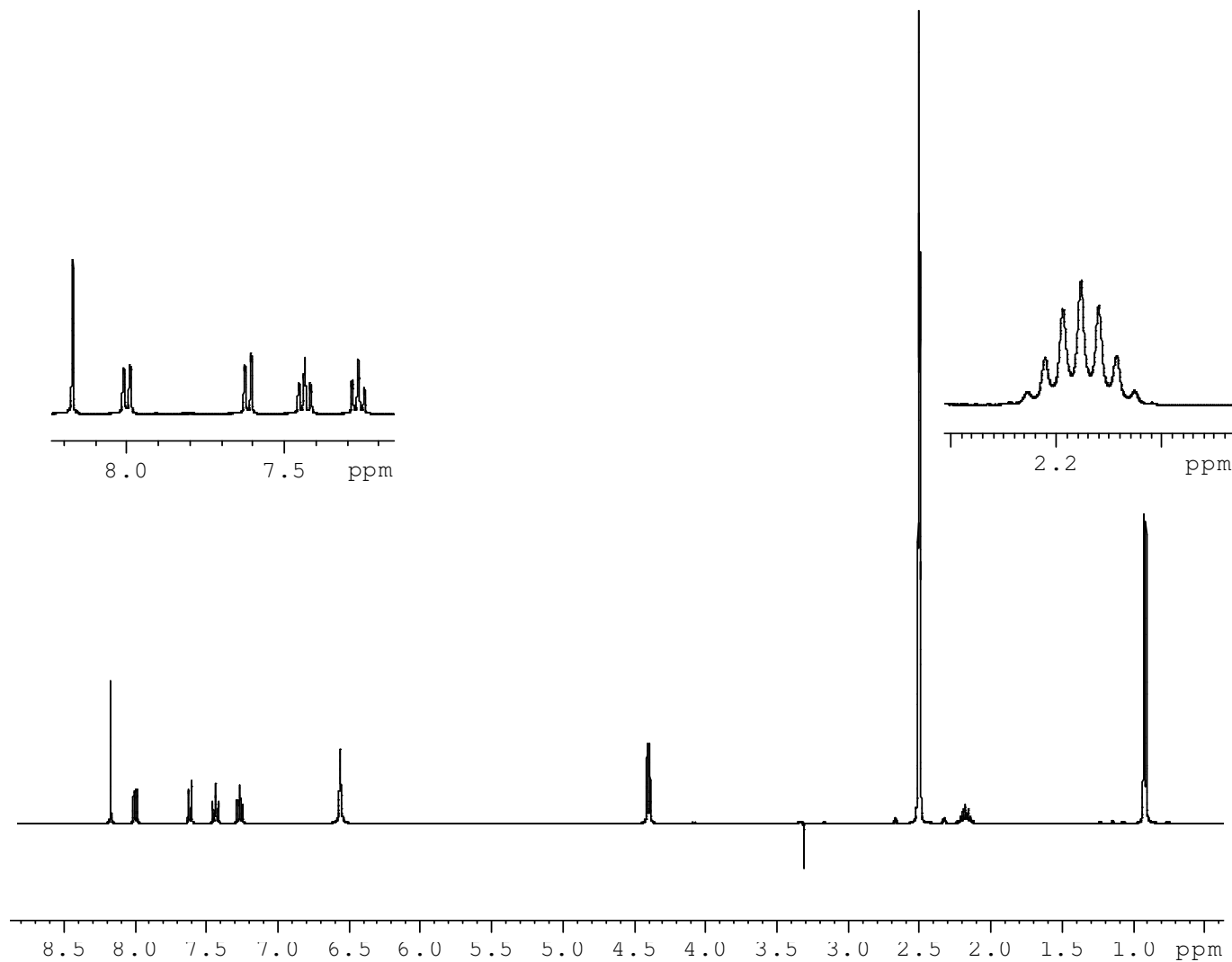
Current Data Parameters
NAME abr051sgH3
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140405
Time 13.36
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBI 1H/
PULPROG zgpr
TD 65536
SOLVENT DMSO
NS 64
DS 0
SWH 4409.171 Hz
FIDRES 0.067279 Hz
AQ 7.4317822 sec
RG 203
DW 113.400 usec
DE 7.00 usec
TE 300.2 K
D1 1.00000000 sec
D12 0.00002000 sec
TD0 1

==== CHANNEL f1 =====
SFO1 400.1813329 MHz
NUC1 1H
P1 7.74 usec
PLW1 12.00000000 W
PLW9 0.00002876 W

F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 400.1800080 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

123



Anexo 1. Espectro de RMN ¹H do Imiquimod (concentração 26 mM).

