

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos  
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**Desenvolvimento, caracterização e avaliação da formação de  
complexos de inclusão de rutina, avobenzona e  $\rho$ -  
metoxicinamato de octila na presença de ciclodextrinas**

Tércio Elyan Azevedo Martins

Tese para obtenção do grau de  
DOUTOR

Orientador:

Prof. Assoc. André Rolim Baby

São Paulo

2018

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos  
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**Desenvolvimento, caracterização e avaliação da formação de  
complexos de inclusão de rutina, avobenzona e  $\rho$ -  
metoxicinamato de octila na presença de ciclodextrinas**

Tércio Elyan Azevedo Martins

Tese para obtenção do grau de  
DOUTOR

Orientador:

Prof. Assoc. André Rolim Baby

São Paulo

2018

**Ficha Catalográfica**  
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e  
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:  
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

Martins, Tércio Elyan Azevedo  
M386d Desenvolvimento, caracterização e avaliação de complexos de  
inclusão rutina, avobenzona e  $\rho$ - metoxicinamato de octila na  
presença de ciclodextrinas / Tércio Elyan Azevedo Martins. --  
São Paulo, 2018.  
97p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da  
Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia  
Orientador: Baby, André Rolim

1. Filtro solar : cosméticos : tecnologia I. T. II. Baby,  
André Rolim, orientador.

668.55 CDD

Tércio Elyan Azevedo Martins

**Desenvolvimento, caracterização e avaliação de complexos de inclusão  
rutina, avobenzona e  $p$ -metoxicinamato de octila na presença de  
ciclodextrinas**

Comissão Julgadora  
da  
Tese para obtenção do grau de Doutor

---

Prof. Assoc. André Rolim Baby  
Orientador/presidente

---

1º. Examinador

---

2º. Examinador

---

3º. Examinador

---

4º. Examinador

São Paulo, \_\_\_\_\_ de 2018.

*Ao meu marido, amigo e companheiro,  
Marcos*

*Ao meu filho de quatro patas,  
Gucci,*

*Aos meus pais,  
Egber e Madalena,*

*Às minhas irmãs,  
Izabel e Bruna,*

*Aos meus sobrinhos,  
Maria Eduarda e Eric*

## Agradecimentos

*Ao meu orientador Prof. Assoc. André Rolim Baby.*

*À Prof<sup>ª</sup>. Dra. Letícia Carpentieri.*

*Ao Prof. Assoc. Humberto Gomes Ferraz.*

*À Prof.<sup>a</sup> Assoc.<sup>a</sup>. Nádia Araci Bou Chacra.*

*À Prof<sup>ª</sup>. Assoc.<sup>a</sup>. Maria Valéria Robles Velasco*

*À amiga Dr.<sup>a</sup> Claudinéia Aparecida Sales de Oliveira Pinto por toda ajuda, palavras de incentivo e orientações.*

*Às professoras, Dr.<sup>a</sup> Michele Georges Issa e Dr.<sup>a</sup> Vânia Rodrigues Leite e Silva, pelas valiosas contribuições durante o exame de qualificação.*

*À Marina Mancini.*

*Aos colegas de laboratório de cosmetologia Alessandra Mari Goshiyama, Mirela Cardoso Garcia, Rafael Sauce Silva, Thamires Batello Freire, Thalita M. Candido, Paulo Vitor Gonçalves, André Luis Máximo Daneluti e Michelle Dario.*

*Aos técnicos de laboratório Claudinéia Aparecida Sales de Oliveira Pinto e Edgar M. Machado Júnior*

*À Doralice Rita de Jesus Santos.*

*À Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP.*

*À CAPES pela concessão da bolsa de auxílio à pesquisa.*

*À todos que colaboraram para realização deste trabalho.*

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS .....	ix
LISTA DE TABELAS .....	xii
LISTA DE EQUAÇÕES .....	xiv
LISTA DE FIGURAS .....	xvi

### CAPÍTULO 1. Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação simultânea de rutina (RUT), avobenzona (BMBM) e $\rho$ -metoxicinamato de octila (EHMC) na presença de CDs por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) .....

1. INTRODUÇÃO .....	02
2. OBJETIVO .....	04
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	04
3.1 MATERIAL E REAGENTES .....	04
3.2 INSTRUMENTOS .....	04
3.2.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE FASE REVERSA .....	04
3.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES-PADRÃO (RUT, BMBM e EHMC) .....	05
3.4 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA .....	05
3.4.1 SELETIVIDADE .....	05
3.4.2 LINEARIDADE E FAIXA DE APLICAÇÃO .....	05
3.4.3 PRECISÃO .....	06
3.4.4 EXATIDÃO .....	06
3.4.5 LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ) .....	06
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	06
4.1 SELETIVIDADE .....	06
4.2 LINEARIDADE E FAIXA DE APLICAÇÃO .....	11
4.3 PRECISÃO (REPETIBILIDADE) .....	15
4.4 EXATIDÃO .....	15
4.5 LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ) .....	16
5. CONCLUSÕES .....	16
6. REFERÊNCIAS .....	17

### CAPÍTULO 2. Obtenção e caracterização de complexos de inclusão binários da rutina (RUT) e ciclodextrinas (HP $\beta$ CD e SBE $\beta$ CD) ...

1. INTRODUÇÃO .....	23
2. OBJETIVO .....	25
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	25
3.1 MATERIAL .....	25
3.2 MÉTODOS .....	26
3.2.1 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS .....	26
3.2.2 OBTEÇÃO DOS SISTEMAS BINÁRIOS RUT:CD .....	26
3.2.3 CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS BINÁRIOS RUT:CD (HP $\beta$ CD e SBE $\beta$ CD) .....	26
3.2.3.1 CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS BINÁRIOS “EM SOLUÇÃO” ...	26
3.2.3.1.1 ENSAIO DE SOLUBILIDADE .....	26
3.2.3.1.2 ENSAIO DE SOLUBILIDADE DE FASES .....	27
3.2.3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS BINÁRIOS “NO ESTADO SÓLIDO” .....	27
3.2.3.2.1 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC) ...	27
3.2.3.2.2 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TG/DTG) .....	27
3.2.3.2.3 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X DE PÓ (P-DRX) .....	28
3.2.3.3 ENSAIO DE FOTOESTABILIDADE .....	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	28
5. CONCLUSÕES .....	43
6. REFERÊNCIAS .....	44

<b>CAPÍTULO 3. Obtenção e caracterização de complexos de inclusão binários da avobenzona (BMBM) e ciclodextrinas (HP<math>\beta</math>CD e SBE<math>\beta</math>CD)</b> .....	<b>49</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>50</b>
<b>2. OBJETIVO</b> .....	<b>52</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>53</b>
3.1 MATERIAL .....	53
3.2 MÉTODOS.....	53
3.2.1 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	53
3.2.2 OBTEÇÃO DOS SISTEMAS BINÁRIOS BMBM:CD .....	53
3.2.3 CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS BINÁRIOS BMBM:CD (HP $\beta$ CD e SBE $\beta$ CD) .....	53
3.2.3.1 CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS BINÁRIOS “EM SOLUÇÃO” ...	54
3.2.3.1.1 ENSAIO DE SOLUBILIDADE .....	54
3.2.3.1.2 ENSAIO DE SOLUBILIDADE DE FASES .....	54
3.2.3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS BINÁRIOS NO ESTADO SÓLIDO”” .....	54
3.2.3.2.1 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC) ...	54
3.2.3.2.2 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TG/DTG) .....	54
3.2.3.2.2 DIFRAÇÃO DE RAIOS X DE PÓ.....	55
3.2.3.3 ENSAIO DE FOTOESTABILIDADE .....	55
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>55</b>
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	<b>68</b>
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>68</b>

<b>CAPÍTULO 4. Obtenção e caracterização de complexos de inclusão binários da p-metoxicinamato de octila (EHMC) e ciclodextrinas (HP<math>\beta</math>CD e SBE<math>\beta</math>CD)</b> .....	<b>73</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>74</b>
<b>2. OBJETIVO</b> .....	<b>76</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>76</b>
3.1 MATERIAL .....	76
3.2 MÉTODOS.....	76
3.2.1 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	76
3.2.2 OBTEÇÃO DOS SISTEMAS BINÁRIOS EHMC:CD.....	77
3.2.3 CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS BINÁRIOS EHMC:CD (HP $\beta$ CD e SBE $\beta$ CD) .....	77
3.2.3.1 CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS BINÁRIOS “EM SOLUÇÃO” ...	77
3.2.3.1.1 ENSAIO DE SOLUBILIDADE .....	77
3.2.3.1.2 ENSAIO DE SOLUBILIDADE DE FASES .....	77
3.2.3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS BINÁRIOS “NO ESTADO SÓLIDO”” .....	78
3.2.3.2.1 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC) ...	78
3.2.3.2.2 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TG/DTG) .....	78
3.2.3.2.3 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X DE PÓ (P-DRX).....	78
3.2.3.3 ENSAIO DE FOTOESTABILIDADE .....	78
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>79</b>
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	<b>92</b>
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>92</b>



## RESUMO

MARTINS, T. E. A. **Desenvolvimento, caracterização e avaliação da formação de complexos de inclusão entre rutina, avobenzona e  $\rho$ -metoxicinamato de octila na presença de ciclodextrinas.** 2018. 97f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A radiação UV pode causar danos à pele humana, e, evitar estes danos, é uma preocupação crescente para a população e um desafio à comunidade científica. Para uma ação efetiva de fotoproteção, a associação de filtros, como avobenzona (BMBM) e  $\rho$ -metoxicinamato de octila (EHMC), são empregados. Devido à semelhança estrutural com os filtros solares químicos, a rutina (RUT), tal como outros flavonoides, apresenta atividade fotoprotetora. Apesar da disponibilidade de diferentes classes de filtros solares, o desenvolvimento de fotoprotetores contendo filtros químicos é um desafio, devido à instabilidade inerente a certos filtros orgânicos. As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos, de formato tronco-cônico, cuja estrutura externa é hidrófila e sua cavidade interna central hidrofóbica, com a capacidade de acomodar substâncias lipofílicas, formando complexos de inclusão. A formação dos complexos de inclusão pode levar à alterações de propriedades físico-químicas da molécula hóspede, tais como, solubilidade, fotoestabilidade e biodisponibilidade. O objetivo deste trabalho foi desenvolver, caracterizar e avaliar a formação de complexos de inclusão entre RUT, BMBM e EHMC e as CDs (HP $\beta$ CD e SBE $\beta$ CD). Os complexos de inclusão (RUT:HP $\beta$ CD, RUT:SBE $\beta$ CD, BMBM:HP $\beta$ CD, BMBM:SBE $\beta$ CD, EHMC:HP $\beta$ CD e EHMC:SBE $\beta$ CD) foram obtidos pelo método de liofilização e quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os sistemas binários foram caracterizados em solução, pelo método de equilíbrio de solubilidade, e, no estado sólido, empregando calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria (TG/DTG) e difração de raios-X de pó (P-DRX). As substâncias isoladas e os complexos binários foram avaliados quanto à fotoestabilidade em estado sólido, e, em solução. Incremento na solubilidade (X mcg mL<sup>-1</sup>) foi observado para os complexo RUT:HP $\beta$ CD (4,13x); RUT:SBE $\beta$ CD (4,38x); BMBM:HP $\beta$ CD (43,3x); BMBM:SBE $\beta$ CD (53,3x); EHMC:HP $\beta$ CD (12,7x); e EHMC:SBE $\beta$ CD (70,0x). Os ensaios de DSC, TG/DTG, e P-DRX indicaram a formação de complexos de inclusão para os todos os sistemas, onde a supressão dos eventos endotérmicos característicos das substâncias isoladas foram observados; porém, nos complexos de BMBM, a presença de avobenzona livre no meio foi detectada, sugerindo, que a complexação não foi completa. A formação dos complexos de inclusão promoveu o aumento da fotoestabilidade em todos os sistemas avaliados, tanto no estado sólido, como em solução. Os resultados reportados neste estudo, indicaram que a complexação de substâncias fotoprotetoras com HP $\beta$ CD e SBE $\beta$ CD, pode representar, uma estratégia promissora quanto ao aumento da solubilidade e da fotoestabilidade.

**Palavras-chave:** ciclodextrina, rutina, avobenzona,  $\rho$ -metoxicinamato de octila, fotoestabilidade, complexo de inclusão, DSC, TG, DTG, P-DRX.

## ABSTRACT

MARTINS, T. E. A. **Development, characterization and evaluation of inclusion complexes between rutin, avobenzone and octyl p-methoxycinnamate with cyclodextrins.** 2018. 97p. Thesis (Doctoral Degree) – School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, 2018.

UV radiation may cause damage on human skin, and preventing it, is an increasing worry for the population and a challenge to the scientific community. For an effective action of photoprotection, the association of filters, like avobention (BMBM) and octyl p-methoxycinnamate (EHMC), are used. Due to the structural similarity with the chemical solar filters, the rutin (RUT), like other flavonoids, shows photoprotective activity. Despite the availability of different classes of sunscreens, the development of photoprotectors containing chemical filters is a challenge, due to the inherent instability of certain organic filters. The cyclodextrins (CD) are cyclic oligosaccharides of truncated conical structure, which external structure is hydrophilic and its internal central hydrophobic cavity, with capacity to accommodate lipophilic substances, forming inclusion complexes. The formation of the inclusion complexes can lead to changes in physical-chemical properties of the host molecule, such as, solubility, photostability and bioavailability. The objective of this work was to develop, characterize and evaluate the formation of the inclusion complexes between RUT, BMBM and EHMC and the CDs (HP $\beta$ CD and SBE $\beta$ CD). The inclusion complexes (RUT:HP $\beta$ CD, RUT:SBE $\beta$ CD, BMBM:HP $\beta$ CD, BMBM:SBE $\beta$ CD, EHMC:HP $\beta$ CD and EHMC:SBE $\beta$ CD) were obtained by the lyophilization method and quantified by high performance liquid chromatography (HPLC). The binary systems were characterized in solution, by solubility equilibrium method and in solid state, using differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetry (TG/DTG) and powder X-ray diffraction (P-XRD). The isolated substances and binary complexes were evaluated the photostability in solid state, and in solution. The increase in solubility (X mcg mL<sup>-1</sup>) was observed for the complexes RUT:HP $\beta$ CD (4.13x); RUT:SBE $\beta$ CD (4.38x); BMBM:HP $\beta$ CD (43.3x); BMBM:SBE $\beta$ CD (53.3x); EHMC:HP $\beta$ CD (12.7x); and EHMC:SBE $\beta$ CD (70.0x). The analysis of DSC, TG/DTG, and P-DRX indicated the formation of inclusion complexes for all systems, where the suppression of the endothermic events characteristic of the isolated substances were observed; however, in the BMBM complexes, the presence of free avobenzone was detected, suggesting that the complexation was not complete. The formation of inclusion complexes promoted the increase of photostability in all evaluated systems, as in solid state as in solution. The results reported in this study indicated that the complexation of photoprotective substances with (HP $\beta$ CD e SBE $\beta$ CD). may represent a promising strategy for increasing solubility and photostability.

**Key words:** cyclodextrin, rutin, avobenzone, octyl p-methoxycinnamate, photostability, inclusion complex, DSC, TG, DTG, P-DRX.

**LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS**

[CD] Concentração de ciclodextrina

[CD]<sub>mM</sub> Concentração de ciclodextrina em milimolar

[F/CD] Concentração do complexo dissolvido

°C Grau Celsius

<sup>1</sup>H Deutério

2θ 2 Teta

A Ampere

Abs Absorbância

A<sub>L</sub> Complexo de inclusão de primeira ordem

BMBM Butyl methoxydibenzoylmethane

CB BMBM:HPβCD - Complexo binário avobenzona:hidroxipropil-beta-ciclodextrina

CB BMBM:SBEβCD - Complexo binário avobenzona:sulfobutil-eter-beta-ciclodextrina

CB EHMC:HPβCD - Complexo binário *p*-metoxicinamato de octila:hidroxipropil-beta-ciclodextrina

CB EHMC:SBEβCD - Complexo binário *p*-metoxicinamato de octila:sulfobutil-eter-beta-ciclodextrina

CB RUT:HPβCD - Complexo binário rutina:hidroxipropil-beta-ciclodextrina

CB RUT:SBEβCD - Complexo binário rutina:sulfobutil-eter-beta-ciclodextrina

CDs - Ciclodextrinas

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

*d* - Deslocamento químico

Da. - Daltons

DSC - Calorimetria exploratória diferencial

DTG<sub>pico</sub> – Início da inflexão do pico da DTG

EC - Eficiência de complexação

EHMC - ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE

FPS - Fator de Proteção Solar

g – Grama

GL – Porcentagem em volume

HP $\beta$ CD - hidroxipropil-beta-ciclodextrina  
ICH - International Conference on Harmonization  
IS - Incremento de solubilidade  
J - Joule  
k' - Fator de retenção  
K<sub>c</sub> - Constante de estabilidade  
KV Quilovolt  
l<sub>c</sub> - Comprimento de onda crítico  
LD - Limite de Detecção  
LQ - Limite de Quantificação  
mA – Miliamperagem  
mbar – Milibar  
MF BMBM:HP $\beta$ CD - Mistura física avobenzona:hidroxipropil-beta-ciclodextrina  
MF BMBM:SBE $\beta$ CD- Mistura física avobenzona:sulfobutil-éter-beta-ciclodextrina  
MF EHMC:HP $\beta$ CD - Mistura física *p*-metoxicinamato de octila:hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina  
MF EHMC:SBE $\beta$ CD- Mistura física *p*-metoxicinamato de octila:sulfobutil-eter- $\beta$ -ciclodextrina  
MF RUT:HP $\beta$ CD - Mistura física rutina:hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina  
MF RUT:SBE $\beta$ CD- Mistura física rutina:sulfobutil-eter- $\beta$ -ciclodextrina  
mg – Miligramas  
min – Minuto  
mL - Mililitro  
mm – Milímetro  
n - Frequência de radiação absorvida  
N - Número de pratos teóricos  
nm – Nanômetro  
P-DRX - Difração de Raios X de Pó  
r - Coeficiente de correlação  
R – Resolução  
R<sup>2</sup> - Coeficiente de correlação  
RM - Razão molar  
RMN - Ressonância Magnética Nuclear

RM $\beta$ CD - Randomly-methylated-beta-ciclodextrina  
RUT – RUTINA  
RUT:CD - Rutina:ciclodextrina  
RUT:HP $\beta$ CD - Rutina:hidroxipropil-beta-ciclodextrina  
RUT:SBE $\beta$ CD - Rutina:sulfobutil-eter-beta-ciclodextrina  
S - Inclinação da linha de regressão linear (coeficiente angular)  
S<sub>0</sub> - Solubilidade intrínseca  
SBE $\beta$ CD - Sulfobutil-eter-beta-ciclodextrina  
S<sub>int</sub> - Solubilidade do intercepto  
T<sub>fusão</sub> – Temperatura de fusão  
TG - Termogravimetria  
TG/DTG - Termogravimetria/termogravimetria derivada  
T<sub>onset</sub> – Temperatura de início de perda de massa  
T<sub>pico</sub> – Temperatura do pico  
t<sub>r</sub> - Tempo de retenção em minutos  
UV – Ultra violeta  
UVA - Utra violeta A  
UVB - Utra violeta B  
v/v - Volume/volume  
W - Largura do pico em centímetros  
 $\alpha$  - Fator de seletividade  
 $\alpha$ CD - Alfa-ciclodextrina  
 $\beta$ CD - Beta-ciclodextrina  
 $\gamma$ CD - Gama-ciclodextrina  
 $\Delta H$  - Entalpia  
 $\Delta H_{fusão}$  - Entalpia de fusão  
 $\Delta_m$  – Variação de massa  
 $\mu g$  – Micrograma  
 $\mu L$  – Microlitro  
 $\mu m$  – Micrometro  
 $\sigma$  - Desvio padrão da intercepção (coeficiente linear)

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1. Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação simultânea de rutina (RUT), avobenzona (BMBM) e $\rho$ -metoxicinamato de octila (EHMC) na presença de CDs por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

<b>Tabela 1.</b>	Valores médios dos parâmetros cromatográficos ( $t_m$ , $t_r$ , $W$ , $k'$ , $\alpha$ e $R$ ) .....	07
<b>Tabela 2.</b>	Parâmetros de regressão linear obtidos a partir das curvas $1/k'$ versus $[CD]_{mM}$ . .....	11
<b>Tabela 3.</b>	Parâmetros de regressão linear obtidos a partir das curvas analíticas da RUT, BMBM e EHMC .....	14
<b>Tabela 4.</b>	Valores de precisão intermediária média e desvio padrão relativo (%)Valores de precisão intermediária média e desvio padrão relativo (%).....	15
<b>Tabela 5.</b>	Valores médios de Limite de Determinação (LD) e Limite de Quantificação (LQ) para as substâncias RUT, BMBM e EHMC na ausência presença das CDs. ....	16

### CAPÍTULO 2. Obtenção e caracterização de complexos de inclusão binários da rutina (RUT) e ciclodextrinas (HP $\beta$ CD e SBE $\beta$ CD)

<b>Tabela 1.</b>	Valores de solubilidade intrínseca ( $S_0$ ) da rutina (RUT), solubilidade do intercepto ( $S_{int}$ ), coeficiente angular e coeficiente de determinação ( $R^2$ ). .....	30
<b>Tabela 2.</b>	Valores de constante de estabilidade ( $k_c$ ), eficiência de complexação (EC) e incremento de solubilidade (IS). .....	32
<b>Tabela 3.</b>	Dados termodinâmicos obtidos a partir das curvas DSC e TG/DTG da RUT, CDs (HP $\beta$ CD e SBE $\beta$ CD), misturas físicas (MF RUT:CD) e complexos de inclusão (CB RUT:CD).....	35

### CAPÍTULO 3. Obtenção e caracterização de complexos de inclusão binários da avobenzona (BMBM) e ciclodextrinas (HP $\beta$ CD e SBE $\beta$ CD)

<b>Tabela 1.</b>	Valores de solubilidade intrínseca ( $S_0$ ) da avobenzona (BMBM), solubilidade do intercepto ( $S_{int}$ ), coeficiente angular e coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtidos a partir dos diagramas de solubilidade de fases dos sistemas binários CB BMBM:SBE $\beta$ CD e CB BMBM:HP $\beta$ CD. ....	57
<b>Tabela 2.</b>	Constante de estabilidade ( $k_c$ ), eficiência de complexação (EC) e razão molar de complexação (BMBM:CD) calculadas à partir dos diagramas de solubilidade de fases para os sistemas binários CB BMBM:SBE $\beta$ CD e CB BMBM:HP $\beta$ CD. ....	59

<b>Tabela 3.</b>	Valores de solubilidade da avobenzona (BMBM) e dos sistemas binários obtidos por liofilização (CB BMBM:HP $\beta$ CD e CB BMBM:SBE $\beta$ CD) em mg mL <sup>-1</sup> , mM e valores de incremento de solubilidade (IS) obtido nos sistemas.....	60
<b>Tabela 4.</b>	Dados termodinâmicos obtidos a partir das curvas DSC e TG/DTG da BMBM, CDs (HP $\beta$ CD e SBE $\beta$ CD), misturas físicas (MF BMBM:CD) e complexos de inclusão (CB BMBM:CD).....	61

#### **CAPÍTULO 4. Obtenção e caracterização de complexos de inclusão binários da $\rho$ -metoxicinamato de octila (EHMC) e ciclodextrinas (HP $\beta$ CD e SBE $\beta$ CD)**

<b>Tabela 1.</b>	Valores de solubilidade intrínseca ( $S_0$ ) do $\rho$ -metoxicinamato de octila (EHMC), solubilidade do intercepto ( $S_{int}$ ), coeficiente angular e coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtidos a partir dos diagramas de solubilidade de fases dos sistemas binários.....	80
<b>Tabela 2.</b>	Valores de constante de estabilidade ( $k_c$ ), eficiência de complexação (EC) e razão molar de complexação (EHMC:CD) calculadas à partir dos diagramas de solubilidade de fases para os sistemas binários CB EHMC:SBE $\beta$ CD e CB EHMC:HP $\beta$ CD.....	82
<b>Tabela 3.</b>	Valores de solubilidade da $\rho$ -metoxicinamato de octila (EHMC) e dos complexos binários obtidos por liofilização (CB EHMC:HP $\beta$ CD e CB EHMC:SBE $\beta$ CD) em mg mL <sup>-1</sup> , mM e valores de incremento de solubilidade (IS) obtido nos sistemas binários.....	83
<b>Tabela 4.</b>	Dados termodinâmicos obtidos a partir das curvas DSC e TG/DTG do EHMC, CDs (HP $\beta$ CD e SBE $\beta$ CD), misturas físicas (MF EHMC:CD) e complexos de inclusão (CB EHMC:CD).....	85

## LISTA DE EQUAÇÕES

<b>CAPÍTULO 1. Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação simultânea de rutina (RUT), avobenzona (BMBM) e <math>\rho</math>-metoxicinamato de octila (EHMC) na presença de CDs por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)</b>	
<b>Equação 1.</b>	Cálculo do Limite de Detecção .....06
<b>Equação 2.</b>	Cálculo do Limite de Quantificação .....06
<b>CAPÍTULO 2. Obtenção e caracterização de complexos de inclusão binários da rutina (RUT) e ciclodextrinas (HP<math>\beta</math>CD e SBE<math>\beta</math>CD)</b>	
<b>Equação 1:</b>	Cálculo da Constante de Estabilidade ( $K_c$ ).....30
<b>Equação 2:</b>	Cálculo da Eficiência de Complexação (EC).....31
<b>Equação 3:</b>	Cálculo da Razão Molar (RM) entre a substância hóspede e a ciclodextrina (CD). .....31
<b>CAPÍTULO 3. Obtenção e caracterização de complexos de inclusão binários da avobenzona (BMBM) e ciclodextrinas (HP<math>\beta</math>CD e SBE<math>\beta</math>CD)</b>	
<b>Equação 1:</b>	Cálculo da Constante de Estabilidade ( $K_c$ ).....58
<b>Equação 2:</b>	Cálculo da Eficiência de Complexação (EC).....58
<b>Equação 3:</b>	Cálculo da Razão Molar (RM) entre a substância hóspede e a ciclodextrina (CD). .....58
<b>CAPÍTULO 4. Obtenção e caracterização de complexos de inclusão binários da <math>\rho</math>-metoxicinamato de octila (EHMC) e ciclodextrinas (HP<math>\beta</math>CD e SBE<math>\beta</math>CD)</b>	
<b>Equação 1:</b>	Cálculo da Constante de Estabilidade ( $K_c$ ).....81



<b>Equação 2:</b> Cálculo da Eficiência de Complexação (EC).....	81
<b>Equação 3:</b> Cálculo da Razão Molar (RM) entre a substância hóspede e a ciclodextrina (CD).....	82

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1. Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação simultânea de rutina (RUT), avobenzona (BMBM) e *p*-metoxicinamato de octila (EHMC) na presença de CDs por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

- Figura 1.** Cromatograma da RUT, BMBM e EHMC (64,0 µg mL<sup>-1</sup>) obtido empregando coluna cromatográfica Kromazil® RP C18 (100 Å, 5µm, 250x4,6mm) e fluxo 0,8 mL min<sup>-1</sup>.....07
- Figura 2.** Dependência do fator de retenção (*k'*) em função da concentração das CDs (HPβCD ou SBEβCD) na Fase Móvel metanol-água (88:12, v/v) a 25 °C. ....09
- Figura 3.** Curva analítica média da RUT, BMBM e EHMC obtidas, simultaneamente, no intervalo de 2,0 a 64,0 µg mL<sup>-1</sup> (n=3). ....12
- Figura 4.** Representação gráfico dos resíduos *versus* valores ajustados a um nível de significância de 5%.....12

### CAPÍTULO 2. Obtenção e caracterização de complexos de inclusão binários da rutina (RUT) e ciclodextrinas (HPβCD e SBEβCD)

- Figura 1.** Estrutura química da rutina. Fonte: BABY *et al.*, 2008b .....23
- Figura 2.** Estrutura química da α-CD, β-CD e γ-CD. Fonte: MARTINS, 2008. ....24
- Figura 3.** Diagrama de solubilidade de fases da RUT na presença de concentrações de HPβCD e SBEβCD (2,0 – 80,0 µg mL<sup>-1</sup>) .....29
- Figura 4.** Curva DSC, DTA e TG/DTG da rutina obtidos sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (100,0 mL min<sup>-1</sup>) e razão de aquecimento de 10,0 °C min<sup>-1</sup> .....34
- Figura 5.** Curvas DSC da rutina (RUT), ciclodextrina (HPβCD), misturas físicas 1:1 (p/p) (MF RUT:HPβCD) e complexo de inclusão (CB RUT:HPβCD), obtidos sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (100,0 mL min<sup>-1</sup>) e razão de aquecimento de 10,0 °C min<sup>-1</sup> .....36
- Figura 6.** Curva TG/DTG da rutina (RUT), ciclodextrinas (HPβCD), mistura física 1:1 (p/p) (MF RUT:HPβCD) e complexo de inclusão (CB RUT:HPβCD), obtidas sob atmosfera dinâmica de nitrogênio e razão de aquecimento 10,0 °C.min<sup>-1</sup> .....37
- Figura 7.** Curvas DSC da rutina (RUT), ciclodextrina (SBEβCD), misturas físicas 1:1 (p/p) (MF RUT:SBE-βCD) e complexo de inclusão (RUT:SBEβCD), obtidos sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (100,0 mL.min<sup>-1</sup>) e razão de aquecimento de 10,0 °C min<sup>-1</sup> .....38

<b>Figura 8.</b>	Curva TG/DTG da rutina (RUT), ciclodextrina (SBE $\beta$ CD), mistura física 1:1 (MF RUT:SBE $\beta$ CD) e complexo de inclusão (CB RUT:SBE $\beta$ CD), obtidas sob atmosfera dinâmica de N <sub>2</sub> e razão de aquecimento 10,0 °C.min <sup>-1</sup> .....	39
<b>Figura 9.</b>	Difratogramas obtidos para a rutina (RUT), mistura física 1:1 (p/p) (MF RUT:HP $\beta$ CD) e sistema binário (CB RUT:HP $\beta$ CD) obtidos a 40 KV e 40 mA, com velocidade de varredura de 2° min <sup>-1</sup> (2 theta) .....	41
<b>Figura 10.</b>	Difratogramas obtidos para a rutina (RUT), mistura física (MF RUT:SBE $\beta$ CD) e sistema binário (CB RUT:SBE $\beta$ CD) obtidos a 40 KV e 40 mA, com velocidade de varredura de 2° min <sup>-1</sup> (2 theta)....	42
<b>Figura 11.</b>	Degradação da rutina (RUT) e dos complexos binários (CB RUT:HP $\beta$ CD e CB RUT:SBE $\beta$ CD), no estado sólido e em solução, após radiação UV por um período de 168 horas.....	43

### **CAPÍTULO 3. Obtenção e caracterização de complexos de inclusão binários da avobenzona (BMBM) e ciclodextrinas (HP $\beta$ CD e SBE $\beta$ CD)**

<b>Figura 1.</b>	Estrutura química da molécula da BMBM na forma cetônica e enólica. Adaptado de MTURI & MARTINCIGH, 2008.....	51
<b>Figura 2.</b>	Estrutura da $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD) com representações de suas dimensões e a posição dos grupos hidroxílicos. Fonte: MARTINS, 2008.....	52
<b>Figura 3.</b>	Diagrama de solubilidade de fases da BMBM em água purificada em concentrações de HP $\beta$ CD e SBE $\beta$ CD (2,0 – 80,0 $\mu$ g mL <sup>-1</sup> ) .....	57
<b>Figura 4.</b>	Curvas DSC da avobenzona (BMBM), ciclodextrina (HP $\beta$ CD), misturas físicas 1:1 (MF BMBM:HP $\beta$ CD) e sistemas binários 1:1 (CB BMBM:HP $\beta$ CD), obtidos sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (100 mL min <sup>-1</sup> ) e razão de aquecimento de 10°C min <sup>-1</sup> e rampa de aquecimento de 40 - 600°C .....	62
<b>Figura 5.</b>	Curva TG/DTG da avobenzona (BMBM), ciclodextrinas (HP $\beta$ CD), mistura física 1:1 (MF BMBM:HP $\beta$ CD) e complexo binário 1:1 (CB BMBM:HP $\beta$ CD), obtidas sob atmosfera dinâmica de N <sub>2</sub> e razão de aquecimento 10°C.min <sup>-1</sup> com rampa de aquecimento entre 40 e 900°C.....	63
<b>Figura 6.</b>	Curvas DSC da avobenzona (BMBM), ciclodextrina (SBE $\beta$ CD), misturas físicas 1:1 (MF BMBM:SBE $\beta$ CD) e sistemas binários 1:1 (CB BMBM:SBE $\beta$ CD), obtidos sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (100 mL min <sup>-1</sup> ) e razão de aquecimento de 10°C min <sup>-1</sup> e rampa de aquecimento de 40 - 600°C.. ..	64
<b>Figura 7.</b>	Curva TG/DTG da avobenzona (BMBM), ciclodextrina (SBE $\beta$ CD), mistura física 1:1 (MF BMBM:SBE $\beta$ CD) e sistema binário 1:1 (CB BMBM:SBE $\beta$ CD), obtidas sob atmosfera dinâmica de N <sub>2</sub> e razão de aquecimento 10°C.min <sup>-1</sup> com rampa de aquecimento entre 40 e 900°C.....	65

- Figura 8.** Difractogramas obtidos para a avobenzona (BMBM), mistura física (MF BMBM:HP $\beta$ CD 1:1) e complexo binário (CB BMBM:HP $\beta$ CD 1:1) obtidos por liofilização operando a 40 KV e 40 mA, com velocidade de varredura de 2° min<sup>-1</sup> (2 theta).....66
- Figura 9.** Difractogramas obtidos para a avobenzona (BMBM), mistura física (MF BMBM:SBE $\beta$ CD 1:1) e complexo binário (CB BMBM:SBE $\beta$ CD 1:1) obtidos por liofilização operando a 40 KV e 40 mA, com velocidade de varredura de 2° min<sup>-1</sup> (2 theta).....67
- Figura 10.** Degradação da avobenzona (BMBM) e dos complexos binários (CB BMBM:HP $\beta$ CD e CB BMBM:SBE $\beta$ CD), no estado sólido e em solução, após radiação UV por um período de 168 horas.....68

#### **CAPÍTULO 4. Obtenção e caracterização de complexos de inclusão binários da *p*-metoxicinamato de octila (EHMC) e ciclodextrinas (HP $\beta$ CD e SBE $\beta$ CD)**

- Figura 1.** Fórmula estrutural do *p*-metoxicinamato de octila (EHMC) adaptado de PATTANAARGSON e LIMPHONG, 2001.....74
- Figura 2.** Formação do complexo de inclusão. A: molécula da substância hóspede; B: ciclodextrina (CD); C: cavidade da ciclodextrina; D: moléculas de água; E: complex substância hóspede:CD. Fonte: MIRANDA *et al.*, 2011.....75
- Figura 3.** Diagrama de solubilidade de fases do *p*-metoxicinamato de octila (EHMC) na presença de concentrações de HP $\beta$ CD e SBE $\beta$ CD (2,0 – 80,0  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>).....80
- Figura 4.** Curva DSC do *p*-metoxicinamato de octila (EHMC) obtida sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (100 mL min<sup>-1</sup>) e razão de aquecimento de 10°C min<sup>-1</sup> e rampa de aquecimento de 40 - 600°C. Os termogramas TG e DTG do EHMC obtidas sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> e razão de aquecimento 10°C min<sup>-1</sup> com rampa de aquecimento entre 40 e 900°C.....84
- Figura 5.** Curvas DSC da *p*-metoxicinamato de octila (EHMC), ciclodextrina (HP $\beta$ CD), misturas físicas 1:1 (MF EHMC:HP $\beta$ CD) e sistema binário 1:1 (CB EHMC:HP $\beta$ CD), obtidos sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (100 mL min<sup>-1</sup>) e razão de aquecimento de 10°C min<sup>-1</sup> e rampa de aquecimento de 40 - 600°C.. .....86
- Figura 6.** Curva TG/DTG da *p*-metoxicinamato de octila (EHMC), ciclodextrina (HP $\beta$ CD), mistura física 1:1 (MF EHMC:HP $\beta$ CD) e complexo binário 1:1 (CB EHMC:HP $\beta$ CD), obtidas sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> e razão de aquecimento 10°C.min<sup>-1</sup> com rampa de aquecimento entre 40 e 900°C.....87
- Figura 7.** Curvas DSC da *p*-metoxicinamato de octila (EHMC), ciclodextrina (SBE $\beta$ CD), misturas físicas 1:1 (MF EHMC:SBE $\beta$ CD) e sistemas binários 1:1 (CB EHMC:SBE $\beta$ CD), obtidos sob atmosfera dinâmica de

- nitrogênio (100 mL min<sup>-1</sup>) e razão de aquecimento de 10°C min<sup>-1</sup> e  
rampa de aquecimento de 40 - 600°C.....88
- Figura 8.** Curva TG/DTG da *p*-metoxicinamato de octila (EHMC), ciclodextrina (SBEβCD), mistura física 1:1 (MF EHMC:SBEβCD) e sistema binário 1:1 (CB EHMC:SBEβCD), obtidas sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> e razão de aquecimento 10°C.min<sup>-1</sup> com rampa de aquecimento entre 40 e 900 °C.. .....89
- Figura 9.** Difractogramas obtidos para a *p*-metoxicinamato de octila (EHMC), mistura física (MF EHMC:HPβCD 1:1) e complexo binário (CB EHMC:HPβCD) obtidos por liofilização operando a 40 KV e 40 mA, com velocidade de varredura de 2° min<sup>-1</sup> (2 theta).....90
- Figura 10.** Difractogramas obtidos para o *p*-metoxicinamato de octila (EHMC), mistura física (MF EHMC:SBEβCD) e complexo binário (CB EHMC:SBEβCD) obtidos por liofilização operando a 40 KV e 40 mA, com velocidade de varredura de 2° min<sup>-1</sup> (2 theta).....91
- Figura 11.** Degradação do *p*-metoxicinamato de octila (EHMC) e dos complexos binários (CB EHMC:HPβCD e CB EHMC:SBEβCD), no estado sólido e em solução, após radiação UV por um período de 168 horas.. .....92

# Capítulo I

**Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação simultânea de rutina (RUT), avobenzona (BMBM) e  $\rho$ -metoxicinamato de octila (EHMC) na presença de CDs por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

---

---

## 1 INTRODUÇÃO

O conhecimento em expansão sobre os efeitos nocivos da radiação ultravioleta (UV) da luz solar (290-400 nm), incluindo eritema, fotoenvelhecimento cutâneo, imunossupressão e câncer de pele, promoveu o uso generalizado de preparações tópicas contendo filtrantes das radiações UV. Os constituintes ativos mais comuns nestes produtos são substâncias orgânicas que atenuam a transmissão da energia solar à pele, absorvendo a radiação mencionada (SIMEONI, SCALIA, BENSON, 2004). Uma característica essencial para a eficácia dos filtros UV é apresentar alta fotoestabilidade, uma vez que a decomposição induzida pela luz do agente protetor solar não só diminui sua capacidade de retenção das radiações UV, mas, também, pode gerar produtos de degradação de natureza tóxica. Ademais, uma vez que os filtros solares UV exercem seu efeito na superfície da pele, é necessário um alto grau de retenção dessas substâncias nas camadas superficiais da pele para obter maior efeito protetor e minimizar o risco toxicológico resultante da sua penetração percutânea (MAIER *et al.*, 2001). Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que certas substâncias com atividade protetora solar são absorvidas através de pele humana após aplicação tópica (POTARD *et al.*, 2000). Diante do exposto, é crescente a busca por novos sistemas capazes de reduzir a penetração dessas substâncias na pele.

