



**JÉSSICA MARIA DA
SILVA BARBOSA**

**INCLUSÃO DE MONTELUCASTE EM
CICLODEXTRINA GAMA POR MECANOQUÍMICA**



**JÉSSICA MARIA DA
SILVA BARBOSA**

**INCLUSÃO DE MONTELUCASTE EM
CICLODEXTRINA GAMA POR MECANOQUÍMICA**

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica da Doutora Susana Isabel Fonseca de Almeida Santos Braga e do Doutor Filipe Alexandre Almeida Paz, Investigadores principais do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

o júri

presidente

Doutora Rita Maria Pinho Ferreira
Professora auxiliar da Universidade de Aveiro

Doutora Susana Isabel Fonseca de Almeida Santos Braga
Investigadora principal da Universidade de Aveiro

Doutor Luís Manuel Cunha Silva
Investigador de Pós Doutoramento da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

agradecimentos

Aproveito este momento para agradecer aos meus orientadores, Susana Braga e Filipe Paz, por todo o conhecimento que me transmitiram e por estarem sempre disponíveis para esclarecer quaisquer dúvidas que surgissem. Agradeço à Celeste, à Rosário e à doutora Paula pela ajuda disponibilizada nas técnicas de caracterização. Ao Engenheiro José Simões e ao Senhor Ivo Mateus por me terem ajudado com os equipamentos quando eles teimavam em não funcionar. Ao Sérgio, ao Ricardo e à Daniela que também se mostraram sempre disponíveis para me ajudar.

palavras-chave

Montelucaste, ciclodextrina gama, mecanoquímica, solubilidade, estabilidade.

resumo

O montelucaste de sódio (MLK), muito usado no tratamento da asma, apresenta como limitações ao uso e formulação a baixa solubilidade e a instabilidade à luz e à humidade. De forma a contornar estas limitações, neste trabalho foram formados compostos de inclusão entre o MLK e a γ -ciclodextrina (γ -CD).

O composto MLK: γ -CD foi formado através de mecanoquímica, tendo-se usado três variantes: (1) moagem de uma mistura equimolar num moinho planetário, 600 rotações.minuto⁻¹; (2) repetição do ensaio 1 com pré-amorfização da γ -CD; (3) repetição do ensaio 1 a baixa velocidade (50 rotações.minuto⁻¹) num forno de rolos. Amostras foram recolhidas a intervalos de tempo pré-determinados e analisadas por difração de Raios-X de pós, ressonância magnética nuclear ¹³C{¹H} CP-MAS, microscopia eletrónica de varrimento, espectroscopia de infravermelho, termogravimetria e calorimetria diferencial de varrimento.

Os resultados mostram que a formação do composto de inclusão MLK: γ -CD ocorre preferencialmente em condições de elevada transmissão de energia mecânica, tais como as que ocorrem no moinho planetário. Verificou-se ainda que a interação entre MLK e γ -CD se inicia mais cedo quando a γ -CD não é sujeita a pré-moagem. De facto, este tratamento altera a morfologia da γ -CD, o que parece condicionar a interação com o MLK. No seu conjunto os resultados sugerem que a abordagem 1 é a mais indicada para a obtenção de compostos de inclusão MLK: γ -CD por mecanoquímica. Verificou-se ainda que a dissolução do MLK a partir destes compostos atinge mais do dobro dos valores de solubilidade do que o MLK puro, o que poderá contribuir para melhorar a sua eficácia terapêutica.

keywords

Montelukast, γ -cyclodextrin, mechanochemistry, solubility, stability.

abstract

Montelukast sodium (MLK), a widely used anti-asthmatic drug, presents low solubility and some instability to light and humidity, which limit its formulation. In the present work, we investigate the formation of inclusion compounds of MLK and γ -cyclodextrin (γ -CD) as a possible solution for these issues.

The MLK: γ -CD inclusion compounds were formed by mechanochemistry, using three different processes: (1) co-milling an equimolar quantity in a ball mill at 600 cycles.minute⁻¹; (2) pre-milling γ -CD and co-milling with MLK as in 1; (3) co-milling, with amounts as in 1, in a roll oven at low speed, 50 cycles.minute⁻¹. Aliquots were collected at defined timelines and analyzed by powder X-Ray diffraction, solid-state ¹³C{¹H} CP-MAS NMR, scanning electron microscopy, FT-IR spectroscopy, thermogravimetry and differential scanning calorimetry.

The results show that the formation of MLK: γ -CD inclusion compounds occurs preferably under high mechanical energy conditions, as provided by the ball mill. Moreover, it was shown that MLK and γ -CD interact earlier when γ -CD is not pre-milled. In fact, the pre-milling of γ -CD alters the shape of the particles making them more round and thus limiting the interaction with MLK. These results suggest that the process 1 is the most effective, allowing the formation of a MLK: γ -CD inclusion compound from which over twice the amount of MLK dissolves into water as compared to dissolution of pure MLK.

MLK: γ -CD co-milled adducts are thus a promising solution for improving the therapeutic effectiveness of this drug.

Abreviaturas

α-CD	Ciclodextrina Alfa
β-CD	Ciclodextrina Beta
γ-CD	Ciclodextrina Gama
API	Composto ativo, do inglês <i>Active Pharmaceutical Ingredient</i>
AUC	Área sob a curva, do inglês <i>Area Under the Curve</i>
C_{máx}	Concentração máxima
CD	Ciclodextrina
CGTase	Ciclodextrina glicosiltransferase
CP-MAS	Polarização cruzada com rotação segundo o ângulo mágico, do inglês <i>Cross Polarization - Magic Angle Spinning</i>
CysLT	Cistenil leucotrienos
CysLTR	Recetor de Cistenil Leucotrienos, do inglês <i>Cysteinyl Leukotriene Receptor</i>
DIMEB	Heptakis-(2,6-di-O-metil)- β -ciclodextrina
DMF	Dimetilformamida
DSC	Calorimetria diferencial de varrimento, do inglês <i>Scanning Differential Calorimetry</i>
EDS	<i>Energy Dispersive X-ray Spectroscopy</i>
Esteq.	Estequiometria
EtOH	Etanol
FR	Forno de Rolos
Glu	Glutamato
Gly	Glicina
H₂O(dest)	Água destilada
HPβCD	Hidroxipropil- β -ciclodextrina
ICS	Corticosteróides de inalação
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
IV	Infravermelho
LABA	Agonistas adrenérgicos β_2 de longa ação, do inglês <i>Long-Acting Beta-adrenoceptor Agonists</i>
LT	Leucotrienos
LTD₄	Leucotrieno D ₄
MB	Moinho de Bolas planetário

MetOH	Metanol
MLK	Montelucaste de sódio, do inglês <i>sodium Montelukast</i>
NMR	Ressonância Magnética Nuclear, do inglês Nuclear Magnetic Resonance
PEO	Óxido de poli(etileno)
PXRD	Difração de Raios-X de pós, do inglês Powder X-Ray Diffraction
SABA	Agonistas adrenérgicos β_2 de curta ação, do inglês <i>Short-acting Beta-adrenoceptor Agonists</i>
SEM	Microscopia eletrónica de varrimento, do inglês Scanning Electron Microscopy
$t_{m\acute{a}x}$	Tempo necessário para atingir a $C_{m\acute{a}x}$
TGA	Análise termogravimétrica, do inglês <i>ThermoGravimetric Analysis</i>
THF	Tetrahidrofurano
UV	Ultravioleta
Vis	Visível

Lista de Figuras

Introdução

- Figura 1.** Biossíntese dos leucotrienos. Um influxo de íões cálcio ativa a Fosfolipase A_2 que vai atuar sobre os fosfolípidos da membrana nuclear, formando o ácido araquidónico. Este pode sofrer a ação de 2 enzimas, a ciclooxigenase, que leva à formação de prostaglandinas e tromboxanos, e a 5-lipoxigenase que leva à formação do leucotrieno A_4 . Este, por sua vez, é rapidamente convertido em leucotrieno B_4 ou leucotrieno C_4 , que são transportados para o exterior da célula. O leucotrieno C_4 é então sujeito à ação de peptidases, que removem os aminoácidos glutamato (Glu) e glicina (Gly), de forma a produzir o leucotrieno D_4 e o leucotrieno E_4 , respetivamente. (Os elementos celulares presentes nesta imagem foram obtidos em regime de acesso livre, a partir de: Servier Medical Art).6
- Figura 2.** Estrutura química do sal de sódio de montelucaste, um medicamento antagonista de leucotrienos desenvolvido pela Merck [24].7
- Figura 3.** Modo de ação do montelucaste. Tanto o montelucaste como os cistenil leucotrienos (CysLT) (leucotrieno C_4 , leucotrieno D_4 e leucotrieno E_4) se ligam ao mesmo recetor celular, o recetor CysLT₁ (Figura 3a). Uma vez ligado ao recetor, o montelucaste impede a ligação dos CysLT (Figura 3b). (Os elementos celulares presentes nesta imagem foram obtidos em regime de acesso livre, a partir de: Servier Medical Art).7
- Figura 4.** Estrutura molecular e composição, em termos de unidades de glucose, da ciclodextrina alfa, beta e gama (α -, β - e γ -CD) [69].11
- Figura 5.** Estrutura química da β -ciclodextrina, onde estão indicados os hidroxilos secundários ligados aos carbonos 2 e 3 da unidade de glucose (seta 2 e 3), e o hidroxilo primário ligado ao carbono 6 da unidade de glucose (seta 6) (Figura 5a). Na figura 5b está representada a estrutura da ciclodextrina, em forma de cone truncado, estando os hidroxilos secundários virados para a orla maior e o hidroxilo primário virado para a orla menor (adaptado de [77]).12
- Figura 6.** Diferentes estequiometrias possíveis para a formação de compostos de inclusão entre o hóspede e as ciclodextrinas, nomeadamente 1:1 (Figura 6a) e 1:2 (Figura 6b) (adaptado de [75]).....12
- Figura 7.** Transformações mecanoquímicas que ocorrem aquando o processo de moagem de uma mistura de duas substâncias sólidas (adaptado de [94]).15

Resultados e Discussão

- Figura 1.** Estrutura do montelucaste na sua forma neutra, com destaque para o grupo carboxílico (átomos representados por esferas; para o resto da molécula usa-se a representação em wireframe). Redesenhado a partir das coordenadas atómicas do montelucaste [107], usando o software Mercury (v3.7, © CCDC 2001-2015). Por baixo mostra-se a distribuição espacial das moléculas na rede cristalina.21

Figura 2. Numeração dos carbonos, e respectivos hidrogénios, na estrutura molecular do montelucaste de sódio [110].	23
Figura 3. Gráfico de Job obtido para o composto de inclusão entre o montelucaste e a ciclodextrina gama.	24
Figura 4. Difrátogramas da γ -CD, do MLK (difratograma previsto através do software Mercury (v3.7, © CCDC 2001-2015) e do MLK: γ -CD liofilizado.	26
Figura 5. Difrátograma experimental de MLK: γ -CD (liofilizado) e calculado (usando o software Mercury, v3.7, © CCDC 2001-2015) de 1,4,7,10-tetraoxaciclododecano- γ -CD. Em a) está ilustrada a estrutura de empacotamento em forma de canal deste composto de inclusão; e em b) a vista de topo deste empacotamento, onde se mostra que os canais se alinham com os eixos, formando um quadrado, com um grande espaço entre eles.	27
Figura 6. Espectros de ^{13}C NMR da γ -CD, do MLK e do MLK: γ -CD liofilizado. A identificação dos carbonos da γ -CD está indicada na unidade de glucose (adaptado de [115]).	28
Figura 7. Imagem de microscopia eletrónica do MLK: γ -CD liofilizado (a) com detalhe da superfície das partículas (c) e respetiva distribuição de elementos (C, Cl, S e Na) determinada por mapeamento por EDS (b, d).	29
Figura 8. Estrutura molecular do montelucaste de sódio (MLK) evidenciando os grupos de interesse em espectroscopia de infravermelho: a quinolina (a), e os anéis aromáticos (b, c).	29
Figura 9. Espectro de infravermelho, na região $1610\text{-}1580\text{ cm}^{-1}$, do MLK, da γ -CD e do MLK: γ -CD liofilizado.	30
Figura 10. Termogramas da γ -CD, do MLK e do MLK: γ -CD liofilizado.	31
Figura 11. DSC do MLK, da γ -CD e do MLK: γ -CD liofilizado, no intervalo de temperaturas selecionado.	32
Figura 12. Difrátogramas do MLK, da γ -CD e da sua mistura física 1:1 após 0, 5, 15, 30, 60, 120, 360 e 720 min de moagem num moinho planetário.	34
Figura 13. Difrátogramas da γ -CD antes e após 5, 15, 30, 60 e 120 min de moagem num moinho planetário.	35
Figura 14. Difrátogramas da γ -CD e da mistura de MLK: γ -CD (1:1) moída durante 720 min no moinho planetário, coletados imediatamente após a moagem e após 3 meses de armazenamento.	36
Figura 15. Espectros de ^{13}C NMR da γ -CD, do MLK e da sua mistura física 1:1 moída durante 5, 30, 120 e 720 min (num moinho planetário). A identificação dos carbonos da γ -CD está indicada na unidade de glucose (adaptado de [115]).	38
Figura 16. Espectros de ^{13}C NMR da γ -CD não moída e após 120 min de moagem (num moinho planetário). A identificação dos carbonos da γ -CD está indicada na unidade de glucose (adaptado de [115]).	39

Figura 17. Imagens de (a) microscopia eletrônica da mistura MLK:γ-CD (não moída), com a respectiva distribuição de elementos determinada por mapeamento por EDS: (b) enxofre, (c) sódio, (d) cloro e (e) carbono.	40
Figura 18. Imagens de microscopia eletrônica (coluna da esquerda) com respectivo mapeamento (coluna da direita) das amostras MLK:γ-CD moídas por 5 min (a, b), 15min (c, d), 120 min (e, f) e 720 (g, h) num moinho planetário. A distribuição de elementos (C, Cl, S e Na) foi determinada por mapeamento por EDS.	41
Figura 19. Espectro de infravermelho, na região 1620-1580 cm ⁻¹ , do MLK, da γ-CD e de MLK:γ-CD após 5, 15, 30, 60, 120, 360 e 720 min de moagem num moinho planetário.	42
Figura 20. Termogramas da γ-CD, do MLK, da sua mistura física 1:1 (indicada como 0 min) e das amostras MLK:γ-CD moídas durante 5, 30, 120 e 720 min (num moinho planetário).	44
Figura 21. DSC do MLK, da γ-CD e da mistura de MLK:γ-CD moída por 30, 60, 120 e 720 min num moinho planetário, no intervalo de temperaturas selecionado.	45
Figura 22. Difrátogramas do MLK, da γ-CD (sem moagem) e da mistura 1:1 de MLK com γ-CD (pré-moída) aos 0, 5, 10, 15, 25, 30 e 60 min de moagem num moinho planetário.	47
Figura 23. Difrátogramas de MLK:γ-CD(pré-moída) moído 60 min coletados imediatamente após a moagem e após 3 meses de armazenamento.	47
Figura 24. Espectros de ¹³ C NMR da γ-CD, do MLK e da mistura física MLK:γ-CD(pré-moída) 1:1 não moída e moída durante 5, 10, 15, 25, 30 e 60 min (num moinho planetário). A identificação dos carbonos da γ-CD está indicada na unidade de glucose (adaptado de [115]).	48
Figura 25. Imagens de microscopia eletrônica (coluna da esquerda) com respectivo mapeamento (coluna da direita) das amostras MLK:γ-CD(pré-moída) não moídas (a, b) e moídas por 5 min (c, d), 30 min (e, f) e 60 min (g, h) num moinho planetário. A distribuição de elementos (C, Cl, S e Na) foi determinada por mapeamento por EDS.	50
Figura 26. Espectro de infravermelho, na região 1620-1580 cm ⁻¹ , do MLK, da γ-CD e de MLK:γ-CD(pré moída) após 5, 10, 15, 25, 30 e 60 min de moagem conjunta.	51
Figura 27. Termogramas da γ-CD, do MLK, da mistura física MLK:γ-CD(pré-moída) 1:1 (indicada como 0 min) e das amostras MLK:γ-CD(pré-moída) moídas durante 5, 15, 30 e 60 min (num moinho planetário).	52
Figura 28. Termogramas da γ-CD e da γ-CD pré-moída durante 60 min num moinho planetário.	53
Figura 29. Difrátogramas do MLK, da γ-CD e de MLK:γ-CD após 0, 4320, 8640 e 21600 min (0, 3, 6 e 15 dias) de moagem num forno de rolos.	55
Figura 30. Difrátogramas de MLK:γ-CD moído a velocidades diferentes, 600 ciclos.min ⁻¹ no moinho de bolas planetário (MB) e 50 ciclos.min ⁻¹ no forno de rolos (FR): baixo, 216000 ciclos; cima, 432000 ciclos.	55

Figura 31. Espectros de ^{13}C NMR da γ -CD, do MLK e da sua mistura física 1:1 moída durante 4320, 8640 e 21600 min (num forno de rolos). A identificação dos carbonos da γ -CD está indicada na unidade de glucose (adaptado de [115]).	57
Figura 32. Imagens de microscopia eletrónica das amostras MLK: γ -CD moídas por 8640 min (a) e 21600 min (c) num forno de rolos e respetiva distribuição de elementos (C, Cl, S e Na) por mapeamento por EDS (b, d).	58
Figura 33. Espectro de infravermelho, na região 1620-1580 cm^{-1} , do MLK, da γ -CD e de MLK: γ -CD após 4320, 8640 e 21600 min de moagem num forno de rolos.	59
Figura 34. Termogramas da γ -CD, do MLK, da sua mistura física 1:1 (indicada como 0 min) e das amostras MLK: γ -CD moídas durante 0, 4320, 8640 e 21600 min (num forno de rolos).	60
Figura 35. DSC do MLK, da γ -CD e da mistura de MLK: γ -CD moída por 4320, 8640 e 21600 min num forno de rolos, no intervalo de temperaturas selecionado.	61
Figura 36. Gráfico da solubilidade em água do MLK e dos compostos de inclusão MLK: γ -CD obtidos por: moagem durante 120 minutos ou pré-moagem da γ -CD durante 60 minutos, seguido de adição do MLK e moagem por mais 60 minutos (num moinho planetário).	62
Figura 37. Espectro de infravermelho do MLK, em comparação com os dos precipitados formados aquando os ensaios de solubilidade do MLK e dos compostos de inclusão MLK: γ -CD formados por moagem de uma mistura equimolar dos dois componentes, durante 120 min, ou com recurso à pré-moagem da γ -CD, seguido de moagem dos dois componentes durante 60 min.	63

Materiais e Métodos

Figura 1. Numeração dos carbonos, e respetivos hidrogénios, na estrutura molecular do montelucaste de sódio [110].	74
Figura 2. Diferentes modos de preparação dos ensaios de co-precipitação em tubos em U. Na Figura 2a adiciona-se ao mesmo tempo, em cada secção do tubo, uma solução de montelucaste de sódio (MLK) e de ciclodextrina gama (γ -CD). Em b) coloca-se primeiro a solução de γ -CD, à qual é adicionada a solução de MLK. Na Figura 2c o fundo do tubo é preenchido com uma solução de água miliQ:etanol seco ou água miliQ:metanol seco, à qual é depois adicionada em cada secção uma solução de MLK ou de γ -CD.	78
Figura 3. Ilustração da preparação dos ensaios de co-precipitação em tubos em U de duas entradas. A secção horizontal foi preenchida com uma solução de água miliQ:etanol seco (1:2) ou com uma solução de água miliQ:metanol seco (1:2) (Figura 3a). Estas soluções são usadas como interface de contacto entre as soluções de montelucaste de sódio (MLK) e de ciclodextrina gama (γ -CD), que são posteriormente adicionadas nas secções verticais do tubo (Figura 3b) (adaptado de [128]).	79
Figura 4. Numeração dos carbonos do montelucaste de sódio (Figura 4a) e de uma unidade de glucose constituinte da ciclodextrina gama (Figura 4b) (adaptado de [110, 115]).	80

Figura 5. Reta de calibração dos padrões de montelucaste de sódio (MLK), com concentrações compreendidas ente 0.0022 e 0.088 mg/mL.86

Lista de Tabelas

Introdução

Tabela 1. Resumo dos estudos sobre a eficácia da administração do fármaco montelucaste a grupos de pacientes asmáticos, de diferentes escalões etários.	8
Tabela 2. Propriedades da ciclodextrina alfa, beta e gama (α -, β - e γ -CD) [69, 74].	11
Tabela 3. Valores de AUC e $C_{m\acute{a}x}$ obtidos para os fármacos Artimisina, Raloxifeno, Cetoprofeno e Tolbutamida após a formação de compostos de inclusão com ciclodextrinas.	13

Resultados e Discussão

Tabela 1. Variação dos desvios químicos (em ppm) dos prótons 4, 8 e 15 do MLK em soluções com χ_{MLK} compreendidas entre 0/10 e 10/10.	23
Tabela 2. Frequências observadas (cm^{-1}) para MLK e MLK: γ -CD liofilizado.	30
Tabela 3. Frequências observadas (cm^{-1}) para MLK e MLK: γ -CD 720 min.	43
Tabela 4. Frequências observadas (cm^{-1}) para MLK e MLK: γ -CD(pré-moída) 60 min.	51
Tabela 5. Frequências observadas (cm^{-1}) para MLK e MLK: γ -CD 21600 min.	59

Materiais e Métodos

Tabela 1. Experiências de cristalização de montelucaste de sódio.	75
Tabela 2. Condições dos ensaios de co-precipitação, indicando a razão molar (Esteq.) e de massa de cada componente, o volume e tipo de solvente utilizado e a temperatura (T). A coluna à esquerda indica se as soluções foram sujeitas a ultrassons.	76
Tabela 3. Composição das soluções preparadas nos ensaios de co-precipitação onde se observou a formação de cristais.	77
Tabela 4. Dados de $^{13}C\{^1H\}$ CP-MAS NMR da ciclodextrina gama (γ -CD), do montelucaste de sódio (MLK) e das amostras γ -CD:MLK obtidas no ensaio de moagem.	80
Tabela 5. Principais bandas de absorção de IV da ciclodextrina gama (γ -CD), do montelucaste de sódio (MLK) e das amostras γ -CD:MLK obtidas no ensaio de moagem.	81
Tabela 6. Dados de $^{13}C\{^1H\}$ CP-MAS NMR da ciclodextrina gama (γ -CD), do montelucaste de sódio (MLK) e das amostras γ -CD:MLK obtidas no ensaio de pré-moagem.	82
Tabela 7. Principais bandas de absorção de IV da ciclodextrina gama (γ -CD), do montelucaste de sódio (MLK) e das amostras γ -CD:MLK obtidas no ensaio de pré-moagem.	83
Tabela 8. Dados de $^{13}C\{^1H\}$ CP-MAS NMR da ciclodextrina gama (γ -CD), do montelucaste de sódio (MLK) e das amostras γ -CD:MLK obtidas no ensaio de moagem no forno de rolos.	84
Tabela 9. Principais bandas de absorção de IV da ciclodextrina gama (γ -CD), do montelucaste de sódio (MLK) e das amostras γ -CD:MLK obtidas no ensaio de moagem no forno de rolos.	85

Índice

Abreviaturas	XI
Lista de Figuras	XIII
Lista de Tabelas	XIX
Índice	XXI
I. Introdução	1
1. Asma, uma patologia global de tendência crescente	3
1.1. Montelukaste, o antagonista do leucotrieno D ₄	7
1.1.1. <i>Limitações ao uso de Montelukaste</i>	8
1.1.2. <i>Farmacocinética do Montelukaste</i>	9
2. Ciclodextrinas	10
2.1. Compostos de inclusão com ciclodextrinas	11
2.1.1. <i>Alteração das propriedades físico-químicas do hóspede</i>	12
2.1.2. <i>Modulação de parâmetros farmacocinéticos</i>	13
2.2. Preparação de Compostos de inclusão com ciclodextrinas	14
2.2.1. <i>Co-dissolução</i>	14
2.2.2. <i>Mecanoquímica, um método sem solventes</i>	14
2.3. Caracterização de Compostos de inclusão com ciclodextrinas	15
3. Objetivo	17
II. Resultados e Discussão	19
1. O montelukaste e o seu sal sódico: formas cristalinas e amorfas	21
2. Estudo da estequiometria de inclusão de MLK em γ-CD pelo método de Job	23
3. Compostos de inclusão MLK:γ-CD	25
3.1. Liofilização	25
<i>Difração de Raios-X de pós</i>	25
¹³ C{ ¹ H} CP-MAS NMR.....	27
<i>Microscopia eletrónica de varrimento</i>	28
<i>Espectroscopia de Infravermelho</i>	29
<i>Termogravimetria</i>	31
<i>Calorimetria Diferencial de Varrimento</i>	32
3.2. Mecanoquímica	33
I. Moinho Planetário	33
<i>Difração de Raios-X de pós</i>	33
¹³ C{ ¹ H} CP-MAS NMR.....	36

<i>Microscopia eletrónica de varrimento</i>	39
<i>Espectroscopia de Infravermelho</i>	42
<i>Termogravimetria</i>	43
<i>Calorimetria Diferencial de Varrimento</i>	44
II. Moinho planetário com pré-moagem da ciclodextrina gama	46
<i>Difração de Raios-X de pós</i>	46
<i>¹³C{¹H} CP-MAS NMR</i>	48
<i>Microscopia eletrónica de varrimento</i>	49
<i>Espectroscopia de Infravermelho</i>	51
<i>Termogravimetria</i>	52
<i>Calorimetria Diferencial de Varrimento</i>	53
III. Forno de Rolos	54
<i>Difração de Raios-X de pós</i>	54
<i>¹³C{¹H} CP-MAS NMR</i>	56
<i>Microscopia eletrónica de varrimento</i>	57
<i>Espectroscopia de Infravermelho</i>	59
<i>Termogravimetria</i>	60
<i>Calorimetria Diferencial de Varrimento</i>	61
4. Dissolução de MLK a partir dos aductos MLK:γ-CD	62
5. Estabilidade à luz do MLK e dos aductos MLK:γ-CD formados	64
III. Conclusões	65
IV. Perspetivas Futuras	67
V. Materiais e Métodos	69
1. Reagentes	71
2. Técnicas de Caracterização	71
<i>Raios-X de Monocristal</i>	71
<i>Difração de Raios-X de pós (PXRD)</i>	72
<i>¹³C NMR em estado sólido</i>	72
<i>Espectroscopia de Infravermelho</i>	72
<i>Termogravimetria</i>	72
<i>Microscopia eletrónica de Varrimento (SEM)</i>	73
<i>Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC)</i>	73
<i>Análise Elementar</i>	73
<i>¹H NMR em solução</i>	73
<i>Espectroscopia de Ultravioleta-Visível</i>	73
3. Estequiometria do composto de inclusão MLK:γ-CD pelo método de Job	74

4. Formação de cristais de Montelucaste de sódio	74
5. Formação de compostos de inclusão MLK:γ-CD	76
5.1. Difusão em gel de óxido de poli(etileno)	76
5.2. Co-Precipitação	76
5.3. Co-Precipitação em Tubos em U	77
5.4. Mecanoquímica	79
I. Moinho Planetário	79
II. Moinho Planetário com pré-moagem da γ-CD	82
III. Forno de Rolos	84
5.5. Liofilização	85
6. Testes de solubilidade do composto de inclusão MLK:γ-CD formado.....	86
7. Testes de estabilidade do composto de inclusão MLK:γ-CD formado.....	87
VI. Bibliografia.....	89

I. INTRODUÇÃO

O anti-asmático montelucaste de sódio, já disponível para o tratamento da asma, apresenta determinadas limitações ao seu uso, como a instabilidade à luz, a baixa solubilidade e baixa biodisponibilidade. As ciclodextrinas, conhecidas pela sua ação solubilizante de moléculas hidrofóbicas através da formação de compostos de inclusão, apresentam-se como uma solução promissora para contornar as limitações associadas a este fármaco.

1. Asma, uma patologia global de tendência crescente

A asma é uma patologia que afeta uma grande parte da população mundial, cerca de 300 milhões de pessoas, de todas as faixas etárias e etnias, com tendência a crescer em vários países, principalmente nos industrializados [1, 2]. Em Portugal a asma afeta 6.8% da população sendo que 175 mil são crianças. Destas cerca de metade apresenta asma não controlada e, por isso, acarretam, em urgências não programadas, resultantes de episódios de exacerbação asmática, um custo anual para o Sistema Nacional de Saúde que ronda os 40 milhões de euros [3, 4]. Torna-se desta forma necessário desenvolver novos tratamentos, ou modificar os existentes, de modo a que seja possível controlar a asma nestes pacientes, proporcionando-lhes uma melhor qualidade de vida [4].

A asma é de predisposição familiar e está associada a variações alélicas nos genes que codificam citocinas e recetores de citocinas [5, 6], podendo ainda ser induzida por meios gestacionais, como, por exemplo, o tabagismo na gravidez [7, 8]. Por outro lado, alguns autores defendem a hipótese higiénica como uma das causas, ou seja, o aumento do número de indivíduos com asma resultaria duma menor exposição a bactérias e vírus durante a infância [9].

A patologia pode ser desencadeada por diversos estímulos ambientais tais como a exposição à poluição do ar [10], a fumo de tabaco [7, 11] ou a alérgicos de casa (ácaros do pó, pêlos de animais, etc.) [12] e a ingestão de alguns fármacos, tais como a aspirina [13, 14]. Quando expostos a estes estímulos, os pacientes desencadeiam uma resposta inflamatória nas vias respiratórias, que se manifesta por pieira, aperto no peito, falta de ar e tosse [1]. A inflamação está, por sua vez, associada à broncoconstrição (obstrução reversível das vias respiratórias) e à hiper reatividade [15]. Esta faz com que o indivíduo reaja a estímulos que normalmente não provocam uma resposta por parte do sistema imunitário [16]. Por sua vez, a obstrução das vias é desencadeada por mediadores de inflamação e fatores de transcrição que provocam alterações estruturais nos tecidos, nomeadamente o espessamento epitelial para o interior das vias respiratórias, reduzindo o calibre das mesmas [15, 16]. Esta diminuição do calibre das vias deve-se também ao espessamento do músculo liso, que se verificou ser mais acentuado em pacientes com asma severa [17, 18].

Usualmente o tratamento da asma começa com a administração de anti-inflamatórios corticosteróides por via inalável (ICS), de forma a controlar a patologia e os seus sintomas, reduzir o número de ataques de asma e reverter a obstrução nas vias respiratórias [18, 19]. Contudo, por vezes é necessária uma dose maior de ICS para

obter o mesmo tratamento, tendo sido demonstrado que quanto maior a dose diária de ICS, maior a intensidade e percepção dos efeitos secundários [18-21]. A literatura indica ainda que a eficácia do tratamento com ICS diminui com o tempo e, por isso, o controlo da asma torna-se menos eficiente [22]. Sendo assim, como alternativa ao aumento da dose de ICS, pode combinar-se o seu uso com broncodilatadores agonistas adrenérgicos β_2 de longa ação (LABA), capazes de relaxar do músculo liso. Esta opção de tratamento tem-se demonstrado como a mais eficaz, e é a que normalmente é usada para manter a doença estável [18, 19, 23, 24]. Contudo, tal como os ICS, os LABA estão também associados a efeitos secundários tais como câibras musculares e taquicardia. Além disso, o uso apenas de LABA resulta numa inflamação exacerbada, devido à ausência de ação anti-inflamatória para a suprimir [23, 25, 26]. Sendo assim, para além destes fármacos, usados no controlo da patologia, por vezes são necessários fármacos para uma ação mais rápida, de forma a tratar ataques agudos ou o aumento súbito dos sintomas. Para tal, são usados agonistas adrenérgicos β_2 de curta ação (SABA), de atuação rápida, mas de curta duração [1]. No entanto, apesar destes tratamentos se terem demonstrado eficazes no tratamento da asma, existem ainda determinados casos em que o controlo da patologia não é possível, tal como referido inicialmente [18, 19]. Por vezes os pacientes não respondem ou, com o tempo, deixam de responder ao tratamento com ICS [18]. Deste modo, há uma grande necessidade de implementar novos tratamentos para a asma, como por exemplo o uso de antagonistas de mediadores envolvidos no processo inflamatório subjacente. Neste contexto, os antagonistas de leucotrienos, atuando por bloqueio dos seus recetores no músculo liso pulmonar, têm-se mostrado úteis [18, 19].

Os leucotrienos (LT) são mediadores lipídicos pró inflamatórios produzidos por diferentes tipos de células inflamatórias, tais como eosinófilos, basófilos, macrófagos ou mastócitos, quando os pacientes asmáticos são expostos a um dos estímulos referidos anteriormente [27, 28]. A formação destes mediadores é desencadeada por um influxo de iões cálcio Ca^{2+} para o interior da célula, que ativa as enzimas responsáveis pela síntese (ver com mais detalhe na Figura 1) [27-31]. Dos LT produzidos, o cistenil leucotrieno D_4 (LTD_4) é o mais preponderante nos processos patofisiológicos subjacentes à asma, uma vez que é dos principais agonistas do recetor de cistenil leucotrienos ($CysLT_1R$), que se encontra principalmente nas células do músculo liso dos pulmões [24, 28, 30-33]. A ligação do LTD_4 ao recetor desencadeia processos como a broncoconstrição, a hiperreatividade, a proliferação do músculo liso, a produção de muco e a migração de leucócitos, nomeadamente eosinófilos, para as vias respiratórias. Além disso, aumentam o fluxo sanguíneo e a permeabilidade vascular, o que contribui para a formação de

edema [28, 29, 32, 34, 35]. Sendo os corticosteróides incapazes de normalizar os níveis de leucotrienos, têm sido procurados outros fármacos com esta propriedade, com vista a um melhor tratamento da asma [29, 32, 35-37]. Neste contexto, foram desenvolvidos os antagonistas de leucotrienos, que se têm demonstrado eficazes [32]. Estes apresentam elevada seletividade e competitividade para o CysLT₁R, inibindo-o, possuem atividades anti-inflamatória e broncodilatadora [26, 30], melhoram a função pulmonar e contribuem para reduzir os sintomas de pacientes asmáticos [26, 38]. Atualmente já se encontram disponíveis no mercado alguns antagonistas de leucotrienos, sendo que o montelucaste é o que atua mais rapidamente e aparenta ter maior afinidade e seletividade para o recetor CysLT₁ [30, 32].

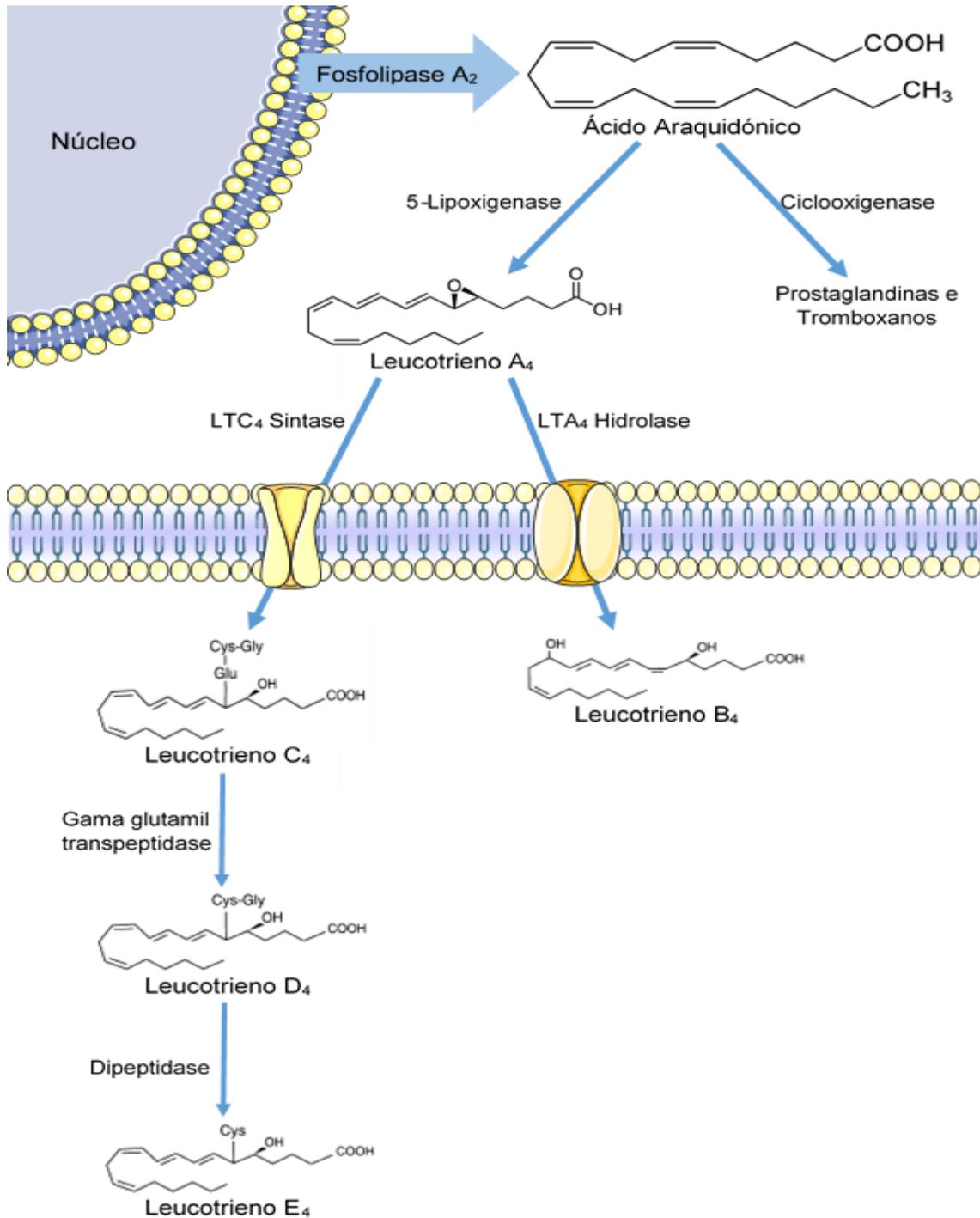


Figura 1. Biossíntese dos leucotrienos. Um influxo de íões cálcio ativa a Fosfolipase A₂ que atua sobre os fosfolípidos da membrana nuclear, formando o ácido araquidónico. Este pode sofrer a ação de 2 enzimas, a ciclooxigenase, que leva à formação de prostaglandinas e tromboxanos, e a 5-lipoxygenase que leva à formação do leucotrieno A₄. Este, por sua vez, é rapidamente convertido em leucotrieno B₄ ou leucotrieno C₄, que são transportados para o exterior da célula. O leucotrieno C₄ é sujeito à ação de peptidases, que removem os aminoácidos glutamato (Glu) e glicina (Gly), de forma a produzir o leucotrieno D₄ e o leucotrieno E₄, respetivamente. (Os elementos celulares presentes nesta imagem foram obtidos em regime de acesso livre, a partir de: *Servier Medical Art*).

1.1. Montelucaste, o antagonista do leucotrieno D₄

O montelucaste (Figura 2) é um antagonista competitivo do LTD₄ [39], atuando, como referido para esta classe de compostos, por inibição do recetor CysLT₁ (Figura 3).

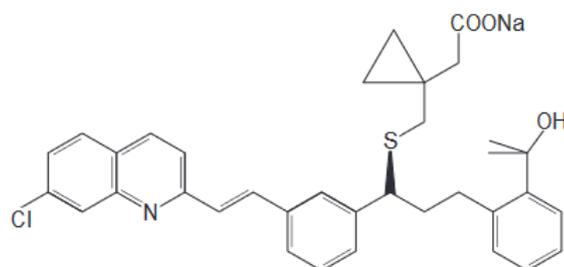


Figura 2. Estrutura química do sal de sódio de montelucaste, um medicamento antagonista de leucotrienos desenvolvido pela Merck [24].

