

**PPGMQ-MG UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI**



**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM QUÍMICA DE  
MINAS GERAIS**

**ANA MARIA DOS SANTOS MOREIRA**

**COMPOSIÇÕES NANOESTRUTURADAS DE AVERMECTINAS  
COM  $\beta$ -CICLODEXTRINA: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO  
FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CONTRA  
LARVAS DO *Aedes Aegypti***

**GOVERNADOR VALADARES - MG**

**SETEMBRO/2016**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL -REI  
Departamento de Ciências Naturais  
Campus Dom Bosco, Praça Dom Helvécio, 74 –  
Fábricas, São João del-Rei - MG CEP 36301-160  
Secretaria: Sala A – 2.17 Tel.: (32) 3371-2472  
e-mail: ppgmq@ufsj.edu.br



**PROGRAMA  
DE PÓS-GRADUAÇÃO  
MULTICÊNTRICO  
EM QUÍMICA  
DE MINAS GERAIS**

ANA MARIA DOS SANTOS MOREIRA

**COMPOSIÇÕES NANOESTRUTURADAS DE AVERMECTINAS  
COM  $\beta$ -CICLODEXTRINA: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO  
FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CONTRA  
LARVAS DO *Aedes Aegypti***

Dissertação/Tese apresentada ao Programa de PósGraduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais da Universidade Federal de São João del-Rei, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Keyller Bastos Borges

Co-Orientador: Prof. Dr. Ângelo Márcio Leite Denadai

São João del-Rei, 2016

Ficha catalográfica elaborada pela Divisão de Biblioteca (DIBIB)  
e Núcleo de Tecnologia da Informação (NTINF) da UFSJ,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M835c

Moreira, Ana Maria dos Santos.

Composições nanoestruturadas de avermectinas com  $\beta$ -ciclodextrina: síntese, caracterização físico-química e avaliação da atividade contra larvas do *Aedes aegypti* / Ana Maria dos Santos Moreira ; orientador Keyller Bastos Borges; co-orientador Angelo Marcio Leite Denadai. -- São João del-Rei, 2016.

89 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais) -Universidade Federal de São João del-Rei, 2016.

1. avermectinas. 2.  $\beta$ -ciclodextrina. 3. nanocomposições. 4. complexos de inclusão. 5. *Aedes aegypti*. I. Borges, Keyller Bastos , orient. II. Denadai, Angelo Marcio Leite, co-orient. III. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI

UNIVERSIDADE FEDERAL  
DE SÃO JOÃO DEL-REI

**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM QUÍMICA  
DE MINAS GERAIS**

Defesa da dissertação de mestrado da Mestranda **Ana Maria dos Santos Moreira**, intitulada: “**Composições nanoestruturadas de avermectinas com  $\beta$ -ciclodextrina: síntese, caracterização físico-química e avaliação da atividade contra larvas do *Aedes aegypti*” orientada pelo **Prof. Dr. Keyller Bastos Borges** e co-orientada pelo **Prof. Dr. Ângelo Márcio Leite Denadai**, apresentado à banca examinadora designada pelo colegiado do Programa de Pós Graduação Multicêntrico em Química da Universidade Federal de São João del Rei , em 05 de Setembro de 2016.**

Os membros da banca consideraram a candidata \_\_\_\_\_.

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Dr. Keyller Bastos Borges – UFSJ

---

Prof. Dr. Ângelo Márcio Leite Denadai – UFJF/GV

---

Prof. Dr. Fernando de Oliveira Castro – CEFET/MG

---

Prof. Dr. Clebio Soares Nascimento Júnior – UFSJ

Dedico este trabalho às pessoas mais presentes em minha vida:  
À Deus, princípio de todas as coisas;  
Ao meu amor, companheiro de toda vida e a minha grande família,  
Vocês são o alicerce de todos os meus projetos.

## Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador, o professor Dr. Keyller Bastos Borges, pelo apoio, disponibilidade, gentileza e principalmente pela confiança depositada, sem a qual não seria possível o desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Dr. Ângelo Márcio Leite Denadai, meu co-orientador, por sua fundamental participação no desenvolvimento desta pesquisa, agradeço por seu conhecimento científico, por seu entusiasmo contagiante pelo projeto, por seu otimismo sem limites e pela confiança que sempre depositou no meu trabalho.

Ao professor Dr. Jeferson Gomes da Silva, por todas as horas em que teve a paciência de me apoiar, pela amizade e enorme disponibilidade de seu tempo e conhecimento, sem sua valiosa ajuda não conseguiria concluir esta pesquisa. Obrigada pela revisão científica, e por todos os pontos e vírgulas.

Ao professor Dr. Warley de Souza Borges, do Departamento de Química da UFES, pela colaboração com todos os espectros de RMN, fundamentais para o meu trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Aos professores Drs. Leonardo Meneghin Mendonça, Antônio Frederico de Freitas Gomides e as professoras Dras. Cibele Velloso Rodrigues e Elaine M. Souza-Fagundes, que destinaram parte de seu precioso tempo e conhecimento para colaborarem com esta pesquisa.

A professora Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia do Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG e a sua equipe de trabalho, especialmente ao pós doutorando Fábio L. S. Costa pela realização dos experimentos de toxicidade.

Ao professor Dr. Gustavo Ferreira Martins do Departamento de Biologia Geral da UFV, pela doação dos ovos do mosquito *Aedes aegypti*.

A equipe do Laboratório de Separações (LASEP) da UFSJ pelas amostras das avermectinas.

Aos técnicos do Departamento de Ciências Naturais da Universidade Federal de São João del-Rei pela calorosa recepção e amizade e por todas as análises térmicas.

Ao Programa de Pós-graduação Multicêntrico da Rede Mineira de Química, e a Universidade Federal de São João del-Rei pela oportunidade oferecida.

A todos os professores do Mestrado que de alguma forma contribuíram para a minha formação, especialmente às professoras Priscila L. Sequetto e Barbára N. Enes da disciplina de iniciação à docência.

Ao Departamento de farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora Campus GV, à UNIVALE, sede provisória do Campus GV, pelo apoio à minha participação no Mestrado e pelo suporte analítico.

À FAPEMIG, CNPq, CAPES, PROPG-UFJF e FINEP pelo fomento aos equipamentos e bolsas de Iniciação Científica.

Ao grupo de pesquisa: Nanotecnologia dos Fluidos Complexos e dos Sistemas Supramoleculares, e aos futuros pesquisadores, Ewerton, Máyra, Rafael, Alan, Felipe e Aline, alunos de iniciação científica, pela ajuda nos experimentos e amizade.

Aos amigos e companheiros de trabalho da UFJF/GV, Anna Isabel, Leticia, Vanessa M., Vanessa B., Bolívar e Juliano pela amizade, incentivo e ajuda em todas as fases do mestrado, sem a compreensão e o apoio de vocês não eu conseguiria o tempo necessário para desenvolver esse trabalho.

A minha amiga e companheira de Mestrado Vanessa Cristina Estevam Bittencourt, por dividir comigo todo o trabalho, todas as dúvidas, todos os erros e vitórias deste projeto. Sinto que nós percorremos este caminho juntas, nos complementando e nos fortalecendo. Obrigada pela rica troca e cumplicidade.

Aos meus familiares e amigos pelo incentivo e apoio. Especialmente a minha pequena sobrinha, Maria, minha alegria nas pausas das longas horas de dissertação.

Ao meu marido, Robson Ubirae Moreira, meu motorista e companheiro nas cansativas viagens para cursar as disciplinas, pelo apoio incondicional. Obrigada por esses dois anos que você dedicou inteiramente a me ajudar na conclusão deste Mestrado.

Enfim, a todas as pessoas que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

## Resumo

Moreira, A.M.S. Composições nanoestruturadas de avermectinas com  $\beta$ -ciclodextrina: síntese, caracterização físico-química e avaliação da atividade contra larvas do *Aedes aegypti*. 89f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química – Universidade Federal de São João del-Rei, São João del-Rei, 2016.

Neste trabalho foram preparados e caracterizados os complexos de inclusão entre avermectinas (ivermectina e eprinomectina) e  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD), bem como avaliada a atividade larvicida e a segurança dessas nanocomposições. Inicialmente, alterações nos espectros de IV e perfis térmicos dos complexos em relação aos seus precursores sugeriram a ocorrência de interação hóspede: hospedeiro. Os espectros de RMN confirmaram a interação da  $\beta$ -CD com as avermectinas e o envolvimento do anel benzofurânico e do grupo dissacarídeo das avermectinas com a inclusão. Os dados termodinâmicos obtidos por calorimetria isotérmica de titulação indicaram espontaneidade do processo de inclusão em solução, com estequiometria 1:1 e moderada constante de afinidade. Dados de espalhamento de luz dinâmico e potencial zeta demonstraram que em todas as nanocomposições ocorre uma redução nos valores de diâmetro hidrodinâmico devido à maior estabilidade coloidal dos complexos em relação às avermectinas livres, principalmente em baixas concentrações. Tais complexos apresentam maior solubilidade e solubilização comparadas com as substâncias puras. Na avaliação da atividade larvicida nos estádios L1 e L4, IVER- $\beta$ -CD foi menos potente que o precursor contra larvas do *Aedes aegypti*, enquanto que o complexo EPRI- $\beta$ -CD apresentou-se mais potente que a EPRI pura. Os valores de dose letal a 50% das larvas de *Aedes aegypti* ( $DL_{50}$ ) foram menores que 1  $\mu$ M. Na avaliação de segurança das nanocomposições utilizando o ensaio do MTT em células de fibroblastos WI26VA4, foi observado que apesar dos complexos apresentarem certo grau de citotoxicidade, inerente aos precursores: as avermectinas, os valores de dose letal a 50% das larvas de *Aedes aegypti* foram inferiores aos valores de concentração para inibir a viabilidade de 50% das células de fibroblastos. Uma vez que os complexos apresentaram potente atividade larvicida, a preparação dos complexos de inclusão apresenta-se como uma alternativa interessante no controle do mosquito *Aedes aegypti*.

.....

Palavras chave: avermectinas,  $\beta$ -ciclodextrina, nanocomposições, complexos de inclusão, *Aedes aegypti*.



## Abstract

Moreira, A.M.S. Nanostructured compositions of avermectins in  $\beta$ -cyclodextrin: Synthesis, physico-chemical characterization and evaluation of larvicidal activity against *Aedes aegypti* larvae. 89f. Thesis (MA) - Multicenter Graduate Program in Chemistry – Federal University of São João del-Rei, São João del-Rei, 2016.

In this work, the inclusion complexes between avermectins (ivermectin and eprinomectin) and  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD) were prepared and characterized. The larvicidal and cytotoxic activities of these nanocomposites were also evaluated. Changes in the IR spectra and thermal profiles of the complexes in relation to their precursors suggest the interaction guest / host. The NMR data confirmed the interaction between avermectins and  $\beta$ -CD, and the involvement of the benzofuran ring and disaccharide group of avermectins with inclusion. Thermodynamic data obtained by isothermal titration calorimetry indicated a 1: 1 stoichiometry of the complex in solution. These processes were spontaneous and with moderate affinity constant. Dynamic light scattering and zeta potential data showed that a decrease in hydrodynamic diameter values for all nanocomposites occurs in due to greater colloidal stability of the complex relative to the free avermectins, especially at low concentrations. Such complexes showed an increased in solubility and dissolution compared with the pure substances. In the evaluation of larvicidal activity in L1 and L4 instars, IVER- $\beta$ -CD was less potent than the precursor against larvae of *Aedes aegypti*, while the EPRI-  $\beta$ -CD show to more potent than pure EPRI. The lethal dose at 50% values of *Aedes aegypti* larvae were less than 1  $\mu$ M. The cytotoxic activity against fibroblasts WI26VA4 was evaluated using the MTT assay and the complexes showed cytotoxicity inherent of their precursors: the avermectins. However, the lethal values of dose at 50% of *Aedes aegypti* larvae were less than the concentration values to viability inhibit at 50% fibroblast cells. Since the complexes have potent larvicidal activity, the preparation of inclusion complexes appears to be an interesting alternative for control of *Aedes aegypti*.

.....

Keywords: avermectins,  $\beta$ -cyclodextrin, nanocomposites, inclusion complexes, *Aedes aegypti*.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>1</b>
1.1. SISTEMAS SUPRAMOLECULARES E A QUÍMICA SUPRAMOLECULAR .....	5
1.1.1 Ciclodextrinas (CDs).....	6
1.1.1.1 Estrutura e propriedades.....	6
1.1.1.2 Toxicologia.....	11
1.1.1.3 Complexos de inclusão .....	11
1.2. MOLÉCULAS DE INTERESSE PARA O ESTUDO DA COMPLEXAÇÃO .....	15
1.2.1 Avermectinas .....	15
1.2.1.2 Ivermectina.....	18
1.2.1.3 Eprinomectina .....	19
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>21</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
3.1 MATÉRIAS-PRIMAS E REAGENTES UTILIZADOS.....	22
3.2 DELINEAMENTO DOS EXPERIMENTOS.....	22
3.3 DIAGRAMA DE SOLUBILIDADE .....	24
<b>3.4. PREPARO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO E MISTURAS MECÂNICAS .....</b>	<b>24</b>
3.5 CARACTERIZAÇÕES DOS COMPLEXOS .....	25
3.5.1 Análises no Estado Sólido .....	25
3.5.2 Análises em Solução/Suspensão .....	26
3.6 Ensaios Biológicos .....	28
3.6.1 Bioensaios envolvendo larvas do mosquito <i>Aedes aegypti</i> .....	28
3.6.2 Ensaio de citotoxicidade.....	29
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>31</b>
4.1. DIAGRAMA DE SOLUBILIDADE DE FASE.....	31
4.2. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO .....	36
4.2.1. Análises no Estado Sólido .....	36
4.2.2. Análises em Solução/Suspensão .....	46
4.3. ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	61
4.3.1. Avaliação da toxicidade frente aos estádios L1 e L4 de larvas do mosquito <i>Aedes aegypti</i> . .....	61
4.3.2 Avaliação da atividade citotóxica frente a fibroblastos WI26VA4.....	62
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>64</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>66</b>
<b>MATERIAL SUPLEMENTAR.....</b>	<b>71</b>

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>FIGURA 1</b>	Ciclo de vida do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	02
<b>FIGURA 2</b>	Fórmulas estruturais das ciclodextrinas naturais	06
<b>FIGURA 3</b>	Representação estrutural de uma unidade glicosídica na conformação de cadeira	07
<b>FIGURA 4</b>	Representação esquemática da estrutura funcional das ciclodextrinas	07
<b>FIGURA 5</b>	Disposição da cavidade hidrofóbica e superfície hidrofílica da ciclodextrina	08
<b>FIGURA 6</b>	Dimensões moleculares das ciclodextrinas naturais	09
<b>FIGURA 7</b>	Formas de disposições das CDs no estado sólido	10
<b>FIGURA 8</b>	Representação esquemática da formação de um complexo em solução aquosa	12
<b>FIGURA 9</b>	Estrutura genérica das avermectinas	15
<b>FIGURA 10</b>	Estrutura genérica as avermectinas com destaque para as principais subunidades	17
<b>FIGURA 11</b>	Estrutura molecular da ivermectina B1a (A) e B1b (B)	19
<b>FIGURA 12</b>	Estrutura molecular da eprinomectina	20
<b>FIGURA 13</b>	Fluxograma de desenvolvimento da pesquisa	23
<b>FIGURA 14</b>	Esquema de preparação das amostras para o experimento de solubilidade	24
<b>FIGURA 15</b>	Processo de incorporação das moléculas hóspedes em ciclodextrina	25
<b>FIGURA 16</b>	Processo de preparação das misturas mecânicas	25
<b>FIGURA 17</b>	Diagrama de solubilidade adaptado de Higuchi e Connors	32
<b>FIGURA 18</b>	Diagrama de solubilidade da ivermectina em presença de concentrações crescentes de $\beta$ -CD a 30°C.	33
<b>FIGURA 19</b>	Diagrama de solubilidade da eprinomectina em presença de concentrações crescentes de $\beta$ -CD a 30°C.	33
<b>FIGURA 20</b>	Espectro de infravermelho da ivermectina (IVER), $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD), mistura mecânica de (MM) e complexo de inclusão (IVER- $\beta$ -CD) na região 4000 a 400 em KBr.	36
<b>FIGURA 21</b>	Espectro de infravermelho da eprinomectina (EPRI), $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD), mistura mecânica de (MM) e composto de inclusão (EPRI- $\beta$ -CD) na região 4000 a 400 em KBr.	38

<b>FIGURA 22</b>	Curvas de TG (A); DTG (B) e DTA (C) da $\beta$ -CD, IVER, MM e IVER- $\beta$ -CD, em N <sub>2</sub> .	40
<b>FIGURA 23</b>	Curvas de TG (A); DTG (B) e DTA (C) da $\beta$ -CD, EPRI, MM e EPRI- $\beta$ -CD, em N <sub>2</sub> .	44
<b>FIGURA 24</b>	Titulação calorimétrica da ivermectina (A) e da eprinomectina (B) a 30 mM em DMSO: H <sub>2</sub> O (90:10) em solução de $\beta$ -CD 2 mM em DMSO: H <sub>2</sub> O (90:10): curva final após subtração da curva de titulação do solvente.	46
<b>FIGURA 25</b>	Espectros de RMN de <sup>1</sup> H de $\beta$ -CD (A), IVER- $\beta$ -CD (B) e IVER (C) em DMSO-d <sub>6</sub> ,400 MHz.	50
<b>FIGURA 26</b>	Espectros de RMN de <sup>1</sup> H de $\beta$ -CD (A), EPRI- $\beta$ -CD (B) e EPRI (C) em DMSO-d <sub>6</sub> ,400 MHz.	51
<b>FIGURA 27</b>	Região selecionada do mapa de contorno ROESY de IVER- $\beta$ -CD em DMSO-d <sub>6</sub> ,400 MHz.	55
<b>FIGURA 28</b>	Região selecionada do mapa de contorno ROESY de EPRI- $\beta$ -CD em DMSO-d <sub>6</sub> ,400 MHz.	56
<b>FIGURA 29</b>	Propostas de interações das moléculas de EPRI (A) e IVER (B) com a $\beta$ -CD.	56
<b>FIGURA 30</b>	Distribuição de valores de potencial zeta em função da concentração de IVER (A) e EPRI (B) e seus respectivos complexos $\beta$ -CD.	57
<b>FIGURA 31</b>	Distribuição de tamanho de partículas em suspensão em função da concentração de IVER (A) e de EPRI (B) e seus respectivos complexos com $\beta$ -CD	58
<b>FIGURA 32</b>	Curvas de solubilização de IVER e seu complexos de inclusão com $\beta$ -CD em água a 30°C.	59
<b>FIGURA 33</b>	Curvas de solubilização de EPRI e seu complexos de inclusão com $\beta$ -CD em água a 30°C.	60

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b>	Características das Ciclodextrinas naturais	09
<b>TABELA 2</b>	Solubilidade das ciclodextrinas em solventes orgânicos a 25 °C	10
<b>TABELA 3</b>	Fórmulas estruturais das avermectinas naturais	15
<b>TABELA 4</b>	Composição e teor das amostras	22
<b>TABELA 5</b>	Valores termodinâmicos (K e $\Delta G^\circ$ ) calculados pelo experimento de solubilidade e obtidos por titulação calorimétrica isotérmica.	35
<b>TABELA 6</b>	Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho de $\beta$ -CD, ivermectina (IVER), mistura mecânica (MM) e complexo de inclusão (IVER- $\beta$ -CD).	37
<b>TABELA 7</b>	Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho de $\beta$ -CD, eprinomectina (EPRI), mistura mecânica (MM) e complexo de inclusão (EPRI- $\beta$ -CD).	38
<b>TABELA 8</b>	Principais eventos térmicos atribuídos para a $\beta$ -CD, IVER, sua mistura mecânica e o complexo IVER- $\beta$ -CD.	41
<b>TABELA 9</b>	Principais eventos térmicos atribuídos para a $\beta$ -CD, EPRI, sua mistura mecânica e o complexo EPRI- $\beta$ -CD.	45
<b>TABELA 10</b>	Parâmetros termodinâmicos de interação da ivermectina e eprinomectina com a $\beta$ -CD, onde $T\Delta S$ (Termo entrópico da interação) a 298,15 K.	47
<b>TABELA 11</b>	Atribuições e deslocamentos químicos de hidrogênio da ivermectina livre e de IVER- $\beta$ -CD.	52
<b>TABELA 12</b>	Atribuições e deslocamentos químicos de hidrogênio da eprinomectina livre e de EPRI- $\beta$ -CD.	53
<b>TABELA 13</b>	Deslocamentos químicos de hidrogênios ( $\delta H$ ppm) da $\beta$ -CD, na molécula livre e nos complexos IVER- $\beta$ -CD e EPRI- $\beta$ -CD obtidos em DMSO- $d_6$ , 400 MHz, e a variação do deslocamento ( $\Delta\delta$ ) dos sinais de $^1H$ da $\beta$ -CD nos respectivos complexos.	54
<b>TABELA 14</b>	Toxicidade da IVER, EPRI e seus respectivos complexos com $\beta$ -CD frente a larvas de <i>Aedes aegypti</i> nos estádios L1 e L4 (os dados obtidos são médias de 9 replicatas).	61
<b>TABELA 15</b>	Efeito citotóxico (IC <sub>50</sub> ) de IVER, IVER- $\beta$ -CD, EPRI e EPRI- $\beta$ -CD em fibroblastos WI26VA4.	63

## TABELA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABA	Abamectina
AD	Adulto com os tarsos deformados
$\alpha$ -CD	Alfa-ciclodextrina
AP	Adulto com emergência parcial
$\beta$ -CD	Beta-ciclodextrina
CDs	Ciclodextrinas
$D_h$	Diâmetro hidrodinâmico
DL <sub>50</sub>	Dose letal a 50% dos indivíduos
DSL	Espalhamento de luz dinâmico
DMSO	Dimetilsulfóxido
<i>DMSO-d<sub>6</sub></i>	Dimetilsulfóxido deuterado
DTA	Análise térmica diferencial
DTG	Análise térmica derivada
EPRI	Eprinomectina
H <sub>2</sub> O	Água
$\gamma$ -CD	Gama ciclodextrina
IV	Infravermelho
IVER	Ivermectina
IVER- $\beta$ -CD	Complexo de inclusão ivermectina com $\beta$ -ciclodextrina
KBr	Brometo de potássio
LMs	Lactonas Macrocíclicas
L1	Primeiro estágio larval
L2	Segundo estágio larval
L3	Terceiro estágio larval
L4	Quarto estágio larval
MELD	Micro-eletroforese laser-doppler
MHz	Mega Hertz
ML	Mortalidade em larva
MM	Mistura mecânica
MTT	Brometo de tetrazólio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil

OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Pupa albina
PD	Pupa distendida
PI	Pupa com adulto visível no interior
PP	Mortalidade como pré-pupa
RMN	Ressonância magnética nuclear
ROESY	Rotating-frame Overhauser Enhancement Spectroscopy
TG	Termogravimetria
UV-VIS	Ultravioleta-visível
WHO	World Health Organization
ZP	Potencial Zeta

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

---

No planeta, os insetos representados principalmente por moscas, besouros, formigas, baratas e cupins, constituem cerca de dois terços das espécies animais existentes, sendo bem mais numerosos que os quase sete bilhões de seres humanos.<sup>1,2</sup>

A grande maioria dos insetos é inofensiva ao homem e alguns são muito úteis para polinização de plantas e reciclagem do lixo. No entanto, existem insetos que causam danos diretos ou indiretos à humanidade, destruindo plantações, prejudicando a saúde animal ou vetorizando doenças, implicando em sérios problemas de saúde pública. Existem hoje inúmeras doenças transmitidas à espécie humana por esses vetores como, por exemplo, esquistossomose, doença de chagas, malária, filariose e leishmaniose, que apresentam como principais vetores caramujos, barbeiros e mosquitos, respectivamente.<sup>3,4</sup>

O mosquito *Aedes aegypti* (LINNAEUS, 1762) tornou-se popularmente conhecido por sua frequente vinculação na mídia como o alvo principal das campanhas de combate à dengue. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a dengue constitui a principal doença viral transmitida por mosquitos. Estima-se que, no mundo, ocorram entre 50 e 100 milhões de casos, resultando em cerca de 500 mil internações e 20 mil óbitos por ano.<sup>5</sup>

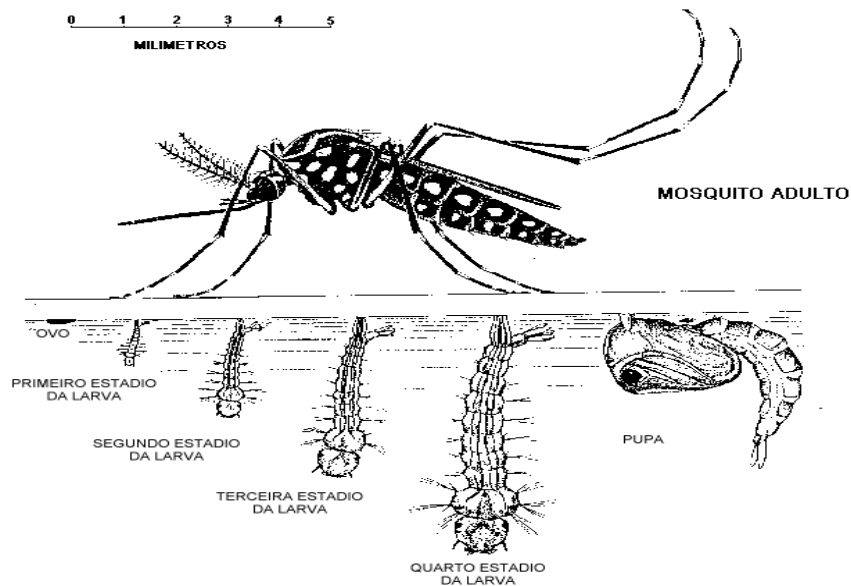
Além desta doença, ele também pode transmitir a Febre Amarela, Chikungunya e Zika. Essas são doenças endêmicas em vários países das Américas, Europa e Ásia. No Brasil já foram registrados mais de 17 mil casos de Febre de Chikungunya. A ocorrência de casos da doença Zika foi confirmada em 22 estados, e a relação entre o vírus Zika e o surto de microcefalia foi confirmada pelo Ministério da Saúde.<sup>6</sup> Recentemente, o conjunto de distúrbios neurológicos e malformações neonatais que tem sido associado com o vírus da doença Zika (ZIKV) foi declarado pela OMS como emergência de saúde pública internacional. Neste cenário, as ações de combate ao mosquito tornam-se cada vez mais urgentes, o que instiga pesquisas para novos métodos de controle do vetor *Aedes aegypti*.<sup>3</sup>

O ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti* é composto por quatro fases: ovo, larva, pupa e adulto (Figura 1). Os ovos são brancos, mas adquirem a cor negro brilhante ao contato com o oxigênio do ar, sendo muito resistentes, suportando longos períodos de dessecação, podendo chegar até 492 dias.<sup>7</sup>



A fase de larva, período de alimentação e crescimento é dividida em 4 estádios, distinguíveis pelo tamanho das larvas, ocorrendo 3 mudas do exoesqueleto. Na fase pupa, as larvas adquirem o formato de vírgula e é nesta fase que ocorre a metamorfose do estágio de larva para o adulto, sendo que nesse período não há mais alimentação, mas apenas respiração.

Na fase adulta, 24 horas após emergirem os insetos já podem acasalar. Uma única inseminação é suficiente para fecundar todos os ovos que a fêmea venha a produzir durante sua vida. Os mosquitos se alimentam de seiva, mas as fêmeas necessitam de albumina e proteínas para a maturação dos ovos e quando infectadas com vírus podem transmitir doenças. Em condições ambientais favoráveis, após a eclosão do ovo, o desenvolvimento do mosquito até a forma adulta pode levar um período de 10 dias.



**Figura 1.** Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*. Fonte: [www.dengue.org.br/mosquito\\_aedes.html](http://www.dengue.org.br/mosquito_aedes.html)

As ações de combate aos mosquitos baseiam-se no controle dos indivíduos adultos e das larvas, principalmente pelo uso de inseticidas químicos (adulticidas e larvicidas). No Brasil, o controle da população do *Aedes aegypti* é direcionado principalmente para eliminação das larvas, devido a maior vulnerabilidade dessa fase.<sup>5</sup> O controle é realizado de três formas: mecânica, pela remoção manual dos criadouros potenciais; biológica com a utilização de peixes larvívagos; e química, sendo que esta última, baseada no uso de inseticidas, constitui uma das principais ações no combate ao vetor da dengue.<sup>5</sup>

Um dos problemas relacionados ao uso contínuo de inseticidas é o desenvolvimento de resistência por parte dos insetos. A resistência implica em diminuição da eficiência, aumento da frequência e da dosagem, maior impacto ambiental e consequente manutenção das doenças.

Diversos estudos demonstraram o aparecimento de resistência aos inseticidas comuns para o controle da dengue, tais como temefós, cipermetrina e deltametrina.<sup>8-14</sup> Como forma de minimizar o desenvolvimento de resistência, uma importante estratégia seria a rotatividade no uso dos inseticidas preconizados para o controle da dengue, entretanto dos 12 inseticidas larvicidas que são recomendados pela OMS,<sup>5</sup> apenas 5 são preconizados para o uso no combate ao *Aedes aegypti*, desta forma, este pequeno número de inseticidas registrados pela agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA) para o uso em programas de controle de vetores limita esta estratégia.<sup>15</sup>

O número limitado de inseticidas registrados e o crescente desenvolvimento de resistência aos produtos já utilizados têm impulsionado as pesquisas para o desenvolvimento de inseticidas mais eficazes, sendo que vários produtos têm sido avaliados como alternativa para os atualmente utilizados.<sup>16-18</sup>

Considerando a baixa disponibilidade de inseticidas no mercado para esse fim e que as pesquisas para o desenvolvimento de novos produtos são caras e demoradas, a prática de avaliar inseticidas agrícolas ou de uso veterinário é uma opção mais acessível.

Neste contexto, uma possível alternativa para o combate a esses vetores são as avermectinas, compostos amplamente utilizados como medicamentos antiparasitários em animais e humanos. Experimentalmente, foi comprovado tanto a letalidade larvicida quanto adulticida das avermectinas para várias espécies de artrópodes, além de efeitos subletais que incluem a má formação, dificuldade de locomoção, diminuição da fecundidade, redução do número de eclosões, redução da frequência de repasto sanguíneo, além de distúrbios sensoriais e motoras.<sup>19-26</sup>

Dentre as avermectinas conhecidas, a ivermectina é a única avermectina licenciada para uso humano, já tendo sido administrada a mais de 180 milhões de pacientes com comprovada segurança.<sup>27</sup> Em humanos, seu uso oral é indicado para o tratamento de vários tipos de parasitas em adultos e crianças.<sup>28</sup>

Para tratamento animal, as avermectinas são comercializadas para administração oral, tópica ou por injeção. Devido a sua alta lipofilicidade, são praticamente insolúveis em água e para sua formulação é necessário o uso de surfactantes aquosos ou solventes orgânicos. Esse emprego de diluentes, agentes umectantes, solventes, surfactantes, dentre outros, é comum na maioria das formulações de inseticidas, pois são raros os compostos que são solúveis em água.

Nesse tipo de formulação o produto é liberado lentamente para o meio o que pode influenciar na sua biodisponibilidade no organismo alvo.

Diante da necessidade de busca por novas formulações ou aprimoramento de formulações existentes, uma estratégia promissora é a complexação desses inseticidas com ciclodextrinas (CDs). Esta tecnologia possui um amplo espectro de aplicações em várias áreas, como por exemplo, na identificação seletiva de espécies químicas, impressão molecular, adsorção de moléculas bioativas a tecidos, remoção de poluentes do solo, detoxificação, atenuação de sabores e/ou odores desagradáveis, redução da volatilidade de óleos essenciais, e como dispositivos de liberação controlada de fármacos e correlatos. Na agricultura, tem sido utilizada no encapsulamento de várias classes de pesticidas, com comprovada melhoria em suas propriedades físico-químicas.<sup>29-35</sup>

Na literatura tem sido relatado que os principais benefícios apresentados pelos complexos de inclusão de inseticidas com CDs, em relação a compostos livres, foram aumento da solubilidade, liberação controlada, proteção contra fotodegradação, aumento da estabilidade, melhora na formulação e diminuição da toxicidade humana por inalação e contato.<sup>36-41</sup>

Desta forma, a ação das avermectinas contra uma variedade de artrópodes sugere que esta família de compostos seja promissora na redução de incidências de doenças transmitidas por esses vetores. No entanto, algumas de suas propriedades como baixa solubilidade aquosa e alta lipofilicidade, limitam a biodisponibilidade de suas formulações. Além disso, a grande persistência das avermectinas nos tecidos adiposos tem sido um dos principais problemas relacionados ao uso intensivo desses compostos em animais produtores de alimentos, por gerarem resíduos sobretudo em carnes e leite. Neste contexto, as ciclodextrinas surgem como uma importante alternativa para melhorar as propriedades físico-químicas dessas moléculas, nos motivando ao estudo da sua complexação e avaliação da atividade larvicida e toxicidade desses sistemas.

