



**LUCAS BRAGANÇA DE CARVALHO**

**DESENVOLVIMENTO DE COMPOSTOS DE INCLUSÃO  
ENTRE CICLODEXTRINAS E METILTESTOSTERONA E  
SUA APLICAÇÃO EM AQUICULTURA**

**LAVRAS - MG**

**2018**

**LUCAS BRAGANÇA DE CARVALHO**

**DESENVOLVIMENTO DE COMPOSTOS DE INCLUSÃO ENTRE CICLODEXTRINAS E  
METILTESTOSTERONA E SUA APLICAÇÃO EM AQUICULTURA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Agroquímica, área de concentração  
Química/Bioquímica, para obtenção do título de  
Doutor.

Profa. Dra. Luciana de Matos Alves Pinto

Orientadora

Prof. Dr. Carlos Jaime

Coorientador

**LAVRAS - MG**

**2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Carvalho, Lucas Bragança de.

Desenvolvimento de compostos de inclusão entre  
ciclodextrinas e metiltestosterona e sua aplicação em aquicultura /  
Lucas Bragança de Carvalho. - 2018.  
156 p.

Orientador(a): Luciana de Matos Alves Pinto.

Coorientador(a): Carlos Jaime.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2018.  
Bibliografia.

1. Compostos de inclusão. 2. Metiltestosterona. 3. Adsorção. I.  
Pinto, Luciana de Matos Alves. II. Jaime, Carlos. III. Título.

**LUCAS BRAGANÇA DE CARVALHO**

**DESENVOLVIMENTO DE COMPOSTOS DE INCLUSÃO ENTRE CICLODEXTRINAS E  
METILTESTOSTERONA E SUA APLICAÇÃO EM AQUICULTURA**

**DEVELOPMENT OF INCLUSION COMPOUNDS BETWEEN CYCLODEXTRINES AND  
METHYLTESTOSTERONE AND ITS APPLICATION IN AQUACULTURE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Agroquímica, área de concentração  
Química/Bioquímica, para obtenção do título de  
Doutor.

APROVADA em 19 de janeiro de 2018.

Prof. Dr. Cleber Paulo Andrada Anconi	UFLA
Prof. Dr. Gilberto Lúcio Benedito de Aquino	UEG
Prof. Dr. Juliano Elvis de Oliveira	UFLA
Prof. Dr. Sérgio Scherrer Thomasi	UFLA

Profa. Dra. Luciana de Matos Alves Pinto

Orientadora

Prof. Dr. Carlos Jaime

Coorientador

**LAVRAS - MG**

**2018**

## AGRADECIMENTOS

A todas as pessoas, que de um modo ou outro tenham me ajudado, apoiado e compartilhado esses anos em que foi desenvolvido esse projeto de tese.

À Profa. Luciana, por ser minha orientadora, pela confiança, apoio e amizade ao longo dos últimos 10 anos.

Ao Prof. Carlos, por participar desse projeto como coorientador, pela receptividade em Barcelona, por ter aberto as portas do seu laboratório e propiciado uma ótima introdução ao campo de química teórica. Grato também pelas conversas, discussões e principalmente sua amizade.

Aos integrantes do Serviço de Ressonância Magnética Nuclear da UAB, pela amizade, confraternizações, e terem facilitado acesso aos equipamentos. Especialmente ao Pau Nolis, que colaborou com a realização das análises de RMN no estado sólido.

Aos colegas de Laboratório na UAB, especialmente à Asli, Adrian e Rosa, pela amizade, colaboração e agradáveis conversas.

À todos os amigos que fiz na Espanha, obrigado por haverem cruzado meu caminho, vocês contribuíram muito com meu crescimento pessoal, e fizeram com que eu me sentisse em casa todo o tempo. Especialmente à família Jaime, ao Anderson, Diego, Rafa, Rafael, Jhon, Manu e Kelerson.

Ao Prof. Tiago Venâncio (UFSCar) por facilitar as análises de RMN em meio líquido.

Ao Prof. Paulo Pinheiro pelas medidas de SSA e porosidade das amostras no Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux, Université de Lorraine.

Ao Centro de Análises e Prospecção Química da UFLA (CAPQ) pelas facilidades nas análises de DSC e TG.

Aos membros dessa banca examinadora, por terem aceitado o convite em avaliar o trabalho desenvolvido, e sem dúvidas colaborar com críticas e sugestões.

Aos membros da defesa de qualificação, Profs. Leonardo, Sérgio e Iara, pela atenção, discussão e valiosas sugestões.

À todos os amigos e colegas do Laboratório de Bioquímica, em especial à Pri, Tamara, Ju, Lucilene, Marianas, Tássia, Adneia, Lucimara, Pedro, Cris, Tati e Gustavo, pelo companheirismo e força ao longo de tantos anos.

Aos amigos e familiares que, mesmo distantes, ofertam do seu carinho e torcem por mim nessa batalha.

Aos Professores do DQI, que colaboraram direta ou indiretamente na execução desse projeto, e em minha formação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, à UFLA e a Universitat Autònoma de Barcelona.

Um agradecimento especial às amigas Lu Lopes e Tássia, que me ajudaram com um espaço para morar após meu retorno da estância doutoral em Barcelona.

Aos novos companheiros de república, Willian e Isaac pelo apoio e carinho nessa etapa de conclusão.

À FAPEMIG pela concessão da bolsa de doutorado e suporte financeiro (projeto CBB-BDS-00284-15).

À minha amada e querida irmã, Patrícia, e minha sobrinha Angelina, mesmo distantes oferecendo todo o incentivo e apoio. E por me compreender tão bem.

Aos meus pais, Irene e João, porque sou como sou graças a eles, por todo incentivo, apoio e amor. E porque são o que existe de mais importante e melhor em minha vida. A quem dedico essa tese.

A todos vocês,

**Muito Obrigado!**

## RESUMO

A 17 $\alpha$ -metiltestosterona (MT) é um andrógeno sintético amplamente empregado na reversão sexual de tilápias. Devido às suas propriedades físico-químicas, a ciclodextrina (CD) utilizada na formação de compostos de inclusão com a MT representa uma nova possibilidade de método para inversão sexual. As hidroxilas, externas à cavidade, permitem sua modificação e estabilização em uma série de suportes, como a sílica por exemplo. Neste trabalho os complexos de inclusão entre a MT e a  $\gamma$ -ciclodextrina (gCD) foram preparados por liofilização e malaxagem, foi realizada a funcionalização da sílica com as CDs  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , feito ensaios de adsorção da MT com o compósito obtido com a  $\beta$ -ciclodextrina (bCD) e também abordado os sistemas de complexação e adsorção com modelos de dinâmica de partículas dissipativas (DPD). Os complexos foram caracterizados por métodos espectroscópicos e análises térmicas. O comportamento do hormônio na presença de gCD foi avaliado quanto à mudança de polaridade do ambiente de solvatação. A avaliação da solubilidade foi realizada pelo método de fases de Higuchi e Connors, cuja associação com a gCD em meio aquoso é bastante favorável, com uma constante de associação,  $K_a$ , de 26000 L mol<sup>-1</sup> e um incremento de 17 vezes na solubilidade do hormônio. A calorimetria diferencial de varredura avaliou a formação dos complexos em estado sólido, cuja fração incluída é de 83% para a formulação obtida por liofilização. As interações existentes entre hospede e hospedeiro foram avaliadas por <sup>1</sup>H RMN e medidas de DOSY, os experimentos de Job Plot indicam que a complexação ocorre na razão molar de 1:1 e a constante de associação obtida por DOSY é de 10970 L mol<sup>-1</sup> (DMSO/D<sub>2</sub>O, 1:3). Experimentos de ROESY 2D foram utilizados para estabelecer a conformação do complexo, que encontra-se totalmente incluso na cavidade hidrofóbica da gCD e tem a carbonila voltada para a face mais ampla do oligossacarídeo, concordando com os cálculos de mecânica molecular e dinâmica molecular. Testes realizados *in vitro* mostraram uma liberação cerca de 40% mais lenta em comparação à MT livre. A funcionalização das CDs à superfície da sílica foi realizada em refluxo utilizando xilol como solvente, com um ancoramento orgânico em torno de 60%, determinado por análise termogravimétrica. O ácido cítrico, empregado na síntese, atua como ligante entre as hidroxilas superficiais da matriz inorgânica e a hidroxila primária dos oligossacarídeos, evidenciado pelas análises de <sup>13</sup>C RMN no estado sólido e a espectroscopia na região do infravermelho. A adsorção de N<sub>2</sub> mostra uma redução da área superficial dos compósitos em relação à sílica não modificada, proporcionalmente ao tamanho das CDs. Os experimentos de adsorção da MT no compósito de bCD apresentaram melhores resultados em pH ácido, e indicam uma cinética rápida, em que as interações envolvidas na adsorção são de natureza física, comprovado pela baixa magnitude no valor de  $\Delta H$  igual a -3,13 kJ mol<sup>-1</sup>. A melhor correlação da adsorção com o modelo de Sips e Langmuir indica a formação de monocamada (complexos com as bCDs funcionalizadas), com capacidade máxima de remoção da MT de 13, 12, 11 e 10 mg g<sup>-1</sup> de compósito, nas temperaturas de 25, 35, 45 e 55°C, respectivamente. O  $\Delta G$  negativo indica a espontaneidade da adsorção, com um  $\Delta S$  de 74,3 J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup> característico do recobrimento da superfície adsorvente. O compósito se mostrou eficiente para a remoção do hormônio em sistema de filtragem em coluna. A dessorção, realizada em etanol, é rápida e deixa o material em perfeitas condições de reuso. Já modelagem por DPD não apresentou resultados conclusivos, possivelmente devido à incongruências ou limitações entre os parâmetros e o modelo para a molécula de MT.

**Palavras-chave:** Ciclodextrina. Metiltestosterona. Compostos de inclusão. Reversão sexual. Adsorção. Funcionalização. Materiais híbridos. Sílica. Dinâmica de Partículas Dissipativas. RMN.

## ABSTRACT

17 $\alpha$ -methyltestosterone (MT) is a synthetic androgen widely employed in the sexual reversion of tilapias. Due to its physico-chemical properties, cyclodextrin (CD) used in the formation of inclusion compounds with MT, represents a new possibility of method for sexual inversion. The hydroxyls, external to the cavity, allow their modification and stabilization in a series of supports, such as silica for example. In this work, the inclusion complexes between MT and  $\gamma$ -cyclodextrin (gCD) were prepared by lyophilization and malaxation, it was made the functionalization of the silica with  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  CDs, adsorption tests of the MT with the composite obtained with the  $\beta$ -cyclodextrin (bCD) were made and also addressed in the complexation and adsorption systems with dissipative particle dynamics (DPD) models. The complexes were characterized by spectroscopic methods and thermal analyzes. The behavior of the hormone in the presence of gCD was evaluated for the polarity change of the solvation environment. The solubility evaluation was performed by the Higuchi and Connors phase method, whose association with gCD in aqueous medium is quite favorable, with an association constant,  $Ka$ , of 26,000 L mol<sup>-1</sup> and an increase of seventeen fold in solubility of the hormone. Differential scanning calorimetry evaluated the formation of the solid state complexes, and the included fraction was 83% for the lyophilized formulation. The host-guest interactions were evaluated by <sup>1</sup>H NMR and DOSY measurements, JobPlot experiments indicated that the complexation occurs in a molar ratio of 1:1 and the association constant obtained by DOSY was 10,970 L mol<sup>-1</sup> (DMSO/D<sub>2</sub>O, 1:3). ROESY 2D experiments were used to obtain the conformation of the complex, which is totally enclosed in the hydrophobic cavity of the gCD and has the carbonyl group facing the wider face of the oligosaccharide, in agreement with the calculations of molecular mechanics and molecular dynamics. Tests performed *in vitro* showed a release about 40% slower compared to free MT. The functionalization of CDs on the silica surface was carried out at reflux using xylene as solvent, with an organic anchoring around 60%, determined by thermogravimetric analysis. Citric acid used in the synthesis acted as a linker between the surface hydroxyls of the inorganic matrix and the primary hydroxyl of the oligosaccharides, evidenced by solid-state <sup>13</sup>C NMR and infrared spectroscopy. The adsorption of N<sub>2</sub> showed a reduction of the surface area of the composites relative to the unmodified silica, in proportion to the size of the CDs. The adsorption experiments of MT in the bCD composite showed better results in acidic pH, and indicated a fast kinetics, in which the interactions involved in the adsorption are of a physical nature, evidenced by the low magnitude in the value of  $\Delta H$  equal to -3.13 kJ mol<sup>-1</sup>. The best adsorption correlation with the Sips and Langmuir model indicated a monolayer formation (complexes with functionalized bCDs), with a maximum removal capacity of MT of 13, 12, 11 and 10 mg g<sup>-1</sup> of composite, at temperatures of 25, 35, 45 and 55 °C, respectively. The negative  $\Delta G$  indicated the spontaneity of the adsorption, with a  $\Delta S$  of 74.3 J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup> characteristic of the coating of the adsorbent surface. The composite was efficient for the removal of the hormone in the column filtration system. Desorption, performed in ethanol, is quick and left the material in perfect reuse condition. DPD modeling did not present conclusive results, possibly due to the incongruences or limitations between the parameters and the model for the MT molecule.

**Keywords:** Cyclodextrin. Methyltestosterone. Inclusion compounds. Sexual reversion. Adsorption. Functionalization. Hybrid materials. Silica. Dissipative Particles Dynamics. NMR.

## SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	09
PRIMEIRA PARTE.....	10
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
2.1 Metiltestosterona.....	12
2.2 Inversão sexual em peixes.....	14
2.3 Ciclodextrinas.....	17
2.4 Caracterização dos complexos de inclusão.....	20
2.4.1 Espectroscopia na região do ultravioleta/visível.....	21
2.4.2 Isotermas de solubilidade.....	21
2.4.3 Calorimetria diferencial exploratória.....	23
2.4.4 Ressonância magnética nuclear (RMN).....	23
2.5 Sílica.....	26
2.6 Adsorção.....	28
2.7 Abordagem teórica para formação de complexos de inclusão com CDs.....	29
Referências.....	33
3 Considerações gerais.....	47
SEGUNDA PARTE - ARTIGOS.....	50
ARTIGO 1 – Complexos de inclusão molecular entre o hormônio metiltestosterona e $\gamma$ -ciclodextrina.....	51
ARTIGO 2 – Incorporação de ciclodextrinas em sílica mesoporosa utilizando ácido cítrico.....	83
ARTIGO 3 – Remoção do hormônio sintético metiltestosterona em solução aquosa usando o composto de $\beta$ -Ciclodextrina e sílica.....	106
ARTIGO 4 – Aplicação da dinâmica de partículas dissipativas (DPD) no entendimento da complexação entre a metiltestosterona e ciclodextrinas.....	134

## APRESENTAÇÃO

Este trabalho de tese está dividido em 2 partes: na primeira, constam a introdução, referencial teórico e considerações gerais, e na segunda parte, constam os resultados dos trabalhos, que estão apresentados sob a forma de artigos. A formatação da primeira parte segue as normas do manual de normalização da UFLA, e a na segunda parte, os artigos seguem as normas das revistas, nas quais serão submetidos.

O estudo foi desenvolvido baseando-se nas propriedades das ciclodextrinas em formarem complexos de inclusão com compostos hidrofóbicos. O composto estudado foi o hormônio esteroide metiltestosterona, amplamente empregado na inversão sexual pela aquicultura. De modo geral a ideia foi avaliar e caracterizar a complexação para futuros testes *in vivo*, com intuito de estabelecer uma técnica que possibilite a inversão com dosagens menores de hormônio, oferecendo um produto mais seguro e que conseqüentemente gere menor impacto ambiental. Dando continuidade ao trabalho, buscou-se produzir e avaliar um adsorvente para remoção dos resíduos desse tipo de esteroide na água.

O Artigo 1 aborda o preparo e caracterização dos complexos de inclusão com a  $\gamma$ -ciclodextrina. Nessa etapa foram determinadas a estequiometria de complexação, solubilidade do hormônio em associação com o oligossacarídeo, fração complexada, conformação do hormônio na cavidade hidrofóbica da ciclodextrina, a liberação *in vitro* e os estudos de dinâmica molecular.

O Artigo 2 aborda a síntese dos compósitos, onde foi empregado o ácido cítrico como agente ligante entre as ciclodextrinas e a sílica. As caracterizações realizadas permitiram conhecer detalhes da área superficial e dos poros do material, o possível mecanismo de funcionalização e o percentual de componentes orgânicos enxertados à sílica.

Com o compósito produzido a partir da  $\beta$ -ciclodextrina, foram realizados os estudos de remoção da metiltestosterona em meio aquoso, descritos no Artigo 3. Neste trabalho foram avaliados a influencia do pH na remoção do hormônio, o efeito da concentração inicial e temperatura, foram realizados os estudos cinéticos e das isotermas de adsorção, determinado os parâmetros termodinâmicos, avaliada a adsorção em coluna, a dessorção e regeneração do hidrido.

O Artigo 4 avalia a modelagem em escala mesoscópica para a molécula de metiltestosterona conjuntamente à avaliação dos parâmetros de repulsão com as ciclodextrinas. As simulações foram avaliadas com modelos *coarse-grain*, em sistema homogêneo e heterogêneo, através de dinâmica de partículas dissipativas (DPD).

## **PRIMEIRA PARTE**

### **1 INTRODUÇÃO**

A população mundial tem experimentado um expressivo e rápido crescimento em decorrência de alguns fatores como o aumento da expectativa de vida e a redução da mortalidade infantil. De acordo com os resultados da revisão de 2017, realizado pelas Nações Unidas, a população mundial atingiu a casa dos 7,6 bilhões em meados no referido ano. As estimativas atuais mostram que anualmente 83 milhões de pessoas estão se somando à população mundial. Assim, mesmo que os níveis de fertilidade continuem a diminuir, a população deverá chegar a 8,6 bilhões em 2030, 9,8 bilhões em 2050 e 11,2 em 2100. Com este elevado contingente populacional também aumenta a demanda por uma maior produção de alimentos e por recursos naturais.

Neste contexto, a indústria pesqueira apresenta um importante papel na produção de alimentos e cada vez mais requer novas tecnologias para a produção de pescado, que vem ganhando um espaço mais continental. Dentre as produções, a tilapicultura tem se tornado alvo de muita polêmica devido à 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.

A  $17\alpha$ -metiltestosterona (MT) é o andrógeno sintético mais largamente utilizado na produção de tilápias. No entanto, assim como o uso em humanos, a rápida absorção da molécula pelo organismo pode ser um fator limitante, que requer a ministração de repetidas doses refletindo também em seus efeitos.

É grande a quantidade de compostos utilizados para fins terapêuticos, na agricultura ou produção animal, por exemplo, que apresentam limitações por alguns problemas em suas formulações que estão, normalmente, relacionados com a biodisponibilidade de seus princípios ativos, fazendo com que atenção considerável seja voltada para o desenvolvimento de novos sistemas para melhoramento e transporte de drogas. Esses sistemas são responsáveis por contornar propriedades físico-químicas limitantes dos compostos encapsulados melhorando a sua ação e os efeitos toxicológicos.

Entre os inúmeros sistemas carreadores estudados atualmente, as ciclodextrinas (CDs) despertam grande interesse por sua capacidade de formar compostos de inclusão com uma variedade de substâncias que têm suas propriedades alteradas pela complexação. A CD, utilizada na formação de complexos de inclusão com a MT, representa uma nova possibilidade de método para a inversão sexual o que justifica o seu estudo.

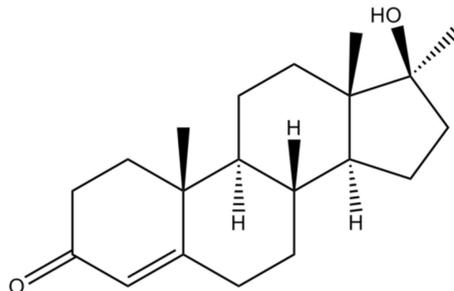
Visando então, essa necessidade de aumentar a produção de alimentos de forma mais sustentável, agredindo o mínimo possível o meio ambiente, este trabalho direciona-se ao desenvolvimento de tecnologias passíveis de aplicação na produção aquícola para reversão sexual de peixes e no tratamento dos resíduos de esteroides gerados. Sendo que as aplicações dos produtos obtidos não necessariamente se condicionam especificamente ao uso em aquicultura. Portanto, este trabalho busca a preparação de complexos de inclusão entre a MT e a gCD, o desenvolvimento de um compósito para tratamento de efluentes contaminados com hormônios, a caracterização dos sistemas trabalhados e a criação de um modelo teórico capaz de simular as complexações com as CDs naturais.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Metiltestosterona

A metiltestosterona (MT, 17 $\beta$ -hidroxi-17 $\alpha$ -metilandrosta-4-en-3-ona) é um andrógeno sintético derivado da testosterona, com fórmula molecular C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub> e massa molar de 302,45 g mol<sup>-1</sup>, cuja estrutura é mostrada na Figura 1. Ocorre na forma de um pó cristalino de coloração branca ou creme, solúvel em vários solventes orgânicos, mas praticamente insolúvel em água. Como não absorve radiação visível (comprimentos de onda > 290 nm) não sofre fotólise direta (PUBCHEM, 2016).

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



Como derivado da testosterona, este esteroide foi bastante utilizado na medicina para o controle da andropausa em homens (BANSAL, 2013). E em mulheres no tratamento de alguns sintomas da menopausa, tratamento de câncer de mama, dores pós-parto e obstrução dos seios. Estudos mostram que a MT pode destruir células malignas (neoplasmas) podendo inibir o crescimento e a disseminação de tumores (DAVIS; WORSLEY, 2014; SARTORELLI; JOHNS, 2013). Também é utilizada como anabolizante para aumento de força e massa muscular, sendo frequentemente detectada em análises de controle “anti doping” (GÓMEZ et al., 2013)

A MT é bastante conhecida pelos seus efeitos como interferente endócrino tanto de organismos vertebrados como invertebrados. Portanto seu uso não se restringe a áreas ligadas à medicina, sendo extensivamente empregada na aquicultura para controle do sexo, induzindo a inversão sexual de peixes para machos (HU et al., 2011; GAO et al., 2015). A indução sexual para reversão do sexo já foi avaliada para 47 espécies de peixes gonocóricos e hermafroditas, os hormônios preferidos para a masculinização e feminização são a 17 $\alpha$ -metiltestosterona e o 17 $\beta$ -estradiol, respectivamente (PANDIAN; SHEELA, 1995). A

administração por via oral da MT é o método mais comum e utilizado com êxito para a produção de populações macho de tilápia, espécie de peixe gonocórico (SINGH, 2013; EL-SAYED; ABDEL-AZIZ; ABDEL-GHANI, 2012). A maior utilização desse andrógeno sintético é devido a sua grande eficácia, facilidade de aquisição, menor custo quando comparado aos outros hormônios e facilidade de excreção após o tratamento (MLALILA, 2015; CNAANI; LEVAVI-SIVAN, 2009).

Aplicações específicas da MT, como a terapia de reposição androgênica, apresentam ainda um grande desafio. A MT tem um período de meia-vida curto, de 2,5 a 3,5 horas (PUBCHEM, 2016), exigindo sua administração em repetidas doses. A farmacocinética do hormônio leva a níveis suprafisiológicos de andrógeno logo após a absorção, seguido de rápido declínio, apresentando assim ampla variabilidade de absorção (ARLT, 2006; SHINOHARA; BABA; KASUYA, 1985).

Estudos farmacocinéticos para o emprego da MT em animais de criação ainda são pouco detalhados, no entanto, assim como ocorre com humanos, o esteroide também deve apresentar essas limitações com animais, pois há relatos da metabolização de mais de 99% do hormônio administrado dentro de algumas horas ou dias (PANDIAN; SHEELA, 1995; MEGBOWON; MOJEKWU, 2014). Dessa forma, os estudos de tecnologias que visem melhorar propriedades específicas do hormônio são de grande interesse do setor, assim como da indústria farmacêutica.

Outro ponto preocupante é com relação ao destino final dos resíduos desse esteroide (MLALILA et al., 2015). A MT possui um  $K_{oc}$  de 1600 (coeficiente de partição do contaminante entre solo-água corrigido pela matéria orgânica do solo), portanto sua mobilidade no solo deve ser baixa e na água é esperada sua absorção em sólidos suspensos e sedimentos. Com um pKa de 19,09 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 possui grupos funcionais que se hidrolisam facilmente sob as condições ambientais (GUEDES-ALONSO et al., 2017; PUBCHEM, 2016).

Hormônios esteroides, tanto naturais como sintéticos, possuem uma grande afinidade para se ligarem aos receptores hormonais e apresentam alto potencial para interromper as funções hormonais normais envolvidas no crescimento, metabolismo ou outras funções de espécies aquáticas e, possivelmente em seres humanos, em que a fase de crescimento é o período mais crítico (MLALILA et al., 2015). Há casos de metabólitos farmacologicamente ativos em efluentes de instalações aquícolas e que requerem devida atenção quanto ao uso de

esteroides em humanos e animais de criação, demandando o desenvolvimento de novas tecnologias, que possam mitigar quantidades utilizadas e propiciar um tratamento adequado para os efluentes gerados (HU et al., 2011; MLALILA et al., 2015; YOUNG et al., 2013).

## 2.2 Inversão sexual em peixes

A produção mundial de pescado tem crescido a cada ano, movimentando um mercado bilhonário. Neste cenário, a pesca de captura tem-se mantido constante e a aquicultura é a responsável pelo aumento crescente no volume de pescados. A Tabela 1 apresenta de forma sucinta a produção e utilização mundial da pesca e aquicultura.

Tabela 1 - Produção e utilização da pesca e aquicultura

	2009	2010	2011	2012	2013	2014
	<i>milhões de toneladas</i>					
<b>PRODUÇÃO</b>						
<b>Captura</b>						
Continental	10,5	11,3	11,1	11,6	11,7	11,9
Marinha	79,7	77,9	82,6	79,7	81,0	81,5
<b>Total captura</b>	<b>90,2</b>	<b>89,1</b>	<b>93,7</b>	<b>91,3</b>	<b>92,7</b>	<b>93,4</b>
<b>Aquicultura</b>						
Continental	34,3	36,9	38,6	42,0	44,8	47,1
Marinha	21,4	22,1	23,2	24,4	25,5	26,7
<b>Total aquicultura</b>	<b>55,7</b>	<b>59,0</b>	<b>61,8</b>	<b>66,5</b>	<b>70,3</b>	<b>73,8</b>
<b>TOTAL PESCA MUNDIAL</b>	<b>145,9</b>	<b>148,1</b>	<b>155,5</b>	<b>157,8</b>	<b>162,9</b>	<b>167,2</b>
<b>UTILIZAÇÃO</b>						
Consumo humano	123,8	128,1	130,8	136,9	141,5	146,3
Uso não alimentar	22,0	20,0	24,7	20,9	21,4	20,9
População (bilhões)	6,8	6,9	7,0	7,1	7,2	7,3
Abastecimento de peixe per capita (kg)	18,1	18,5	18,6	19,3	19,7	20,1

Fonte: FAO, 2016

Como mostrado na Tabela 1, a aquicultura continental se destaca da marinha, com uma produção bem mais elevada, 47,1 contra 26,7 milhões de toneladas em 2014 (FAO, 2016). Dentre os pescados produzidos, a tilapicultura tem chamado a atenção nas últimas décadas pela sua expansão em todo o mundo, assim como a rápida industrialização dos sistemas de produção deste pescado. Como resultado, a produção mundial de tilápia cultivada teve um aumento anual de 13,5% de 1990 a 2010, saltando de 384 mil para 3,5 milhões de

toneladas. (FAO, 2012). A estimativa de crescimento na produção desse pescado aumenta, e juntamente com a carpa e o peixe-gato, deverão representar 60% da produção aquícola mundial até 2025 (FAO, 2016).

A aquicultura no Brasil é bastante favorecida devido ao fato do país possuir coleções hídricas extensas, abundantes e disponíveis, condições climáticas propícias e tecnologia disponível, envolvendo técnicas de criação, equipamentos e insumos. Com esses fatores favoráveis ao desenvolvimento do setor no cenário nacional, a produção aquícola no Brasil é 69,7% continental e segue com projeção de aumento (OLIVEIRA, 2015).

No que se refere ao cultivo de tilápias, é a atividade aquícola mais importante no Brasil, tanto em volume produzido quanto em seu aspecto socioeconômico, com uma produção voltada para o mercado interno, tem grande contribuição na geração de renda e na segurança alimentar. De acordo com a EMBRAPA (2017), o cultivo de tilápia deu um salto de 67.850 para 219.329 toneladas, entre os anos de 2005 a 2015 respectivamente, correspondendo a um aumento de 223%.

Visando uma maior produtividade, o uso de técnicas de masculinização para obtenção de populações monossexo de tilápias é bastante difundida nesse setor. A cultura de tilápias monossexuais, em que os machos são preferidos em detrimento das fêmeas, desempenha papel significativo, pois nos machos, a energia metabólica é canalizada para o crescimento enquanto que nas fêmeas há uma maior atribuição da energia metabólica para reprodução (EL-GREISY; EL-GAMAL, 2012). Os indivíduos macho apresentam taxas de crescimento mais rápidas, maior tolerância a mudanças nas condições ambientais, resistência ao estresse e doenças, conservação da energia mais elevada, agressividade reduzida e maior uniformidade no tamanho da colheita (EL-SAYED; ABDEL-AZIZ; ABDEL-GHANI, 2012).

As populações monossexo de tilápias podem ser obtidas por métodos diretos ou indiretos, dentre os quais se destacam a sexagem manual, a hibridação, a manipulação cromossômica e a inversão hormonal (ABO-AL-ELA, 2018). Mas é a inversão hormonal, a partir da administração oral de andrógenos sintéticos incorporados na ração, o método mais utilizado em usos comerciais (EL-GREISY; EL-GAMAL, 2012; SINGH, 2013; ZANARDI et al., 2011).

O tratamento de reversão hormonal mais comum envolve o fornecimento de uma alimentação incorporada de MT às pós-larvas recém eclodidas, e ainda indiferenciadas sexualmente, produzindo indivíduos que crescem e funcionam reprodutivamente como machos (POPMA; LOVSHIN, 1995). A adição do hormônio à dieta larval normalmente é

feita nas proporções de 30-60 mg de MT por kg de ração, que é ministrada por 21 a 28 dias atribuído ao período crítico de diferenciação das larvas (ABO-AL-ELA, 2018; KUBITZA, 2000). Para um bom desempenho no processo de inversão sexual é recomendado o fornecimento de 5 a 6 arraçoamentos diários, resultando em maior quantidade de machos revertidos (SANCHES; HAYASHI, 2001).

Um rigoroso controle na prática de inversão sexual é preciso para atingir resultados eficazes e sustentáveis. Entretanto, o que se observa é que a quantidade de MT utilizada na prática convencional é grande em comparação a dose efetiva necessária para que ocorra a reversão sexual. Apesar dos peixes produzidos serem seguros para o consumo humano, os riscos ambientais e à saúde humana devem ser enfatizados (MLALILA, 2015). O uso indiscriminado do hormônio pode levar peixes não tratados à inversão sexual quando se utiliza sistemas fechados (SANCHES; HAYASHI, 2001), e caso não haja uma remoção efetiva do hormônio remanescente na água dos tanques de inversão, seu descarte em cursos hídricos pode impactar, através de disfunções endócrinas, uma série organismos. Compostos esteroides têm sido comumente detectados como poluentes, especialmente em agroecossistemas drenados. A MT, por exemplo, pode prejudicar a fecundidade dos peixes em concentrações ambientalmente relevantes, e que diferem de uma espécie pra outra (ABO-AL-ELA, 2018).

Embora haja estudos atestando que os animais submetidos à prática de inversão sexual são seguros à alimentação humana, uma vez que relatam nesses trabalhos que a utilização da MT não resulta em acúmulo de resíduos nos tecidos dos peixes tratados (DRUMMOND; MURGAS; VICENTINI, 2009), é crescente a aversão do público quanto ao uso de compostos esteroides em animais de produção. Em contrapartida, há estudos que mostram níveis elevados de MT no sêrum e músculo de peixes adultos monossexo (SAYED; MONEEB, 2015; ABO-AL-ELA, 2018), elevando o nível de preocupação quanto ao emprego desses hormônios e justificando mais pesquisas na área. Portanto, o desenvolvimento de novos métodos para a manipulação do sexo é considerada de valor estratégico para a aquicultura (REIG; TOLDRÁ, 2008), assim como de métodos para tratamento dos resíduos de esteroides gerados nas pisciculturas.

### 2.3 Ciclodextrinas

Sistemas carreadores são desenvolvidos com o objetivo de entregar a quantidade precisa de droga no sítio alvo, por um período de tempo necessário para que sua ação seja efetiva (TIWARI et al., 2012). Para ajustar as melhores dosagens, contornar propriedades indesejáveis de princípios ativos e favorecer seu desempenho, uma série de biomateriais pode ser empregada. Neste contexto, as ciclodextrinas (CDs) são candidatas em potencial para essa função, devido sua capacidade de alterar propriedades físicas, químicas e biológicas das moléculas convidadas através da formação de complexos de inclusão (UEKAMA, 1998).

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 (VILLIERS, 1891). No entanto os primeiros detalhes de sua preparação, descrição e isolamento foram feitos por Schardinger a partir de 1903 (SCHARDINGER, 1903), e sua capacidade em formar complexos de inclusão apenas foi descrita por Cramer no livro “Einschlussverbindunge”, em 1954 (CRAMER, 1954; LOFTSSON; DUCHENE, 2007).

As CDs são oligossacarídeos cíclicos formados por monômeros de D-(+)-glicopiranoses, unidas por meio de ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 e obtidas a partir da degradação enzimática do amido (enzima ciclodextrina glicosiltransferase) de espécies como a mandioca, batata, milho, trigo *etc.* As CDs  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  são as CDs naturais mais amplamente utilizadas, constituídas por seis, sete e oito resíduos de glicose (Figura 2), cuja obtenção depende do tipo de microorganismo que produz a enzima e das condições de reação (BREWSTER; LOFTSSON, 2007; MURA, 2014; SZEJTLLI, 2013).

Estas macromoléculas possuem estrutura tridimensional na forma de cone truncado cuja cavidade contém um esqueleto carbônico, contendo hidrogênios e oxigênios glicosídicos voltados para o seu interior formando uma zona de alta densidade eletrônica. Grupos hidroxilas secundárias estão situadas na face mais larga, enquanto os grupos hidroxilas primários na face mais estreita. A distribuição dos grupos funcionais que formam a CD confere à sua cavidade um caráter hidrofóbico e um exterior hidrofílico, assegurando sua compatibilidade com sistemas aquosos (BREWSTER; LOFTSSON, 2007; SZEJTLLI, 2013). Algumas propriedades físico-químicas das CDs são descritas na Tabela 2.

Figura 2 - Estrutura química da  $\gamma$ CD, formada por 8 monômeros de glicose e perfil mostrando a cavidade hidrofóbica e o exterior hidrofílico. A  $\alpha$ CD e  $\beta$ CD possuem respectivamente 6 e 7 unidades de glicose.

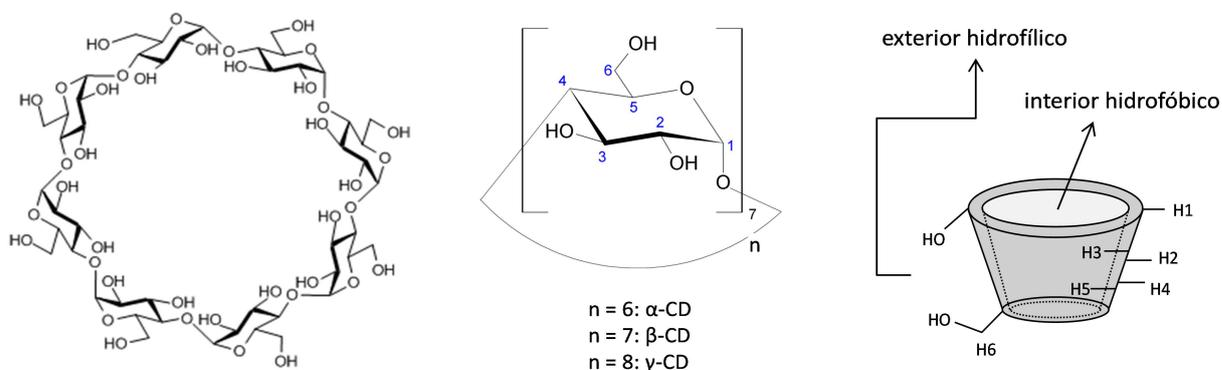


Tabela 2 - Propriedades físico-químicas das CDs.

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

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

Além do tamanho, as moléculas de CDs apresentam distintas solubilidades em água inerentes do número de unidades de glicose, que proporciona diferenças na estrutura conformacional e na flexibilidade do anel. Dentre as CDs naturais, a  $\beta$ CD é a que possui menor solubilidade, e a formação de complexos com compostos lipofílicos geralmente resulta em precipitação dos complexos sólidos se o limite de solubilidade for atingido. As ligações de hidrogênio intramoleculares relativamente fortes entre as hidroxilas secundárias diminuem sua capacidade de formar ligações com as moléculas de água circundante. 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; MURA 2014; LOFTSSON; BREWSTER, 2012).

As CDs naturais são praticamente atóxicas, e vem sendo utilizadas em formulações farmacêuticas a mais de meio século (AKKARI et al., 2016; LOFTSSON E DUCHENE,

2007; ALVAREZ-LORENZO; GARCIA-GONZÁLEZ; CONCHEIRO, 2017). Como apresentam uma notável habilidade para acomodar substâncias hidrofóbicas em sua cavidade, são bastante estudadas para modulação do comportamento físico-químico das moléculas convidadas. No entanto, a grande versatilidade dessas macromoléculas faz com que seu uso não seja exclusividade da indústria farmacêutica, atualmente vem apresentando aplicações também na agricultura (OLIVEIRA et al., 2014; RUBIO-BELLIDO; MORILLO; VILLAVERDE, 2016), na remoção de metais e compostos orgânicos em meio aquoso (ZHAO et al., 2015; KAKHKI, 2015; SHEN et al., 2015), cromatografia (VARGA et al., 2012; FOX et al., 2015), catálise (KUMAR; SHUKLA, 2015), mascaramento de sabores e odores (ZHU et al., 2014), dentre outras aplicações.

A habilidade das CDs em formarem complexos de inclusão é a principal característica dessas macromoléculas, cuja complexação depende essencialmente da compatibilidade estérica e dos critérios de polaridade existentes com a molécula convidada. É em meio aquoso que o potencial multifacetado das CDs pode ser completamente revelado, liberada de sua estrutura cristalina (estado sólido), a cavidade hidrofóbica das CDs está preenchida com moléculas de água (ALVAREZ-LORENZO; GARCIA-GONZÁLEZ; CONCHEIRO, 2017). No entanto, como o microambiente é termodinamicamente desfavorável, as moléculas de água tendem a sair e entrar com dificuldade, a adição de um substrato compatível acaba expulsando essas moléculas de água e ocupa a cavidade (FRÖMMING; SZEJTLI, 1994; VAN DE MANAKKER et al., 2009). O complexo de inclusão formado é um equilíbrio dinâmico, com a molécula hóspede constantemente se associando e desassociando da cavidade da CD, e que é regido pela força da constante de associação (LOFTSSON; BREWSTER, 2012; SZEJTLI, 2013; ASTRAY et al., 2009).

Não é característico da complexação a existência de ligações químicas “formais”, as forças que governam a complexação têm sido atribuídas à entropia favorável quanto à liberação da água de inclusão da 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).

Muitos casos de insucessos no desenvolvimento de novos fármacos se devem a limitações farmacotécnicas, como baixa capacidade de dissolução e permeabilidade (DAVIS; BREWSTER, 2004). As CDs podem colaborar no aumento da absorção dessas moléculas

através de barreiras biológicas, devido sua capacidade em modificar propriedades de moléculas pouco solúveis em água, e serem empregadas como carreadores em formulações de liberação imediata, por exemplo (UEKAMA, 2004). A complexação também pode promover a estabilização da molécula convidada com a diminuição na sublimação e volatilização da mesma (SZEJTLI, 2013; STELLA et al., 1999). Os efeitos mais significantes da inclusão de uma molécula na cavidade das CDs são observados na solubilidade e na liberação do composto complexado. Em consequência disso, a administração de compostos associados a CDs irá influenciar na intensidade e duração dos efeitos esperados para a molécula (FRÖMMING; SZEJTLI, 1994; LOFTSSON; BREWSTER, 2012).

## **2.4 Caracterização dos complexos de inclusão**

A avaliação e caracterização da formação de um complexo de inclusão entre uma molécula convidada e uma CD não é uma tarefa simples e muitas vezes exige a combinação de diferentes métodos analíticos, já que cada método explora uma característica particular do complexo de inclusão. O uso concomitante de diferentes técnicas pode permitir um melhor entendimento das interações hóspede-hospedeiro (MURA, 2014).

As técnicas empregadas normalmente 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 exploratória (DSC), a termogravimetria (TG) e a termogravimetria diferencial (DTG) (LYRA et al., 2010; MURA, 2014; MURA, 2015). A seguir há uma breve descrição das técnicas empregadas neste trabalho para a caracterização dos complexos de inclusão molecular.

### **2.4.1 Espectroscopia na região do ultravioleta/visível**

A espectroscopia na região do ultravioleta e visível é uma técnica não destrutiva eventualmente requerida numa série de análises. É um método simples, rápido e econômico para avaliar a formação de complexos em solução (MURA, 2014). A absorção de radiação em

comprimentos de onda específicos 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 (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2017), no entanto, o método não é específico e pode sofrer da presença de substâncias interferentes (MURA, 2014).

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 absorvidade molar ( $\epsilon$ ).

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

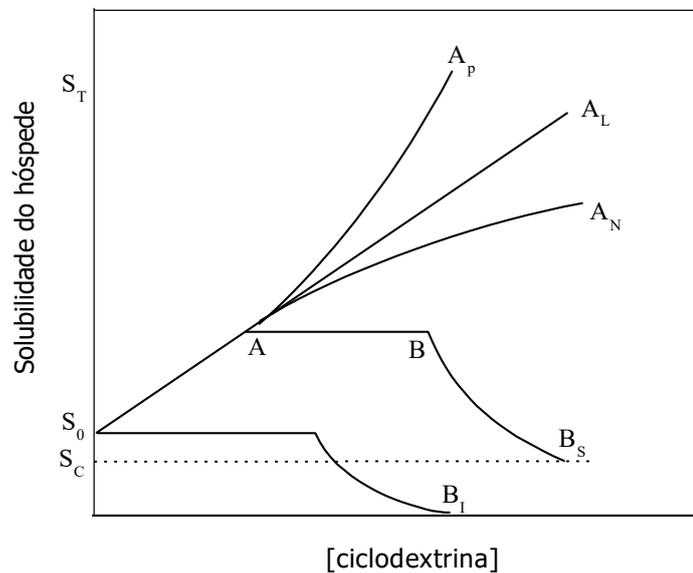
Dependendo da posição do grupo cromóforo da molécula convidada, a transferência da molécula do meio aquoso para a cavidade hidrofóbica da CD pode ocasionar mudanças no modo com que a molécula inclusa absorve a radiação incidente, devido à mudança do ambiente de solvatação e às diferentes interações entre hóspede e hospedeiro. Essas mudanças podem ser visualizadas por alterações na intensidade e deslocamentos hipocrômicos ou batocrômicos das bandas de absorção (LYRA et al., 2010; DODZIUK, 2006; MURA 2014).

#### 2.4.2 Isotermas de solubilidade

Nos processos de complexação é de grande importância o conhecimento da constante de associação ( $Ka$ ), pois esses valores podem inferir quanto ao índice de alterações das propriedades físico-químicas resultantes da inclusão de uma molécula hóspede na cavidade da CD, em especial a solubilidade. A análise de solubilidade de um composto sob efeito de agentes complexantes é uma abordagem tradicional que possibilita tanto a determinação da constante de estabilidade, quanto a visão da estequiometria do equilíbrio (BREWSTER; LOFTSSON; 2007). Higuchi e Connors (1965) descreveram um método, representado por um diagrama de fases (Figura 3), que possibilita avaliar a solubilidade do complexo de inclusão formado tendo como fundamento a variação da solubilidade do soluto com o aumento da concentração da molécula hospedeira, neste caso a CD. De acordo com o complexo de inclusão formado, a solubilidade pode apresentar diversos perfis 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 3.