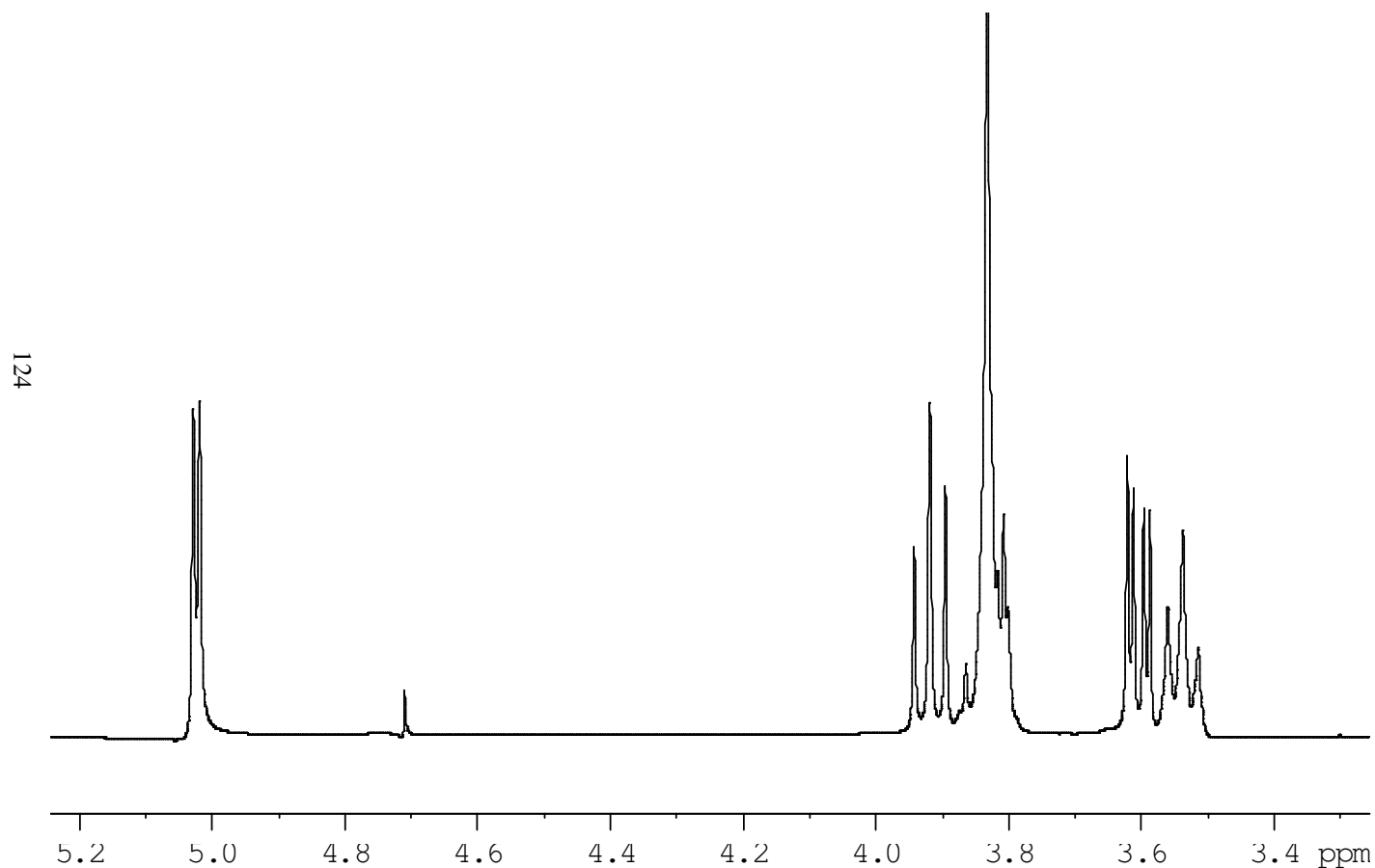


Current Data Parameters
NAME abr051sgH2
EXPNO 2
PROCNO 1

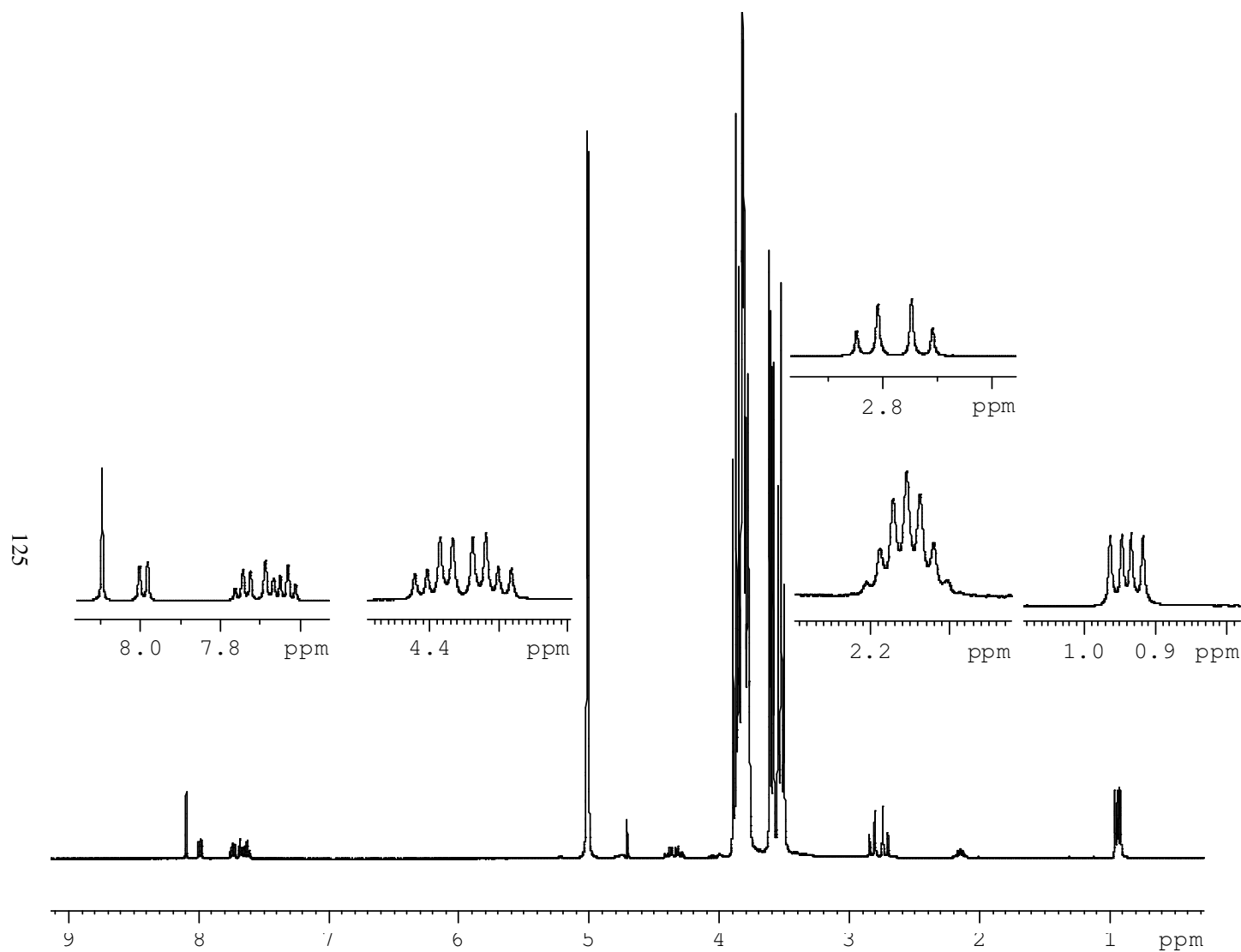
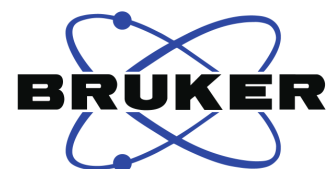
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140405
Time 12.34
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBI 1H/
PULPROG zgpr
TD 65536
SOLVENT D2O
NS 64
DS 0
SWH 4409.171 Hz
FIDRES 0.067279 Hz
AQ 7.4317822 sec
RG 71.8
DW 113.400 usec
DE 7.00 usec
TE 300.2 K
D1 1.00000000 sec
D12 0.00002000 sec
TD0 1

===== CHANNEL f1 =====
SFO1 400.1818857 MHz
NUC1 1H
P1 8.05 usec
PLW1 12.00000000 W
PLW9 0.00003114 W

F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 400.1800010 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00



Anexo 2. Espectro de RMN ¹H da β-ciclodextrina (concentração 26 mM).



Current Data Parameters
NAME abr051sgH4
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140405
Time 14.38
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBI 1H/
PULPROG zgpr
TD 65536
SOLVENT D2O
NS 64
DS 0
SWH 4409.171 Hz
FIDRES 0.067279 Hz
AQ 7.4317822 sec
RG 80.6
DW 113.400 usec
DE 7.00 usec
TE 300.2 K
D1 1.00000000 sec
D12 0.00002000 sec
TD0 1

==== CHANNEL f1 =====
SFO1 400.1818856 MHz
NUC1 1H
P1 8.07 usec
PLW1 12.00000000 W
PLW9 0.00003123 W

F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 400.1800009 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

Anexo 3. Espectro de RMN ¹H do complexo βCD:IMQ (concentração 26 mM).



Current Data Parameters
NAME out031sgH3
EXPNO 4
PROCNO 1

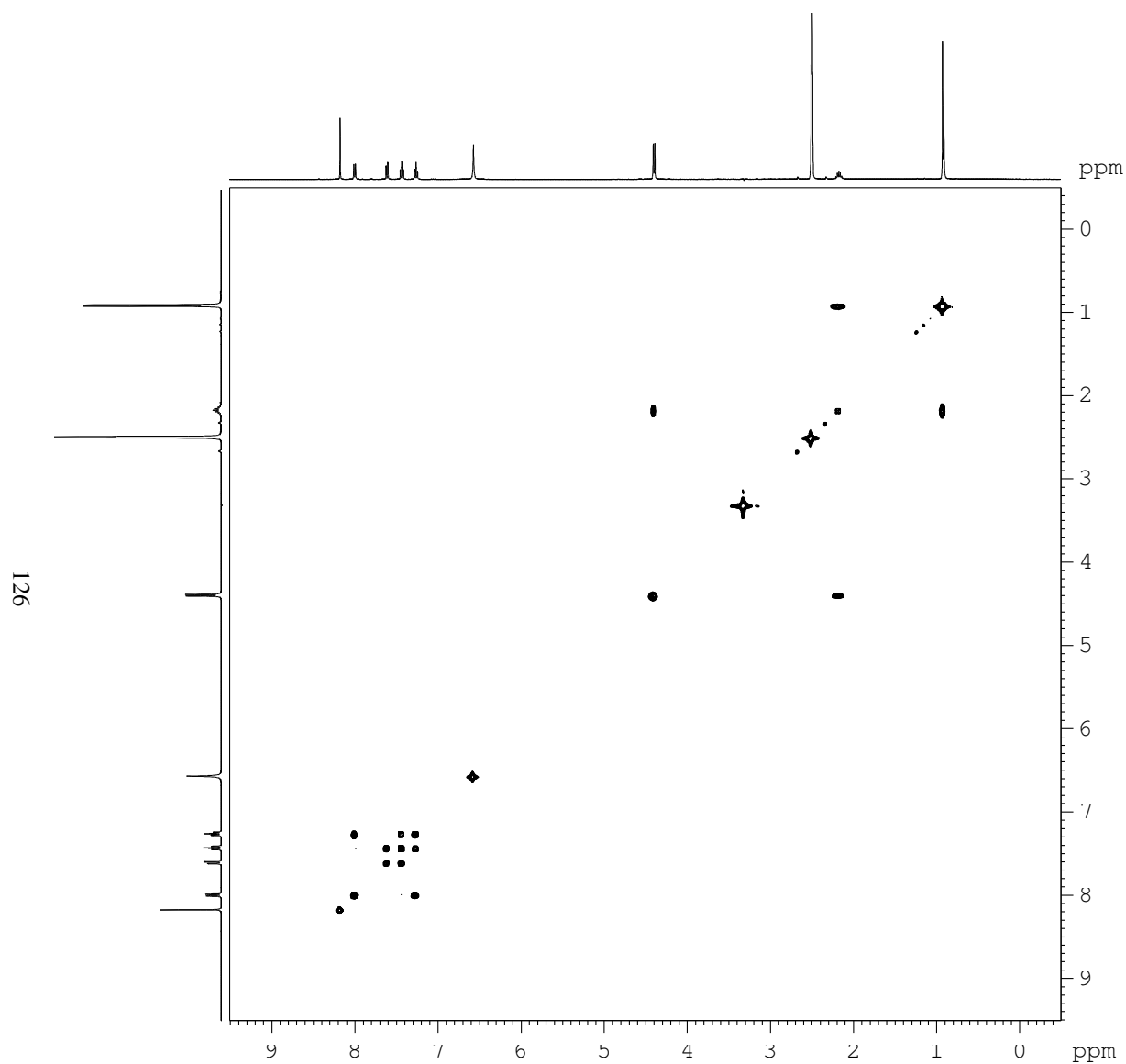
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20131003
Time 13.38
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm TBI 1H/13
PULPROG cosygppqf
TD 2048
SOLVENT DMSO
NS 2
DS 16
SWH 4006.410 Hz
FIDRES 1.956255 Hz
AQ 0.2555904 sec
RG 203
DW 124.800 usec
DE 10.00 usec
TE 298.2 K
D0 0.00000300 sec
D1 1.00000000 sec
D13 0.00000400 sec
D16 0.00020000 sec
IN0 0.00024960 sec

==== CHANNEL f1 =====
SF01 400.1818022 MHz
NUC1 1H
P0 8.40 usec
P1 8.40 usec
PLW1 14.99699974 W

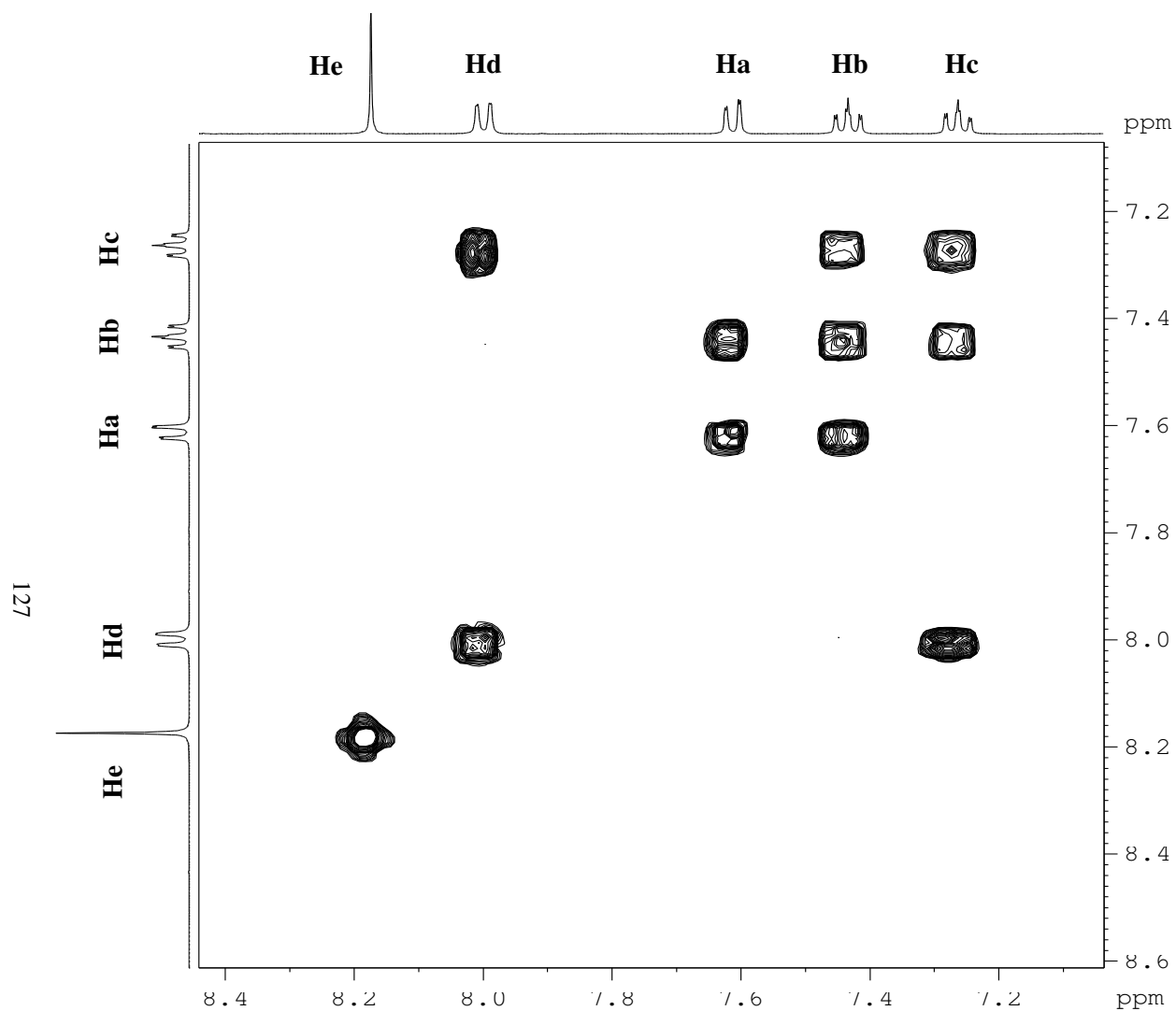
===== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM[1] SINE.100
GPZ1 10.00 %
P16 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD 256
SF01 400.1818 MHz
FIDRES 15.650040 Hz
SW 10.011 ppm
FnMODE QF