### 1.1. Sistemas Supramoleculares e a Química Supramolecular

A química supramolecular tem se destacado nos últimos anos, principalmente devido a sua natureza multidisciplinar, promovendo a aproximação dos diversos segmentos científicos, e a somatória de diversas perspectivas possibilitam surpreendentes avanços.<sup>42</sup>

Avanços no modo de perceber as interações intermoleculares e suas potencialidades para organizar e estruturar materiais foram obtidos através da observação dos sistemas biológicos.<sup>42</sup> As estruturas biológicas são projetadas a partir de moléculas que interagem especificamente umas com as outras, originando sistemas ou estruturas altamente complexas e funcionais. Essa organização, reatividade e seletividade dos processos que ocorrem a nível molecular tornou-se um novo ramo de estudo na química, sendo chamada por J-M Lehn como “a química além da molécula”, ou como hoje é conhecida, química supramolecular.<sup>43</sup>

A química supramolecular é também conhecida como a química dos arranjos moleculares, e das interações não covalentes. O objetivo desta ciência é caracterizar, tentar prever e atribuir funcionalidade aos agregados de moléculas, envolvendo dois conceitos importantes: reconhecimento e função molecular.<sup>43</sup> O reconhecimento e função molecular envolve geometria e interações intermoleculares compatíveis e altamente seletivas entre as espécies interagentes.<sup>43</sup>

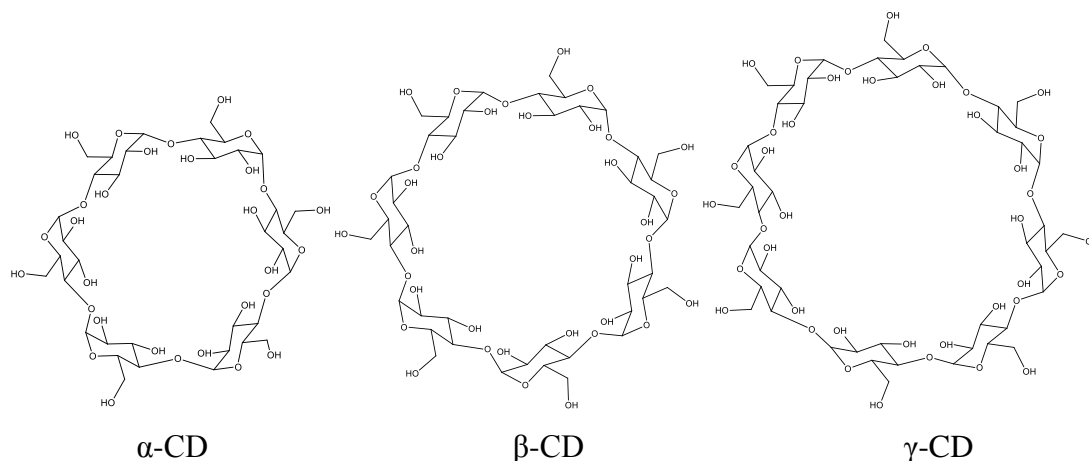
Na química supramolecular, como o foco são as interações, é válido classificá-las em interações de curto ou de longo alcance.<sup>43</sup> Interações de pequeno alcance definem a forma dos arranjos moleculares, assim como o tamanho e modo de empacotamento das moléculas. São interações de curto alcance as ligações de hidrogênio, interações dipolares (dipolo permanente-dipolo permanente, dipolo permanente-dipolo induzido, dipolo induzido-dipolo induzido, multipolos induzidos), interações eletrostáticas (íon-íon e íon-dipolo).<sup>44</sup> As interações de longo alcance definem orientações e funções, como efeitos de exclusão de volume que são responsáveis por modificações na estrutura do solvente e interações devidas ao efeito hidrofóbico que são responsáveis pela estruturação terciária e quaternária de biomoléculas e organelas biológicas.<sup>44</sup>

Um exemplo comum de (sistemas) associações supramoleculares são os complexos de inclusão (CI), dentre os vários dispositivos passíveis de formar este tipo de complexo, as CDs se destacam, pela sua incrível capacidade de “receptionar” uma enorme variedade de moléculas e potencializar suas funções individuais ou, até mesmo, possibilitar novas aplicações para o sistema formado.<sup>42,45</sup>

### 1.1.1 Ciclodextrinas (CDs)

As CDs são oligossacarídeos cíclicos, constituídos por unidades de glicopiranosose unidas por ligações glicosídicas  $\alpha$  1-4 (**Figura 2**). São produzidas pela degradação do amido através da ação da enzima ciclodextrina glicosil transferase (CGTase), produzida por diferentes microrganismos, como o *Bacillus macerans*, *B. megaterium*, *B. circulans*, *B. stearothermophilus*, *B. alcalofílico*, *B. subtilis*, *Micrococcus varians*, *M. luteus* e *Klebsiella pneumoniae*. O amido é composto basicamente de dois tipos de polímeros de glicose: a amilose, molécula essencialmente linear e as ligações são  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4'). Na amilopectina, há uma ramificação na hidroxila de C6 com uma ligação  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6'). Porém, as ligações  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4') continuam no polímero.<sup>46</sup> No processo de produção das CDs, a enzima CGTase age principalmente na amilose, catalisando a hidrólise das ligações glicosídicas  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4') e a subsequente reação de transglicosilação intramolecular ou ciclização dos oligossacarídeos; obtendo-se assim dextranas cíclicas como produto da reação.<sup>47,48</sup>

As CDs naturais mais conhecidas, possuem seis, sete e oito unidades de glicose, sendo denominadas de  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD, respectivamente. As unidades de glicose que compõem a estrutura cíclica das CDs adotam a conformação de cadeira. Podem existir CDs com nove ou mais unidades de glicose;<sup>49</sup> entretanto não há formação de CDs com menos de seis unidades de glicose devido a fatores estéricos.<sup>43,50-53</sup>

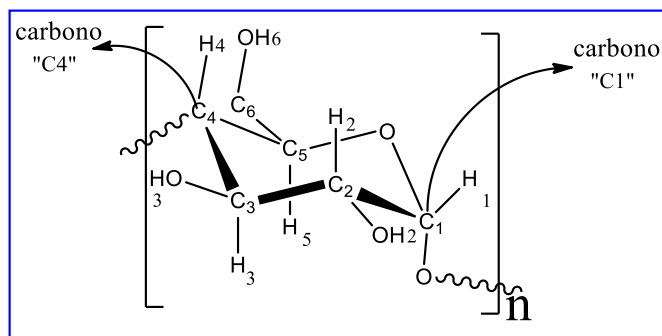


**Figura 2.** Estrutura química das ciclodextrinas naturais.

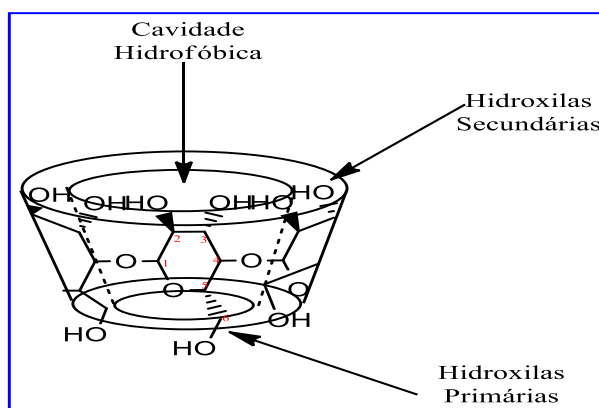
#### 1.1.1.1 Estrutura e propriedades

A estrutura das CDs foi elucidada por estudos de raios-X,<sup>54</sup> onde se observou que a disposição espacial das unidades de glicopiranosose, com conformação em cadeira e ausência de

livre rotação das ligações glicosídicas, conferem às CDs uma geometria de anel toroidal, em forma de cone truncado ou cápsulas cilíndricas ocas, abertas em ambas as extremidades, com um lado mais largo formado pelas hidroxilas secundárias nos carbonos C2 e C3, e uma face mais estreita, promovida pela livre rotação das hidroxilas primárias ligadas em C6 (Figuras 3 e 4).



**Figura 3.** Representação estrutural de uma unidade glicosídica na conformação de cadeira

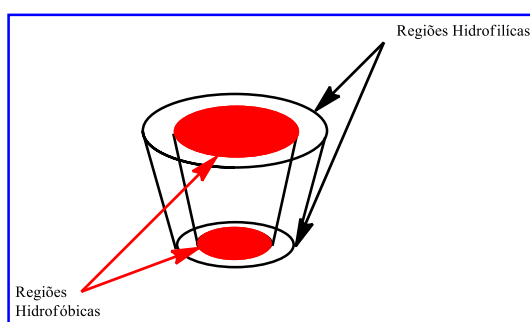


**Figura 4.** Representação esquemática da estrutura funcional das ciclodextrinas

O interior da cavidade é delimitado pelo alinhamento dos átomos de hidrogênio ligados aos carbonos C3 e C5 e pelo oxigênio da ligação éter C1-O1-C4. O par de elétrons não ligante do oxigênio das ligações glicosídicas está orientado para o interior da cavidade produzindo uma elevada densidade eletrônica conferindo-lhe algum caráter de base de Lewis. Além disso, a cavidade central das CDs não se encontra vazia, estando ocupada por moléculas de água de cristalização que originam vários estados de hidratação e por moléculas de água da própria solução. Essas moléculas de água presentes na cavidade das CDs podem formar ligações de hidrogênio com os grupos presentes na cavidade. Entretanto, devido a tensão do anel essas interações não são totalmente satisfeitas, resultando em ligações de hidrogênio anômalas e de alta energia em relação as ligações de hidrogênio convencionais, formadas entre as moléculas

de água e as hidroxilas externas ou entre as moléculas de água da rede. Esse confinamento desfavorável das moléculas de água na cavidade das CDs, somadas à presença dos grupamentos C-H, fazem com que esta região da molécula apresente um caráter hidrofóbico.<sup>55</sup>

A face externa das CDs apresenta um maior número de hidroxilas (C3-OH equatorial voltado para o exterior da cavidade e a hidroxila primária ligada ao carbono C6), essas hidroxilas das extremidades atribuem a esta região um caráter hidrofílico pela possibilidade de formação de ligações de hidrogênio com o solvente (**Figura 5**).<sup>47,55</sup>



**Figura 5.** Disposição da cavidade hidrofóbica e superfície hidrofílica da ciclodextrina. Adaptada de Kubota 2010, Calderine 2006 e Ribeiro, 2004.

Essa disposição espacial das CDs resulta em ambientes com polaridades diferentes em uma mesma molécula, ou seja, duas regiões que apresentam comportamento distinto, podendo ser então consideradas moléculas anfifílicas.

A presença de grupos hidroxilas nas extremidades favorece a solubilidade das CDs em água, pela possibilidade de ligações de hidrogênio. No entanto, as hidroxilas posicionadas na face exterior da molécula podem formar ligações de hidrogênio intramoleculares, através da interação entre o grupo ‘HO-C2’ de uma unidade glucopiranosídica com o grupo ‘HO-C3’ da unidade adjacente, criando uma cinta secundária que influencia na flexibilidade da estrutura destas moléculas e em sua solubilidade em água.<sup>47,55</sup>

A dimensão da cavidade das CDs é determinada pelo número de unidades de glicopiranoses que as constitui, e a variação no número dessas unidades confere a cada ciclodextrina propriedades físico-químicas diferentes.

A  $\alpha$ -CD possui 6 unidades de glicopiranosose e apresenta três formas cristalinas diferentes: forma I,  $\alpha$ -CD.6H<sub>2</sub>O, forma II,  $\alpha$ -CD.6H<sub>2</sub>O (polimorfo) e a forma III,  $\alpha$ -CD.7,5H<sub>2</sub>O. Nessa CD uma unidade de glicose encontra-se em uma posição distorcida, desta forma apenas quatro das seis possíveis ligações de hidrogênio são estabelecidas.

A  $\beta$ -CD possui em sua estrutura 7 unidades de glucopiranosose e apresenta duas formas cristalinas diferentes: forma I,  $\beta$ -CD.11H<sub>2</sub>O e a forma II,  $\beta$ -CD.12H<sub>2</sub>O. A diferença estrutural

entre as duas formas encontra-se principalmente na distribuição desordenada das moléculas de água dentro da sua cavidade. Estas duas formas podem-se converter uma na outra ao fim de algumas semanas durante o armazenamento. Devido à disposição estrutural na  $\beta$ -CD todas as ligações de hidrogênio possíveis ocorrem, e a rigidez do anel é a provável explicação para a sua reduzida solubilidade aquosa quando comparada com todas as outras CDs.<sup>47,55</sup>

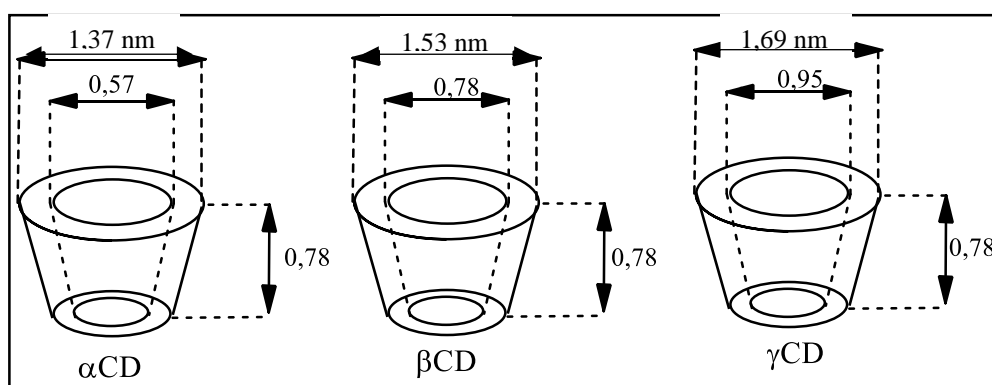
A  $\gamma$ -CD contém oito unidades de glucopirranose em sua estrutura e apresenta uma forma cristalina:  $\gamma$ -CD.13,3H<sub>2</sub>O. As moléculas de água presentes nesta CD não causam torção no anel e sua estrutura não coplanar torna a mais flexível e mais solúvel entre as três ciclodextrinas.<sup>47,55</sup>

Na **Tabela 1** e na **Figura 6** estão apresentadas algumas características das CDs naturais.

**Tabela 1.** Características das ciclodextrinas naturais

Propriedades	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD
Unidade de glicose	6	7	8
Massa molar (g/mol)	972	1135	1297
Solubilidade aquosa (g/100mL a 25°C)	14,5	1,85	23,2
Diâmetro interno da cavidade (Å)	4,7-5,3	6,0-6,5	7,5-8,3
Diâmetro externo da cavidade (Å)	13,7	15,3	16,9
Altura da estrutura (Å)	7,9 ± 0,1	7,9 ± 0,1	7,9 ± 0,1
Volume aproximado da cavidade (Å) <sup>3</sup>	174	262	427
pKa (25°C)	12,333	12,202	12,081

Fonte: Adaptado de Denadai, 2005; Kubota, 2010; Veiga, 2006 e Szetli, 1988.<sup>45</sup>



**Figura 6.** Dimensões moleculares das ciclodextrinas naturais. Adaptado de Szetli, 1988.

Como citado anteriormente, as CDs apresentam solubilidades diferentes em água. Em solventes orgânicos geralmente a solubilidade das CDs diminui devido à formação de complexos com as moléculas orgânicas. Na **Tabela 2** estão apresentados os valores de solubilidade das CDs em alguns solventes orgânicos.<sup>47,55</sup>

No estado sólido, a disposição das moléculas de CDs na matriz cristalina pode ser de dois modos: gaiola ou canal. Na forma de gaiola ou caixa, a cavidade da molécula é bloqueada

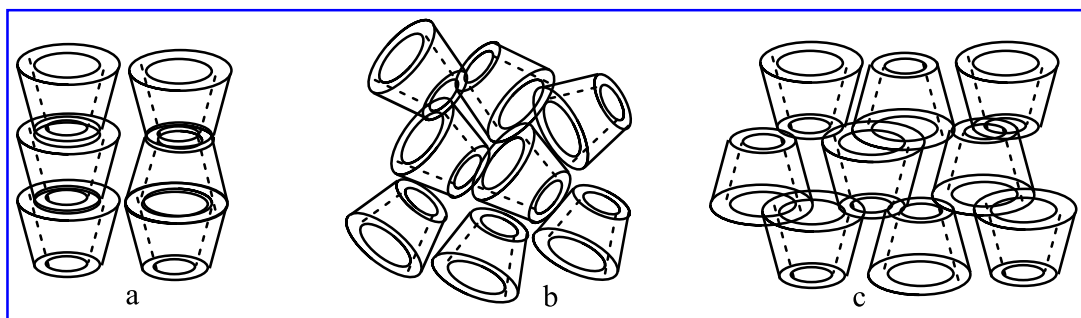


em ambas as extremidades pelas CDs adjacentes, ficando o seu interior isolado. Essas estruturas ordenam-se espacialmente em forma cruzada numa disposição em “espinha” ou dispostas em forma de “parede de tijolos” (**Figura 7**). Na forma de canal, as moléculas se empilham uma sobre as outras com alinhamento central. Podendo este alinhamento ocorrer numa disposição topo-base ou topo-topo (**Figura 7**). A  $\beta$ -CD pode formar dímeros topo-topo mesmo em solução aquosa.<sup>47,55</sup>

**Tabela 2.** Solubilidade das ciclodextrinas em solventes orgânicos a 25°C (g/ 100 mL).

<i>Solvente</i>	<i><math>\alpha</math>-CD</i>	<i><math>\beta</math>-CD</i>	<i><math>\gamma</math>-CD</i>
<i>Metanol</i>	<i>i</i>	<i>i</i>	>0,1
<i>(aquoso, 50%)</i>	0,3	0,3	208
<i>Etanol</i>	<i>i</i>	<i>i</i>	>0,1
<i>(aquoso, 50%)</i>	>0,1	1,3	2,1
<i>Isopropanol</i>	<i>i</i>	<i>i</i>	>0,1
<i>Acetona</i>	<i>i</i>	<i>i</i>	>0,1
<i>Clorofórmio</i>	<i>i</i>	<i>i</i>	<i>i</i>
<i>Piridina</i>	7	37	-
<i>Tetrahidrofurano</i>	<i>i</i>	<i>i</i>	<i>i</i>
<i>Dimetilformamida</i>	54	32	-
<i>Dimetilsulfóxido</i>	2	35	-
<i>Etilenoglicol</i>	9	21	-
<i>Propilenoglicol</i>	<i>i</i>	2	-
<i>Glicerina</i>	<i>i</i>	4,3	-

Legenda: *i* – insolúvel Fonte: Szejtli et al, 1983.<sup>56</sup>



**Figura 7.** Formas de disposições das ciclodextrinas no estado sólido Canal. a) disposições topo-base (esquerda) e topo-topo (direita); b) Gaiola, “escama de peixe”; c) “parede de tijolos. Adaptada de Szejtli e colaboradores, 1988.<sup>55</sup>

Do ponto de vista da estabilidade química, as CDs são mais estáveis que os polissacarídeos lineares, apresentam resistência às soluções alcalinas (idêntica à celulose) e em

reações de hidrólise ácida sua estabilidade é 2 a 5 vezes maior do que a das dextrinas acíclicas, dependendo, no entanto, da temperatura e da acidez.<sup>55</sup>

As CDs são termicamente estáveis até 200 °C, a partir desta temperatura inicia-se a sua decomposição, essas moléculas não têm ponto de fusão bem definido. As propriedades termoanalíticas observadas para as CDs dependem do teor de água, estrutura cristalina, taxa de aquecimento e condições atmosféricas.<sup>47,55</sup>

#### *1.1.1.2 Toxicologia*

As CDs são pouco absorvidas no trato gastrointestinal devido a sua dimensão molecular e hidrofobicidade superficial, o que dificulta a sua permeação através das membranas celulares. Sendo assim, a possibilidade de apresentarem toxicidade oral é muito reduzida.<sup>48</sup> Vários estudos em animais comprovaram que as CDs não provocam qualquer tipo de toxicidade aguda, e mesmo quando administrada em doses elevadas a animais não provocou mortalidade. A  $\beta$ -CD por ser a mais utilizada, foi alvo de vários estudos sobre sua toxicidade oral utilizando ratos, cachorros e em humanos, sendo considerada como substância não tóxica para administração oral. O DL<sub>50</sub> oral, rato > 5000 mg/kg, DL<sub>50</sub> i.v., rato: entre 450 e 790 mg/kg.<sup>34,53</sup>

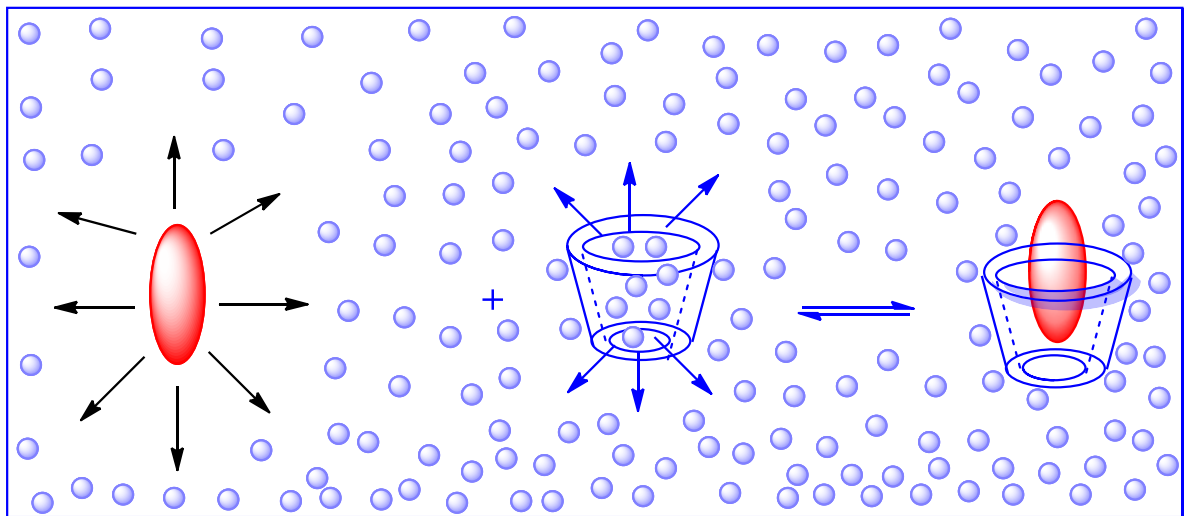
#### *1.1.1.3 Complexos de inclusão*

A natureza anfifílica das CDs lhe permite desempenhar vários tipos de interações intermoleculares que regem todo o processo de complexação, o que lhes conferem a capacidade de formar complexos de inclusão, em solução e no estado sólido, com uma variedade de moléculas em diversos estados de agregação, conferindo vantajosas modificações em suas características físicas e químicas sem, contudo, modificar a natureza de sua composição.<sup>57-59</sup>

Os complexos de inclusão formados pelas CDs são conhecidos como do tipo “hospedeiro/hóspede”, do inglês “host-guest”. Neste tipo de sistema, moléculas que possuem cavidades podem receber outras moléculas, sendo chamadas de hospedeiras. Já a molécula que se insere em sua cavidade pode ser chamada de convidado, substrato ou “hóspede”.<sup>60</sup>

Em solução aquosa o fenômeno de inclusão ocorre essencialmente pela substituição das moléculas de água inclusas na cavidade da CD por moléculas de menor polaridade, cuja esquematização pode ser observada na **Figura 8**. Em solução, a CD encontra-se dissolvida em água, devido as interações de hidrogênio, e sua cavidade preenchida por moléculas de água, porém em condição energeticamente desfavorável (estado de alta entalpia e baixa entropia).

Caso ocorra a adição de moléculas cuja polaridade seja menor do que a da água, ocorrerá o deslocamento das moléculas de água da cavidade para a solução ocorrendo a sua substituição pelo composto hidrofóbico. Desta forma, as contribuições termodinâmicas mais importantes para a formação do complexo são decorrentes da entrada da molécula hidrofóbica na cavidade da CD, e a diminuição da tensão interfacial entre as moléculas de água e a molécula hidrofóbica, o que caracteriza um processo tipicamente de efeito hidrofóbico.<sup>30</sup>



**Figura 8.** Representação esquemática da formação de um complexo em solução aquosa. Substrato em vermelho e ciclodextrina em azul (forma de copo), os círculos em azul representam as moléculas de água. Adaptada de Szejtli, 1988, 1998 e 2004.

Quanto à estequiometria de formação, a mais comum é 1:1 (hóspede:  $\beta$ -CD), mas sabe-se que as CDs podem formar complexos 2:1, 1:2, 2:2, ou estruturas supramoleculares de ordem superior.<sup>48,61</sup>

Os complexos de inclusão, quando em solução, estabelecem um equilíbrio dinâmico entre as espécies dissociadas e complexadas. Esse equilíbrio pode ser expresso pela constante de estabilidade ( $K$ ) (também chamada de constante de afinidade, formação ou associação) do complexo.<sup>48</sup> Esta constante é um parâmetro muito importante na avaliação da afinidade e do grau de ligação das moléculas incluídas na cavidade da CD. Os valores considerados adequados para aplicações dos complexos de inclusão em sistemas biológicos estão geralmente entre 50 e 2000.<sup>62-63</sup> Complexos pouco estáveis ( $< 50$ ) apresentam como problema a liberação muito rápida da substância, enquanto que os muito estáveis ( $>2000$ ) apresentam dificuldade na liberação.

As interações intermoleculares estabelecidas entre a CD e a molécula hóspede refletem diretamente nos valores de  $K$ . Na complexação, o composto hóspede troca um conjunto de interações com o solvente por um conjunto de interações com a cavidade da CD, e espera-se

que as interações entre as CDs e convidado sejam mais fortes que as estabelecidas com a água. As interações mais frequentemente relatadas envolvidas na complexação são ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas, forças de Van der Waals e interações hidrofóbicas.

As ligações de hidrogênio ocorrem entre átomos de hidrogênio e átomos de elemento mais eletronegativo. Nas CDs os grupos hidroxilas primários (C6-OH) são geralmente os principais responsáveis pelas ligações de hidrogênio com os hóspedes, pois possuem livre rotação na ligação C5-C6. Os grupos C2-OH e C3-OH geralmente se encontram comprometidos com interações intramoleculares.<sup>64</sup>

Nos complexos de inclusão, as interações eletrostáticas ocorrem quando moléculas hóspede de carga positiva interagem com elétrons desemparelhados dos oxigênios da cavidade (cujo potencial eletrostático é negativo) através de interações íon-dipolo.<sup>30</sup>

As interações de Van der Waals ocorrem como resultado das interações entre os momentos de dipolo permanentes ou temporários entre as moléculas hóspede e hospedeira. No caso das CDs, estas moléculas apresentam intensos momentos de dipolo e podem gerar fortes forças de indução na complexação.<sup>65</sup> Essas interações são consideradas as principais responsáveis pela estabilização dos complexos, bem como pela remoção da água da cavidade das CDs.

A interação hidrofóbica é o resultado da grande perda de entropia durante a hidratação, pela estruturação das moléculas de água nas vizinhanças de um soluto apolar. Desta forma, a agregação dos solutos apolares em solução aquosa é compensada pela libertação da camada de hidratação, ou seja, a libertação das moléculas de água da estrutura ordenada, o que é entropicamente favorável e força motriz deste tipo de interação. Esta interação é estabelecida após a remoção da água presente na cavidade da CD, o que promove a agregação de solutos não-polares em soluções aquosas.<sup>65,66</sup>

Em solução, a molécula hóspede pode estar localizada, inteira ou parcialmente, dentro da cavidade da CD, estando o complexo solvatado ou rodeado por moléculas do solvente. Em geral moléculas hidrofóbicas tem maior afinidade pela cavidade apolar das CDs em solução.<sup>63</sup> No estado cristalino, a molécula hóspede pode estar localizada, não somente dentro da cavidade da CD, mas também nos espaços intersticiais formados pela rede cristalina do complexo. As moléculas incluídas normalmente ficam orientadas de modo que se alcance o máximo contato entre a parte hidrofóbica da molécula hóspede e a cavidade apolar das CDs.<sup>67</sup>

Alternativas para a formação de complexos entre a CD e moléculas significativamente maiores que sua cavidade, podem ocorrer através de uma interação parcial do hóspede,

associações ou mediante a formação de complexos CD-hóspede de estequiometria diferente de 1:1.

Existem várias técnicas que podem ser empregadas no preparo de complexos de inclusão e a sua escolha dependerá da natureza do hóspede. Os métodos mais utilizados para preparação dos complexos de inclusão são descritos a seguir.<sup>30,68,69</sup>

Co-precipitação é um método no qual adiciona-se uma solução da molécula hóspede a uma solução aquosa de CD. Caso seja preciso utiliza-se um solvente diferente da água para solubilizar o hóspede. Deve-se escolher um solvente que seja miscível com água. A mistura é agitada até o equilíbrio e o complexo sólido é obtido por evaporação a vácuo ou liofilizado.

Suspensão é um método onde a molécula hóspede no estado sólido é adicionada a uma solução aquosa de CD formando uma suspensão que é agitada vigorosamente, o complexo é formado em um intervalo de 2 a 24 horas em temperatura ambiente, após este período a suspensão é filtrada. O complexo, dissolvido no filtrado é coletado à vácuo ou por liofilização.

Empastagem (*kneading*) é um método no qual a molécula hóspede no estado sólido é adicionada a uma mistura de CD com água, sendo utilizadas apenas 0,5 partes de água por parte de CD. O complexo sólido formado pode ser removido sob vácuo ou aquecimento.

Moagem conjunta (*grinding*) é um método no qual uma mistura de CD e molécula hóspede no estado sólido são trituradas vigorosamente por um determinado tempo na presença de uma pequena quantidade de água até que ela evapore durante a mistura.

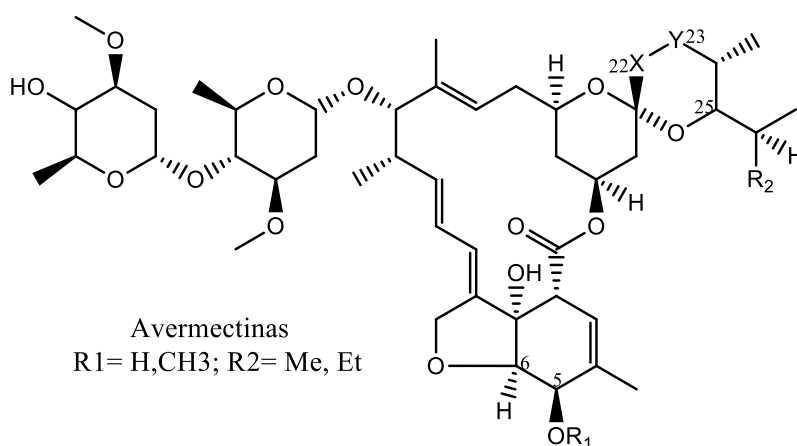
Nas caracterizações físico-químicas dos complexos de inclusão, visando a identificação das interações intermoleculares, emprega-se um grande número de técnicas analíticas, dentre as mais usadas: análise térmica diferencial (DTA)/calorimetria de varredura diferencial (DSC), análise termogravimétrica (TGA), calorimetria isotérmica de titulação (ITC), as técnicas espectroscópicas na região do infravermelho (IV), na região do ultravioleta e visível (UV-Vis), ressonância magnética nuclear (RMN uni e/ou bi-dimensionais), além de técnicas de equilíbrio de fases como solubilidade e particionamento.