Figura 3 - 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.



Um tratamento matemático, a depender do perfil de isoterma obtido, pode ser feito e assim determinar os valores para a constante de estabilidade. Se a formação dos complexos ocorrerem na estequiometria de 1:1 a constante,  $K_a$ , pode ser calculada pela razão entre inclinação e intercepto da porção inicial linear do diagrama, como descrito na Equação 2, onde  $S_0$  corresponde à solubilidade intrínseca do hóspede e é igual ao valor obtido para o intercepto.

$$K_a = \frac{\text{inclinação}}{S_0(1 - \text{inclinação})} \quad (2)$$

### 2.4.3 Calorimetria diferencial exploratória

As análises térmicas, em particular a calorimetria diferencial exploratória (DSC) e a análise termogravimétrica (TGA), são bastante difundidas para caracterização de sistemas multicomponentes em estado sólido, incluindo os complexos de inclusão (MURA, 2015). A calorimetria diferencial de varredura fornece informações detalhadas sobre propriedades físicas e energéticas dos compostos de inclusão através da comparação das curvas térmicas de componentes isolados, sua mistura e o complexo formado (MURA 2015; GIORDANO; NOVAK; MOYANO, 2001). 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).

O princípio fundamental do método 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 (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2017).

#### **2.4.4 Ressonância magnética nuclear (RMN)**

A espectroscopia de RMN é considerada uma das técnicas analíticas mais úteis e completas para a elucidação de estruturas orgânicas e é extensivamente empregada para investigar as interações entre CDs e compostos convidados (MURA, 2014). Essas técnicas possibilitam compreender as forças que dirigem a complexação e o modo com o qual ocorrem estas associações não covalentes (SCHNEIDER et al., 1998), também permite a elucidação da conformação do complexo em solução, fornecendo informações específicas sobre a orientação da molécula convidada dentro da cavidade (MURA, 2014).

As variações no ambiente magnético do H (RMN  $^1\text{H}$ ) ou do C (RMN  $^{13}\text{C}$ ) entre as moléculas convidadas, as CDs e o referido complexo, é o experimento de RMN mais comum para obter rapidamente uma evidência direta da inclusão de um convidado na cavidade da CD

(MURA, 2014). A grande maioria das investigações por RMN normalmente iniciam 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, 2016).

Apesar da existência de 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, 2016). Assim, 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. As medidas de DOSY podem fornecer 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 a conformação espacial da molécula incluída na CD (SCHNEIDER et al., 1998).

Com a realização de medidas nas variações de deslocamento químico no espectro de H, por exemplo, em função da variação das proporções molares entre hóspede e hospedeiro, é possível ter uma visão da estequiometria e conformação do complexo formado. No entanto a baixa solubilidade das amostras em água deuterada é um fator limitante para a técnica, exigindo muitas vezes o uso de outros solventes que podem influenciar nas interações hospedeiro-convidado em relação ao meio aquoso simples (MURA, 2014).

A difusão molecular em misturas químicas complexas e soluções multicomponentes pode ser determinada com precisão por espectroscopia de RMN ordenada por difusão (DOSY), as medidas são realizadas através da determinação da atenuação dos sinais de RMN durante uma experiência de graus de campo pulsado (MURA, 2014). A difusão pode ser definida como o movimento de um determinado soluto pelas moléculas de um fluido, cuja difusão pode ser determinada pela Equação de Stokes-Einstein (Equação 3).

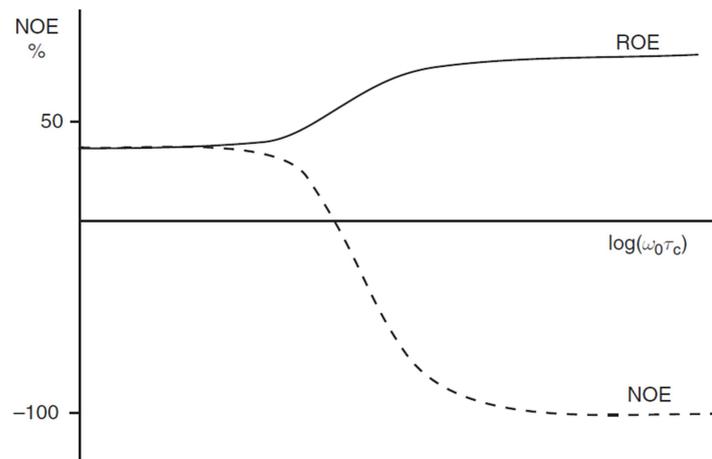
$$D = \frac{k_b T}{6\eta\pi r} \quad (3)$$

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. (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* (SOUZA; LAVERDE JUNIOR, 2002; MORRIS; JOHNSON JUNIOR, 1993).

No que se refere à formação dos complexos de inclusão com CDs é observada uma 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, permitindo a determinação também da constante de associação ( $K_a$ ) (RYMDÉN; CARLFORS; STILBS, 1983; CLARIDGE, 2016).

O efeito nuclear overhauser (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 estrutura tridimensional de uma molécula ou complexo. Os experimentos baseados em NOE realizados em duas dimensões permitem evidenciar no espectro todas as correlações de cruzamento, 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 4), a relaxação cruzada é positiva para todos os valores do tempo de correlação rotacional (CLARIDGE, 2016).

Figura 4 - Dependência do NOE-ROE para um isolado homonuclear em relação a  $\omega_0$  e  $\tau_c$ .



Fonte: CLARIDGE, 2016

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 (MURA, 2014).

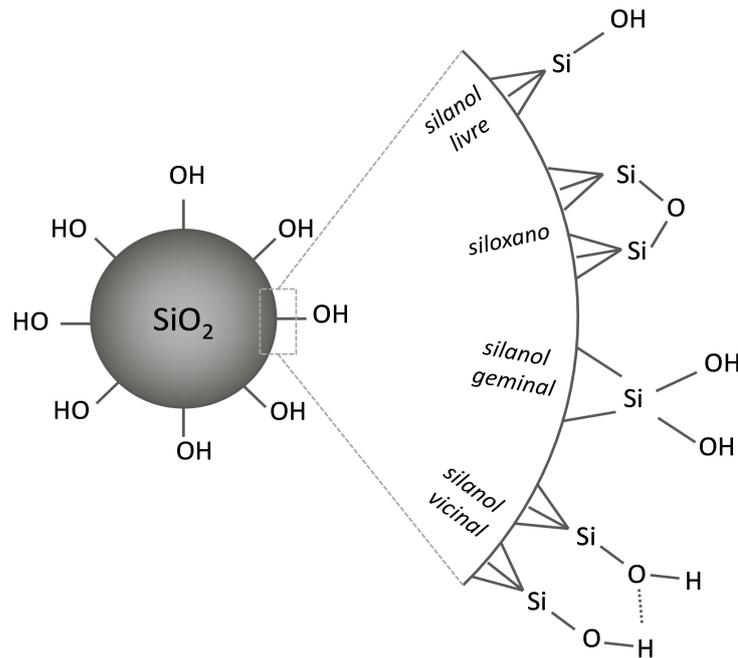
## 2.5 Sílica

O estudo das propriedades de superfície de sólidos inorgânicos, principalmente o dos porosos, tem aumentado consideravelmente, conforme a quantidade de trabalhos que vêm sendo desenvolvidos, visando a modificação físico-química da superfície desses sólidos e a dotação de propriedades específicas. O que atrai os pesquisadores, para modificarem estas superfícies aparentemente inertes, é o aproveitamento dessas propriedades físicas e químicas específicas, para tornar possível o uso dos sólidos modificados em inúmeras áreas (CALVO et al., 2009; WANG et al., 2015).

Tratando-se de processos de descontaminação ambiental, a sílica gel amorfa é, sem dúvida, a mais estudada com uma grande variedade de utilidades, pois a simples ligação covalente estabelecida na superfície do polímero é capaz de produzir materiais com características amplamente desejáveis, como sua aplicação em sistemas de catálise, adsorção (GALARNEAU et al., 2016; KANGO et al., 2013; GIRALDO et al., 2007), fases estacionárias para cromatografia (KHARAISHVILI et al., 2016), processos biotecnológicos (LIU; BU; SHI, 2015), sensores eletroquímicos (HSU et al., 2017), extração de cátions (WANG et al., 2014), troca iônica (LEUNG et al., 2013), dentre outras.

A sílica gel é um composto inorgânico inerte, amorfo, resistente e com alta porosidade. A presença de grupos silanois (Si-OH) em sua superfície (Figura 5) permite sua modificação química, no sentido de produzir novos materiais com aplicações tecnológicas diversas (CASHIN et al, 2018; CORRIU et al., 1996). A funcionalização da sílica com grupos orgânicos é muito importante e pode seguir por diferentes rotas de sínteses, sendo envolvida uma variedade de funções orgânicas inseridas nas cadeias e ancoradas covalentemente ao suporte (AGUADO et al., 2009). A distribuição desigual da densidade eletrônica nos grupos silanois faz com que os mesmos manifestem um comportamento ácido. Desta forma, os sítios ácidos são os responsáveis pelo controle da reatividade que ocorre na superfície da sílica. Assim como apresentado na Figura 5, estes silanois são denominados como vicinais, isolados ou geminais (PRADO; FARIA; PADILHA, 2005).

Figura 5 - Esquema geral da estrutura da sílica gel com seus grupos silanol livre, siloxano, silanol geminal e silanol vicinal.



Uma das maneiras mais usadas para modificar a sílica é através das reações com agentes silantes, que são reagentes bastante específicos e caros. Esses reagentes proporcionam uma série de reações diferentes de imobilização que dão origem aos compostos híbridos inorgânico-orgânicos (CASHIN et al., 2018; TROFYMCHUK; ROIK; BELYAKOVA, 2017). Devido à baixa acidez de Lewis do átomo de silício, a ligação deste suporte com

átomos de carbono tem caráter apolar. Por isso, estes silanos são extremamente eficientes em reações de imobilização e proporcionam a efetiva ligação da parte orgânica do agente com o suporte inorgânico do óxido. Essa ligação só é possível devido à reatividade dos grupos silanois, que são fracamente ácidos, presentes na superfície da sílica (JAL et al., 2004).

O uso de CDs funcionalizadas em sílica já vem sendo estudado e apresentando resultados muito interessantes, como em biomedicina para liberação controlada de drogas utilizadas no controle de células tumorais (BADRUDDOZA et al., 2013), na separação de moléculas de colesterol de alimentos (SINHA et al., 2015), no tratamento de contaminantes emergentes (CARVALHO et al., 2014; BHATTARAI; MURUGANANDHAM; SURI, 2014), dentre inúmeras outras aplicações. A infinidade de possibilidades quanto ao uso desse tipo de material torna necessário o desenvolvimento de métodos menos onerosos para a funcionalização, principalmente no que se refere aos agentes ligantes. Além de avaliar as propriedades para novas aplicações.

## 2.6 Adsorção

A adsorção é um fenômeno no qual um soluto, posto em contato com uma superfície sólida, é acumulado na interface do material. O material inicialmente adsorvido é o adsorvato, e o material onde se faz a remoção é chamado adsorvente (ROUQUEROL et al., 2013).

A adsorção tem se destacado como um processo de separação e remoção de determinados poluentes de efluentes industriais sejam eles metais pesados ou de natureza orgânica (WANG; CHEN, 2015; YU et al., 2015; CRINI, 2005 e 2006), como os esteroides. Os princípios para um processo de adsorção eficiente são baseados na escolha de um adsorvente com alta seletividade, alta capacidade, longa vida e disponibilidade em grandes quantidades a um baixo custo (FIGUEIREDO et al., 2000). Os principais fatores que influenciam o equilíbrio de adsorção são a estrutura porosa do sólido, sua heterogeneidade e propriedades químicas superficiais. O fenômeno de adsorção também depende das diferenças entre as propriedades químicas do solvente e adsorvato (CRINI, 2006; SALEH; GUPTA, 2014).

Existem dois processos de adsorção que podem ser caracterizados de acordo com as forças envolvidas: a adsorção física (fisiossorção) e a adsorção química (quimiossorção). Na adsorção física as moléculas adsorvidas são retidas na superfície por forças fracas de van der

Waals e a formação da multicamada é possível. Na adsorção química, uma única camada de moléculas, átomos ou íons é formada na superfície do adsorvente por ligações químicas (ROUQUEROL et al., 2013).

A classificação da adsorção normalmente é feita pelas cinéticas e isotermas de adsorção, usadas na modelagem do fenômeno permitindo a determinação dos parâmetros relacionados ao equilíbrio do processo. São curvas que determinam e apresentam os dados de equilíbrio de adsorção de um adsorvente específico à temperatura constante (RUSSO et al., 2016).

Um dos materiais mais amplamente empregados em processos de adsorção é o carvão ativado (SALEH; GUPTA, 2014), porém o carvão ativado não possui alta seletividade, seu valor de mercado é relativamente alto e o processo de reciclagem é bastante dispendioso, além de não regenerar o material com as mesmas características iniciais, levando a perdas na sua capacidade de adsorção (BHATNAGAR; MINOCHA, 2006). Tais aspectos fazem com que estudos sobre novos materiais adsorventes estejam sendo desenvolvidos, tais como, sílica gel (WANG et al., 2014), quitosana (ZHAO et al., 2014), derivados de celulose (GOEL et al., 2015), argilas e alguns polímeros (COTTET et al., 2014; WESTON et al., 2014) e também as CDs (KYZAS; LAZARIDIS; BIKIARIS, 2013; BHATTARAI; MURUGANANDHAM; SURI, 2014).

## **2.7 Abordagem teórica para formação de complexos de inclusão com CDs**

Estudos 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 as CDs fornecem importantes informações a respeito da estabilidade decorrente da interação convidado/hospedeiro. Inúmeros trabalhos são realizados buscando avaliar a capacidade de complexação de compostos com as CDs, conhecer as energias envolvidas e a conformação adotada pelo complexo após a inclusão (WANG; HOU; XU, 2006; LIPKOWITZ 1998). Compostos como a atrazina (PEREIRA et al., 2015), sulfadimetoxina (RAJENDIRAN; SIVA, 2014), praziquantel (OLIVEIRA; FERREIRA; MOTA, 2016), sulfanilamida (VENKATESH et al., 2013), dentre outros, já foram estudados em complexos de inclusão com CDs empregando-se métodos de modelagem molecular.

Dentre os métodos disponíveis para a modelagem molecular, os clássicos, que inclui os métodos da mecânica molecular e da dinâmica molecular, e os quânticos, que inclui os métodos *ab initio* e semi-empíricos, têm sido as aproximações mais rotineiramente utilizadas. A opção entre uma ou outra aproximação irá depender de quais propriedades se pretende avaliar, da precisão desejada e da capacidade computacional disponível para a realização dos cálculos (SANT'ANNA, 2009).

Os cálculos utilizando mecânica molecular tem despertado um crescente interesse da comunidade acadêmica, em função da aprimoração dos métodos e do melhor desempenho dos computadores disponíveis. Esse tipo de modelagem molecular é relativamente simples, pois permite o estudo de sistemas, como àqueles contendo CDs, em menor tempo que os ensaios experimentais e os métodos quânticos, além disso, podem ser realizados em computadores pessoais, o que resulta em cálculos computacionais baratos e práticos (YOUNG, 2004).

Enquanto a mecânica quântica trata da descrição matemática do comportamento dos elétrons, prevendo propriedades de um átomo ou molécula, usando função de onda ou densidade eletrônica, a mecânica molecular consiste na utilização de uma equação mais simples para a energia de um composto. As constantes utilizadas nessa equação são obtidas a partir de dados espectroscópicos ou cálculos *ab initio*, cujo conjunto de equações com suas constantes associadas é denominado de campo de força, do inglês “*force field*”. Para a grande maioria dos casos, o interesse é encontrar geometrias de moléculas estáveis e/ou diferentes conformações, inclusive a interconversão entre elas. O problema é então reduzido a encontrar mínimos de energia, e possivelmente também alguns pontos de sela de primeira ordem, na superfície de energia potencial (JENSEN, 2017).

Na mecânica molecular as moléculas são descritas como uma coleção de átomos de diferentes tamanhos e “maciez”, e ligados entre si por forças elásticas ou harmônicas, de forma mais simplista, ligações com diferentes tamanhos e “rigidez”. As forças envolvidas são descritas pelas funções de energia potencial das contribuições estruturais, por exemplo os comprimentos de ligação ( $r$ ), ângulos de ligação ( $\theta$ ), ângulos diedros ( $\phi$ ) e interações não ligadas ( $d$ ). O conjunto destas funções é conhecido como campo de força empírico, e representa a energia potencial molecular em relação a uma geometria de referência, em um determinado sistema de coordenadas, como mostra a Equação 4 (COELHO et al., 1998; JENSEN, 2017).

$$U = \sum U(r) + \sum U(\theta) + \sum U(\phi) + \sum U(d) + \dots \quad (4)$$

Assim, a energia,  $U$ , de uma molécula é a soma de todas as contribuições de energia, também conhecida como energia estérica da molécula. Outros tipos de interações que influenciam nos valores de energia, como as interações eletrostáticas ou ligações de hidrogênio, também podem ser adicionadas ao campo de força, bem como as interações cruzadas, as quais consideram certo número de interações entre comprimentos de ligação, ângulos de ligação e diedros, interações carga-carga e dipolo-dipolo. A escolha do número ou tipo de funções de energia potencial a serem utilizados é feita com base nas propriedades moleculares que se queira reproduzir, permitindo cálculos das propriedades geométricas, vibracionais e termodinâmicas (COELHO et al., 1998).

A dinâmica molecular é uma extensão da mecânica molecular, cujas simulações facilitam a compreensão a nível microscópico e as escalas de tempo de mecanismos, que muita das vezes só é passível da observação macroscópica no laboratório. Normalmente, se fornece um palpite sobre as interações entre as moléculas e são obtidas as previsões de suas propriedades em massa. Assim, essas simulações atuam como uma ponte entre a teoria e prática. A simulação de dinâmica molecular consiste na solução numérica das equações clássicas de movimento, que para um sistema simples pode ser descrito de acordo com as Equações 5 e 6 (ALLEN, 2004).

$$m_i \ddot{r}_i = f_i \quad f_i = -\frac{\partial}{\partial r_i} U \quad (5 \text{ e } 6)$$

Onde deve ser possível o cálculo das forças que atuam nos átomos, que geralmente são derivadas de uma energia potencial  $U(r^N)$ , em que  $r^N = (r_1, r_2, \dots, r_N)$  representa o conjunto completo de coordenadas atômicas  $3N$  (ALLEN, 2004).

Outro método de modelagem abordado neste trabalho de tese é o da dinâmica de partículas dissipativas (DPD). A DPD trata-se de um método de simulação mesoscópica, introduzido para descrever o comportamento hidrodinâmico complexo, como uma alternativa às simulações de dinâmica molecular contemplando todos os átomos presentes, e que para sistemas grandes apresentem limitações como o tempo gasto para obtenção dos resultados. A dinâmica molecular fornece muitos detalhes do movimento real das moléculas em um fluido, enquanto que, se o interesse é no comportamento hidrodinâmico, pode ser adotado um olhar mais grosseiro ao sistema. Dessa forma, em DPD as partículas são consideradas como porções

de moléculas agrupadas para formar uma partícula fluída, e não moléculas em um fluído simples (ESPAÑOL; WARREN, 1995). Nesse tipo de simulação, um conjunto de átomos pode ser agrupado, de maneira a formar uma única entidade, os *beads*, reduzindo assim o número de variáveis do sistema. Conseqüentemente, podem ser realizadas simulações com moléculas grandes em períodos de tempo bastante razoáveis (ESPAÑOL, 2005).

A técnica de simulação de DPD é baseada na simulação de esferas macias (*beads*), cujo movimento é regido por certas regras de colisão. Nesse sistema, as partículas interagem por três forças, sendo uma força conservativa ( $F_C$ ), uma força dissipativa ( $F_D$ ) e uma força aleatória ( $F_R$ ), sendo que, as forças dissipativa e aleatória têm que satisfazer a uma certa relação, para que o sistema apresente a mecânica estatística correspondente ao conjunto canônico, com uma temperatura relacionada às amplitudes relativas das interações aleatórias e dissipativas (GROOT WARREN, 1997). O somatório dessas três forças (Equação 7), corresponde à força total de uma dada partícula (ESPAÑOL; WARREN, 1995).

$$f_i = \sum_{j \neq i} F_{ij}^C + \sum_{j \neq i} F_{ij}^D + \sum_{j \neq i} F_{ij}^R \quad (7)$$

Dessa forma, esse tipo de modelagem pode servir para a modelagem dos estudos de complexação entre a MT e as CDs livres e funcionalizadas em sílica, ampliando o conhecimento a nível mesoescalar e fornecendo dados e modelos para simulações das CDs com outros compostos.

## REFERÊNCIAS

- ABO-AL-ELA, H. G. Hormones and fish monosex farming: A spotlight on immunity. **Fish & shellfish immunology**, v. 72, p. 23-30, 2018.
- AGUADO, J. et al. Aqueous heavy metals removal by adsorption on amine-functionalized mesoporous silica. **Journal of Hazardous Materials**, v.163, p.213-221, 2009.
- AKKARI, A. C. S. et al. Budesonide-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex in binary poloxamer 407/403 system for ulcerative colitis treatment: A physico-chemical study from micelles to hydrogels. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 138, p. 138-147, 2016.
- ALLEN, M. P. Introduction to molecular dynamics simulation. **Computational soft matter: from synthetic polymers to proteins**, v. 23, p. 1-28, 2004.
- ALVAREZ-LORENZO, C.; GARCÍA-GONZÁLEZ, C. A.; CONCHEIRO, A. Cyclodextrins as versatile building blocks for regenerative medicine. **Journal of Controlled Release**, v. 268, p. 269-281, 2017.
- ARLT, W. Androgen therapy in women. **European Journal of Endocrinology**, v. 154, n. 1, p. 1-11, 2006.
- ASTRAY, G. et al. A review on the use of cyclodextrins in foods. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 7, p. 1631-1640, 2009.
- BADRUDDOZA, A.Z.M. et al. Synthesis of carboxymethyl- $\beta$ -cyclodextrin conjugated magnetic nano-adsorbent for removal of methylene blue. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.367. p.85-95, 2010.
- BANSAL, V. P. Andropause a clinical entity. **Journal of Universal College of Medical Sciences**, v. 1, n. 2, p. 54-68, 2013.

BHATNAGAR, A.; MINOCHA, A.K. Conventional and non-conventional adsorbents for removal pollutants from water – a review. **Indian Journal of Chemical Technology**, v.13, p.203-217, 2006.

BHATTARAI, B.; MURUGANANDHAM, M.; SURI, R. P. S. Development of high efficiency silica coated  $\beta$ -cyclodextrin polymeric adsorbent for the removal of emerging contaminants of concern from water. **Journal of hazardous materials**, v. 273, p. 146-154, 2014.

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

BREWSTER, M. E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Advanced drug delivery reviews**, v. 59, n. 7, p. 645-666, 2007.

CALVO, A. et al. Mesoporous films and polymer brushes helping each other to modulate ionic transport in nanoconfined environments. An interesting example of synergism in functional hybrid assemblies. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 31, p. 10866-10868, 2009.

CARVALHO, L. B. et al. Cyclodextrin/silica hybrid adsorbent for removal of methylene blue in aqueous media. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 78, n. 1-4, p. 77-87, 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**, v. 74, n. 1-4, p. 375-381, 2012.

CASHIN, V. B. et al. Surface functionalization and manipulation of mesoporous silica adsorbents for improved removal of pollutants: a review. **Environmental Science: Water Research & Technology**, 2018. DOI: 10.1039/c7ew00322f

CLARIDGE, Timothy DW. **High-resolution NMR techniques in organic chemistry**. Elsevier, 2016.

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

COELHO, L. W. et al. Aplicação de mecânica molecular em química inorgânica. **Química Nova**, v. 22, n. 3, 1999.

CORRIU, R.J.P. et al. Hybrid sílica gels containing 1,3-butadiyne bridging units. Thermal and chemical reactivity of the organic fragment, **Chemical Materials**, v. 8, p. 100-106, 1996.

COTTET, L. et al. Adsorption characteristics of montmorillonite clay modified with iron oxide with respect to methylene blue in aqueous media. **Applied Clay Science**, v. 95, p. 25-31, 2014.

CRAMER, F. **Einschlussverbindungen**. Berlin: Springer, 1954.

CRINI, G. Non-conventional low-cost adsorbents for dye removal: a review. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1061-1085, 2006.

CRINI, G. Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbent in wastewater treatment. **Progress in Polymer Science**, v. 30, p. 38-70, 2005.

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

DAVIS, S. R.; WORSLEY, R. Androgen treatment of postmenopausal women. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 142, p. 107-114, 2014.

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

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**, v. 33, n. 3, p. 895-902, 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**, v. 38, n. 1, p. 59-66, 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**, v. 360-361, p. 58-63, 2012.

EMBRAPA, Produção de tilápia no Brasil cresce 223% em dez anos, <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/21621836/producao-de-tilapia-no-brasil-cresce-223-em-dez-anos>. Acessado em 18/12/2017

ESPAÑOL, P. Dissipative particle dynamics. **Handbook of Materials Modeling**, p. 2503-2512, 2005.

ESPAÑOL, P.; WARREN, P. Statistical mechanics of dissipative particle dynamics. **EPL (Europhysics Letters)**, v. 30, n. 4, p. 191, 1995.

FAO. (2012). The State of World Fisheries and Aquaculture 2012. Rome. 209 pp.

FAO. (2016). The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all. Rome. 200 pp.

FIGUEIREDO, S.A.; BOAVENTURA, R.A.; LOUREIRO, J.M. Color removal with natural adsorbents: modeling, simulation and experimental. **Separation and Purification Technology**, v. 20, p. 129-141, 2000.

FOX, S. et al. Gas chromatographic separation of stereoisomers of non-protein amino acids on modified  $\gamma$ -cyclodextrin stationary phase. **Journal of Chromatography A**, v. 1411, p. 101-109, 2015.

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

GALARNEAU, A. et al. Hierarchical porous silica monoliths: A novel class of microreactors for process intensification in catalysis and adsorption. **Comptes Rendus Chimie**, v. 19, n. 1, p. 231-247, 2016.

GAO, J. et al. Effects of 17  $\alpha$ -methyltestosterone on transcriptome, gonadal histology and sex steroid hormones in rare minnow *Gobiocypris rarus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics**, v. 15, p. 20-27, 2015.

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

GIRALDO, L. F. et al. Mesoporous silica applications. In: **Macromolecular symposia.** WILEY-VCH Verlag, 2007. p. 129-141.

GOEL, N. K. et al. Cellulose based cationic adsorbent fabricated via radiation grafting process for treatment of dyes waste water. **Carbohydrate polymers**, v. 132, p. 444-451, 2015.

GÓMEZ, C. et al. Alternative long-term markers for the detection of methyltestosterone misuse. **Steroids**, v. 78, n. 1, p. 44-52, 2013.

GROOT, R. D.; WARREN, P. B. Dissipative particle dynamics: Bridging the gap between atomistic and mesoscopic simulation. **The Journal of chemical physics**, v. 107, n. 11, p. 4423-4435, 1997.

GUEDES-ALONSO, R.; SOSA-FERRERA, Z.; SANTANA-RODRÍGUEZ, J. J. Determination Of Steroid Hormones In Fish Tissues By Microwave-Assisted Extraction Coupled To Ultra-High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. **Food Chemistry**, v. 237, p. 1012-1020, 2017.

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**, v. 89, n. 6, p. 780-783, 2012.

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

HSU, S. et al. Electrochemical Sensor Constructed Using a Carbon Paste Electrode Modified with Mesoporous Silica Encapsulating PANI Chains Decorated with GNPs for Detection of Ascorbic Acid. **Electrochimica Acta**, v. 238, p. 246-256, 2017.

HU, X. et al. Adsorption and heterogeneous Fenton degradation of 17 $\alpha$ -methyltestosterone on nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/MWCNTs in aqueous solution. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 107, n. 3, p. 274-283, 2011.

JAL, P.K.; PATEL, S.; MISHRA, B.K. Chemical modification of silica surface by immobilization of functional groups for extractive concentration of metal ions. **Talanta**, v.62, p.1005-1028, 2004.

JENSEN, Frank. **Introduction to computational chemistry**. John wiley & sons, 2017.

KAKHKI, R. M. Application of magnetic nanoparticles modified with cyclodextrins as efficient adsorbents in separation systems. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 82, n. 3-4, p. 301-310, 2015.

KANGO, S. et al. Surface modification of inorganic nanoparticles for development of organic–inorganic nanocomposites—a review. **Progress in Polymer Science**, v. 38, n. 8, p. 1232-1261, 2013.

KHARAISHVILI, Q. et al. Further proof to the utility of polysaccharide-based chiral selectors in combination with superficially porous silica particles as effective chiral stationary phases for separation of enantiomers in high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1467, p. 163-168, 2016.

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

KUMAR, A.; SHUKLA, R. D.  $\beta$ -Cyclodextrin catalysed C–C bond formation via C (sp<sup>3</sup>)–H functionalization of 2-methyl azaarenes with diones in aqueous medium. **Green Chemistry**, v. 17, n. 2, p. 848-851, 2015.

KYZAS, G. Z.; LAZARIDIS, N. K.; BIKIARIS, D. N. Optimization of chitosan and  $\beta$ -cyclodextrin molecularly imprinted polymer synthesis for dye adsorption. **Carbohydrate polymers**, v. 91, n. 1, p. 198-208, 2013.

LEUNG, P. K. et al. Preparation of silica nanocomposite anion-exchange membranes with low vanadium-ion crossover for vanadium redox flow batteries. **Electrochimica Acta**, v. 105, p. 584-592, 2013.

LIPKOWITZ, K. B. Applications of computational chemistry to the study of cyclodextrins. **Chemical reviews**, v. 98, n. 5, p. 1829-1874, 1998.

LIU, J.; BU, W.; SHI, J. Silica coated upconversion nanoparticles: A versatile platform for the development of efficient theranostics. **Accounts of chemical research**, v. 48, n. 7, p. 1797-1805, 2015.

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

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M. E. Cyclodextrins as functional excipients: methods to enhance complexation efficiency. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 101, n. 9, p. 3019-3032, 2012.

LOFTSSON, T.; DUCHENE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **International journal of pharmaceutics**, v. 329, n. 1, p. 1-11, 2007.

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

MEGBOWON, I.; MOJEKWU, T. O. Tilapia Sex Reversal Using Methyl Testosterone (MT) and its Effect on Fish, Man and Environment. **Biotechnology**, v. 13, n. 5, p. 213, 2014.

MLALILA, N. et al. Human food safety and environmental hazards associated with the use of methyltestosterone and other steroids in production of all-male tilapia. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 7, p. 4922-4931, 2015.

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**, v. 115, n. 10, p. 4291-4299, 1993.

MURA, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: a review. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 101, p. 238-250, 2014.

MURA, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in the solid state: A review. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 113, p. 226-238, 2015.

OLIVEIRA, C. X.; FERREIRA, N. S.; MOTA, G. V. S. A DFT study of infrared spectra and Monte Carlo predictions of the solvation shell of Praziquantel and  $\beta$ -cyclodextrin inclusion

complex in liquid water. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 153, p. 102-107, 2016.

OLIVEIRA, J. L. et al. Application of nanotechnology for the encapsulation of botanical insecticides for sustainable agriculture: prospects and promises. **Biotechnology advances**, v. 32, n. 8, p. 1550-1561, 2014.

OLIVEIRA, R. C. O panorama da aquicultura no Brasil: a prática com foco na sustentabilidade. **Revista INTERTOX de toxicologia, risco ambiental e sociedade**, v. 2, n. 1, 2015.

PANDIAN, T. J.; SHEELA, S. G. Hormonal induction of sex reversal in fish. **Aquaculture**, v. 138, n. 1, p. 1-22, 1995.

PEREIRA, R. A. et al. Stability and spatial arrangement of the 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid and  $\beta$ -cyclodextrin inclusion compound: a theoretical study. **Chemical Physics Letters**, v. 633, p. 158-162, 2015.

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

PRADO, A.G.S.; FARIA, E.A.; PADILHA, P.M. Aplicação e modificação química da sílica gel obtida de areia. **Química Nova**, v.28, n.3, p.544-547, 2005.

PUBCHEM. **Methyltestosterone**. Bethesda, 2016. Disponível em: <<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=6010>>. Acesso em: 05 jan. 2016.

RAJENDIRAN, N.; SIVA, S. Inclusion complex of sulfadimethoxine with cyclodextrins: Preparation and characterization. **Carbohydrate polymers**, v. 101, p. 828-836, 2014.

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

ROUQUEROL, J. et al. **Adsorption by powders and porous solids: principles, methodology and applications**. Academic press, 2013.

RUBIO-BELLIDO, M.; MORILLO, E.; VILLAVERDE, J. Effect of addition of HPBCD on diuron adsorption–desorption, transport and mineralization in soils with different properties. **Geoderma**, v. 265, p. 196-203, 2016.

RUSSO, V. et al. Fluid-solid adsorption in batch and continuous processing: a review and insights on the modelling. **Chemical Engineering & Technology**, v. 40, n. 5, p. 799-820, 2016.

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**, v. 1, n. 2, p. 159-167, 1983

SALEH, T.; GUPTA, V. K. Processing methods, characteristics and adsorption behavior of tire derived carbons: a review. **Advances in colloid and interface science**, v. 211, p. 93-101, 2014.

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**, v. 23, n. 4, p. 871-876, 2001.

SANT'ANNA, C. M. Métodos de modelagem molecular para estudo e planejamento de compostos bioativos: Uma introdução. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 1, p. 49-57, 2009.

SARTORELLI, A. C.; JOHNS, D. G. **Antineoplastic and immunosuppressive agents**. Springer Science & Business Media, 2013.

SAYED, Alaa El-Din H.; MONEEB, Rehab H. Hematological and biochemical characters of monosex tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758) cultivated using methyltestosterone. **The Journal of Basic & Applied Zoology**, v. 72, p. 36-42, 2015.

SCHARDINGER, Franz. Über thermophile Bakterien aus verschiedenen Speisen und Milch. **Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A**, v. 6, n. 19, p. 865-880, 1903.

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

SHEN, Hai-Min et al. Fast adsorption of p-nitrophenol from aqueous solution using  $\beta$ -cyclodextrin grafted silica gel. **Applied Surface Science**, v. 356, p. 1155-1167, 2015.

SHINOHARA, Y.; BABA, S.; KASUYA, Y. Quantitative determination of methyltestosterone and methyltestosterone-d3 in serum by gas chromatography—mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 338, p. 281-288, 1985.

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

SINHA, A. et al.  $\beta$ -Cyclodextrin Functionalized Magnetic Mesoporous Silica Colloid for Cholesterol Separation. **ACS applied materials & interfaces**, v. 7, n. 2, p. 1340-1347, 2015.

SKOOG, Douglas A.; HOLLER, F. James; CROUCH, Stanley R. **Principles of instrumental analysis**. Cengage learning, 2017.

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**, v. 25, n. 6, p. 1022-1026, 2002.

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

SZEJTLI, J. **Cyclodextrin technology**. Springer Science & Business Media, 2013.

TIWARI, G. et al. Drug delivery systems: An updated review. **International journal of pharmaceutical investigation**, v. 2, n. 1, p. 2, 2012.

TROFYMCHUK, I.; ROIK, N.; BELYAKOVA, L. Structural Variety and Adsorptive Properties of Mesoporous Silicas with Immobilized Oligosaccharide Groups. **Nanoscale Research Letters**, v. 12, n. 1, p. 307, 2017.

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

UNITED NATIONS, Department of Economic and Social Affairs, Population Division. World Population Prospects: The 2017 Revision, Key Findings and Advance Tables. Working Paper No. ESA/P/WP/248, 2017.

VAN DE MANAKKER, F. et al. Cyclodextrin-based polymeric materials: synthesis, properties, and pharmaceutical/biomedical applications. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 12, p. 3157-3175, 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**, v. 70, p. 71-76, 2012.

VENKATESH, G. et al. Inclusion complexes of sulphanilamide drugs and  $\beta$ -cyclodextrin: a theoretical approach. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 77, n. 1-4, p. 309-318, 2013.

VILLIERS, A. Sur la fermentation de la fécule par l'action du ferment butyrique (Compt. rend. de l'acad. Paris t. CXII, 1891, p. 536).

WANG, J.; CHEN, B. Adsorption and coadsorption of organic pollutants and a heavy metal by graphene oxide and reduced graphene materials. **Chemical Engineering Journal**, v. 281, p. 379-388, 2015.

WANG, J.; HOU, T.; XU, X. Recent advances in free energy calculations with a combination of molecular mechanics and continuum models. **Current Computer-Aided Drug Design**, v. 2, n. 3, p. 287-306, 2006.

WANG, Q. et al. Simultaneous adsorption of Cu (II) and  $\text{SO}_4^{2-}$  ions by a novel silica gel functionalized with a ditopic zwitterionic Schiff base ligand. **Chemical Engineering Journal**, v. 250, p. 55-65, 2014.

WANG, Q. et al. Simultaneous adsorption of Cu (II) and  $\text{SO}_4^{2-}$  ions by a novel silica gel functionalized with a ditopic zwitterionic Schiff base ligand. **Chemical Engineering Journal**, v. 250, p. 55-65, 2014.

WANG, Y. et al. Mesoporous silica nanoparticles in drug delivery and biomedical applications. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 11, n. 2, p. 313-327, 2015.

WESTON, M. H. et al. High propylene/propane adsorption selectivity in a copper (catecholate)-decorated porous organic polymer. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 2, n. 2, p. 299-302, 2014.

YOUNG, D. **Computational chemistry: a practical guide for applying techniques to real world problems**. John Wiley & Sons, 2004.

YOUNG, R. B. et al. Direct photodegradation of androstenedione and testosterone in natural sunlight: inhibition by dissolved organic matter and reduction of endocrine disrupting potential. **Environmental science & technology**, v. 47, n. 15, p. 8416-8424, 2013.

YU, Jin-Gang et al. Graphene nanosheets as novel adsorbents in adsorption, preconcentration and removal of gases, organic compounds and metal ions. **Science of the Total Environment**, v. 502, p. 70-79, 2015.

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

ZHAO, F. et al. EDTA-cross-linked  $\beta$ -cyclodextrin: an environmentally friendly bifunctional adsorbent for simultaneous adsorption of metals and cationic dyes. **Environmental science & technology**, v. 49, n. 17, p. 10570-10580, 2015.

ZHAO, J. et al. Chitosan-coated mesoporous microspheres of calcium silicate hydrate: environmentally friendly synthesis and application as a highly efficient adsorbent for heavy metal ions. **Journal of colloid and interface science**, v. 418, p. 208-215, 2014.

ZHU, Guangyong et al. Study of production and pyrolysis characteristics of sweet orange flavor- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex. **Carbohydrate polymers**, v. 105, p. 75-80, 2014.

### 3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

As CDs são macromoléculas com amplo espectro de aplicação na complexação com substratos, capazes de alterar suas propriedades físico-químicas, entregar princípios ativos em sítios alvo, modular a liberação e melhorar a biodisponibilidade desses compostos. E a associação desses oligossacarídeos com sistemas poliméricos, como a sílica, confere novas finalidades para o compósito, às quais não seriam possíveis com os sistemas isolados.

Neste estudo foram preparados e caracterizados os complexos de inclusão entre a gCD e a MT. A liofilização é, sem sombra de dúvidas, o melhor método de preparo para esse tipo de complexo em detrimento do preparo por malaxagem. Os estudos avaliaram que a complexação é bastante favorável, apresentando uma constante de associação ( $K_a$ ) em meio aquoso de  $26.600 \text{ L mol}^{-1}$ . Os resultados de Dinâmica Molecular concordam com os resultados experimentais, para uma complexação na razão molar de 1:1, a molécula de MT é totalmente incluída na cavidade hidrofóbica da gCD, e a extremidade do esteroide que apresenta o grupamento carbonila permanece voltado para a cavidade mais ampla do oligossacarídeo. A complexação promove um incremento de solubilidade para a MT de 17 vezes, e as frações complexadas em meio aquoso e no estado sólido apresentaram valores bastante semelhantes, 86 e 83% respectivamente. Os ensaios de liberação *in vitro*, realizados em compartimentos de diálise, mostram que a complexação altera o perfil de liberação do hormônio em meio aquoso, promovendo-a de forma mais lenta quando comparado à MT livre. Assim, essas formulações são passíveis de preparação, possuem potencial para aplicação da aquicultura de inversão sexual, e devem ter sua absorção investigada *in vivo*, a qual poderá apresentar os efeitos esperados com dosagens reduzidas.

Os hormônios esteroides, como a MT, podem ser bioacumulativos e promover uma série de danos à organismos vivos não tratados, e o descarte das águas residuais, mesmo que em concentrações pequenas é bastante preocupante e merece atenção. As CDs apresentam grande compatibilidade para formar complexos de inclusão com a MT, no entanto é solúvel em meio aquoso. A sua funcionalização à superfície da sílica possibilita trabalhar com o material em um meio heterogêneo, facilitando sua remoção e possível reutilização. A funcionalização foi realizada utilizando-se o ácido cítrico como agente ligante, sendo economicamente mais viável que o emprego dos organossilanos habituais. O percentual de funcionalização foi elevado, em torno de 60% de conteúdo orgânico foi enxertado à matriz inorgânica. De acordo com as caracterizações realizadas, o aconramento ocupa os sítios e/ou obstrui os poros de adsorção da sílica, reduzindo sua área superficial específica. O mecanismo

de funcionalização, investigado por espectroscopia na região do infravermelho e ressonância magnética nuclear, indica que o ácido cítrico atua como agente de ligação através de uma reação de esterificação entre o silanol da superfície inorgânica com a hidroxila secundária do oligossacarídeo.

O compósito obtido foi então avaliado quanto à sua capacidade para remoção do hormônio MT em meio aquoso. De acordo com os modelos de isothermas e cinéticos empregados no estudo, a adsorção do esteroide é favorável, não é controlada majoritariamente por difusão, ocorre em sítios independentes, formando uma monocamada de adsorvato e é regida por interações de natureza física. Resultados esses que concordam que a remoção esteja ocorrendo pela complexação da MT com a cavidade hidrofóbica da bCD. Em sistema de filtragem em coluna o compósito foi capaz de remover o hormônio da água, até o limite de  $7,56 \text{ mg g}^{-1}$  de compósito, quando o híbrido começa a perder eficiência. O ensaio de dessorção foi trabalhado pensando no deslocamento do equilíbrio para a descomplexação em meio contendo etanol, ocorre de forma bastante rápida, regenerando o material e deixando-o apto ao reuso. Dessa forma, o estudo apresenta grande relevância para aplicação desse material em filtros para remoção de MT em efluentes da aquicultura e pecuária contendo esse hormônio, e também poderá ser avaliada sua aplicabilidade para outras moléculas esteroides.

As tentativas para o desenvolvimento de um modelo mesoscópico para a molécula de MT conjuntamente à avaliação dos parâmetros de repulsão com as CDs, estudado com dinâmica de partículas dissipativas (DPD), mostraram que as forças hidrofóbicas, impulsionam as interações entre o hormônio e as CDs. Um modelo para a gCD conseguiu simular a complexação a valores próximos do experimental, no entanto, um modelo representativo deveria funcionar para as demais CDs, e isso não ocorre. Há ainda detalhes para serem trabalhados, a complexação da MT em bCD ocorre na razão molar de 1:2, mas nas simulações DPD, esse percentual ainda não é alcançado. A complexação entre as faces híbridas, mais ou menos densa, parecem inicialmente estar relacionada com a probabilidade de colisão, e em seguida à aglomeração com as regiões mais hidrofóbicas. Os resultados detalham avanços para essa modelagem, que poderá ser útil para estudos em escala mesoscópica com esse tipo de esteroide, ou demais compostos a serem inclusos com CDs, no entanto carece de mais investigações para a concretização de um modelo representativo para todas as CDs.

De modo geral, o complexo entre a MT e a gCD apresenta potencial para ser empregado na reversão sexual de alevinos na aquicultura contribuindo para o

desenvolvimento sustentável, pois permite, possivelmente, 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. Além disso, os resultados mostram que a bCD funcionalizada em sílica pode ser usada para a remoção de MT em meio aquoso. Certamente esse material pode contribuir na redução de impactos ambientais gerados pelo descarte indiscriminado desse tipo de contaminante emergente nos cursos hídricos.