F2 - Processing parameters
SI 1024
SF 400.1800012 MHz
WDW SINE
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0
PC 1.40



Anexo 4. Mapa de contorno COSY do Imiquimod (concentração 26 mM).



Current Data Parameters
 NAME out031sgH3
 EXPNO 4
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20131003
 Time_ 13.38
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm TBI 1H/13
 PULPROG cosygpqf
 TD 2048
 SOLVENT DMSO
 NS 2
 DS 16
 SWH 4006.410 Hz
 FIDRES 1.956255 Hz
 AQ 0.2555904 sec
 RG 203
 DW 124.800 usec
 DE 10.00 usec
 TE 298.2 K
 D0 0.00000300 sec
 D1 1.00000000 sec
 D13 0.00000400 sec
 D16 0.00020000 sec
 IN0 0.00024960 sec

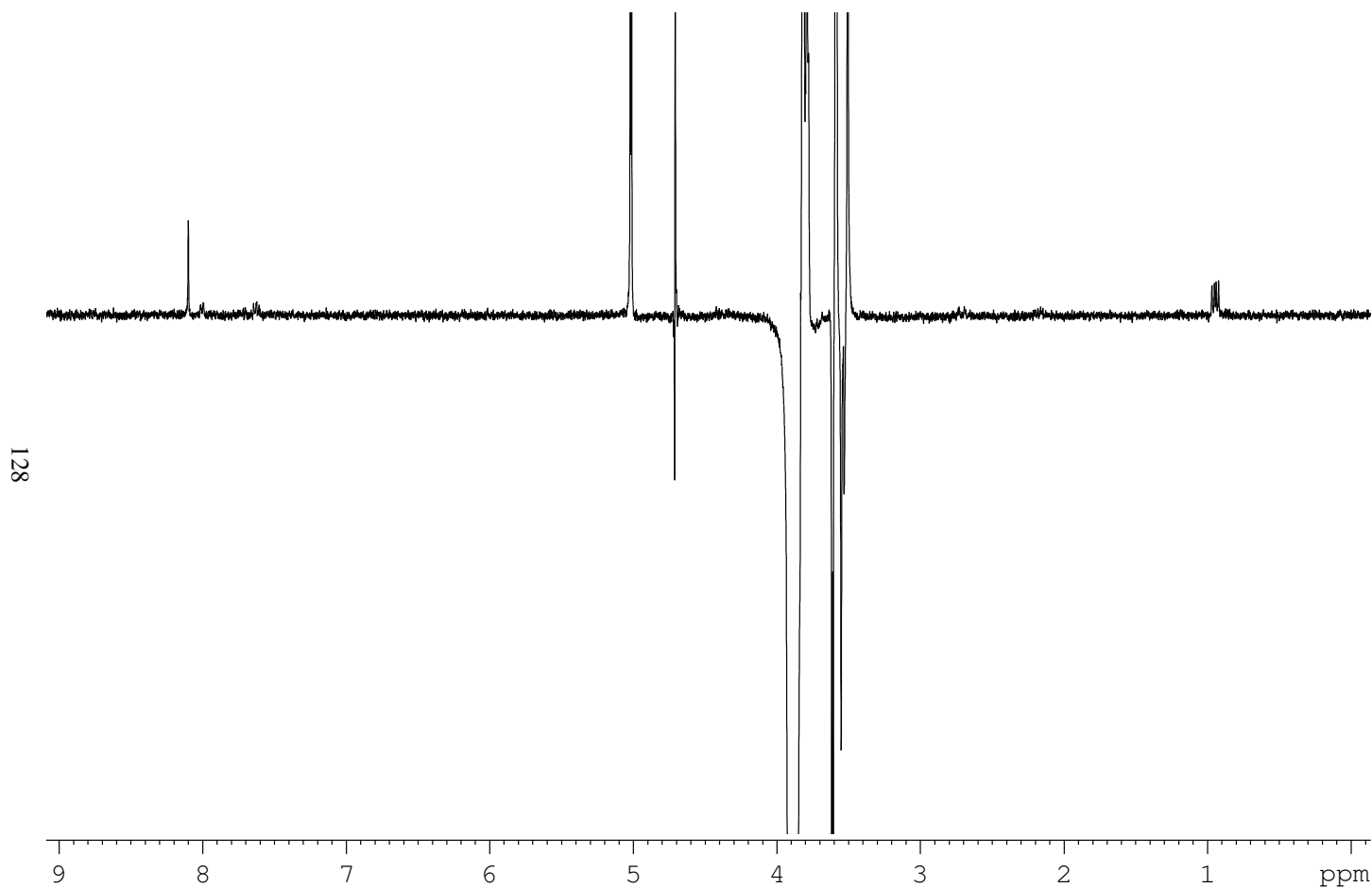
==== CHANNEL f1 =====
 SFO1 400.1818022 MHz
 NUC1 1H
 P0 8.40 usec
 P1 8.40 usec
 PLW1 14.99699974 W

===== GRADIENT CHANNEL =====
 GPNAM[1] SINE.100
 GPZ1 10.00 %
 P16 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
 TD 256
 SFO1 400.1818 MHz
 FIDRES 15.650040 Hz
 SW 10.011 ppm
 FnMODE QF

F2 - Processing parameters
 SI 1024
 SF 400.180012 MHz
 WDW SINE
 SSB 0
 LB 0 Hz
 GB 0
 PC 1.40

Anexo 5. Ampliação do mapa de contorno COSY do Imiquimod com as correlações homonucleares dos prótons do grupo imidazoquinolina.



```
Current Data Parameters
NAME          abr061sgH4
EXPNO         8
PROCNO        1

F2 - Acquisition Parameters
Date_         20140406
Time          19.31
INSTRUM       spect
PROBHD        5 mm PABBI 1H/
PULPROG       selrogp.2
TD            32768
SOLVENT       D2O
NS            512
DS            4
SWH           8012.820 Hz
FIDRES        0.244532 Hz
AQ            2.0447233 sec
RG            90.5
DW            62.400 usec
DE            7.00 usec
TE            300.2 K
D1            5.00000000 sec
D16           0.00020000 sec
L4            1587
P15           400000.00 usec
TD0           1
ZGOPTNS

===== CHANNEL f1 =====
SFO1          400.1815570 MHz
NUC1           1H
P1             8.11 usec
P12            80000.00 usec
P25            126.00 usec
PLW0           0 W
PLW1           12.00000000 W
PLW27          0.19902000 W
SPNAM[2]      Gaus1_180r.1000
SPOAL2         0.500
SPOFFS2       0 Hz
SPW2           0.00000291 W

===== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM[1]      SMSQ10.100
GPZ1          15.00 %
P16           1000.00 usec
```

Anexo 6. Espectro de RMN ^1H ROESY 1D do complexo $\beta\text{CD}:\text{IMQ}$ (concentração 26 mM), a 400 MHz, 25 °C, pulso seletivo nos prótons H3 da β -ciclodextrina.

