



**LUCAS BRAGANÇA DE CARVALHO**

**USO DE CICLODEXTRINA NA FORMAÇÃO  
DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO COM O  
HORMÔNIO MASCULINIZANTE  
17 $\alpha$ -METILTESTOSTERONA**

**LAVRAS - MG**

**2014**

**LUCAS BRAGANÇA DE CARVALHO**

**USO DE CICLODEXTRINA NA FORMAÇÃO DE COMPLEXOS DE  
INCLUSÃO COM O HORMÔNIO MASCULINIZANTE  
17 $\alpha$ -METILTESTOSTERONA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Luciana de Matos Alves Pinto

**LAVRAS - MG**

**2014**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e  
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Carvalho, Lucas Bragança de.

Uso de ciclodextrina na formação de complexos de inclusão com o hormônio masculinizante 17- $\alpha$ -metiltestosterona / Lucas Bragança de Carvalho. – Lavras : UFLA, 2014.

102 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Luciana de Matos Alves Pinto.

Bibliografia.

1. Ciclodextrina. 2. Metiltestosterona. 3. Complexo de inclusão.  
4. Reversão sexual. 5. Tilápia. I. Universidade Federal de Lavras. II.  
Título.

CDD – 639.31

**LUCAS BRAGANÇA DE CARVALHO**

**USO DE CICLODEXTRINA NA FORMAÇÃO DE COMPLEXOS DE  
INCLUSÃO COM O HORMÔNIO MASCULINIZANTE  
17 $\alpha$ -METILTESTOSTERONA**

Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de Lavras, como parte das  
exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Agroquímica, para  
obtenção do título de Mestre

APROVADA em 27 de fevereiro de 2014

Dra. Josefina Aparecida de Souza UFLA

Dr. Paulo Sérgio Castilho Preté UFLA

Dr. Luis David Solis Murgas UFLA

Dra. Luciana de Matos Alves Pinto  
Orientadora

**LAVRAS - MG**

**2014**

Aos meus pais,  
Irene e João Marcos,  
pelo incentivo, apoio e  
amor.

Dedico

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Irene e João Marcos, pelo apoio e confiança em todas as minhas escolhas e pelos princípios ensinados.

Gostaria de agradecer à Profa. Dra. Luciana pela confiança, amizade e ensinamentos durante toda a fase deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Tiago Venâncio (UFSCar) pelos espectros de RMN.

Ao Prof. Dr. Carlos Jaime (UAB) pelos cálculos teóricos, ensinamentos e sugestões.

Ao Prof. Dr. Luis Murgas (UFLA) e a doutoranda Aline pela colaboração e os ensaios *in vivo*.

Ao Prof. Leonardo Fraceto (UNESP - Sorocaba) e o doutorando Renato Grillo pelas análises de DSC.

Aos membros da banca examinadora por terem aceitado o convite, pelas valiosas opiniões e importantes sugestões.

À todos os meus amigos e colegas que sempre deram forças e apoiaram para que chegássemos até aqui.

À todos de minha família, sem citar nomes, pois é enorme, obrigado pela torcida!

À CAPES pela bolsa concedida

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

**Muito Obrigado!**

## RESUMO

A  $17\alpha$ -metiltestosterona (MT) é o andrógeno sintético mais largamente empregado na reversão sexual de tilápias. Devido às suas propriedades físico-químicas a ciclodextrina (CD) utilizada na formação de complexos de inclusão com a metiltestosterona representa uma nova possibilidade de método para inversão sexual. Neste trabalho foram preparados os complexos de inclusão entre a metiltestosterona e a  $\beta$ -ciclodextrina por liofilização, malaxagem e mistura física. O produto obtido foi caracterizado por métodos espectroscópicos, análises térmicas e microscopia. O comportamento do hormônio em presença de ciclodextrina foi avaliado quanto à mudança de polaridade do ambiente de solvatação. A avaliação da solubilidade e estimativa da estequiometria do complexo de inclusão foi realizada por isotermas de solubilidade. A calorimetria diferencial de varredura e a microscopia eletrônica de varredura foram empregadas para avaliar a formação dos complexos em estado sólido. As interações existentes entre hóspede e hospedeiro foram avaliadas por  $^1\text{H}$  RMN e medidas de DOSY. Experimentos de ROESY 2D foram utilizados para estabelecer a estrutura do complexo e como ocorre a interação corroborando com os resultados de dinâmica molecular para a formação do complexo de inclusão no vácuo. A formação do complexo de inclusão propiciou um aumento de 6 vezes na solubilidade do hormônio, a formação de um complexo com solubilidade limitada e estequiometria de 1:2 (MT:CD). A supressão dos picos endotérmicos do hormônio e da água de solvatação das ciclodextrinas, assim como a alteração da morfologia dos produtos obtidos confirmam a formação dos complexos de inclusão. Os deslocamentos químicos de H3 e H5 da ciclodextrina apontam para uma inclusão completa do hormônio na cavidade. Com o DOSY foi determinado a constante de associação  $K_a = 2.846 \text{ L mol}^{-1}$  e a fração complexada de 76%. Testes de liberação mostraram a liberação mais lenta para os complexos preparados por liofilização, sendo um percentual de 65% para o complexo de razão molar 1:1 e de 50% para o 1:2. Os experimentos *in vivo* parecem indicar que as formulações dos complexos são um método viável a ser empregado comercialmente, no entanto os resultados, ainda são preliminares e carecem de mais estudos. Assim, o uso da nanotecnologia, representada pela associação da metiltestosterona com a  $\beta$ -ciclodextrina, apresenta forte potencial para ser empregada na aquicultura para reversão sexual de tilápias.

Palavras-chave: Ciclodextrina. Metiltestosterona. Complexo de inclusão. Reversão sexual. Tilápia.

## ABSTRACT

17 $\alpha$ -methyltestosterone (MT) is the most widely used synthetic androgen for sex reversal in tilapia. Due to its physicochemical properties, the cyclodextrin (CD) used to form inclusion complexes with methyltestosterone is a new possibility of sex reversal method. In this study, inclusion complexes between  $\beta$ -CD and MT were prepared by lyophilization, kneading and physical mixture. The product was characterized by spectroscopic methods, thermal analysis and microscopy. The behavior of the hormone in the presence of cyclodextrin was evaluated for change in polarity of the solvation environment. Evaluation of solubility and estimated stoichiometry of the inclusion complex were performed by phase techniques. Differential scanning calorimetry and scanning electron microscopy were used to assess the formation of complexes in the solid state. The interactions between guest and host were evaluated by  $^1\text{H}$  NMR and DOSY measurements. 2D ROESY experiments were used to establish the structure of the complex, and how the interaction occurs, confirming the results of molecular dynamics for the formation of the inclusion complex in vacuum. The formation of the inclusion complex provided a 6-fold increase in the solubility of the hormone, the formation of a complex with limited solubility and a 1:2 stoichiometry (MT:CD). The suppression of endothermic hormone peaks and water solvation of cyclodextrins, as well as the change in morphology of the products obtained confirm the formation of inclusion complexes. The chemical shifts of H3 and H5 in cyclodextrin point out to a complete inclusion of the hormone in the cavity. The association constant  $K_a=2.846 \text{ mol L}^{-1}$  and the complexed fraction of 76% was determined with the DOSY. Release tests showed a slower release for the complexes prepared by lyophilization, with 65% for the 1:1 molar ratio complex, and 50% for the 1:2 molar ratio complex. The *in vivo* experiments seem to indicate that the formulations of the complexes are a viable method to be used commercially; however, the results are still preliminary and require further studies. Thus, the use of nanotechnology, represented by the association of methyltestosterone with  $\beta$ -cyclodextrin, has strong potential to be used in aquaculture for sex reversal of tilapia.

Keywords: Cyclodextrin. Methyltestosterone. Inclusion complex. Sex reversal. Tilapia.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Estrutura química do hormônio 17 $\alpha$ -metiltestosterona.....	19
Figura 2	Estrutura química da $\beta$ -CD, formada por 7 monômeros de glicose. A $\alpha$ e $\gamma$ -CD possuem respectivamente 6 e 8 unidades de glicose .....	22
Figura 3	Representação esquemática da formação do complexo de inclusão entre a CD e o tolueno.....	25
Figura 4	Isotermas de solubilidade. $S_t$ = [soluto] dissolvido (livre + complexado); $S_0$ = solubilidade do soluto na ausência de CD; $S_C$ = solubilidade limite do complexo pouco solúvel; Isotermas $A_P$ , $A_L$ , e $A_N$ = complexos muito solúveis (limite de solubilidade determinado pela solubilidade da CD); Isoterma $B_S$ = complexo de solubilidade limitada é formado; Isoterma $B_I$ = complexo insolúvel é formado.....	34
Figura 5	Dependência do NOE-ROE para um isolado homonuclear em relação a $w_0$ e $\tau_c$ .....	43
Figura 6	Micrografia eletrônica de varredura da $\beta$ -CD com aumento de 500 (a), 1000 (b), 1500 (c) e 2000 (d) X.....	60
Figura 7	Micrografia eletrônica de varredura da MT com aumento de 500 (a), 1000 (b), 1500 (c) e 2000 (d) X .....	60
Figura 8	Micrografia eletrônica de varredura da MT/CD obtida por malaxagem, com aumento de 500 (a), 1000 (b), 1500 (c) e 2000 (d) X.....	61
Figura 9	Micrografia eletrônica de varredura da MT/CD obtida por liofilização, com aumento de 500 (a), 1000 (b), 1500 (c) e 2000 (d) X.....	62

Figura 10	Estrutura química da 17 $\alpha$ -metiltestosterona (MT) mostrando as posições dos carbonos .....	68
Figura 11	Provável geometria do complexo de inclusão formado entre a MT e a $\beta$ -CD .....	71
Figura 12	Estruturas da MT e da $\beta$ -CD utilizadas nos cálculos, obtidas mediante o campo de forças MM3* .....	72
Figura 13	Estruturas obtidas utilizando o campo de forças MM3* .....	74
Figura 14	Estrutura final da dinâmica molecular de 1000 ps para o complexo 1.....	75
Figura 15	Estrutura final da dinâmica molecular de 1000 ps para o complexo 2.....	76
Figura 16	Complexo MT/CD na razão molar de 1:2 obtido por mecânica molecular .....	77
Figura 17	Simulação de dinâmica molecular de 1000 ps para o complexo MT/CD (1:2) .....	78
Figura 18	Simulações de dinâmica molecular (1000 ps) com modelo de solvatação contínuo para simular a presença de água nos complexos de inclusão MT/CD (1:2) .....	79
Gráfico 1	Espectros de absorção na região do UV para a MT em diferentes concentrações (a) e curva analítica para a MT (b)	51
Gráfico 2	Espectros de absorbância da MT em meios com diferentes polaridades (a) e curva de variação da absorbância em função da constante dielétrica (b).....	53
Gráfico 3	Espectros de absorção na região do UV da MT em solução etanólica 10% de CD nas proporções de 1:0, 1:50 e 1:100 ..	54
Gráfico 4	Isoterma de solubilidade para a MT em $\beta$ -CD, T = 26 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C	56
Gráfico 5	Termogramas de DSC das amostras de MT (a), $\beta$ -CD (b), mistura física MT+CD (c), complexos de inclusão	

	preparados por malaxagem na razão molar 1:1 (d) e 1:2 (e) e por liofilização nas razões de 1:1 (f) e 1:2 (g) .....	58
Gráfico 6	Espectros $^1\text{H}$ RMN 400 MHz em $\text{D}_2\text{O}$ e $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$ do complexo de inclusão MT/CD (a) e da $\beta\text{-CD}$ (b) .....	63
Gráfico 7	Mapa de contorno de difusão (DOSY, 1H, 400 MHz, 25 $^\circ\text{C}$ ) da $\beta\text{-CD}$ .....	65
Gráfico 8	Mapa de contorno de difusão (DOSY, 1H, 400 MHz, 25 $^\circ\text{C}$ ) da MT.....	66
Gráfico 9	Mapa de contorno de difusão (DOSY, 1H, 400 MHz, 25 $^\circ\text{C}$ ) do complexo de inclusão MT/CD .....	66
Gráfico 10	Espectro de ROESY 2D do complexo MT/CD .....	69
Gráfico 11	Expansão do espectro de ROESY 2D do complexo MT/CD. Região correspondente ao H do C4 da MT .....	70
Gráfico 12	Expansão do espectro de ROESY 2D do complexo MT/CD	70
Gráfico 13	Porcentagem de liberação de MT livre (a) e dos complexos de inclusão MT/CD preparados na proporção 1:1 por malaxagem (b), liofilização (c) e 1:2 por malaxagem (d) e liofilização (e), $T = 26 \pm 1^\circ\text{C}$ .....	80

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Propriedades físico-químicas das CDs .....	23
Tabela 2	Variação das proporções água:etanol e suas respectivas constantes dielétricas a 25 °C .....	33
Tabela 3	Dados de <sup>1</sup> H RMN mostrando o efeito da MT nos deslocamentos ( $\Delta\delta$ ) químicos dos hidrogênios da $\beta$ -CD em D <sub>2</sub> O a 25 °C .....	64
Tabela 4	Coefficientes de difusão de MT livre e complexado com $\beta$ -CD obtidos por DOSY .....	67
Tabela 5	Valores de energia estérica obtidos nas otimizações usando diferentes campos de forças .....	73
Tabela 6	Taxas de sobrevivência e reversão hormonal de tilápias submetidas a diferentes tratamentos .....	82

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO .....	17
2.1	Inversão sexual em tilápias.....	17
2.2	Carreadores de moléculas .....	20
2.3	Ciclodextrinas .....	22
2.3.1	Complexos de inclusão .....	24
3	OBJETIVO GERAL .....	28
3.1	Objetivos específicos .....	28
4	METODOLOGIA .....	29
4.1	Preparo dos complexos de inclusão .....	29
4.2	Espectroscopia de UV/Vis.....	31
4.2.1	Determinação da absorvidade molar e avaliação do comportamento da MT em diferentes constantes dielétricas.	32
4.2.2	Avaliação da interação MT/CD por absorção molecular .....	33
4.3	Isotermas de solubilidade .....	33
4.4	Calorimetria diferencial de varredura.....	35
4.4.1	Avaliação da formação dos complexos de inclusão por calorimetria diferencial de varredura .....	36
4.5	Microscopia eletrônica de varredura .....	37
4.5.1	Avaliação da formação dos complexos de inclusão por microscopia eletrônica de varredura.....	38
4.6	Ressonância magnética nuclear .....	38
4.6.1	Aquisição dos espectros de <sup>1</sup> H RMN .....	39
4.6.2	Espectroscopia de RMN ordenada por difusão (DOSY) .....	40
4.6.2.1	Medidas do coeficiente de difusão .....	42
4.6.3	Efeito nuclear overhauser (NOE) .....	42

4.6.3.1	Medidas de ROESY-2D .....	43
4.7	Avaliação teórica da formação dos complexos de inclusão ....	44
4.7.1	Metodologia de cálculo .....	44
4.7.1.1	Cálculos de mecânica molecular .....	45
4.7.1.2	Simulações de dinâmica molecular .....	45
4.8	Ensaio de liberação da MT <i>in vitro</i> .....	45
4.9	Ensaio <i>in vivo</i> .....	46
4.9.1	Animais e instalações experimentais .....	46
4.9.2	Procedimento experimental.....	47
4.9.3	Determinação da taxa de sobrevivência.....	48
4.9.4	Determinação da taxa de reversão sexual.....	49
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	50
5.1	Determinação da absorvidade molar da MT .....	50
5.2	Avaliação do comportamento ótico da MT em soluções com diferentes constantes dielétricas.....	52
5.3	Isoterma de solubilidade para o complexo MT/CD .....	55
5.4	Avaliação da formação dos complexos de inclusão por calorimetria diferencial de varredura.....	57
5.5	Avaliação da formação dos complexos de inclusão por microscopia eletrônica de varredura.....	59
5.6	<sup>1</sup> H RMN para avaliação da interação entre MT e β-CD .....	62
5.7	Determinação do coeficiente de difusão por DOSY .....	65
5.8	Experimentos bidimensionais ROESY 2D.....	68
5.9	Estudo teórico da complexação da MT com a β-CD.....	72
5.10	Ensaio de liberação da MT .....	80
5.11	Taxas de sobrevivência e reversão sexual em tilápias.....	81
6	CONCLUSÃO .....	86
	REFERÊNCIAS .....	88

<b>ANEXOS .....</b>	<b>102</b>
---------------------	------------

## 1 INTRODUÇÃO

Segundo o Fundo de Populações das Nações Unidas (UNFPA), temos hoje um crescimento expressivo e rápido da população mundial que se deve a alguns fatores como o aumento da expectativa de vida e menores taxas de mortalidade infantil.

De 1999 a 2011 houve um crescimento populacional da ordem de 1 bilhão de habitantes, onde a população mundial alcançou a casa dos 7 bilhões. A estimativa para 2050 é de uma população de 9,3 bilhões de habitantes (UNFPA, 2011). Com este elevado contingente populacional também aumenta a demanda por uma maior produção de alimentos e a preservação do meio ambiente.

A utilização da grande maioria dos compostos terapêuticos é limitada por alguns problemas em suas formulações que estão relacionados normalmente com a biodisponibilidade de seus princípios ativos, fazendo com que atenção considerável seja voltada para o desenvolvimento de novos sistemas de transporte de drogas. Nestes sistemas, carreadores são responsáveis por contornar propriedades físico-químicas limitantes das drogas encapsuladas melhorando a farmacodinâmica, farmacocinética e os efeitos toxicológicos das mesmas.

Dentre uma série de carreadores estudados atualmente, as ciclodextrinas (CDs) despertam grande interesse pela capacidade de formar complexos de inclusão com uma variedade de substâncias que têm suas propriedades alteradas pela complexação.

A tilapicultura, tem se tornado alvo de muita polêmica no Brasil devido a utilização de hormônios esteroides para inversão sexual das larvas. Há ainda estudos controversos sobre a sua utilização, principalmente no que diz respeito à dose e duração do tratamento e se a utilização destes hormônios faz ou não mal

ao meio ambiente, tendo em vista que uma das maiores preocupações é a liberação dos resíduos desse hormônio nos recursos hídricos.

Tendo em vista essa necessidade de aumentar a produção de alimentos de forma sustentável, agredindo o mínimo possível o meio ambiente, este trabalho direciona-se a estudar tecnologias que viabilizem a produção de pescado, especificamente a tilapicultura com o uso de hormônio masculinizante complexado em sistemas carreadores.

A17 $\alpha$ -metiltestosterona (MT) é o andrógeno sintético mais largamente empregado na produção de tilápias. A CD, utilizada na formação de complexos de inclusão com a MT, representa uma nova possibilidade de método para a inversão sexual. Sendo assim, este trabalho visa a preparação de complexos de inclusão entre a MT e a CD bem como a caracterização físico-química dos novos compostos e realização de testes de reversão sexual em tilápias.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Inversão sexual em tilápias**

Nas últimas décadas a tilapicultura se expandiu por todo o mundo, assim como a rápida industrialização dos sistemas de produção deste pescado. Como resultado, a produção mundial de tilápia cultivada aumentou de 384 mil toneladas, em 1990, representando 4,5% da produção total de peixes de cativeiro para 3,5 milhões de toneladas em 2010, representando 8,9% da produção total de peixes de viveiro, com um crescimento médio anual de 13,5% (FAO, 2012).

No Brasil, a Aquicultura Continental, como atividade autossustentável, é a que mais cresce nos dias de hoje. Coleções hídras extensas, abundantes e disponíveis, condições climáticas favoráveis, tecnologia disponível (técnicas de criação, equipamentos e insumos), são fatores favoráveis ao desenvolvimento do setor no cenário nacional (IBAMA, 2005).

No que se refere ao cultivo de tilápias a produção passou a ter atenção especial no âmbito comercial a partir da década de 1950, tornando-se uma atividade promissora para piscicultores e uma nova fonte para obtenção de proteína. Cerca de 155 mil toneladas de tilápias, espécie mais cultivada no Brasil, foram produzidas no ano de 2010, movimentando um agronegócio de 1,3 bilhões de reais por ano (MPA, 2013).

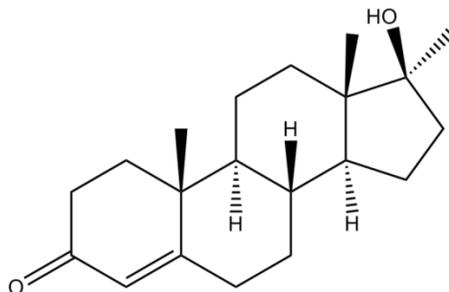
A tilapicultura é baseada, em sua maior parte, na produção de populações monossexo por meio das técnicas de masculinização (GALE et al., 1999). A produção de tilápias monossexuais (todos macho) desempenha papel significativo, devido às suas rápidas taxas de crescimento, a tolerância maior a uma vasta gama de condições ambientais, a resistência ao estresse e doenças, conservação de energia mais elevada, agressividade reduzida e maior uniformidade do tamanho da colheita (EL-SAYED et al., 2012). Portanto, muita

atenção tem sido dada à cultura de tilápia monossexo durante as últimas décadas.

Várias são as opções para se conseguir populações monossexo, incluindo métodos genéticos, não genéticos e mesmo uma combinação entre eles. Dentre os principais métodos utilizados destacam-se a sexagem manual, a hibridação, a manipulação cromossômica e a inversão hormonal (BEARDMORE; MAIR; LEWIS, 2001). Entretanto, a técnica mais utilizada comercialmente é a inversão hormonal do sexo, envolvendo a administração de andrógenos sintéticos incorporados na ração (SINGH, 2013; ZANARDI et al., 2011).

A administração por via oral da MT é o método mais comum e utilizado com êxito para a produção de populações macho de tilápia (BEARDMORE; MAIR; LEWIS, 2001; EL-SAYED et al., 2012). A MT é o andrógeno sintético mais utilizado devido a sua grande eficácia, facilidade de aquisição, menor custo quando comparado aos outros hormônios e facilidade de excreção após o tratamento (BEARDMORE; MAIR; LEWIS, 2001; CNAANI; LEVAVI-SIVAN, 2009).