## **SEGUNDA PARTE**

### **ARTIGOS**

**ARTIGO 1 – COMPOSTOS DE INCLUSÃO MOLECULAR ENTRE O HORMÔNIO METILTESTOSTERONA E  $\gamma$ -CICLODEXTRINA**

**ARTIGO 2 – INCORPORAÇÃO DE CICLODEXTRINAS EM SÍLICA MESOPOROSA UTILIZANDO ÁCIDO CÍTRICO**

**ARTIGO 3 – REMOÇÃO DO HORMÔNIO SINTÉTICO METILTESTOSTERONA EM SOLUÇÃO AQUOSA USANDO O COMPÓSITO DE  $\beta$ -CICLODEXTRINA E SÍLICA**

**ARTIGO 4 – APLICAÇÃO DA DINÂMICA DE PARTÍCULAS DISSIPATIVAS (DPD) NO ENTENDIMENTO DA COMPLEXAÇÃO ENTRE A METILTESTOSTERONA E CICLODEXTRINAS**

## ARTIGO 1

Artigo a ser submetido à revista Carbohydrate Polymers

### COMPOSTOS DE INCLUSÃO MOLECULAR ENTRE O HORMÔNIO METILTESTOSTERONA E $\gamma$ -CICLODEXTRINA

#### RESUMO

Os complexos de inclusão entre a metiltestosterona (MT) e a  $\gamma$ -ciclodextrina (gCD) foram preparados e caracterizados em dissolução e fase sólida. O complexo promoveu um incremento na solubilidade do hormônio de 17 vezes, tem solubilidade limitada e estequiometria de 1:1 (MT:gCD) determinada pelos experimentos de absorção UV, DSC e RMN. A constante de associação,  $K_a$ , determinada por DOSY é de  $10.970 \text{ L mol}^{-1}$  (utilizando DMSO- $d_6$ /D $_2$ O) e a fração complexada de 86%, enquanto que em água o valor de  $K_a$  é de  $26.600 \text{ L mol}^{-1}$ , determinado por isoterma de solubilidade. A fração complexada em estado sólido é de 83%, avaliado por DSC, e permanece similar quando o mesmo se encontra em fase líquida. Experimentos de ROESY 2D indicam a orientação intermolecular (inclusão completa do hormônio na cavidade), com a carbonila voltada para a face mais ampla da gCD. Simulações de Dinâmica Molecular corroboram com a formação do complexo de inclusão 1:1. E os testes de liberação *in vitro* mostram que, para o complexo, a difusão da MT através da membrana é cerca de 40% mais lenta que em sua forma livre. Esses resultados demonstram claramente a complexação da MT em gCD, cujas formulações são promissoras para futuras aplicações envolvendo este esteroide na aquicultura, tanto para reversão sexual como em tecnologias de sequestro de hormônio em água.

**Paravras Chave:** Ciclodextrina, complexos de inclusão, Metiltestosterona, RMN, Reversão sexual

## 1. Introdução

A indústria pesqueira apresenta um importante papel na produção de alimentos e requer cada vez mais novas tecnologias para a produção de pescado, que vem ganhando um espaço mais continental. Enquanto a pesca de captura tem-se mantido constante, com produção anual em torno de 90 milhões de toneladas de 2000 a 2015, a aquicultura vem crescendo expressivamente, com um salto de 33 para 76,6 milhões de toneladas neste mesmo período (FAO, 2017).

A aquicultura continental se destaca da marinha, com uma produção bem mais elevada, 48,7 contra 27,8 toneladas em 2015 (FAO, 2017). Dentre os pescados produzidos, a tilapicultura tem chamado a atenção nas últimas décadas pela sua expansão em 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, para 3,5 milhões de toneladas em 2010, representando um aumento de 4,5% para 8,4% da produção total de peixes de cativeiro (FAO, 2012). A estimativa de crescimento na produção desse pescado aumenta, e juntamente com a carpa e o peixe-gato, deverão representar 60% da produção aquícola mundial em 2025 (FAO, 2016).

A tilapicultura é baseada, em sua maior parte, na produção de populações monossexo por meio das técnicas de masculinização (El-Greisy & El-Gamal, 2012). Os peixes revertidos sexualmente apresentam taxas de crescimento mais rápidas, são mais tolerantes a alterações nas condições ambientais, apresentam maior resistência ao estresse e doenças, possuem uma conservação de energia mais elevada e maior uniformidade de tamanho na colheita (El-Sayed, Abdel-Aziz, & Abdel-Ghani, 2012). Dentre os principais métodos utilizados na obtenção de populações monossexo de peixes, a inversão hormonal do sexo envolvendo a administração de andrógenos sintéticos é a técnica mais utilizada comercialmente (Singh, 2013), sendo a  $17\alpha$ -metiltestosterona (MT) o andrógeno sintético mais largamente empregado na produção de tilápias (El-Sayed, Abdel-Aziz, & Abdel-Ghani, 2012). No entanto, assim como o uso em humanos, a rápida absorção da molécula pelo organismo (Arlt, 2006) pode ser um fator limitante, que requer a ministração de repetidas doses refletindo também em seus efeitos, além de tornar mais preocupante os riscos ambientais com os níveis de esteroides não absorvidos que ficam na água.

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos, formados por monômeros de D-glicose e unidas por meio de ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4, obtidas a partir da degradação enzimática do amido (Villiers, 1981; Mura, 2015), sendo as CDs  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , de ocorrência

natural, que possuem maior número de aplicações. Descobertas por Villiers em 1891 figuram atualmente como um dos carreadores de moléculas mais estudados (Peng et al., 2017; Monteil et al., 2017; Song et al., 2017; Anirudhan, Divya, & Nima, 2016). 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, possibilitando acomodar em sua cavidade uma série de substratos, cuja complexação depende essencialmente da compatibilidade estérica e dos critérios de polaridade com a molécula hóspede (Szejtli, 2013; Loftsson & Brewster, 2012).

A modificação das propriedades físico-químicas das moléculas convidadas são os efeitos mais significativos 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 (Loftsson & Brewster, 2012). Portanto, o emprego das CDs na formação de complexos de inclusão com a MT representa uma nova possibilidade de método para a inversão sexual e carece ser investigada.

Estudos realizados anteriormente atestam que o encapsulamento da MT em duas moléculas da  $\beta$ -ciclodextrina (bCD) eleva a solubilidade aquosa do esteroide além de promover uma liberação *in vitro* mais lenta. No entanto, a acomodação da MT no interior da cavidade da bCD é bastante justa o que limita os movimentos da molécula hóspede (Carvalho et al., 2018). A complexação com a  $\gamma$ -ciclodextrina (gCD), oligossacarídeo composto por 8 monômeros de D-glicose, deve propiciar um maior grau de liberdade para o movimento da MT na cavidade hidrofóbica propiciando diferentes mudanças físicas e químicas, no que tange a solubilidade, liberação e consequentemente sua biodisponibilidade, em relação a MT livre e também complexada em bCD. Assim, este trabalho trata do preparo de complexos de inclusão entre a gCD e a MT, e a caracterização experimental dos complexos em fase líquida e sólida, além dos estudos de modelagem molecular para os complexos formados.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Soluções e reagentes

Todas as soluções foram preparadas utilizando água ultra pura obtida por sistema Milli-Q (Millipore<sup>®</sup>, Bedford, MA, USA). Foram utilizados  $\gamma$ -ciclodextrina (gCD, 98%, sigma Aldrich) e 17- $\alpha$ -metiltestosterona (MT, pureza mínima de 97%, Sigma Aldrich). O etanol utilizado foi grau HPLC (99,8%, Merck<sup>®</sup>), água deuterada (D<sub>2</sub>O, 99,9%) e dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d<sub>6</sub>, 99,8%) ambos da Acros Organics<sup>®</sup>.

### 2.2. Preparação dos complexos de inclusão

Os complexos de inclusão, entre a MT e a gCD na razão molar 1:1, foram preparados de acordo com metodologia descrita por Carvalho et al. (2018). Quantidades equimolares de MT e gCD foram adicionados em solução aquosa de etanol a 10%, mantida sob agitação constante por 7 dias a  $25 \pm 1$  °C, congelada em nitrogênio líquido e posteriormente liofilizado.

Outra metodologia utilizada para preparo dos complexos foi a malaxagem, em que foi obtida uma pasta ao se umedecer quantidades equimolares de MT e gCD com água deionizada, que foi posteriormente seca em estufa a 45 °C. A mistura física entre MT e gCD também foi preparada, pela simples mistura mecânica dos componentes, em um almofariz, por 10 min.

### 2.3. Avaliação da complexação por espectroscopia na região do UV

A interação entre as moléculas de MT e gCD foi observada pelos espectros de absorção obtidos na faixa de 200 a 300 nm em um equipamento UV-Vis da Shimadzu, modelo UV-1800. Neste ensaio foi mantida constante a concentração de MT enquanto variações eram feitas na concentração de gCD, cujo preparo das soluções aquosas foram feitos nas proporções de 1 MT para 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 5 e 10 de gCD.

A complexação em meio aquoso envolve a mudança da molécula hóspede de um ambiente de solvatação hidrofílico para outro mais hidrofóbico. Assim, como modelo de comparação com os espectros obtidos com a interação MT:gCD, o comportamento mediante a

absorção de radiação UV da MT foi investigado em soluções de diferentes constantes dielétricas. Espectros da MT na concentração de 20  $\mu\text{mol L}^{-1}$  foram obtidos na faixa de 200 a 300 nm em meios contendo diferentes proporções água:etanol, com frações variando de 0 a 1 e soma constante (Wohlfarth, 2008).

Os valores de energia foram determinados pela Equação 1, em que  $h$  corresponde a constante de Planck ( $6,63 \cdot 10^{-34}$  J s),  $c$  é a velocidade da luz no vácuo ( $2,99 \cdot 10^8$  m s<sup>-1</sup>) e  $\lambda$  o comprimento de onda (Skoog, Holler, & Crouch, 2017).

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad (1)$$

#### 2.4. Isoterma de solubilidade

O efeito da gCD na solubilidade da MT foi realizado como descrito pelo método de Higuchi e Connors (1965), em água ultrapura a  $25 \pm 1$  °C. Neste ensaio, quantidades crescentes de gCD (0 a 8 mmol L<sup>-1</sup>) foram adicionadas a uma solução com excesso de MT (2 mmol L<sup>-1</sup>) e mantidas sob agitação constante por 24 horas. Posteriormente, as suspensões foram centrifugadas e filtradas em filtros MillexGP de 0,22  $\mu\text{m}$  e quantificadas em espectrofotômetro (Varian, model Cary Probe 50) em  $\lambda$  de 249 nm.

#### 2.5. Ensaios de liberação da MT *in vitro*

Os ensaios de liberação da MT foram realizados em triplicata utilizando compartimento de diálise com área de seção transversal de 0,81 cm<sup>2</sup>. Foi utilizada membrana com poro de exclusão molecular de 1000 Da (Sigma-Aldrich) para separação entre o compartimento doador e o receptor. Aliquotas de 2 mL de solução 1,6 mmol L<sup>-1</sup> de amostra (complexo de inclusão e MT livre) foram colocadas em compartimento doador e imersas em 78 mL de solução aquosa contendo 5% de etanol. A liberação do hormônio foi monitorada por leituras a 249 nm em espectrofotômetro, em intervalos de tempo predefinidos.

## 2.6. Calorimetria diferencial exploratória

Os experimentos de calorimetria diferencial exploratória (DSC) foram conduzidos em calorímetro de DSC da Shimadzu DTA-AH. Amostras de 5 mg foram aquecidas a uma velocidade de  $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , em um intervalo de 30-300  $^{\circ}\text{C}$  sob fluxo de  $\text{N}_2$  a  $30\text{ mL min}^{-1}$ .

## 2.7. Experimentos de ressonância magnética nuclear (RMN)

As amostras foram preparadas em  $\text{D}_2\text{O}$  e  $\text{DMSO-d}_6$  como cosolvente em uma concentração de  $4\text{ mmol L}^{-1}$ , agitadas em vortex e analisadas em espectrômetro de ressonância Bruker Avance III-400 com sonda de detecção inversa BBI, a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Os espectros de hidrogênio foram obtidos com 16 varreduras, intervalo entre varreduras de 2 s com pré-saturação do sinal da água, tempo de aquisição de 7,3 s (64 k pontos), janela espectral de 4485,65 Hz e utilizando como referência o pico da água residual (4,7 ppm). Os dados foram analisados utilizando o software MestReNova.

Para o experimento de Job Plot foram preparadas soluções entre a gCD e a MT, em  $\text{D}_2\text{O}$  e  $\text{DMSO}$ , variando a razão molar de 0 a 1 e mantendo constante a soma das concentrações. O parâmetro físico-químico observado foi a variação do deslocamento químico do H5 da gCD. Para determinar a estequiometria os dados foram racionalizados no gráfico de  $r\Delta\delta_{\text{obs}}$  versus  $r$ , onde  $r = [\text{MT}] / ([\text{MT}] + [\text{CD}])$ .

As medidas de DOSY foram realizadas utilizando um big delta ( $\Delta$ ) de 100 ms e little delta ( $\delta$ ) de 1,2 ms (1200  $\mu\text{s}$ ). 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 5 s. O tempo de aquisição foi de 3,98 s (64 k pontos), janela espectral de 8223,68 Hz e temperatura de  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A sequência de pulsos foi bipolar com filtro de corrente de anel (BPP-LED, bipolar pulse pair longitudinal eddy current). E o processamento dos dados adquiridos processados no software TopSpin 3.0 Bruker.

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 2 s e número de varreduras igual a 64. A temperatura do experimento foi de  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## 2.8. Avaliação teórica da formação dos complexos de inclusão

A modelagem computacional das estruturas dos complexos de inclusão MT:gCD foram feitos por Mecânica Molecular (otimização) e Dinâmica Molecular (dinâmica de evolução ao longo do tempo), executado com o programa Macromodel (Macromodel, 2014), e usando os campos de forças MM3\* (MM3\*, 2014) e AMBER\* (AMBER\*, 2012). Os modelos para a MT e a gCD foram retiradas de trabalhos do grupo (Carvalho et al., 2018; Jaime et al., 1990).

Os cálculos no vácuo foram realizados usando os parâmetros de constante dielétrica e carga atômica fornecidos por cada campo de força. As minimizações de energia foram realizadas exclusivamente no vácuo usando o método de otimização de gradiente conjugado Polak-Ribiere, com um critério de convergência de  $0,05 \text{ kJ mol}^{-1}$ .

Para os cálculos de Dinâmica Molecular, realizados no vácuo e em água, foram utilizadas as estruturas de mais baixa energia obtidas pelos cálculos de Mecânica Molecular. As simulações foram conduzidas utilizando o algoritmo de Verlet (dinâmica molecular padrão) (Verlet, 1967) a uma temperatura de 298 K, com “passo de tempo” de 1,5 fs, tempo de equilíbrio de 1000 ps e tempos de simulação de 10000 ps. Para comparação das energias antes e após a complexação também foram realizados cálculos com sistemas em que a MT foi mantida a 12 angstroms do centro da cavidade da gCD, onde aparentemente os efeitos energéticos entre as estruturas podem ser considerados desprezíveis.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Avaliação da complexação por espectroscopia na região do UV

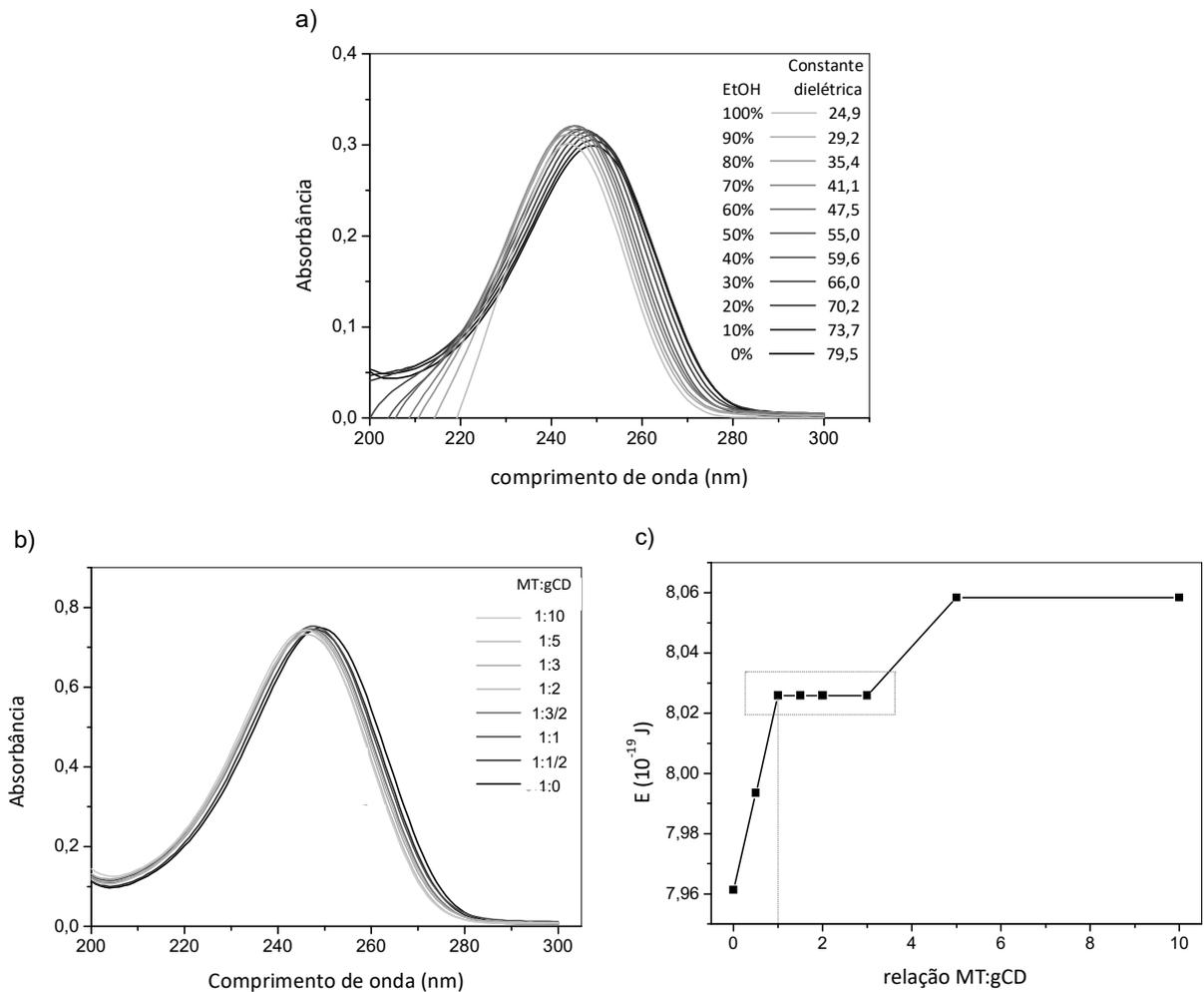
A forma como as moléculas orgânicas vão absorver radiação UV depende das transições eletrônicas que podem ocorrer e os efeitos do ambiente em que estão os átomos sob transição. A alteração nas propriedades espectroscópicas de uma molécula inclusa na cavidade das CDs pode ser, normalmente, interpretada em termos das interações dielétricas (Lambert et al., 2011). Dessa forma, o efeito da gCD em uma solução de MT pode ser comparado em função dos efeitos de polaridade. O estudo da polaridade dessas moléculas pode ser feito com o auxílio de solventes cujos parâmetros são bem conhecidos, portanto esta avaliação ocorreu com o preparo das amostras de MT em diferentes proporções de

água:etanol (Wohlfarth, 2008), para posteriormente servir de parâmetro para as interações da MT com a gCD.

Com a diminuição da polaridade do meio, os espectros obtidos (Figura 1a) sofreram deslocamentos para comprimentos de onda menores ( $\Delta\lambda = 9$  nm). O deslocamento hipsocrômico é devido aos efeitos de conjugação, neste caso específico às transições  $\pi \rightarrow \pi^*$ . 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  $\epsilon_{max}$  entre 10.000 e 20.000, e sofrem deslocamento batocrômico com o aumento da polaridade do solvente (Silverstein, 2014).

De modo similar ao que ocorre com a adição de etanol à água, o aumento na concentração de gCD promove um deslocamento nos comprimentos de onda máximo da MT para valores menores (Figura 1b), evidenciando assim a mudança do ambiente de solvatação da MT para um ambiente mais hidrofóbico. As interações entre a cavidade gCD e a MT são favoráveis elevando o nível energético das transições eletrônicas (Figura 1c), que é mais pronunciado até razão molar 1:1, permanecendo constante mesmo com o aumento das proporções. Apenas quando se excede a concentração de gCD em 5 ou mais vezes, ocorre um ligeiro deslocamento do  $\lambda_{max}$  para um nível mais energético. Estes resultados podem sugerir que a complexação esteja ocorrendo em meio aquoso na razão molar de 1:1. Sendo a complexação descrita como um equilíbrio dinâmico (Loftsson & Brewster, 2012), com moléculas do convidado entrando e saindo da cavidade das CDs, é coerente considerar que parte dessas moléculas não se encontram complexadas. Com o aumento excessivo na concentração de gCD, esse equilíbrio é deslocado e o esteroide se vê mais forçado a complexar-se e permanecer na cavidade, o que possivelmente justifica o último deslocamento do espectro UV com o aumento na concentração de gCD em 5 e 10 vezes à de MT.

A variação nos valores de  $\lambda_{max}$  encontrados nestes espectros (249, 248 e 247 nm) mostra que a solução de MT:gCD em proporção igual ou superior a 1:1 se encontra em um ambiente de solvatação semelhante àquele cuja constante dielétrica é de 59,6. As variações nos valores de constante dielétrica encontrados na literatura são grandes, possivelmente ao fato de 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). No entanto, esse experimento pode nos fornecer indícios da ocorrência da formação dos complexos entre a gCD e o esteroide em meio aquoso, além de nos induzir a dizer que a provável estequiometria de complexação seja de 1:1.

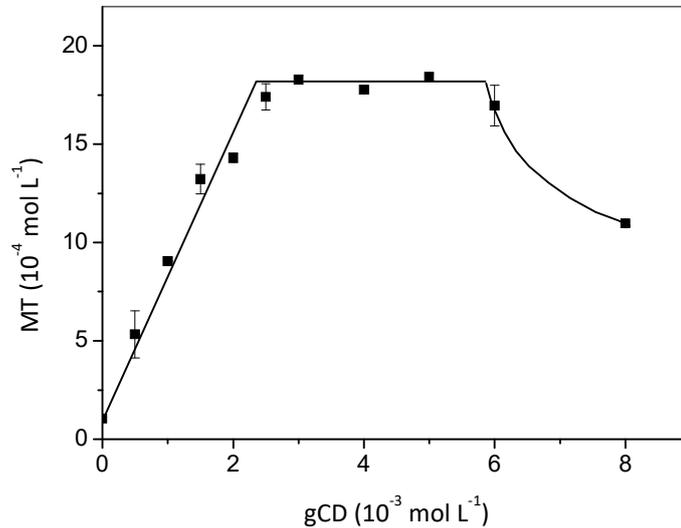


**Figura 1** Espectros de absorvância da MT em meios com diferentes polaridades (a), em soluções com proporções crescentes de gCD (b) e correlação entre razão MT:gCD e valores de energia (c)

### 3.2. Isoterma de solubilidade para o Complexo MT:gCD

A complexação em CDs pode ocasionar em alterações nas propriedades físico-químicas da molécula convidada, como a melhora da solubilidade (Loftsson & Brewster, 2012). O diagrama de solubilidade da MT e gCD (Figura 2), indica que a gCD promove um incremento na solubilidade de 17 vezes, aproximadamente 3 vezes superior ao aumento promovido pela bCD (Carvalho et al., 2018). A bCD é menos solúvel em água que a gCD, 18,5 e 230 g L<sup>-1</sup> respectivamente, portanto é coerente que a gCD propicie um incremento mais significativo na solubilidade da MT. Semelhante ao perfil encontrado para a bCD em trabalho anterior do grupo, o diagrama para a gCD evidencia uma isoterma do tipo B<sub>s</sub> (Szejtli,

2013), com uma região de platô configurando a formação de complexo com solubilidade limitada e posteriormente precipitação com o progressivo aumento na concentração de gCD.



**Figura 2** Diagrama de solubilidade para a MT e gCD

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 ( $Ka$ ) conforme segue a Equação 2, com  $S_0$  correspondendo à solubilidade intrínseca do convidado. Apesar do valor da constante de associação poder ser significativamente modificado pelas diferentes associações e grau de hidratação dos componentes em equilíbrio em uma solução com excesso de analito, serve como um importante parâmetro de comparação com sistemas semelhantes e também indicam o quão forte são as associações que ocorrem entre a CD e o convidado.

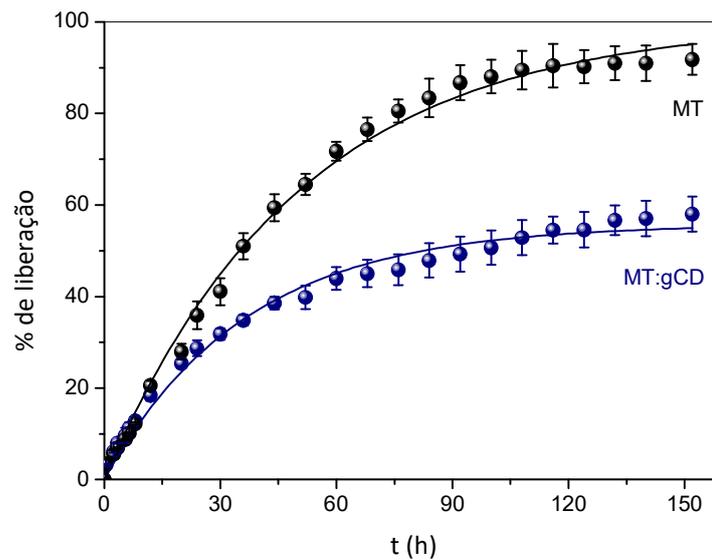
$$Ka = \frac{\text{inclinação}}{S_0(1 - \text{inclinação})} \quad (2)$$

O valor para a constante de associação obtido por esse método é de 26.600 L mol<sup>-1</sup>, similar aos valores encontrados na literatura para a progesterona, 24.000 L mol<sup>-1</sup> (Uekama et al., 1982), comprovando a complexação e a existência de uma forte interação entre o hormônio e a cavidade da gCD.

### 3.3. Ensaios *in vitro* da liberação da MT

A curva de liberação da MT conduzido em sistema de diálise (Figura 3) apresenta o efeito da complexação em gCD na taxa de liberação do esteroide. Neste ensaio, a MT tem capacidade de atravessar os poros da membrana, porém as moléculas de gCD não a atravessam e, desta forma, é possível observar a influência da incorporação em gCD na velocidade de liberação da molécula de MT.

Pela análise das curvas observa-se que a difusão da MT nesse arranjo experimental de diálise ocorre de maneira bastante lenta. As curvas apresentadas na Figura 10 dão indícios de estabilização após 60 horas de diálise (4,5 dias). De acordo com as curvas obtidas, nesse período, cerca de 72% da MT livre é liberada, enquanto que aproximadamente 46% da MT é liberada nos sistemas em que ela está associada à gCD.

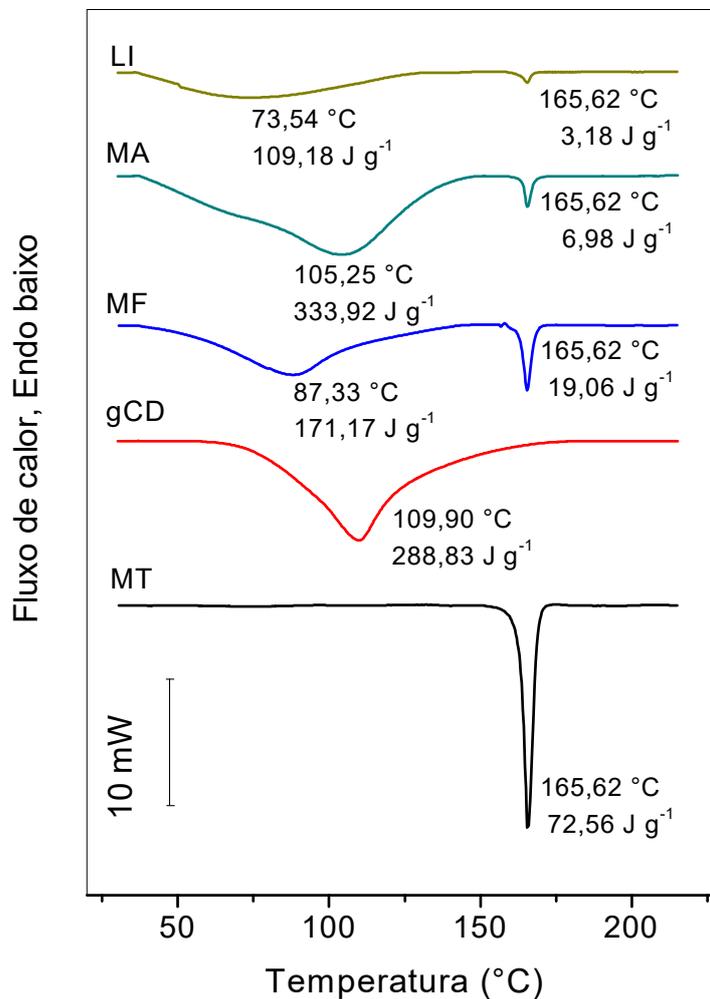


**Figura 3** Porcentagem de liberação da MT livre (a) e MT:gCD 1:1, a  $26 \pm 2$  °C.

Dessa forma a associação da MT na cavidade da gCD altera os parâmetros de difusão da molécula hóspede (Mura, 2014; Del Valle, 2004), podendo prolongar seu tempo de atuação e retardar a rápida absorção que ocorre *in vivo*. Assim como a bCD, com liberação da MT complexada na ordem de 50% (Carvalho et al., 2018), a liberação mais lenta para o complexo em gCD demonstra a eficácia do sistema para o objetivo proposto.

### 3.4. Avaliação da formação dos complexos de inclusão por calorimetria diferencial exploratória

Com a calorimetria diferencial exploratória (DSC) foram obtidos os termogramas mostrados nos gráficos a seguir (Figura 4), por meio dos quais é possível notar os picos endotérmicos que caracterizam cada substância isoladamente e também os complexos de inclusão.



**Figura 4** Termogramas de DSC para a MT, gCD, mistura física (MF), e os complexos MT:gCD preparados por malaxagem (MA) e liofilização (LI).

O termograma para a MT é bastante característico dessa estrutura com um pico agudo em 165,62 °C correspondente ao seu ponto de fusão e  $\Delta H$  de 72,56  $\text{J g}^{-1}$ . Estes valores são

condizentes com os dados presentes na literatura, que indicam uma faixa limite de 162 a 168 °C para a temperatura de fusão do esteroide e uma entalpia de fusão em torno de 84 J g<sup>-1</sup> (L'vova et al., 1995).

As curvas de DSC indicam claramente a ocorrência de complexação entre a MT e a gCD para ambas as formulações produzidas, por malaxagem e liofilização, em decorrência da supressão do pico referente à fusão da MT (Mura, 2015), sendo aparentemente melhor para o complexo produzido por liofilização. A análise da estequiometria de complexação pelos termogramas ainda gera dúvidas pelo fato do complexo 1:1 não ter o pico da MT completamente suprimido do termograma, no entanto sua magnitude não é considerável para indicar que a estequiometria ocorra na razão de 1:2. O mais aceitável é que a complexação esteja ocorrendo na razão molar de 1:1 e não é 100% eficiente, como calculado a seguir. Como a mistura física trata-se da simples mistura mecânica entre os componentes, nas razões molares apropriadas (1:1), e na ausência de solvente, não é esperado nenhuma interação significativa no que tange a inclusão da molécula hóspede na cavidade da CD. Portanto, os calores de reação deste preparo podem ser utilizados para estimar a eficiência na complexação da MT em gCD de acordo com a Equação 3 (Grandelli et al., 2013):

$$\%Inclus\tilde{a}o = 100 \left[ 1 - \frac{\Delta H_{MF}}{\Delta H_{complexo}} \right] \quad (3)$$

onde  $\Delta H_{MF}$  e  $\Delta H_{complexo}$  correspondem respectivamente às entalpias de fusão da MT na mistura física e nos complexos preparados. Com os valores da entalpia obtidos pela integração do pico de fusão para a MT, a eficiência determinada para a complexação foi de 83,32% para o complexo preparado por liofilização e 63,38% por malaxagem. Ao contrário da formulação obtida por liofilização, a quantidade restrita de solvente, concomitante ao menor tempo de preparo, para a formulação obtida por malaxagem, dificulta a difusão da MT para a cavidade da gCD, influenciando para que menos associações entre as duas estruturas ocorressem.

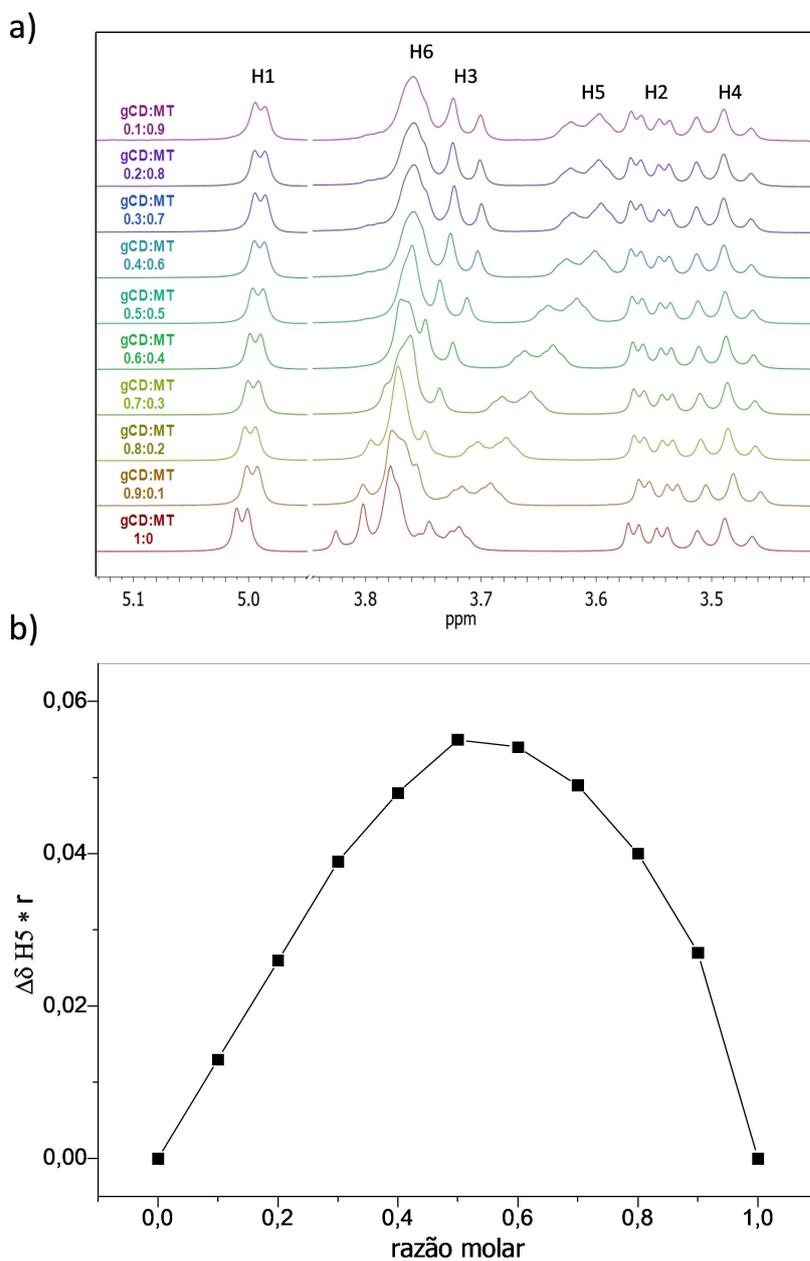
Estudos realizados por Giordano, Novak e Moyano (2001), mostraram que as CDs apresentam um pico em temperaturas próximas a 120 °C que é referente à perda de moléculas de água de inclusão para o ambiente. As alterações de entalpia e nos deslocamentos dos picos referentes à desidratação e remoção da água da cavidade das CDs devem estar associados à complexação, manuseio e secagem dos materiais.

No caso da gCD, as formulações preparadas para formação dos complexos de inclusão mostram claramente o encapsulamento da MT preparada pelo processo de liofilização. A inclusão da MT na cavidade da gCD tende a expulsar as moléculas de água existentes em seu interior, dessa forma esse pico pode ser parcialmente suprimido do termograma, evidenciando uma redução na quantidade de água presente da cavidade da CD (Wang & Cai, 2008; Zhu et al., 2015). Quando presente, o pico referente à expulsão da água de inclusão tende a deslocar-se para temperaturas mais baixas, pois a presença de um composto mais hidrofóbico no meio faz com que as moléculas de água remanescentes sofram com os efeitos de repulsão e fiquem mais fracamente associadas à cavidade.

### 3.5. $^1\text{H}$ RMN para avaliar a interação entre gCD e MT

Variações nos sinais dos deslocamentos químicos (ver Tabela S1 e Figuras S1 e S2 do material suplementar) para as moléculas de gCD e de MT são uma evidência concreta da complexação entre ambos os compostos (Mura, 2014). Os hidrogênios da molécula de MT apresentam variação no deslocamento químico e alargamento dos picos em presença de gCD. Os espectros de  $^1\text{H}$  RMN mostram também que o H3 e o H5 da gCD sofrem muita influência com a complexação, enquanto que H1, H2, H4 e H6 não passam por modificações expressivas em seus deslocamentos químicos ( $|\Delta\delta| \leq 0,01$ ), indicando assim que a MT solúvel é complexada com a gCD e que as interações com o exterior hidrofílico da gCD são bem fracas. A nuvem eletrônica da MT promove um efeito de blindagem nos prótons da gCD, confirmando a complexação entre o oligossacarídeo e o hormônio (Aksamija et al., 2016). A variação dos deslocamentos químicos do H3 e H5 ( $\Delta\delta = -0,04$  e  $-0,08$  respectivamente), também indica que a molécula de MT é totalmente incluída na cavidade da gCD, pois  $\Delta\delta \text{ H5} \geq \Delta\delta \text{ H3}$  (Greatbanks & Pickford, 1987).

A estequiometria do complexo formado foi determinada pelo método de Job (Renny et al., 2013; Job 1928), que tem por princípio o monitoramento de algum parâmetro físico ou químico do sistema com a variação contínua das concentrações mantendo constante sua soma. Por meio da variação nas razões molares do sistema MT:gCD é possível monitorar também a variação dos deslocamentos químicos dos hidrogênios da gCD na presença de MT (Figura 5a). A curva de Job construída (Figura 5b) trata da variação do deslocamento químico do H5 em função da razão molar ( $\Delta\delta \times r$  versus  $r$ ), e o ponto de máximo desta curva ( $r = 0,5$ ) indica que o complexo formado apresenta estequiometria de 1:1.



**Figura 5** Expansões dos espectros de  $^1\text{H}$  (a) e curva de Job (b) para as soluções de gCD e MT em diferentes razões molares.  $^1\text{H}$ , 400 MHz, 25 °C,  $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO-d}_6$  3:1

### 3.6. Determinação do coeficiente de difusão por DOSY-RMN

A formação dos compostos de inclusão com CDs pode ser observada pela redução do seu coeficiente de difusão, devido ao aumento do seu raio hidrodinâmico e consequente

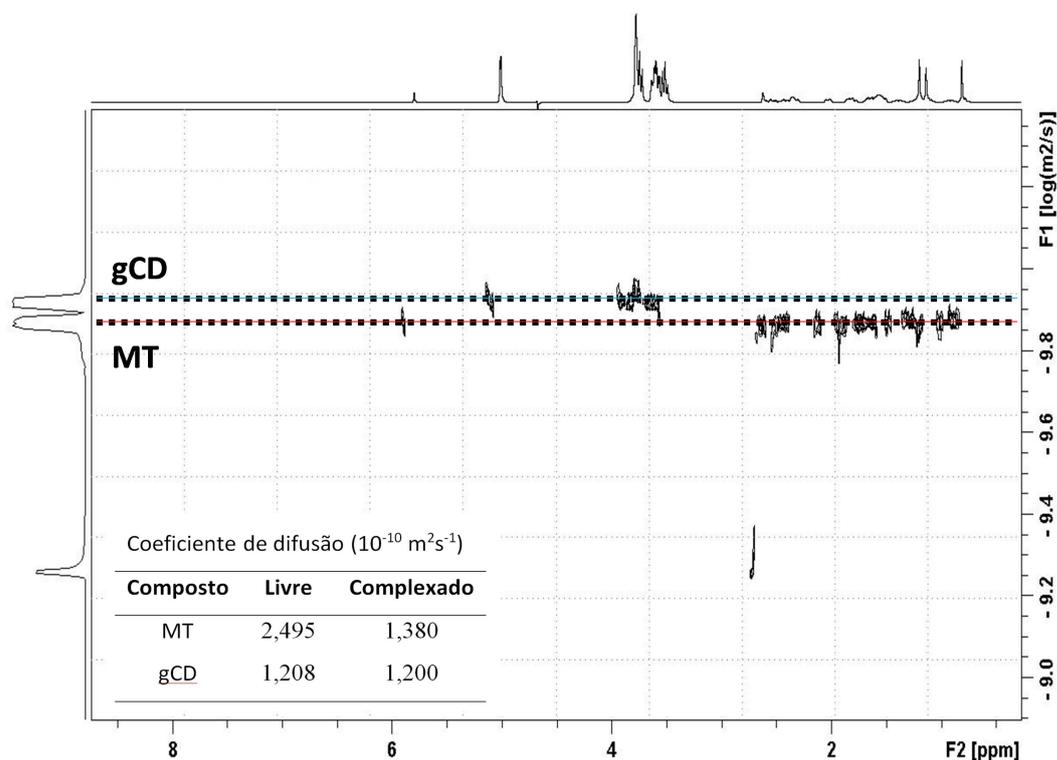
mobilidade no meio (Willenbacher et al., 2014; Wimmer et al., 2002). Quanto maior for a diferença entre a difusão em solução de hóspede com CD comparado com a difusão do hóspede livre (sem CD), maior será a fração complexada. As medidas dos coeficientes de difusão em gradiente de campo magnético, utilizando a técnica de RMN DOSY, são mostradas na Figura 6. A população do convidado envolvida no processo de complexação pode ser determinada pelos coeficientes de difusão das espécies observadas nas formas livre e complexada (Claridge, 2016). Assim, a fração complexada ( $f_{ligada}$ ) e a constante de associação ( $Ka$ ) são calculadas pelas equações 4 e 5 respectivamente (Claridge, 2016; Zhao et al., 2016), onde  $D_{ligado}$  e  $f_{ligado}$  e  $D_{livre}$  e  $f_{livre}$  são os coeficientes de difusão e as frações das moléculas ligadas e não ligadas, respectivamente.

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

$$Ka = \frac{f_{ligado}}{(1 - f_{ligado})([CD] - f_{ligado}[MT])} \quad (5)$$

A constante de associação ( $Ka$ ) obtida a partir dos mapas de contorno (ver Figura 6 e S3 e S4, material suplementar) foi de  $10.970 \text{ L mol}^{-1}$ , evidenciando uma interação bastante favorável entre as estruturas, com a MT fortemente associada à cavidade da gCD. Este valor é menor do que aquele encontrado pela isoterma de solubilidade, cuja diferença deve estar relacionada pelo método de determinação e as variações de solvente entre os dois testes. O valor para a fração complexada de 86% também foi bastante expressivo, mostrando a grande afinidade do esteroide com a cavidade hidrofóbica da gCD.

