

DETERMINAÇÃO DA ESTEQUIOMETRIA E CONSTANTE DE ESTABILIDADE DO COMPLEXO DE INCLUSÃO DO 4-NEROLIDILCATECOL DE *Pothomorphe umbellata* (*Piperaceae*) EM 2-HIDROXIPROPIL- β -CICLODEXTRINA.

SOARES, Lillian Amélia¹; LEAL, Ana Flávia Vasconcelos Borges²; REZENDE, Kênnia Rocha³

Palavras-chave: 4-nerolidilcatecol, 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina, complexo de inclusão, Job's plot, ¹H-NMR.

1. INTRODUÇÃO

Complexos de inclusão com ciclodextrinas (CDs) têm sido amplamente empregados para aumentar a estabilidade química, a solubilidade aquosa e a biodisponibilidade de substâncias pouco solúveis em água (DAVIS e BREWSTER, 2004). Dentre as CDs a 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) merece atenção especial devido à sua baixa toxicidade, alta hidrossolubilidade e maior cavidade hidrofóbica, o que resulta em uma melhor capacidade de inclusão. Este trabalho visa determinar a estequiometria e a constante de estabilidade do complexo de inclusão entre HP- β -CD e 4-nerolidilcatecol (4-NRC), um potente antioxidante extraído das raízes de *Pothomorphe umbellata* L. Miq. (*Piperaceae*) (KIJOA et al., 1980) que possui diversas ações farmacológicas como ação analgésica, antiinflamatória, fotoprotetora, antimicrobiana, entre outras. Porém tal substância apresenta baixa hidrossolubilidade, o que dificulta a viabilidade de formulações terapêuticas e a avaliação da biodisponibilidade do mesmo. Para determinação da formação do complexo foi utilizada a técnica de ressonância magnética nuclear (RMN). A estequiometria foi estabelecida através do método o Job's plot e a constante de estabilidade através do estudo de solubilidades de fases.

2. METODOLOGIA

2.1 – Estudo de solubilidade de fases

Estudo realizado de acordo com o método descrito por Higuchi & Connors (1965). Soluções aquosas de HP- β -CD em concentrações crescentes foram adicionadas à frascos contendo 4-NRC. As soluções foram agitadas por três dias. Alíquotas foram coletadas, filtradas e analisadas em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) ProStar 210 com Detector UV (Varian[®]) 340, coluna Phenomenex[®] Synergi Fusion 4u C18 (150 mm X 4,6 mm), com fase móvel: ACN:MeOH:TFA 0,1% 62:20:18, fluxo de 1mL/min e volume de injeção 20 μ L. A absorbância foi monitorada em 282 nm.

2.2- Preparo do complexo de inclusão

2.2.1- Liofilização

Soluções aquosas em concentrações crescentes de HP- β -CD (0 - 4,8 mM) foram adicionadas à frascos contendo 4-NRC, obtendo-se as seguintes proporções estequiométricas: 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:6, 1:8, 1:10, 1:12 e 1:15. As soluções foram agitadas e após o equilíbrio as amostras foram filtradas, congeladas e liofilizadas.

2.2.2 - Malaxagem

Quantidades estequiométricas de HP- β -CD e 4-NRC (1:1) foram trituradas e misturadas a uma solução de etanol/água 50% (v/v). A mistura foi agitada por 60min. O solvente foi evaporado e o produto obtido foi congelado e liofilizado.

2.2.3 - Preparo da mistura física

Quantidades estequiométricas de HP- β -CD e 4-NRC (1:1) foram misturadas em gral por 5 min.

2.3 - Determinação da constante de associação do complexo

A constante de associação (K_a) foi determinada através da fórmula $K_a = slope / S_o (1 - slope)$, segundo Higuchi & Connors (1965), onde *slope* é a inclinação da reta obtida da porção linear do diagrama de solubilidade de fases e S_o é a solubilidade aquosa de 4-NRC.

2.4 – Determinação da estequiometria do complexo por espectrofotometria UV-vis.