Para uma ação efetiva de fotoproteção, pelo menos dois tipos de filtros químicos, que absorvem a radiação em diferentes regiões do espectro UV (UVA ou UVB), devem ser associados em um protetor solar, como a avobenzona (BMBM) e *p*-metoxicinamato de octila (EHMC), que são substâncias capazes de absorverem as radiações UVA e UVB, respectivamente (KAWAKAMI e GASPAR, 2015).

Algumas substâncias naturais favorecem a proteção dos filtros químicos contra a radiação UVA e UVB. A rutina (RUT) é um flavonoide empregado tradicionalmente como potente antioxidante e, devido à similaridade dos espectros de absorção na região UV, apresenta potencial para exercer atividade fotoprotetora, podendo proporcionar a diminuição da concentração de filtros químicos em formulações de proteção solar. Segundo Oliveira e colaboradores (2015), o acréscimo de 0,1% de rutina a associação de benzofenona-3 e EHMC promoveu o aumento do fator de proteção solar (FPS) das preparações cosméticas.

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos de formato toroidal cíclico com uma superfície externa hidrofílica e uma superfície interna de caráter hidrofóbica. São capazes de incorporar moléculas não polares de tamanho adequado, ou parte delas, em sua cavidade apolar, formando complexos de inclusão não covalentes. Este tipo de encapsulamento molecular pode condizir a mudanças em algumas das propriedades físicas e químicas da substância incluída, como o aumento da estabilidade ao O<sub>2</sub> e à luz, e a solubilidade aquosa aparente (RAJEWSKI, STELLA, 1996; LOFTSSON, BREWSTER, 1996; LOFTSSON, MASSON, 2001).

Simeoni, Scali e Benson (2004) estudaram a influência da hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP $\beta$ CD) e sulfobutil-eter- $\beta$ -ciclodextrina (SBE $\beta$ CD) sobre a absorção do filtro solar, BMBM, na pele humana. A permeabilidade da BMBM na epiderme ( $2,29 \pm 1,10\%$ ) foi reduzida na presença SBE $\beta$ CD ( $0,06 \pm 0,52\%$ ), entretanto, não foi influenciada pela complexação com HP $\beta$ CD ( $2,27 \pm 1,33\%$ ). A HP $\beta$ CD reduziu a fotodegradação do BMBM (SCALIA *et al.*, 1998) e 4-dimetil-aminobenzoato de 2-etilhexila (SCALIA, VILLANI e CASOLARI, 1999).

Scalia e colaboradores, (2006) estudaram a complexação da  $\beta$ CD e HP $\beta$ CD com EHMC e incorporação em fibras de algodão, para produção de tecidos com proteção solar, na indústria têxtil. A presença das CDs melhorou a resistência do EHMC aos ciclos de lavagem e as propriedades de proteção UV do tecido pelo aumento da estabilidade fotoquímica da substância.

A quantificação dos filtros solares químicos é um importante parâmetro na avaliação da estabilidade e toxicidade das formulações fotoprotetoras. Diversos métodos tem sido descritos para quantificação da RUT utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), que consiste no método de escolha, por permitir a separação e quantificação simultânea dos filtros (ARAÚJO *et al.*, 2013; KUNTIC *et al.*, 2006; NGUYEN *et al.*, 2013; YAN *et al.*, 2011; ZU *et al.*, 2006), BMBM (MTURI, MARTINCIGH, 2008; YANG *et al.*, 2008) e EHMC (GASPAR, MAIA CAMPOS, 2006; SCALIA *et al.*, 2002; SCALIA *et al.*, 2006).

A adição de CDs na fase móvel em ensaios de cromatografia líquida pode causar a redução no tempo de retenção das substâncias. Esta modificação das características de retenção está intimamente relacionada à estabilidade dos complexos e, portanto, a extensão da interação do soluto com as diferentes CDs



pode ser estimada por meio dos dados cromatográficos (FUJIMURA *et al.*, 1986; MOHSENI, HURTUBISE, 1990).

## 2 OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi desenvolver um método rápido por CLAE para quantificação de filtros solares químicos (*p*-metoxicinamato de octila e avobenzona) e rutina, na presença de ciclodextrinas (HP $\beta$ CD e SBE $\beta$ CD).

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Material e Reagentes

As CDs utilizadas foram a HP $\beta$ CD (2-hidroxipropil-beta-ciclodextrina, Mw  $\approx$  1.460, grau médio de substituição molar, 0,6), cedida pelo Labonathus Biotecnologia Internacional Ltda., e a SBE $\beta$ CD (Captisol<sup>®</sup>, sulfobutileter-beta-ciclodextrina, sal de sódio, Mw  $\approx$  2,163, grau médio de substituição molar, 6-7,1) cedida por Captisol A Ligand Technology, Inc. A rutina (RUT) (98,8% de pureza, Sunji Trading Company, China), a avobenzona (BMBM) (98,0% de pureza, Parsol<sup>®</sup> 1789, DSM, Brasil) e o *p*-metoxicinamato de octila (EHMC) (98,0% de pureza, Basf, Brasil). Metanol e acetona grau UHPLC-Supergradient (AppliChem Panreac ITW Companies, Germany) e a água ultrapura Milli-Q<sup>®</sup> Integral (Merck Millipore, Germany). Todos os demais reagentes foram de pureza analítica.

### 3.2 Instrumentos

#### 3.2.1 Cromatografia Líquida de Fase Reversa

RUT, BMBM e EHMC foram analisados em cromatógrafo em fase líquida Shimadzu<sup>®</sup> módulo Prominence Modular CLAE com detector PDA (*Photodiode Array*) SPD-20A UV, bomba LC-20AB, sistema de degaseificação DGU-20A, amostrador automático SIL-20A/C, sistema de aquecimento CTO-20AC, controlador CBM-20A e programa LC-Solution, empregando metanol:água (88:12, v/v), pH 6,8-7,0 como fase móvel, fluxo de 0,8 mL min<sup>-1</sup>, volume de injeção de 20,0  $\mu$ L em coluna cromatográfica de fase-reversa Kromasil RP-C18 (100 A, 5  $\mu$ m, 250x4.6 mm) equilibrada à temperatura ambiente e eluída sob condições isocráticas em comprimento de onda 325 nm. A fase móvel foi previamente degaseificada por filtração à vácuo (bomba da vácuo KNF<sup>®</sup> mod. N810.FT.18, 100,0 mbar) em

membrana semipermeável de acetato de celulose 45,0  $\mu\text{m}$ , seguida de sonicação (Altsonic Clean mod. 9L) por 15 minutos.

### **3.3 Preparo das Soluções-Padrão (RUT, BMBM e EHMC)**

Soluções-padrão de RUT, BMBM e EHMC ( $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ) foram preparadas em metanol, acetona e etanol 96 $^{\circ}$ GL, respectivamente. Em seguida, alíquotas de 2,5 mL de cada uma das soluções-padrão foram transferidas, separadamente, para balões volumétricos de 25,0 mL e o volume foi completado com fase móvel ( $400,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

### **3.4 Validação da metodologia analítica**

Os critérios de validação empregados foram linearidade, seletividade, exatidão (recuperação), precisão, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), de acordo com o Guia para Validação de Métodos Analíticos (ICH, 2005).

#### **3.4.1 Seletividade**

Para avaliar a seletividade, alíquotas de 240,0  $\mu\text{L}$  das soluções-padrão de cada uma das substâncias ( $400,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) foram transferidas para frasco âmbar de 1,5 mL e o volume completado com fase móvel ( $64,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). O ensaio foi realizado em triplicata. O grau de interferência das CDs (HP $\beta$ CD ou SBE $\beta$ CD) sobre a seletividade do método analítico foi avaliado por meio da adição de solução aquosa de CDs ( $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) sobre as soluções-padrão contendo  $64,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  de cada uma das substâncias. Os ensaios foram realizados em triplicata.

#### **3.4.2 Linearidade e faixa de aplicação**

A linearidade foi calculada usando dez concentrações, em triplicata. Curva analítica foi construída a partir diluições das soluções-padrão ( $400,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) no intervalo de 2,0 a  $64,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Para avaliar o grau de interferência das CDs sobre a linearidade do método, curvas analíticas foram construídas no intervalo de 2,0 a  $64,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  na presença de concentração fixa de CDs ( $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). A adequabilidade do modelo de regressão, com base nos resíduos, foi avaliada (BRITO *et al.*, 2003).

### 3.4.3 Precisão (Repetibilidade)

A precisão intermediária, na presença das CDs (100,0 µg mL<sup>-1</sup>), foi avaliada para três níveis (2,0; 32,0; e 64,0 µg mL<sup>-1</sup>), com três repetições, resultando em 54 determinações para cada substância em estudo (RUT, BMBM e EHMC), realizados intra (três repetições no mesmo dia) e inter-dias (três repetições em três dias diferentes).

### 3.4.4 Exatidão

A exatidão do método, expressa em porcentagem de recuperação, foi avaliada para cada uma das substâncias (RUT, BMBM e EHMC) na concentração de 64,0 µg mL<sup>-1</sup>, na presença das CDs (100,0 µg mL<sup>-1</sup>); os ensaios foram realizados em triplicata.

### 3.4.5 Limite de detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Os valores de LD (**Equação 1**) e LQ (**Equação 2**), foram calculados por meio de parâmetros das curvas analíticas obtidas para cada uma das substâncias (RUT, BMBM e EHMC) na presença e ausência de CDs, de acordo com as equações e seguintes:

$$LD = 3,3(\sigma/S) \text{ (Equação 1)}$$

$$LQ = 10(\sigma/S) \text{ (Equação 2)}$$

onde  $\sigma$  é o desvio padrão da intercepção (coeficiente linear) e S é a inclinação da linha de regressão linear (coeficiente angular), determinada a partir da curva analítica.

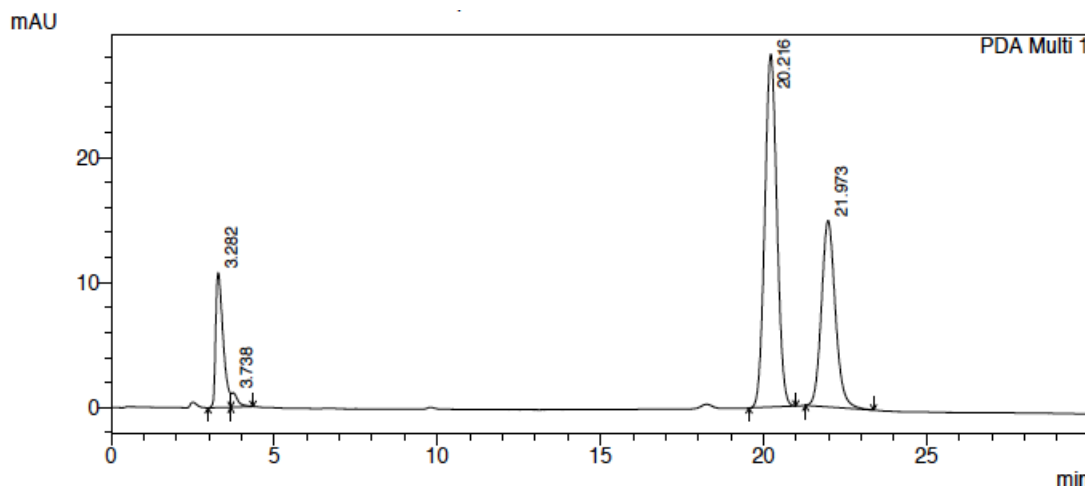
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Seletividade

A seletividade do método instrumental de separação avalia o grau de interferência entre substâncias ativas, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como, outros componentes que possam estar, por ventura, presentes (RIBANI *et al.*, 2004). A seletividade do método foi realizada quanto ao

grau de interferência entre RUT, BMBM e EHMC, e quanto ao grau de interferência das CDs (HP $\beta$ CD e SBE $\beta$ CD).

RUT, BMBM e EHMC apresentaram picos simétricos com tempos de retenção em 3,282; 20,216; e 21,973 minutos, respectivamente (**Figura 1**).



**Figura 1.** Cromatograma da RUT, BMBM e EHMC ( $64,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) empregando coluna cromatográfica Kromasil<sup>®</sup> RP C18 (100 A,  $5\mu\text{m}$ ,  $250 \times 4,6\text{mm}$ ) e fluxo  $0,8 \text{ mL min}^{-1}$

Os valores médios dos parâmetros cromatográficos obtidos a partir da média de três determinações para cada uma das substâncias (RUT, BMBM e EHMC) estão descritos na **Tabela 1**.

**Tabela 1.** Valores médios dos parâmetros cromatográficos ( $t_m$ ,  $t_r$ ,  $W$ ,  $k'$ ,  $\alpha$  e  $R$ )

	$t_r$	$W$	$N$	$k'$	$\alpha_{RUT}$	$\alpha_{BMBM}$	$R_{RUT}$	$R_{BMBM}$
<b>RUT</b>	3,28	0,60	478,73	3,21				
<b>BMBM</b>	20,22	0,90	8072,82	24,92	7,77		22,58	
<b>EHMC</b>	21,97	1,10	6384,30	27,17	8,47	1,09	21,99	1,76

$t_r$  (tempo de retenção, min),  $W$  (largura do pico, cm),  $N$  (número de pratos teóricos),  $k'$  (fator de retenção),  $\alpha$  (fator de seletividade) e  $R$  (resolução)

A resolução ( $R$ ) de uma coluna mede a capacidade de separar dois solutos e depende: da seletividade ( $\alpha$ ), representada pela medida da separação entre dois solutos ( $\alpha > 1$ ); do fator (capacidade) de retenção ( $k'$ ), que descreve a velocidade com que um composto migra ao longo da coluna ( $1 < k' < 10$ ); e da eficácia da coluna ( $N$ ), à qual deverá ser a maior possível (BRITO *et al.*, 2003). Valores de resolução ( $R$ ) igual a 1 indicam separação quase completa das substâncias, porém, valores maiores que 1,5 referem-se à separação completa. Os valores de seletividade ( $\alpha$ ) para BMBM e EHMC, em relação à RUT, e para o EHMC, em relação à BMBM, foram superiores a 1, indicando que houve separação adequada das substâncias. Os valores de  $k'$  observados para BMBM e EHMC demonstraram menor velocidade de

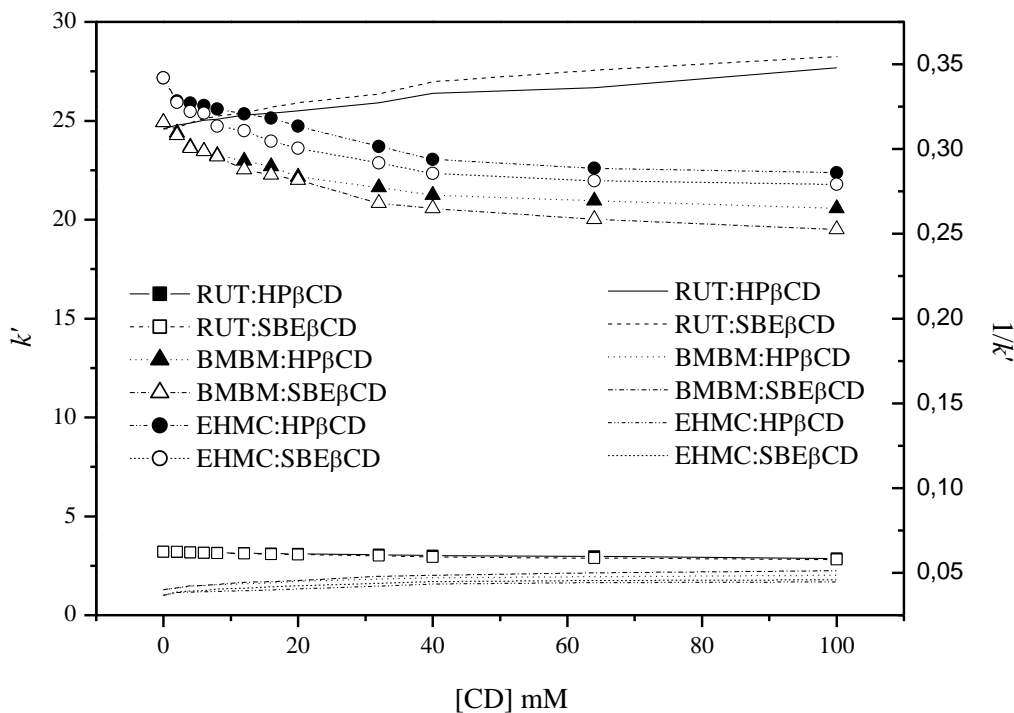
migração dessas substâncias ao longo da coluna que a RUT, o que pode ser explicado pela diferença de solubilidade entre as substâncias e consequente afinidade para a coluna cromatográfica (LETELLIER *et al.*, 1995). Os valores de resolução ( $R$ ) para o BMBM e EHMC, calculados em relação à RUT, e para o EHMC, calculado em relação à BMBM, foram superiores a 1,5, indicando separação completa das substâncias.

Estudos têm demonstrado que as CDs podem alterar os parâmetros cromatográficos das substâncias (GAZPIO *et al.*, 2005; RODRIGUEZ-BONILLA *et al.*, 2011; GONZÁLEZ-RUIZ *et al.*, 2011; GONZÁLEZ-RUIZ, OLIVES, MARTÍN, 2011; ZENG *et al.*, 2012) por meio do aumento da solubilidade dessas, quando na presença das CDs. Os valores de tempos de retenção observados para a RUT, BMBM e EHMC ( $64,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) na presença de HP $\beta$ CD ( $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) foram 3,01; 16,82; e 18,24, respectivamente; enquanto que para SBE $\beta$ CD ( $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) foram 2,98; 16,00; e 17,77, respectivamente. Redução no tempo de retenção das substâncias avaliadas foi observado para ambas as CDs modificadas (SBE $\beta$ CD e HP $\beta$ CD) evidenciando a redução da afinidade destas substâncias com a fase estacionária apolar (FENG *et al.*, 2012). Diferença diminuta de solubilidade é observada entre as CDs modificadas HP $\beta$ CD ( $\sim 600 \text{ mg mL}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$ ) e SBE $\beta$ CD ( $\sim 700 \text{ mg mL}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$ ), o que justifica a diferença entre os valores de tempos de retenção obtidos para cada substância (JAIN *et al.*, 2011; XU *et al.*, 2017).

Considerando que uma modificação nas características de retenção da molécula está relacionada à formação de complexos hidrossolúveis, a extensão da interação do soluto com as CDs pode ser estimada por parâmetros cromatográficos (FENG *et al.*, 2012; SCALIA, CASOLARI, IACOMINOTO, SIMEONI, 2002). A **Figura 2** ilustra a influência de várias concentrações das CDs (HP $\beta$ CD e SBE $\beta$ CD) na fase móvel metanol-água (88:12, v/v) sobre o fator de retenção ( $k'$ ).

A extensão da interação de substâncias com as CDs pode ser estimada por meio dos dados cromatográficos. Determinação linear foi observada entre o fator de retenção ( $k'$ ) e a concentração das CDs (HP $\beta$ CD ou SBE $\beta$ CD) indicando a formação de complexos com estequiometria 1:1 entre as substâncias (RUT, BMBM ou EHMC) e as CDs. Nenhuma significativa diferença nos valores de  $k'$  foram observados com o aumento da concentração das CDs na fase móvel para a RUT. Contudo, a adição da HP $\beta$ CD ou SBE $\beta$ CD no eluente produziu diminuição no fator de retenção ( $k'$ ) para

BMBM e EHMC. Os resultados indicaram que BMBM e EHMC reagem mais fortemente com as CDs (HP $\beta$ CD ou SBE $\beta$ CD) que a RUT. Tais resultados são apresentados nos **Capítulos II, III e IV**.



**Figura 2.** Dependência do fator de retenção ( $k'$ ) em função da concentração das CDs (HP $\beta$ CD ou SBE $\beta$ CD) na Fase Móvel metanol-água (88:12, v/v) a 25,0 °C

Vários são os fatores que condicionam a complexação com CDs, destacando-se a composição química, tamanho e geometria da molécula-hóspede, sua solubilidade em água, estado de ionização, peso molecular e ponto de fusão, além das condições do meio, como temperatura, pH e solventes. De forma geral, a complexação ocorre de forma mais favorável quando a molécula-hóspede possui massa molecular entre 100,0 e 400,0 Daltons, solubilidade em água inferior a 10,0 mg mL<sup>-1</sup> e ponto de fusão inferior a 250 °C. Moléculas maiores também podem ser complexadas, desde que apresentem cadeias laterais apropriadas para a inclusão parcial, que também levará a modificações na solubilidade e estabilidade da molécula original (RAMA *et al.*, 2005, MARTINS, 2008; MIRANDA *et al.*, 2011).

O elevado peso molecular da RUT (610,5175 Da.) e sua natureza hidrofílica (125,0 mg mL<sup>-1</sup> à 25 °C) dificultam a sua acomodação no interior da cavidade hidrofóbica das CDs; entretanto, o menor peso molecular e baixa solubilidade da

BMBM (310,39 Da.; 10,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  à 25 °C) e EHCM (290,397 Da.; 1,0  $\text{mg mL}^{-1}$  à 25 °C) tornam estas moléculas bons candidatos à formação de complexos de inclusão com CDs.

Metanol, em concentração inferior a 40,0%, apresenta interferência reduzida sobre a formação dos complexos de inclusão, quando comparado com outros solventes orgânicos (p. ex. acetonitrila) (LETELLIER *et al.*, 1995; SCALIA, CASOLARI, IACOMINOTO, SIMEONI, 2002). Elevada porcentagem de metanol foi necessária para separação da BMBM e EHMC, o que pode ter sido prejudicial aos fenômenos de inclusão (LETELLIER *et al.*, 1995; GAZPIO *et al.*, 2005).

Wang e colaboradores (2011) avaliaram a influência das CDs naturais ( $\alpha\text{CD}$ ,  $\beta\text{CD}$  e  $\gamma\text{CD}$ ) sobre a separação dos ácidos oleanólico e ursólico por CLAE. Menor tempo de retenção foi observado para os ácidos na presença da  $\gamma\text{CD}$ , indicando a formação de complexos mais solúveis e estáveis (MARTIN DEL VALLE, 2004).

Feng e colaboradores (2012) avaliaram o comportamento do tempo de retenção da isoflavona na presença de CDs ( $\beta\text{CD}$ ,  $\text{HP}\beta\text{CD}$  e  $\text{RM}\beta\text{CD}$ ), empregando a razão  $k_1/k_0$ . Os valores de  $k_1/k_0$  seguiram a seguinte ordem  $\text{RM}\beta\text{CD} > \text{HP}\beta\text{CD} > \beta\text{CD}$ , sugerindo que CDs derivadas diminuem em maior intensidade os valores de tempo de retenção do soluto quando comparadas à  $\beta\text{CD}$ . Tal fenômeno pode ser atribuído à maior hidrofiliabilidade dos derivados da  $\beta\text{CD}$  ( $\text{RM}\beta\text{CD}$  e  $\text{HP}\beta\text{CD}$ ) que promovem a formação de complexos mais solúveis, e, portanto, de menor afinidade pela fase estacionária.

Letellier e colaboradores (1995) avaliaram a interação entre a rutina e metil- $\beta$ -ciclodextrinas em solução aquosa, empregando cromatografia líquida de fase reversa; no gráfico de  $1/k'$  versus  $[\text{CD}]_{\text{mM}}$ , na presença de um segmento linear, é assumida a formação de complexos de estequiometria 1:1, ou seja, de primeira ordem relativamente à ciclodextrina e de ordem 1 relativamente à molécula hóspede. A **Tabela 2** apresenta os resultados obtidos a partir da análise de regressão linear do gráfico de  $1/k'$  versus  $[\text{CD}]_{\text{mM}}$  (**Figura 2**). Relações lineares ( $R > 0,99$ ) foram observadas, indicando a formação de complexos com estequiometria 1:1 entre as substâncias (RUT, BMBM ou EHMC) e as CDs ( $\text{HP}\beta\text{CD}$  ou  $\text{SBE}\beta\text{CD}$ ).

**Tabela 2.** Parâmetros de regressão linear obtidos a partir das curvas  $1/k'$  versus  $[CD]_{mM}$ 

	Coeficiente Angular	Coeficiente Linear	R
RUT:HP $\beta$ CD	0,000349	0,31483	0,99588
RUT:SBE $\beta$ CD	0,000443	0,31577	0,99857
BMBM:HP $\beta$ CD	0,000080	0,04223	0,99327
BMBM:SBE $\beta$ CD	0,000110	0,04238	0,99986
EHCM:HP $\beta$ CD	0,000077	0,03854	0,99986
EHCM:SBE $\beta$ CD	0,000084	0,03946	0,99491

r, - coeficiente de correlação

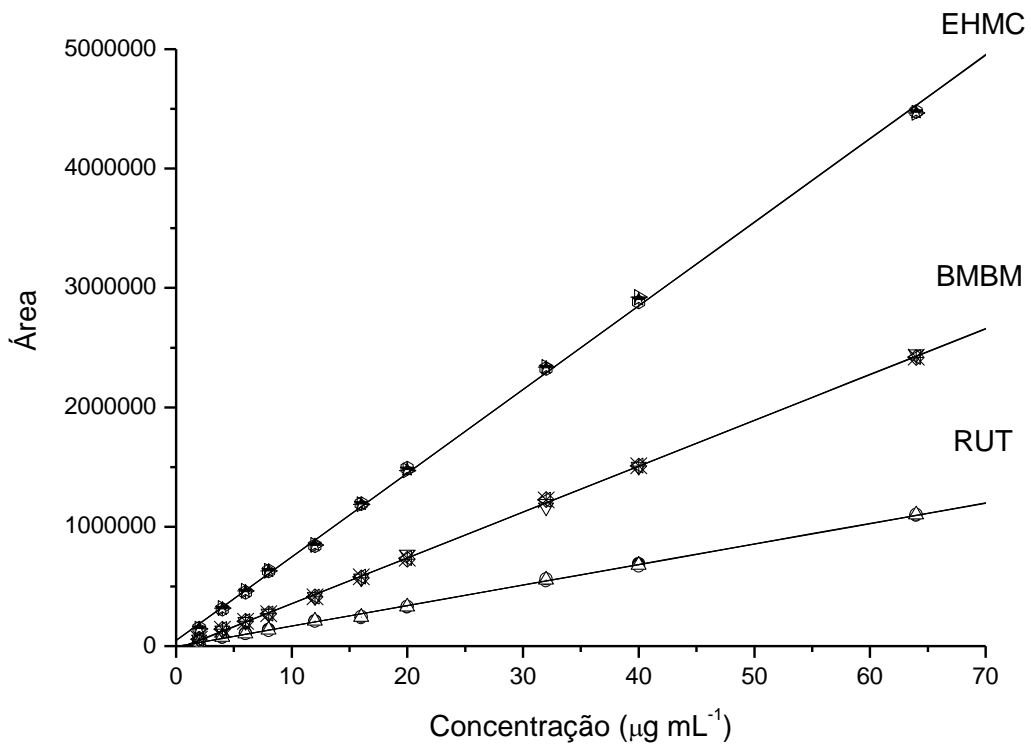
## 4.2 Linearidade e faixa de aplicação

A quantificação da substância de interesse em validação pode ser obtida a partir de vários métodos, entre os quais temos o *método da padronização externa* e o *método da superposição de matriz*. O *método de padronização externa* compara a área da substância a ser quantificada na amostra com as áreas obtidas com soluções de concentrações conhecidas a partir de um padrão; o *método de superposição de matriz* consiste na adição do padrão em diversas concentrações em uma matriz similar à amostra, isenta da substância. O método de padronização externa é realizado quando nenhum erro sistemático proveniente da matriz é suspeito, enquanto o método de superposição da matriz compensa o efeito da matriz (RIBANI *et al.*, 2004).

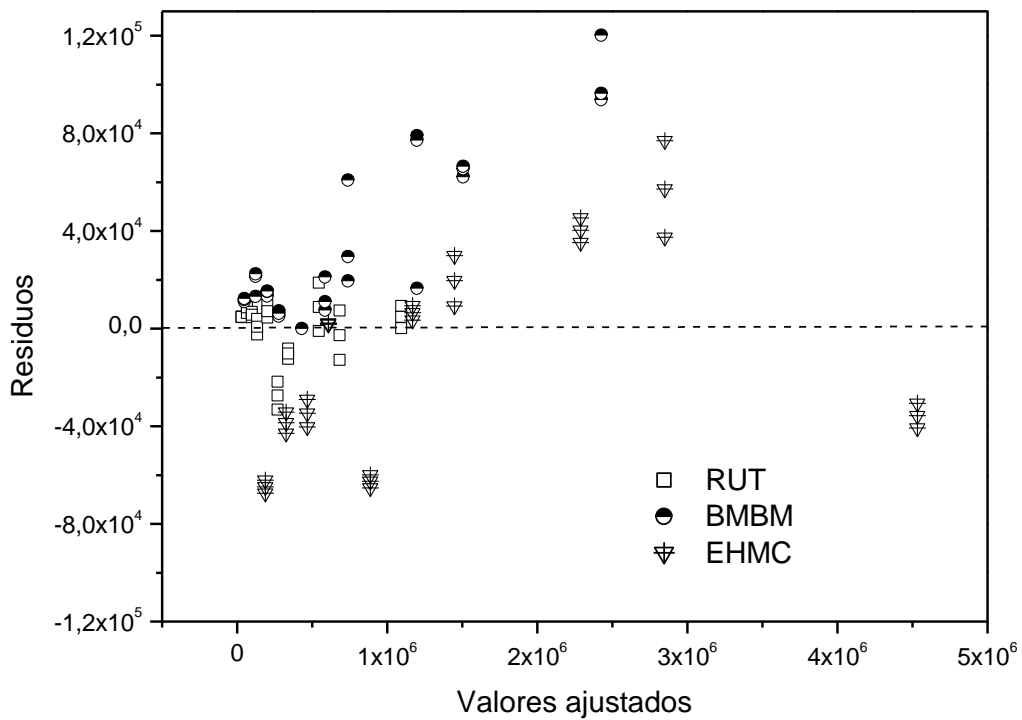
A **Figura 3** ilustra a representação gráfica do método de padronização externa para as substâncias RUT, BMBM e EHMC. Relações lineares foram obtidas no intervalo de concentrações entre 2,0 a 64,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para RUT, BMBM e EHMC.

A homocedasticidade das variâncias foi avaliada pelo teste de hipótese (Teste de Cochran). Os valores de "P" observados para as substâncias RUT, BMBM e EHMC foram 0,1755; 0,2435; e 0,1925, respectivamente. Como P-valor, apresentou valor superior a 0,05, não rejeitamos a hipótese de igualdade de variância ( $H_0$ ), ao nível de significância de 5,%. Logo, modelos homocedásticos foram obtidos para RUT, BMBM e EHMC. A ausência de valores extremos foi observada no teste de resíduos (**Figura 4**).





**Figura 3.** Curva analítica média da RUT, BMBM e EHMC obtidas, simultaneamente, no intervalo de 2,0 a 64,0 µg mL<sup>-1</sup> (n=3)



**Figura 4.** Representação gráfica dos resíduos *versus* valores ajustados a um nível de significância de 5,0%

A **Tabela 3** descreve os parâmetros de regressão linear, em triplicata, obtidos a partir das curvas analíticas da RUT, BMBM e EHMC, pelo método de padronização externa e método de superposição de matriz, empregando cromatografia líquida.

**Tabela 3.** Parâmetros de regressão linear obtidos a partir das curvas analíticas da RUT, BMBM e EHMC

RUT							
Método de padronização externa				Método da Superposição de Matriz			
				HP $\beta$ CD (1,0 mg.mL <sup>-1</sup> )		SBE $\beta$ CD (1,0 mg.mL <sup>-1</sup> )	
Dia	N	Equação da reta	R	Equação da reta	R	Equação da reta	r
1	10	y=17127x-3614,7	0,99852	y=17216x-7493,2	0,99840	y=16816x-3793,4	0,99940
2	10	y=17201x-3601,3	0,99871	y=17220x-7706,7	0,99852	y=17077x-5156,6	0,99952
3	10	y=17164x-3608	0,99888	y=17303x-10348	0,99864	y=17134x-2235	0,99958

BMBM							
Método de padronização externa				Método da Superposição de Matriz			
				HP $\beta$ CD (1,0 mg.mL <sup>-1</sup> )		SBE $\beta$ CD (1,0 mg.mL <sup>-1</sup> )	
Dia	N	Equação da reta	R	Equação da reta	R	Equação da reta	r
1	10	y=38466x-31414	0,99939	y=38906x-28280	0,99938	y=35367x+51316	0,99920
2	10	y=38320x-27419	0,99961	y=39077x+2024,7	0,99944	y=35387x+45190	0,99942
3	10	y=38326x-25097	0,99971	y=39586x-3704,5	0,99962	y=34978x+50992	0,99925

EHMC							
Método de padronização externa				Método da Superposição de Matriz			
				HP $\beta$ CD (1,0 mg.mL <sup>-1</sup> )		SBE $\beta$ CD (1,0 mg.mL <sup>-1</sup> )	
Dia	N	Equação da reta	R	Equação da reta	R	Equação da reta	r
1	10	y=70110x+47997	0,99903	y=59046x+149550	0,99959	y=70157x+30028	0,99803
2	10	y=70043x+45998	0,99927	y=58615x+169651	0,99813	y=70079x+49821	0,99906
3	10	y=70067x+46998	0,99919	y=58913x+158071	0,99934	y=70143x+48592	0,99908

N, número de pontos; r, coeficiente de correlação

O valor da linearidade de uma curva analítica pode ser avaliado por meio do coeficiente de correlação ( $r$ ), sendo considerado  $r=1$  uma correlação perfeita,  $0,91 < r < 0,99$  uma correlação fortíssima,  $0,6 < r < 0,91$  forte correlação,  $0,31 < r < 0,60$  correlação média,  $0,01 < r < 0,30$  correlação fraca e,  $r=zero$  correlação nula (BRITO *et al.*, 2003; CURRIE, SVEHLA, 1994).

### 4.3 Precisão (Repetibilidade)

A precisão do ensaio foi calculada para três níveis (8,0; 20,0; e 64,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) com três repetições para RUT, BMBM e EHMC (**Tabela 4**), resultando em 54 determinações para cada substância, empregando o mesmo analista e diferentes dias.

**Tabela 4.** Valores de precisão intermediária média e desvio padrão relativo (%)

C ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	HP $\beta$ CD		SBE $\beta$ CD	
	Intra-dia	Inter-dia	Intra-dia	Inter-dia
<b>RUT</b>				
8	8,2242 (2,2546)	8,3196 (1,2479)	8,55789 (2,4419)	8,6408 (2,4682)
20	19,7280 (0,6179)	19,7108 (0,9391)	19,6013 (0,7531)	19,6140 (0,7589)
64	65,1830 (0,4120)	65,4382 (0,4865)	64,8974 (0,4016)	64,4448 (0,4072)
<b>BMBM</b>				
8	6,3671 (0,4585)	6,5099 (1,7244)	6,4601 (0,5113)	6,5099 (1,7237)
20	19,0956 (0,8931)	19,0228 (1,7244)	19,1078 (0,9011)	19,9058 (1,7348)
64	62,5687 (0,6069)	63,5620 (1,8115)	64,6215 (0,6113)	63,7472 (1,8227)
<b>EHMC</b>				
8	8,3302 (0,0545)	8,4596 (1,6743)	8,4016 (0,0545)	8,5083 (1,7023)
20	20,4423 (0,7243)	19,9956 (1,9527)	20,7192 (0,7366)	21,3741 (1,9802)
64	63,1445 (0,1133)	63,9495 (1,1711)	63,3705 (0,1272)	64,4556 (1,1809)

Segundo Wood (1999), o desvio-padrão relativo está relacionado com o nível de concentração da analito (C), definido pela equação  $2^{(1-0,5\log C)}$ . Desse modo, substituindo-se os níveis de concentração empregados (8,0; 20,0; e 64,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), consideram-se aceitáveis valores de desvio-padrão relativo de 2,9; 2,5; e 2,1%, para RUT, BMBM e EHMC, respectivamente.

### 4.4 Exatidão

Valores de recuperação de  $99,55 \pm 0,30\%$ ,  $98,01 \pm 0,06\%$ , e  $99,99 \pm 0,65\%$  foram obtidos para a RUT, BMBM e EHMC (64,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), respectivamente, na presença de HP $\beta$ CD (100,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ); e  $99,85 \pm 0,83\%$ ,  $98,82 \pm 0,34\%$  e  $99,01 \pm 0,82\%$  para a RUT, BMBM e EHMC (64,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), respectivamente, na presença de SBE $\beta$ CD (100,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Os valores de recuperação (%) indicaram que o método foi exato para a quantificação simultânea das substâncias na presença das CDs.