Como mostrado anteriormente nas curvas calorimétricas (Figura 4), no complexo em estado sólido, a supressão do pico de fusão da MT indica que 83% do hormônio se encontra encapsulado, corroborando com os dados de DOSY para a complexação em meio aquoso. A formação desse tipo de complexo em meio aquoso é regida por um equilíbrio dinâmico, onde a molécula hóspede está constantemente se associando e desassociando da cavidade da gCD (Szejtli, 2013). Como as medidas de DOSY são um somatório dos coeficientes de difusão das moléculas, tanto livre quanto complexadas (Wimmer et al., 2002), este valor de 86% de complexação é bastante interessante do ponto de vista biológico, pois apesar da alta constante de associação há moléculas livres de MT biodisponíveis.



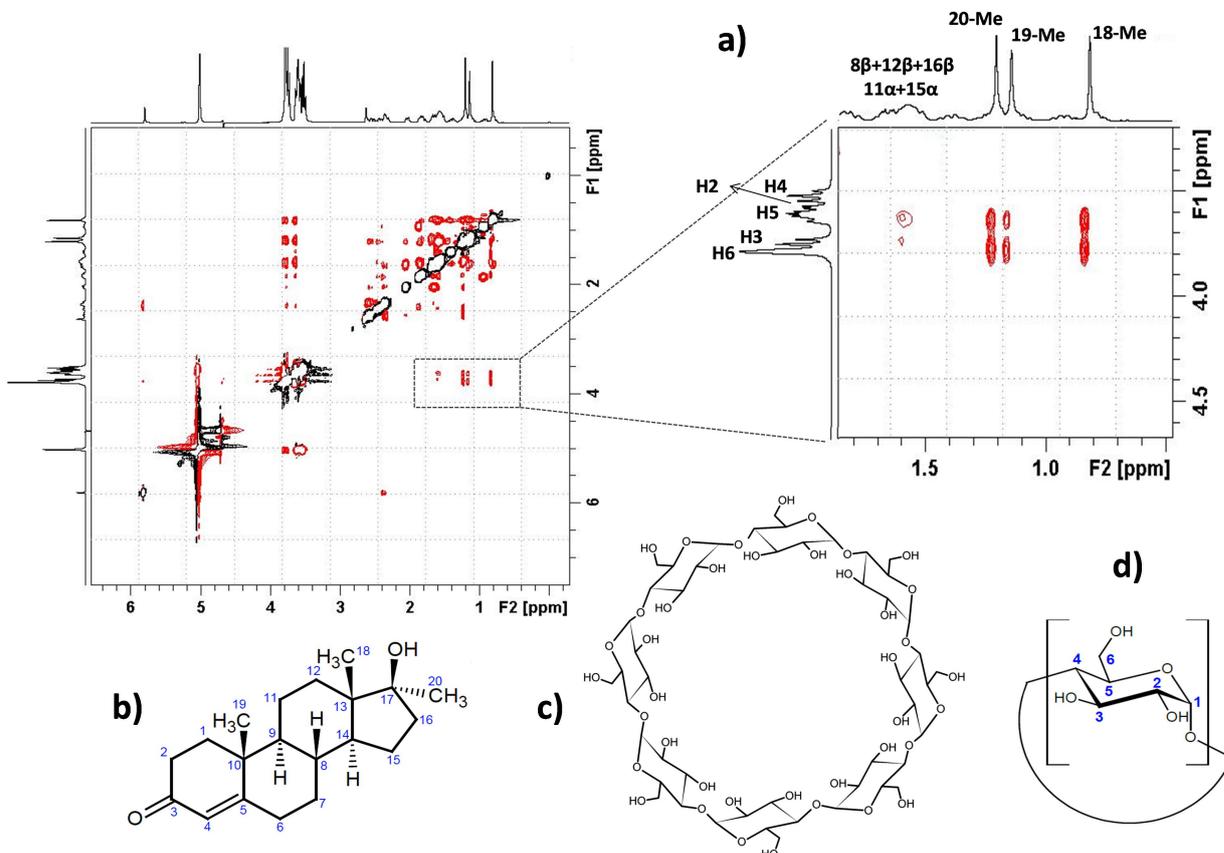
**Figura 6** Mapa de contorno de difusão do complexo MT:gCD. DOSY,  $^1\text{H}$ , 400 MHz, 25 °C,  $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO-d}_6$  3:1

### 3.7. Experimentos bidimensionais ROESY 2D

Os experimentos de ROESY correlacionam hidrogênios próximos uns dos outros através do espaço, tipicamente a 4,5 angstroms ou menos (Silverstein et al., 2014). A intensidade dos sinais observados no espectro (Figura 7a) mostra que as 3 metilas da MT estão próximas dos prótons H3 e H5 da gCD, sendo que o grupo 19-Me se encontra ligeiramente mais afastado dos hidrogênios da cavidade, principalmente do H5, quando comparado à distância com os grupos 18-Me e 20-Me, descritos na estrutura (Figura 7b).

Os prótons dos sistemas cíclicos da MT que também interagem com a cavidade da gCD, possíveis de serem observados, são os que apresentam  $\Delta\delta$  1,5-1,7 (possivelmente 11 e 15 $\alpha$  e também os 8, 12 e 16 $\beta$ ). Como mostrado na expansão do espectro de ROESY (Figura 7a), em relação aos hidrogênios metílicos, os hidrogênios dos carbonos cíclicos apresentam uma interação menos pronunciada com os prótons da cavidade da gCD, sendo observada uma maior proximidade ao H5 do que ao H3. Portanto, os efeitos nOE percebidos entre os prótons internos da gCD com os prótons dos carbonos cíclicos mais distantes da carbonila, e também com os grupos metílicos (numerados como 18, 19 e 20), indica que a complexação deve

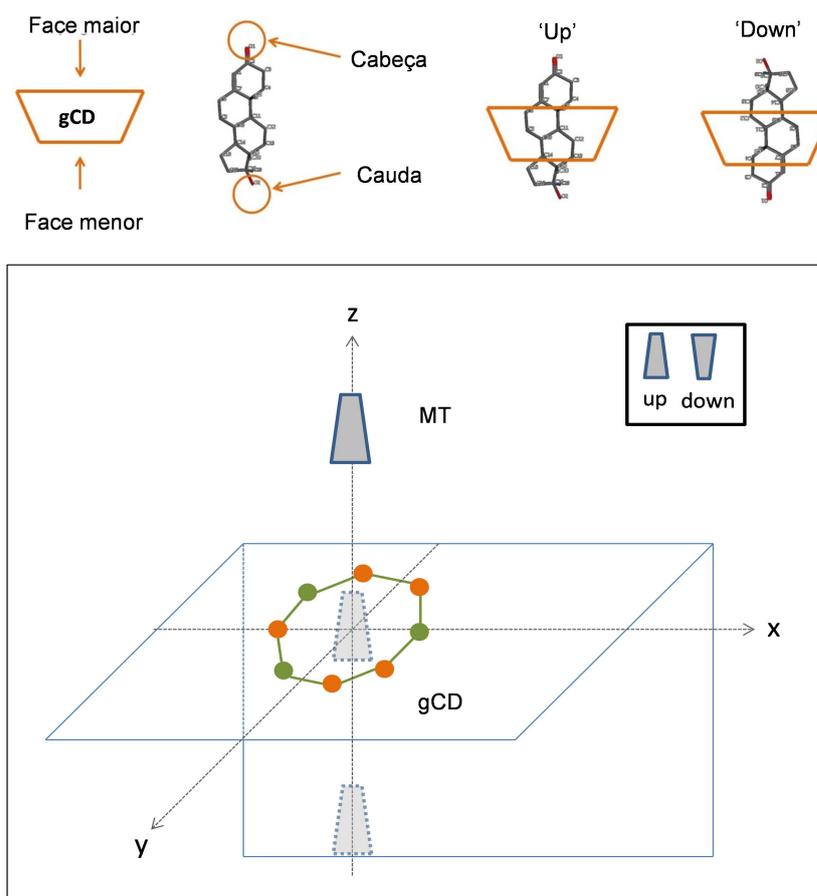
ocorrer pela face mais ampla da gCD, em uma orientação ‘up’ (Figura 8), àquela em que a carbonila está voltada para a face mais ampla e a hidroxila para a mais estreita.



**Figura 7** Expansão dos espectros de ROESY 2D dos complexos MT:gCD,  $^1\text{H}$ , 400 MHz, 25 °C,  $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO}$  3:1 (a). Estrutura da MT (b) e gCD (c, d)

### 3.8. Estudo teórico da complexação da MT com a gCD

Diferentemente ao que ocorre para a complexação da MT em bCD, no qual a estabilização do complexo, descrita por Carvalho et al. (2018), é alcançada com duas bCD envolvendo uma molécula de MT, as evidências experimentais com a gCD mostram que a complexação ocorre na razão molar de 1:1, apontando para a necessidade de se realizar as simulações para essa estequiometria de complexação. As minimizações de energia foram realizadas exclusivamente no vácuo em 3 posições distintas (dentro da cavidade, fora pela face maior e fora pela face menor) e com a molécula de MT em orientação ‘up’ (carbonila para cima) e ‘down’ (carbonila para baixo), como esquematizado na Figura 8.



**Figura 8** Representação do modelo de faces da gCD, estrutura da MT, bimodalidade da complexação MT:gCD e a orientação de uma molécula de MT no eixo z com a molécula de gCD no plano xy.

Os valores de energia para as minimizações (Tabela 1) indicam que a orientação 'up' é a mais favorável para ambos os campos de forças. A posição 2 é aquela cuja minimização já se inicia com a molécula de MT dentro da cavidade da gCD, portanto se deduz que os menores valores de energia para as posições 1 e 3, utilizando o campo de forças MM3\*, deve representar um mínimo global e não local, haja visto que ao final da minimização as moléculas, cujo *input* foi iniciado nas 3 distintas posições, vão terminar dentro da cavidade da gCD e a diferença de energia entre as 3 posições não é grande, cerca de 10 kJ de um total de 2400 kJ.

**Tabela 1** Minimização de energia para a complexação de MT:gCD em 3 distintas posições para as orientações ‘up’ e ‘down’ utilizando os campos de força MM3\* e AMBER\*

<b>Campo de Força</b>	<b>Orientação</b>	<b>Posição</b>	<b>Energia Total (kJ mol<sup>-1</sup>)</b>	<b>%</b>
MM3*	up	1	2438,63	32,3
		2	2447,17	1,0
		3	2437,11	59,6
	down	1	2492,18	0,0
		2	2442,37	7,1
		3	2463,74	0,0
soma das razões				100
AMBER*	up	1	396,03	0,0
		2	317,70	99,6
		3	339,89	0,0
	down	1	332,44	0,3
		2	335,13	0,1
		3	351,96	0,0
soma das razões				100

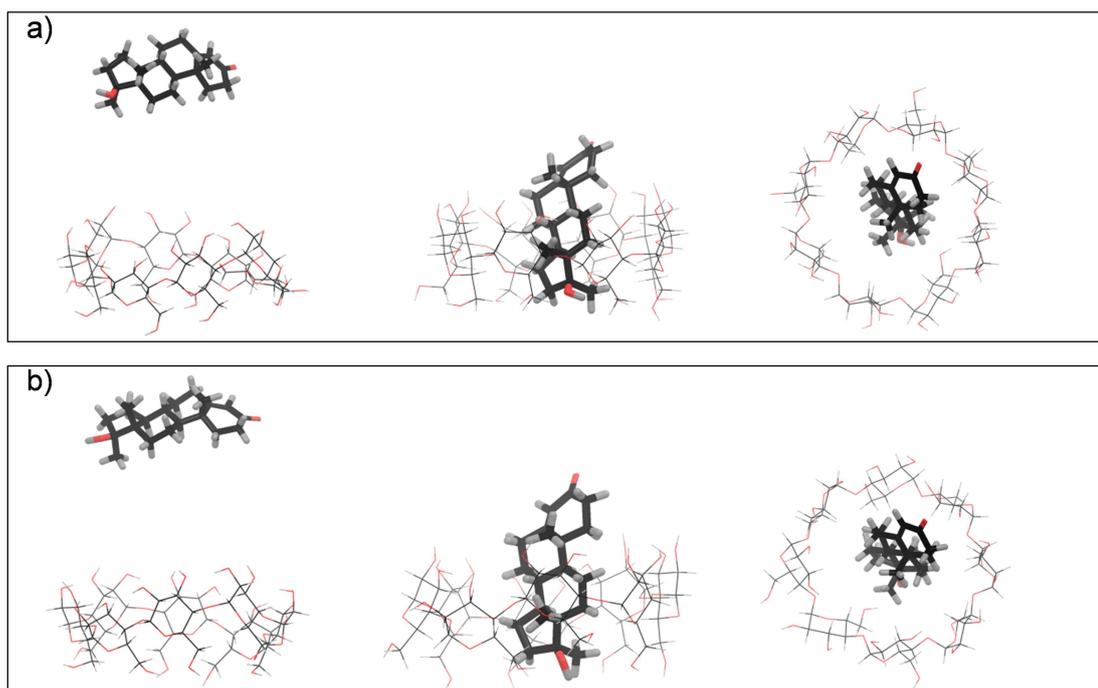
Todos os cálculos de minimização foram feitos no vácuo

Para comparação das energias antes e após a complexação, os cálculos foram feitos para os sistemas e posição de menor energia obtidas por mecânica molecular e também pelo sistema contendo a MT a uma distância de aproximadamente 12 ângstrons do centro da cavidade, onde aparentemente os efeitos energéticos entre as duas estruturas são desprezíveis.

De acordo com as simulações de dinâmica molecular (Tabela 2), em ambas as conformações a formação dos complexos compreende a total inclusão da molécula hóspede no interior da cavidade e pode ocorrer tanto na orientação ‘up’ quanto ‘down’, com menores energias para a orientação ‘up’, cujas estruturas são mostradas nas Figuras 9 e 10. Essa conformação é, aparentemente, a mais estável tanto para a formação do complexo no vácuo quanto em água, e para ambos os campos de forças, MM3\* e AMBER\*. Assim, o valor médio estimado para a população dos complexos, majoritariamente na orientação ‘up’, concorda com os resultados experimentais discutidos anteriormente neste trabalho.

**Tabela 2** Energias e população dos complexos MT:gCD mais estáveis mediante simulação de Dinâmica Molecular

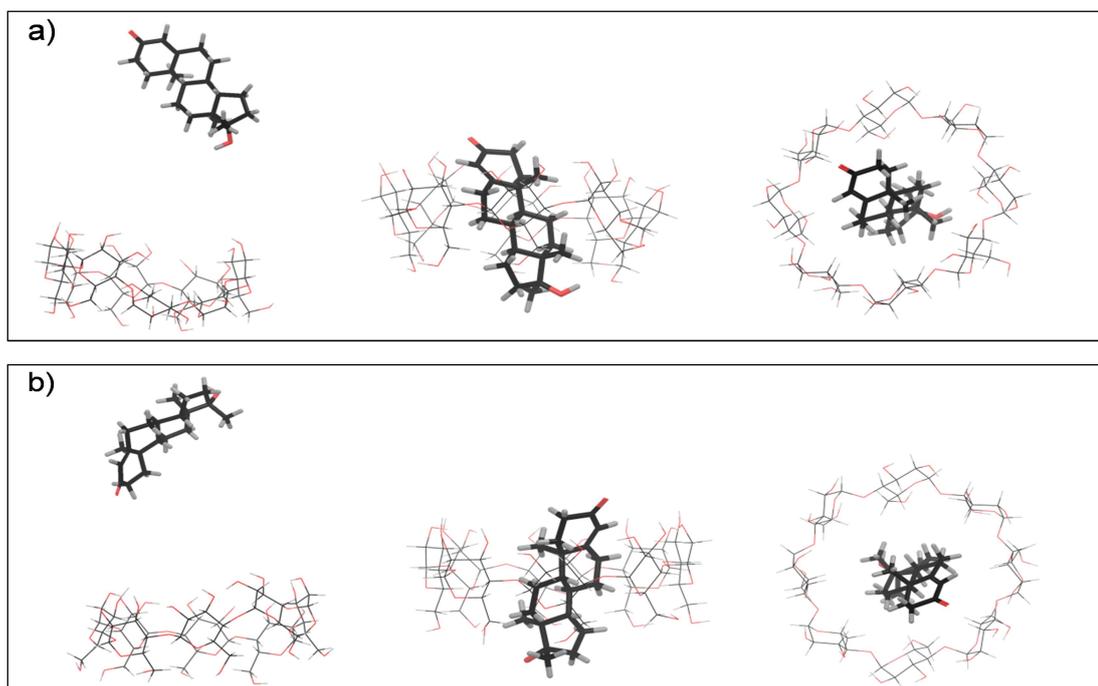
Solvente	Campo de Forças	Posição	Energia Cinética (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta E$ Energia Cinética	Energia Total (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta E$ Energia Total	Desvio Padrão	%
vácuo	MM3*	up-fix	815.68	-0.17	4171.07	-76.59	16.25	99.9
		up-6	815.51		4094.48		15.10	
vácuo	MM3*	down-fix	815.76	-0.22	4164.27	-52.1	21.92	0.1
		down-2	815.54		4112.17		12.37	
water	MM3*	up-fix	815.69	0.07	4046.96	-80.56	14.57	85.6
		up-6	815.76		3966.40		12.85	
water	MM3*	down-fix	815.73	0.1	4044.36	-73.54	15.11	14.4
		down-2	815.83		3970.82		12.59	
vácuo	AMBER*	up-fix	816.20	0.14	2033.69	-99.73	11.50	100.0
		up-5	816.34		1933.96		17.35	
vácuo	AMBER*	down-fix	815.96	-0.33	1988.73	-9.19	29.03	0.0
		down-1	815.63		1979.54		11.27	
water	AMBER*	up-fix	816.07	0	1869.64	-38.96	23.54	97.8
		up-5	816.07		1830.68		15.13	
water	AMBER*	down-fix	815.84	0.65	1870.88	-30.76	19.75	2.2
		down-1	816.49		1840.12		11.10	



**Figura 9** Conformação após Dinâmica Molecular utilizando Campo de Forças MM3\* no vácuo (a) e em água (b). Da esquerda para direita, a MT orientada fora da cavidade da gCD e as duas estruturas seguintes para o complexo menos energético mostrado em 2 perspectivas.

Como mostrado na Tabela 2, para os cálculos realizados com campo de forças MM3\* a população para a orientação ‘up’ é de 99,9 e 85,6%, determinados no vácuo e em água respectivamente. Utilizando o campo de forças AMBER\* a população para a orientação ‘up’ é de 100 e 97,8% para os cálculos realizados no vácuo e em água respectivamente. No entanto, o valor calculado para o desvio padrão é relativamente alto, havendo assim uma ressalva em afirmar que a orientação ‘up’ seja a mais estável, embora a tendência dos valores médios aponte para essa orientação.

Os resultados corroboram entre si, inclusive a orientação que confere maior estabilidade é coerente com os resultados experimentais. A complexação também é favorável, tendo em vista que a molécula de MT permanece na cavidade ao longo da simulação. Assim, a variação de energia entre as simulações realizadas para a orientação ‘down’ foi de um  $\Delta\Delta E$  (kJ/mol) de 42,91 e 41,6 para os cálculos em vácuo e em água respectivamente, estando assim na mesma ordem de variação. No entanto, para a orientação ‘up’ o  $\Delta\Delta E$  (kJ/mol) é de -23,14 e 42,78 para os cálculos em vácuo e em água respectivamente. Essa variação deveria apresentar um valor na mesma ordem e não é o observado. Este ponto está sendo revisado para realizar a submissão do trabalho para publicação.



**Figura 10** Conformação após Dinâmica Molecular utilizando Campo de Forças Amber\* no vácuo (a) e em água (b). Da esquerda para direita, a MT orientada fora da cavidade da gCD e as duas estruturas seguintes para o complexo menos energético mostrado em 2 perspectivas.

#### 4. Conclusões

Este estudo demonstra claramente a formação do complexo de inclusão entre a MT e gCD na razão molar de 1:1. A complexação é comprovada em meio aquoso pelas medidas de absorção na região do UV, que apresenta deslocamento da banda de máxima absorção da MT para estados mais energéticos, com as medidas de  $^1\text{H}$  RMN que confirmam a inclusão total da MT na cavidade da gCD e as medidas de ROESY 2D que contribuíram para elucidação da provável geometria do complexo por meio dos efeitos nOe obtidos entre os H da gCD e da MT. O alto valor determinado para a constante de associação indica que a complexação é bastante favorável e que um percentual elevado do esteroide se encontra na cavidade da gCD. Similarmente aos complexos em meio líquido, a avaliação dos calores de fusão para a MT confirma que no estado sólido o percentual complexado se mantém elevado. Os complexos de estequiometria 1:1 simulados por Dinâmica Molecular, no vácuo e em água, se mostraram estáveis e sugerem a complexação com a carbonila da MT voltada para a face maior da gCD. Finalmente, a complexação em gCD interfere nos parâmetros de solubilidade do esteroide em

água, elevando-a em torno de 17 vezes e promove uma liberação mais lenta em comparação com a MT livre.

Portanto, formulações com complexos de inclusão MT:gCD são passíveis de preparação e devem ter sua absorção investigada *in vivo*, já que o esteroide complexado pode apresentar mudanças na forma pela qual atinge o seu alvo, quando comparado ao não complexado. Esse tipo de preparação possui potencial para aplicação na aquicultura de reversão sexual e pode apresentar, com dosagens reduzidas, boa eficiência e consequentemente menor risco ambiental. Além disso, a complexação da MT em gCD eventualmente deve servir como modelo para inclusão de outros esteroides ou moléculas altamente apolares que apresentem estrutura e/ou determinadas propriedades que remetem à MT.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem o suporte financeiro da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, número do processo: CBB-BDC-00284-15), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, T.V. agradece ao processo: 455630/2014-3), Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da UFSCar pelas análises de RMN e ao Centro de Análises e Prospecção Química da UFLA (CAPQ) pelas facilidades nas análises de DSC.

## Referências

- Aksamija, A., Polidori, A., Plasson, R., Dangles, O., & Tomao, V. (2016). The inclusion complex of rosmarinic acid into beta-cyclodextrin: A thermodynamic and structural analysis by NMR and capillary electrophoresis. *Food chemistry*, *208*, 258-263.
- AMBER\*, Version of the original AMBER program (Cornell, W. D., Cieplak, P., Bayly, C. I., Gould, I. R., Merz, K. M., ..., & Kollman, P. A. (1995) A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids and organic molecules. *Journal of the American Chemical Society*, *117*, 5179) tailored for MACROMODEL, 2012.
- Anirudhan, T. S., Divya, P. L., & Nima, J. (2016). Synthesis and characterization of novel drug delivery system using modified chitosan based hydrogel grafted with cyclodextrin. *Chemical Engineering Journal*, *284*, 1259-1269.
- Arlt, W. (2006). Androgen therapy in women. *European journal of endocrinology*, *154*(1), 1-11.
- Carvalho, L. B., Burusco, K. K., Jaime, C., Venâncio, T., de Carvalho, A. F. S., Murgas, L. D. S., & Pinto, L. D. M. A. (2018). Complexes between methyltestosterone and  $\beta$ -cyclodextrin for application in aquaculture production. *Carbohydrate Polymers*, *179*, 386-393.
- Claridge, T. D. (2016). *High-resolution NMR techniques in organic chemistry* (Vol. 27). Elsevier.
- Del Valle, E. M. (2004). Cyclodextrins and their uses: a review. *Process biochemistry*, *39*(9), 1033-1046.
- El-Greisy, Z. A., & El-Gamal, A. E. (2012). 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*, *38*(1), 59-66.

El-Sayed, A. F. M., Abdel-Aziz, E. S. H., & Abdel-Ghani, H. M. (2012). Effects of phytoestrogens on sex reversal of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) larvae fed diets treated with 17 $\alpha$ -Methyltestosterone. *Aquaculture*, 360, 58-63.

FAO. (2012). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2012*. Rome. 209 pp.

FAO. (2016). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all*. Rome. 200 pp.

FAO. (2017). *FAO Aquaculture Newsletter*. No. 56 (April). Rome.

Giordano, F., Novak, C., & Moyano, J. R. (2001). Thermal analysis of cyclodextrins and their inclusion compounds. *Thermochimica Acta*, 380(2), 123-151.

Grandelli, H. E., Stickle, B., Whittington, A., & Kiran, E. (2013). Inclusion complex formation of  $\beta$ -cyclodextrin and Naproxen: a study on exothermic complex formation by differential scanning calorimetry. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 77(1-4), 269-277.

Greatbanks, D., & Pickford, R. (1987). Cyclodextrins as chiral complexing agents in water, and their application to optical purity measurements. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 25(3), 208-215.

Higuchi, T. K., & Connors, A. (1965). Phase-solubility techniques. *Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation*, 4, 117-121.

Jaime, C., Redondo, J., Sanchez-Ferrando, F., & Virgili, A. (1990). Solution geometry of beta-cyclodextrin-1-bromoadamantane host-guest complex as determined by  $^1\text{H}$  [ $^1\text{H}$ ] intermolecular NOE and MM2 calculations. *The Journal of Organic Chemistry*, 55(15), 4772-4776.

Job, P. (1928). Formation and Stability of Inorganic Complexes in Solution. *Annali di Chimica Applicata*. 9, 113–203.

Lambert, A., Yeguas, V., Monard, G., & Ruiz-López, M. F. (2011). What is the effective dielectric constant in a  $\beta$ -cyclodextrin cavity? Insights from Molecular Dynamics simulations and QM/MM calculations. *Computational and Theoretical Chemistry*, 968(1), 71-76.

Loftsson, T., & Brewster, M. E. (2012). Cyclodextrins as functional excipients: methods to enhance complexation efficiency. *Journal of pharmaceutical sciences*, 101(9), 3019-3032.

L'vova, M. S., Vishnevetskaya, I. A., Maslov, L. G., Shchavlinskii, A. N., & Kozlov, E. I. (1995). Study of progesterone and methyltestosterone melting by the method of differential scanning calorimetry. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 29(6), 432-435.

Macromodel, Version 10.5, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2014.

MM3\*, Version of the original MM3 program (Allinger, N. L., Yuh, Y. H., & Lii, J.H.(1989). *Journal of the American Chemical Society*, 111, 8551–8576) tailored for MACROMODEL, 2014.

Monteil, M., Lecouvey, M., Landy, D., Ruellan, S., & Mallard, I. (2017). Cyclodextrins: A promising drug delivery vehicle for bisphosphonate. *Carbohydrate polymers*, 156, 285-293.

Mura, P. (2014). Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: a review. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 101, 238-250.

Mura, P. (2015). Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in the solid state: A review. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 113, 226-238.

Peng, L., Liu, S., Feng, A., & Yuan, J. (2017). Polymeric Nanocarriers Based on Cyclodextrins for Drug Delivery: Host-Guest Interaction as Stimuli-Responsive Linker. *Molecular Pharmaceutics*, 14(8), 2475-2486.

Renny, J. S., Tomasevich, L. L., Tallmadge, E. H., & Collum, D. B. (2013). Method of continuous variations: applications of Job plots to the study of molecular associations in organometallic chemistry. *Angewandte Chemie International Edition*, 52(46), 11998-12013.

Silverstein, R. M., Webster, F. X., Kiemle, D. J., & Bryce, D. L. (2014). *Spectrometric identification of organic compounds*. John Wiley & Sons.

Singh, A. K. (2013). Introduction of modern endocrine techniques for the production of monosex population of fishes. *General and comparative endocrinology*, 181, 146-155.

Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2017). *Principles of instrumental analysis*. Cengage learning.

Song, M., Li, L., Zhang, Y., Chen, K., Wang, H., & Gong, R. (2017). Carboxymethyl- $\beta$ -cyclodextrin grafted chitosan nanoparticles as oral delivery carrier of protein drugs. *Reactive and Functional Polymers*, 117, 10-15.

Szejtli, J. (2013). *Cyclodextrin technology* (Vol. 1). Springer Science & Business Media.

Uekama, K., Fujinaga, T., Hirayama, F., Otagiri, M., & Yamasaki, M. (1982). Inclusion complexations of steroid hormones with cyclodextrins in water and in solid phase. *International Journal of Pharmaceutics*, 10(1), 1-15.

Verlet, L. (1967). Computer experiments on classical fluids. I. Thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules. *Physical review*, 159(1), 98.

Villiers, A. (1891). Sur la fermentation de la fécule par l'action du ferment butyrique. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences*, 112, 536-538.

Wang, J. H., & Cai, Z. (2008). Investigation of inclusion complex of miconazole nitrate with  $\beta$ -cyclodextrin. *Carbohydrate polymers*, 72(2), 255-260.

Willenbacher, J., Schmidt, B. V., Schulze-Suenninghausen, D., Altintas, O., Luy, B., Delaittre, G., & Barner-Kowollik, C. (2014). Reversible single-chain selective point folding via cyclodextrin driven host–guest chemistry in water. *Chemical Communications*, *50*(53), 7056-7059.

Wimmer, R., Aachmann, F. L., Larsen, K. L., & Petersen, S. B. (2002). NMR diffusion as a novel tool for measuring the association constant between cyclodextrin and guest molecules. *Carbohydrate research*, *337*(9), 841-849.

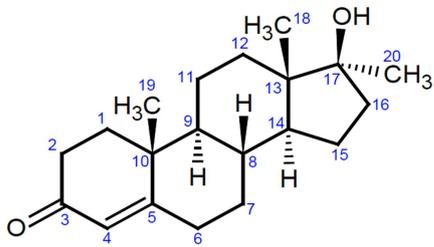
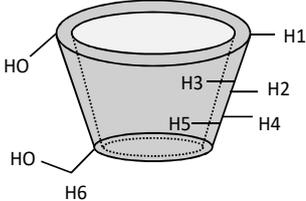
Wohlfarth, C. (2008). *Static dielectric constants of pure liquids and binary liquid mixtures: supplement to IV/6* (Vol. 17). Springer Science & Business Media.

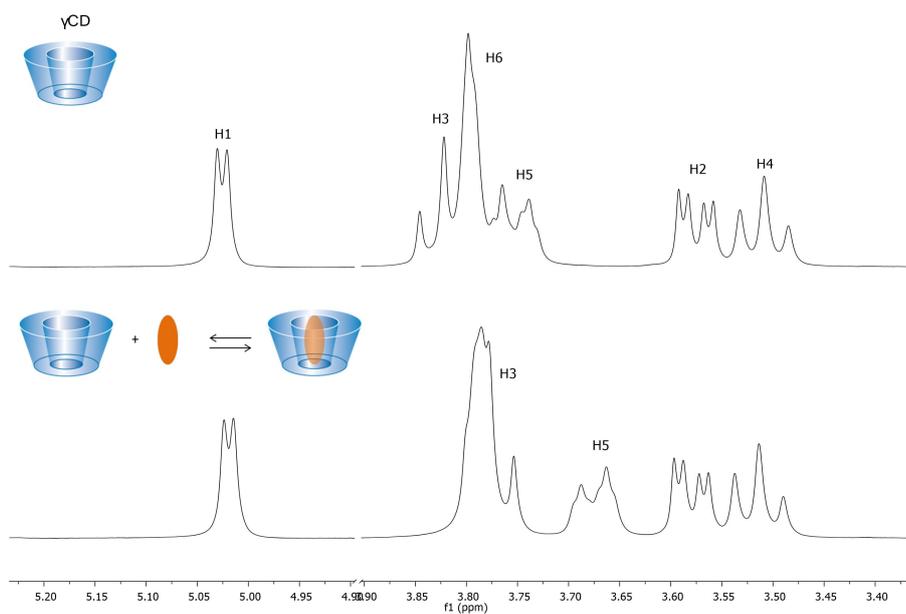
Zhao, R., Sandström, C., Zhang, H., & Tan, T. (2016). NMR Study on the Inclusion Complexes of  $\beta$ -Cyclodextrin with Isoflavones. *Molecules*, *21*(4), 372.

Zhu, G., Feng, N., Xiao, Z., Zhou, R., & Niu, Y. (2015). Production and pyrolysis characteristics of citral–monochlorotriazinyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, *120*(3), 1811-1817.

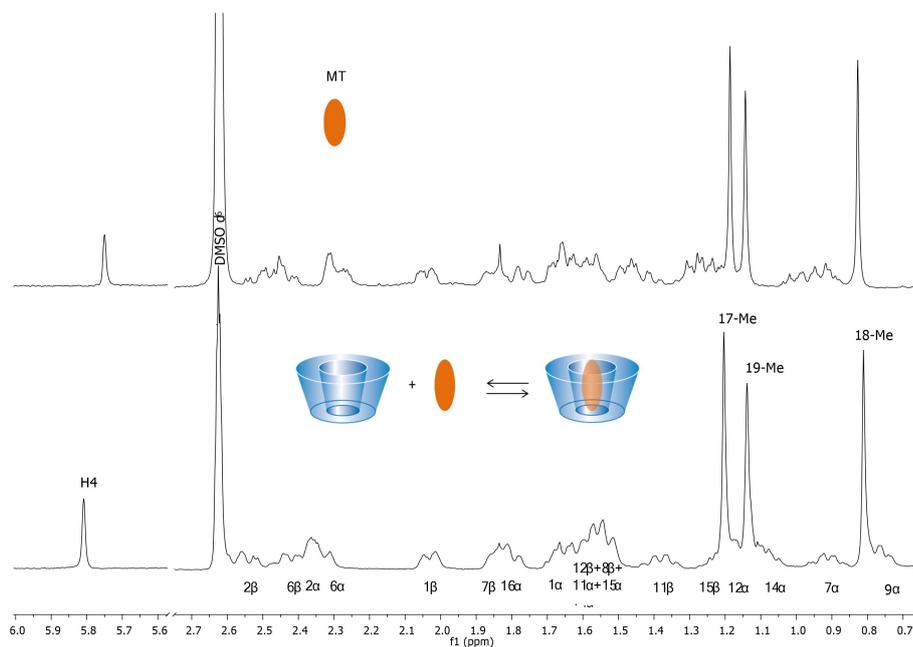
## Material Suplementar

**Tabela S1** Atribuição e variação dos deslocamentos químicos ( $\Delta\delta$ ) da MT e gCD complexadas em relação às estruturas livres.  $^1\text{H}$ , 400 MHz, 25 °C,  $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO}$ .

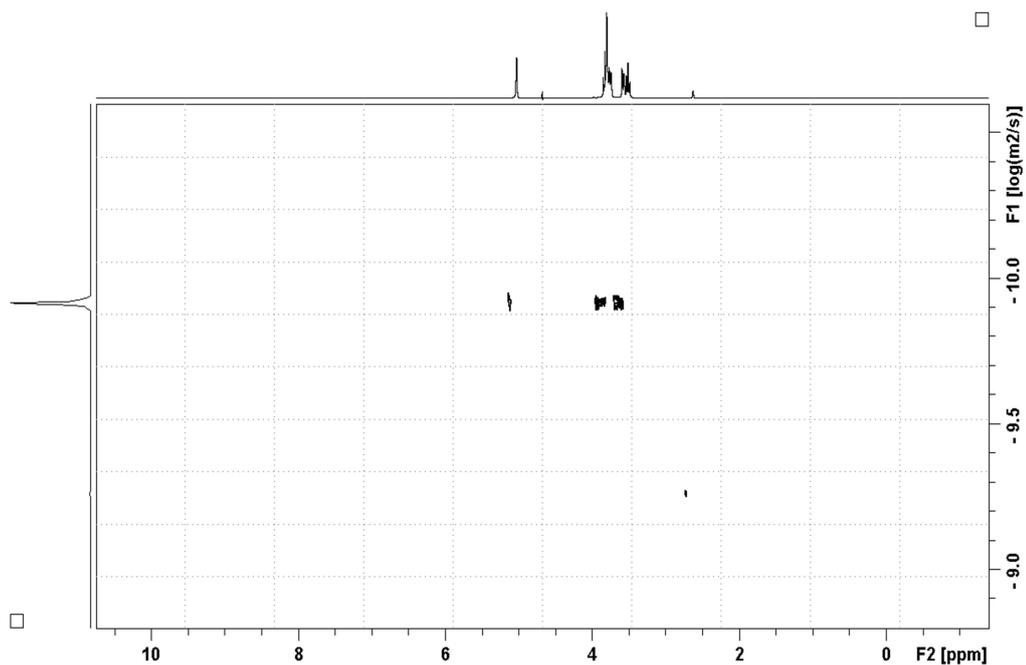
Representação dos H	Posição do hidrogênio	$\delta$ da molécula livre (ppm)	$\delta$ da molécula complexada (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
	9 $\alpha$	0.92	0.77	-0.15
	18Me	0.83	0.81	-0.02
	7 $\alpha$	0.98	0.90	-0.08
	14 $\alpha$	1.22	1.08	-0.14
	19Me	1.14	1.14	0
	12 $\alpha$	1.24	1.18	-0.06
	20Me	1.19	1.20	0.01
	15 $\beta$	1.28	1.24	-0.04
	11b	1.45	1.37	-0.08
	12 $\beta$ +8 $\beta$ + 11 $\alpha$ +15 $\alpha$	nd	1.52-1.60	nd
	1 $\alpha$	nd	1.66	nd
	16 $\alpha$	1.78	1.80	0.02
	7 $\beta$	1.87	1.84	-0.03
	1 $\beta$	2.05	2.03	-0.02
	6 $\alpha$	2.27	2.31	0.04
	2 $\alpha$	2.31	2.36	0.05
	6 $\beta$	2.42	2.44	0.02
	2 $\beta$	2.47	2.53	0.06
	4 $\alpha$	5.75	5.81	0.06
		H1	5.03	5.02
H2		3.58	3.59	0.01
H3		3.82	3.78	-0.04
H4		3.51	3.51	0.0
H5		3.75	3.67	-0.08
H6		3.80	3.79	-0.01



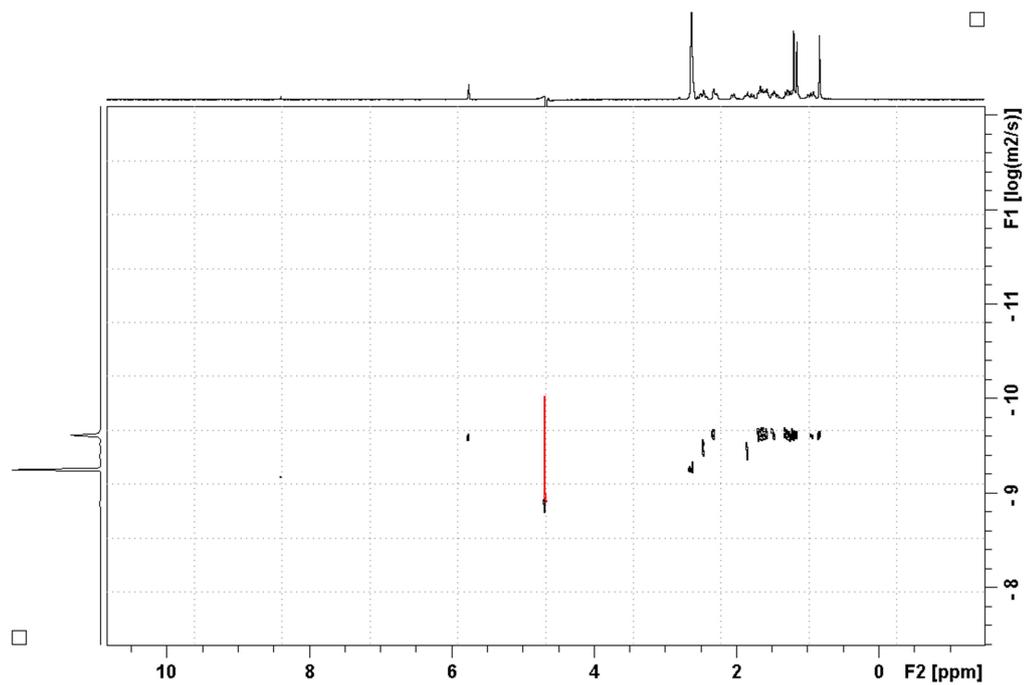
**Figura S1** Espectros  $^1\text{H}$  RMN 400 MHz em  $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO}$  e  $T = 25^\circ\text{C}$  do complexo de inclusão  $\text{MT}:\gamma\text{CD}$  e da  $\gamma\text{CD}$  livre.



**Figura S2** Espectros  $^1\text{H}$  RMN 400 MHz em  $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO}$  e  $T = 25^\circ\text{C}$  do complexo de inclusão  $\text{MT}:\gamma\text{CD}$  e da MT livre.



**Figura S3** Mapa de contorno de difusão (DOSY,  $^1\text{H}$ , 400 MHz, 25 °C,  $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO}$ ) da gCD.



**Figura S4** Mapa de contorno de difusão (DOSY,  $^1\text{H}$ , 400 MHz, 25 °C,  $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO-d}_6$ ) da MT.

## ARTIGO 2

Artigo a ser submetido à revista Composites Science and Technology

### INCORPORAÇÃO DE CICLODEXTRINAS EM SÍLICA MESOPOROSA UTILIZANDO ÁCIDO CÍTRICO

#### RESUMO

Ácido cítrico foi utilizado para funcionalizar as ciclodextrinas à superfície da sílica gerando um compósito híbrido orgânico-inorgânico. As análises termogravimétricas e diferenciais (TGA e DTA) evidenciam alterações físico-químicas nas ciclodextrinas enxertadas na matriz cerâmica, com a redução na temperatura de início da decomposição e a ausência do pico endotérmico que antecede esse evento, presentes para as ciclodextrinas não funcionalizadas. O percentual de funcionalização foi elevado, com cerca de 60% da massa do compósito correspondendo à parte orgânica do material. A área superficial específica reduz com a funcionalização e com o tamanho da ciclodextrina, enquanto os tamanhos de poros, 5-8 nm, são mantidos similares aos da sílica não funcionalizada. As análises espectroscópicas de RMN  $^{13}\text{C}$  e infravermelho indicam que o mecanismo de funcionalização ocorre por uma reação de esterificação entre o ácido cítrico com os grupos silanois da sílica e as hidroxilas primárias das ciclodextrinas. Com essas características, o compósito deve ser avaliado quanto ao seu potencial para utilização em processos de adsorção, catálise, sistemas de liberação de drogas e outras moléculas de interesse comercial.

**Paravras Chave:** Sílica; Ciclodextrina; Funcionalização; Materiais mesoporosos; Reação de esterificação.

## 1. Introdução

Um número considerável de estudos evidencia o forte apelo no desenvolvimento de metodologias inovadoras para o confinamento e transporte molecular [1,2]. Os principais interesses nesse tipo de tecnologia são para aplicação em processos envolvendo o transporte controlado de espécies moleculares no controle de danos ambientais, em sistemas de liberação e entrega de drogas, aprisionamento de moléculas indesejáveis, catálise, dosagens e separação molecular [3].

As ciclodextrinas (CDs) são macromoléculas de oligossacarídeos cíclicos, formadas por unidades de D-(+)-glicopiranoses em ligações  $\alpha$ -1,4, obtidas a partir da degradação enzimática do amido. 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 primárias estão situados na extremidade mais estreita, enquanto os grupos hidroxilas secundárias na parte mais larga. Devido à distribuição dos grupos funcionais que formam a CD, a parte externa adquire caráter hidrofílico e a interna hidrofóbica [4,5]. Tais características possibilitam às CDs formarem complexos de inclusão com uma variedade de compostos orgânicos em solução aquosa. Os critérios para que ocorra a complexação estão basicamente centrados na compatibilidade estérica com a molécula convidada e sua polaridade, tornando-a potencialmente apta para ser incluída na cavidade de uma CD [4-6].

As CDs apresentam muitas vantagens e aplicações em métodos de purificação e podem ser utilizadas como receptores e no reconhecimento seletivo de isômeros de compostos orgânicos, bem como drogas, moléculas ambientalmente tóxicas e biomoléculas [7]. Os aspectos moleculares associados a uma toxicidade praticamente nula tornaram sua aplicação bastante difundida pela indústria farmacêutica como carreador e no melhoramento das propriedades de fármacos [8-10]. A produção de compósitos híbridos e estruturas supramoleculares contendo CDs expandiu o seu emprego em novas áreas da ciência e tecnologia como na agricultura [11,12], na remoção de metais e compostos orgânicos em meio aquoso [13-15], cromatografia [16,17], catálise [18], mascaramento de sabores e odores [19], dentre outras aplicações.

As hidroxilas dispostas no exterior da cavidade das CDs tornam essas macromoléculas compatíveis para funcionalização em suportes inorgânicos como a sílica [20]. A sílica gel é um polímero amorfo, resistente e com alta porosidade, e possui grupos silanois (Si-OH) em sua superfície que permitem sua modificação química, no sentido de produzir materiais com

aplicações tecnológicas diversas [21]. A funcionalização da sílica com grupos orgânicos é muito importante e pode seguir por diferentes rotas de sínteses, sendo envolvida uma variedade de funções orgânicas inseridas nas cadeias e ancoradas covalentemente ao suporte [22,23].