Este derivado sintético da testosterona (Figura 1), de fórmula molecular  $C_{20}H_{30}O_2$  e massa de  $302,45 \text{ g mol}^{-1}$ , ocorre na forma de um pó cristalino de coloração branca ou creme, que é solúvel em vários solventes orgânicos, mas praticamente insolúvel em água. Como não absorve luz em comprimentos de onda  $> 290 \text{ nm}$  não é esperado que ocorra fotólise direta (PUBCHEM, 2014).



**Figura 1** Estrutura química do hormônio 17 $\alpha$ -metiltestosterona

Os resíduos de MT, se lançados ao solo, deverá ter baixa mobilidade baseada em um  $K_{oc}$  (coeficiente de partição do contaminante entre solo-água corrigido pela matéria orgânica do solo) de 1600. Se liberados em água é esperada a absorção em sólidos suspensos e sedimentos com base no  $K_{oc}$  estimado. O potencial de bioconcentração em organismos aquáticos é moderado e não é esperado que a hidrólise seja um importante processo de destino ambiental para este composto, pois como pode ser evidenciado em sua estrutura não tem os grupos funcionais que se hidrolisam sob as condições ambientais (PUBCHEM, 2014).

No processo de inversão hormonal a ração deve ser oferecida às pós-larvas recentemente eclodidas, com 9 a 13 mm de comprimento, desenvolvendo o tecido gonadal indiferenciado das fêmeas genéticas em testículos, produzindo indivíduos que crescem e funcionam reprodutivamente como machos (POPMA; LOVSHIN, 1995). O genótipo dos peixes invertidos não será alterado, apenas o fenótipo será direcionado, além disso, tilápias invertidas não retornam ao seu sexo original. A duração do tratamento hormonal é determinada pelo consumo de ração que, por sua vez, varia em função da temperatura da água e do estágio de desenvolvimento dos peixes (POPMA; LOVSHIN, 1995), entretanto Kubitzka (2000) determina que o tratamento deve ser de 21 a 28 dias. O hormônio é geralmente incorporado no alimento larval em proporções de 30-60 mg por kg

de ração, durante o período crítico da diferenciação sexual. Para obter um bom desempenho na inversão a ração deve ser fornecida em 5 a 6 arraçoamentos diários, resultando em maior quantidade de machos revertidos (SANCHES; HAYASHI, 2001).

Para alcançar resultados eficazes e sustentáveis é necessário um rigoroso controle de qualidade na prática da inversão sexual. Entretanto, o que se observa é o uso indiscriminado do hormônio, aplicado em dosagens aleatórias e elevadas, resultando na produção de resíduos acima dos limites biologicamente aceitáveis. Além disso, existe ainda a possibilidade de ocorrer a inversão em peixes não tratados quando utiliza-se sistemas fechados (SANCHES; HAYASHI, 2001).

A maior preocupação em relação ao uso inadequado destes hormônios refere-se à sua liberação no ambiente, uma vez que já foi demonstrado que a utilização do hormônio não resulta no acúmulo de resíduos nos tecidos dos peixes tratados (DRUMMOND; MURGAS; VICENTINI, 2009).

Como não existem leis e nem portarias com limites máximos permitidos para este composto nos recursos hídricos, torna-se necessário o monitoramento desse composto na água e nos sedimentos de regiões onde há pisciculturas. O desenvolvimento de novos métodos para a manipulação do sexo é considerada de valor estratégico para a indústria da aquicultura, em consequência do aumento da aversão do público ao uso de hormônios esteroides em animais de produção (REIG; TOLDRA, 2008).

## **2.2 Carreadores de moléculas**

Atualmente, o interesse em materiais nano estruturados vem crescendo de forma vertiginosa devido à sua potencialidade em diversas áreas científicas e

tecnológicas, como catálise, sensores biológicos, liberação controlada de fármacos e bioencapsulação (SCHUCH; BELIVAQUA; FAGAN, 2007).

Os investimentos nas pesquisas em nanotecnologia ultrapassaram 2 bilhões de dólares ao ano, podendo chegar a 1 trilhão no período de 2010 a 2015 (ZANETTI-RAMOS; CRECZYNSKI-PASA, 2008). A busca, normalmente, é por métodos de preparação, caracterização e manipulação de nanoestruturas para um uso específico, como no caso da nanotecnologia associada a fármacos (SCHUCH; BELIVAQUA; FAGAN, 2007). Deste modo, tornou-se possível o desenvolvimento de diversos tipos de materiais como carreadores de moléculas (HUGHES, 2005):

- a) Os de origem biológica como os lipídios, peptídeos, oligossacarídeos;
- b) Polímeros como o poli-ácido lático, poli-amidoamina, poli-ácido glicólico;
- c) Carreadores baseados em silicone, como o próprio silicone e dióxido de silicone;
- d) Carreadores baseados em carbono, como os fulerenos e nanotubos;
- e) Estruturas metálicas de ouro, prata, paládio ou platina, que são capazes de formar nanopartículas e nanoesferas.

A nanotecnologia tem aplicação em diversos setores industriais e de serviços como na indústria farmacêutica, na área de dispositivos eletrônicos e óticos, de pigmentos e tintas, na de siderurgia, vidros e cerâmicas, no setor químico e petroquímico, no agronegócio, no setor têxtil, além da área de biotecnologia e saúde (ZANETTI-RAMOS; CRECZYNSKI-PASA, 2008).

### 2.3 Ciclodextrinas

As CDs (Figura 2) são atualmente um dos carreadores de moléculas mais estudados, atraindo a atenção de investigadores tanto no campo de pesquisa como no campo de tecnologias aplicadas (VENTURINI et al., 2008). Também conhecidas como cicloamiloses, ciclomaltoses ou dextrinas de Schardinger, as CDs foram descobertas por Villiers em 1891, quando obteve uma pequena quantidade de material cristalino após a hidrólise do amido com *Bacillus amylobacter*, o qual denominou de celulosina, no entanto os primeiros detalhes de sua preparação, descrição e isolamento foram descritos por Schardinger em 1903 (DEL VALLE, 2004).

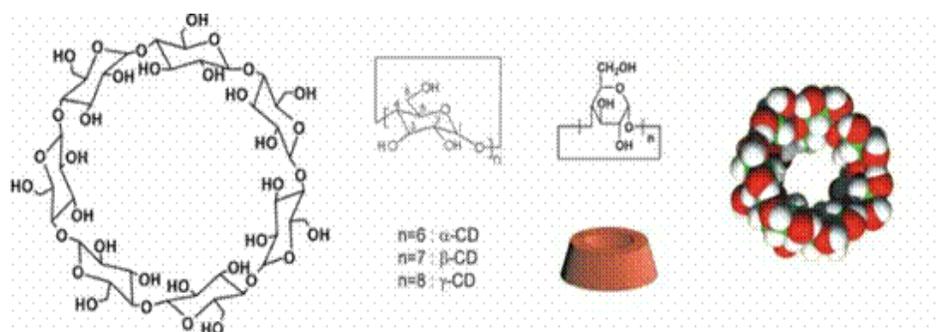


Figura 2 Estrutura química da β-CD, formada por 7 monômeros de glicose. A α e γ CD possuem respectivamente 6 e 8 unidades de glicose

As CDs são oligossacarídeos cíclicos formados por moléculas de D-glicose unidas por meio de ligações glicosídicas, obtidas a partir da degradação enzimática do amido (enzima ciclodextrina glicosiltransferase) de espécies como a mandioca, batata, milho, trigo, etc. As macromoléculas produzidas dependem do tipo de microorganismo que produz a enzima e das condições de reação. As CDs de maior importância e ocorrência natural são as α, β e γ-CDs, constituídas

por seis, sete ou oito monômeros de D-(+)-glicopiranoses, respectivamente, unidas por ligações  $\alpha$ -1,4 (LOFTSSON; MASSON, 2001).

Estas macromoléculas possuem a forma de cone truncado cuja cavidade contém um esqueleto carbônico com hidrogênios e oxigênios glicosídicos voltados para o seu interior formando uma zona de alta densidade eletrônica. Grupos hidroxilas secundárias estão situadas na extremidade mais larga, enquanto os grupos hidroxilas primários na parte mais estreita. Devido à distribuição dos grupos funcionais que formam a CD, a parte externa adquire caráter hidrofílico e a interna hidrofóbica (LOFTSSON; BREWSTER, 1996; SZEJTLI, 1998). Algumas propriedades físico-químicas das CDs são descritas na Tabela 1.

Tabela 1 Propriedades físico-químicas das CDs

<b>Propriedades</b>	<b><math>\alpha</math>-CD</b>	<b><math>\beta</math>-CD</b>	<b><math>\gamma</math>-CD</b>
Número de unidades de glicose	6	7	8
Massa molar (g mol <sup>-1</sup> )	972	1135	1297
Solubilidade em água a 25 °C (g/100 mL)	14,5	1,85	23,2
Diâmetro interno da cavidade (Å)	4,7-5,3	6,0-6,5	7,5-8,3
Diâmetro externo da cavidade (Å)	14,6	15,4	17,5
Volume da cavidade (Å <sup>3</sup> )	174	262	472
Forma dos cristais	Lâminas hexagonais	Paralelogramos monoclinicos	Prismas quadráticos

Fonte Del Valle, 2004; Frömming; Szejtli, 1994.

As CDs naturais, em particular as  $\beta$ -CDs, têm solubilidade aquosa limitada e a formação de complexos com compostos lipofílicos geralmente resulta em precipitação dos complexos sólidos se o limite de solubilidade for atingido (16,4 mM ou 18,5 mg mL<sup>-1</sup>). Assim, numerosas modificações na estrutura química das  $\beta$ -CDs têm sido feitas originando derivados mais solúveis como a 2-hidroxipropil- $\beta$ -CD, 2,6-dimetil- $\beta$ -CD e CDs sulfatadas como sulfobutiléter- $\beta$ -CD, dentre outras (BREWSTER et al., 1991).

Esse aspecto molecular tem possibilitado a utilização das CDs em diferentes áreas da ciência e tecnologia (DODZIUK, 2006). A CD é praticamente atóxica e tem sido comumente utilizada como carreador e no melhoramento das propriedades de fármacos (DE JESUS et al., 2006 e 2010; RODRIGUES et al., 2011) e de uso agrícola (VENTURINI et al., 2008), remoção de metais e compostos orgânicos em meio aquoso (MAHLAMBI et al., 2010; SHAO, et al., 2010; BARUCH-TEBLUM; MASTAI; LANDFESTER, 2010), cromatografia (VARGA et al., 2012; ZHAO et al., 2010), catálise (STRIMBU; LIU; KAIFER, 2003), mascaramento de sabores e odores (BINELLO et al., 2004), dentre outras aplicações.

### **2.3.1 Complexos de inclusão**

A habilidade das CDs de formarem complexos de inclusão depende essencialmente da compatibilidade estérica e dos critérios de polaridade existentes com a droga. Além disso, as forças que dirigem a complexação têm sido atribuídas à alta energia de repulsão da água na cavidade das CDs, às interações de Van der Waals, hidrofóbicas e ligações de hidrogênio (VAN DE MANAKKER et al., 2009). As moléculas complexadas permanecem normalmente orientadas em uma posição onde há o máximo contato entre sua porção hidrofóbica e a cavidade apolar, estando sua porção hidrofílica em

contato com os grupos hidroxila da CD (FRÖMMING; SZEJTLI, 1994). O complexo de inclusão formado entre CDs e moléculas hóspedes é um equilíbrio dinâmico, em que se tem a molécula hóspede constantemente se associando e desassociando da cavidade da CD (LOFTSSON; BREWSTER, 1996; STELLA et al., 1999; ASTRAY et al., 2009).

Em solução aquosa, a cavidade hidrofóbica das CDs está preenchida com moléculas de água (Figura 3). Por apresentar um microambiente termodinamicamente desfavorável, as moléculas de água tendem a sair e entrar com dificuldade. Assim, uma molécula hóspede específica, quando adicionada à solução de CD, expulsa as moléculas de água e ocupa a cavidade (TABUSHI, 1982; MATIOLI, 2000).

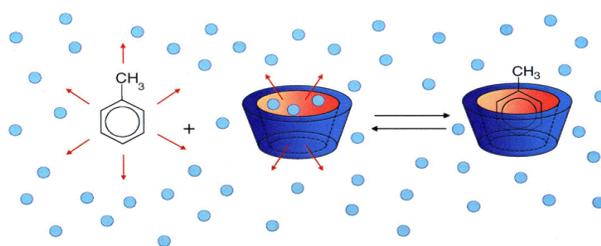


Figura 3 Representação esquemática da formação do complexo de inclusão entre a CD e o tolueno  
Fonte Szejtli, 1998

As  $\beta$ -CDs são as CDs mais largamente utilizadas para a complexação com várias classes de moléculas (LOFTSSON; MASSON, 2001). Sua cavidade tem um diâmetro de cerca de  $7\text{\AA}$ , sendo grande o bastante para acomodar um anel aromático por exemplo (KALINKOVA, 1999). Porém, como já foi descrito (Tabela 1) sua solubilidade pode ser limitante.

Estudos mostram que mais de 40% dos insucessos no desenvolvimento de novos fármacos se devem a limitações farmacotécnicas como baixa capacidade de dissolução e permeabilidade (DAVIS; BREWSTER, 2004). A

capacidade das CDs em modificar propriedades de moléculas pouco solúveis em água faz com que as mesmas sejam úteis no aumento da absorção de fármacos através de barreiras biológicas, podendo ser utilizadas como carreadores em formulações de liberação imediata, por exemplo (UEKAMA, 2004).

A estabilização da molécula convidada também pode favorecer uma diminuição drástica na sublimação e volatilização da mesma (LOFTSSON; BREWSTER, 1996; STELLA et al., 1999). A modificação das propriedades físico-químicas das moléculas convidadas são os efeitos mais significantes da complexação com CDs. Esses efeitos são observados especialmente na solubilidade e na liberação do composto complexado. Como consequência disso, a administração de compostos complexados em CDs influencia na intensidade e duração dos efeitos esperados para a molécula (FRÖMMING; SZEJTLI, 1994).

A imobilização estereoseletiva com  $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$ -CDs tem sido descrita para a solubilização e liberação controlada de drogas como a Carbamazepina (BREWSTER et al., 1991), a Nifedipina (SKALKO et al., 1996), a Hipericina (SATTLER et al., 1997), o Propanidid (VIERSTEIN; STUMPF; WOLSCHANN, 1997), o Miconazol (TENJARLA et al., 1998), o Praziquantel (DE JESUS et al., 2006; DE JESUS et al., 2010; RODRIGUES et al., 2011; CHAVES et al., 2010), o Zolpidem (TRAPANI et al., 2000) e um análogo de nucleotídeo (JORDHEIM et al., 2009). Também já foram descritas a utilização com agroquímicos (YAÑEZ; ARAYA; BOLLO, 2010; CARVALHO; PINTO, 2012), como adsorvente na remoção de poluentes orgânicos da água (CARVALHO, et al., 2014; BARUCH-TEBLUM; MASTAI; LANDFESTER, 2010) e em colunas para química analítica (ZHAO et al., 2010).

As interações moleculares podem ser avaliadas utilizando-se diferentes técnicas, que se baseiam em alterações físico-químicas da molécula incluída. Em solução aquosa um dos métodos mais comumente empregados no estudo de complexação é o diagrama de solubilidade de fases e a espectroscopia de UV-

Visível. Outros métodos de análise também são utilizados para a caracterização dos complexos de inclusão com CDs como a espectroscopia de infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear (RMN), microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de raios-X (DRX) e análises térmicas como a calorimetria diferencial de varredura (DSC), a termogravimetria (TG) e a termogravimetria diferencial (DTG) (LYRA et al., 2010).

### **3 OBJETIVO GERAL**

Preparar, caracterizar complexos de inclusão entre a MT e a CD e avaliar seus efeitos *in vivo*.

#### **3.1 Objetivos específicos**

- a) Identificar o melhor método de preparo dos complexos de inclusão (MT/CD);
- b) Caracterização da formação do complexo de inclusão;
- c) Avaliação teórica, da formação dos complexos de inclusão entre a MT e a CD, em diferentes razões molares;
- d) Avaliar a liberação do hormônio *in vitro*;
- e) Identificar os efeitos da complexação *in vivo*.

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 Preparo dos complexos de inclusão**

Para a grande maioria dos substratos, as técnicas de complexação utilizadas são procedimentos simples e a escolha do método experimental, depende fundamentalmente das características do substrato que se está trabalhando.

A fim de avaliar o melhor método para preparação dos complexos de inclusão entre a CD e a MT, os complexos sólidos foram obtidos por diferentes metodologias, como descritas abaixo (SZEJTLI, 1988; DE JESUS, et al., 2006; VILLAVERDE, et al., 2005).

#### **a) Em solução aquosa**

O procedimento de preparação mais habitual consiste na solubilização da CD em meio aquoso e posterior adição do composto ativo em excesso. A suspensão resultante permanece a temperatura constante, sob agitação, por um intervalo de tempo suficiente para atingir o equilíbrio termodinâmico de encapsulação (RAJEWSKI; STELLA, 1996). Quantidades perfazendo um total de 2 g, nas razões molares de 1:1 e 1:2 MT/CD (Sigma-Aldrich), foram mantidas sob agitação constante por 7 dias em solução aquosa a 10% de etanol em recipiente fechado e protegidos da luz ambiente. A temperatura na qual foi realizado o experimento foi de  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ .

**b) Liofilização**

Consiste na eliminação de solvente dos sistemas em solução, através de um prévio congelamento e posterior secagem a pressões reduzidas. Esta técnica permite a obtenção de complexos de inclusão com elevado rendimento e um baixo estresse térmico. Soluções com os complexos de inclusão em meio aquoso foram congeladas e liofilizadas (Liofilizador Labconco Freezone 4.5) até a total eliminação do solvente. O complexo obtido foi acondicionado em frascos hermeticamente fechados e recobertos com papel alumínio a uma temperatura de  $-22^{\circ}\text{C}$ .

**c) Mistura física**

Este método baseia-se na simples mistura dos componentes sem adição de água. Em alguns casos são necessários vários dias para se detectar a formação de complexos de inclusão. Para o preparo da mistura, quantidades nas razões molares de 1:1 e 1:2 de MT e CD foram pesadas, transferidas para um graal e com o auxílio de um pistilo foram maceradas por cerca de 10 min para que houvesse uma perfeita homogeneização da amostra. O produto obtido foi acondicionado em frascos hermeticamente fechados e recobertos com papel alumínio a  $-22^{\circ}\text{C}$ .

**d) Malaxagem**

Consiste em formar uma pasta a partir da adição da mínima quantidade de líquido (água ou misturas etanoaquosas) suficiente para umedecer a mistura em pó de fármaco e CD. Em escala laboratorial, é realizada em um almofariz com auxílio de um pistilo.

Como na mistura física, quantidades nas razões molares de 1:1 e 1:2 de MT e CD foram pesadas, umedecidas com água deionizada, macerada com o auxílio do pistilo e secas em estufa a 45°C. O complexo obtido foi acondicionado em frascos hermeticamente fechados e recobertos com papel alumínio a -22°C.

#### 4.2 Espectroscopia de UV/Vis

A espectroscopia na região do ultravioleta e visível é uma técnica não destrutiva eventualmente requerida numa série de análises. No caso do ultravioleta (UV) a absorção de radiação em comprimentos de onda específicos (190 a 400 nm) causa a promoção de elétrons de um estado fundamental a um estado excitado. Essa absorção de energia depende da estrutura eletrônica da molécula e por isso essa técnica apresenta um amplo espectro de aplicações (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

Basicamente, quando um feixe de luz incide sobre uma amostra tem uma fração desta luz absorvida por ela e cujo princípio é expresso pela Lei de Lambert-Beer (Equação 1). A Lei de Beer diz que essa fração deve ser sempre a mesma, ou seja, estabelece que a absorbância ( $A$ ) é diretamente proporcional ao caminho que a luz percorre na amostra ( $b$ ), à concentração ( $c$ ) e a absortividade molar ( $\epsilon$ ).

$$A = \epsilon cb \quad (1)$$

Na formação de complexos de inclusão podem ocorrer mudanças no modo com que a molécula inclusa absorve a radiação UV devido à mudança do ambiente de solvatação e às diferentes interações entre hóspede e hospedeiro.

Essas mudanças podem ser visualizadas por alterações na intensidade e/ou deslocamento das bandas de absorção (LYRA et al., 2010; DODZIUK, 2006).

#### **4.2.1 Determinação da absortividade molar e avaliação do comportamento da MT em diferentes constantes dielétricas**

Para avaliação do comprimento de onda de máxima absorção da MT foram feitas varreduras, de 300 a 200 nm, das soluções utilizadas na construção de uma curva analítica.

A absortividade molar ( $\epsilon$ ) da MT foi determinada através dos valores de absorbância de soluções com concentrações entre 20 e 80  $\mu\text{M}$  do hormônio em água deionizada contendo 10% de etanol. A partir dos valores de absorbância das soluções foi construída uma curva analítica, sendo a inclinação da curva correspondente ao valor de  $\epsilon$ , como mostra a Equação 1. Foi utilizado um espectrofotômetro UV-Vis marca Varian, modelo Cary 50 Probe.

A fim de simular o comportamento da MT em ambientes químicos de diferentes constantes dielétricas, espectros da MT 20  $\mu\text{M}$  foram obtidos na faixa de 200 a 300 nm em meios contendo diferentes proporções água:etanol cujos valores são mostrados na Tabela 2 juntamente aos respectivos valores de constantes dielétricas, os quais foram utilizados na construção da curva de variação de absorbância pela constante dielétrica.

Tabela 2 Variação das proporções água:etanol e suas respectivas constantes dielétricas a 25 °C

% água	% etanol	Constante dielétrica
100	0	79,5
90	10	73,7
80	20	70,2
70	30	66,0
60	40	59,6
50	50	55,0
40	60	47,5
30	70	41,1
20	80	35,4
10	90	29,2
0	100	24,9

Fonte Wohlfarth, 2008

#### 4.2.2 Avaliação da interação MT/CD por absorção molecular

Para a avaliação da interação entre a molécula de MT e a molécula hospedeira, foram observados os efeitos da CD no espectro de absorção UV/Vis da MT. Para isso, foram preparadas soluções aquosas contendo 10% de etanol de MT e CD nas proporções de 1:0, 1:50 e 1:100 e obtidos os espectros de absorção na faixa de 200 a 300nm.