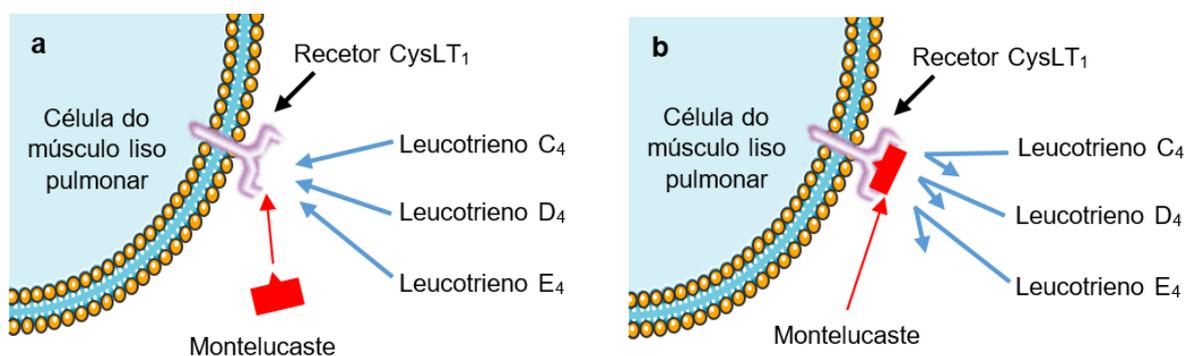


Figura 3. Modo de ação do montelucaste. Tanto o montelucaste como os cistenil leucotrienos (CysLT) (leucotrieno C₄, leucotrieno D₄ e leucotrieno E₄) se ligam ao mesmo recetor celular, o recetor CysLT₁ (Figura 3a). Uma vez ligado ao recetor, o montelucaste impede a ligação dos CysLT (Figura 3b). (Os elementos celulares presentes nesta imagem foram obtidos em regime de acesso livre, a partir de: Servier Medical Art).

Além da melhoria sintomatológica (Tabela 1), o uso de montelucaste permite aos pacientes passar um maior número de dias sem que haja um ataque de asma e uma diminuição da necessidade de tratamento com β_2 agonistas [12, 31, 38, 40-45], inclusivamente no caso de fumadores [46, 47]. Foi ainda demonstrado que o montelucaste reduz a broncoconstrição induzida pela prática de exercício físico, pela exposição a alergénicos e pela ingestão de aspirina [24, 48-50]. Está ainda indicado para uso pediátrico [41] e em tratamentos prolongados. Um estudo longitudinal (de 2 anos) mostrou que o montelucaste permite o controlo da asma ao longo do tempo, não tendo sido observada uma redução da sua eficácia [22].

Tabela 1. Resumo dos estudos sobre a eficácia da administração do fármaco montelukaste a grupos de pacientes asmáticos, de diferentes escalões etários.

Grupo etário	Resultados após a administração de Montelukaste	Referências
6 meses-5 anos	Melhor controlo da asma e das suas exacerbações – consistente entre idades, género e raça	[41, 51]
6-14 anos	Redução dos sintomas asmáticos induzidos pela exposição a gatos	[12]
6-85 anos	Melhor controlo da asma ao longo de 2 anos	[22]
15-45 anos	Maior proteção contra a broncoconstrição induzida pelo exercício físico	[50]
19-45 anos	Redução do teor de eosinófilos no sangue, dos sintomas da asma e da necessidade de β_2 agonistas	[45]
18-55 anos	Melhor controlo da asma em fumadores	[46]

Como substituto dos corticosteróides inaláveis, o montelukaste tem a vantagem de se apresentar em formulações orais (comprimidos ou grânulos) e de não afetar o metabolismo de outros fármacos, tais como os contraceptivos orais e a varfarina [24, 48, 52-55]. Mostrou-se ainda que o tratamento com o montelukaste não influencia a taxa de crescimento dos pacientes, ao contrário dos ICS [21, 56].

1.1.1. Limitações ao uso de montelukaste

As formulações de montelukaste atualmente existentes apresentam, no entanto, determinadas limitações ao seu uso. Por exemplo, na sua forma neutra, o montelukaste apresenta baixa solubilidade em água (0.2-0.5 $\mu\text{g/mL}$, 25 °C), o que foi posteriormente melhorado através da preparação do sal de sódio do montelukaste (100-1000 $\mu\text{g/mL}$), denominado Singulair[®], pela Merck¹. No entanto, o montelukaste é ainda sensível à luz, calor e humidade [58, 59]. A luz leva à sua oxidação para sulfóxido de montelukaste e à isomerização para a forma *cis* [58, 60]. Al Omari *et al.* verificaram que a exposição à luz durante 1 e 4 horas leva à isomerização de 30 e 77 % deste fármaco [58]. Em meio ácido, tal como a exposição a uma solução de 0.1 M de HCl, observou-se uma

¹ O montelukaste foi desenvolvido e comercializado na forma de sal de sódio pela Merck, que tinha exclusividade de produção até Agosto de 2012. Desde então, existem formulações alternativas para este fármaco, disponíveis na forma de genérico. Referência: 57. Merck & Co., Inc. Annual Report Pursuant to Section 13 or 15(d) of the Securities Exchange Act of 1934. 2013. Disponível em: <http://www.merck.com/investors/financials/form-10-k-2012.pdf>. Acedido a: 20 de Outubro de 2015.

degradação de 28.7 e 97.56 % de montelucaste após 30 minutos e 24 horas de exposição, respetivamente. Quando numa solução de 0.1 M de NaOH durante 30 minutos ou 24 horas, verificou-se uma degradação de 2.4 e 19.06 % do fármaco, respetivamente [61, 62]. Esta instabilidade do fármaco é de especial importância no caso dos grânulos de montelucaste. Estes são particularmente úteis na administração em crianças, no entanto, degradam-se rapidamente, tendo por isso de ser administrados após 15 minutos de abrir a embalagem [63, 64]. O uso do fármaco pelo paciente fica, portanto, limitado, sendo, por isso, necessário encontrar soluções que permitam aumentar a sua estabilidade.

1.1.2. Farmacocinética do montelucaste

O montelucaste de sódio, tal como todos os medicamentos que se apresentam na forma de comprimidos, passa por um passo inicial de desagregação, seguido de dissolução parcial do composto ativo (API) e da absorção ao longo do trato gastrointestinal. Estes passos estão, no entanto, dependentes da solubilidade e do coeficiente de partilha óleo/água do fármaco, isto é, da capacidade do API em atravessar a membrana fosfolipídica. Depois de absorvido o montelucaste entra no sistema porta-hepático, e é levado pela veia porta até ao fígado, onde uma determinada fração do mesmo é metabolizada (metabolismo da primeira passagem hepática) antes de alcançar a circulação sistémica. Surge então o conceito de biodisponibilidade, que se refere à fração de montelucaste de sódio que é absorvida e que alcança a circulação sistémica, podendo atuar nos recetores e exercer o seu princípio ativo [65, 66]. No caso do montelucaste, a biodisponibilidade é de aproximadamente 64 %. Isto porque a sua absorção se encontra limitada pela baixa solubilidade, e porque mesmo depois de absorvido o fármaco é sujeito ao metabolismo da primeira passagem hepática [63]. Torna-se desta forma necessário encontrar soluções que permitam ultrapassar estas limitações à biodisponibilidade do fármaco.

2. Ciclodextrinas

As ciclodextrinas (CDs) foram descobertas no final do século XIX, por Villiers, que verificou que o amido quando exposto a *Bacillus amylobacter* era degradado, dando origem a uma substância cristalina. Esta substância apresentava propriedades semelhantes à celulose, sendo por isso denominada de celulosina, de composição química $(C_6H_{10}O_5)_2 \cdot 3H_2O$ e que apresentava elevada atividade ótica. Villiers verificou ainda que se formavam dois tipos de substâncias cristalinas, muito provavelmente as moléculas presentemente conhecidas como ciclodextrina alfa (α -CD) e beta (β -CD). Doze anos mais tarde, Schardinger observou, por digestão bacteriana do amido, a formação de dois produtos cristalinos idênticos às celulosinas identificadas por Villiers. Em estudos posteriores, Schardinger aperfeiçoou os métodos de obtenção dos cristais, agora denominados de dextrinas, analisou as suas propriedades, e isolou o microrganismo responsável pela sua síntese. Posteriormente, Freudenberg e os seus colaboradores demonstraram que as dextrinas eram polissacarídeos cíclicos compostos por unidades de glucose em ligação glicosídica α -(1-4). Além disso, estes autores descobriram e caracterizaram a estrutura de uma nova molécula, a ciclodextrina gama (γ -CD). A partir de 1950 começaram a ser realizados cada vez mais estudos sobre as CDs, de forma a melhorar os processos de produção e purificação, bem como a caracterização das propriedades físico-químicas. Cramer e os seus colaboradores estudaram a capacidade das CDs em formar compostos de inclusão com outras substâncias – os hóspedes. Mais tarde, esta propriedade foi explorada em maior detalhe por Freudenberg, Cramer e Plieninger, notando-se que as CDs permitem proteger os hóspedes da oxidação, melhorar a solubilidade e reduzir a volatilidade. Sendo assim, desde essa altura, cada vez mais estudos têm sido realizados com as CDs, tirando partido das suas propriedades, para aplicações nas mais diversas áreas [67-71].

Presentemente as CDs são obtidas a partir do amido por reação com a enzima ciclodextrina glicosiltransferase (1,4- α -D-glucopiranosil transferase) (CGTase), que é produzida por vários microorganismos, principalmente *Bacillus* sp. [72, 73]. Da reação enzimática resultam, em maior quantidade, as CDs nativas, que são oligossacarídeos cíclicos compostos por seis, sete ou oito unidades de α -D-glucose, em ligação α -(1,4), sendo denominadas de α -, β - e γ -CD, respetivamente (Figura 4) [67, 69, 71, 73, 74]. Na Tabela 2 estão indicadas algumas das propriedades físico-químicas características de cada CD [67, 75].

Tabela 2. Propriedades da ciclodextrina alfa, beta e gama (α -, β - e γ -CD) [69, 74].

	α -CD	β -CD	γ -CD
Número de unidades de glucose	6	7	8
Peso molecular	972	1135	1297
Solubilidade em água (g / 100mL) 25°C	14.5	1.85	23.2
Altura do cone (Å)	7.9±0.1	7.9±0.1	7.9±0.1
Diâmetro externo (Å)	14.6±0.4	15.4±0.4	17.5±0.4
Diâmetro da cavidade (Å)	4.7-5.3	6.0-6.5	7.5-8.3
Volume da cavidade (Å ³)	174	262	427

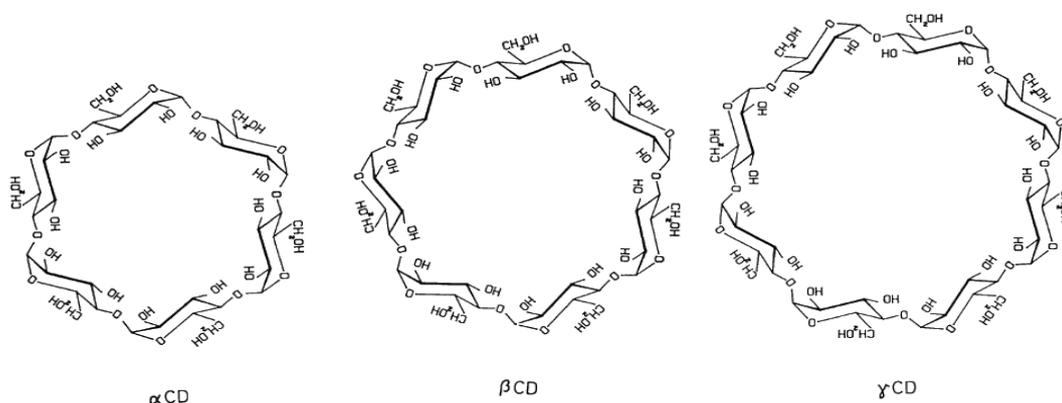


Figura 4. Estrutura molecular e composição, em termos de unidades de glucose, da ciclodextrina alfa, beta e gama (α -, β - e γ -CD) [69].

2.1. Compostos de inclusão com ciclodextrinas

As CDs têm na realidade a forma de um cone truncado, sendo que devido à conformação em 4C_1 das suas unidades de glucose, os grupos hidroxilo das mesmas estão direcionados para as orlas. Isto é, os hidroxilos secundários (ligados aos carbonos 2 e 3, tal como mostra a Figura 5a) estão virados para a orla maior, enquanto os primários (ligados ao carbono 6, tal como mostra a Figura 5a) estão virados para a orla menor do cone (Figura 5b). As orlas apresentam-se, pois, hidrofílicas, o que confere às ciclodextrinas solubilidade em água. As CDs apresentam ainda uma cavidade central hidrofóbica, estando esta forrada pelos prótons ligados aos carbonos 3 e 5 [67, 69, 75].

Na cavidade hidrofóbica das CDs pode ser inserida uma grande variedade de hóspedes, formando compostos de inclusão. Os hóspedes têm apenas de apresentar dimensões e polaridade adequadas à cavidade da CD [69, 74]. Podem deste modo estabelecer-se várias estequiometrias de inclusão, sendo as mais comuns 1:1, 1:2 e 2:1, dependendo do tamanho e estrutura da molécula hóspede em relação à cavidade da CD

(Figura 6) [74]. Moléculas de pequenas dimensões ou de forma alongada, como cadeias alifáticas, são preferencialmente incluídas pela α -CD. A β -CD tem uma cavidade que permite acomodar anéis aromáticos simples (ou não mais largos do que o benzeno), e finalmente a γ -CD é apropriada para a inclusão de moléculas de maior tamanho, tal como o montelucaste acima referido [74, 76]. Aquando da formação destes compostos de inclusão não ocorre a formação ou quebra de ligações covalentes, sendo que apenas se estabelecem interações electrostáticas, ligações de van der Waals e efeito hidrofóbico, entre os hóspedes e a cavidade hidrofóbica, podendo também ocorrer pontes de hidrogénio entre os grupos hidroxilo localizados nas orlas da ciclodextrina e o grupo carboxílico do montelucaste [72].

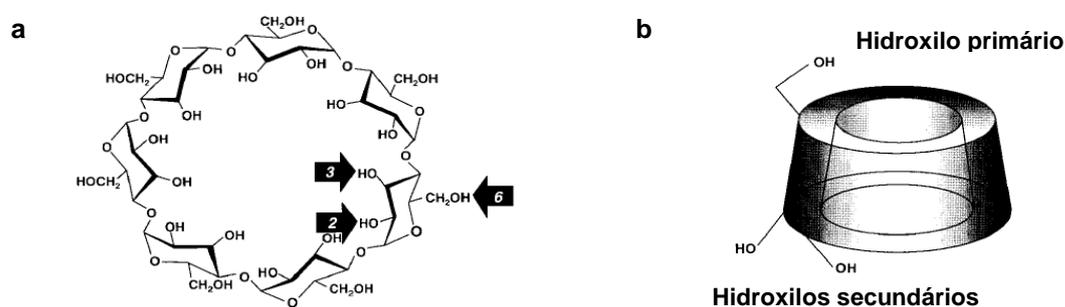


Figura 5. Estrutura química da β -ciclodextrina, onde estão indicados os hidroxilos secundários ligados aos carbonos 2 e 3 da unidade de glucose (seta 2 e 3), e o hidroxilo primário ligado ao carbono 6 da unidade de glucose (seta 6) (Figura 5a). Na figura 5b está representada a estrutura da ciclodextrina, em forma de cone truncado, estando os hidroxilos secundários virados para a orla maior e o hidroxilo primário virado para a orla menor (adaptado de [77]).

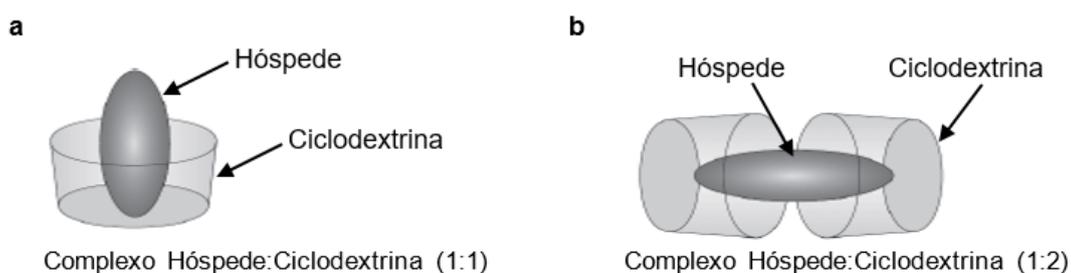


Figura 6. Diferentes estequiometrias possíveis para a formação de compostos de inclusão entre o hóspede e as ciclodextrinas, nomeadamente 1:1 (Figura 6a) e 1:2 (Figura 6b) (adaptado de [75]).

2.1.1. Alteração das propriedades físico-químicas do hóspede

A inclusão em CDs permite, conforme foi mencionado na introdução desta secção, alterar algumas propriedades físico-químicas do hóspede. Para a área farmacêutica, são de particular relevância o aumento da solubilidade, a capacidade de mascarar sabores amargos e o aumento da estabilidade à luz, temperatura, oxidação e até degradação microbiológica [77-80].

No caso do montelucaste de sódio, a inclusão foi estudada com a *Heptakis*-(2,6-di-O-metil)- β -ciclodextrina (DIMEB) [81] e com a hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD), tendo este hospedeiro permitido aumentar a solubilidade. A HP β CD permitiu ainda aumentar a estabilidade do fármaco ao longo do tempo, tendo-se verificado que menos de 1% do mesmo se degradava e que não se formava precipitado após 2 meses de armazenamento [59]. No presente trabalho pretende-se estudar a inclusão de montelucaste de sódio com a ciclodextrina gama. Sobre este sistema hóspede-hospedeiro, pouco está descrito, apenas sendo mencionado o uso de γ -CD para separar, em eletroforese capilar, o montelucaste das suas impurezas, através da formação de um composto de inclusão [76].

2.1.2. Modulação de parâmetros farmacocinéticos

A formação de compostos de inclusão com ciclodextrinas permite também aumentar a biodisponibilidade de fármacos, tal como demonstrado nos estudos indicados na Tabela 3. Tipicamente, medem-se parâmetros representativos da quantidade de fármaco presente na circulação sistémica: a AUC (área sob a curva), indicativa da quantidade total de fármaco presente na circulação sistémica ao longo do tempo de observação; a $C_{m\acute{a}x}$ (concentração máxima), o valor de concentração máxima que se atinge durante o tempo de observação, e o $t_{m\acute{a}x}$ (tempo necessário para atingir a $C_{m\acute{a}x}$) [65, 71, 82, 83].

Tabela 3. Valores de AUC e $C_{m\acute{a}x}$ obtidos para os fármacos Artemisina, Raloxifeno, Cetoprofeno e Tolbutamida após a formação de compostos de inclusão com ciclodextrinas.

	AUC_{0-∞} (ng.h/mL)	C_{máx} (ng/mL)	Referência
Artemisina	782.3	271.7	[84]
Artemisina: β -CD	1329.4	651.5	
Artemisina: γ -CD	1131.3	458.1	
	AUC_{0-24h} (ng.h/mL)	C_{máx} (ng/mL)	
Raloxifeno	452.46	39.52	[85]
Raloxifeno: β -CD	878.64	83.49	
	AUC_{0-8h} (μg.h/mL)	C_{máx} (μg/mL)	
Cetoprofeno	17.33	7.55	[86]
Cetoprofeno: β -CD	44.41	46.69	
Cetoprofeno:HP β CD	50.14	45.36	
	AUC_{0-∞} (μg.h/mL)	C_{máx} (μg/mL)	
Tolbutamida	443.96	18.58	[87]
Tolbutamida: β -CD	621.62	36.26	
Tolbutamida:HP β CD	654.63	34.99	

O aumento dos valores de AUC e $C_{m\acute{a}x}$ referidos na Tabela 3 s\~{a}o atribu\~{i}dos \~{a} capacidade das CDs em aumentar a solubilidade e conseq\~{u}ente dissolu\~{c}\~{a}o do f\~{a}rmaco, ficando mais quantidade dispon\~{i}vel junto da membrana biol\~{o}gica e permitindo uma maior absor\~{c}\~{a}o [84, 86, 88, 89]. Postula-se ainda que, o aumento da absor\~{c}\~{a}o do f\~{a}rmaco possa, por sua vez, levar \~{a} satura\~{c}\~{a}o das enzimas envolvidas no metabolismo da primeira passagem hep\~{a}tica. Podendo assim aumentar a concentra\~{c}\~{a}o de f\~{a}rmaco na circula\~{c}\~{a}o sist\~{e}mica [84]. Sendo assim, e tendo em conta a baixa solubilidade do montelucaste, tal como referido anteriormente, espera-se que a forma\~{c}\~{a}o de compostos de inclus\~{a}o entre este f\~{a}rmaco e a γ -CD permita aumentar a sua solubilidade e conseq\~{u}ente biodisponibilidade, tal como se verificou nos f\~{a}rmacos referidos.

2.2. Preparação de compostos de inclus\~{a}o com ciclodextrinas

2.2.1. Co-dissolu\~{c}\~{a}o

A forma\~{c}\~{a}o dos compostos de inclus\~{a}o entre as ciclodextrinas e o h\~{o}spede depende das propriedades deste. Caso o h\~{o}spede seja sol\~{u}vel em \~{a}gua, ele \~{e} adicionado a uma solu\~{c}\~{a}o aquosa concentrada de ciclodextrina. Por outro lado, caso o h\~{o}spede seja insol\~{u}vel em \~{a}gua, ele \~{e} dissolvido num solvente org\~{a}nico (etanol, metanol, etc.), sendo depois adicionado a uma solu\~{c}\~{a}o aquosa concentrada de CD [90]. Ap\~{o}s a dissolu\~{c}\~{a}o da CD e do h\~{o}spede, o composto de inclus\~{a}o pode ser obtido por liofiliza\~{c}\~{a}o ou co-precipita\~{c}\~{a}o. A primeira t\~{e}cnica \~{e} utilizada para compostos sens\~{i}veis \~{a} hidr\~{o}lise e que n\~{a}o podem permanecer durante muito tempo em solu\~{c}\~{a}o. Nesta t\~{e}cnica a solu\~{c}\~{a}o de CD e h\~{o}spede \~{e} congelada instantaneamente e depois sujeita a press\~{o}es reduzidas, o que permite a remo\~{c}\~{a}o gradual do solvente [91, 92]. Na t\~{e}cnica de co-precipita\~{c}\~{a}o ocorre o arrefecimento lento da solu\~{c}\~{a}o onde se encontra a CD e o h\~{o}spede, sendo que quando a temperatura baixa a solu\~{c}\~{a}o atinge o limite de solubilidade e o composto de inclus\~{a}o precipita [71, 79, 80, 92].

2.2.2. Mecanoqu\~{i}mica, um m\~{e}todo sem solventes

As rea\~{c}\~{o}es s\~{o}lido-s\~{o}lido por a\~{c}\~{a}o mecanoqu\~{i}mica trazem a vantagem de n\~{a}o utilizar solventes, em contraponto com os processos cl\~{a}ssicos de prepara\~{c}\~{a}o de compostos de inclus\~{a}o, anteriormente descritos. De facto, a co-dissolu\~{c}\~{a}o implica sempre uma fase de secagem do excesso de \~{a}gua (mesmo quando h\~{a} um precipitado), com custos energ\~{e}ticos elevados.

Uma rea\~{c}\~{a}o mecanoqu\~{i}mica define-se, segundo a Uni\~{a}o Internacional de Qu\~{i}mica Pura e Aplicada (IUPAC) como uma rea\~{c}\~{a}o qu\~{i}mica induzida pela absor\~{c}\~{a}o de energia

mecânica. Esta energia mecânica provém de técnicas tais como a moagem, que pode ser manual, com um almofariz e um pilão, ou com recurso, por exemplo, a um moinho planetário, o que permite fornecer mais energia ao sistema [93]. Durante a moagem, o tamanho das partículas dos componentes da mistura é gradualmente reduzido, formando-se agregados mistos onde os componentes interagem a nível molecular. Este processo permite a formação de novos compostos e de aductos intermoleculares (Figura 7) [94].

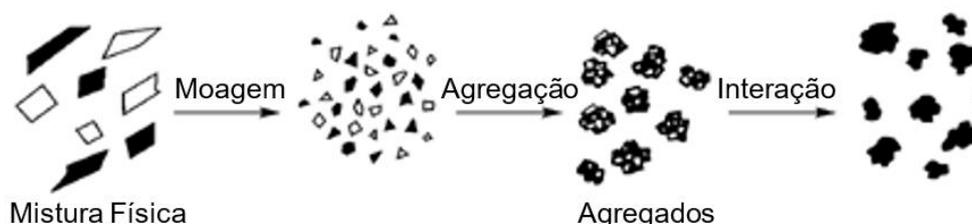


Figura 7. Transformações mecanoquímicas que ocorrem aquando o processo de moagem de uma mistura de duas substâncias sólidas (adaptado de [94]).

A mecanoquímica já foi, com sucesso, usada na preparação de alguns compostos de inclusão com CDs:

- ✓ β -CD e esteróis [95]
- ✓ β -CD e glimepiride [96]
- ✓ DIMEB e gemfibrozil [97]
- ✓ HP β CD e loratadina [98]
- ✓ HP β CD e puerarin [99]

Mais ainda, alguns destes compostos de inclusão apresentam, tal como aqueles obtidos pelos métodos tradicionais, propriedades físico-químicas melhoradas. A inclusão de glimepiride na β -CD permitiu aumentar a sua solubilidade [96], e para o composto HP β CD-puerarin observou-se solubilidade e taxa de dissolução notavelmente mais elevadas, comparativamente com a formulação comercial [99].

2.3. Caracterização dos compostos de inclusão com ciclodextrinas

Os compostos de inclusão obtidos podem ser caracterizados mediante uma ampla variedade de técnicas analíticas, cujos resultados devem ser combinados e avaliados em conjunto, de forma a obter informação compreensiva sobre o composto de inclusão formado. Atualmente existem diversas técnicas disponíveis para a análise dos compostos de inclusão na forma de material sólido: análise termogravimétrica (TGA), calorimetria diferencial de varrimento (DSC), ressonância magnética nuclear (NMR) de estado sólido

(é normalmente efetuado o espectro monodimensional de ^{13}C , recorrendo-se à técnica de polarização cruzada e rotação em torno do ângulo mágico (CP-MAS)), técnicas de difração de raios-X, de pós ou, quando estes estão disponíveis, de monocristais, a microscopia eletrónica de varrimento (SEM) e a espectroscopia vibracional, nomeadamente a de infravermelho (IV). No curso do trabalho descrito nesta tese, serão ainda efetuados alguns ensaios de caracterização em meio líquido, nomeadamente por espectroscopia de ultravioleta-visível (UV-Vis) e por NMR monodimensional de protão (^1H) [71, 74, 78-80, 90].

Por análise termogravimétrica é possível observar mudanças na temperatura de decomposição de um composto de inclusão relativamente às dos seus componentes (ciclodextrina ou hóspede puro) [100, 101]. É ainda comum que a inclusão do hóspede resulte em alterações na temperatura a que ocorrem normalmente as suas mudanças de fase, o que é observável por DSC [97, 102, 103].

Relativamente a técnicas de difração de raios-X, por monocristal, a partir de um cristal do composto de inclusão é possível determinar aproximadamente a estrutura do mesmo. Isto é, a partir de mapas de densidade eletrónica é possível determinar as coordenadas dos átomos do composto de inclusão, no seu arranjo tridimensional. A partir destas coordenadas, e com recurso a *softwares* matemáticos, é possível resolver a possível estrutura do composto de inclusão, bem como verificar de que modo é que o hóspede interage com a CD e se ele está total ou parcialmente inserido na sua cavidade. Quando não é possível obter cristais do composto de inclusão é utilizada a difração de raios-X de pós (PXRD). Esta técnica permite avaliar a cristalinidade da amostra que, no caso da mecanoquímica, vai diminuindo devido à moagem, ficando mais amorfa. Pode ainda observar-se o aparecimento de uma fase cristalina nova, ou seja, com reflexões a ângulos diferentes daqueles observados para a CD e o hóspede. Nestes casos, por comparação com difratogramas de compostos de inclusão modelo, e verificando-se a ocorrência de isoestruturalidade, pode-se postular que se formou um composto de inclusão com um arranjo espacial idêntico ao do composto modelo [90, 101, 104, 105].

A espectroscopia de infravermelho permite-nos avaliar a integridade estrutural do composto formado. Caso não apareçam sinais do hóspede em regiões espectrais onde não se observem bandas da CD, então é provável que o hóspede se tenha degradado. Através desta análise podemos ainda confirmar a formação do composto de inclusão, usando grupos característicos do hóspede como sondas de inclusão (no caso do montelucaste, o grupo quinolina). Estes grupos encontram-se numa zona espectral livre de bandas da CD sendo, por isso, fáceis de observar. Aquando da formação do

composto de inclusão estes grupos sofrem comumente desvios na frequência vibracional, devido a uma alteração na polaridade do ambiente onde a molécula se encontra [90, 98, 101].

Em $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ CP-MAS NMR é possível observar alterações na ressonância dos carbonos da ciclodextrina e do hóspede, nomeadamente uma perda da sua multiplicidade aquando a formação do composto de inclusão [106]. Por sua vez a partir de ^1H NMR é possível observar alterações nos desvios químicos dos prótons da CD (H3 e H5) e do hóspede, que se encontram dentro da cavidade, aquando a formação do composto de inclusão [71, 74, 78, 90, 101].

Quanto à microscopia eletrónica de varrimento, esta permite-nos analisar alterações na morfologia dos compostos formados relativamente aos seus componentes. Através de *Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDS) mapping*, é ainda possível verificar a homogeneidade da amostra, uma vez que o montelucaste utilizado neste trabalho apresenta grupos característicos (S, N, Na e Cl) que não estão presentes nas CDs [101, 105].

3. Objetivo

Nesta tese pretende-se formar compostos de inclusão entre o montelucaste de sódio e a γ -ciclodextrina, de modo a melhorar as propriedades físico-químicas do fármaco, nomeadamente a sua estabilidade e solubilidade (o que poderá contribuir para aumentar a biodisponibilidade). Os compostos de inclusão serão formados através de técnicas usuais de co-dissolução (a co-precipitação e a liofilização), em comparação com a mecanoquímica, que é uma técnica que se tem demonstrado promissora na formação de compostos de inclusão, e que apresenta a vantagem de não utilizar solventes.

II. Resultados e Discussão

A formação do composto de inclusão MLK: γ -CD foi inicialmente analisada em meio líquido, com recurso ao método de Job, tendo-se verificado uma estequiometria preferencial de inclusão de 1:1. Tendo em conta esta razão estequiométrica, foram formados compostos de inclusão MLK: γ -CD por liofilização e mecanoquímica. O composto obtido por liofilização era cristalino, e a sua caracterização demonstrou evidências da formação do composto de inclusão MLK: γ -CD. Os compostos formados por mecanoquímica demonstraram características bastante distintas entre si, consoante o procedimento adotado. Isto é, a moagem de uma mistura equimolar dos componentes tal como recebidos, num moinho planetário, resultou na formação de um aducto MLK: γ -CD amorfo, cuja caracterização sugere que se formou um composto de inclusão, tal como na liofilização. No entanto, se a γ -CD for pré-moída antes da moagem conjunta com MLK, consegue-se obter um composto amorfo num tempo total de moagem mais curto embora os componentes não interajam de imediato. Esta interação parece ser também limitada no forno de rolos, onde a energia mecânica é menor, e, por isso, os compostos formados apresentavam ainda cristalinidade proveniente da γ -CD. Por fim, verificou-se que a dissolução do MLK a partir dos compostos formados no moinho planetário permitiu aumentar a solubilidade do fármaco.

1. O montelucaste e o seu sal sódico: formas cristalinas e amorfas

O montelucaste é uma molécula com vários grupos funcionais, destacando-se o ácido carboxílico (Figura 1) que permite, conforme referido na Introdução, a formação de sais, que apresentam alterações na solubilidade e grau de cristalinidade. A forma neutra do montelucaste foi descrita em 2009 e cristaliza no grupo $P2_1$. Neste sistema cristalino duas moléculas de montelucaste, em orientação antiparalela, interagem por empilhamento π dos grupos quinolina. Por seu turno estes dímeros estabelecem pontes de hidrogénio entre o azoto do grupo quinolina e grupo carboxílico da molécula vizinha [107].

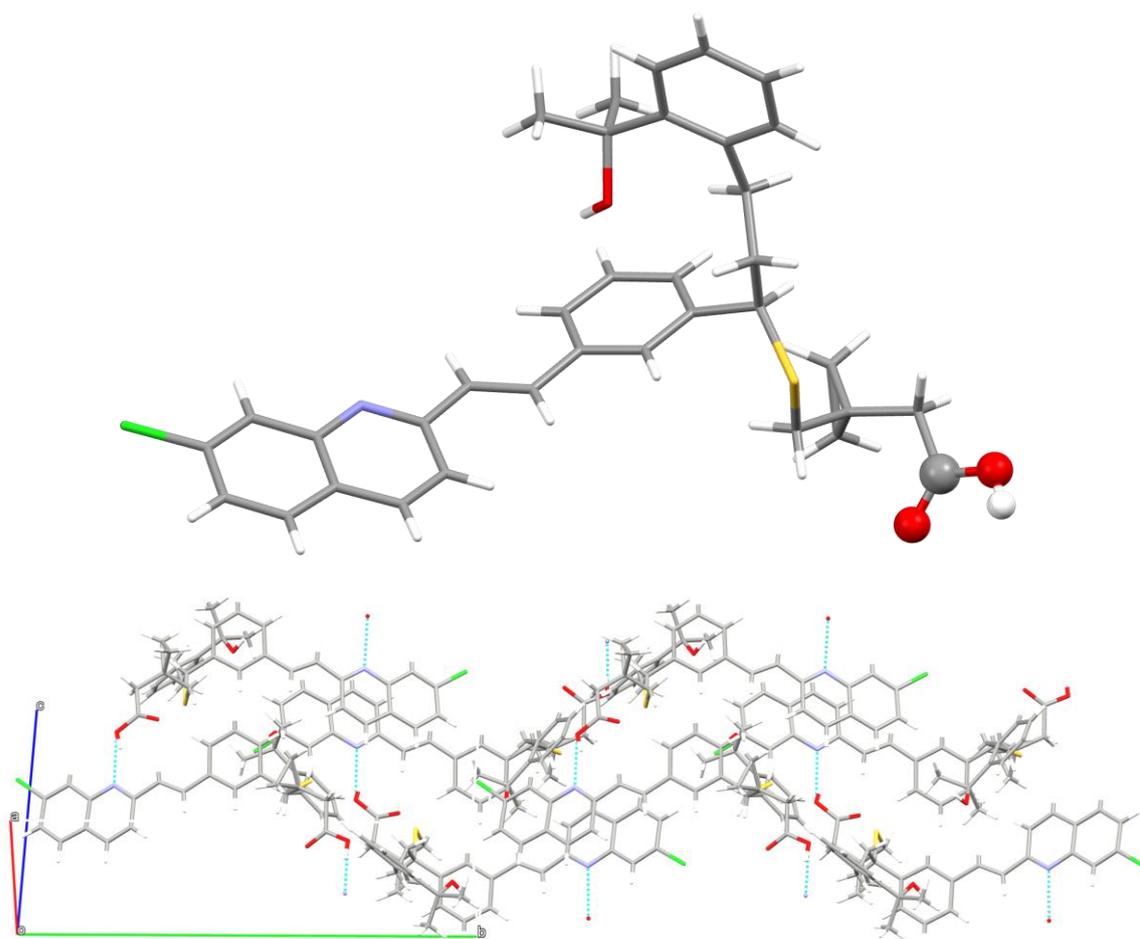


Figura 1. Estrutura do montelucaste na sua forma neutra, com destaque para o grupo carboxílico (átomos representados por esferas; para o resto da molécula usa-se a representação em wireframe). Redesenhado a partir das coordenadas atómicas do montelucaste [107], usando o software Mercury (v3.7, © CCDC 2001-2015). Por baixo mostra-se a distribuição espacial das moléculas na rede cristalina.

O sal sódico de montelucaste é o mais usado na indústria pela sua maior solubilidade e por se conseguir obter na forma amorfa. Estão também descritas várias formas cristalinas do mesmo (polimorfos) obtidas por recristalização em solventes como o acetonitrilo (formas A e B) [108] ou misturas de solvente polar com um antisolvente (formas C a E) [109]; no entanto, estes materiais foram apenas isolados na forma de pó microcristalino, não sendo, portanto, conhecida a sua estrutura. Deste modo, foram efetuados estudos de cristalização do montelucaste de sódio (MLK) dissolvendo pequenas quantidades deste material em diferentes solventes ou misturas de solventes (detalhes na Tabela 1 da secção experimental).

Foi possível observar a formação de pequenos cristais em água destilada, mas as suas dimensões eram demasiado reduzidas para a análise por difração de raios-X de monocristal. Nas soluções de etanol e metanol + acetonitrilo formaram-se poucos cristais, mas de maiores dimensões. No entanto, estes não difratavam o suficiente para serem analisados por raios-X de monocristal. Usando misturas de água destilada e outros solventes, observaram-se cristais de pequenas dimensões em água destilada + etanol + metanol (2:1:2) e outros maiores em água destilada + etanol (1:1) ou água destilada + metanol + acetonitrilo (4:5:1). No entanto, após coletados os dados cristalográficos foi demonstrado que estes cristais correspondiam não ao sal de sódio inicialmente dissolvido, mas à forma neutra do montelucaste, o que demonstra que ocorreu uma troca do ião sódio por um próton presente nos solventes.

As cristalizações subsequentes foram, portanto, feitas com solventes secos e água miliQ para evitar protonação do MLK (detalhes na Tabela 1 da Secção Experimental). Em todos os casos em que se formaram cristais, estes apresentavam forma irregular, dimensões muito pequenas ou baixo índice de difração sob o feixe de raios-X. Cristais isolados de água miliQ + 1,4-Dioxano (1:1), quando analisados por raios-X de monocristal revelaram, mais uma vez, ocorrência de reconversão à forma neutra do montelucaste. Foram ainda testados solventes deuterados, tendo-se formado material policristalino ou, mais uma vez, cristais de montelucaste neutro, devido provavelmente à presença de água como contaminante nos solventes deuterados.

Na cristalização a partir de um cogumelo de cristalização, foram colocadas nos vários compartimentos diferentes soluções de MLK, assim como água miliQ no poço do cogumelo (tal como descrito no ponto 4 da secção experimental). No entanto, formaram-se apenas precipitados amorfos.

2. Estudo da estequiometria de inclusão de MLK em γ -CD pelo método de Job

Aquando da formação dos compostos de inclusão podem estabelecer-se diferentes estequiometrias entre o montelucaste e a ciclodextrina gama, como por exemplo 1:1, 1:2 ou 2:1 de γ -CD:MLK. Sendo assim, de forma a determinar qual ou quais as estequiometrias mais favoráveis para este sistema hóspede:hospedeiro foi aplicado o método das variações contínuas, comumente designado pelo nome do seu criador – método de Job. Foram preparadas soluções com uma fração molar de MLK compreendida entre 0/10 e 10/10 (com intervalos de 1/10, ver detalhes no ponto 3 da secção experimental). As soluções foram analisadas por ^1H NMR, tendo-se acompanhado os desvios químicos dos prótons atribuídos ao MLK. Na Tabela 1 estão indicados os valores para os prótons H4, H8 e H15 do MLK (ver numeração no esquema representado na Figura 2).