#### 4.5 Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

Os valores de limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) obtidos para a RUT, BMBM e EHMC, na presença ou ausência das CDs (HP $\beta$ CD e SBE $\beta$ CD) estão apresentados na **Tabela 5**.

**Tabela 5.** Valores médios de Limite de Determinação (LD) e Limite de Quantificação (LQ) para as substâncias RUT, BMBM e EHMC na ausência ou presença das CDs

	LD ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	LQ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
RUT	0,0012	0,0039
RUT:HP $\beta$ CD	0,2766	0,9220
RUT:SBE $\beta$ CD	0,2578	0,8595
BMBM	0,2498	0,8327
BMBM:HP $\beta$ CD	1,1251	3,7504
BMBM:SBE $\beta$ CD	0,2934	0,9781
EHMC	0,0428	0,1426
EHMC:HP $\beta$ CD	0,5142	1,7142
EHMC:SBE $\beta$ CD	0,4744	1,5814

O cálculo de LD e LQ baseado em parâmetros da curva analítica apresenta maior confiabilidade estatística, pois leva em consideração o intervalo de confiança da regressão (RIBEIRO *et al.*, 2008). O LD, neste caso, é definido como a concentração mínima de uma substância que pode ser medida e informada com 95% de confiança, enquanto o LQ é a menor quantidade do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2017).

A presença das CDs aumentou os valores de LD e LQ para todas as substâncias analisadas, reduzindo a capacidade de detecção e quantificação do método analítico. No entanto, formulações fotoprotetoras multifuncionais possuem concentrações de filtros e anti-oxidantes em ampla faixa (VELASCO *et al.*, 2008; BABY *et al.*, 2008; PERES *et al.*, 2017; PINTO, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2015), e, portanto, em níveis de concentração suficientemente elevados para serem detectados e quantificados.

## 5 CONCLUSÕES

Este trabalho reportou o desenvolvimento e validação de um método de CLAE para determinação simultânea de rutina, avobenzona e *p*-metoxicinamato de octila na presença de ciclodextrinas (HP $\beta$ CD e SBE $\beta$ CD).

As ciclodextrinas (HP $\beta$ CD e SBE $\beta$ CD) reduziram o tempo de retenção dos filtros e da rutina no processo cromatográfico. A formação de complexos de inclusão entre as substâncias e as ciclodextrinas pode explicar a modificação dos tempos de retenção.

A dificuldade de desenvolvimento de um método analítico para quantificação de filtros solares em preparações fotoprotetoras está relacionado à complexidade da preparação, onde a presença de substâncias com estruturas relacionadas, torna a separação destas substâncias uma tarefa difícil.

O método foi sensível, seletivo, linear, exato, preciso e com limites de detecção e quantificação adequados para determinação da RUT, BMBM e EHMC, simultaneamente, na presença e ausência de CDs, uma vez que este foi capaz de analisar as substâncias de forma inequívoca.

## 6 REFERÊNCIAS

ARAÚJO, K. C. F.; COSTA, E. M. M. B.; PAZINI, F.; VALADARES, M. C.; OLIVEIRA, V. Bioconversion of quercetin and rutin and cytotoxicity activities of the transformed products. **Food and Chemical Toxicology**, v.51, p.93-96, 2013.

BABY, A. R.; HAROUTIOUNIAN-FILHO, C. A.; SARRUF, F. D.; TAVANTE-JÚNIOR, C. R.; PINTO, C. A. S. O.; ZAGUE, V.; ARÊAS, E. P. G.; KANEKO, T. M.; VELASCO, M. V. R. Estabilidade e estudo de penetração cutânea *in vitro* da rutina veiculada em uma emulsão cosmética através de um modelo de biomembrana alternativo. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.44, n.2, p. 233-248, 2008.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Resolução RDC nº 8166, de 25 de julho de 2017. *Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos*. Disponível em: <https://www20.anvisa.gov.br/coifa/pdf/rdc166.pdf>

BRITO, N. M.; AMARANTE J. R., O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Ecotoxicol e Meio Ambiente**, v.13, p.129-146, 2003.

CURRIE, L. A.; SVEHLA, G. Nomenclature for the presentation of results of chemical analysis. **Pure & Applied Chemistry**, v. 66, n. 3, p. 595-908, 1994.

FENG, B.; JIN, J.; WANG, C.; SONG, J.; YANG, G.; ZENG, A. Analysis and retention behavior of isoflavone and aglycones in Radix Astragali by HPLC with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin as a mobile phase additive. **Journal of Separation Science**, v.35, p.3469-3476, 2012.

FUJIMURA, K.; UEDA, T.; KITAGAWA, M.; TAKAYANAGI, H.; ANDO, T. Reversed-phase retention behavior of aromatic compounds involving  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex formation in the mobile phase. **Analytical Chemistry**, v.58, n.13, p.2668-2674, 1986.

GASPAR, L. R.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Evaluation of the photostability of diferente UV filter combinations in a sunscreen. **International Journal of Pharmaceutics**, v.307, n.2, p.123-128, 2006.

GAZPIO, C.; SÁNCHEZ, M.; FÁRCIA-ZUBIRI, I.X.; VÉLAZ, I.; MARTINEZ-OHÁRRIZ, C.; MARTÍN, C.; ZORNOZA, A. HPLC and solubility study of the interaction between pindolol and cyclodextrin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.37, n.3, p.487-492, 2005.

GONZÁLEZ-RUIZ, V.; LEÓN, A.G.; OLIVES, A. I.; MARTÍN, M.A.; MENÉNDEZ, J.C. Eco-friendly liquid chromatographic separations based on the use of cyclodextrins as mobile phase additives. **Green Chemistry**, v.13, n.1, p.115-126, 2011.

GONZÁLEZ-RUIZ, V.; OLIVES, A.I.; MARTÍN, M. A. SPE/RP-HPLC using C1 columns: an environmentally friendly alternative to conventional reverse-phase separations for quantitation of beta-carboline alkaloids in human serum samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.400, n.2, p.395-401, 2011.

ICH INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. Quality Guidelines. View All Quality Guidelines. Analytical Validation Q2. Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology Q2(R1). 2005, 17p. Disponível em: [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf)

JAIN, A. S.; DATE, A. A.; PISSURLENKAR, R. R. S.; COUTINHO, E. C; NAGARSENKER, M. S. Sulfobutyl Ether $\beta$ -Cyclodextrin (SBE $\beta$ -CD) Carbamazepine Complex: Preparation, Characterization, Molecular Modeling, and Evaluation of *In Vivo* Anti-epileptic Activity. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v.12, n.4, p.1163–1175, 2011.

KAWAKAMI, C. M.; GASPAR, L. R. Mangiferin and naringenin affect the photostability and phototoxicity of sunscreen containing avobenzone. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.151, p.239-247, 2015.

KUNTIC, V.; PEJIC, N.; IVKOVIC, B.; VUJIC, Z.; ILIC, K.; MICIC, S.; VUKOJEVIC, V. Isocratic RP-HPLC method for rutin determination in solid oral dosage forms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.43, n.2, p.718-721, 2006.

LETELLIER, S; MAUPAS, B.; GRAMOND, J. P.; GUYON, F.; GAREIL, P. Determination of the formation constant for the inclusion complex between rutin and methyl- $\beta$ -cyclodextrins. **Analytica Chimica Acta**, v.315, n.3 ,357-363, 1995.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M. E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.85, n.10, p.1017-1025, 1996.

LOFTSSON, T.; MASSON, M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. **International Journal of Pharmaceutics**, v.225, n.1-2, 25-50, 2001.

MAIER, H.; SHAUBERGER, G.; BRUNNHOFER, K.; HONIGSMANN, H. Change of ultraviolet absorbance of sunscreens by exposure to solar-simulated radiation. **Journal of investigative Dermatology**, v.117, n.2, p.256-262, 2001.

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

MARTINS, T.E.A. **Obtenção e caracterização de complexos ternários de saquinavir, β-ciclodextrina e polivinilpirrolidona**. 2008. 82f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

MIRANDA, J.C.; MARTINS, T.E.A.; VEIGA, F.; FERRAZ, H.G. Cyclodextrins and ternary complexes: technology to improve solubility of poorly soluble drugs. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.47, n.4, p.665-681, 2011.

MTURI, G. J.; MARTINCIGH, B. S. Photostability of the sunscreensing agente 4-tert-butyl-4'-methoxydibenzoylmethane (avobenzone) in solvents of different polarity and proticity. **Journal of Photochemistry and Photobiology A Chemistry**, v.200, n.2, p.410-420, 2008.

MOHSENI, R. M.; HURTUBISE, R. J. Retention characteristics of several compound classes in reversed-phase liquid chromatography with β-cyclodextrin as a mobile phase modifier. **Journal of Chromatography A**, v.499, n.19, p.395-410, 1990.

NGUYEN, T. A.; LIU, B.; ZHAO, J.; THOMAS, D. S.; HOOK, J. M. An investigation into the supramolecular structure, solubility, stability and antioxidant activity of rutin/cyclodextrin inclusion complex. **Food Chemistry**, v.136, n.1, p.186-192, 2013.

OLIVEIRA, C. A.; PERES, D. D.; RUGNO, C. M.; KOJIMA, M.; PINTO, C. A. S. O.; CONSIGLIERI, V. O.; KANEKO, T. E.; ROSADO, C.; MOTA, J.; VELASCO, M. V. R.; BABY, A. R. Functional photostability and cutaneous compatibility of vioactive UVA. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.148, p.154-159, 2015.

PERES, D. D.; ARIEDE, M. B.; CANDIDO, T. M.; ALMEIDA, T. S.; LOURENCO, F. R.; OLGA, C. V.; KANEKO, T. M. ; VELASCO, M. V. R. ; BABY, A. R. Quality by design (QbD), Process Analytical Technology (PAT), and design of experiment applied to the development of multifunctional sunscreens. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.43, n.2, p.246-256, 2017.

PINTO, C. A. S.O. **Influência da rutina na fotoestabilização da avobenzone (filtro UVA) e do ρ-metoxicinamato de octila (filtro UVB)**. 2014. 211f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

POTARD, G.; LAUGEL, C.; SCHAEFER, H.; MARTY, J. P.; The stripping technique: in vitro absorption and penetration of five UV filters on excised fresh human skin. **Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology**, v.13,n.6, p.336-344, 2000.

RAMA, A. C. R.; VEIGA, F.; FIGUEIREDO, I. V., SOUSA, A.; CARAMONA, M. Aspectos biofarmacêuticos da formulação de medicamentos para neonatos. Fundamentos da complexação de indometacina com hidroxipropil-β-ciclodextrina para tratamento oral do fechamento do canal arterial. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.41, n.3, p.281-299. 2005.



RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIN, I. C. S. F.; Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, n.5, p.771-780, 2004.

RIBEIRO, F. A. L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C.; SILVA, L. R.; SCHNEIDER, R. P. Planilha de avaliação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v.31, n.1, p.164-171, 2008.

RODRÍGUEZ-BONILLA, P.; LÓPEZ-NICOLÁS, J. M.; MÉNDEZ-CAZORLA, L.; GARCÍA-CARMONA, F. Development of a reversed phase high performance liquid chromatography method based on the use of cyclodextrins as mobile phase additives to determine pterostilbene in blueberries. **Journal of Chromatography B**, v.879, n.15-16, p.1091-1097, 2011.

SCALIA, S.; CASOLARI, A.; IACONIMOTO, A.; SIMEONI, S. Comparative studies of the influence of cyclodextrins on the stability of the sunscreen agente, 2-ethylhexyl-p-methoxycinnamate. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical**, v.30, n.4, p.1181-1189, 2002.

SCALIA, S.; TURSILLI, T.; BIANCHI, A.; NOSTRO, P. L.; BOCCI, E.; RIDI, F.; BAGLIONI, P. Incorporation of the sunscreen agente, octyl methoxycinnamate in a cellulosic fabric grafted with  $\beta$ -cyclodextrin. **International Journal of Pharmaceutics**, v.308, n.1-2, p.155-159, 2006.

SCALIA, S.; VILLANI, S.; SCATTURIN, A.; VANDELLI, M. A.; FONI, F. Complexation of the sunscreen agente, butyl-methoxy-dibenzoylmethane, with hydroxy-propyl- $\beta$ -cyclodextrin. **International Journal of Pharmaceutics**, v.175, n.2, p.205-213, 1998.

SCALIA, S.; VILLANI, S.; CASOLARI, A. Inclusion complexation of the sunscreen agente 2-ethylhexyl-p-dimethylaminobenzoate with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin: effect on photostability. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.51, n.12, p.1367-1374, 1999.

SIMEONI, S.; SCALIA, S.; BENSON, H. A. E. Influence of cyclodextrins on in vitro human skin absorption of the sunscreen, butyl-methoxydibenzoylmethane. **International Journal of Pharmaceutics**, v.280, n.1-2, p.163-171, 2004.

VELASCO, M. V. R.; BALOGH, T. S.; PEDRIALI, C. A.; SARRUF, F. D.; PINTO, C. A. S. O.; KANEKO, T. M.; BABY, A. R. Associação da rutina com *p*-metoxicinamato de octila e benzofenona-3: avaliação *in vitro* da eficácia fotoprotetora por espectrofotometria de refletância. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.27, n.1, p.23-27, 2008.

WANG, C.; LIU, H.; ZHANG, B.; GUO, H. Determination of oleanolic and ursolic acid in Chinese herbs using HPLC and  $\gamma$ -CD as mobile phase modifier. **Journal of Separation Science**, v.34, n.12, p.3023-3028, 2011.

WOOD, R. How to validate analytical methods. **Trends in Analytical Chemistry**, v.18, n.9-10, p.624-632, 1999.

YAN, M.; LI, B.; ZHAO, X.; YI, J. Physicochemical properties of gelatin gels from walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) skin cross-linked by gallic acid and rutin. **Food Hydrocolloids**, v.25, n.5, p.907-914, 2011.

YANG, J.; WILEY, C. J.; GODWIN, D. A.; FELTON, L. A. Influence of hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin on transdermal penetration and photostability of avobenzone. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.69, n.2, p.605-612, 2008.

ZENG, A. G.; XING, J. F.; WANG, C. H.; SONG, J.; LI, C.; YANG, X.; YANG, G. D.; Simultaneous analysis and retention behavior of major isoflavonoids in Radix Puerariae lobatae and Radix Puerariae thomsonii by high performance liquid chromatography with cyclodextrins as a mobile phase modifier. **Analytica Chimica Acta**, v.712, n.27, p.145-151, 2012.

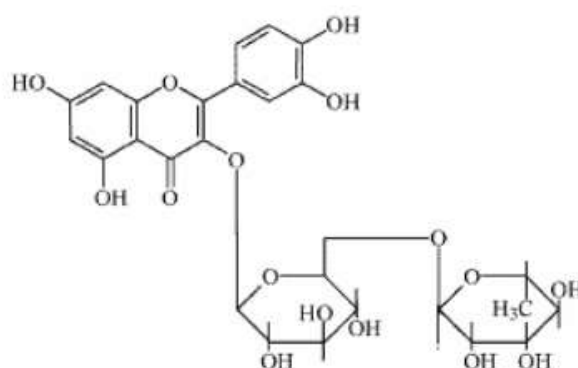
ZU, Y.; LI, C.; FU, Y.; ZHAO, C. Simultaneous determinations of catechin, rutin, quercetin kaempferol and isorhamnetin in the extract of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves by RP-HPLC with DAD. **Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.41, n.3, p.714-719, 2006.

# Capítulo II

Obtenção e caracterização de complexos de inclusão binários da rutina (RUT) e ciclodextrinas (HP $\beta$ CD e SBE $\beta$ CD)

## 1 INTRODUÇÃO

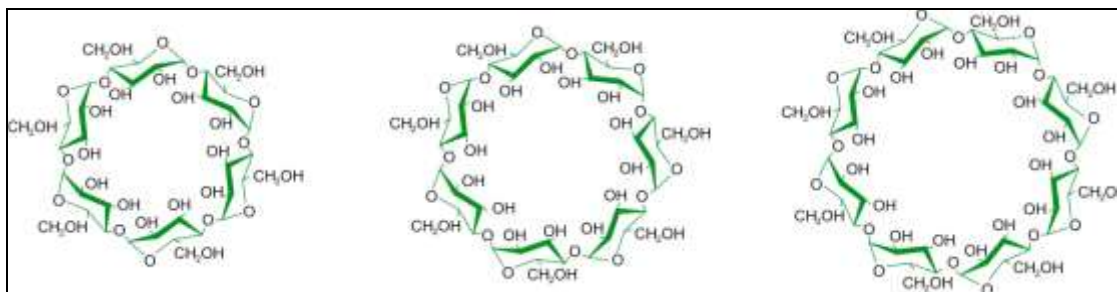
Flavonoides são substâncias com estrutura química formada por um núcleo comum fundamental, benzopirano ou cromano, unido ao anel aromático caracterizado pelo esqueleto de carbono C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> (NISHIKAWA *et al.*, 2007). A rutina (RUT) (3-O-rutinosídeo-quercetina), representada na **Figura 1**, é um flavonoide de pigmentação amarela-esverdeado, na forma de cristais em agulha, com baixa solubilidade em água ( $\approx 130 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Pertence ao grupo de flavonoides fotossensíveis (SAVIC *et al.*, 2016), com reconhecida atividade antioxidante e de proteção contra os raios ultravioletas (UV) na pele (OLIVEIRA *et al.*, 2015; VELASCO *et al.*, 2008a). Sua semelhança estrutural com os filtros solares químicos e absorção na região do UV, aliada ao seu potencial antioxidante, torna esta substância potencialmente útil como aditivo em fórmulas fotoprotetoras (VELASCO *et al.*, 2008ab; BABY *et al.*, 2008a).



**Figura 1.** Estrutura química da rutina. Fonte: BABY *et al.*, 2008b.

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos, compostos por unidades D-glucopiranosídicas (glicose) ligadas entre si por meio de ligações  $\alpha$ -1,4 glicosídicas. São obtidas à partir de processos biotecnológicos, por degradação enzimática do amido do milho, e apresentam maior rendimento com 6, 7, e 8 unidades de glicose, conhecidas, respectivamente, por  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD (CDs naturais), representadas na **Figura 2** (SZEJTLI, 1998; KURKOV e LOFTSSON, 2013). Apresentam forma troco-cônica devido à ausência de rotação livre das ligações glicosídicas e da conformação em cadeia apresentadas pelas unidades de glicose. Nesta estrutura peculiar, os grupos hidroxílicos secundários encontram-se localizados na extremidade mais larga, ligados aos átomos C2 e C3 das unidades de glicose, enquanto os grupos hidroxílicos primários localizam-se na extremidade oposta mais estreita, ligados aos átomos C6 das unidades de glicose

(BEKERS *et al.*, 1991; LOFTSSON, HREINSDÓTTIR e MÁSSON, 2007; VEIGA, PECORELLI e RIBEIRO, 2006; MOYA-ORTEGA *et al.*, 2012; VALENTINI *et al.*, 2015).



**Figura 2.** Estrutura química das ciclodextrinas naturais,  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD, respectivamente. Fonte: MARTINS, 2008.

A estrutura tronco-cônico das CDs, abertas em ambas as extremidades, permite a inclusão de enorme variedade de moléculas orgânicas (substâncias apolares) em sua cavidade central. Da associação das moléculas hospedeiras (CDs) com moléculas encapsuladas resultam complexos hóspede-hospedeiro, ou complexos fármaco-CDs, também conhecidos como complexos ou compostos de inclusão (SZEJTLI, 1998; MARTINS, 2008; MIRANDA *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2015).

A formação dos complexos de inclusão ocorre por meio de arranjo dimensional entre a cavidade hospedeira e a molécula hóspede, onde a cavidade lipofílica das moléculas de CDs promove ambiente em que as moléculas de tamanho apropriado, apolares, podem interagir para formar os sistemas de inclusão ou, ainda, complexos de inclusão. A força envolvida na formação dos complexos é originada pela entalpia das moléculas de água, que são deslocadas pelas moléculas mais hidrofóbicas da substância presente na solução para manter uma associação apolar-apolar e diminuir a força do anel da CD, resultando, assim, em um estado de baixa energia (VALLE, 2004; GREBOGI *et al.*, 2012).

A partir das CDs naturais foi possível introduzir modificações químicas nos grupos hidroxílicos primários e secundários, e assim, modificar as características químicas destas CDs, como a toxicidade e o aumento da capacidade de inclusão, obtendo-se, assim, derivados hidrofóbicos (hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina - HP $\beta$ CD), hidrófilo e ionizáveis (sulfobutil éter- $\beta$ -ciclodextrina - SBE $\beta$ CD) (VALLE, 2004; VEIGA, PECORELLI e RIBEIRO, 2006; MARTINS e VEIGA, 2008).

A HP $\beta$ CD pertence ao grupo dos derivados hidroxialquilados, sendo este grupo um dos mais utilizados na obtenção de complexos de inclusão, por apresentarem

hidrossolubilidade elevada e menor higroscopicidade quando comparado à CD de origem (UEKAMA e OTAGARI, 1998; UEKAMA, HIRAYA e ARIMA, 2006; MARTINS 2008; BREWSTER *et al.*, 2008; MIRANDA *et al.*, 2011). As HP $\beta$ CD e SBE $\beta$ CD são as derivadas da  $\beta$ CD mais utilizadas pela indústria por apresentarem baixa toxicidade e alta solubilidade, tornando-as, assim, ideais para aplicação oral e parenteral (DAVIS e BREWSTER, 2007; LOFTSSON e DUCHÊNE, 2007).

A SBE $\beta$ CD é uma ciclodextrina polianiônica por substituição dos grupos hidroxílicos 2, 3 e 6 das unidades de glicose da  $\beta$ -CD por substituintes sulfobutil éter que encontram-se totalmente ionizados em ampla faixa de valor de pH e proporcionam cabeça polar carregada negativamente, associada à cauda hidrofóbica ligada à cavidade interna da CD. Em função de suas características químicas, apresenta aumento do seu caráter hidrofóbico e de sua capacidade de complexação (VEIGA, PECORELLI e RIBEIRO, 2006; MARTINS e VEIGA, 2003; GUEDES *et al.*, 2008; MIRANDA *et al.*, 2011; FULOP, SAOKHAM e LOFTSSON, 2014).

A principal propriedade das CDs é sua capacidade de alterar as características físico-químicas e biológicas de substâncias por meio da formação dos complexos de inclusão. Dentre as mais diversas aplicações, o aumento da solubilidade e estabilidade das moléculas hóspedes, quanto a reações de hidrólise, oxidação e fotodegradação, apresentam elevada relevância nas mais diversas áreas da ciência (LOFTSSON, MÁSSON e BREWSTER, 2004; LOFTSSON, HREINSDÓTTIR e MÁSSON, 2005; ZHANG *et al.*, 2015).

## **2 OBJETIVO**

O objetivo do presente trabalho foi obter e caracterizar a formação de complexos de inclusão entre rutina e as ciclodextrinas (HP $\beta$ CD e SBE $\beta$ CD), e avaliar o efeito sobre a estabilidade do flavonóide.

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Material**

Rutina (RUT) (98,8% de pureza), substância química de referência, foi adquirida da empresa Pharmanostra (Sunji Trading Company, China). HP $\beta$ CD (2-hidroxypropil-beta-ciclodextrina, Mw  $\approx$  1,460) foi adquirida da empresa Aldrich Chemistry. SBE- $\beta$ CD

(Captisol<sup>®</sup>, sulfobutileter-beta-ciclodextrina, sal de sódio, Mw  $\approx$  2,163) foi gentilmente cedida pela empresa Cydex Pharmaceuticals Inc (Lenexa, KS, USA). Foram utilizados metanol grau UHPLC-Supergradient (AppliChem Panreac ITW Companies, Germany) e água ultrapura Milli-Q<sup>®</sup> Integral (Merck Millipore, Germany).

## **3.2 Métodos**

### **3.2.1 Condições cromatográficas**

Utilizou-se cromatógrafo em fase líquida Shimadzu<sup>®</sup> mod. Prominense Modular HPLC composto por detector DAD SPD-20A UV, bomba LC-20AB, sistema de degaseificação DGU-20A, amostrador automático SIL-20A/C, sistema de aquecimento CTO-20AC, controlador CBM-20A e programa LC-Solution. As condições cromatográficas foram: metanol:água 88:12 (v/v), pH 6,8-7,0 como fase móvel; fluxo de 0,8 mL min<sup>-1</sup>; volume de injeção de 20,0  $\mu$ L em coluna cromatográfica de fase-reversa Kromasil<sup>®</sup> RP-C18 (100,0 A, 5,0  $\mu$ m, 250x4,6 mm) equilibrada à temperatura ambiente e eluída sob condições isocráticas em comprimento de onda 325 nm. A fase móvel foi previamente degaseificada por filtração à vácuo (bomba de vácuo KNF<sup>®</sup> mod. N810.FT.18, 100 mbar) em membrana semipermeável de acetato de celulose 45,0  $\mu$ m, seguida de sonicação (Altsonic<sup>®</sup> Clean mod. 9L) por 15,0 minutos. O método para quantificação da RUT, na ausência ou presença de CDs, foi previamente validado no **Capítulo I**.

### **3.2.2 Obtenção dos sistemas binários RUT:CD (HP $\beta$ CD ou SBE $\beta$ CD)**

Quantidades equimolares de RUT e CDs (HP $\beta$ CD ou SBE $\beta$ CD) foram pesadas, dispersas em metanol e água purificada, respectivamente, homogeneizadas em câmara incubadora com agitação orbital Solab<sup>®</sup> por 120,0 minutos e submetidas à secagem em liofilizador Liotop<sup>®</sup> L108. Os sistemas binários foram armazenados em dessecador Marconi<sup>®</sup> MA 192.

### **3.2.3 Caracterização dos sistemas binários RUT:CD (HP $\beta$ CD ou SBE $\beta$ CD)**

#### **3.2.3.1 Caracterização dos sistemas binários “em solução”**

##### **3.2.3.1.1 Ensaio de solubilidade da rutina**

A solubilidade intrínseca da RUT foi avaliada de acordo com o método descrito por Higuchi e Connors (1965). Excesso de RUT ( $\approx$  1,0 g) foi adicionado a um volume fixo (10,0 mL) de água purificada. As dispersões obtidas foram mantidas sob agitação em

câmara incubadora com agitação orbital Solab® mod. Shaker SL 222, por 72 horas, a temperatura  $37,0 \pm 5,0$  °C, filtradas em filtro de membrana com tamanho de poro de 0,45 µm, e quantificadas por cromatógrafo em fase líquida. O ensaio foi realizado em triplicata.

### **3.2.3.1.2 Ensaio de solubilidade de fases**

O ensaio de solubilidade de fases foi realizado segundo método descrito por Higuchi e Connors (1965): um excesso de rutina foi adicionado às soluções aquosas contendo concentrações crescentes de SBEβCD ou HPβCD (2,0 a 80,0 mmol L<sup>-1</sup>). As suspensões obtidas foram mantidas sob agitação em câmara incubadora com agitação orbital Solab® mod. Shaker SL 222, por 72 horas, à temperatura de  $37,0 \pm 5,0$  °C, filtradas em filtro de membrana de poro 0,45 µm, e quantificadas por meio de cromatógrafo em fase líquida. Os ensaios foram realizados em triplicata.

### **3.2.3.2 Caracterização dos sistemas binários “no estado sólido”**

#### **3.2.3.2.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)**

Curvas DSC foram obtidas por meio de sistema de calorimetria exploratória diferencial Shimadzu® mod. DSC-60, em cápsula de alumínio selada, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (100,0 mL min<sup>-1</sup>), razão de aquecimento de 10,0 °C min<sup>-1</sup>, massa de amostra entre 2,0 e 3,0 mg, e rampa de aquecimento de 40,0 – 600,0 °C. O equipamento foi previamente calibrado com índio metálico 99,99% ( $T_{\text{fusão}} = 156,4$  °C,  $\Delta H_{\text{fusão}} = 28,5$  J g<sup>-1</sup>). As curvas foram tratadas usando o programa TA-60WS.

#### **3.2.3.2.2 Análise Termogravimétrica (TG/DTG)**

Curvas termogravimétricas foram obtidas em sistema de termogravimetria diferencial Shimadzu® mod. DTG-60, em cápsula de alumínio, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (100,0 mL min<sup>-1</sup>), razão de aquecimento de 10,0 °C min<sup>-1</sup>, massa de amostra de 4,0 – 6,0 mg, e rampa de aquecimento de 40,0 – 900,0 °C. O equipamento foi previamente calibrado usando padrão de oxalato de cálcio monohidratado (ASTM 1582-93). As curvas obtidas foram tratadas usando o programa TA-60WS.



### 3.2.3.2.3 Difração de Raios-X de Pó (P-DRX)

Os difratogramas de raios-X de pó foram obtidos em difratômetro Bruker® modelo D8 ADVANCE, operando à 40 KV e 40 mA, com velocidade de varredura de  $2^\circ \text{ min}^{-1}$  ( $2\theta$ ), usando silício (Si) policristalino como padrão.

### 3.2.3.3 Ensaio de Fotoestabilidade

O ensaio de fotoestabilidade da RUT, e seus complexos de inclusão, foi realizado no estado sólido, e em etanol 96,0 °GL ( $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ), empregando câmara de fotoestabilidade Nova Ética (São Paulo, Brasil) mod. 424/CF, equipada com área de exposição de  $1380,0 \text{ cm}^2$  e fontes de luz conforme recomendações do ICH Q1B (2005) opção 2: lâmpada fluorescente branca associada à lâmpada UV com distribuição espectral entre 320 e 400 nm e emissão máxima de energia entre 350 e 370 nm. As amostras foram expostas a irradiação em diferentes intervalos de tempo (0,0; 1440,0; 4320,0; e 10080,0 segundos) à temperatura de  $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5$ . As amostras no estado sólido foram acomodadas em placas de Petri. As soluções etanólicas ( $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ) foram transferidas para ampolas de vidro tipo 1, transparente, de 10,0 mL, e, em seguida, hermeticamente fechadas. O teor de RUT remanescente nas amostras foi quantificado por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

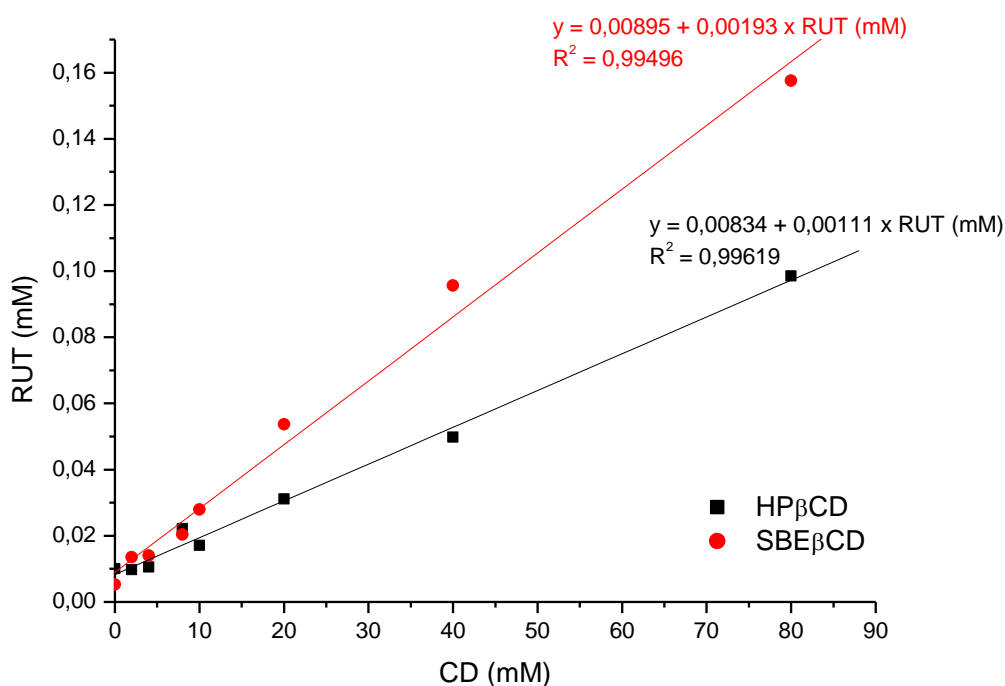
Autores relataram o efeito das CDs sobre os parâmetros cromatográficos (GAZPIO *et al.*, 2005; FENG *et al.*, 2012). Visando eliminar esses interferentes na quantificação da RUT, curvas analíticas foram construídas para RUT na presença das CDs (HP $\beta$ CD e SBE $\beta$ CD).

Relações lineares foram obtidas para a RUT no intervalo de 2,0 a  $64,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $r^2 = 0,99852$ ) segundo a equação  $\text{Abs} = -3608 + 17164 \times C$  ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), com valores de limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) de 0,0012 e  $0,0039 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Relações lineares foram obtidas para a RUT na presença de HP $\beta$ CD no intervalo de 2,0 a  $64,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $r^2 = 0,99852$ ) segundo a equação  $\text{Abs} = -8515,9 + 17346 \times C$  ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), com valores de limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) de 0,2766 e  $0,9220 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente; e a curva analítica da RUT na presença de SBE $\beta$ CD apresentou linearidade no intervalo de 2,0 a  $64,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $r^2 = 0,9995$ ) segundo

a equação  $Abs = -3728,3 + 17009 \times C$  ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), com valores de limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) de 0,2578 e 0,8595  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente.

O método de solubilidade de fases descrito por Higuchi e Connors (1965) é habitualmente utilizado como primeira verificação da formação de complexos de inclusão. Este método fundamenta-se na monitorização das alterações de solubilidade das moléculas hóspedes induzidas pela adição de quantidades crescentes de agentes solubilizantes, como as CDs. A capacidade de solubilização das CDs é, então, quantitativamente avaliada por meio de diagramas cuja forma é dependente do modelo de equilíbrio que se estabelece durante a formação dos complexos de inclusão (BREWSTER e LOFTSSON, 2007).

O ensaio de solubilidade de fases foi empregado para evidenciar o efeito da adição das CDs (HP $\beta$ CD e SBE $\beta$ CD) sobre a solubilidade da RUT (**Figura 3**). A **Tabela 1** descreve os valores de solubilidade intrínseca ( $S_0$ ) da RUT e solubilidade de intercepto ( $S_{int}$ ), coeficiente angular e coeficiente de determinação ( $R^2$ ) para os sistemas binários RUT:SBE $\beta$ CD e RUT:HP $\beta$ CD, obtidos a partir do diagrama de solubilidade de fases.



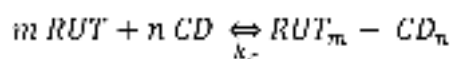
**Figura 3.** Diagrama de solubilidade de fases da RUT na presença de concentrações de HP $\beta$ CD e SBE $\beta$ CD (2,0 – 80,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ )

**Tabela 1.** Valores de solubilidade intrínseca ( $S_0$ ) da rutina (RUT), solubilidade do intercepto ( $S_{int}$ ), coeficiente angular e coeficiente de determinação ( $R^2$ )

Sistemas	$S_0$ (mg mL <sup>-1</sup> /mM)	$S_{int}$ (mM)	Coeficiente Angular	$R^2$
RUT	3,23/0,0053			
CB RUT: HPβCD		0,0083	0,0011	0,9962
CB RUT: SBEβCD		0,0089	0,0019	0,9950

A solubilidade intrínseca da RUT obtida foi 3,23 mg mL<sup>-1</sup> (0,0053 mM). Aumento linear da solubilidade da RUT foi observado em função do aumento da concentração das CDs (SBEβCD ou HPβCD), exibindo diagramas de solubilidade de fases do tipo AL, demonstrando a formação de complexos solúveis RUT:CDs.

Os valores de coeficiente angular obtidos a partir da regressão linear dos diagramas de solubilidade de fases para os sistemas binários estudados apresentaram valores inferiores a 1, assumindo estequiometria 1:1. A partir da formação dos sistemas binários 1:1, ou seja, de primeira ordem relativo às CDs (n=1), e de ordem 1, relativo à RUT (m=1), tem-se a situação representada pelo equilíbrio químico representado a seguir: (BREWSTER e LOFTOSSON, 2007):



sendo o valor de  $k_c$  é determinado a partir da equação de Higuchi e Connors (1965).

A constante de estabilidade aparente  $k_c$  pode ser calculada de acordo com Higuchi e Connors (1965) a partir de porção linear do diagrama de solubilidade, de acordo com a **Equação 1:**

$$k_c = \frac{\text{coeficiente angular}}{S_0 (1 - \text{coeficiente angular})} \quad \text{(Equação 1)}$$

onde  $k_c$  é a constante de estabilidade e  $S_0$  é a solubilidade intrínseca da molécula hóspede.

A eficiência de complexação ( $EC$ ) é calculada a partir do coeficiente angular do diagrama de solubilidade de fases, de acordo com a **Equação 2** (LOFTSSON, MÁSSON e BREWSTER, 2004):

$$EC = \frac{[F/CD]}{[CD]} = S_0 k_c = \frac{\text{coeficiente angular}}{1 - \text{coeficiente angular}} \quad \text{(Equação 2)}$$

onde  $[F/CD]$  é a concentração do complexo dissolvido,  $[CD]$  é a concentração de ciclodextrina livre dissolvida e o *coeficiente angular* obtido à partir do diagrama de solubilidade de fases.

A  $EC$  é usada para calcular a razão molar ( $RM$ ) entre a substância hóspede e a ciclodextrina ( $CD$ ), empregando-se a **Equação 3** (KURKOV e LOFTSSON, 2013; LOFTSSON, MÁSSON e BREWSTER, 2004):

$$RM = 1: \left(1 + \frac{1}{EC}\right) \quad \text{(Equação 3)}$$

onde  $RM$  é a razão molar, e  $EC$  é a eficiência de complexação.

Para substâncias que apresentam solubilidade superior a 1 mM, os valores de solubilidade intrínseca ( $S_0$ ) devem ser iguais aos valores de solubilidade do intercepto ( $S_{int}$ ) definido pelo coeficiente angular da equação da reta. Para substâncias com solubilidade intrínseca ( $S_0$ ) inferior a 0,1 mM, um desvio negativo da solubilidade intrínseca é observado (LOFTSSON, HREINSDÓTTIR e MÁSSON, 2005). No intuito de não agregar erros advindos da construção da reta e da determinação de sua equação, o valor de  $S_0$  obtido experimentalmente foi empregado para o cálculo da constante de estabilidade do complexo ( $k_c$ ) (KURKOV e LOFTSSON, 2013).