#### 4.3 Isotermas de solubilidade

A avaliação da solubilidade do complexo de inclusão formado foi realizada pelo método descrito por Higuchi e Connors (1965) que tem como fundamento a variação da solubilidade do soluto (MT), com o aumento da

concentração da molécula hospedeira (no caso a CD). Este método é bastante utilizado e seu tratamento matemático permite o cálculo da constante de associação ( $K_a$ ) do complexo (FRÖMMING; SZEJTLI, 1994). O ensaio constituiu na adição de quantidades crescentes de  $\beta$ -CD (0; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5 e 6 mM) a um excesso de MT em solução aquosa (2 mM). Após 24 horas de agitação o material foi centrifugado. Com o auxílio de uma seringa, coletou-se o sobrenadante que foi passado em filtros MillexGP de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore), diluiu-se as amostras na ordem de 15 vezes em etanol 10% e fez-se a quantificação de MT em solução, por leituras no espectrofotômetro UV-Vis ( $\lambda = 249 \text{ nm}$ ). De acordo com o complexo de inclusão formado, a solubilidade pode apresentar diversos tipos de isotermas, uma vez que pode haver um aumento ou diminuição na solubilidade. Uma correlação entre a solubilidade do composto a incorporar e a concentração de CD está ilustrada na Figura 4.

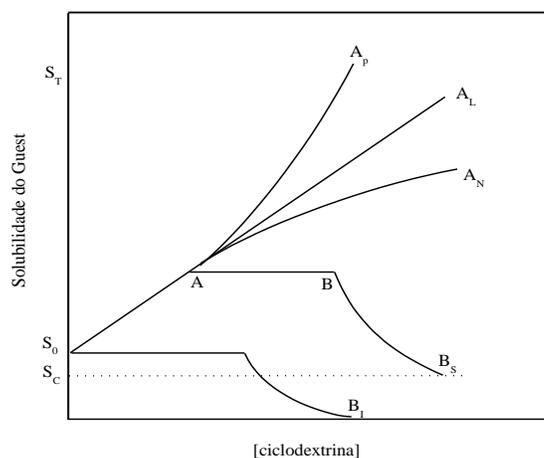


Figura 4 Isotermas de solubilidade.  $S_t$  = [soluto] dissolvido (livre + complexo);  $S_0$  = solubilidade do soluto na ausência de CD;  $S_c$  = solubilidade limite do complexo pouco solúvel; Isotermas  $A_p$ ,  $A_L$ , e  $A_N$  = complexos muito solúveis (limite de solubilidade determinado pela solubilidade da CD); Isoterma  $B_s$  = complexo de solubilidade limitada é formado; Isoterma  $B_i$  = complexo insolúvel é formado

De acordo com os mesmos autores e também Brewster e Loftsson (2007), os valores da constante de associação ( $Ka$ ) para formação de complexos de estequiometria 1:1 podem ser calculados pela razão entre inclinação e intercepto da porção inicial linear do diagrama (Equação 2), como segue:

$$Ka = \frac{\textit{inclinação}}{S_0(1 - \textit{inclinação})} \quad (2)$$

Onde  $S_0$  corresponde à solubilidade intrínseca do hóspede.

Caso os complexos de inclusão apresentem um diagrama com um perfil  $B_s$ , a estequiometria do complexo pode ser estimada a partir da região de platô, pela resolução da Equação 3:

$$\text{Razão molar} = \frac{S_T - S_A}{CD_{(B-A)}} \quad (3)$$

Onde,  $S_T$  corresponde ao substrato total adicionado ao sistema,  $S_A$  a quantidade de substrato em solução no ponto A e  $CD_{(B-A)}$  a quantidade de CD correspondente a região do platô (SZEJTLI, 1988).

#### 4.4 Calorimetria diferencial de varredura

O princípio fundamental da Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) é que, quando uma amostra sofre uma transformação física tais como as transições de fase o calor terá de fluir pela amostra a fim de se manter a mesma temperatura da célula de referência. A quantidade de calor que deve fluir para a amostra depende se o processo é exotérmico ou endotérmico. Se o processo é endotérmico a amostra vai requerer mais calor para aumentar a sua temperatura

com a mesma taxa da célula de referência. Se o processo é exotérmico, como em processos de cristalização, menos calor é necessário para aumentar a temperatura da amostra. Dessa forma, ao observar a diferença de fluxo de calor entre a amostra e a referência, a calorimetria diferencial de varredura é capaz de medir a quantidade de calor absorvida ou liberada durante as transições (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2006).

Esse tipo de análise é amplamente empregado nos estudos de complexos de inclusão com CDs. Pelos termogramas obtidos pode-se avaliar se há a formação de complexos de inclusão na razão molar testada, monitorando-se mudanças nas temperaturas de fusão e na entalpia dos compostos antes e após a complexação (CARVALHO; PINTO, 2012; LOFTSSON; MASSON, 2001).

Esta técnica vem sendo empregada para avaliação de complexos de inclusão com CDs avaliando mudanças na temperatura de transição dos compostos após a complexação (CHAVES et al., 2010; PINTO et al., 2004; PINTO et al., 2005; VILLAVERDE et al., 2005; ZHANG et al., 2005).

#### **4.4.1 Avaliação da formação dos complexos de inclusão por calorimetria diferencial de varredura**

Os experimentos de calorimetria diferencial de varredura (DSC) foram realizados num calorímetro DSC Q20-TA instruments pertencente ao Departamento de Engenharia Ambiental/UNESP/Campus Experimental de Sorocaba. Amostras de 5 mg foram aquecidas a uma velocidade de  $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , numa faixa de 30-300°C sob atmosfera de  $\text{N}_2$ . Foram avaliadas as amostras de MT, CD, mistura física de MT e CD e os complexos de inclusão MT/CD.

#### 4.5 Microscopia eletrônica de varredura

Por fornecer um número de informações bastante detalhadas das características microestruturais dos materiais analisados, a microscopia eletrônica de varredura (MEV) tornou-se uma técnica imprescindível em estudos nas mais diversas áreas, como eletrônica, ciência e engenharia de materiais, geologia, ciências da vida, entre outras.

Na MEV a amostra é irradiada por um fino feixe de elétrons. Como resultado da interação do feixe de elétrons com a superfície desta amostra, uma série de radiações são emitidas sendo que os sinais de maior interesse para a formação da imagem são os elétrons secundários e os retroespalhados. De acordo com as variações existentes na superfície da amostra o feixe de elétrons primários que vai varrendo a amostra infere em modificações nos seus sinais que são responsáveis por gerar as imagens e fornecer dados de variação de composição (REIMER, 1998).

Nos estudos de complexos de inclusão com CDs a MEV, normalmente avalia a redução de cristalinidade das partículas obtidas por diferentes métodos de síntese para a formação dos complexos de inclusão. Alterações drásticas no formato das partículas, assim como em seu aspecto e tamanho são fortes indicadores quanto a existência de novas fases sólidas (Lyra *et al.*, 2010). No entanto, mesmo com mudanças claras no estado de cristalização dos reagentes precursores e produto obtido, este método não é capaz, por si só, de confirmar a formação do complexo de inclusão (SINGH *et al.*, 2010).

Estudo realizado com a nitrofurazona encapsulada com CD aponta alterações da estrutura cristalina decorrente à interação entre a CD e a molécula incluída (MELO *et al.*, 2007), o mesmo ocorreu para a inclusão da curcumina ocorrendo alterações morfológicas e mudanças nos modos de agregação das partículas (YADAV *et al.*, 2009). Uma série de outras estruturas usadas na

formação de complexos de inclusão com CDs também foram avaliadas por MEV, como o diclofenaco de zinco (II) (GUILHERME et al., 2010), o rifabutin (PRIYA et al., 2013), a sivistantina (JUN et al., 2007), a benzocaína (PINTO et al., 2005) e o praziquantel (RODRIGUES et al., 2011).

#### **4.5.1 Avaliação da formação dos complexos de inclusão por microscopia eletrônica de varredura**

As análises morfológicas dos complexos de inclusão foram realizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em um microscópio de varredura LEO EVO 40XVP pertencente ao Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Amostras de MT, CD e complexos de inclusão MT/CD foram montadas em *stubs* de alumínio, usando fita dupla face e cobertas com ouro coloidal em atmosfera de argônio sob vácuo por 180 s em evaporador SCD 050 da BALZERS para tornarem-se condutoras, possibilitando a análise.

#### **4.6 Ressonância magnética nuclear**

A espectroscopia de RMN é atualmente o método mais importante para a elucidação de estruturas orgânicas e é extensivamente empregado na maioria dos estudos envolvendo CDs e seus complexos de inclusão. A utilização das técnicas de RMN na investigação dos complexos com CDs possibilita compreender as forças que dirigem a complexação e o modo com o qual ocorrem estas associações não covalentes (SCHNEIDER et al., 1998).

A maioria das investigações por RMN normalmente começam com a análise do espectro de prótons da amostra de interesse, com a análise habitual dos deslocamentos químicos, as constantes de acoplamento e as intensidades

relativas dos sinais. No entanto há uma infinidade de métodos de RMN disponíveis para serem empregados em estudos, cabendo ao pesquisador selecionar experiências apropriadas para obter as informações mais importantes para a resolução de determinado problema (CLARIDGE, 2008).

Embora haja um grande número de sequência de pulsos os experimentos de RMN exploram basicamente quatro fenômenos: as interações através de ligações, as interações através do espaço, as trocas químicas e a difusão molecular (CLARIDGE, 2008). Dessa forma, informações importantes relacionadas à inclusão de uma determinada molécula na cavidade da CD podem ser obtidas a partir dos espectros de prótons, por variação dos deslocamentos químicos. Medidas de DOSY podem ser utilizadas para medir a constante de associação do complexo de inclusão e medidas de Efeito Nuclear Overhauser (NOE), como o ROESY, permitem identificar as interações que ocorrem entre hóspede e hospedeiro descrevendo assim a conformação espacial da molécula inclusa na CD (LIMA, 2010).

#### **4.6.1 Aquisição dos espectros de $^1\text{H}$ RMN**

As amostras de MT, CDs e complexos de inclusão (4,6 mM) foram preparadas em  $\text{D}_2\text{O}$  e agitadas em vórtex. Alíquotas de  $500\mu\text{L}$  das amostras foram levadas ao espectrômetro de ressonância, Bruker Avance III – 400 com sonda de detecção inversa BBI, pertencente ao Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

Os experimentos foram conduzidos a  $25^\circ\text{C}$  usando como referência o pico da água residual (4,7 ppm). Os espectros de próton foram obtidos com 16 varreduras, intervalo entre varreduras de 2s com pré-saturação do sinal da água, tempo de aquisição de 7,3s (64k pontos), e janela spectral de 4485,65 Hz.

A análise dos dados foi realizada utilizando-se o software ACD/NMR Processor Academic Edition cujos espectros monodimensionais permitiram a atribuição dos hidrogênios pertencentes à CD e a MT.

#### 4.6.2 Espectroscopia de RMN ordenada por difusão (DOSY)

A difusão pode ser definida como o movimento de um determinado soluto pelas moléculas de um fluido. Em fase líquida as leis que regem a difusão são normalmente mais complexas do que em fase gasosa devido às forças intermoleculares que são mais intensas neste caso (SOUZA; LAVERDE JUNIOR, 2002).

No estado líquido o movimento das moléculas, chamado de movimento Browniano, é aleatório devido à sua energia térmica. A difusão molecular pode ser determinada pela Equação de Stokes-Einstein (Equação 3).

$$D = \frac{k_b T}{6\eta\pi r} \quad (3)$$

Onde  $D$  é o coeficiente de difusão,  $K_b$  é a constante de Boltzman,  $T$  é a temperatura,  $\eta$  é a viscosidade do meio e  $r$  é o raio hidrodinâmico da molécula. O coeficiente de difusão fornece informações importantes sobre a organização molecular e a estrutura de fases (SOUZA; LAVERDE JUNIOR, 2002; HARMON et al., 2012).

As experiências de difusão utilizando o RMN são medições dos movimentos translacionais das moléculas onde compostos em uma mistura, com base em seus coeficientes de difusão, podem ser separados por diferenças no tamanho e forma da molécula, bem como as propriedades físicas do meio circundante, tais como a viscosidade, a temperatura, *etc.* Dentre as técnicas

utilizadas, a técnica também conhecida como “cromatografia de Spins”, o DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy), foi desenvolvida em 1992 por Morris e Johnson. Nela é possível discriminar qualquer componente de uma mistura que apresente núcleos ativos em RMN (SOUZA; LAVERDE JUNIOR, 2002; MORRIS; JOHNSON JUNIOR, 1993).

A formação dos complexos de inclusão com CDs pode ser observada pela redução do seu coeficiente de difusão. Quanto maior for a diferença entre a difusão em solução de hóspede com CD comparado com a difusão do hóspede livre (sem CD), maior será a fração complexada. Dessa forma, a população do hóspede envolvido no processo de complexação está diretamente associado aos coeficientes de difusão para as espécies observadas nas formas livre e complexada, de acordo com a Equação 4, permitindo a determinação também da constante de associação ( $Ka$ ) (RYMDÉN; CARLFORS; STILBS, 1983; CLARIDGE, 2008).

$$D_{observado} = f_{ligada} D_{ligado} + f_{livre} D_{livre} \quad (4)$$

Onde  $D_{observado}$  e  $D_{livre}$  são os coeficiente de difusão do complexo e ligante livre, respectivamente e a fração do ligante nos estados livre e complexado são representados por  $f_{livre}$  e  $f_{ligada}$ , respectivamente. Assim, a fração do ligante complexado ( $f_{ligada}$ ) e a constante de associação ( $Ka$ ) podem ser calculadas através das Equações 5 e 6 (RYMDÉN; CARLFORS; STILBS, 1983):

$$f_{ligada} = \frac{D_{observado} - D_{livre}}{D_{ligado} - D_{livre}} \quad (5)$$

$$Ka = \frac{f_{ligada}}{(1 - f_{ligada})([hospedeiro] - f_{ligada}[hospede])} \quad (6)$$

Assim, a Equação 5 nos dá a porcentagem aproximada de moléculas receptoras complexadas com às do ligante (CABEÇA, 2009).

#### 4.6.2.1 Medidas do coeficiente de difusão

As medidas de DOSY foram realizadas utilizando um big delta ( $\Delta$ ) de 100 ms, little delta ( $\delta$ ) de 1,2 ms (1200  $\mu$ s). Foram obtidos 16 pontos para a construção da curva, numa variação linear da força do gradiente entre 2 e 98%. Cada um dos pontos foi adquirido pela aquisição de 8 varreduras, com intervalos de 5s. O Tempo de aquisição foi de 3,98s (64k pontos), janela espectral de 8223,68 Hz e temperatura de 25 °C.

A seqüência de pulsos foi bipolar com filtro de corrente de anel (BPP-LED, bipolar pulse pair longitudinal eddy current). E o processamento foi feito no software TopSpin 3.0 Bruker.

#### 4.6.3 Efeito nuclear overhauser (NOE)

O NOE é produto das interações magnéticas entre spins através do espaço (acoplamentos dipolares). O NOE apresenta grande importância na elucidação de estruturas por sua capacidade de fornecer informações sobre a geometria da molécula em 3D. No entanto sua aplicação é limitada para moléculas com massa elevada (cerca de 1000-2000 daltons), pois o NOE observado torna-se muito pequeno. Em métodos de diferença de NOE homonuclear a relaxação cruzada depende do produto entre o tempo de correlação para reorientação molecular ( $\tau_c$ ) e a frequência de Larmor do núcleo ( $w_0$ ). Assim, a medição do NOE rotativo (ROEs) fornece uma solução alternativa, pois como mostra a relação NOE –ROE (Figura 5), a relaxação

cruzada é positiva para todos os valores do tempo de correlação rotacional (CLARIDGE, 2008).

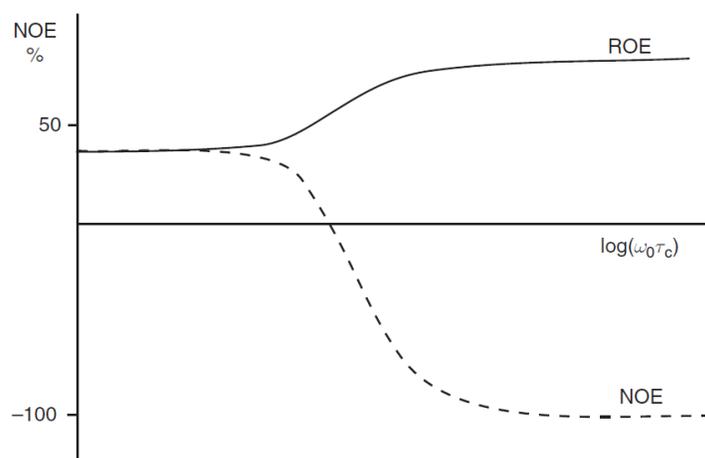


Figura 5 Dependência do NOE-ROE para um isolado homonuclear em relação a  $w_0$  e  $\tau_c$

Dessa forma, o experimento de ROE possibilita determinar as interações entre os hidrogênios da CD com os do hóspede incluso em sua cavidade fornecendo dados da estrutura do complexo de inclusão formado (BUDAL, 2003).

#### 4.6.3.1 Medidas de ROESY-2D

Nas medidas de ROESY-2D foi utilizado um tempo de mistura de 250 ms, e adquiridos 256 transientes para gerar a 2ª dimensão (F1). O sinal foi adquirido com 2048 pontos em F2, Janela espectral de 4411,46 Hz, intervalo de varreduras de 2s e número de varreduras igual a 64. A temperatura do experimento foi de 25°C.

## 4.7 Avaliação teórica da formação dos complexos de inclusão

Cálculos teóricos tem sido uma importante ferramenta utilizada na predição de uma variedade de parâmetros moleculares. O conhecimento das estruturas e respectivas energias envolvidas na formação dos complexos de inclusão entre moléculas convidadas e CDs (molécula hospedeira) fornecem importantes informações a respeito da estabilidade decorrente da interação convidado/hospedeiro.

Cálculos utilizando Mecânica Molecular são relativamente simples, pois permitem o estudo de sistemas contendo CDs em pouco tempo, além de poderem ser realizados em computadores pessoais, o que resulta em cálculos computacionais baratos e práticos (JURSIC; ZDRAVKOVSKI; FRENCH, 1996; PINTO et al., 2004; RODRIGUES et al., 2011).

Dessa forma, cálculos de mecânica molecular e dinâmica molecular, realizados pelo professor Carlos Jaime, da Universidade Autônoma de Barcelona, foram utilizados para otimização das estruturas dos complexos de inclusão MT/CD e para a determinação de suas energias, de forma a avaliar termodinamicamente sua viabilidade de formação e tipo de incorporação mais provável. Estudos para diferentes formas de incorporação nas estequiometrias 1:1 e 1:2 (MT/CD) incluindo modelos no vácuo e em simulação de solvente foram comparados para se encontrar o complexo mais estável.

### 4.7.1 Metodologia de cálculo

Todos os cálculos foram realizados com o programa Macromodel existente dentro do pacote Maestro. Tanto os cálculos de Mecânica Molecular como as simulações de Dinâmica Molecular foram realizados com os campos de forças MM3\* e AMBER\*.

#### **4.7.1.1 Cálculos de mecânica molecular**

Os cálculos no vácuo foram realizados utilizando os parâmetros de constante dielétrica e de cargas atômicas fornecidos por cada campo de forças. As minimizações energéticas foram realizadas mediante o método de otimização de Polak-Ribiere Conjugated Gradient, com um critério de convergência de 0,05 kJ/mol. Os cálculos em água como solvente foram conduzidos com o método GB/SA (STILL et al., 1990) usando as mesmas condições de convergência energética.

#### **4.7.1.2 Simulações de dinâmica molecular**

As estruturas iniciais foram obtidas nos cálculos de mecânica molecular. Todas as simulações foram realizadas usando o algoritmo de Verlet (dinâmica molecular padrão) (VERLET, 1967) a uma temperatura de 300 K, com "passo de tempo" de 1,5 fs, tempo de equilíbrio de 1ps, tempos de simulação de 1000 ps e com o algoritmo SHAKE aplicado às ligações de hidrogênio (RYCKAERT; CICCOTTI; BERENDSEN, 1977).

As simulações no vácuo e em solvente foram realizadas utilizando as mesmas condições que os cálculos de mecânica molecular.

#### **4.8 Ensaios de liberação da MT *in vitro***

Ensaios de liberação da MT foram feitos em triplicata utilizando compartimento de diálise com área de seção transversal de 1,54 cm<sup>2</sup>. Foi utilizada membrana com poro de exclusão molecular de 1000 Da (Sigma-Aldrich) para separação entre a amostra e o meio aquoso contendo 10% de etanol.

Alíquotas de 12 mL de solução  $8,33 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> de amostra (complexo de inclusão e MT livre) foram colocadas em compartimento doador que foi imerso em compartimento acceptor contendo 188 mL de solução etanólica 10%. A liberação do hormônio foi monitorada retirando-se alíquotas em tempos específicos e realizando-se leitura em espectrofotômetro em  $\lambda=249$  nm.

A liberação da MT foi observada através do gráfico de percentagem de MT liberada em função do tempo.

#### **4.9 Ensaios *in vivo***

Ensaios *in vivo* foram realizados para avaliar o efeito dos complexos de inclusão na reversão sexual das tilápias. Para avaliar o efeito dos diferentes tratamentos sobre a taxa de reversão sexual e sobrevivência foi feito uma análise de variância utilizando o pacote computacional R (R Development Core Team, 2012), considerando um nível de significância de 5%.

##### **4.9.1 Animais e instalações experimentais**

O experimento foi realizado no Biotério Central do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras (UFLA), durante o período de 06 de dezembro a 4 de fevereiro. Foram utilizadas 2640 larvas de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) doados pela piscicultura New Fish, sediada no município de Alterosa, Minas Gerais.