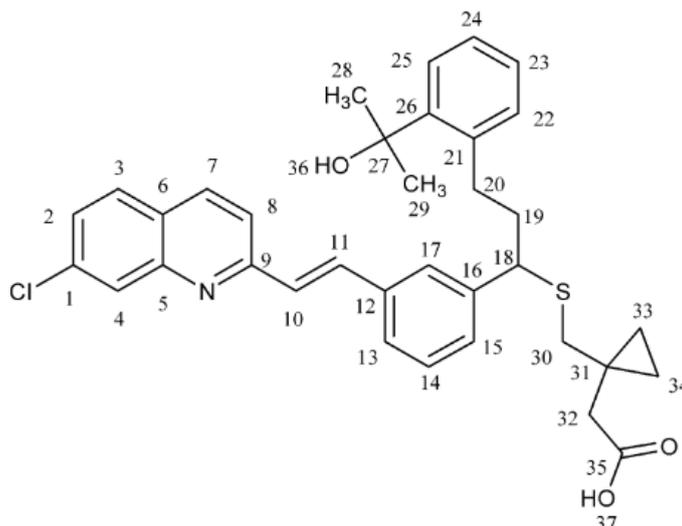


Figura 2. Numeração dos carbonos, e respetivos hidrogénios, na estrutura molecular do montelucaste de sódio [110].

Tabela 1. Variação dos desvios químicos (em ppm) dos prótons 4, 8 e 15 do MLK em soluções com χ_{MLK} compreendidas entre 0/10 e 10/10.

χ_{MLK}	δH4	$\Delta\delta\text{H4}$	δH8	$\Delta\delta\text{H8}$	δH15	$\Delta\delta\text{H15}$
0/10	0	0	0	0	0	0
1/10	8.310	0.042	7.970	0.031	7.475	0.036
2/10	8.306	0.038	7.967	0.028	7.471	0.032
3/10	8.302	0.034	7.964	0.025	7.468	0.029
4/10	8.297	0.029	7.960	0.021	7.464	0.025
5/10	8.292	0.024	7.957	0.018	7.459	0.020
6/10	8.287	0.019	7.953	0.014	7.455	0.016
7/10	8.282	0.014	7.949	0.010	7.451	0.012
8/10	8.279	0.011	7.946	0.007	7.448	0.009
9/10	8.269	0.001	7.939	0	7.442	0.003
10/10	8.268	0	7.939	0	7.439	0

Na Figura 3 está representado o gráfico de Job, que permite determinar a estequiometria do composto de inclusão MLK: γ -CD. Esta é indicada pelo valor da χ_{MLK} em que $\Delta\delta \times \chi_{MLK}$ é máximo. O gráfico da Figura 3 apresenta um máximo para $\chi_{MLK} = 5$, o que indica uma estequiometria de 1:1. Nota-se ainda um ombro a $\chi_{MLK} = 8$, correspondendo a uma estequiometria de MLK: γ -CD de 4:1 (o que é altamente improvável). Mais ainda, no protão H15, observa-se outro ombro a $\chi_{MLK} = 4$, indicando a possível ocorrência de compostos MLK: γ -CD de estequiometria 2:3. No entanto, estas espécies serão minoritárias em solução e pouco prováveis de ocorrer em estado sólido, pelo que nos estudos de interação por mecanoquímica se optou por usar uma proporção inicial de 1:1.

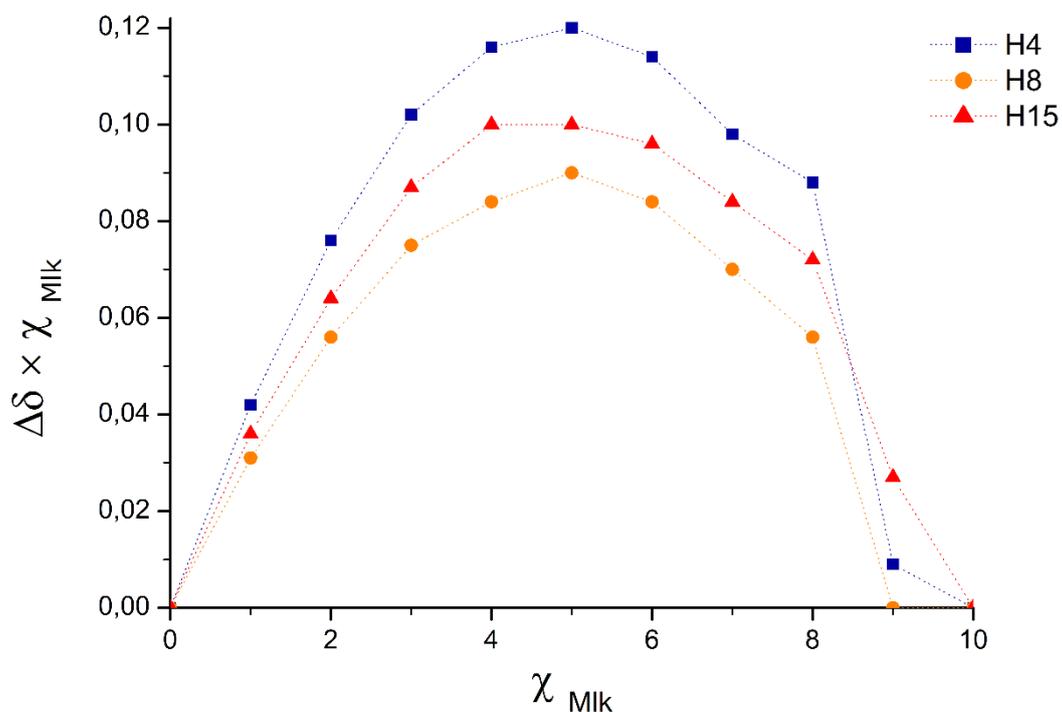


Figura 3. Gráfico de Job obtido para o composto de inclusão entre o montelucaste e a ciclodextrina gama.

3. Compostos de inclusão MLK: γ -CD

O principal objetivo deste trabalho é estudar a interação entre estes dois componentes no estado sólido por ação de energia mecânica, que se espera que leve à formação de aductos de caráter tendencialmente amorfo. Ainda assim, estudos deste sistema no estado cristalino não foram descurados, dado que a obtenção de cristais do composto de inclusão MLK: γ -CD permite determinar a sua estrutura e obter informação sobre a geometria de inclusão, as interações que o MLK estabelece com a γ -CD e se está total ou parcialmente inserido na sua cavidade. Além disso, a obtenção de cristais do composto de inclusão permite conhecer inequivocamente a estequiometria preferencial no estado sólido, visto que embora os dados de solução (método de Job) apontem uma inclusão tendencialmente 1:1, não excluem a ocorrência de espécies hóspede-hospedeiro com outra razão estequiométrica. Sendo assim, foi tentada a obtenção de cristais do composto de inclusão por co-precipitação, com recurso a diferentes misturas de solventes, temperaturas, proporção dos componentes e, por vezes, com recurso a ultrassons (detalhes na secção Experimental). Foram ainda testadas técnicas de cristalização em tubos em U, no entanto, apesar das diferentes condições, os cristais formados não se revelaram adequados para análise por raios-X de monocristal, sendo, na maioria dos casos, agregados de placas muito finas.

3.1. Liofilização

A liofilização é uma técnica usualmente aplicada na formação de compostos de inclusão. Por co-dissolução com subsequente liofilização, consegue-se obter o composto de inclusão MLK: γ -CD substancialmente puro, podendo os resultados da sua caracterização ser usados como modelo para os ensaios de mecanoquímica.

Foram preparadas, em separado, uma solução de MLK em etanol seco e outra de γ -CD em água miliQ. As soluções foram seguidamente misturadas e congeladas em azoto líquido, sendo por fim colocadas num liofilizador (para mais detalhes consultar o ponto 5.5 da secção experimental). O MLK: γ -CD liofilizado obtido foi analisado por diversas técnicas de caracterização no estado sólido, cujos resultados, quando analisados em conjunto, nos permitem confirmar a formação do composto de inclusão.

Difração de Raios-X de pós

O difratograma do MLK: γ -CD liofilizado foi comparado com o da γ -CD e com o do MLK (Figura 4). Dado que o MLK se apresenta na forma amorfa, o difratograma da fase

cristalina mais abundante foi calculado usando o *software* Mercury (v3.7, © CCDC 2001-2015) aplicado às coordenadas atômicas da forma neutra do montelucaste já descrita. Note-se que o MLK: γ -CD liofilizado apresenta reflexões em posições diferentes das do MLK e da γ -CD, o que sugere a formação de um composto de inclusão. Note-se ainda a ausência de reflexões associadas a fases cristalinas dos componentes, o que constitui uma indicação inicial da pureza do aducto.

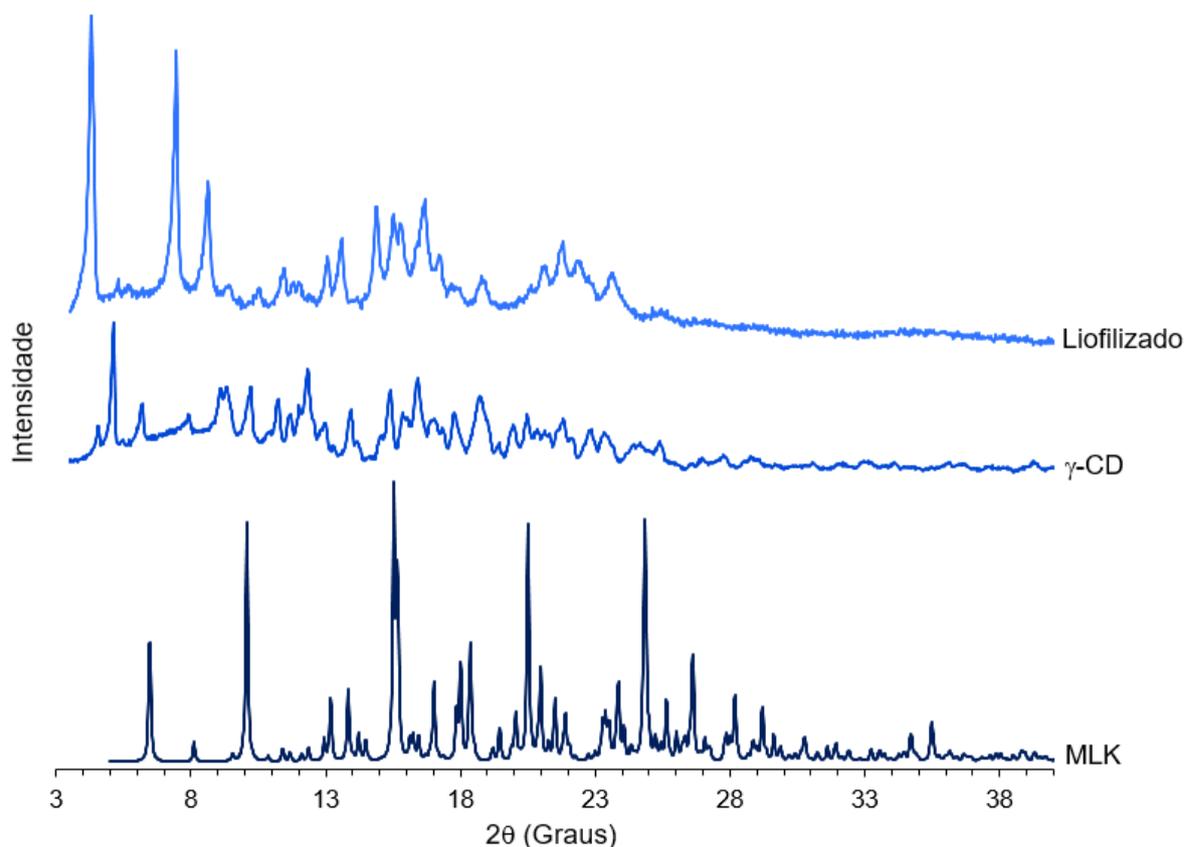


Figura 4. Difratogramas da γ -CD, do MLK (difratograma previsto através do software Mercury (v3.7, © CCDC 2001-2015) e do MLK: γ -CD liofilizado.

De forma a determinar as propriedades da estrutura cristalina do composto de inclusão MLK: γ -CD formado por liofilização, o seu difratograma foi comparado com o do composto de inclusão 1,4,7,10-tetraoxaciclododecano- γ -CD, cuja estrutura cristalina já é conhecida [111] (Figura 5). Verificou-se assim que algumas das reflexões apresentadas pelo composto de inclusão modelo, assinaladas na Figura 5, estão posicionadas a valores de 2θ iguais aos de determinadas reflexões do MLK: γ -CD liofilizado. Sabendo-se que o composto de inclusão modelo apresenta uma estrutura cristalina com as ciclodextrinas empacotadas em canal (Figura 5a, b), sugere-se que MLK: γ -CD liofilizado apresente também este tipo de empacotamento.

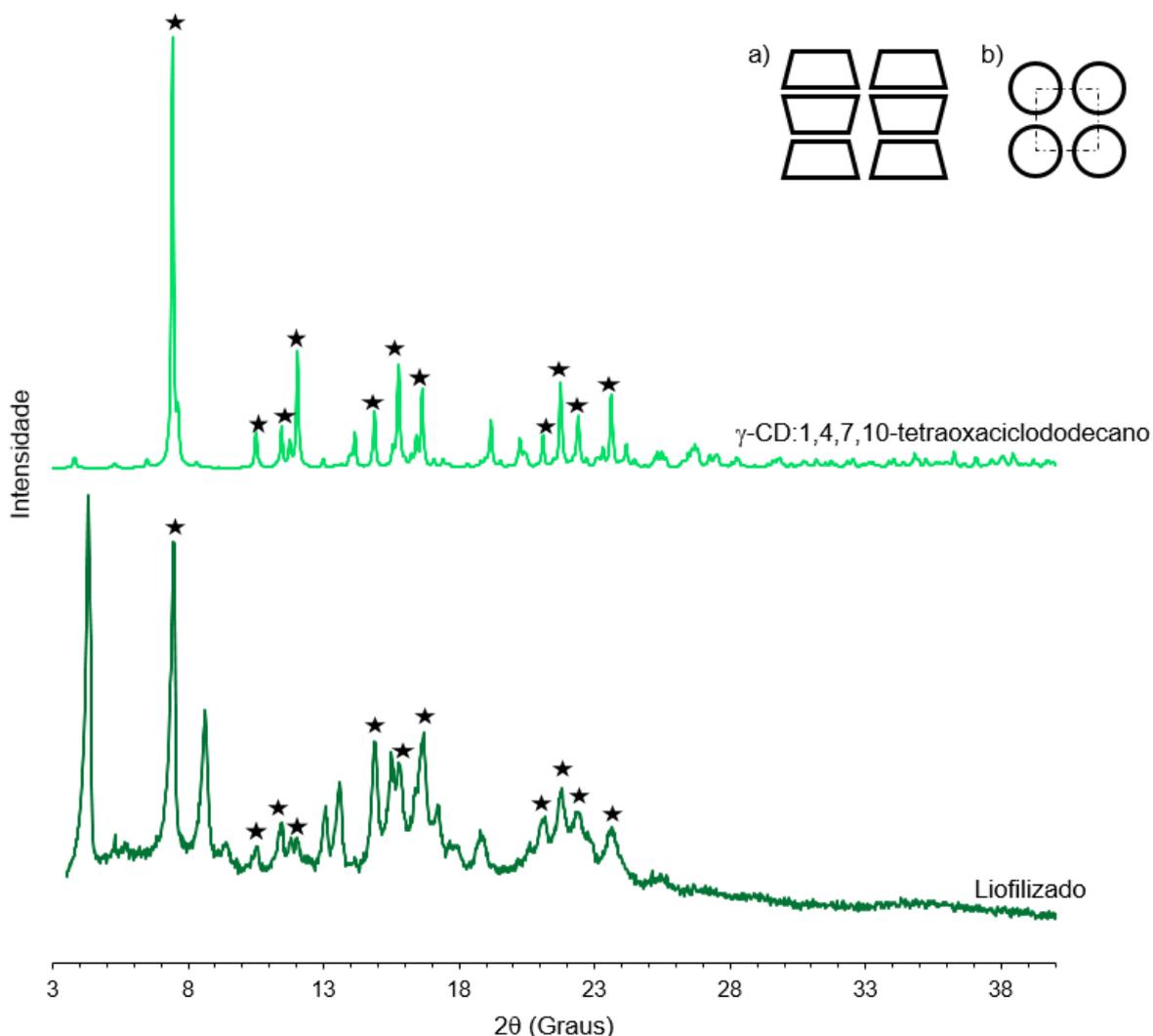


Figura 5. Difratoograma experimental de MLK:γ-CD (liofilizado) e calculado (usando o software Mercury, v3.7, © CCDC 2001-2015) de 1,4,7,10-tetraoxaciclododecano-γ-CD. Em a) está ilustrada a estrutura de empacotamento em forma de canal deste composto de inclusão; e em b) a vista de topo deste empacotamento, onde se mostra que os canais se alinham com os eixos, formando um quadrado, com um grande espaço entre eles.

¹³C{¹H} CP-MAS NMR

O espectro de ¹³C NMR do MLK:γ-CD liofilizado apresenta ressonâncias de carbonos referentes à γ-CD e ao MLK (Figura 6) (no ponto 5.5, da secção experimental, é possível ver com mais detalhe a listagem das ressonâncias presentes no espectro). No entanto, as ressonâncias associadas aos carbonos da γ-CD perderam a sua multiplicidade, apresentando-se agora como picos simples. Tal pode dever-se à inclusão

do MLK na cavidade da γ -CD que induz a γ -CD a adotar uma conformação mais simétrica. Os carbonos das suas unidades de glucose ficam expostos a um ambiente similar, resultando numa perda de multiplicidade [112-114].

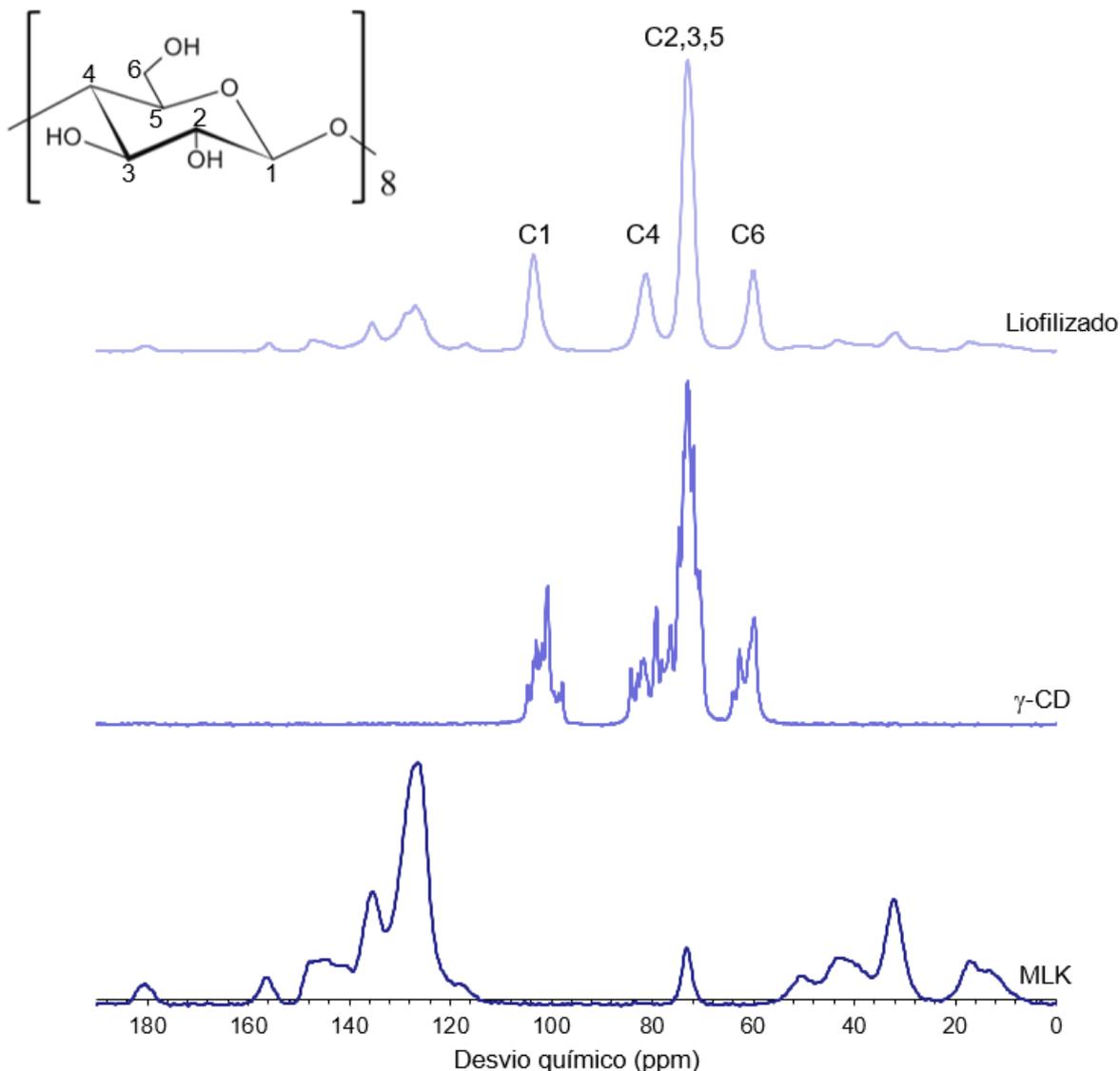


Figura 6. Espectros de ^{13}C NMR da γ -CD, do MLK e do MLK: γ -CD liofilizado. A identificação dos carbonos da γ -CD está indicada na unidade de glucose (adaptado de [115]).

Microscopia Eletrónica de Varrimento

As imagens de SEM do MLK: γ -CD liofilizado (Figura 7) revelam uma morfologia um tanto irregular (Figura 7a). Ao observar com mais detalhe a superfície destas partículas, é possível verificar que esta é composta por cristais com diferentes orientações espaciais (Figura 7c). Esta morfologia mais cristalina do MLK: γ -CD liofilizado

está, no entanto, concordante com os resultados obtidos por PXRD, que demonstraram a existência dum novo composto microcristalino.

A análise por EDS *mapping* do MLK: γ -CD liofilizado demonstrou uma distribuição uniforme do MLK pela amostra (Figura 7b, d), o que é consistente com a formação de um composto de inclusão.

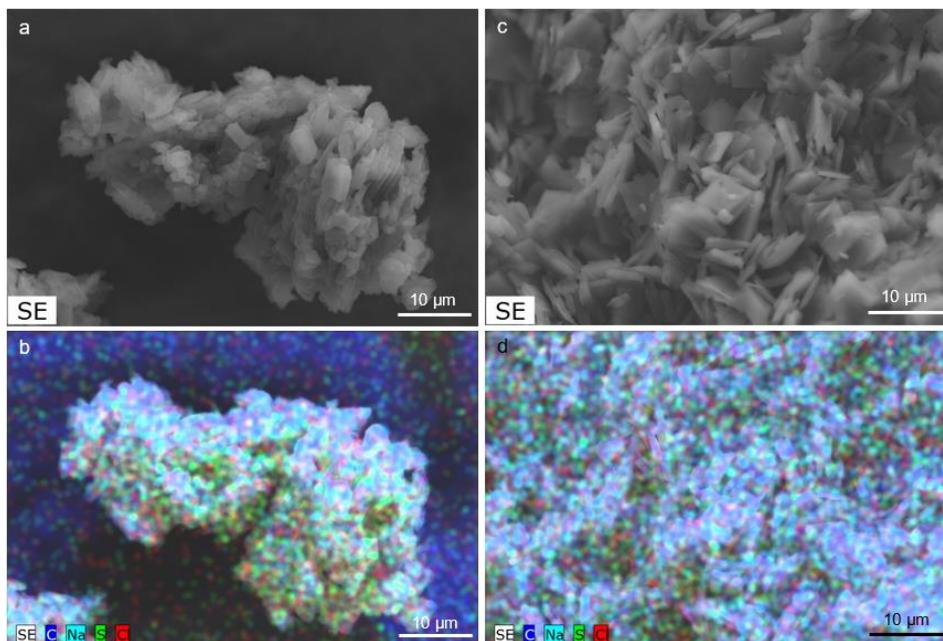


Figura 7. Imagem de microscopia eletrónica do MLK: γ -CD liofilizado (a) com detalhe da superfície das partículas (c) e respetiva distribuição de elementos (C, Cl, S e Na) determinada por mapeamento por EDS (b, d).

Espectroscopia de Infravermelho

O MLK apresenta na sua estrutura molecular grupos funcionais que funcionam como sondas de inclusão nesta técnica de caracterização vibracional, nomeadamente a quinolina (Figura 8a), ou os anéis aromáticos, que passam a ser rotulados de b e c.

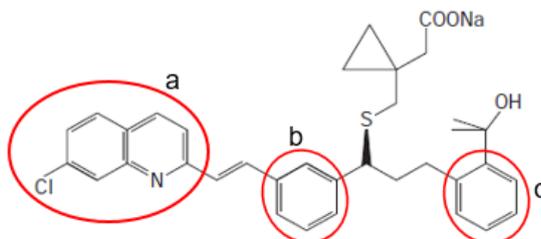


Figura 8. Estrutura molecular do montelucaste de sódio (MLK) evidenciando os grupos de interesse em espectroscopia de infravermelho: a quinolina (a), e os anéis aromáticos (b, c).

A absorção de radiação infravermelha pelas moléculas de MLK e γ -CD faz com que estas vibrem a uma determinada frequência. No entanto, aquando a formação do composto de inclusão o MLK é inserido na cavidade da γ -CD, estando, por isso, exposto a um ambiente diferente e sujeito a uma maior restrição de movimentos vibracionais, que podem causar alterações nas frequências vibracionais do hóspede. Em MLK: γ -CD liofilizado foram observados desvios nas frequências da região 1620-1580 cm^{-1} , conforme ilustrado na Figura 9.

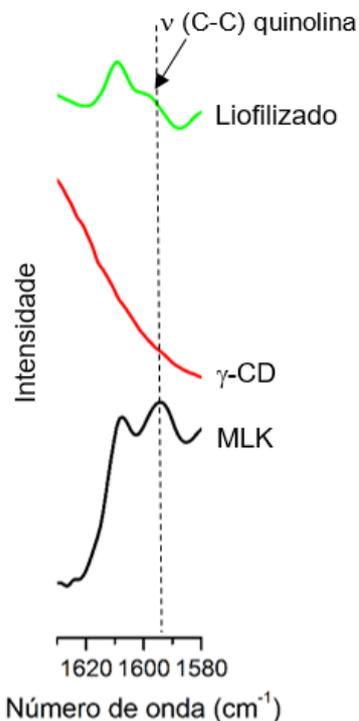


Figura 9. Espectro de infravermelho, na região 1610-1580 cm^{-1} , do MLK, da γ -CD e do MLK: γ -CD liofilizado.

Na Tabela 2 estão apresentadas as frequências atribuídas à quinolina e aos anéis b e c do MLK puro e do MLK: γ -CD liofilizado. Note-se que o desvio registado para os anéis b e c aquando a inclusão é inferior ao limite de resolução (2 cm^{-1}). Por sua vez, o desvio da banda da quinolina aponta para a inclusão deste grupo na cavidade da γ -CD.

Tabela 2. Frequências observadas (cm^{-1}) para MLK e MLK: γ -CD liofilizado.

MLK	MLK: γ -CD liofilizado	Descrição aproximada
1595	1600	$\nu(\text{C-C})$ anel quinolina
1608	1609	$\nu(\text{C-C})$ anéis b e c

Termogravimetria

A Figura 10 mostra os termogramas do MLK: γ -CD liofilizado, do MLK e da γ -CD. O liofilizado é a amostra que apresenta uma maior perda de massa inicial por desidratação, cerca de 15%. Na γ -CD e no MLK esta perda de massa é de apenas 10% [100] e 4%, respectivamente. Esta diferença pode resultar de uma maior quantidade de água nos espaços exteriores à cavidade da CD, nomeadamente espaços inter-canais. De acordo com os dados de difração de pó, as unidades de MLK: γ -CD estarão organizadas em canais, que deixam espaços amplos entre eles devido à geometria quase octogonal deste hospedeiro.

A segunda perda de massa que se observa nos termogramas corresponde à decomposição dos compostos, que no caso do MLK: γ -CD liofilizado começa a cerca de 210 °C. Este valor é bastante inferior ao da γ -CD cuja decomposição se inicia aos 263 °C [100], e do MLK, aos 257 °C, o que sugere que ocorreu uma interação entre ambos os componentes, formando um composto com uma estabilidade térmica reduzida.

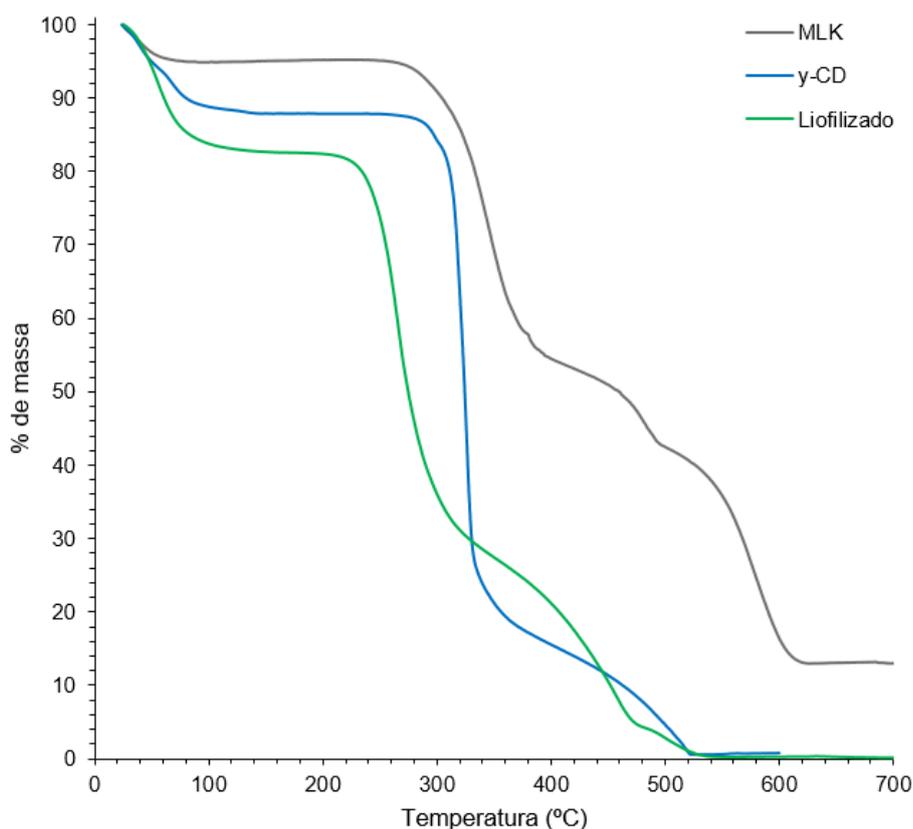


Figura 10. Termogramas da γ -CD, do MLK e do MLK: γ -CD liofilizado.

Calorimetria Diferencial de Varrimento

Os gráficos de DSC do MLK, da γ -CD e do MLK: γ -CD liofilizado estão representados na Figura 11. O MLK apresenta o pico de fusão a c.a. 124 °C, enquanto a γ -CD tem um sinal a 115 °C atribuído à desidratação. No MLK: γ -CD liofilizado as águas de hidratação saem a temperaturas mais baixas, com um pico endotérmico a 81 °C, o que pode dever-se ao facto de estas já não se encontrarem dentro da cavidade, mas nos espaços entre os canais de γ -CD. Nota-se ainda uma muito ligeira contaminação com MLK não incluído, que dá origem a dois sinais amplos e de baixa intensidade a cerca de 135 e a 153 °C (atribuídos hipoteticamente às duas formas polimórficas do MLK).

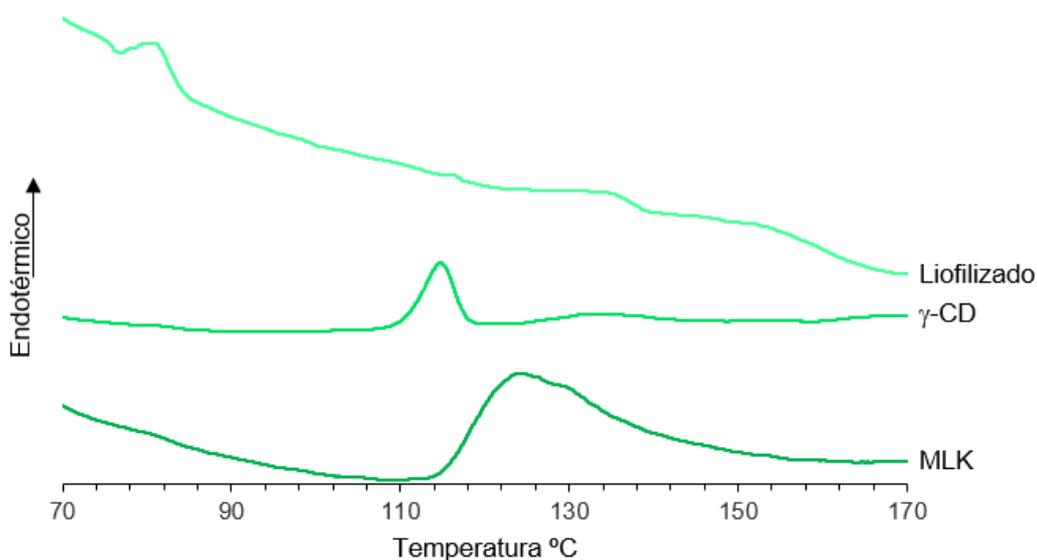


Figura 11. DSC do MLK, da γ -CD e do MLK: γ -CD liofilizado, no intervalo de temperaturas selecionado.

3.2. Mecanoquímica

I. Moinho Planetário

Para formar compostos de inclusão MLK: γ -CD pela técnica de mecanoquímica, os dois componentes, em quantidade equimolar, foram moídos num moinho planetário durante 720 minutos, tendo sido recolhidas alíquotas aos 0, 5, 15, 30, 60, 120 e 360 minutos de moagem (para mais detalhe consultar a secção experimental, ponto 5.4, parte I). Depois de recolhidas, as amostras foram analisadas por diversas técnicas de caracterização no estado sólido, cujos resultados, quando analisados em conjunto, nos permitem confirmar a formação do composto de inclusão.

Difração de Raios-X de pós

O montelucaste de sódio é amorfo e, por isso, o seu difratograma não apresenta reflexões, ao contrário do da ciclodextrina gama, que apresenta reflexões devido à sua cristalinidade, tal como é possível observar na Figura 12. Os difratogramas das amostras recolhidas durante a moagem apresentam, pois, apenas reflexões provenientes da γ -CD, que, com o decorrer da moagem, perdem gradualmente intensidade. Após 720 min de moagem praticamente já não se observam reflexões, o que indica a formação de um produto amorfo. Foi observado um resultado semelhante na interação, por mecanoquímica, de β -CD com cloranfenicol [116] e com ibuprofeno [117], assim como na interação da DIMEB com o gemfibrozil [97] e da γ -CD com o fármaco actarite [118].

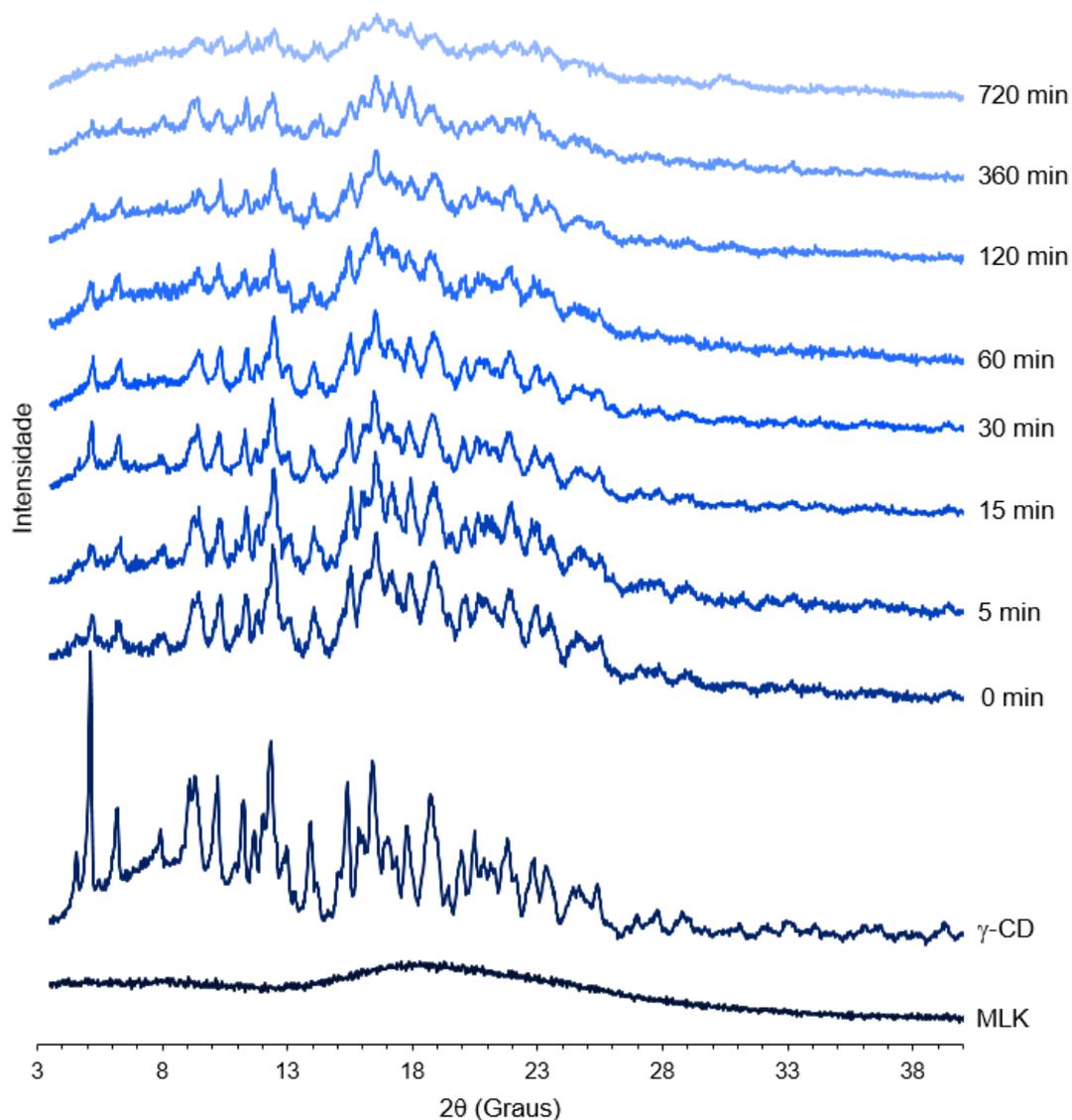


Figura 12. Difratogramas do MLK, da γ -CD e da sua mistura física 1:1 após 0, 5, 15, 30, 60, 120, 360 e 720 min de moagem num moinho planetário.

Para efeitos de comparação, foi efetuada a moagem da γ -CD pura (heptahidratada), tendo-se verificado que esta perde mais rapidamente a sua cristalinidade (Figura 13). Mais precisamente, após 60 minutos de moagem o difratograma da γ -CD já não apresenta reflexões, tal como se tinha verificado num estudo realizado por Inoue *et al.* [115], enquanto que na mistura MLK: γ -CD ainda há reflexões muito para além dos 60 min de moagem (Figura 12). Esta diferença na perda da cristalinidade da γ -CD sugere que o MLK exerce um efeito protetor sobre a γ -CD, fazendo com que esta demore mais tempo a perder a sua estrutura cristalina.