## 1.2. Moléculas de interesse para o estudo da complexação

### 1.2.1 Avermectinas

As avermectinas são compostos pertencentes a classe das Lactonas Macrocíclicas (LM). Foram descobertas em 1975, pelo pesquisador japonês Satoshi Omura no Instituto Kitasato, a partir de microrganismos presentes em uma amostra de solo da cidade de Ito no Japão.<sup>70</sup> Sua descoberta causou um grande impacto na indústria de alimentos de origem animal, pois apresentavam elevada eficiência parasiticida contra artrópodes e nematódeos, sendo amplamente utilizadas em diversas espécies animais, principalmente no setor agropecuário, para o tratamento de doenças parasitárias e como acaricida no setor agrícola.<sup>71</sup>

As avermectinas são sintetizadas a partir da fermentação do microrganismo actinomiceto *Streptomyces avermitilis*, que produz uma mistura de oito tipos de avermectinas: A1a, A1b, A2a, A2b, B1a, B1b, B2a e B2b (**Figura 9** e **Tabela 3**).<sup>70</sup> Neste processo os tipos que são produzidos em maiores quantidades são: A2a, B1a e B2a.<sup>72</sup>



**Figura 9.** Estrutura genérica das avermectinas, os principais átomos de carbono estão numerados para identificação.

**Tabela 3.** Fórmulas estruturais das avermectinas naturais.

avermectina	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	X-Y
A1a	CH <sub>3</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	CH=CH
A1b	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH=CH
A2a	CH <sub>3</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	CH <sub>2</sub> -CH(OH)
A2b	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> -CH(OH)
B1a	H	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	CH=CH
B1b	H	CH <sub>3</sub>	CH=CH
B2a	H	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	CH <sub>2</sub> -CH(OH)
B2b	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> -CH(OH)

Dos oito tipos de avermectinas naturais, embora possuam uma estrutura complexa, são estreitamente relacionadas entre si e são classificados de acordo com algumas de suas características estruturais. As avermectinas que compõem a série “A” possuem um radical metil ligado ao carbono 5, diferindo da série “B” que possui uma hidroxila ligada a este carbono. Os compostos da série “1” possuem entre o carbono 22 e 23 uma dupla ligação, e os da série “2” possuem uma ligação simples com o grupo hidroxila ligado ao carbono 23. A série “a” e “b” difere pelo radical ligado ao carbono 25, as avermectinas da série “a” têm um grupo sec-butil e as da série “b” possuem um grupo isopropil ligado a este carbono (**Tabela 3**).<sup>73</sup> Pertencem ao grupo das avermectinas a abamectina, ivermectina, eprinomectina, doramectina, selamectina e emamectina.

Em 1981, o pesquisador Albers-Schonberg através de trabalhos por espectrometria de massa e RMN <sup>13</sup>C, apresentou um estudo detalhado da estrutura das avermectinas majoritárias, identificadas como substâncias do tipo “a” e as minoritárias (homólogos designados como substâncias do tipo “b”).<sup>73</sup>

Essas substâncias foram estudadas durante anos, sendo verificado a maior atividade biológica para a estrutura B<sub>1</sub>, composta pelas frações B1a (cerca de 80%) e B1b (não mais que 20%) às vezes referida como avermectina B<sub>1</sub>, ou como abamectina (ABA).

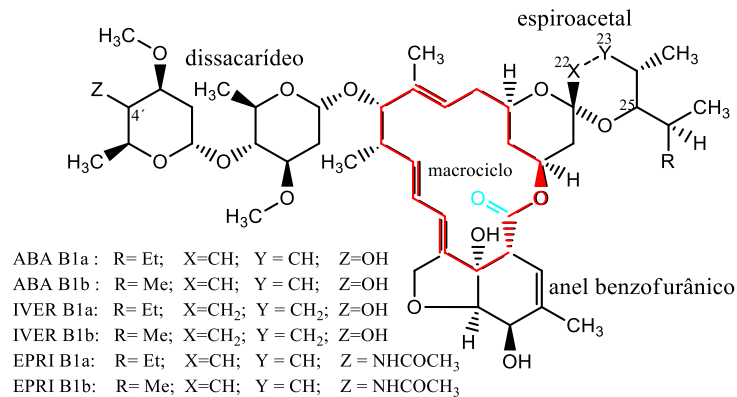
Aparentemente todas as avermectinas apresentam o mesmo mecanismo de ação antiparasitária. Embora esse mecanismo ainda não esteja totalmente esclarecido, existem algumas propostas que explicam a sua ação nos diversos organismos.

A primeira proposta de mecanismo baseia-se em sua ação como agonista do ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), aumentando a permeabilidade dos íons cloreto (Cl<sup>-</sup>), resultando em paralisia muscular.<sup>74,75</sup> Esta hipótese poderia explicar porque as avermectinas não agem sobre cestódeos e trematódeos, uma vez que estes não possuem receptores GABA. Em mamíferos a baixa toxicidade desses compostos é explicada pela impossibilidade de atravessar a barreira hematocefálica, não atingindo, assim, os receptores GABA restritos quase exclusivamente ao sistema nervoso central (SNC).<sup>76</sup>

Outra proposta de mecanismo seria a ação desses compostos nos canais de cloro potencializados pelo glutamato (GluCl), presentes apenas em invertebrados.<sup>77-79</sup> Os receptores GluCl possuem duas subunidades,  $\alpha$  e  $\beta$ , a unidade alfa é sensível às avermectinas e a unidade beta ao glutamato.<sup>80</sup> Estes receptores estão presente em diversos locais do organismo dos invertebrados. Deste modo, as avermectinas possuem vários locais de ação, bloqueando transmissões interneurais de nervos excitatórios, agindo diretamente sobre a musculatura,<sup>81</sup> causando paralisia, principalmente da faringe.<sup>82</sup> Há evidências da presença desses receptores

em células musculares do aparelho reprodutivo do parasita *Ascaris Suum*,<sup>83</sup> o que pode explicar a ação destas drogas na fertilidade e ovipostura dos nematódeos.<sup>77</sup>

As avermectinas são classificadas como lactonas pela presença do grupo éster em sua estrutura principal, um macrociclo composto por 16 elementos. Em sua subestrutura há a presença de um espiroacetal e, um anel benzofurânico, há também a presença de um grupo dissacarídeo (bis-oleandrase).



**Figura 10.** Estrutura genérica das avermectinas, para visualização das similaridades estruturais e dos principais grupos.

A avermectina B1a contém 5 ligações duplas, das quais duas são conjugadas, os dienos C8,C9 e C10,C11. Isto resulta numa forte absorção de UV a 245 nm, uma propriedade vantajosa para a detecção analítica. Das três ligações duplas restantes, os dienos C3,C4 e C14,C15 são trissubstituídos e o dieno C22,C23 (presente apenas nos componentes 1) é cis dissustituído. A avermectina B1a tem 3 grupos hidroxilas livres, um alílico secundário muito reactivo no C5, um derivado alílico secundário no C4" um pouco menos reactivo, e um grupo alílico terciário relativamente não reactivo no C8. Os grupos hidroxilas secundários são muito susceptíveis a oxidação para as cetonas correspondentes. As AVR possuem várias posições alílicas suscetíveis a modificações oxidativas. Em especial o grupo metilênico C7 na posição  $\alpha$  ao oxigênio do éter, suscetível a oxidação do radical. O composto também tem muitas ligações éter, das quais as duas ligações glicosídicas nos carbonos C1' e C1" dos açúcares são particularmente interessantes, pois são responsáveis pela facilidade de alcoólises ácidas e hidrólise do grupo dissacarídeo à monossacarídeo e aglicona. As avermectinas possuem um hidrogênio ácido no C2 junto ao grupo carbonílico. Luz UV abaixo de 280 nm provoca a epimerização dos isômeros E (trans) C8,C9 e C10,C11 em Z-8,9 e 10,11, e a exposição prolongada provoca a decomposição em diversos produtos.<sup>84,85</sup>

As propriedades químicas das LM variam em função de diferentes grupos químicos presentes em sítios específicos. Em geral todas as LM apresentam massa molecular elevada e



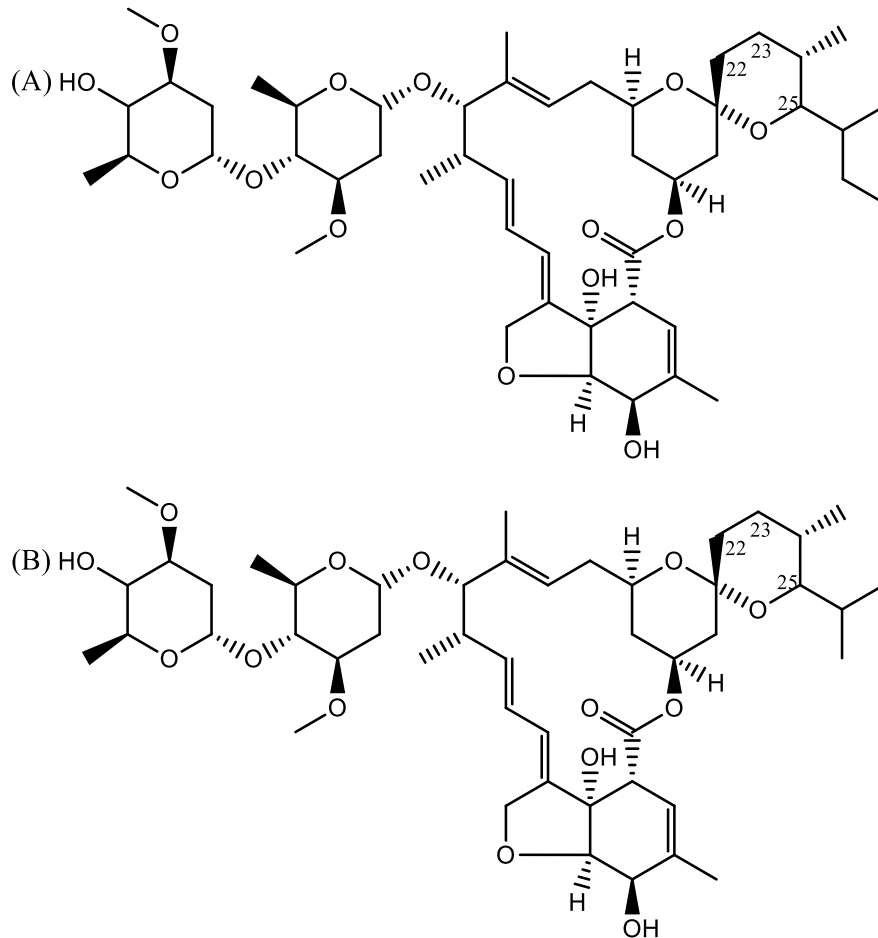
elevados valores de coeficiente de partição, sendo substâncias altamente lipofílicas. Um exemplo para a diferença de lipofilicidade entre as avermectinas pode ser observado pela ligação insaturada em C22 e C23 da ivermectina e a presença de grupo acetilamino na subestrutura dissacarídea da eprinomectina.<sup>84</sup>

As avermectinas possuem baixa solubilidade aquosa, mas são solúveis na maioria dos solventes orgânicos tais como clorofórmio, cloreto de metileno, acetato de etila, acetona, álcoois, tolueno, ciclo hexano, dimetilformamida, dimetilssulfóxido e tetrahydrofurano. Na forma sólida, apresentam-se como pós branco. Não são voláteis e apresentam sensibilidade moderada a temperatura. São estáveis em condições moderadamente ácidas (pH 4,0 ~ 4,6), porém em determinadas combinações de pH, temperatura e tempo de exposição, as avermectinas podem sofrer hidrólise na subestrutura dissacarídea no C13.

#### 1.2.1.2. *Ivermectina*

A ivermectina foi sintetizada em 1981 por cientistas da *Merck Sharp and Dohme*, pela hidrogenação seletiva da dupla ligação entre os carbonos 22 e 23 da abamectina, resultando em uma conformação em cadeira semelhante à avermectina B2, podendo ser considerada como um híbrido das avermectinas B1 e B2.<sup>84-87</sup>

A ivermectina é constituída por uma mistura de homólogos que não deve conter menos que 80% de seu homólogo B1a, que tem fórmula molecular  $C_{48}H_{74}O_{14}$  e massa molecular de  $875,1 \text{ g mol}^{-1}$ , e não mais de 20% de seu homólogo B1b, de fórmula molecular  $C_{47}H_{72}O_{14}$  e massa molecular  $861,07 \text{ g mol}^{-1}$  (**Figura 11**). Ambas diferem por um grupo metileno ligado ao C-25, onde a ivermectina B1a possui um grupo sec-butila e a ivermectina B1b possui um grupo isopropila. Desde 1987 é empregada no tratamento da oncocercose, infecção causada por filária, conhecida como a cegueira do rio e também para o tratamento da estrogiloidíase, uma infecção intestinal causada pelo parasita nemátode *Strongyloides stercoralis*, em humanos.<sup>28,88</sup>



**Figura 11.** Estrutura molecular da ivermectina B1a (A) e B1b (B)

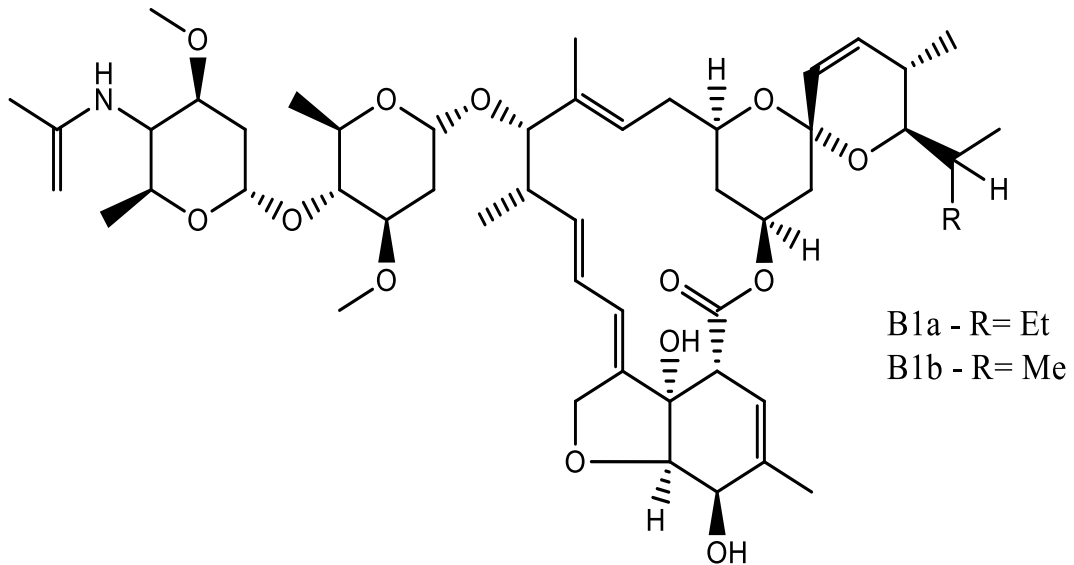
Essa molécula, dotada de potente atividade antiparasitária, tem se mostrado eficaz no tratamento contra um grande espectro de endo e ectoparasitas.<sup>71,84,89-94</sup>

Com o sucesso da comercialização e eficiência da ivermectina outros derivados foram preparados a partir dela. A 22,23-diidroavermectina B1 monossacarídeo, por exemplo, obtida através da remoção de uma oleandrose da ivermectina por hidrólise ácida, é um pouco menos potente que o seu precursor. Outros exemplos são a 22,23 diidroavermectina B1 aglicona, resultante da perda das duas oleandroses substituídas por um grupo 13- $\alpha$ -hidroxi e a 22,23-dihidro-13-desoxi-avermectina B1 aglicona, produzida pela perda das duas oleandroses substituídas por um grupo 13- $\alpha$ -desoxi.<sup>84,86</sup>

### 1.2.1.3. Eprinomectina

A 4'-epiacetilamino-4''-desoxiavermectina (**Figura 12**) é uma mistura semissintética da avermectina B1a B1b comercializada com o nome genérico de eprinomectina. Foi desenvolvida em 1996 nos laboratórios da Merck pela substituição do grupo hidroxila equatorial do C-4'' por um substituinte acetilamino. É composta de uma mistura de não menos

de 90% de eprinomectina B1a e não mais de 10% de eprinomectina B1b. A eprinomectina conserva as mesmas atividades antiparasitárias das avermectinas e, por ser mais hidrofílica, é menos provável seu aparecimento no leite. Isto levou à permissão do uso em gado leiteiro.<sup>95</sup>



**Figura 12.** Estrutura molecular da eprinomectina.

A dosagem de eprinomectina recomendada para uso tópico no tratamento de parasitas é de  $500 \mu\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$  de peso, sendo que não foi adotado período de carência para a utilização desta droga em gados de abate e para vacas em lactação, isto se deve a sua baixa lipofilidade e alta hidrossolubilidade devido a existência de um radical acetilamino em comparação com outras avermectinas, favorecendo a sua rápida eliminação por vias excretoras.

## 2. OBJETIVOS

---

### 2.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo a síntese e caracterização físico-química das composições nanoestruturadas das avermectinas: ivermectina e eprinomectina com  $\beta$ -CD bem como a avaliação da atividade dessas composições contra larvas do mosquito *Aedes aegypti* e da toxicidade humana *in vitro*, contra linhagens de células de fibroblastos WI26VA4.

### 2.2 Objetivos específicos

- Preparar o complexo de inclusão de ivermectina em  $\beta$ -CD;
- Preparar o complexo de inclusão de eprinomectina em  $\beta$ -CD;
- Avaliar a solubilidade e solubilização dos compostos de inclusão;
- Caracterizar a formação dos complexos, em fase sólida, através de análises térmicas e espectrofotometria de absorção na região do infravermelho (IV);
- Avaliar as interações intermoleculares entre a  $\beta$ -CD e os inseticidas em solução por Ressonância Magnética Nuclear (RMN de  $^1\text{H}$  e ROESY- *Rotating-frame Overhauser Enhancement Spectroscopy*);
- Avaliar o efeito da  $\beta$ -CD na formação de nanoprecipitados hidrofóbicos em mistura de solventes, por medidas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial zeta (ZP);
- Determinar parâmetros termodinâmicos de interação das avermectinas com  $\beta$ -CD por calorimetria isotérmica de titulação (ITC);
- Avaliar a atividade larvicida das nanocomposições e seus precursores frente às larvas do *Aedes aegypti* (estádios L1 e L4);
- Avaliar e comparar a citotoxicidade das nanocomposições e seus precursores utilizando o método de viabilidade celular (MTT).

### 3. MATERIAIS E METÓDOS

---

#### 3.1 Matérias-primas e reagentes utilizados

As amostras dos inseticidas foram cedidas pelo Laboratório de Separações (LASEP) do Departamento de Ciências Naturais da Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ), sendo as amostras padrões secundários, conforme descrição abaixo:

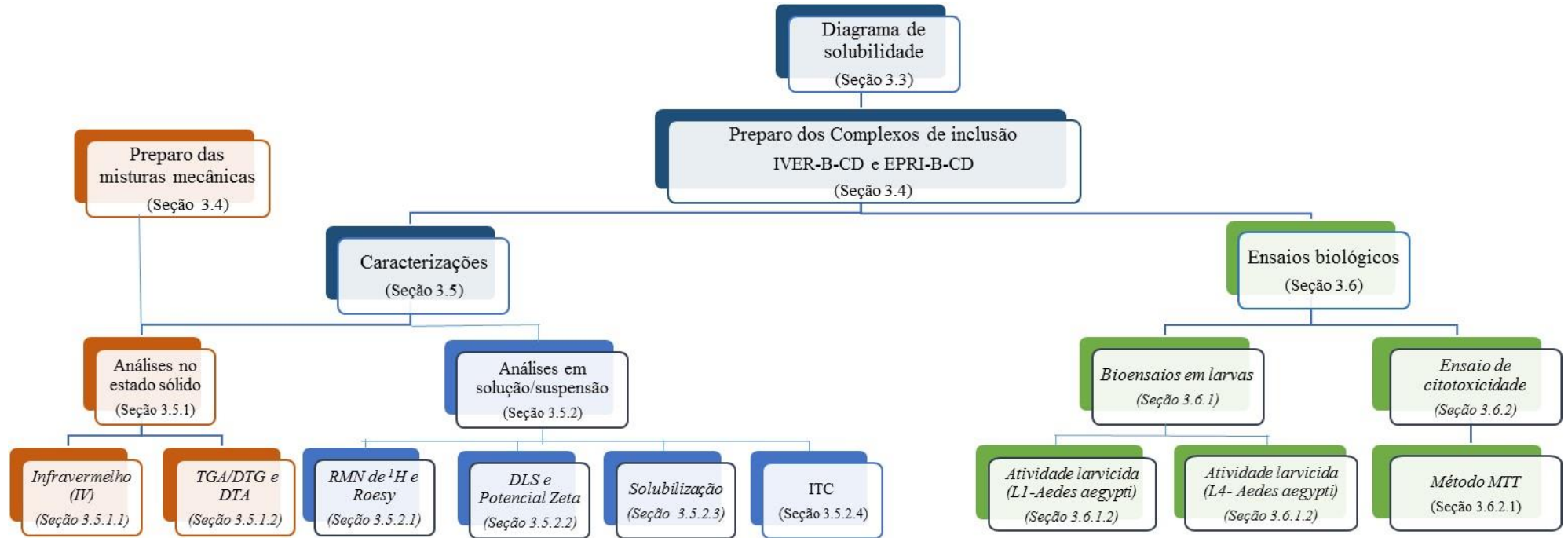
**Tabela 4.** Composição e teor das amostras

Amostra	Teor	Massa Molar	Fórmula Molecular
Ivermectina (IVER)	89,83% – B1a	875,1 g/mol	B1a (>80%) - C <sub>48</sub> H <sub>74</sub> O <sub>14</sub> B1b (<20%) - C <sub>47</sub> H <sub>72</sub> O <sub>14</sub>
Eprinomectina (EPRI)	94,34% – B1a	914,14 g/mol	B1a (≥90%) - C <sub>50</sub> H <sub>75</sub> NO <sub>14</sub> B1b (≤10%) – C <sub>49</sub> H <sub>73</sub> NO <sub>14</sub>

A β-CD foi comprada da Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, EUA). Os solventes (etanol, dimetilsulfóxido - DMSO e outros) foram adquiridos das empresas Vetec® (Rio de Janeiro, RJ, Brasil), Synth® (Diadema, SP, Brasil) e J. T. Baker® (Cidade do México, DF, México) com pureza para fins analíticos (P.A.).

#### 3.2 Delineamento dos experimentos

De forma a facilitar o entendimento do trabalho, elaboramos um fluxograma no qual estão apresentadas as etapas de síntese, caracterização e os ensaios biológicos realizados (Figura 13). Para uma melhor organização do projeto ele foi estruturado em duas partes (Caracterização e Ensaios biológicos). Na etapa de caracterização dos complexos de inclusão, as análises foram separadas de acordo com o estado físico do sistema. Os ensaios biológicos estão divididos entre aqueles que irão avaliar a atividade larvicida dos compostos nos estádios L1 e L4; e os que irão avaliar a citotoxicidade *in vitro* das composições pelo método MTT.

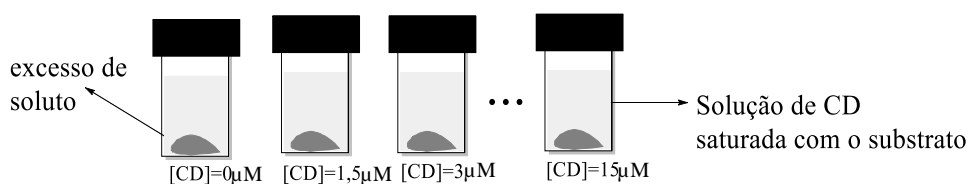


**Figura 13.** Fluxograma de desenvolvimento da pesquisa.

### 3.3 Diagrama de solubilidade

O primeiro experimento realizado consistiu na obtenção do diagrama de solubilidade, baseado na técnica desenvolvida por Higuchi e Connors.<sup>96</sup> O diagrama de solubilidade em água da molécula hóspede, na presença de  $\beta$ -CD foi obtido usando o procedimento descrito a seguir: (i) Inicialmente, 25,0 mL de uma solução estoque de  $\beta$ -CD foi preparada na concentração de 15,0 mM em água Milli-Q; (ii) Em seguida, 1,0 mg do composto hóspede foi pesado em um tubo de ensaio, e então, adicionou-se um volume pré-definido da solução estoque e o volume final foi ajustado com água Milli-Q para 3,0 mL. Esta etapa foi realizada 11 vezes de forma a obter concentrações crescentes de  $\beta$ -CD no intervalo de 0 a 15 mM (**Figura 14**).

Os tubos contendo as suspensões preparadas foram colocados em um banho termostático com agitação à  $30,0 \pm 0,1^\circ \text{C}$ , durante 48 horas para se garantir o equilíbrio termodinâmico de dissolução. Após este período, o sobrenadante foi filtrado utilizando um filtro Millipore<sup>®</sup> 0,22  $\mu\text{m}$ . A quantidade da molécula hóspede no sobrenadante foi dosada utilizando a espectrofotometria de UV-VIS.



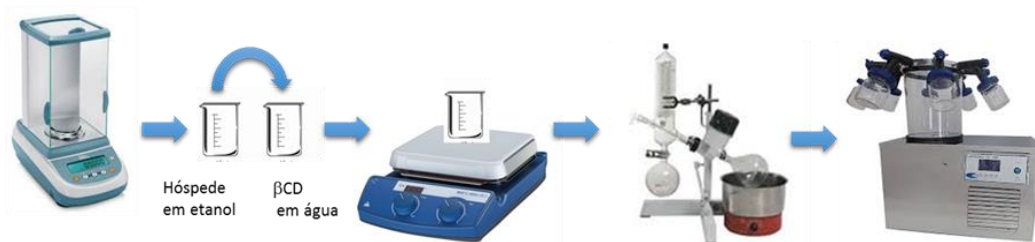
**Figura 14.** Esquema de preparação das amostras para o experimento de solubilidade.

### 3.4. Preparo dos complexos de inclusão e misturas mecânicas

Os complexos de inclusão foram preparados usando quantidades equimolares das moléculas hóspedes (ivermectina e eprinomectina) e de  $\beta$ -CD baseados nos métodos de coprecipitação/liofilização.<sup>43,55</sup>

Em béqueres separados, foram preparadas soluções da  $\beta$ -CD e das moléculas hóspedes de mesma concentração molar. A  $\beta$ -CD foi solubilizada em água, e as moléculas hóspedes em etanol, devido a sua baixa solubilidade em água. As soluções das moléculas hóspedes foram adicionadas às soluções de  $\beta$ -CD e mantidas sob agitação por 24 h. As suspensões formadas foram rotaevaporadas para a retirada do solvente orgânico, congeladas e liofilizadas.

Na **Figura 15** está esquematizado o processo de obtenção dos complexos de inclusão. Os sólidos obtidos foram submetidos a caracterização.



**Figura 15.** Processo de incorporação das moléculas hóspedes em ciclodextrina.

As misturas mecânicas das moléculas hóspedes (IVER e EPRI) com a  $\beta$ -CD foram preparadas na proporção molar de 1:1, sendo o hospede e a CD homogeneizados em grau de porcelana com auxílio de pistilo, acondicionados em tubo *ependorf*<sup>®</sup> e armazenados em geladeira (**Figura 16**). Estas misturas mecânicas serão utilizadas para efeitos de comparação nas análises no estado sólido.



**Figura 16.** Processo de preparação das misturas mecânicas.

### 3.5 CARACTERIZAÇÕES DOS COMPLEXOS

#### 3.5.1 Análises no Estado Sólido

##### 3.5.1.1. Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho (IV)

Os espectros na região do infravermelho médio ( $4000$  a  $400$   $\text{cm}^{-1}$ ) das moléculas hóspedes (IVER e EPRI) da  $\beta$ -CD das misturas mecânicas e dos complexos de inclusão foram obtidas em equipamento de infravermelho da Perkin Elmer, com transformada de Fourier, modelo Spectrum Two TM. Foram preparadas pastilhas em KBr contendo as moléculas hóspedes, pura ou combinadas com CD e as misturas mecânicas. Os espectros foram obtidos como a média de 16 varreduras consecutivas, com resolução de  $2$   $\text{cm}^{-1}$ , e intervalo de onda de  $4000$  a  $400$   $\text{cm}^{-1}$ . Para a aquisição dos espectros foi utilizado o programa Perkin Elmer Spectrum ES (versão do aplicativo: 10.03.08.0133). Os dados foram exportados para o Microcal Origin 8.0 (OriginLab, Northampton, MA) para edição.



### 3.5.1.2 *Análises Térmicas: termogravimetria (TGA), análise térmica diferencial (DTA)*

As análises térmicas foram realizadas no Departamento de Ciências Naturais da Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ). O equipamento DTG 60/60H da Shimadzu foi utilizado na aquisição das curvas TGA e DTA da molécula hóspede, do complexo de inclusão e da mistura mecânica. Na referência foi utilizado o cadinho de alumina vazio. As condições de análises foram: atmosfera de N<sub>2</sub> a 50 mL/min, com rampa de temperatura de 30 a 700 °C e uma taxa de aquecimento de 10°C/min, e massa aproximada de 3,5 ± 0,5 mg do composto a ser analisado em cadinho de alumina.

### 3.5.2 *Análises em Solução/Suspensão*

#### 3.5.2.1 *Espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)*

As análises de RMN de <sup>1</sup>H e ROESY foram realizadas no Departamento de Química da Universidade Federal do Espírito Santo, utilizando um espectrômetro Varian 400 MHz. Os espectros foram obtidos a partir da dissolução dos compostos em DMSO-d<sub>6</sub>. Os dados apresentados neste trabalho foram editados utilizando o programa MestReC.

#### 3.5.2.2. *Fotometria de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Potencial Zeta (ZP)*

O caráter nanométrico das moléculas hóspedes (IVER e EPRI) e de seus respectivos complexos de inclusão com a β-CD foram avaliados por medidas de tamanho de partículas (Diâmetro hidrodinâmico – Dh) por espalhamento de luz dinâmico (DLS). Os experimentos foram realizados em um módulo fotométrico de DLS, Zetasizer Nano ZS90 da Malvern, a 25 °C ± 1,0 °C, com termostatização via sistema Peltier. As amostras foram inseridas em cubetas de polietileno de 1 cm de caminho óptico, padrão Malvern, e submetidas a um feixe de luz monocromático (Laser He-Ne de 4 mW e comprimento de onda de 633 nm), com intensidade de luz espalhada medida a um ângulo de 90°. O Dh foi determinado pela média de cinco medidas independentes, cada uma delas obtida a partir da média de 5 contagens. Para os experimentos, foram pesados 1,0 mg do composto puro e quantidade molar equivalente de seu complexo com CD e solubilizados em 500 µL de DMSO. Foram realizadas 25 injeções de 20 µL desta solução em 2000 µL ± 0,2 µL de água Milli-Q. O tratamento dos dados foi executado com o auxílio do programa Microcal Origin 8.0.

Na determinação da energia potencial normalizada pela carga superficial das partículas ou potencial zeta (ZP) foram preparadas suspensões similares às utilizadas no experimento de tamanho hidrodinâmico citado acima. Cada uma das suspensões foi vertida em uma cubeta de

vidro na qual é imersa a célula de medida (*Dip Cell*) e avaliada pelo módulo Zetasizer Nano-ZS 90 através da técnica de micro-eletoforese laser-doppler (MELD), com ângulo de espalhamento de luz a  $173^\circ$  e ddp alternada 40 V, a partir dos valores de mobilidade eletroforética, calculado pelo modelo de Smoluchowski. Assim como o diâmetro hidrodinâmico, o valor final do potencial foi calculado como a média de 5 medidas independentes com 5 contagens cada e o tratamento dos dados foi executado com o auxílio do programa Microcal Origin 8.0.

### 3.5.2.3. *Análise de solubilização*

Nesse experimento, 1,0 mg do composto puro (IVER e EPRI) e quantidade molar equivalente de seu complexo com  $\beta$ -CD foram pesados diretamente em cubetas de quartzo, e em seguida, adicionou-se 3,0 mL de água Milli-Q. Os espectros eletrônicos na região de 400-200 nm foram obtidos durante um intervalo de 24 h, contabilizando 97 ciclos com 15 min entre cada. Os espectros eletrônicos do composto puro e do complexo de inclusão para a construção dos gráficos de solubilização foram obtidos utilizando-se o espectrofotômetro UV-vis, marca Perkin Elmer, modelo Lambda 25, contendo acessório de troca automática para oito amostras, acoplado a um banho termostático Peltier ( $20^\circ\text{C} - 60^\circ\text{C}$ ) e gerenciado pelo software UV WinLab. O branco utilizado foi água Milli-Q e todas as medidas foram realizadas a  $30^\circ\text{C} \pm 1,0^\circ\text{C}$ . O experimento foi realizado em duplicata. Após a obtenção dos espectros, os dados foram transferidos e editados no programa Microcal Origin 8.0.