A instalação experimental, durante o período de reversão sexual, foi composta por 24 aquários de vidro com capacidade volumétrica de 50 L sendo o abastecimento de água feita de forma individual, em um sistema aberto, para evitar a interferência entre os tratamentos. Os aquários receberam aeração constante por pedra microporosa ligadas a um aerador de aquário. A temperatura

do ambiente foi controlada através do uso de aquecedores, mantendo assim, constante a temperatura da água dos aquários.

Para a manutenção da qualidade da água, os aquários foram sifonados duas vezes ao dia, às 12 e 18 h, sendo retirada, em média, 50 % do volume total de água. A temperatura da água,  $27,29 \pm 0,80^{\circ}\text{C}$ , foi verificada por meio de termômetro duas vezes ao dia, às 8 e 17 h. Foram quantificados, semanalmente, pela manhã, o pH e o teor de amônia através de kits comerciais colorimétricos. O pH e o teor de amônia da água foram de  $7,17 \pm 0,25$  e  $0,6 \pm 0,3 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente, de acordo com o que se recomenda para a espécie.

Após o período de tratamento hormonal, os animais foram transferidos para uma instalação composta por 24 aquários de 50 L e mantidos em sistema de recirculação de água com controle de temperatura, onde permaneceram até a realização da sexagem.

#### **4.9.2 Procedimento experimental**

O processo de inversão sexual teve início sete dias após a eclosão das larvas com duração de 28 dias correspondente ao período crítico de diferenciação sexual e maior sensibilidade do hormônio. Foram utilizadas 2640 larvas de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) distribuídas em um delineamento inteiramente casualizado com oito tratamentos e três repetições, sendo a unidade experimental um aquário com volume de 50 L contendo 110 larvas. Inicialmente, antes das pós-larvas serem transferidas para os aquários, foi retirada uma amostra de 100 larvas para a determinação do peso e do comprimento total médio, que foram, respectivamente, de  $0,056 \pm 0,015 \text{ g}$  e  $1,05 \pm 0,3 \text{ cm}$ .

Os grupos experimentais foram:

- a) MT  $60 \text{ mg kg}^{-1}$  de ração (controle positivo);

- b) MT 30 mg kg<sup>-1</sup> de ração;
- c) CD 60 mg kg<sup>-1</sup> de ração ;
- d) MT/CD 60 mg kg<sup>-1</sup> de ração Liofilizada;
- e) MT/CD 30 mg kg<sup>-1</sup> de ração Liofilizada;
- f) MT/CD 60 mg kg<sup>-1</sup> de ração Malaxagem;
- g) MT/CD 30 mg kg<sup>-1</sup> de ração Malaxagem;
- h) Ração sem adição de hormônio (controle negativo).

A alimentação dos animais foi feita com uma ração comercial farelada com teor de proteína bruta de 55%. O arraçoamento foi feito quatro vezes ao dia às 8h, 11h, 14h e 17h, em um sistema de alimentação *ad libitum*.

As dosagens com as formulações dos diferentes tratamentos foram diluídas em uma solução de álcool etílico 50% para posterior inclusão na ração. Estas soluções foram misturadas, separadamente em 160 g de ração para cada tratamento, sendo a ração homogeneizada para a incorporação adequada dos complexos. As rações permaneceram em temperatura ambiente por 24 horas para secagem. Após esse período, as rações foram armazenadas em potes plásticos escuros, ao abrigo de luz e sob refrigeração.

#### **4.9.3 Determinação da taxa de sobrevivência**

Após 28 dias de tratamento, os alevinos foram mantidos em jejum por 24 horas para a transferência e determinação da taxa de sobrevivência em cada tratamento. Para isso, os animais foram capturados, cuidadosamente, com auxílio de um puçá, contados e transferidos para os aquários em sistema de recirculação de água. Os animais permaneceram neste sistema por mais 30 dias, até atingirem peso necessário para realização da sexagem. A alimentação permaneceu em um regime *ad libitum* com 4 arraçoamentos às 8, 11, 14 e 17 h,

no entanto, alimentados com ração sem adição de hormônio. O manejo seguiu-se da mesma maneira realizada durante o período de reversão sexual.

#### **4.9.4 Determinação da taxa de reversão sexual**

Para verificar a efetividade da reversão sexual amostras de sete animais por unidade experimental (21 animais por tratamento) foram coletadas para sexagem manual. Essa técnica baseia-se no exame macroscópico da papila genital sendo que, os machos possuem apenas uma abertura, o poro urinário do ureter, através da qual tanto o esperma quanto a urina passam. Enquanto nas fêmeas, é possível visualizar duas aberturas, sendo que os ovos saem através de um oviduto separado e somente a urina passa pelo poro urinário. Esta análise foi feita por um técnico experiente em sexagem. Em seguida, foi feita a biometria dos animais sendo mensurado o peso e o comprimento total. As gônadas dos animais foram, também, retiradas para análise histológica.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Determinação da absorvidade molar da MT

Como a absorbância é uma propriedade intrínseca de cada substância, podendo fornecer informações a seu respeito, visto que diferentes materiais podem absorver radiações em comprimentos de onda distintos, foram obtidos os espectros de absorção na região do UV para a MT (Gráfico 1a). A partir do espectro de absorção da MT na região do UV pode-se observar que a molécula apresenta absorção máxima em solução etanólica 10% em um  $\lambda=249$  nm.

Realizando as leituras de absorbância das soluções em diferentes concentrações do hormônio foi possível a construção da curva analítica (Gráfico 1b) e a partir de sua inclinação foi obtido um  $\varepsilon=12.590$  L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Este valor de absorvidade molar relativamente alto mostra que a molécula de MT apresenta intensa absorção de radiação na frequência utilizada. Esse valor foi utilizado nos cálculos de concentração para os demais experimentos de espectroscopia na região do UV deste trabalho.

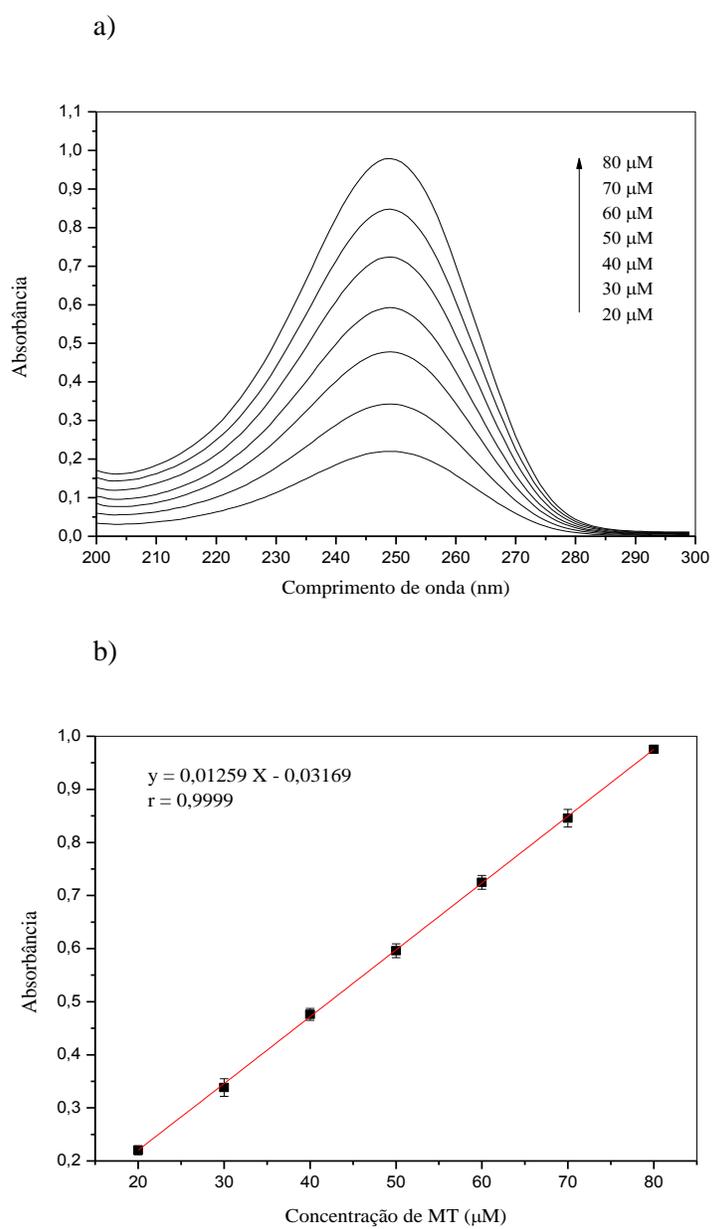


Gráfico 1 Espectros de absorção na região do UV para a MT em diferentes concentrações (a) e curva analítica para a MT (b)

## 5.2 Avaliação do comportamento ótico da MT em soluções com diferentes constantes dielétricas

As características de absorção, na região do UV, das moléculas orgânicas dependem das transições eletrônicas que podem ocorrer e os efeitos do ambiente em que estão os átomos sob transição. Dessa forma, amostras de MT em diferentes proporções de água:etanol (WOHLFARTH, 2008) foram preparadas com o intuito de verificar a influência da polaridade do meio na absorção da MT na região do UV.

Os espectros obtidos (Gráfico 2a) mostram uma diminuição da absorbância ( $\Delta\varepsilon=26.700 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) e o seu deslocamento para comprimentos de onda maiores ( $\Delta\lambda=9 \text{ nm}$ ) com o aumento da polaridade do meio.

Possivelmente o deslocamento batocrômico e o efeito hipocrômico observado nos espectros com o aumento da polaridade do meio são devido às transições  $\pi \rightarrow \pi^*$ . De acordo com a literatura, compostos que apresentam o grupo carbonila em conjugação com um grupo etileno tem como característica uma banda intensa na região compreendida de 215-250 nm, com  $\varepsilon_{m\acute{a}x}$  entre 10.000 e 20.000 e sofrem deslocamento batocrômico com o aumento da polaridade do solvente. Sendo que em sistemas cíclicos, como no caso da MT, normalmente ocorre a redução da intensidade dessa banda devido ao impedimento estérico que impede a coplanaridade (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRIL, 1994).

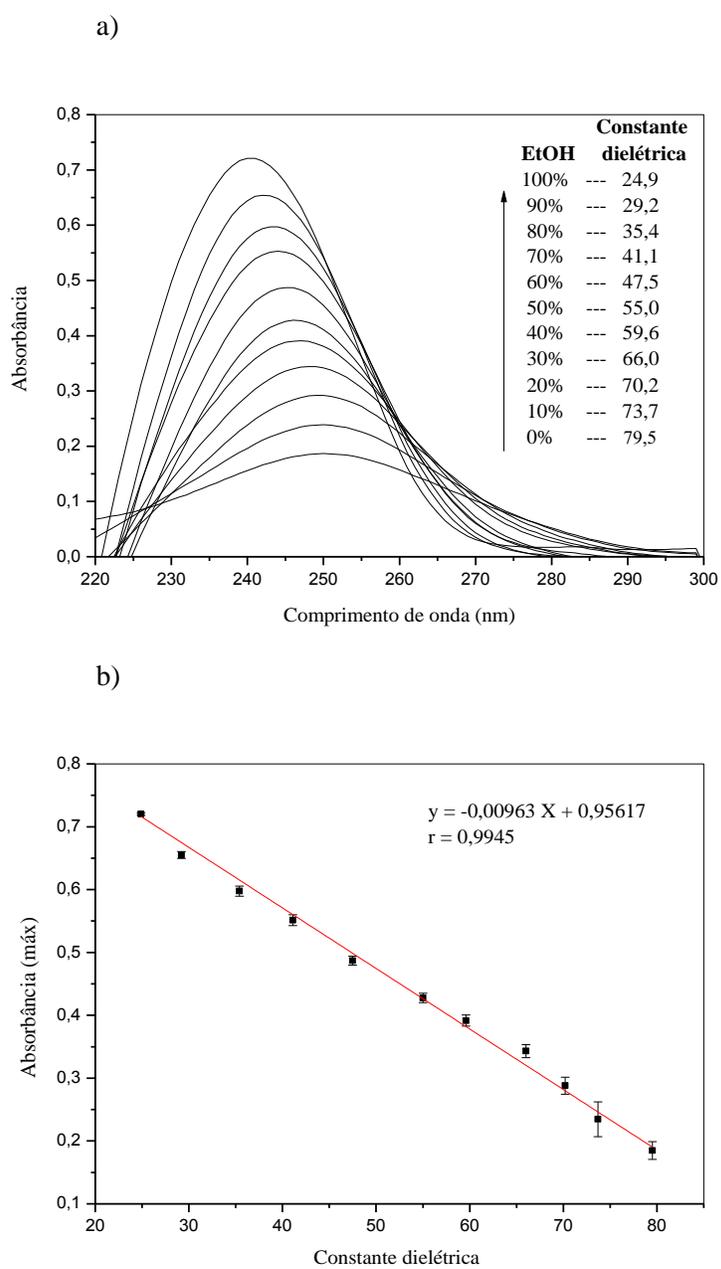


Gráfico 2 Espectros de absorvância da MT em meios com diferentes polaridades (a) e curva de variação da absorvância em função da constante dielétrica (b)

A modificação das propriedades espectroscópicas de uma molécula hóspede dentro da cavidade das CDs é, muitas vezes, interpretada em termos das interações dielétricas (LAMBERT et al., 2011). Dessa forma o efeito da presença de CD à MT pode ser comparado em função dos efeitos de polaridade. O Gráfico 3 apresenta os espectros de absorção da MT em soluções de CD nas proporções de 1:0, 1:50 e 1:100.

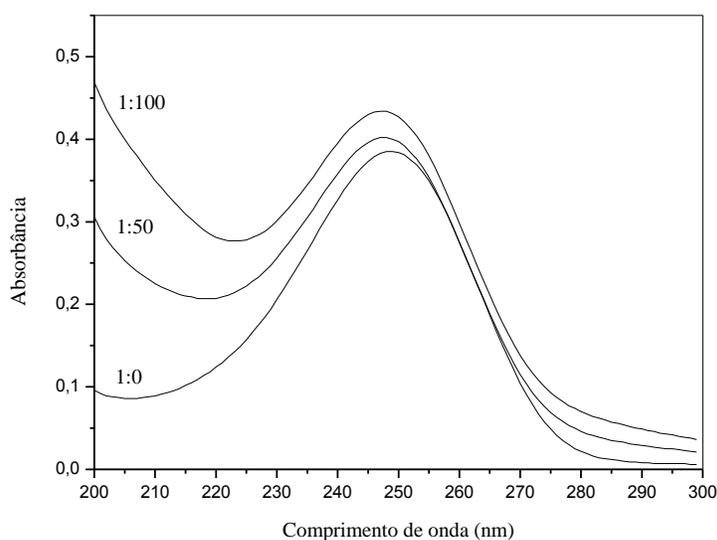


Gráfico 3 Espectros de absorção na região do UV da MT em solução etanólica 10% de CD nas proporções de 1:0, 1:50 e 1:100

Assim como ocorre com a adição de etanol à água, a adição de CDs em solução de MT causa um deslocamento do  $\lambda_{m\acute{a}x}$  para a região do azul com o consequente aumento de intensidade da absorbância, evidenciando assim a mudança do ambiente de solvatação da MT para um ambiente mais hidrofóbico. Os valores de  $\lambda_{m\acute{a}x}$  encontrados nestes espectros (249, 248 e 247nm para as soluções de MT/CD nas proporções de 1:0, 1:50 e 1:100, respectivamente)

mostram que em solução de MT/CD na proporção de 1:50 o ambiente de solvatação da MT é semelhante àquele cuja constante dielétrica é de 66,0 e na proporção de 1:100 a uma constante dielétrica de 59,6. Vários autores têm tentado obter uma melhor estimativa experimental para as constantes dielétricas efetivas dentro das CDs, no entanto a variação nos valores encontrados são grandes. Isso possivelmente se deve ao fato de poder haver moléculas de solvente no interior da cavidade da CD juntamente ao hóspede dificultando a separação dos efeitos de solvatação convidado/solvente e convidado/CD (LAMBERT et al., 2011).

### **5.3 Isoterma de solubilidade para o Complexo MT/CD**

No Gráfico 4 é possível observar que houve um aumento na concentração da MT em solução 10% de etanol na ordem de 6 vezes quando associada à  $\beta$ -CD. No entanto, a análise deste experimento evidencia uma isoterma do tipo  $B_s$ , com uma região de platô configurando a formação de complexo com solubilidade limitada e posteriormente precipitação com o aumento da concentração de CD.

Como ocorre a formação de complexo com solubilidade limitada, a estequiometria pode ser estimada. Resolvendo a Equação 3 o valor encontrado para a proporção MT/CD é de 1,1:1,9. Assim, este resultado é uma evidência de que a formação do complexo entre a MT e a  $\beta$ -CD provavelmente ocorre na proporção de 1:2, respectivamente.

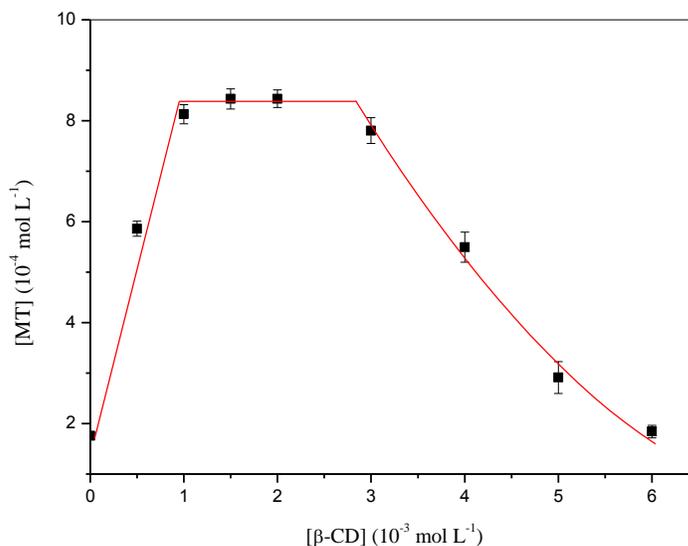


Gráfico 4 Isoterma de solubilidade para a MT em  $\beta$ -CD,  $T = 26 \pm 1^\circ\text{C}$

De acordo com os modelos de solubilidade propostos por Higuchi e Connors (1965), a porção linear que antecede a região de platô neste tipo de isoterma pode ser utilizada para a determinação de uma constante de associação aparente. No entanto a constante obtida dessa forma, mesmo que fosse um caso ideal, pode não apresentar os valores reais porque em solução saturada não se pode ter certeza de que a substância investigada é monomérica e a estequiometria é 1:1. Assim o valor da constante de estabilidade pode ser significativamente modificado pelas diferentes associações e grau de hidratação dos componentes em equilíbrio. Sabendo disso e também tendo indícios de que o complexo formado está na razão 1:2 torna-se mais confiável a sua determinação utilizando outros métodos (SZEJTLI, 1988).

De acordo com Szejtli (1988), a determinação de constantes de associação a partir de dados de solubilidade para complexos de inclusão com

razão molar 1:2 ou superiores requer muito cuidado, e as medidas devem ser tomadas em intervalos de concentração o mais amplo possível.

#### **5.4 Avaliação da formação dos complexos de inclusão por calorimetria diferencial de varredura**

Para a análise de DSC foram utilizadas amostras contendo  $\beta$ -CD, MT, a mistura física e os complexos MT/CD preparados por malaxagem e liofilização nas proporções de 1:1 e 1:2. Com a calorimetria diferencial de varredura obtivemos os termogramas mostrados no Gráfico 5, por meio dos quais é possível notar os picos endotérmicos que caracterizam cada substância isoladamente e também os complexos de inclusão.

Estudos realizados por Giordano, Novak e Moyano (2001), mostraram que o termograma da  $\beta$ -CD apresenta um pico em temperaturas próximas a 120 °C referente à perda de moléculas de água de inclusão para o ambiente. O termograma da  $\beta$ -CD está representado no Gráfico 5b em que é possível observar esse pico em torno de 110 °C.

O termograma para a MT (Gráfico 5a) é bastante característico dessa estrutura com um pico agudo em 166°C correspondente ao seu ponto de fusão. Nas formulações preparadas para formação dos complexos de inclusão é bastante claro o encapsulamento da MT preparada pelo processo de liofilização (Gráficos 5f, g). A inclusão da MT na cavidade da CD expulsa as moléculas de água existentes em seu interior, dessa forma esse pico é suprimido do termograma, pois no complexo de inclusão a quantidade de água presente na cavidade na CD se torna muito reduzida. Quando presente, o pico referente à expulsão da água de inclusão se encontra em temperaturas mais baixas, pois a presença de um composto mais hidrofóbico no interior da cavidade da CD faz com que as moléculas de água remanescentes fiquem mais fracamente

associadas à cavidade. Para o pico referente ao ponto de fusão da MT também ocorre uma redução de sua intensidade, sua complexação com a CD possivelmente altera seu ponto de fusão para temperaturas superiores às mostradas neste termograma.