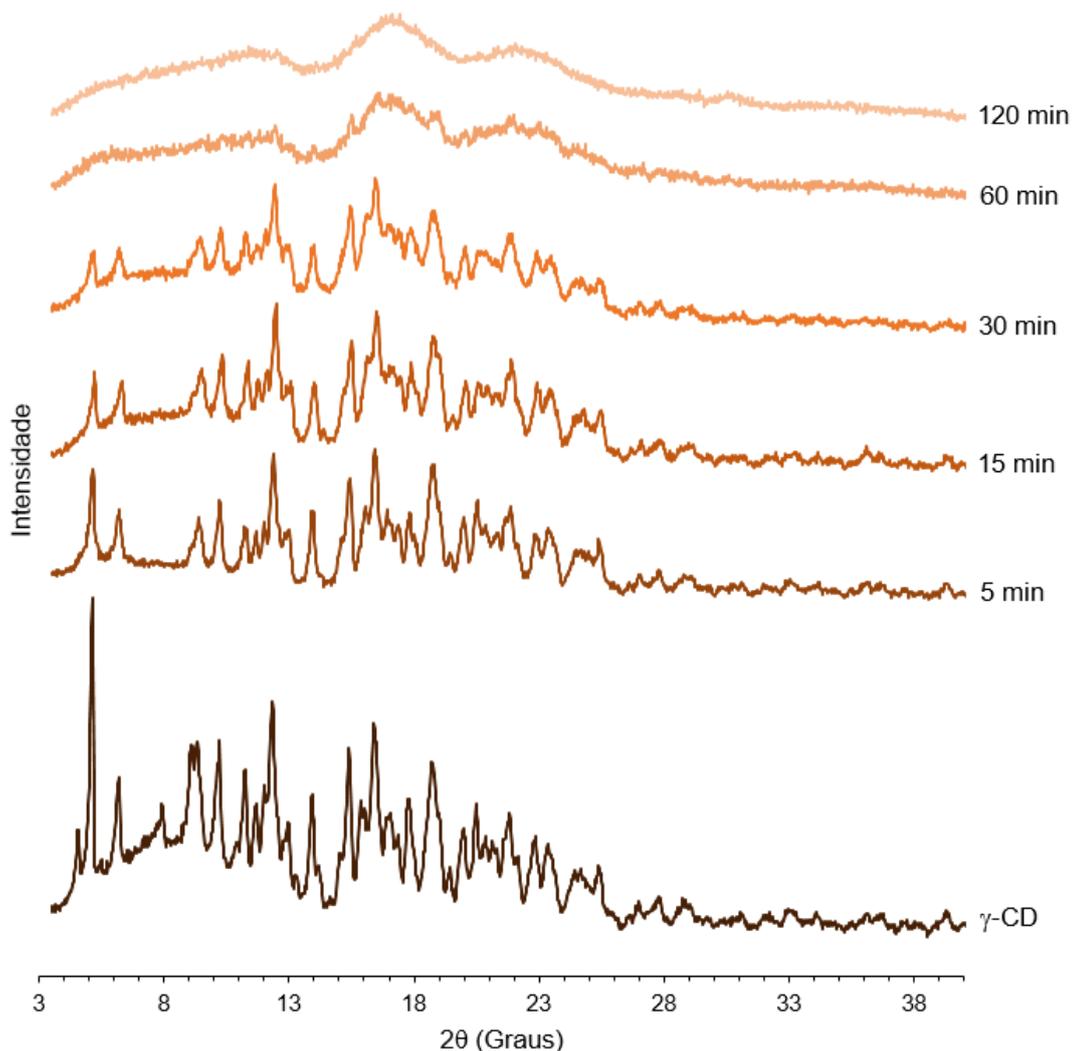


Figura 13. Difratogramas da γ -CD antes e após 5, 15, 30, 60 e 120 min de moagem num moinho planetário.

Fez-se ainda um estudo simples de estabilidade da amostra em condições normais de armazenamento. As amostras foram armazenadas por 3 meses num local protegido da luz, em condições de humidade e temperatura ambiente, e foram analisadas por difração de raios-X de pós novamente. Na Figura 14 está representada a comparação entre os difratogramas da amostra inicialmente mais amorfa (720 min de moagem), sendo possível observar que após 3 meses da sua moagem o difratograma apresenta reflexões com uma intensidade maior. A ângulos de 2θ mais baixos é possível observar o aparecimento de reflexões que tinham desaparecido devido à moagem (sinalizadas com tracejado) e que podem ser atribuídas à recristalização de γ -CD. Por sua vez, esta alteração na cristalinidade é uma característica que se deve ter em particular atenção, uma vez que aquando a aplicação na área farmacêutica é mais útil a forma amorfa.

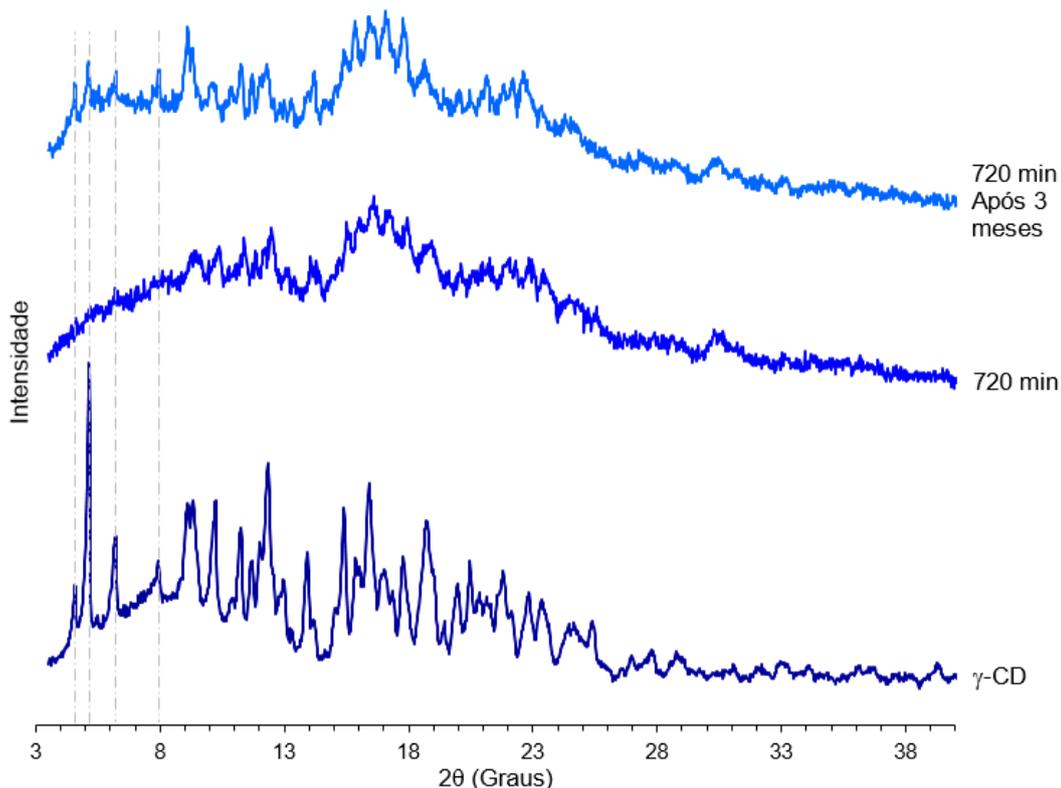


Figura 14. Difratogramas da γ -CD e da mistura de MLK: γ -CD (1:1) moída durante 720 min no moinho planetário, coletados imediatamente após a moagem e após 3 meses de armazenamento.

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ CP-MAS NMR

Os espectros das amostras recolhidas após a moagem e representados na Figura 15, apresentam ressonâncias de carbonos em desvios químicos referentes tanto à γ -CD como ao MLK. No entanto estas ressonâncias apresentam diferenças relativamente às dos componentes puros (na Tabela 4 do ponto 5.4, parte I, na secção experimental, é possível ver com mais detalhe a listagem das ressonâncias presentes no espectro).

As ressonâncias dos carbonos das unidades de glucose que compõem a γ -CD, numerados na Figura 15, apresentam multiplicidade. Esta é resultante de uma conformação não simétrica da γ -CD, isto é, da existência de diferentes ângulos de torsão entre as ligações das unidades de glucose e de diferentes ângulos de torsão do grupo hidroxilo ligado ao C6 [113, 119, 120]. Sendo assim, o C1 é composto por um conjunto de 8 ressonâncias (98-105 ppm), o C4 por um conjunto de 7 ressonâncias (78-84 ppm) e o C6 por um conjunto de 3 ressonâncias (60-64 ppm). Os sinais dos carbonos C2, 3, 5 apresentam-se sobrepostos, centrados a 73 ppm. Com o decorrer da moagem,

principalmente a partir dos 120 min, observa-se uma redução na multiplicidade das ressonâncias dos carbonos da γ -CD, que pode resultar da formação de um composto de inclusão ou da amorfização. Ao incluir um hóspede, a ciclodextrina ajusta-se de forma a maximizar o tamanho da cavidade, adotando uma conformação mais simétrica que faz com que os carbonos das suas unidades de glucose estejam expostos a um ambiente similar, resultando assim numa perda de multiplicidade das ressonâncias [112-114]. Esta perda de multiplicidade pode ainda resultar da amorfização da amostra, uma vez que esta faz com que os carbonos estejam expostos a um ambiente menos ordenado [122]. Note-se, no entanto, que normalmente a amorfização provoca uma maior dispersão dos valores das ressonâncias com consequente alargamento de sinal [121], o que não se observou com esta ciclodextrina.

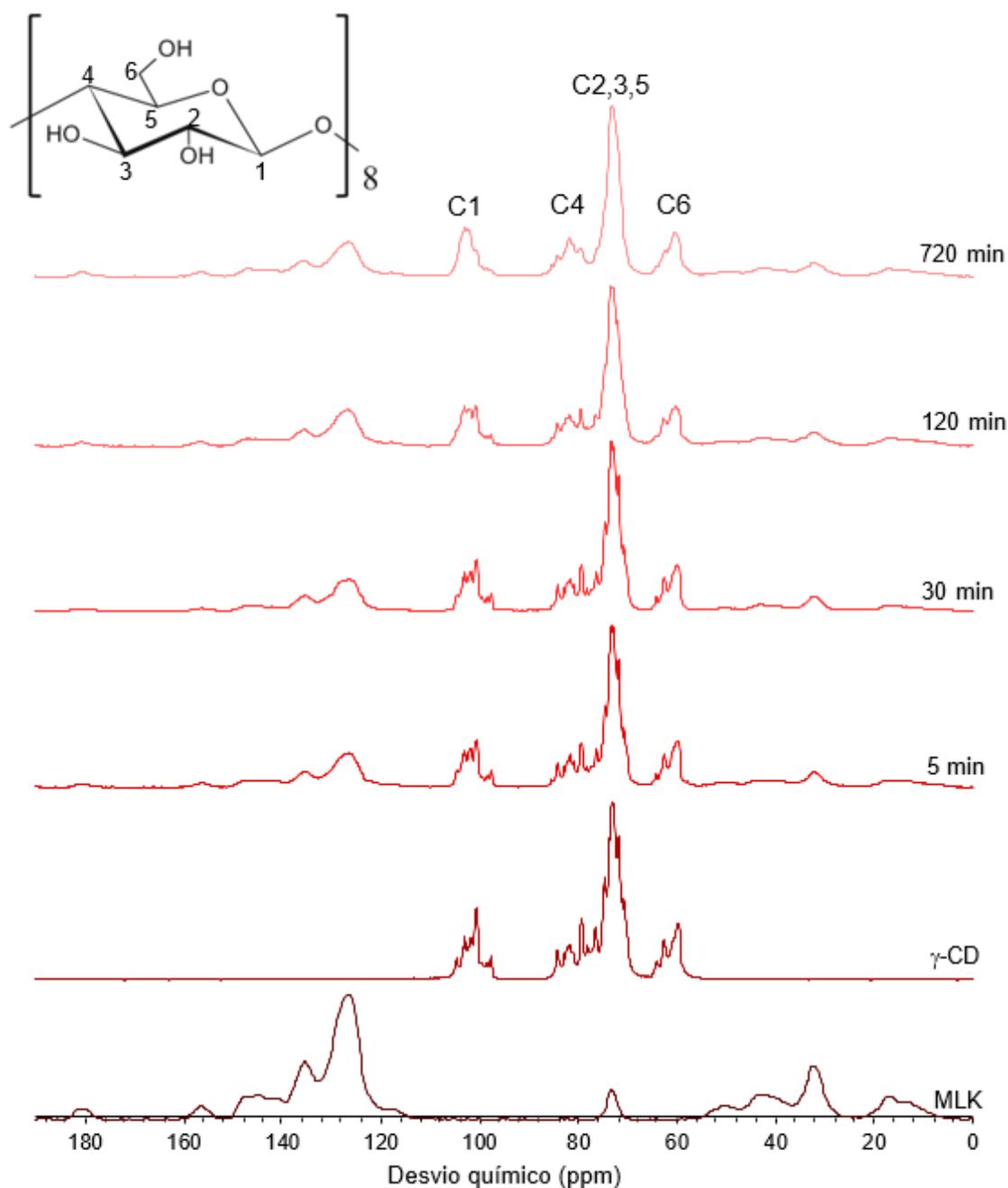


Figura 15. Espectros de ^{13}C NMR da $\gamma\text{-CD}$, do MLK e da sua mistura física 1:1 moída durante 5, 30, 120 e 720 min (num moinho planetário). A identificação dos carbonos da $\gamma\text{-CD}$ está indicada na unidade de glucose (adaptado de [115]).

O espectro da $\gamma\text{-CD}$ após 120 minutos de moagem está apresentado na Figura 16, sendo possível verificar que a moagem da $\gamma\text{-CD}$ sozinha resultou na perda de multiplicidade das suas ressonâncias, que se apresentam como um único sinal para cada carbono. Este resultado indica a formação de um material amorfo a um tempo de

moagem bastante inferior ao registado para MLK: γ -CD, o que indica, por sua vez, que o MLK exerce um efeito protetor sobre a γ -CD.

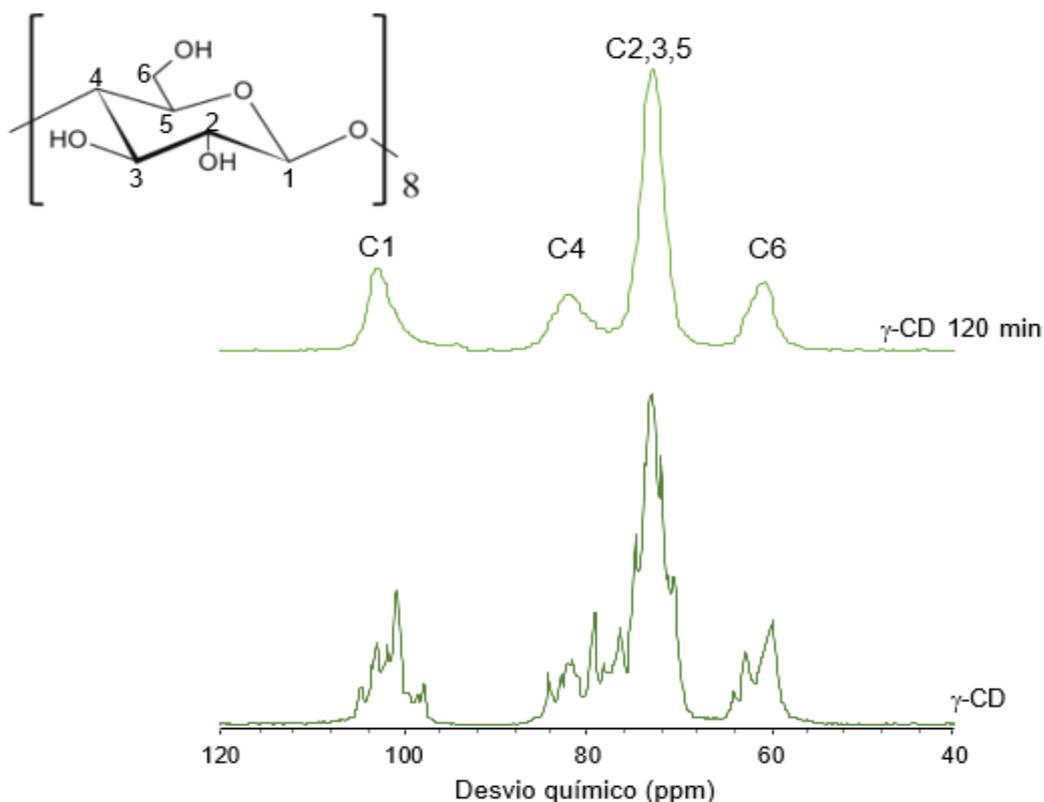


Figura 16. Espectros de ^{13}C NMR da γ -CD não moída e após 120 min de moagem (num moinho planetário). A identificação dos carbonos da γ -CD está indicada na unidade de glucose (adaptado de [115]).

Microscopia eletrónica de varrimento

As alterações que ocorrem com a amostra devido à moagem, nomeadamente alterações na morfologia dos componentes, bem como na homogeneidade do produto formado, podem ser acompanhadas por microscopia eletrónica de varrimento [102, 116, 117].

A análise da mistura física de MLK: γ -CD (1:1) (amostra não sujeita a moagem) permitiu distinguir os dois componentes, que apresentam morfologias bastante distintas entre si. A γ -CD apresenta-se na forma de prismas de bordos irregulares enquanto o MLK se apresenta na forma de aglomerados de esferas (Figura 17a). Esta identificação dos dois componentes é confirmada pela técnica de EDS *mapping*, que mostra a presença de elementos característicos do MLK, como por exemplo o S, Na e Cl, nos aglomerados de

esferas (Figura 17b-d). Já o carbono, comum a ambos os componentes, está uniformemente distribuído (Figura 17e).

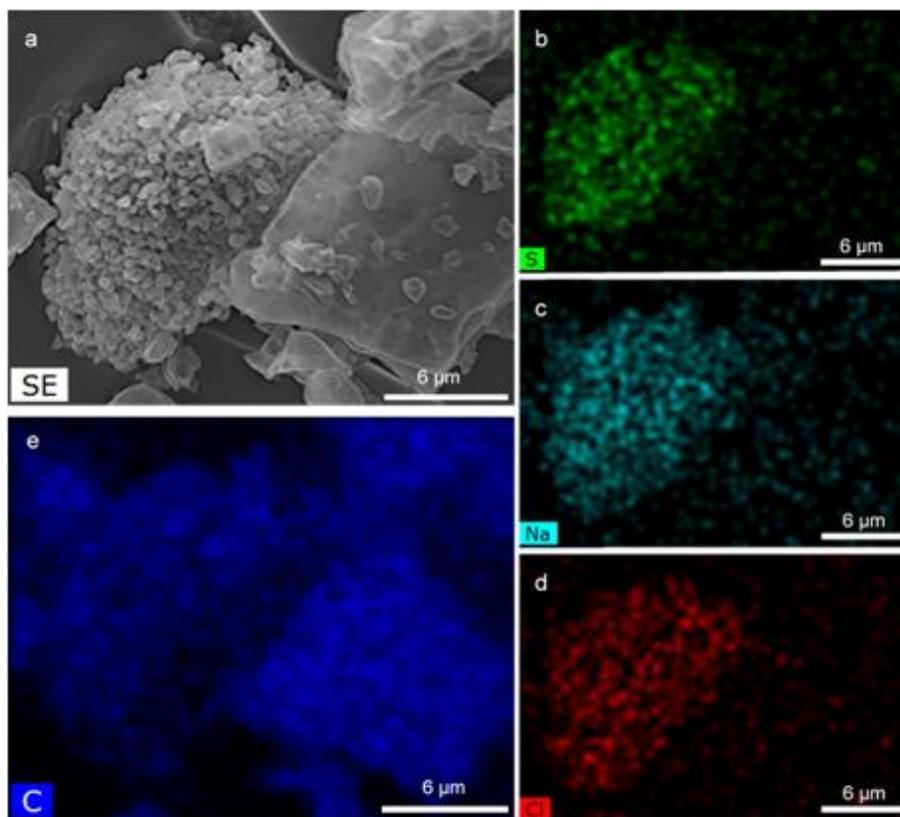


Figura 17. Imagens de (a) microscopia eletrônica da mistura MLK:γ-CD (não moída), com a respectiva distribuição de elementos determinada por mapeamento por EDS: (b) enxofre, (c) sódio, (d) cloro e (e) carbono.

As imagens de SEM da mistura de MLK:γ-CD moída por 5, 15, 120 e 720 min estão representadas na Figura 18. São notórias as alterações morfológicas decorrentes da moagem. Já não se observam estruturas com a mesma forma e tamanho que na mistura física, não sendo possível distinguir a γ-CD do MLK. Com o decorrer do tempo de moagem as partículas de γ-CD tornam-se, como esperado, mais pequenas, e mais arredondadas, por erosão dos bordos dos prismas (Figura 18a, c, e, g).

Através da análise por EDS *mapping*, foi possível analisar a distribuição de elementos característicos do MLK (Na, S, Cl) pela amostra. Após 5 minutos de moagem estes elementos ainda não se encontram uniformemente distribuídos, sendo possível observar que algumas partículas de γ-CD apresentam maior quantidade de MLK à sua superfície do que outras (Figura 18b). Esta diferença na distribuição do MLK pela amostra resulta de um baixo tempo de moagem, que não permitiu ainda uma completa interação entre ambos os componentes. No entanto, com o decorrer do tempo de moagem,

nomeadamente aos 15, 120 e 720 minutos, já foi possível observar uma distribuição tendencialmente uniforme do MLK (Figura 18d, f, h), sugerindo que este formou uma camada em volta das partículas de γ -CD, interagindo com a mesma e formando, muito provavelmente, um composto de inclusão. Por sua vez, esta disposição do hóspede em torno da γ -CD ajuda a explicar os resultados de PXRD e NMR, justificando a proteção da γ -CD pelo hóspede, que retarda a sua amorfização.

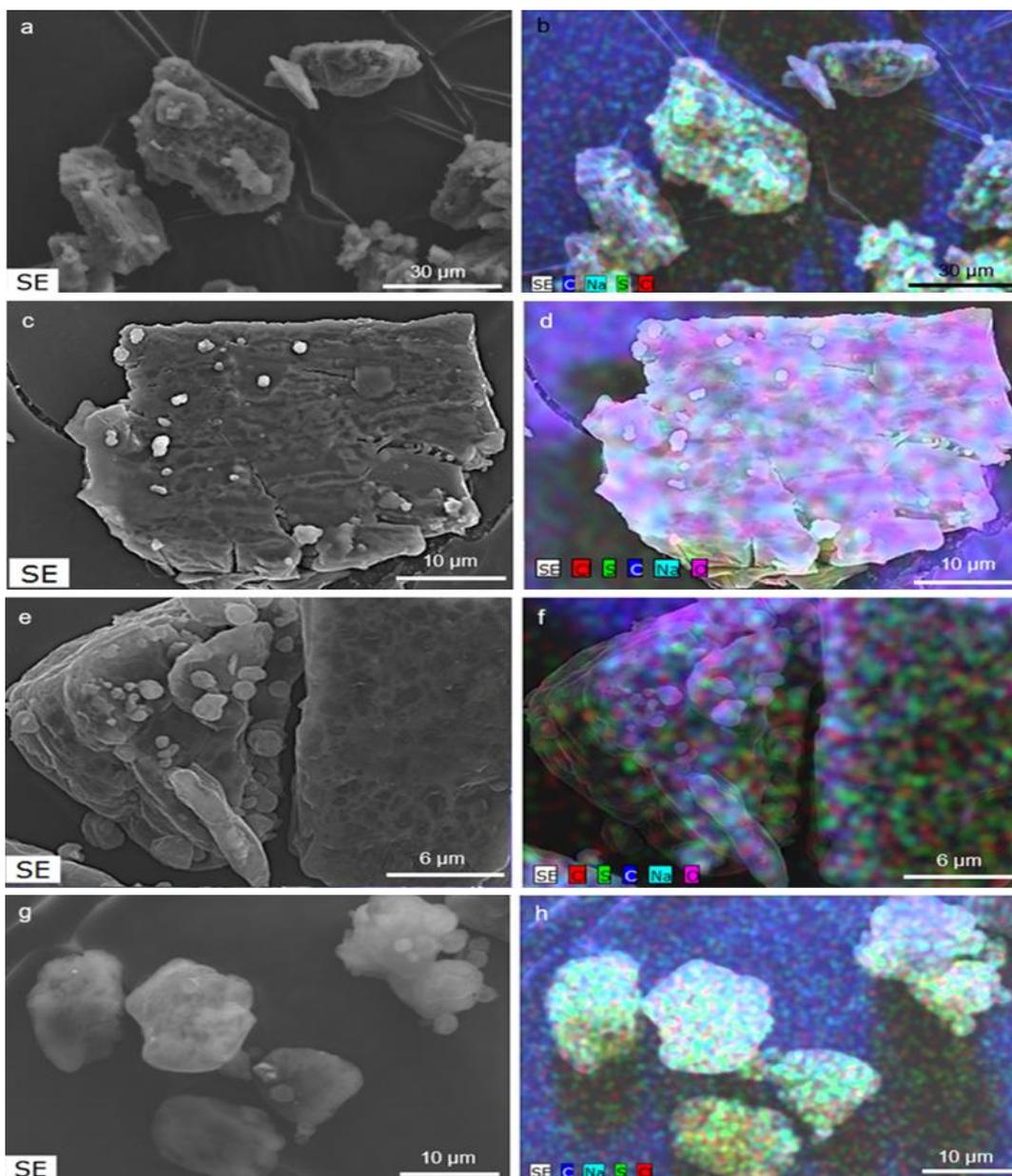


Figura 18. Imagens de microscopia eletrónica (coluna da esquerda) com respectivo mapeamento (coluna da direita) das amostras MLK: γ -CD moídas por 5 min (a, b), 15min (c, d), 120 min (e, f) e 720 (g, h) num moinho planetário. A distribuição de elementos (C, Cl, S e Na) foi determinada por mapeamento por EDS.

Espectroscopia de Infravermelho

A espectroscopia vibracional de infravermelho permite confirmar a formação do composto de inclusão MLK: γ -CD através da análise de desvios nas frequências vibracionais de grupos do hóspede, que atuem como sondas de inclusão. Estas alterações ocorrem, porque aquando a formação do composto de inclusão o MLK é inserido na cavidade da γ -CD, estando, por isso, sujeito a uma maior restrição vibracional. Esta restrição vibracional irá, por sua vez, fazer com que ocorram alterações nas frequências vibracionais e, conseqüentemente, no número de onda dos grupos funcionais inseridos na cavidade. No caso do MLK, são acompanhados os desvios no número de onda do seu grupo quinolina (Figura 8a) e dos anéis b e c (Figura 8b, c) que se encontram numa zona livre de bandas da γ -CD (Figura 19).

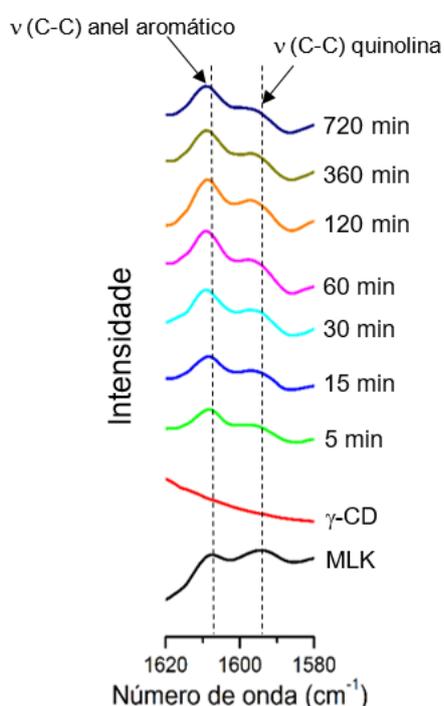


Figura 19. Espectro de infravermelho, na região 1620-1580 cm^{-1} , do MLK, da γ -CD e de MLK: γ -CD após 5, 15, 30, 60, 120, 360 e 720 min de moagem num moinho planetário.

Na Tabela 3 apresentam-se os valores dos números de onda atribuídos ao grupo quinolina e aos anéis b e c do MLK. Note-se o desvio, na amostra MLK: γ -CD moída 720 min, para números de onda superiores. Isto indica a inclusão da molécula de MLK e conseqüente interação da mesma com a cavidade da γ -CD. No entanto, tendo em conta a estrutura do MLK, nomeadamente o facto de o grupo quinolina se encontrar espacialmente afastado do anel aromático c, postula-se que apenas a porção da molécula de MLK constituída pelo grupo quinolina e pelo anel aromático b tenham sido

incorporados na cavidade da γ -CD. Outros estudos descritos na literatura demonstram também desvios nas frequências vibracionais de grupos característicos do hóspede, como consequência da sua interação com o hospedeiro, a CD, aquando da formação dos compostos de inclusão [123-125].

Tabela 3. Frequências observadas (cm^{-1}) para MLK e MLK: γ -CD moídos 720 min.

MLK	MLK: γ -CD 720 min	Descrição aproximada
1595	1599	$\nu(\text{C-C})$ anel quinolina
1608	1610	$\nu(\text{C-C})$ anéis b e c

Termogravimetria

Os termogramas das amostras de MLK: γ -CD preparadas no moinho planetário são apresentados na Figura 20, mostrando-se ainda, para comparação, os da γ -CD, do MLK e da sua mistura física 1:1 (não moída). A primeira perda de massa é associada à saída de moléculas de água, sendo de 4% para o MLK, cerca de 10% no caso da γ -CD (valor coincidente com o descrito para este hospedeiro [100]) e de 6.5% para a sua mistura física 1:1. A perda de massa por desidratação não sofre grandes alterações com a moagem, oscilando entre 6 e 8% para as amostras recolhidas.

A característica mais distintiva dos termogramas das amostras moídas é a sua temperatura de decomposição que se inicia entre os 200 e os 215 °C, valores bastante mais baixos do que os da γ -CD, cuja decomposição inicia aos 263 °C [100], e do MLK (aos 247 °C). Este fenómeno ocorre também, embora de forma menos acentuada, na mistura física 1:1 (não moída), com a decomposição a iniciar-se aos 240 °C, o que sugere uma afinidade entre ambos os componentes. Note-se ainda que as amostras MLK: γ -CD moídas no moinho planetário iniciam a sua decomposição a temperaturas que são gradualmente mais baixas em função do maior tempo de moagem. Pode, pois, postular-se a formação do composto de inclusão MLK: γ -CD que altera as propriedades térmicas dos componentes, nomeadamente a redução da sua estabilidade térmica.

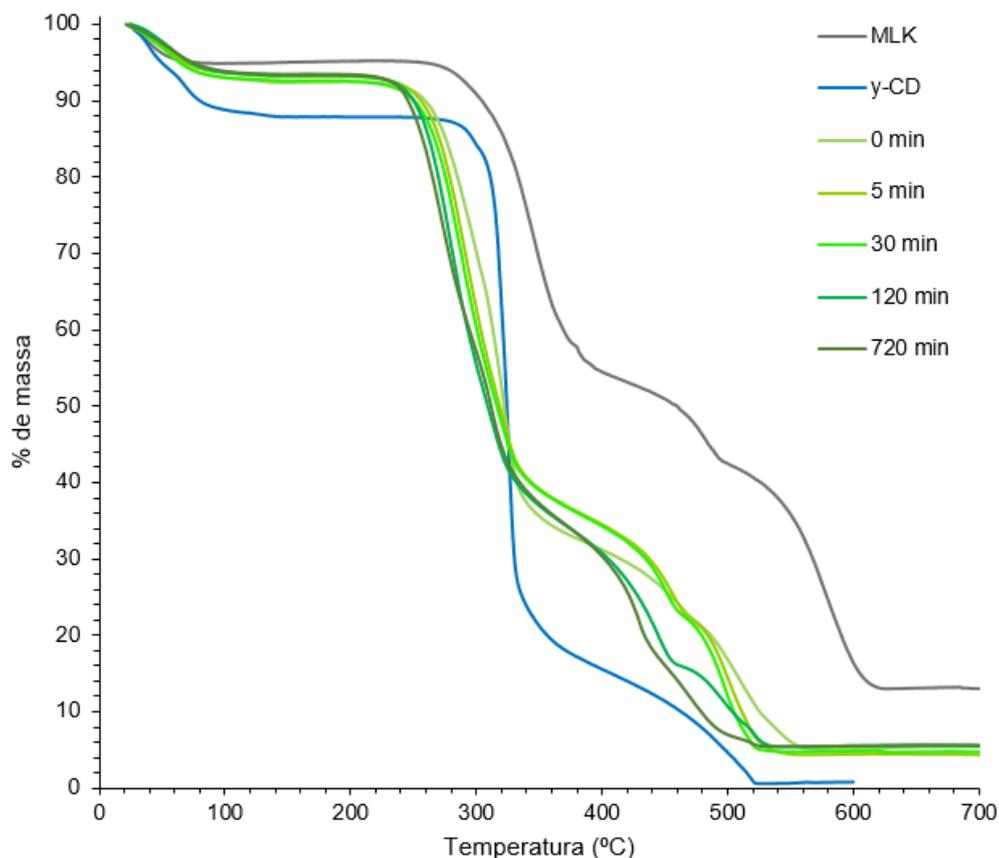


Figura 20. Termogramas da γ -CD, do MLK, da sua mistura física 1:1 (indicada como 0 min) e das amostras MLK: γ -CD moídas durante 5, 30, 120 e 720 min (num moinho planetário).

Calorimetria Diferencial de Varrimento

Os resultados da análise de DSC do MLK, da γ -CD e da mistura de MLK: γ -CD moída por 30, 60, 120 e 720 min no moinho planetário estão representados na Figura 21. O MLK apresenta um sinal endotérmico amplo centrado a cerca de 124 °C, atribuído à fusão. A γ -CD apresenta um pico endotérmico centrado a 115 °C que se atribui à saída de águas de hidratação. Na amostra de MLK: γ -CD moída por 30 min observa-se um pico endotérmico, centrado a cerca de 124 °C e ainda mais largo que o observado para o MLK puro, o que pode indicar aumento da amorfização da amostra com o tempo de moagem. Note-se ainda que não se observa o pico referente à γ -CD, que pode estar mascarado pelo pico largo dos 124 °C. Após 60 min de moagem este pico alarga ainda mais, provavelmente por sobreposição dos eventos de desidratação da γ -CD e fusão de MLK amorfo. É, no entanto, de realçar o aparecimento de um novo pico endotérmico a

153 °C, que indica a formação de um novo composto. Este pode ser um dos polimorfos do MLK, que se pode ter formado *in situ* por ação da temperatura [108, 109]. Na amostra obtida após 120 min de moagem observou-se também o aparecimento de novos picos, a 150 e 155 °C. Tendo em conta que diferentes polimorfos do MLK podem apresentar comportamentos térmicos diferentes [108, 109], estes picos podem resultar realmente de diferentes formas polimórficas. Note-se ainda que nesta amostra já não se observa o pico largo resultante do composto MLK:γ-CD amorfo. Por sua vez, na amostra obtida após 720 min de moagem este pico volta a observar-se, desaparecendo os picos que se postulou pertencerem às formas polimórficas do MLK.

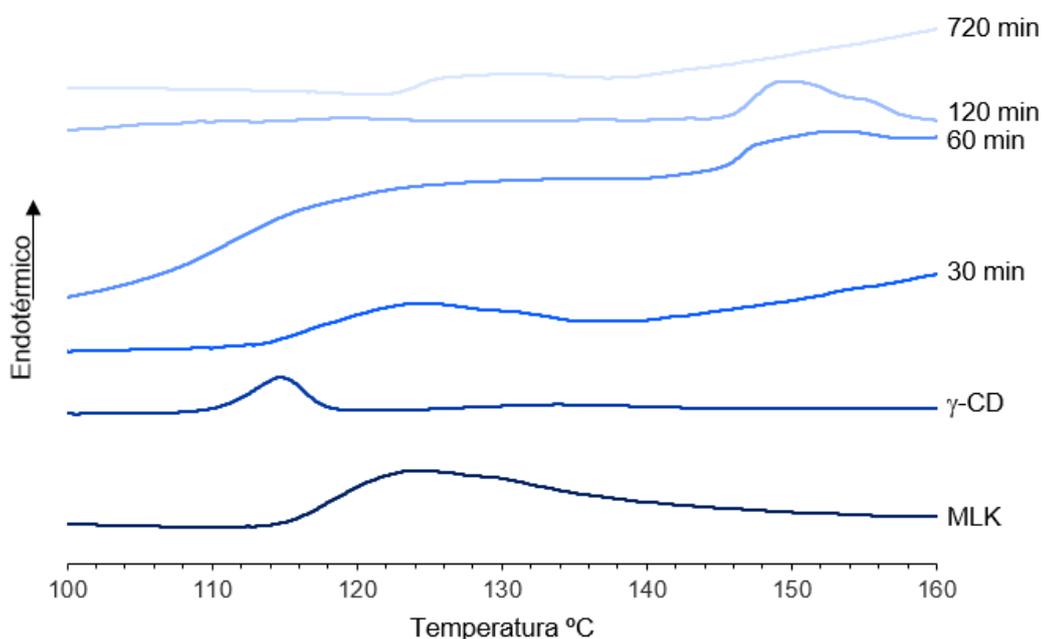


Figura 21. DSC do MLK, da γ -CD e da mistura de MLK: γ -CD moída por 30, 60, 120 e 720 min num moinho planetário, no intervalo de temperaturas selecionado.

II. Moinho planetário com pré-moagem da ciclodextrina gama

Para reduzir o tempo necessário à interação da γ -CD com o MLK foi efetuado um ensaio em que a γ -CD foi previamente moída durante 60 minutos, de modo a reduzir o tamanho das suas partículas. À γ -CD moída foi adicionada uma quantidade equimolar do MLK (considerado o tempo zero). A mistura física de MLK: γ -CD(pré-moída) foi moída durante outros 60 minutos, tendo sido coletadas alíquotas aos 5, 10, 15, 25 e 30 minutos de moagem (para mais detalhe consultar a secção experimental, ponto 5.4, parte II). Por fim estas amostras foram analisadas pelas técnicas anteriormente referidas.

Difração de Raios-X de pós

Os difratogramas das amostras recolhidas durante a moagem da mistura física de MLK: γ -CD(pré-moída) não apresentam reflexões (Figura 22). Ao comparar o difratograma do MLK e da γ -CD com o da amostra dos zero minutos, composta por γ -CD pré-moída e MLK, é possível inferir que esta ausência de reflexões se deve a uma amorfização da γ -CD aquando da pré-moagem (conforme se pode observar na Figura 13). Consequentemente, com o decorrer da moagem já não se observam praticamente alterações nos difratogramas das amostras recolhidas, uma vez que a amostra inicial já possui um grau de amorficidade considerável. Ainda assim, é possível observar, para a amostra MLK: γ -CD(pré-moída) dos 60 min, o aparecimento de um halo a baixos valores de 2θ , indicando um aumento do grau de amorficidade com o decorrer da moagem.

Foi ainda avaliada por PXRD a estabilidade da amostra MLK: γ -CD(pré-moída) dos 60 min, após o seu armazenamento durante três meses num local protegido da luz, em condições de humidade e temperatura ambiente. Na Figura 23 estão representados os difratogramas da mesma amostra no momento após a moagem e após os três meses. Note-se que o halo observado a baixos valores de 2θ na amostra acabada de moer desaparece após o armazenamento, indicando redução do grau de amorficidade. Este resultado era espectável, sendo que para MLK: γ -CD moído 720 min (sem pré-moagem) também se observou recristalização parcial após 3 meses de armazenamento (Figura 14). No entanto, é de realçar que a amostra obtida por pré-moagem se mantém, ainda assim, livre de cristais, pelo que será mais interessante para aplicações farmacêuticas.