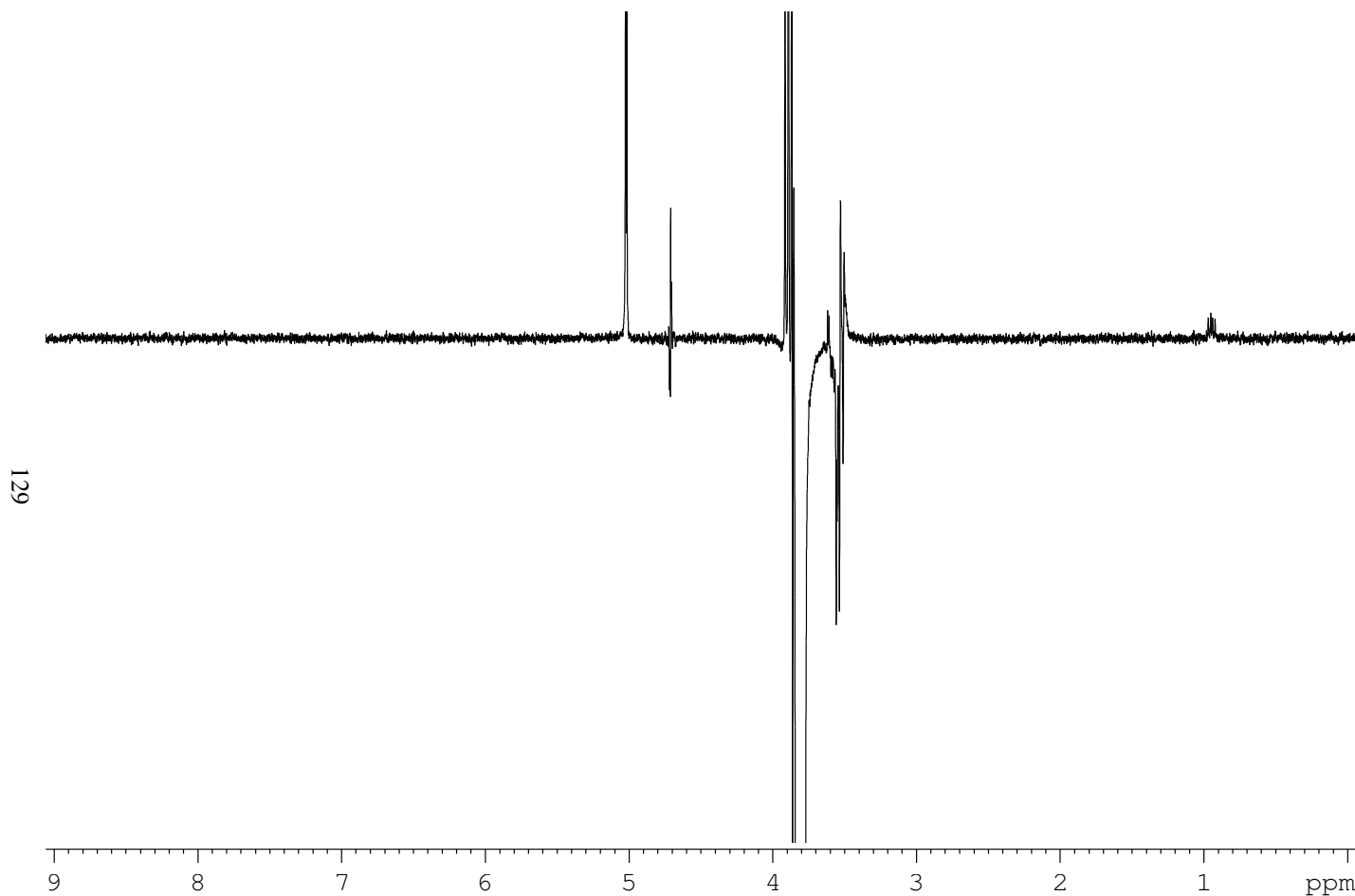


Current Data Parameters
NAME abr061sgH4
EXPNO 9
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140406
Time 20.36
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBI 1H/
PULPROG selrogp.2
TD 32768
SOLVENT D2O
NS 512
DS 4
SWH 8012.820 Hz
FIDRES 0.244532 Hz
AQ 2.0447233 sec
RG 90.5
DW 62.400 usec
DE 7.00 usec
TE 300.2 K
D1 5.00000000 sec
D16 0.00020000 sec
L4 1587
P15 400000.00 usec
TD0 1
ZGOPTNS

==== CHANNEL f1 =====
SFO1 400.1815175 MHz
NUC1 1H
P1 8.11 usec
P12 80000.00 usec
P25 126.00 usec
PLW0 0 W
PLW1 12.00000000 W
PLW27 0.19902000 W
SPNAM[2] Gaus1_180r.1000
SPOAL2 0.500
SPOFFS2 0 Hz
SPW2 0.00000291 W

===== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM[1] SMSQ10.100
GPZ1 15.00 %
P16 1000.00 usec



Anexo 7. Espectro de RMN ^1H ROESY 1D do complexo $\beta\text{CD}:\text{IMQ}$ (concentração 26 mM), a 400 MHz, 25 °C, pulso seletivo nos prótons H5 da β -ciclodextrina.

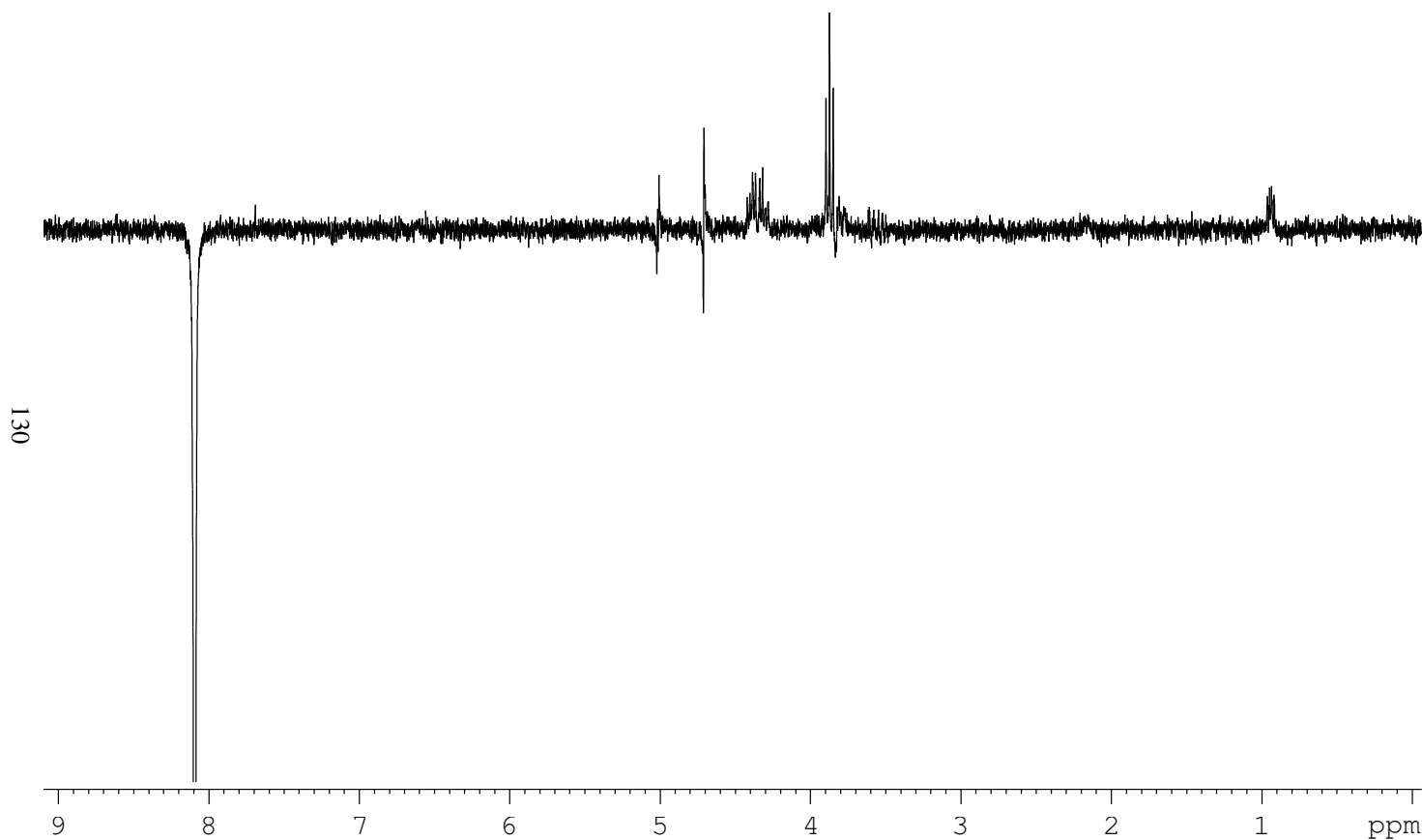


Current Data Parameters
NAME abr051sgH4
EXPNO 11
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameter
Date_ 20140405
Time 19.26
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBI 1H/
PULPROG selrogp.2
TD 32768
SOLVENT D2O
NS 512
DS 4
SWH 8012.820 Hz
FIDRES 0.244532 Hz
AQ 2.0447233 se
RG 80.6
DW 62.400 us
DE 7.00 us
TE 300.2 K
D1 5.00000000 se
D16 0.00020000 se
L4 1587
P15 400000.00 us
TD0 1
ZGOFINS

==== CHANNEL f1 =====
SFO1 400.1832407 MH
NUC1 1H
P1 8.07 us
P12 80000.00 us
P25 126.00 us
PLW0 0 W
PLW1 12.00000000 W
PLW27 0.19674000 W
SPNAM[2] Gaus1_180r.1000
SPOAL2 0.500
SPOFFS2 0 Hz
SPW2 0.00000288 W

==== GRADIENT CHANNEL ==
GPNAM[1] SMSQ10.100
GPZ1 15.00 %
P16 1000.00 us



Anexo 8. Espectro de RMN ^1H ROESY 1D do complexo $\beta\text{CD}:\text{IMQ}$ (concentração 26 mM), a 400 MHz, 25 °C, pulso seletivo no próton He do Imiquimod.