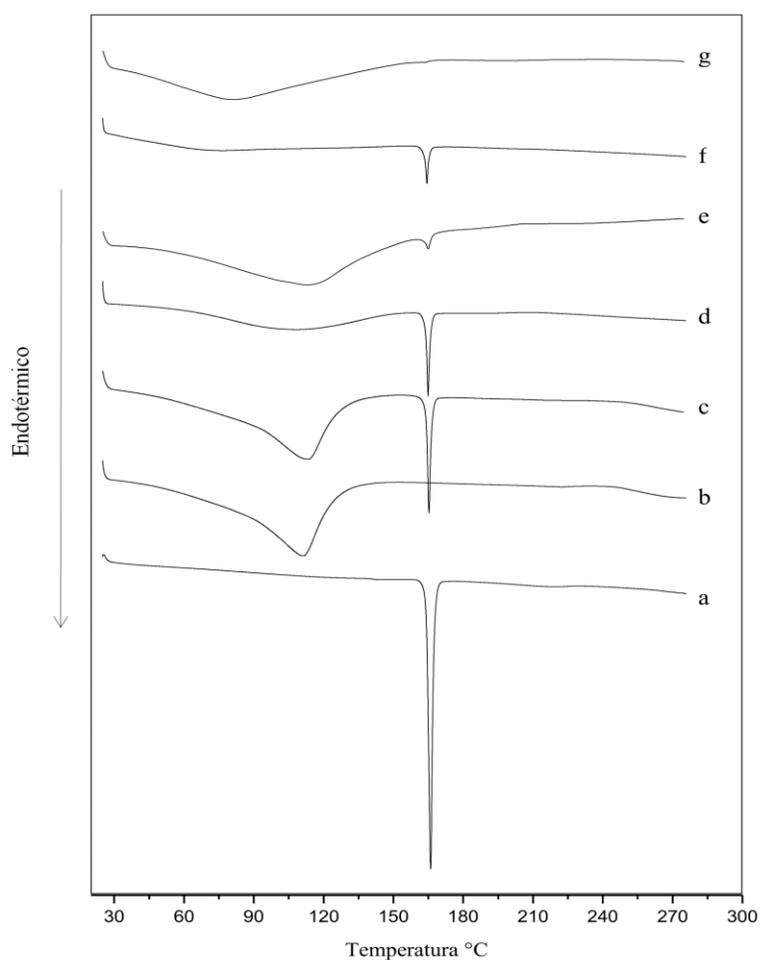


Gráfico 5 Termogramas de DSC das amostras de MT (a),  $\beta$ -CD (b), mistura física MT+CD (c), complexos de inclusão preparados por malaxagem na razão molar 1:1 (d) e 1:2 (e) e por liofilização nas razões de 1:1 (f) e 1:2 (g)

A presença do pico em 166 °C (Gráfico 5f) de intensidade relativa reduzida é explicada pelo fato de que a formação do complexo entre a MT e a  $\beta$ -CD, ao que tudo indica, ocorre na razão molar de 1:2, como evidenciado em experimentos de solubilidade. Como a formulação foi preparada a partir de quantidades equimolares de hóspede e hospedeiros há, portanto, uma parte de MT não complexada no sólido obtido. Assim na preparação do complexo por liofilização em razão molar 1:2 (Gráfico 5g) este pico é completamente suprimido.

Ao comparar os termogramas dos produtos obtidos por malaxagem (Gráficos 5d, e) e mistura física (Gráfico 5c) também é evidente a supressão parcial no pico endotérmico referente à perda de moléculas de solvatação da cavidade da CD e a redução de intensidade do pico de fusão da MT para o composto preparado por malaxagem. No entanto, estas supressões não são tão expressivas quanto às do complexo de inclusão preparado por liofilização. Neste caso, ocorre também a formação de complexos de inclusão, porém em menor proporção. A quantidade restrita de solvente, dificultando a difusão da MT para a cavidade da  $\beta$ -CD, e o menor tempo gasto neste tipo de preparo pode ter influenciado para que menos associações entre as duas estruturas ocorressem.

### **5.5 Avaliação da formação dos complexos de inclusão por microscopia eletrônica de varredura**

As micrografias da  $\beta$ -CD (Figura 6) mostram seus cristais típicos, na forma de paralelogramos monoclinicos, com dimensões de algumas dezenas de micra, superfície e contornos definidos. Enquanto que a Figura 7 apresenta as micrografias da MT com seus cristais longilíneos.

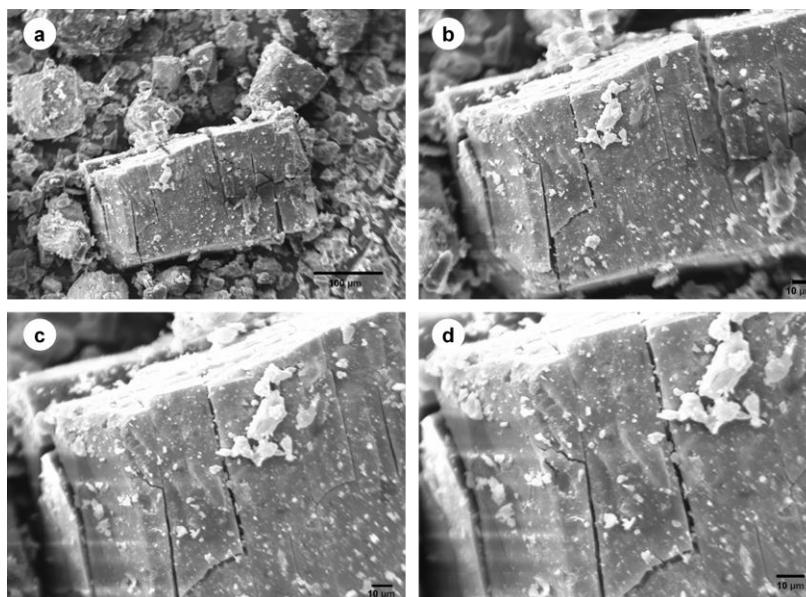


Figura 6 Micrografia eletrônica de varredura da  $\beta$ -CD com aumento de 500 (a), 1000 (b), 1500 (c) e 2000 (d) X

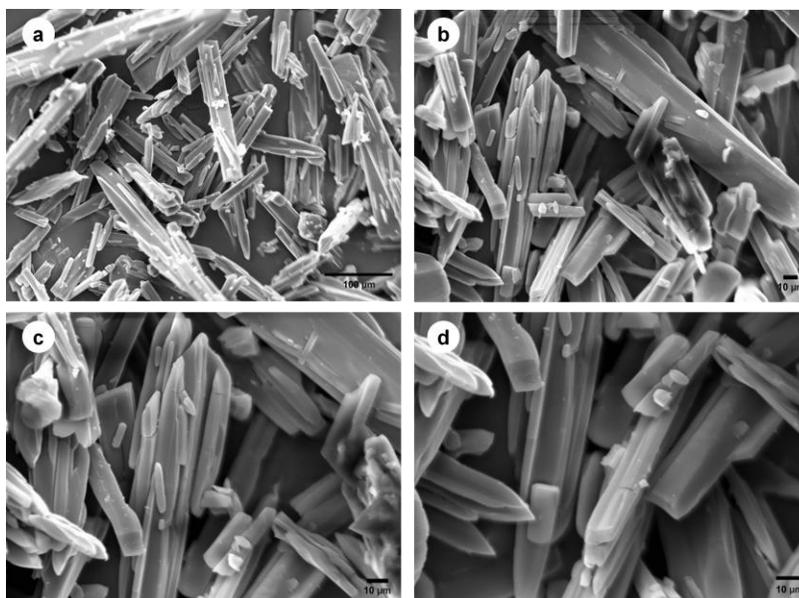


Figura 7 Micrografia eletrônica de varredura da MT com aumento de 500 (a), 1000 (b), 1500 (c) e 2000 (d) X

Assim, na análise das micrografias relativas aos complexos de inclusão (Figuras 8 e 9), ficam claras as mudanças morfológicas do material frente aos seus precursores. A morfologia apresentada pelo complexo MT/CD produzido por meio da malaxagem apresenta uma intensa redução da cristalinidade do material com a formação de agregados amorfos, característico da modificação química superficial, de dimensões menores àquelas encontradas nos cristais das substâncias puras, como podem ser vistos na Figura 8.

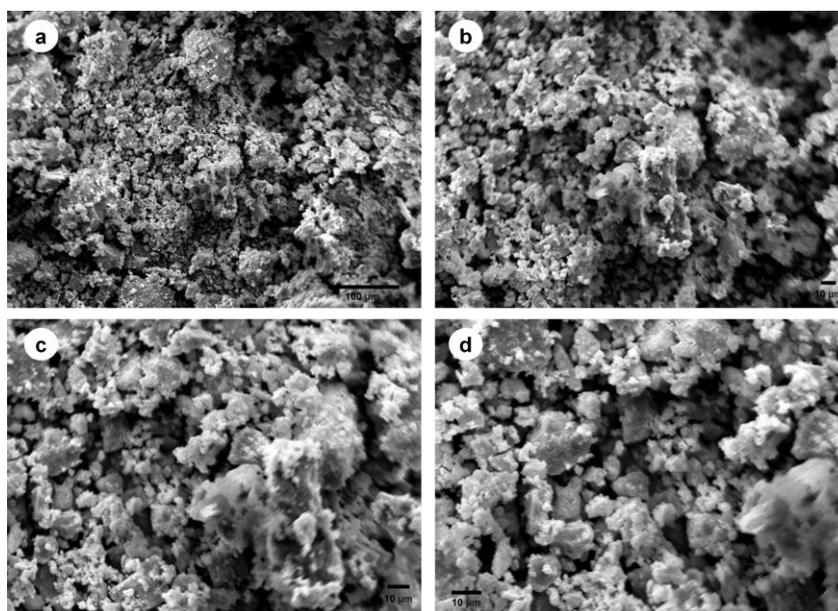


Figura 8 Micrografia eletrônica de varredura da MT/CD obtida por malaxagem, com aumento de 500 (a), 1000 (b), 1500 (c) e 2000 (d) X

Para o complexo de inclusão obtido através de liofilização (Figura 9) observa-se uma mudança drástica no formato e aspecto das partículas na amostra. A redução da cristalinidade para partículas menores, mais laminares e formatos pontiagudos é indicativa da presença de uma nova fase sólida. A grande diferença observada entre os complexos obtidos por malaxagem e

liofilização pode ser atribuída à menor extensão de complexação, no caso da malaxagem, e principalmente, aos métodos de secagem utilizados. A secagem de forma mais lenta produz partículas mais regulares com certo padrão de organização, enquanto a secagem realizada em velocidades maiores produz partículas mais porosas e irregulares (SALÚSTIO et al., 2009).

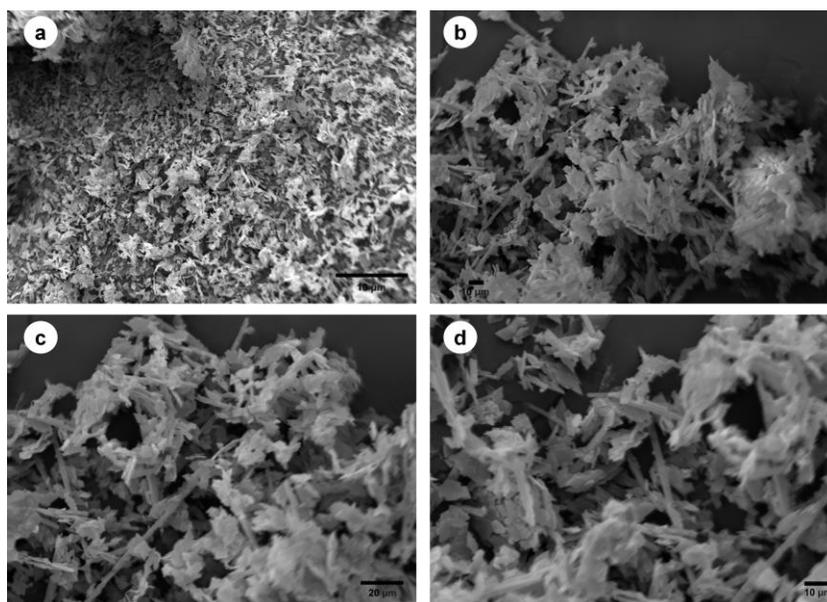


Figura 9 Micrografia eletrônica de varredura da MT/CD obtida por liofilização, com aumento de 500 (a), 1000 (b), 1500 (c) e 2000 (d) X

### 5.6 $^1\text{H}$ RMN para avaliação da interação entre MT e $\beta\text{-CD}$

Para investigar a interação da MT com a  $\beta\text{-CD}$  e obter evidências concretas da complexação foram realizados experimentos de  $^1\text{H}$  RMN. A técnica de RMN é sem dúvidas, a mais eficiente nos estudos de complexação com CDs. Os espectros de  $^1\text{H}$  RMN da CD livre e da mistura de CD e MT (Gráfico 6) são mostrados a seguir com os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) calculados com

referência ao pico do solvente ( $D_2O$ ) em 4,7 ppm. A variação do deslocamento químico ( $\Delta\delta$ ) dos hidrogênios da  $\beta$ -CD é mostrada na Tabela 3.

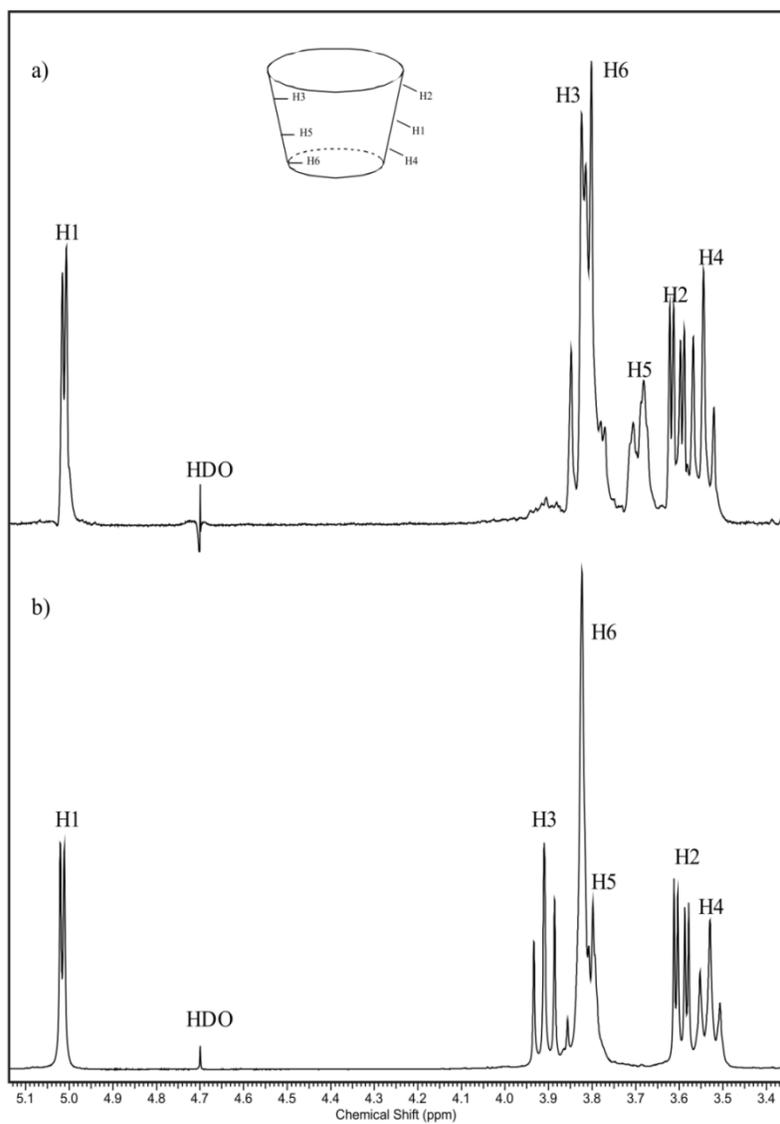


Gráfico 6 Espectros  $^1H$  RMN 400 MHz em  $D_2O$  e  $T = 25\text{ }^\circ C$  do complexo de inclusão MT/CD (a) e da  $\beta$ -CD (b)

Tabela 3 Dados de  $^1\text{H}$  RMN mostrando o efeito da MT nos deslocamentos ( $\Delta\delta$ ) químicos dos hidrogênios da  $\beta$ -CD em  $\text{D}_2\text{O}$  a  $25^\circ\text{C}$

Posição do hidrogênio	$\delta$ da $\beta$ -CD livre (ppm)	$\delta$ da $\beta$ -CD com MT (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
H1	5,02	5,02	0,00
H2	3,60	3,61	0,01
H3	3,91	3,82	-0,09
H4	3,55	3,57	0,02
H5	3,80	3,68	-0,12
H6	3,82	3,80	-0,02

De acordo com Greatbanks e Pickford (1987) dados sobre a estabilidade do complexo de inclusão e a orientação da molécula hóspede pode ser inferida pela análise da variação do deslocamento químico. Assim, se tomarmos por análise a variação do deslocamento químico dos hidrogênios H3 e H5 pode-se concluir que há a formação do complexo de inclusão entre a MT e a  $\beta$ -CD, sendo que a molécula de MT deve estar totalmente incluída na cavidade da CD. Segundo os autores acima mencionados, quando  $\Delta\delta \text{ H3} > \Delta\delta \text{ H5}$  ocorre a inclusão parcial do convidado dentro da cavidade e quando  $\Delta\delta \text{ H5} \geq \Delta\delta \text{ H3}$  ocorre a inclusão total.

Os dados apresentados na Tabela 3 mostram que os hidrogênios da cavidade da CD foram bastante influenciados pela complexação, enquanto que a variação de deslocamento químico dos hidrogênios externos é pouco expressiva. Assim sugere-se que quando em solução a maior parte da MT solúvel encontra-se complexada com a CD ou interage muito fracamente com a parte externa da CD, fato que tem fundamentação já que o exterior das CDs são mais hidrofílicos (DODZUIK, 2006; FIGUEIRAS et al., 2007).

### 5.7 Determinação do coeficiente de difusão por DOSY

Para obter informações a respeito da constante de associação entre a MT e a  $\beta$ -CD na formação dos complexos de inclusão e suas frações molares, foram realizadas medidas dos coeficientes de difusão em gradiente de campo magnético, usando a técnica de DOSY.

A partir dos mapas de contorno de difusão obtidos para a  $\beta$ -CD, a MT e o complexo MT/CD (Gráficos 7, 8 e 9, respectivamente) foi possível determinar os coeficientes de difusão das moléculas em solução (Tabela 4).

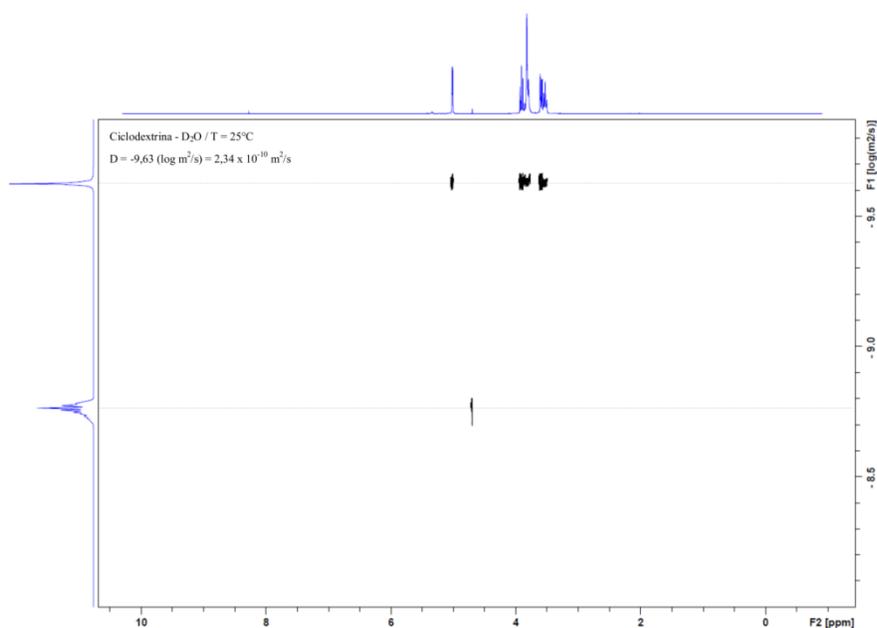


Gráfico 7 Mapa de contorno de difusão (DOSY, <sup>1</sup>H, 400 MHz, 25 °C) da  $\beta$ -CD

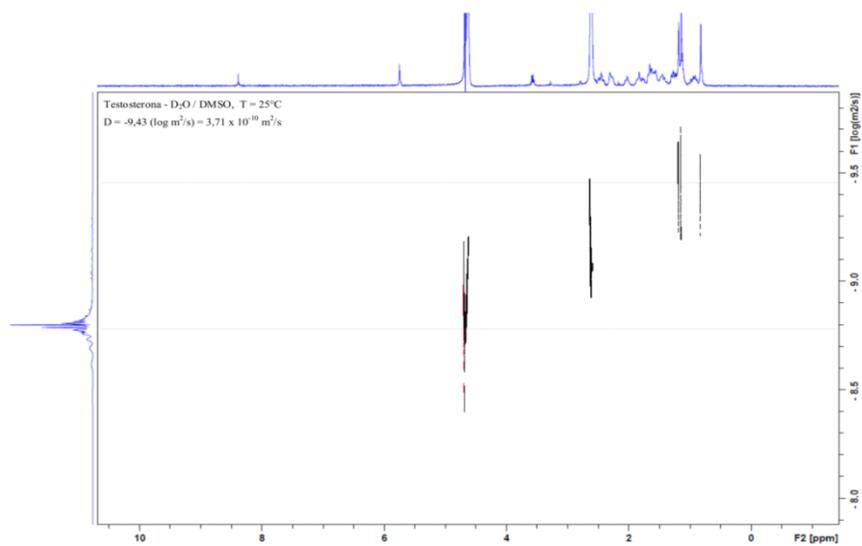


Gráfico 8 Mapa de contorno de difusão (DOSY, <sup>1</sup>H, 400 MHz, 25 °C) da MT

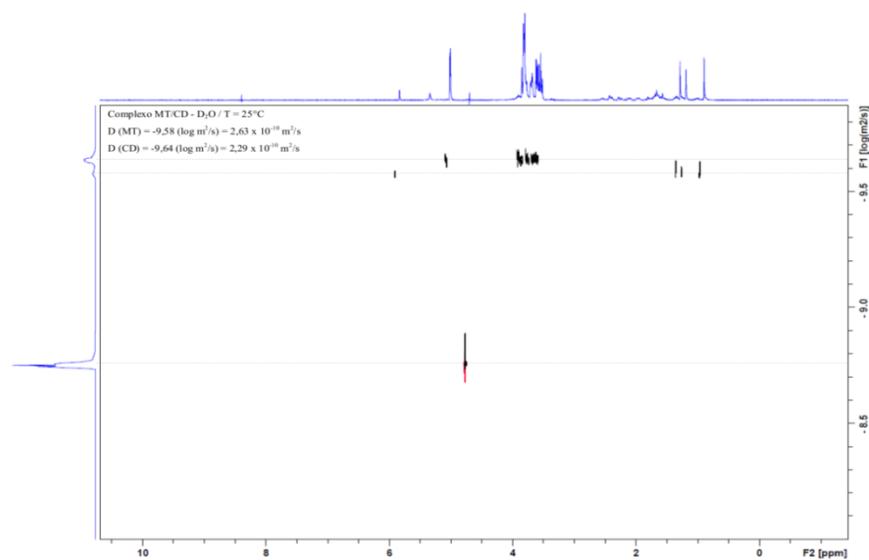


Gráfico 9 Mapa de contorno de difusão (DOSY, <sup>1</sup>H, 400 MHz, 25 °C) do complexo de inclusão MT/CD

Os valores de coeficiente de difusão obtidos indicam a ocorrência de interação entre o hormônio e a CD formando o complexo de inclusão. Devido à menor massa, raio hidrodinâmico e tamanho, a MT apresenta um maior coeficiente de difusão do que a CD. Quando juntos em solução a medida do coeficiente de difusão corresponde à média dos compostos em equilíbrio de complexação, assim é característico que ocorra a diminuição nos valores deste coeficiente com o aumento do raio hidrodinâmico das moléculas provocando a redução de mobilidade no meio, como observado nos mapas de contorno (WIMMER et al., 2002; DE JESUS et al., 2010).