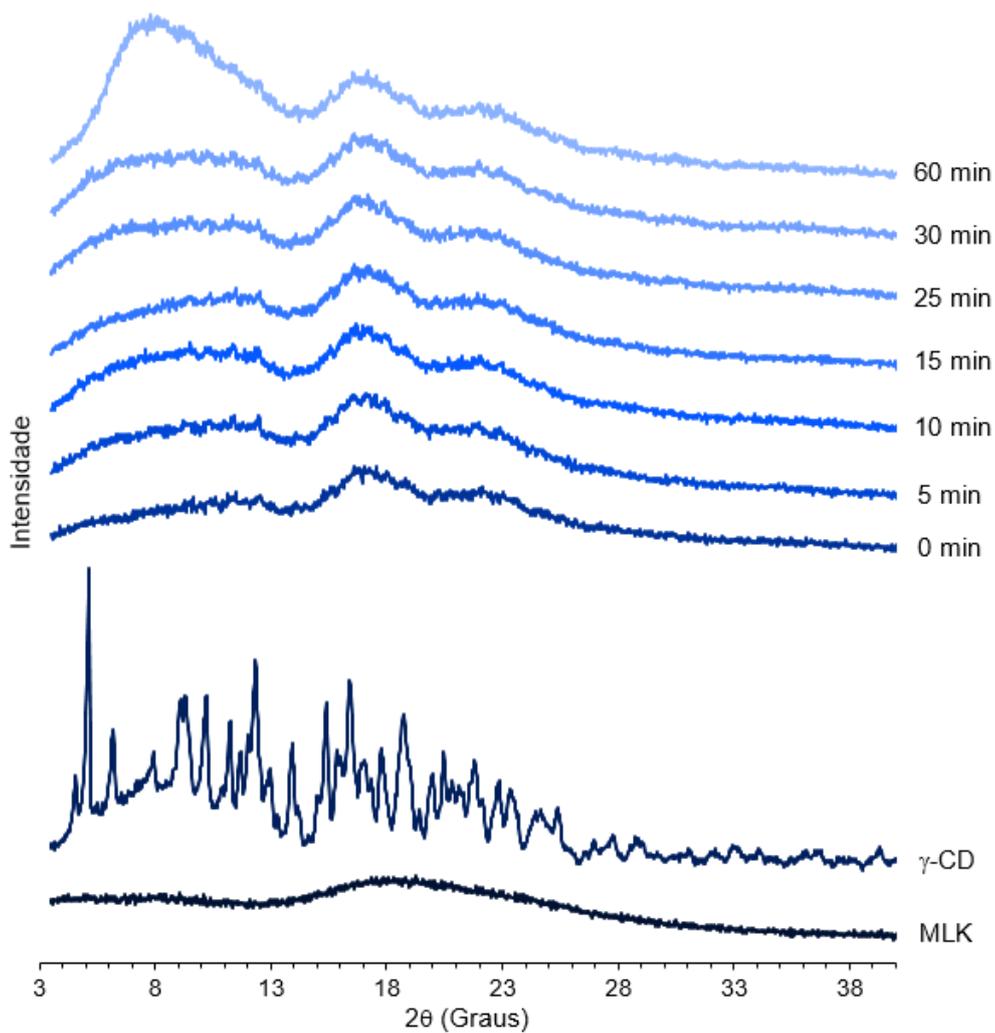


Figura 22. Difratogramas do MLK, da γ -CD (sem moagem) e da mistura 1:1 de MLK com γ -CD (pré-moída) aos 0, 5, 10, 15, 25, 30 e 60 min de moagem num moinho planetário.

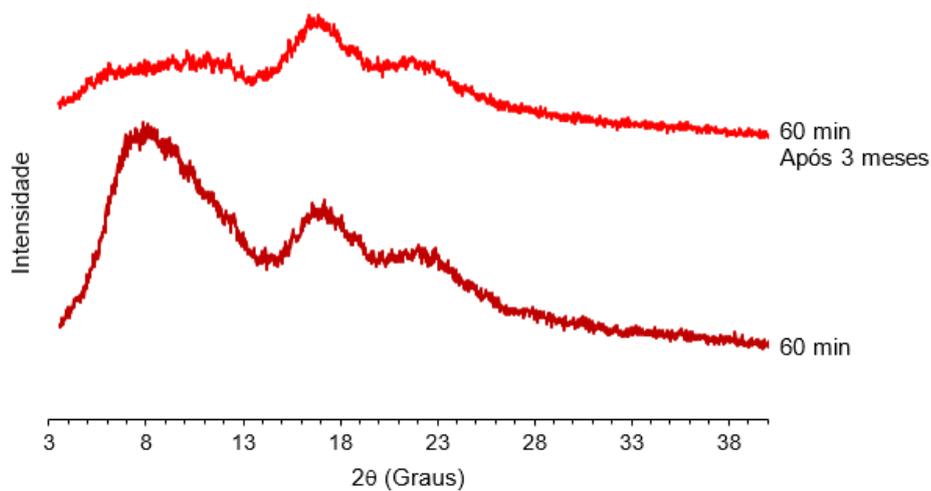


Figura 23. Difratogramas de MLK: γ -CD(pré-moída) moído 60 min coletados imediatamente após a moagem e após 3 meses de armazenamento.

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ CP-MAS NMR

Os espectros das amostras de MLK: γ -CD(pré-moída) a diferentes tempos de moagem apresentam alterações na multiplicidade das ressonâncias dos carbonos comparativamente com os componentes puros (Figura 24) (na Tabela 6 do ponto 5.4, parte II, da secção experimental, é possível ver com mais detalhe a listagem das ressonâncias presentes no espectro).

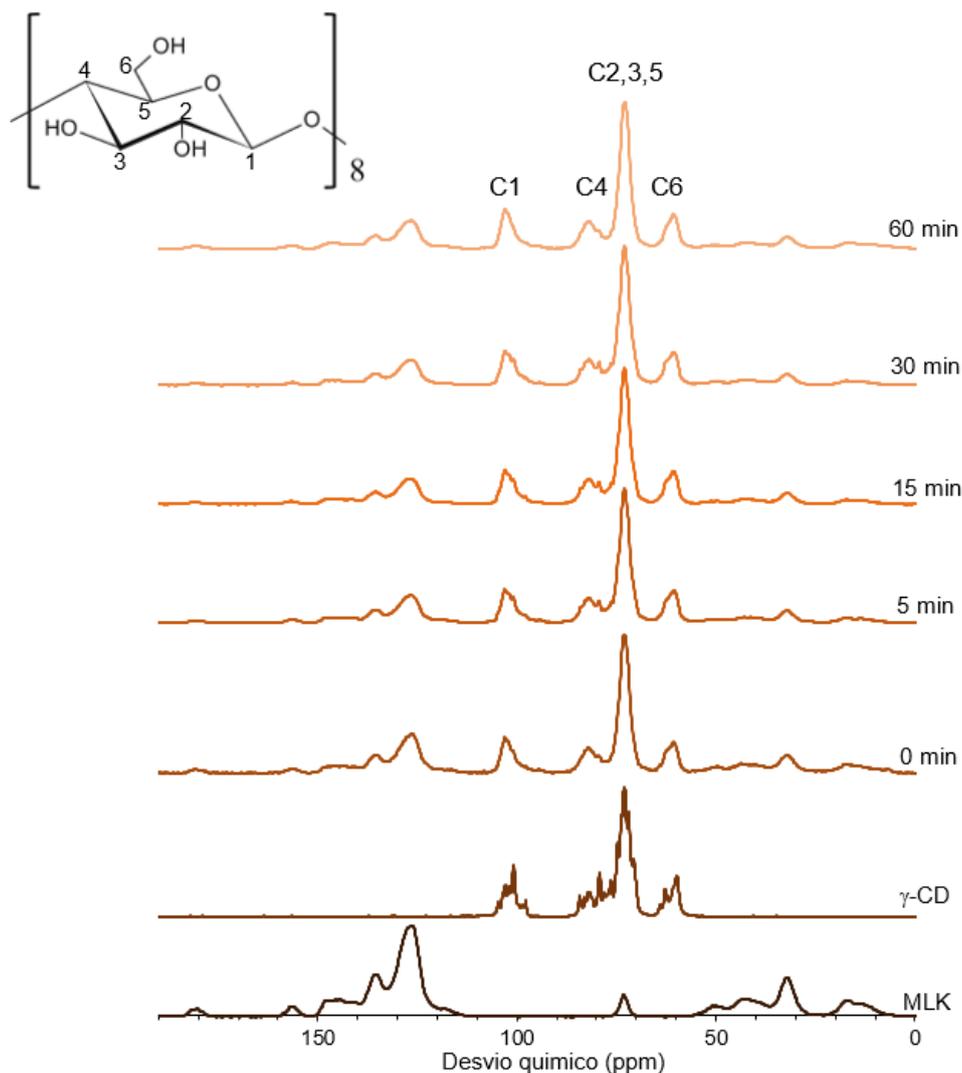


Figura 24. Espectros de ^{13}C NMR da γ -CD, do MLK e da mistura física MLK: γ -CD(pré-moída) 1:1 não moída e moída durante 5, 10, 15, 25, 30 e 60 min (num moinho planetário). A identificação dos carbonos da γ -CD está indicada na unidade de glucose (adaptado de [115]).

Ao observar o espectro da amostra do tempo zero verifica-se que as ressonâncias dos carbonos da γ -CD já perderam alguma multiplicidade (Figura 24), resultante do tratamento prévio deste hospedeiro que provoca a sua amorfização, tal como verificado

por PXRD (Figura 22). Estes resultados estão de acordo com o observado no ensaio em que se moeu a γ -CD sozinha, onde se observou também que a moagem provocava uma perda da multiplicidade das suas ressonâncias (Figura 16).

Com o decorrer da moagem de MLK: γ -CD(pré-moída) há uma redução gradual na multiplicidade das ressonâncias da γ -CD. Esta alteração poderá resultar da inclusão do MLK na cavidade da γ -CD, uma vez que este processo está associado a um ajuste da γ -CD de modo a incorporar o MLK, adotando assim uma conformação mais simétrica e, conseqüentemente, reduzindo a sua multiplicidade [112-114].

Microscopia Eletrônica de Varrimento

A análise da mistura física de MLK: γ -CD(pré-moída) pela técnica de EDS *mapping* permite distinguir a presença de dois componentes com composições químicas diferentes: uns apresentam elementos característicos do MLK (Na, S, Cl) enquanto outros apresentam apenas elementos comuns ao MLK e γ -CD (C) (Figura 25a, b). Estes componentes são, pois, respetivamente identificados como o MLK e a γ -CD.

As partículas de γ -CD apresentam uma morfologia diferente daquela observada nas imagens de SEM da mistura física de MLK com a γ -CD não moída (ver Figura 17). Nessa amostra, a γ -CD apresentava-se, conforme é típico das ciclodextrinas, como prismas, de bordos mais ou menos irregulares. Nas misturas onde houve pré-moagem da γ -CD, as partículas são mais pequenas e arredondadas (Figura 25a), como resultado da ação mecânica do moinho.

Através da análise por EDS *mapping* foi possível verificar que após 5 minutos de moagem as partículas de γ -CD começam a apresentar elementos característicos do MLK (Na, S, Cl) (Figura 25c, d), sugerindo assim uma interação entre ambos os componentes. Com o decorrer do tempo de moagem esta interação aumenta e aos 30 min já existem partículas de γ -CD completamente envolvidas por MLK (Figura 25e, f), havendo também, contudo, partículas de γ -CD sem vestígios de MLK (Figura 25f, seta 1) e aglomerados de MLK isolados (Figura 25f, seta 2). Só aos 60 min de moagem se consegue observar uma distribuição tendencialmente uniforme do MLK (Figura 25h), indicando uma maior interação hóspede-hospedeiro (que pode ser mais ou menos superficial). É de notar que no ensaio efetuado no moinho planetário, sem recurso à pré-moagem da γ -CD, se tinha observado uma distribuição uniforme do MLK pela amostra logo após 15 min de moagem.

Estes resultados sugerem, por isso, que a pré-moagem atrasou a interação, provavelmente por diminuir o atrito entre os dois componentes.

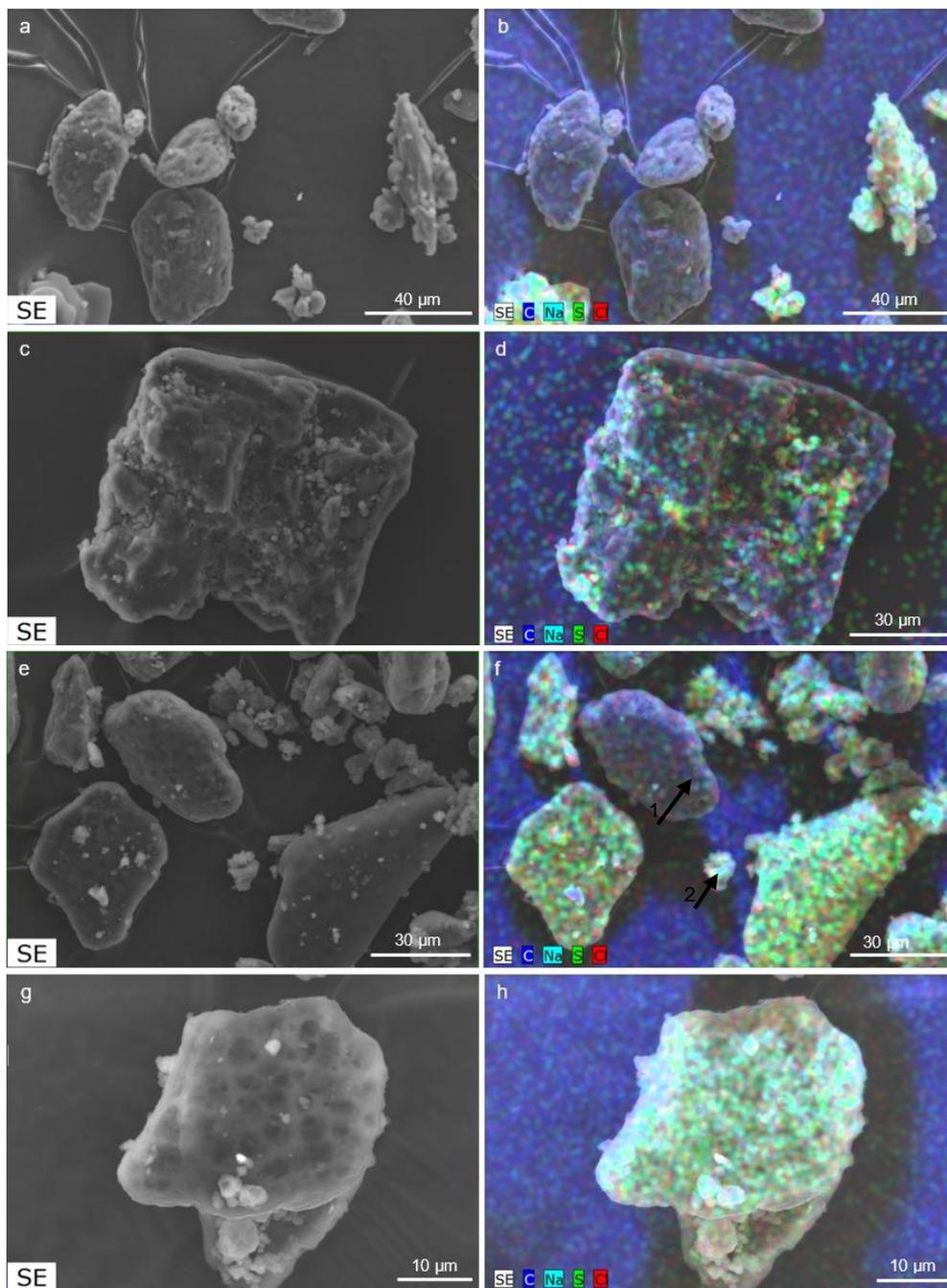


Figura 25. Imagens de microscopia eletrônica (coluna da esquerda) com respectivo mapeamento (coluna da direita) das amostras MLK:γ-CD(pré-moída) não moídas (a, b) e moídas por 5 min (c, d), 30 min (e, f) e 60 min (g, h) num moinho planetário. A distribuição de elementos (C, Cl, S e Na) foi determinada por mapeamento por EDS.

Espectroscopia de Infravermelho

O MLK apresenta grupos funcionais como a quinolina (Figura 8a) e os anéis b e c (Figura 8b, c) que, tal como demonstrado no ensaio da liofilização, funcionam como sondas de inclusão, por apresentarem bandas de absorção em infravermelho numa região espectral livre de sinais da γ -CD, e que sofrem desvios com a inclusão. Permitem, pois, monitorizar a inclusão com o tempo de moagem, como se mostra na Figura 26.

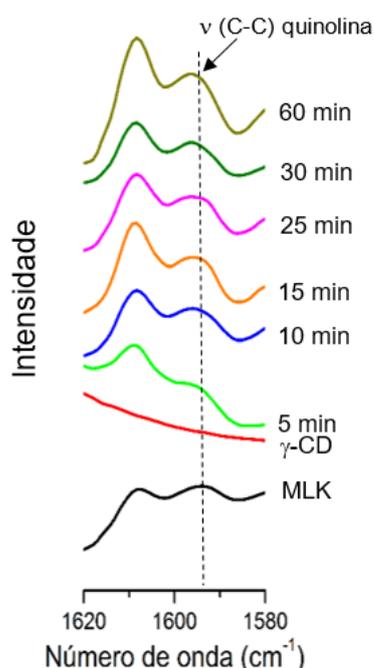


Figura 26. Espectro de infravermelho, na região 1620-1580 cm^{-1} , do MLK, da γ -CD e de MLK: γ -CD(pré moída) após 5, 10, 15, 25, 30 e 60 min de moagem conjunta.

A Tabela 4 mostra os valores das bandas associadas a estiramentos C-C dos anéis de quinolina e dos anéis b e c do MLK. Note-se que após 60 min de moagem de MLK: γ -CD(pré-moída) se observa um desvio da banda atribuída à quinolina para frequências ligeiramente superiores, bem como um pequeno desvio para os anéis b e c, dentro do limite de resolução (2 cm^{-1}). Estes resultados indicam, tal como para o ensaio anterior, que a zona da molécula de MLK onde se encontra o grupo quinolina foi inserida na cavidade da γ -CD para formar um composto de inclusão.

Tabela 4. Frequências observadas (cm^{-1}) para MLK e MLK: γ -CD(pré-moída) 60 min.

MLK	MLK: γ -CD(pré-moída) 60 min	Descrição aproximada
1595	1597	ν (C-C) anel quinolina
1608	1609	ν (C-C) anéis b e c

Termogravimetria

Os termogramas das amostras de MLK: γ -CD(pré-moída) ao tempo zero e demais tempos de moagem conjunta são apresentados na Figura 27, juntamente com os da γ -CD e do MLK. A primeira perda de massa, correspondente à saída de moléculas de água, é cerca de 10% para a γ -CD, e que está de acordo com os valores já descritos na literatura [100]. Por sua vez, no MLK a perda de massa resultante da desidratação é cerca de 7%, cerca de 2 vezes mais que o registado no primeiro ensaio. Esta diferença pode dever-se ao facto de esta amostra provir de outro fornecedor, e apresentar mais água. A mistura física de MLK: γ -CD(pré-moída) perde 6.5% de massa por desidratação, valor que praticamente não se altera com a moagem (varia entre 6.2 e os 7%).

A diferença mais evidente nos termogramas das amostras moídas é a redução gradual da temperatura de decomposição, que oscila entre os 208 e os 225 °C, valores bastante inferiores aos dos componentes puros (γ -CD e MLK), e que indicam uma interação entre ambos. É ainda de salientar o facto de a mistura física de MLK: γ -CD(pré-moída) também iniciar a sua decomposição a uma temperatura mais baixa (235 °C) do que os componentes puros, indicando uma forte afinidade entre eles.

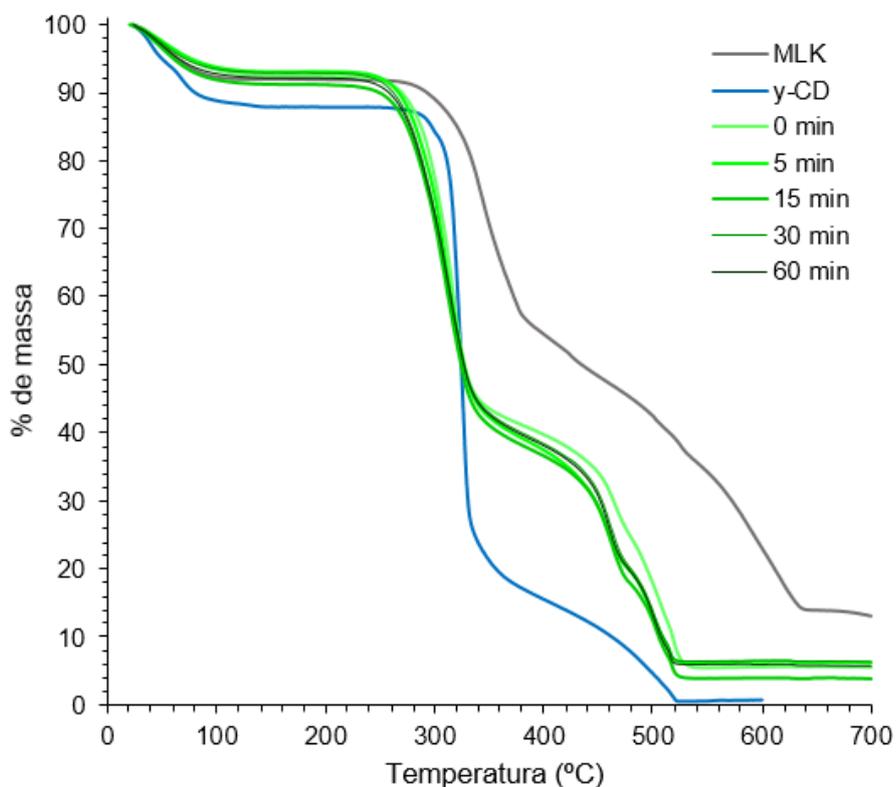


Figura 27. Termogramas da γ -CD, do MLK, da mistura física MLK: γ -CD(pré-moída) 1:1 (indicada como 0 min) e das amostras MLK: γ -CD(pré-moída) moídas durante 5, 15, 30 e 60 min (num moinho planetário).

Note-se ainda que a temperatura de decomposição da mistura de MLK: γ -CD(pré-moída) (235 °C) é inferior à observada no ensaio anterior para a mistura física de MLK: γ -CD (240 °C). Sendo que estas misturas diferem apenas na moagem prévia, ou não, da γ -CD, sugere-se que a alteração observada pode resultar desse pré-tratamento. Para confirmar, foi comparado o termograma da γ -CD pura e da γ -CD pré-moída, que estão representados na Figura 28. Tal como se pode verificar, estes termogramas são diferentes. Há uma ligeira redução no número de águas de desidratação, de 10 para 9.5 (desidratação diminui em 0.5%), mas é na temperatura de decomposição que se observam diferenças mais acentuadas. A da γ -CD era de 263 °C e, após a moagem, passa para 250 °C. Estas alterações sugerem que a amorfização da γ -CD por moagem é suficiente para baixar a sua temperatura de decomposição, confirmando que as diferenças observadas entre as temperaturas de decomposição das misturas de MLK: γ -CD e de MLK: γ -CD(pré-moída) resultam da pré-moagem da γ -CD

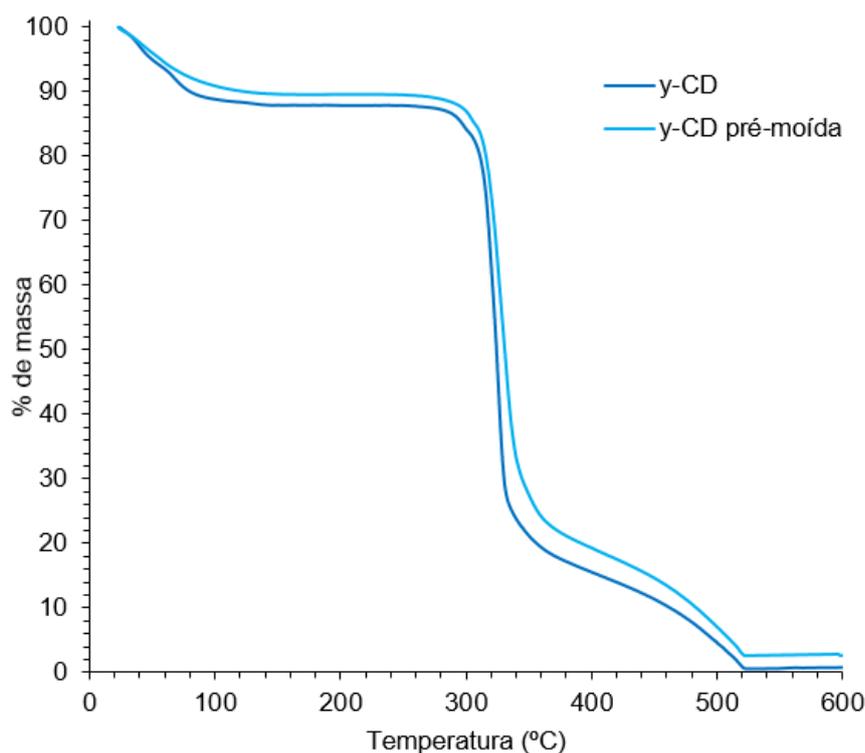


Figura 28. Termogramas da γ -CD e da γ -CD pré-moída durante 60 min num moinho planetário.

Calorimetria Diferencial de Varrimento

Os resultados de DSC das amostras MLK: γ -CD(pré-moída) moídas não são apresentados, uma vez que não se observaram sinais.

III. Forno de Rolos

A formação de compostos de inclusão MLK: γ -CD resultante da absorção de energia mecânica proveniente de um forno de rolos foi também estudada. A principal diferença introduzida por este equipamento é a redução da velocidade de rotação das bolas de moagem. No forno de rolos, atinge-se apenas 50 rotações.min⁻¹ enquanto no moinho planetário, usado nos ensaios anteriores, a velocidade de operação é de 600 rotações.min⁻¹.

Usaram-se, como anteriormente, quantidade equimolares de MLK e γ -CD que foram moídas durante 4320, 8640 e 21600 minutos (3, 6 e 15 dias) (detalhes na secção experimental, ponto 5.4, parte III) e analisadas segundo as técnicas já descritas.

Difração de Raios-X de pós

As amostras de MLK: γ -CD recolhidas durante a moagem no forno de rolos apresentam uma redução na cristalinidade, que se traduz pela diminuição da intensidade de algumas reflexões e pelo desaparecimento de outras, mais evidente a baixos valores de 2θ (Figura 29). Ao fim de 21600 min de moagem, nota-se um halo na região 3 - 13° de 2θ , semelhante ao observado em MLK: γ -CD(pré-moída) após 60 min no moinho planetário (Figura 22), e indicativo da presença concomitante de material amorfo.

Note-se, porém, que a redução de cristalinidade não é tão evidente como a registada para as amostras obtidas no primeiro ensaio do moinho planetário, em que a moagem de MLK: γ -CD por apenas 720 min levou à formação de um produto amorfo (Figura 12). Neste ensaio, mesmo após 21600 min de moagem (15 dias) a amostra analisada ainda apresenta várias reflexões. Esta diferença resulta, muito provavelmente, da diferença na velocidade de rotação de cada moinho.

Para melhor se estudar o efeito da velocidade, devem comparar-se amostras moídas no forno de rolos e no moinho planetário que tenham em comum o mesmo número de rotações totais das bolas de moagem. Deste modo, a amostra tratada por 4320 min no forno de rolos corresponderá à dos 360 min do moinho planetário, com 216000 rotações. Interessantemente, os seus difratogramas aparentam uma amorfização semelhante (Figura 30). Por sua vez, comparando a amostra tratada 8640 min no forno de rolos com a de 720 min no moinho planetário, ambas sujeitas a 432000 rotações, notam-se já algumas diferenças, tendo a amostra do forno de rolos mantido alguma cristalinidade, praticamente ausente na amostra do moinho planetário (Figura 30). Demonstra-se, então, que a amorfização não resulta meramente do número de ciclos de moagem.

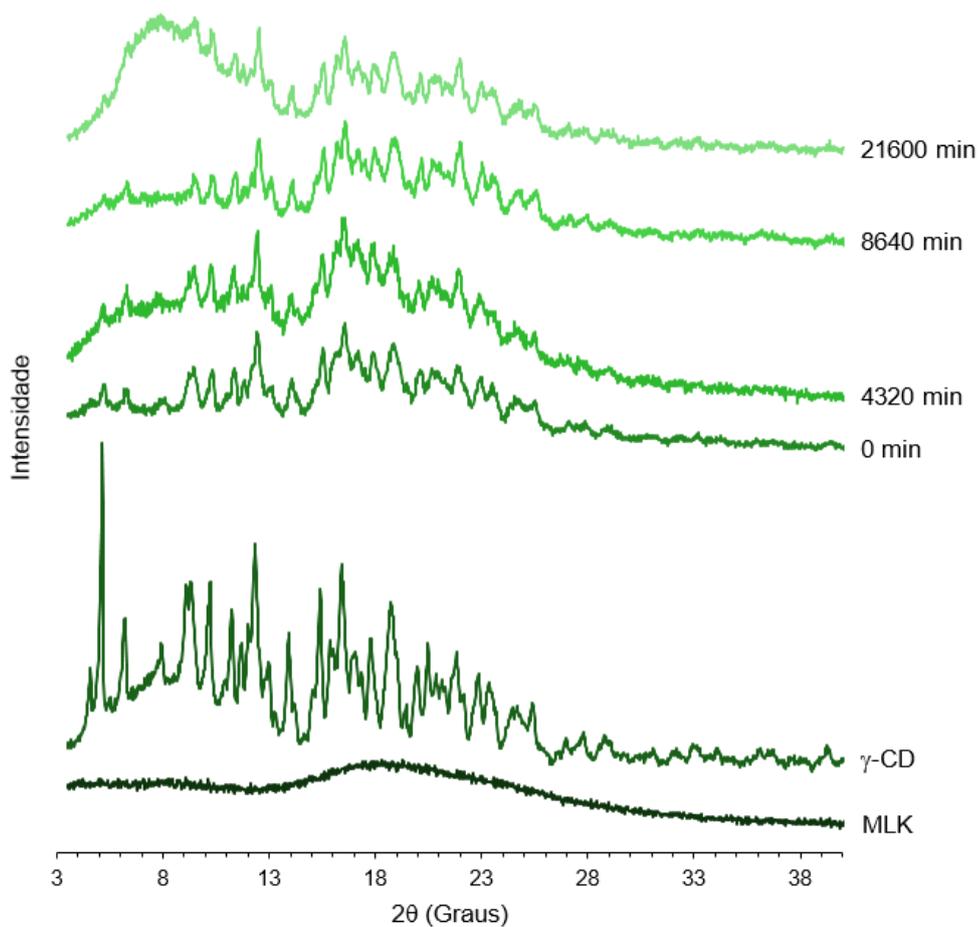


Figura 29. Difrátogramas do MLK, da γ -CD e de MLK: γ -CD após 0, 4320, 8640 e 21600 min (0, 3, 6 e 15 dias) de moagem num forno de rolos.

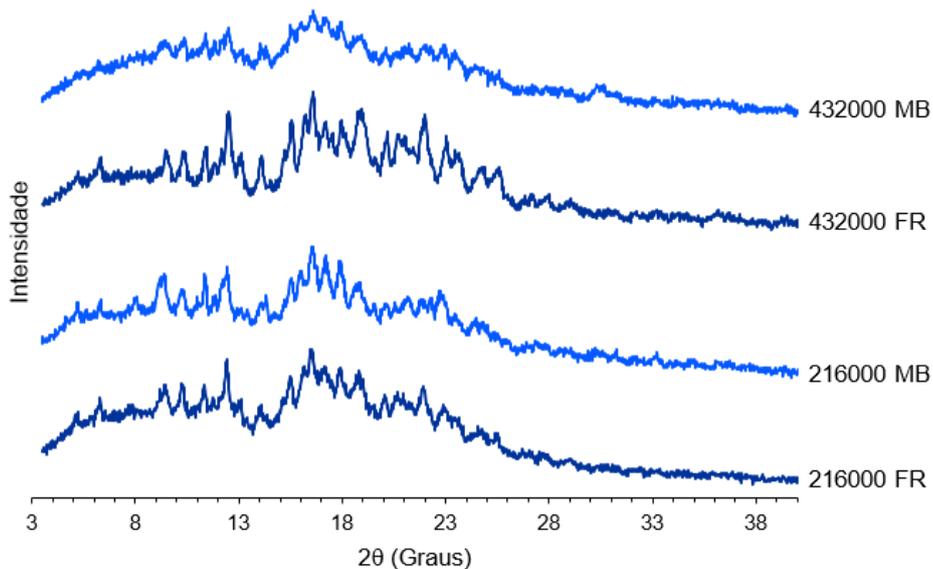


Figura 30. Difrátogramas de MLK: γ -CD moído a velocidades diferentes, 600 ciclos.min⁻¹ no moinho de bolas planetário (MB) e 50 ciclos.min⁻¹ no forno de rolos (FR): baixo, 216000 ciclos; cima, 432000 ciclos.

A comparação de resultados de amostras com o mesmo número de ciclos de moagem aponta para uma forte influência da velocidade no grau de amorficidade dos produtos. Note-se ainda que a morfologia das cubas usadas na moagem é distinta. As cubas usadas no forno de rolos têm um diâmetro inferior que as usadas no moinho planetário e, conseqüentemente, um menor percurso de rotação. Isto associado a uma menor velocidade do forno de rolos, resulta numa menor energia cinética e, por isso, a uma menor energia mecânica que pode ser absorvida pela amostra. Conseqüentemente, as amostras de MLK: γ -CD moídas no forno de rolos apresentam maior cristalinidade.

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ CP-MAS NMR

Os espectros das amostras de MLK: γ -CD moídas no forno de rolos apresentam algumas diferenças nos sinais dos carbonos quando comparados com os espectros dos componentes puros, conforme se pode observar na Figura 31 (na Tabela 8 do ponto 5.4, parte III, da secção experimental, é possível ver com mais detalhe a listagem das ressonâncias presentes no espectro).

O espectro da amostra MLK: γ -CD moída por 4320 min apresentou alterações na multiplicidade do C1, que diminuiu de oito ressonâncias para cinco. Nos restantes carbonos não se observou uma alteração da multiplicidade das ressonâncias, no entanto, os seus picos começaram a surgir na forma de ombros e a ficar menos definidos, especialmente nos sinais dos C2,3,5. Por sua vez, ao analisar as amostras MLK: γ -CD moídas por 8640 e 21600 min, foi possível verificar que estas apresentam ainda as oito ressonâncias correspondentes ao C1, assim como as ressonâncias dos restantes carbonos com multiplicidade bem definida. Estes resultados sugerem, por isso, que possa ter ocorrido uma recristalização da γ -CD.

Note-se ainda que sendo uma das razões para a perda de multiplicidade das ressonâncias a amorfização das amostras, estes resultados estão concordantes com os obtidos por difração de raios-X de pós, uma vez que as amostras de MLK: γ -CD moídas ainda apresentavam cristalinidade.

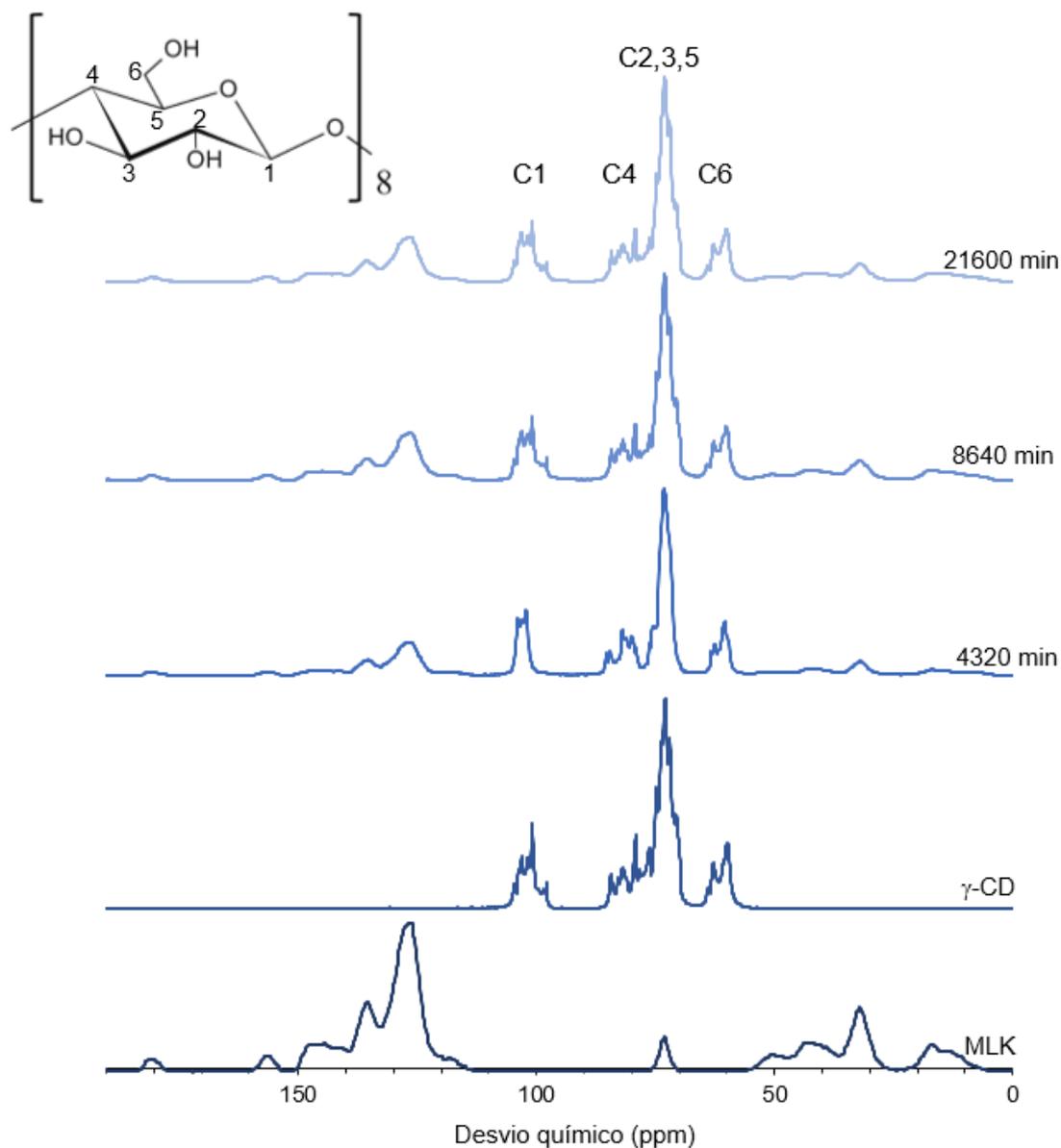


Figura 31. Espectros de ^{13}C NMR da $\gamma\text{-CD}$, do MLK e da sua mistura física 1:1 moída durante 4320, 8640 e 21600 min (num forno de rolos). A identificação dos carbonos da $\gamma\text{-CD}$ está indicada na unidade de glucose (adaptado de [115]).