Considerando que o valor de  $k_c$  pode variar, segundo método de determinação, Loftsson, Hreinsdóttir e Másson (2005) propuseram o cálculo da eficiência de complexação ( $EC$ ), que é obtida a partir do coeficiente angular do diagrama de solubilidade de fases, sendo o seu valor independente do valor de solubilidade intrínseca da substância (LOFTSSON, HREINSDÓTTIR e MÁSSON, 2005; LOFTSSON,

HREINSDÓTTIR e MÁSSON, 2007; LOFTSSON e DUCHÊNE, 2007). A partir do valor de EC é possível determinar a relação molécula hóspede/hospedeira obtida na complexação e o acréscimo de massa na molécula hóspede.

A **Tabela 2** apresenta os valores de constante de estabilidade ( $k_c$ ), eficiência de complexação (EC) e incremento de solubilidade (IS) calculadas a partir dos diagramas de solubilidade de fases.

**Tabela 2.** Valores de constante de estabilidade ( $k_c$ ), eficiência de complexação (EC) e incremento de solubilidade (IS)

Sistemas	$k_c$ (M <sup>-1</sup> )	EC	IS
CB RUT:HP $\beta$ CD	210,72	0,0011	4,13x
CB RUT:SBE $\beta$ CD	366,68	0,0019	4,38x

A constante de estabilidade dos complexos ( $k_c$ ) indica a afinidade da molécula hóspede (RUT) pela CD. Assim, quanto maior o valor de  $k_c$ , maior será a facilidade de formação dos complexos de inclusão (WEN, LIU e ZHU, 2005; LOFTSSON, HREINSDÓTTIR, MÁSSON, 2005; LOFTSSON, HREINSDÓTTIR, MÁSSON, 2007; LOFTSSON e DUCHÊNE, 2007; KURKOV e LOFTSSON, 2013). Segundo Pitha e colaboradores (1983), complexos de inclusão com valores de  $k_c$  entre 200,0 e 5000,0 M<sup>-1</sup> apresentam aplicações práticas; complexos de inclusão com valores inferiores a 200,0 M<sup>-1</sup> são considerados lábeis, levando à liberação prematura da molécula hóspede e, os com valores de  $k_c$  muito elevados, originam a liberação retardada ou incompleta da molécula hóspede. Contudo, Rama e colaboradores (2005) consideram adequados valores  $k_c$  entre 100,0 e 1000,0 M<sup>-1</sup>.

Os valores de  $k_c$  observados para os sistemas binários (CB RUT:HP $\beta$ CD e CB RUT:SBE $\beta$ CD) apresentaram-se adequados (RAMA *et al.*, 2005). Os valores de EC apresentaram-se reduzidos e a razão molar de complexação indicou que, em média, para cada molécula da rutina são necessárias 900,0 moléculas de HP $\beta$ CD presentes no meio para formação do complexo. No entanto para a SBE $\beta$ CD, para cada molécula de RUT são necessárias 518,0 moléculas da CD, comprovando a maior facilidade de formação de complexos de inclusão entre a RUT e SBE $\beta$ CD. Autores corroborando com os resultados obtidos. Lederer e Leipzing-Pagani (1996) estudaram a complexação da rutina com  $\beta$ CD e concluíram que é viável a formação de complexos de inclusão na proporção estequiométrica 1:1. Calabro e colaboradores (2005) demonstraram as interações entre a RUT e a  $\beta$ CD por meio de ressonância magnética nuclear (<sup>1</sup>H-RMN). Miyake e

colaboradores (2000) observaram aumento da solubilidade e da bioatividade da RUT com HP $\beta$ CD.

Nguyen e colaboradores (2013) estudaram a formação de complexos de inclusão entre a rutina e quatro CDs ( $\beta$ CD, HP $\beta$ CD, HP $\alpha$ CD e HP $\gamma$ CD); diagramas de solubilidade de fases tipo A<sub>L</sub> foram obtidos para todos os complexos; os valores de  $k_c$  observados foram, 405,3; 390,6; 250,3; e 24,3 M<sup>-1</sup>, respectivamente. Tais resultados podem ser explicados, parcialmente, pela diferença no tamanho da cavidade das CDs. Os autores ainda relataram que o valor da constante de estabilidade dos complexos ( $k_c$ ) é influenciado pela temperatura de obtenção dos sistemas.

Para avaliar o incremento da solubilidade (IS) obtido pela formação dos complexos de inclusão, a solubilidade intrínseca da RUT foi comparada à solubilidade dos sistemas binários obtidos por liofilização na razão molar 1:1 (**Tabela 2**).

Apesar da eficiência de complexação baixa, considerável incremento de solubilidade foi observado. O maior incremento da solubilidade no CB RUT:SBE $\beta$ CD pode ser atribuído à capacidade da CD fazer interações eletrostáticas além das interações hidrofóbicas, aumentando a estabilidade e solubilidade dos complexos de inclusão (HUANG *et al.*, 2013).

A forma mais simples e comum na formação dos complexos de inclusão ocorre por meio da inserção da molécula hóspede na cavidade hidrófoba da CD, porém, existem outras formas de associação entre as CD e outras moléculas. De forma análoga ocorre com oligossacarídeos e polissacarídeos não-cíclicos (BREWSTER e LOFTSSON, 2007) por meio da formação de pontes de hidrogênio com os grupos hidroxilas, localizados na superfície externa do anel das CDs. Tanto as CDs isoladas, como os complexos de inclusão podem formar agregados que tem a capacidade de alterar a solubilidade aquosa de moléculas hidrófobas pelo mecanismo semelhante à formação de micelas (LOFTSSON, HREINSDÓTTIR, MÁSSON, 2005; LOFTSSON e DUCHÊNE, 2007).

Vale ressaltar que o método utilizado na obtenção dos complexos binários não pode ser descartado como um fator adicional que contribui para o incremento da solubilidade dos complexos; o processo de liofilização, promove a formação de complexos porosos, normalmente mais solúveis quando comparados aos complexos obtidos por malaxagem ou coevaporação (RIBEIRO *et al.*, 2003).

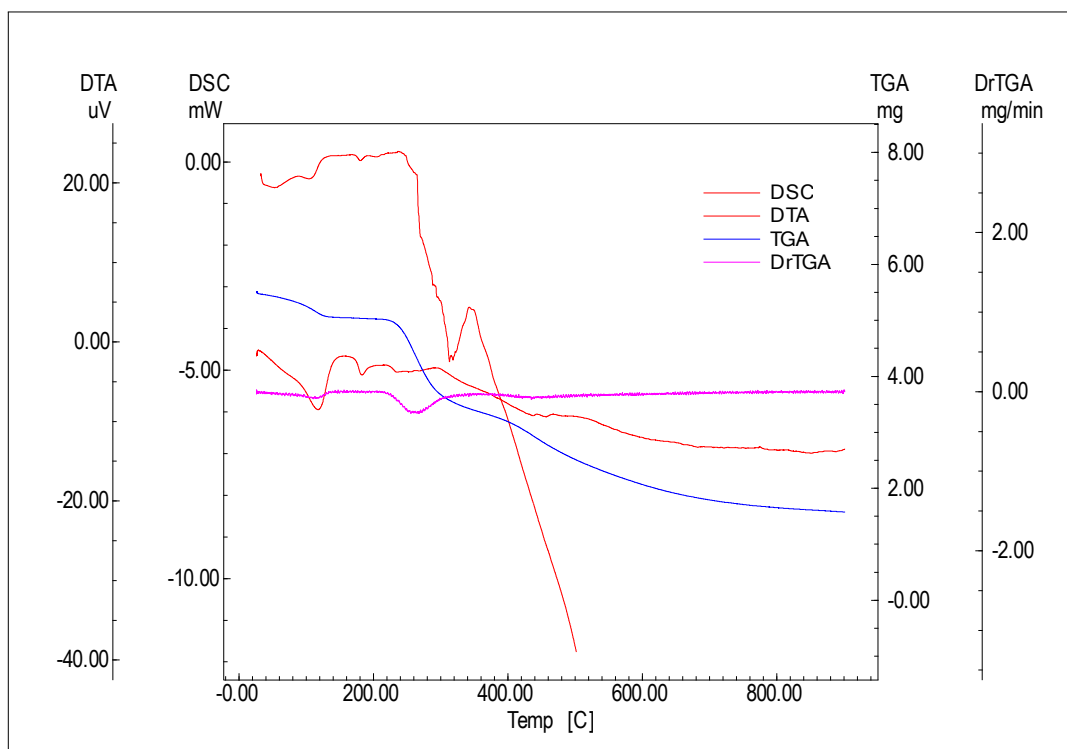
A formação dos complexos de inclusão em solução não garante, necessariamente, a sua obtenção e isolamento no estado sólido, uma vez que estes resultam de um conjunto de equilíbrios químicos, podendo ser uma mistura de complexos

de inclusão, fármaco não complexado, e fármaco e ciclodextrinas livres (KURKOV e LOFTSSON, 2013).

A investigação da formação de complexos de inclusão no estado sólido pode ser realizada por diversas técnicas. Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria/termogravimetria derivada (TG/DTG) tem sido frequentemente utilizadas na investigação da formação de complexos de inclusão no estado sólido (KURKOV e LOFTSSON, 2013; LOFTSSON e DUCHÊNE, 2007).

As propriedades térmicas das amostras RUT, CDs (HP $\beta$ CD e SBE $\beta$ CD), mistura físicas (RUT:HP $\beta$ CD e RUT:SBE $\beta$ CD) e complexos binários (RUT:HP $\beta$ CD e RUT:SBE $\beta$ CD), investigadas por DSC e TG/DTG, estão apresentados na **Tabela 3**.

A curva DSC da RUT demonstrou evento endotérmico de fusão em 283,83 °C ( $\Delta H = 2,54 \text{ J g}^{-1}$ ), correspondente ao seu ponto de fusão, seguido de decomposição. As curvas TG/DTG da RUT evidenciaram decomposição em quatro etapas: a primeira, em 26,43 °C ( $\Delta_m = 8,00\%$ ) e segunda etapas 140,34 °C ( $\Delta_m = 25,89\%$ ), associadas à perda de água superficial da molécula, tornando-se uma molécula anidra; seguida da terceira etapa, em 306,56 °C ( $\Delta_m = 20,54\%$ ), atribuída à decomposição do material; e, finalmente, a última etapa, em 506,08 °C ( $\Delta_m = 16,46\%$ ), referente à carbonização da molécula (**Figura 4, Tabela 3**).



**Figura 4.** Curva DSC, DTA e TG/DTG da rutina obtidos sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (100,0 mL min<sup>-1</sup>) e razão de aquecimento de 10,0 °C min<sup>-1</sup>

**Tabela 3.** Dados termodinâmicos obtidos a partir das curvas DSC e TG/DTG da RUT, CDs (HP $\beta$ CD e SBE $\beta$ CD), misturas físicas (MF RUT:CD) e complexos de binários (CB RUT:CD)

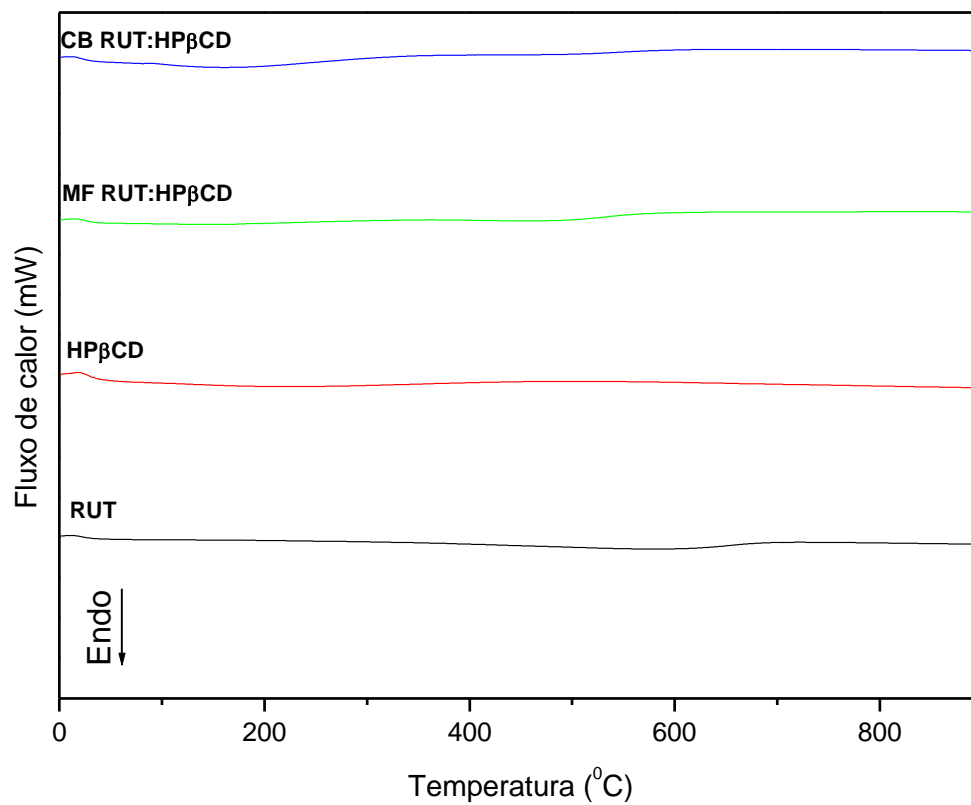
	DSC		TG < 100°C	TG		
	T <sub>pico</sub> °C	$\Delta H$ (J g <sup>-1</sup> )		T <sub>onset</sub> °C		$\Delta m$ (%)
RUT	283,93	2,54	4,93	26,43/140,34/306,56/506,08		8,00/25,89/20,54/16,43
<b>CD</b>						
HP $\beta$ CD			2,88	27,34/121,83		3,11/91,84
SBE $\beta$ CD			5,33	28,55/148,64/316,19/446,75		7,88/22,14/26,81/14,28
<b>MF RUT:CD</b>						
RUT:HP $\beta$ CD			4,89	29,00/161,31/376,63		6,18/65,14/2,46
RUT:SBE $\beta$ CD			4,93	27,38/172,32/332,86/506,47		7,81/24,27/24,03/13,97
<b>CB RUT:CD</b>						
RUT:HP $\beta$ CD			2,43	31,05/140,37/360,78		5,10/68,77/16,57
RUT:SBE $\beta$ CD			4,48	27,06/164,39/336,42/485,81		9,12/25,14/24,79/14,38

\*T<sub>pico</sub> (temperatura do pico, °C), T<sub>onset</sub> (temperatura inicial do pico, °C),  $\Delta H$  (perda de massa em J/g, mW/mg, %),  $\Delta m$  (perda de massa, %)

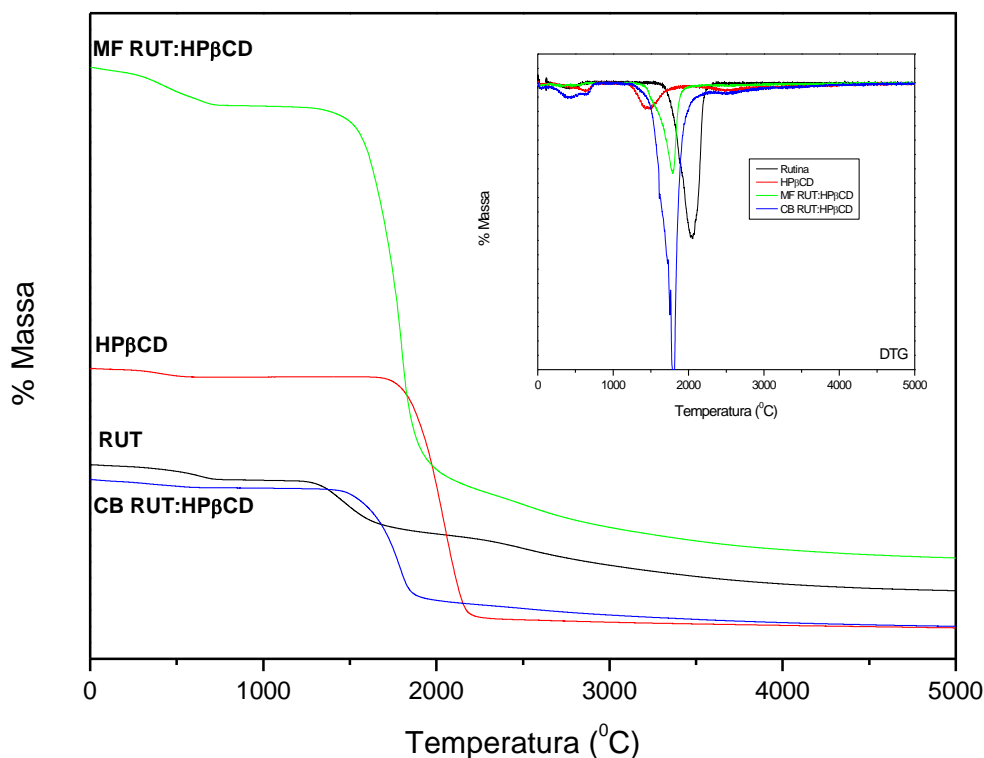
Segundo Costa e colaboradores (2002), a RUT apresenta quatro estágios de decomposição entre os intervalos de temperaturas entre 25,0 – 139,0 °C, 139,0 – 304,0 °C, 304,0 – 511,0 °C e 511,0 – 892,0 °C; as duas primeiras etapas estão relacionadas com a perda de duas moléculas de água, tornando-se assim uma molécula anidra; a presença de polimorfos na RUT também é sugerida pelos autores. A decomposição térmica da RUT ocorreu em quatro etapas. A primeira etapa (< 134,0 °C) foi atribuída à perda de água superficial da molécula. Entre 134,0 e 333,0 °C observou-se um evento endotérmico atribuído à perda de duas moléculas de água, tornando-se anidra; finalmente, a partir desta temperatura observou-se a decomposição da molécula, com formação de efervescência (ZHANG *et al.*, 2015).

As curvas DSC e TG/DTG da RUT, HP $\beta$ CD, mistura física 1:1 (p/p) RUT:HP $\beta$ CD e do complexo de inclusão RUT:HP $\beta$ CD obtidos na razão molar 1:1 são apresentados nas **Figuras 5 e 6 e Tabela 3.**





**Figura 5.** Curvas DSC da rutina (RUT), ciclodextrina (HP $\beta$ CD), misturas físicas 1:1 (p/p) (MF RUT:HP $\beta$ CD) e complexo de inclusão (CB RUT:HP $\beta$ CD), obtidos sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (100,0 mL min<sup>-1</sup>) e razão de aquecimento de 10,0 °C min<sup>-1</sup>



**Figura 6.** Curva TG/DTG da rutina (RUT), ciclodextrina (HPβCD), mistura física 1:1 (p/p) (MF RUT:HPβCD) e complexo de inclusão (CB RUT:HPβCD), obtidas sob atmosfera dinâmica de nitrogênio e razão de aquecimento 10,0 °C.min<sup>-1</sup>

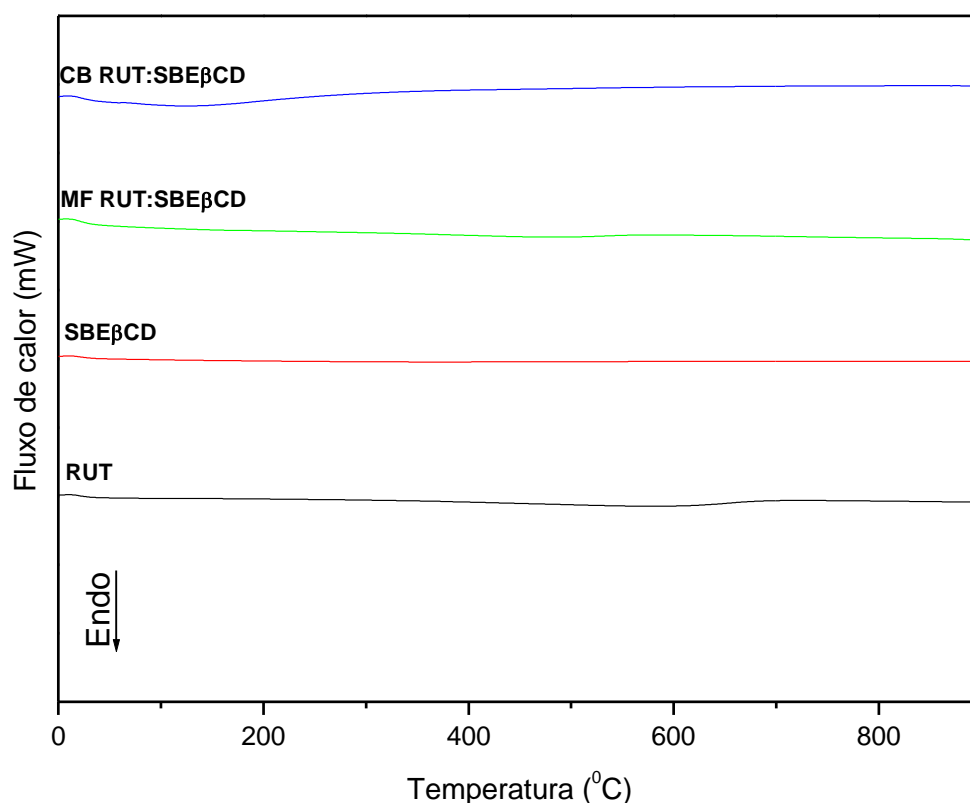
A curva DSC da HPβCD apresentou um evento endotérmico em aproximadamente 60,0 °C ( $\Delta H = 115,35 \text{ J g}^{-1}$ ), relativo à desidratação do material, seguido de eventos térmicos irregulares atribuídos à decomposição. A curva TG/DTG da HPβCD demonstrou decomposição em duas etapas: a primeira em 27,34 °C ( $\Delta m = 3,11\%$ ), relativa à desidratação da molécula, seguida de decomposição em 121,83 °C ( $\Delta m = 91,84\%$ ) (**Tabela 3**).

A curva DSC da mistura física RUT:HPβCD 1:1 (p/p) o evento térmico característico da fusão da RUT (283,93 °C), foi suprimido indicando a provável interação entre a RUT e CD em questão. A curva TG/DTG da mistura física RUT:HPβCD apresentou decomposição térmica em três etapas: a primeira entre 29,00 °C ( $\Delta m = 6,18\%$ ), referente à desidratação do material; a segunda entre 161,31 °C ( $\Delta m = 65,14\%$ ) e, a terceira, correspondem a uma decomposição entre 376,63 °C ( $\Delta m = 2,46\%$ ) (**Tabela 3**).

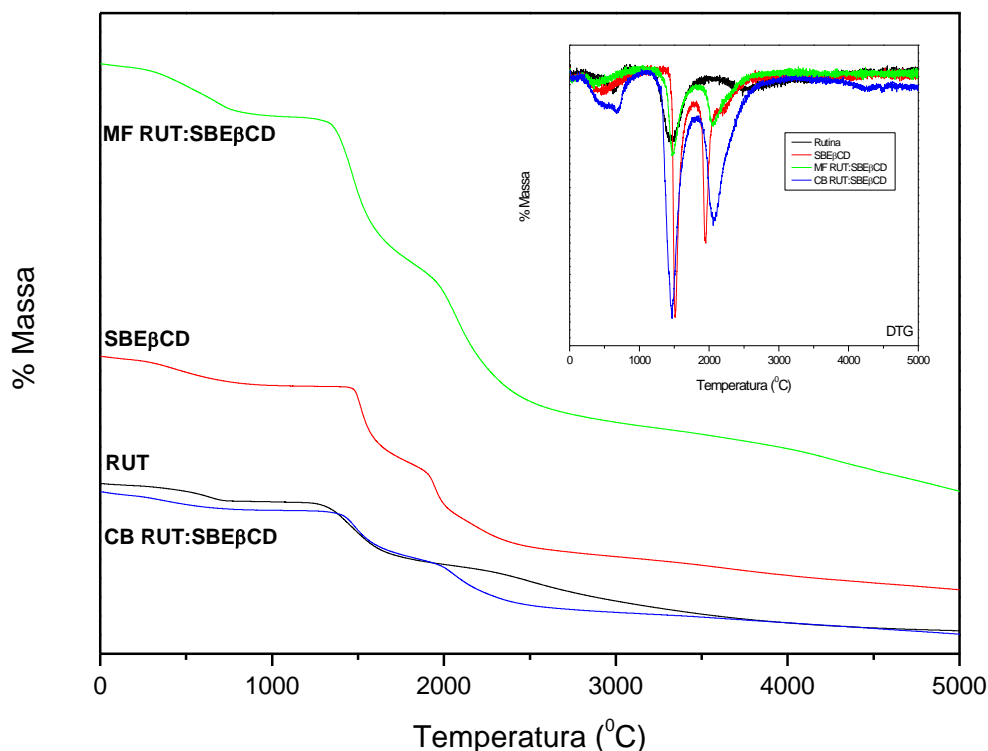
O evento térmico característico da fusão da RUT em 283,93 °C ( $\Delta H = 2,54 \text{ J g}^{-1}$ ) também foi suprimido na curva DSC do sistema binário RUT:HPβCD. A curva TG/DTG do

complexo binário RUT:HP $\beta$ CD demonstrou comportamento térmico semelhante à HP $\beta$ CD, com decomposição térmica em três etapas: a primeira entre 31,05 °C ( $\Delta m = 5,10\%$ ) e, a segunda, entre 140,37 °C ( $\Delta m = 68,77\%$ ) e, a terceira, 360,78 °C ( $\Delta m = 16,57\%$ ). Os resultados de DSC e TG/DTG sugerem a formação de complexos de inclusão (**Tabela 3**).

As curvas DSC e TG/DTG da RUT, SBE $\beta$ CD, da mistura física 1:1 (p/p) (MF RUT:SBE $\beta$ CD) e do complexo de inclusão (CB RUT:SBE $\beta$ CD) obtido na razão molar 1:1, são ilustrados nas **Figuras 7 e 8 e Tabela 3**.



**Figura 7.** Curvas DSC da rutina (RUT), ciclodextrina (SBE $\beta$ CD), misturas físicas 1:1 (p/p) (MF RUT:SBE $\beta$ CD) e complexo de inclusão (RUT:SBE $\beta$ CD), obtidos sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (100,0 mL.min<sup>-1</sup>) e razão de aquecimento de 10,0 °C min<sup>-1</sup>



**Figura 8.** Curva TG/DTG da rutina (RUT), ciclodextrina (SBE $\beta$ CD), mistura física 1:1 (MF RUT:SBE $\beta$ CD) e complexo de inclusão (CB RUT:SBE $\beta$ CD), obtidas sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> e razão de aquecimento 10,0 °C.min<sup>-1</sup>

A curva DSC da SBE $\beta$ CD apresentou comportamento térmico estável, com amplo evento em 68,0 °C, atribuído à sua desidratação, seguido de evento endotérmico de até a 277,19 °C, referente à sua decomposição. A curva TG/DTG da SBE $\beta$ CD apresentou decomposição térmica em várias etapas consecutivas: a primeira, em 28,55 °C ( $\Delta m = 7,88\%$ ), referente à desidratação do material; seguida de eventos térmicos em 148,64 °C ( $\Delta m = 22,14\%$ ), 316,19 °C ( $\Delta m = 26,81\%$ ), e, 446,75 °C ( $\Delta m = 14,28\%$ ), referentes à decomposição da substância (**Tabela 3**).

A curva DSC da mistura física RUT:SBE $\beta$ CD apresentou comportamento térmico representativo da somatória das substâncias. A curva TG/DTG desta mistura física demonstrou decomposição térmica em quatro etapas: a primeira em 27,38 °C ( $\Delta m = 7,81\%$ ), referente à desidratação; a segunda e terceira etapas ocorreram em 172,32 °C ( $\Delta m = 24,27\%$ ) e 332,86 °C ( $\Delta m = 24,03\%$ ) respectivamente; seno a última etapa correndo em 506,47 °C ( $\Delta m = 13,97\%$ ), correspondente à decomposição do material (**Tabela 3**).

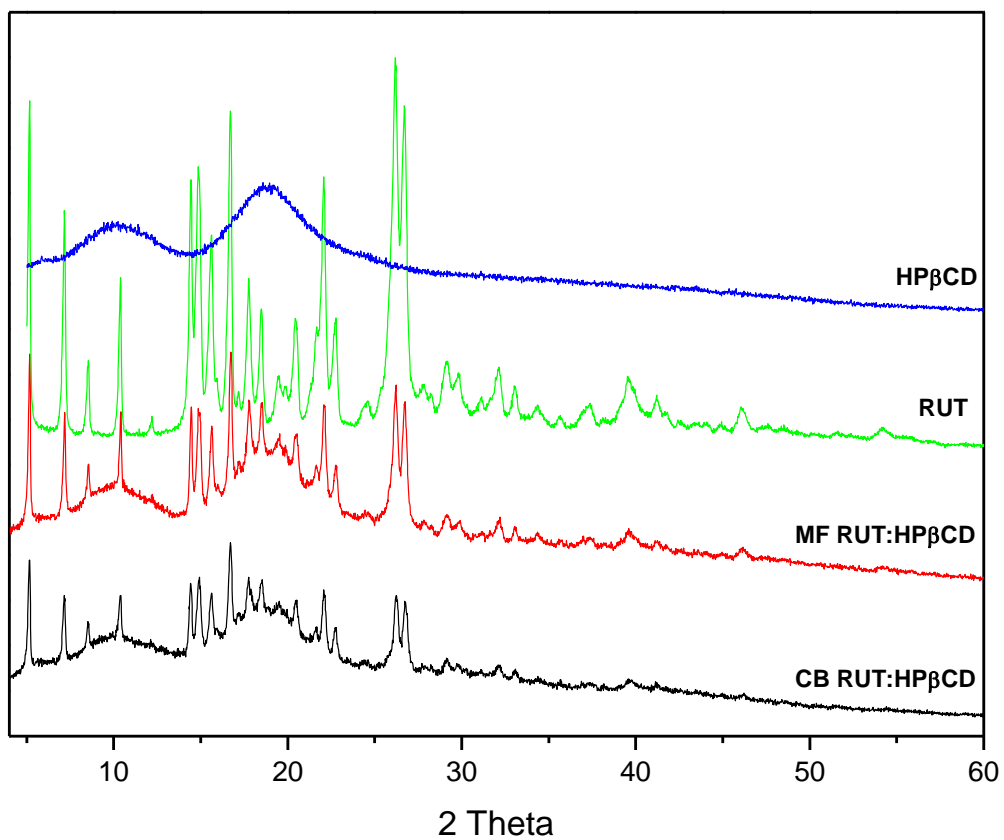
A curva DSC do sistema binário RUT:SBE $\beta$ CD não apresentou o evento característico da RUT, sugerindo a formação do complexo de inclusão RUT: SBE $\beta$ CD. A curva TG/DTG do sistema binário apresentou decomposição térmica em quatro etapas: a primeira em 27,06 °C ( $\Delta m = 9,12\%$ ), referente à desidratação; a segunda etapa em 164,39 °C ( $\Delta m = 25,14\%$ ); terceira, em 336,42 °C ( $\Delta m = 24,79\%$ ) e a última etapa em 485,81 °C ( $\Delta m = 14,38\%$ ) (**Tabela 3**).

Um método indireto para avaliar a quantidade de substância no interior das CDs pode ser obtido comparando a quantidade de água na CD e nos complexos. Na formação dos complexos há a substituição das moléculas de água do interior da cavidade da CD pela molécula-hóspede. A análise termogravimétrica dos complexos, bem como das CDs, entre a temperatura ambiente e temperatura inferior a 100 °C permite avaliar a liberação da água do interior da cavidade da CD e sua substituição pela molécula-hóspede (AMMAR *et al.*, 2006; MORIWAKI *et al.*, 2007; HADARUGA, HADARUGA e ISENGARD, 2012). Quando ocorre a formação de complexos de inclusão, espera-se que o evento de fusão da molécula hóspede desapareça (AL OMARI *et al.*, 2009) ou que diminua, acontecendo uma complexação parcial (AL-MARZOUQI *et al.*, 2007).

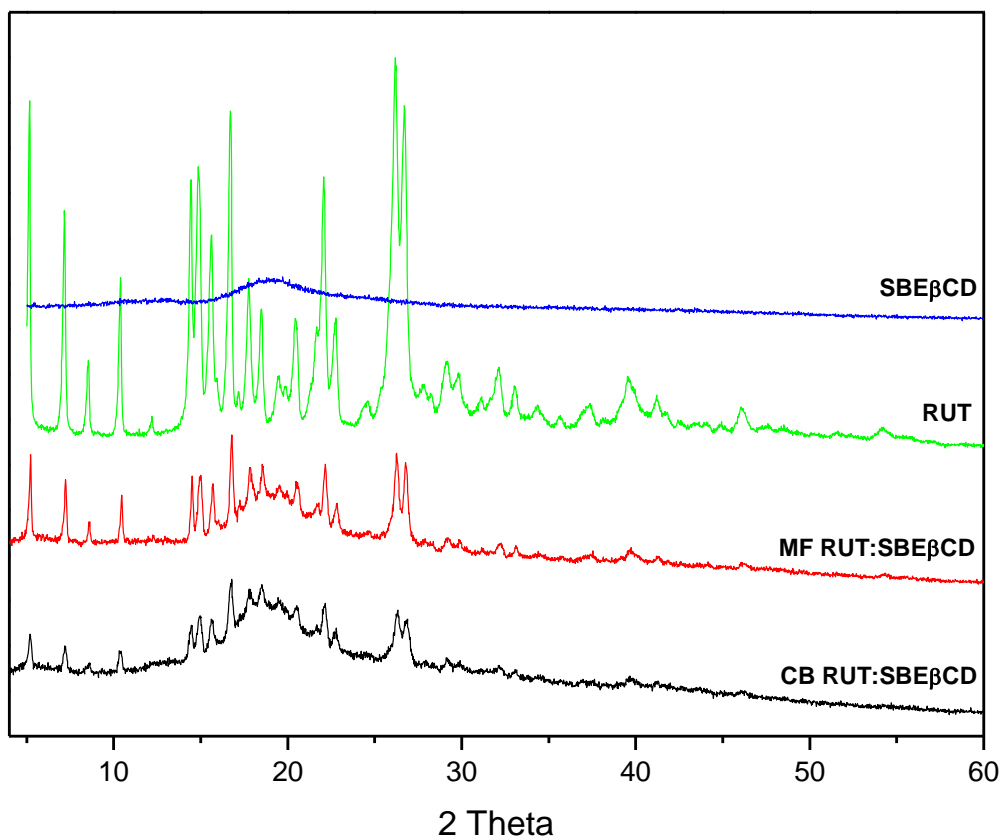
As perdas de massas relativas para a perda de água para as CDs – HP $\beta$ CD e SBE $\beta$ CD - em temperatura inferior a 100 °C foram 2,88 e 5,33%, respectivamente; para as misturas físicas (RUT:HP $\beta$ CD e RUT:SBE $\beta$ CD) foram 4,89 e 4,93%, respectivamente; para os sistemas binários (RUT:HP $\beta$ CD e CB RUT:SBE $\beta$ CD) 2,43 e 4,48%, respectivamente. As misturas físicas e os sistemas binários apresentaram redução da água ligada no interior da cavidade da CDs, sugerindo a substituição das moléculas de água, e a interação da RUT com as CDs.

Os difratogramas da RUT, HP $\beta$ CD, mistura física RUT:HP $\beta$ CD e complexo binário RUT:HP $\beta$ CD são apresentados na **Figura 9**. Os difratogramas da RUT, SBE $\beta$ CD, mistura física RUT:SBE $\beta$ CD e complexo binário RUT:SBE $\beta$ CD são apresentados na **Figura 10**.

O difratograma da RUT evidenciou reflexões intensas em 5,12°; 16,6°; 22,0°; 26,1° e 26,8° ( $2\theta$ ), características da cristalinidade da substância. Os difratogramas das CDs - HP $\beta$ CD e SBE $\beta$ CD - apresentaram comportamento amorfo. Os difratogramas das misturas físicas obtidas entre a RUT e CDs (HP $\beta$ CD e SBE $\beta$ CD) demonstram reflexões características da RUT, indicando a presença da substância livre no meio. As reflexões relativas à RUT não foram totalmente suprimidas nos difratogramas dos sistemas binários (CB RUT:HP $\beta$ CD e CB RUT:SBE $\beta$ CD), indicando a presença de RUT livre.

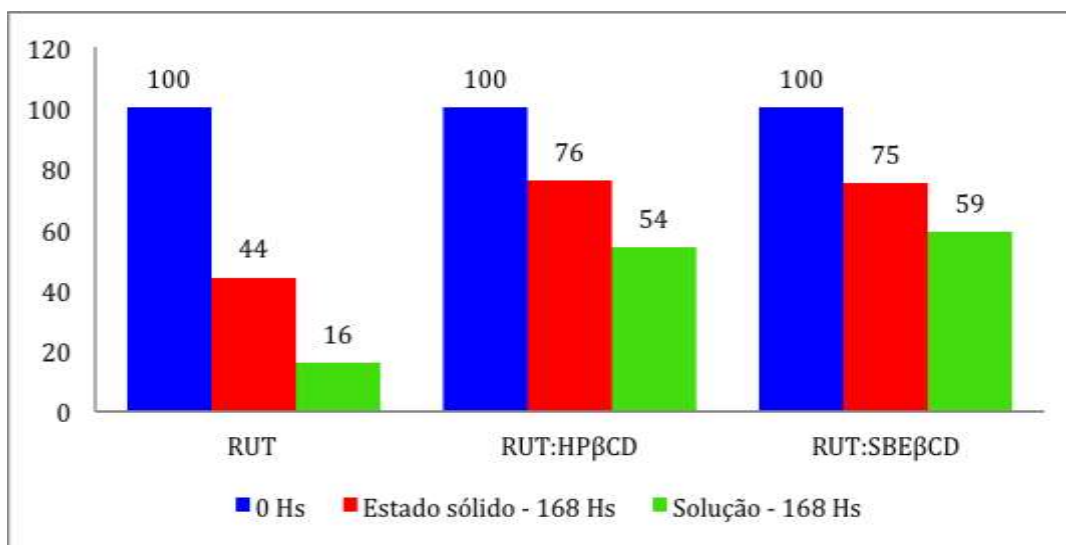


**Figura 9.** Difratogramas obtidos para a rutina (RUT), mistura física 1:1 (p/p) (MF RUT:HPβCD) e sistema binário (CB RUT:HPβCD) obtidos a 40 KV e 40 mA, com velocidade de varredura de  $2^{\circ} \text{ min}^{-1}$  (2 theta)



**Figura 10.** Difratoogramas obtidos para a rutina (RUT), mistura física (MF RUT:SBE $\beta$ CD) e sistema binário (CB RUT:SBE $\beta$ CD) obtidos a 40 KV e 40 mA, com velocidade de varredura de 2° min<sup>-1</sup> (2 theta)

A fotoestabilidade da RUT, na ausência e presença de CDs (HP $\beta$ CD e SBE $\beta$ CD), foi monitorada no estado sólido e em solução etanólica (1,0 mg mL<sup>-1</sup>) (**Figura 11**).