Tabela 4 Coeficientes de difusão de MT livre e complexado com  $\beta$ -CD obtidos por DOSY

Composto	Coeficiente de difusão ( $10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ )	
	Livre	Ligado
MT	3,71	2,63
$\beta$ -CD	2,34	2,29

Com estes dados em mão foi possível determinar a constante de associação ( $Ka$ ) e a fração de MT ligada a CD (Equação 2). Foi obtido o valor de  $Ka = 2.846 \text{ L mol}^{-1}$ , que demonstra uma associação entre a MT e a CD bastante favorável, ficando a MT fortemente associada à cavidade da CD. Se comparado com valores da literatura, este valor para a constante de associação se assemelha àquele encontrado por Cameron e Fielding (2002) para o complexo de inclusão formado entre  $\beta$ -CD e o amino esteroide brometo de rocurônio ( $Ka = 2.600 \text{ L mol}^{-1}$ ). O valor para a fração complexada de 76% também foi bastante expressivo, mostrando a grande afinidade da MT com a cavidade da  $\beta$ -CD.

Como mostrado anteriormente nas curvas calorimétricas (Gráfico 5), no complexo em estado sólido o pico de fusão da MT é completamente suprimido fornecendo indícios de que praticamente todo o hormônio se encontra na forma

encapsulada. Em estado líquido a formação desse tipo de complexo é regida por um equilíbrio dinâmico, onde a molécula hóspede está constantemente se associando e desassociando da cavidade da CD. Como as medidas de DOSY são um somatório dos coeficientes de difusão das moléculas, tanto livre quanto complexadas, este valor de 76% de complexação é bastante interessante do ponto de vista biológico, pois apesar da alta constante de associação há moléculas livres de MT biodisponíveis.

### 5.8 Experimentos bidimensionais ROESY 2D

Como já verificado nos experimentos de  $^1\text{H}$  RMN anteriores, os prótons da cavidade da CD sofrem mudanças no deslocamento químico devido à complexação com a MT (Figura 10) e a molécula convidada deve estar totalmente incluída na cavidade da CD. Resta agora definirmos a geometria do complexo formado definindo qual a melhor conformação por ele adotada.

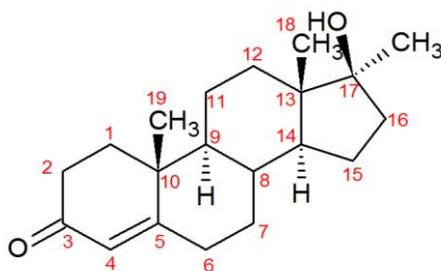


Figura 10 Estrutura química da 17 $\alpha$ -metiltestosterona (MT) mostrando as posições dos carbonos

Os experimentos de ROESY correlacionam hidrogênios próximos uns dos outros através do espaço, tipicamente a 4,5 angstroms ou menos (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRIL, 1994). Dessa forma, foi utilizado como experimento conclusivo da formação dos complexos de inclusão entre a MT e a

$\beta$ -CD, para estabelecer sua estrutura e como ocorre esta interação. O espectro de ROESY 2D é mostrado no Gráfico 10 e suas expansões nos Gráficos 11 e 12.

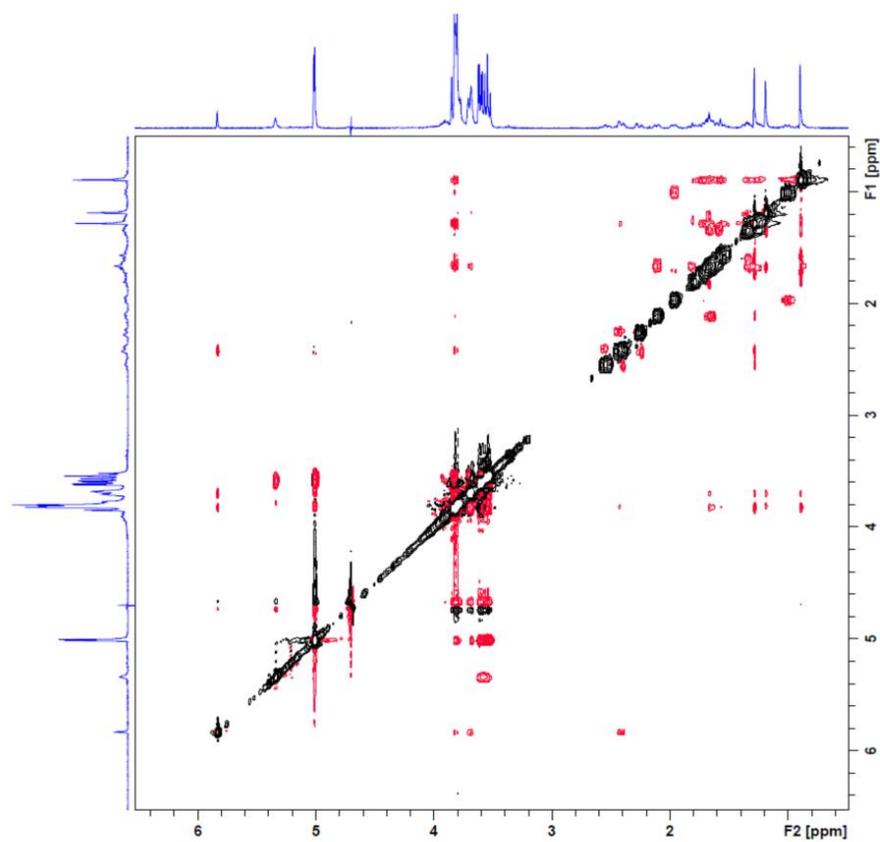


Gráfico 10 Espectro de ROESY 2D do complexo MT/CD

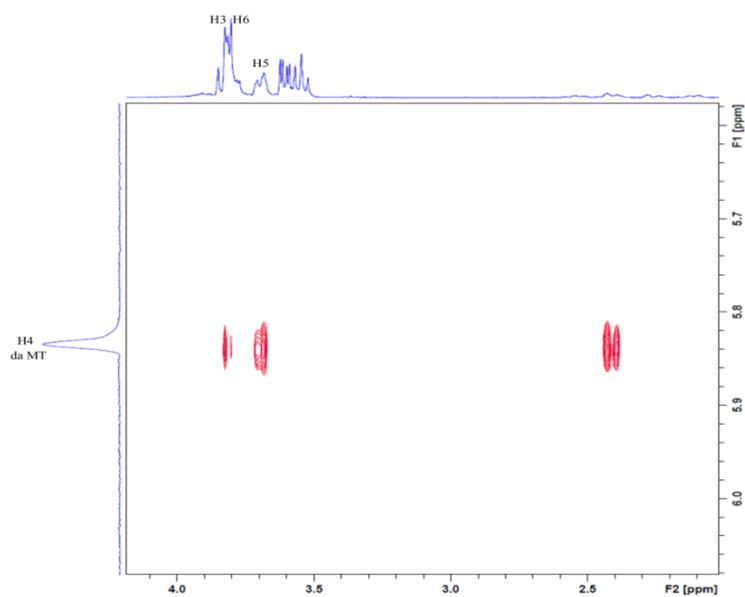


Gráfico 11 Expansão do espectro de ROESY 2D do complexo MT/CD. Região correspondente ao H do C4 da MT

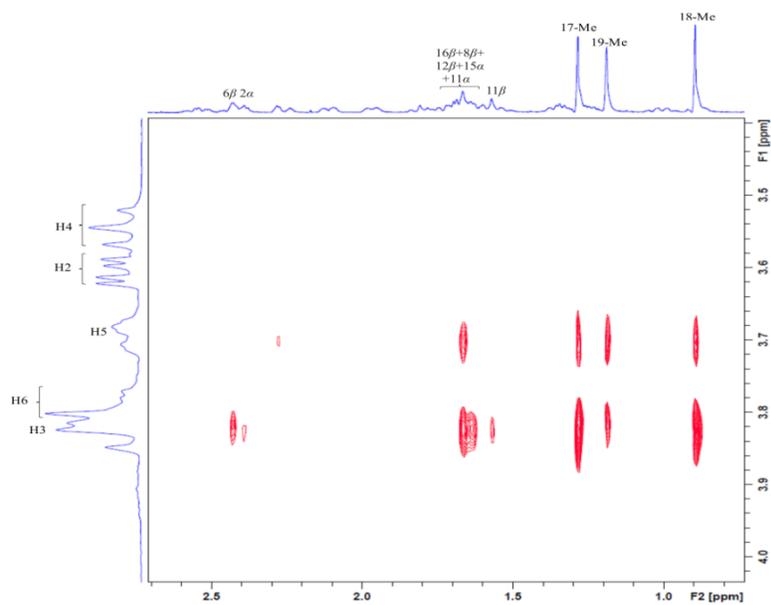


Gráfico 12 Expansão do espectro de ROESY 2D do complexo MT/CD

Os dados do espectro de ROESY (Gráfico 12) mostram que os grupos metílicos da MT estão próximos dos prótons H3 e H5 da  $\beta$ -CD. De acordo com a intensidade dos sinais mostrados no espectro, estes grupos apresentam interação com ambos os prótons mencionados, no entanto os grupos 18-Me e 17-Me estão mais próximos do H3 e o grupo 19-Me mais próximo do H5.

Os prótons dos carbonos cíclicos da MT que também apresentam interação com o H3 da CD são o ligado ao C4, o 2, 11 e 15 $\alpha$ , e o 6, 8, 11 e 12 $\beta$ . Como mostrado na expansão do espectro de ROESY (Gráfico 11), o H ligado ao C4 apresenta além de uma interação mais tímida com o H3, uma interação um pouco mais fraca com o H6 e forte com o H5. A partir das observações acima é plausível que sejam necessárias duas moléculas de  $\beta$ -CD para se complexar com uma molécula de MT que deve de complexar pela cabeça da CD, de forma a explicar o fato de todos os grupos metílicos apresentarem forte interação com os prótons internos da CD. A conformação do complexo que melhor se adapta aos resultados obtidos é mostrada esquematicamente na Figura 11, com a MT inclusa na cavidade de duas CDs.

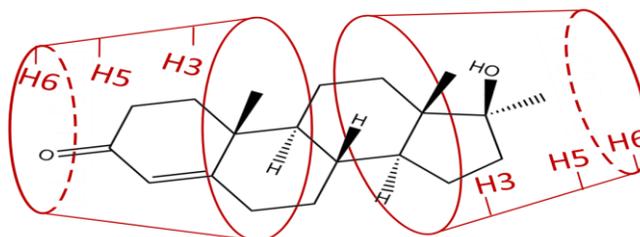


Figura 11 Provável geometria do complexo de inclusão formado entre a MT e a  $\beta$ -CD

### 5.9 Estudo teórico da complexação da MT com a $\beta$ -CD

A  $17\alpha$ -metiltestosterona (MT) foi construída diretamente a partir de modelos existentes no pacote de programas Maestro (MAESTRO, 2012). Iniciou-se usando uma estrutura do ciclopentanoperhidro-fenantreno, onde foram acrescentados os grupos relevantes para finalmente chegar a estrutura da MT (Figura 12). A  $\beta$ -CD não foi construída desde o início, mas foi retirada de trabalho anterior do grupo do professor Carlos Jaime, da Universidade Autónoma de Barcelona (JAIME et al., 1990).

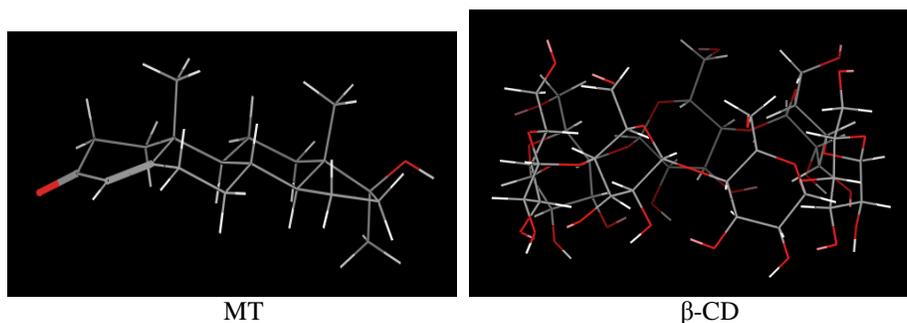


Figura 12 Estruturas da MT e da  $\beta$ -CD utilizadas nos cálculos, obtidas mediante o campo de forças MM3\*

Deste modo, dada a falta de simetria da MT, pôde-se considerar complexos bimodais entre a MT e a  $\beta$ -CD. Portanto, dois possíveis complexos de estequiometria 1:1, identificados como 1 e 2, foram construídos, em que a MT é incluída na cavidade da  $\beta$ -CD de forma diferenciada. No complexo 1, o anel A (que contém a carbonila) da MT encontra-se na cavidade mais voltado para a calda, próximo dos H5 e CH<sub>2</sub>OH da  $\beta$ -CD. No complexo denominado 2, o anel A se encontra na região que compreende à cabeça, próximo do H3 da  $\beta$ -CD.

A Tabela 5 mostra os valores de energia estérica obtidos nas minimizações energéticas de todos os compostos estudados (moléculas isoladas e complexadas) usando os campos de forças MM3\* (ALLINGER; YUH; LII,

1989) e AMBER\* (PEARLMAN et al., 1995), tanto no vácuo como com modelo de solvatação implícito para simular seu comportamento em água. Todos os cálculos foram realizados com o programa Macromodel (MACROMODEL, 2012) existente dentro do pacote Maestro (MAESTRO, 2012).

Tabela 5 Valores de energia estérica obtidos nas otimizações usando diferentes campos de forças

Produto	MM3* (kJ mol <sup>-1</sup> )	AMBER* (kJ mol <sup>-1</sup> )	MM3*+H2O (kJ mol <sup>-1</sup> )	AMBER*+H2O (kJ mol <sup>-1</sup> )
MT	229,65	46,22	216,02	26,11
β-CD	2001,95	331,37	1881,01	245,64
β-CD + MT	2231,60	377,59	2097,03	271,75
MT/CD-1	2178,39	326,11	2044,86	211,02
ΔE(complexo 1)	-53,21	-51,48	-52,17	-60,73
MT/CD-2	2168,27	315,70	2036,67	209,66
ΔE(complexo 2)	-63,33	-61,89	-60,36	-62,09

Como pode ser observado, apesar dos valores absolutos obtidos com MM3\* ou AMBER\* serem substancialmente distintos (há uma ordem de magnitude de diferença), os valores da complexação são similares em todos os casos. Assim, em todos os campos de força estudados, o complexo denominado 2, com o anel A da MT na cabeça da β-CD, é mais estável que o complexo 1 por uma diferença de 1,3-10,4 kJ mol<sup>-1</sup>. O campo de forças MM3\* dá uma variação energética menor ao considerar a solvatação (de 10,1 a 8,2 kJ mol<sup>-1</sup>), enquanto que o AMBER\* mostra maior variação (de 10,4 a 1,3 kJ mol<sup>-1</sup>).

Na Figura 13 são mostradas as estruturas obtidas mediante o campo de forças MM3\*. Não são mostradas as do AMBER\* por não haver diferenças significativamente grandes entre as geometrias obtidas por nenhum dos métodos.

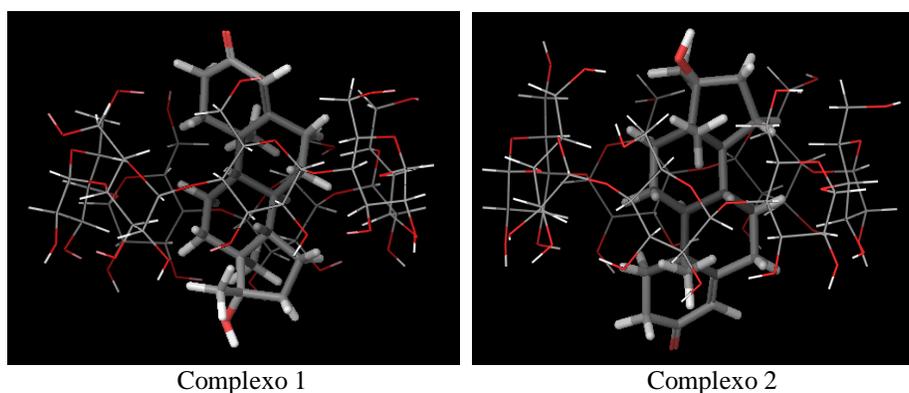


Figura 13 Estruturas obtidas utilizando o campo de forças MM3\*

As estruturas obtidas por mecânica molecular não permitem justificar os NOEs observados, quando comparados aos resultados de ROESY 2D obtidos para o complexo. Nos espectros de NOE, tanto os grupos metílicos do anel D (numerados como 17 e 18) quanto o grupo metílico do anel A (numerado como 19) do esqueleto esteroidal apresentam efeito NOE com os prótons H3 e H5 da  $\beta$ -CD. O H3 está na cabeça, enquanto que o H5 está na calda da cavidade da  $\beta$ -CD, tornando impossível que o anel esteja situado em ambas as regiões ao mesmo tempo, a não ser que exista um movimento, ascendente e descendente, muito rápido da estrutura da MT no interior da  $\beta$ -CD. Caso exista, este movimento poderá ser observado mediante simulações de dinâmica molecular.

Assim, procedeu-se com a realização de simulações de dinâmica molecular no mesmo programa Macromodel, mesmo campo de força e no vácuo. As simulações foram iniciadas com as estruturas dos complexos previamente obtidos nos cálculos de mecânica molecular e foram simulados o comportamento durante 1000 ps em cada um dos complexos.

O complexo 1 mantém o anel A da MT no interior da cavidade da  $\beta$ -CD durante toda a simulação, mas deixando o anel D (que contém a hidroxila) no exterior de sua cavidade, portanto a sua estrutura média não pode explicar os NOEs experimentalmente obtidos. A energia média obtida para este complexo é

de  $2936,76 \text{ kJ mol}^{-1}$ . A Figura 14 mostra a estrutura obtida após os 1000 ps de simulação.

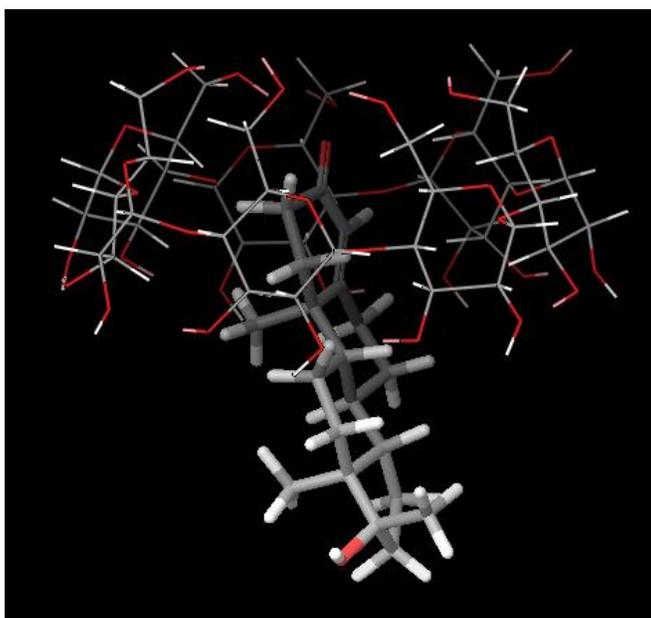


Figura 14 Estrutura final da dinâmica molecular de 1000 ps para o complexo 1

Em contrapartida, o complexo 2 vai evoluindo ao longo da simulação para acabar com a MT praticamente fora da cavidade da  $\beta$ -CD, mantendo o anel D incluso (Figura 15). Este complexo se mostra menos estável que o 1 porque sua energia média ao longo da simulação é de  $2988,85 \text{ kJ mol}^{-1}$ , mas no final variação é de apenas  $8 \text{ kJ mol}^{-1}$ , valor este dentro da margem de flutuação das energias ao longo da dinâmica molecular, por isso pode-se dizer que as estabilidades são praticamente as mesmas em ambos os complexos. Este complexo por si só também não pode explicar os NOEs obtidos.

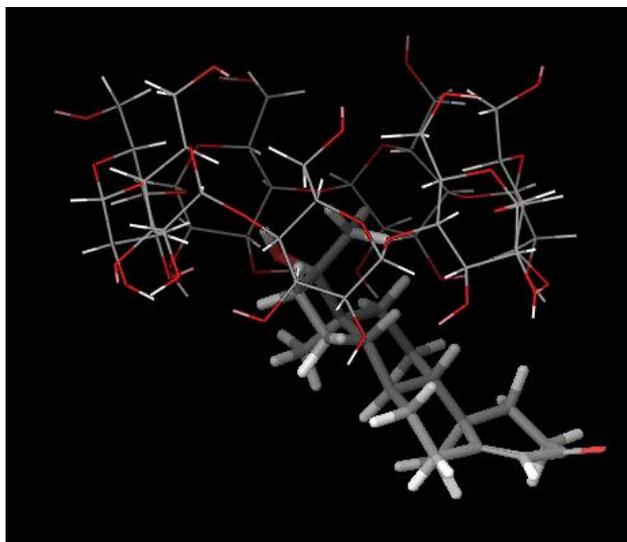


Figura 15 Estrutura final da dinâmica molecular de 1000 ps para o complexo 2

Se considerarmos um equilíbrio 50:50 entre os complexos 1 e 2, poderíamos considerar que os efeitos NOE seriam bastante justificados qualitativamente. Assim, no complexo 1, os grupos metílicos 17 e 18 do anel D da MT, apresentariam NOE com os prótons H3 da  $\beta$ -CD, enquanto que no complexo 2 seria o grupamento 19, do anel A, que apresentaria. No entanto, nenhum dos grupos metílicos poderia apresentar efeito NOE com os H3 da  $\beta$ -CD nestas geometrias.