Microscopia eletrónica de varrimento

A análise por SEM das amostras de MLK: $\gamma\text{-CD}$ moídas no forno de rolos, permite observar as alterações morfológicas que ocorrem no MLK e na $\gamma\text{-CD}$ durante a moagem [102, 116, 117]. As imagens obtidas para a mistura de MLK: $\gamma\text{-CD}$ moída durante 8640 e 21600 min estão representadas na Figura 32, sendo possível observar a presença de

partículas com uma morfologia diferente das observadas na mistura física MLK: γ -CD (Figura 17). Nas amostras de MLK: γ -CD moídas as partículas de γ -CD perderam a forma de prismas com bordos irregulares, passando a ser mais arredondadas e mais pequenas (Figura 32a, c). A análise das amostras com recurso à técnica de EDS *mapping* permitiu verificar que com o tempo de moagem o MLK se distribuiu pela superfície da γ -CD, formando uma camada (Figura 32b, d). Estes resultados sugerem assim uma interação entre ambos os componentes, que poderá indicar a formação do composto de inclusão.

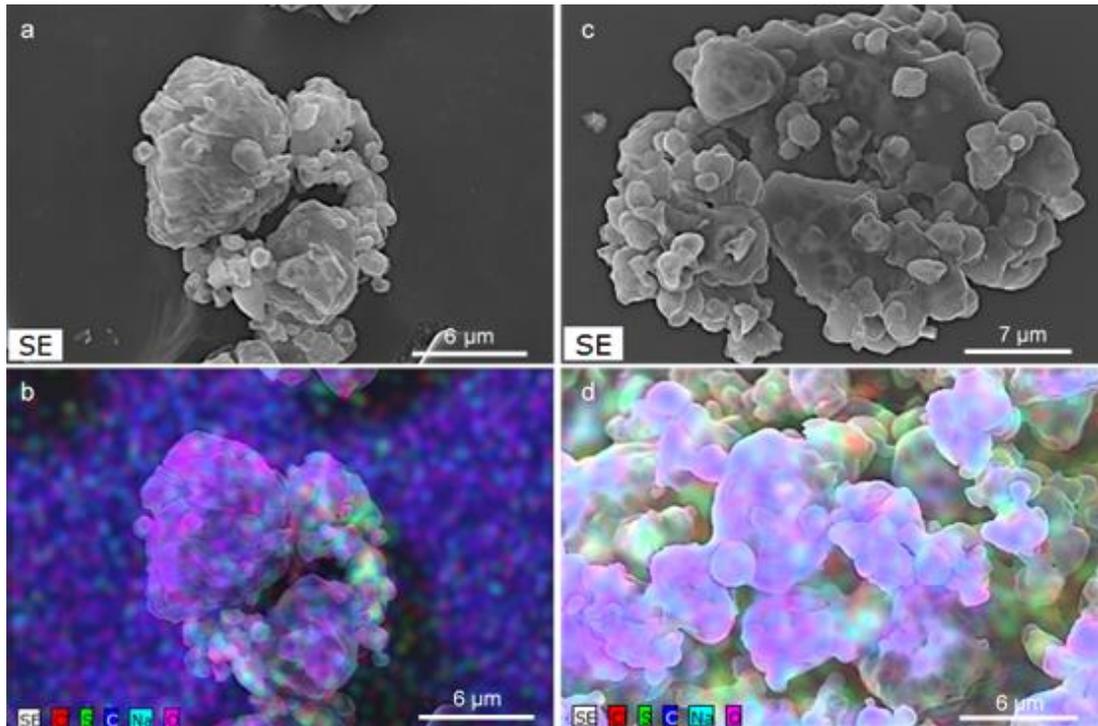


Figura 32. Imagens de microscopia eletrónica das amostras MLK: γ -CD moídas por 8640 min (a) e 21600 min (c) num forno de rolos e respetiva distribuição de elementos (C, Cl, S e Na) por mapeamento por EDS (b, d).

Espectroscopia de Infravermelho

A Figura 33 e a Tabela 5 mostram os dados de infravermelho para as bandas de alongação C-C dos anéis de quinolina e dos anéis aromáticos b e c do MLK, usados como sonda de inclusão.

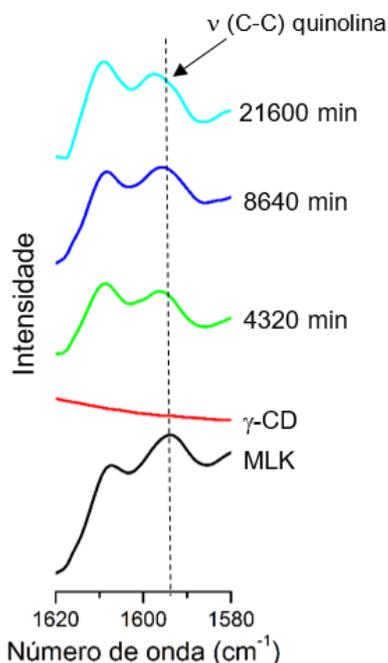


Figura 33. Espectro de infravermelho, na região 1620-1580 cm^{-1} , do MLK, da γ -CD e de MLK: γ -CD após 4320, 8640 e 21600 min de moagem num forno de rolos.

A amostra MLK: γ -CD moída 21600 min apresenta a banda $\nu(\text{C-C})$ do anel quinolínico desviada $+3 \text{ cm}^{-1}$, o que, tal como nas amostras dos ensaios anteriores, pode ser interpretado como indicativo de inclusão (pelo menos de uma parte do material, visto que os dados das outras técnicas indicam a presença de γ -CD e MLK que não interagiram). As bandas $\nu(\text{C-C})$ dos anéis b e c apresentam um desvio de apenas $+1 \text{ cm}^{-1}$ (que fica abaixo do limite de resolução, 2 cm^{-1}).

Tabela 5. Frequências observadas (cm^{-1}) para MLK e MLK: γ -CD moídos 21600 min.

MLK	MLK: γ -CD 21600 min	Descrição aproximada
1595	1598	$\nu(\text{C-C})$ anel quinolina
1608	1609	$\nu(\text{C-C})$ anéis b e c

Termogravimetria

Os termogramas da γ -CD, do MLK, da sua mistura física 1:1 e das amostras MLK: γ -CD moídas no forno de rolos são apresentados na Figura 34. A primeira perda de massa correspondente à desidratação é cerca de 10% para a γ -CD [100], 4% para o MLK e 6.5% para a mistura física dos componentes. A perda de massa por desidratação é algo incoerente nas amostras moídas, com valores de 10% para MLK: γ -CD moída 4320 min e de 6% para as amostras moídas 8640 e 21600 min.

A alteração mais proeminente nos termogramas obtidos é na temperatura de decomposição. A da γ -CD é a 263 °C [100] e a do MLK é a 247 °C. Na mistura física de MLK: γ -CD observou-se uma diminuição da temperatura de decomposição para 240 °C, o que sugere uma afinidade entre os dois componentes. Com o decorrer da moagem estes interagem, resultando assim numa descida gradual da temperatura de decomposição das amostras MLK: γ -CD moídas para valores compreendidos entre os 211 e os 214 °C. Estes resultados estão em concordância com os obtidos nos ensaios anteriores, e sugerem que a interação entre o MLK e a γ -CD, aquando a formação dos compostos de inclusão, provoca uma diminuição da estabilidade térmica destes componentes.

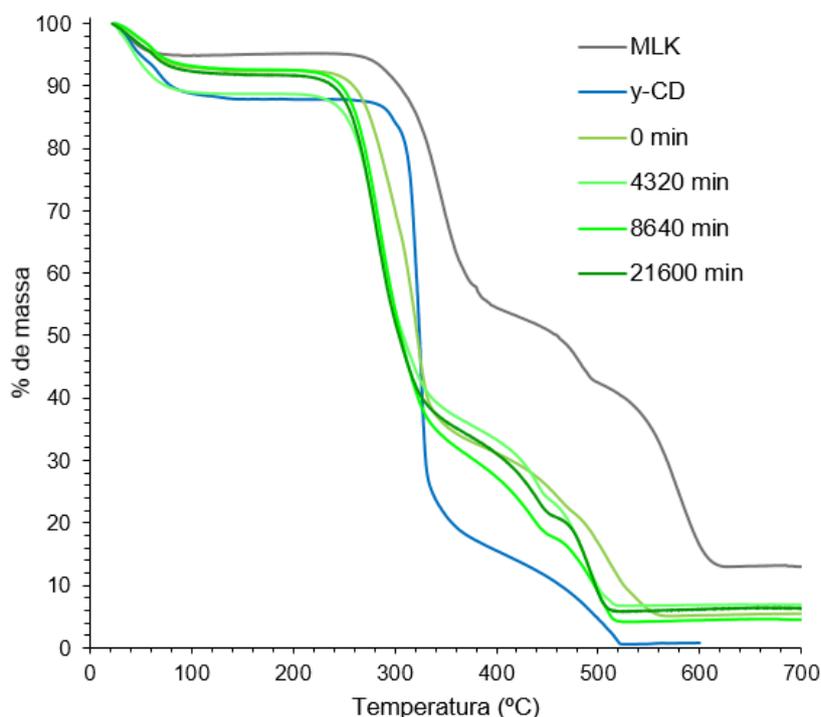


Figura 34. Termogramas da γ -CD, do MLK, da sua mistura física 1:1 (indicada como 0 min) e das amostras MLK: γ -CD moídas durante 0, 4320, 8640 e 21600 min (num forno de rolos).

Calorimetria Diferencial de Varrimento

Os gráficos de DSC do MLK, da γ -CD e da mistura de MLK: γ -CD moída por 4320, 8640 e 21600 min estão representados na Figura 35. A característica mais relevante dos traçados para estas amostras é a ausência de sinal correspondente à fusão do MLK, o que pode ser interpretado como uma possível inclusão. As amostras apresentam ainda ocorrência de novos sinais. Na de MLK: γ -CD moída 4320 min, observam-se novos picos a 103 e 110 °C, atribuídos à formação de um novo composto com uma estabilidade térmica mais baixa que a do MLK e da γ -CD. Para MLK: γ -CD moída 8640 min não se observou o pico dos 103 °C, enquanto que o dos 110 °C e o da γ -CD aumentaram. Estes resultados podem sugerir que nesta amostra se formou apenas um composto diferente, havendo ainda alguma γ -CD sozinha na amostra. Por sua vez, para MLK: γ -CD moída 21600 min, observa-se um sinal na região 105-115°C, mais amplo e menos intenso do que os das amostras com menos tempo de moagem, e surge um novo pico a 153 °C, que pode ser um polimorfo do MLK. Note-se ainda a presença de um pico exotérmico a 172 °C que pode indicar uma recristalização.

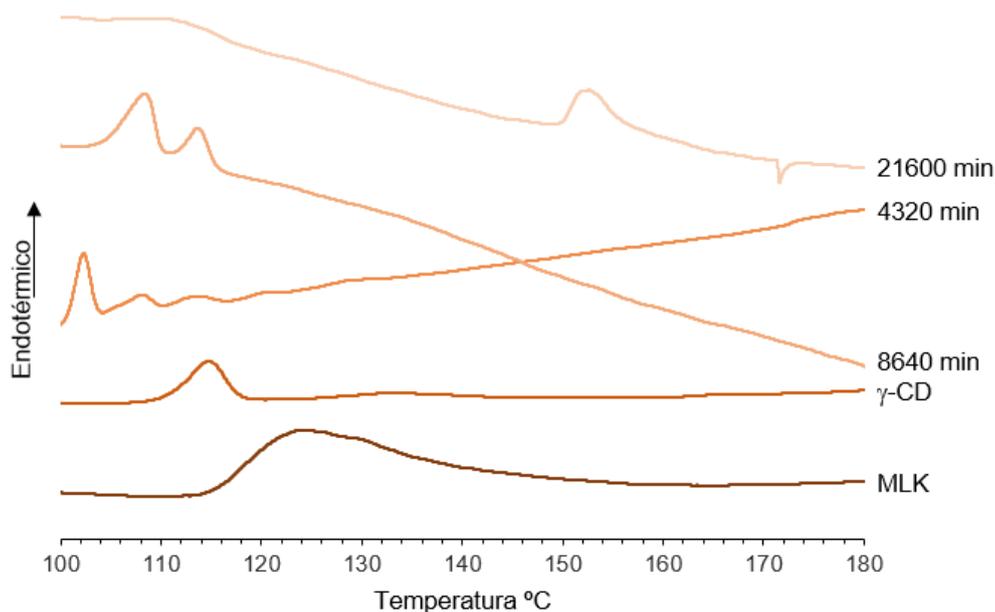


Figura 35. DSC do MLK, da γ -CD e da mistura de MLK: γ -CD moída por 4320, 8640 e 21600 min num forno de rolos, no intervalo de temperaturas selecionado.

4. Dissolução de MLK a partir dos aductos MLK: γ -CD

A dissolução de MLK a partir dos diferentes produtos de moagem foi analisada e comparada com o perfil de dissolução do MLK puro. Para tal, os produtos da moagem ou o MLK foram colocados em contacto com água, sob agitação e num local protegido da luz, monitorizando-se a quantidade de MLK dissolvido ao longo de duas horas, a partir de espectroscopia de Ultravioleta-Visível (detalhes na secção experimental, ponto 6). Os resultados são apresentados na Figura 36.

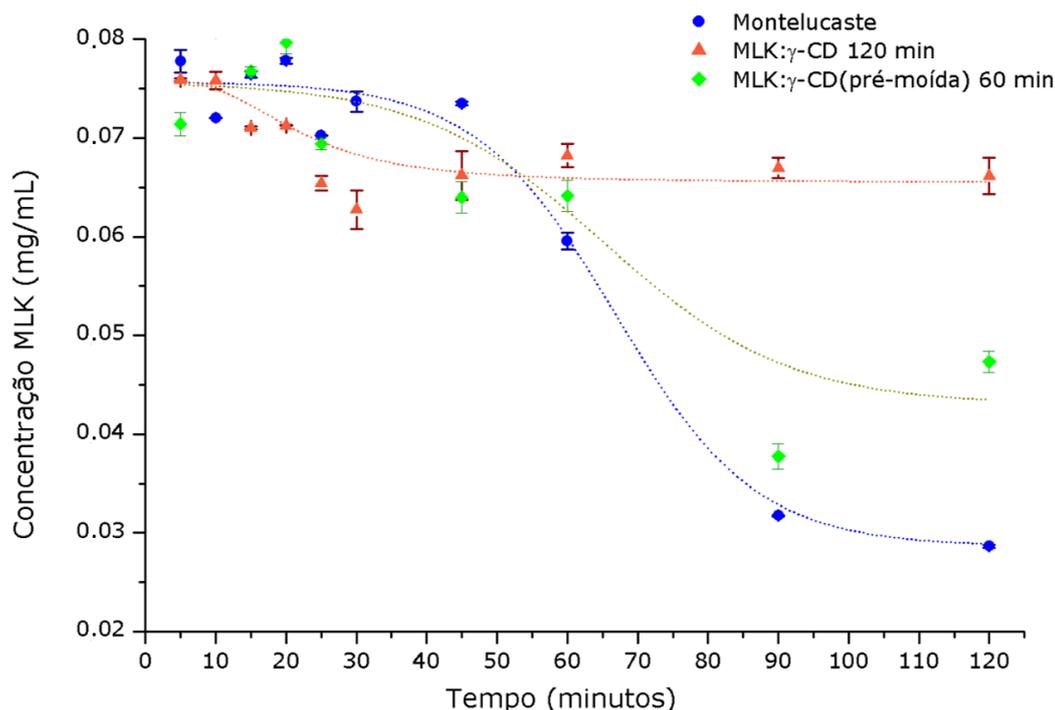


Figura 36. Gráfico da solubilidade em água do MLK e dos compostos de inclusão MLK: γ -CD obtidos por: moagem durante 120 minutos ou pré-moagem da γ -CD durante 60 minutos, seguido de adição do MLK e moagem por mais 60 minutos (num moinho planetário).

De um modo global, com o decorrer do tempo observou-se em ambas as soluções preparadas uma diminuição na quantidade de MLK em solução. Mais precisamente, nos tempos iniciais (5-45 min), a quantidade deste API nas soluções variou entre os 0,08-0,06 mg/mL. Por sua vez, desde os 60 até aos 120 minutos, a concentração do MLK nas soluções preparadas com MLK ou com os compostos de inclusão MLK: γ -CD (pré-moída) 60 min e MLK: γ -CD 120 min, diminuiu para 0,03 mg/mL, 0,05 mg/mL e 0,07 mg/mL, respetivamente. Estes resultados indicam assim que a formação de compostos de inclusão entre o MLK e a γ -CD permite aumentar cerca de duas vezes mais a solubilidade do fármaco, uma vez que a sua concentração final é maior nas soluções preparadas com os compostos de inclusão, comparativamente com o MLK sozinho.

É ainda de salientar o facto de a concentração deste API ter diminuído com o decorrer do tempo, o que indica a presença de menos fármaco em solução. Na realidade, esta diminuição da concentração do fármaco deve-se à formação de um precipitado amarelo, com o decorrer do ensaio, e que se postula ser MLK degradado. Sendo assim, de forma a identificar este precipitado, o mesmo foi analisado por espectroscopia de infravermelho, estando indicado na Figura 37 o espectro obtido, em comparação com o do MLK. Na generalidade os espectros apresentam um perfil idêntico, no entanto, observam-se também algumas diferenças entre ambos, como por exemplo o aparecimento de uma nova banda, no espectro do precipitado, a valores de frequência de 1709 cm^{-1} (Figura 37a). Além disso, as bandas observadas desde 1578 até 1560 cm^{-1} , assim como a banda a 1269 cm^{-1} , no espectro do MLK, já não se observam no espectro dos precipitados (Figura 37b). Nos seus espectros não se observa também a banda a 1401 cm^{-1} , presente no MLK, no entanto, observa-se uma banda nova a 1383 cm^{-1} (Figura 37c).

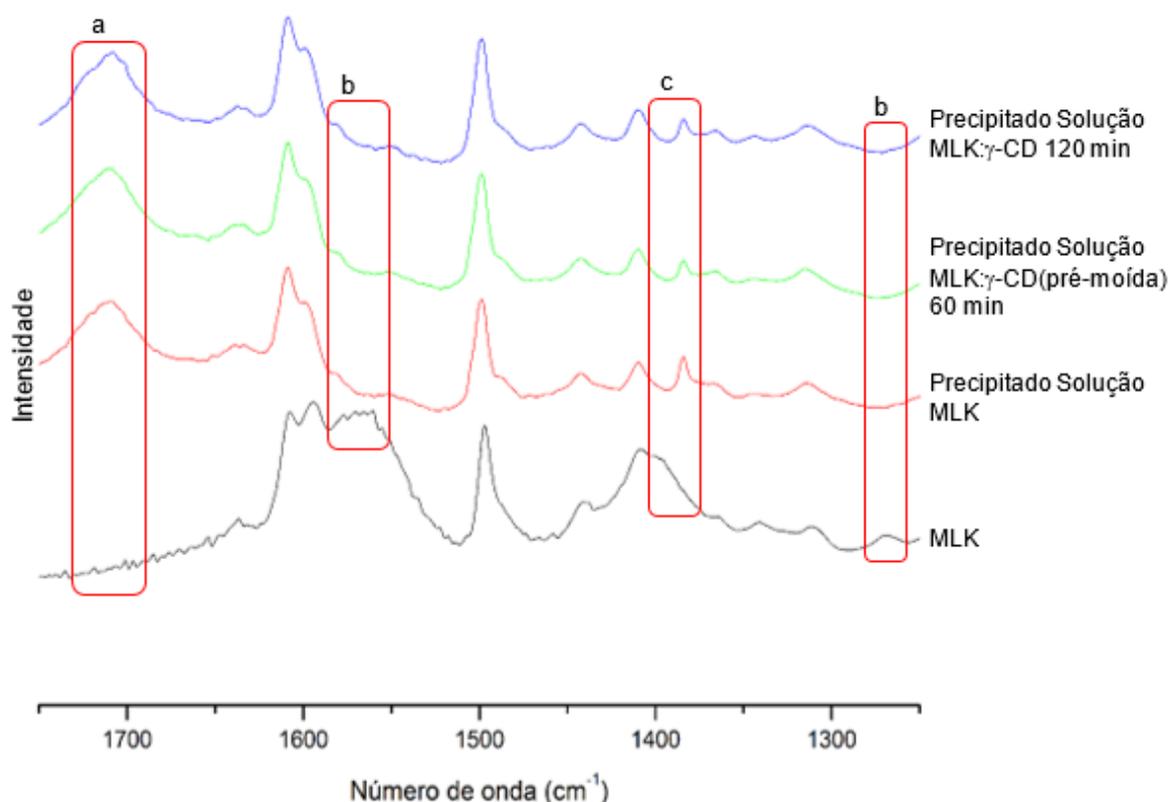


Figura 37. Espectro de infravermelho do MLK, em comparação com os dos precipitados formados aquando os ensaios de solubilidade do MLK e dos compostos de inclusão MLK:γ-CD formados por moagem de uma mistura equimolar dos dois componentes, durante 120 min, ou com recurso à pré-moagem da γ-CD, seguido de moagem dos dois componentes durante 60 min.

5. Estabilidade à luz do MLK e dos aductos MLK:γ-CD formados

A exposição do MLK à luz, durante 120 minutos, não provocou nenhuma alteração visível no fármaco, como por exemplo a mudança de cor. Através da análise das amostras por espectroscopia de infravermelho verificou-se também que a exposição à luz não provocou alterações no espectro, que seriam de esperar caso o fármaco se degradasse (como aconteceu no ensaio da solubilidade). Estes resultados indicam, por isso, que o MLK é estável à luz, pelo menos durante o tempo de exposição utilizado neste ensaio. Na realidade, num estudo realizado por Al Omari *et al.* verificou-se uma degradação de 20 % do MLK (na forma de pó comercial, como o usado neste ensaio), mas após exposição à luz durante 1 semana [58]. Sendo assim, a ausência de degradação neste ensaio pode dever-se ao baixo período de exposição à luz.

Visto que a exposição do MLK à luz não provocou alterações no seu espectro de infravermelho, as amostras dos compostos de inclusão MLK:γ-CD não foram analisadas, uma vez que também não se esperariam observar alterações nos espectros.

III. Conclusões

Os compostos MLK: γ -CD formados pelas diferentes abordagens mecanoquímicas apresentaram características distintas, quer quanto às propriedades físico-químicas, quer quanto à cinética de inclusão. A cristalinidade das amostras preparadas no forno de rolos é bastante superior à daquelas preparadas no moinho planetário, que se conseguiram obter no estado amorfo com tempos de moagem relativamente curtos. Esta diferença demonstra, pois, que a velocidade de rotação aplicada (forno de rolos: 50 rotações.min⁻¹; moinho planetário: 600 rotações.min⁻¹) tem uma forte influência na amorfização, tal como seria de esperar, uma vez que uma velocidade mais baixa está relacionada com uma menor energia cinética, e, por sua vez, uma menor energia mecânica disponível para a formação dos compostos de inclusão.

Um outro fator importante na formação dos compostos MLK: γ -CD é o grau de amorfização da ciclodextrina gama. Num dos ensaios a γ -CD foi pré-moída com o intuito de potenciar a sua interação com o MLK, através de uma maior área de contacto entre os dois componentes. Os resultados de DXRP demonstraram realmente a formação de um composto MLK: γ -CD amorfo com apenas 60 min de moagem, comparativamente com os 720 min necessários no ensaio sem o pré-tratamento. Por sua vez, os resultados de SEM dos primeiros tempos de moagem destas amostras mostraram um fenómeno interessante. No ensaio com pré-moagem da γ -CD, até aos 30 min de moagem as amostras são heterogéneas, não havendo (contrariamente às expectativas) uma completa interação entre o MLK e a γ -CD. Por seu turno, no ensaio sem pré-tratamento observou-se uma completa interação entre os dois componentes logo após 15 min de moagem. Uma explicação possível para este resultado é que a pré-moagem da γ -CD terá alterado a morfologia das partículas de γ -CD tornando-as mais arredondadas e reduzindo o atrito com o MLK.

Enquanto os resultados de DXRP mostram que o ensaio com recurso á pré-moagem permite obter mais rapidamente o composto MLK: γ -CD amorfo, os resultados de FT-IR sugerem, por seu turno, que no ensaio sem pré-tratamento ocorreu possivelmente uma maior interação entre o MLK e a γ -CD. Na verdade, o desvio da banda ν (C-C) quinolina é comparável àquele observado para a amostra obtida por liofilização, que se acredita ser constituída por um composto de inclusão MLK: γ -CD mais puro. Consequentemente, a quantidade de MLK dissolvido em água a partir da amostra

MLK: γ -CD, sem pré moagem, foi 1.4 vezes superior à da amostra com pré moagem. Relativamente ao MLK puro a solubilidade foi aumentada 2.3 vezes.

Concluiu-se assim que a interação com a γ -CD por mecanoquímica é uma forma eficaz de aumentar a solubilidade do MLK, sendo que a melhor abordagem para maximizar a formação de compostos de inclusão MLK: γ -CD é moagem de uma mistura equimolar dos dois componentes, tal como recebidos, sem pré-tratamentos.

IV. Perspetivas Futuras

Um dos seguimentos lógicos para este trabalho, face aos resultados obtidos é, por exemplo, aumentar o tempo de moagem da mistura de MLK:γ-CD(pré-moída), de forma a verificar se permitiria obter um maior rácio de inclusão. Mais ainda, tendo em conta a ausência de alterações no ensaio da estabilidade do MLK à luz, seria pertinente avaliar a sua estabilidade durante um período de tempo mais longo.

Visto que os compostos de inclusão formados apresentam uma solubilidade em água maior que o MLK, seria importante efetuar estudos de biodisponibilidade do fármaco, através de simulações *in vitro*, como por exemplo, estudos de dissolução e permeabilidade através de membranas que mimetizam as biológicas, usando meios que simulem as condições do trato gastrointestinal superior [126]. Poderiam ainda ser efetuados estudos para avaliar a influência do pH do meio e da presença de moléculas biológicas normalmente presentes no trato gastrointestinal, na solubilidade do fármaco.

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a mecanoquímica pode ser uma técnica bastante útil e eficaz para aplicar futuramente na formação de compostos de inclusão. O método será particularmente útil no caso de fármacos pouco solúveis em água, que normalmente são encapsulados por formação de uma suspensão aquosa (*slurry*) e secos com recurso a circulação de ar e calor (com inevitável gasto energético). A expansão do uso da mecanoquímica como um método para a inclusão de uma vasta gama de fármacos em ciclodextrinas poderá apresentar uma enorme vantagem para a indústria farmacêutica, pela sua simplicidade e acessibilidade.

V. Materiais e Métodos

1. Reagentes

As amostras de Montelucaste de sódio (MLK) (> 98 % de pureza, MW=608.17) foram adquiridas à TCI ou foram gentilmente cedidas pela Ashland (sendo produzidas pela Ria International, Índia). As ciclodextrinas gama (MW=1423.11) e beta (MW=1315) foram também cedidas pela Ashland Industries Deutschland GmbH (sendo produzidas pela Wacker-Chemie, com os nomes comerciais Cavamax W8 e W7, respetivamente).

Inicialmente foi utilizada água destilada, tendo esta sido posteriormente substituída por água MiliQ. Outros solventes usados incluem: etanol (99.9 % de pureza, MW=46.07, Panreac Quimica S.A.U.), metanol (99.99 % de pureza, MW=32.04, Fisher Scientific), acetonitrilo (99.5 % de pureza, MW=41.05, Sigma-Aldrich), propanol (> 99.5 % de pureza, MW=60.097, Carlo Erba reagentes), isopropanol (> 99.7 % de pureza, MW=76.10, Carlo Erba reagentes), tetrahidrofurano (THF) (> 99 % de pureza, MW=72.11, Sigma-Aldrich), dimetilformamida (DMF) (> 99.9 % de pureza, MW=73.09, Sigma-Aldrich) e 1,4-Dioxano (99.5 % de pureza, MW=88.11, Scharlau). Destes, o etanol, metanol, acetonitrilo, THF e DMF foram secos usando peneiros moleculares (3 Å), segundo o procedimento descrito por Bradley *et al.* [127]. Foram também utilizados solventes deuterados, nomeadamente água deuterada (99.90 % de pureza), etanol deuterado (99.00 % de pureza) e metanol deuterado (99.80 % de pureza), que foram adquiridos à Euriso-top.

Para a formação de cristais do composto de inclusão MLK:γ-CD, foi ainda testada a cristalização num gel de óxido de poli(etileno) (MW=100 000, Acros Organics), segundo o procedimento descrito por Choquesillo-Lazarte e García-Ruiz [128].

2. Técnicas de Caracterização

Raios-X de Monocristal

Para verificar se se tinham formado cristais, as soluções de montelucaste de sódio puro e com ciclodextrina gama foram analisadas num estereomicroscópio Stemi 2000, equipado com lentes Carl Zeiss. Os cristais observados foram selecionados e recolhidos manualmente da solução em que se encontravam, sendo depois imersos num óleo altamente viscoso, o FOMBLIN Y perfluoropoliéter (LVAC 140/13, Sigma-Aldrich), de maneira a evitar a degradação do cristal por evaporação de solvente. Os cristais foram colocados num Hampton Research CryoLoop, sendo depois coletados dados preliminares da difração de raios-X, a 150(2) K, num equipamento Bruker D8 QUEST.

Este é equipado com um tubo selado de Mo K α ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$), um espelho multicamadas TRIUMPH, um detetor PHOTON 100 CMOS, e um equipamento de baixa temperatura Oxford Instruments Cryostrem 700+ Series. Este equipamento foi controlado com o *software* APEX2.

Difração de Raios-X de pós (PXRD)

Os compostos de inclusão formados por mecanoquímica e liofilização foram analisados por difração de Raios-X de pós, à temperatura ambiente, num difractómetro Empyrean PANalytical (radiação de Cu K $\alpha_{1,2}$, $\lambda_1 = 1.540598 \text{ \AA}$; $\lambda_2 = 1.544426 \text{ \AA}$), equipado com um detetor PIXcel 1D e um porta amostras plano, numa configuração ótica parafocal de Bragg-Brentano (45 kV, 40 mA). Os difratogramas foram recolhidos pelo método *step-counting* (*step* de 0.02°), em modo contínuo, com valores compreendidos entre $3.5 \leq 2\theta \leq 50^\circ$, aproximadamente.

^{13}C NMR em estado sólido

Os espectros de NMR ^{13}C , no estado sólido, foram registados num espectrómetro Bruker Avance III 400 MHz (9.4 T), à temperatura de 25°C . Recorreu-se à técnica de polarização cruzada e rotação segundo o ângulo mágico (CP-MAS), com um pulso de ^1H de $2.75 \mu\text{s}$ a 90° , $2000 \mu\text{s}$ de tempo de contacto em ^{13}C , rotação entre os 12 e 15 kHz e um intervalo de 3-5 segundos entre cada aquisição. Os sinais nos espectros estão apresentados em partes por milhão (ppm), e estão posicionados numa escala que apresenta o TMS como referencia externa.

Espectroscopia de Infravermelho

Os espectros de infravermelho foram obtidos num espectrofotómetro Unicam Mattson Mod 7000, tendo sido utilizadas pastilhas de KBr. Os espectros, tipicamente com 128 *scans*, foram recolhidos em modo de absorvância com uma resolução de 2.0 cm^{-1} e no intervalo de número de onda entre 280 e 4000 cm^{-1} .

Para as amostras preparadas usando o forno de rolos os espectros foram coletados num espectrofotómetro Bruker Tensor 27, usando as mesmas condições de aquisição e num intervalo de número de onda entre $350\text{-}4000 \text{ cm}^{-1}$.

Termogravimetria

Os termogramas foram obtidos num equipamento Shimadzu TGA-50, com taxa de aquecimento de $5^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ em atmosfera de ar, com um fluxo de $20 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. As

amostras, com massas compreendidas entre 3.0-6.5 mg foram colocadas num suporte de platina com 5 mm \varnothing e foram sujeitas a um aquecimento até 700 °C.

Microscopia eletrônica de varrimento (SEM)

As amostras foram montadas num suporte de alumínio usando fita adesiva de dupla-face, tendo depois sido revestidas com uma camada fina de carbono, num evaporador de carbono Emitech K950X. as amostras foram analisadas num microscópio Hitachi SU-70, com uma fonte de emissão de elétrons Schottky, a operar a uma voltagem elétrica de 10 kV, tendo sido obtidas imagens com ampliações de 2500-5000x. Para analisar a homogeneidade das amostras foram ainda obtidos mapas de distribuição química, recorrendo a um sistema de *Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDS)* e usando um sistema de análise Bruker Quantax.

Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC)

As amostras foram colocadas em cápsulas de aço inox, que foram fechadas hermeticamente e aguentam uma pressão interna de 24 bar. Estas foram analisadas num Calorímetro diferencial de varrimento, com compensação de potência Diamond DSC da PerkinElmer. O equipamento foi previamente aquecido à temperatura de 25 °C, deixando-se este valor estabilizar durante 5 min e, de seguida, as amostras foram sujeitas a temperaturas compreendidas entre 25 e 200 °C.

Análise Elementar

O composto de inclusão MLK: γ -CD obtido pela técnica de liofilização foi analisado num equipamento de Análise Elementar Truspec 630-200-200.

¹H NMR em solução

Os espectros de ¹H NMR foram obtidos num espectrómetro Bruker Advance III 300, à temperatura de 40 °C, durante 1 hora. Para a análise dos espectros foi usado como referência interna o desvio dos prótons do etanol deuterado ($\delta=1.11$ ppm).

Espectroscopia de Ultravioleta-Visível

A absorvância das soluções com MLK puro ou com γ -CD foram lidas num espectrofotómetro Shimadzu, UV-2501 PC ou Jasco V-560, tendo sido utilizadas células de quartzo.

3. Estequiometria do composto de inclusão MLK: γ -CD pelo método de Job

A estequiometria do composto de inclusão MLK: γ -CD pode ser determinada através do método das variações contínuas, desenvolvido por Job em 1928 [129]. Para tal foram analisados espectros de ^1H NMR, de soluções com diferentes concentrações de hóspede e hospedeiro (MLK e γ -CD, respetivamente). Estas soluções apresentam valores definidos de χ (sendo χ a fração molar do MLK, $\chi = [\text{MLK}]_0 / \{[\text{MLK}]_0 + [\gamma\text{-CD}]_0\}$), mantendo constante o valor de $[\text{MLK}]_0 + [\gamma\text{-CD}]_0$. Sendo assim, foram preparadas soluções de MLK e γ -CD a 7 mM, usando como solvente uma solução de etanol e água deuterados (1:1). Estas foram posteriormente misturadas de forma a variar χ entre 1/10 e 9/10 (com intervalos de 1/10), e mantendo constante o volume, para que $[\text{MLK}]_0 + [\gamma\text{-CD}]_0$ seja constante (7 mM). Por fim, é possível determinar a estequiometria do composto de inclusão traçando o gráfico de $\Delta\delta.[\text{MLK}]_0$ versus χ , sendo $\Delta\delta$ o desvio de NMR dos prótons estimados como sendo o H4, H8 e H15 do MLK (ver numeração na Figura 1).

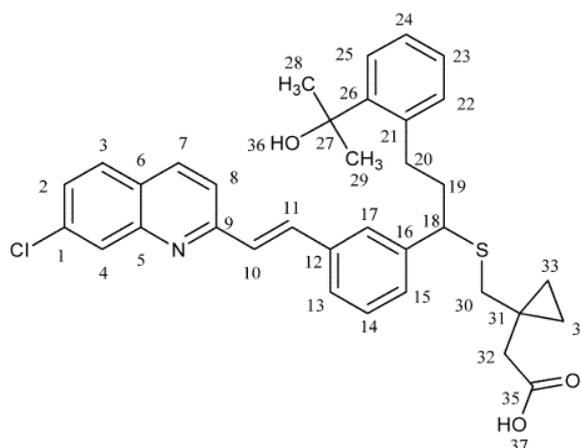


Figura 1. Numeração dos carbonos, e respetivos hidrogénios, na estrutura molecular do montelucaste de sódio [110].

4. Formação de cristais de Montelucaste de sódio

Uma pequena quantidade de montelucaste de sódio foi dissolvida em diferentes solventes, ou misturas de solventes, tal como indicado na Tabela 1. Inicialmente, a escolha dos solventes a utilizar baseou-se em informação descrita na literatura (Tabela 1. Secção 1) [63, 130, 131]. Depois, tendo em conta os resultados deste ensaio, foram escolhidos novos solventes, ou misturas de solventes, que permitissem obter melhores cristais (Tabela 1. Secção 2 e 3). Depois de preparadas, as soluções de MLK foram deixadas a repousar à temperatura ambiente, num local protegido da luz. Passados

alguns dias verificou-se a formação de cristais, que foram analisados pela técnica de difração de raios-X de monocristal.

Tabela 1. Experiências de cristalização de montelukaste de sódio.

	Solventes/Mistura de solventes	Racio	V_f (mL)	Resultado
1	Água destilada	—	1	Cristais
	Etanol	—	1	Cristais
	Metanol + Acetonitrilo	4:1	1	Cristais
	Propanol	—	1	Precipitado amorfo
	Isopropanol	—	1	Precipitado amorfo
2	Água destilada + Etanol	1:1	1	Cristais
	Água destilada + Metanol	1:2	1	Precipitado amorfo
	Água destilada + Metanol + Acetonitrilo	4:5:1	1	Cristais
	Água destilada + Acetonitrilo	1:1	1	Precipitado amorfo
	Água destilada + Etanol + Metanol	3:1:2	1	Cristais
	Água destilada + Propanol	1:1	1	Precipitado amorfo
	Água destilada + Isopropanol	1:1	1	Precipitado amorfo
3	Água miliQ + Etanol seco	1:1	1	Precipitado amorfo
	Água miliQ + Etanol seco	1:1	0.8	Cristais
	Água miliQ + Etanol seco	1:2	1	Precipitado amorfo
	Água miliQ + Etanol seco	1:2	3	Cristais
	Água miliQ + Etanol seco	1:5	1.2	Precipitado amorfo
	Água miliQ + Metanol seco	1:1	1	Cristais
	Água miliQ + Metanol seco	1:1,5	5	Precipitado amorfo
	Água miliQ + Metanol seco	1:1,5	1	Precipitado amorfo
	Água miliQ + Metanol seco	1:3	1	Precipitado amorfo
	Água miliQ + Metanol seco + Acetonitrilo seco	4:5:1	1	Precipitado amorfo
	Água miliQ + Metanol seco + Acetonitrilo seco	1:3:2	3	Precipitado amorfo
	Água miliQ + Metanol seco + Acetonitrilo seco	1:15:4	2	Precipitado amorfo
	Metanol seco + Acetonitrilo seco	2:1	1	Precipitado amorfo
	Água miliQ + Acetonitrilo seco	1:4	1	Precipitado amorfo
	Água miliQ + Etanol seco + Metanol seco	1:2:3	3	Cristais
	Etanol seco + Metanol seco	1:2	3	Precipitado amorfo
	THF seco	—	1	Precipitado amorfo
	Água miliQ + THF seco	1:1	1	Precipitado amorfo
	Água miliQ + THF seco	1:2	1	Cristais
	Água miliQ + THF seco	1:5	1.2	Precipitado amorfo
	DMF seco	—	1	Cristais
	Água miliQ + DMF seco	1:1	1	Precipitado amorfo
	Água miliQ + DMF seco	1:2	1	Cristais
	Água miliQ + DMF seco	3:7	1	Cristais
	1,4-Dioxano	—	1	Cristais
	Água miliQ + 1,4-Dioxano	1:1	1	Cristais
	Metanol deuterado d4	—	0.5	Cristais
	Etanol deuterado	—	1	Cristais

Além das cristalizações referidas na Tabela 1, que foram realizadas em porta amostras, foi também utilizado um cogumelo de cristalização. Para tal, foram preparadas soluções de MLK, tal como anteriormente, a partir de diferentes solventes: etanol seco, metanol seco, água miliQ + etanol seco (1:1), água miliQ + metanol seco (1:2), THF seco e DMF seco. Uma gota de cada solução de MLK foi colocada em diferentes compartimentos do cogumelo, a cujo poço foram adicionados 3 mL de água miliQ. Por fim o cogumelo foi deixado em repouso durante alguns dias, num local protegido da luz, tendo-se observado a formação de um precipitado amorfo.