### 3.5.2.4. *Titulações calorimétricas isotérmicas (ITC)*

Alterações nas propriedades termodinâmicas em decorrência da complexação foram medidas por microcalorimetria isotérmica de titulação. Essas análises foram realizadas em um Microcalorímetro VP-ITC da Microcal utilizando os seguintes parâmetros experimentais: 51 injeções automáticas de 5  $\mu\text{L}$  de titulante (solução da molécula hóspede a 30 mM em DMSO:  $\text{H}_2\text{O}$  - 90:10, v/v - em 1,5 mL do titulado, solução de  $\beta$ -CD a 2 mM em DMSO:  $\text{H}_2\text{O}$  - 90:10, v/v. Temperatura dos experimentos  $25^\circ\text{C}$ , rotação de 300 rpm. A primeira injeção de  $1\mu\text{L}$  foi descartada afim de eliminar os efeitos de difusão de material da seringa para a célula e vice-versa. Os experimentos de referência (branco), consistiram de titulação da molécula hóspede a 30 mM em 1,5 mL de DMSO:  $\text{H}_2\text{O}$  - 90:10, v/v, após os experimentos, as curvas de titulação foram subtraídas dos respectivos brancos afim de se eliminar matematicamente os efeitos de interação dos compostos com o solvente. Os experimentos foram realizados em duplicata e os dados tratados com o auxílio do programa Microcal Origin 6.0.

## 3.6 Ensaios Biológicos

### 3.6.1. Bioensaios envolvendo larvas do mosquito *Aedes aegypti*

#### 3.6.1.1. Obtenção das larvas

Os ovos do mosquito *Aedes aegypti* doados pelo Professor Gustavo Ferreira Martins do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa foram colocados para eclodir em bacias plásticas com dimensões de 30 × 20 × 7 cm contendo 2 L de água deionizada, em uma sala climatizada (temperatura ≈ 25 °C e umidade ≈ 50%). Após 24h, os ovos eclodiram e as larvas no estágio L1 foram transferidas para outra bacia com 2 L de água deionizada e ~100 mg de alimento. A partir daí a água foi trocada diariamente fazendo reposição do alimento até os indivíduos atingirem o estágio L4 de desenvolvimento. Após os indivíduos atingirem o estágio de pupa, os mesmos foram descartados.

#### 3.6.1.2. Avaliação da atividade larvicida frente ao estágio L1 de larvas do mosquito *Aedes aegypti*

A avaliação da atividade larvicida dos compostos no estágio L1 foi realizada utilizando uma adaptação do método desenvolvido por Pridgeon e colaboradores,<sup>97</sup> que consiste em um teste rápido, de triagem para identificar o potencial larvicida dos compostos.

Cinco larvas no estágio L1 (24h após a eclosão dos ovos) foram adicionadas em um *eppendorf*<sup>®</sup> juntamente com 940 µL de água deionizada e 10 µL de uma suspensão de comida. Em seguida, adicionou-se 50 µL de cada composto de tal forma que a solução final (V = 1000 µL) tenha a concentração desejada do composto e com 1% (v/v) de dimetilsulfóxido. A curva dose-resposta foi construída utilizando-se as seguintes concentrações 0,0001, 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10 e 100 µM. Após 24h de exposição aos compostos, o número de larvas mortas foi registrado, sendo consideradas mortas aquelas que não apresentaram movimento ou não respondem aos estímulos externos. Os experimentos foram realizados a 25 °C ± 2 °C. Foram realizadas quatro replicatas por experimento e os resultados dos testes foram submetidos à análise estatística PROBIT pelo programa Origin 8.0 (OriginLab, Northampton, MA), para determinar a dose letal a 50% da população, DL<sub>50</sub>. Como controle negativo foi usado água deionizada, solução de β-CD e a solução de DMSO 1%.

Nos testes com larvas no estágio L1 foram adotados os cuidados preconizados por Silva, Silva e Lira (1998), ou seja, manuseadas apenas larvas com tegumento escuro e cápsula cefálica bem visível.<sup>7</sup>

### 3.6.1.3. Avaliação da atividade larvicida frente ao estágio L4 de larvas do mosquito *Aedes aegypti*.

A avaliação da atividade larvicida dos compostos foi realizada pelo método recomendado pela Organização Mundial de Saúde, com adaptações.<sup>98</sup>

Quantidades equimolares do composto puro e seu respectivo composto de inclusão foram pesadas e diluídas em solução de DMSO obtendo uma solução estoque. A partir desta solução foram realizadas diluições dando origem as soluções de trabalho. Em seguida, 20 larvas no estágio L4 de desenvolvimento do *Aedes aegypti* foram transferidas com o auxílio da pipeta de Pasteur para um balão volumétrico e o volume ajustado para 50 mL com água. Posteriormente, o material foi transferido para um béquer de 250 mL e adicionados 50 mL de solução do composto em concentrações definidas para um volume final de 100 mL gerando as concentrações teste (100 µM, 10 µM, 1 µM, 0,1 µM; 0,01 µM e 0,001µM em DMSO 1%). Após 24h e 48h de exposição das larvas ao tratamento, o número de larvas mortas foi registrado sendo consideradas mortas aquelas que não apresentaram movimento ou não responderam aos estímulos externos. O experimento foi realizado a 28 °C, em três dias independentes e com três replicatas por experimento. Os resultados dos testes foram submetidos à análise estatística PROBIT pelo programa Origin 8.0 (OriginLab, Northampton, MA), para determinar a dose letal a 50% da população, DL<sub>50</sub>. Os gráficos de mortalidade × concentração foram construídos no programa GraphPad Prism 5.0. Como controle positivo foi usado o novaluron e negativo água e a solução de DMSO 1%. Os dados do teste foram utilizados somente quando durante a realização do teste menos que 10% das larvas se tornaram pupas e a mortalidade no controle foi inferior a 20% atendendo assim, às recomendações preconizadas pela literatura.<sup>99</sup>

## 3.6.2 Ensaio de citotoxicidade

### 3.6.2.1 Avaliação da citotoxicidade dos compostos frente a fibroblastos WI26VA4 pelo Método MTT.

Os testes de atividade citotóxica foram realizados no Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG.

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados com compostos selecionados utilizando-se linhagens de células de fibroblastos WI26VA4 enriquecidas com meio de cultura EMEM. As células foram cultivadas para a replicação e após atingirem uma confluência adequada, foram colocadas em placas de 96 poços (5.10<sup>3</sup> células). As células foram mantidas durante

48h a 37 °C em uma atmosfera contendo 5% CO<sub>2</sub> com meio de cultura EMEM suplementado com bicarbonato de sódio, L-glutamina e 10% (v/v) de soro fetal bovino estéril. Em seguida, cada composto foi adicionado a microplaca contendo as células, em concentrações variadas entre 0,001-500 µM, de modo a obter em um volume final de 100 µL. Em seguida, as microplacas foram novamente incubadas durante 48h a 37 °C em uma atmosfera contendo 5% CO<sub>2</sub>. O MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil-2,5-difenil)-2H-tetrazólio) foi utilizado para determinar a viabilidade celular. Foram realizadas 4 replicatas em 2 experimentos independentes. Os resultados foram plotados de acordo com a porcentagem da viabilidade celular × concentração molar da amostra, utilizando-se o software GraphPad Prism 6.0, sendo determinados os valores de IC<sub>50</sub>.<sup>100</sup>

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

---

### 4.1. Diagrama de solubilidade de fase

A solubilidade de uma substância é a sua quantidade máxima de dissolução em determinado volume de solvente a uma dada temperatura.<sup>96,101</sup> Um dos efeitos mais relatados nos estudos de complexos com CDs é a melhora na solubilidade, o que pode ser avaliado se recriarmos o diagrama de solubilidade de fase das moléculas hóspedes na presença de CD a uma dada temperatura.

Para a obtenção do diagrama de solubilidade as concentrações das moléculas hóspedes foram determinadas por leituras do sobrenadante no espectrofotômetro de UV-Vis, após centrifugação e filtração. Este método baseia-se na medição da absorbância máxima a um comprimento de onda que caracteriza a substância com adequação nas condições operacionais.<sup>102</sup>

Os primeiros métodos para identificar as avermectinas fizeram uso da sua absorção na região do ultravioleta. Segundo Fink, as avermectinas são caracterizadas por intensa absorção de luz ultravioleta, não são altamente fluorescentes e não existem efeitos significativos de solventes em seu espectro de absorção.<sup>103,104</sup>

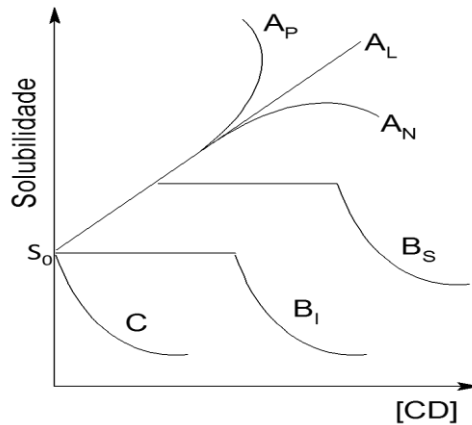
As avermectinas, devido ao dieno conjugado (ligações olefínicas entre os carbonos 8 e 9 e carbonos 9 e 10) e a presença de insaturações conjugadas com átomos de oxigênio, podem estabelecer dois tipos de transições, as transições de elétrons  $n$  (não ligantes) dos átomos de oxigênio ou  $\pi$  (das duplas ligações) para o estado excitado  $\pi^*$ , essas transições são altamente energéticas e tanto a IVER quanto a EPRI absorvem fortemente a 245 nm e possuem uma absorvidade molar de mais de 30 000 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>.<sup>102-104</sup>

Se compararmos os perfis obtidos no presente trabalho, com o diagrama de solubilidade de fase desenvolvido por Higuchi e Connors<sup>96</sup> podemos avaliar a influência da concentração da CD na estabilidade do complexo formado. Segundo Higuchi e Connors, os complexos formados podem assumir três tipos de perfis (**Figura 17**):

- Perfil A, quando o complexo de inclusão formado é mais solúvel que a molécula livre; esse perfil pode ser subdividido em: A<sub>L</sub>, quando a solubilidade do hóspede aumenta linearmente com a concentração de ciclodextrina; A<sub>P</sub>, a solubilidade sofre um desvio positivo indicando que mais de uma molécula de ciclodextrina está envolvida na complexação; e A<sub>N</sub>, a solubilidade

sofre um desvio negativo devido a contribuição significativa de interações soluto-solvente para a complexação;

- Perfil  $B_1$  quando o complexo formado apresenta limitada solubilidade aquosa do que na forma livre, esse perfil também pode ser subdividido em:  $B_S$ , quando ocorre um aumento inicial da solubilidade seguido por uma região onde a solubilidade não mais aumenta, devido à formação de precipitado e posterior redução da solubilidade pela formação de complexo pouco solúvel de estequiometria diferente daquela encontrada nas regiões crescente e constante; e  $B_1$  no qual não há aumento de solubilidade, indicado estabilização inicial da solubilidade com consequente redução da mesma devido à precipitação do complexo em água.
- Perfil C, quando o complexo formado apresenta solubilidade inferior a molécula livre.



**Figura 17.** Diagrama de solubilidade de Higuchi e Connors, adaptado por Denadai, 2005, onde  $S_0$  é a solubilidade intrínseca do hospedeiro livre e  $A_L$ ,  $A_P$ ,  $A_N$ ,  $B_1$ ,  $B_S$  e C são os possíveis perfis obtidos no experimento.

Nas Figuras 18 e 19 estão apresentados os diagramas de solubilidade de fase das moléculas hóspedes na presença de concentrações crescentes de  $\beta$ -CD a 30 °C. Para a conversão dos valores de absorbância em concentração, foi aplicada a Lei de Lambert-Beer (equação 1), utilizando os valores das absorbâncias experimentais, o valor da absorvidade molar ( $\epsilon$ ) no comprimento de onda de 245 nm e o valor do caminho ótico da cubeta (1 cm).<sup>103</sup>

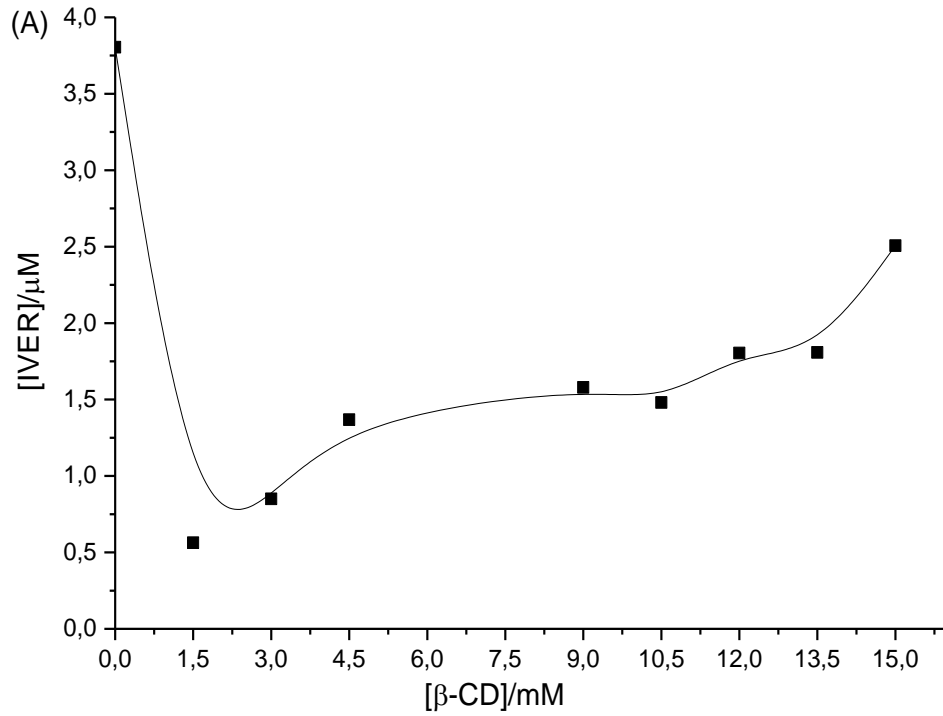
$$A = \epsilon \cdot c \cdot l \qquad \text{Equação 1}$$

Onde:

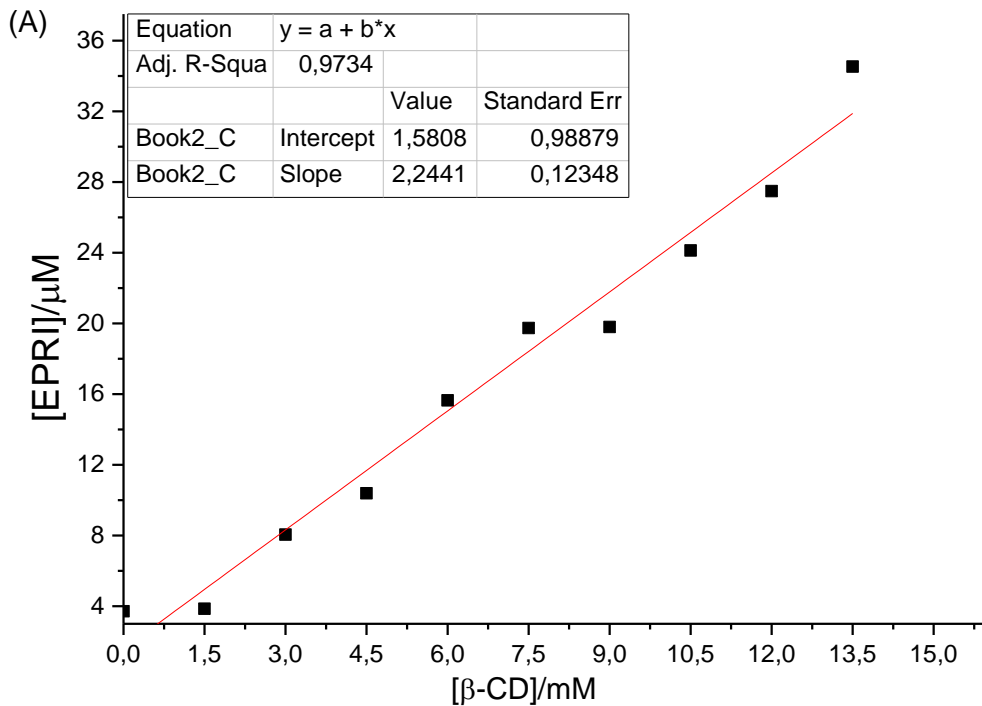
A = absorbância

$\epsilon$  = absorvidade molar

l = caminho ótico da cubeta



**Figura 18.** Diagrama de solubilidade da ivermectina (IVER) em presença de concentrações crescentes de β-CD a 30°C.



**Figura 19.** Diagrama de solubilidade da eprinomectina (EPRI) em presença de concentrações crescentes de β-CD a 30°C.



No experimento envolvendo a IVER, foi observado que com a adição de  $\beta$ -CD ocorre inicialmente uma redução na solubilidade pela formação do complexo. Isso indica que a contribuição hidrofóbica da molécula de IVER supera a contribuição hidrofílica da  $\beta$ -CD. Num segundo momento, o aumento da concentração de  $\beta$ -CD leva a um aumento na solubilidade que não chega a superar o valor de solubilidade da IVER livre. Ao compararmos a **Figura 18** com o diagrama de Higuchi e Connors, foi observado que este sistema apresenta um perfil complexo, não se encaixando exatamente em nenhum dos perfis ali apresentados, embora assemelhe-se mais ao perfil do tipo C, que apresenta solubilidade inferior a molécula livre.

Para EPRI foi observado a um perfil do tipo AL, em que a solubilidade dos complexos é superior ao da molécula livre, mostrando que a complexação com a  $\beta$ -CD pode promover um aumento da solubilidade para a EPRI que pode chegar até próximo de nove vezes o valor da solubilidade inicial. Esse efeito na solubilidade dos compostos em presença de  $\beta$ -CD geralmente é observado para complexos de inclusão.<sup>105-107</sup>

Considerando as curvas AL, que são de primeira ordem em relação à ciclodextrina, e considerando complexos do tipo hóspede: ciclodextrina, cuja estequiometria foi determinada por ITC (1:1), é possível calcular uma constante de equilíbrio usando a equação 2, na qual a constante está relacionada com os valores dos coeficientes angular e linear da curva de solubilidade.<sup>42</sup>

$$\text{Coef. angular} = \frac{m K S_0^m}{1 + K S_0^m} \quad \text{Equação 2}$$

$$\text{Coef. linear} = S_0$$

Onde:

m = índice estequiométrico

K = constante de equilíbrio

S<sub>0</sub> = solubilidade do composto hóspede

A partir do resultado obtido, com a utilização da equação 3 é possível determinar a energia de Gibbs padrão de interação ( $\Delta G^\circ$ ).<sup>42</sup>

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

$\Delta G^\circ$  = energia livre de Gibbs

R = constante dos gases ideais

T = Temperatura em Kelvin

K = constante de equilíbrio

Na **Tabela 5** estão apresentados os valores de  $K$  e  $\Delta G^\circ$  calculados a partir do experimento de solubilidade e os valores obtido por ITC.

**Tabela 5.** Valores termodinâmicos ( $K$  e  $\Delta G^\circ$ ) calculados pelo experimento de solubilidade e obtidos por titulação calorimétrica isotérmica.

Composto	Dados calculados		Determinados por ITC	
	$K$	$\Delta G^\circ$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )	$K$	$\Delta G^\circ$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )
EPRI- $\beta$ -CD	1420	- 17,937	1060 $\pm$ 71	-17,306

Apesar de existirem vários fatores que podem contribuir para propagação de incertezas quando se determina propriedades termodinâmicas através do experimento de solubilidade,<sup>42</sup> os valores determinados no presente trabalho são da mesma ordem de grandeza e apresentam o mesmo sinal dos determinados por ITC. (Ver sessão 4.2.2.1 - *Titulação Calorimétrica isotérmica (ITC)*).

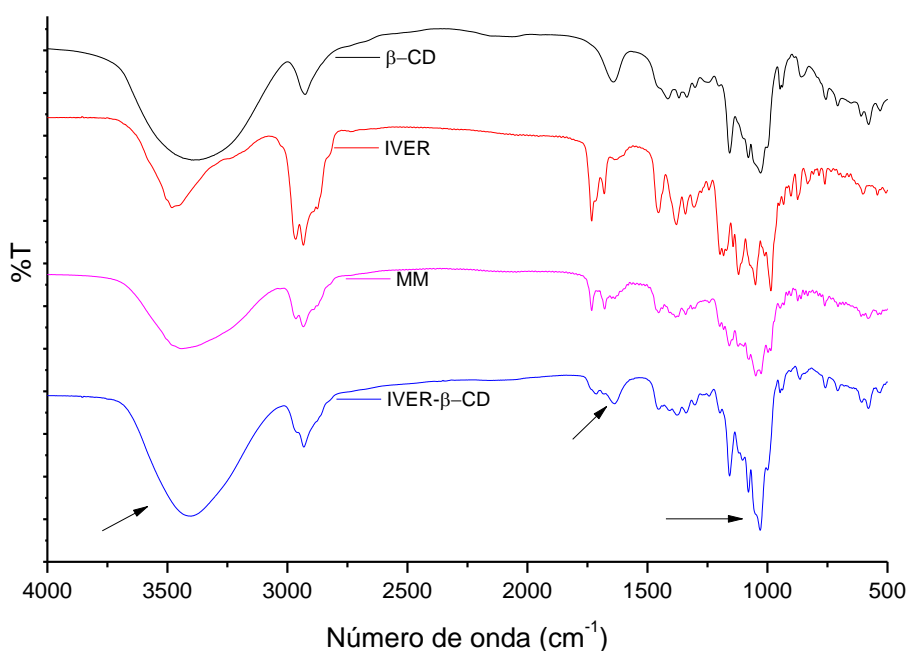
## 4.2. Caracterização dos Complexos de Inclusão

### 4.2.1. Análises no Estado Sólido

#### 4.2.1.1. Espectroscopia de absorção no Infravermelho (IV)

A espectroscopia na região do infravermelho é uma ferramenta importante na caracterização dos complexos de inclusão no estado sólido. Quando moléculas interagem para formar complexos de inclusão podem ocorrer alterações no momento de dipolo das ligações ou grupos funcionais destas moléculas. Essas alterações podem provocar aumento ou redução de bandas, restrição ou intensificação do movimento vibratório que se reflete no espectro de IV como deslocamento, redução ou supressão das bandas.<sup>43,101</sup>

Na **Figura 20** estão apresentados os espectros de infravermelho da  $\beta$ -CD, IVER, MM e seu complexo de inclusão (IVER- $\beta$ -CD) na região de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ . Na **Tabela 6** estão apresentadas as principais bandas observadas para a  $\beta$ -CD, IVER, MM e IVER- $\beta$ -CD.



**Figura 20.** Espectro de infravermelho da ivermectina (IVER),  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD), mistura mecânica (MM) e complexo de inclusão (IVER- $\beta$ -CD) na região 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  em KBr.

Na mistura mecânica não ocorreram mudanças significativas nas posições das principais bandas observadas para a IVER e a  $\beta$ -CD isoladas (**Tabela 6**), sendo que o perfil observado é justificado pela sobreposição das bandas oriundas da IVER e da  $\beta$ -CD (**Figura 20**).

No composto de inclusão (IVER- $\beta$ -CD) mudanças significativas ocorrem no perfil das bandas no espectro de infravermelho, tais como: afinamento da banda de  $\beta$ -CD a 3401  $\text{cm}^{-1}$  (referente às hidroxilas), devido à formação de um novo padrão de ligações de hidrogênio;

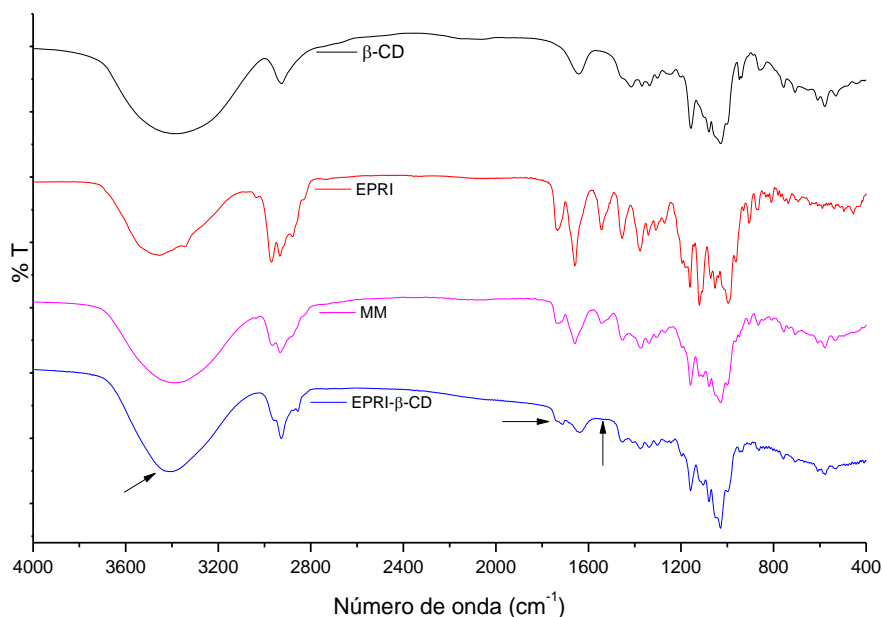
atenuação e deslocamento das bandas a  $1735\text{ cm}^{-1}$ ,  $1678\text{ cm}^{-1}$  e  $1635\text{ cm}^{-1}$  atribuídas à ligação C=O e ao estiramento de alcenos conjugados ( $\nu\text{C}=\text{C}$ ) da IVER e a intensificação e mudança no perfil das bandas na região de  $1200$  a  $900\text{ cm}^{-1}$  associadas  $\beta$ -CD. Geralmente alterações, principalmente nas vibrações características do grupo C=O, são observadas na complexação e indicam uma modificação no ambiente eletrônico do grupo C=O, sugerindo a existência de interações entre o grupo carbonila e grupos hidroxilas presentes nas CDs.<sup>108</sup> Todas essas alterações sugerem que o complexo foi realmente formado.

**Tabela 6:** Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho de  $\beta$ -CD, ivermectina (IVER), mistura mecânica (MM) e complexo de inclusão (IVER- $\beta$ -CD).

Atribuições*	Número de ondas (cm-1)			
	IVER	$\beta$ -CD	MM	IVER- $\beta$ -CD
$\nu(\text{O-H})$	3480	3380	3440	3401
$\nu(\text{C-H})$ , $\text{CH}_2$ e $\text{CH}_3$	2965; 2933	2925	2965; 2933	2931
$\nu_{\text{ass}}(\text{C=O})$ , carbonila do macrociclo.	1735	-	1735	1713
$\delta(\text{OH})$ ; $\nu\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{C}$ , sobreposição	1678, 1635	-	1678	1683
$\delta\text{O-H}$ , água de hidratação	-	1647	1640	1637
$\delta_{\text{ass}}(\text{C-H})$ , $\delta(\text{C-OH})$	1454,1380	1400-1300	1453, 1382	1453, 1375
$\nu(\text{C-O-C})$ , $\nu_{\text{ass}}(\text{C-O-C})$	1341-1000	-	1341-1000	1339-1000
Macrociclo $\nu(\text{C-O-C})$	1197 e 1183	-	1198, 1183	1197, 1155
Vibração do anel piranose (acoplamento $\delta(\text{O-C-H})$ , $\delta(\text{C-O-H})$ , $\delta(\text{C-C-H})$ )	-	1158, 1028	1158, 1027	1158, 1030

\*atribuições feitas com base em estudo relatado na literatura.<sup>109,110</sup>

Na **Figura 21** estão apresentados os espectros de infravermelho da  $\beta$ -CD, EPRI, MM e seu complexo de inclusão (EPRI- $\beta$ -CD) na região de  $4000$  a  $400\text{ cm}^{-1}$ . Na **Tabela 7** estão apresentadas as principais bandas observadas para a  $\beta$ -CD, EPRI, MM e complexo EPRI- $\beta$ -CD.



**Figura 21.** Espectro de infravermelho da eprinomectina (EPRI),  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD), mistura mecânica de (MM) e composto de inclusão (EPRI- $\beta$ -CD) na região 4000 a 400 em KBr.

**Tabela 7:** Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho de  $\beta$ -CD, eprinomectina (EPRI), mistura mecânica (MM) e complexo de inclusão (EPRI- $\beta$ -CD).

Atribuições*	Número de ondas (cm-1)			
	EPRI	$\beta$ -CD	MM	EPRI- $\beta$ -CD
$\nu(\text{O-H})$ , acoplamento $\nu(\text{N-H})$ , $\nu(\text{O-H})$	3457	3380	3393	3404
$\nu(\text{C-H})$ , $\text{CH}_2$ e $\text{CH}_3$	2969;2933	2925	2965; 2932	2961, 2931
$\nu_{\text{ass}}(\text{C=O})$ , carbonila do macrociclo.	1735	-	1738	1740, 1710
$\nu(\text{C=O})$ , característica de amidas secundárias	1659, 1544	-	1658,1544	-
$\delta\text{O-H}$ , água de hidratação	-	1647	-	1637
$\delta_{\text{ass}}(\text{C-H})$ , $\delta(\text{C-OH})$	1455,1377	1400-1300	1453, 1375	1453, 1375
$\nu(\text{C-O-C})$ , $\nu_{\text{ass}}(\text{C-O-C})$	1341-1072	-	1340-1078	1336-1000
C-N alifático	1272,1161	-	1271, 1159	1263, 1159
Macrociclo $\nu(\text{C-O-C})$	1161	-	-	-
Vibração do anel piranose (acoplamento $\delta(\text{O-C-H})$ , $\delta(\text{C-O-H})$ , $\delta(\text{C-C-H})$ )		1158, 1028	1159, 1029	1159, 1029

\*atribuições feitas com base em estudo relatado na literatura.<sup>104,105</sup>

Em relação aos espectros da EPRI, na MM não foram observadas mudanças significativas nas posições das principais bandas relacionadas à EPRI e a  $\beta$ -CD isoladas (**Tabela 7**), sendo que o perfil observado é justificado pela sobreposição das bandas oriundas da EPRI e da  $\beta$ -CD (**Figura 21**).

Já no complexo de inclusão (EPRI- $\beta$ -CD) mudanças significativas ocorrem no perfil das bandas no espectro de infravermelho, tais como: afinamento da banda de  $\beta$ -CD a  $3404\text{ cm}^{-1}$  (referente ao acoplamento das vibrações  $\nu(\text{N-H})$ ,  $\nu(\text{O-H})$ ), atribuído à formação de um novo padrão de ligações de hidrogênio; atenuação e deslocamento das bandas a  $1735\text{ cm}^{-1}$ ,  $1658\text{ cm}^{-1}$  correspondente a vibrações da ligação C=O; o desaparecimento da banda a  $1545\text{ cm}^{-1}$ ; a atenuação das bandas da EPRI a  $1300\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$  e a mudança no perfil e posições de bandas na região de  $1200\text{ a }900\text{ cm}^{-1}$  associadas à  $\beta$ -CD.

Essas alterações nos perfis dos espectros de IV dos compostos sugerem a formação dos complexos de inclusão no estado sólido.