**Figura 11.** Degradação da rutina (RUT) e dos complexos binários RUT:HPβCD e RUT:SBEβCD, em estado sólido e na forma de solução etanólica, após radiação UV por um período de até 168,0 horas

A presença das CDs - HPβCD e SBEβCD – apresentaram significativo efeito sobre a velocidade de degradação da RUT, tanto no estado sólido, como em solução. Após 168,0 horas de irradiação das amostras em estado sólido, o conteúdo remanescente foi 44,0; 76,0 e 75,0% para substância química de referência (RUT), CB RUT:HPβCD e CB RUT:SBEβCD, respectivamente. Para as amostras armazenadas em solução etanólica o conteúdo remanescente foi de 16,0; 54,0 e 59,0% para substância química de referência (RUT), CB RUT:HPβCD e CB RUT:SBEβCD, respectivamente. Tais resultados demonstram que a formação de complexos de inclusão da RUT com as CDs (HPβCD e SBEβCD) elevaram a estabilidade fotoquímica da substância (BREWSTER e LOFTSSON, 2007), sendo este efeito melhor observado para os complexos com SBEβCD.

## 5 CONCLUSÕES

Os ensaios de solubilidade de fases demonstraram que RUT e as CDs (HPβCD e SBEβCD) formam complexos de inclusão estáveis, de estequiometria 1:1. Os complexos de inclusão RUT:CDs foram capazes de aumentar consideravelmente a solubilidade da RUT, em mais de quatro vezes nos dois complexos obtidos (CB RUT:HPβCD e CB RUT:SBEβCD). As curvas DSC e os difratogramas de raios-x indicam a formação de complexos de inclusão entre a RUT e as CDs (HPβCD e SBEβCD), entretanto a complexação é parcial, visto que a presença de RUT livre é observada. A formação do



complexo de inclusão foi capaz de retardar com eficiência a fotodegradação da RUT quando exposta à radiação UV.

## 6 REFERÊNCIAS

AL OMARI, M. M.; EL-BARGHOUTHIL, M. I.; ZUGHUL, M. B.; DAVIES, J. E. D. Dipyridamole/ $\beta$ -cyclodextrin complexation: Effect of buffer species, thermodynamics and guest-host interactions probed by  $^1\text{H-NMR}$  and molecular modeling studies. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v.64, n.3-4, p.305-315, 2009.

AL-MARZOUQI, A. H.; JOBE, B.; DOWAIDAR, A.; MAESTRELLI, F.; MURA, P. Evaluation of supercritical fluid technology as preparative technique of benzocaine – cyclodextrin complexes – Comparison with conventional methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.43, n.2, p.566-574, 2007.

AMMAR, H. O.; SALAMA, H. A.; GHORAB, M.; MAHMOUD, A. A. Formulation and biological evaluation of glimepiride-cyclodextrin-polymer systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 309, n.1-2, p.129-138, 2006.

BABY, A. R.; HAROUTIOUNIAN-FILHO, C. A.; SARRUF, F. D.; TAVANTE-JÚNIOR, C. R.; PINTO, C. A. S. O.; ZAGUE, V.; ARÊAS, E. P. G.; KANEKO, T. M.; VELASCO, M. V. R. Estabilidade e estudo de penetração cutânea *in vitro* da rutina veiculada em uma emulsão cosmética através de um modelo de biomembrana alternativo. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.44, n.2, p. 233-248, 2008a.

BABY, A. R.; SANTORO, D. M.; VELASCO, M. V. R.; SERRA, C. H. R. Emulsified systems based on glyceryl monostearate and potassium cetyl phosphate: scale-up and characterization of physical properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v.361, n.1-2, p.99-103, 2008b.

BEKERS, O.; UIJTENDAAL, E. V.; BEIJNEN, J. H.; BULT, A.; UNDERBERG, W. J. M. Cyclodextrins in the pharmaceutical field. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.17, n.11, p.1503-1549, 1991.

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

BREWSTER, M. E.; VANDECRUYS, R.; PEETERS, J.; NEESKENS, P.; VERRECK, G.; LOFTSSON, T. Comparative interaction of 2-hydroxypropil- $\beta$ -cyclodextrin and sulfobutylether- $\beta$ -cyclodextrin with itraconazole: Phase-solubility behavior and stabilization of supersaturated drug solution. **European Journal of Pharmaceutical Science**, v.34, n.2-3, p.94-103, 2008.

CALABRÓ, M. L.; TOMMASINI, S.; DONATO, P.; STANCANELLI, R.; RANERI, D.; CATANIA, S.; COSTA, C.; VALARI, V.; FICARRA, P.; FICARRA, R. The rutin/ $\beta$ -cyclodextrin interactions in fully aqueous solution: spectroscopic studies and biological assays. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.36, n.5, p.1019-1027, 2005.

COSTA, E. M.; FILHO, J. M. B.; NASCIMENTO, T. G.; MACÊDO, R. O. Thermal characterization of the quercetin and rutin flavonoids. **Thermochimica Acta**, v.392-393, p.79-84, 2002.

DAVIS, M. E.; BREWSTER, M. E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: Past, present and future. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.3, n.12, p.1023-1035, 2007.

FENG, B.; JIN, J.; WANG, C.; YANG, G.; ZENG, A. Analysis and retention behavior of isoflavone glycosides and aglycones in Radix Astragali by HPLC with hydroxy  $\beta$ -cyclodextrin as a mobile phase additive. **Journal of Separation Science**, v.35, n.24, p.3469-3476, 2012.

FULOP, Z.; SAOKHAM, P.; LOFTSSON, T. Sulfobutylether- $\beta$ -cyclodextrin/chitosan nano- and microparticles and their physicochemical characteristics. **International Journal of Pharmaceutics**, v.472, n.1-2, p.282-287, 2014.

GAZPIO, C.; SÁNCHEZ, M.; FÁRCIA-ZUBIRI, I.X.; VÉLAZ, I.; MARTINEZ-OHÁRRIZ, C.; MARTÍN, C.; ZORNOZA, A. HPLC and solubility study of the interaction between pindolol and cyclodextrin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.37, n.3, p.487-492, 2005.

GUEDES, F.L.; ALVES, G.M.C.; SANTOS, F.L.A.; LIMA, L.F.; ROLIM, L.A.; NETO, P.J.R. Cyclodextrins: as a technological adjuvante to improve drugs' bioavailability. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 89, n.3, p.220-225, 2008.

HADARUGA, N.G.; HADARUGA, D.I.; ISENGARD, H-D. Water content of natural cyclodextrin and their essential oil complexes: A comparative study between Karl Fischer titration and thermal. **Food Chemistry**, v.132, n.4, p.1741-1748, 2012.

HIGUCHI, T.; CONNORS, A.K. Phase-solubility techniques. **Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation**, v.4, p.117-212, 1965.

HUANG, M.; CHEN, W.; ZHOU, Y.; FENG, R.; FU, J.; MA, J.; TAN, X.; HE, C.; ZHANG, Q.; HE, W.; DENG, Y.; ZHANG, Y.; ZHANG, X.; WANG, Y. Enantiomeric separation of four basic drugs containing N-alkyl groups by a RP-HPLC system using SBE- $\beta$ -CD as chiral mobile phase additive. **Chinese Chemical Letters**, v.24, n.9, p.840-844, 2013.

ICH INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. Quality Guidelines. View All Quality Guidelines. Analytical Validation Q2. **Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology Q2(R1)**. 2005, 17p. Disponível em: [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf)

KURKOV, S.V.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins. **International Journal of Pharmaceutics**, v.453, n.1, p.167-180, 2013.

LEDERE, M.; LEIPZING-PAGANI, E. A simple alternative determination of the formation constant for the inclusion complex between rutin and  $\beta$ -cyclodextrin. **Analytica Chimica Acta**, v.329, n.3, p.311-314, 1996.

LI, W.; LIU, X.; YANG, Q.; ZHANG, N.; DU, Y.; ZHU, H. Preparation and characterization of inclusion complex of benzyl isothiocyanate extracted from *papaya* seed with  $\beta$ -cyclodextrin. **Food Chemistry**, v.184, p.99-104, 2015.

LOFTSSON, T.; MÁSSON, M.; BREWSTER, M.E. Self-Association of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.93, n.5, p.1091-1099, 2004.

LOFTSSON, T.; DUCHÊNE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v.329, n.1-2, p.1-11, 2007.

LOFTSSON, T.; HREINSDÓTTIR, D.; MÁSSON, M. The complexation efficiency. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v.57, n.1-4, p.545-552, 2007.

LOFTSSON, T.; HREINSDÓTTIR, D.; MÁSSON, M. Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v.302, n.1-2, p.18-28, 2005.

MARTINS, M. R. F. M.; VEIGA, F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.38, n.1, p.33-54, 2003.

MARTINS, T. E. A. **Obtenção e caracterização de complexos ternários de saquinavir,  $\beta$ -ciclodextrina e polivinilpirrolidona**. 2008. 82f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

MIRANDA, J. C.; MARTINS, T. E. A.; VEIGA, F.; FERRAZ, H. G. Cyclodextrins and ternary complexes: technology to improve solubility of poorly soluble drugs. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n.4, p.665-881, 2011.

MIYAKE, K.; ARIMA, H.; HIRAYAMA, F.; YAMAMOTO, M.; HORIKAWA, T.; SUMIYOSHI, H.; NODA, S.; UEKAMA, K. Improvement of solubility and oral bioavailability of rutin by complexation with 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. **Pharmaceutical Development and Technology**, n.5, v.3, p.399-407, 2000.

MORIWAKI, C.; COSTA, G. L.; PAZZETTO, R.; ZANIN, G. M.; MORAES, F. F.; PORTILHO, M.; MATIOLI, G. Production and characterization of a new cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus firmus* isolated from Brazilian soil. **Process Biochemistry**, v.42, n.10, p.1384-1390, 2007.

MOYA-ORTEGA, D.; ALVAREZ-LORENZO, C.; CONCHEIRO, A.; LOFTSSON, T. Cyclodextrin-based nanogels for pharmaceutical and biomedical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v.428, v.1-2, p.152-163, 2012.

NGUYEN, T. A.; LIU, B.; ZHAO, J.; THOMAS, D.S.; HOOK, J. M. An investigation into the supramolecular structure, solubility, stability and antioxidant activity of rutin/cyclodextrin inclusion complex. **Food Chemistry**, v.136, n.1, p.186-192, 2013.

NISHIKAWA, D. O.; ZAGUE, V.; PINTO, C. A. S. O.; VIEIRA, R. P.; KANEKO, T. M.; VELASCO, M. V. R.; BABY, A. R. Avaliação da estabilidade de máscaras faciais peel-off contendo rutina. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v.28, n.2, p.227-232, 2007.

OLIVEIRA, C. A.; PERES, D. D.; RUGNO, C. M.; KOJIMA, M.; PINTO, C. A. S. O.; CONSIGLIERI, V. O.; KANEKO, T. M.; ROSADO, C.; MOTA, J.; VELASCO, M. V. R.; BABY, A. R. Funtional photostability and cutaneous compatibility of bioactive UVA sun care products. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.148, p.154-159, 2015.

PITHA, J.; SZENTE, L.; GREENBERG, J. Poly-L-methionine sulfoxide: A biologically inter analogue of dimethyl sulfoxide with solubilizing potente. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.72, n.6, p.665-668, 1983.

RAMA, A. C. R.; VEIGA, F.; FIGUEIREDO, I. V.; SOUSA, A.; CARAMONA, A. Aspectos biofarmacêuticos da formulação de medicamentos para neonatos. Fundamentos da complexação de indometacina com hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina para tratamento oral do fechamento do canal arterial. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.41, n.3, p. 281-299, 2005.

RIBEIRO, L.; LOFTSSON, T.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. Investigation and physicochemical characterization of vinpocetine-sulfobutyl ether  $\beta$ -cyclodextrin binary and ternary complexes. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.51, n.8, p.914-922, 2003.

SAVIC, I. M.; SAVIC-GAJIC, I. M.; NIKOLIC, V. D.; NIKOLIC, L. B.; RADOVANIVIC, B. C.; MILENKOVIC-ANDJELKOVIC, A. Enhencemnet of solubility and photostability of rutin by complexation with  $\beta$ -cyclodextrin and (2-hydroxypropyl)- $\beta$ -cyclodextrin. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v.86, n.1, p.33-43, 2016.

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

UEKAMA, K.; OTAGARI, M. Cyclodextrins in drugs carrier systems. **Chemical Reviews**, v.98, n.5, p.2045-2076, 1998.

UEKAMA, K.; HIRAYAMA, F.; ARIMA, H. Pharmaceutical applications of cyclodextrins and their derivatives. In: DODZIUK, H. (Ed.). Cyclodextrins and their complexes. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006. **Pharmaceutical applications of Cyclodextrins and Their Derivatives**, p.381-422.

VALENTINI, S. R.; NOGUEIRA, A. C.; FENELON, V. C.; SATO, F.; MEDINA, A. N.; SANTANA, R. G.; BAESSO, M. L.; MATOLI, G. Insulin complexation with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin: Spectroscopic evaluation of molecular inclusion and use of the complex in gel for healing of pressure ulcers. **International Journal of Pharmaceutics**, v.490, n.1-2, p.229-239, 2015.

VALLE, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**, v.39, n.9, May 31, p.1033-1046. 2004.

VEIGA, F.; PECORELLI, C.; RIBEIRO, L. **As ciclodextrinas em Tecnologia Farmacêuticas**. 1. Ed. Coimbra: MinervaCoimbra, 2006, 224p.

VELASCO, M. V. R.; BALOGH, T. S.; PEDRIALI, C. A.; SARRUF, F. D.; PINTO, C. A. S. O.; KANEKO, T. M.; BABY, A. R. Associação da rutina com *p*-metoxicinamato de octila e benzofenona-3: avaliação *in vitro* da eficácia fotoprotetora por espectrofotometria de refletância. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.27, n.1, p.23-27, 2008a.

VELASCO, M. V. R.; SARRUF, F. D.; SALGADO-SANTOS, I. M. N.; HAROUTIOUNIAN-FILHO, C. A.; KANEKO, T. M.; BABY, A. R. Broad spectrum bioactive sunscreens. **International Journal of Pharmaceutics**, v.363, n.1-2, p.50-57, 2008b.

WEN, X.; LIU, Z.; ZHU, T. Mass spectrometry and molecular modeling studies on the inclusion complexes between  $\alpha$ ,  $\beta$ -cyclodextrins and simvastatin. **Chemical Physics Letters**, v.405, n.1-3, p.114-117, 2005.

ZHANG, W.; LI, X.; YU, T.; YUAN, L.; RAO, G.; LI, D.; MU, C. Preparation, physicochemical characterization and release behavior of the inclusion complex of *trans*-anethole and  $\beta$ -cyclodextrin. **Food Research International**, v.74, p.55-62, 2015.

# Capítulo III

Obtenção e caracterização de complexos de inclusão binários da avobenzona (BMBM) e ciclodextrinas (HP $\beta$ CD e SBE $\beta$ CD)

## 1 INTRODUÇÃO

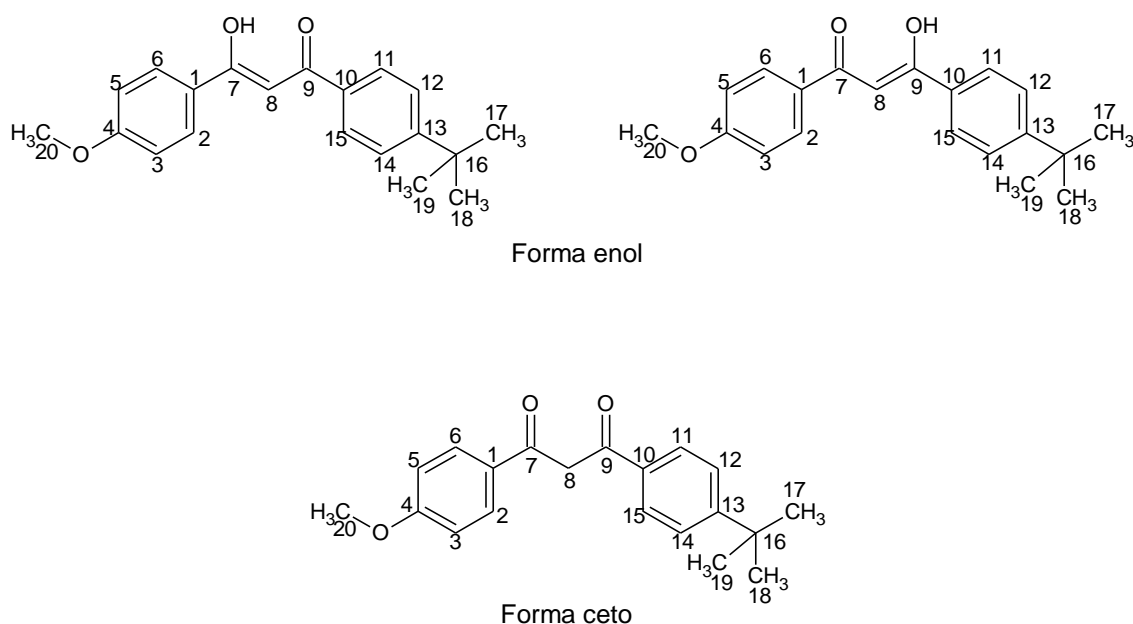
A exposição aos raios ultravioleta (UV) (UVA, - 320-400 nm - e UVB, - 290-320 nm) é potencialmente perigosa, podendo causar danos severos e graves à saúde. A radiação UVB, restrita às camadas mais superficiais da pele, pode causar danos ao DNA, eritemas e queimaduras solares, causando câncer de pele (SKLAR *et al.*, 2013; NARAYAN *et al.*, 2010; MARROTI *et al.*, 2008). A radiação UVA possui ação direta na derme, acreditando ser o principal responsável pelo fotoenvelhecimento e danos ao DNA, causados principalmente pela produção das espécies reativas de oxigênio (KAWAKAMI and GASPAR *et al.*, 2015; BALOGH *et al.*, 2011; MELONI, FARINA e SERVI, 2010).

Pesquisas descrevem a necessidade do desenvolvimento de filtros de amplo espectro de absorção, permitindo assim, a absorção dos raios UV, sem a necessidade de quantidades elevadas de produtos químicos, uma vez que alguns destes estão associados à reações alérgicas (KOKLER *et al.*, 2012; DAMIANI *et al.*, 2010). A associação de filtros pode ser uma opção, promovendo efeito sinérgico do desempenho. Porém, é importante ressaltar que, em alguns casos, a associação de filtros também pode acelerar a decomposição de um ou mais produtos associados (LHIAUBET-VALLET *et al.*, 2010).

A fotodecomposição dos filtros UV pode não apenas diminuir a atividade quanto ao poder de absorção de raios UV, como também, promover dermatites de contato, além de possíveis interações dos produtos da fotodegradação com componentes da pele com o sebo, o que pode ocasionar a formação de novas moléculas com propriedades toxicológicas desconhecidas (KAWAKAMI and GASPAR, 2015; DAMIANI *et al.*, 2006; CHATELAIN *et al.*, 2001; GASPAR *et al.*, 2006).

A avobenzona (BMBM) também conhecida como butil metoxidibenzoilmetano, pelo INCI, e 1-[4-(1,1-Dimethylethyl)phenyl]-3-(4-methoxyphenyl)propane-1,3-dione, pela IUPAC, é um dos filtros com capacidade de proteção UVA mais comuns e mais presentes em formulações cosméticas, apresentando proteção máxima em 360 nm, porém, apresenta significativa degradação sob exposição à radiação UV, reduzindo assim, sua capacidade de proteção, resultando na perda de sua eficácia (KIM *et al.*, 2015; PARIS *et al.*, 2009; SCHWACK e RUDOLPH, 1995; AFONSO *et al.*, 2014). Muitas reações fotoalérgicas são associadas à BMBM pela formação de produtos de fotodegradação (KARLSSON *et al.*, 2009; CHATELAIN *et al.*, 2001).

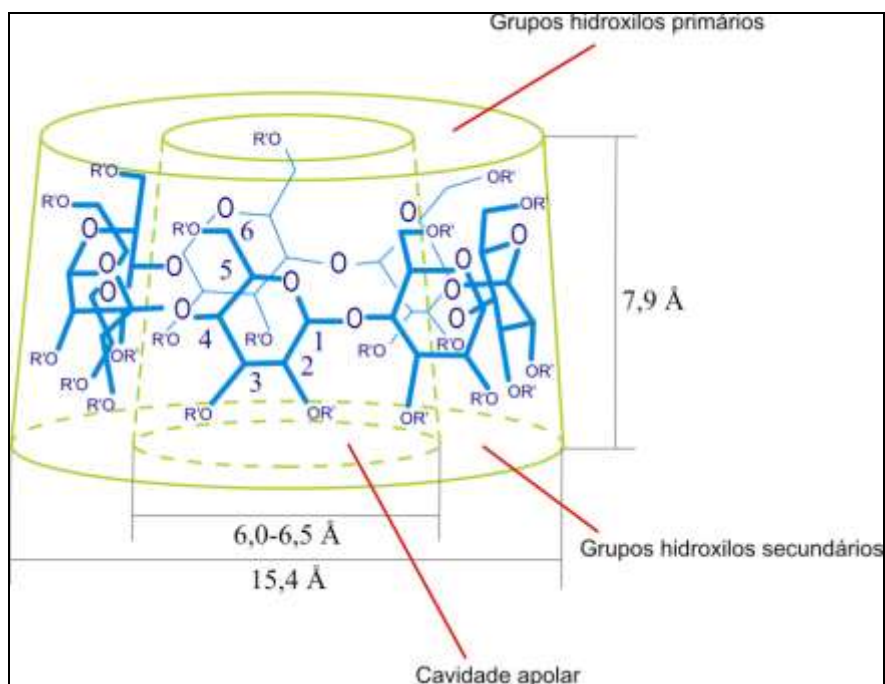
O BMBM é considerada uma molécula  $\beta$ -dicetona e, por este motivo, apresenta equilíbrio tautomérico na forma ceto-enol, como apresentado na **Figura 1**. A tendência deste equilíbrio pode ser afetada pela variação da temperatura, do solvente e da concentração. A forma “ceto” ocorre somente em uma forma geométrica enquanto a “enol” ocorre em diferentes configurações (PARIS, *et al.*, 2009, MTURI e MARTINCIGH, 2008).



**Figura 1.** Estrutura química da molécula da BMBM na forma cetônica e enólica. Adaptado de MTURI & MARTINCIGH, 2008.

Ciclodextrinas (CDs) representadas na **Figura 2**, são oligossacarídeos cíclicos em formato tronco-cônico e obtidas à partir da degradação enzimática do amido de milho, compostos de unidade glucopiranosose em ligações  $\alpha$ -1,4. Seu formato tronco-cônico é devido à ausência de rotação livre das ligações glicosídicas e a conformação em cadeia apresentadas pelas unidades de glicose, assim, sua cavidade central promove um microambiente lipofílico com tamanho adequando para incluir as mais diversas moléculas (VALLE, 2004; VEIGA, PECORELLI e RIBEIRO, 2006; CARRIER, MILLER e AHMED, 2007; MIRANDA, 2008; MIRANDA *et al.*, 2011).





**Figura 2.** Estrutura da  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD) com representações de suas dimensões e a posição dos grupos hidroxílicos. Fonte: MARTINS, 2008.

As CDs naturais ( $\alpha$ CD,  $\beta$ CD e  $\gamma$ CD) apresentam 6, 7 e 8 unidades de  $\alpha$ -1,4 glucopiranoose, respectivamente. Na parte externa de sua estrutura, apresentam superfície hidrófila e, em sua cavidade interna, hidrófoba, à qual apresenta a capacidade de acomodar variedade diversa de substâncias lipofílicas, formando assim, os complexos de inclusão hóspede-hospedeiro (**Figura 2**). Tais sistemas apresentam modificações em algumas propriedades químicas e físico-químicas, como aumento da estabilidade, solubilidade, velocidade de dissolução e biodisponibilidade, redução dos efeitos adversos quando associados à fármacos, ademais de melhorar a estabilidade frente a agentes oxidantes e à luz (RAJEWSKI e STELLA, 1996; LOFTSSON e BREWSTER, 1996; UEKAMA e OTAGIRI 1998; LOFTSSON e DUCHÊNE, 2007; LOFTSSON e MASSON, 2001; KURKOV e LOFTSSON, 2013).

## 2 OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi obter, caracterizar e comparar a eficiência de complexação dos sistemas binários contendo avobenzona (BMBM) e ciclodextrinas (HP $\beta$ CD e SBE $\beta$ CD).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material

Avobenzona (BMBM) (98,0% de pureza), substância de referência, foi adquirida da empresa DSM Brasil (PARSOL<sup>®</sup>TX, Brasil). HP $\beta$ CD (2-hidroxipropil-beta-ciclodextrina, Mw  $\approx$  1.460) foi adquirida da empresa Aldrich Chemistry, enquanto SBE- $\beta$ CD (Captisol<sup>®</sup>, sulfobutileter-beta-ciclodextrina, Mw  $\approx$  2.163) foi gentilmente cedida pela empresa Cydex Pharmaceuticals. Foram utilizados acetona grau UHPLC-Supergradient (AppliChem Panreac ITW Companies, Germany) e água ultrapura Milli-Q<sup>®</sup> Integral (Merck Millipore, Germany).

#### 3.2 Métodos

##### 3.2.1 Condições cromatográficas

Utiliza-se cromatógrafo em fase líquida Shimadzu<sup>®</sup> mod. Prominense Modular HPLC composto por detector PDA (*Photodiode Array*) SPD-20A UV, bomba LC-20AB, sistema de degaseificação DGU-20A, amostrador automático SIL-20A/C, sistema de aquecimento CTO-20AC, controlador CBM-20A e programa LC-Solution. As condições cromatográficas foram: metanol:água 88:12 (v/v), pH 6,8-7,0 como fase móvel; fluxo de 0,8 mL min<sup>-1</sup>; volume de injeção de 20,0  $\mu$ L em coluna cromatográfica de fase-reversa Kromasil<sup>®</sup> RP-C18 (100 A, 5,0  $\mu$ m, 250x4.6 mm) equilibrada à temperatura ambiente e eluída sob condições isocráticas em comprimento de onda 325 nm. A fase móvel foi previamente degaseificada por filtração à vácuo (bomba de vácuo KNF<sup>®</sup> mod. N810.FT.18, 100 mbar) em membrana semipermeável de acetato de celulose 45,0  $\mu$ m, seguida de sonicação (Altsonic<sup>®</sup> Clean mod. 9L) por 15 minutos. O método para quantificação da BMBM, na ausência ou presença de CDs, foi previamente validado, como apresentado no **Capítulo I**.

##### 3.2.2 Obtenção dos sistemas binários BMBM:CD (HP $\beta$ CD e SBE $\beta$ CD)

Quantidades equimolares de BMBM e HP $\beta$ CD ou SBE $\beta$ CD foram pesadas, dispersas em acetona e água purificada, respectivamente, homogeneizadas em câmara incubadora com agitação orbital Solab<sup>®</sup> por 120 minutos e submetidas à secagem em liofilizador Liotop<sup>®</sup> L108. Os sistemas binários foram armazenados em dessecador Marconi<sup>®</sup> MA 192.

### **3.2.3 Caracterização dos sistemas binários BMBM:CD (BMBM:HP $\beta$ CD e BMBM:SBE $\beta$ CD)**

#### **3.2.3.1 Caracterização “em solução”**

##### **3.2.3.1.1 Ensaio de solubilidade da avobenzona**

A solubilidade intrínseca da BMBM foi avaliada por meio do ensaio descrito por Higuchi e Connors (1965). Excesso de BMBM ( $\approx 1,0$  g) foi adicionado à volume fixo (10,0 mL) de água purificada. As dispersões foram mantidas sob agitação em câmara incubadora orbital de agitação mecânica Solab, modelo Shaker SL 222, por 72 horas, à temperatura de  $37 \pm 5$  °C, filtradas em filtro de membrana de  $0,45 \mu\text{m}$  e quantificadas por cromatógrafo em fase líquida. O ensaio foi realizado em triplicata.

##### **3.2.3.1.2 Ensaio de solubilidade de fases**

O ensaio de solubilidade de fases foi realizado como descrito por Higuchi e Connors (1965), um excesso de BMBM foi adicionado em soluções aquosas contendo concentrações crescentes de SBE $\beta$ CD e HP $\beta$ CD (2,0 a 80,0 mmol L<sup>-1</sup>). As suspensões foram mantidas sob agitação em câmara incubadora orbital de agitação mecânica, por 72 horas, em temperatura de  $37 \pm 5$  °C, filtradas em filtro de membrana de  $0,45 \mu\text{m}$ , e quantificadas por meio de cromatógrafo em fase líquida. Os ensaios foram realizados em triplicata.

#### **3.2.3.2 Caracterização dos sistemas binários “no estado sólido”**

##### **3.2.3.2.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)**

Curvas DSC foram obtidas por meio de sistema de calorimetria exploratória diferencial Shimadzu®, modelo DSC-60, em cápsula de alumínio selada, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (100,0 mL min<sup>-1</sup>); razão de aquecimento de 10,0 °C min<sup>-1</sup>, massa de amostra de 2,0 e 3,0 mg, e rampa de aquecimento de 40,0 – 600,0 °C. O equipamento foi previamente calibrado com índio metálico (99,99%) à partir da  $T_{\text{fusão}}$  (156,4 °C) e  $\Delta H_{\text{fusão}}$  (28,5 J.g<sup>-1</sup>). As curvas obtidas foram tratadas usando o programa TA-60WS.

##### **3.2.3.2.2 Análise Termogravimétrica (TG/DTG)**

Curvas termogravimétricas foram obtidas em sistema de termogravimetria diferencial Shimadzu®, modelo DTG-60, em cápsula de alumínio sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (100,0 mL min<sup>-1</sup>); razão de aquecimento de 10,0 °C min<sup>-1</sup>, massa de amostra

de 4,0 – 6,0 mg, e rampa de aquecimento de 40,0 – 900,0 °C. O equipamento foi previamente calibrado com padrão de oxalato de cálcio monohidratado (ASTM 1582-93). As curvas foram tratadas usando o programa TA-60WS.

### 3.2.3.2.3 Difração de Raios X de Pó (PDRX)

Os difratogramas de raios X de pó foram obtidos em difratômetro Bruker® modelo D8 ADVANCE, operando à 40 KV e 40 mA, com velocidade de varredura de 2° min<sup>-1</sup> (2θ), usando silício (Si) policristalino como padrão.

### 3.2.3.3 Ensaio de Fotoestabilidade

O ensaio de fotoestabilidade da BMBM, e seus complexos de inclusão, foi realizado no estado sólido e em etanol 96 °GL (1,0 mg mL<sup>-1</sup>), empregando câmara de fotoestabilidade Nova Ética (São Paulo, Brasil) mod. 424/CF, equipada com área de exposição de 1380 cm<sup>2</sup> e fontes de luz conforme recomendações do ICH Q1B (2005) opção 2: lâmpada fluorescente branca associada à lâmpada UV com distribuição espectral entre 320 e 400 nm e emissão máxima de energia entre 350,0 e 370,0 nm. As amostras foram expostas a irradiação em diferentes intervalos de tempo (0,0; 1440,0; 4320,0; e 10080,0 segundos) à temperatura de 25 °C ± 0,5. As amostras no estado sólido foram acomodadas em placas de Petri. As soluções etanólicas (1,0 mg mL<sup>-1</sup>) foram transferidas para ampolas de vidro tipo 1, transparente, de 10,0 mL, e, em seguida, hermeticamente fechadas. O teor de BMBM remanescente nas amostras foi quantificado por meio de cromatógrafo líquido (HPLC).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diversos autores relataram o efeito das CDs sobre os parâmetros cromatográficos (GAZPIO *et al.*, 2005; FENG *et al.*, 2012). Com o intuito de eliminar esses interferentes na quantificação da BMBM, curvas analíticas foram construídas para BMBM na presença das CDs (HPβCD e SBEβCD).

Relações lineares foram obtidas para BMBM no intervalo de 2,0 a 64 µg mL<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup> = 0,99957), segundo equação  $Abs = -27976,6 + 38371 \times C$  (µg mL<sup>-1</sup>), com valores de limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) de 0,2498 e 0,8327 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Relações lineares foram obtidas para a BMBM na presença de HPβCD no intervalo de 2,0 a 64,0 µg mL<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup> = 0,99948), segundo a equação  $Abs = -11336,4 +$

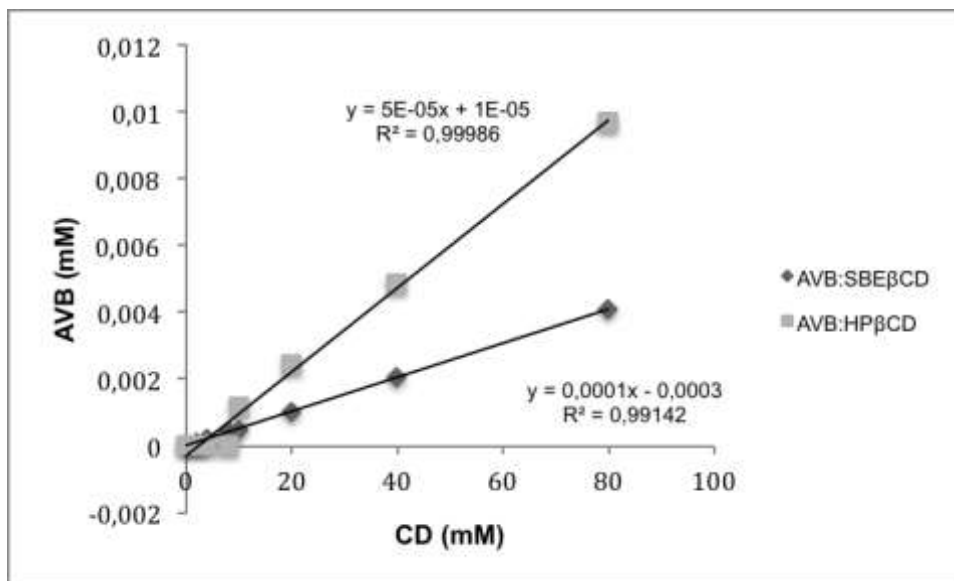
$39190 \times C$  ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), com valores de limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) de 1,1252 e  $3,7504 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Relações lineares foram obtidas para a BMBM na presença de SBE $\beta$ CD no intervalo de 2,0 a  $64,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $R^2 = 0,99929$ ), segundo a equação  $\text{Abs} = 49166 + 35244 \times C$  ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), com valores de limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) de 0,2934 e  $0,9781 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente.

O método de solubilidade de fases é utilizado como primeira verificação da formação de complexos de inclusão em solução. Baseia-se na medição do efeito de complexação na solubilidade do substrato e permite fazer interferências sobre a estequiometria de inclusão e estimar uma constante de estabilidade do complexo formado. A ação solubilizante das CDs é quantitativamente avaliada pelos diagramas de solubilidades de fases, cuja forma depende do modelo de equilíbrio estabelecido na formação dos complexos de inclusão (HIGUCHI e CONNORS, 1965).

O ensaio de solubilidade de fases foi utilizado no intuito de identificar o efeito da adição da HP $\beta$ CD e da SBE $\beta$ CD na solubilidade intrínseca da BMBM (**Figura 3**). O método de solubilidade de fases é habitualmente utilizado na verificação da formação de complexos de inclusão em solução (BREWSTER e LOFTSSON, 2007; VEIGA *et al.*, 1996; VEIGA, PECORELLI e RIBEIRO, 2006).

As curvas obtidas para os diagramas de solubilidade de fases para os complexos binários (BMBM:HP $\beta$ CD e BMBM:SBE $\beta$ CD) foram do tipo  $A_L$  indicando a formação de complexos de inclusão solúveis, de primeira ordem relativo às CDs e, de primeiro ou ordem superior em relação à substância de interesse (BREWSTER e LOFTSSON, 2007; CARRIER, MILLER e AHMED, 2007).

A **Tabela 1** apresenta os valores de solubilidade intrínseca ( $S_0$ ) da BMBM obtida pelo método de agitação em frasco (shake flasks) e solubilidade de intercepto ( $S_{int}$ ), coeficiente angular e coeficiente de determinação ( $R^2$ ) para os sistemas binários BMBM:SBE $\beta$ CD e BMBM:HP $\beta$ CD, obtidos a partir do diagrama de solubilidade de fase.

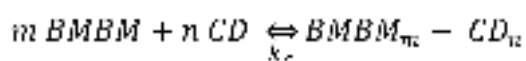


**Figura 3.** Diagrama de solubilidade de fases da BMBM em água purificada em concentrações de HPβCD e SBEβCD (2,0 – 80,0 μg mL<sup>-1</sup>)

**Tabela 1.** Valores de solubilidade intrínseca ( $S_0$ ) da avobenzona (BMBM), solubilidade do intercepto ( $S_{int}$ ), coeficiente angular e coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtidos a partir dos diagramas de solubilidade de fases dos sistemas binários CB BMBM:SBEβCD e CB BMBM:HPβCD

Sistemas	$S_0$ (mg mL <sup>-1</sup> /mM)	$S_{int}$ (mM)	Coef. Angular	$R^2$
<b>BMBM</b>	0,0091/0,00003	---	---	---
<b>CB BMBM:HPβCD</b>		0,00001	0,00005	0,99986
<b>CB BMBM:SBEβCD</b>		0,0003	0,0001	0,99142

Os valores de coeficiente angular obtidos à partir da regressão linear dos diagramas de solubilidade de fases para os sistemas binários - CB BMBM:HPβCD e CB BMBM:SBEβCD - apresentaram valores inferiores a 1, assumindo assim, estequiometria 1:1. À partir da formação dos sistemas binários de estequiometria 1:1 (de primeira ordem), relativo às CDs ( $n=1$ ), e de ordem 1, relativo à BMBM ( $m=1$ ), teve-se a situação representada pelo equilíbrio químico, representado à seguir (BREWSTER e LOFTSSON, 2007; KURKOV e LOFTSSON, 2013):



sendo o valor de  $k_c$  determinado a partir da equação de Higuchi e Connors (1965).