5. Formação de compostos de inclusão MLK:γ-CD

5.1. Difusão em gel de óxido de poli(etileno)

A cristalização do composto de inclusão MLK:γ-CD em gel de óxido de poli(etileno) (PEO) não se demonstrou eficaz. Esta técnica não permitiu a formação de cristais do composto de inclusão, precipitando apenas material amorfo.

5.2. Co-precipitação

Foram preparadas soluções de ciclodextrina gama (em água destilada (H₂O(dest)) ou água miliQ (H₂O(mQ)) e de montelucaste de sódio (em etanol (EtOH) seco, ou metanol (MetOH) seco ou uma mistura de ambos), a razões molares diferentes (Tabela 2). Cada solução de γ-CD foi aquecida (a 30 ou 50 °C) e agitada por 10 minutos, sendo-lhe depois adicionada a solução de MLK. Esta mistura foi deixada sob agitação durante mais 10 minutos, mantendo o aquecimento.

Foram ainda realizados ensaios em que soluções já com ambos os componentes, e após serem sujeitas à temperatura e agitação, foram colocadas num ultrassons PSelecta durante 15 min, à mesma temperatura que se realizou a preparação do composto de inclusão.

Tabela 2. Condições dos ensaios de co-precipitação, indicando a razão molar (Esteq.) e de massa de cada componente, o volume e tipo de solvente utilizado e a temperatura (T). A coluna à esquerda indica se as soluções foram sujeitas a ultrassons.

	Massas (mg)	Esteq.	Solvente	T (°C)	
Sem ultrassons	200 γ-CD + 85.47 MLK	1:1	6 mL H ₂ O(dest) + MeOH (1:1)	50	
	100 γ-CD + 42.74 MLK	1:1	6 mL H ₂ O(dest) + MeOH + EtOH (3:2:1)	50	
	50 γ-CD + 21.37 MLK	1:1	4 mL H ₂ O (mQ) + EtOH seco (1:1)	50	
	50 γ-CD + 21.37 MLK	1:1	4 mL H ₂ O (mQ) + MeOH seco (1:1)	50	
	50 γ-CD + 21.37 MLK + 46 β-CD	1:1:1	10 mL H ₂ O (mQ) + MeOH seco (1:1)	50	
	25 γ-CD + 10.68 MLK	1:1	4 mL H ₂ O (mQ) + MeOH seco (1:1)	50	
	25 γ-CD + 10.68 MLK	1:1	4 mL H ₂ O (mQ) + MeOH seco (1:1)	30	
	25 γ-CD + 10.68 MLK	1:1	4 mL H ₂ O (mQ) + EtOH seco (1:1)	30	
	25 γ-CD + 21.37 MLK	1:2	4 mL H ₂ O (mQ) + MeOH seco (1:1)	50	
	25 γ-CD + 21.37 MLK	1:2	4 mL H ₂ O (mQ) + EtOH seco (1:1)	50	
	25 γ-CD + 21.37 MLK	1:2	4 mL H ₂ O (mQ) + MeOH seco + EtOH seco (2:1:1)	50	
	25 γ-CD + 21.37 MLK	1:2	4 mL H ₂ O (mQ) + MeOH seco (1:1)	30	
	Com ultrassons	50 γ-CD + 21.37 MLK	1:1	4 mL H ₂ O (mQ) + MeOH seco (1:1)	50
		50 γ-CD + 21.37 MLK	1:1	4 mL H ₂ O (mQ) + MeOH seco (1:1)	30
25 γ-CD + 10.68 MLK		1:1	4 mL H ₂ O (mQ) + MeOH seco (1:1)	30	
25 γ-CD + 10.68 MLK		1:1	4 mL H ₂ O (mQ) + EtOH seco (1:1)	30	
50 γ-CD + 42.74 MLK		1:2	4 mL H ₂ O (mQ) + MeOH seco (1:1)	50	
25 γ-CD + 21.37 MLK		1:2	4 mL H ₂ O (mQ) + MeOH seco (1:1)	50	

No final as soluções com os dois componentes foram deixadas em repouso durante alguns dias para arrefecer muito lentamente, num local protegido da luz. Decorrido esse tempo, verificou-se a formação de cristais em algumas das soluções preparadas, conforme indicado na Tabela 3.

Tabela 3. Composição das soluções preparadas nos ensaios de co-precipitação onde se observou a formação de cristais.

	Massas (mg)	Esteq.	Solvente	T (°C)
Sem ultrassons	50 γ -CD + 21.37 MLK + 46 β -CD	1:1:1	10 mL H ₂ O (mQ) + MeOH seco (1:1)	50
	25 γ -CD + 10.68 MLK	1:1	4 mL H ₂ O (mQ) + MeOH seco (1:1)	50
	25 γ -CD + 10.68 MLK	1:1	4 mL H ₂ O (mQ) + MeOH seco (1:1)	30
	25 γ -CD + 10.68 MLK	1:1	4 mL H ₂ O (mQ) + EtOH seco (1:1)	30
	25 γ -CD + 21.37 MLK	1:2	4 mL H ₂ O (mQ) + MeOH seco (1:1)	50
	25 γ -CD + 21.37 MLK	1:2	4 mL H ₂ O (mQ) + EtOH seco (1:1)	50
	25 γ -CD + 21.37 MLK	1:2	4 mL H ₂ O (mQ) + MeOH seco (1:1)	30
Com ultrassons	25 γ -CD + 10.68 MLK	1:1	4 mL H ₂ O (mQ) + MeOH seco (1:1)	30
	25 γ -CD + 10.68 MLK	1:1	4 mL H ₂ O (mQ) + EtOH seco (1:1)	30
	25 γ -CD + 21.37 MLK	1:2	4 mL H ₂ O (mQ) + MeOH seco (1:1)	50

5.3. Co-precipitação em Tubos em U

Foram preparadas soluções de MLK (42.74 mg em 4 mL de metanol seco; 0.0703 mmol) e de γ -CD (100 mg em 4 mL de água miliQ; 0.0703 mmol), que foram colocadas simultaneamente e lentamente em cada uma das secções do tubo em U, tal como demonstrado na Figura 2a. Alterando a forma como as duas soluções se misturam, num tubo em U foi primeiro colocada a solução de ciclodextrina, de forma a preencher o fundo, sendo-lhe depois adicionada, em ambas as secções do tubo, gota-a-gota, a solução de MLK (Figura 2b). Os tubos foram deixados a repousar num local protegido da luz, até que se observou a formação de um precipitado amorfo.

Num outro ensaio, um tubo em U foi preenchido com 15 mL de uma solução de água miliQ:etanol seco (1:2), sendo depois adicionada numa das aberturas, gota-a-gota, uma solução de MLK (21.37 mg; 0.0351 mmol) em etanol seco (4 mL) e na outra uma solução de γ -CD (50 mg; 0.0351 mmol) em água miliQ (2 mL) (Figura 2c). De modo a alterar as razões estequiométricas dos reagentes para 2MLK:1 γ -CD, foram preparadas soluções de MLK (42.74 mg; 0.0703 mmol) em metanol seco (2 mL) e de γ -CD (50 mg; 0.0351 mmol) em água miliQ (2 mL). Estas soluções foram adicionadas, gota-a-gota, a cada secção do tubo em U que tinha sido preenchido previamente com 8 mL de uma solução de água miliQ:metanol seco (1:1). Mantendo a estequiometria de MLK: γ -CD em 2:1, foram preparadas soluções de MLK (42.74 mg; 0.0703 mmol) em metanol seco (2

mL) e de γ -CD (50 mg; 0.0351 mmol) em água miliQ (1 mL). Estas foram adicionadas a cada secção vertical do tubo, que tinha sido previamente preenchido com uma solução de 6 mL de água miliQ:metanol seco (1:2). Depois de preparados, os tubos foram guardados num local protegido da luz, tendo-se verificado a formação de um precipitado amorfo nos tubos que foram preparados com uma estequiometria de 2MLK:1 γ -CD. Por sua vez, no tubo com uma estequiometria dos reagentes de 1:1 verificou-se a formação de cristais.

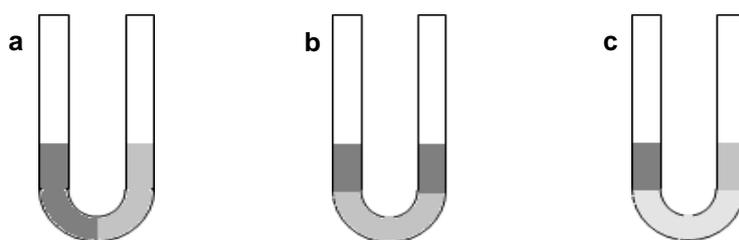


Figura 2. Diferentes modos de preparação dos ensaios de co-precipitação em tubos em U. Na Figura 2a adiciona-se ao mesmo tempo, em cada secção do tubo, uma solução de montelucaste de sódio (MLK) e de ciclodextrina gama (γ -CD). Em b) coloca-se primeiro a solução de γ -CD, à qual é adicionada a solução de MLK. Na Figura 2c o fundo do tubo é preenchido com uma solução de água miliQ:etanol seco ou água miliQ:metanol seco, à qual é depois adicionada em cada secção uma solução de MLK ou de γ -CD. ■ Solução de MLK; ■ Solução de γ -CD; □ Solução de água miliQ:etanol seco ou água miliQ:metanol seco.

Foram ainda usados tubos em U, tais como os ilustrados na Figura 3, e cujos extremos da secção horizontal foram fechados com septos de borracha. Num dos ensaios foi adicionado ao tubo em U uma solução de água miliQ:etanol seco (1:2), de forma a preencher a secção horizontal do tubo (Figura 3a). De seguida foi preparada uma solução de MLK (21.37 mg; 0.0351 mmol) em etanol seco (2 mL) e outra de γ -CD (50 mg; 0.0351 mmol) em água miliQ (1 mL). Cada uma destas soluções foi adicionada a uma secção vertical do tubo, tal como ilustrado na Figura 3b. Alterando a proporção dos reagentes para 2MLK:1 γ -CD, foi preparada uma solução de MLK (42.74 mg; 0.0703 mmol) em metanol seco (4 mL) e uma solução de γ -CD (50 mg; 0.0351 mmol) em água miliQ (2 mL). Estas soluções foram adicionadas à secção vertical de um tubo em U reto, cuja secção horizontal tinha sido previamente preenchida com uma solução de água miliQ:metanol seco (1:2). Depois de preparados estes tubos foram deixados em repouso, num local protegido da luz, tendo-se observado a formação de um precipitado amorfo após alguns dias.

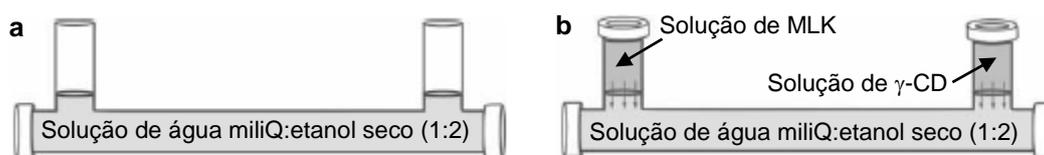


Figura 3. Ilustração da preparação dos ensaios de co-precipitação em tubos em U de duas entradas. A secção horizontal foi preenchida com uma solução de água miliQ:etanol seco (1:2) ou com uma solução de água miliQ:metanol seco (1:2) (Figura 3a). Estas soluções são usadas como interface de contacto entre as soluções de montelucaste de sódio (MLK) e de ciclodextrina gama (γ -CD), que são posteriormente adicionadas nas secções verticais do tubo (Figura 3b) (adaptado de [128]).

5.4. Mecanoquímica

A preparação por mecanoquímica² foi testada em dois tipos de equipamento, o moinho planetário MiniMill da Philips, que apresenta uma velocidade de rotação de 600 rotações.min⁻¹, e um forno de rolos Toshiba da Termolab, Fornos eléctricos, que permite manipular as condições a que ocorre a formação do composto de inclusão, nomeadamente a velocidade de rotação das cubas de zircônio e a temperatura a que estas são sujeitas.

I. Moinho planetário

Quantidades equimolares de MLK e γ -CD foram colocadas em cubas de zircônio de 50 mL, juntamente com duas bolas de moagem de 1 cm de diâmetro. A mistura foi moída durante 720 minutos, tendo sido coletadas amostras aos 0, 5, 15, 30, 60, 120 e 360 minutos de moagem. Na Figura 4 está representada a estrutura molecular do montelucaste de sódio e de uma unidade de glucose constituinte da ciclodextrina gama, com os carbonos numerados, para a identificação das suas ressonâncias em ¹³C NMR. Na Tabela 4 estão indicados os desvios químicos observados no espectro de ¹³C NMR da ciclodextrina gama e do montelucaste de sódio em comparação com as amostras recolhidas durante a moagem. Estas amostras foram também analisadas por espectroscopia de IV, estando na Tabela 5 as principais bandas observadas.

² Os compostos de inclusão MLK: γ -CD formados pela técnica de mecanoquímica não foram analisados por Análise Elementar, dado que o procedimento experimental não altera a composição inicial das amostras.

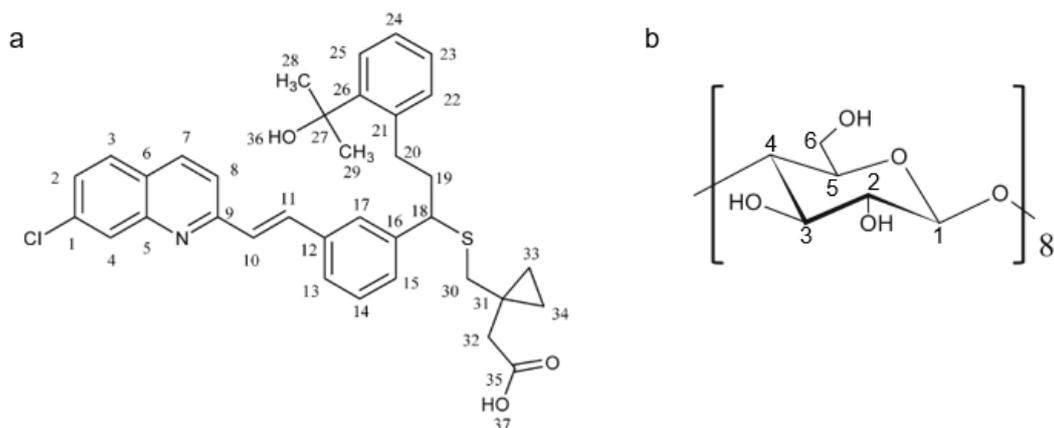


Figura 4. Numeração dos carbonos do montelucaste de sódio (Figura 4a) e de uma unidade de glucose constituinte da ciclodextrina gama (Figura 4b) (adaptado de [110, 115]).

Tabela 4. Dados de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ CP-MAS NMR da ciclodextrina gama (γ -CD), do montelucaste de sódio (MLK) e das amostras γ -CD:MLK obtidas no ensaio de moagem.

Amostra	δ (ppm)
γ -CD	105, 104, 103, 102, 101, 100, 99, 98 (8 ressonâncias, C1); 84, 83, 82, 82, 81, 79, 78 (7 ressonâncias, C4); 76, 75, 74, 73, 72; 71, 71 (7 ressonâncias, C2,3,5); 64, 63, 60 (3 ressonâncias, C6).
MLK	181 (C35); 156 (C9); 148 (C5); 145 (C16,26); 141 (C21); 135 (C10,7); 126 (C23,4); 118 (C8); 73 (C27); 51 (C18); 43 (C30); 32 (C20); 17 (C31); 13 (C33,34).
γ -CD:MLK	
5 min	181 (MLK, C35); 156 (MLK, C9); 148 (MLK, C5); 145 (MLK, C16,26); 141 (MLK, C21); 135 (MLK, C10,7); 127 (MLK, C4,23); 117 (MLK, C8); 105, 104, 103, 102, 101, 100, 99, 98 (γ -CD, C1); 85, 84, 83, 82, 82, 81, 79, 78 (γ -CD, C4); 77, 76, 75, 73, 73, 72, 71, 71 (γ -CD, C2,3,5); 64, 63, 60 (γ -CD, C6); 50 (MLK, C18); 43 (MLK, C30); 32 (MLK, C20); 17 (MLK, C31); 13 (MLK, C33,34).
30 min	181 (MLK, C35); 156 (MLK, C9); 148 (MLK, C5); 145 (MLK, C16,26); 141 (MLK, C21); 135 (MLK, C10,7); 127 (MLK, C4,23); 118 (MLK, C8); 105, 104, 103, 102, 101, 100, 99, 98 (γ -CD, C1); 85, 84, 83, 82, 82, 81, 79, 78 (γ -CD, C4); 77, 76, 75, 73, 73, 72, 71, 71 (γ -CD, C2,3,5); 64, 63, 60 (γ -CD, C6); 50 (MLK, C18); 43 (MLK, C30); 32 (MLK, C20); 17 (MLK, C31).
120 min	181 (MLK, C35); 156 (MLK, C9); 148 (MLK, C5); 135 (MLK, C10,7); 127 (MLK, C4,23); 118 (MLK, C8); 105, 103, 102, 101, 100, 99, 98 (γ -CD, C1); 84, 83, 82, 82, 81, 79, 78 (γ -CD, C4); 76, 75, 73, 73, 72, 71 (γ -CD, C2,3,5); 64, 63, 60 (γ -CD, C6); 50 (MLK, C18); 43 (MLK, C30); 32 (MLK, C20); 17 (MLK, C31).
720 min	181 (MLK, C35); 156 (MLK, C9); 148 (MLK, C5); 135 (MLK, C10,7); 127 (MLK, C4,23); 118 (MLK, C8); 103, 102, 101, 99, 98 (γ -CD, C1); 85, 84, 83, 82, 81, 80 (γ -CD, C4); 76, 73 (γ -CD, C2,3,5); 64, 63, 60 (γ -CD, C6); 50 (MLK, C18); 43 (MLK, C30); 32 (MLK, C20); 17 (MLK, C31).

Tabela 5. Principais bandas de absorção de IV da ciclodextrina gama (γ -CD), do montelucaste de sódio (MLK) e das amostras γ -CD:MLK obtidas no ensaio de moagem.

Amostra	ν (cm^{-1})
γ -CD	3396 vs, 2933 m, 1644 m, 1460 sh, 1415 m, 1385 m, 1371 m, 1337 m, 1305 m, 1243 m, 1204 m, 1160 s, 1124 sh, 1102 m, 1080 s, 1054 sh, 1028 vs, 1002 s, 942 m, 914 sh, 862 m, 846 m, 793 sh, 760 m, 709 m, 653 m, 611 m, 584 m, 530 m, 482 sh, 444 sh, 434 m, 413 sh, 399 m, 363 m, 338 vw, 327 vw, 303 m, 293 vw, 289 w.
MLK	3396 vs, 3062 s, 2975 s, 2929 s, 2865 sh, 1638 m, 1608 vs, 1595 vs, 1578 vs, 1572 vs, 1567 vs, 1560 vs, 1556 sh, 1498 vs, 1441 m, 1409 s, 1401 sh, 1365 m, 1340 m, 1312 m, 1269 w, 1242 w, 1221 w, 1161 sh, 1144 m, 1131 m, 1114 sh, 1069 m, 1055 w, 1018 w, 997 w, 984 sh, 965 m, 938 w, 932 w, 914 vw, 874 sh, 864 w, 838 m, 801 w, 762 m, 753 sh, 724 w, 697 m, 644 vw, 622 m, 601 w, 579 w, 569 w, 560 w, 525 w, 510 vw, 496 w, 474 w, 419 vw, 414 vw, 376 vw, 360 vw, 338 vw, 328 vw, 312 vw, 303 w, 296 w, 289 w.
γ -CD:MLK	
5 min	3396 vs, 2930 m, 1640 m, 1609 m, 1598 m, 1562 m, 1558 m, 1499 m, 1441 sh, 1412 m, 1398 sh, 1373 m, 1338 m, 1309 w, 1265 w, 1243 w, 1202 w, 1159 s, 1132 m, 1103 m, 1081 s, 1055 sh, 1029 vs, 1001 s, 967 sh, 941 m, 912 sh, 863 w, 839 w, 799 sh, 762 m, 727 sh, 711 m, 699 m, 681 m, 669 m, 656 m, 608 m, 584 m, 529 m, 497 m, 477 m, 464 m, 444 m, 429 m, 410 m, 340 w, 376 w, 358 w, 343 w, 327 w, 311 w, 304 w, 292 w.
15 min	3396 vs, 2930 m, 1638 m, 1609 m, 1598 m, 1562 m, 1557 m, 1499 m, 1442 sh, 1412 m, 1398 sh, 1371 m, 1338 m, 1309 w, 1265 w, 1245 w, 1202 w, 1159 s, 1133 m, 1103 m, 1080 s, 1053 sh, 1027 vs, 1002 s, 968 sh, 940 m, 913 sh, 863 w, 837 w, 798 sh, 762 m, 730 sh, 707 m, 688 sh, 664 m, 643 m, 611 m, 584 m, 542 sh, 528 m, 499 m, 476 m, 453 w, 430 w, 409 w, 387 w, 361 w, 345 w, 325 w, 320 w, 295 w.
30 min	3396 vs, 2930 m, 1638 m, 1610 m, 1598 m, 1561 m, 1557 m, 1498 m, 1441 sh, 1412 m, 1385 m, 1371 sh, 1338 m, 1309 w, 1265 w, 1246 w, 1202 w, 1159 s, 1131 m, 1103 m, 1080 s, 1053 sh, 1028 vs, 1001 s, 967 sh, 939 m, 914 sh, 864 w, 838 w, 798 sh, 762 m, 730 sh, 707 m, 699 m, 669 m, 652 m, 610 m, 582 m, 527 m, 507 m, 493 m, 476 m, 463 m, 448 w, 434 w, 419 w, 404 w, 391 sh, 375 w, 360 w, 351 w, 334 w, 322 w, 316 w, 308 w, 303 w, 294 w, 290 w, 283 w.
60 min	3396 vs, 2930 m, 1641 m, 1610 m, 1598 m, 1562 m, 1557 m, 1498 m, 1441 sh, 1411 m, 1385 m, 1371 m, 1338 m, 1309 w, 1265 sh, 1445 w, 1202 w, 1159 s, 1132 m, 1103 m, 1080 s, 1053 sh, 1028 vs, 1001 s, 968 sh, 940 m, 914 sh, 863 w, 838 w, 797 sh, 761 m, 730 sh, 705 m, 649 m, 610 m, 584 m, 529 m, 495 m, 476 m, 404 sh, 375 w, 360 w, 336 w, 331 sh, 325 w, 316 sh, 312 vw, 306 vw, 298 sh, 295 vw, 290 w.
120 min	3396 vs, 2930 m, 1638 m, 1610 m, 1598 m, 1562 m, 1498 m, 1443 sh, 1411 m, 1398 sh, 1370 m, 1337 m, 1309 m, 1264 sh, 1243 w, 1202 w, 1158 s, 1132 m, 1102 m, 1081 s, 1052 sh, 1028 vs, 1001 s, 968 sh, 940 m, 915 sh, 863 w, 837 w, 797 sh, 761 m, 730 sh, 702 m, 669 m, 650 m, 610 m, 584 m, 530 m, 495 m, 479 m, 438 m, 416 sh, 404 sh, 375 w, 361 w, 336 w, 328 w, 312 w, 303 w, 290 w.
360 min	3396 vs, 2930 m, 1640 m, 1610 m, 1598 m, 1562 m, 1557 m, 1498 m, 1444 sh, 1410 m, 1385 m, 1372 m, 1339 m, 1308 m, 1265 sh, 1243 w, 1202 w, 1158 s, 1130 m, 1104 m, 1081 s, 1052 sh, 1028 vs, 1002 s, 969 sh, 939 m, 914 sh, 863 w, 838 w, 800 sh, 761 m, 730 sh, 704 m, 648 m, 611 m, 584 m, 529 m, 496 sh, 477 m, 417 sh, 375 w, 361 w, 335 vw, 328 vw, 316 vw, 311 vw, 305 vw, 297 vw, 294 vw, 290 vw.
720 min	3396 vs, 2930 m, 1640 m, 1610 m, 1599 m, 1563 m, 1556 m, 1498 m, 1444 m, 1410 m, 1385 m, 1373 m, 1339 m, 1309 m, 1265 sh, 1244 w, 1202 w, 1158 s, 1131 m, 1104 m, 1081 s, 1053 sh, 1028 vs, 1003 s, 969 sh, 940 m, 862 w, 839 w, 801 sh, 761 m, 704 m, 644 sh, 609 m, 584 m, 529 m, 496 sh, 478 m, 446 sh, 414 w, 397 sh, 377 w, 360 w, 346 sh, 328 vw, 312 vw, 303 vw, 295 vw, 290 vw.

NOTA: A intensidade das bandas é indicada pelo código: vs- muito forte, s- forte, m- média, w- fraca, vw- muito fraca e sh- ombro.

Foi ainda efetuada a moagem de apenas γ -CD no moinho planetário (também com duas bolas de 1 cm de diâmetro e por 120 minutos). O espectro de ^{13}C NMR mostra perda de multiplicidade dos seus carbonos que se apresentam como picos simples, nomeadamente a 103 (C1); 82 (C4); 73 (sobreposição dos C2,3,5) e 61 ppm (C6). O espectro de IV mostra que a moagem não alterou os máximos das frequências vibracionais da γ -CD.

II. Moinho planetário com pré-moagem da γ -CD

A γ -CD foi previamente moída durante 60 minutos, numa cuba de zircônio de 50 mL com duas bolas de moagem de 1 cm de diâmetro. Decorrido este tempo foi-lhe adicionada uma quantidade equimolar de montelucaste de sódio. Esta amostra que contém γ -CD moída durante 60 minutos e montelucaste de sódio não moído, foi considerado como sendo o tempo zero minutos, tendo depois sido recolhidas amostras aos 5, 10, 15, 25, 30 e 60 minutos de moagem. Estas amostras foram analisadas por ^{13}C NMR e IV, sendo os resultados apresentados nas Tabelas 6 e 7, respetivamente.

Tabela 6. Dados de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ CP-MAS NMR da ciclodextrina gama (γ -CD), do montelucaste de sódio (MLK) e das amostras γ -CD:MLK obtidas no ensaio de pré-moagem.

Amostra	δ (ppm)
γ -CD	105, 104, 103, 102, 101, 100, 99, 98 (8 ressonâncias, C1); 84, 83, 82, 82, 81, 79, 78 (7 ressonâncias, C4); 76, 75, 74, 73, 72; 71, 71 (7 ressonâncias, C2,3,5); 64, 63, 60 (3 ressonâncias, C6).
MLK	181 (C35); 156 (C9); 148 (C5); 145 (C16,26); 141 (C21); 135 (C10,7); 126 (C23,4); 118 (C8); 73 (C27); 51 (C18); 43 (C30); 32 (C20); 17 (C31); 13 (C33,34).
γ -CD:MLK	
0 min	181 (MLK, C35); 156 (MLK, C9); 148 (MLK, C5); 145 (MLK, C16,26); 141 (MLK, C21); 135 (MLK, C10,7); 126 (MLK, C23,4); 118 (MLK, C8); 103, 102, 101, 100, 99, 98 (γ -CD, C1); 84, 83, 82, 82, 80, 79, 77 (γ -CD, C4); 76, 73 (γ -CD, C2,3,5); 64, 63, 60 (γ -CD, C6); 51 (MLK, C18); 43 (MLK, C30); 32 (MLK, C20); 17 (MLK, C31); 13 (MLK, C33,34).
5 min	181 (MLK, C35); 156 (MLK, C9); 148 (MLK, C5); 145 (MLK, C16,26); 141 (MLK, C21); 136 (MLK, C7,10); 127 (MLK, C4,23); 118 (MLK, C8); 103, 102, 101, 99, 98 (γ -CD, C1); 84, 83, 82, 82, 81, 79, 78 (γ -CD, C4); 76, 73 (γ -CD, C2,3,5); 63, 61 (γ -CD, C6); 51 (MLK, C18); 43 (MLK, C30); 32 (MLK, C20); 17 (MLK, C31); 13 (MLK, C33,34).
15 min	181 (MLK, C35); 156 (MLK, C9); 148 (MLK, C5); 145 (MLK, C16,26); 141 (MLK, C21); 136 (MLK, C7,10); 127 (MLK, C4,23); 118 (MLK, C8); 103, 102, 101, 98 (γ -CD, C1); 84, 83, 82, 82, 79, 78 (γ -CD, C4); 76, 73 (γ -CD, C2,3,5); 63, 61 (γ -CD, C6); 51 (MLK, C18); 43 (MLK, C30); 32 (MLK, C20); 17 (MLK, C31); 13 (MLK, C33,34).
30 min	181 (MLK, C35); 156 (MLK, C9); 148 (MLK, C5); 145 (MLK, C16,26); 141 (MLK, C21); 136 (MLK, C7,10); 127 (MLK, C4,23); 118 (MLK, C8); 103, 102, 101, 98 (γ -CD, C1); 84, 83, 82, 82, 79, 78 (γ -CD, C4); 76, 73 (γ -CD, C2,3,5); 63, 61 (γ -CD, C6); 51 (MLK, C18); 43 (MLK, C30); 32 (MLK, C20); 17 (MLK, C31); 13 (MLK, C33,34).

60 min 181 (MLK, C35); 156 (MLK, C9); 148 (MLK, C5); 145 (MLK, C16,26); 141 (MLK, C21); 136 (MLK, C7,10); 127 (MLK, C4,23); 118 (MLK, C8); 103, 101 (γ -CD, C1); 84, 82, 82, 79 (γ -CD, C4); 73 (γ -CD, C2,3,5); 63, 61 (γ -CD, C6); 51 (MLK, C18); 43 (MLK, C30); 32 (MLK, C20); 17 (MLK, C31).

Tabela 7. Principais bandas de absorção de IV da ciclodextrina gama (γ -CD), do montelucaste de sódio (MLK) e das amostras γ -CD:MLK obtidas no ensaio de pré-moagem.

Amostra	ν (cm^{-1})
γ -CD	3396 vs, 2933 m, 1644 m, 1460 sh, 1415 m, 1385 m, 1371 m, 1337 m, 1305 m, 1243 m, 1204 m, 1160 s, 1124 sh, 1102 m, 1080 s, 1054 sh, 1028 vs, 1002 s, 942 m, 914 sh, 862 m, 846 m, 793 sh, 760 m, 709 m, 653 m, 611 m, 584 m, 530 m, 482 sh, 444 sh, 434 m, 413 sh, 399 m, 363 m, 338 vw, 327 vw, 303 m, 293 vw, 289 w.
MLK	3396 vs, 3062 s, 2975 s, 2929 s, 2865 sh, 1638 m, 1608 vs, 1595 vs, 1578 vs, 1572 vs, 1567 vs, 1560 vs, 1556 sh, 1498 vs, 1441 m, 1409 s, 1401 sh, 1365 m, 1340 m, 1312 m, 1269 w, 1242 w, 1221 w, 1161 sh, 1144 m, 1131 m, 1114 sh, 1069 m, 1055 w, 1018 w, 997 w, 984 sh, 965 m, 938 w, 932 w, 914 vw, 874 sh, 864 w, 838 m, 801 w, 762 m, 753 sh, 724 w, 697 m, 644 vw, 622 m, 601 w, 579 w, 569 w, 560 w, 525 w, 510 vw, 496 w, 474 w, 419 vw, 414 vw, 376 vw, 360 vw, 338 vw, 328 vw, 312 vw, 303 w, 296 w, 289 w.
γ -CD:MLK	
5 min	3396 vs, 2933 m, 1637 m, 1609 m, 1596 sh, 1562 m, 1556 sh, 1498 m, 1440 sh, 1411 m, 1388 sh, 1372 m, 1345 m, 1309 w, 1268 sh, 1245 w, 1204 w, 1158 s, 1130 m, 1100 m, 1081 s, 1056 sh, 1029 vs, 1002 s, 972 sh, 938 w, 861 w, 839 w, 800 sh, 761 m, 707 sh, 698 m, 668 m, 611 m, 585 m, 527 m, 473 m, 450 w, 438 w, 421 w, 400 w, 385 sh, 370 w, 354 w, 335 vw, 321 vw, 303 vw, 292 vw.
10 min	3396 vs, 2930 m, 1637 m, 1609 m, 1596 m, 1561 m, 1556 m, 1498 m, 1440 m, 1410 m, 1391 sh, 1371 sh, 1340 m, 1310 w, 1267 w, 1243 w, 1203 sh, 1159 m, 1131 m, 1106 m, 1080 s, 1054 sh, 1027 s, 1000 m, 968 sh, 938 w, 863 w, 838 m, 800 sh, 761 m, 707 sh, 699 m, 621 sh, 610 m, 583 m, 527 m, 510 sh, 494 m, 474 m, 360 w, 342 vw, 334 vw, 329 vw, 323 vw, 316 vw, 310 vw, 303 w.
15 min	3396 vs, 2930 m, 1637 m, 1609 m, 1596 m, 1561 m, 1556 m, 1498 m, 1441 sh, 1410 m, 1393 sh, 1371 sh, 1340 m, 1309 w, 1267w, 1243 w, 1203 sh, 1159 s, 1131 m, 1105 m, 1080 s, 1055 sh, 1027 vs, 1000 s, 968 sh, 938 w, 863 w, 838 w, 761 m, 706 sh, 699 m, 612 m, 584 m, 530 w, 495 w, 476 w, 360 vw, 355 sh, 324 vw, 305 vw, 297 vw.
25 min	3396 vs, 2930 m, 1639 m, 1609 m, 1596 m, 1562 m, 1556 m, 1498 m, 1441 m, 1410 m, 1396 sh, 1372 sh, 1341 m, 1310 w, 1267 w, 1245 w, 1201 sh, 1159 s, 1131 m, 1104 m, 1081 s, 1054 sh, 1027 vs, 1000 s, 966 sh, 938 m, 864 m, 838 m, 801 ah, 760 m, 706 sh, 699 m, 621 sh, 611 m, 597 sh, 584 m, 576 sh, 564 sh, 551 w, 537 sh, 527 m, 515 sh, 502 m, 491 m, 477 m, 467 sh, 455 w, 442 w, 431 w, 421 w, 416 w, 409 w, 396 w, 386 w, 372 s, 360 s, 352 sh, 338 vw, 330 vw, 326 vw, 316 vw, 307 sh, 303 w, 293 w.
30 min	3396 vs, 2930 m, 1638 m, 1609 m, 1596 m, 1561 m, 1556 sh, 1497 m, 1441 m, 1410 m, 1396 sh, 1372 sh, 1341 m, 1310 w, 1266 w, 1242 w, 1199 sh, 1159 s, 1131 m, 1101 m, 1081 s, 1053 sh, 1027 vs, 1000 s, 967 sh, 938 m, 863 m, 839 m, 801 sh, 761 m, 707 sh, 699 m, 622 sh, 611 m, 597 sh, 583 m, 528 m, 510 sh, 495 w, 485 vw, 474 w, 361 w, 354 sh, 341 w, 336 w, 325 vw, 313 vw, 301 w, 291 w.
60 min	3396 vs, 2931 m, 1638 m, 1609 m, 1597 m, 1562 m, 1557 sh, 1497 m, 1441 m, 1410 m, 1397 sh, 1372 sh, 1338 w, 1311 w, 1266 w, 1243 w, 1196 sh, 1158 s, 1131 m, 1103 m, 1081 s, 1054 sh, 1028 vs, 1001 s, 967 sh, 938 m, 863 m, 838 m, 801 sh, 761 m, 707 sh, 699 m, 622 sh, 612 m, 582 m, 528 m, 495 w, 474 w, 360 m, 354 m, 332 vw, 329 vw, 322 vw, 315 vw, 302 vw, 295 vw, 289 vw.

NOTA: A intensidade das bandas é indicada pelo código: vs- muito forte, s- forte, m- média, w- fraca, vw- muito fraca e sh- ombro.

III. Forno de rolos

Quantidades equimolares de γ -CD e MLK foram colocadas em cubas de zircônio de 35 mL, e foram sujeitas à ação mecânica proveniente da moagem com uma *milling ball* de 1 cm de diâmetro, duas de 0.5 cm de diâmetro e três com 0.2 cm de diâmetro. A mistura dos componentes foi sujeita a uma velocidade de rotação de 50 rotações.min⁻¹ e a uma temperatura de 50 °C durante 4320, 8640 e 21600 minutos (3, 6 e 15 dias). Na Tabela 8 estão indicados os desvios químicos dos carbonos das amostras recolhidas no forno de rolos, bem como do MLK e da γ -CD.

Tabela 8. Dados de ¹³C{¹H} CP-MAS NMR da ciclodextrina gama (γ -CD), do montelucaste de sódio (MLK) e das amostras γ -CD:MLK obtidas no ensaio de moagem no forno de rolos.

Amostra	δ (ppm)
γ -CD	105, 104, 103, 102, 101, 100, 99, 98 (8 ressonâncias, C1); 84, 83, 82, 82, 81, 79, 78 (7 ressonâncias, C4); 76, 75, 74, 73, 72; 71, 71 (7 ressonâncias, C2,3,5); 64, 63, 60 (3 ressonâncias, C6).
MLK	181 (C35); 156 (C9); 148 (C5); 145 (C16,26); 141 (C21); 135 (C10,7); 126 (C23,4); 118 (C8); 73 (C27); 51 (C18); 43 (C30); 32 (C20); 17 (C31); 13 (C33,34).
γ -CD:MLK	
4320 min	181 (MLK, C35); 156 (MLK, C9); 148 (MLK, C5); 145 (MLK, C16,26); 141 (MLK, C21); 135 (MLK, C10,7); 127 (MLK, C4,23); 118 (MLK, C8); 105, 104, 103, 103, 102 (γ -CD, C1); 85, 84, 82, 82, 81, 80, 79 (γ -CD, C4); 76, 75, 74, 73, 73, 72, 72 (γ -CD, C2,3,5); 64, 63, 60 (γ -CD, C6); 51 (MLK, C18); 43 (MLK, C30); 32 (MLK, C20); 17 (MLK, C31).
8640 min	181 (MLK, C35); 156 (MLK, C9); 148 (MLK, C5); 145 (MLK, C16,26); 141 (MLK, C21); 135 (MLK, C10,7); 127 (MLK, C4,23); 105, 104, 103, 102, 101, 100, 99, 98 (γ -CD, C1); 84, 83, 82, 82, 81, 79, 78 (γ -CD, C4); 76, 75, 73, 73, 72, 71, 71 (γ -CD, C2,3,5); 64, 63, 60 (γ -CD, C6); 51 (MLK, C18); 43 (MLK, C30); 32 (MLK, C20); 17 (MLK, C31).
21600 min	181 (MLK, C35); 156 (MLK, C9); 146 (MLK, C26,16); 141 (MLK, C21); 135 (MLK, C10,7); 127 (MLK, C4,23); 118 (MLK, C8); 105, 104, 103, 102, 101, 100, 99, 98 (γ -CD, C1); 84, 83, 82, 82, 81, 79, 78 (γ -CD, C4); 76, 75, 73, 73, 72, 71, 71 (γ -CD, C2,3,5); 64, 63, 60 (γ -CD, C6); 51 (MLK, C18); 43 (MLK, C30); 32 (MLK, C20); 17 (MLK, C31).

Na Tabela 9 apresentam-se as principais bandas de absorção de radiação infravermelha das amostras do forno de rolos, assim como do MLK e da γ -CD.