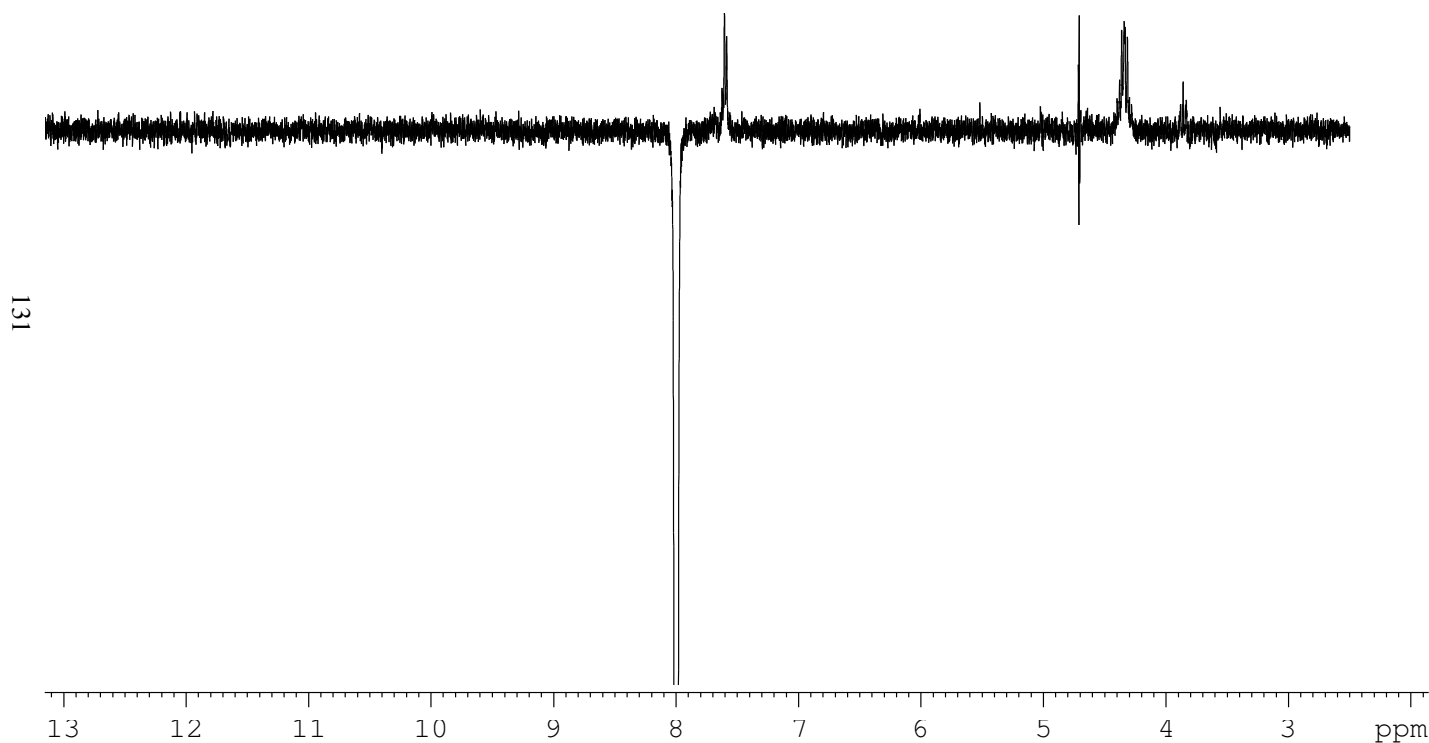


Current Data Parameters
NAME jun141sgH5
EXPNO 6
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140614
Time 15.37
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBI 1H/
PULPROG selrogp.2
TD 32768
SOLVENT D2O
NS 512
DS 4
SWH 4401.409 Hz
FIDRES 0.134320 Hz
AQ 3.7224448 sec
RG 90.5
DW 113.600 usec
DE 7.00 usec
TE 300.2 K
D1 5.00000000 sec
D16 0.00020000 sec
L4 1587
P15 400000.00 usec
TD0 1
ZGPTNS

==== CHANNEL f1 =====
SFO1 400.1832015 MHz
NUC1 1H
P1 8.00 usec
P12 80000.00 usec
P25 126.00 usec
PLW0 0 W
PLW1 12.00000000 W
PLW27 0.19359000 W
SPNAM[2] Gaus1_180r.1000
SPOAL2 0.500
SPOFFS2 0 Hz
SPW2 0.00000284 W

==== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM[1] SMSQ10.100
GPZ1 15.00 %
P16 1000.00 usec



Anexo 9. Espectro de RMN ^1H ROESY 1D do complexo $\beta\text{CD}:\text{IMQ}$ (concentração 26 mM), a 400 MHz, 25 °C, pulso seletivo no próton Hd do Imiquimod.

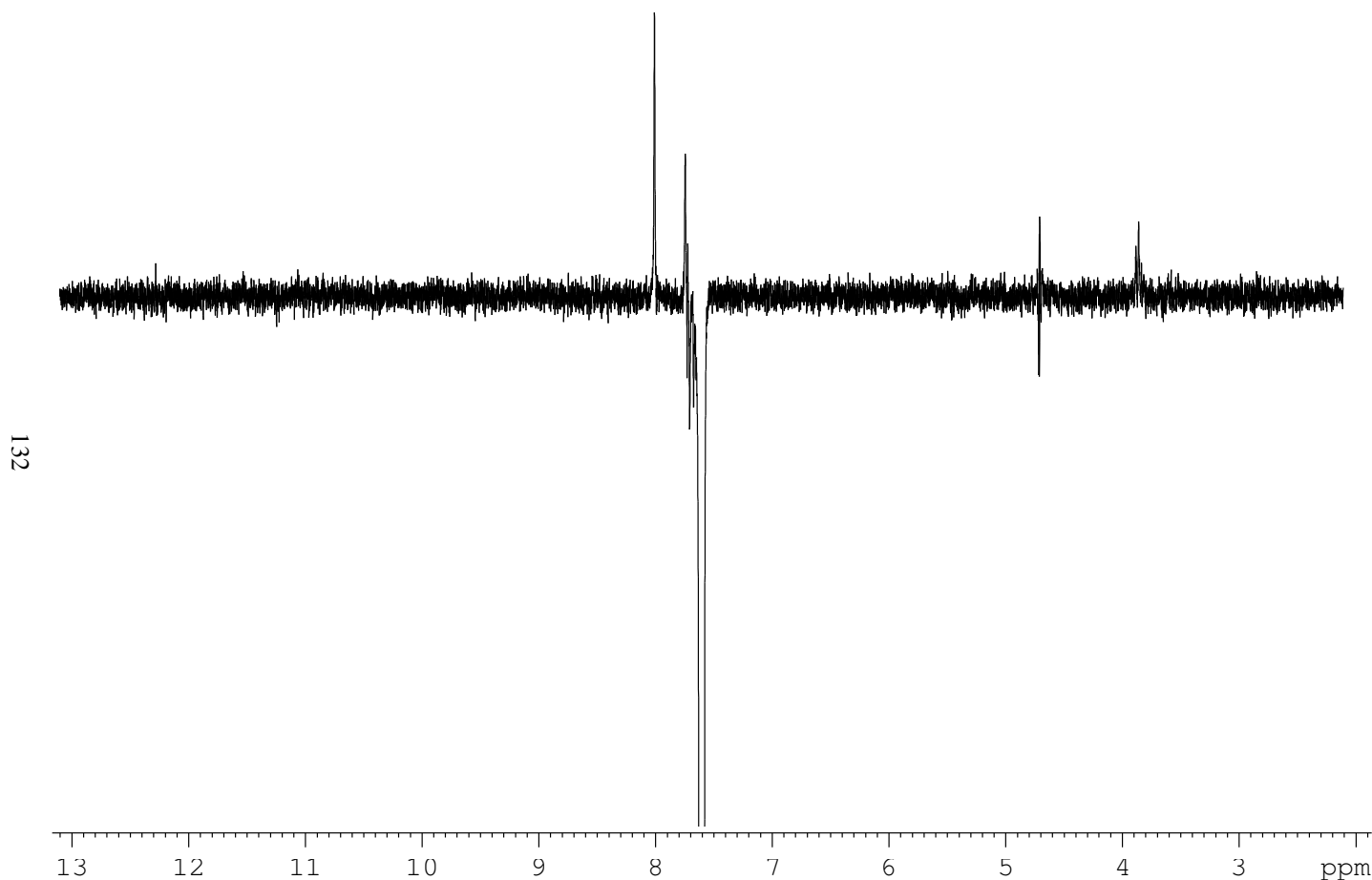


Current Data Parameters
NAME jun141sgH5
EXPNO 9
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters:
Date_ 20140614
Time 19.35
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBI 1H/
PULPROG selrogp.2
TD 32768
SOLVENT D2O
NS 512
DS 4
SWH 4401.409 Hz
FIDRES 0.134320 Hz
AQ 3.7224448 sec
RG 90.5
DW 113.600 usec
DE 7.00 usec
TE 300.2 K
D1 5.00000000 sec
D16 0.00020000 sec
L4 1587
P15 400000.00 usec
TD0 1
ZGOPTNS

==== CHANNEL f1 =====
SFO1 400.1830445 MHz
NUC1 1H
P1 8.00 usec
P12 80000.00 usec
P25 126.00 usec
PLW0 0 W
PLW1 12.00000000 W
PLW27 0.19359000 W
SPNAM[2] Gaus1_180r.1000
SPOAL2 0.500
SPOFFS2 0 Hz
SPW2 0.00000284 W

==== GRADIENT CHANNEL ====
GPNAM[1] SMSQ10.100
GPZ1 15.00 %
P16 1000.00 usec



Anexo 10. Espectro de RMN ^1H ROESY 1D do complexo $\beta\text{CD}:\text{IMQ}$ (concentração 26 mM), a 400 MHz, 25 °C, pulso seletivo no próton Hc do Imiquimod.

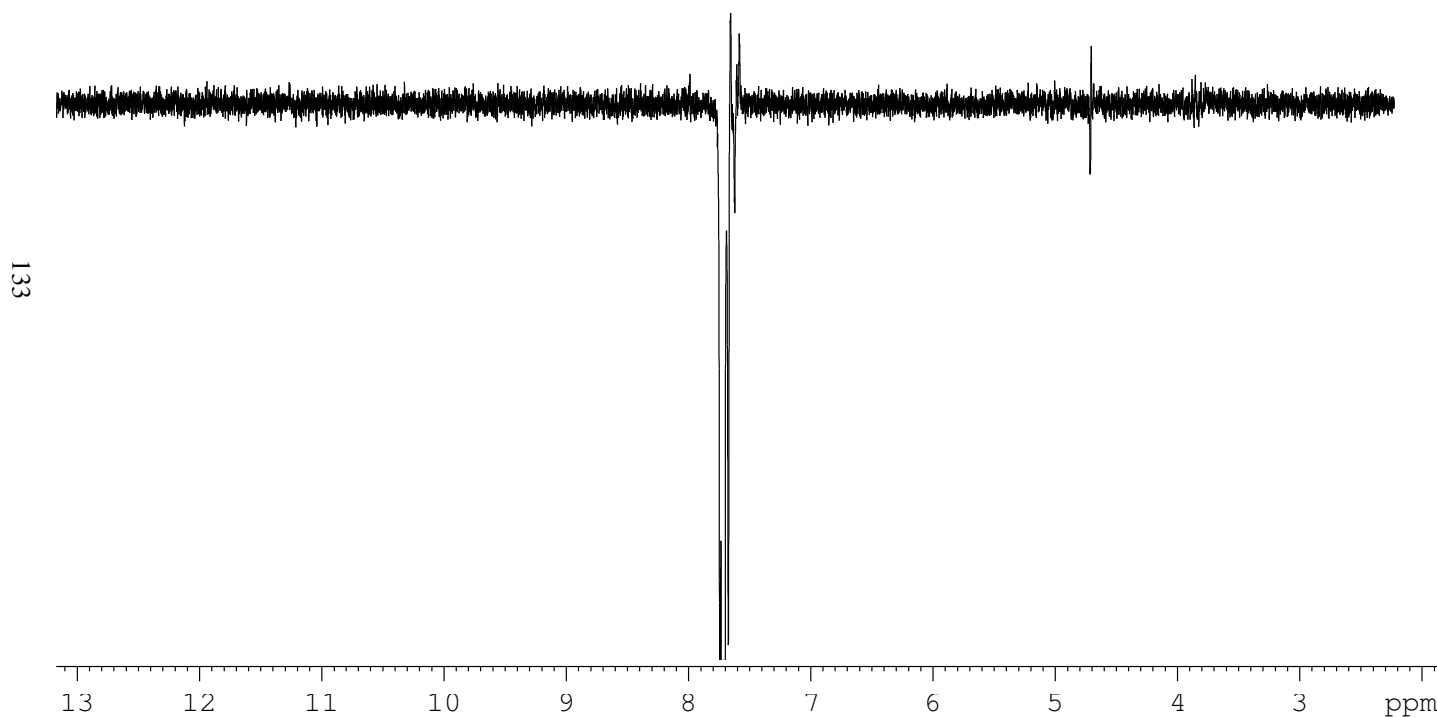


Current Data Parameters
NAME jun14lsgH5
EXPNO 7
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140614
Time 16.56
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBI 1H/
PULPROG selrogp.2
TD 32768
SOLVENT D2O
NS 512
DS 4
SWH 4401.409 Hz
FIDRES 0.134320 Hz
AQ 3.7224448 sec
RG 90.5
DW 113.600 usec
DE 7.00 usec
TE 300.2 K
D1 5.00000000 sec
D16 0.00020000 sec
L4 1587
P15 400000.00 usec
TD0 1
ZGPTNS