#### 4.2.1.2. *Análise Termogravimétrica (TGA) e Análise Térmica Diferencial (DTA)*

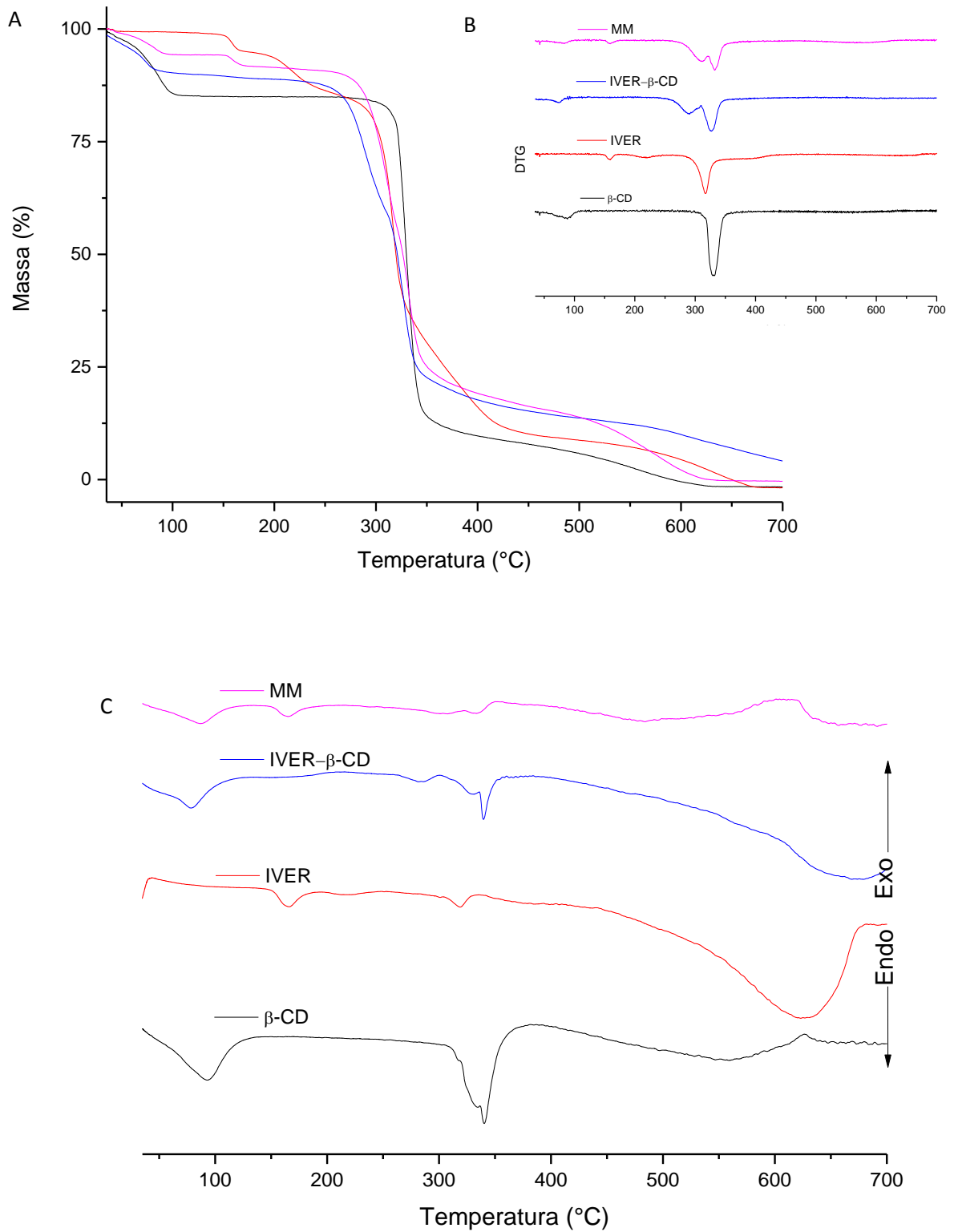
Através da análise termogravimétrica e da análise térmica diferencial podemos avaliar a estabilidade térmica dos complexos de inclusão e compará-los com seus precursores. Este tipo de avaliação é importante visto que a complexação pode causar modificações nas propriedades térmicas dos precursores, como alterações nas temperaturas de evaporação, fusão, sublimação, decomposição, oxidação ou redução e outros.<sup>38,111</sup>

Na **Figura 22** estão apresentadas as curvas TG/DTG e DTA e na **Tabela 8** estão apresentados os eventos térmicos para os compostos  $\beta$ -CD, IVER, MM e IVER- $\beta$ -CD.

Em relação ao perfil térmico das ciclodextrinas é relatado que as  $\alpha$ -CD e  $\gamma$ -CD anidras mostram picos exotérmicos a  $152\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $167\text{ }^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. A  $\alpha$ -CD e  $\beta$ -CD hidratadas mostram picos endotérmicos largos, representando uma perda de água correspondente as moléculas de água de hidratação. As  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CDs comportam-se similarmente dando picos indiferenciados, os quais se iniciam a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. Para a  $\alpha$ -CD são observados três picos endotérmicos que presumivelmente refletem a água hidratada e adsorvida as quais possuem diferentes energias. Estes picos aparecem a  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $106\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $129\text{ }^{\circ}\text{C}$ .<sup>47,55</sup>

A curva TG para a  $\beta$ -CD apresenta uma perda de 14,8% em massa, na faixa de  $30\text{--}110\text{ }^{\circ}\text{C}$ , atribuída à saída das moléculas de água que se encontram presentes na cavidade e nos espaços intersticiais da  $\beta$ -CD. A  $\beta$ -CD segue estável até  $\sim 260^{\circ}\text{C}$ , quando ocorre a sua fusão acompanhada de decomposição entre  $270\text{--}350\text{ }^{\circ}\text{C}$ .<sup>112,113</sup> A partir de  $350\text{ }^{\circ}\text{C}$  seguem sucessivos eventos de decomposição até  $640\text{ }^{\circ}\text{C}$ , com a completa calcinação do composto.<sup>114</sup> Na curva DTA, observa-se um pico endotérmico com  $T_{\text{máx}}$  a  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ , atribuído a desidratação. Um segundo pico endotérmico entre  $250\text{ a }380\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $T_{\text{máx}} \approx 340\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), atribuído à decomposição e fusão da

$\beta$ -CD.<sup>115</sup> Após esse evento, foram observadas sucessivas etapas de decomposição, a calcinação é finalizada, quando não se observa variação de massa ou de potência térmica.<sup>112</sup>



**Figura 22.** Curvas de TG (A); DTG (B) e DTA (C) da  $\beta$ -CD, IVER, MM e IVER- $\beta$ -CD, em N<sub>2</sub>.

**Tabela 8.** Tabela com os principais eventos térmicos atribuídos para a  $\beta$ -CD, IVER, sua mistura mecânica e o complexo IVER- $\beta$ -CD.

Composto	TG/DTG					DTA			
	Eventos			$\Delta m$ (%)	Atribuição	Eventos			Atribuição
	$T_i$	$T_f$	$T_{m\acute{a}x}$			$T_i$	$T_f$	$T_{m\acute{a}x}$	
$\beta$ -CD	30	110	87,1	14,8	Perda de moléculas de água.	30	135	93	Processo endotérmico de desidratação.
	262	350	331	72,7	Decomposição.	252	382	340	Processos endotérmicos de fusão e decomposição em sucessivas etapas da $\beta$ -CD.
	350	640	460	12,5		384	640	555	
IVER	145	168	157	5,2	Volatilização de solventes residuais de síntese, geralmente dimetilformamida e etanol.	140	189	164	Pico endotérmico discreto atribuído a volatilização de solventes e fusão da IVER.
	193	280	220	10,6	Estágios múltiplos de decomposição.	192	250	219	Processos endotérmicos de decomposição da IVER em etapas sucessivas (cristalização, carbonização).
	280	330	316	48,3		250	335	319	
	330	427	370	24,5		335	683	625	
	427	647	538	11,4		-	-	-	
MM	30	93	82	6,0	Perda de moléculas de água.	30	128	87	Processo endotérmico de desidratação.
	153	173	160	2,5	Volatilização de solventes	140	198	165	Processo endotérmico atribuído a volatilização de solventes e fusão da IVER.
	247	320	311	35	Decomposição da mistura mecânica.	224	322	304	Processo endotérmico de decomposição da IVER e início de decomposição da $\beta$ -CD.
	320	449	332	40,2		322	351	332	Processos endotérmicos de decomposição das moléculas de IVER e de $\beta$ -CD em etapas sucessivas.
	449	635	574	16,3		355	608	487	
	-	-	-	-		-	608	700	673
IVER - $\beta$ -CD	30	93	73	9,5	Perda de moléculas de água.	30	129	78	Processo endotérmico de desidratação.
	232	310	289	29,1	Estágios múltiplos de decomposição do complexo.	221	300	284	Processos endotérmicos atribuídos a decomposição do complexo.
	310	352	327	37,2		300	389	339	
	352	698	433	18,8		382	700	668	
	Residual de 5,4%								

Legenda:  $T_i$  - temperatura inicial do evento,  $T_f$  - temperatura final do evento,  $T_{m\acute{a}x}$  - temperatura onde há a máxima perda de massa (DTG) ou máximo fluxo de calor (DTA).



Nas curvas TGA/DTG da IVER foi observado um evento de perda de massa ( $\Delta m = 5,2\%$ ) entre 145-168 °C, atribuído a dessolvatação de solventes residuais de síntese, geralmente etanol e dimetilformamida (78 °C e 164 °C).<sup>116</sup> Em seguida, foi observado outro evento de perda de massa entre 193 °C a 280 °C, atribuído ao início da decomposição da amostra. Após este evento, sucessivas perdas de massa foram observadas até a sua completa decomposição. Na curva de DTA da IVER, foi observado um primeiro evento endotérmico entre 140 °C a 189 °C, com máxima temperatura em 164 °C, atribuído à dessolvatação de solventes residuais que ocorre juntamente com o evento relacionado a fusão (150-160 °C). Em seguida, outro evento endotérmico foi observado entre 192-250 °C ( $T_{\text{máx}} \approx 219$  °C), atribuído ao início da decomposição. Outros eventos endotérmicos foram ainda observados (ver **Tabela 8** acima) e atribuídos às sucessivas etapas de decomposição da molécula.

Nas curvas TGA/DTG e DTA da MM, foram observados os eventos de desidratação, atribuídos a  $\beta$ -CD, e a volatilização dos solventes residuais<sup>116</sup> da IVER, bem como o pico endotérmico com máximo a 165 °C atribuído a dessolvatação seguida de fusão da IVER. Na MM, os compostos são estáveis até a temperatura de 247 °C quando então inicia-se sucessivas etapas de decomposição das moléculas. O primeiro evento de decomposição na MM ocorreu a uma temperatura maior que na molécula de IVER livre. Isso pode ser atribuído a solubilização da  $\beta$ -CD pela IVER após a sua fusão, o que leva a formação de interações intermoleculares entre as mesmas e consequentemente mudanças no perfil térmico da MM.

Nas curvas TGA/DTG e DTA do complexo IVER- $\beta$ -CD, quatro observações importantes foram identificadas, sendo elas:

- 1) A faixa de temperatura de desidratação da  $\beta$ -CD é menor no complexo comparado com a ciclodextrina pura, indicando interações mais fracas com as moléculas de água presentes em virtude da complexação.
- 2) Na curva de DTA o primeiro evento endotérmico que ocorre entre 140-189 °C, atribuído à dessolvatação da IVER não foi observado no complexo, mostrando que o processo de síntese remove resíduos de solvente.
- 3) Tanto na MM quanto no composto de inclusão, a  $\beta$ -CD inicia sua decomposição a uma temperatura mais baixa, em virtude das novas interações formadas.
- 4) Na curva TGA, a perda de massa, atribuída ao evento de decomposição da IVER que ocorre entre 192-280 °C não foi observado no complexo, mostrando um perfil térmico diferente da substância livre e sugerindo aumento da estabilidade térmica do composto.

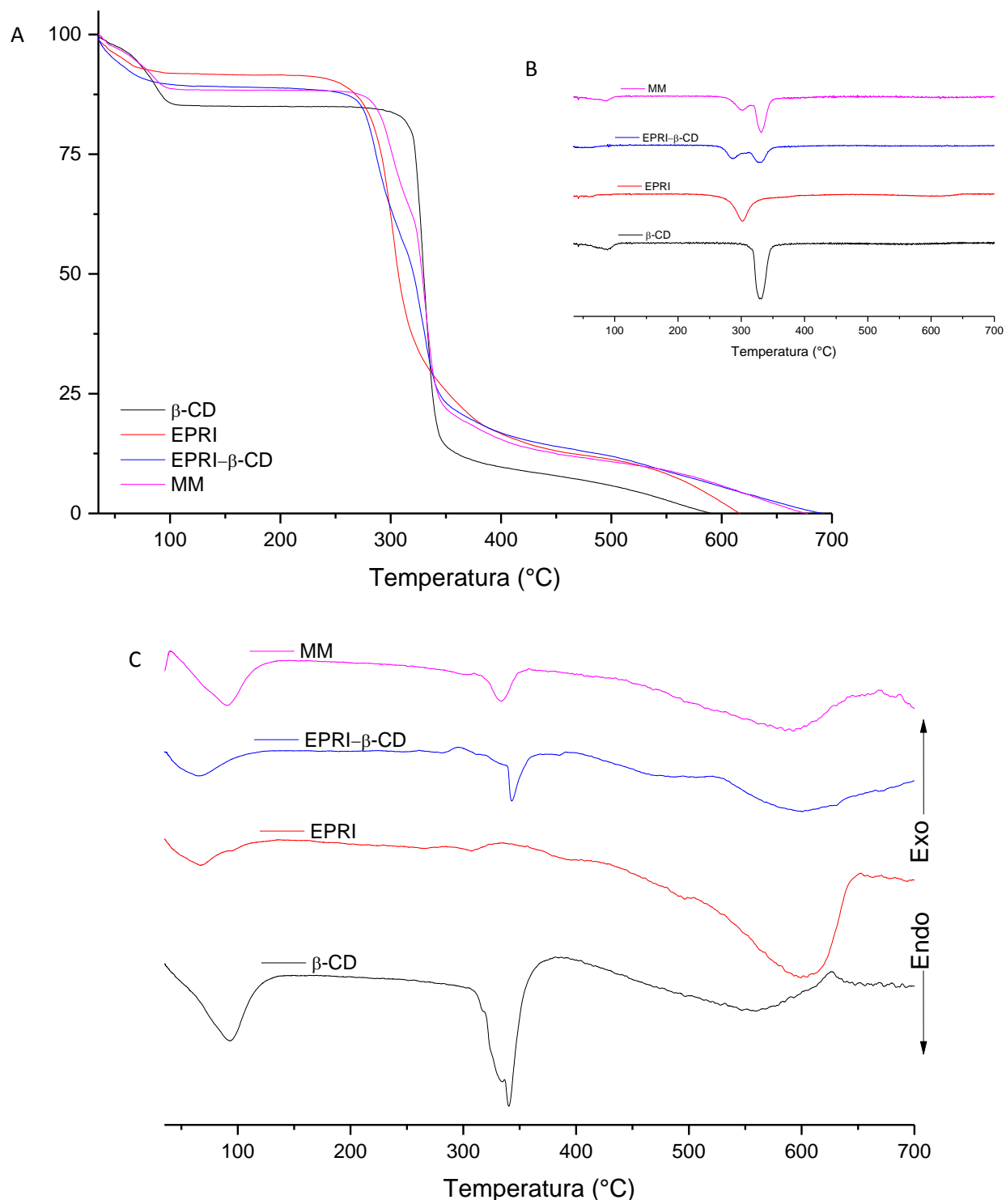
Na **Figura 23** (A, B e C) estão apresentadas as curvas de TGA/DTG e DTA para os compostos  $\beta$ -CD, EPRI, MM e EPRI- $\beta$ -CD enquanto que na **Tabela 9** está apresentado o resumo dos principais eventos térmicos.

Nas curvas de TGA/DTG e DTA da EPRI foi observado um perfil de decomposição em sucessivas etapas (ver **Tabela 9**). A desidratação da amostra ocorre até a temperatura de 95 °C. O primeiro evento de decomposição ocorre entre 227-341 °C, sendo ele responsável pela maior perda de massa da EPRI ( $\Delta_m = 63,1\%$ ).

Nas curvas TGA/DTG da MM, a primeira perda de massa, entre 30-106°C ( $T_{m\acute{a}x} \approx 71,3$  °C), é associada a desidratação, sendo muito próxima aquela observada para desidratação da  $\beta$ -CD livre. A MM permaneceu estável até a temperatura de 270 °C. Esse aumento na temperatura de início do primeiro evento de decomposição em relação a de EPRI livre indica a interação entre os compostos durante a decomposição.

Em relação a EPRI- $\beta$ -CD, o evento de desidratação foi observado entre 30-95,5 °C ( $T_{m\acute{a}x} \approx 61$  °C), uma faixa de temperatura bem inferior a observada na  $\beta$ -CD livre, mas próxima a observada na EPRI livre. Ainda no complexo, a interação entre EPRI e a  $\beta$ -CD fez com que a decomposição da EPRI- $\beta$ -CD ocorresse a uma temperatura intermediária à observada para as espécies livres, inferior à observada para a  $\beta$ -CD livre e superior a observada para o composto puro.<sup>63</sup>

Destacamos ainda que em nenhum dos casos ocorre a sobreposição das curvas TGA/DTG e DTA das MM's e dos complexos de inclusão, indicando que existe diferenças significativas em relação às interações intermoleculares estabelecidas nas nanocomposições quando comparadas a mistura física. Todas as alterações observadas tanto nos experimentos de IV quanto nos experimentos térmicos indicam a interação entre os compostos no estado sólido, sugerindo a formação dos complexos.



**Figura 23.** Curvas de TG (A); DTG (B) e DTA (C) da  $\beta$ -CD, EPRI, MM e EPRI- $\beta$ -CD, em  $\text{N}_2$ .

**Tabela 9.** Tabela com os principais eventos térmicos atribuídos para a  $\beta$ -CD, EPRI, sua mistura mecânica e o complexo EPRI- $\beta$ -CD.

Composto	TG/DTG					DTA			
	Eventos			$\Delta m$ (%)	Atribuição	Eventos			Atribuição
	$T_i$	$T_f$	$T_{m\acute{a}x}$			$T_i$	$T_f$	$T_{m\acute{a}x}$	
$\beta$ -CD	30	110	87,1	14,8	Perda de moléculas de água.	30	135	93	Processo endotérmico de desidratação.
	262	350	331	72,7	Decomposição.	252	382	340	Processos endotérmicos de decomposição e fusão com pico característico atribuído a fusão da molécula de $\beta$ -CD.
	350	640	460	12,5		384	640	555	
EPRI	30	95	68	8,1	Perda de moléculas de água.	30	136	67,5	Processo endotérmico de desidratação.
	227	341	301	63,1	Estágios múltiplos de decomposição.	145	333	307	Processos endotérmicos atribuídos a fusão e etapas de decomposição.
	341	400	367	12,0		333	656	599	
	400	614	601	16,8		-	-	-	
MM	30	106	71,3	11,7	Perda de moléculas de água.	30	141	89	Processo endotérmico de desidratação.
	270	323	305	16,0	Decomposição da EPRI e início decomposição da $\beta$ -CD.	145	310	302	Processo endotérmico atribuído a fusão/decomposição EPRI.
	325	353	330	52	Decomposição da mistura mecânica.	310	359	334	Processos endotérmicos associados a fusão da molécula de $\beta$ -CD seguido de decomposição da mistura mecânica.
	353	669	502	20,3		359	671	590	
EPRI - $\beta$ -CD	30	95,5	61	10,6	Perda de moléculas de água.	30	125	65	Processo endotérmico de desidratação.
	252	315	291	33,9	Estágios múltiplos de decomposição do complexo.	229	261	246,5	Processo endotérmico de decomposição do complexo.
	315	350	334	32,6		261	295	280	
	350	687	530	22,6		295	391	343	Pico endotérmico associado a fusão das moléculas de $\beta$ -CD.
	-	-	-	-	-	391	522	471	Processos endotérmicos associados a sucessivas etapas de decomposição do complexo (cristalização, carbonização).

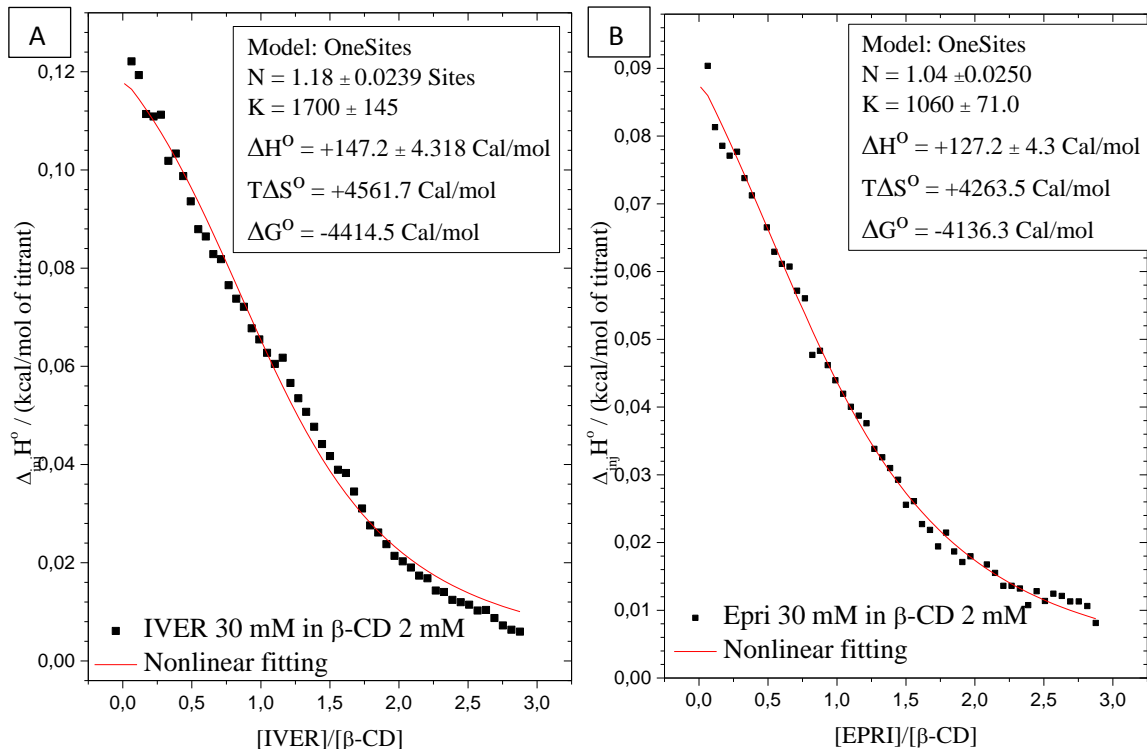
Legenda:  $T_i$  - temperatura inicial do evento,  $T_f$  - temperatura final do evento,  $T_{m\acute{a}x}$  - temperatura onde há a máxima perda de massa (DTG) ou máximo fluxo de calor (DTA).

## 4.2.2. Análises em Solução/Suspensão

### 4.2.2.1. Titulação Calorimétrica isotérmica (ITC)

A técnica de titulação calorimétrica isotérmica (ITC) que baseia-se na medição do calor liberado ou absorvido durante a interação entre duas moléculas tem sido amplamente utilizada na determinação de vários processos moleculares em solução. Ela é potencialmente valiosa na caracterização de complexos de inclusão por permitir a determinação da estequiometria de complexação (N), da constante de associação (K) e da variação de entalpia ( $\Delta H$ ). Além disso, os parâmetros como entropia ( $\Delta S$ ) e energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) do processo podem ser calculados a partir do emprego de equações termodinâmicas e dos dados obtidos no experimento de ITC.<sup>43,57,117-122</sup>

Na **Figura 24** estão apresentadas as curvas de titulação da IVER (A) e da EPRI (B) em  $\beta$ -CD após a subtração da curva de diluição.<sup>43</sup> Na **Tabela 10** estão apresentados os valores termodinâmicos de interação das avermectinas com a  $\beta$ -CD.



**Figura 24.** Titulação calorimétrica da IVER (A) e da EPRI (B) a 30 mM em DMSO: H<sub>2</sub>O (90 :10) em solução de  $\beta$ -CD 2 mM em DMSO: H<sub>2</sub>O (90 : 10): curva final após subtração da curva de titulação do solvente.

**Tabela 10.** Parâmetros termodinâmicos de interação da ivermectina e eprinomectina com a  $\beta$ -CD, onde  $T\Delta S$  (Termo entrópico da interação) a 298,15 K.

Composto	N	K	$\Delta G^\circ$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H^\circ$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )	$T\Delta S^\circ$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )
IVER- $\beta$ -CD	1,18 $\pm$ 0,02	1700 $\pm$ 145	-18,470	0,616 $\pm$ 0,02	19,086
EPRI- $\beta$ -CD	1,04 $\pm$ 0,03	1060 $\pm$ 71	-17,306	0,532 $\pm$ 0,02	17,838

Nos dois sistemas, o valor de N é aproximadamente igual a 1, demonstrando que a estequiometria mais favorável para os sistemas foi 1:1. Isso era de se esperar pelo fato de que as moléculas são muito semelhantes. Em ambos os casos os processos de complexação foram espontâneos ( $\Delta G^\circ < 0$ ), endotérmicos ( $\Delta H^\circ > 0$ ) e favorecidos pela entropia ( $T\Delta S^\circ > 0$ ). Valores positivos de entalpia sugerem quebra de ligações em agregados moleculares ou estruturas de solvatação. Os valores positivos para a componente entrópica foram atribuídos à ocorrência de interações de natureza hidrofóbica, ou seja, na dessolvatação dos precursores com concomitante ganho de graus de liberdade rotacional e translacional por parte das moléculas dessolvatadas.<sup>120,123</sup>

Em relação às constantes de equilíbrio, os valores obtidos foram da mesma ordem de grandeza para as duas espécies ( $10^3$ ), corroborando a hipótese de que as interações nos dois sistemas são semelhantes devido à similaridade estrutural dos compostos. Valores de constante de afinidade desta magnitude são considerados moderados se comparados com outros sistemas e similares ao encontrado na literatura para compostos de inclusão.<sup>121-124</sup> Todavia, o maior valor de K obtido para o complexo IVER- $\beta$ -CD, indica uma maior interação da  $\beta$ -CD com esta molécula. Essa diferença entre os dois sistemas pode estar relacionada à ausência da ligação dupla e do grupo acetilamino na molécula de IVER. Tal diferença pode contribuir para uma maior hidrofobicidade da IVER em relação a molécula de EPRI, favorecendo uma maior afinidade com a  $\beta$ -CD em solução.

Esses dados indicam que a estequiometria 1:1 foi a mais favorecida o que justificou a preparação dos complexos com esta estequiometria. Além disso os parâmetros termodinâmicos obtidos são compatíveis com de outros complexos de inclusão relacionados na literatura.<sup>43,101,125</sup>

#### 4.2.2.1. Espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma poderosa ferramenta utilizada na caracterização estrutural de moléculas, tanto em solução, quanto no estado sólido. Esta técnica é capaz de fornecer parâmetros relacionados à disposição espacial de grupos funcionais de moléculas ou complexos, bem como dados relativos à dinâmica molecular.<sup>43,63,126</sup>

Na formação de um complexo entre a ciclodextrina e a molécula hóspede, várias interações intermoleculares são estabelecidas de modo a definir a topologia dos complexos e, conseqüentemente, a estabilidade. Dentre as forças intermoleculares usualmente envolvidas, as de curta distância como dipolo induzido, dipolo-dipolo, íon-dipolo e ligações de hidrogênio; que por sua vez são baseadas em interações de campos eletromagnéticos (provenientes dos núcleos e dos elétrons), são consideradas as maiores responsáveis pela estabilidade dos complexos de inclusão.

O estabelecimento dessas interações leva a mudanças na distribuição eletrônica sobre os núcleos dos grupos funcionais envolvidos e, conseqüentemente, altera o momento magnético nuclear resultante sobre estes núcleos. Isto é refletido no espectro de RMN como uma variação do deslocamento químico, alteração no perfil do sinal ou nas suas intensidades.<sup>63,126</sup> Além disso, interações intermoleculares são conhecidas por causarem aproximações entre grupos funcionais de moléculas. Tal aproximação produz uma transferência de energia eletromagnética entre os núcleos envolvidos de tal forma que, quando esses núcleos se encontram a uma distância de até 5 Å no espaço, podem ser detectadas pela técnica de RMN conhecida por ROESY (*Rotating frame Overhauser Enhancement Spectroscopy*).

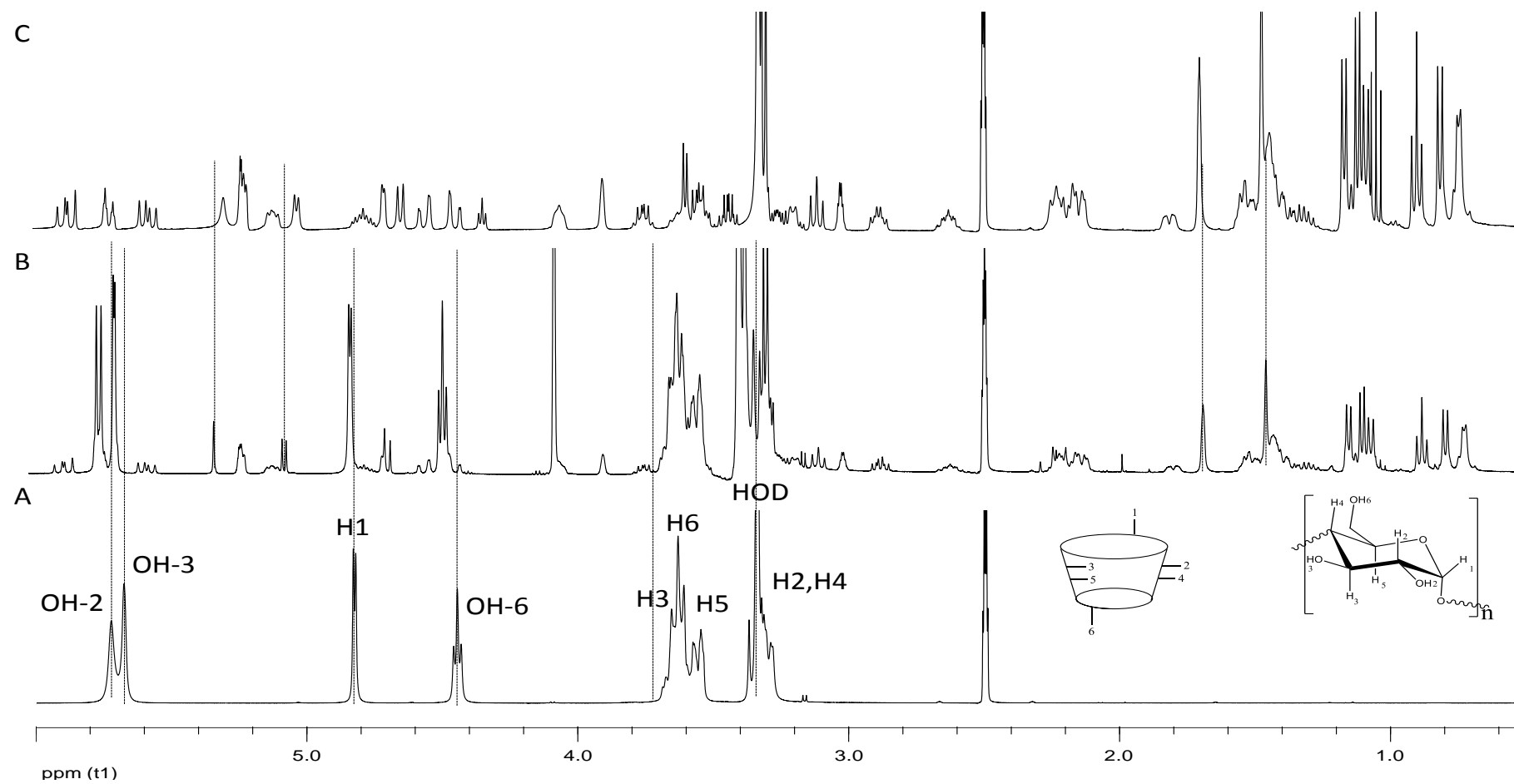
Nas **Figuras 25 e 26** estão apresentados os espectros de RMN de <sup>1</sup>H da β-CD, IVER e do complexo IVER-β-CD e da β-CD, EPRI e do complexo EPRI-β-CD, respectivamente.

Em função da complexidade estrutural das moléculas de IVER e EPRI, a atribuição dos sinais de RMN de <sup>1</sup>H das moléculas livres e nos complexos foram realizadas com base na análise conjunta de espectros uni- (RMN de <sup>1</sup>H) e bidimensional (ROESY) e dados da literatura.<sup>85,127,128</sup> Os valores de deslocamentos químicos assim como as atribuições dos sinais são apresentados nas **Tabelas 11 e 12**. Todos os sinais de hidrogênios atribuídos apresentaram valores de deslocamentos químicos condizentes com a estrutura química das moléculas.