Perante esta falta de concordância com os resultados experimentais, passou-se a considerar a complexação da MT com a  $\beta$ -CD na razão molar de 1:2. O complexo foi construído a partir das estruturas otimizadas separadamente. A princípio foram realizados cálculos de MM no vácuo, e posteriormente foi feita uma simulação de 1000 ps com ambos os campos de força no vácuo e também usando um modelo de solvatação contínua para simular seu comportamento em água como solvente.

O resultado obtido por MM3\* foi de um complexo estável, mantendo a MT no interior da cavidade formada pelas duas  $\beta$ -CDs (Figura 16). Esta geometria estática não permitiu justificar os valores de NOE experimentais, pois sempre deixavam os grupos metílicos dos anéis A e D próximos do H5 da  $\beta$ -CD, de modo que foi realizada a simulação do comportamento do complexo mediante dinâmica molecular.

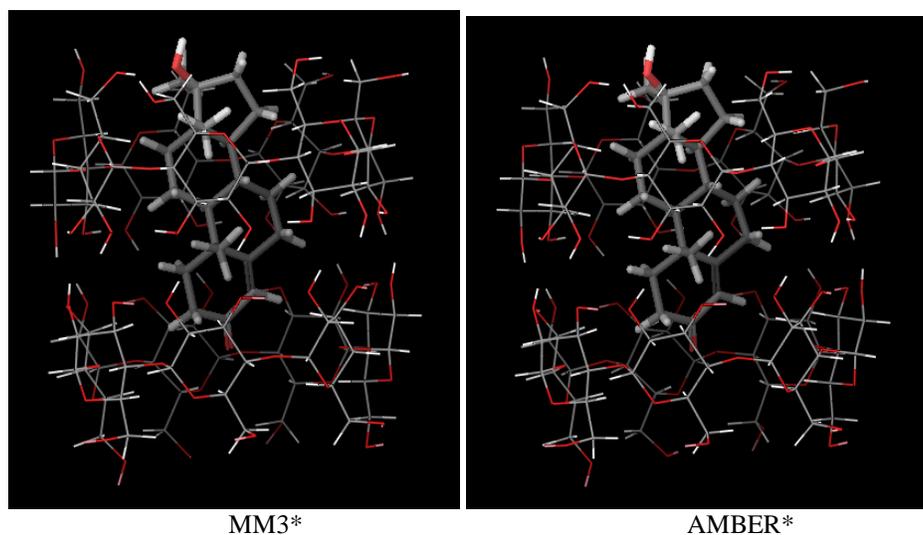


Figura 16 Complexo MT/CD na razão molar de 1:2 obtido por mecânica molecular

Os resultados das dinâmicas moleculares indicaram um complexo estável que apresenta um ligeiro movimento da MT no interior da  $\beta$ -CD, movimento este que justifica que os extremos da MT estejam próximos dos H3 da  $\beta$ -CD. A Figura 17 mostra a estrutura final obtida com cada um dos campos de força, MM3\* e AMBER\*.

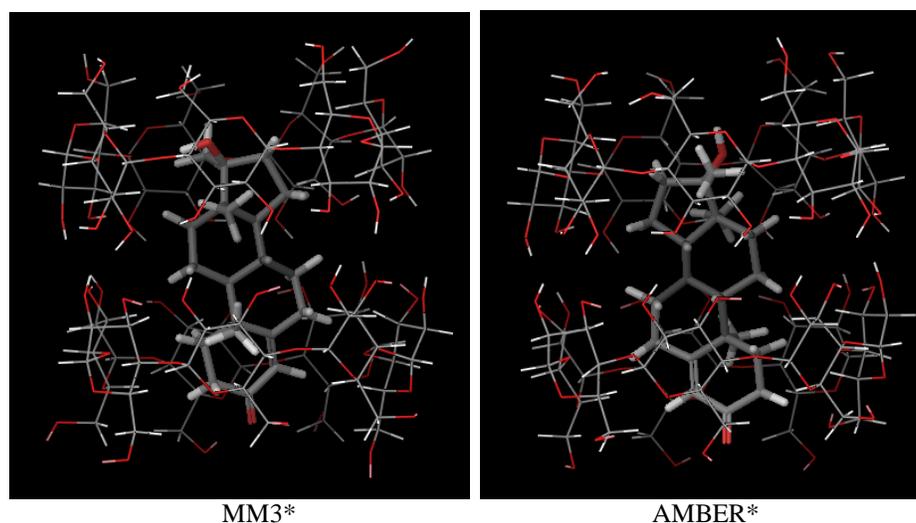


Figura 17 Simulação de dinâmica molecular de 1000 ps para o complexo MT/CD (1:2)

Os resultados obtidos usando o modelo de solvatação contínua (Figura 18), para simular o comportamento em água, foram distintos, dependendo do campo de força usado. Assim, com o campo de forças MM3\* o complexo parece querer deformar-se, visto que ao final dos 1000 ps as duas  $\beta$ -CDs adotam uma geometria relativa em forma de T e a MT está, em sua maior parte, exposta ao solvente. Em contrapartida, nas simulações com AMBER\*, ao final dos 1000 ps a estrutura do complexo parece manter-se melhor, embora também se observe uma separação das duas  $\beta$ -CDs que permitem à MT estar acessível ao solvente.

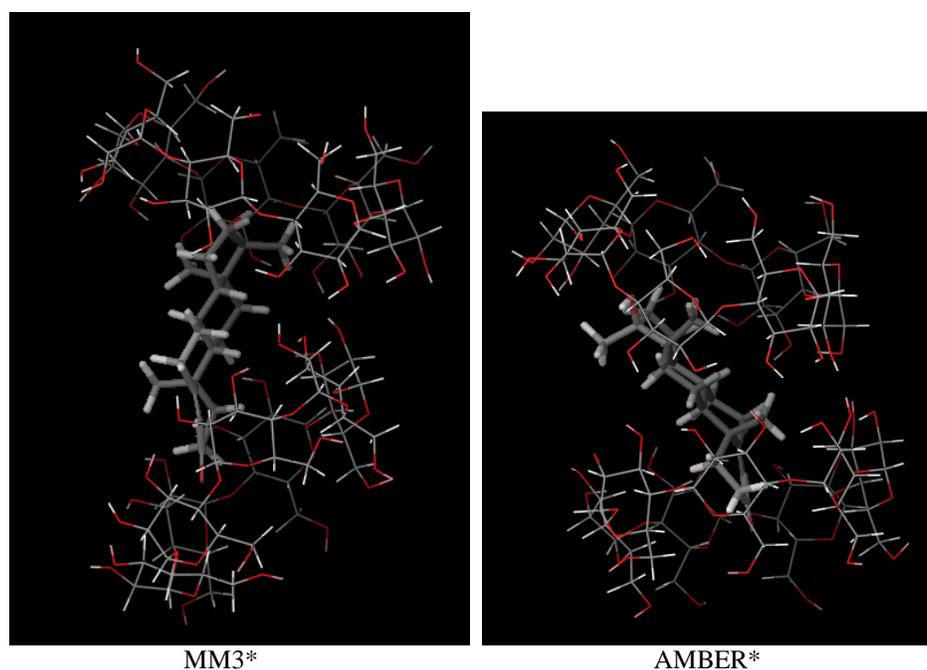


Figura 18 Simulações de dinâmica molecular (1000 ps) com modelo de solvatação contínuo para simular a presença de água nos complexos de inclusão MT/CD (1:2)

Os dados em que a MT fica totalmente incluída no interior da cavidade da  $\beta$ -CD corroboram com os dados experimentais relativos à magnitude da variação de deslocamento químico para os prótons H3 e H5 e com os dados obtidos nos experimentos de ROESY 2D, sendo que o complexo formado deve apresentar geometria similar a obtida por dinâmica molecular no vácuo (Figura 17). Assim, parece necessário repetir os cálculos preliminares com um método de cálculo mais completo, em presença de moléculas de água reais (modelo TIP3P ou TIP4P e campo de forças AMBER original) para uma melhor avaliação teórica deste tipo de complexação.

### 5.10 Ensaio de liberação da MT

Testes de liberação da MT foram conduzidos em sistemas de diálise. Neste ensaio, a MT possui capacidade de atravessar os poros da membrana, porém as moléculas de CD não a atravessam e, desta forma, é possível observar o efeito da complexação na velocidade de liberação da molécula de MT (Gráfico 13).

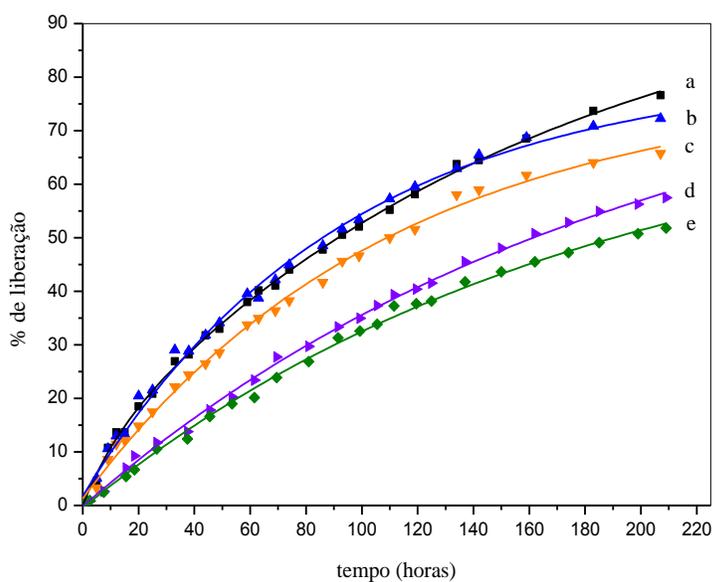


Gráfico 13 Percentagem de liberação de MT livre (a) e dos complexos de inclusão MT/CD preparados na proporção 1:1 por malaxagem (b), liofilização (c) e 1:2 por malaxagem (d) e liofilização (e),  $T = 26 \pm 1^\circ\text{C}$

Pela análise das curvas observa-se que a difusão da MT nesse arranjo experimental de diálise ocorre de maneira muito lenta. As curvas apresentadas no Gráfico 13 dão indícios de estabilização após 8 dias de diálise (192 horas).

De acordo com as curvas obtidas, nesse período de 8 dias, cerca de 75% da MT livre é liberada (Gráfico 13a), enquanto que aproximadamente 71% da MT é liberada no sistemas preparado na razão molar 1:1 a partir da malaxagem (Gráfico 13b), e 65% para o complexo preparado por liofilização (Gráfico 13c). Para os complexos MT/CD preparados na razão molar de 1:2 a liberação é mais lenta, sendo que cerca de 50% ocorreu para o complexo liofilizado (Gráfico 13e), seguido da malaxagem (Gráfico 13d) com percentual de 56%.

Dessa forma a associação da MT na cavidade da  $\beta$ -CD altera os parâmetros de difusão da molécula hóspede podendo prolongar seu tempo de atuação.

### **5.11 Taxas de sobrevivência e reversão sexual em tilápias**

Os estudos preliminares com as formulações dos complexos e grupos controle são de grande importância na avaliação da eficácia dos tratamentos com reversão hormonal e padronização dos métodos de reversão.

Os dados de reversão sexual (Tabela 6) apresentam uma variação percentual de 62,0 a 95,2%, no entanto, não houve diferença significativa entre os tratamentos avaliados ( $P = 0,191$ ). É importante ressaltar que, do ponto de vista biológico, taxas de reversão sexual diferentes para diferentes tratamentos, mesmo que sem diferença estatística significativa, irá influenciar diretamente na obtenção de populações monosexo. Sendo assim, deve-se convencionar que, tratamentos que forneçam maior porcentagem de machos terão melhor eficácia.

Quando comparados ao resultado obtido pelo controle negativo (ração pura) a maior eficiência foi obtida com os tratamentos que fizeram uso da MT na dosagem de  $60 \text{ mg kg}^{-1}$  de ração, preparado por liofilização ( $95,2 \pm 8,2$ ), e na dosagem de  $30 \text{ mg kg}^{-1}$  preparado por malaxagem ( $90,5 \pm 8,2$ ). Esses resultados estão de acordo com o que é indicado na literatura. O uso de MT, geralmente,

influencia a proporção do sexo em favor dos machos obtendo taxas de reversão sexual entre 90 a 99%, portanto, valores situados nessa faixa são considerados ótimos (POPMA; LOVSHIN, 1995). Corroborando com essa informação, os resultados obtidos indicam que ambos os tratamentos podem ser utilizados para a masculinização de tilápia.

Tabela 6 Taxas de sobrevivência e reversão hormonal de tilápias submetidas a diferentes tratamentos

<b>Tratamento</b>	<b>Sobrevivência (%)</b>	<b>Indivíduos machos (%)</b>
MT 60	38,8 ± 31,8	80,9 ± 21,8
MT 30	32,2 ± 20,6	62,0 ± 16,5
CD 60	14,5 ± 16,0	61,9 ± 21,8
MT/CD 60 liofilizado	10,0 ± 13,4	95,2 ± 8,2
MT/CD 30 liofilizado	44,2 ± 37,3	76,2 ± 21,8
MT/CD 60 malaxagem	56,3 ± 35,4	76,2 ± 8,2
MT/CD 30 malaxagem	67,9 ± 17,9	90,5 ± 8,2
Ração pura	21,2 ± 24,2	71,4 ± 14,3
P	0,886	0,191
CV (%)	73,05	21,14

\* Não houve diferença significativa entre os tratamentos, considerando  $p < 0,05$

O resultado obtido para o controle negativo (MT 60 mg kg<sup>-1</sup>) foi inesperado uma vez que, preconiza-se para esse tipo de tratamentos uma porcentagem elevada de indivíduos machos. Por exemplo, Celik, Guner e Celik (2011) obtiveram uma taxa de reversão sexual em tilápia na ordem de 93,7%. De forma semelhante, El-Greisy e El-Gamal (2012) obtiveram uma proporção de machos de 95%. Vários são os fatores que podem ser atribuídos a essas diferenças observadas, especialmente relacionadas às condições experimentais em que os animais foram expostos, como temperatura, fotoperíodo, qualidade da

água, densidade de estocagem, regime de alimentação, entre outros. Além disso, o tipo de técnica utilizada para avaliar a eficácia da reversão sexual pode afetar o resultado obtido (POPMA; LOVSHIN, 1995).

Dentre os vários fatores que afetam a biodisponibilidade oral de um princípio ativo, a solubilidade, a taxa de dissolução e a permeabilidade são os maiores responsáveis por controlar a absorção intestinal (AMIDON et al, 1995). Assim, os melhores resultados obtidos em formulações contendo CDs podem estar relacionados ao aumento na solubilidade da MT. O aumento da concentração de MT solúvel nos fluídos intestinais das tilápias pode ter contribuído com sua passagem pela parede intestinal, e assim entrar na corrente sanguínea. O complexo também deve estar sendo liberado de forma modificada, como mostrado nos ensaios *in vitro*, assim é esperada a manutenção de uma dose contínua de MT à tilápia.

Os tratamentos que fizeram uso de uma dosagem reduzida da MT (30 mg kg<sup>-1</sup>), exceto para o complexo preparado por malaxagem, apresentaram baixa taxa de reversão sexual. Outros autores também encontraram baixa proporção de machos utilizando o hormônio em doses inferiores. Celik, Guner e Celik (2011) obtiveram 69,4 % de reversão sexual utilizando a MT na dose de 30 mg kg<sup>-1</sup>. Sabe-se que o efeito do andrógeno na masculinização depende, dentre outros fatores, da quantidade de hormônio ingerida pelo animal. Em parte, esse resultado pode ser atribuído ao fato de que, em doses baixas, o hormônio não é capaz de suprimir a ovogênese (EL-GREISY; EL-GAMAL, 2012).

A sexagem manual pode ter contribuído para as baixas taxas de reversão sexual observadas em alguns tratamentos. Esse tipo de técnica, baseada na aparência visual da papila, apresenta maior chance de ocorrência de erros, quando comparada a sexagem histológica, mesmo quando realizada por técnicos experientes (PHELPS; POPMA, 2000). Além disso, a eficiência da sexagem está diretamente relacionada com o aumento do tamanho e peso dos animais

(MAKINO et al., 2009). Segundo esses autores, para aumentar a chance de acerto, os peixes têm que ser maiores que 5,0 cm. Nesse estudo, o comprimento médio e peso médio total dos animais foram de  $7,41 \pm 0,75$  cm e  $6,33 \pm 1,84$  g, respectivamente, estando de acordo com o que é recomendado. À medida que os peixes crescem, maior será a diferenciação do aparelho genital externo e, conseqüentemente, maior a efetividade da sexagem manual.

A taxa de sobrevivência (Tabela 6) apresentou variação da ordem de 10,0 a 67,9%, no entanto, não houve diferença significativa entre os tratamentos ( $P = 0,886$ ). A baixa taxa de sobrevivência observada, provavelmente, não está relacionada com o efeito do hormônio uma vez que, observou-se alta taxa de mortalidade também para o controle negativo (ração pura). Alguns estudos já reportaram que a  $17\alpha$ -metiltestosterona não tem efeito sobre a sobrevivência de tilápias. Supõe-se que a sobrevivência durante a fase de tratamento com o hormônio seja em torno de 80% (GREEN; TEICHERT-CODDINGTON, 2000; CHAKRABORTY et al., 2011). Dessa forma, seria necessária uma investigação mais profunda do motivo pelo qual encontrou-se uma baixa sobrevivência nesse trabalho.

O alto índice de mortalidade encontrado no tratamento com incorporação de CD livre à ração é um fato curioso, pois estudos com elevadas doses de CDs em ratos e cachorros indicaram efeito não tóxico para esses animais (BELLINGER et al., 1995), assim estudos de toxicidade em tilápias serão importantes para avaliar este tipo de efeito.

As taxas de sobrevivência encontradas para os tratamentos com os complexos preparados por liofilização na concentração de  $30 \text{ mg kg}^{-1}$  e os preparados por malaxagem apresentaram resultados semelhantes ao encontrado por Zanardi et al. (2011).

Para a recomendação de um produto a ser aplicado na produção de tilápias monosexo, este deve apresentar elevadas taxas de reversão sexual e

também de sobrevivência dos animais tratados. Apesar da dosagem de  $60 \text{ mg kg}^{-1}$  do produto obtido por liofilização ter apresentado uma excelente taxa de reversão, esse resultado pode ser colocado em cheque visto que o índice de mortandade foi muito elevado. Avaliando, portanto, tanto a taxa de reversão quanto a de sobrevivência o melhor resultado pode ser atribuído à dosagem de  $30 \text{ mg kg}^{-1}$  de ração preparada por malaxagem.

Dessa forma, este estudo preliminar parece indicar a complexação do hormônio na CD um método viável a ser empregado comercialmente. No entanto, os altos valores no coeficiente de variação e a elevada taxa de mortandade, em determinados tratamentos, carecem de mais estudos e sugerem a necessidade, de possivelmente, refazer os experimentos com condições recomendadas bem padronizadas. A técnica de sexagem por microscopia também deve ser empregada a fim de reduzir possíveis erros inerentes à sexagem manual.

## 6 CONCLUSÃO

Evidências da complexação entre a MT e a CD foram observadas pelo deslocamento do comprimento de onda máximo para a região do azul e o aumento de intensidade da absorbância decorrente a elevação da concentração de CD.

A complexação promove uma melhoria na solubilidade do hormônio na ordem de 6 vezes. Sendo que a isoterma do tipo Bs caracteriza, neste caso, uma estequiometria de 1:2 para o complexo MT/CD.

A supressão dos picos endotérmicos observados na calorimetria diferencial de varredura confirma a formação dos complexos em estado sólido, sendo a formação de novas fases sólidas, para os complexos, mostradas por microscopia eletrônica de varredura.

Os dados de  $^1\text{H}$  RMN constataam a formação do complexo em meio aquoso indicando a inclusão total da MT na cavidade da CD cujo experimento de ROESY 2D possibilitou a proposta da provável geometria do complexo de inclusão.

A constante de associação do complexo, obtida por medidas de difusão, é de  $2846 \text{ L mol}^{-1}$  e o valor da fração complexada é de 76%.

Simulações de dinâmica molecular realizados no vácuo mostraram estabilidade para a formação dos complexos na razão molar de 1:2, justificando os NOEs obtidos experimentalmente. As simulações em solvente não condizem com os NOEs experimentais sugerindo a avaliação teórica com um método de cálculo mais completo.

A liberação da MT nos complexos de inclusão ocorre mais lentamente comparado à MT livre, podendo assim, influenciar a velocidade com que atinge o seu alvo e melhorando a biodisponibilidade.

Quanto a reversão sexual, o melhor resultado foi obtido pela formulação do complexo preparado por malaxagem na dosagem de  $30 \text{ mg kg}^{-1}$  de ração.

Enfim, os complexos formados entre a MT e a  $\beta$ -CD apresentam potencial para serem empregados na reversão sexual de alevinos na aquicultura contribuindo para o desenvolvimento sustentável, pois permite a melhoria na ação do hormônio e evita a aplicação de quantidades excedentes na ração animal. Assim reduz-se os custos de tratamento da água de manejo, conseqüentemente o risco ambiental e aumenta a produção de um pescado de qualidade e com menores riscos de contaminação por resíduos de hormônios esteroides.

## REFERÊNCIAS

ALLINGER, N.L.; YUH, Y.H.; LII, J.H. Version of the original program tailored to MM3 MACROMODEL. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 111, p. 8551, 8566 and 8576, 1989.

AMIDON, G. L. et al. A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 12, n. 3, p. 413-420, Mar. 1995.