==== CHANNEL f1 =====
SFO1 400.1830928 MHz
NUC1 1H
P1 8.00 usec
P12 80000.00 usec
P25 126.00 usec
PLW0 0 W
PLW1 12.00000000 W
PLW27 0.19359000 W
SPNAM[2] Gaus1_180r.1000
SPOAL2 0.500
SPOFFS2 0 Hz
SPW2 0.00000284 W

==== GRADIENT CHANNEL ====
GPNAM[1] SMSQ10.100
GPZ1 15.00 %
P16 1000.00 usec



Anexo II. Espectro de RMN ^1H ROESY 1D do complexo $\beta\text{CD}:\text{IMQ}$ (concentração 26 mM), a 400 MHz, 25 °C, pulso seletivo no próton Hb do Imiquimod.

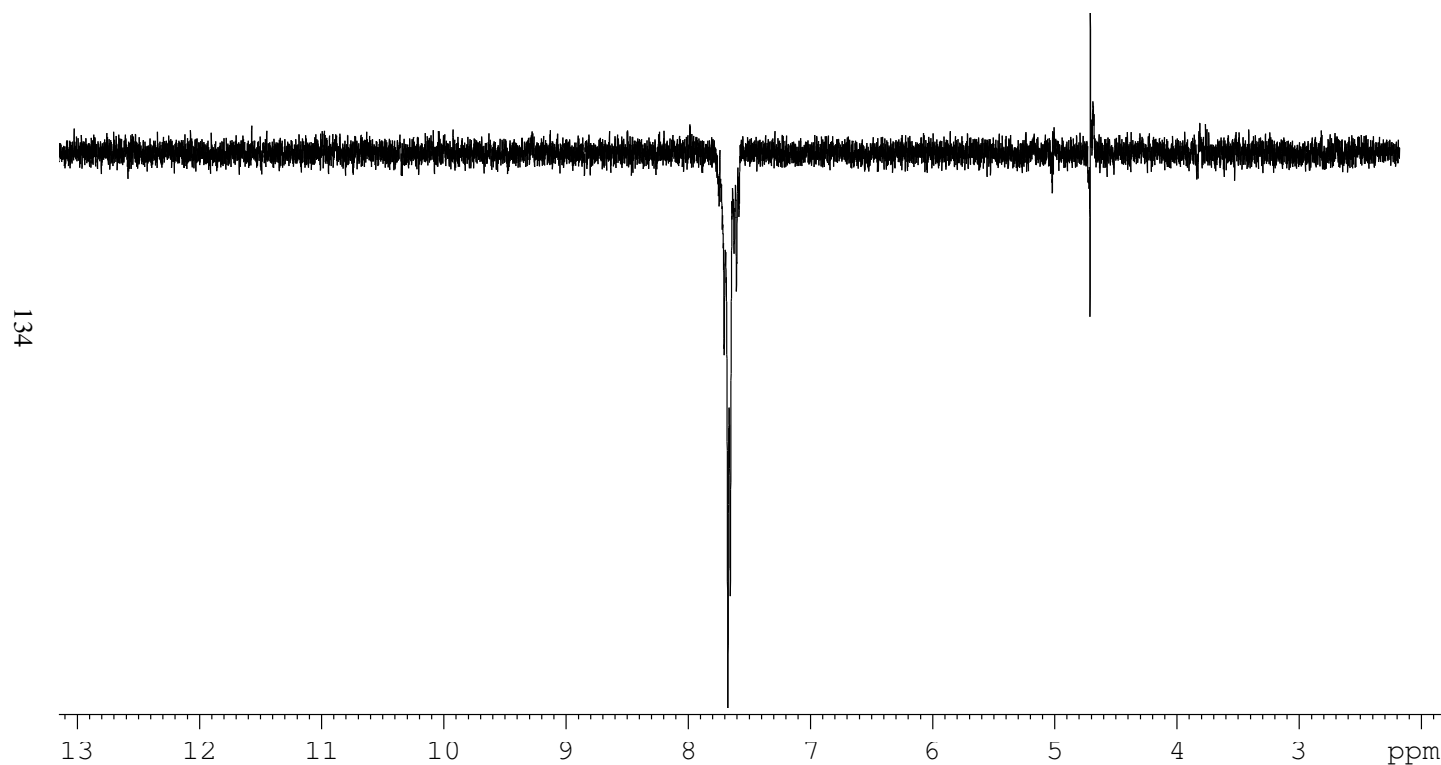


Current Data Parameters
NAME jun141sgH5
EXPNO 8
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameter
Date_ 20140614
Time 18.16
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBI 1H/
PULPROG selrogp.2
TD 32768
SOLVENT D2O
NS 512
DS 4
SWH 4401.409 Hz
FIDRES 0.134320 Hz
AQ 3.7224448 se
RG 90.5
DW 113.600 us
DE 7.00 us
TE 300.2 K
D1 5.00000000 se
D16 0.00020000 se
L4 1587
P15 400000.00 us
TD0 1
ZGOPTNS

===== CHANNEL f1 =====
SFO1 400.1830728 MHz
NUC1 1H
P1 8.00 us
P12 80000.00 us
P25 126.00 us
PLW0 0 W
PLW1 12.00000000 W
PLW27 0.19359000 W
SPNAM[2] Gaus1_180r.1000
SPOAL2 0.500
SPOFFS2 0 Hz
SPW2 0.00000284 W

===== GRADIENT CHANNEL ==
GPNAM[1] SMSQ10.100
GPZ1 15.00 %
P16 1000.00 us



Anexo 12. Espectro de RMN ¹H ROESY 1D do complexo βCD:IMQ (concentração 26 mM), a 400 MHz, 25 °C, pulso seletivo no próton Ha do Imiquimod.