A constante de estabilidade aparente  $k_c$  pode ser calculada de acordo com Higuchi e Connors (1965), a partir de porção linear do diagrama de solubilidade, de acordo com a **Equação 1**:

$$k_c = \frac{\text{coeficiente angular}}{S_0 (1 - \text{coeficiente angular})} \quad \text{(Equação 1)}$$

onde  $k_c$  é a constante de estabilidade e  $S_0$  é a solubilidade intrínseca da molécula hóspede.

A eficiência de complexação ( $EC$ ) é calculada a partir do coeficiente angular do diagrama de solubilidade de fases, de acordo com a **Equação 2** (LOFTSSON, HREINSDÓTTIR e MÁSSON, 2007):

$$EC = \frac{[F/CD]}{[CD]} = S_0 k_c = \frac{\text{coeficiente angular}}{1 - \text{coeficiente angular}} \quad \text{(Equação 2)}$$

onde  $[F/CD]$  é a concentração do complexo dissolvido,  $[CD]$  é a concentração de ciclodextrina livre dissolvida e o *coeficiente angular* obtido à partir do diagrama de solubilidade de fases.

A  $EC$  usada para calcular a razão molar ( $RM$ ) entre a substância hóspede e a ciclodextrina (CD), empregando-se a **Equação 3** (KURKOV e LOFTSSON, 2013; LOFTSSON, HREINSDÓTTIR e MÁSSON, 2007):

$$RM = 1: \left(1 + \frac{1}{EC}\right) \quad \text{(Equação 3)}$$

onde  $RM$  é a razão molar, e  $EC$  é a eficiência de complexação.

Para substâncias que apresentam solubilidade superior a 1 mM, os valores de solubilidade intrínseca ( $S_0$ ) devem ser iguais aos valores de solubilidade do intercepto ( $S_{int}$ ) definido pelo coeficiente angular da equação da reta. Para substâncias com

solubilidade intrínseca ( $S_0$ ) inferior a 0,1 mM, um desvio negativo da solubilidade intrínseca é observado (LOFTSSON, HREINSDÓTTIR e MÁSSON, 2005). No intuito de não agregar erros advindos da construção da reta e da determinação de sua equação, o valor de  $S_0$  obtido experimentalmente foi empregado para o cálculo da constante de estabilidade do complexo ( $k_c$ ) (KURKOV e LOFTSSON, 2013).

Para moléculas pouco solúveis, que apresentam digrama de solubilidade de fases  $A_L$ , são relatadas diferenças entre a solubilidade em meio aquoso e a intercepção da reta do diagrama em y, resultando em valores de  $k_c$  diferentes. Desta forma, pode-se calcular o valor de eficiência de complexação ( $EC$ ) como alternativa (CARRIER, MILLER e AHMED, 2007). O cálculo de  $EC$  é feito à partir do coeficiente angular do diagrama de solubilidade de fases, sendo o seu valor independente do valor de solubilidade (LOFTSSON, HREINSDÓTTIR e MÁSSON, 2005; LOFTSSON, HREINSDÓTTIR e MÁSSON, 2007; LOFTSSON e DUCHÊNE, 2007). Por meio do valor de  $EC$ , consegue-se determinar a relação entre as moléculas hospede e hospedeira obtida na complexação, ademais do acréscimo de massa na molécula hóspede.

A **Tabela 2** apresenta os valores de constante de estabilidade ( $k_c$ ), eficiência de complexação ( $EC$ ), razão molar de complexação (BMBM:CD), calculadas à partir dos diagramas de solubilidade de fases.

**Tabela 2.** Constante de estabilidade ( $k_c$ ), eficiência de complexação ( $EC$ ) e razão molar de complexação (BMBM:CD) calculadas à partir dos diagramas de solubilidade de fases para os sistemas binários CB BMBM:SBE $\beta$ CD e CB BMBM:HP $\beta$ CD

Sistemas	$k_c$ ( $M^{-1}$ )	EC	Razão Molar
CB BMBM:HP $\beta$ CD	5000,25	0,05	1:21
CB BMBM:SBE $\beta$ CD	300,37	0,1	1:11

Os valores de  $k_c$  observados para os sistemas binários BMBM:HP $\beta$ CD e BMBM:SBE $\beta$ CD indicam maior afinidade da BMBM com a cavidade hidrofóbica da HP $\beta$ CD (**Tabela 2**). Quanto maior o valor de  $k_c$ , maior a afinidade e interação entre a molécula hóspede e a CD e, ainda, maior a estabilidade do complexo (LOFTSSON, HREINSDÓTTIR, MASSON, 2007; WEN *et al.*, 2005; STELLA *et al.*, 1999; VEIGA *et al.*, 1996).

Carrier, Miller e Ahmed (2007) classificam a força de ligação entre a molécula hóspede e a CD de acordo com valores de  $k_c$ : inferior a 500,0  $M^{-1}$  muito fraca; entre 500,0 e 1000,0  $M^{-1}$  fraca; 1000,0 e 5000,0 moderada; 5000,0 e 20000,0 forte; e superior a



20000,0 muito forte. Para Pitha e colaboradores (1983), apenas complexos de inclusão com valores de constante de estabilidade ( $k_c$ ) entre 200 e 5000  $M^{-1}$  apresentam aplicações práticas, já que complexos lábeis podem levar à liberação prematura, e complexos muito estáveis podem retardar ou não liberar totalmente a molécula hóspede. Contudo, para Rama e colaboradores (2005),  $k_c$  é um fator relevante na obtenção de complexos de inclusão, dado que se o valor for elevado não há liberação da molécula com consequente diminuição da sua fração livre, considerando adequadas, constantes de estabilidade entre 100,0 e 1000,0  $M^{-1}$ .

Scalia e colaboradores (1998) e Yuan e colaboradores (2008), avaliaram a influência da complexação da BMBM com a HP $\beta$ CD e encontraram diagramas de solubilidade de fases do tipo  $A_L$  e  $A_p$ , de estequiometria 1:1 e 1:2, respectivamente. A metodologia empregada na obtenção dos complexos tem influência sobre a estequiometria e estabilidade dos complexos.

Maiores valores de EC e da razão molar foram observados para o sistema binário com SBE $\beta$ CD (**Tabela 2**), demonstrando maior interação entre a BMBM e esta CD; tal fato pode ser corroborado de incremento de solubilidade obtidos, apresentados na **Tabela 3**.

**Tabela 3.** Valores de solubilidade da avobenzona (BMBM) e dos sistemas binários obtidos por liofilização (CB BMBM:HP $\beta$ CD e CB BMBM:SBE $\beta$ CD) em  $mg mL^{-1}$ , mM e valores de incremento de solubilidade (IS) obtido nos sistemas

	Solubilidade da Avobenzona		IS
	( $mg mL^{-1}$ )	(mM)	
<b>BMBM</b>	0,01	0,00003	---
<b>CB BMBM:HP<math>\beta</math>CD</b>	0,42	0,0013	43,3x
<b>CB BMBM:SBE<math>\beta</math>CD</b>	0,51	0,0016	53,3x

As propriedades térmicas das amostras BMBM, CDs (HP $\beta$ CD e SBE $\beta$ CD), mistura físicas (BMBM:HP $\beta$ CD e BMBM:SBE $\beta$ CD) e complexos binários BMBM:HP $\beta$ CD e BMBM:SBE $\beta$ CD), investigadas por DSC e TG/DTG, estão apresentados na **Tabela 4**.

**Tabela 4.** Dados termodinâmicos obtidos a partir das curvas DSC e TG/DTG da BMBM, CDs (HP $\beta$ CD e SBE $\beta$ CD), misturas físicas (MF BMBM:CD) e complexos de inclusão (CB BMBM:CD)

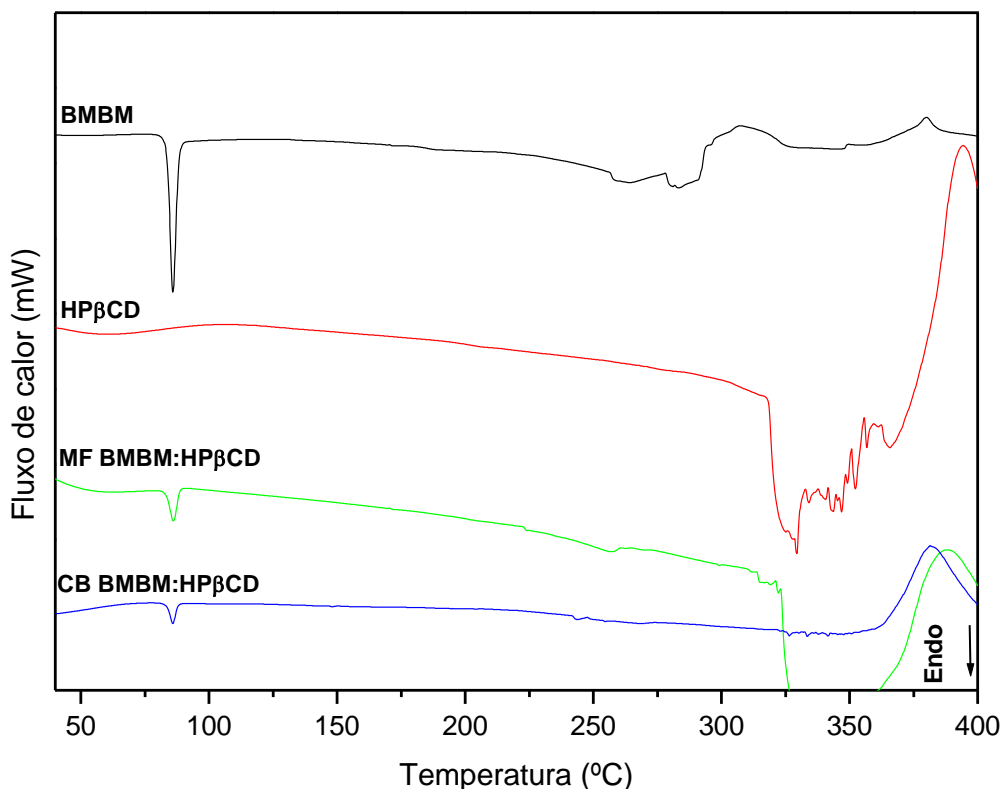
	DSC		TG <	TG	
	T <sub>pico</sub> °C	$\Delta H$ (J g <sup>-1</sup> )	100°C	T <sub>onset</sub> °C	$\Delta m$ (%)
BMBM	85,82	46,06	0,16	27,22	99,79
<b>CD</b>					
HP $\beta$ CD			2,88	27,34/121,83	3,11/91,84
SBE $\beta$ CD			5,33	28,55/148,64/316,19/446,75	7,88/22,14/26,81/14,28
<b>MF BMBM:CD</b>					
BMBM:HP $\beta$ CD	85,92	16,23	3,84	27,92/109,13/289,02/399,07	3,92/65,14/2,46
BMBM:SBE $\beta$ CD	86,21	11,97	3,90	23,00/182,88/292,67/387,28	6,11/26,91/27,22/16,05
<b>CB BMBM:CD</b>					
BMBM:HP $\beta$ CD	86,98	10,54	1,33	31,05/140,37/360,78	5,10/16,95/72,69/5,88
BMBM:SBE $\beta$ CD	85,79	5,33	3,49	25,94/138,37/309,27/377,53	7,04/332,33/17,71/12,47

\*T<sub>pico</sub> (temperatura do pico, °C), T<sub>onset</sub> (temperatura inicial do pico, °C),  $\Delta H$  (perda de massa em J/g, mW/mg, %),  $\Delta m$  (perda de massa, %)

As curvas DSC da BMBM, HP $\beta$ CD, mistura física BMBM:HP $\beta$ CD e complexo binário BMBM:HP $\beta$ CD estão apresentados na **Figura 4** e as propriedades térmicas das amostras apresentadas na **Tabela 4**. O termograma da BMBM apresentou um evento endotérmico a 85,82 °C ( $\Delta H = 46,06$  J g<sup>-1</sup>) relativo à sua fusão, seguido de decomposição à partir de 292,96 °C. A HP $\beta$ CD apresentou evento endotérmico em aproximadamente 60,0 °C, relativo à desidratação, e acima desta temperatura, apresenta eventos irregulares atribuídos à decomposição (**Figura 4** e **Tabela 4**).

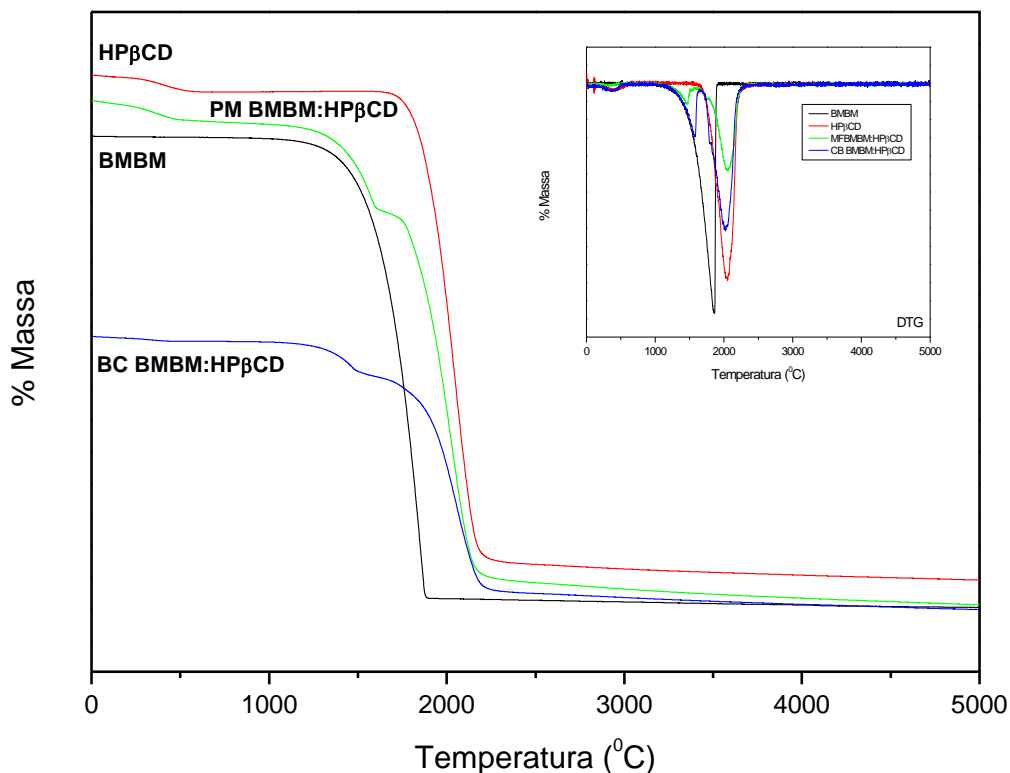
As curvas DSC da mistura física e do complexo de inclusão binário apresentaram o evento de fusão característico da BMBM, em, 85,95 °C e 85,95 °C, respectivamente, indicando desta forma, a existência de BMBM livre. Os resultados observados estão de acordo com os achados de Scalia e colaboradores (1998).

Villaverde e colaboradores (2005) comentam que, de um modo geral, no processo de complexação nem todas as moléculas de CDs formam complexos e o material obtido pode ser constituído por uma mistura de complexo substância:CD, molécula de substância e CDs livres, corroborando com dados obtidos no projeto.



**Figura 4.** Curvas DSC da avobenzona (BMBM), ciclodextrina (HP $\beta$ CD), misturas físicas 1:1 (MF BMBM:HP $\beta$ CD) e sistemas binários 1:1 (CB BMBM:HP $\beta$ CD), obtidos sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (100,0 mL min<sup>-1</sup>) e razão de aquecimento de 10,0 °C min<sup>-1</sup> e rampa de aquecimento de 40,0 – 600,0 °C

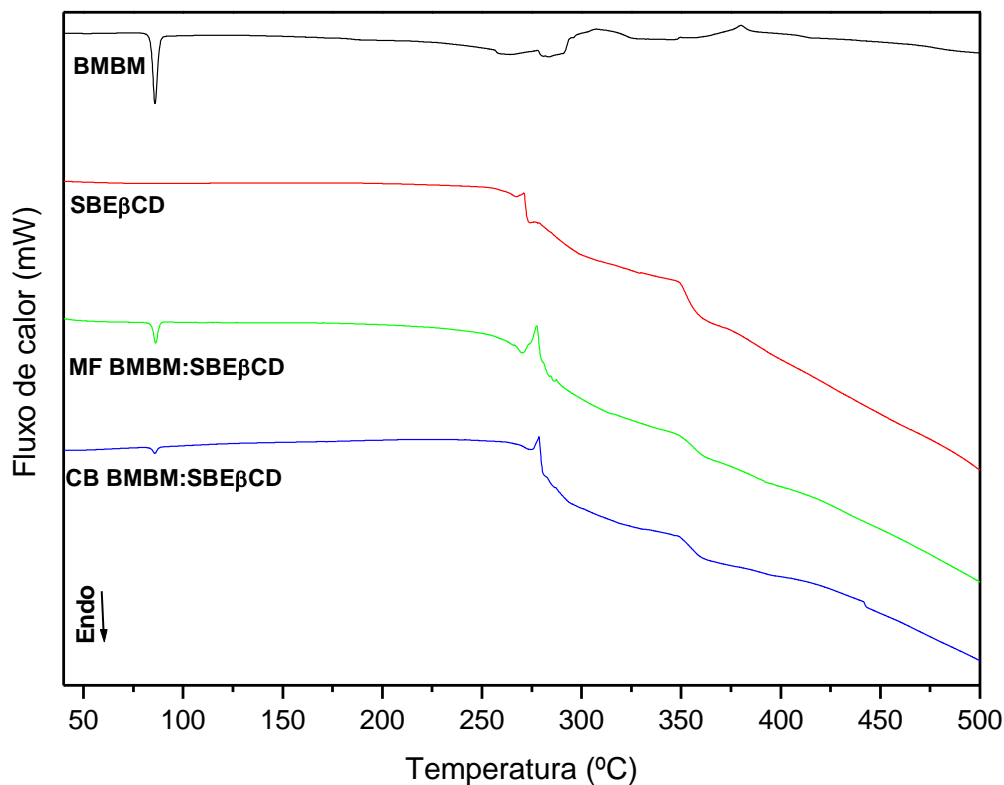
A **Figura 5** apresenta as curvas TG/DTG para BMBM, HP $\beta$ CD, mistura física 1:1 (p/p) BMBM:HP $\beta$ CD e complexo binário BMBM:HP $\beta$ CD. A curva TG/DTG da BMBM apresentou decomposição em uma única etapa da mesma forma que a HP $\beta$ CD. Nas curvas termogravimétricas da mistura física observa-se termod decomposição em quatro etapas: em 27,92 °C ( $\Delta m = 3,92\%$ ), 109,13 °C ( $\Delta m = 16,95\%$ ), 289,02 °C ( $\Delta m = 72,69\%$ ) e 399,07 °C ( $\Delta m = 5,88\%$ ); enquanto no complexo de inclusão acontece em três etapas: 25,26 °C ( $\Delta m = 12,61\%$ ), 270,51 °C ( $\Delta m = 79,43\%$ ) e 395,16 °C ( $\Delta m = 7,91\%$ ).



**Figura 5.** Curva TG/DTG da avobenzona (BMBM), ciclodextrinas (HP $\beta$ CD), mistura física 1:1 (MF BMBM:HP $\beta$ CD) e complexo binário 1:1 (CB BMBM:HP $\beta$ CD), obtidas sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> e razão de aquecimento 10,0 °C.min<sup>-1</sup> com rampa de aquecimento entre 40,0 e 900,0 °C

As curvas DSC da BMBM, SBE $\beta$ CD, mistura física BMBM:HP $\beta$ CD 1:1 (p/p) e do sistema binário BMBM:SBE $\beta$ CD obtido na razão molar 1:1 são apresentados na **Figura 6**.

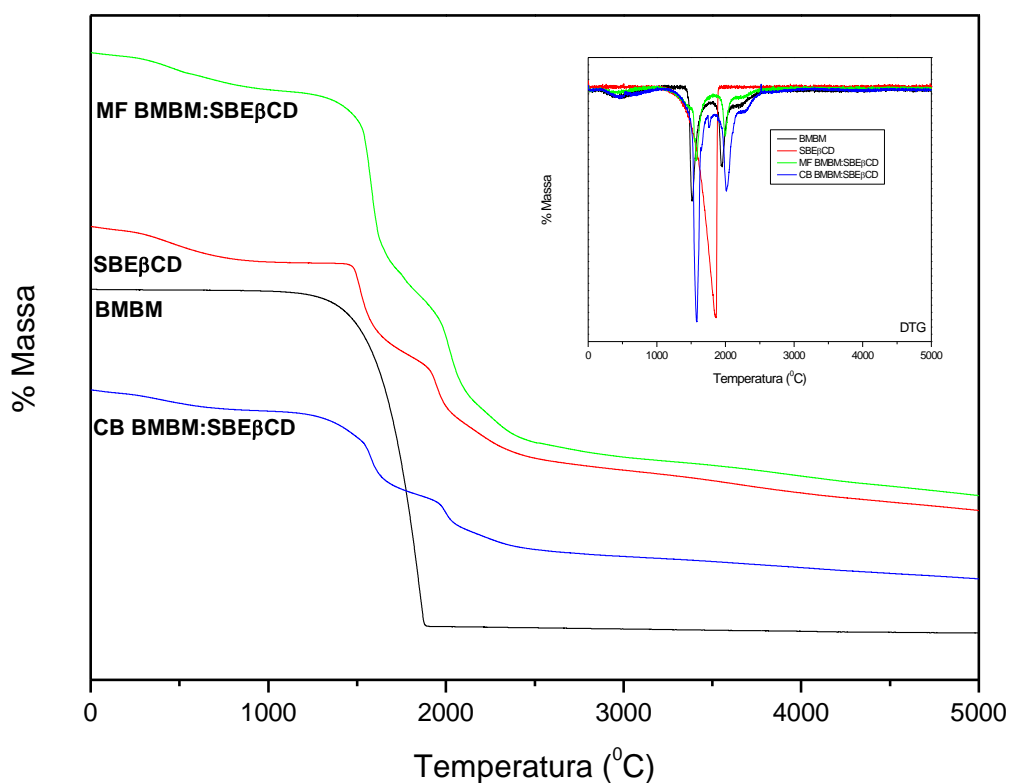
A curva DSC da SBE $\beta$ CD apresentou amplo evento em 68,0 °C, atribuído à desidratação, seguido de s evento de decomposição em 277,0 °C. As curvas DSC das misturas físicas e dos complexos correspondem a sobreposição das substâncias isoladas, desta forma, a presença do evento endotérmico do BMBM é observado, indicando a presença de substância livre no meio.



**Figura 6.** Curvas DSC da avobenzona (BMBM), ciclodextrina (SBE $\beta$ CD), misturas físicas 1:1 (MF BMBM:SBE $\beta$ CD) e sistemas binários 1:1 (CB BMBM:SBE $\beta$ CD), obtidos sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (100,0 mL min<sup>-1</sup>) e razão de aquecimento de 10,0 °C min<sup>-1</sup> e rampa de aquecimento de 40,0 – 600,0 °C

A **Figura 7** apresenta as curvas TG/DTG para BMBM, SBE $\beta$ CD, mistura física BMBM:SBE $\beta$ CD e complexo binário BMBM:SBE $\beta$ CD.

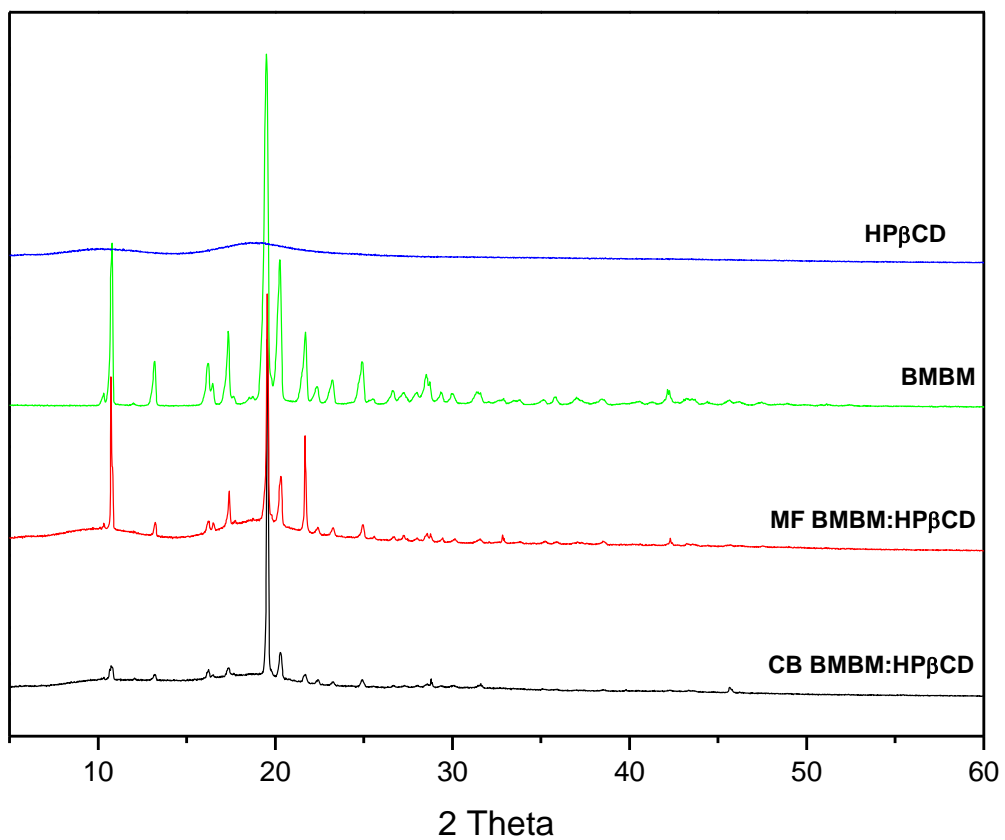
A curva termogravimétrica da SBE $\beta$ CD apresenta decomposição em quatro etapas. As curvas TG/DTG da mistura física e do complexo BMBM:SBE $\beta$ CD, apresentaram comportamento semelhante à somatória das substâncias isoladas, supondo a presença de BMBM livre (**Figura 7** e **Tabela 4**).



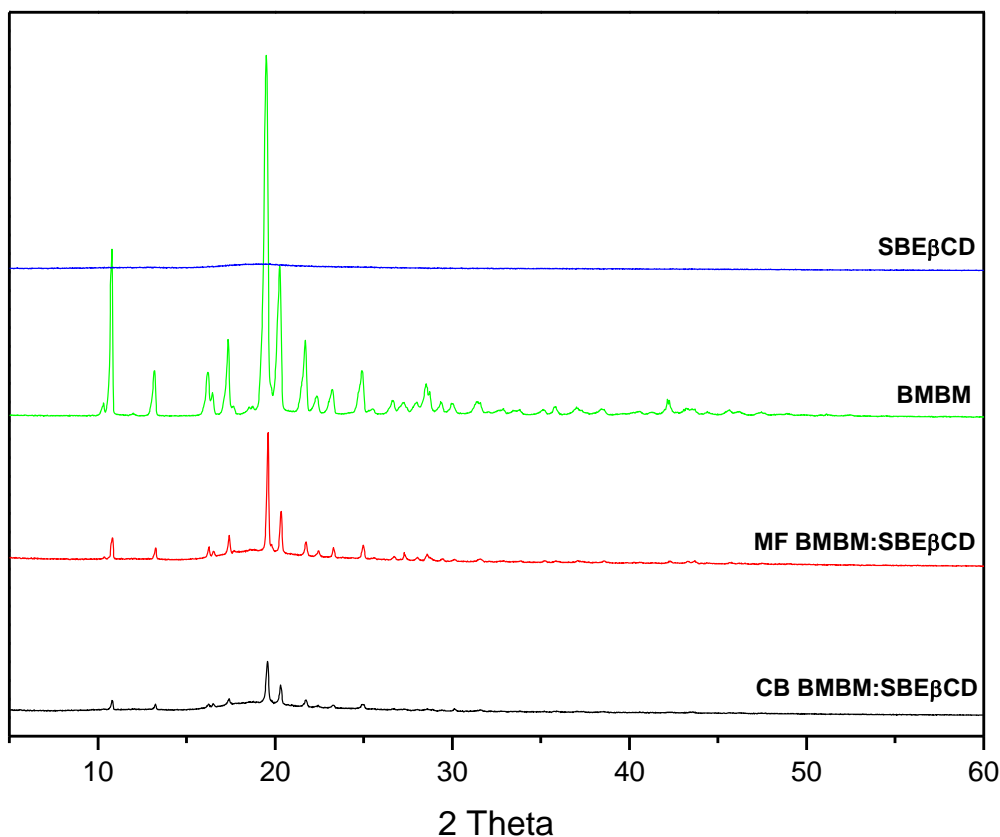
**Figura 7.** Curva TG/DTG da avobenzona (BMBM), ciclodextrina (SBE $\beta$ CD), mistura física 1:1 (MF BMBM:SBE $\beta$ CD) e sistema binário 1:1 (CB BMBM:SBE $\beta$ CD), obtidas sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> e razão de aquecimento 10,0 °C.min<sup>-1</sup> com rampa de aquecimento entre 40,0 e 900,0 °C

Os difratogramas da BMBM, HP $\beta$ CD, mistura física BMBM:HP $\beta$ CD e sistema binário BMBM:HP $\beta$ CD são apresentados na **Figura 7**. Os difratogramas da BMBM, SBE $\beta$ CD, mistura física (MF BMBM:SBE $\beta$ CD) e complexo binário (CB BMBM:SBE $\beta$ CD) estão apresentados na **Figura 8**.

A BMBM apresentou reflexões intensas em 10,63°; 17,31°; 19,54°; 20,29° e 21,68° (2 $\theta$ ), características das substâncias. HP $\beta$ CD e SBE $\beta$ CD apresentaram comportamento padrão de substância amorfa. Reflexões características da BMBM foram observadas nas misturas físicas e nos complexos binários, indicando a presença da substância livre no meio. Scalia e colaboradores (2006 e 2002) observaram a presença de reflexões características da BMBM nas misturas físicas 1:1 (p/p), entretanto os difratogramas dos complexos BMBM:HP $\beta$ CD 1:1 e 1:2 apresentaram-se amorfos.



**Figura 8.** Difractogramas obtidos para a avobenzona (BMBM), mistura física (MF BMBM:HPβCD 1:1) e complexo binário (CB BMBM:HPβCD 1:1) obtidos por liofilização operando a 40,0 KV e 40,0 mA, com velocidade de varredura de 2,0 ° min<sup>-1</sup> (2 theta)

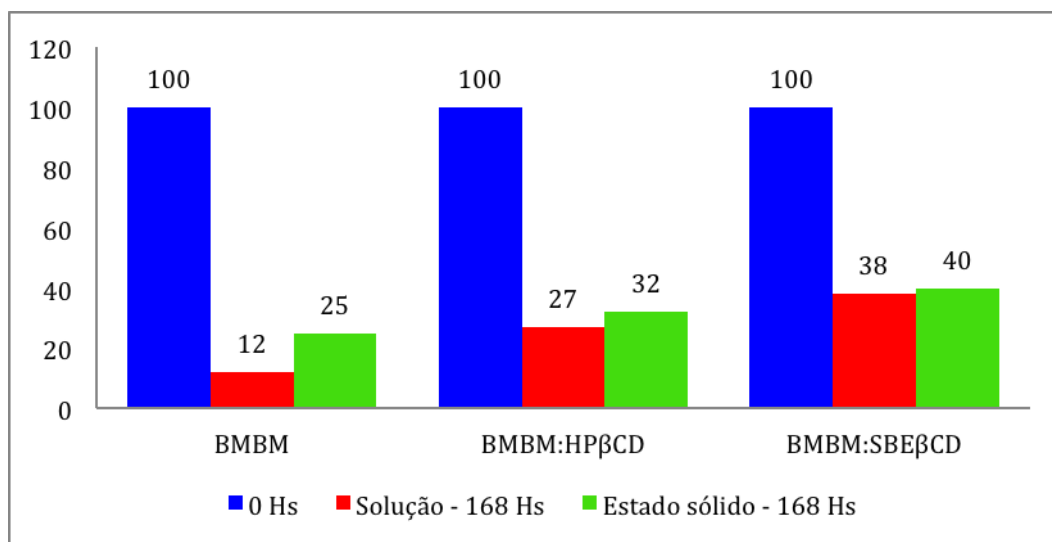


**Figura 9.** Difratomogramas obtidos para a avobenzona (BMBM), mistura física (MF BMBM:SBE $\beta$ CD 1:1) e complexo binário (CB BMBM:SBE $\beta$ CD 1:1) obtidos por liofilização operando a 40 KV e 40 mA, com velocidade de varredura de 2° min<sup>-1</sup> (2 theta)

A eficácia fotoprotetora da BMBM frente à radiação UVA é comprovada e estabelecida, contudo, apresenta fotoinstabilidade, que conduz à conversão fotoquímica para a forma dicetônica (proteção à radiação UVC) comprometendo, assim, sua eficiência frente a radiação UVA (TROSSINI *et al.*, 2015). A fotoestabilidade da BMBM, na ausência e presença de CDs (HP $\beta$ CD e SBE $\beta$ CD), foi monitorada no estado sólido e em solução etanólica (1,0 mg mL<sup>-1</sup>) (**Figura 10**).

A porcentagem de BMBM remanescente nas amostras de BMBM, BMBM:HP $\beta$ CD e BMBM:SBE $\beta$ CD, submetidas à fotodegradação forçada por 168 horas, no estado sólido, foram 25,0; 32,0; e 40,0%, respectivamente; e em solução etanólica (1,0 mg mL<sup>-1</sup>) foram 12,0; 27,0; e 38,0%, respectivamente. Os resultados sugerem maior estabilidade da BMBM no estado sólido do que em solução. Ambas as CDs aumentam a estabilidade fotoquímica da BMBM de forma semelhante, quer em estado sólido, ou em solução (**Figura 10**).





**Figura 10.** Degradação da avobenzona (BMBM) e dos complexos binários BMBM:HPβCD e BMBM:SBEβCD, em estado sólido e em solução, após radiação forçada (U)V por um período de até 168,0 horas

## 5 CONCLUSÕES

As ciclodextrinas são capazes de aumentar a solubilidade da BMBM por meio da formação de complexos de inclusão solúveis. Os resultados das análises térmicas e difração de raios-x indicam a presença de BMBM livre nos sistemas binários formados. Os resultados sugerem maior estabilidade da BMBM no estado sólido do que em solução. A formação de complexos BMBM:CD pode contribuir para aumentar a estabilidade de preparações fotoprotetoras.

## 6 REFERÊNCIAS

AFONSO, S.; HOTITA, K.; SOUSA E SILVA, J. P.; ALMEIDA, I. F.; AMARAL, M. H.; LOBÃO, P. A.; COSTA, P. C.; MIRANDA, M. S.; SILVA, J. C. G. E.; LOBO, J. M. S. Photodegradation of avobenzone: stabilization effects os antioxidants. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.140, p.36-40, 2014.

BALAOGH, T. S.; VELASCO, M. V. R.; PEDRIALI, C. A.; KANEKO, T. M.; BABY, A. R. Ultraviolet radiation protection: current available in photoprotection. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.86, n.4, 2011.

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

CARRIER, R.L.; MILLER, L.A.; AHMED, I. The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. **Journal of Controlled Release**, v.123, v.2, p.78-99, 2007.

CHATELAIN, E.; GABARD, B. Photostabilization of butylmethoxydibenzoylmethane (avobenzone) and ethylhexyl methoxycinnamate by bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine (Tinosorb), a new UV broadband filter. **Photochemistry and Photobiology**, v.74, n.3, p.401-406, 2001.

DAMIANI, E.; ASTOLFI, P.; GIESINGER, J.; EHLIS, T.; HERZOG, B.; GRECI, L.; BASCHONG, W. Assessment of the photo-degradation of UV-filters and radical-induced peroxidation in cosmetics sunscreen formulation. **Free Radical Research**, v.44, n.3, p.304-312, 2010.

DAMIANI, E.; ASTOLFI, P.; CIONNA, L.; IPPOLITI, F.; GRECI, L. Synthesis and application of a novel sunscreen-antioxidant. **Free Radical Research**, v.40, n.5, p.485-494, 2006.

FENG, B.; JIN, J.; WANG, C.; SONG, J.; YANG, G.; ZENG, A. Analysis and retention behavior of isoflavone and aglycones in Radix Astragali by HPLC with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin as a mobile phase additive. **Journal of Separation Science**, v.35, n.24, p.3469-3476, 2012.

GASPAR, L. R.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Evaluation of the photostability of different UV filter combinations in a sunscreen. **International Journal of Pharmaceutics**, v.307, n.2, p.123-128, 2006.

GAZPIO, C.; SÁNCHEZ, M.; FÁRCIA-ZUBIRI, I.X.; VÉLAZ, I.; MARTINEZ-OHÁRRIZ, C.; MARTÍN, C.; ZORNOZA, A. HPLC and solubility study of the interaction between pindolol and cyclodextrin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.37, n.3, p.487-492, 2005.

HIGUCHI, T.; CONNORS, A.K. Phase-solubility techniques. *Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation*, v.4, p.117-212, 1965.

KARLSSON, I.; HILLERSTROM, L.; STENFELD, A.; MARTENSSON, J.; BORJE, A. Photodegradation of dibenzoylmethane: potential causes of photocontact allergy to sunscreen. **Chemical Research in Toxicology**, v.22, n.11, p.1881-1892, 2009.