As pesquisas com materiais envolvendo sílicas mesoporosas foram amplamente difundidas desde a década de 1990. Estas sílicas possuem uma estrutura de poros uniformes e alta área superficial, correspondendo em boa eficiência em processos de adsorção seletiva e habilidades catalíticas [7]. Uma das maneiras mais usadas para modificar a sílica é através das reações com agentes silantes, também chamados de organossilanos, que são reagentes muito específicos e caros. Esses reagentes proporcionam uma série de reações diferentes de imobilização que dão origem aos compósitos híbridos orgânico-inorgânicos [23]. Os organossilanos comumente utilizados são extremamente eficientes em reações de imobilização e proporcionam a efetiva ligação da parte orgânica com o suporte inorgânico do óxido. Essa ligação só é possível devido a reatividade dos grupos alcóxidos frente aos silanois presentes na superfície da sílica [24].

Neste contexto, a funcionalização entre ambas as estruturas, dando origem a um compósito híbrido orgânico-inorgânico, resulta em comportamentos funcionais cooperativos não encontrados para as estruturas não associadas [25]. Além do mais, a busca por mecanismos mais simples e menos onerosos para incorporação de matrizes orgânicas em suportes inorgânicos é de grande importância para que se possa expandir cada vez mais as aplicações desses materiais. Este trabalho apresenta nossos resultados recentes na fixação de macromoléculas de CDs em sílica mesoporosa utilizando o ácido cítrico como mediador para o mecanismo de ancoramento.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1. Reagentes e solventes**

Foram utilizados  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ CD com pureza >98% (Sigma-Aldrich), sílica gel de grau cromatográfico com partículas entre 5 e 50  $\mu\text{m}$  (Vetec), ácido cítrico anidro com 99,5% de pureza (Vetec), xilol (Vetec), acetona P.A. 99,5% (Vetec), etanol absoluto (Merck) e ácido clorídrico P.A. 37%.

## 2.2. Incorporação das CDs à superfície da sílica

O ancoramento das CDs à superfície da sílica foi realizado em sistema de refluxo de acordo com metodologia modificada de Carvalho e colaboradores [27]. Inicialmente foi feita a ativação da sílica em meio ácido [27,28], 50 g de sílica gel foi adicionada a 500 mL de HCl 1 mol L<sup>-1</sup>, mantido sob agitação constante por 24 horas, e posteriormente lavado com água deionizada até pH neutro e seco por 12 horas a 150 °C.

Para a funcionalização, 2 g de sílica ativada, CD, ácido cítrico e 50 mL de xilol foram submetidos ao sistema de refluxo por um período de 6 horas. O produto foi lavado abundantemente sob filtração a vácuo, com água deionizada, acetona e etanol, e posteriormente seco em estufa a 90 °C por 24 horas. O material seco foi macerado e resubmetido a um refluxo com 200 mL de etanol para melhor limpeza dos resíduos de xilol, filtrado e novamente seco em estufa a 90 °C durante 24 horas.

## 2.3. Caracterização da sílica organofuncionalizada

Os produtos de síntese foram caracterizados por análise termogravimétrica (TGA) e térmica diferencial (DTA), análises de adsorção de N<sub>2</sub> pelos métodos BET e BJH, espectroscopia na região do infravermelho (IV) e espectroscopia de RMN de <sup>13</sup>C no estado sólido.

As curvas TGA e de DTA foram obtidas sob atmosfera de N<sub>2</sub>, utilizando um aparelho Shimadzu detector DTG-60 AH, com temperatura variando entre 25 e 600 °C, fluxo de gás de 50 mL min<sup>-1</sup>, massa inicial da amostra de cerca de 10 mg e taxa de aquecimento de 10 °C min<sup>-1</sup>.

As medidas de áreas de superfície específicas (SSA, sigla em inglês de Specific Surface Areas) e porosidade de amostras de sílica foram realizadas com base na volumetria de adsorção-dessorção de nitrogênio com N<sub>2</sub> líquido à temperatura de 77 K. As isotermas de adsorção-dessorção de nitrogênio foram registradas em um Belsorp-mini II (BEL Japan, Inc). O dispositivo é equipado com sensores de pressão na faixa de 0-133 kPa. As isotermas de adsorção-dessorção de nitrogênio foram realizadas utilizando um método passo a passo em uma gama de pressões relativas de nitrogênio até 0,98. Todas as experiências foram realizadas com nitrogênio ultra puro (> 99,9995%). Antes das medidas, todas as amostras foram degaseificadas sob vácuo durante a noite, a 110 °C, para obtenção de amostras limpas.

O método BET (Brunauer, Emmett, Teller) foi utilizado para avaliar a área superficial específica, utilizando uma área de seção transversal de moléculas de nitrogênio de 16,3 Å [29]. O volume microporoso (diâmetro < 20Å) e a área superficial externa foram estimados a partir do método do t-plot [30]. A distribuição de tamanho dos mesoporos (diâmetro entre 20 e 500 Å) foi avaliada utilizando o método BJH (Barret, Joyner e Halenda) [31].

Utilizou-se um espectrômetro Shimadzu - modelo IRAffinity-1, com transformada de Fourier para obtenção dos espectro de absorção na região IV, empregando-se pastilhas de KBr e 1,5% de amostra. Os espectros foram obtidos na faixa de 4000 a 400 cm<sup>-1</sup>, com resolução de 8 cm<sup>-1</sup> e número de acumulações igual a 32 scans.

Os experimentos de RMN no estado sólido, de <sup>13</sup>C com polarização cruzada (CP, sigla em inglês de Cross Polarization) e rotação em torno do ângulo mágico (MAS, sigla em inglês de Magic Angle Spinning) (RMN CPMAS de <sup>13</sup>C), foram realizados em um espectrômetro BRUKER Avance III 400 MHz que opera em um campo magnético de 9,4 T e equipado com uma sonda MAS de duplo canal de 4,0 mm. Os materiais em pó foram embalados em rotores de ZrO<sub>2</sub> de 4 mm e foram selados com tampas Kel-F apertadas. A rotação da amostra foi configurada para 12 kHz em todos os experimentos. Os deslocamentos químicos de <sup>13</sup>C foram relatados em partes por milhão (ppm) referenciados externamente ao adamantano (pico do CH<sub>2</sub> ajustado para 38,5 ppm).

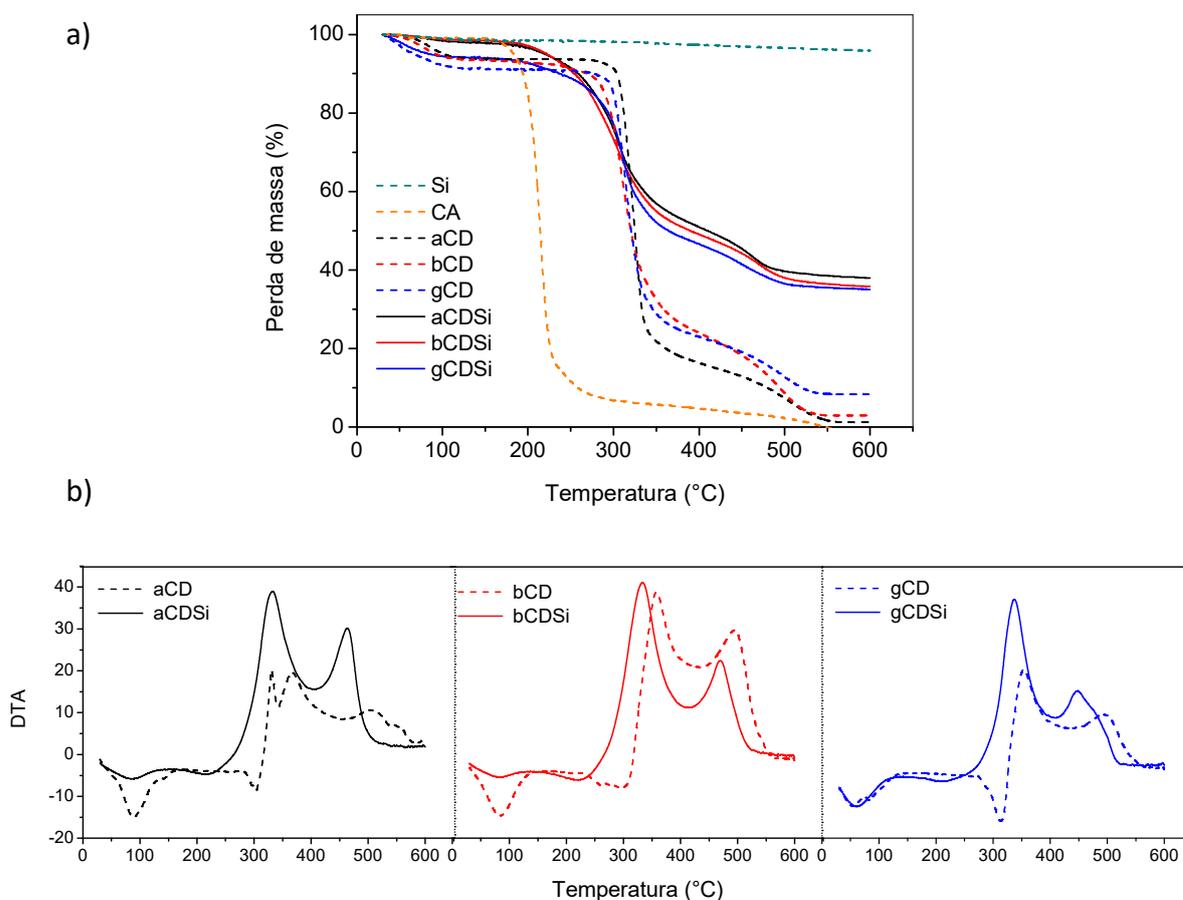
### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Análise termogravimétrica

A degradação térmica dos compósitos e seus precursores foi investigada por análise termogravimétrica (TGA) e diferencial (DTA), cujas curvas estão demonstradas na Figura 1. Além de inferir quanto ao processo de funcionalização da superfície da sílica, pois há mudanças no perfil termogravimétrico e nas entalpias dos materiais sintetizados, essa técnica fornece valores aproximados referentes à composição relativa dos novos materiais [32].

Na Figura 1, a primeira etapa de perda de massa, observada nas curvas TG e nos perfis endotérmicos da DTA, até 130 °C está relacionada com a desidratação dos reagentes e produtos de síntese. As CDs apresentam, naturalmente, moléculas de água de solvatação adjacentes e inclusas em suas cavidades [33], portanto o percentual de perda de massa é um pouco maior para essas estruturas, sendo de 6,3, 6,8 e 8,9% para aCD, bCD e gCD

respectivamente. As moléculas de água também são associadas à maior estabilização da estrutura cristalina das CDs, que se tornam mais amorfas com a desidratação [5]. Assim, o menor grau de hidratação para os compósitos aCDSi e bCDSi, 1,3 e 1,4% respectivamente, podem estar relacionados ao fato de que essas CDs se tornaram mais amorfas com sua funcionalização, enquanto que para a gCDSi esse grau de hidratação, de 5,9% não sofreu uma redução considerável.



**Figura 1** Curvas termogravimétricas (a) e de DTA (b) para as amostras de sílica (Si), ácido cítrico (CA), aCD, aCDSi, bCD, bCDSi, gCD e gCDSi.

As CDs, além da primeira etapa de perda de massa, constituindo a desidratação do material, apresentam mais uma etapa entre 270 e 360 °C referente à decomposição dos grupos orgânicos que, de acordo com o perfil endotérmico seguido ao exotérmico das curvas DTA, se inicia em fase sólida e continua em estado líquido após a fusão [33]. E uma terceira e última etapa com perfil exotérmico, acima de 360 °C, atribuída à ignição dos resíduos finais [34].

A sílica é um material inorgânico e apresenta apenas uma ligeira perda de massa de menos de 2%, no estágio inicial, atribuída à desidratação de água adsorvida. Enquanto o ácido cítrico apresenta uma etapa com perda de 1,9% referente ao processo de desidratação, que ocorre até os 120 °C e uma segunda etapa que se inicia em 160 °C levando à degradação total deste composto orgânico.

O perfil termogravimétrico e das curvas DTA apresentados neste trabalho evidenciam a ocorrência de alterações físico-químicas nas CDs ancoradas à sílica (Figura 1). O material sintetizado tem uma ligeira queda nas temperaturas iniciais de decomposição comparada às CDs livres, iniciando em torno de 200 °C e alcançando aproximadamente 15% de perda de massa em 270 °C, temperatura essa que estaria associada ao início da degradação térmica para as CDs não funcionalizadas. A ausência do pico endotérmico associado às temperaturas de fusão para as CDs e o ácido cítrico, assim como a permanência dos dois picos exotérmicos, embora um pouco mais intensos e ligeiramente deslocados para temperaturas mais baixas, similares aos perfis de degradação térmica para suas respectivas CDs não ancoradas, indicam que a funcionalização da sílica possivelmente está ocorrendo com o intermédio do ácido cítrico funcionando como uma espécie de ligante entre as estruturas.

A otimização do processo de síntese pela utilização da sílica gel tratada em solução ácida, concomitante à lavagem em refluxo de etanol, proporcionou um incremento no rendimento da reação, como mostra a Tabela 1, havendo um maior percentual de CDs aderidas à matriz inorgânica por intermédio do ácido cítrico, quando comparado aos materiais obtidos por Carvalho e colaboradores [26] e Baracho e colaboradores [35]. A sílica gel comercial apresenta uma menor concentração de grupos silanois superficiais adequados para a modificação sendo, portanto, necessária a ativação da sua superfície para disponibilizar mais grupos silanois para as ligações de funcionalização [27]. A otimização no mecanismo de funcionalização deve propiciar ao novo material um incremento em sua capacidade de interação com outras moléculas, e deverá ser avaliado quanto a aplicações por exemplo, em processos de adsorção, catálise, sistemas de liberação de drogas e outros tipos de moléculas de interesse comercial.

**Tabela 1** Percentagem relativa de CDs funcionalizadas com ácido cítrico à sílica comercial e tratada previamente em solução ácida.

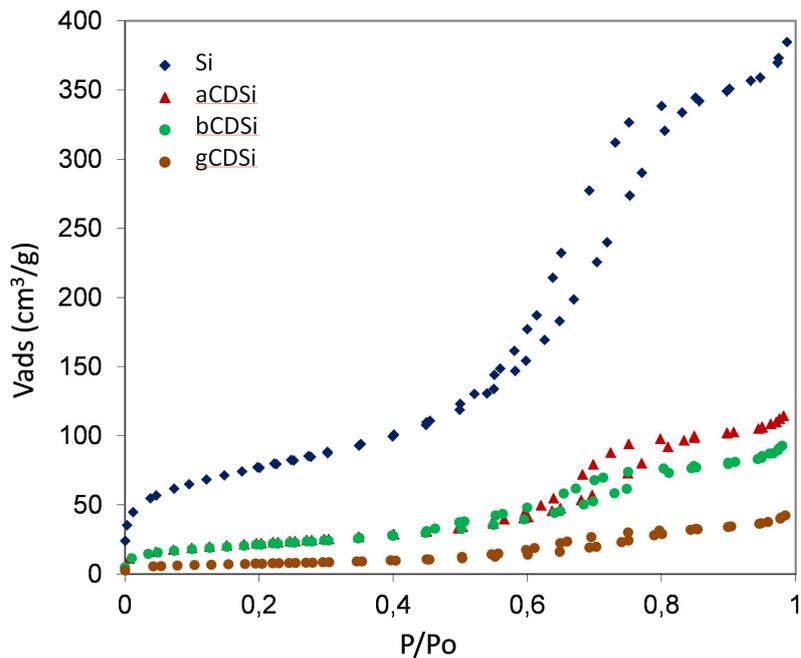
CDSi	% de ancoramento	
	Si comercial	Si tratada
$\alpha$	41,0	60,6
$\beta$	44,0	62,6
$\gamma$	47,0	58,9

### 3.2. Adsorção e dessorção de N<sub>2</sub>

O método BET fornece uma avaliação precisa da área superficial específica avaliando a adsorção de múltiplas camadas de nitrogênio que são medidas como uma função da pressão relativa usando um analisador totalmente automatizado (Belsorp-mini). A técnica fornece a área externa da superfície, bem como a avaliação da área dos poros para determinar a superfície específica total em m<sup>2</sup>g<sup>-1</sup> e o tamanho dos poros [29]. Neste estudo, as isotermas de adsorção e dessorção de N<sub>2</sub>, para a sílica empregada como suporte e também dos compósitos formados pelas 3 diferentes CDs (Figura 2), possuem um loop de histerese típico de isotermas de adsorção tipo IV, associadas a materiais mesoporosos [36], e as áreas superficiais específicas evoluem com a conformação da CD funcionalizada na superfície inorgânica (Tabela 2).

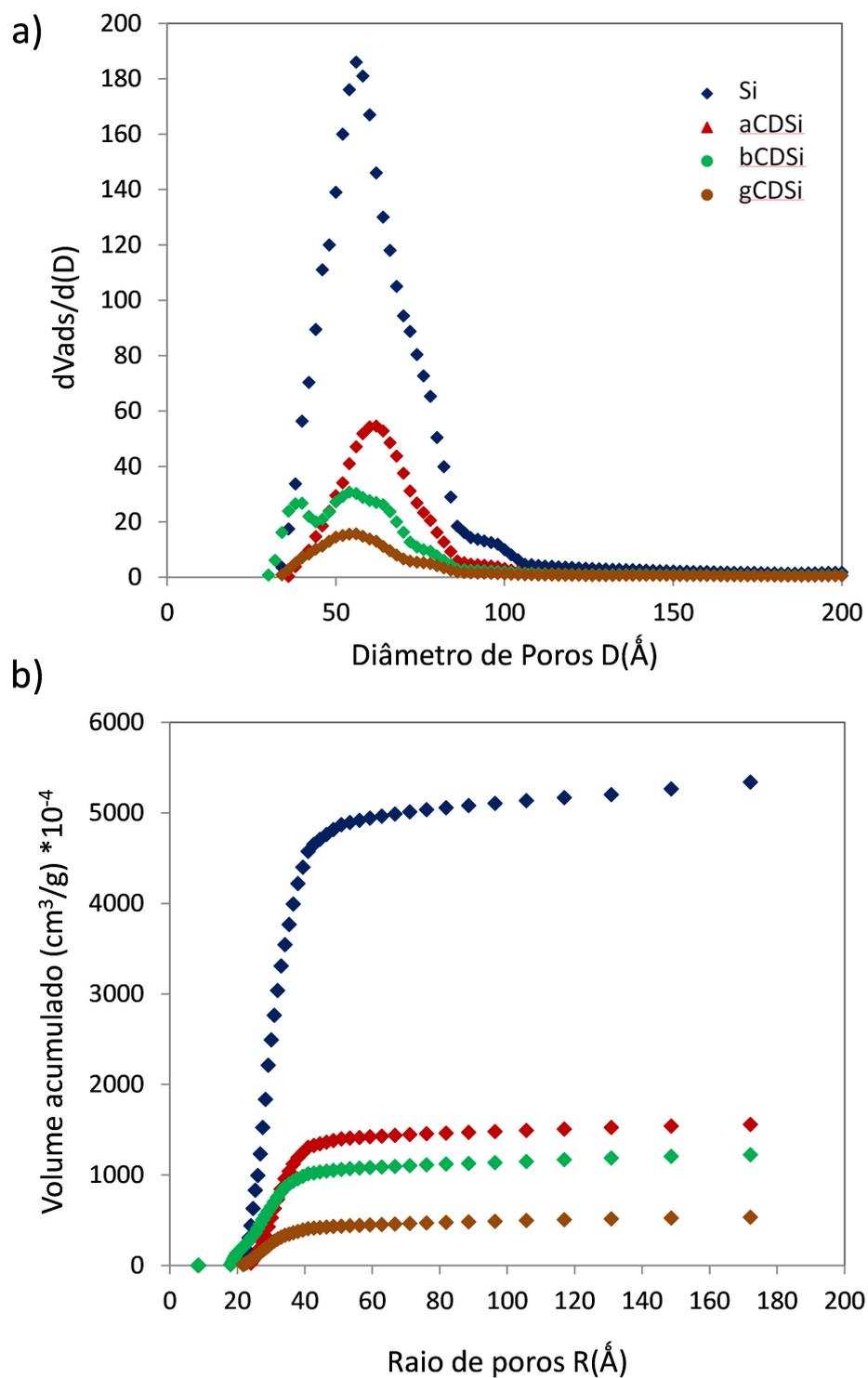
**Tabela 2** Área superficial específica obtidas pelo método BET.

Amostras (degaseificadas a 110 °C no vácuo)	Área superficial específica SSA (m <sup>2</sup> /g)	Constante C
Sílica	276,0 ± 8,7	128
aCDSi	80,0 ± 6,6	110
bCDSi	76,0 ± 6,8	119
gCDSi	26,5 ± 6,4	128



**Figura 2** Isotermas de adsorção-desorção de N<sub>2</sub> a 77 K para sílica (Si), aCDSi, bCDSi e gCDSi.

Sobre a distribuição de tamanho de mesoporos (forma cilíndrica de poros) determinada pelo método BJH (Figura 3) mostra diâmetros em torno de 5-8 nm para todos os materiais [31,36]. O pico inicial observado para a curva verde (bCDSi) é provavelmente um artefato. Além da área específica, o volume dos poros diminui quando o tamanho molecular é aumentado (Tabela 3). Por ser a sílica um material mesoporoso, o processo de funcionalização de sua superfície empregado neste trabalho possivelmente ocupa os sítios e canais específicos de adsorção. A estabilidade relativa da constante energética C (método BET), que está relacionada à afinidade do adsorvato (nitrogênio) com o adsorvente [29], é estável, o que sugere que as moléculas enxertadas estão localizadas dentro dos mesoporos, deixando disponíveis as superfícies externas à adsorção de nitrogênio. Como em todos os compósitos o percentual de incorporação por grupamentos orgânicos é de aproximadamente 60%, e o bloqueio para o acesso de N<sub>2</sub> às superfícies externas é maior para as CDs de maior diâmetro, assim essas CDs devem estar promovendo um bloqueio mais efetivo para a difusão do adsorvato para os sítios de adsorção existentes na superfície da sílica, e/ou podem estar funcionalizadas à sílica por um número maior de agentes ligantes, e que conseqüentemente estariam ocupando mais sítios de adsorção.



**Figura 3** Distribuição de tamanho de mesoporos (forma cilíndrica de poros) pelo método de BJH (a) e volume acumulado de mesoporos (b).

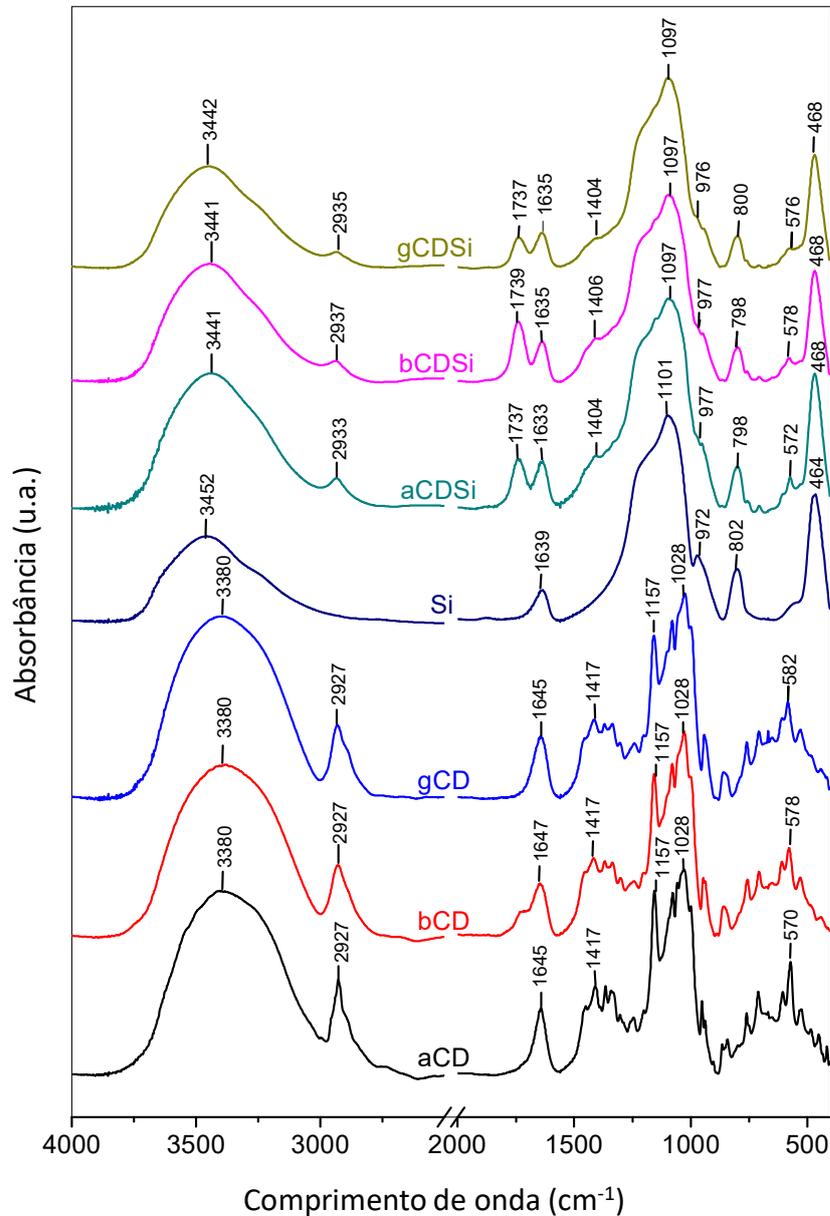
**Tabela 3** Tamanho das moléculas de CDs e volumes acumulados de mesoporos.

Amostra	Tamanho da CD (Å)		Volume de mesoporo (cm <sup>3</sup> /g) (volume gás)	Volume de mesoporo (cm <sup>3</sup> /g) (volume líquido)*10 <sup>-4</sup>
	Diâmetro da cavidade interna	Diâmetro externo		
Sílica	--	--	0,56	8,6
aCDSi	4,7 – 5,2	14,2 – 15,0	0,17	2,6
bCDSi	6,0 – 6,4	15,0 – 15,8	0,14	2,2
gCDSi	7,5 – 8,3	17,1 – 17,9	0,06	0,9

### 3.3. Espectroscopia na região do infravermelho

A incorporação dos oligossacarídeos à superfície da sílica é evidenciada pela variação de intensidade e deslocamento de bandas de absorção características dos materiais frente aos seus precursores. Nos espectros de IV (Figura 4), as bandas de absorção largas presentes em torno de 3400 cm<sup>-1</sup> são características de estiramentos O-H dos grupos silanois, de água remanescente adsorvida e grupamentos hidroxilas das CDs [26,37]. Nos produtos de síntese é possível notar um aumento de intensidade concomitante a uma ligeira alteração no perfil dessa banda, se comparado à sílica pura e ficando centradas entre as bandas de absorção de seus precursores. Tais mudanças são ocasionadas por contribuição dos estiramentos O-H das CDs aderidas à sílica.

A banda em 2927 cm<sup>-1</sup> é característica das vibrações de deformação axial de C-H das CDs [38]. A ligeira variação no deslocamento vibracional, para comprimentos de onda maiores, pode ser observada nos três materiais sintetizados, fornecendo indícios da modificação da sílica com as CDs. A presença da banda em 1737 cm<sup>-1</sup> para os compósitos obtidos é referente ao grupamento carbonila, proveniente do agente ligante utilizado para a funcionalização, neste caso o ácido cítrico. Além da matriz inorgânica poder ter ativa as ligações OH da superfície pelo grupo carboxila (-COOH) [39], o ácido cítrico também pode ser utilizado como agente esterificante havendo relatos de aplicação em materiais celulósicos através de ligações do tipo éster com os monômeros de glicose [40-42]. A banda de absorção presente na região de 1635 cm<sup>-1</sup> é atribuída às vibrações angulares das moléculas de água [37] cujo suporte à superfície da sílica provoca leve alteração de suas intensidades e deslocamentos, podendo estar relacionado a interações mais fortes destas moléculas com o compósito ou impedimentos de alguns modos vibracionais pela nova estrutura.

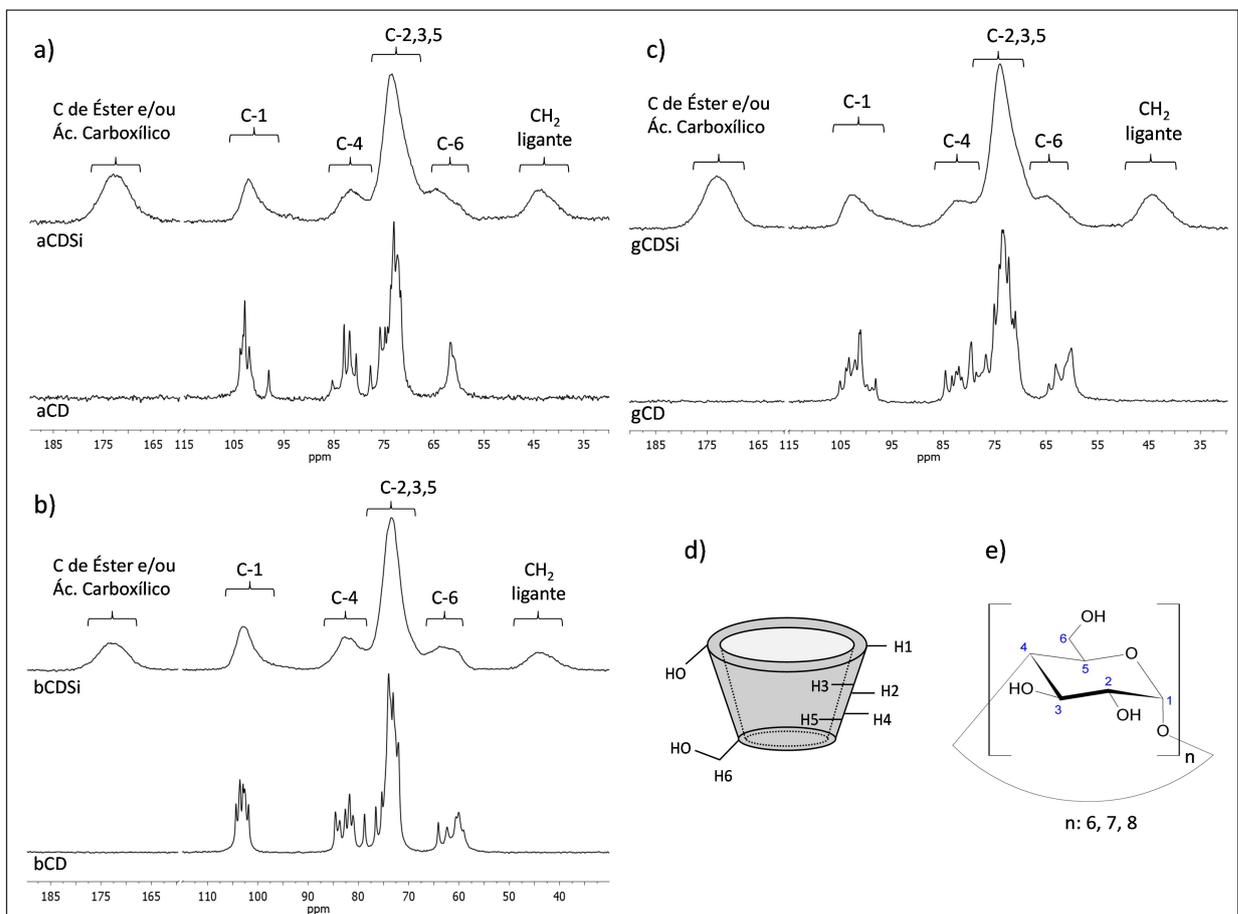


**Figura 4** Espectros de infravermelho das amostras de aCD, bCD, gCD, sílica (Si), aCDSi, bCDSi e gCDSi

A bandas características em  $972\text{ cm}^{-1}$  correspondem ao grupo  $\equiv\text{Si-OH}$ , que trata da deformação dos silanois livres que cobrem a superfície da sílica e em  $802\text{ cm}^{-1}$  é atribuída ao estiramento Si-OH [37,38] e têm sua intensidade reduzida nos espectros dos compósitos. Como a reatividade da sílica está associada a alta concentração de grupos silanois, os quais são centros reativos que possibilitam a imobilização de moléculas [21,26,43], é provável que estes grupos estejam sendo utilizados nas ligações de ancoramento das CDs em sua superfície.

### 3.4. Espectroscopia de RMN de $^{13}\text{C}$ no estado sólido

A Espectroscopia de RMN no estado sólido foi empregada na intenção de identificar os possíveis pontos de ligação entre as estruturas que compõem o híbrido e, corroborando com as demais técnicas de caracterização, propor um mecanismo envolvido na incorporação das diferentes CDs à superfície da sílica. A Figura 5 mostra o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  400 MHz para as CDs livres e seus respectivos compósitos, e na Tabela 4 apresenta as respectivas atribuições para os sinais dos distintos carbonos que constituem essas estruturas [44].



**Figura 5** Representação da estrutura das CDs e espectros de  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta/\text{ppm}$ ) para as ciclodextrinas livres (aCD, bCD e gCD) e funcionalizadas em sílica (aCDSi, bCDSi e gCDSi).

Os sinais para as CDs em sua forma livre se mostram bem definidos, em contraste aos sinais para os compósitos, que sofrem drástica redução em suas definições, apresentando-se em forma de sinais únicos e alargados. O perfil desses sinais para os compósitos evidenciam

que as estruturas dos oligossacarídeos sofreram algum impedimento nos movimentos moleculares inerentes do processo de ancoramento.

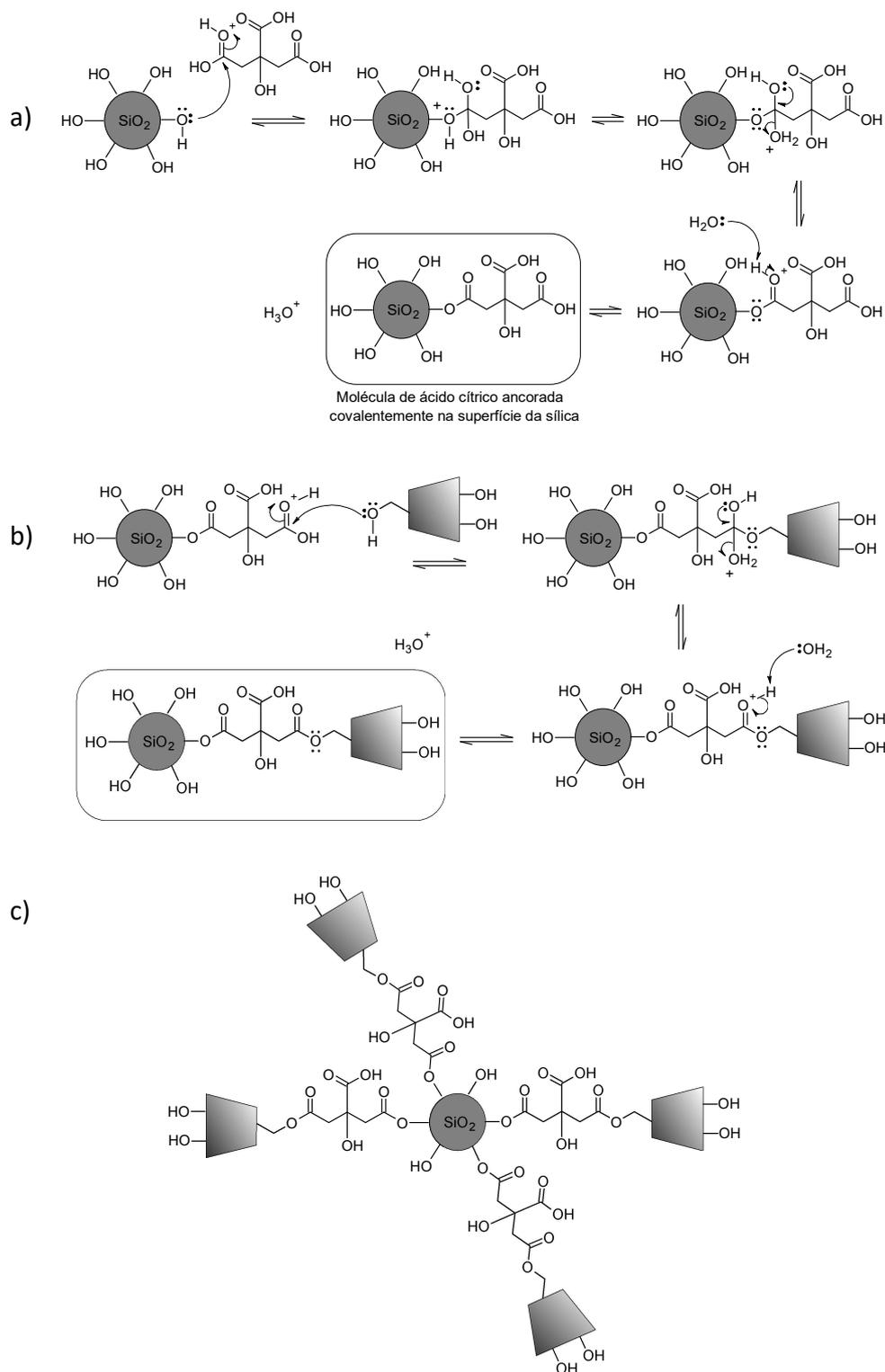
**Tabela 4**  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\delta/\text{ppm}$ ) para as ciclodextrinas livres e funcionalizadas em sílica.

	C-1	C-4	C-2,3,5	C-6	Éster e/ou ác. carboxílico	CH <sub>2</sub> (ligante)
aCD	103,78	85,33	75,78	61,70		
	103,21	83,00	74,78	61,14		
	102,87	81,88	74,25			
	101,99	80,56	73,63			
	98,07	77,71	73,01			
			72,31			
			71,65			
<b>média</b>	<b>102,87</b>	<b>81,88</b>	<b>73,63</b>	<b>61,42</b>		
<b>aCDSi</b>	<b>102,22</b>	<b>81,53</b>	<b>73,39</b>	<b>64,62</b>	<b>172,93</b>	<b>43,43</b>
bCD	104,32	84,55	76,52	64,10		
	103,54	83,71	75,33	62,35		
	102,93	82,60	73,98	60,59		
	102,61	81,75	73,09	60,05		
	101,85	81,07	72,05	59,10		
	102,93	78,77	73,98	60,59		
<b>média</b>	<b>102,93</b>	<b>82,18</b>	<b>73,98</b>	<b>60,59</b>		
<b>bCDSi</b>	<b>102,93</b>	<b>82,11</b>	<b>73,46</b>	<b>63,63</b>	<b>173,29</b>	<b>44,43</b>
gCD	105,09	84,6	75,11	64,49		
	103,96	83,33	74,11	63,15		
	103,38	82,52	73,58	61,02		
	102,18	81,99	73,33	60,11		
	101,35	81,41	72,29			
	101,12	79,58	71,47			
	99,85	78,61	71,01			
	98,91	77,49				
	98,17	76,74				
<b>média</b>	<b>101,35</b>	<b>81,41</b>	<b>73,33</b>	<b>63,15</b>		
<b>gCDSi</b>	<b>102,63</b>	<b>82,31</b>	<b>73,97</b>	<b>64,91</b>	<b>173,1</b>	<b>44,20</b>

Para comparar as variações nos deslocamentos químicos dos carbonos, entre as CDs livres e daquelas incorporadas à sílica, é levada em consideração a média dos sinais específicos para cada tipo de carbono e os valores de deslocamentos centrados em cada sinal alargado correspondente [44], valores esses apresentados na Tabela 4. A maior variação no C-

6 para as CDs (alfa, beta e gama, de 3,2, 3,04 e 1,76 respectivamente) indica que possivelmente a ligação ocorre por esse carbono [20], deixando as estruturas de CDs ancoradas de forma a manter mais livre, à utilização desse material para complexação com outras moléculas, a cavidade mais larga ou ficando dependuradas à superfície inorgânica.

A participação do ácido cítrico como agente ligante entre a matriz inorgânica e as CDs é evidenciada pelo sinal que aparece em torno de 173 ppm, característico de grupamentos carbonílicos associados a ligações do tipo éster e de ácidos carboxílicos. O novo material também apresenta um sinal na região de 44 ppm atribuído ao CH<sub>2</sub> proveniente da estrutura do ácido cítrico. Diante os resultados obtidos das caracterizações, foi realizada a proposta do mecanismo de funcionalização das CDs à superfície da sílica (Figura 6). O ácido cítrico atua como ligante entre o polímero inorgânico, através de uma reação de esterificação entre um grupamento carboxílico e um silanol, e com o oligossacarídeo, também por uma reação de esterificação envolvendo a hidroxila ligada ao C6 da ciclodextrina.



**Figura 6** Mecanismo de esterificação de uma hidroxila da superfície da sílica com o grupamento carboxílico de uma molécula de ácido cítrico (a), mecanismo de esterificação de uma unidade de ciclodextrina com o grupamento carboxílico da molécula de ácido cítrico ancorada na superfície da sílica (b), e exemplo de uma partícula de sílica com outros pontos de ancoramento do ácido cítrico com a ciclodextrina (c).

#### 4. Conclusão

Três compósitos híbridos orgânico-inorgânicos foram produzidos pela funcionalização das ciclodextrinas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  à sílica utilizando o ácido cítrico como ligante. O percentual de ciclodextrinas associadas ao ácido cítrico e fixadas na matriz inorgânica foi de aproximadamente 60% para as três macromoléculas. Os resultados das análises térmicas (TGA e DTA) indicam a ocorrência de alterações físico-químicas para as ciclodextrinas funcionalizadas, pela ausência do pico endotérmico que antecede o evento de decomposição e também a diminuição da temperatura na qual se inicia a decomposição. A área superficial específica reduziu com a funcionalização e com a utilização de ciclodextrinas maiores, enquanto os tamanhos de poros, 5-8 nm, foram mantidos similares aos da sílica não funcionalizada, possivelmente ao bloqueio ou mesmo maior utilização dos sítios de adsorção ativos da sílica gel. De acordo com as análises espectroscópicas de RMN  $^{13}\text{C}$  e infravermelho, foi possível propor um mecanismo para a funcionalização dos oligossacarídeos à sílica. Os resultados indicam que o processo é intermediado pelo ácido cítrico, em uma reação de esterificação entre os grupamentos carboxílicos com os silanois e as hidroxilas primárias das ciclodextrinas. Conhecendo as propriedades das ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão com uma série de substratos, o compósito deve apresentar aplicações promissoras em processos de adsorção, catálise, sistemas de liberação de drogas e outras moléculas de interesse comercial.

#### Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPEMIG pelo suporte financeiro (projeto CBB-BDS-00284-15); o Servei de Ressonância Magnètica Nuclear, UAB, pela disponibilização dos espectrômetros de RMN para esse projeto; o Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux, Université de Lorraine, por facilitar as medidas de SSA e porosidade das amostras.

## Referências

- [1] L.A.S. Bahari, H.Hamishchkar, The Impact of Variables on Particle Size of Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers; A Comparative Literature Review, *Adv. Pharm. Bull.* 6 (2016) 143.
- [2] J. Safari, Z. Zarnegar, Advanced drug delivery systems: Nanotechnology of health design A review, *J. Saudi Chem. Soc.* 18 (2014) 85-99.
- [3] A. Calvo, B. Yameen, F.J. Williams, G.J. Soler-Illia, O. Azzaroni, Mesoporous films and polymer brushes helping each other to modulate ionic transport in nanoconfined environments. An interesting example of synergism in functional hybrid assemblies, *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 10866-10868.
- [4] M.E. Brewster, T. Loftsson, Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (2007) 645-666.
- [5] J. Szejtli, *Cyclodextrin technology*, Springer Science & Business Media, 2013.
- [6] C. Alvarez-Lorenzo, C.A. García-González, A. Concheiro, Cyclodextrins as versatile building blocks for regenerative medicine, *Journal of Controlled Release*, 268 (2017) 269-281.
- [7] X. Xu, Z. Liu, X. Zhang, S. Duan, S. Xu, C. Zhou,  $\beta$ -Cyclodextrin functionalized mesoporous silica for electrochemical selective sensor: simultaneous determination of nitrophenol isomers, *Electrochim. Acta* 58 (2011) 142-149.
- [8] A.C.S. Akkari, E.V.R. Campos, A.F. Keppler, L.F. Fraceto, E. de Paula, G.R. Tófoli, D.R. de Araujo, Budesonide-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex in binary poloxamer 407/403 system for ulcerative colitis treatment: A physico-chemical study from micelles to hydrogels, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 138 (2016) 138-147.