O método de Job's plot foi adotado para determinar a estequiometria do complexo (JOB, 1928). Misturas de 4-NRC:HP- β -CD foram preparadas variando a fração molar de cada substância de 0 a 1 e mantendo constante a concentração de total da solução (2 mM). As soluções foram analisadas em espectrofotômetro UV-Vis Varian Cary. A diferença de intensidade (ΔA) entre as soluções contendo apenas 4-NRC e as misturas de 4-NRC com HP- β -CD multiplicada pela razão molar (r) de 4-NRC *versus* a razão molar de 4-NRC (r) foi plotada em um gráfico. O ponto onde ocorre a mudança de inclinação da curva corresponde à razão estequiométrica do complexo.

2.3.5 – Ressonância Magnética Nuclear de ^1H

As amostras foram analisadas em espectrômetro Varian Inova 500 MHz, utilizando D_2O como solvente. O sinal em 4.75 ppm é devido ao solvente residual e impurezas (H_2O HDO) à 298 K.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 – Estudo de solubilidade de fases

O diagrama de solubilidade de fases obtido neste estudo foi do tipo A_N (figura 1), que representa um desvio negativo da linearidade. A solubilidade de 4-NRC em água determinada neste estudo foi de $1,06 \times 10^{-2}$ mM SD=0,005; n=3 e a concentração máxima de 4-NRC dissolvido em presença de HP- β -CD foi de 0,14 mM SD=0,01; n=3, um aumento de 13 vezes na solubilidade aquosa do 4-NRC.

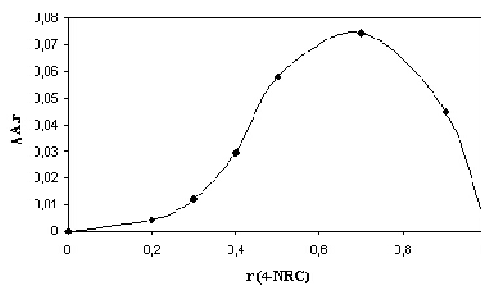
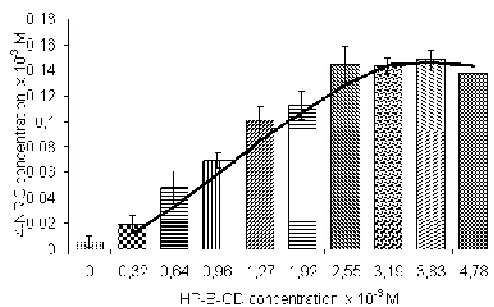


Figura 1- Diagrama de solubilidade

Figura 2- Job plot de 4-NRC: HP- β -CD

3.2 – Determinação da constante de associação do complexo

A constante de estabilidade aparente (K_a) determinada foi de $8154,7 \pm 767,6$, indicando a formação de um complexo bastante estável quando comparado com de outros catecóis.

3.3 - Determinação da estequiometria do complexo por espectrofotometria UV-vis.

A figura 2 corresponde ao Job's plot de ($\Delta A \times r$) em função de r . O ponto máximo de mudança de inclinação ocorre em $r \approx 0,66$, sugerindo que o complexo entre 4-NRC e HP- β -CD, possui proporção estequiométrica de 2:1.

3.4 - Ressonância Magnética Nuclear de ^1H

A HP- β -CD (figura 3) possui 6 prótons identificáveis por RMN, H₁, H₂, H₄ e H₆ localizados externamente e H₃ and H₅ na cavidade da ciclodextrina. A modificação dos sinais dos prótons internos da cavidade da CD sugere uma complexação. A tabela 1 apresenta as alterações dos sinais dos prótons da HP- β -CD no complexo. A figura 4 mostra os espectros de RMN do 4-NRC, malaxagem, complexo e mistura física. Observa-se uma grande alteração dos sinais dos prótons internos da ciclodextrina, o que infere uma interação do 4-NRC e a cavidade da HP- β -CD.