ASTRAY, G. et al. A review on the use of cyclodextrins in foods. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 23, n. 7, p. 1631-1640, Oct. 2009.

BARUCH-TEBLUM, E.; MASTAI, Y.; LANDFESTER, K. Miniemulsion polymerization of cyclodextrin nanospheres for water purification from organic pollutants. **European Polymer Journal**, New York, v. 46, n. 8, p. 1671-1678, Aug. 2010.

BEARDMORE, J. A.; MAIR, G. C.; LEWIS, R. I. Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: application, problems, and prospects. **Aquaculture**, Hawaii, v. 197, n. 1-4, p. 283-301, June 2001.

BELLRINGER, M. E. et al.  $\beta$ -cyclodextrin: 52-week toxicity studies in the rat and dog. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 33, n. 5, p. 367-376, May 1995.

BINELLO, A. et al. Synthesis of chitosan-cyclodextrin adducts and evaluation of their bitter-masking properties. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 19, n. 5, p. 394-400, Sept./Oct. 2004.

BREWSTER, M. E. et al. Development of aqueous parenteral formulations for carbamazepine through the use of modified cyclodextrins. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, v. 80, n. 4, p. 380-383, Apr. 1991.

BREWSTER, M. E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Advanced Drug Delivery**, Amsterdam, v. 59, n. 7, p. 645-666, July 2007.

BUDAL, R. M. **Estudos de formação de complexos de inclusão em ciclodextrinas**. 2003. 197 p. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

CABEÇA, L. F. **Topologia de complexos formados entre drogas/ $\beta$ -ciclodextrinas/lipossomas/células, aplicando técnicas de ressonância magnética nuclear - RMN**. 2009. 174p. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

CAMERON, K. S.; FIELDING, L. NMR diffusion coefficient study of steroid-cyclodextrin inclusion complexes. **Magnetic Resonance in Chemistry**, Chichester, v. 40, n. 13, p. S106-S109, Dec. 2002.

CARVALHO, L. B. et al. Cyclodextrin/silica hybrid adsorbent for removal of methylene blue in aqueous media. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, Dordrecht, v. 78, n. 1-4, p. 77-87, Apr. 2014.

CARVALHO, L. B.; PINTO, L. M. A. Formation of inclusion complexes and controlled release of atrazine using free or silica-anchored  $\beta$ -cyclodextrin. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, Dordrecht, v. 74, n. 1-4, p. 375-381, Dec. 2012.

CELIK, I.; GUNER, Y.; CELIK, P. Effect of orally-administered 17  $\alpha$ -methyltestosterone at different doses on the sex reversal of the Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1758). **Journal of Animal and Veterinary Advances**, Bareilly, v. 10, n. 7, p. 853-857, 2011.

CHAKRABORTY, S. B. et al. Growth of mixed-sex and monosex Nile Tilapia in different culture systems. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Trabzon, v. 11, n. 1, p. 131-138, Mar. 2011.

CHAVES, I. S. et al. Alternativas para o tratamento da esquistossomose: caracterização físico-química do complexo de inclusão entre praziquantel e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina. **Latin American Journal of Pharmacy**, Buenos Aires, v. 29, n. 7, p. 1067-74, nov. 2010.

CLARIDGE, T. D. W. **High-resolution NMR techniques in organic chemistry**. Oxford: Newnes Elsevier, 2008.

CNAANI, A.; LEVAVI-SIVAN, B. Sexual development in fish, practical applications for aquaculture. **Sexual Development**, Würzburg, v. 3, n. 2-3, p. 164-175, Aug. 2009.

DAVIS, M. E.; BREWSTER, M. E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. **Nature Review Drug Discovery**. London, v. 3, n. 12, p. 1023-1035, Dec. 2004.

DE JESUS, M. B. et al. Improvement of the oral praziquantel anthelmintic effect by cyclodextrin complexation. **Journal of Drug Targeting**, Yverdon, v. 18, n. 1, p. 21-26, Jan. 2010.

DE JESUS, M. B. et al. Theoretical and experimental study of a praziquantel and  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex using molecular mechanic calculations and  $^1\text{H}$ -nuclear magnetic resonance. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 41, n. 4, p. 1428-1432, May 2006.

DEL VALLE, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**, London, v. 39, n. 9, p. 1033-1046, May 2004.

DODZUIK, H. **Cyclodextrins and their complexes: chemistry, analytical methods, applications**. Weinheim: Wiley & Sons, 2006.

DRUMMOND, C. D.; MURGAS, L. D.; VICENTINI, B. Growth and survival of tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) submitted to different

temperatures during the process of sex reversal. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 3, p. 895-902, May/June 2009.

EL-GREISY, Z. A.; EL-GAMAL, A. E. Monosex production of tilapia, *Oreochromis niloticus* using different doses of 17 $\alpha$ -methyltestosterone with respect to the degree of sex stability after one year of treatment. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, Cairo, v. 38, n. 1, p. 59-66, Nov. 2012.

EL-SAYED, A. F. M.; ABDEL-AZIZ, E. S. H.; ABDEL-GHANI, H. M. Effects of phytoestrogens on sex reversal of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) larvae fed diets treated with 17 $\alpha$ -methyltestosterone. **Aquaculture**, Hawaii, v. 360-361, p. 58-63, Sept. 2012.

FIGUEIRAS, A. et al. Interaction of omeprazole with a methylated derivative of  $\beta$ -cyclodextrin: phase solubility, nmr spectroscopy and molecular simulation. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 24, n. 2, p. 377-389, Dec. 2007.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The state of world fisheries and aquaculture**. Rome: FAO Fisheries and Aquaculture Department, 2012. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/016/i2727e/i2727e.pdf>>. Acesso em: [://ftp.fao.org/docrep/fao/009](http://ftp.fao.org/docrep/fao/009). Acesso em: 15 ago. 2012.

FRÖMMING, K. H.; SZEJTLI, J. **Cyclodextrins in pharmacy. Topics in inclusion science**. Hungria: Kluwer Academic Publishers, 1994.

FUNDO DE POPULAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. **Relatório sobre a Situação da População Mundial 2011**. Brasília, 2011. Disponível em: <<http://www.unfpa.org.br/Arquivos/swop2011.pdf>>. Acesso em: 02 jan. 2014.

GALE, W. L. et al. Masculinization of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) by immersion in androgens. **Aquaculture**, Hawaii, v. 178, n. 3-4, p. 349-357, Aug. 1999.

GIORDANO, F.; NOVAK, C.; MOYANO, J. R. Thermal analysis of cyclodextrins and their inclusion compounds. **Thermochim Acta**, Amsterdam, v. 380, n. 2, p. 123-151, Dec. 2001.

GREATBANKS, D.; PICKFORD, R. Cyclodextrins as chiral complexing agents in water, and their application to optical purity measurements. **Magnetic Resonance in Chemistry**, Chichester, v. 25, n. 3, p. 208-215, Mar. 1987.

GREEN, B. W.; TEICHERT-CODDINGTON, D. R. Human food safety and environmental assessment of the use of 17  $\alpha$ -methyltestosterone to produce male tilapia in the united states. **Journal of the World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 31, n. 3, p. 337-357, Sept. 2000.

GUILHERME, V. A. et al. Caracterização e atividade farmacológica do diclofenaco-zinco (II) e do complexo de inclusão diclofenaco-zinco (II)-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina. **Bioikos**, Campinas, v. 24, n. 2, p. 119-127, jul./dez. 2010.

HARMON, J. et al. Determination of molecular self-diffusion coefficients using pulsed-field-gradient nmr: an experiment for undergraduate physical chemistry laboratory. **Journal of Chemical Education**, Easton, v. 89, n. 6, p. 780-783, Mar. 2012.

HIGUCHI, T.; CONNORS, K. A. Phase solubility techniques. **Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation**, New York, v. 4, p. 117-121, 1965.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de análise instrumental**. Porto Alegre: Bookman, 2009.

HUGHES, G.A. Nanostructure-mediated drug delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, New York, v. 1, n. 1, p. 22-30, Mar. 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Estatística da Pesca 2005**. Brasília, 2007.

Disponível em:

<<https://www.ibama.gov.br/category/40?download=2458%3A2005.p>>. Acesso em: 27 ago. 2013.

JAIIME, C. et al. Solution geometry of beta-cyclodextrin-1-bromoadamante host-guest complex as determined by  $^1\text{H}[1]$  intermolecular NOE and MM2 calculations. **Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 55, n. 15, p. 4773-4776, July 1990.

JORDHEIM, L. P. et al. Inclusion complexes of a nucleotide analogue with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, Dordrecht, v. 63, n. 1-2, p. 11-16, Feb. 2009.

JUN, S. W. et al. Preparation and characterization of simvastatin/hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex using supercritical antisolvent (SAS) process. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Stuttgart, v. 66, n. 3, p. 413-421, June 2007.

JURSIC, B. S.; ZDRAVKOVSKI, Z.; FRENCH, A. D. Molecular modeling methodology of  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes. **Journal of Molecular Structure: Theochem**, Amsterdam, v. 366, n. 1-2, p. 113-117, July 1996.

KALINKOVA, G. N. Studies of beneficial interactions between active medicaments and excipients in pharmaceuticals formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 187, n. 1, p. 1-15, Sept. 1999.

KUBITZA, F. **Tilápia: Tecnologia e planejamento na produção comercial**. Jundiaí: Aqua Supre, 2000.

LAMBERT, A. et al. What is the effective dielectric constant in a  $\beta$ -cyclodextrin cavity? Insights from molecular dynamics simulations and QM/MM calculations. **Computational and Theoretical Chemistry**, Amsterdam, v. 968, n. 1-3, p. 71-76, Aug. 2011.

LIMA, R. A. F. **Avaliação de formulações anestésicas de tetracaína em beta-ciclodextrina e hidroxipropil beta-ciclodextrina**. 2010. 98 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M. E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: drug solubilization and stabilization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, v. 85, n. 10, p. 1017-1025, Oct. 1996.

LOFTSSON, T.; MASSON, M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 225, n. 1-2, p. 15-30, Aug. 2001.

LYRA, M. A. M. et al. Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 31, n. 2, p. 117-124, ago. 2010.

MACROMODEL, version 9.9, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012

MAESTRO, version 9.3, Schrödinger, LLC. New York, NY, 2012.

MAHLAMBI, M. M. et al.  $\beta$ -Cyclodextrin-ionic liquid polyurethanes for the removal of organic pollutants and heavy metals from water: synthesis and characterization. **Journal of Polymer Research**, Dordrecht, v. 17, n. 4, p. 589-600, July 2010.

MAKINO, L. C. et al. Efetividade de métodos de identificação sexual em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) revertidas sexualmente com hormônio em ração com diferentes granulometrias. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 25, n. 2, mar./abr. 2009.

MATIOLI, G. **Ciclodextrinas e suas aplicações em: alimentos, fármacos, cosméticos, agricultura, biotecnologia, química analítica e produtos gerais.** Maringá: Eduem, 2000.

MELO, N. F. S. et al. Preparação e caracterização inicial de complexo de inclusão entre nitrofurazona e 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 28, n. 1, p. 35-44, set. 2007.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. **O mundo precisa de tilápia diz Crivella.** Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/index.php/topicos/2154-o-mundo-precisa-de-tilapia-diz-crivella>>. Acesso em: 05 dez. 2013.

MORRIS, K. F.; JOHNSON JUNIOR, C. R. Resolutions of discrete and continuous molecular size distributions by means diffusion-ordered 2D NMR spectroscopy. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 115, n. 10, p. 4291-4299, May 1993.

PEARLMAN, D. A. et al. **AMBER 4.1.** University of California, San Francisco, CA, 1995.

PHELPS, R. P.; POPMA, T. J. **Sex reversal of tilapia.** Louisiana: Costa-Pierce and J.E. Rakocy, 2000.

PINTO, L. M. A. et al. Elucidation of inclusion compounds between  $\beta$ -cyclodextrin/local anaesthetics structure: a theoretical and experimental study using differential scanning calorimetry and molecular mechanics. **Journal of Molecular Structure: Theochem**, Amsterdam, v. 678, n. 1-3, p. 63-66, June 2004.

PINTO, L. M. A. et al. Physico-chemical characterization of benzocaine- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 39, n. 5, p. 956-963, Oct. 2005.

POPMA J. T.; LOVSHIN, L. L. **Worldwide prospects for commercial production of Tilapia**. Alabama: Department of Fisheries and Allied Aquacultures Auburn University, 1995.

PRIYA, A. S. et al. Improvement on dissolution rate of inclusion complex of rifabutin drug with  $\beta$ -cyclodextrin. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 62, p. 472-480, Nov. 2013.

PUBCHEM. **Methyltestosterone**. Bethesda, 2014. Disponível em: <<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=6010>>. Acesso em: 05 jan. 2014.

RAJEWSKI, R.A.; STELLA, V.J. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. In vivo drug delivery. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, v. 85, n. 11, p. 1142-1169, Nov. 1996.

REIG, M.; TOLDRÁ, F. Veterinary drug residues in meat: concerns and rapid methods for detection. **Meat Science**, Barking, v. 78, n. 1-2, p. 60-67, Jan. 2008.

REIMER, L. **Scanning electron microscopy: physics of image formation and microanalysis**. New York: Springer, 1998.

RODRIGUES, S. G. et al. Computational analysis and physico-chemical characterization of an inclusion compound between praziquantel and methyl- $\beta$ -cyclodextrin for use as an alternative in the treatment of schistosomiasis. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, Dordrecht, v. 70, n. 1-2, p. 19-28, June 2011.

RYCKAERT, J. P.; CICCOTTI, G.; BERENDSEN, H. J. C. Numerical integration of the cartesian equation of motion of a system with constraints: molecular dynamics of N-alkanes. **Journal of Computational Physics**, Orlando, v. 23, n. 3, p. 327-341, Mar. 1977.

RYMDÉN, R.; CARLFORS, J.; STILBS, P. Substrate binding to cyclodextrins in aqueous solution: a multicomponent self-diffusion study. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, Dordrecht, v. 1, n. 2, p. 159-167, June 1983.

SALÚSTIO, P. J. et al. The influence of the preparation methods on the inclusion of model drugs in  $\beta$ -cyclodextrin cavity. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, London, v. 71, n. 2, p. 377-386, Feb. 2009.

SANCHES, L. E. F.; HAYASHI, C. Effect of feeding frequency on Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) fries performance during sex reversal in hapas. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, n. 4, p. 871-876, 2001.

SATTLER, S. et al. Binding, uptake, and transport of hypericin by caco-2 cell monolayers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, v. 86, n. 10, p. 1120-1131, Oct. 1997.

SCHNEIDER, H. J. et al. NMR studies of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. **Chemical Reviews**, Washington, v. 98, n. 5, p. 1755-1785, July 1998.

SCHUCH, F. F., BEVILAQUA, R. C. A., FAGAN, S. B. Propriedades eletrônicas e estruturais de nanotubos de carbono e aplicação como carreadores de fármacos, **Disciplinarum Scientia: Ciências Naturais e Tecnológicas**, Santa Maria, v. 8, n. 1, p. 95-105, 2007.

SHAO, D. et al. Removal of polychlorinated biphenyls from aqueous solutions using  $\beta$ -cyclodextrin grafted multiwalled carbon nanotubes. **Chemosphere**, Oxford, v. 79, n. 7, p. 679-685, Apr. 2010.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. L.; MORRIL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

SINGH, A.K. Introduction of modern endocrine techniques for the production of monosex population of fishes. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 181, n. 15, p. 146-155, Jan. 2013.

SINGH, R. et al. Characterization of cyclodextrin inclusion complexes. **Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, Bethesda, v. 2, n. 3, p. 171-183, Jan. 2010.

SKALKO, N. et al. Nifedipine and nifedipine-cyclodextrin complexes in liposomes and microspheres. **Acta Pharmaceutica**, Zagreb, v. 46, n. 2, p. 159-168, Jan. 1996.

SOUZA, A. A.; LAVERDE JUNIOR. A. Aplicação da espectroscopia de ressonância magnética nuclear para estudos de difusão molecular em líquidos: a técnica DOSY. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 6, p. 1022-1026, nov./dez. 2002.

STELLA, V. J. et al. Mechanism of drug release from cyclodextrin complexes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 36, n. 1, p. 3-16, Mar. 1999.

STILL, W. C. et al. Semianalytical treatment of solvation for molecular mechanics and dynamics. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 112, n. 16, p. 6127-6129, Aug. 1990.

STRIMBU, L.; LIU, J.; KAIFER, A. E. Cyclodextrin-capped palladium nanoparticles as catalysts for the suzuki reaction. **Langmuir**, Washington, v. 19, n. 2, p. 483-485, Jan. 2003.

SZEJTLI, J. **Cyclodextrin Technology**. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1988.

SZEJTLI, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. **Chemical Reviews**, Washington, v. 98, n. 5, p. 1743-1753, July 1998.

TABUSHI, I. Cyclodextrin catalysis as a model for enzyme action. **Accounts of Chemical Research**, Washington, v. 15, n. 3, p. 66-72, Mar. 1982.

TENJARLA, S. et al. Preparation, characterization, and evaluation of miconazole-cyclodextrin complexes for improved oral and topical delivery. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, v. 87, n. 4, p. 425-429, Apr. 1998.

TRAPANI, G. et al. Complexation of zolpidem with 2-hydroxypropyl-beta-, methyl-beta-, and 2-hydroxypropyl-gamma-cyclodextrin: effect on aqueous solubility, dissolution rate, and ataxic activity in rat. **Journal of Pharmaceutical Science**, Washington, v. 89, n. 11, p. 1443-1451, Nov. 2000.

UEKAMA, K. Design and evaluation of cyclodextrin-based drug formulation. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 52, n. 8, p. 900-915, Aug. 2004.

VAN DE MANAKKER, F. et al. Cyclodextrin-based polymeric materials: synthesis, properties, and pharmaceutical/biomedical applications. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 12, p. 3157-3175, Dec. 2009.

VARGA, G. et al. Comparison of separation performances of novel  $\beta$ -cyclodextrin-based chiral stationary phases in high-performance liquid chromatographic enantioseparation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 70, p. 71-76, Nov. 2012.

VENTURINI, C. G. et al. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 360-368, fev. 2008.

VERLET, L. Computer experiments on classical fluids. Thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules. **Physical Review**, New York, v. 159, n. 1, p. 98-103, July 1967.

VIERSTEIN, H.; STUMPF, C. H.; WOLSCHANN, P. Pharmaceutical and pharmacological properties of propanidid as cyclodextrin complex.

**Pharmaceutical and Pharmacological Letters**, Stuttgart, v. 7, n. 1, p. 39-41, 1997.

VILLAVERDE, J. et al. Inclusion complexes of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -cyclodextrins and the herbicide norflurazon: I. Preparation and characterization. II. Enhanced solubilisation and removal from soils. **Chemosphere**, Oxford, v. 60, n. 5, p. 656–664, Aug. 2005.

WIMMER, R. et al. NMR diffusion as a novel tool for measuring the association constant between cyclodextrin and guest molecules. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 337, n. 9, p. 841-849, Apr. 2002.

WOHLFARTH, C. **Static dielectric constants of pure liquids and binary liquid mixtures**. Halle: Springer, 2008.

YADAV, V. R. et al. Effect of cyclodextrin complexation of curcumin on its solubility and antiangiogenic and anti-inflammatory activity in rat colitis model. **Journal Pharmaceutical Science Technology**, Bethesda, v. 10, n. 3, p. 752-762, June 2009.

YAÑEZ, C.; ARAYA, M.; BOLLO, S. Complexation of herbicide bentazon with native and modified beta-cyclodextrin. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, Dordrecht, v. 68, n. 1-2, p. 237-241, Oct. 2010.

ZANARDI, M. F. et al. Concentrações de hormônio na carcaça de tilápias do nilo e maturação precoce após reversão sexual. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 40, n. 1, p. 7-11, 2011.

ZANETTI-RAMOS, B. G.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. O desenvolvimento da nanotecnologia: cenário mundial e nacional de investimentos. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 89, n. 2, p. 95-101, 2008.

ZHANG, A. et al. Characterization of inclusion complexation between fenoxaprop-p-ethyl and cyclodextrin. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, n. 18, p. 7193-7197, Sept. 2005.

ZHAO, J. et al. Preparation and application of rifamycin-capped (3-(2-O- $\beta$ -cyclodextrin)-2-hydroxypropoxy)-propylsilyl-appended silica particles as chiral stationary phase for high-performance liquid chromatography. **Talanta**, London, v. 83, n. 1, p. 286-290, Nov. 2010.

**ANEXOS**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**  
 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS  
 Cx.P.3037 - Lavras - MG - 37200-000 - (35) 3829-5182 cba@nintec.ufla.br

**CERTIFICADO**

Certificamos que o protocolo nº 052/13, relativo ao projeto intitulado Nanotecnologia na inversão sexual de tilápias: Uso de ciclodextrina na formação de complexos de inclusão com o hormônio masculinizante 17- $\alpha$ -metiltestosterona, que tem como responsável Luis David Solis Murgas está de acordo com os princípios éticos da experimentação animal, adotados pela comissão de ética no uso de animais (comissões permanentes/prp-ufla), tendo sido aprovado na reunião de 31/10/2013.

início do projeto:01/11/2013 - término do projeto:01/08/2015

**CERTIFICATE**

We hereby certify that the Protocol nº 052/13, related to the project entitled "Nanotechnology in sex reversal of tilapia: Use of cyclodextrin in the formation of inclusion complexes with masculinizing hormone 17- $\alpha$ -methyltestosterone", under the supervision of Luis David Solis Murgas, is in agreement with the Ethics Principles in Animal Experimentation, adopted by the Institutional Animal Care and Use Committee (Standing Committees/PRP-UFLA), and was approved in October 31, 2013.

Project's beginning:01/11/2013 - Project's end:01/08/2015

Lavras, 31 de outubro de 2013

  
**Prof. Gabriela Rodrigues Sampaio**  
 Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA

Universidade Federal de Lavras  
 Pró-Reitoria de Pesquisa /Comissões Permanentes  
 Campus Universitário -  
 Caixa Postal 3037 / CEP 37200-000 - Lavras, MG - Brasil  
 Tel.: - 55 (35) 3829 5182  
 cba@nintec.ufla.br - www.prp.ufla.br