KAWAKAMI, C. M.; GASPAR, L. R. Mangiferin and naringenin affect the photostability and phototoxicity of sunscreen containing avobenzone. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.151, p.239-247, 2015.

KIM, E. J.; KIM, M. J.; IM, N. R.; PARK, S. N. Photolysis of the organic UV filter, avobenzone, combined with octyl methoxycinnamate by nano-TiO<sub>2</sub> composites. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.149, p.196-203, 2015.

KOKLER, J.; OELGEMOLLER, M.; ROBERTSON, S.; GLASS, B.D. Photostability of sunscreen. **Journal of Photochemistry and Photobiology C**, v.13, n.1, p.91-110, 2012.

KURKOV, S. V.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins. **International Journal of Pharmaceutics**, v.453, n.1, p.167-180, 2013.

LHIAUBET-VALLET, V.; MARIN, M.; JIMENEZ, O.; GORCHS, O.; TRLLAS, C.; MIRANDA, M.A. Filter-filter interaction. Photostabilization, triplet quenching and reactivity with singlet oxygen. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v.9, n.4, p.552-558, 2010.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M.E. Pharmaceutical applications of cyclodextrin. 1. Drug solubilization and atabilization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.85, n.10, p.1017-1025, 1996.

LOFTSSON, T.; DUCHÊNE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v.329, n.1-2, p.1-11, 2007.

LOFTSSON, T.; MÁSSON, M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. **International Journal of Pharmaceutics**, v.28, n.1-2, p.15-30, 2001.

LOFTSSON, T.; HREINSDÓTTIR, D.; MÁSSON, M. The complexation efficiency. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic**, v.57, n.1-4, p.545-552, 2007.

LOFTSSON, T.; HREINSDÓTTIR, D.; MÁSSON, M. Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v.302, n.1-2, p.18-28 2005.

MARROTI, L.; MEUNIER, J. R. Skin DNA photodamage and its biological consequences. **Journal of American Academy of Dermatology**, v.58, n.5, s.2, p.139-148, 2008.

MARTINS, T.E.A. **Obtenção e caracterização de complexos ternários de saquinavir,  $\beta$ -ciclodextrina e polivinilpirrolidona**. 2008. 82f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

MELONI, M.; FARINA, A.; SERVI, B. Molecular modifications of dermal and epidermal biomarkers following UVA exposures on reconstructed full-thickness human skin. **Photochemical & Photobiological Science**, v.9, n.4, p.439-447, 2010.

MIRANDA, J. C.; MARTINS, T. E. A.; VEIGA, F.; FERRAZ, H. G. Cyclodextrins and ternary complexes: technology to improve solubility of poorly soluble drugs. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.47, n.4, p.665-681, 2011.

MIRANDA, J. C. **Obtenção e caracterização de complexos binários e ternários de benznidazol com ciclodextrinas e polímeros hidrossolúveis**. 2008. 88f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

MTURI, G. J.; MARTINCIGH, B. S. Photostability of the sunscreensing agent 4-*tert*-butyl-4'-methoxydibenzoylmethane (avobenzone) in solvents of different polarity and proticity. **Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry**, v.200, n.2-3, p.410-420, 2008.

NARAYAN, D. L.; SALADI, R. N. FOX, J. L. Ultraviolet radiation and skin cancer. **International Journal of Dermatology**, v.49, n.9, p.978-986, 2010.

NOVÁK, C.; EHEN, Z.; FODOR, M.; JICSINSZKY, L.; ORGOVANYL, J. Application of combined thermoanalytical techniques in the investigation of cyclodextrin inclusion complexes. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.84, n.3, p.693-701, 2006.

PARIS, C.; LHIAUBET-VALLET, V.; JIMÉNEZ, O.; TRULLAS, C.; MIRANDA, M.Á. A blocked diketo form of avobenzene: photostability, photosensitizing properties and triplet quenching by a triazine-derived UVB-filter. **Photochemistry and Photobiology**, v.85, n.1, p.178-184, 2009.

PITHA, J.; SZENTE, L.; GREENBERG, J. Poly-L-methionine sulfoxide: A biologically inert analogue of dimethyl sulfoxide with solubilizing potency. **Journal of Pharmaceutical Science**, v.72, n.6, p.665-668, 1983.

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

RAMA, A. C. R.; VEIGA, F.; FIGUEIREDO, I. V.; SOUSA, A.; CARAMONA, M. Aspectos biofarmacêuticos da formulação de medicamentos para neonatos. Fundamentos da complexação de indometacina com hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina para tratamento oral do fechamento do canal arterial. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**, v.41, n.3, p.281-299, 2005.

SCALIA, S.; VILLANI, S.; SCATTURIN, A.; VANDELLI, M. A.; FORNI, F. Complexation of the sunscreen agent, butyl-methoxydibenzoylmethane, with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. **International Journal of Pharmaceutics**, v.175, n.2, p.205-213, 1998.

SCALIA, S.; SIMEONI, S.; BARBIERI, A.; SOSTERO, S. Influence of hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin on photo-induced free radical production by the sunscreen agent, butyl-methoxydibenzoylmethane. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.54, n.11, p.1553-1558, 2002.

SCALIA, S.; TURSILLI, R.; SALA, N.; IANNUCELLI, V. Encapsulation in lipospheres of the complex between butyl methoxydibenzoylmethane and hydroxypropyl-  $\beta$ -cyclodextrin. **International Journal of Pharmaceutics**, v.320, n.1-2, p.79-85, 2006.

SCHWACK, W.; RUDOLPH, T. Photochemistry of dibenzoyl methane UVA filters Part 1. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.28, n.3, p.229-234, 1995.

SKLAR, L. R.; ALMUTAWA, F.; LIM, H. W.; HAMZAVI, I. Effects of ultraviolet radiation, visible light, and infrared radiation on erythema and pigmentation: a review. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v.12, n.1, p.54-64, 2013.

STELLA, V. J.; RAO, V.M.; ZANNOU, E. A.; ZIA, V. Mechanisms of drugs release from cyclodextrin complexes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.36, n.1, p.3-16, 1999.

TROSSINI, G. H. G.; MALTAROLLO, V. G.; GARCIA, R. D'A.; PINTO, C. A. S. O.; VELASCO, M. V. R.; HONORIO, K. M.; BABY, A. R. Theoretical study of tautomers and photoisomers of avobenzene by DFT methods. *Journal of Molecular Modeling*, v.21, n.319, p.3-7, 2015

TROTTA, F.; ZANETTI, M.; CAMINO, G. Thermal degradation of cyclodextrins. **Polymer Degradations and Stability**, v.69, n.3, p.373-379, 2000.

UEKAMA, K.; OTAGARI, M. Cyclodextrins in drugs carrier systems. **Chemical Reviews**, v.98, n.5, p.2045-2076, 1998.

VALLE, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**, v.39, n.9, May 31, p.1033-1046. 2004.

VEIGA, F.; PECORELLI, C.; RIBEIRO, L. **As ciclodextrinas em Tecnologia Farmacêuticas**.1. Ed. Coimbra: MinervaCoimbra, 2006.

VEIGA, F.; TEIXEIRA-DIAS, J. J. C.; KEDZIEREWICZ, F.; SOUSA, A.; MAINCENT, P. Inclusion complexation of tolbutamide with  $\beta$ -cyclodextrin and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. **International Journal of Pharmaceutics**, v.129, n.1-2, p.63-71, 1996.

VILLAVERDE, J.; PÉREZ-MARTÍNEZ, J. I.; MAQUEDA, C.; GINÉS, J. M.; MORILLO. Inclusion complexes of  $\alpha$  and  $\gamma$ -cyclodextrins and the herbicide norflurazon: I. Preparation and characterization. II. Enhanced solubilisation and removal from soils. **Chemosphere**, v.60, n.5, p.656-664, 2005.

WEN, X.; LIU, Z.; ZHU, T. Mass spectrometry and molecular modeling studies on the inclusion complexes between  $\alpha$ ,  $\beta$ -cyclodextrins and simvastatin. **Chemical Physics Letters**, v.405, n.1-3, p.114-117, 2005.

YUAN, C.; JIN, Z.; LI, X. Evaluation of complex forming ability of hydroxypropyl-  $\beta$ -cyclodextrins. **Food Chemistry**, v.106, n.1, p.50-55, 2008.

# Capítulo IV

Obtenção e caracterização de complexos de inclusão binários de *p*-metoxicinamato de octila (EHMC) e ciclodextrinas (HP $\beta$ CD e SBE $\beta$ CD)

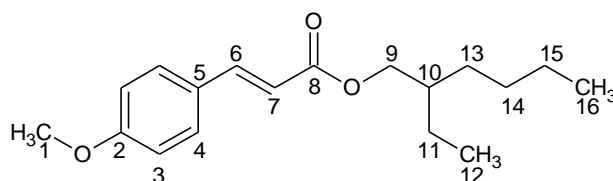
---

---

## 1 INTRODUÇÃO

A necessidade do uso de fotoprotetores é uma realidade irrefutável, uma vez que a exposição da pele às radiações favorece a redução da concentração das substâncias antioxidantes endógenas e à alterações nos lipídios das membranas celulares; inativação de sistemas enzimáticos; modificações de constituintes proteicos, carboidratos e DNA, propiciando o desenvolvimento de determinadas patologias, como reações inflamatórias, queratose solar (SKLAR *et al.*, 2013; NARAYAN, SALADI e FOX, 2010; MARROTI e MEUNIER, 2008), carcinoma, melanoma, sensibilização cutânea (KAWAKAMI e GASPAR, 2015; BALOGH *et al.*, 2011; MELONI *et al.*, 2010), reações fototóxicas e fotoalérgicas além do fotoenvelhecimento (BABY, 2007; VELASCO *et al.*, 2008; PERES *et al.*, 2018).

O *p*-metoxicinamato de octila (EHMC), também conhecido como octinoxate pela nomenclatura *International Non-proprietary Name* (INN) (**Figura 1**), é um filtro solar amplamente utilizado em vários produtos fotoprotetores pelo seu amplo coeficiente de extinção em diversos solventes, aproximadamente 22000–24000 L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, a 310nm. Se exposto à radiação UV, apresenta fotoproteção diminuída, pelo processo de isomerização, gerando assim, sua forma *cis*, que por sua vez possui absorvidade reduzida no UV quando comparado com sua forma *trans*. Poucas reações de fotosensibilização e/ou fotoalergênica foram registradas na literatura (PATTANAARGSON e LIMPHONG, 2001; MAIER *et al.*, 2001).

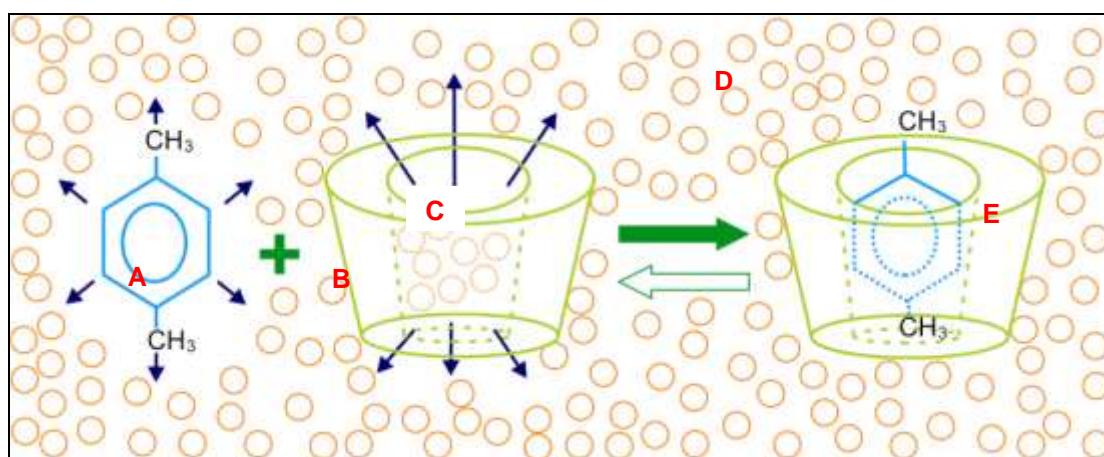


**Figura 1.** Fórmula estrutural do *p*-metoxicinamato de octila (EHMC). Adaptado de PATTANAARGSON e LIMPHONG, 2001.

O nível de informações disponíveis sobre os efeitos nocivos da radiação UV na pele e problemas de fotoestabilidade, torna a busca por formulações fotoestáveis cada vez mais necessária (KULLAVANIJAYA e LIM, 2005; NOHYNEK e SCHAEFER, 2001; PETRAZZUOLI, 2000). A decomposição dos filtros pela luz pode gerar a diminuição da

atividade e do poder de absorção dos raios UV, além de possibilitar a formação de dermatites de contato, fototóxicas ou fotoalérgicas (KAWAKAMI *et al.*, 2015; DAMIANI *et al.*, 2006).

Uma das estratégias para aumentar a eficácia de produtos cosméticos fotoprotetores é a associação de filtros, conduzindo ao efeito sinérgico do desempenho, bem como à fotoestabilidade (LHIAUBET-VALLET *et al.*, 2010). Outra técnica que também pode ser utilizada no intuito de aumentar a estabilidade térmica de filtros é a formação de complexos de inclusão (substâncias filtrantes:CD), uma vez que a formação dos complexos é um arrajno dimensional entre a cavidade hospedeira (CD) e a molécula hóspede (**Figura 2**), capaz de alterar as características químicas da substância hóspede, como proteger da luz a molécula fotoinstável (CEREDA, 2003). Scalia e colaboradores (1998, 2002 e 2004) descrevem estudos de fotoestabilidade de filtros solares (EHMC e BMBM) pela formação de complexos de inclusão com CDs.



**Figura 2.** Formação do complexo de inclusão. A: molécula da substância hóspede; B: ciclodextrina (CD); C: cavidade da ciclodextrina; D: moléculas de água; E: complex substância hóspede:CD. Fonte: MARTINS, 2008.

As CDs apresentam uma forma troco-cônica devido à ausência de rotação livre das ligações glicosídicas e da conformação em cadeia apresentadas pelas unidades de glicose. Nesta estrutura peculiar, os grupos hidroxílicos secundários encontram-se localizados na extremidade mais larga, ligados aos átomos C-2 e C-3 das unidades de glicose, enquanto os grupos hidroxílicos primários localizam-se na extremidade oposta mais estreita, ligados aos átomos C-6 das unidades de glicose (VEIGA *et al.*, 1996; VEIGA, PECORELLI e RIBEIRO, 2006). Com a formação dos complexos de inclusão (substância:CD) os sistemas tem demonstrado a capacidade em alterar características como estabilidade (LOFTSSON, FRIDRIKSDÓTTIR, GUDMUNDSÓTTIR, 1996),



solubilidade, velocidade de dissolução (PITHA, HARMAN e MICHEL, 1986), biodisponibilidade (LIN *et al.*, 1994), além de melhorar a estabilidade a agentes oxidantes e à luz (LOFTSSON e BREWSTER, 2012). Além das naturais, existem as CDs modificadas que podem ser obtidas pela substituição das hidroxilas por grupos metil, etila, carboxietila, hidroxipropila, sulfobutila, ou ainda, por meio da polimerização das CDs (BREWSTER e LOFTSSON, 2007; SZEJTLI, 1998) como a HP $\beta$ CD e SBE $\beta$ CD.

## 2 OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi obter e caracterizar complexos de inclusão contendo *p*-metoxicinamato de octila e na presença de CDs (HP $\beta$ CD e SBE $\beta$ CD).

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Material

O *p*-metoxicinamato de octila (EHMC) (98,0 % de pureza) foi gentilmente cedido pela empresa Basf (São Paulo, Brasil). HP $\beta$ CD (2-hidroxipropil-beta-ciclodextrina, Mw  $\approx$  1.460) foi adquirida da empresa Aldrich Chemistry, enquanto SBE $\beta$ CD (Captisol<sup>®</sup>, sulfobutileter-beta-ciclodextrina, Mw  $\approx$  2.163) foi gentilmente cedida pela empresa Cydex Pharmaceuticals. Foram utilizados etanol 96° GL, metanol grau UHPLC-Supergradient (AppliChem Panreac ITW Companies, Germany) e a água ultrapura Milli-Q<sup>®</sup> Integral (Merck Millipore, Germany).

### 3.2 Métodos

#### 3.2.1 Condições cromatográficas

Utilizou-se cromatógrafo em fase líquida Shimadzu<sup>®</sup> mod. Prominense Modular HPLC composto por detector PAD (*Photodiode Array*) SPD-20A UV, bomba LC-20AB, sistema de degaseificação DGU-20A, amostrador automático SIL-20A/C, sistema de aquecimento CTO-20AC, controlador CBM-20A e programa LC-Solution. As condições cromatográficas empregadas foram: metanol:água 88:12 (v/v), pH 6,8-7,0 como fase móvel, fluxo de 0,8 mL min<sup>-1</sup>, volume de injeção de 20,0  $\mu$ L em coluna cromatográfica de fase-reversa Kromasil<sup>®</sup> RP-C18 (100 A, 5,0  $\mu$ m, 250x4.6 mm) equilibrada à temperatura ambiente e eluída sob condições isocráticas em comprimento de onda 325 nm. A fase móvel foi previamente degaseificada por filtração à vácuo (bomba de vácuo KNF<sup>®</sup> mod.

N810.FT.18, 100 mbar) em membrana semipermeável de acetato de celulose 45,0  $\mu\text{m}$ , seguida de sonicação (Altsonic<sup>®</sup> Clean mod. 9L) por 15,0 minutos. O método para quantificação do EHMC, na ausência ou presença de CDs, foi previamente validado e apresentado no **Capítulo I**.

### **3.2.2 Obtenção dos sistemas binários EHMC:CD (HP $\beta$ CD ou SBE $\beta$ CD)**

Quantidades equimolares de EHMC e CDs (HP $\beta$ CD ou SBE $\beta$ CD) foram pesadas, dispersas em etanol e água purificada, respectivamente, homogeneizadas em câmara incubadora com agitação orbital Solab<sup>®</sup> por 120,0 minutos e submetidas à secagem em liofilizador Liotop<sup>®</sup> L108. Os sistemas binários obtidos foram armazenados em dessecador Marconi<sup>®</sup> MA 192.

### **3.2.3 Caracterização dos sistemas binários EHMC:CD (HP $\beta$ CD ou SBE $\beta$ CD)**

#### **3.2.3.1 Caracterização dos sistemas binários “em solução”**

##### **3.2.3.1.1 Ensaio de Solubilidade do *p*-metoxicinamato de octila (EHMC)**

A solubilidade intrínseca da EHMC foi avaliada de acordo com o método descrito por Higuchi e Connors (1965). Excesso de *p*-metoxicinamato de octila ( $\approx 1,0$  g) foi adicionado a um volume fixo (10,0 mL) de água purificada. As dispersões obtidas foram mantidas sob agitação em câmara incubadora com agitação orbital Solab<sup>®</sup> mod. Shaker SL 222, por 72 horas, a temperatura  $37,0 \pm 5,0$  °C, filtradas em filtro de membrana com tamanho de poro de 0,45  $\mu\text{m}$ , e quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O ensaio foi realizado em triplicata.

##### **3.2.3.1.2 Ensaio de solubilidade de fases**

O ensaio de solubilidade de fases foi realizado segundo método descrito por Higuchi e Connor (1965). Excesso de EHMC foi adicionado às soluções aquosas contendo concentrações crescentes de SBE $\beta$ CD ou HP $\beta$ CD (2,0 a 80,0 mmol L<sup>-1</sup>). As suspensões obtidas foram mantidas sob agitação em câmara incubadora com agitação orbital Solab<sup>®</sup> mod. Shaker SL 222, por 72,0 horas, a temperatura de  $37,0 \pm 5,0$  °C, filtradas em filtro de membrana com tamanho de poro de 0,45  $\mu\text{m}$ , e quantificadas por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os ensaios foram realizados em triplicata.

### **3.2.3.2 Caracterização dos sistemas binários “no estado sólido”**

#### **3.2.3.2.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)**

Curvas DSC foram obtidas por meio de sistema de calorimetria exploratória diferencial Shimadzu® mod. DSC-60, em cápsula de alumínio selada, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (100,0 mL min<sup>-1</sup>), razão de aquecimento de 10,0 °C min<sup>-1</sup>, massa de amostra entre 2,0 – 3,0 mg, e rampa de aquecimento de 40,0 – 600,0 °C. O equipamento foi previamente calibrado com índio metálico 99,99% (T<sub>fusão</sub> = 156,4°C, ΔH<sub>fusão</sub> = 28,5 J g<sup>-1</sup>). As curvas obtidas foram tratadas usando o programa TA-60WS.

#### **3.2.3.2.2 Análise Termogravimétrica (TG/DTG)**

Curvas termogravimétricas foram obtidas em sistema de termogravimetria diferencial Shimadzu® mod. DTG-60, em cápsula de alumínio, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (100,0 mL min<sup>-1</sup>), razão de aquecimento de 10,0 °C min<sup>-1</sup>, massa de amostra de 4,0 – 6,0 mg, e rampa de aquecimento de 40,0 – 900,0 °C. O equipamento foi previamente calibrado usando padrão de oxalato de cálcio monohidratado (ASTM 1582-93). As curvas obtidas foram tratadas usando o programa TA-60WS.

#### **3.2.3.2.3 Difração de Raios X de Pó (P-DRX)**

Os difratogramas de raios-X de pó foram obtidos em difratômetro Bruker® modelo D8 ADVANCE, operando à 40 KV e 40 mA, com velocidade de varredura de 2° min<sup>-1</sup> (2θ), usando silício (Si) policristalino como padrão.

#### **3.2.3.3 Ensaio de Fotoestabilidade**

O ensaio de fotoestabilidade da EHMC, e seus complexos de inclusão, foi realizado no estado sólido e em etanol 96°GL (1,0 mg mL<sup>-1</sup>), empregando câmara de fotoestabilidade Nova Ética (São Paulo, Brasil) mod. 424/CF, equipada com área de exposição de 1380 cm<sup>2</sup> e fontes de luz conforme recomendações do ICH Q1B (2005) opção 2: lâmpada fluorescente branca associada à lâmpada UV com distribuição espectral entre 320 e 400 nm e emissão máxima de energia entre 350 e 370 nm. As amostras foram expostas a irradiação em diferentes intervalos de tempo (0,0; 1440,0; 4320,0; e 10080,0 segundos) à temperatura de 25,0 °C ± 0,5. As amostras no estado sólido foram organizadas em placas de Petri. As soluções etanólicas (1,0 mg mL<sup>-1</sup>) foram transferidas para ampolas de vidro tipo 1, transparente, de 10,0 mL e, em seguida, hermeticamente

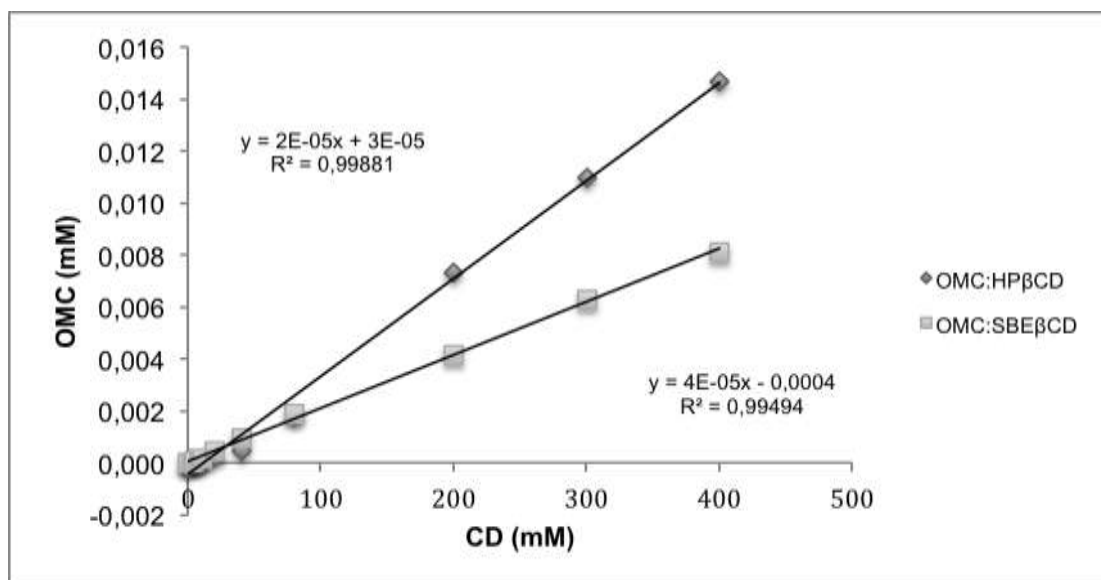
fechadas. O teor de EHMC remanescente nas amostras foi quantificado por meio de por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A ação das CDs sobre os parâmetros cromatográficos já foram relatados por alguns autores (GASPAR e MAIA CAMPOS, 2006; GAZPIO *et al.*; 2005; ROZOU e ANTONIADOU-VYZA, 1998). No intuito de eliminar possíveis interferências na quantificação do EHMC, curvas analíticas foram construídas para EHMC na presença das CDs (HP $\beta$ CD e SBE $\beta$ CD). A presença das CDs (HP $\beta$ CD e SBE $\beta$ CD) não interferem na seletividade do método, como discutido no **Capítulo 1**.

O método de solubilidade de fases, é o método de escolha para verificação da formação de complexos de inclusão. Por meio dos diagramas de solubilidade de fases é possível avaliar a estabilidade e a estequiometria dos complexos de inclusão (BREWSTER e LOFTSSON, 2007).

A **Figura 3** apresenta o diagrama de solubilidade de fases do EHMC na presença de concentrações crescente (2,0 a 80,0 mM) das CDs (HP $\beta$ CD e SBE $\beta$ CD). A **Tabela 1** apresenta os valores de solubilidade intrínseca ( $S_0$ ), obtida a partir do método de agitação em frascos, e dados de solubilidade de intercepto ( $S_{int}$ ), coeficiente angular e coeficiente de determinação ( $R^2$ ), para o EHMC e para os sistemas binários EHMC:SBE $\beta$ CD e EHMC:HP $\beta$ CD, obtidos a partir da regressão linear dos diagramas de solubilidade de fases.



**Figura 3.** Diagrama de solubilidade de fases do  $\rho$ -metoxicinamato de octila (EHMC) na presença de concentrações de HP $\beta$ CD e SBE $\beta$ CD (2,0 – 80,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ )

**Tabela 1.** Valores de solubilidade intrínseca ( $S_0$ ) do  $\rho$ -metoxicinamato de octila (EHMC) obtida a partir do método de agitação em frascos e valores de solubilidade do intercepto ( $S_{int}$ ), coeficiente angular e coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtidos a partir dos diagramas de solubilidade de fases dos sistemas binários

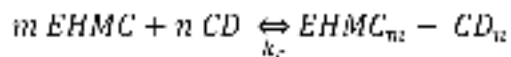
Sistemas	$S_0$ (mM/mg mL $^{-1}$ )	$S_{int}$ (mM)	Coef. Angular	$R^2$
EHMC	0,0003/0,01	---	---	---
EHMC:HP $\beta$ CD		0,00003	0,00002	0,99881
EHMC:SBE $\beta$ CD		0,0004	0,00004	0,99494

A solubilidade intrínseca obtida para EHMC foi 0,01 mg mL $^{-1}$  (0,0003 mM). Os diagramas de solubilidade de fases apresentaram aumento linear da solubilidade do EHMC em função da concentração de CDs (HP $\beta$ CD e SBE $\beta$ CD), exibindo diagrama de solubilidade do tipo AL.

Os valores de coeficiente angular obtidos à partir da regressão linear dos diagramas de solubilidade de fases para os sistemas binários apresentaram valores inferiores a 1, assumindo estequiometria 1:1. A proporção estequiométrica 1:1 ocorre pela associação de uma única molécula hóspede na cavidade de uma molécula de CD, sendo este tipo de complexação mais relatada na literatura (CAPELLO *et al.*, 2007; CAPELLO *et al.*, 2009; SATHIGARI *et al.*, 2009; CIRRI *et al.*, 2009; BRUN *et al.*, 2006; DOIPHONE *et al.*, 2008).

A partir da formação dos complexos binários de estequiometria 1:1, isto é, de primeira ordem para as CDs ( $n=1$ ) e também de ordem 1, relativo à EHMC ( $m=1$ ), desta

forma, tem-se a situação representada pelo equilíbrio químico (BREWSTER e LOFTOSSON, 2007):



sendo o valor de  $k_c$  determinado a partir da equação de Higuchi e Connors (1965).

A constante de estabilidade aparente  $k_c$  pode ser calculada de acordo com Higuchi e Connors (1965), a partir de porção linear do diagrama de solubilidade, de acordo com a **Equação 1**:

$$k_c = \frac{\text{coeficiente angular}}{S_0 (1 - \text{coeficiente angular})} \quad \text{(Equação 1)}$$

onde  $k_c$  é a constante de estabilidade e  $S_0$  é a solubilidade intrínseca da molécula hóspede.

A eficiência de complexação ( $EC$ ) é calculada a partir do coeficiente angular do diagrama de solubilidade de fases, de acordo com a **Equação 2** (LOFTSSON, MÁSSON e BREWSTER, 2004; LOFTSSON *et al.*, 2004):

$$EC = \frac{[F/CD]}{[CD]} = S_0 k_c = \frac{\text{coeficiente angular}}{1 - \text{coeficiente angular}} \quad \text{(Equação 2)}$$

onde  $[F/CD]$  é a concentração do complex dissolvido,  $[CD]$  é a concentração de ciclodextrina livre dissolvida e o *coeficiente angular* é obtido à partir do diagrama de solubilidade de fases.

A *EC* é usada para calcular a razão molar (*RM*) entre a substância hospedeira e a ciclodextrina (*CD*), empregando-se a **Equação 3** descrita a seguir (KURKOV e LOFTSSON, 2013; LOFTSSON, MÁSSON e BREWSTER, 2004; LOFTSSON *et al.*, 2004)

$$RM = 1: \left(1 + \frac{1}{EC}\right) \quad \text{(Equação 3)}$$

onde *RM* é a razão molar e *EC* a eficiência de complexação.

Loftsson, Hreinsdóttir e Másson (2005) descrevem que para substâncias com solubilidade superior a 1,0 mM, os valores de solubilidade intrínseca (*S<sub>0</sub>*) devem ser iguais aos valores de solubilidade do intercepto (*S<sub>int</sub>*) definido pela equação da reta. No entanto, para substâncias com *S<sub>0</sub>* inferior a 0,1 mM um desvio negativo da solubilidade intrínseca é observado, causando erro, desta forma, nos cálculos da constante de estabilidade (*k<sub>c</sub>*) e eficiência de complexação (*EC*) foi utilizado valor de solubilidade de intercepto (*S<sub>int</sub>*).

Loftsson, Hreinsdóttir e Másson (2005) propuseram o cálculo da eficiência de complexação (*EC*) considerando que o valor de *k<sub>c</sub>* pode variar segundo método de determinação. O cálculo de *EC* é realizado à partir do coeficiente angular do diagrama de solubilidade de fases, sendo o seu valor independente do valor de solubilidade, como apresentado na **Equação 2** (LOFTSSON, HREINSDÓTTIR e MÁSSON, 2005; LOFTSSON, HREINSDÓTTIR e MÁSSON, 2007; LOFTSSON e DUCHÊNE, 2007). Por meio do valor de *EC* foi possível determinar a relação molécula hospede/hospedeira obtida na complexação e o acréscimo de massa na molécula hóspede.

A **Tabela 2** apresenta os valores de constante de estabilidade (*k<sub>c</sub>*), eficiência de complexação (*EC*), e razão molar (*RM*) de complexação (EHMC:CD), calculadas à partir dos diagramas de solubilidade de fases para CB EHMC:SBEβCD e CB EHMC:HPβCD.

**Tabela 2.** Valores de constante de estabilidade (*k<sub>c</sub>*), eficiência de complexação (*EC*) e razão molar de complexação (EHMC:CD) calculadas à partir dos diagramas de solubilidade de fases para os sistemas binários CB EHMC:SBEβCD e CB EHMC:HPβCD

Sistemas	<i>k<sub>c</sub></i> (M <sup>-1</sup> )	<i>EC</i>	Razão Molar
CB EHMC:HPβCD	100,00	0,04	1:26
CB EHMC:SBEβCD	666,68	0,02	1:51

Quanto maior o valor de  $k_c$ , mais favorável a interação entre a substância hóspede e a CD (WEN, LIU e ZHU, 2005). Pitha, Szente e Greenberg (1983) relatam que complexos com constante de estabilidade ( $k_c$ ) compreendidos entre 200,0 e 5000,0 M<sup>-1</sup> apresentam aplicações práticas, uma vez que complexos lábeis podem levar à liberação prematura e complexos muito estáveis retardar ou não liberar totalmente a molécula hóspede. Para Rama e colaboradores (2005),  $k_c$  é um fator relevante na obtenção de complexos de inclusão, dado que se o valor for elevado não há liberação da molécula, com conseqüente diminuição da fração livre da molécula hóspede, considerando adequadas, constantes de estabilidade entre 100,0 e 1000,0 M<sup>-1</sup>.

Os valores de  $k_c$  sugerem a formação de complexos de inclusão estáveis na proporção de uma molécula de EHMC para 26 moléculas de HP $\beta$ CD e 51 moléculas de SBE $\beta$ CD (**Tabela 2**).

Diversos autores estudaram a complexação do  $p$ -metoxicinamato de octila com CD e verificaram a formação de complexos de inclusão (MOTA *et al.*, 2009; AL-RAWASHDEH *et al.*, 2013; CHISVERT, PASCUAL-MARTÍ e SALVADOR, 2001; SCALIA *et al.*, 2004; SCALIA *et al.*, 2006). Scalia e colaboradores (2002) estudaram a complexação do EHMC com as CDs naturais ( $\gamma$ CD,  $\beta$ CD,  $\alpha$ CD) e a CD derivada (HP $\beta$ CD), de elevada solubilidade, observando melhor efeito de solubilização do EHMC com a HP $\beta$ CD.

O complexo EHMC:SBE $\beta$ CD apresentou maior incremento de solubilidade que os sistemas binários obtidos com a HP $\beta$ CD (**Tabela 3**).

**Tabela 3.** Valores de solubilidade da  $p$ -metoxicinamato de octila (EHMC) e dos complexos binários obtidos por liofilização (CB EHMC:HP $\beta$ CD e CB EHMC:SBE $\beta$ CD) em mg mL<sup>-1</sup>, mM e valores de incremento de solubilidade (*IS*) obtido nos sistemas binários

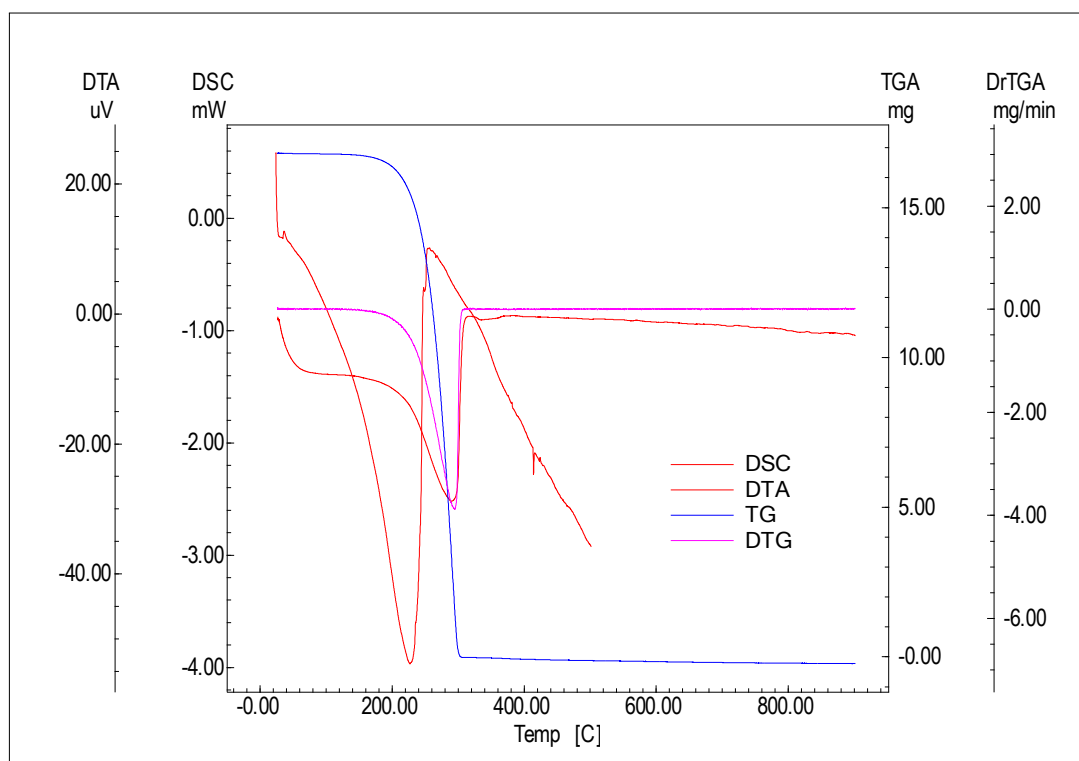
	Solubilidade do $p$ -metoxicinamato de octila		<i>IS</i>
	(mg mL <sup>-1</sup> )	(mM)	
<b>EHMC</b>	0,01	0,00003	---
<b>CB EHMC:HP<math>\beta</math>CD</b>	0,11	0,0038	12,7x
<b>CB EHMC:SBE<math>\beta</math>CD</b>	0,06	0,0021	70,0x

Complexos de inclusão são obtidos pela inserção da molécula hóspede na cavidade hidrófoba da CD, ligando-se por meio das pontes de hidrogênio com grupos hidroxílicos localizados na superfície externa do anel das CDs (BREWSTER e LOFTSSON, 2007; LOFTSSON, HREINSDÓTTIR e MÁSSON, 2005; LOFTSSON e DUCHÊNE, 2007).