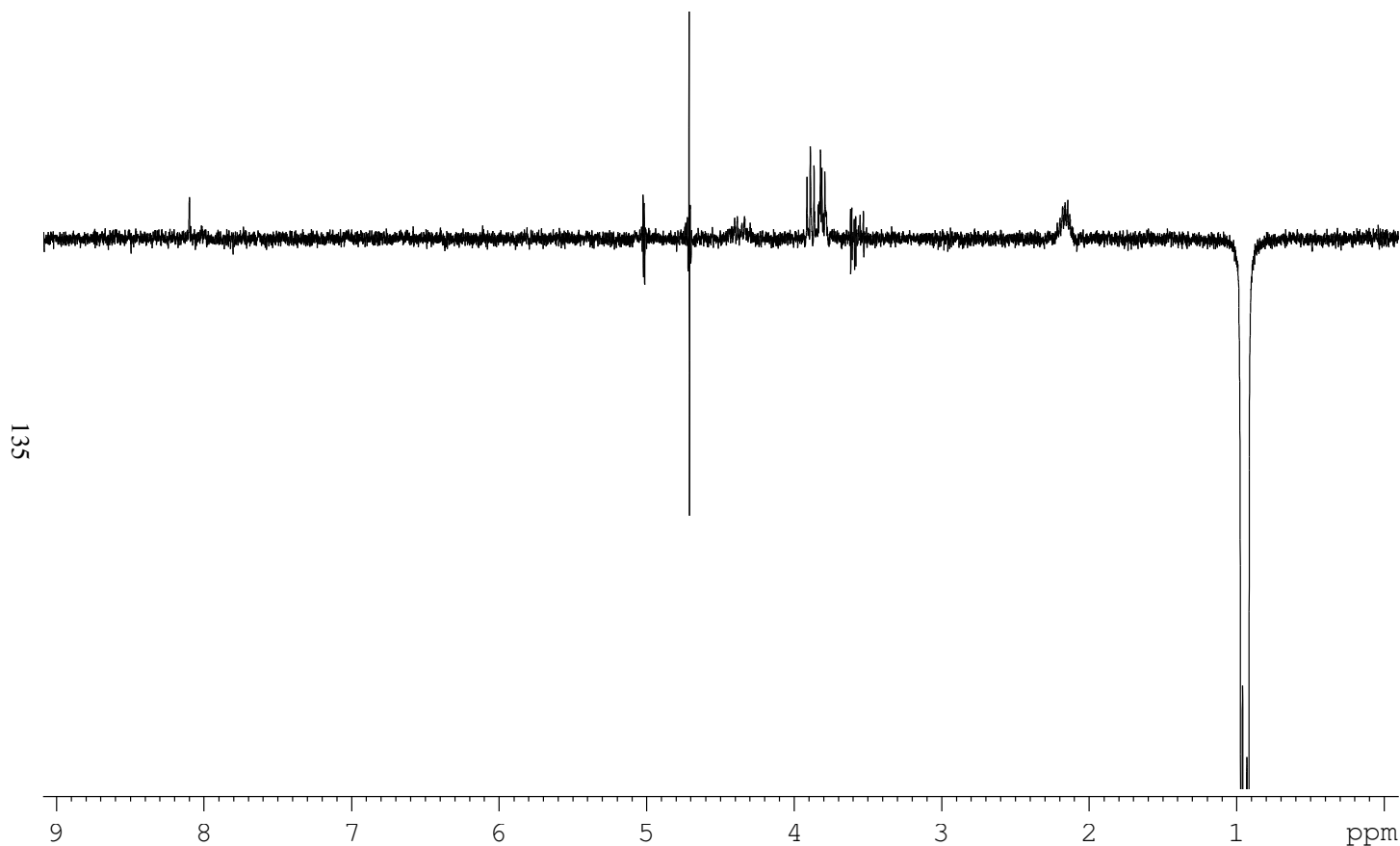


Current Data Parameters
NAME abr061sgH4
EXPNO 10
PROCNO 1

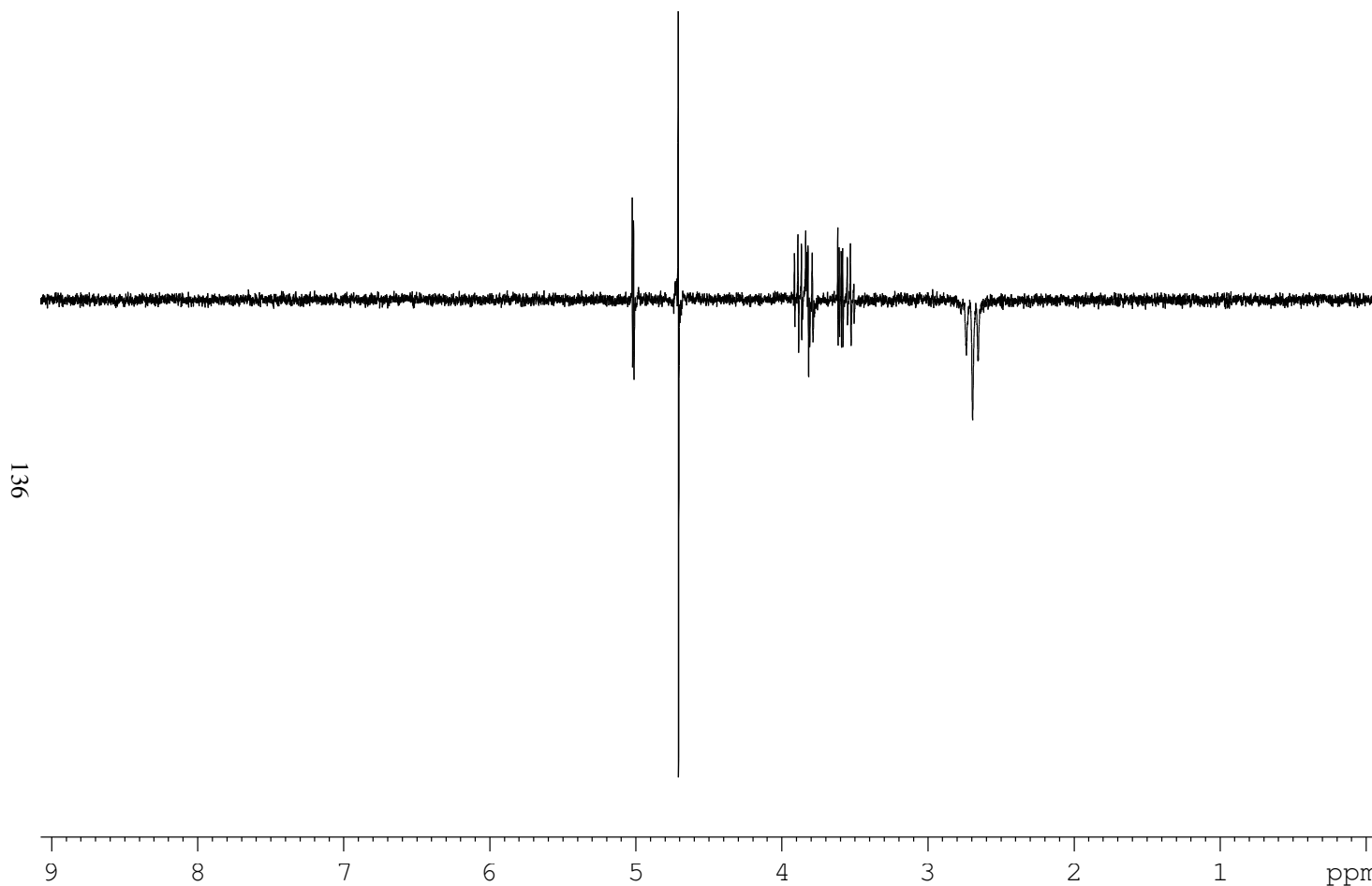
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140406
Time 21.41
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBI 1H/
PULPROG selrogp.2
TD 32768
SOLVENT D2O
NS 512
DS 4
SWH 8012.820 Hz
FIDRES 0.244532 Hz
AQ 2.0447233 sec
RG 90.5
DW 62.400 usec
DE 7.00 usec
TE 300.2 K
D1 5.00000000 sec
D16 0.00020000 sec
L4 1587
P15 400000.00 usec
TD0 1
ZGOPTNS

===== CHANNEL f1 =====
SF01 400.1803788 MHz
NUC1 1H
P1 8.11 usec
P12 80000.00 usec
P25 126.00 usec
PLW0 0 W
PLW1 12.00000000 W
PLW27 0.19902000 W
SPNAM[2] Gaus1_180r.1000
SPOAL2 0.500
SPOFFS2 0 Hz
SPW2 0.00000291 W

===== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM[1] SMSQ10.100
GPZ1 15.00 %
P16 1000.00 usec



Anexo 13. Espectro de RMN ¹H ROESY 1D do complexo βCD:IMQ (concentração 26 mM), a 400 MHz, 25 °C, pulso seletivo nos prótons Hh do Imiquimod.



Current Data Parameters
NAME abr061sgH4
EXPNO 12
PROCNO 1

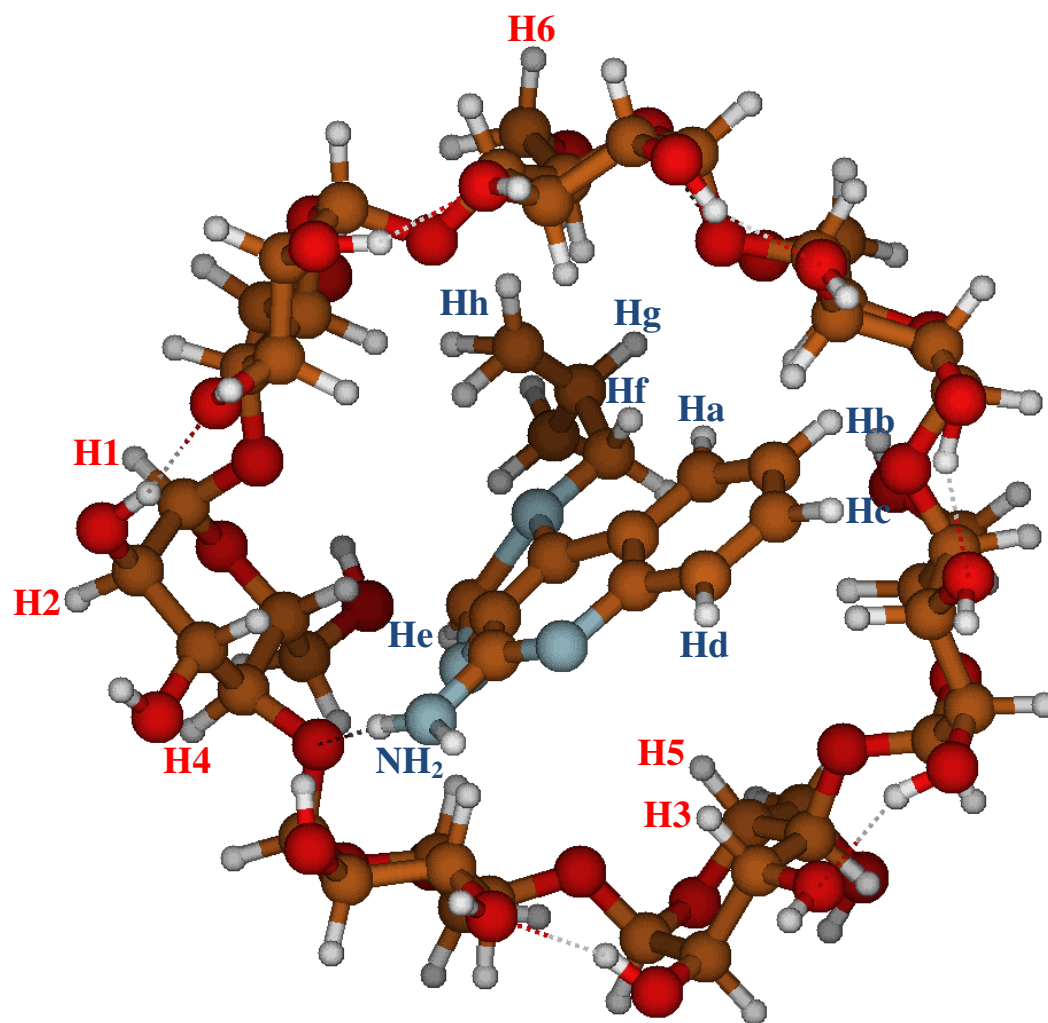
F2 - Acquisition Parameters

Date_ 20140406
Time 23.52
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBI 1H/
PULPROG selrogp.2
TD 32768
SOLVENT D2O
NS 512
DS 4
SWH 8012.820 Hz
FIDRES 0.244532 Hz
AQ 2.0447233 sec
RG 90.5
DW 62.400 usec
DE 7.00 usec
TE 300.2 K
D1 5.00000000 sec
D16 0.00020000 sec
L4 1587
P15 400000.00 usec
TD0 1
ZGOPTNS