Tabela 9. Principais bandas de absorção de IV da ciclodextrina gama (γ -CD), do montelucaste de sódio (MLK) e das amostras γ -CD:MLK obtidas no ensaio de moagem no forno de rolos.

Amostra	ν (cm^{-1})
γ -CD	3396 vs, 2933 m, 1644 m, 1460 sh, 1415 m, 1385 m, 1371 m, 1337 m, 1305 m, 1243 m, 1204 m, 1160 s, 1124 sh, 1102 m, 1080 s, 1054 sh, 1028 vs, 1002 s, 942 m, 914 sh, 862 m, 846 m, 793 sh, 760 m, 709 m, 653 m, 611 m, 584 m, 530 m, 482 sh, 444 sh, 434 m, 413 sh, 399 m, 363 m, 338 vw, 327 vw, 303 m, 293 vw, 289 w.
MLK	3367 s, 3068 m, 2984 m, 2931 m, 1636 w, 1608 vs, 1594 vs, 1579 sh, 1573 sh, 1564 vs, 1559 sh, 1554 sh, 1498 vs, 1442 m, 1409 s, 1400 sh, 1365 m, 1340 m, 1311 m, 1269 w, 1242 w, 1222 w, 1161 sh, 1143 m, 1131 m, 1114 sh, 1069 m, 1054 w, 1018 w, 997 w, 984 sh, 964 m, 938 m, 930 m, 914 w, 874 sh, 864 m, 837 m, 800 sh, 762 m, 753 sh, 724 w, 694m, 644 w, 622 w, 600 vw, 579 vw, 560 vw, 525 vw, 510 vw, 494 w, 474 w, 418 vw, 416 vw, 374 vw, 363 vw, 359 vw.
γ -CD:MLK	
4320 min	3304 s, 2931 m, 1640 m, 1609 m, 1596 m, 1564 m, 1498 m, 1442 sh, 1409 m, 1367 m, 1338 m, 1310 m, 1269 sh, 1242 w, 1153 m, 1132 sh, 1101 sh, 1078 m, 1054 sh, 1020 s, 998 s, 938 m, 863 m, 838 m, 760 m, 751 sh, 698 m, 603 sh, 577 m, 525 vw, 494 vw, 474 vw, 374 vw, 363 vw, 358 vw.
8640 min	3304 s, 2931 m, 1640 m, 1609 m, 1597 m, 1564 m, 1498 m, 1442 sh, 1409 m, 1367 m, 1338 m, 1310 m, 1243 w, 1153 m, 1132 sh, 1101sh, 1078 m, 1054 sh, 1020 s, 998 s, 938 m, 863 m, 838 m, 760 m, 751 sh, 698 m, 603sh, 577 m, 524 vw, 494 vw, 474 vw, 374 vw, 363 vw, 358 vw.
21600 min	3304 s, 2931 m, 1641 m, 1609 m, 1598 m, 1563 m, 1498 m, 1442 sh, 1409 m, 1367 m, 1338 m, 1310 m, 1243 w, 1153 m, 1132 sh, 1101 sh, 1078 m, 1054 sh, 1020 s, 998 s, 938 m, 863 m, 838 m, 760 m, 751 sh, 698 m, 603 sh, 577 m, 524 vw, 494 vw, 474 vw, 374 vw, 363 vw, 358 vw.

NOTA: A intensidade das bandas é indicada pelo código: vs- muito forte, s- forte, m- média, w- fraca, vw- muito fraca e sh- ombro.

5.5. Liofilização

Dissolveu-se γ -CD (170 mg; 0,119 mmol) em água miliQ (9 mL) com auxílio de agitação e temperatura (50 °C). A solução foi arrefecida até ficar à temperatura ambiente e foi-lhe adicionada uma solução de MLK (72,65 mg; 0,119 mmol) em etanol seco (9 mL). A solução conjunta de γ -CD e MLK foi deixada em agitação durante 10 minutos, sendo depois imersa em azoto líquido, ficando imediatamente congelada. O solvente foi removido por liofilização (cerca de 96 horas), e o liofilizado obtido foi re-hidratado por armazenamento numa câmara saturada em vapor de água durante uma noite.

Composição (em %): Calculado para $(\text{C}_{48}\text{H}_{80}\text{O}_{40})_2 \cdot (\text{C}_{35}\text{H}_{35}\text{O}_3\text{NSCINA})_1 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$ (MW=3634.8): C, 43.29; H, 6.738; N, 0.385; S, 0.882. Obtido: C, 43.21; H, 5.952; N, 0.577; S, 0.509.

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ CP-MAS NMR (ppm): δ = 181 (MLK, C35); 156 (MLK, C9); 148 (MLK, C5); 146 (MLK, C26,16); 136 (MLK, C7,10); 129 (MLK, C3); 127 (MLK, C4,23); 117 (MLK, C8);

104 (γ -CD, C1); 81 (γ -CD, C4); 73 (γ -CD, C2,3,5); 60 (γ -CD, C6); 51 (MLK, C18); 44 (MLK, C30); 32 (MLK, C20); 17 (MLK, C31); 13 (MLK, C33,34).

FT-IR (cm^{-1}): $\nu = 3396$ vs, 2930 s, 1639 m, 1609 m, 1600 sh, 1563 m, 1559 m, 1500 m, 1444 sh, 1410 m, 1385 m, 1372 m, 1338 m, 1308 m, 1270 sh, 1247 w, 1201 w, 1158 s, 1106 m, 1081 s, 1054 sh, 1028 vs, 1003 s, 963 sh, 938 m, 915 sh, 862 w, 841 w, 804 sh, 786 sh, 762 m, 727 sh, 705 m, 672 m, 652 m, 610 sh, 594 sh, 584 m, 528 m, 496 m, 475 m, 462 sh, 444 m, 423 sh, 414 m, 375 sh, 368 sh, 358 w, 341 w, 326 vw, 319 vw, 315 vw, 310 vw, 305 vw, 299 vw, 290 vw, 285 vw.

6. Testes de solubilidade do composto de inclusão MLK: γ -CD formado

Inicialmente foi preparada uma solução *stock* de Montelucaste de sódio, com uma concentração de 0.088 mg/mL, a partir da qual se efetuaram várias diluições de modo a preparar soluções padrão de MLK com concentrações de 0.055, 0.022, 0.011, 0.0055 e 0.0022 mg/mL. A partir do padrão mais concentrado de MLK coletou-se um espectro de toda a gama do Ultravioleta-Visível, que permitiu determinar que o seu máximo de absorvância é aos 346 nm. Foram então lidos os valores de absorvância das soluções padrão de MLK a este comprimento de onda fixo, a partir dos quais foi traçada uma reta de calibração (Figura 5).

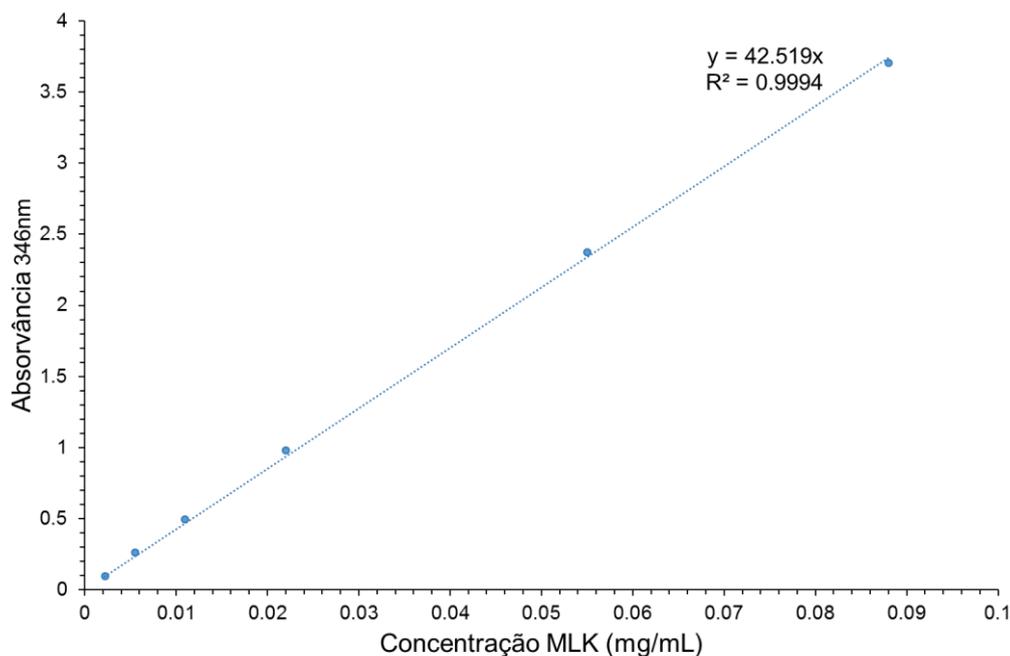


Figura 5. Reta de calibração dos padrões de montelucaste de sódio (MLK), com concentrações compreendidas ente 0.0022 e 0.088 mg/mL.

A dissolução do montelucaste foi testada a partir de três amostras: montelucaste de sódio tal como foi obtido do fabricante, aducto MLK: γ -CD (1:1) moído 120 min (sem pré-moagem) e aducto MLK: γ -CD(pré-moída) (1:1) moído 60 minutos. Em cada ensaio 30 mL de água miliQ foram adicionados a uma quantidade de amostra correspondente a 30 mg de MLK (que é de 100,2 mg no caso dos aductos). As soluções foram mantidas sob agitação magnética, a c.a. 700 rotações/min, à temperatura de 30 °C, num local protegido da luz. Foram recolhidas alíquotas de cada solução aos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos, que foram filtradas por filtro Simplepure™ 0,45 μ m *nylon*. Por fim, foi lida a absorvância das alíquotas aos 346 nm, sendo depois as soluções devolvidas à solução em agitação, de forma a minimizar perdas de volume.

7. Testes de estabilidade do composto de inclusão MLK: γ -CD formado

A estabilidade do montelucaste de sódio à luz foi testada expondo o fármaco à luz proveniente de uma lâmpada de 48 W, durante 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos. Decorrido o período de exposição, as amostras de MLK foram imediatamente analisadas por espectroscopia de infravermelho. Dado que não se observaram alterações no MLK durante o período de exposição analisado, a análise dos compostos de inclusão MLK: γ -CD formados não foi necessária.

VI. Bibliografia

1. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, Global Initiative for Asthma (GINA) 2015. Disponível a partir de: <http://www.ginasthma.org/>. Acedido a: 2 de Outubro de 2015.
2. Pawankar R. Allergic diseases and asthma: a global public health concern and a call to action. *The World Allergy Organization Journal*. 2014;7(1):12.
3. Gomes R, Rothes P, Carvalho MS. Metade das crianças com asma não tem a doença controlada. RTP1, "Diário da manhã". 2 de Maio de 2016.
4. Serviço Nacional de Saúde (SNS). Dia Mundial da Asma. 3 de Maio de 2016.
5. Daniels SE, Bhattacharya S, James A, Leaves NI, Young A, Hill MR, Faux JA, Ryan GF, leSouef PN, Lathrop GM, Musk AW, Cookson W. A genome-wide search for quantitative trait loci underlying asthma. *Nature*. 1996;383(6597):247-250.
6. van Beijsterveldt CEM, Boomsma DI. Genetics of parentally reported asthma, eczema and rhinitis in 5-yr-old twins. *European Respiratory Journal*. 2007;29(3):516-521.
7. Goksor E, Amark M, Alm B, Gustafsson PM, Wennergren G. The impact of pre- and post-natal smoke exposure on future asthma and bronchial hyper-responsiveness. *Acta Paediatrica*. 2007;96(7):1030-1035.
8. Alati R, Al Mamun A, O'Callaghan M, Najman JM, Williams GM. In utero and postnatal maternal smoking and asthma in adolescence. *Epidemiology*. 2006;17(2):138-144.
9. Douwes J, van Strien R, Doekes G, Smit J, Kerkhof M, Gerritsen J, Postma D, Travier N, Brunekreef B. Does early indoor microbial exposure reduce the risk of asthma? The Prevention and Incidence of Asthma and Mite Allergy birth cohort study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2006;117(5):1067-1073.
10. Kasznia-Kocot J, Kowalska M, Gorny RL, Niesler A, Wypych-Slusarska A. Environmental risk factors for respiratory symptoms and childhood asthma. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 2010;17(2):221-229.
11. Samir S, Colin Y, Thomas S. Impact of Environmental Tobacco Smoke on Children Admitted With Status Asthmaticus in the Pediatric Intensive Care Unit. *Pediatric Pulmonology*. 2011;46(3):224-229.
12. Phipatanakul W, Nowak-Wegrzyn A, Eggleston PA, Van Natta M, Kesavan J, Schuberth K, Wood RA. The efficacy of montelukast in the treatment of cat allergen-induced asthma in children. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2002;109(5):794-799.
13. Szczeklik A, Nizankowska E, Duplaga M, Investigators A. Natural history of aspirin-induced asthma. *European Respiratory Journal*. 2000;16(3):432-436.
14. Gaber F, Daham K, Higashi A, Higashi N, Gulich A, Delin I, James A, Skedinger M, Gyllfors P, Nord M, Dahlen SE, Kumlin M, Dahlen B. Increased levels of cysteinyl-leukotrienes in saliva, induced sputum, urine and blood from patients with aspirin-intolerant asthma. *Thorax*. 2008;63(12):1076-1082.
15. Kudo M, Ishigatsubo Y, Aoki I. Pathology of asthma. *Frontiers in Microbiology*. 2013;4:16.
16. Gil FR, Lauzon AM. Smooth muscle molecular mechanics in airway hyperresponsiveness and asthma. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2007;85(1):133-140.
17. Benayoun L, Druilhe A, Dombret MC, Aubier M, Pretolani M. Airway structural alterations selectively associated with severe asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2003;167(10):1360-1368.
18. Adcock IM, Caramori G, Chung KF. New targets for drug development in asthma. *Lancet*. 2008;372(9643):1073-1087.
19. Barnes PJ. New therapies for asthma. *Trends in Molecular Medicine*. 2006;12(11):515-520.
20. Foster JM, Aucott L, van der Werf RHW, van der Meijden MJ, Schraa G, Postma DS, van der Molen T. Higher patient perceived side effects related to higher daily doses of inhaled

- corticosteroids in the community: A cross-sectional analysis. *Respiratory Medicine*. 2006;100(8):1318-1336.
21. Becker AB, Kuznetsova O, Vermeulen J, Soto-Quiros ME, Young B, Reiss TF, Dass SB, Knorr BA, Paediat Montelukast L. Linear growth in prepubertal asthmatic children treated with montelukast, beclomethasone, or placebo: a 56-week randomized double-blind study. *Annals of Allergy Asthma & Immunology*. 2006;96(6):800-807.
 22. Williams B, Noonan G, Reiss TF, Knorr B, Guerra J, White R, Matz J. Long-term asthma control with oral montelukast and inhaled beclomethasone for adults and children 6 years and older. *Clinical and Experimental Allergy*. 2001;31(6):845-854.
 23. Bjermer L, Bisgaard H, Bousquet J, Fabbri LM, Greening A, Haahtela T, Holgate ST, Picado C, Leff JA. Montelukast or salmeterol combined with an inhaled steroid in adult asthma: design and rationale of a randomized, double-blind comparative study (the IMPACT Investigation of Montelukast as a Partner Agent for Complementary Therapy-trial). *Respiratory Medicine*. 2000;94(6):612-621.
 24. Lipworth BJ. Leukotriene-receptor antagonists. *Lancet*. 1999;353(9146):57-62.
 25. Lazarus SC, Boushey HA, Fahy JV, Chinchilli VM, Lemanske RF, Sorkness CA, Kraft M, Fish JE, Peters SP, Craig T, Drazen JM, Ford JG, Israel E, Martin RJ, Mauger EA, Nachman SA, Spahn JD, Szeffler SJ, Natl Heart Lung Blood Inst A. Long-acting beta(2)-agonist monotherapy vs continued therapy with inhaled corticosteroids in patients with persistent asthma - A randomized controlled trial. *Jama-Journal of the American Medical Association*. 2001;285(20):2583-2593.
 26. Chen X, Kang YB, Wang LQ, Li Y, Luo YW, Zhu Z, Chen R. Addition to inhaled corticosteroids of leukotriene receptor antagonists versus theophylline for symptomatic asthma: a meta-analysis. *Journal of Thoracic Disease*. 2015;7(4):644-652.
 27. Mastalerz L, Kumik J. Antileukotriene drugs in the treatment of asthma. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnetrznej-Polish Archives of Internal Medicine*. 2010;120(3):103-107.
 28. Nicosia S, Capra V, Rovati GE. Leukotrienes as mediators of asthma. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*. 2001;14(1):3-19.
 29. Henderson WR. The role of leukotrienes in inflammation. *Annals of Internal Medicine*. 1994;121(9):684-697.
 30. Wenzel SE. The role of leukotrienes in asthma. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 2003;69(2-3):145-155.
 31. Stokes JR, Busse WW. Antileukotriene therapy in asthma. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*. 1998;19(6):647-656.
 32. Bisgaard H. Pathophysiology of the cysteinyl leukotrienes and effects of leukotriene receptor antagonists in asthma. *Allergy*. 2001;56:7-11.
 33. Niimi A. Cough, asthma, and cysteinyl-leukotrienes. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*. 2013;26(5):514-519.
 34. Bisgaard H. Vascular effects of leukotriene-D4 in human-skin. *Journal of Investigative Dermatology*. 1987;88(2):109-114.
 35. Munoz NM, Douglas I, Mayer D, Herrnreiter A, Zhu XD, Leff AR. Eosinophil chemotaxis inhibited by 5-lipoxygenase blockade and leukotriene receptor antagonism. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1997;155(4):1398-1403.
 36. Lam S, Chan H, Leriche JC, Chanyung M, Salari H. Release of leukotrienes in patients with bronchial-asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1988;81(4):711-717.
 37. Wenzel SE, Trudeau JB, Kaminsky DA, Cohn J, Martin RJ, Westcott JY. Effect of 5-Lipoxygenase inhibition on bronchoconstriction and airway inflammation in nocturnal asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1995;152(3):897-905.

38. Harmanci K, Bakirtas A, Turktas I, Degim T. Oral montelukast treatment of preschool-aged children with acute asthma. *Annals of Allergy Asthma & Immunology*. 2006;96(5):731-735.
39. DeLepeleire I, Reiss TF, Rochette F, Botto A, Zhang J, Kundu S, Decramer M. Montelukast causes prolonged, potent leukotriene D-4-receptor antagonism in the airways of patients with asthma. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 1997;61(1):83-92.
40. Knorr B, Matz J, Bernstein JA, Nguyen H, Seidenberg BC, Reiss TF, Becker A, Pediat Montelukast Study G. Montelukast for chronic asthma in 6- to 14-year-old children - A randomized, double-blind trial. *Jama-Journal of the American Medical Association*. 1998;279(15):1181-1186.
41. Knorr B, Franchi LM, Bisgaard H, Vermeulen JH, LeSouef P, Santanello N, Michele TM, Reiss TF, Nguyen HH, Bratton DL. Montelukast, a leukotriene receptor antagonist, for the treatment of persistent asthma in children aged 2 to 5 years. *Pediatrics*. 2001;108(3):10.
42. Cylly A, Kara A, Ozdemir T, Ogus C, Gulkesen KH. Effects of oral montelukast on airway function in acute asthma. *Respiratory Medicine*. 2003;97(5):533-536.
43. Simons FER, Villa JR, Lee BW, Teper AM, Lyttle B, Aristizabal G, Laessig W, Schuster A, Perez-Frias J, Sekerel BE, Menten J, Leff JA. Montelukast added to budesonide in children with persistent asthma: A randomized, double-blind, crossover study. *Journal of Pediatrics*. 2001;138(5):694-698.
44. Storms W. Update on montelukast and its role in the treatment of asthma, allergic rhinitis and exercise-induced bronchoconstriction. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2007;8(13):2173-2187.
45. Pizzichini E, Leff JA, Reiss TF, Hendeles L, Boulet LP, Wei LX, Efthimiadis AE, Zhang J, Hargreave FE. Montelukast reduces airway eosinophilic inflammation in asthma: a randomized, controlled trial. *European Respiratory Journal*. 1999;14(1):12-18.
46. Price D, Popov TA, Bjermer L, Lu S, Petrovic R, Vandormael K, Mehta A, Strus JD, Polos PG, Philip G. Effect of montelukast for treatment of asthma in cigarette smokers. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2013;131(3):763-+.
47. Lazarus SC, Chinchilli VM, Rollings NJ, Boushey HA, Cherniack R, Craig TJ, Deykin A, DiMango E, Fish JE, Ford LG, Israel E, Kiley J, Kraft M, Lemanske RF, Leone FT, Martin RJ, Pesola GR, Peters SP, Sorkness CA, Szeffler SJ, Wechsler ME, Fahy JV, Natl Heart Lung Blood Instit A. Smoking affects response to inhaled corticosteroids or leukotriene receptor antagonists in asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2007;175(8):783-790.
48. Hon KLE, Leung TF, Leung AKC. Clinical effectiveness and safety of montelukast in asthma. What are the conclusions from clinical trials and meta-analyses? *Drug Design Development and Therapy*. 2014;8:839-850.
49. Zhang HP, Jia CE, Lv Y, Gibson PG, Wang G. Montelukast for prevention and treatment of asthma exacerbations in adults: Systematic review and meta-analysis. *Allergy and Asthma Proceedings*. 2014;35(4):278-287.
50. Leff JA, Busse WW, Pearlman D, Bronsky EA, Kemp JA, Hendeles L, Dockhorn R, Kundu S, Zhang J, Seidenberg BC, Reiss TF. Montelukast, a leukotriene-receptor antagonist, for the treatment of mild asthma and exercise-induced bronchoconstriction. *New England Journal of Medicine*. 1998;339(3):147-152.
51. van Adelsberg J, Moy J, Wei LX, Tozzi CA, Knorr B, Reiss TF. Safety, tolerability, and exploratory efficacy of montelukast in 6-to 24-month-old patients with asthma. *Current Medical Research and Opinion*. 2005;21(6):971-979.
52. Jones TR, Labelle M, Belley M, Champion E, Charette L, Evans J, Fordhutchinson AW, Gauthier JY, Lord A, Masson P, McAuliffe M, McFarlane CS, Metters KM, Pickett C, Piechuta H, Rochette C, Rodger IW, Sawyer N, Young RN, Zamboni R, Abraham WM. Pharmacology of

- montelukast sodium (Singulair (TM)), a potent and selective leukotriene D-4 receptor antagonist. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 1995;73(2):191-201.
53. Choroa P, Pereira AM, Fonseca JA. Inhaler devices in asthma and COPD - An assessment of inhaler technique and patient preferences. *Respiratory Medicine*. 2014;108(7):968-975.
54. Van Hecken A, Depre M, Verbesselt R, Wynants K, De Lepeleire I, Arnout J, Wong PH, Freeman A, Holland S, Gertz B, De Schepper PJ. Effect of montelukast on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of warfarin in healthy volunteers. *Journal of Clinical Pharmacology*. 1999;39(5):495-500.
55. Knorr B, Holland S, Rogers JD, Nguyen HH, Reiss TF. Montelukast adult (10-mg film-coated tablet) and pediatric (5-mg chewable tablet) dose selections. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2000;106(3):S171-S178.
56. Pedersen S, Agertoft L, Williams-Herman D, Kuznetsova O, Reiss TF, Knorr B, Dass SB, Wolthers OD. Placebo-controlled study of montelukast and budesonide on short-term growth in prepubertal asthmatic children. *Pediatric Pulmonology*. 2007;42(9):838-843.
57. Merck & Co., Inc. Annual Report Pursuant to Section 13 or 15(d) of the Securities Exchange Act of 1934. 2013. Disponível em: <http://www.merck.com/investors/financials/form-10-k-2012.pdf>. Acedido a: 20 de Outubro de 2015.
58. Al Omari MM, Zoubi RM, Hasan EI, Khader TZ, Badwan AA. Effect of light and heat on the stability of montelukast in solution and in its solid state. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2007;45(3):465-471.
59. Kim YH, Kim DW, Kwon MS, Kwon TK, Park JH, Jin SG, Kim KS, Kim YI, Park JH, Kim JO, Yong CS, Woo JS, Choi HG. Novel montelukast sodium-loaded clear oral solution prepared with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin as a solubilizer and stabilizer: enhanced stability and bioequivalence to commercial granules in rats. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. 2015;82(3-4):479-487.
60. Rashmitha N, Raj TJS, Srinivas C, Srinivas N, Ray UK, Sharma HK, Mukkanti K. A Validated RP-HPLC Method for the Determination of Impurities in Montelukast Sodium. *E-Journal of Chemistry*. 2010;7(2):555-563.
61. Redasani VK, Kothawade AR, Surana SJ. Stability indicating RP-HPLC method for simultaneous estimation of rupatadine fumarate and montelukast sodium in bulk and tablet dosage form. *Journal of Analytical Chemistry*. 2014;69(4):384-389.
62. Patnaik A, Panda S, Sahoo S, Patro V. RP-HPLC method development and validation for the determination and stability indicative studies of Montelukast in Bulk and its pharmaceutical formulations. *Journal of Chemistry*. 2012;9(1):35-42.
63. Merck & Co., Inc. Prescribing information for Singulair (R). Merck 1998-2012. 2015. Disponível a partir de: <http://www.merck.com/index.html>. Acedido a: 20 de Outubro de 2015.
64. International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. ICH harmonised tripartite guideline Q1A(R2): Stability testing of new drug substances and products. 2003. Disponível a partir de: <http://www.ich.org/>. Acedido a: 5 de Abril de 2016.
65. Goodman & Gilman`s. *Manual of Pharmacology and Therapeutics*. In: Brunton L, Parker K, Blumenthal D, Buxton I, editors.: The McGraw-Hill Companies, Inc; 2008.
66. Ritter J, Lewis L, Mant T, Ferro A. *A Textbook of Clinical Pharmacology and herapeutics*. 5 ed. Purdy S, Tod J, editors: Hodder Arnold, part of Hachette Livre UK; 2008.
67. Szejtli J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chemical Reviews*. 1998;98(5):1743-1753.

68. Lee DK, Ahn J, Kwak HS. Cholesterol removal from homogenized milk with beta-cyclodextrin. *Journal of Dairy Science*. 1999;82(11):2327-2330.
69. Del Valle EMM. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*. 2004;39(9):1033-1046.
70. Loftsson T, Leeves N, Bjornsdottir B, Duffy L, Masson N. Effect of cyclodextrins and polymers on triclosan availability and substantivity in toothpastes in vivo. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1999;88(12):1254-1258.
71. Manolihar MK, Sawant MR. Study of solubility of isoproturon by its complexation with beta-cyclodextrin. *Chemosphere*. 2003;51(8):811-816.
72. Charoenlap N, Dharmsthiti S, Sirisansaneeyakul S, Lertsiri S. Optimization of cyclodextrin production from sago starch. *Bioresource Technology*. 2004;92(1):49-54.
73. Terada Y, Yanase M, Takata H, Takaha T, Okada S. Cyclodextrins are not the major cyclic alpha-1,4-glucans produced by the initial action of cyclodextrin glucanotransferase on amylose. *J Biol Chem*. 1997;272(25):15729-15733.
74. Venturini CDG, Nicolini J, Machado C, Machado VG. Properties and recent applications of cyclodextrins. *Quimica Nova*. 2008;31(2):360-368.
75. Szejtli J. Past, present, and future of cyclodextrin research. *Pure and Applied Chemistry*. 2004;76(10):1825-1845.
76. Shakalisava Y, Regan F. Determination of montelukast sodium by capillary electrophoresis. *Journal of Separation Science*. 2008;31(6-7):1137-1143.
77. Uekama K, Hirayama F, Irie T. Cyclodextrin drug carrier systems. *Chemical Reviews*. 1998;98(5):2045-2076.
78. Ficarra R, Tommasini S, Raneri D, Calabro ML, Di Bella MR, Rustichelli C, Gamberini MC, Ficarra P. Study of flavonoids/beta-cyclodextrins inclusion complexes by NMR, FT-IR, DSC, X-ray investigation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2002;29(6):1005-1014.
79. Wang J, Cao YP, Sun BG, Wang CT. Physicochemical and release characterisation of garlic oil-beta-cyclodextrin inclusion complexes. *Food Chemistry*. 2011;127(4):1680-1685.
80. Liu LX, Zhu SY. Preparation and characterization of inclusion complexes of prazosin hydrochloride with beta-cyclodextrin and hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2006;40(1):122-127.
81. Duran Meras I, Espinosa-Mansilla A, Rodriguez DA. Complexation study of cinalukast and montelukast with cyclodextrines. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2007;43(3):1025-1032.
82. Prabagar B, Yoo B-K, Woo J-S, Kim J-A, Rhee J-D, Piao MG, Choi H-G, Yong CS. Enhanced bioavailability of poorly water-soluble clotrimazole by inclusion with β -cyclodextrin. *Archives of pharmacal research*. 2007;30(2):249-254.
83. Evrard B, Chiap P, DeTullio P, Ghalmi F, Piel G, Van Hees T, Crommen J, Losson B, Delattre L. Oral bioavailability in sheep of albendazole from a suspension and from a solution containing hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Journal of Controlled Release*. 2002;85(1-3):45-50.
84. Wong JW, Yuen KH. Improved oral bioavailability of artemisinin through inclusion complexation with β - and γ -cyclodextrins. *International Journal of Pharmaceutics*. 2001;227(1-2):177-185.
85. Shah N, Seth A, Balaraman R. Bioavailability enhancement of poorly soluble Raloxifene by designing inclusion complex with β -Cyclodextrin. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2015;8(8).
86. Ann HJ, Kim KM, Choi J-S, Kim C-K. Effects of cyclodextrin derivatives on bioavailability of ketoprofen. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 1997;23(4):397-401.

87. Veiga F, Fernandes C, Teixeira F. Oral bioavailability and hypoglycaemic activity of tolbutamide/cyclodextrin inclusion complexes. *International Journal of Pharmaceutics*. 2000;202(1–2):165-171.
88. Carrier RL, Miller LA, Ahmed I. The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. *Journal of Controlled Release*. 2007;123(2):78-99.
89. Vyas A, Saraf S, Saraf S. Cyclodextrin based novel drug delivery systems. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. 2008;62(1):23-42.
90. Saenger W. Cyclodextrin inclusion-compounds in research and industry. *Angewandte Chemie-International Edition in English*. 1980;19(5):344-362.
91. Wang ZS, Deng YJ, Sun SY, Zhang XP. Preparation of hydrophobic drugs cyclodextrin complex by lyophilization monophasic solution. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2006;32(1):73-83.
92. Farcas A, Jarroux N, Farcas A-M, Harabagiu V, Guegan P. Synthesis and characterization of furosemide complex in β -cyclodextrin. *Journal of Nanomaterials and Biostructures*. 2006;1(2):55-60.
93. James SL, Adams CJ, Bolm C, Braga D, Collier P, Friscic T, Grepioni F, Harris KDM, Hyett G, Jones W, Krebs A, Mack J, Maini L, Orpen AG, Parkin IP, Shearouse WC, Steed JW, Waddell DC. Mechanochemistry: opportunities for new and cleaner synthesis. *Chemical Society Reviews*. 2012;41(1):413-447.
94. Dushkin AV. Potential of mechanochemical technology in organic synthesis and synthesis of new materials. *Chemistry for Sustainable Development*. 2004;12(3):251-273.
95. Rinaldi L, Binello A, Stolle A, Curini M, Cravotto G. Efficient mechanochemical complexation of various steroid compounds with α - β -, and γ -cyclodextrin. *Steroids*. 2015;98:58-62.
96. Iwata M, Fukami T, Kawashima D, Sakai M, Furuishi T, Suzuki T, Tomono K, Ueda H. Effectiveness of mechanochemical treatment with cyclodextrins on increasing solubility of glimepiride. *Pharmazie*. 2009;64(6):390-394.
97. Aigner Z, Berkesi O, Farkas G, Szabó-Révész P. DSC, X-ray and FTIR studies of a gemfibrozil/dimethyl- β -cyclodextrin inclusion complex produced by co-grinding. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2012;57:62-67.
98. Lin SY, Hsu CH, Sheu MT. Curve-fitting FTIR studies of loratadine/hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex induced by co-grinding process. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2010;53(3):799-803.
99. Xie J, Yang F, Shi XJ, Zhu XY, Su WK, Wang P. Improvement in solubility and bioavailability of puerarin by mechanochemical preparation. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2013;39(6):826-835.
100. Giordano F, Novak C, Moyano JR. Thermal analysis of cyclodextrins and their inclusion compounds. *Thermochimica Acta*. 2001;380(2):123-151.
101. Zhang J-q, Jiang K-m, An K, Ren S-H, Xie X-g, Jin Y, Lin J. Novel water-soluble fisetin/cyclodextrins inclusion complexes: Preparation, characterization, molecular docking and bioavailability. *Carbohydrate Research*. 2015;418:20-28.
102. Wang J, Cao Y, Sun B, Wang C. Characterisation of inclusion complex of trans-ferulic acid and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Food Chemistry*. 2011;124(3):1069-1075.
103. Fernandes CM, Teresa Vieira M, B. Veiga FJ. Physicochemical characterization and in vitro dissolution behavior of nifedipine–cyclodextrins inclusion compounds. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2002;15(1):79-88.
104. Caira MR. On the isostructurality of cyclodextrin inclusion complexes and its practical utility. *Revue Roumaine De Chimie*. 2001;46(4):371-386.

105. de Araujo DR, Tsuneda SS, Cereda CM, Carvalho FDG, Preté PS, Fernandes SA, Yokaichiya F, Franco MK, Mazzaro I, Fraceto LF. Development and pharmacological evaluation of ropivacaine-2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex. *European journal of pharmaceutical sciences*. 2008;33(1):60-71.
106. Gidley MJ, Bociek SM. C-13 CP/MAS NMR-studies of amylose inclusion complexes, cyclodextrins, and the amorphous phase of starch granules - relationships between glycosidic linkage conformation and solid-state C-13 chemical-shifts. *Journal of the American Chemical Society*. 1988;110(12):3820-3829.
107. Thun J, Milius W, Wedel B, Ridder A, Moersdorf P, Breu J. The crystal structure of the API Montelukast. *CrystEngComm*. 2009;11(7):1306-1308.
108. Chou JH, Gentzler MB, Michaels JN, Wu MG, Bazin C, Clas SD, Dalton C. Merck & Co., Inc., Merck Frosst Canada Ltd. Polymorphic form of montelukast sodium. World Patent WO 2004091618 A1, 15 de Março de 2006.: Google Patents; 2006.
109. Niddam-Hildesheim V, Aronhime J, Sterimbaum G. Montelukast sodium polymorphs. World Patent WO 2005075427 A2, 18 de Agosto de 2005.
110. Saravanan M, Reddy PP, Naidu M, Babu JM, Srivastava AK, Kumar TL, Sekhar BC, Satyanarayana B. Identification, synthesis, isolation and spectral characterization of potential impurities of montelukast sodium. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2008;48(3):708-715.
111. Kamitori S, Hirotsu K, Higuchi T. Crystal and molecular structure of the [gamma]-cyclodextrin-12-crown-4 1 : 1 inclusion complex. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*. 1986(9):690-691.
112. Harada A, Li J, Kamachi M. Formation of Inclusion Complexes of Monodisperse Oligo (ethylene glycol) s with. alpha.-Cyclodextrin. *Macromolecules*. 1994;27(16):4538-4543.
113. Li J, Yan D, Jiang X, Chen Q. Formation of the crystalline inclusion complex between γ -cyclodextrin and poly (N-acetyleneimine). *Polymer*. 2002;43(9):2625-2629.
114. Porbeni FE, Edeki EM, Shin ID, Tonelli AE. Formation and characterization of the inclusion complexes between poly (dimethylsiloxane) and polyacrylonitrile with γ -cyclodextrin. *Polymer*. 2001;42(16):6907-6912.
115. Inoue Y, Suzuki K, Ezawa T, Murata I, Yokota M, Tokudome Y, Kanamoto I. Examination of the physicochemical properties of caffeic acid complexed with γ -cyclodextrin. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. 2015;83(3):289-298.
116. Ramos AI, Braga TM, Silva P, Fernandes JA, Ribeiro-Claro P, Lopes MdFS, Paz FAA, Braga SS. Chloramphenicol- cyclodextrin inclusion compounds: co-dissolution and mechanochemical preparations and antibacterial action. *CrystEngComm*. 2013;15(15):2822-2834.
117. Wang Q, Li S, Che X, Fan X, Li C. Dissolution improvement and stabilization of ibuprofen by co-grinding in a β -cyclodextrin ground complex. *Asian J Pharm Sci*. 2010;5:188-193.
118. Inoue Y, Watanabe S, Suzuki R, Murata I, Kanamoto I. Evaluation of actarit/ γ -cyclodextrin complex prepared by different methods. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. 2015;81(1):161-168.
119. Veregin RP, Fyfe CA, Marchessault RH, Taylor MG. Correlation of ^{13}C chemical shifts with torsional angles from high-resolution, ^{13}C -C.P.-M.A.S. N.M.R. studies of crystalline cyclomalto-oligosaccharide complexes, and their relation to the structures of the starch polymorphs. *Carbohydrate Research*. 1987;160:41-56.
120. Heyes SJ, Clayden NJ, Dobson CM. ^{13}C -CP/MAS NMR studies of the cyclomalto-oligosaccharide (cyclodextrin) hydrates. *Carbohydrate Research*. 1992;233:1-14.

121. Zoppi A, Garnero C, Linck YG, Chattah AK, Monti GA, Longhi MR. Enalapril: β -CD complex: stability enhancement in solid state. *Carbohydrate Polymers*. 2011;86(2):716-721.
122. Koontz JL, Marcy JE, O'Keefe SF, Duncan SE. Cyclodextrin Inclusion Complex Formation and Solid-State Characterization of the Natural Antioxidants α -Tocopherol and Quercetin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009;57(4):1162-1171.
123. Sambasevam KP, Mohamad S, Sarih NM, Ismail NA. Synthesis and characterization of the inclusion complex of β -cyclodextrin and azomethine. *International journal of molecular sciences*. 2013;14(2):3671-3682.
124. Guan Y, Qian L, Xiao H. Novel Anti-Microbial Host-Guest Complexes Based on Cationic β -Cyclodextrin Polymers and Triclosan/Butylparaben. *Macromolecular Rapid Communications*. 2007;28(23):2244-2248.
125. Kayaci F, Umu OCO, Tekinay T, Uyar T. Antibacterial Electrospun Poly(lactic acid) (PLA) Nanofibrous Webs Incorporating Triclosan/Cyclodextrin Inclusion Complexes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013;61(16):3901-3908.
126. Batchelor HK, Fotaki N, Klein S. Paediatric oral biopharmaceutics: Key considerations and current challenges. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2014;73:102-126.
127. Williams DBG, Lawton M. Drying of Organic Solvents: Quantitative Evaluation of the Efficiency of Several Desiccants. *The Journal of Organic Chemistry*. 2010;75(24):8351-8354.
128. Choquesillo-Lazarte D, García-Ruiz JM. Poly (ethylene) oxide for small-molecule crystal growth in gelled organic solvents. *Journal of applied crystallography*. 2011;44(1):172-176.
129. Job P. Formation and stability of inorganic complexes in solution. *Annali di Chimica Applicata*. 1928;9:113-203.
130. Shapiro E, Yahalomi R, Niddam-Hildesheim V, Sterimbaum G, Chen K. Teva Pharmaceutical Industries Ltd. Processes for preparing montelukast sodium. World Patent WO 2005105751 A1, 16 de Junho de 2009.
131. Overeem A, van den Heuvel DJM. Synthon Bv. Solid-state montelukast. World Patent WO 2005040123 A1, 30 de Junho de 2009.