- [9] Z. Aytac, H.S. Sen, E. Durgun, T. Uyar, Sulfisoxazole/cyclodextrin inclusion complex incorporated in electrospun hydroxypropyl cellulose nanofibers as drug delivery system, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 128 (2015) 331-338.
- [10] S.M. Gontijo, P.P. Guimarães, C.T. Viana, Â.M. Denadai, A.D. Gomes, P.P. Campos, ..., M.E. Cortés, Erlotinib/hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex: characterization and in vitro and in vivo evaluation, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 83 (2015) 267-279.
- [11] J.L. Oliveira, E.V.R. Campos, M. Bakshi, P.C. Abhilash, L.F. Fraceto, Application of nanotechnology for the encapsulation of botanical insecticides for sustainable agriculture: prospects and promises, *Biotechnol. Adv.* 32 (2014) 1550-1561.
- [12] M. Rubio-Bellido, E. Morillo, J. Villaverde, Effect of addition of HPBCD on diuron adsorption–desorption, transport and mineralization in soils with different properties. *Geoderma* 265 (2016) 196-203.
- [13] F. Zhao, E. Repo, D. Yin, Y. Meng, S. Jafari, M. Sillanpää, EDTA-cross-linked  $\beta$ -cyclodextrin: an environmentally friendly bifunctional adsorbent for simultaneous adsorption of metals and cationic dyes, *Environ. Sci. Technol.* 49 (2015), 10570-10580.
- [14] R.M. Kakhki, Application of magnetic nanoparticles modified with cyclodextrins as efficient adsorbents in separation systems, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 82 (2015) 301-310.
- [15] H.M. Shen, G.Y. Zhu, W.B. Yu, H.K. Wu, H.B. Ji, H.X. Shi, ..., Y.F. Zheng, Fast adsorption of p-nitrophenol from aqueous solution using  $\beta$ -cyclodextrin grafted silica gel, *Appl. Surf. Sci.* 356 (2015) 1155-1167.
- [16] G. Varga, G. Fodor, I. Ilisz, J. Szemán, J. Visy, L. Szente, A. Péter, Comparison of separation performances of novel  $\beta$ -cyclodextrin-based chiral stationary phases in high-performance liquid chromatographic enantioseparation, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 70 (2012) 71-76.

- [17] S. Fox, H. Strasdeit, S. Haasmann, H. Brückner, Gas chromatographic separation of stereoisomers of non-protein amino acids on modified  $\gamma$ -cyclodextrin stationary phase, *J. Chromatogr. A* 1411 (2015) 101-109.
- [18] A. Kumar, R.D. Shukla,  $\beta$ -Cyclodextrin catalysed C–C bond formation via C (sp<sup>3</sup>)–H functionalization of 2-methyl azaarenes with diones in aqueous médium, *Green Chem.* 17 (2015) 848-851.
- [19] G. Zhu, Z. Xiao, R. Zhou, Y. Zhu, Study of production and pyrolysis characteristics of sweet orange flavor- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex, *Carbohydr. Polym.* 105 (2014) 75-80.
- [20] A.R. Khan, P. Forgo, K.J. Stine, V.T. D'Souza, Methods for selective modifications of cyclodextrins, *Chem. Rev.* 98 (1998) 1977-1996.
- [21] R.J. Corriu, J.J. Moreau, P. Thepot, M. Wong Chi Man, Hybrid silica gels containing 1, 3-butadiyne bridging units. Thermal and chemical reactivity of the organic fragmente, *Chem. Mater.* 8 (1996) 100-106.
- [22] J. Aguado, J.M. Arsuaga, A. Arencibia, M. Lindo, V. Gascón, Aqueous heavy metals removal by adsorption on amine-functionalized mesoporous silica, *J. Hazard. Mater.* 163 (2009) 213-221.
- [23] V.B. Cashin, D.S. Eldridge, A. Yu, D. Zhao, Surface functionalization and manipulation of mesoporous silica adsorbents for improved removal of pollutants: a review, *Environmental Science: Water Res. Technol.* (2018). DOI: 10.1039/c7ew00322f
- [24] P.K. Jal, S. Patel, B.K. Mishra, Chemical modification of silica surface by immobilization of functional groups for extractive concentration of metal ions, *Talanta*, 62 (2004) 1005-1028.
- [25] C. Coll, A. Bernardos, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, Gated silica mesoporous supports for controlled release and signaling applications, *Acc. Chem. Res.* 46 (2012) 339-349.

- [26] L.B. Carvalho, T.G. Carvalho, Z.M. Magriotis, T.C. Ramalho, L.M.A. Pinto, Cyclodextrin/silica hybrid adsorbent for removal of methylene blue in aqueous media, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 78 (2014) 77-87.
- [27] N. Jiang, X. Chang, H. Zheng, Q. He, Z. Hu, Z. Selective solid-phase extraction of nickel (II) using a surface-imprinted silica gel sorbent, *Anal. Chim. Acta* 577 (2006) 225-231.
- [28] S.A. Kozlova, S.D. Kirik, Post-synthetic activation of silanol covering in the mesostructured silicate materials MCM-41 and SBA-15, *Microporous Mesoporous Mater.* 133 (2010) 124-133.
- [29] S. Brunauer, P.H. Emmett, E. Teller, Adsorption of gases in multimolecular layers, *J. Am. Chem. Soc.* 60 (1938) 309-319.
- [30] J.H. de Boer, B.C. Lippens, B.G. Linsen, J.C.P. Broekhoff, A. Van den Heuvel, T.J. Osinga, The curve of multimolecular N<sub>2</sub>-adsorption, *J. Colloid Interface Sci.* 21 (1966) 405-414.
- [31] E.P. Barrett, L.G. Joyner, P.P. Halenda, The determination of pore volume and area distributions in porous substances. I. Computations from nitrogen isotherms, *J. Am. Chem. Soc.* 73 (1951) 373-380.
- [32] M. Dogan, S.M. Unlu, Flame retardant effect of boron compounds on red phosphorus containing epoxy resins, *Polym. Degrad. Stab.* 99 (2014) 12-17.
- [33] F. Giordano, C. Novak, J.R. Moyano, Thermal analysis of cyclodextrins and their inclusion compounds, *Thermochim. Acta* 380 (2001) 123-151.
- [34] L.C. Cruz, C.M. Perez, H.M. Romero, P.G. Casillas, Synthesis of magnetite nanoparticles- $\beta$ -cyclodextrin complex, *J. Alloys Compd.* 466 (2008) 330-334.

- [35] R.V. Baracho, L.B. Carvalho, J.M. Andrade, A.F. Venceslau, D.A. Rocha, L.M.A. Pinto, Obtention and characterization of a silica and cyclodextrin hybrid material. *Quím. Nova* 38 (2015) 1063-1067.
- [36] M. Thommes, K. Kaneko, A.V. Neimark, J.P. Olivier, F. Rodriguez-Reinoso, J. Rouquerol, K.S. Sing, Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.* 87 (2015) 1051-1069.
- [37] R.M. Silverstein, F.X. Webster, D.J. Kiemle, D.L. Bryce, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, John Wiley & Sons, 2014.
- [38] I. Trofymchuk, N. Roik, L. Belyakova, Structural Variety and Adsorptive Properties of Mesoporous Silicas with Immobilized Oligosaccharide Groups, *Nanoscale Res. Lett.* 12 (2017) 307.
- [39] A.Z.M. Badruddoza, G.S.S. Hazel, K. Hidajat, M.S. Uddin, Synthesis of carboxymethyl- $\beta$ -cyclodextrin conjugated magnetic nano-adsorbent for removal of methylene blue, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 367 (2010) 85-95.
- [40] C. Demitri, R. Del Sole, F. Scalera, A. Sannino, G. Vasapollo, A. Maffezzoli, ..., L. Nicolais, Novel superabsorbent cellulose-based hydrogels crosslinked with citric acid, *J. Appl. Polym. Sci.* 110 (2008) 2453-2460.
- [41] M.G. Raucci, M.A. Alvarez-Perez, C. Demitri, D. Giugliano, V. de Benedictis, A. Sannino, L. Ambrosio, Effect of citric acid crosslinking cellulose-based hydrogels on osteogenic differentiation, *J. Biomed. Mater Res. A* 103 (2015), 2045-2056.
- [42] Y. Bai, X. Chen, A fast water-induced shape memory polymer based on hydroxyethyl cellulose/graphene oxide composites, *Compos. Part A Appl. Sci. Manuf.* 103 (2017) 9-16.

[43] B. Dou, Q. Hu, J. Li, S. Qiao, Z. Hao, Adsorption performance of VOCs in ordered mesoporous silicas with different pore structures and surface chemistry, *J. Hazard. Mater.* 186 (2011) 1615-1624.

[44] S.J. Heyes, N.J. Clayden, C.M. Dobson,  $^{13}\text{C}$ -CP/MAS NMR studies of the cyclomalto-oligosaccharide (cyclodextrin) hydrates, *Carbohydr. Res.* 233 (1992) 1-14.

### ARTIGO 3

Artigo a ser submetido à revista Journal of Hazardous Materials

## REMOÇÃO DO HORMÔNIO SINTÉTICO METILTESTOSTERONA EM SOLUÇÃO AQUOSA USANDO O COMPÓSITO DE $\beta$ -CICLODEXTRINA E SÍLICA

### RESUMO

Neste trabalho foi avaliada a eficiência do compósito de sílica e  $\beta$ -ciclodextrina na remoção do hormônio 17  $\alpha$ -metiltestosterona em meio aquoso. A adsorção é rápida e efetiva na faixa de pH ácido, com uma expressiva capacidade de adsorção, 11 mg g<sup>-1</sup>. O melhor ajuste cinético para aos modelos de pseudo-primeira e pseudo-segunda-ordem indica que o mecanismo de adsorção é físico, porém ocorre em sítios independentes. Tal constatação é corroborada pelo ajuste aos modelos de isothermas de Sips e Langmuir, sugerindo a inclusão do hormônio nas cavidades hidrofóbicas das ciclodextrinas. O valor  $n_S$ , 0,75-0,92, sugere que a superfície é parcialmente heterogênea e o  $R_L$ , 0,64-0,72, mostra que o processo é favorável. O processo de remoção é espontâneo e exotérmico, cuja magnitude do valor de  $\Delta H$  (-3,129 kJ mol<sup>-1</sup>) confirma que as interações entre o hormônio e o compósito são de natureza fraca. A remoção em coluna demonstrou a eficiência do compósito para a filtragem do hormônio em meio aquoso e a dessorção, realizada com etanol, é rápida e eficaz deixando o material em condições de reuso. Assim o compósito apresenta grande potencial para ser utilizado no tratamento de águas residuais contendo o esteroide estudado, e poderá ter sua eficácia avaliada para outras moléculas esteroides.

**Palavras Chave:** Contaminantes esteroides; Metiltestosterona; Ciclodextrinas; Compósito; Adsorção.

## 1. Introdução

Dentre uma grande variedade de poluentes emergentes, os hormônios esteroides são especialmente preocupantes por causa de seus potenciais efeitos sobre a biota aquática e também ao homem, via consumo de água e alimentos contendo esse tipo de resíduo [1]. Esse tipo de contaminantes são bioacumulativos e atuam como disruptores endócrinos, que podem interferir no sistema reprodutivo e no desenvolvimento natural de organismos vivos [1,2].

A metiltestosterona (MT) é um andrógeno sintético derivado da testosterona que apresenta atividade endócrina no tratamento do hipogonadismo masculino e da puberdade retardada e é extensivamente empregado na aquicultura de reversão sexual [3]. Essa molécula possui alta predisposição para bioacumulação, e há casos de metabólitos biologicamente ativos ocorrendo em efluentes de instalações aquícolas, fazendo-se necessário o desenvolvimento de novas tecnologias capazes de tratar os efluentes contaminados [1,4].

Tratando-se de processos de descontaminação ambiental, a utilização da sílica gel apresenta uma grande variedade de aplicações, pois a simples ligação covalente estabelecida na superfície do polímero é capaz de produzir materiais com características amplamente desejáveis, como aplicação em sistemas de catálise, adsorção, fases estacionárias para cromatografia [5,6], processos biotecnológicos [7], sensores eletroquímicos [8], extração de cátions [9], troca iônica [10], dentre outras.

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos obtidos a partir da degradação enzimática do amido, e apresentam habilidade para formar complexos de inclusão com uma infinidade de substratos. A inclusão de moléculas hóspede na cavidade das CDs depende essencialmente da compatibilidade estérica e dos critérios de polaridade existentes com a molécula convidada. 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 [11]. A  $\beta$ -ciclodextrina (bCD) é a CD natural mais largamente utilizada para a complexação, tanto por suas propriedades como pela abundância e consequentemente menor custo. Sua cavidade tem um diâmetro de cerca de 7Å, sendo grande o bastante para acomodar um anel aromático, por exemplo [12,13].

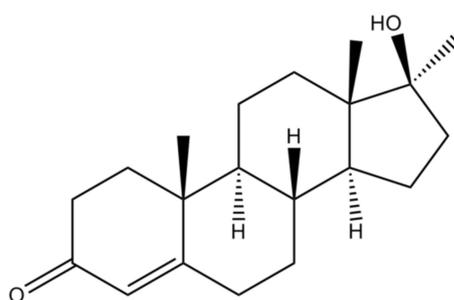
O uso de CDs funcionalizadas em sílica já vem sendo estudado e apresentando resultados muito interessantes, como em biomedicina para liberação controlada de drogas utilizadas no controle de células tumorais [14], na separação de moléculas de colesterol de alimentos [15], no tratamento de contaminantes emergentes [16,17], dentre inúmeras outras

aplicações. Importante ressaltar que a capacidade da MT na complexação com a bCD livre foi estudada pelo grupo, e os resultados indicaram uma alta afinidade do esteroide pela cavidade hidrofóbica, com uma constante de associação ( $k_a$ ) igual a  $7540 \text{ L mol}^{-1}$  [18]. Assim, este trabalho tem por objetivo a avaliação do compósito preparado pela funcionalização da bCD em sílica, na remoção do hormônio MT em meio aquoso visando a produção de sistemas de filtragem desse contaminante e futura expansão para outros esteroides.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Adsorvato

O adsorvato utilizado neste estudo foi a 17- $\alpha$ -metiltestosterona (MT) com pureza mínima de 97% (Sigma-Aldrich), cuja estrutura é mostrada na Figura 1; fórmula molecular,  $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_2$ ; massa molecular, 302,45; e solubilidade,  $34 \text{ mg L}^{-1}$  em água a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Todas as soluções foram preparadas em água ultrapura obtida por sistema Milli-Q (Millipore<sup>®</sup>, Bedford, MA, USA). A solução estoque de MT a  $100 \text{ }\mu\text{M}$  foi preparada pela solubilização do hormônio com auxílio de banho ultrassom, que foi posteriormente diluída para as demais concentrações utilizadas (5, 10, 20, 30, 40, 60 e  $80 \text{ }\mu\text{M}$ ).



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

### 2.2. Adsorvente

A  $\beta$ -ciclodextrina ancorada covalentemente à sílica (bCDSi), produzida de acordo com trabalhos anteriores do grupo [16], foi empregada como adsorvente. O adsorvente foi obtido, portanto, em refluxo de 6 horas a partir de 2g de  $\beta$ -Ciclodextrina (pureza  $> 98\%$ , Sigma-Aldrich), sílica gel de grau cromatográfico (Vetec) previamente tratada em meio ácido (HCl

1 mol L<sup>-1</sup>), ácido cítrico (99,5%, Vetec) e 50 mL de xilol (Vetec) como solvente. Na sequência, o produto obtido foi lavado consecutivamente em água, acetona e etanol, seco em estufa a 90 °C, macerado e passado por peneira de controle granulométrico de 60 mesh.

### 2.3. Experimentos de adsorção

Os experimentos de adsorção foram realizados pela adição de 20 mL de solução de MT, nas diferentes concentrações e temperaturas avaliadas, em 5 mg de adsorvente. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e sob agitação constante de 120 rpm, as soluções de hormônio e adsorvente foram centrifugadas a 2500 g e as quantificações da MT realizadas em espectrofotômetro de UV-Visível (Biochrom Libra S12) no comprimento de onda de 249 nm. A capacidade de adsorção ( $q_e$ , em mg g<sup>-1</sup>) da MT em bCDSi foi calculada pela equação seguinte:

$$q_e = \frac{(C_0 - C_e)V}{m} \quad (1)$$

onde,  $C_0$  e  $C_e$  correspondem às concentrações de MT inicial e no equilíbrio respectivamente (mg L<sup>-1</sup>),  $V$  é o volume da solução e  $m$  a massa do adsorvente utilizado [19,20], no caso a bCDSi.

Para a avaliação do pH no processo de adsorção do esteroide pela bCDSi foram utilizadas soluções de MT 30 µM e o pH ajustado entre 2 e 12 com HCl e NaOH 0,1 e 0,025 mol L<sup>-1</sup>, respectivamente. As soluções foram mantidas em agitação por um período de 6 horas a 25 ± 2 °C.

Nos ensaios cinéticos foram empregadas soluções de MT nas concentrações de 10, 30 e 60 µM. O meio contendo o adsorvente foi mantido sob agitação constante a 25 ± 2 °C, onde alíquotas foram coletadas em intervalos de tempo pré-definidos e quantificadas.

Os experimentos das isotermas de adsorção foram conduzidos em banhos termostatizados nas temperaturas de 25, 35, 45 e 55 °C, e agitação constante por 12 h. Para fins de controle, a remoção da MT em sílica pura foi avaliada em ensaio conduzido a 25 °C.

A identificação do modelo cinético e de isoterma que oferece os melhores ajustes aos dados experimentais foi realizado pelo teste de Qui-quadrado não-linear [19,20]. A estatística

do teste se baseia fundamentalmente no somatório dos quadrados das diferenças entre os dados experimentais e calculados, com cada diferença quadrada sendo dividida por seu valor correspondente, apurado a partir dos modelos. A equação matemática para os cálculos é sumarizada como:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^N \frac{(q_{e,exp} - q_{e,calc})^2}{q_{e,calc}} \quad (2)$$

onde  $q_{e,exp}$  e  $q_{e,calc}$  correspondem à capacidade de adsorção obtida experimentalmente e calculada a partir do modelo respectivamente. A análise do conjunto de dados utilizando o teste de Qui-quadrado é uma ferramenta importante para confirmar o modelo, cinético ou de isoterma, que melhor se ajuste ao processo de adsorção.  $\chi^2$  será um valor pequeno se os dados do modelo forem análogos aos dados experimentais, ou será grande se forem diferentes.

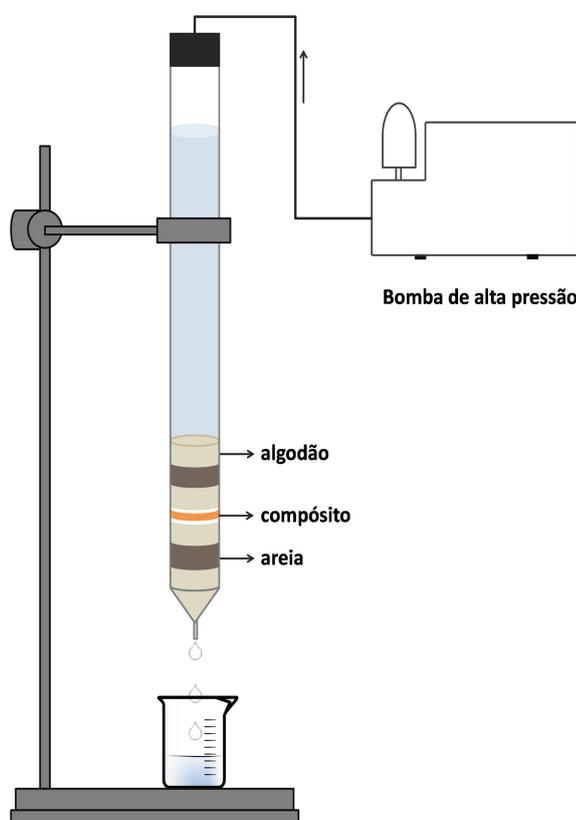
#### 2.4. Ensaio de Dessorção

Os experimentos para avaliar a dessorção do hormônio da bCDSi foram constituídos de 2 etapas. Na etapa 1, foram imersos 60 mg do adsorvente em 240 mL de solução de MT 100  $\mu$ M. O meio foi mantido sob agitação constante por 12 h, posteriormente centrifugado e a parte sólida seca em dessecador. Na etapa 2 foi realizado de fato o ensaio de dessorção, que constituiu-se da imersão de 5 mg do adsorvente impregnado de MT (preparado na etapa 1) em 20 mL de etanol 99,8% (Vetec). A dessorção foi quantificada pelo monitoramento da absorbância no comprimento de onda de 249 nm, em intervalos de tempo pré-definidos, levando-se em consideração o quantitativo que foi removido por grama de adsorvente na etapa 1.

#### 2.5. Ensaio em coluna

100 mg do adsorvente (bCDSi) foram empregados no ensaio de remoção em coluna. A montagem da coluna foi realizada como esquematizado na Figura 2, utilizando uma bureta com 1,19 cm de diâmetro e capacidade de 50 mL. Para a montagem do sistema de filtragem em coluna foi utilizado algodão estéril, papel de filtro e areia previamente lavada

(sequencialmente em: NaOH 0,5M, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado e exaustivamente em água deionizada) e seca. A estruturação da coluna se deu pela compactação sequencial de 1 cm<sup>3</sup> de algodão, areia e algodão, 1 folha de papel filtro com diâmetro de 1,19 cm, 100 mg do adsorvente, e novamente 1 folha de papel filtro, 1 cm<sup>3</sup> de algodão, areia e algodão. A coluna foi então condicionada pela passagem de 1 L de água ultrapura. Para avaliar a possível interferência dos componentes de recheio no processo de remoção da MT, foi construída uma segunda coluna similar à descrita anteriormente, no entanto, substituindo os 100 mg de adsorvente por 100 mg de sílica.



**Figura 2** Esquema representativo do aparato experimental utilizado para a remoção de MT em coluna empregando o composto bCDSi.

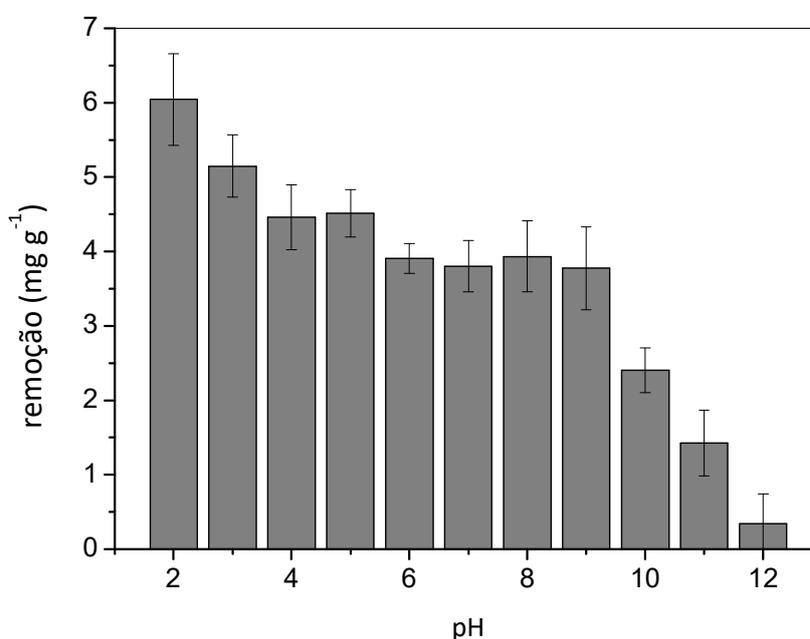
Através da coluna foi feita a filtração descendente de uma carga de hormônio de 10 µM até completa saturação do composto. Entre uma carga e outra a coluna era regenerada pela passagem de etanol 99,8%, e recondicionada com água ultrapura. Tanto na retenção como na eluição, a cada 2 mL de volume corrido pela coluna era monitorada, por meio dos valores de absorbância, a concentração de MT resultante nessas alíquotas. Com auxílio de

uma bomba, foi mantida constante a pressão de 2,5 psi sobre o fluido, e um fluxo de líquido de  $0,48 \text{ mL min}^{-1}$ .

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Efeito do pH

O pH pode facilmente atuar nas propriedades do adsorvente, bem como na especiação do adsorvato, sendo assim um importante parâmetro no controle da adsorção [21]. A Figura 3 representa o potencial de adsorção da MT em bCDSi para soluções em uma faixa de pH de 2 a 12. O estudo mostra que a remoção do hormônio é um processo dependente do pH da solução, cuja eficiência decresce com o seu aumento. Os efeitos adsorventes devem estar mediados por interações de hidrogênio, ou outras forças motrizes como van der Waals e interações hidrofóbicas entre o esteroide e a cavidade da ciclodextrina, e o meio ácido favorece essas interações entre o adsorvente e a MT.



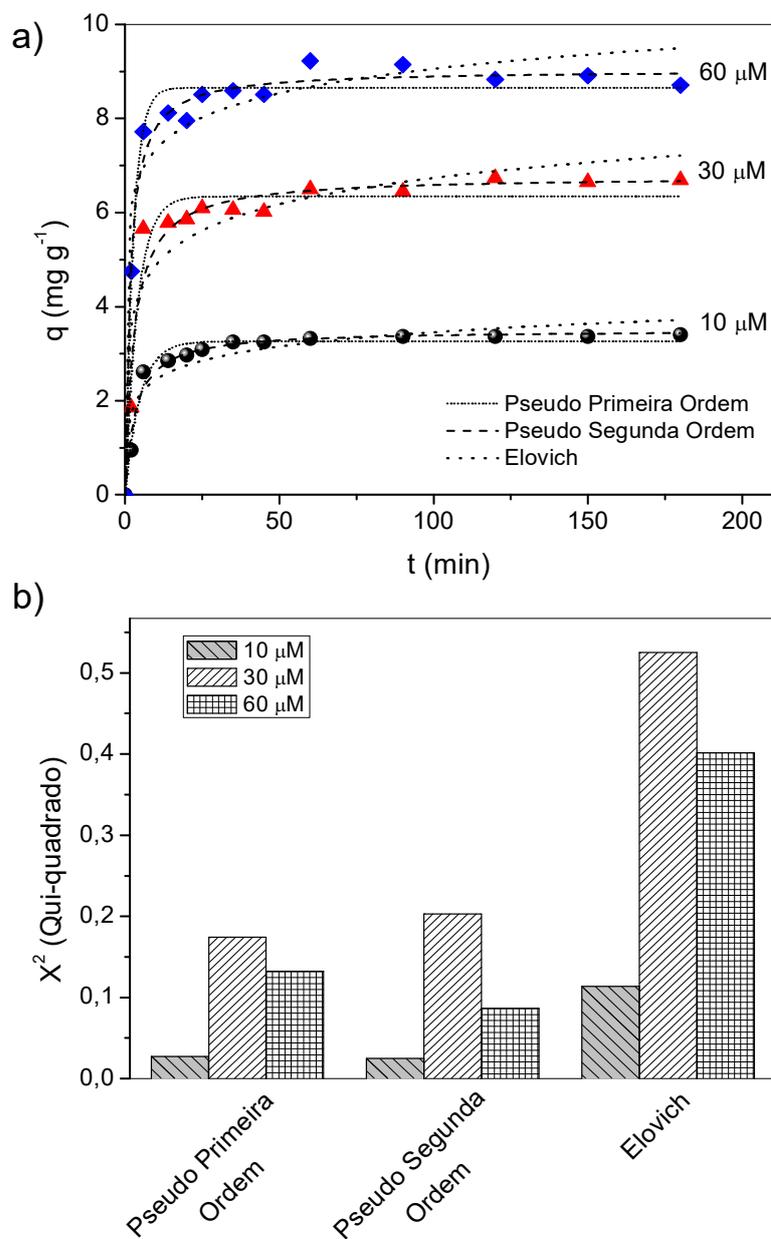
**Figura 3** Efeito do pH na remoção de MT pelo nanocompósito (bCDSi).

Estudos já demonstraram que a constante de associação de uma molécula hidrofóbica com a cavidade de uma ciclodextrina pode ser afetado pelo pH do meio [23]. A MT é uma

molécula bipolar, com um grupo funcional hidroxilo em C-17 e cetona em C-3 conjugado à uma dupla ligação, que possui tendência em estabelecer ligações de hidrogênio. A depender do balanço iônico do meio, a entropia de liberação da água de inclusão das ciclodextrinas pode ser afetada e influenciar diretamente na associação com a molécula hóspede. Presumidamente, o efeito do pH na remoção do hormônio pode estar associado ao fato de que os hidrogênios do oligossacarídeo estabelecem uma rede de ligações intermoleculares [24], que em pH neutro deve estar bastante consolidadas. A protonação das hidroxilas da ciclodextrina em meio ácido, pode causar algum desbalanço nas ligações de hidrogênio intermoleculares e favorecer as intramoleculares com a molécula esteroide. Além disso, a tendência das enonas em serem fortes aceitadores de hidrogênio, pode sofrer de uma influencia eletrostática com a protonação das ciclodextrinas, esse efeito pode contribuir com a aproximação e orientação mais efetiva do esteroide com a cavidade da ciclodextrina, o que explica a efetividade da adsorção em meio ácido [23,24].

### 3.2. Estudo cinético da adsorção de MT

A cinética de adsorção da MT em bCDSi foi acompanhada por um período de 3 horas (Figura 4a) sem nenhum ajuste no pH. Para melhor compreensão do mecanismo de adsorção do hormônio pelo compósito, foram empregados modelos cinéticos de reação e de difusão que contribuem para definir se o processo é controlado por adsorção química ou física [25]. As curvas cinéticas (Figura 4a), conduzidas em três concentrações distintas (10, 30 e 60  $\mu\text{M}$ ), mostram que a remoção é bastante rápida, ocorrendo, em grande parte, nos 10 min iniciais de contato entre o compósito e a solução de MT. Além disso, a capacidade de adsorção aumenta quando a concentração do adsorvato em meio aquoso é elevada, sugerindo que, ou possa ocorrer um aumento nas interações efetivas entre as moléculas do hormônio e o compósito, ou que em concentrações maiores o equilíbrio de adsorção é mantido forçando um número maior de moléculas de MT a permanecerem nas cavidades das ciclodextrinas fixadas à sílica.



**Figura 4** Cinética de adsorção da MT em bCDSi contendo os dados experimentais e as curvas calculadas por modelos (a) e teste de Qui-quadrado para os modelos cinéticos empregados (b).

Os modelos cinéticos têm grande importância nos estudos de remoção, pois com eles é possível estabelecer o mecanismo de adsorção e como ocorrem os transportes de massa em solução [25]. Inúmeros modelos cinéticos são utilizados para descrever estes mecanismos, neste estudo foram empregados os modelos de pseudo-primeira-ordem, pseudo-segunda-ordem, Elovich e de Morris-Weber [26-30], cujas equações são descritas a seguir.

Os modelos de pseudo-primeira-ordem (Equação 3) e pseudo-segunda-ordem (Equação 4) são habitualmente os mais utilizados para avaliar o mecanismo envolvido no processo de adsorção e calcular a constante cinética. Enquanto o de pseudo-primeira-ordem assume que a taxa de adsorção é diretamente proporcional à diferença entre a quantidade de hormônio removida com o tempo e a quantidade removida em equilíbrio, o modelo de pseudo-segunda-ordem assume que a taxa de adsorção é proporcional ao quadrado da diferença entre a quantidade de hormônio com o tempo e a quantidade de hormônio adsorvida no equilíbrio [27,28], sendo expressos como:

$$q_t = q_e(1 - e^{-k_1 t}) \quad (3)$$

$$q_t = \frac{q_e^2 k_2 t}{1 + k_2 q_e t} \quad (4)$$

$$h_2 = k_2 q_e^2 \quad (5)$$

Onde  $q_e$  e  $q_t$  ( $\text{mg g}^{-1}$ ) são as quantidades de MT adsorvida no equilíbrio e no tempo  $t$  respectivamente;  $k_1$  ( $\text{min}^{-1}$ ) é a constante cinética de pseudo-primeira-ordem; e  $k_2$  ( $\text{g mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) é a constante cinética de pseudo-segunda-ordem. A partir da constante cinética ( $k_2$ ) é possível determinar a taxa de adsorção inicial,  $h$  ( $\text{mg g}^{-1} \text{min}^{-1}$ ), (Equação 5).

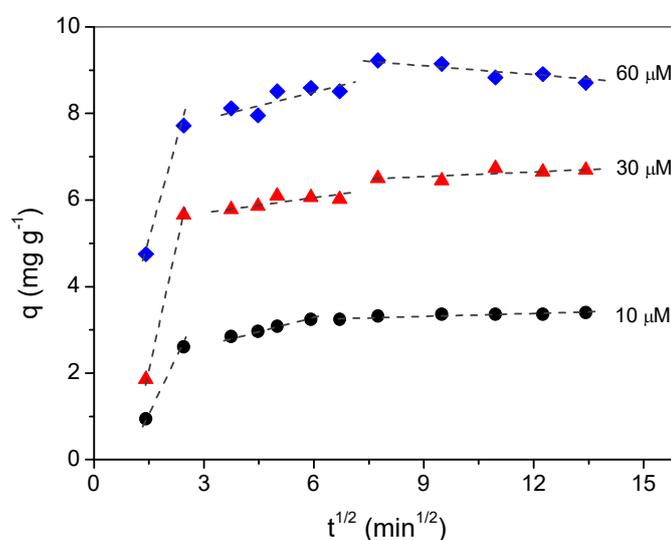
O modelo de Elovich foi proposto inicialmente para descrever a cinética de quimissorção de gases em superfícies sólidas, posteriormente foi modificado e empregado em processos de retenção em fase líquida. Na equação que define este modelo (Equação 6),  $\alpha$  ( $\text{mg g}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) é a taxa de adsorção inicial da equação de Elovich e a constante  $\beta$  ( $\text{g mg}^{-1}$ ) esta relacionada com a cobertura da superfície e a energia de ativação por quimissorção [26,28].

$$q_t = \frac{1}{\beta} \ln(1 + \alpha \cdot b \cdot t) \quad (6)$$

O modelo de Morris-Weber foi proposto para determinar se a taxa de difusão intrapartícula é uma etapa limitante no processo de adsorção. O modelo pode ser expresso pela seguinte equação:

$$q_t = k_{id} t^{1/2} + C \quad (7)$$

Onde  $k_{id}$  ( $\text{mg g}^{-1} \text{min}^{-1/2}$ ) é a taxa de difusão intrapartícula e  $C$  ( $\text{mg g}^{-1}$ ) é uma constante relacionada com a resistência à adsorção. A curva de difusão intrapartícula pode envolver vários segmentos de retas, em que cada segmento corresponde a um estágio no processo de adsorção. O primeiro estágio corresponde à difusão do adsorvato através da solução até a superfície externa do adsorvente, o segundo estágio compreende a uma adsorção gradual, onde a taxa de difusão intrapartícula é limitante e o terceiro estágio é relacionado ao equilíbrio final alcançado devido à redução dos sítios de adsorção internos e à menor concentração de adsorvato em solução [28-30]. Como apresentado na Tabela 1, a redução considerável na constante de difusão na segunda etapa ( $k_{i,2}$ ) em relação à primeira ( $k_{i,3}$ ) indica uma diminuição na difusão das moléculas de MT até alcançarem o equilíbrio na terceira etapa. As curvas cinéticas para o modelo de Weber-Morris (Figura 5) mostram que, além da quantidade adsorvida na primeira etapa ser bastante superior às etapas seguintes, os seguimentos lineares não passam pela origem e não apresentam um bom coeficiente de correlação ( $R^2$ ), assinalando que a difusão intrapartícula não é o mecanismo predominante na adsorção. Os valores negativos observados para a primeira etapa podem indicar algum efeito de resistência no filme de difusão externo [31] ou refletir alguma imprecisão na determinação do  $q_t$  experimental na fase inicial da adsorção tendo em vista que o processo de deposição é bastante rápido [32]. Enquanto que, a redução considerável na constante de difusão na segunda etapa ( $k_{i,2}$ ) em relação à primeira ( $k_{i,3}$ ) indica uma diminuição na difusão das moléculas de MT até alcançarem o equilíbrio na terceira etapa.



**Figura 5** Curvas cinéticas da remoção de MT em bCDSi para o modelo de Morris-Weber.

**Tabela 1** Parâmetros cinéticos para a adsorção de MTT em  $\beta$ CDSi.

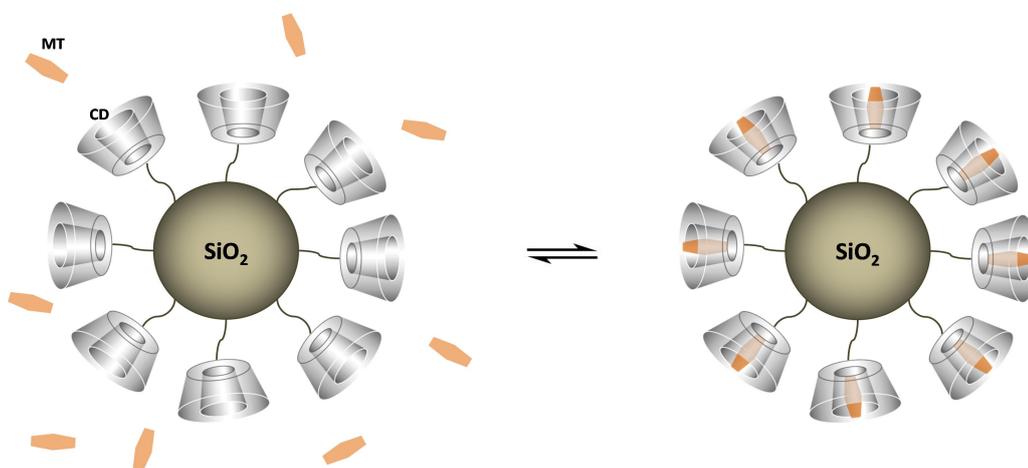
Modelo cinético	Parâmetros	Concentração de MTT ( $\mu\text{M}$ )		
		10	30	60
Valor experimental	$q_{e,\text{exp}}$ ( $\text{mg g}^{-1}$ )	3,405	6,692	9,226
Pseudo-primeira ordem	$k_1$ ( $\text{min}^{-1}$ )	0,2082	0,2493	0,3865
	$q_e$ ( $\text{mg g}^{-1}$ )	3,265	6,343	8,654
	$\chi^2$	0,0275	0,1742	0,1322
	$r^2$	0,9753	0,9588	0,9798
Pseudo-segunda ordem	$k_2$ ( $\text{g mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ )	0,0855	0,0513	0,0698
	$q_e$ ( $\text{mg g}^{-1}$ )	3,501	6,775	9,903
	$h$ ( $\text{mg g}^{-1} \text{min}^{-1}$ )	1,048	2,354	5,696
	$\chi^2$	0,0249	0,2031	0,0866
	$r^2$	0,9777	0,9520	0,9868
Elovich	$\alpha$ ( $\text{mg g}^{-1} \text{min}^{-1}$ )	11,49	33,98	1397
	$\beta$ ( $\text{g mg}^{-1}$ )	2,276	1,239	1,341
	$\chi^2$	0,1135	0,5252	0,4018
	$r^2$	0,8982	0,8758	0,9385
Difusão intrapartícula				
Etapa I	$k_{i,1}$ ( $\text{mg g}^{-1} \text{min}^{-1/2}$ )	1,044	2,253	3,164
	$C_i$ ( $\text{mg g}^{-1}$ )	-1,321	-3,332	0,6948
	$r^2$	--	--	--
Etapa II	$k_{i,2}$ ( $\text{mg g}^{-1} \text{min}^{-1/2}$ )	0,1375	0,1361	0,2553
	$C_i$ ( $\text{mg g}^{-1}$ )	2,341	5,524	7,319
	$r^2$	0,9290	0,7892	0,8333
Etapa III	$k_{i,3}$ ( $\text{mg g}^{-1} \text{min}^{-1/2}$ )	0,0112	0,0426	-0,0900
	$C_i$ ( $\text{mg g}^{-1}$ )	3,245	6,146	9,934
	$r^2$	0,7378	0,4626	0,8235

Os parâmetros cinéticos para os modelos de adsorção da MT no compósito de  $\beta$ CDSi são sumarizados na Tabela 1. Tendo em vista os coeficientes de correlação ( $R^2$ ) e os resultados estatísticos de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) (Figura 4b), o modelo cinético de Elovich é o que apresenta o pior ajuste quando comparado aos modelos de pseudo-primeira-ordem e pseudo-

segunda-ordem. Ambos os modelos, pseudo-primeira-ordem e pseudo-segunda-ordem, apresentaram  $R^2$  e  $\chi^2$  bastante próximos, o que dificulta a definição entre qual é o melhor modelo para descrever a adsorção de MT no compósito, apesar dos valores experimentais estarem ligeiramente mais próximos ao mecanismo para adsorção de pseudo-segunda-ordem, que é característico de eventos de quimissorção. Tal ambiguidade entre os modelos pode estar relacionada com a natureza da deposição das moléculas de hormônio no compósito, já que a remoção da MT em solução aquosa pode ocorrer por algum mecanismo de complexação com as ciclodextrinas funcionalizadas à sílica [33]. Assim, as forças que regem a adsorção são aquelas associadas à cavidade das ciclodextrinas, como as interações de hidrogênio, hidrofóbicas e de van der Waals. Apesar das moléculas de hormônio não estarem se associando ao compósito por meio de ligações químicas formais, a constante de complexação entre as moléculas de MT e a cavidade hidrofóbica das bCDs é bastante elevada [18], tornando bastante favorável o processo de deposição. Como os sítios de adsorção são bastante uniformes, a complexação ocorre de forma específica e a transmigração do hormônio pela superfície do compósito não deve ser consideravelmente relevante. Resumidamente, a cinética de remoção do hormônio pode ser descrita como:



onde  $A$  corresponde aos sítios de adsorção ativos existentes na superfície da bCDSi,  $M$  é a concentração de MT livre em solução e  $AM$  é a concentração do hormônio adsorvida no compósito. Um esquema do mecanismo de adsorção das moléculas de MT na superfície adsorvente é mostrado na Figura 6.