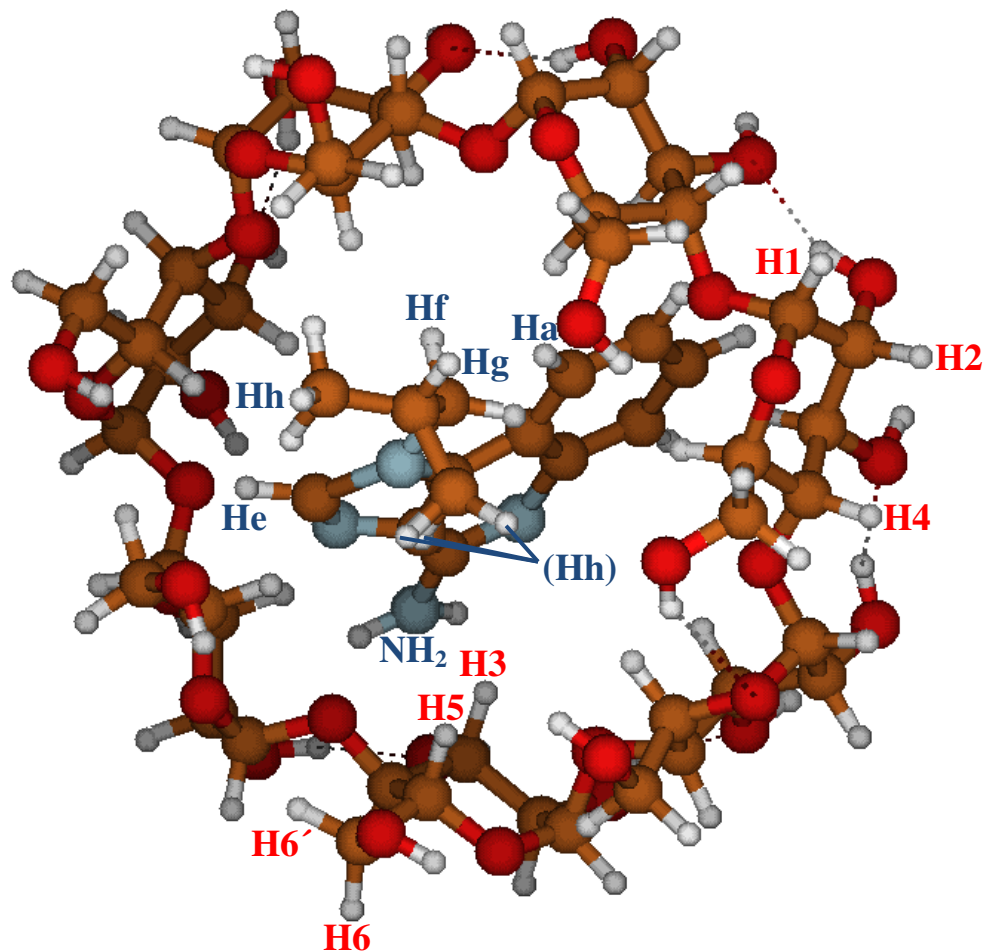
===== CHANNEL f1 =====
SFO1 400.1810875 MHz
NUC1 1H
P1 8.11 usec
P12 80000.00 usec
P25 126.00 usec
PLW0 0 W
PLW1 12.00000000 W
PLW27 0.19902000 W
SPNAM[2] Gaus1_180r.1000
SPOAL2 0.500
SPOFFS2 0 Hz
SPW2 0.00000291 W

===== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM[1] SMSQ10.100
GPZ1 15.00 %
P16 1000.00 usec

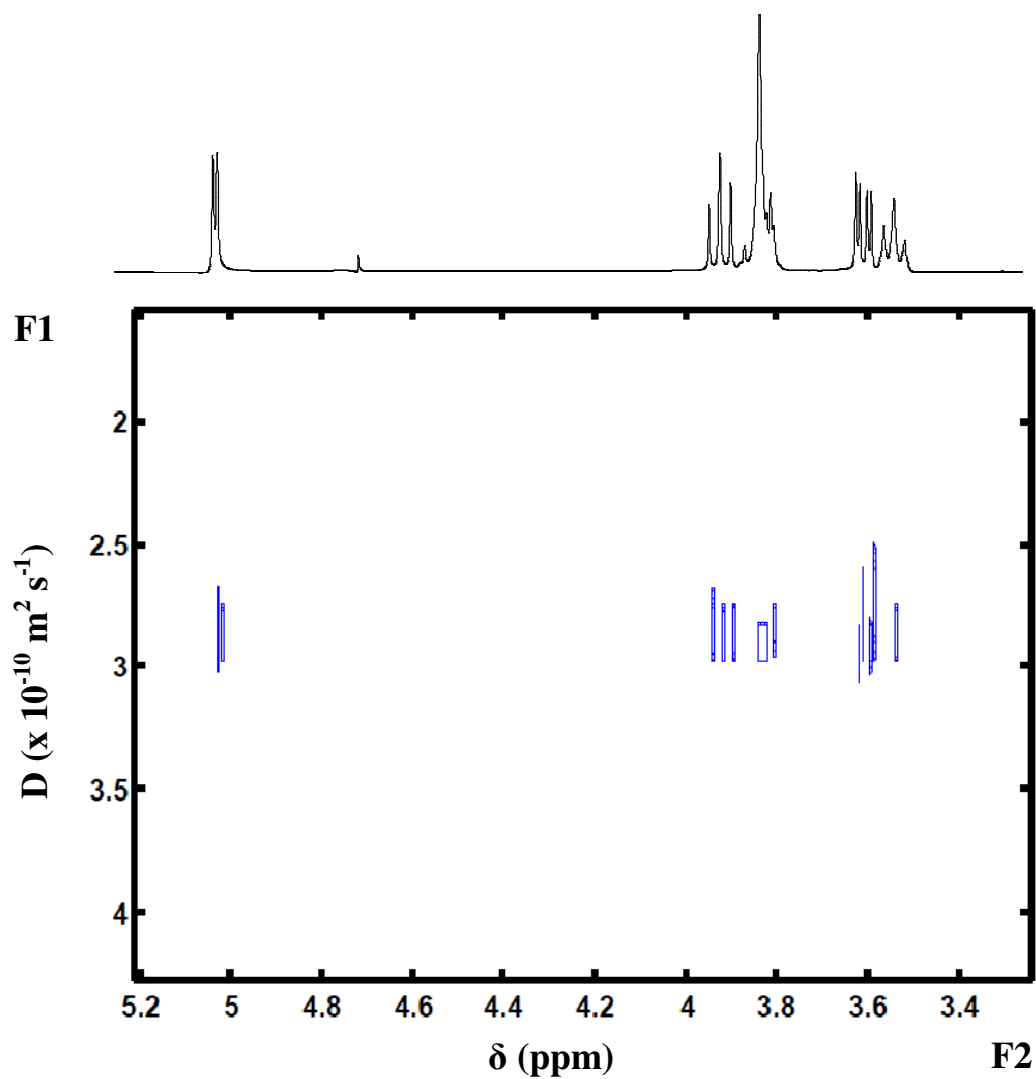
Anexo 14. Espectro de RMN ^1H ROESY 1D do complexo $\beta\text{CD}:\text{IMQ}$ (concentração 26 mM), a 400 MHz, 25 °C, pulso seletivo nos prótons Hi e Hj do ácido cítrico.



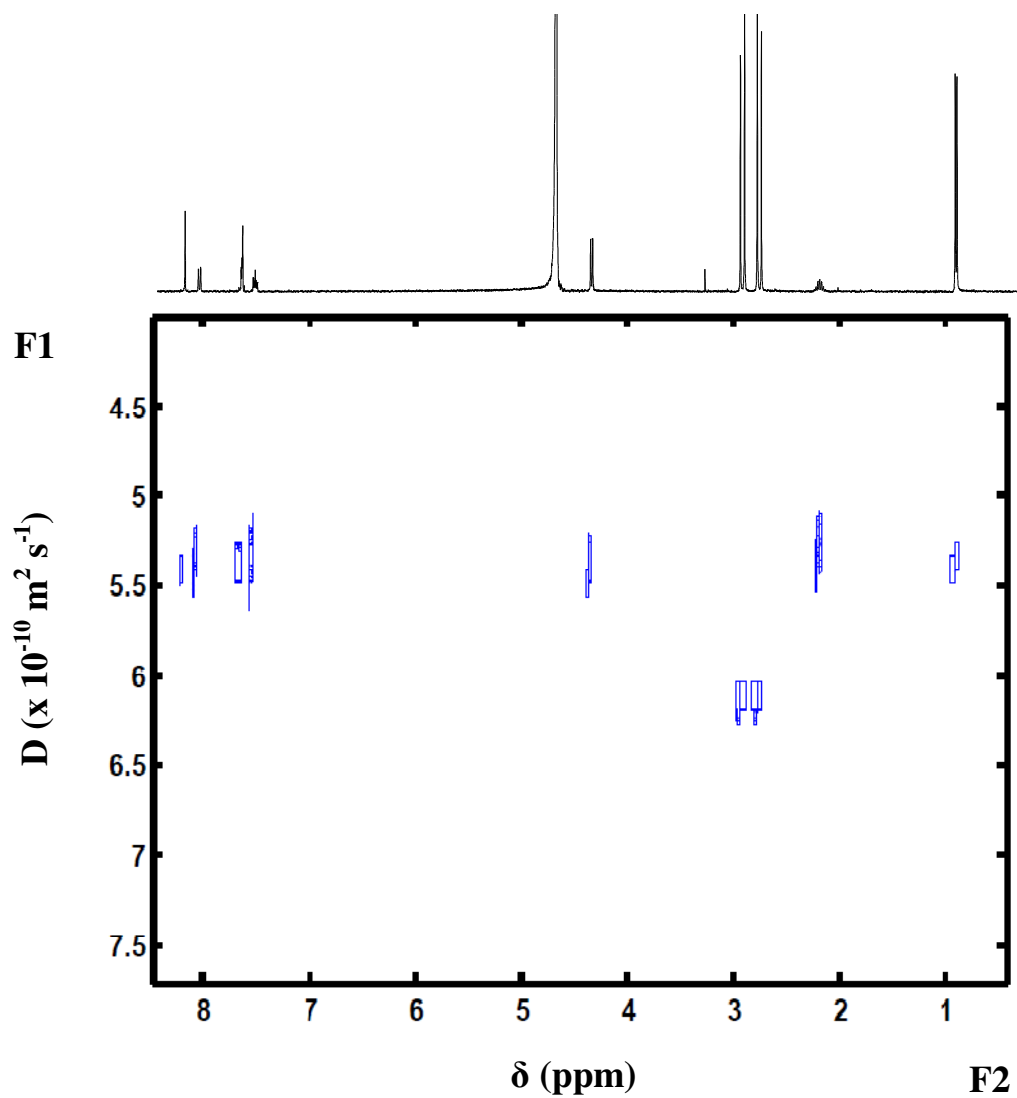
Anexo 15. Estrutural tridimensional do complexo β CD:IMQ, onde os prótons da β -ciclodextrina estão indicados em vermelho e os prótons do Imiquimod estão indicados em azul. Visualização da extremidade maior da β -ciclodextrina.



Anexo 16. Estrutural tridimensional do complexo β CD:IMQ, onde os prótons da β -ciclodextrina estão indicados em vermelho e os prótons do Imiquimod estão indicados em azul. Visualização da extremidade menor da β -ciclodextrina.



Anexo 17. Espectro DOSY (^1H , 400 MHz, 25 °C) da β -ciclodextrina em D_2O . Projeção do coeficiente de difusão (D) em F1 e projeção do espectro de RMN ^1H em F2.



Anexo 18. Espectro DOSY (^1H , 400 MHz, 25 °C) do Imiquimod em solução de ácido cítrico pH 3,0 em D_2O .
Projeção do coeficiente de difusão (D) em F1 e projeção do espectro de RMN ^1H em F2.