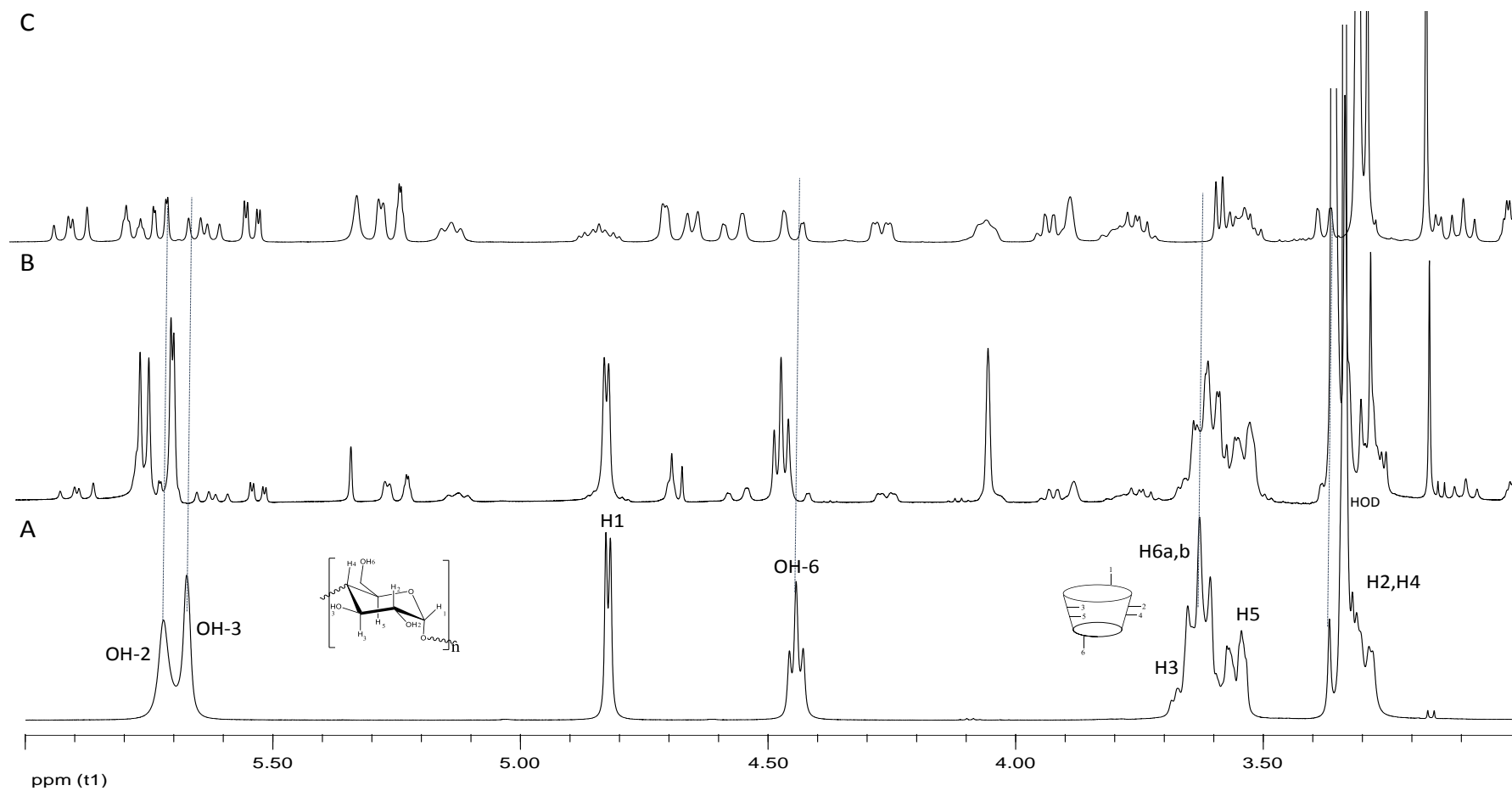
No espectro de RMN de <sup>1</sup>H da β-CD obtido em DMSO-d<sub>6</sub> a 400 MHz (**Figuras 25A** ou **26A**) todos os sinais referentes aos hidrogênios foram observados e estão de acordo com dados da literatura<sup>126</sup> A β-CD, sendo um oligômero simétrico de 7 unidades idênticas,

apresentou sinais referentes aos hidrogênios 1-6 como se fosse de um monômero glicopiranosídico. O hidrogênio 1 apresenta um dubleto em  $\delta = 4,82$ . Os sinais para os hidrogênios 3, 5 e 6 apresentaram-se sobrepostos na região entre  $\delta \approx 3,54$  a 3,68. Os sinais para os hidrogênios 2 e 4 apresentaram-se sobrepostos na região entre  $\delta \approx 3,29$  a 3,36. Em relação aos hidrogênios das hidroxilas, observa-se dois singletos em  $\delta = 5,67$  e 5,72 e um tripleto em  $\delta = 4,46$  referentes aos hidrogênios ligados aos oxigênios dos carbonos 2, 3 e 6, respectivamente.

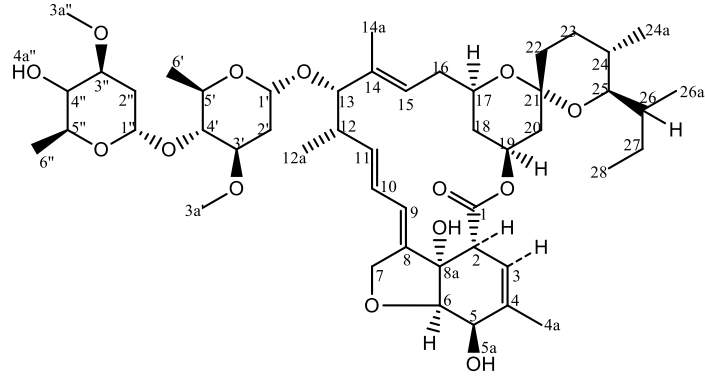




**Figura 25.** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de  $\beta\text{-CD}$  (A), IVER- $\beta\text{-CD}$  (B) e IVER (C) em  $\text{DMSO-d}_6$ , 400 MHz.

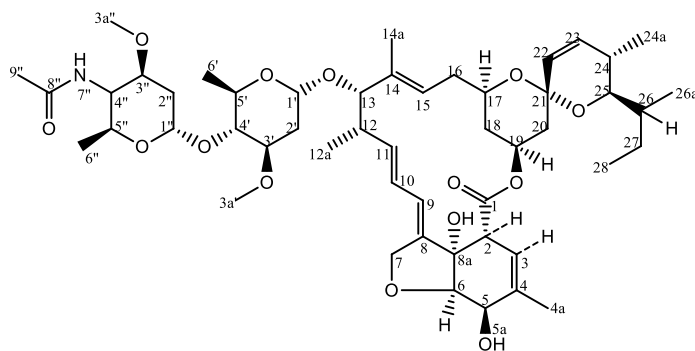


**Figura 26.** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de  $\beta$ -CD (A), EPRI- $\beta$ -CD (B) e EPRI (C) em  $\text{DMSO-d}_6$ , 400 MHz.



**Tabela 11.** Atribuições e deslocamentos químicos de hidrogênio da ivermectina livre e de IVER- $\beta$ -CD.

Atribuições		IVER ( $\delta$ em ppm)	IVER- $\beta$ -CD ( $\delta$ em ppm)	$\Delta\delta$ ( $\delta$ complexo - $\delta$ livre)
2	—CH	3,03 (q, J= 2,4 Hz)	3,02 (ap q, J= 2,4 Hz)	-0,01
3	—CH	5,30, s	5,32, s	0,02
4a	—CH <sub>3</sub>	1,71, s	1,70, s	-0,01
5	—CH	4,34 (t, J= 5,1 Hz)	4,0-3,98, m	-
5a	—OH	2,26-2,13, m	2,26-2,12, m	-
6	—CH	5,03, d (J= 6,0 Hz)	5,06 (d, J= 6,0 Hz)	0,03
7	—CH <sub>2</sub>	4,56 (dd, J= 14,2; 2,0 Hz)	4,55 (dd, J=14,8; 2,0 Hz)	-0,01
		4,45 (dd, J=14,6; 2,0 Hz)	4,44 (dd, J=14,8 e 2,0 Hz)	-0,01
8a	—OH	4,06, s	4,08, s	0,02
9	—CH	5,72 (dt, J=11,6; 2,0; 1,6 Hz)	5,75-5,68, m	-
10	—CH	5,88 (dd, J=15,0; 11,6 Hz)	5,87 (dd, J=14,8; 11,6 Hz)	-0,01
11	—CH	5,58 (dd, J=15,0; 9,6 Hz)	5,57 (dd, J= 14,8; 9,6 Hz)	-0,01
12	—CH	2,63, m	2,62, m	-
12a	—CH <sub>3</sub>	1,09 (d, J= 7,0 Hz)	1,08 (d, J= 7,0 Hz)	-0,01
13	—CH	3,90, s largo	3,90, s largo	-
14a	—CH <sub>3</sub>	1,48, s	1,47, s	-0,01
15	—CH	5,12 (ap t, J= 6,0 Hz)	5,11 (ap t, J= 8,0 Hz)	-0,01
16	—CH <sub>2</sub>	2,26-2,13, m	2,26-2,12, m	-
17	—CH	3,79-3,72, m	3,78-3,71, m	-
18	—CH <sub>2</sub>	1,56-1,50, m	1,56-1,48	-
		0,77-0,71, m obs	0,76-0,70, m obs	-
19	—CH	4,79, m	4,77, m	-
20	—CH <sub>2</sub>	2,26-2,13, m	2,26-2,12, m	-
		1,82 (dd, J= 12,2; 4,4 Hz)	1,80 (dd, J= 11,2; 4,4 Hz)	-0,02
22	—CH <sub>2</sub>	1,58-1,49, m	1,57-1,49, m	-
23	—CH <sub>2</sub>	1,45-1,36, m	1,45-1,39, m	-
24	—CH	2,26-2,13, m	2,26-2,12, m	-
24a	—CH <sub>3</sub>	0,75 (d, J= 5,2 Hz)	0,74 (d, J=5,2 Hz)	-0,01
25	—CH	3,66-3,51, m	3,68 (d, J=6,4 Hz)	-
26	—CH	1,45-1,36, m	1,56-1,48, m	-
26a	—CH <sub>3</sub>	0,82 (d, J= 6,4)	0,81 (d, J=6,8 Hz)	-0,01
27	—CH <sub>2</sub>	1,45-1,36, m	1,45-1,39, m	-
		1,31 (dd, J=14,0, 7,0 Hz)	1,30 (dd, J=14,0; 7,0 Hz)	-0,01
28	—CH <sub>3</sub>	0,90 (t, J= 7,5 Hz)	0,90 (t, J=7,5 Hz)	-
1'	—CH	5,22 (d, J= 4,0 Hz)	5,21 (d, J=1,2 Hz)	-0,01
2'	—CH <sub>2</sub>	1,45-1,36, m	1,45-1,39, m	-
3'	—CH	3,66-3,51, m	3,69-3,50, m obs	-
3a'	—OCH <sub>3</sub>	3,30, s	3,40-3,27, m	-
4'	—CH	3,11 (t, J= 9,0 Hz)	3,11 (t, J= 9,0 Hz)	-
5'	—CH	3,79-3,72, m	3,78-3,71, m	-
6'	—CH <sub>3</sub>	1,17 (d, J= 6,2 Hz)	1,17 (d, J=6,2 Hz)	-
1''	—CH	5,23 (d, J= 1,6 Hz)	5,23 (d, J= 1,6 Hz)	-
2''	—CH <sub>2</sub>	1,45-1,36, m	1,45-1,39, m	-
3''	—CH	3,66-3,51, m obs	3,69-3,50, m obs	-
3a''	—OCH <sub>3</sub>	3,32, s	3,40-3,27, m	-
4''	—CH	4,71 (d, J= 3,2 Hz)	4,70 (d, J=4,0 Hz)	-0,01
5''	—CH	4,65 (d, J=8,0 Hz)	4,68, s	0,03
6''	—CH <sub>3</sub>	1,12 (ap t, J= 6,2 Hz)	1,12 (d, J=6,2 Hz)	-
4a''	—OH	2,89 (dt, J=9,0; 5,5 Hz)	2,88 (dt, J=9,0; 6,0 Hz)	-0,01



**Tabela 12.** Atribuições e deslocamentos químicos de hidrogênio da eprinomectina livre e de EPRI- $\beta$ -CD.

Atribuições		EPRI ( $\delta$ em ppm)	EPRI- $\beta$ -CD ( $\delta$ em ppm)	$\Delta\delta$ ( $\delta$ complexo - $\delta$ livre)
2	—CH	3,03 (dd, J = 4,59, 2,31 Hz)	3,02 (dd, J = 4,48; 2,27 Hz)	-0,01
3	—CH	5,31, s	5,33, s	0,02
4a	—CH <sub>3</sub>	1,70, s	1,70, s	-
5	—CH	4,27 (dd, J = 10,41; 3,18 Hz)	4,27 (dd, J = 10,65; 3,46 Hz)	-
5a	—OH	2,26-2,15, m	2,27-2,14, m	-
6	—CH	3,94 (d, J = 7,5 Hz)	3,94 (d, J = 7,5 Hz)	-
7	—CH <sub>2</sub>	4,57 (dd, J = 14,63; 1,43 Hz) 4,45 (dd, J = 15,03; 1,02 Hz)	4,56 (dd, J = 14,57; 1,77 Hz) 4,50-4,41, m	-0,01 -
8a	—OH	4,06, s	4,07, s	0,01
9	—CH	5,75 (dt, J = 9,30; 2,06 Hz)	5,78-5,67, m	-
10	—CH	5,88 (dd, J = 14,84; 11,41 Hz)	5,88 (dd, J = 14,98; 11,47 Hz)	-
11	—CH	5,61 (dd, J = 14,88; 9,5 Hz)	5,61 (dd, J = 14,98; 9,64 Hz)	-
12	—CH	2,63 (ddd, J = 9,5; 7,0; 2,8 Hz)	2,68-2,57, m	-
12a	—CH <sub>3</sub>	1,09 (d, J = 7,0 Hz)	1,08 (d, J = 6,85 Hz)	-0,01
13	—CH	3,90, s	3,89, s	-0,01
14a	—CH <sub>3</sub>	1,48, s	1,47, s	-0,01
15	—CH	5,16-5,09, m	5,16-5,09, m	-
16	—CH <sub>2</sub>	2,26-2,15, m	2,27-2,14, m	-
17	—CH	3,82 (d, J = 8,50 Hz)	3,81 (dd, J = 8,51; 4,45 Hz)	-0,01
18	—CH <sub>2</sub>	1,87-1,72, m 0,84-0,72, m	1,87-1,71, m 0,84-0,70, m	- -
19	—CH	4,83 (ddd, J = 16,02; 11,35; 4,62 Hz)	4,88-4,77, m	-
20	—CH <sub>2</sub>	2,11 (dd, J = 11,85; 3,73 Hz) 1,52 (dd, J = 13,26; 7,41 Hz)	2,10 (dd, J = 12,60; 4,81 Hz) 1,52 (dd, J = 13,15; 7,60 Hz)	-0,01 -
22	—CH	5,70 (dd, J = 9,90, 1,52 Hz)	5,78-5,67, m	-
23	—CH	5,52 (dd, J = 9,88, 2,48 Hz)	5,52 (dd, J = 9,93; 2,50 Hz)	-
24	—CH	3,54 (dd, J = 8,26; 4,92 Hz)	3,70-3,49, m	-
24a	—CH <sub>3</sub>	0,86 (d, J = 5,25 Hz)	0,85 (d, J = 4,88 Hz)	-0,01
25	—CH	3,40 (d, J = 9,95 Hz)	3,40 (d, J = 1,34 Hz)	-
26	—CH	1,87-1,72, m	1,87-1,71, m	-
26a	—CH <sub>3</sub>	0,88 (d, J = 4,83 Hz)	0,87 (d, J = 4,47 Hz)	-0,01
27	—CH <sub>2</sub>	1,40 (dd, J = 13,82; 6,89 Hz) 1,31 (t, J = 11,48; 11,48 Hz)	1,40 (dd, J = 13,80; 7,10 Hz) 1,31 (t, J = 11,51; 11,51 Hz)	- -
28	—CH <sub>3</sub>	0,90 (t, J = 7,48; 7,48 Hz)	0,90 (t, J = 7,43; 7,43 Hz)	-
1'	—CH	5,26 (d, J = 3,65 Hz)	5,26 (d, J = 3,82 Hz)	-
2'	—CH <sub>2</sub>	3,17 (d, J = 4,33 Hz) 1,61 (dd, J = 13,98; 7,05 Hz)	3,16 (d, J = 5,25 Hz) 1,60 (dd, J = 14,14; 7,29 Hz)	-0,01 -0,01
3'	—CH	3,59 (dd, J = 10,81; 4,91 Hz)	3,70-3,49, m	-
3a'	—OCH <sub>3</sub>	3,31, s	3,30, s	-0,01
4'	—CH	3,12 (t, J = 8,91; 8,91 Hz)	3,11 (t, J = 8,99; 8,99 Hz)	-0,01
5'	—CH	3,76 (td, J = 15,49; 6,18; 6,18 Hz)	3,76 (dd, J = 9,37; 6,09 Hz)	-
6'	—CH <sub>3</sub>	1,18 (d, J = 6,20 Hz)	1,17 (d, J = 6,27 Hz)	-0,01
1''	—CH	5,23 (d, J = 1,50 Hz)	5,22 (d, J = 1,58 Hz)	-0,01
2''	—CH <sub>2</sub>	2,26-2,15, m 1,87-1,72, m	2,27-2,14, m 1,87-1,71, m	- -
3''	—CH	3,60 (d, J = 5,24 Hz)	3,70-3,50, m	-
3a''	—OCH <sub>3</sub>	3,19, s	3,19, s	-
4''	—CH	4,70 (d, J = 2,96 Hz)	4,70 (d, J = 2,14 Hz)	-
5''	—CH	4,65 (d, J = 8,32 Hz)	4,67, s	0,02
6''	—CH <sub>3</sub>	0,97 (d, J = 6,40 Hz)	0,96 (d, J = 6,41 Hz)	-0,01
7''	—NH	7,51 (d, J = 10,05 Hz)	7,54 (d, J = 10,05 Hz)	0,03
9''	—CH <sub>3</sub>	1,89, s	1,89, s	-

No estudo da complexação entre as avermectinas (IVER e EPRI) e a  $\beta$ -CD por RMN, foram avaliados inicialmente os deslocamentos dos sinais referentes aos hidrogênios da  $\beta$ -CD na forma livre e no complexo. Essa estratégia foi utilizada considerando a maior complexidade e a grande sobreposição de sinais observados nos espectros das avermectinas em relação aos sinais observados para a  $\beta$ -CD. Na **Tabela 13** estão apresentados os deslocamentos químicos atribuídos aos hidrogênios da  $\beta$ -CD livre e nos complexos IVER- $\beta$ -CD e EPRI- $\beta$ -CD

**Tabela 13.** Deslocamentos químicos de hidrogênios ( $\delta$ H ppm) da  $\beta$ -CD, na molécula livre e nos complexos IVER- $\beta$ -CD e EPRI- $\beta$ -CD obtidos em DMSO- $d_6$ , 400 MHz, e a variação do deslocamento ( $\Delta\delta$ ) dos sinais de  $^1$ H da  $\beta$ -CD nos respectivos complexos.

Atribuições		$\beta$ -CD ( $\delta$ ppm)	COMPLEXO ( $\delta$ ppm)			
			IVER- $\beta$ -CD	$\Delta\delta$	EPRI- $\beta$ -CD	$\Delta\delta$
1	—CH	4,82 (d, J=3,2 Hz)	4,82 (d, J=3,6 Hz)	-	4,82 (d, J=3,5 Hz)	-
2	—CH	3,36-3,29, m	3,32-3,27, m	-	3,35-3,27, m	-
2a	—OH	5,72, s	5,74 (d, J=6,8 Hz)	0,02	5,74 (d, J= 6,9 Hz)	0,02
3	—CH	3,68-3,54, m	3,69-3,50, m	-	3,69-3,54, m	-
3a	—OH	5,67, s	5,69 (d, J=2,4 Hz)	0,02	5,69 (d, J= 2,4 Hz)	0,02
4	—CH	3,36-3,29, m	3,32-3,27, m	-	3,35-3,27, m	-
5	—CH	3,68-3,54, m	3,69-3,50, m	-	3,69-3,54, m	-
6	—CH <sub>2</sub>	3,68-3,54, m	3,69-3,50, m	-	3,69-3,54, m	-
6a	—OH	4,46 (t, J=5,2 Hz)	4,48 (t, J=5,6 Hz)	0,02	4,48 (t, J= 5,6 Hz)	0,02

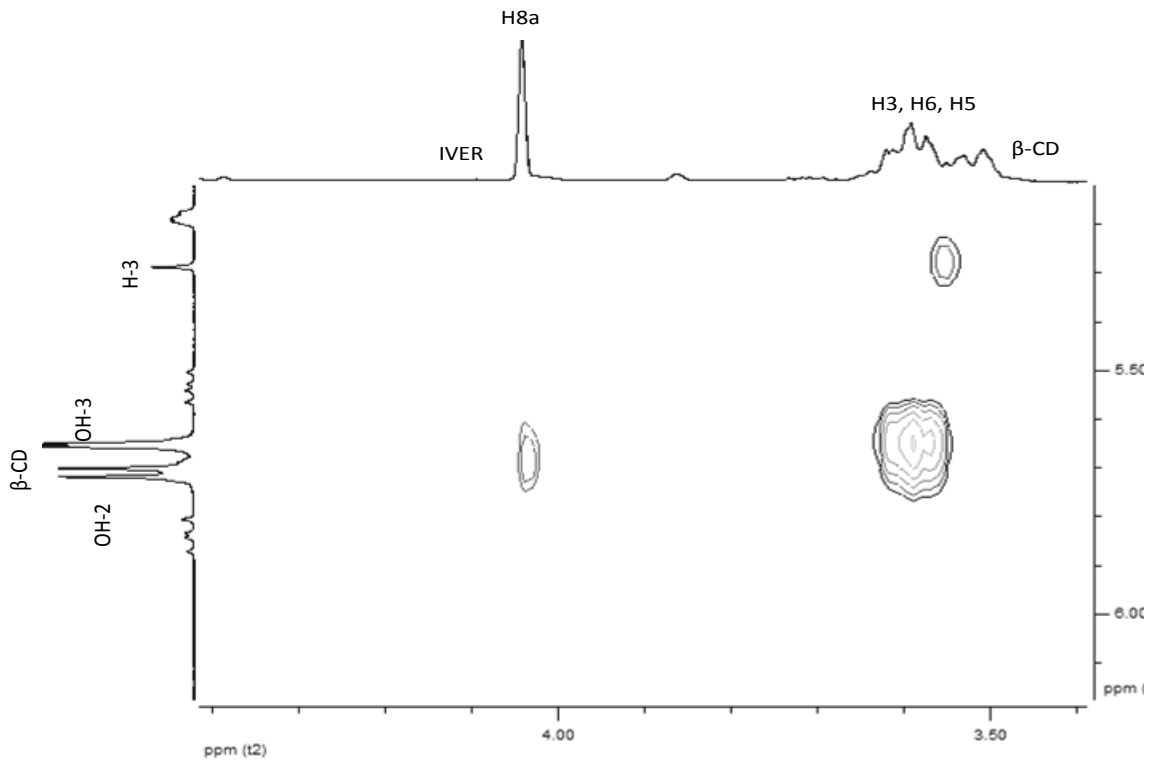
Multiplicidade do sinal: s - singlete d - dubleto t- tripleto m – multipleto. J – constante de acoplamento.

Nos espectros de RMN de  $^1$ H dos complexos foram observadas significativas variações no deslocamento químico dos hidrogênios OH-3 e OH-2 localizados na face externa da  $\beta$ -CD, e do hidrogênio OH-6 presente no lado mais estreito da cavidade da molécula. Os valores obtidos foram condizentes com os apresentados em outros estudos de complexação.<sup>129-132</sup> Em ambos os complexos, as variações nos deslocamentos químicos dos hidrogênios da  $\beta$ -CD ocorreram de forma similar, corroborando a hipótese de que a interações entre a  $\beta$ -CD e as avermectinas sejam semelhantes, conforme já citado anteriormente nos dados de ITC. Os deslocamentos observados, principalmente com as hidroxilas externas da  $\beta$ -CD, sugerem o estabelecimento de ligações de hidrogênio intermoleculares, confirmando a presença de associações supramoleculares.

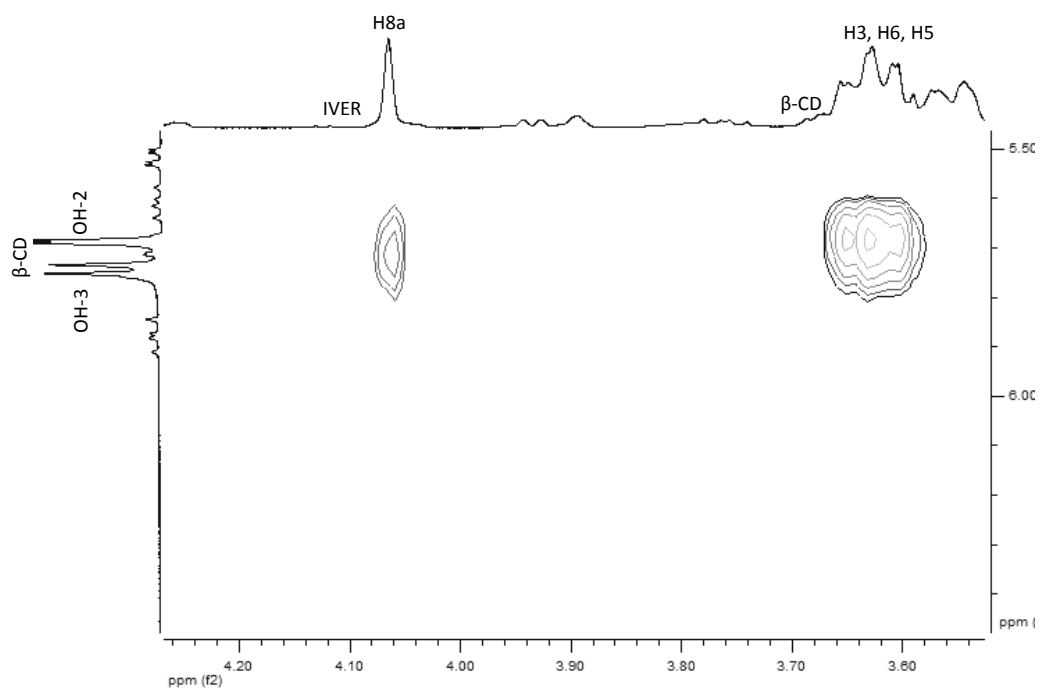
Não foi possível determinar a variação de deslocamento dos sinais referentes aos hidrogênios 3 e 5 da  $\beta$ -CD, devido à sobreposição desses sinais com sinais de hidrogênios das avermectinas. Esses sinais seriam importantes para confirmar a inclusão, pois esses hidrogênios se localizam na cavidade da  $\beta$ -CD. No entanto, com base na variação de deslocamento observada para vários hidrogênios das avermectinas nos complexos, principalmente de hidrogênios presentes no anel benzofurânico, sugerimos a possibilidade de ocorrer a inclusão

dessa parte da molécula à cavidade da ciclodextrina. Além disso, os grupos dissacarídeos presentes nas avermectinas possuem grande mobilidade rotacional, possibilitando a sua interação com a face externa da  $\beta$ -CD. Isso poderia explicar os deslocamentos dos sinais de hidrogênio nos complexos como um todo, pela inclusão e associação externa desses grupos com as hidroxilas da  $\beta$ -CD.

Nas **Figuras 27 e 28** estão apresentadas regiões selecionadas dos mapas de contorno de ROESY para IVER- $\beta$ -CD e EPRI- $\beta$ -CD. Foram identificadas correlações entre os hidrogênios OH-2 e OH-3 da  $\beta$ -CD e o hidrogênio 8a (OH) pertencente a IVER e a EPRI, confirmando a interação entre as moléculas, sugerindo novamente o estabelecimento de ligações de hidrogênio e a formação dos complexos supramoleculares. Outras correlações não puderam ser observadas devido a preexistência de fortes correlações nas moléculas livres na mesma região onde deveriam aparecer às correlações provenientes da complexação.

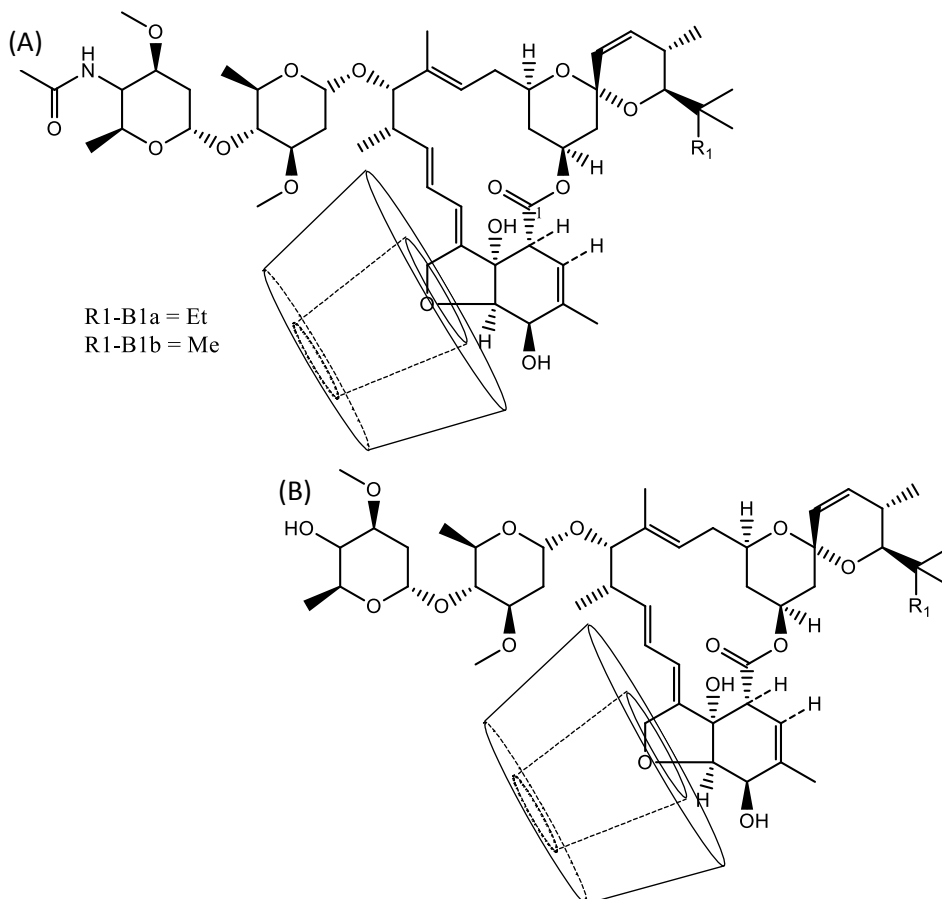


**Figura 27.** Região selecionada do mapa de contorno ROESY de IVER- $\beta$ -CD em DMSO- $d_6$ , 400 MHz.



**Figura 28.** Região selecionada do mapa de contorno ROESY de EPRI- $\beta$ -CD em DMSO- $d_6$ , 400 MHz.

Considerando as informações obtidas neste experimento, apresentamos na **Figura 29**, as propostas de inclusão para os dois sistemas.

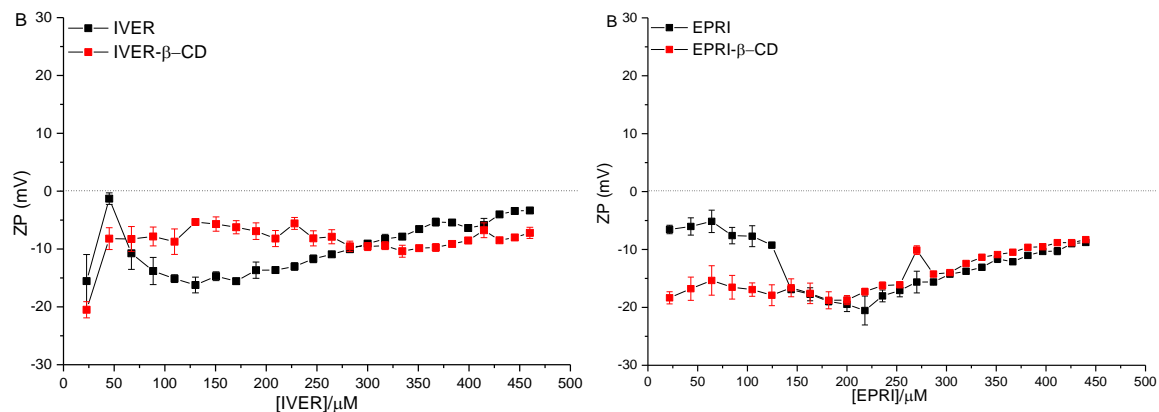


**Figura 29.** Proposta de interações das moléculas de EPRI (A) e IVER (B) com a  $\beta$ -CD.

#### 4.2.2.2. Análise por Fotometria de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Potencial Zeta (ZP)

A carga líquida na superfície de partículas em suspensão afeta a distribuição de íons na sua vizinhança formando uma dupla camada elétrica na interface da partícula com o líquido, em presença de um campo elétrico aplicado, os íons e partículas mais fortemente ligados a superfície da partícula se movem como uma unidade, e o potencial no plano de cisalhamento entre essa unidade e o meio circulante é conhecido como Potencial Zeta ( $\zeta$ ).