**Figura 6** Proposta de mecanismo de adsorção do hormônio MT no compósito bCDSi.

### 3.3. Isotermas de adsorção

Assim como os parâmetros cinéticos, o equilíbrio de adsorção é um dos mais importantes aspectos físico-químicos a se conhecer [34]. As isotermas de adsorção são uma valiosa ferramenta, capaz de estabelecer uma relação apropriada entre o adsorvato e o adsorvente, otimizando de maneira crítica o comportamento entre as espécies envolvidas na adsorção [25]. Os dados adquiridos nos experimentos das isotermas de adsorção, nas temperaturas de 25-55 °C, foram analisados utilizando os modelos não lineares de Freundlich [35], Langmuir [36], Sips [37] e Temkin [38], cujas equações são descritas na sequência:

$$\text{Modelo de Freundlich: } q_e = K_F C_e^{1/n_F} \quad (9)$$

onde  $K_F$  ( $L g^{-1}$ ) é a constante de Freundlich indicativa da capacidade de adsorção do material adsorvente e  $n_F$  indica a eficiência do processo de adsorção. O valor de  $n_F$  deve ser sempre maior do que 1, e na faixa de 2-10 indica que o processo é favorável. Esse modelo assume a existência de multicamadas de adsorção em uma superfície heterogênea do adsorvente com interação entre as moléculas do adsorvato [33,35,39].

$$\text{Modelo de Langmuir: } q_e = \frac{q_{\max} K_L C_e}{1 + K_L C_e} \quad (10)$$

onde  $q_{\max}$  ( $mg g^{-1}$ ) é a capacidade máxima de adsorção e  $K_L$  ( $L mg^{-1}$ ) é a constante de Langmuir relacionada à energia de adsorção. O modelo desta isoterma segue a hipótese de que as moléculas são adsorvidas e aderem na superfície do adsorvente em sítios ativos definidos e localizados, formando uma monocamada. Cada um destes sítios ativos pode acomodar um composto adsorvido e a energia de adsorção de cada espécie é a mesma em todos os sítios da superfície [36,39].

$$\text{Modelo de Sips: } q_e = \frac{q_{\max} K_S C_e^{n_S}}{1 + K_S C_e^{n_S}} \quad (11)$$

onde  $K_S$  ( $L mg^{-1}$ )<sup>1/n<sub>S</sub></sup> é a constante de Sips e  $n_S$  representa o grau de heterogeneidade do sistema, sendo que o sistema será homogêneo para  $n_S$  igual a 1 e heterogêneo para valores

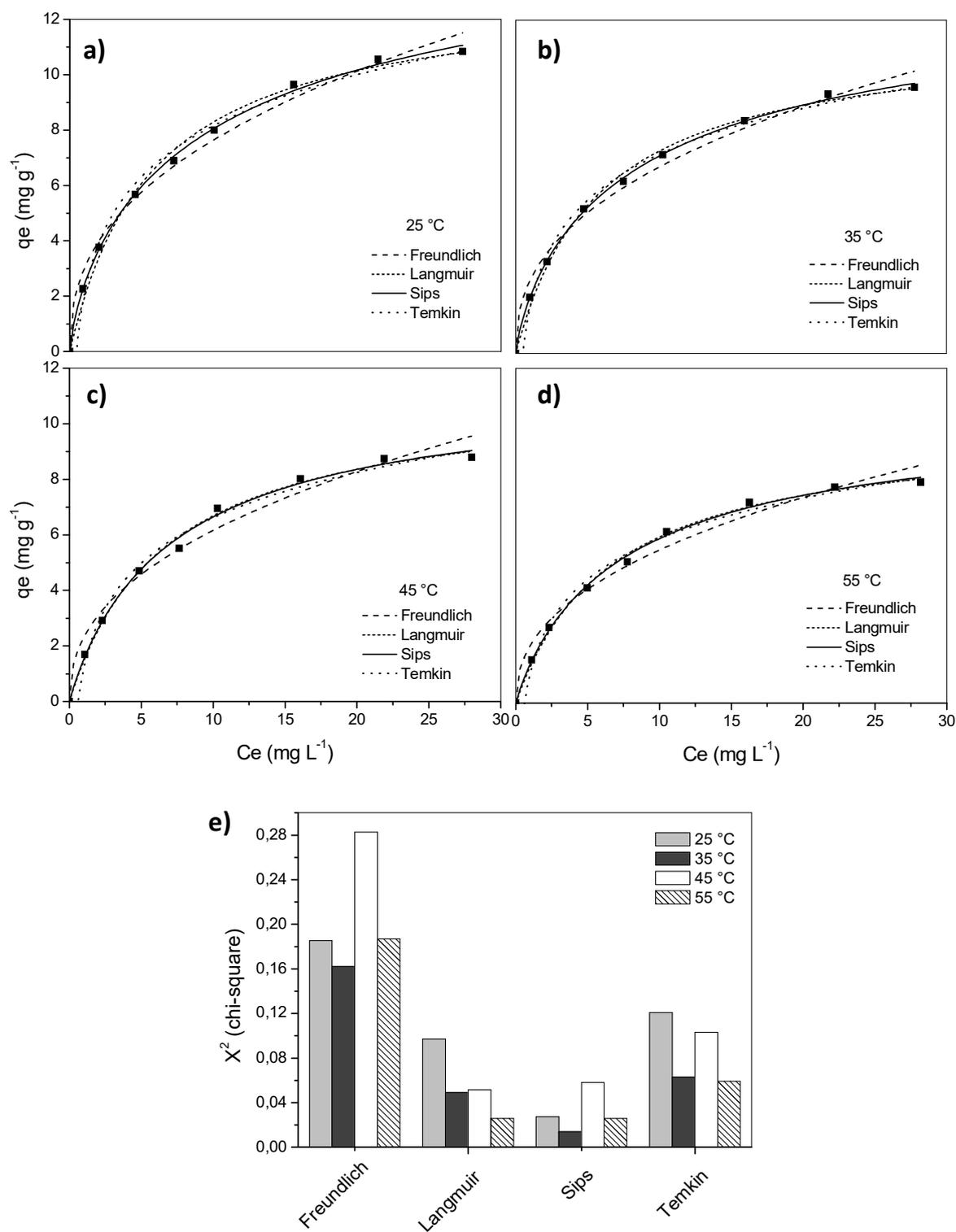
menores que 1. Os valores de  $n_s$  superiores a 1 indicam a formação de mais de uma camada de adsorvato sobre o adsorvente [37,39,40].

$$\text{Modelo de Temkin: } q_e = B \ln(k_T C_e) \quad (12)$$

onde  $B=(RT/b_T)$  é a constante relacionada com o calor de adsorção ( $\text{J mol}^{-1}$ ),  $b_T$  é uma constante de Temkin e  $K_T$  ( $\text{L g}^{-1}$ ) é a constante relacionada ao equilíbrio das ligações. O modelo de Temkin leva em consideração que o calor de adsorção das moléculas adsorvida diminui linearmente com o recobrimento da superfície e que a distribuição das energias de ligação é uniforme [28,38,39].

As isotermas de adsorção da MT no compósito bCDSi são mostradas na Figura 7 juntamente aos modelos empregados nesse estudo e o teste estatístico de Qui-quadrado. A adsorção é perceptivelmente um fenômeno exotérmico e sua eficiência diminui gradativamente com o aumento da temperatura [16]. A concentração adsorvida ( $q_e$ ) aumenta com a concentração de equilíbrio ( $C_e$ ) até atingir o valor máximo para a constante de adsorção ( $Q_{max}$ ), quando as moléculas de MT têm maior dificuldade para encontrar sítios vacantes, o que sugere a saturação progressiva do compósito [41].

A ação da temperatura no processo de adsorção é mostrada na Tabela 2 concomitante aos ajustes para os modelos de isotermas. De acordo com os dados descritos, para as temperaturas de 25, 35, 45 e 55 °C, em sistemas com agitação, a capacidade máxima de adsorção foi de aproximadamente 11, 10, 9 e 8 mg de MT por grama do compósito respectivamente. O compósito mostrou-se bastante promissor para a remoção de MT em meio aquoso e a extensão de sua aplicação para outras moléculas esteroides deve ser investigada. Sua capacidade de adsorção para a mesma molécula foi superior aos resultados encontrados na literatura, como na remoção em nanotubos de carbono funcionalizados com óxido de ferro [3] e em *Salvinia cucullata* [42], que apresentaram capacidade máxima de adsorção de aproximadamente  $120 \mu\text{g g}^{-1}$  e  $5 \text{mg g}^{-1}$  respectivamente.



**Figura 7** Modelos e isothermas de adsorção da MT em bCDSi nas temperaturas de 25 (a), 35 (b), 45 (c) e 55 °C (d) e teste Qui-quadrado para os modelos empregados (e).

**Tabela 2** Parâmetros calculados para as isotermas de Freundlich, Langmuir, Sips e Temkin para o processo de adsorção da MT em bCDSi.

Modelo de Isoterma	Parâmetros	Temperatura (°C)			
		25	35	45	55
Valor experimental	Q <sub>m</sub> (mg g <sup>-1</sup> )	10,84	9,583	8,791	7,924
Freundlich	K <sub>F</sub> (L g <sup>-1</sup> )	2,992	2,635	2,303	2,060
	n <sub>F</sub>	2,455	2,461	2,341	2,349
	χ <sup>2</sup>	0,1855	0,1621	0,2827	0,1869
	R <sup>2</sup>	0,9872	0,9856	0,9722	0,9768
Langmuir	Q <sub>m</sub> (mg g <sup>-1</sup> )	13,09	11,54	11,16	9,958
	K <sub>L</sub> (L mg <sup>-1</sup> )	0,1730	0,1715	0,1495	0,1488
	χ <sup>2</sup>	0,0972	0,0491	0,0515	0,0259
	R <sup>2</sup>	0,9933	0,9956	0,9949	0,9968
	R <sub>L</sub>	0,6385	0,6689	0,7057	0,7180
Sips	Q <sub>m</sub> (mg g <sup>-1</sup> )	16,58	13,81	11,55	10,57
	K <sub>S</sub> (L mg <sup>-1</sup> ) <sup>1/n<sub>S</sub></sup>	0,1682	0,1717	0,1519	0,1522
	n <sub>S</sub>	0,7491	0,7918	0,9503	0,9194
	χ <sup>2</sup>	0,0274	0,0139	0,0580	0,0258
	R <sup>2</sup>	0,9981	0,9988	0,9943	0,9968
Temkin	K <sub>T</sub> (L g <sup>-1</sup> )	2,161	2,032	1,660	1,654
	b <sub>T</sub>	3,523·10 <sup>4</sup>	4,062·10 <sup>4</sup>	4,240·10 <sup>4</sup>	4,902·10 <sup>4</sup>
	B (J mol <sup>-1</sup> )	0,0703	0,0630	0,0624	0,0556
	χ <sup>2</sup>	0,1208	0,0629	0,1032	0,0592
	R <sup>2</sup>	0,9917	0,9944	0,9898	0,9927

A correlação entre os modelos de isotermas, expresso por  $R^2$ , e o teste de Qui-quadrado,  $\chi^2$ , mostrados na Tabela 2 e Figura 7e, indicam o melhor ajuste para os modelos de Sips e Langmuir para todas as temperaturas. Assim, os resultados para ambos os modelos reportam para uma adsorção em monocamada [39,40], com as moléculas de MT sendo adsorvidas em sítios específicos da superfície do compósito, corroborando com o pressuposto de que o mecanismo envolvido seja o de complexação com a cavidade hidrofóbica das CDs. Os valores de  $n_S$  para as temperaturas de 25 a 55 °C, indicam o grau de homogeneidade da

superfície de adsorção, apresentam variação na faixa de 0,7491 a 0,9194, cuja proximidade de 1 implica em uma superfície parcialmente heterogênea [40]. A predisposição para a ocorrência da adsorção das moléculas de MT pelo compósito foi avaliada pela constante adimensional de Langmuir ( $R_L$ ), definida pela equação:

$$R_L = \frac{1}{1 + K_L C_0} \quad (13)$$

onde  $K_L$  ( $L \text{ mg}^{-1}$ ) refere-se a constante de Langmuir relacionada à energia livre de adsorção e  $C_0$  ( $\text{mg L}^{-1}$ ) a concentração inicial adsorvida. A dimensão dos valores para o parâmetro  $R_L$  indica que a isoterma não é favorável se  $R_L > 1$ , linear se  $R_L = 1$ , favorável se  $0 < R_L < 1$ , ou irreversível se  $R_L = 0$  [27,28]. Portanto, os valores de  $R_L$  listados na Tabela 2, para as diferentes temperaturas, estão todos em uma faixa de 0,6385 a 0,7180, assinalando que o processo de adsorção é favorável e beneficiado pela redução de temperatura.

### 3.4. Estudos termodinâmicos

Os parâmetros termodinâmicos podem ser determinados utilizando a constante de Langmuir ( $K_L$ ) para as distintas temperaturas. A alteração na energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) é um critério fundamental para a espontaneidade da reação, que ocorrerão espontaneamente em uma dada temperatura se o  $\Delta G$  for negativo [32]. Os valores de energia livre ( $\Delta G$ ), entalpia ( $\Delta H$ ) e entropia ( $\Delta S$ ) associados ao processo de adsorção foram calculados utilizando as equações a seguir:

$$\Delta G = -RT \ln K_L \quad (14)$$

$$\ln K_L = -\frac{\Delta G}{RT} = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (15)$$

com  $R$  correspondendo a constante do gás ideal ( $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ),  $T$  a temperatura em Kelvin e  $K_L$  ( $L \text{ mol}^{-1}$ ) a constante de Langmuir. Plotando  $\ln K_L$  em função de  $1/T$  os parâmetros

são facilmente calculados a partir da inclinação e intercepto da reta, cujos valores são expressos na Tabela 3.

**Tabela 3** Parâmetros termodinâmicos para a adsorção de MTT em  $\beta$ CDSi.

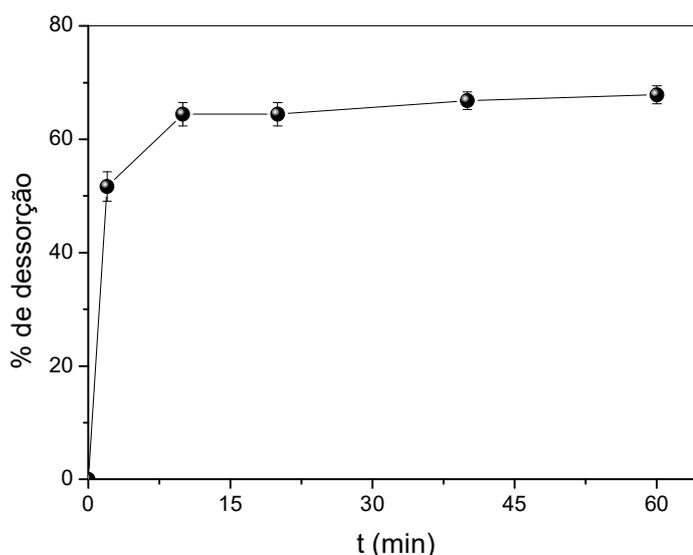
T (°C)	$K_L$ ( $10^3 \text{ L mol}^{-1}$ )	$\Delta H$ ( $\text{kJ mol}^{-1}$ )	$\Delta S$ ( $\text{J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ )	$\Delta G$ ( $\text{kJ mol}^{-1}$ )
25	52,32			-26,93
35	51,87			-27,81
45	45,22	-3,129	74,38	-28,35
55	45,00			-29,23

Os valores de  $\Delta G$  negativos evidenciam que o processo é espontâneo para as temperaturas trabalhadas. O valor negativo para entalpia ( $\Delta H = -3,129 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) confirma o caráter exotérmico para esse processo de adsorção, e acompanhado do valor positivo para a entropia ( $\Delta S = 74,38 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ) sugere o recobrimento da superfície do composto pelas moléculas de MT [19,27,33]. A liberação de energia pelo sistema é pequena, demonstrado pela baixa magnitude no valor de  $\Delta H$ , indicando que as forças envolvidas no processo de adsorção são fracas, características de uma fisissorção [32].

Estes resultados corroboram com as características aguardadas para o material e concordam com o mecanismo de adsorção proposto a partir dos estudos cinéticos, já que as CDs são descritas como estruturas capazes de acomodar moléculas que apresentem afinidade com sua cavidade por meio de interações fracas como as hidrofóbicas, forças de van der Waals e interações de London [11]. Podemos dizer então, que não ocorre quimissorção e que o melhor ajuste dos dados aos modelos de isoterma de Langmuir e Sips deve estar relacionado à formação de monocamada e à existência de sítios independentes. A superfície do material, intuitivamente recoberta por moléculas de CDs, apresenta poros específicos às estruturas da MT impedindo que haja, neste caso de fisissorção, a formação de multicamadas de adsorção [16].

### 3.5. Estudos de dessorção

A Figura 8 apresenta a dessorção do hormônio MT em etanol monitorada por um período de 1 h. Assim como a cinética de remoção em meio aquoso, a dessorção em etanol é bastante rápida, em menos de 10 min cerca de 65% da MT é dessorvida, entrando em equilíbrio com a quantidade ainda remanescente no compósito.



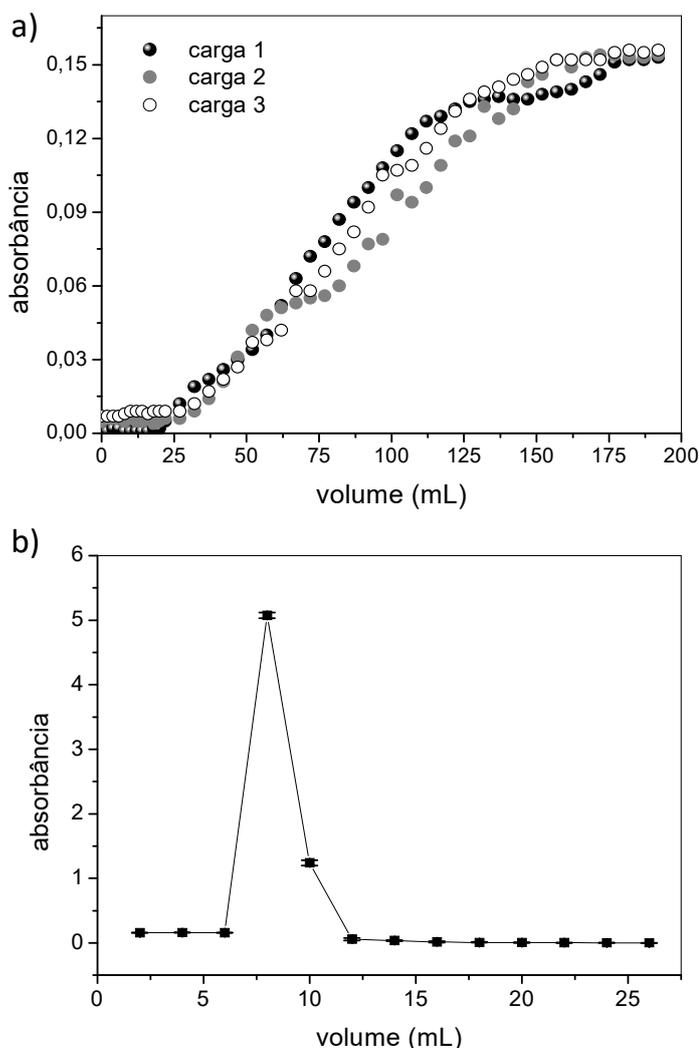
**Figura 8.** Dessorção da MT em etanol.

A MT é uma molécula bastante hidrofóbica e sua adsorção em meio aquoso, por meio da complexação com as CDs funcionalizadas na sílica, se deve pelas forças atrativas da cavidade das CDs relacionadas às interações hidrofóbicas [18], como discutidas anteriormente. A imersão em meio etanólico favorece o processo de dessorção, pois é capaz de promover um ambiente externo mais hidrofóbico fazendo com que a MT abandone a cavidade da bCD funcionalizada na sílica.

### 3.6. Remoção do hormônio em coluna de leito fixo

O ensaio para remoção da MT em um sistema de leito fixo reflete em uma remoção extremamente significativa, até a saturação do compósito, expresso na Figura 9 em termos de absorbância. Com uma concentração de 10  $\mu\text{M}$  de MT, a carga de hormônio foi filtrada pela coluna com uma vazão descendente. Um ensaio controle em uma coluna similar, porém recheada com 100 mg de sílica pura em substituição ao compósito, indicou que os demais

materiais utilizados para a construção da coluna, bem como a sílica pura, não influenciam na remoção do hormônio (Ver Figura S1, material suplementar). Assim, é possível notar que nos 25 mL iniciais filtrados pelo composto (sendo descontados 4 mL iniciais correspondentes à água remanescente utilizada para condicionar a coluna), ocorre a remoção efetiva do hormônio, correspondendo a 7,56 mg de MT por grama do composto. Com o fluxo constante da carga de hormônio através da coluna ocorre a saturação do adsorvente até o ponto em que a concentração do efluente se iguala à do afluente. Após a filtragem dos 25 mL iniciais a eficiência da coluna começa a decrescer e a concentração de hormônio no efluente da coluna começa a aumentar, apresentando uma remoção de 50% da concentração inicial até aproximadamente 80 mL, e se igualando à concentração da carga inserida em 175 mL.



**Figura 9** Remoção (a) e dessorção (b) do hormônio MT em coluna de leito fixo. Carga de MT de 10  $\mu\text{M}$ , a 25  $^{\circ}\text{C}$  e fluxo 0,48  $\text{mL min}^{-1}$ .

Após o uso, a coluna passou pelo processo de dessorção do hormônio aderido ao compósito através da lavagem com uma solução eluente de etanol. O etanol se mostrou bastante eficiente na limpeza da coluna, sendo que a dessorção no hormônio é praticamente instantânea com o fluxo constante, reduzindo a absorvância a zero. Posteriormente, duas cargas subsequentes de MT alimentaram a coluna apresentando resultado idêntico àquele obtido com a primeira carga. Estes resultados indicam o potencial do compósito para elaboração de sistemas para remoção desse tipo de esteroide, com um nível considerável de remoção mesmo em situações de reuso.

#### 4. Conclusão

O compósito de bCD e sílica foi empregado com sucesso na adsorção do hormônio MT em meio aquoso, cuja remoção é favorecida com a diminuição do pH. A cinética de adsorção é rápida, cujo modelo de Weber-Morris indica que a difusão intrapartícula não é um mecanismo limitante para a adsorção. O melhor ajuste cinético aos modelos de pseudo-primeira e pseudo-segunda ordem indicam que a adsorção ocorre por um mecanismo físico, porém em sítios independentes. O compósito apresenta uma capacidade máxima de adsorção de  $11 \text{ mg g}^{-1}$  a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , com melhor ajuste aos modelos de isoterma de Langmuir e Sips, confirmando a deposição da MT em uma monocamada de adsorção em sítios específicos formados pelas cavidades hidrofóbicas das bCDs funcionalizadas à sílica. O parâmetro  $n_s$ , de Sips, entre 0,75 e 0,92 indica que a superfície de adsorção é parcialmente heterogênea e a adsorção é favorável de acordo com um  $R_L$  entre 0,64 e 0,72. A adsorção é favorecida em temperaturas mais baixas e a entropia ( $\Delta S$ ) positiva do sistema sugere o recobrimento da superfície pelas moléculas de MT. A adsorção é um processo espontâneo, confirmado pelos valores de energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) negativos, e um processo exotérmico, expresso por uma entalpia ( $\Delta H$ ) de  $-3,129 \text{ kJ mol}^{-1}$ . O pequeno valor para a energia liberada pela adsorção confirma que as interações entre as moléculas de MT e o compósito são fracas, confirmando que o processo se dá por fisissorção. Por fim, os ensaios em coluna demonstram a eficiência do compósito na filtração do hormônio em solução aquosa, e a dessorção em etanol é eficaz na regeneração do material deixando-o apto para o reuso. Assim, esse estudo apresenta grande relevância para aplicação desse material em filtros para remoção de MT em efluentes da aquicultura e pecuária contendo esse esteroide e também poderá ter avaliada sua aplicabilidade para outras moléculas esteroides.

## Agradecimentos

Este trabalho teve apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa de MG – FAPEMIG (CBB-BDS-00284-15); da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES; e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

## Referências

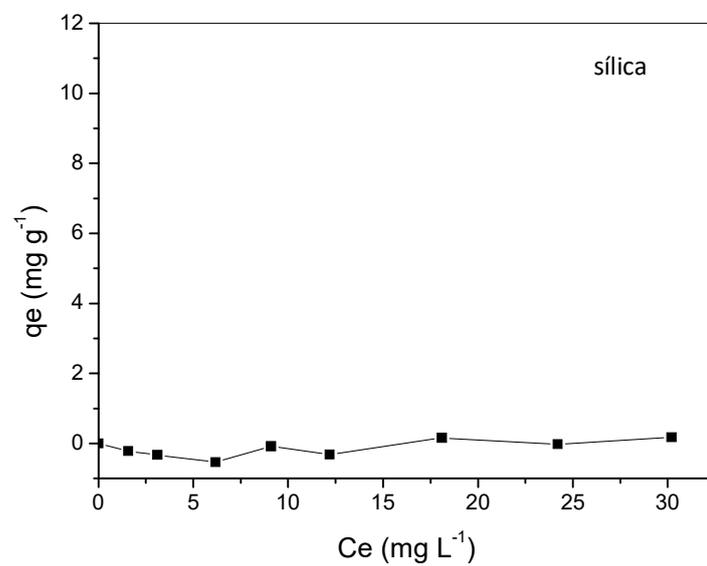
- [1] R. Guedes-Alonso, Z. Sosa-Ferrera, J.J. Santana-Rodríguez, Determination Of Steroid Hormones In Fish Tissues By Microwave-Assisted Extraction Coupled To Ultra-High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry, *Food Chem.* 237 (2017) 1012-1020.
- [2] N. Mlalila, C. Mahika, L. Kalombo, H. Swai, A. Hilonga, Human food safety and environmental hazards associated with the use of methyltestosterone and other steroids in production of all-male tilapia, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22 (2015) 4922-4931.
- [3] X. Hu, B. Liu, Y. Deng, H. Chen, S. Luo, C. Sun, ..., S. Yang, Adsorption and heterogeneous Fenton degradation of 17 $\alpha$ -methyltestosterone on nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/MWCNTs in aqueous solution, *Appl. Catal. B Environ.* 107 (2011) 274-283.
- [4] R.B. Young, D.E. Latch, D.B. Mawhinney, T.H. Nguyen, J.C. Davis, T. Borch, Direct photodegradation of androstenedione and testosterone in natural sunlight: inhibition by dissolved organic matter and reduction of endocrine disrupting potential, *Environ. Sci. Technol.* 47 (2013) 8416-8424.
- [5] S. Kango, S. Kalia, A. Celli, J. Njuguna, Y. Habibi, R. Kumar, Surface modification of inorganic nanoparticles for development of organic–inorganic nanocomposites—a review, *Progr. Polym. Sci.* 38 (2013) 1232-1261.
- [6] L.F. Giraldo, B.L. López, L. Pérez, S. Urrego, L. Sierra, M. Mesa, Mesoporous silica applications, *Macromol. Symp.* 258 (2007) 129-141.

- [7] J.N. Liu, W.B. Bu, J.L. Shi, Silica coated upconversion nanoparticles: A versatile platform for the development of efficient theranostics, *Acc. Chem. Res.* 48 (2015) 1797-1805.
- [8] S.C. Hsu, H.T. Cheng, P.X. Wu, C.J. Weng, K.S. Santiago, J.M. Yeh, Electrochemical Sensor Constructed Using a Carbon Paste Electrode Modified with Mesoporous Silica Encapsulating PANI Chains Decorated with GNPs for Detection of Ascorbic Acid, *Electrochim. Acta* 238 (2017) 246-256.
- [9] Q. Wang, W. Gao, Y. Liu, J. Yuan, Z. Xu, Q. Zeng, ..., M. Schröder, Simultaneous adsorption of Cu (II) and  $\text{SO}_4^{2-}$  ions by a novel silica gel functionalized with a ditopic zwitterionic Schiff base ligand, *Chem. Eng. J.*, 250 (2014) 55-65.
- [10] P.K. Leung, Q. Xu, T.S. Zhao, L. Zeng, C. Zhang, Preparation of silica nanocomposite anion-exchange membranes with low vanadium-ion crossover for vanadium redox flow batteries, *Electrochim. Acta* 105 (2013) 584-592.
- [11] F. van de Manakker, T. Vermonden, C.F. van Nostrum, W.E. Hennink, Cyclodextrin-based polymeric materials: synthesis, properties, and pharmaceutical/biomedical applications, *Biomacromolecules* 10 (2009) 3157-3175.
- [12] M.E. Brewster, T. Loftsson, Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (2007) 645-666.
- [13] C. Alvarez-Lorenzo, C.A. García-González, A. Concheiro, Cyclodextrins as versatile building blocks for regenerative medicine, *J. Control. Release* 268 (2017) 269-281.
- [14] A.Z.M. Badruddoza, M.T. Rahman, S. Ghosh, M.Z. Hossain, J. Shi, K. Hidajat, M.S. Uddin,  $\beta$ -Cyclodextrin conjugated magnetic, fluorescent silica core-shell nanoparticles for biomedical applications, *Carbohydr. Polym.* 95 (2013) 449-457.
- [15] A. Sinha, S.K. Basiruddin, A. Chakraborty, N.R. Jana,  $\beta$ -Cyclodextrin functionalized magnetic mesoporous silica colloid for cholesterol separation, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 7 (2015) 1340-1347.

- [16] L.B. Carvalho, T.G. Carvalho, Z.M. Magriotis, T.C. Ramalho, L.M.A. Pinto, Cyclodextrin/silica hybrid adsorbent for removal of methylene blue in aqueous media, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 78 (2014) 77-87.
- [17] B. Bhattarai, M. Muruganandham, R.P. Suri, Development of high efficiency silica coated  $\beta$ -cyclodextrin polymeric adsorbent for the removal of emerging contaminants of concern from water, *J. Hazard. Mater.* 273 (2014) 146-154.
- [18] L.B. Carvalho, K.K. Burusco, C. Jaime, T. Venâncio, A.F.S. Carvalho, L.D.S. Murgas, L.M.A. Pinto, Complexes between methyltestosterone and  $\beta$ -cyclodextrin for application in aquaculture production, *Carbohydr. Polym.* 179 (2018) 386-393.
- [19] S. Dawood, T.K. Sen, C. Phan, Synthesis and characterization of slow pyrolysis pine cone bio-char in the removal of organic and inorganic pollutants from aqueous solution by adsorption: Kinetic, equilibrium, mechanism and thermodynamic, *Bioresour. Technol.* 246 (2017) 76-81.
- [20] R.R. Mohammed, M.R. Ketabchi, G. McKay, Combined magnetic field and adsorption process for treatment of biologically treated palm oil mill effluent (POME), *Chem. Eng. J.* 243 (2014) 31-42.
- [21] G.Z. Kyzas, N.K. Lazaridis, D.N. Bikiaris, Optimization of chitosan and  $\beta$ -cyclodextrin molecularly imprinted polymer synthesis for dye adsorption, *Carbohydr. Polym.* 91 (2013) 198-208.
- [22] Drugbank, Methyltestosterone, <https://www.drugbank.ca/drugs/DB06710>, 2017, Acessado em 17/12/2017.
- [23] Z.E. Pápay, Z. Sebestyén, K. Ludányi, N. Kállai, E. Balogh, A. Kósa, ... I. Antal, Comparative evaluation of the effect of cyclodextrins and pH on aqueous solubility of apigenin, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 117 (2016) 210-216.

- [24] J.M Silla, R.A. Cormanich, R. Rittner, M.P. Freitas, Does intramolecular hydrogen bond play a key role in the stereochemistry of  $\alpha$ -and  $\beta$ -d-glucose?, *Carbohydr. Res.* 396 (2014) 9-13.
- [25] J.S. Cao, J.X. Lin, F. Fang, M.T. Zhang, Z.R. Hu, A new absorbent by modifying walnut shell for the removal of anionic dye: kinetic and thermodynamic studies, *Bioresour. Technol.* 163 (2014) 199-205.
- [26] Y.S. Ho, G. McKay, Sorption of dye from aqueous solution by peat, *Chem. Eng. J.* 70 (1998) 115-124.
- [27] T. Maneerung, J. Liew, Y. Dai, S. Kawi, C. Chong, C.H. Wang, Activated carbon derived from carbon residue from biomass gasification and its application for dye adsorption: kinetics, isotherms and thermodynamic studies, *Bioresour. Technol.* 200 (2016) 350-359.
- [28] H. Javadian, Application of kinetic, isotherm and thermodynamic models for the adsorption of Co (II) ions on polyaniline/polypyrrole copolymer nanofibers from aqueous solution, *J. Ind. Eng. Chem.* 20 (2014) 4233-4241.
- [29] W.J. Weber, J.C. Morris, Kinetics of adsorption on carbon from solution, *J. Sanit. Eng. Div.* 89 (1963) 31-60.
- [30] C. Zhou, Q. Wu, T. Lei, I.I. Negulescu, Adsorption kinetic and equilibrium studies for methylene blue dye by partially hydrolyzed polyacrylamide/cellulose nanocrystal nanocomposite hydrogels, *Chem. Eng. J.* 251 (2014) 17-24.
- [31] Q. Zhu, G.D. Moggridge, C. D'Agostino, Adsorption of pyridine from aqueous solutions by polymeric adsorbents MN 200 and MN 500. Part 2: Kinetics and diffusion analysis, *Chem. Eng. J.* 306 (2016) 1223-1233.
- [32] F. Raji, M. Pakizeh, Kinetic and thermodynamic studies of Hg (II) adsorption onto MCM-41 modified by ZnCl<sub>2</sub>, *Appl. Surf. Sci.* 301 (2014) 568-575.

- [33] K.V. Ragavan, N.K. Rastogi,  $\beta$ -Cyclodextrin capped graphene-magnetite nanocomposite for selective adsorption of Bisphenol-A, *Carbohydr. Polym.* 168 (2017) 129-137.
- [34] M.T. Yagub, T.K. Sen, S. Afroze, H.M. Ang, Dye and its removal from aqueous solution by adsorption: a review, *Adv. Colloid Interface Sci.* 209 (2014) 172-184.
- [35] H.M.F. Freundlich, Over the adsorption in solution, *J. Phys. Chem.*, 57 (1906) 1100-1107.
- [36] I. Langmuir, The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum, *J. Am. Chem. Soc.* 40 (1918) 1361-1403.
- [37] R. Sips, Combined form of Langmuir and Freundlich equations, *J. Chem. Phys.*, 16 (1948) 490-495.
- [38] M.I. Temkin, V. Pyzhev, Kinetics of ammonia synthesis on promoted iron catalysts, *Acta Physiochim. URSS* 12 (1940) 217-222.
- [39] K.Y. Foo, B.H. Hameed, Insights into the modeling of adsorption isotherm systems, *Chem. Eng. J.* 156 (2010) 2-10.
- [40] S.K. Papageorgiou, F.K. Katsaros, E.P. Kouvelos, J.W. Nolan, H. Le Deit, N.K. Kanellopoulos, Heavy metal sorption by calcium alginate *beads* from *Laminaria digitata*, *J. Hazard. Mater.* 137 (2006) 1765-1772.
- [41] I. Guerrero-Coronilla, L. Morales-Barrera, E. Cristiani-Urbina, Kinetic, isotherm and thermodynamic studies of amaranth dye biosorption from aqueous solution onto water hyacinth leaves, *J. Environ. Manag.* 152 (2015) 99-108.
- [42] F. Adnan, S.P. Thanasupsin, Kinetic studies using a linear regression analysis for a sorption phenomenon of 17 $\alpha$ -methyltestosterone by *Salvinia cucullata* in an active plant reactor, *Environ. Eng. Res.* 21 (2016) 384-392.

**Material Suplementar****Figura S1** Ensaio controle para a adsorção da MT em sílica pura.

## **Aplicação da Dinâmica de Partículas Dissipativas (DPD) no entendimento da complexação entre a metiltestosterona e ciclodextrinas**

A formatação desse artigo está de acordo com o manual de normalização da UFLA

### Resumo

Resultados experimentais atestam as interações entre moléculas esteroides, como a metiltestosterona, com a cavidade hidrofóbica das ciclodextrinas. Esse tipo de interação tem grande importância para aplicações no melhoramento de propriedades físico-químicas desse tipo de hormônio, em sistemas de liberação controlada e no sequestro dos resíduos do esteroide em meio aquoso. Um modelo mesoscópico para a molécula de metiltestosterona foi desenvolvido conjuntamente à avaliação dos parâmetros de repulsão com as ciclodextrinas, estudado com dinâmica de partículas dissipativas. Além das informações que podem ser obtidas com respeito às interações envolvidas na complexação, esse tipo de modelagem, se bem sucedido, pode ser aplicado a este e outros compostos, reduzindo custos com reagentes em experimentos de bancada, e tempo com as simulações computacionais, por se tratar de sistemas formados por muitos átomos. As simulações indicam que as forças hidrofóbicas impulsionam as interações entre o hormônio e as ciclodextrinas. Ao longo do texto são discutidos os modelos e parâmetros que possam imitar através de simulações o que ocorre experimentalmente. Apesar dos avanços, um modelo final que possa ser aplicado com êxito para os sistemas homogêneos, entre o hormônio e as ciclodextrinas, e heterogêneo, em que as ciclodextrinas estão fixadas em uma matriz inorgânica, não foi totalmente concluído. A modelagem se aproxima ao percentual de complexação para a  $\gamma$ -ciclodextrina, no entanto, existem detalhes, seja no desenho do modelo ou nos parâmetros de repulsão, que não foram percebidos para a conclusão de um modelo aplicável para as três ciclodextrinas avaliadas.

**Palavras chave:** Ciclodextrinas, Metiltestosterona, Dinâmica de partículas dissipativas, Modelagem molecular, Métodos mesoscópicos.

## 1. Introdução

A dinâmica de partículas dissipativas (DPD) foi desenvolvida em uma tentativa de reproduzir de maneira coerente os fenômenos que ocorrem em uma escala mesoscópica, para os quais as simulações de dinâmica molecular (DM) apresentem limitações ao fato de contemplar todos os átomos presentes (ESPAÑOL; WARREN, 1995; SHIH et al., 2006). O modelo consiste em um conjunto de *beads* (partículas dissipativas), onde cada *bead* representa um conjunto de átomos ou moléculas e que refletem as propriedades desse conjunto (ESPAÑOL, 2005). As partículas estão sujeitas a três tipos de forças, sendo que uma são forças conservativas ou de repulsão, que capturam os efeitos da pressão entre as diferentes partículas; outra é o atrito, uma força dissipativa, que irá descrever a resistência das partículas à viscosidade em um fluido real; e por último, a força estocástica, ou aleatória, que descreve os graus de liberdade eliminados da descrição no processo de “*coarse-graining*” (GROOT; WARREN, 1997).

Apesar da deficiência do modelo de DPD originário da simplificação excessiva de conceitos em sua formulação, o modelo tem se mostrado atrativo e versátil em simulações com fluidos complexos. Realizando mudanças nas forças conservativas entre o fluido e as partículas, a construção de estruturas poliméricas, sistemas coloidais, anfífilicos e misturas, se dão de maneira bastante simples (ESPAÑOL, 2005; WIJMANS; SMIT, 2002).

A metiltestosterona (MT) é um andrógeno sintético bastante empregado na aquicultura de inversão sexual (HU et al., 2011). É um composto altamente hidrofóbico, que apresenta baixa solubilidade em água, possui potencial de bioconcentração moderado e causa disfunções endócrinas em organismos vivos (MLALILA et al., 2015; GUEDES-ALONSO et al., 2017). Tecnologias que viabilize sua utilização em dosagens menores às habitualmente empregadas, e removam a carga residual em meio aquoso, é de fundamental interesse pelo setor aquícola e os órgãos de preservação ambiental.

O uso das ciclodextrinas (CDs) na formação de complexos de inclusão com uma vasta variedade de moléculas já demonstraram os benefícios da complexação para as moléculas convidadas. Estas macromoléculas apresentam-se em forma de um cone truncado cuja cavidade apresenta características mais apolares e seu exterior polar. A complexação pode alterar propriedades físico-químicas como a solubilidade e a estabilidade modulando liberações e alterando a disponibilidade de drogas por exemplo (SZEJTLI, 2013; BREWSTER; LOFTSSON, 2007).

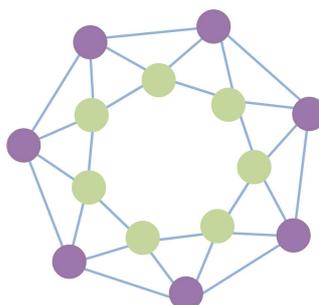
Sistemas contendo CDs muitas vezes podem ser complexos e grandes, e em estudos teóricos demandar maiores custos computacionais ou mesmo inviabilizando os cálculos caso esteja associado a estruturas poliméricas. Assim, esse estudo visa o desenvolvimento de modelos que se aproximem à reprodução dos dados experimentais e possivelmente possam ser utilizados para prever propriedades em experimentos utilizando sistemas complexos, como àqueles em que as CDs estão ancoradas a suportes poliméricos, como a sílica.

## 2 Materiais e Métodos

Nos testes realizados, os sistemas foram construídos a partir de modelos “Coarse-Grain”. As CDs foram utilizadas como construídas por Jaime em sua estância no grupo do professor Berend Smit, que desenvolveu o Mesomol, um programa próprio para realizar simulações de CGMD (coarse-grain molecular dynamics). Este programa faz uso de unidades reduzidas (u.r.) para avaliar as interações entre as *beads*, sendo que 1 u.r. equivale a 6,47 angstroms, assim cada *bead* de 1 u.r. equivale a um conjunto de átomos que possuem o tamanho de 6,47 angstroms.

Inicialmente foram distinguidas três tipos de partículas,  $w$ ,  $h$  e  $t$ , para representar a água e os átomos da cavidade e do exterior das CDs. Neste modelo, uma *bead*  $w$ , equivale a três moléculas de água. O modelo para a CD, construído por Jaime e, utilizado nesse trabalho esta esquematizado na Figura 1a, em que cada unidade de glucose que compõe a CD é representado por 2 *beads*, uma hidrofílica ( $h$ ) e outra hidrofóbica ( $t$ ), sendo que as *beads* hidrofóbicas foram dispostas a meia distância de ligação entre as *beads* hidrofílicas. Os modelos utilizados para todas as 3 CDs são equivalentes, levando em consideração que o número *beads* é correspondente ao número de glucoses.

Figura 1 - Esquema para o modelo *coarse-grain* da bCD, com as *beads* hidrofílicas em tom escuro e o interior hidrofóbico representado pelas *beads* em tom claro.



Nas simulações de DPD, as partículas hidrofílicas e hidrofóbicas interagem através de um modelo de repulsão suave, e cada partícula, ou *bead*, representa o centro de massa de um conjunto de átomos. A técnica de simulação de DPD é baseada na simulação de esferas macias (*beads*), cujo movimento é regido por certas regras de colisão. Nesse sistema, as partículas interagem por três forças, sendo uma força conservativa ( $F_C$ ), uma força dissipativa ( $F_D$ ) e uma força aleatória ( $F_R$ ), sendo que, as forças dissipativa e aleatória são escolhidas de tal forma que uma distribuição canônica adequada seja amostrada (KRANENBURG; SMIT, 2004; GROOT; WARREN, 1997). O somatório dessas três forças (Equação 1), corresponde à força total de uma dada partícula (ESPAÑOL; WARREN, 1995).

$$f_i = \sum_{j \neq i} F_{ij}^C + \sum_{j \neq i} F_{ij}^D + \sum_{j \neq i} F_{ij}^R \quad (1)$$

A força conservadora, dada por  $F_C$ , é uma interação repulsiva suave, que é linear até uma distância de corte  $r_c$ :

$$F_{ij}^C = \begin{cases} a_{ij}(1 - r_{ij}/r_c)\hat{r} & r_{ij} < r_c \\ 0 & r_{ij} \geq r_c \end{cases} \quad (2)$$

onde  $r_{ij}$  é a distância entre as partículas  $i$  e  $j$ ,  $a_{ij}$  é o parâmetro que caracteriza a interação entre duas partículas e  $r_c$  é o raio de corte. Os parâmetros de DPD estão relacionados à compressibilidade da água e aos parâmetros de solubilidade de Flory-Huggins, de modo que uma descrição razoável da termodinâmica do sistema real é passível de ser obtida (GROOT; WARREN, 1997; KRANENBURG; SMIT, 2004).

Os parâmetros de repulsão adotados por Meyer et al. (2009), para o modelo da bicamada de fosfolípidos e o colesterol, são descritos na Tabela 1, em que  $w$  representa as *beads* de água,  $h$  representam as *beads* hidrofílicas do fosfolípido e do colesterol,  $t$ , as *beads* hidrofóbicas do fosfolípido, e  $t'$  as *beads* hidrofóbicas do colesterol. A partir desse modelo, adaptações foram feitas nos parâmetros de repulsão visando a obtenção de um modelo para as CDs e a molécula de metiltestosterona (MT).

Tabela 1 – Parâmetros de repulsão adotados para o modelo da bicamada de fosfolípidos e o colesterol em simulações DPD

	w	h	t	t'
w	25	15	80	120
h		35	80	80
t			25	80
t'				25

Fonte: MEYER et al., 2010

Portanto, as simulações de DPD neste trabalho irão abordar os resultados obtidos para a obtenção dos melhores parâmetros de repulsão das CDs, e a criação e avaliação dos parâmetros de repulsão para o hormônio MT. Todos esses cálculos foram realizados com o programa Mesomol.