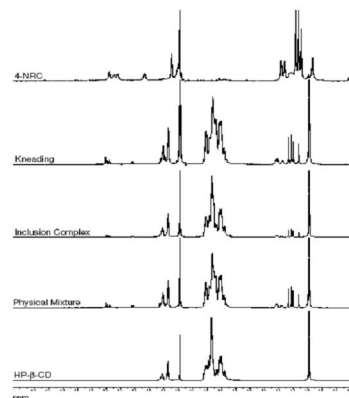
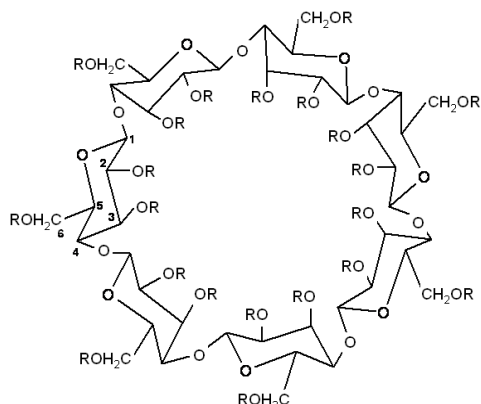


Figura 3 – Estrutura da HP- β -CD

Figura 4 – Espectros ^1H -RMN

Tabela 1: Alterações dos sinais ^1H -NMR ($\Delta\delta$, ppm) de HP- β -CD livre e no complexo de inclusão em D₂O. Onde $\Delta\delta = \delta_{\text{complexo}} - \delta_{\text{CD livre}}$; n.r.: não resolvido; n.d.: não determinado.

Prótons HP- β -CD	δ livre (ppm)	δ complexo (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
H-1	5.136	5.125	-0.011
H-2	n.r.	n.r.	n.d.
H-3	4.011	3.861	-0.150
H-4	n.r.	n.r.	n.d.
H-5	3.778	3.636	-0.142
H-6	3.924	3.775	-0.149

4. CONCLUSÃO

Os resultados indicam a formação de um complexo estável entre 4-NRC: HP- β -CD ($K_a = 8154,7 \pm 767,6$) com estequiometria de complexação de 2:1. Os dados obtidos através da RMN confirmam a formação deste complexo. A complexação do 4-NRC favorece o aumento de sua solubilidade aquosa, estabilidade e, provavelmente sua ação terapêutica, permitindo a administração oral e a avaliação da biodisponibilidade.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DAVIS, M. E.; BREWSTER, M. E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nature Reviews Drug Discovery*. v. 3, n. 12, p.1023-1035, dec. 2004.
- HIGUCHI, T.; CONNORS, K. A. Phase solubility techniques. *Advances in Analytical Chemistry Instrumentation*. v. 4, p.117-212, 1965.
- JOB, P. Formation and stability of inorganic complexes in solution. *Annales de Chimie*. v. 9, p. 113–203, 1928.

SOARES, L. A.; LEAL, A. F. V. B.; REZENDE, K. R. Determinação da estequiometria e constante de estabilidade do complexo de inclusão do 4-nerolidilcatecol de *Pothomorphe umbellata* (Piperaceae) em 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina. **Anais eletrônicos da XV Semana Científica Farmacêutica**, Goiânia: UFG, 2007. n.p

KIJOA, A. et al. The chemistry of Brazilian Piperaceae. 2. 4-nerolidylcatechol from *Pothomorphe umbellata*. *Planta Médica*. v. 39, p. 85-87, 1980.

FONTE DE FINANCIAMENTO: CNPq e SECTEC-GO

¹ Mestranda em Ciências Farmacêutica. Faculdade de Farmácia – BIOPHARMAK – Laboratório de Biofarmácia e Farmacocinética. lillianas@gmail.com

² Aluna de graduação. Faculdade de Farmácia – BIOPHARMAK – Laboratório de Biofarmácia e Farmacocinética. anavbl@gmail.com

³ Orientadora/ Laboratório de Biofarmácia e Farmacocinética/Faculdade de Farmácia/UFG kennia@farmacia.ufg.br