Na **Figura 30** estão apresentados os gráficos de potencial zeta (PZ) em função da concentração crescente de IVER (A) e de EPRI (B) livres e complexados com  $\beta$ -CD.



**Figura 30.** Distribuição de valores de potencial zeta em função da concentração de IVER (A) e EPRI (B) e seus respectivos complexos  $\beta$ -CD. Temperatura: 25 °C, ângulo de espalhamento: 173 °, DDP: 40 V

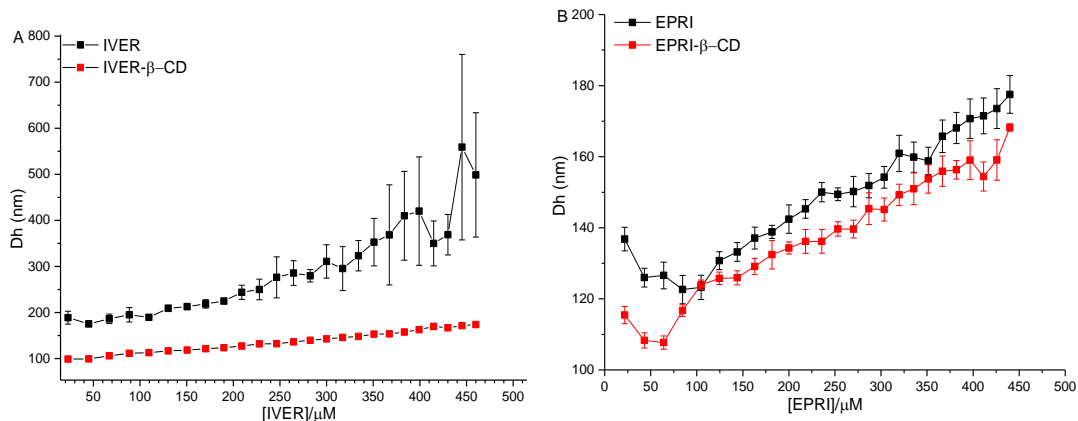
No estudo de nanocompostos em suspensão, a avaliação do Potencial Zeta é especialmente importante para a determinação da estabilidade coloidal. Valores altos de PZ refletem uma alta concentração de carga na superfície e, conseqüentemente, maior repulsão entre as partículas e menor tendência de coalescência. Além disso, quando a intensidade das forças repulsivas é maior do que a intensidade da força gravitacional sobre as partículas, elas se mantêm estáveis. Na prática, isso é observado quando os valores de ZP são superiores  $\pm 30$  mV.<sup>109</sup>

A partir dos gráficos de PZ (**Figura 30**), os valores médios de PZ para a IVER foram observados entre -5 a -16 para o composto puro e valores entre -5 a -10 mV para o complexo, e para a EPRI os valores de PZ foram de -6 a -20 mV para o composto puro e de -8 a 18 mV para o complexo. Esses baixos valores de PZ evidenciam a tendência de ambos os sistemas para a agregação. Isso era de certo modo esperado, já que os compostos apresentaram baixíssima solubilidade no ambiente aquoso.



A determinação do tamanho das partículas é essencial para entendermos o comportamento coloidal de compostos pouco solúveis em água. A análise por espalhamento dinâmico de luz (DLS, do inglês, *dynamic light scattering*) é uma técnica capaz de determinar o tamanho de partículas em coloide, baseando-se na relação entre o tamanho da partícula e sua velocidade devido ao seu movimento browniano, utilizando a relação de Stokes-Einstein.<sup>43</sup> O diâmetro hidrodinâmico ( $D_h$ ) da partícula em suspensão é o parâmetro físico-químico obtido por esse experimento. No presente trabalho, as medidas de  $D_h$  foram realizadas com o objetivo de avaliar o tamanho das nanoestruturas e a formação de nanoprecipitados hidrofóbicos quando as moléculas na forma livre ou em complexo dissolvidas em DMSO são diluídas em água.

Na **Figura 31** estão apresentados os gráficos com os valores de  $D_h$  em função da concentração de IVER (A) e de EPRI (B) e seus respectivos complexos com  $\beta$ -CD.



**Figura 31.** Distribuição de tamanho de partículas em suspensão em função da concentração de IVER (A) e de EPRI (B) e seus respectivos complexos com  $\beta$ -CD. Temperatura: 25 °C, ângulo de espalhamento: 90 °.

A partir dos gráficos de  $D_h$  versus concentração de avermectina livre ou complexada, pode-se observar menores valores de tamanho de partícula para as nanocomposições (IVER/ $\beta$ CD – 97 a 170 nm e EPRI/ $\beta$ CD – 115 a 170 nm) em comparação com as avermectinas livres (IVER – 185 a 500 nm e EPRI – 140 a 180 nm). Isto se dá pelo fato de que os nanoprecipitados formados por compostos de inclusão apresentam maior capacidade de interagirem com a água do que os compostos puros, devido à presença das hidroxilas das ciclodextrinas. Esta maior afinidade com o solvente contribui para uma menor tendência de coalescência, agregação e crescimento de partícula.<sup>133</sup>

Para ambos os sistemas, foi observado também que com a complexação ocorre uma menor taxa de variação do  $D_h$  com a concentração de avermectina, sugerindo um aumento da estabilidade coloidal com a inclusão. Contudo, a variação do tamanho de partículas da EPRI livre foi muito menor com o aumento da concentração, fazendo com que a variação de tamanho

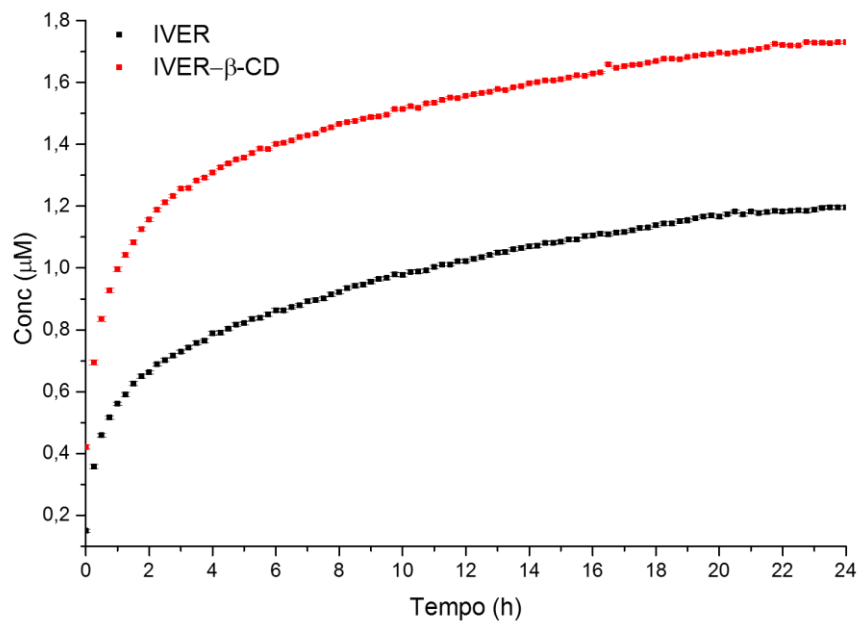
do complexo não seja tão significativa. Além disso, a solubilidade da IVER é menor do que a EPRI (ver sessão 4.1 – *Solubilidade*) o que pode estar associado a formação de agregados moleculares com menores tamanho de partículas.

Em todos os sistemas (IVER, IVER- $\beta$ -CD, EPRI e EPRI- $\beta$ -CD) o aumento da concentração dos compostos em suspensão leva a um aumento no valor de  $D_h$ . Isso acontece em virtude da redução gradativa da solubilidade dos compostos com o aumento da concentração.

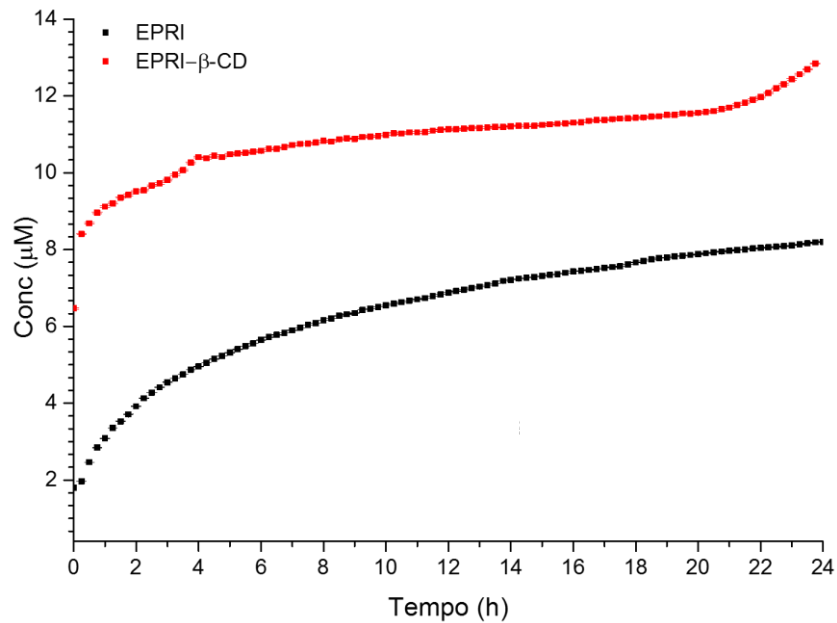
No geral, valores entre 50 e 300 nm são encontrados para nanopartículas utilizadas na área farmacêutica.<sup>138; 139; 140; 141</sup> O efeito da redução de tamanho na presença de  $\beta$ -CD reflete no aumento da área superficial da partícula e maior exposição de átomos na superfície possibilitando uma maior diversidade de interações e adesão a estruturas biológicas.<sup>31</sup>

#### 4.2.2.3. Solubilização

A curva de solubilização relaciona a quantidade de composto dissolvido em função do tempo.<sup>45</sup> No caso dos complexos de inclusão tais curvas podem ser úteis para avaliarmos o perfil de liberação do composto no meio. Nas **Figuras 32 e 33** estão apresentadas as curvas de solubilização de IVER, EPRI e seus respectivos complexos de inclusão com  $\beta$ -CD em função do tempo a 30 °C.



**Figura 32.** Curvas de solubilização de IVER e seu complexos de inclusão com  $\beta$ -CD em água a 30 °C.



**Figura 33.** Curvas de solubilização de EPRI e seu complexos de inclusão com  $\beta$ -CD em água a 30°C.

Em ambos os casos, foi evidente o aumento da concentração de avermectina na presença de  $\beta$ -CD. Essa maior quantidade dissolvida na presença de  $\beta$ -CD pode estar relacionada à maior capacidade de interação dos compostos com o ambiente aquoso, devido à presença da  $\beta$ -CD.

Além disso, outro fator que pode estar relacionado ao aumento da dissolução seria a técnica utilizada para o preparo dos complexos, pois os complexos preparados pela técnica de liofilização geralmente apresentam maior velocidade de dissolução que os preparados por outras técnicas. Na liofilização as características de cristalinidade podem ser alteradas e o estado amorfo altamente energético geralmente obtido para o complexo e moléculas não complexadas, podem refletir no aumento da velocidade de solubilização.<sup>138,75-77</sup> Outro fator seria que a formação do complexo de inclusão levaria a uma diminuição na tensão interfacial o que facilitaria a dissolução,<sup>139</sup> bem como promoveria a formação de agregados menores, com menores valores de  $D_h$ , visto que os complexos apresentam valores de PZ entre 0 e 30 mV.

Desta forma, a dissolução mais rápida dos complexos comparado com os compostos puros pode ser crucial para alcançar uma absorção mais rápida do inseticida pelo organismo alvo e, conseqüentemente, um início mais rápido de sua ação.

### 4.3. Ensaios biológicos

#### 4.3.1. Avaliação da toxicidade frente aos estádios L1 e L4 de larvas do mosquito *Aedes aegypti*.

Pridgeon *et. al.* propôs um método rápido para a avaliação de potenciais compostos com atividade larvicida utilizando larvas de mosquitos no primeiro estágio de desenvolvimento. Além de possibilitar o teste de um grande número de compostos em diversas concentrações, com uma pequena quantidade de larvas (5 larvas por teste), o uso de larvas de 1° estágio reduz o tempo, o trabalho e os cuidados necessários para criar as larvas de estádios mais avançados; conforme preconizados por outras metodologias.<sup>5</sup> Apesar de ser possível utilizarmos qualquer estágio larval na avaliação da toxicidade de novos compostos, a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda a realização do teste nos estádios L3 ou L4. Isso porque essas formas são mais resistentes que as formas mais jovens (L1 e L2) e as pupas não se alimentam, portanto, não ingerem os compostos.<sup>139</sup> Nesse trabalho foi avaliado a atividade larvicida nos estádios L1 e L4 afim de verificarmos a relação da toxicidade dos compostos com o estágio de desenvolvimento.

Na **Tabela 14** estão apresentados os valores de dose letal a 50% das larvas (DL<sub>50</sub>) em µM e ppm para IVER, EPRI e seus complexos de inclusão (IVER-β-CD e EPRI-β-CD) após 24h de exposição. Os valores de DL<sub>50</sub> foram obtidos a partir das curvas de dose resposta dos compostos (% mortalidade × concentração das composições avaliadas) disponíveis no material suplementar. Para os controles água deionizada, solução de β-CD na maior concentração utilizada (100 µM) e DMSO 1% os valores de mortalidade foram de 2-7%, 5-10% e 6-9%, respectivamente.

**Tabela 14.** Toxicidade da IVER, EPRI e seus respectivos complexos com β-CD frente a larvas de *Aedes aegypti* nos estádios L1 e L4 (os dados obtidos são médias de 9 replicatas).

COMPOSTOS	DL <sub>50</sub> ± desvio padrão em µmol L <sup>-1</sup> /ppm					
	L1 (24 h)		L4 (24 h)		L4 (48 h)	
	µmol L <sup>-1</sup>	ppm	µmol L <sup>-1</sup>	ppm	µmol L <sup>-1</sup>	ppm
IVER	0,016 ± 0,002	0,014 ± 0,002	0,262 ± 0,016	0,229 ± 0,014	0,118 ± 0,028	0,103 ± 0,025
IVER-β-CD	0,025 ± 0,003	0,051 ± 0,005	0,401 ± 0,019	0,806 ± 0,039	0,188 ± 0,024	0,379 ± 0,047
EPRI	0,685 ± 0,117	0,626 ± 0,107	0,630 ± 0,072	0,576 ± 0,066	0,399 ± 0,011	0,365 ± 0,097
EPRI -β-CD	0,600 ± 0,048	1,230 ± 0,097	0,199 ± 0,029	0,407 ± 0,060	0,136 ± 0,015	0,278 ± 0,030

Todos os compostos apresentaram valores de DL<sub>50</sub> menores ou próximo de 1 ppm, o que segundo Komalamisra et al.<sup>140</sup> e Geris et al.,<sup>141</sup> é um indicativo de que eles apresentam alta atividade larvicida. Esses valores são comparáveis ao do inseticida temefós, que apresentou valores de DL<sub>50</sub> de 1,10 ppm em estudos realizados por Reegan et al.<sup>142</sup> Em todos os casos nos experimentos em L4, foi observado que a toxicidade está relacionada com o tempo de exposição ao agente tóxico, um comportamento típico de compostos com ação aguda. Além disso, foi observado que a IVER e IVER-β-CD foi mais ativa no estágio L1 quando comparado ao EPRI e EPRI -β-CD (mesma ordem de grandeza), o que deve estar relacionado a alta toxicidade da IVER em relação as outras avermectinas.<sup>143</sup>

Para compararmos o efeito da inclusão sobre a atividade larvicida dos compostos, devemos avaliar os valores de DL<sub>50</sub> em μM. Foi observado que em ambos os estádios larvais (L1 e L4) IVER-β-CD apresentou maiores valores de DL<sub>50</sub> que IVER livre, já EPRI -β-CD apresentou menores valores de DL<sub>50</sub> que EPRI livre.

Os dados apresentados demonstram que a estratégia de preparar os complexos de inclusão de avermectinas tem efeito sobre a atividade larvicida, e que o preparo do complexo com EPRI levou a um aumento em sua toxicidade frente a larvas do *Aedes aegypti*.

#### 4.3.2 Avaliação da atividade citotóxica frente a fibroblastos WI26VA4

No desenvolvimento de novos compostos faz-se necessário a realização de experimentos para avaliar possíveis efeitos tóxicos dos compostos de inclusão sobre as células humanas. Assim, o objetivo da proposta atual é utilizar estudos de citotoxicidade “*in vitro*” para obtermos conhecimento que nos possibilite inferir sobre a segurança dessas novas composições. Estudos de citotoxicidade das avermectinas já foram realizados por Molinari et al.,<sup>144</sup> em células de ovário de hamster (CHO<sub>K1</sub>) na avaliação de ivermectina e sua formulação comercial (IVOMECC<sup>®</sup>).

Nesse trabalho foi avaliado a atividade citotóxica dos compostos (livres e em complexo) frente a fibroblastos WI26VA4. Na **Tabela 15** estão apresentados os valores de concentração que inibe a viabilidade de 50% dessas células (IC<sub>50</sub>) de IVER, IVER-β-CD, EPRI e EPRI-β-CD.

**Tabela 15.** Efeito citotóxico ( $IC_{50}$ ) de IVER, IVER- $\beta$ -CD, EPRI e EPRI- $\beta$ -CD em fibroblastos WI26VA4.

Composto	$IC_{50}$ em $\mu$ M (intervalo de confiança de 95%)
IVER	11,34 (9,84-13,08)
IVER- $\beta$ -CD	10,79 (9,25-12,59)
EPRI	9,66 (8,69-10,75)
EPRI- $\beta$ -CD	16,44 (14,48-18,67)

Neste experimento, os dados obtidos contra fibroblastos WI26VA4 sugerem que todos os compostos apresentam potencial citotóxico. Assim como Molinari et al. que observou para IVER e sua formulação comercial, efeitos citotóxicos nas células CHO<sub>K1</sub> quando expostas a concentrações entre 25 a 250  $\mu$ M, nossos resultados também confirmam a citotoxicidade das avermectinas livres e complexadas quando avaliadas entre 1 a 500  $\mu$ M. A inclusão de IVER em  $\beta$ -CD não altera a toxicidade do composto, já para a inclusão de EPRI em  $\beta$ -CD foi observado uma diminuição da citotoxicidade. Neste caso, a estratégia de preparo do complexo de inclusão EPRI- $\beta$ -CD foi eficiente na redução da citotoxicidade frente a fibroblastos.

Se comparamos os valores da **Tabela 14** com a **Tabela 15**, foi observado que os valores de  $DL_{50}$  para a atividade larvicida são inferiores aos valores de  $IC_{50}$  contra células de fibroblastos. Isso sugere que os compostos poderiam ser utilizados como agentes larvicidas desde que sejam seguidas as recomendações já preconizadas para o uso seguro dos compostos da classe das avermectinas.<sup>145</sup>

## 5. Conclusões

Neste trabalho tivemos sucesso na síntese e caracterização dos complexos de inclusão entre IVER e EPRI com  $\beta$ -CD. As principais informações obtidas durante a caracterização estão descritas a seguir:

- Através dos dados obtidos dos espectros de IV e análises térmicas para os compostos foi possível evidenciar a formação de interações intermoleculares que caracterizam a formação dos sistemas supramoleculares no estado sólido;
- Através da comparação dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  pôde-se observar variações nos valores de deslocamento químicos dos hidrogênios com a complexação, principalmente de hidrogênios presentes no anel benzofurânico. Esses dados levaram a propor que a complexação envolve esse anel e interações intermoleculares entre os grupos dissacarídeos presentes nas avermectinas com a  $\beta$ -CD;
- Através da titulação calorimétrica isotérmica foram determinados os parâmetros termodinâmicos das interações, sendo que: os valores de N foram próximos de 1 (1,18 para IVER- $\beta$ -CD e 1,22 para EPRI- $\beta$ -CD) indicando uma estequiometria de 1:1; as constantes de associação assumiram valores moderados (1700 para IVER- $\beta$ -CD e 1060 para EPRI- $\beta$ -CD); e apenas a componente entrópica foi determinante na espontaneidade dos processos;
- O complexo IVER- $\beta$ -CD apresenta perfil de solubilidade próximo do tipo C, em que os complexos apresentam menor solubilidade em relação à espécie livre; enquanto que o complexo EPRI- $\beta$ -CD apresenta maior solubilidade, exibindo diagrama do tipo  $A_L$ ;
- Os complexos IVER- $\beta$ -CD e EPRI- $\beta$ -CD possuem uma maior solubilização comparados com seus precursores, o que pode ser um fator importante no aumento da biodisponibilidade do inseticida;
- Os complexos apresentaram diâmetro hidrodinâmico na faixa de concentrações estudadas com variações entre 97-170 nm para IVER- $\beta$ -CD e 115-170 nm para EPRI- $\beta$ -CD, valores menores que das moléculas livres.

Com relação a avaliação da atividade biológica desses compostos, IVER- $\beta$ -CD foi menos potente que o precursor contra larvas do *Aedes aegypti*, enquanto que EPRI- $\beta$ -CD apresentou maior potência larvicida no estágio L4 após 24 e 48h. Na avaliação da citotoxicidade frente a fibroblastos WI26VA4 foi observado que os compostos IVER, EPRI, IVER- $\beta$ -CD e EPRI- $\beta$ -CD apresentaram valores de  $IC_{50}$  entre 9,66 e 16,44  $\mu\text{M}$  demonstrando o potencial

citotóxico dessa classe. O menor efeito citotóxico foi observado para EPRI- $\beta$ -CD. As diferenças estruturais entre a IVER e a EPRI são pouco significativas na modificação do perfil de complexação com a  $\beta$ -CD. Todavia, essas diferenças devem contribuir na melhoria da atividade larvicida do complexo EPRI- $\beta$ -CD e redução de sua toxicidade em fibroblastos WI26VA4.

Enfim, os dados das atividades larvicidas e citotóxicas obtidos neste trabalho demonstram que a utilização de compostos da classe das avermectinas podem levar ao desenvolvimento de formulações com mecanismo de ação diferente dos atualmente utilizados, e que a estratégia de preparar o complexo de inclusão com inseticidas dessa classe, pode ter um efeito positivo no aumento da atividade larvicida, e redução da citotoxicidade.



## 7. Referências

1. Mora, C.; Tittensor, D. P.; Adl, S.; Simpson, A. G. B.; Worm, B. *PLoS Biol*, **2011**, *9*, 1.
2. <http://www.unric.org>. Acessado em abril, 2016.
3. FIOCRUZ; *Fundação Oswaldo Cruz*. <http://www.portal.fiocruz.br>, acesso em abril, 2016.
4. FIOCRUZ; *Glossário de Doenças da Fiocruz*. <http://www.agencia.fiocruz.br>, acessado em abril, 2016.
5. OPAS/OMS; *Organização Pan-Americana de Saúde/Organização Mundial de Saúde*. <http://www.paho.org/bra>, acessado em abril, 2016.
6. Ministério da Saúde (MS); <http://portalsaude.saude.gov.br>, acessado em julho, 2016.
7. Da Silva, H. H. G.; Da Silva L.K.; *Rev. Patol. Trop.* **1998**, *27*, 1980.
8. Campos, J.; Andrade, C. F. S.; *Rev. Saúde Pública.* **2001**, *35*, 232.
9. Carvalho, M. D. S. L.; *Rev. Saúde Pública.* **2004**, *38*, 623.
10. Lima, E. P.; *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2006**, *39*, 259.
11. Macoris, M. D. L.G.; *Rev. Patol. Trop.* **1995**, *24*, 31.
12. Macoris, M. D. L. G.; Andrighetti, M. T. M.; Takaku, L.; Glasser, C. M.; Garbeloto, V. C.; Cirino, V. C. B.; *Rev. Saúde pública.* **1999**, *33*, 521.
13. Piccoli, C. F.; *Monografia*, Universidade Federal do Paraná. **2009**.
14. Fontoura, N. G.; Bellinato, D. F.; Valle, D.; Lima, J. B. P.; *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **2012**, *107*, 387.
15. Ministério da Saúde (MS); *Plano de contingência nacional para epidemias de dengue*, <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/janeiro/20/plano-contingencia-dengue-19jan15-web.pdf>, acessado em julho, 2016.
16. Barreto, C. F.; *Rev. Eletrônica FMB.* **2005**, *1*, 62.
17. Braga, I. A.; Valle, D.; *Epidemiol. Serv. saúde*, **2007**, *16*, 179.
18. Macoris, M. D. L. G. Universidade Estadual Paulista; *Monografia.* **2002**.
19. Foley, D. H.; Bryan, J. H.; Lawrence, G. W.; *Transactions Royal Soc Tropical Med & Hyg.* **2000**, *94*, 625.
20. De Freitas, R. M. C.; Faria, M. A.; Alves, S. N.; de Melo, A. L.; *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* **1996**, *38*, 293.
21. Geris, R.; Ribeiro, P. R.; Brandão, M.; da Silva, H. H. G.; da Silva, I. G. In *Studies in Natural Products Chemistry*, 37<sup>th</sup> ed.; Elsevier, 2012, p. 277.
22. Deus, K. M.; Saavedra-Rodriguez, K.; Butters, M. P.; Black, IV W. C.; Foy, B. D.; *J. Med. Entomol.* **2012**, *49*, 356.
23. Pridgeon, J. W.; Pereira, R. M.; Becnel, J. J.; Allan, S. A.; Clark, G. G.; Linthicum, K. J.; *J. Med. Entomol.* **2008**, *45*, 82.
24. Rosa, C. S.; Simões, D. A.; Ataíde, L. M. S.; Horta, M. A. P.; Vilela, E. F.; *Bioassay.* **2011**, *6*, 6.
25. Alves, S. N.; Tibúrcio, J. D.; de Melo, A. L.; *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2011**, *44*, 486.
26. Chaccour, C.; Lines, J.; Whitty, C. J. M.; *J. Infect. Dis.* **2010**, *202*, 113.
27. Guzzo, C. A.; Furtek, C. I.; Porras, A.G.; Chen, C.; Tipping, R.; Clineschmidt, C.M.; Sciberras, D. G.; Hsieh, J. Y.; Lasseter, K. C.; *J. Clin. Pharmacol.* **2002**, *42*, 1122.
28. <http://www.merck.com/about/featured-stories/mectizan.html>, acessado em 08 julho, 2016.
29. Schaffazick, S. R.; Guterres, S. S.; Freitas, L. D. L.; Pohlmann, A. R.; *Quím. Nova.* **2003**, *26*, 726.
30. Venturini, C. D. G.; Nicolini, J.; Machado, C.; Machado, V. G.; *Quím. Nova.* **2008**, *31*, 360.
31. Asanuma, H.; Akiyama, T.; Kajiya, K.; Hishiya, T.; Komiyama, M.; *Anal. Chim. Acta.* **2001**, *435*, 25.

32. Viglianti, C.; Hanna, K.; de Brauer, C.; Germain, P.; *Environ. Pollut.* **2006**, *140*, 427.
33. Cathum, S.; Velicogna, D.; Obenauf, A.; Dumouchel, A.; Punt, M.; Brown, C. E.; Ridal, J.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *381*, 1491.
34. Del Valle, E. M. M. *Process biochem.* **2004**, *39*, 1033.
35. Li, S.; Purdy, W. C.; *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 1457.
36. Galvao, J. G.; Silva, V. F.; Ferreira, S. G.; França, F. R. M.; Santos, D.; Freitas, L. D. S.; Alves, P. B.; Araújo, A. A. S.; Calvalcanti, S.; Nunes, R. S.; *Thermochim. Acta.* **2015**, *608*, 14.
37. Pacioni, N. L.; Pierini, A. B.; Veglia, A. V.; *Spectrochim. Acta. Part A.* **2013**, *103*, 319.
38. Yao, Q.; You, B.; Zhou, S.; Chen, M.; Wang, Y.; Li, W.; *Spectrochim. Acta, Part A.* **2014**, *117*, 576.
39. Villaverde, J.; Morillo, E.; Pérez-Martínez, J. I.; Ginés, J. M.; Maqueda, C.; *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 864.
40. Gurarslan, A.; Shen, J.; Caydamli, Y.; Tonelli, A. E.; *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2015**, *82*, 489.
41. Alonso, M. L. Laza, J. M.; Alonso, R. M.; Jiménez, R. M.; Vilas, J. L.; Fañanás, R.; J.; *Chem. Technol. Biotechnol.* **2014**, *89*, 1077.
42. Denadai, A. M. L. *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de Minas Gerais. 2005, p.166.
43. Szejtli, N. In *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, 1<sup>st</sup> ed.; Atwood, J. L.; Davies, J. E.; Macnicol, D. D.; Vogtle, F.; eds.; Pergamon: Oxford, 1996, pp. 6672.
44. Lehn, J. M.; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*; 1988, *27*, 89.
45. Ripmeester, J. A.; Ratcliffe, C. I. In *Inclusion compounds*, Vol. 5; Atwood, J.L.; Davies, J. E. D.; MacNicol, D. D.; eds.; Oxford Univ. Press: Oxford, 1991, p.37.
46. Cucolo, G. R. *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual Paulista. 2009, p. 119
47. Frömring, K.-H.; Szejtli, J. *Cyclodextrins in Pharmacy*. Springer Science & Business Media, 1993.
48. Szejtli, J.; *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1743.
49. French, D.; Pulley, A. O.; Effenberger, J. A.; Rougvie, M. A.; Abdullah, M.; *Arch. Biochem. Biophys.* **1965**, *111*, 153.
50. De Paula, W. X.; Denadai, A. M.; Santoro, M. M.; Braga, A. N.; Santos, R. A.; Sinisterra, R. D.; *Int. J. Pharm.* 2011, *404*, 116.
51. Davis, M. E.; Brewster, M. E.; *Nat. Rev. Drug Discovery.* **2004**, *3*, 1023.
52. Khan, A. R.; Forgo, P.; Stine, K. J.; D'Souza, V. T.; *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1977.
53. Cunha-Filho, M. S. S. D.; Sá-Barreto, M. S. S.; *Rev. Cien. Farm. Básica Apl.* **2007**, *28*, 1.
54. Lindner, K.; Saenger, W. *Carbohydr. Res.* **1982**, *99*, 103.
55. Szejtli, J. *Cyclodextrin Technology*. Springer Science & Business Media, 1988.
56. Szejtli, J.; Bolla-Pusztai, E.; Tardy-Lengyel, M.; Szabó, P.; Ferenczy, T.; *Pharmazie*, **1983**, *38*, 189.
57. Shan, C. L.; Yang, B.; Sun, W. Q.; Xião, X.; Tao, Z.; Liu, J. X.; *Supramol. Chem.* **2015**, *27*, 606.
58. Corciova, A.; Ciobanu, C.; Poiata, A.; Mircea, C.; Nicolescu, A.; Drobeta, M.; Varganici, C. D.; Pinteala, T.; Marangoci, N.; *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2015**, *81*, 71.
59. Abarca, R. L.; Rodríguez, F. J.; Guarda, A.; Galotto, M. J.; Bruna, J. E.; *Food Chem.* **2016**, *196*, 968.
60. Akita, T.; Yoshikiyo, K.; Yamamoto, T.; *J. Mol. Struct.* **2014**, *1074*, 43.
61. Budal, R. M. *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de Santa Catarina. 2003, p.191.
62. Veiga, F.; Pecorelli, C.; Ribeiro, L. Em *As ciclodextrinas em Tecnologia Farmacêutica*. Minerva Coimbra: Coimbra, 2006, p. 228.
63. Loftsson, T.; Duchene, D.; *Int. J. Pharm.* **2007**, *329*, 1.
64. Inoue, Y.; *Annu. Rep. NMR Spectrosc.* **1993**, *27*, 59.