### 3 Desenvolvimento, resultados e discussão

O modelo *coarse-grain* para a molécula de MT foi desenhado inicialmente com 3 *beads* de 1 u.r. (Figura 2), que possuem caráter hidrofóbico ( $t'$ ). Os ensaios que seguem avaliaram a complexação deste modelo de 3 *beads* em um sistema contendo uma única molécula de MT e uma de CD cujos parâmetros de hidrofobicidade empregados são descritos na Tabela 2. Trata-se de um sistema constituído por 3 tipos de componentes modelados com 4 distintas *beads* que buscam representar os efeitos de polaridade presentes nas moléculas. O sistema apresenta uma dimensão cúbica de 15 u.r., com 10000 moléculas de água, 1 de CD e 1 de MT. A partir de simulações prévias realizadas no grupo do Prof. Carlos Jaime, os parâmetros adotados inicialmente, sofreram algumas alterações com relação aos trabalhos com os fosfolípidos e o colesterol, e estão descritos na Tabela 2.

As simulações de DPD, empregando os parâmetros descritos na Tabela 2, foram avaliadas quanto à distribuição radial dos modelos de *coarse-grain* (com auxílio do Visual Molecular Dynamics – VMD (HUMPHREY; DALKE; SCHLTEN, 1996)), cujo valor de integral indica a proximidade entre as estruturas de CD e de MT, capazes de relacionar se ocorre ou não a complexação. Como 1 u.r. corresponde a 6,47 angstroms, para que ocorra a complexação a distância máxima de uma molécula e outra deve ser de 3,23 angstroms ou seja,

aproximadamente 0,5 u.r. Diante disso os resultados para a aCD, bCD e gCD foi de 57, 43 e 4% de complexação respectivamente.

Figura 2 - Esquema para o modelo coarse-grain de 3 *beads* para a MT.

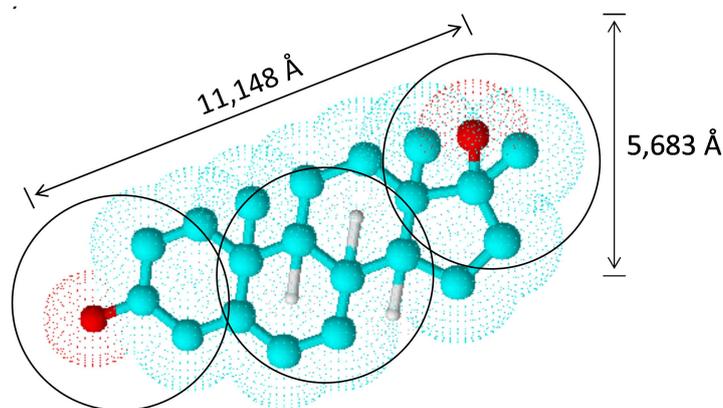


Tabela 2 - Parâmetros de hidrofobicidade entre as *beads* para o modelo de complexação para as CDs e MT.

	w	h	t	t'
w	25	15	80	120
h		35	0	80
t			25	15
t'				35

Os resultados experimentais indicam alta porcentagem de interação entre a MT e as CDs beta e gama, e por apresentar uma cavidade pequena para o tamanho do esteroide não se esperava altos valores para a aCD, assim os resultados obtidos parecem não retratar bem os dados experimentais, e prosseguimos com a avaliação de novos parâmetros para a modelagem da complexação.

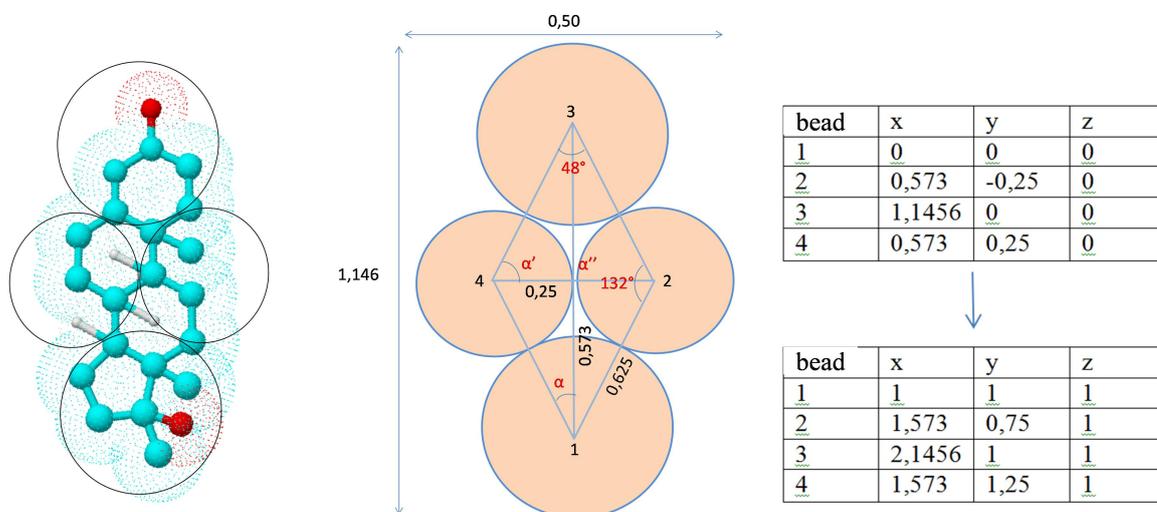
Uma série de desenhos de experimentos (FERRÉ, 2004) foram feitos para averiguar quais parâmetros, relacionados a repulsão e hidrofobicidade, mais influenciam no fenômeno de complexação, simulado por DPD. No entanto, apesar de distintos valores em algumas combinações de parâmetros, nenhuma apresentou alguma aproximação a fim de retratar os dados experimentais. Então, em meio a exaustivas tentativas, passamos considerar que o modelo construído para o hormônio não deve ser o melhor para sua representação e um novo modelo foi construído, o de 4 *beads* (Figura 3).

Para a construção desse modelo foi feita a sobreposição de circunferências sobre a molécula de MT, a qual foi coberta por 4 *beads*, sendo as duas das extremidades (cabeça e cauda) maiores e 2 menores mais centralizadas, cujas dimensões são esquematizadas abaixo e as coordenadas de cada *bead* definidas no quadro ao lado.

Inicialmente este modelo havia sido construído com *beads* de 1 e 0,75 u.r. e os parâmetros utilizados como os demonstrados na Tabela 2, no entanto o modelo era demasiado grande para entrar na cavidade da bCD. A proximidade entre uma molécula de MT e bCD é real mas essa distância é maior que 0,5 u.r., e portanto não ocorre complexação. Como o modelo é grande para a cavidade, a molécula está próxima cerca de 80% do tempo de simulação, mas não complexada.

Com o novo modelo *coarse-grain*, onde foi reduzido o tamanho das *beads*, como apresentado na Figura 3 (*beads* com 0,75 e 0,5 ur), foi realizado um novo ensaio de 210000 ciclos. Neste experimento a complexação ocorre em 24% do tempo de simulação. Apesar de haver complexação com esse modelo, a percentagem com que ocorre ainda não é satisfatória, tendo em vista que os dados experimentais indicam uma complexação bastante expressiva, com uma forte constante de associação. Assim, um desenho de experimentos foi feito buscando correlacionar quais fatores interferem com maior expressividade no fenômeno de complexação, se o modelo ou os parâmetros de hidrofobicidade. Portanto, os fatores investigados foram a interação água/MT, interação MT/cavidade da CD e o modelo da MT

Figura 3 - Modelo de 4 *beads* com as dimensões e correspondentes coordenadas de cada *bead*, construído a partir da sobreposição da molécula de MT com círculos.



A matriz a seguir ilustra o desenho de experimento apresentando os parâmetros utilizados e as respostas obtidas na sequência de quadros.

água/MT	MT/CD int.	modelo MT	A	B	C
120	10	3 beads	-	-	-
150	10	3 beads	+	-	-
120	15	3 beads	-	+	-
150	15	3 beads	+	+	-
120	10	4 beads	-	-	+
150	10	4 beads	+	-	+
120	15	4 beads	-	+	+
150	15	4 beads	+	+	+

Efeitos na matriz:

Experimento	A	B	C	AxB	AxC	BxC	AxBxC	Resposta (%)
1 mtt1bcd1.1	-	-	-	+	+	+	-	50
2 mtt1bcd1.2	+	-	-	-	-	+	+	72
3 mtt1bcd1.3	-	+	-	-	+	-	+	43
4 mtt1bcd1.4	+	+	-	+	-	-	-	73
5 mtt1bcd1-4p.1	-	-	+	+	-	-	+	36
6 mtt1bcd1-4p.2	+	-	+	-	+	-	-	74
7 mtt1bcd1-4p.3	-	+	+	-	-	+	-	41
8 mtt1bcd1-4p.4	+	+	+	+	+	+	+	72.5
<b>Efeitos</b>	<b>30,4</b>	<b>-0,6</b>	<b>-3,6</b>	<b>0,4</b>	<b>4,4</b>	<b>2,4</b>	<b>-3,6</b>	

\*A=água/MT, B=MT/CD cavidade, C=modelo para MT

Com o desenho de experimento, o que se pode concluir é que o fator que mais interfere na complexação é a repulsão do hormônio com a água, e a interação mais importante é justamente entre a repulsão do hormônio com a água e o tipo de modelo que está sendo utilizado para a MT. A complexação é melhor quando é empregado um modelo maior para a MT e valores de repulsão maiores com a água, ou então quando é utilizado o modelo menor com menores repulsões com a água.

### 3.1 Testes para complexação de sistemas com muitas CDs

Nestes cálculos foram avaliados a complexação do hormônio em um sistema constituído de 1 MT e 10 bCDs. A quantidade de CDs dentro da caixa foi estimada realizando os cálculos a partir da quantidade máxima de CD solúvel em água. Olhando a proporção entre água/CD obteve-se que para um *box* de água de 15 u.r., a quantidade de CDs presentes em solução é de aproximadamente 10 moléculas para 1 de MT.

Inúmeras simulações foram feitas alternando os valores dos parâmetros em destaque na tabela 3, relativo à interação MT/água e MT/cavidade.

Tabela 3 - Parâmetros de hidrofobicidade entre as *beads* para o modelo de complexação para as CDs e MT, alterando os parâmetros  $t'$ .

	w	h	t	$t'$
w	25	15	80	150
h		35	0	80
t			25	10
$t'$				35

No entanto o que se observou nos frames ao longo da simulação é que a complexação era favorável, mas não ocorria na razão 1:2. Parece que as CDs tendem a repelir uma a outra com os parâmetros utilizados e em alguns raros momentos se pode observar a aproximação entre elas.

Dois fatores foram levados em consideração aqui. Ou modelo não reproduz os resultados experimentais, pode ser que os o parâmetros de repulsão do esteroide com a água não estejam suficientemente fortes, algo que faz sentido visto que a MT é praticamente insolúvel em água, e/ou também os parâmetros da própria CD não estão bem e as moléculas repelem umas as outras.

Tocando nos parâmetros externos da CD, as modificações também não promoveram bons resultados, pois com as alterações (Figura 4), as complexações na razão molar 1:1 foram ocorrendo com menos frequência (Figura 5). Também, outro fato curioso é que as CDs começavam a enganchar umas nas outras com maior intensidade no sentido  $25 \gg 20 \gg 15$ , para as modificações nos parâmetros exterior-exterior.

Figura 4 - Representação dos parâmetros empregados com a modificação da interação hidrofílica da bCD.

m1b10-4ph1			
25.00000	15.00000	80.00000	170.0000
	25.00000	0.0000000E+00	80.00000
		25.00000	10.00000
			35.00000

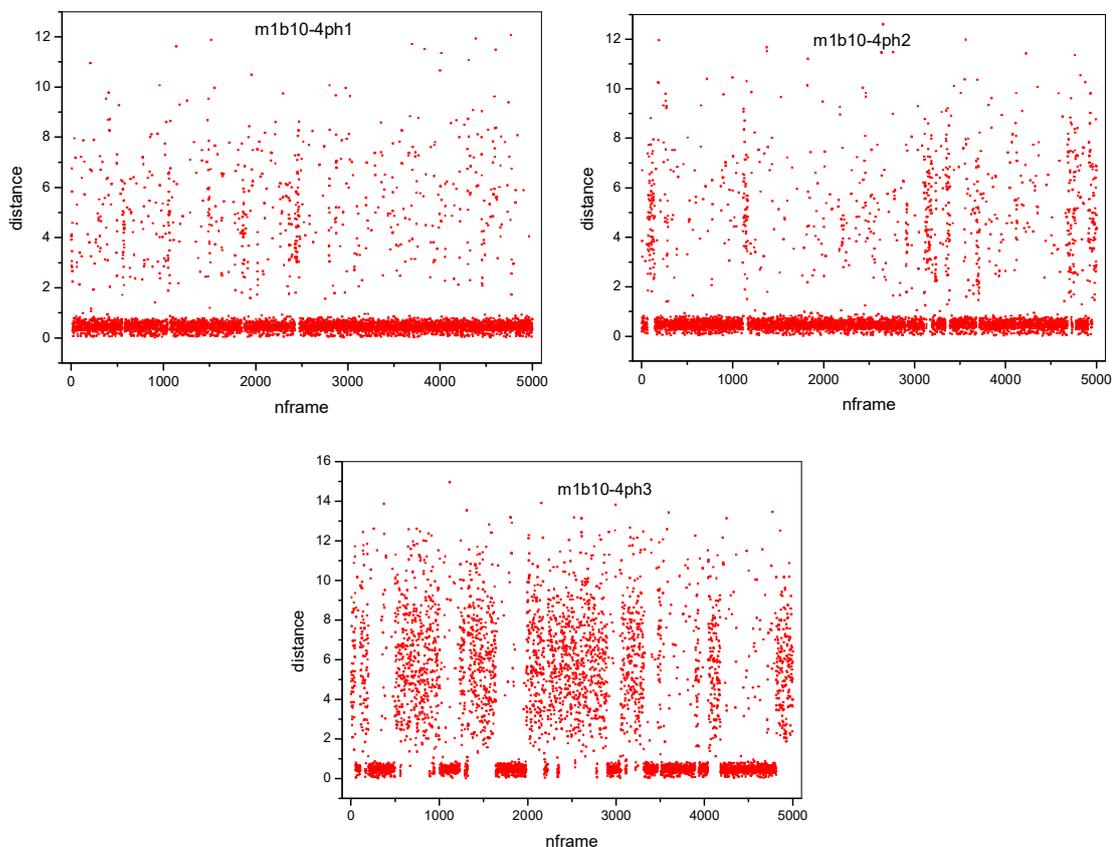
  

m1b10-4ph2			
25.00000	15.00000	80.00000	170.0000
	20.00000	0.0000000E+00	80.00000
		25.00000	10.00000
			35.00000

m1b10-4ph3			
25.00000	15.00000	80.00000	170.0000
	15.00000	0.0000000E+00	80.00000
		25.00000	10.00000
			35.00000

Figura 5 - distribuição dos frames em relação a distancia da metiltestosterna à bCD.



Um desenho de experimento optou, portanto, por avaliar os parâmetros da cavidade/cavidade e cavidade/MT, tendo em vista que, reduzindo o valor do parâmetro

externo da CD ocorre a aproximação, mas é demasiado forte e incomum, fazendo com que as CDs se enganchem umas nas outras. Pode ser que um equilíbrio entre o parâmetro exterior e interior reflita em melhores resultados.

Um desenho de experimento modificando os parâmetros de interação hormônio/cavidade e cavidade/exterior avaliaram a alteração dos parâmetros em destaque na Tabela 4, cujos resultados são expressos na Tabela 5. O percentual de complexação foi calculado baseando-se na distribuição radial das estruturas. A proximidade do modelo da MT à cavidade da CD foi calculada para cada ciclo, quando a distância é igual ou inferior à 0,5 u.r. é considerado que os modelos se encontram complexados.

Tabela 4 - Parâmetros de hidrofobicidade entre as *beads* para o modelo de complexação para as CDs e MT, alterando os parâmetros  $t$  e  $t'$ .

	w	h	t	t'
w	25	15	80	170
h		15	10	80
t			25	10
t'				25

Tabela 5 - Resumo dos resultados de complexação

modelo	int/ext	MT/int	% não complexa	% complexo 1:1	% complexo 2:1
m1b10-1	20	5	12,4	81,5	5,96
m1b10-2	20	15	10,7	83,7	5,4
m1b10-3	30	5	10,9	85,1	3,88
m1b10-4	30	15	11,4	85,8	2,8
m1b10-5	15	10	11,2	78,4	10,2
m1b10-6	20	10	10,1	84,3	5,5
m1b10-7	15	5	9,8	80,0	10,1
m1b10-8	15	15	12,4	79,6	9,96
m1b10-9	30	10	10,7	85,6	3,6

Em posse dos resultados obtidos, foi possível a realização de um desenho mais simplificado de apenas 2 níveis. Os parâmetros de hidrofobicidade de 30 para a cavidade e de 15 para a MT apresentam resultados destoantes dos demais, sendo possível descartá-los na modelagem, adotando um desenho de experimento mais simples, cuja matrix é descrita a seguir:

## Matriz do desenho de experimento

Experimento	A	B	CDint/CDext	MT/CD int.	Resposta (%)
1 m1b10-7	-	-	15	5	10,18
2 m1b10-1	+	-	20	5	5,96
3 m1b10-5	-	+	15	10	10,24
4 m1b10-6	+	+	20	10	5,56

## Efeitos na matriz

Experimento	A	B	AxB	Resposta
1 mtt1bcd1.1	-	-	+	10,18
2 mtt1bcd1.2	+	-	-	5,96
3 mtt1bcd1.3	-	+	-	10,24
4 mtt1bcd1.4	+	+	+	5,56

## Efeitos

Fator	Efeito
A	-8,9
B	-0,34
AxB	-0,46

Se conclui com o desenho descrito que, neste caso, o fator que mais influi para a formação dos complexos 1:2 é o parâmetro de hidrofobicidade da cavidade em interação com a parte externa da CD. Neste desenho a hidrofobicidade da MT e a interação entre a cavidade não apresentaram valores capazes de demonstrar certa influencia nos resultados.

Finalmente, após inúmeras tentativas de encontrar um modelo e parametrizá-lo de forma a poder aproximá-lo de uma representação do que ocorre experimentalmente chegamos à seguinte matriz apresentada na Figura 6.

Os novos parâmetros foram então estendidos às demais CDs, alfa e gama e também realizadas simulações para sistemas contendo 1 CD, 2 CDs e 10 CDs. A Tabela 6 apresenta resumidamente a percentagem de complexação para as simulações descritas. Posteriormente é mostrado, a título de exemplo, nas Figuras 7, 8 e 9, os gráficos e fotogramas indicando o percentual de complexação para a modelagem com a gCD.

Figura 6 - Matriz e dados de input para as simulações DPD.

iseed				
-1				
cycles	15.0	15.0	15.0	
2501000				
skip	0.4200000000000000			
1000				
safety	numcom			
3000	3			
energymc	molecules			
5 5	10000	10	1	
energydpd				
100 5				
nctrj	k-spring			
0 500 2	k-angle			
2 3	atomtypes			
samplerp	4			
100				
timestep	25.00000	15.00000	80.0000	170.000
0.03d0				
cutoff	15.00000		15.0000	80.000
1.0d0			25.0000	10.000
maxdpd				35.000
50				

Tabela 6 - Percentagem de complexação das simulações DPD para os sistemas contendo quantidades distintas de CDs

Ciclodextrina	quantidade	% de complexação		
		0 (MT/CD)	1:1 (MT/CD)	1:2 (MT/CD)
alfa	10	12,98	55,22	31,8
	2	43,2	51,3	5,5
	1	60,2	38,8	-
beta	10	11,28	78,32	10,4
	2	23,1	75,74	1,16
	1	32,98	67,02	-
gama	10	15,5	83,7	0,8
	2	26,64	73,04	3,2
	1	45,68	54,32	-

Figura 7 - Representação gráfica e fotografamas mostrando os percentuais de complexação ao longo da simulação para o sistema contendo uma molécula de MT e 10 gCD.

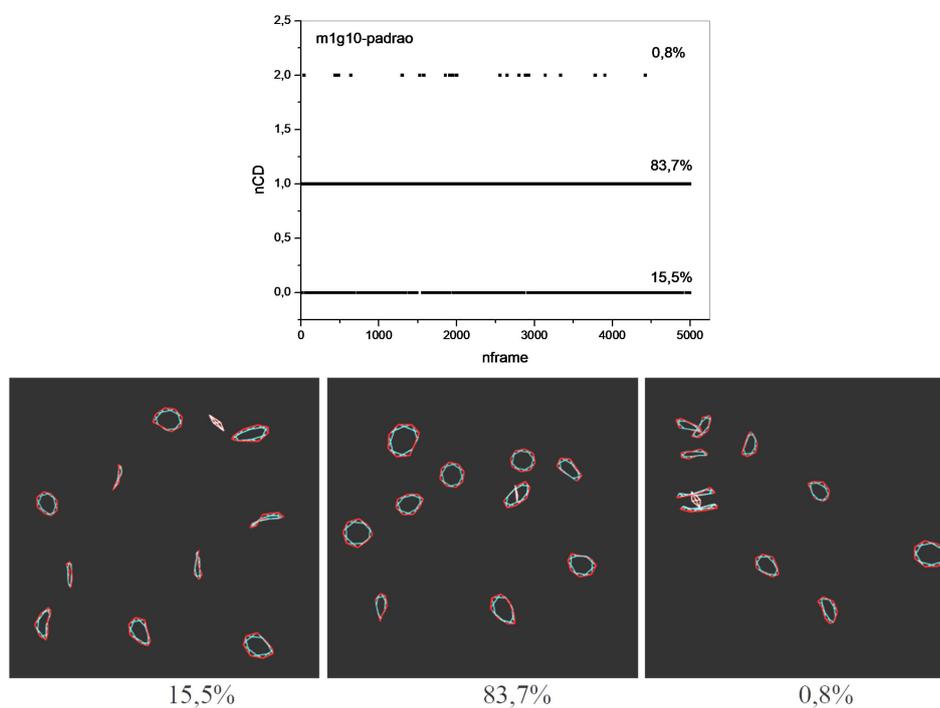


Figura 8 - Representação gráfica e fotografamas mostrando os percentuais de complexação ao longo da simulação para o sistema contendo uma molécula de MT e 2 gCD.

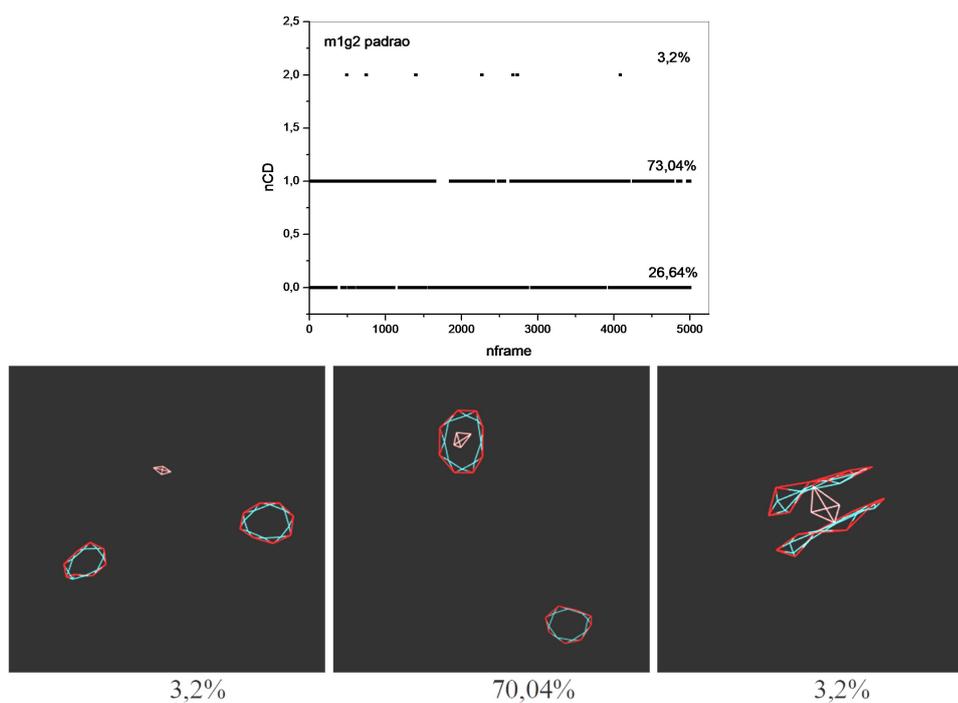
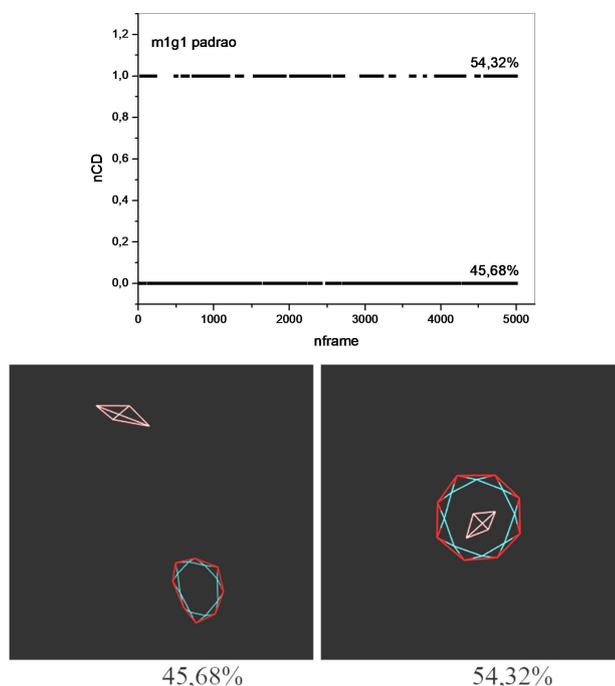


Figura 9 - Representação gráfica e fotografamas mostrando os percentuais de complexação ao longo da simulação para o sistema contendo uma molécula de MT e 1 gCD.



Embora até o presente momento, os parâmetros obtidos tenham propiciado as melhores representações para as simulações de DPD, esses resultados de modelagem são satisfatórios apenas para a gCD quando comparado às respostas experimentais. Diante disso, e praticamente esgotadas as tentativas de avaliação de novos parâmetros imagina-se que o ponto que ainda pode ser tocado é no modelo para a molécula de hormônio e também relativo à densidade de CDs e hormônio em um box de água, que tentem simular com valores mais próximos ao que ocorre experimentalmente, seguindo as devidas proporções. Assim, abaixo são sumarizados na Tabela 7 a percentagem de complexação para os sistemas em que houve alteração no modelo da MT.

O modelo de 9 *beads* consiste em um modelo mais rígido, com 9 *beads* idênticas. Esse modelo foi construído reduzindo-se proporcionalmente o tamanho das *beads* que compunham o modelo de 4 *beads*, inserindo uma *bead* entre cada ligação, mantendo a simetria e tamanho do modelo anteriormente avaliado. O modelo 2+7 *beads* consiste em um modelo rígido para a MT, contendo 7 *beads* idênticas e as 2 das extremidades de maior raio. E também foi avaliado o modelo de 4 *beads* descrito anteriormente em um box contendo 30 mil e 80 mil águas (*box* de 15 e 30 u.r. respectivamente), e 29, 25 e 21, aCD, bCD e gCD respectivamente.

Tabela 7 - Percentagem de complexação das simulações DPD de variações de modelos e water box.

CD	n de CDs	Modelo MT	Water box u.r. <sup>3</sup>	% de complexação		
				0-MT/CD-	1:1-MT/CD	1:2-MT/CD
aCD	10	9 beads	15	59	38	3
bCD				63	37	0
gCD				58	42	0
aCD	10	2+7 beads	15	31	55	14
bCD				59	41	1
gCD				62	38	0
aCD	29	4 beads	15	6	38	56
bCD	25			9	71	20
gCD	21			12	86	2
aCD	29	4 beads	30	28	59	13
bCD	25			8	91	1
gCD	21			24	76	0

Com os resultados das últimas simulações nota-se que os novos modelos para a molécula de hormônio não apresentam resultados mais convincentes do que o modelo de 4 *beads*. Portanto, até o presente momento os melhores resultados para uma modelagem DPD envolvendo as estruturas da MT e as CDs continuam sendo o modelo de 4 *beads* e os últimos parâmetros avaliados. Pode ser que tenha algum detalhe que ainda não conseguimos captar para essa modelagem ou, também, que não seja possível realizar por DPD a modelagem para esse tipo de sistema.

Não obstante, para as simulações em sílica funcionalizada com bCD, serão atribuídas os parâmetros e modelo com os resultados que mais convencem em relação ao que ocorre experimentalmente, ou seja, àqueles descritos na Figura 6.

### 3.2 Modelagem para complexação da MT em bCD funcionalizada em sílica

A avaliação da complexação da MT em bCD funcionalizada em sílica foi investigada mediante simulações de dinâmica molecular de “coarse-grain” com o programa Mesomol, assim como àqueles realizados para as moléculas de CDs não funcionalizadas.

As simulações foram desenvolvidas utilizando-se dos parâmetros de hidrofobicidade já pré-estabelecidos para as CDs. Para facilitar a construção do modelo de *beads* para a superfície da sílica, uma estrutura cristalina foi adotada e as moléculas de CDs foram aderidas aleatoriamente em sua superfície para simular a heterogeneidade da mesma.

Dentre as inúmeras possibilidades para se construir a superfície organofuncionalizada, optou-se por construí-las de modo a poder comparar os efeitos da densidade de CDs ancoradas sob a complexação com as moléculas de hormônio. Assim, foram possíveis 3 distintas estruturas:

- a primeira com 4 CDs em uma face da sílica;
- a segunda com doze CDs em uma face;
- e a terceira com 4 CDs em uma face e doze na outra, totalizando 16 CDs funcionalizadas.

A dinâmica foi realizada em água, em uma caixa de 30 u.r. Esse sistema, já com os demais componentes (Sílica funcionalizada e MT) apresentou densidade final igual a 3, necessária para esse tipo de simulação.

Dentre os parâmetros de hidrofobicidade utilizados, manteve-se os da bCD, como mostra a Tabela 7 e apenas foi investigada a complexação com dois modelos distintos para a molécula de hormônio, ambas com a mesma quantidade de *beads* mas com a alteração do parâmetro de hidrofobicidade em uma delas. Para promover um desbalanço de densidade hidrofóbica na MT, já que apresenta essa variação proveniente da função cetona e álcool, umas das *beads* foi definida como mais hidrófila com relação às demais *beads* da MT, como elucidada a Figura 10, onde os tons representam a polaridade das *beads* na seguinte ordem escura > clara > tracejado. A esse modelo denominamos MTh2 e ao modelo com todos os parâmetros uniformes MT1.

Figura 10 - Modelo de coarse-grain para a bCD e MT1 e MTh2 , respectivamente.

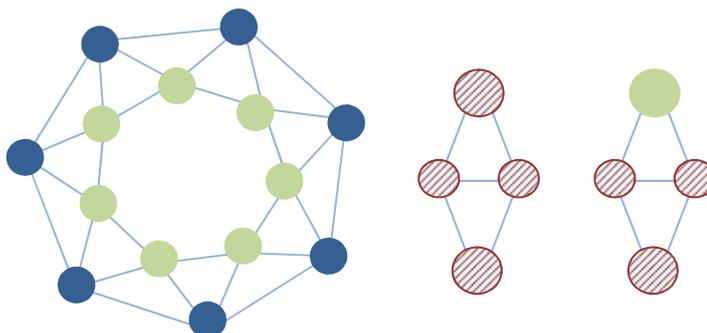


Tabela 7 - Parâmetros de hidrofobicidade entre as *beads*

	w	h	t	t'
w	25	15	80	170
h		15	15	80
t			25	10
t'				35

A quantidade de moléculas de hormônio a serem utilizadas foi de 8, levando em consideração que o sistema com maior quantidade de CDs apresenta 16 das mesmas e a bCD pode complexar na proporção molar de 1:2. A seguir (Figura 11) são fornecidos os frames capturados ao final das simulações de DPD, para os modelos avaliados em distintas concentrações de CDs funcionalizadas.

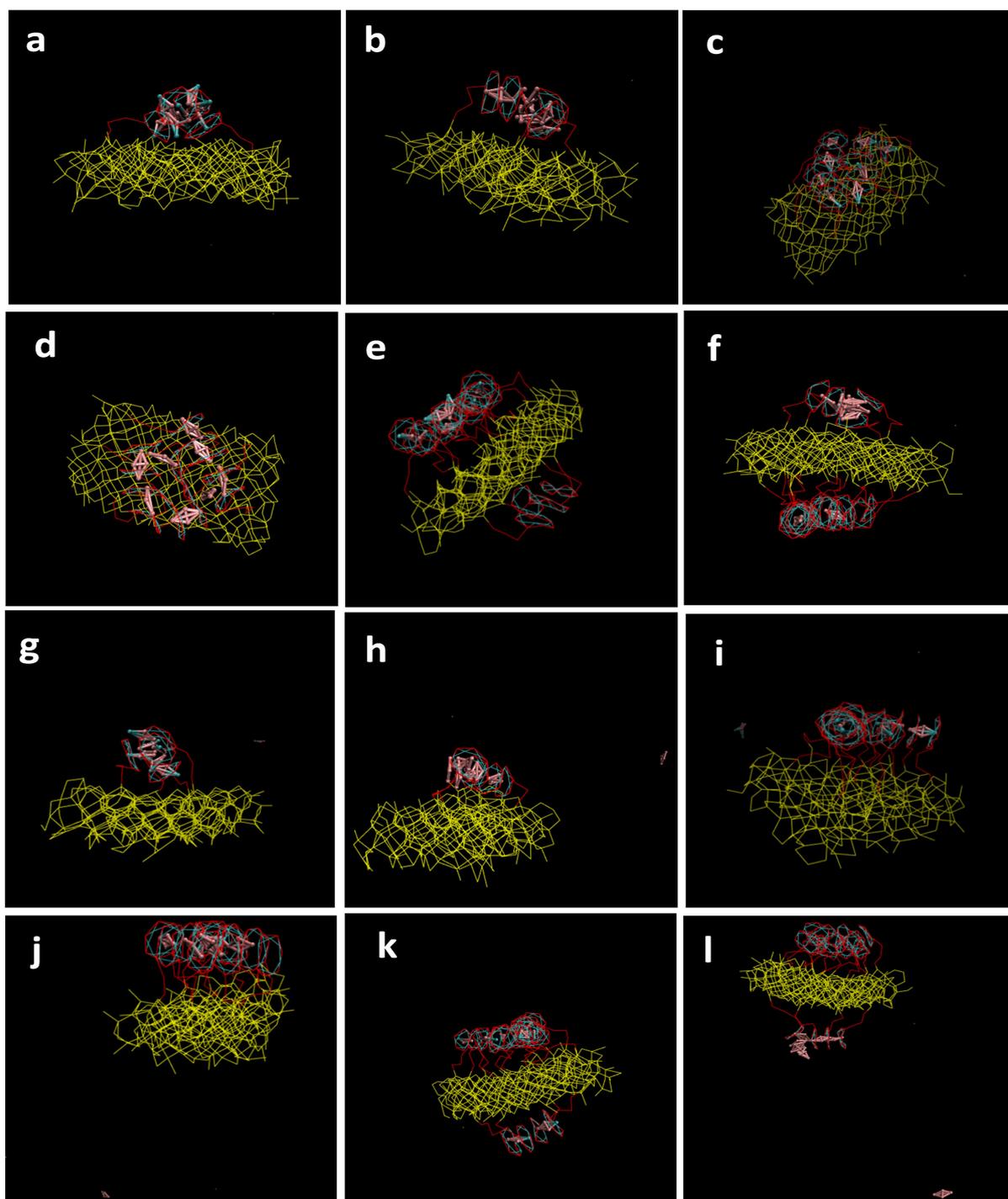
É evidente que as moléculas de MT buscam se agrupar quando colocadas em água devido à alta hidrofobicidade do hormônio. A complexação/agregação na superfície funcionalizada é mais rápida para as moléculas de MT1, com todos os componentes de hidrofobicidade uniformes (Figura 11a-f). Avaliando os vídeos com os frames ao longo da simulação nota-se que para o parâmetros utilizados com esse tipo de superfície funcionalizada, após a complexação da molécula de hormônio, a mesma tem seu movimento restringido e não é mais capaz de abandonar a superfície contendo bCD.

Com as simulações nos sistemas contendo maior quantidade de CDs (12 e 16), o hormônio se distribue melhor na superfície (Figura 11c-f), embora ocorra um pouco de agregação, como nos sistemas contendo 16 CDs. Além dos parâmetros que estão sendo utilizados, a distribuição espacial das moléculas do hormônio pode influenciar em sua aproximação à superfície funcionalizada com a bCD.

Outro fator importante é que o ligante utilizado para ancorar a bCD à superfície da sílica, representado por 3 *beads* hidrofílicas, confere certa mobilidade para as CDs, e estas, mesmo não estando complexadas com o hormônio tendem a orientar-se com relação às suas vizinhas e também deve ser considerado.

É complexo avaliar todos os fatores possíveis, e estar definindo o principal responsável pela maneira que se dão as complexações. As complexações nos sistemas de 12 bCDs foram semelhantes para ambos os modelos de MT (Figura 11c,d), estando as moléculas de hormônio distribuídas com certa uniformidade entre as CDs ancoradas à sílica.

Figura 11 - Fotograma ao final da simulação DPD para a superfície inorgânica: com 4 bCDs, para os modelos MTh2 (a) e MT1 (b); com 12 bCDs, para os modelos MTh2 (c) e MT1 (d); e com 16 bCDs, para os modelos MTh2 (e) e MT1 (f). Fotograma ao final da simulação DPD, com moléculas de MT adicionadas aos pares em intervalos de 200 mil ciclos, para a superfície inorgânica: com 4 bCDs, para os modelos MTh2 (g) e MT1 (h); com 12 bCDs, para os modelos MTh2 (i) e MT1 (j); e com 16 bCDs, para os modelos MTh2 (k) e MT1 (l).



Para o sistema contendo 16 bCDs a complexação ocorreu de forma mais dispersa, com o modelo MTh2, na face de maior densidade de CDs (Figura 11e). Enquanto que no modelo MT1 houve complexação pelas duas faces da superfície funcionalizada, mas com uma maior preferência pela face menos densa das CDs (Figura 11f). Talvez os fatores relativos às interações entre as moléculas de hormônio tenham se sobressaído em relação aos parâmetros de complexação.

Para os mesmos sistemas apresentados acima, foi realizado uma segunda simulação a fim de reduzir um os efeitos de agrupamento das moléculas de hormônio antes da complexação. Essas simulações consistiram em uma espécie de titulação, a cada 200 mil ciclos de simulação eram acrescentadas duas moléculas de hormônio ao sistema, até um total de 8 moléculas. Os frames finais, após 800 mil ciclos de simulação, estão representados na Figura 11g-l.

Para os modelos onde as moléculas de MT foram adicionadas aos pares, é observado a ocorrência de complexação em todas as simulações avaliadas. A preferência pelo sítio ao qual a complexação vai acontecer, e a molécula de hormônio vai ficar retida, parece depender da possibilidade de chocar-se com uma das faces da superfície funcionalizada e também da densidade de CDs.

Para o hormônio com parâmetros de polaridade uniforme (MT1), a preferência na complexação se deu para a face contendo menor quantidade de bCD e para o modelo não uniforme (MTh2), a preferência é para a parte da superfície mais densa e, ao estar todas as CDs da face mais densa proporcionalmente com MT e bCD na razão molar de 1:2, a complexação passa a ocorrer pela face menos densa.

Essa modelagem para sistemas de complexação em CDs, utilizando os modelos “coarse-grain”, ainda está em desenvolvimento. Apesar do grande volume de trabalho e consideráveis avanços, o modelo ainda não está consolidado, pois existe certa incoerência que dificulta explicar e definir, de maneira precisa, os fatores responsáveis pela melhor simulação, e que coincida com os dados experimentais. Um bom modelo deve ser confiável para reproduzir ou aproximar-se de resultados experimentais, além de ter uma boa repetibilidade.

## **Conclusão**

Neste trabalho foram realizadas tentativas para o desenvolvimento de um modelo mesoscópico para a molécula de MT conjuntamente à avaliação dos parâmetros de repulsão

com as CDs, estudado com dinâmica de partículas dissipativas (DPD). As simulações mostram que as forças hidrofóbicas, e/ou de repulsão, impulsionam as interações entre o hormônio e as CDs. Os desenhos de experimentos realizados contribuíram para a avaliação de que, o modelo *coarse-grain* para as moléculas de MT e os parâmetros de hidrofobicidade, hormônio/cavidade/exterior, são os fatores chave para a complexação. Um modelo para a gCD conseguiu simular a complexação a valores próximos do experimental, no entanto, um modelo representativo deveria funcionar para as demais CDs, e isso não ocorre. Há ainda detalhes para serem trabalhados, a complexação da MT em bCD ocorre na razão molar de 1:2, mas nas simulações DPD, esse percentual ainda não é alcançado. Dependendo dos parâmetros utilizados, ou os modelos de *beads* tendem a se enganchar ou a aproximação face a face pelos modelos é dificultada. As simulações em meio heterogêneo indicam que as bCDs buscam uma orientação do tipo tubular sob a superfície da sílica, e as moléculas complexadas às CDs funcionalizadas permanecem presas à estrutura híbrida. A complexação entre as faces híbridas, mais ou menos densa, parecem inicialmente estar relacionada com a probabilidade de colisão, e em seguida à aglomeração com as regiões mais hidrofóbicas. Os resultados detalham avanços para essa modelagem, que poderá ser útil para estudos em escala mesoscópica com esse tipo de esteroide, ou demais compostos a serem inclusos com CDs, no entanto carece de mais investigações para a concretização de um modelo representativo para todas as CDs.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem à FAPEMIG pelo suporte financeiro (projeto CBB-BDS-00284-15).

## REFERÊNCIAS

- BREWSTER, M. E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Advanced drug delivery reviews**, v. 59, n. 7, p. 645-666, 2007.
- ESPAÑOL, P. Dissipative particle dynamics. **Handbook of Materials Modeling**, p. 2503-2512, 2005.
- ESPAÑOL, P.; WARREN, P. Statistical mechanics of dissipative particle dynamics. **EPL (Europhysics Letters)**, v. 30, n. 4, p. 191, 1995.
- FERRÉ, J. I qualimetria, Grup de Quimiometria. El disseny factorial complet  $2^k$ . 2004. Disponível em: <http://www.quimica.urv.es/quimio/general/doecat.pdf>. Acessado em 29 de dezembro de 2017.
- GROOT, R. D.; WARREN, P. B. Dissipative particle dynamics: Bridging the gap between atomistic and mesoscopic simulation. **The Journal of chemical physics**, v. 107, n. 11, p. 4423-4435, 1997.
- GUEDES-ALONSO, R.; SOSA-FERRERA, Z.; SANTANA-RODRÍGUEZ, J. J. Determination Of Steroid Hormones In Fish Tissues By Microwave-Assisted Extraction Coupled To Ultra-High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. **Food Chemistry**, v. 237, p. 1012-1020, 2017.
- HU, X. et al. Adsorption and heterogeneous Fenton degradation of  $17\alpha$ -methyltestosterone on nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/MWCNTs in aqueous solution. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 107, n. 3, p. 274-283, 2011.
- HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: visual molecular dynamics. **Journal of molecular graphics**, v. 14, n. 1, p. 33-38, 1996.
- KRANENBURG, M.; SMIT, B. Simulating the effect of alcohol on the structure of a membrane. **FEBS letters**, v. 568, n. 1-3, p. 15-18, 2004.

MEYER et al. Molecular simulation of the effect of cholesterol on lipid-mediated protein-protein interactions. **Biophysical journal**, v. 99, n. 11, p. 3629-3638, 2010.

MLALILA, N. et al. Human food safety and environmental hazards associated with the use of methyltestosterone and other steroids in production of all-male tilapia. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 7, p. 4922-4931, 2015.

PI, R. Disseny d'experiments: una eina útil al món químic. Text complementari del curs "Experimental design: practical application to processes, products and formulations", 1993.

SHIH, A. Y. et al. Coarse grained protein-lipid model with application to lipoprotein particles. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 8, p. 3674-3684, 2006.

SZEJTLI, J. **Cyclodextrin technology**. Springer Science & Business Media, 2013.

WIJMANS, C. M.; SMIT, B. Simulating tethered polymer layers in shear flow with the dissipative particle dynamics technique. **Macromolecules**, v. 35, n. 18, p. 7138-7148, 2002.