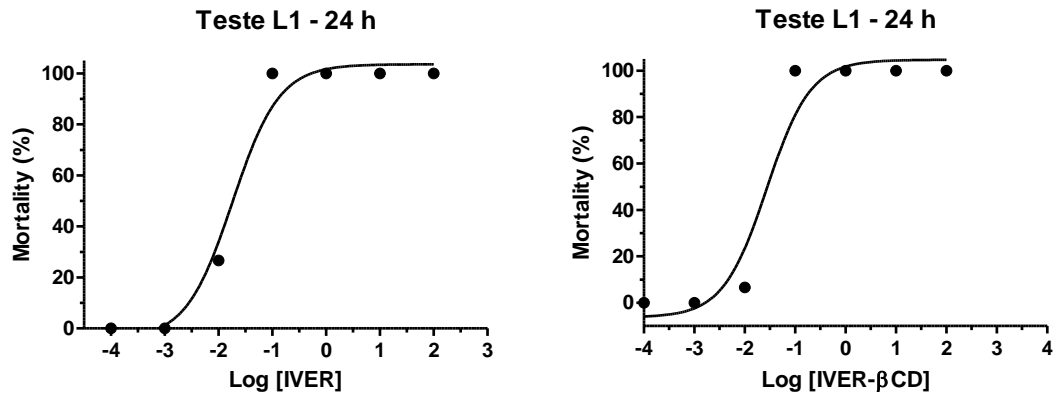
65. Liu, L.; Guo, Q. X.; *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.*, **2002**, 42, 1.
66. Rekharsky, M. V.; Inoue, Y.; *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1875.
67. Egídio, F. D. C. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual de Campinas. 2005, p.79.
68. Gomes, L. M.; Petito, N.; Costa, V. G.; Falcão, D. Q.; Araújo, K. G. D.; *Food Chem.* **2014**, 148, 428.
69. Kubota, D. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Sergipe. **2010**. p. 83
70. Burg, R. W.; Miller, B. M.; Baker, E. E.; Birnbaum, J.; Currie, S. A.; Hartman, R.; Kong, Y. L.; Monaghan, R. L.; Olson, G.; Putter, I.; Tunac, J. B.; Wallick, H.; Stapley, E. O.; Oiwa, R.; Ōmura, S.; *Antimicrob. Agents Chemother.* **1979**, 15, 361.
71. Silva, C. R.; Arantes, G. J.; Marques, A. O.; *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.* **1995**, 4, 121.
72. Fisher, M. H.; Mrozik, H.; *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1992**, 32, 537.
73. Albers-Schoenberg, G.; Arison, B. H.; Chabala J. C.; Douglas, A. W.; Eskola, P.; Fisher, M. H.; Lusi, A.; Mrozik, H.; Smith, J. L.; Tolman, R. L.; *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 4216.
74. Mellin, T. N.; Busch, R. D.; Wang, C. C.; *Neuropharmacology*, **1983**, 22, 89.
75. Albert, J.; Lingle, C. J.; Marder, E.; O'Neill, B.; *Br. J. Pharmacol.* **1986**, 87, 771.
76. Martin, R. J.; Robertson, A. P.; Wolstenholme, A. J.; In *Macrocyclic Lactones in Antiparasitic Therapy*, Vercruyse, J.; Rew, R. S.; eds.; CAB International, 2002, p. 125.
77. Scott, R. H.; Duce, I. R.; *Comp. Biochem. Physiol C.* **1987**, 86, 305.
78. Arena, J. P.; Liu, K. K.; Paress, P. S.; Cully, D. F.; *Mol. Pharmacol.* **1991**, 40, 368.
79. Arena, J. P.; Liu, K. K.; Paress, P. S.; Schaeffer, J. M.; Cully, D. F.; *Mol. Brain Res.* **1992**, 15, 339.
80. Cully, D. F.; Vassilatis, D. K.; Liu, K. K.; Paress, P. S.; Van der Ploeg, L. H.; Schaeffer, J. M.; Arena J. P.; *Nature.* **1994**, 371, 707.
81. Kass, I.S.; Wang, C. C.; Walrond, J. P.; Stretton, A. O.; *Proc. Nati. Acad. Sci.* **1980**, 77, 6211.
82. Geary, T. G.; Sims, S. M.; Thomas, E. M.; Vanover, L.; Davis, J. P.; Winterrowd, C. A.; Klein, R. D.; Ho, N. F.; Thompson, D. P.; *Exp. Parasitol.* **1993**, 77, 88.
83. Fellowes, R. A.; Maule, A. G.; Martin, R. J.; Geary, T. G.; Thompson, D. P.; Kimber, M. J.; Marks, N. J.; Halton, D. W.; *Parasitology.* **2000**, 121, 325.
84. Campbell, W. C.; ed.; *Ivermectin and Abamectin*. 1<sup>st</sup>. New York: Springer Science & Business Media, 1989, p. 363.
85. Awasthi, A.; Razzak, M.; Al-Kassas, R.; Greenwood, D. R.; Harvey, J.; Garg, S.; *Curr. Pharm. Anal.* **2012**, 8, 415.
86. Shoop, W. L.; Mrozik, H.; Fisher, M. H.; *Veterinary parasitology.* **1995**, 59, 139.
87. Chabala, J. C.; Mrozik, H.; Tolman, R. L.; Eskola, P.; Lusi, A.; Peterson, L. H.; Woods, M. F.; Fisher, M. H.; Campbell, W. C.; *Eur. J. Med. Chem.* **1980**, 23, 1134.
88. Goa, K. L.; Mctavish, D.; Clissold, S. P.; *Drugs.* **1991**, 42, 640.
89. Anziani, O. S.; Flores, S. G.; Moltedo, H.; Derozier, C.; Guglielmone, A. A.; Zimmermann, G. A.; Wanker, O.; *Vet. Parasitol.* **2000**, 87, 243.
90. Lifschitz, A.; Pis, A.; Alvarez, L.; Virkel, G.; Sanchez, S.; Sallovitz, J.; Kujanek, R.; Lanusse, C.; *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **1999**, 22, 27.
91. Lifschitz, A.; Virkel, G.; Pis, A.; Imperiale, F.; Sanchez, S.; Alvarez, L.; Kujanek, R.; Lanusse, C.; *Vet. Parasitol.* **1999**, 86, 203.
92. Meeus, P. F. M.; De Bont, J.; Vercruyse, J.; *Vet. Parasitol.* **1997**, 70, 219.
93. Miller, J. A.; Garris, G. I.; Oehler, D. D.; *Journal of Agricultural Entomology.* **1997**, 14, 199.
94. Williams, J. C.; Loyacano, A. F.; DeRosa, A.; Gurie, J.; Clymer, B. C.; Guerino, F.; *Vet. Parasitol.* **1999**, 85, 277.

95. Holste, J. E.; Smith, L. L.; Hair, J. A.; Lancaster, J. L.; Lloyd, J. E.; Langholff, W. K.; Barrick, R. A.; Eagleson, J. S.; *Vet. Parasitol.* **1997**, *73*, 153.
96. Higuchi, T.; Connors, K. A.; *Adv. Anal. Chem. Instrum.* **1965**, *4*, 117.
97. Pridgeon, J. W.; Becnel, J. J.; Clark, G. G.; Linthicum, K. J.; *J. Med. Entomol.* **2009**, *46*, 335.
98. World Health Organization (WHO). *Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides*. <http://www.who/cds/whopes/gcdpp2005>.
99. Consoli, R. A. G. B.; Oliveira, R. L. D.; *Principais Mosquitos de importância Sanitária no Brasil*. 20<sup>a</sup> ed.; Editora Fiocruz: Rio de Janeiro, 1994, p. 225.
100. Denadai, A. M. L.; Santoro, M. M.; Da Silva, L.H.; Viana, A. T.; Santos, R. A. S.; Sinisterra, R. D.; *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2006**, *55*, 41.
101. Heo, D. S.; Park, J.G.; Hata, K.; Day, R.; Herberman, R. B.; Whiteside, T. L. *Cancer Research*, **1990**, *50*, 3681.
102. Rolim, L. A. *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de Pernambuco. 2012, p. 201.
103. Fink, D. W. In *Analytical Profiles of Drug and Substances*, Klaus, F.; ed.; Academic Press, Vol. 17, 1988. p.155.
104. Sams, R.; *Vet. Parasitol.* **1993**, *48*, 59.
105. Olteanu, A. A.; Arama, C. C.; Radu, C.; Mihaescu, C.; Monciu, C. M.; *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2014**, *80*, 17.
106. Lukasiewicz, M.; Kowalski, S.; Ptaszek, A.; Ptaszek, P.; *Chem. Pap.* **2015**, *69*, 747.
107. Chi, L.; Liu, R.; Guo, T.; Wang, M.; Liao, Z.; Wu, L.; Li, H.; Wu, D.; Zhang, J.; *Int. J. Pharm.* **2015**, *479*, 349.
108. Barbato, F.; La Rotonda, M. I.; Miro, A.; Morrica, P.; Quaglia, F.; *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2000**, *38*, 423.
109. Yao, Y. S.; Xie, Y.; Hong, C.; Li, G.; Shen, H.; Ji, G.; *Carbohydr. Polym.* **2014**, *110*, 329.
110. Lula, I.; de Sousa, F. B.; Denadai, A. M. L.; de Lima, G. F.; Duarte, H. A.; dos Mares Guia, T. R.; Faljoni-Alario, A.; Santoro, M. M.; de Camargo, A. C. M.; dos Santos, R. A. S.; Sinisterra, R. D.; *Mat. Sci. Eng., C.* **2012**, *32*, 244.
111. Singh, R.; Bharti, N.; Madan, J.; Hiremath, S. N.; *J. Pharm. Sci. Technol.* **2010**, *2*, 171.
112. Lanna, E. G. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Juiz de Fora. 2015, p. 138.
113. Giordano, F.; Novak, C.; Moyano, J. R.; *Thermochim. Acta.* **2001**, *380*, 123.
114. Kohata, S.; Jyodoi, K.; Ohyoshi, A.; *Thermochim. Acta.* **1993**, *217*, 187.
115. Prabu, S.; Sivakumar, K.; Nayaki, S. K.; Rajamohan, R.; *J. Mol. Liq.* **2016**, *219*, 967.
116. Dos Santos, F. C. M. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Pernambuco, 2013, p.101.
117. Di Cagno, M.; Terndrup, N. T.; Lambertsen, L. K.; Kuntsche, J.; Bauer-Brandl, A.; *Int. J. Pharm.* **2014**, *468*, 258.
118. Arena G.; Pappalardo, A.; Pappalardo, S.; Gattuso, G.; Notti, A.; Parisi, M. F.; Pisagatti, I.; Sgarlata, C.; *J. Therm. Anal. Calorim.* **2015**, *121*, 1073.
119. Bertaut, E.; Landy, D. *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 2630.
120. Ahmed, S. A.; Chatterjee, A.; Maity, B.; Seth, D.; *Int. J. Pharm.* **2015**, *492*, 103.
121. Wszelaka-Rylik, M.; Gierycz, P.; *J. Therm. Anal. Calorim.* **2015**, *121*, 1359.
122. Denadai, A. M. L.; Da Silva, J. G.; Guimarães, P. P.; Gomes, L. B.; Mangrich, A. S.; De Rezende, E. I.; Daniel, I. M.; Beraldo, H.; Sinisterra, R. D.; *Mat. Sci. Eng.* **2013**, *C. 33*, 3916.
123. Liao, Y.; Zhang, X.; Li, C.; Huang, Y.; Lei, M.; Yan, M.; Zhou, Y.; Zhao, C.; *Carbohydr. Polym.* **2016**, *147*, 415.
124. Pitha, J.; Szenté, L.; Szejtli, J.; Molecular encapsulation of drugs by cyclodextrins and congeners. *Controlled Drug Delivery.* **1983**, *1*, 126.

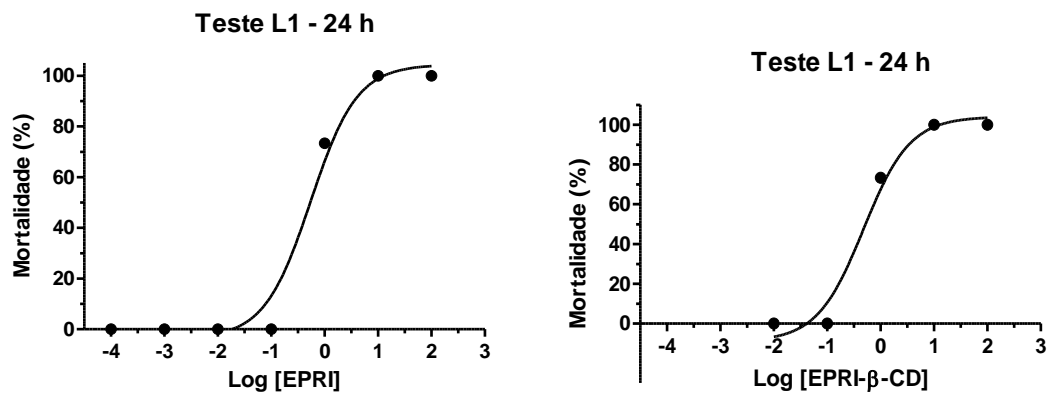
- 125.Roy, M. N.; Saha, S.; Kundu, M.; Saha, B. C.; Barman, S.; *Chem. Phys. Lett.* **2016**, 655-656, 43.
- 126.Schneider, H. J.; Hacket, F.; Rüdiger, V.; Ikeda, H.; *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1755.
- 127.Beasley, C. A.; Hwang, T. L.; Fliszar, K.; Abend, A.; McCollum, D. G.; Reed, R. A.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, 41, 1124.
- 128.Awasthi, A.; Razzak, M.; Al-Kassas, R.; Greenwood, D. R.; Harvey, J.; Garg, S.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2012**, 63, 62.
- 129.Zhang, J.-Q.; D.; Jiang, K.-M.; Zhang, D.; Zheng, X.; Wan, C.-P.; Zhu, H.-Y.; Xie, X.-G.; Jin, Y.; Lin, J.; *Carbohydr. Res.* **2015**, 406, 55.
- 130.Tang, P.; Li, S.; Wang, L.; Yang, H.; Yan, J.; Li, H.; *Carbohydr. Polym.* **2015**, 131, 297.
- 131.Chin, Y. P.; Raof, S. F. A.; Sinniah, S.; Lee, V. S.; Mohamad, S.; Manan, N. S. A.; *J. Mol. Struct.* **2015**, 1083, 236.
- 132.Jahed, V.; Zarrabi, A.; Bordbar, A.-K.; Hafezi, M. S.; *Food Chem.* **2014**, 165, 241.
- 133.Cola, D. F. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual Paulista. 2016, p. 85.
- 134.Daudt, R. M.; Emanuelli, J.; Kulkamp-Guerreiro, I. C.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S.; *Ciênc. Cult.* **2013**, 65, 28.
- 135.Schaffazick, S. R.; Guterres, S. S.; Freitas, L. D. L.; Pohlmann, A. R.; *Quím. Nova* **2003**, 26, 726.
- 136.Cazo, N. A. P. -F. E. R.; Silva, M.F.G.F.; Fernandes, J. B.; Vieira, P.C.; Puhl, A. C. Polikarpov, I. Forim, M. R.; *Orbital - The Electronic Journal of Chemistry*, **2012**, 4, 54.
- 137.Meirelles, L. M. A. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Piauí. 2012. p. 79
- 138.Yazan, Y.; Sumnu, M.; *S.T.P. Pharma Sci. Paris* **1994**, 4, 128.
- 139.Da silva, H. H. G.; da Silva, I. G.; *Rev. Patologia Tropical.* **2011**, 29, 1980.
- 140.Komalamisra, N.; Trongtokit, Y.; Rongsriyam, Y.; Apiwathnasorn, C.; *The Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* **2005**, 36, 1412.
- 141.Geris, R.; Ribeiro, P. R.; Brandão, M.; da Silva, H. H. G.; da Silva, I. G. In *Studies in Natural Products Chemistry*, 37<sup>th</sup>, ed.; Elsevier, 2012, p. 277.
- 142.Reegan, A. D.; Gandhi, M. R.; Sivaraman, G.; Cecilia, K. F.; Ravindhran, R.; Balakrishna, K.; Paulraj, M. G.; Ignacimuthu, S.; *Parasite Epidemiology and Control.* **2016**, 1, 78.
- 143.Campbell, W. C.; Benz, G. W.; *J. Vet. Pharmacol. Therap.* **1984**, 7, 1.
- 144.Molinari, G.; Soloneski, S.; Reigosa, M. A.; Larramendy, M. L.; *J. Hazard. Mater.* **2009**, 165, 1074.
- 145.<http://www.anvisa.gov.br>. Acessado em 12 de abril, 2016.

## Apêndice A - MATERIAL SUPLEMENTAR

### ENSAIO L1

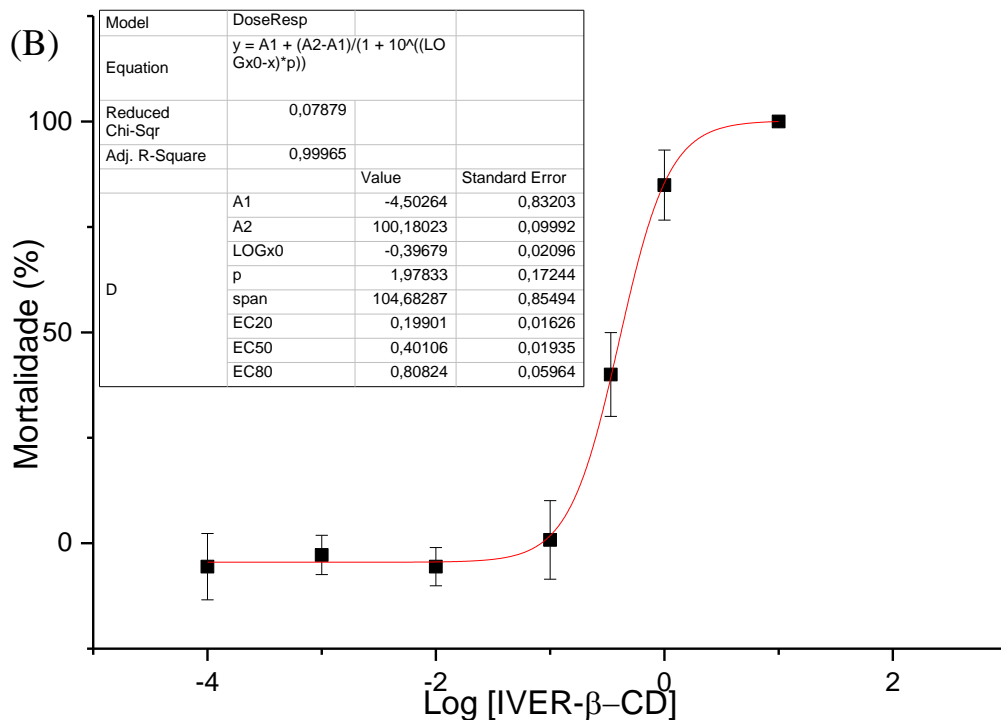
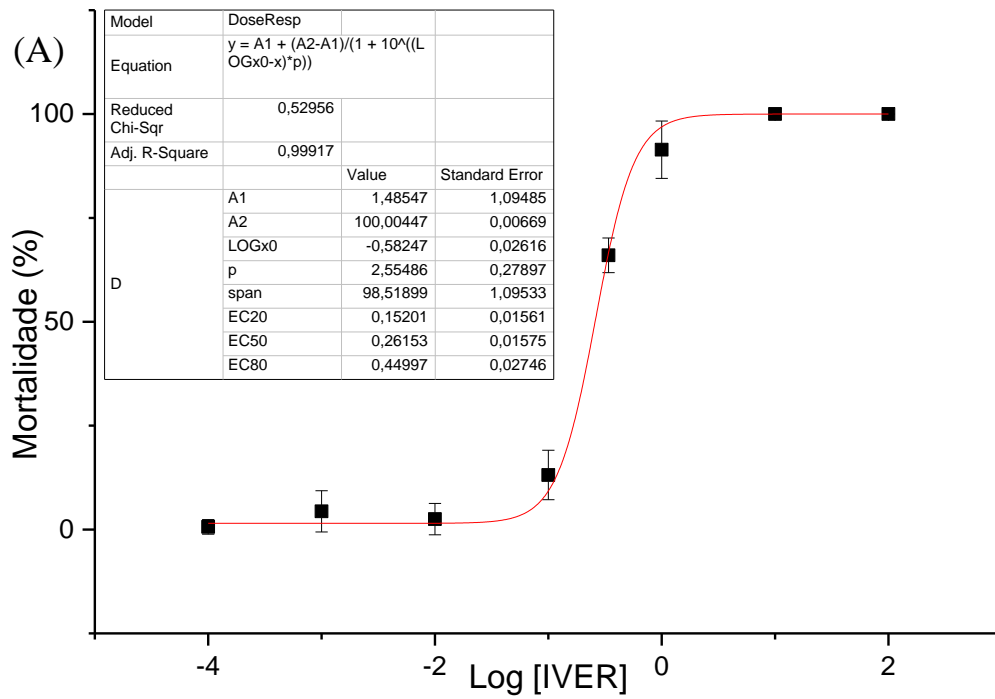


**Figura S1.** Porcentagem em mortalidade de larvas em função da concentração de IVER e de seu complexo com  $\beta$ -CD, avaliada após 24 horas de tratamento.

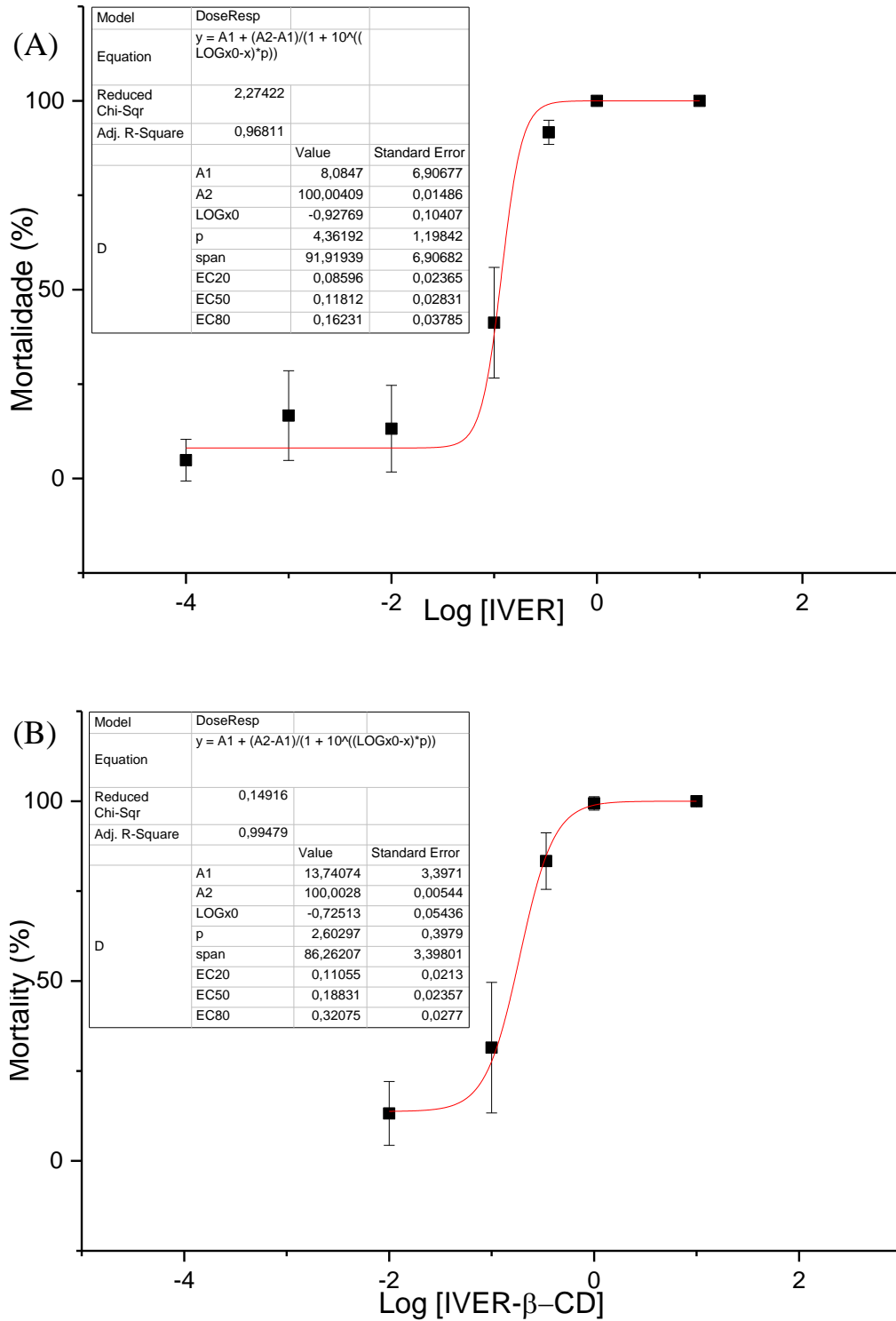


**Figura S2.** Porcentagem em mortalidade de larvas em função da concentração de EPRI e de seu complexo com  $\beta$ -CD, avaliada após 24 horas de tratamento.

## ENSAIO L4



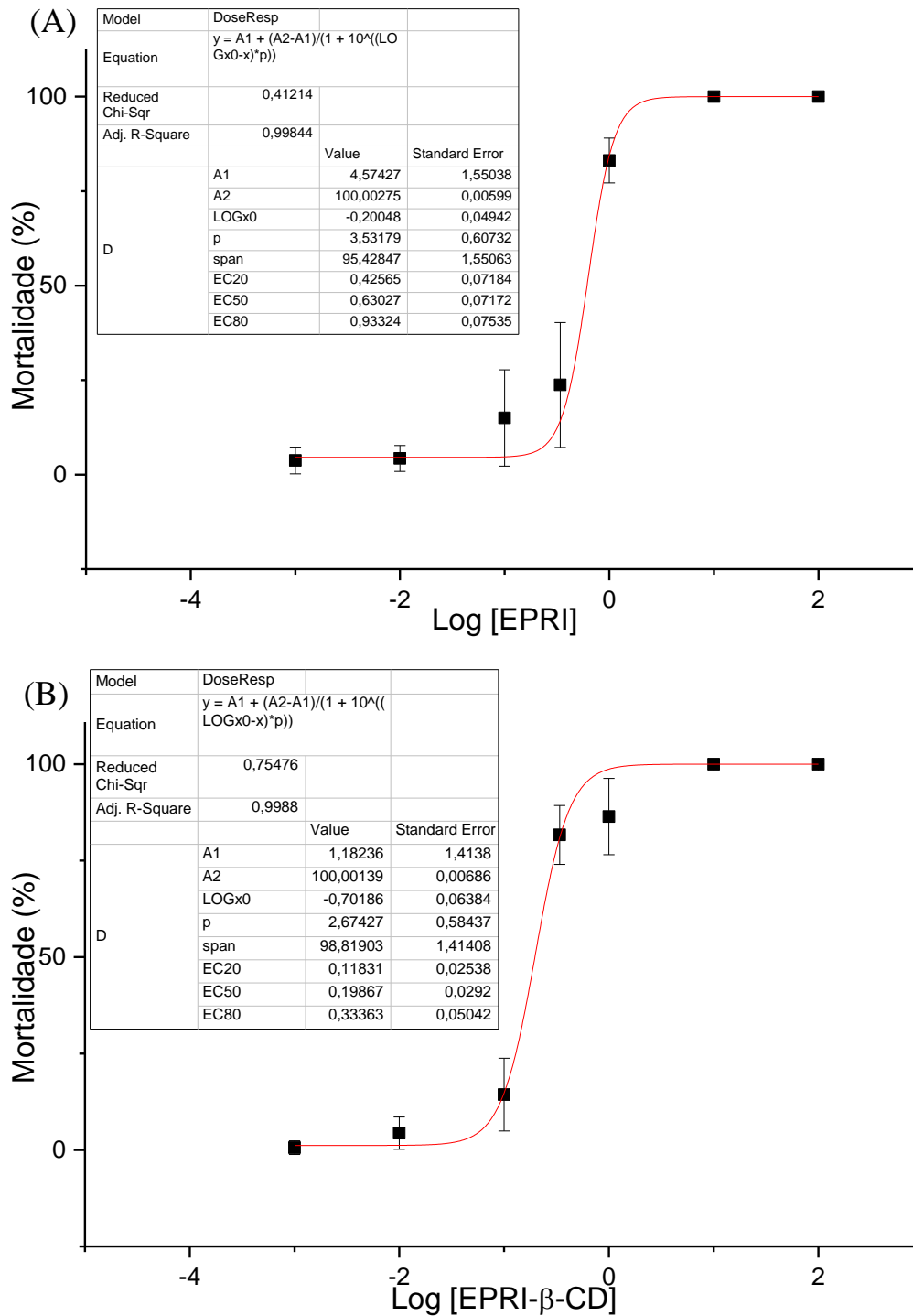
**Figura S3.** Porcentagem em mortalidade de larvas em função da concentração de IVER (A) e de seu complexo com  $\beta$ -CD (B), avaliada após 24 horas de tratamento.



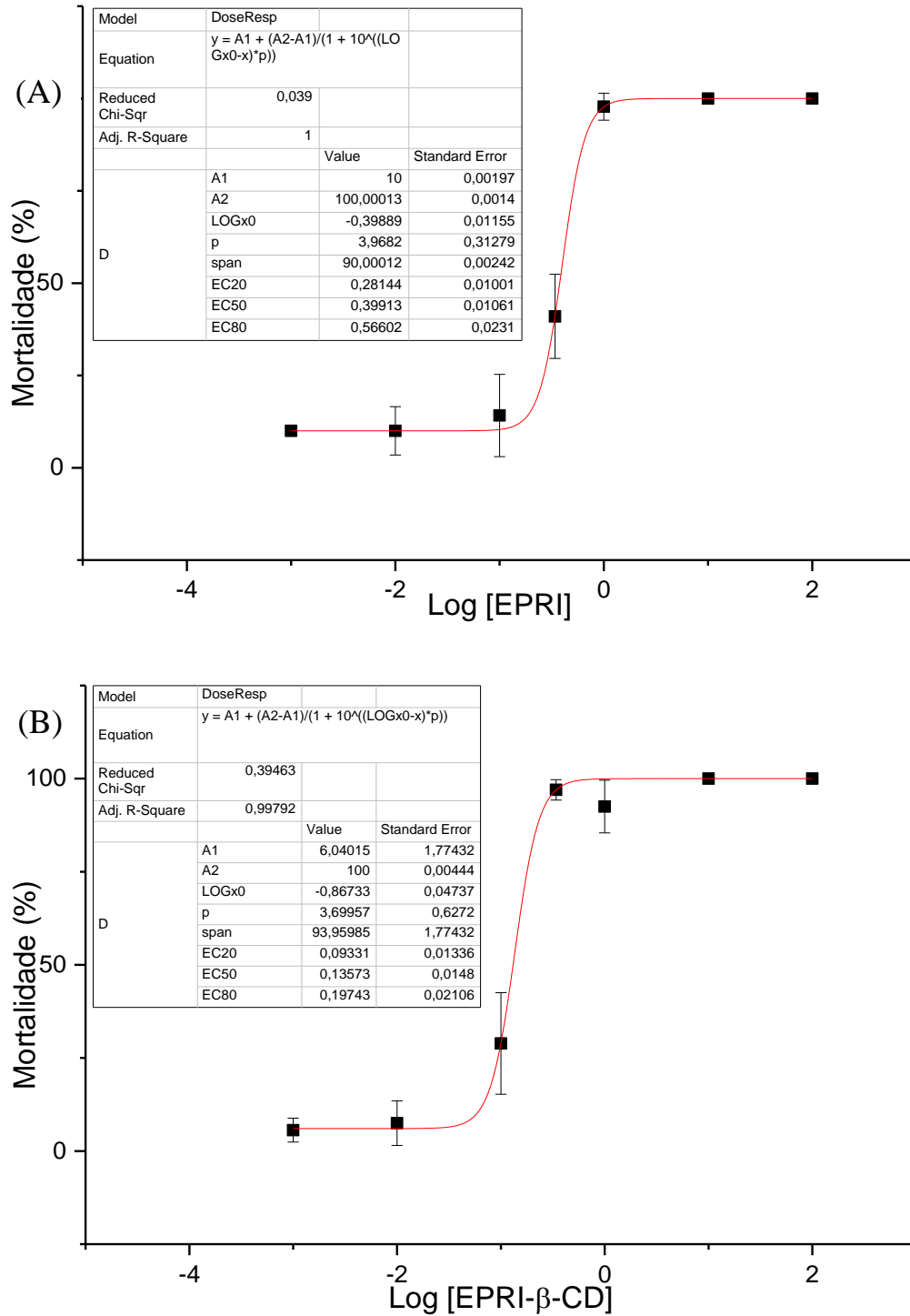
**Figura S4.** Porcentagem em mortalidade de larvas em função da concentração de IVER (A) e de seu complexo com  $\beta$ -CD (B), avaliada após 48 horas de tratamento.



## ENSAIO L4



**Figura S5.** Porcentagem em mortalidade de larvas em função da concentração de EPRI (A) e de seu complexo com  $\beta$ -CD (B), avaliada após 24 horas de tratamento.



**Figura S6.** Porcentagem em mortalidade de larvas em função da concentração de EPRI (A) e de seu complexo com  $\beta$ -CD (B), avaliada após 48 horas de tratamento.