Calorimetria exploratória diferencial (DSC) é um dos métodos de escolha na área farmacêutica com intuito de controle de matérias-primas e, ainda, em estudos de pré-formulação e desenvolvimento de novas formulações (TROTTA, ZANETTI e CAMINO, 2000). Normalmente, uma mudança ou desaparecimento do evento endotérmico correspondente ao ponto de fusão ou ponto de sublimação da molécula hóspede pura é um indício da formação do complexo de inclusão. O desaparecimento ou diminuição do evento endotérmico da substância hóspede deve-se à inclusão desta molécula ao interior da cavidade da CD (GIORDANO *et al.*, 2001; LOFTSSON e MÁSSON, 2001). Já a técnica TG/DTG é capaz de determinar as perdas de massa que se produzem nas substâncias analisadas quando submetidas ao aquecimento.

A **Figura 4** ilustra as curvas DSC, TG/DTG e DTA do EHMC. A curva DSC do EHMC apresentou evento endotérmico de fusão em 226,74 °C ( $\Delta H = 865,25 \text{ J g}^{-1}$ ) correspondente à vaporização do composto no estado líquido. A curva TGA mostra decomposição em uma única etapa em 144,23 °C, referente à volatilização da amostra. A curva DTA confirma os eventos térmicos observados na curva DSC (**Tabela 4**).



**Figura 4.** Curva DSC do  $\rho$ -metoxicinamato de octila (EHMC) obtida sob atmosfera dinâmica de nitrogênio ( $100 \text{ mL min}^{-1}$ ) e razão de aquecimento de  $10,0 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$  e rampa de aquecimento de  $40,0 - 600,0 \text{ }^\circ\text{C}$ . Os termogramas TG e DTG do EHMC obtidos sob atmosfera dinâmica de  $\text{N}_2$  e razão de aquecimento  $10,0 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$  com rampa de aquecimento entre  $40,0$  e  $900,0 \text{ }^\circ\text{C}$

As propriedades térmicas das amostras EHMC, CDs (HP $\beta$ CD e SBE $\beta$ CD), mistura físicas (EHMC:HP $\beta$ CD e EHMC:SBE $\beta$ CD) e complexos binários (EHMC:HP $\beta$ CD e EHMC:SBE $\beta$ CD), investigadas por DSC e TG/DTG, são apresentados na **Tabela 4**.

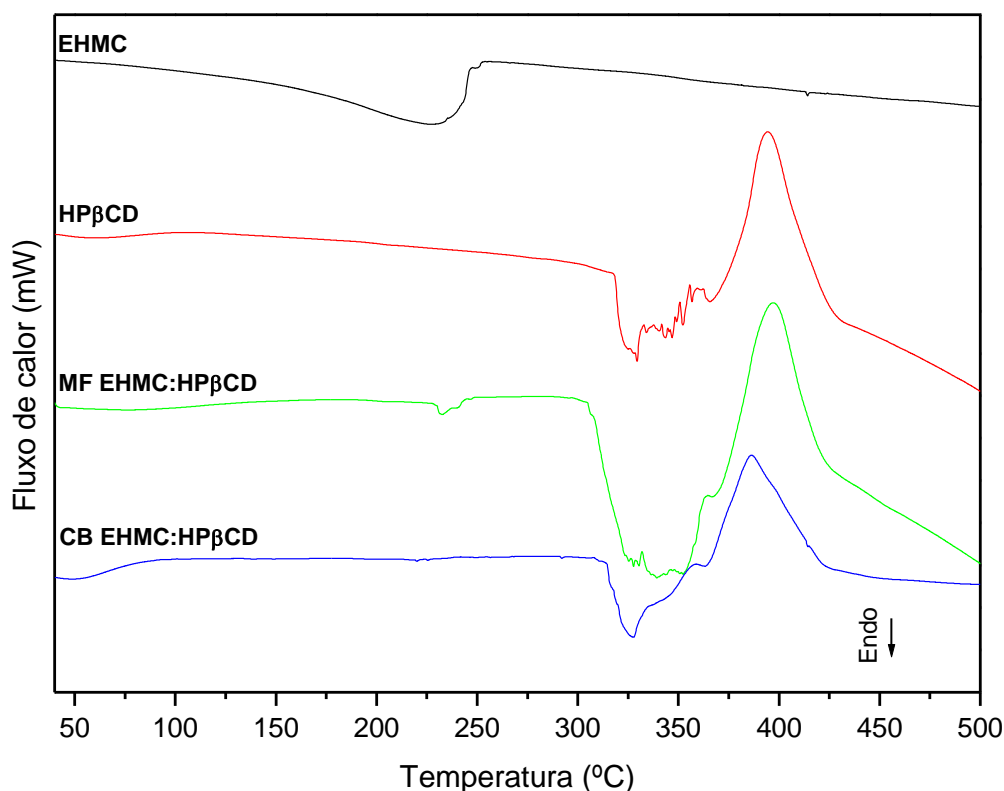
**Tabela 4.** Dados termodinâmicos obtidos a partir das curvas DSC e TG/DTG do EHMC, CDs (HP $\beta$ CD e SBE $\beta$ CD), misturas físicas (MF EHMC:CD) e complexos de inclusão (CB EHMC:CD)

	DSC		TG <sub>&lt;</sub> 100°C	TG	
	T <sub>pico</sub> °C	$\Delta H$ (J g <sup>-1</sup> )		T <sub>onset</sub> °C	$\Delta m$ (%)
<b>EHMC</b>	226,74	865,25	0,15	26,43	101,41
<b>CD</b>					
HP $\beta$ CD			2,88	27,34/121,83	3,11/91,84
SBE $\beta$ CD			5,33	28,55/148,64/316,19/446,75	7,88/22,14/26,81/14,28
<b>MF EHMC:CD</b>					
EHMC:HP $\beta$ CD	232,66	14,58	2,76	27,80/175,38/281,15/328,00/398,01	4,67/17,93/7,26/61,06/3,69
EHMC:SBE $\beta$ CD			3,51	28,44/174,06/260,94/319,18/399,55	6,97/20,84/16,54/17,19/18,87
<b>CB EHMC:CD</b>					
EHMC:HP $\beta$ CD			2,61	26,73/116,78/226,95/390,95	2,72/11,20/79,18/7,47
EHMC:SBE $\beta$ CD			4,60	22,35/170,00/222,58/314,11/426,87	8,94/4,78/20,07/24,48/18,27

\*T<sub>pico</sub> (temperatura do pico, °C), T<sub>onset</sub> (temperatura inicial do pico, °C),  $\Delta H$  (perda de massa em J/g, mW/mg, %),  $\Delta m$  (perda de massa, %)

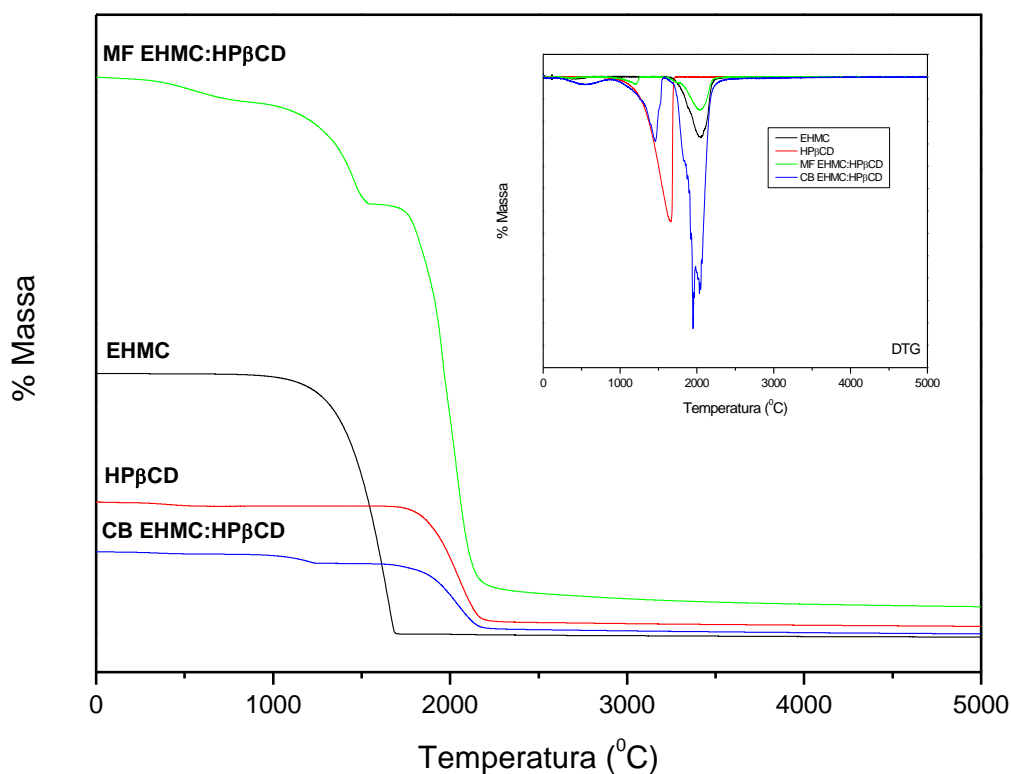
As curvas DSC do EHMC, HP $\beta$ CD, da mistura física 1:1 (p/p) e do complexo de inclusão EHMC:HP $\beta$ CD obtido na razão molar 1:1 (p/p) são apresentados na **Figura 5**.

A curva DSC do HP $\beta$ CD apresenta um evento térmico de desidratação em 60,0 °C, referente a desidratação da substância, seguido de eventos térmicos irregulares de decomposição. A curva DSC da mistura física EHMC:HP $\beta$ CD apresentou o evento endotérmico característico do EHMC em 191,73 °C, indicando a presença de EHMC livre no sistema. Na curva DSC do complexo de inclusão binário, o evento térmico relativo ao EHMC foi suprimido, assumindo comportamento características da CD, indicando provável interação entre o EHMC e a HP $\beta$ CD, por meio da formação do complexo de inclusão.



**Figura 5.** Curvas DSC da *p*-metoxicinamato de octila (EHMC), ciclodextrina (HP $\beta$ CD), misturas físicas 1:1 (MF EHMC:HP $\beta$ CD) e sistema binário 1:1 (CB EHMC:HP $\beta$ CD), obtidos sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (100,0 mL min<sup>-1</sup>) e razão de aquecimento de 10,0 °C min<sup>-1</sup> e rampa de aquecimento de 40,0 – 600,0 °C

Na **Figura 6** estão apresentadas as curvas TG/DTG do EHMC, HP $\beta$ CD, mistura física EHMC:HP $\beta$ CD e sistema binário EHMC:HP $\beta$ CD. O EHMC apresenta decomposição em uma única etapa ( $\Delta_m = 99,64 \text{ J g}^{-1}$ ). A HP $\beta$ CD apresenta decomposição em duas etapas, a primeira, relativa à desidratação (27,34 °C,  $\Delta_m = 3,11 \text{ J g}^{-1}$ ), e a segunda, referente à decomposição do material (121,83 °C,  $\Delta_m = 91,84 \text{ J g}^{-1}$ ). Na curvas DSC da mistura física ainda possível identificar a presença de EHMC livre, por meio evento endotérmico da substância hóspede. Quanto ao complexo binário, o evento característico do EHMC foi suprimido, indicando a formação do complexo de inclusão entre EHMC e a HP $\beta$ CD (**Figura 6 e Tabela 4**).



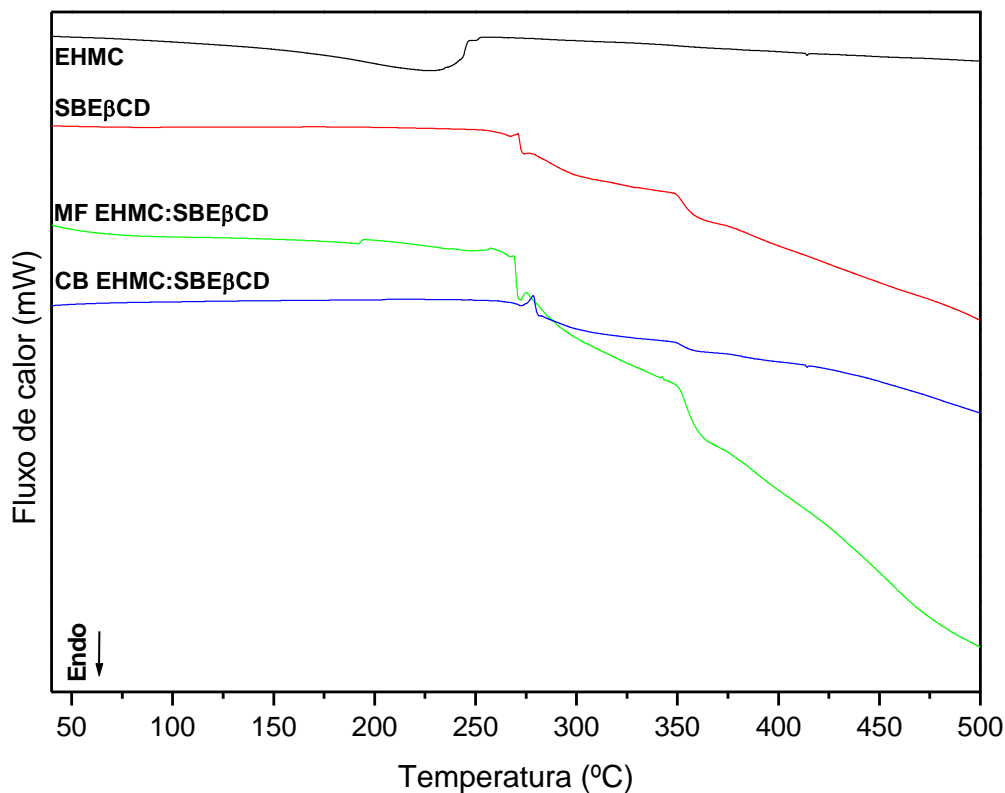
**Figura 6.** Curva TG/DTG da *p*-metoxicinamato de octila (EHMC), ciclodextrina (HP $\beta$ CD), mistura física 1:1 (MF EHMC:HP $\beta$ CD) e complexo binário 1:1 (CB EHMC:HP $\beta$ CD), obtidas sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> e razão de aquecimento 10,0 °C min<sup>-1</sup> com rampa de aquecimento entre 40,0 e 900,0 °C

A curva TG/DTG do sistema binário EHMC:HP $\beta$ CD mostrou elevação da temperatura de termodecomposição do EHMC de 274,70 °C para 355,12 °C. Para Novák e colaboradores (2006), um indicativo da formação de complexos de inclusão é o deslocamento do evento de decomposição térmica da substância hóspede para temperatura mais elevada (**Figura 6**). Scalia e colaboradores (2002), avaliaram a complexação do EHMC com  $\gamma$ CD,  $\beta$ CD,  $\gamma$ CD e HP $\beta$ CD por meio de diversas técnicas, dentre estas a análise termogravimétrica (TG), indicando a formação de complexos entre o *p*-metoxicinamato de octila e a CD por meio do deslocamento dos eventos termogravimétricos do EHMC.

As curvas DSC do EHMC, SBE $\beta$ CD, mistura física EHMC:SBE $\beta$ CD 1:1 (p/p) e do complexo de inclusão binário EHMC:SBE $\beta$ CD obtidos na razão molar 1:1 são apresentados na **Figura 7**.

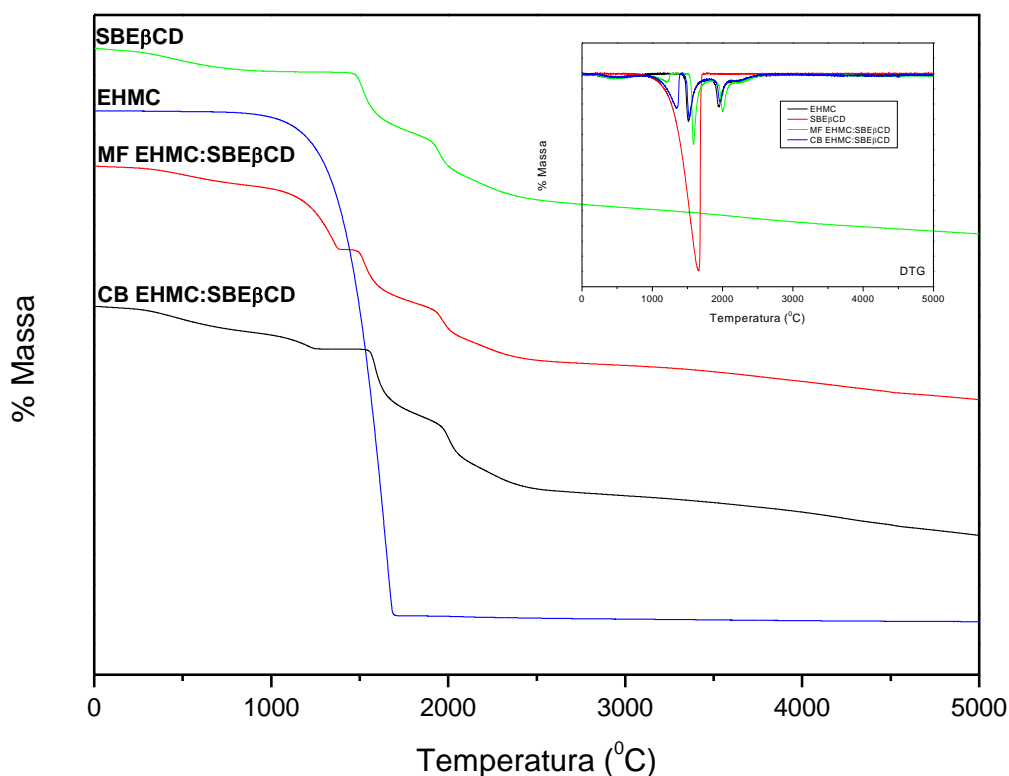
A curva DSC da SBE $\beta$ CD apresentou comportamento térmico estável até a 140,0 °C, seguido de decomposição. A mistura física e os complexos apresentaram

comportamento térmico semelhante, com supressão do evento térmico de fusão do EHMC, sugerindo a formação do complexo de inclusão.



**Figura 7.** Curvas DSC da *p*-metoxicinamato de octila (EHMC), ciclodextrina (SBE $\beta$ CD), misturas físicas 1:1 (MF EHMC:SBE $\beta$ CD) e sistemas binários 1:1 (CB EHMC:SBE $\beta$ CD), obtidos sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (100,0 mL min<sup>-1</sup>) e razão de aquecimento de 10,0 °C min<sup>-1</sup> e rampa de aquecimento de 40,0 – 600,0 °C

A **Figura 8** ilustra as curvas TG/DTG do EHMC, SBE $\beta$ CD, mistura física e complexo de inclusão binário.



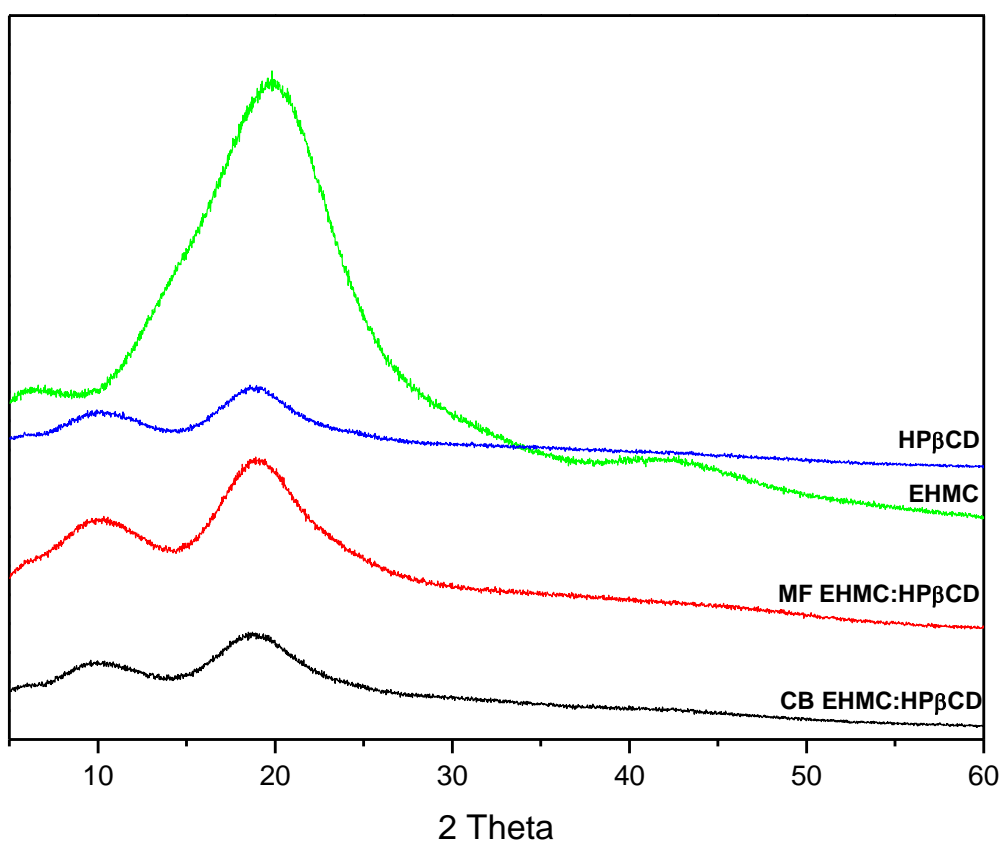
**Figura 8.** Curvas TG/DTG da *p*-metoxicinamato de octila (EHMC), ciclodextrina (SBEβCD), mistura física 1:1 (MF EHMC:SBEβCD) e sistema binário 1:1 (CB EHMC:SBEβCD), obtidas sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> e razão de aquecimento 10,0 °C.min<sup>-1</sup> com rampa de aquecimento entre 40,0 e 900,0 °C

As perdas de massas das CDs (HPβCD e SBEβCD), em temperatura inferior a 100,0 °C, foram, 2,88 e 5,33%, respectivamente; para as misturas físicas (RUT:HPβCD e RUT:SBEβCD), foram 2,76 e 3,51%, respectivamente; para os sistemas binários (EHMC:HPβCD e EHMC:SBEβCD), 2,61 e 4,60%, respectivamente. As misturas físicas e os sistemas binários apresentaram redução da água ligada no interior da cavidade da CDs, sugerindo a substituição das moléculas de água, e a interação da molécula hóspede com as CDs. Para Ammar e colaboradores (2006), na formação dos complexos de inclusão, as moléculas de água presentes no interior da cavidade das CDs podem ser substituídas pela molécula hóspede ou por parte dela, reduzindo a quantidade de água nestas cavidades.

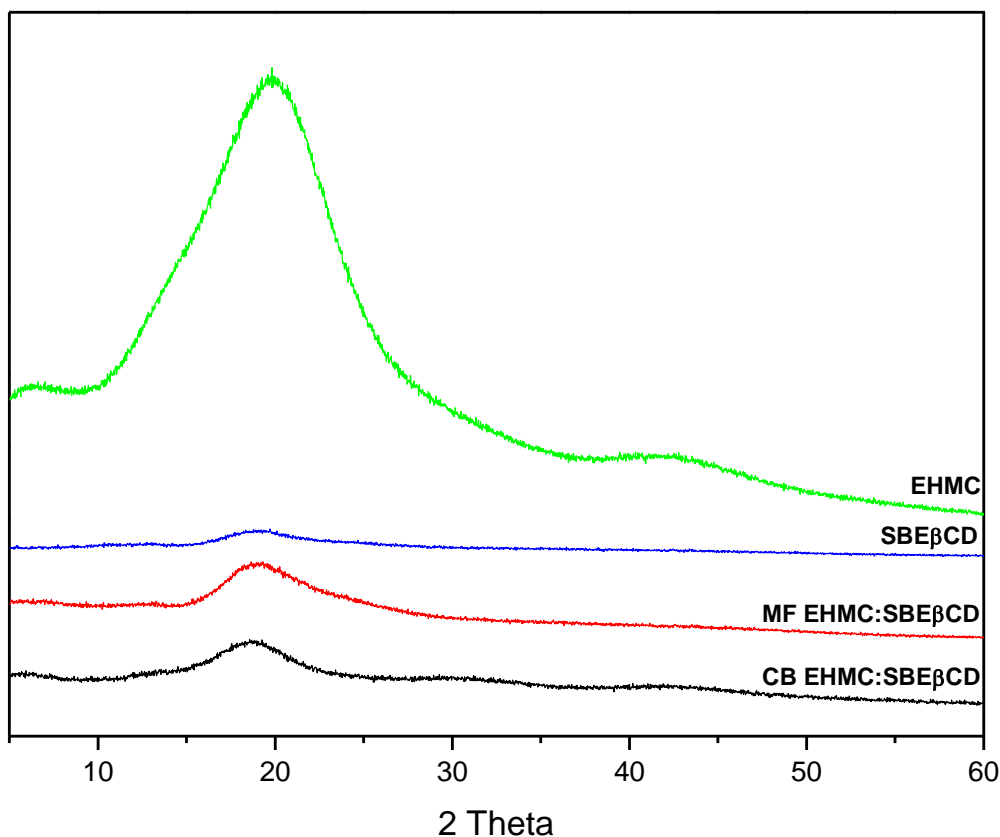
A difração de raios-X é um dos métodos mais úteis na identificação e detecção de complexos de inclusão com CD (LIU e ZHU, 2006).

Na **Figura 9** os difratogramas da EHMC, HP $\beta$ CD, mistura física EHMC:HP $\beta$ CD e sistema binário são apresentados e a **Figura 10**, apresenta os difratogramas do EHMC, SBE $\beta$ CD, mistura física e complexo binário.

O EHMC é um líquido transparente, com comportamento amorfo nos ensaios de difração de raios-X. As CDs (HP $\beta$ CD e SBE $\beta$ CD) apresentam comportamento amorfo, logo, as misturas físicas e sistemas binários do EHMC com ambas CDs apresentaram comportamento semelhante, não sendo possível extrair informações à cerca da formação de complexos de inclusão (**Figura 9 e 10**).



**Figura 9.** Difratogramas obtidos para a *p*-metoxicinamato de octila (EHMC), mistura física (MF EHMC:HP $\beta$ CD 1:1) e complexo binário (CB EHMC:HP $\beta$ CD) obtidos por liofilização operando a 40 KV e 40 mA, com velocidade de varredura de 2° min<sup>-1</sup> (2 theta)

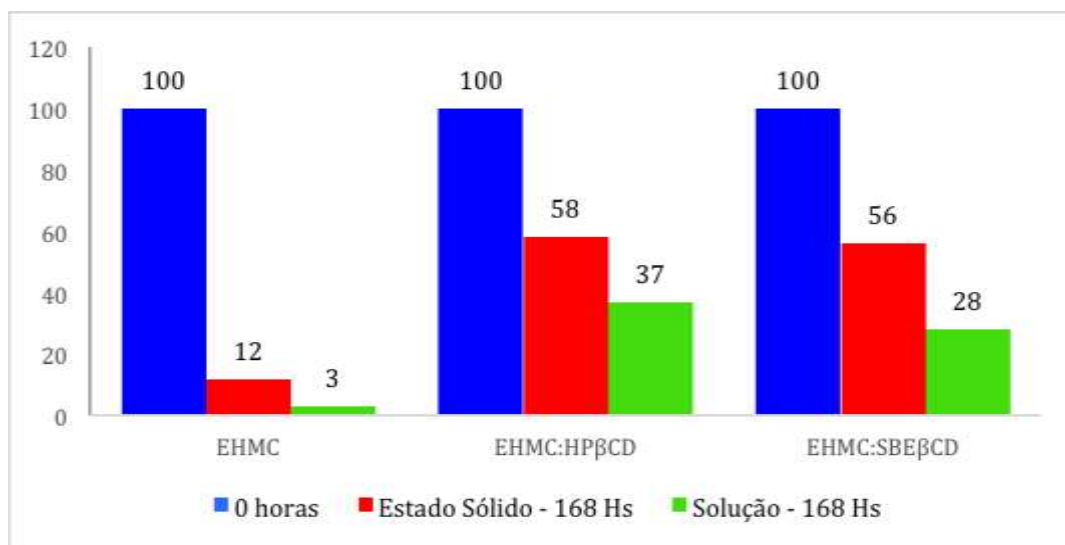


**Figura 10.** Difractogramas obtidos para o *p*-metoxicinamato de octila (EHMC), mistura física (MF EHMC:SBEβCD) e complexo binário (CB EHMC:SBEβCD) obtidos por liofilização operando a 40 KV e 40 mA, com velocidade de varredura de 2° min<sup>-1</sup> (2 theta)

A porcentagem de EHMC remanescente nas amostras de EHMC, EHMC:HPβCD e EHMC:SBEβCD, submetidas à fotodegradação forçada por 168 horas, no estado sólido, foram 12,0; 58,0; e 56,0%, respectivamente; e em solução etanólica (1,0 mg mL<sup>-1</sup>) foram 3,0; 37,0; e 28,0% respectivamente. Os resultados sugerem maior estabilidade da EHMC no estado sólido do que em solução. Ambas as CDs aumentam a estabilidade fotoquímica da EHMC de forma semelhante, que em estado sólido ou em solução (**Figura 11**).

A diminuição na concentração detectada da molécula de EHMC pode ter sido em consequência da isomerização, que é um dos principais cursos de fotodegradação da molécula (PATTANAARGSON & LIMPHONG, 2001). A inclusão do EHMC nas CDs, podem favorecer o aumento da estabilidade fotoquímica das substâncias, retardando assim, a degradação (LOFTSSON & BREWSTER, 1996; LOFTSSON & BREWSTER, 2010).





**Figura 11.** Degradação do *p*-metoxicinamato de octila (EHMC) e dos complexos binários (CB EHMC:HPβCD e CB EHMC:SBEβCD), no estado sólido, após radiação UV por um período de até 168,0 horas

## 5 CONCLUSÕES

Os ensaios de solubilidade de fases demonstraram que as CDs (HPβCD e SBEβCD) são capazes de formarem complexos de inclusão com o EHMC, e aumentarem a solubilidade da substância.

As curvas DSC e TG/DTG sugerem a formação de complexos de inclusão entre EHMC e as CDs (HPβCD e SBEβCD) os quais favorecem o aumento da estabilidade fotoquímica da molécula de EHMC.

## 6 REFERÊNCIAS

AL-RAWASHDEH, N. A. F.; AL-SADEH, K. S.; AL-BITAR, M. B. Inclusion complexes of sunscreen agents with β-cyclodextrin: spectroscopic and molecular modeling studies. **Journal of Spectroscopy**, v.2013, p.1-11, 2013.

AMMAR, H. O.; SALAMA, H. A.; GHORAB, M.; MAHMOUD, A. A. Formulation and biological evaluation of glimepiride-cyclodextrin-polymer systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v.309, n.1-2, p.129-138, 2006.

BABY, A. R. **Avaliação in vitro da permeabilidade cutânea da rutina em emulsões cosméticas**. São Paulo, 2007. 144f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

BALOGH, T. S.; VELASCO, M. V. R.; PEDRIALI, C. A.; KANEKO, T. M.; BABY, A. R. Ultraviolet radiation protection: current available in photoprotection. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.86, n.4, 2011.

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

BRUN, H.; PAUL, M.; RAZZOUQ, N.; BINHAS, M.; GIBAUD, S.; ASTIER, A. Cyclodextrin inclusion complexes of the central analgesic drug nefopam. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.32, n.10, p.1123-1134, 2006.

CAPELLO, B.; DI MAIO, C.; IERVOLINO, M.; MIRO, A. Combined effect of hydroxypropyl methylcellulose and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin on physicochemical and dissolution properties of celecoxib. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v.59, n.3-4, p.237-244, 2007.

CAPELLO, B.; DI MAIO, C.; IERVOLINO, M.; MIRO, A.; CALIGNANO, A. Etodolac/cyclodextrin formulations: Physicochemical characterization and in vivo pharmacological studies. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 35, n.7, p.877-886, 2009.

CEREDA, M. P. Ciclodextrinas: características e aplicações. In: CARGIL, F. (Ed). Tecnologia usos e potencialidades de tuberosas amiláceas Latino Americanas, v.3, 2003. Cixlodextrinas: carcaterísticas e aplicações, p.475-498. (CULTURAS AMILÁCEAS LATINO AMERICANAS).

CHISVERT, A.; PASCUAL-MARTÍ, M. C.; SALVADOR, A. Determination of the UV filters worldwide authorise in sunscreens by hight-performance liquid chromatography. Use of cyclodextrins as mobile phase modifier. **Journal of Chromatography A**, v.921, n.7-8, p.207-215, 2001.

CIRRI, G.; RIGHI, M. F.; MAESTRELLI, F.; MURA, P.; VALLERI, M. Development of glyburide fast-dissolving tablets based on the combined use of cyclodextrins and polymers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.35, n.1, p.73-82, 2009.

DAMIANI, E.; ASTOLFI, P.; CIONNA, L.; IPPOLITI, F.; GRECI, L. Synthesis and application of a novel sunscreen-antioxidant. **Free Radical Research**, v.40, n.5, p.485-494, 2006.

DOIPHONE, D.; GAIKWAD, S.; PORE, Y.; KUCHEKAR, B.; LATE, S. Effect of  $\beta$ -cyclodextrin complexation on physicochemical properties of zapelon. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v.62, n.1-2, p.43-50, 2008.

GASPAR, L. R.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Evaluation og the photostability of diferente UV filter combinations in a sunscreen. **International Journal of Pharmaceutics**, v.307, n.2, p.123-128, 2006.

GAZPIO, C.; SÁNCHEZ, M.; GARCÍA-ZUBIRI, I. X.; VÉLAZ, I.; MARTÍNEZ-OHÁRRIZ, C.; MARTÍN, C.; ZORNOZA, A. HPLC and solubility study of the interaction between pindolol and cyclodextrins. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.37, n.3, p.487-492, 2005.

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

HIGUCHI, T.; CONNORS, A. K. Phase-solubility techniques. **Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation**, v.4, p.117-212, 1965.

KAWAKAMI, C. M.; GASPAR, L. R. Mangiferin and naringenin affect the photostability and phototoxicity of sunscreen containing avobenzone. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.151, p.239-247, 2015.

KULLAVANIJAYA, P.; LIM, H. W. Photoprotection. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.52, n.6, p.959-962, 2005.

KURKOV, S. V.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins. **International Journal of Pharmaceutics**, v.453, n.1, p.167-180, 2013.

LHIAUBET-VALLET, V.; MARIN, M.; JIMENEZ, O.; GORCHS, O.; TRLLAS, C.; MIRANDA, M.A. Filter-filter interaction. Photostabilization, triplet quenching and reactivity with singlet oxygen. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v.9, n.4, p.552-558, 2010.

LIN, S. Z.; WOUESSIDJEW, D.; POELMAN, M.C.; DUCHÊNE, D. In vivo evaluation of indomethacin / cyclodextrin complexes gastrointestinal tolerance and dermal anti-inflammatory activity. **International Journal of Pharmaceutics**, v.106, n.1, p.63-67, 1994.

LIU, L.; ZHU, S. Preparation and characterization of inclusion complexes of prazosin hydrochloride with  $\beta$ -cyclodextrin and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.40, n.1, p.122-127, 2006.

LOFTSSON, T.; MÁSSON, M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. **International Journal of Pharmaceutics**, v.28, n.1-2, p.15-30, 2001.

LOFTSSON, T.; MÁSSON, M.; BREWSTER, M. E. Self-Association of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.93, n.5, p.1091-1099, 2004.

LOFTSSON, T. SIGURDSSON, H. H.; MÁSSON M.; SCHIPPER, N. Preparation of solid drug/cyclodextrin complexes of acidic and basic drugs. **Pharmazie**, v.59, n.1, p.25-29, 2004.

LOFTSSON, T.; DUCHÊNE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v.329, n.1-2, p.1-11, 2007.

LOFTSSON, T.; FRIDRIKSDÓTTIR, H.; GUDMUNDSDÓTTIR, T. K. The effect of water-soluble polymers on aqueous solubility of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v.127, n.2, p.293-296, 1996.

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.; BREWSTER, M. E. Pharmaceutical applications of cyclodextrin. 1. Drug solubilization and stabilization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.85, n.10, p.1017-1025, 1996.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M. E. Pharmaceutical applications of cyclodextrin: basic Science and product development. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.62, n.11, p.1607-1621, 2010.

LOFTSSON, T.; HREINSDÓTTIR, D.; e MÁSSON, M. Effect of cyclodextrin solubilization of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v.302, n.1-2, p.18-28, 2005.

LOFTSSON, T.; HREINSDÓTTIR, D.; MÁSSON, M. The complexation efficiency. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v.57, n.1-4, p.545-552, 2007.

MAIER, H.; SCHAUBERGER, G.; BRUNNHOFER, K.; HONIGSMANN, H. Change of ultraviolet absorbance of sunscreens by exposure to solar simulated radiation. **Journal of Investigative Dermatology**, v.117, n.2, p.256-262, 2001.

MARROTI, L.; MEUNIER, J.R. Skin DNA photodamage and its biological consequences. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.58, n.5, s.2, p.139-148, 2008.

MARTINS, T.E.A. **Obtenção e caracterização de complexos ternários de saquinavir,  $\beta$ -ciclodextrina e polivinilpirrolidona**. 2008. 82f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

MELONI, M.; FARINA, A.; SERVI, B. Molecular modifications of dermal and epidermal biomarkers following UVA exposures on reconstructed full-thickness human skin. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v.9, n.4, p.439-447, 2010.

MOTA, A.C.V.; FREITAS, Z.M.F.; TODESCHINI, A.R.; CABRAL, L.M.; SANTOS, E.P. Inclusão do filtro solar *p*-metoxicinamato de octila em  $\beta$ -ciclodextrina e Avaliação da purificação dos complexos de inclusão por RMN  $^1\text{H}$ . **Latin American Journal of Pharmacy**, v.28, n.1, p. 97-99, 2009.

NARAYAN, D.L.; SALADI, R.N. FOX, J.L. Ultraviolet radiation and skin cancer. **International Journal of Dermatology**, v.49, n.9, p.978-986, 2010.

NOHYNEK, G.J.; SCHAEFER, H. Benefit and risk of organic ultraviolet filters. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 33, n.3, p.285-299, 2001.

NOVÁK, C.; ÉHEN, Z.; FODOR, M.; JICSINSZKY, L.; ORGOVANYI, J. Application of combined thermoanalytical techniques in the investigation of cyclodextrin inclusion complexes. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 84, n.3, p.693-701. 2006.

- PATTANAARGSON, S.; LIMPHONG, P. Stability of octyl methoxycinnamate and identification of its photo-degradation product. **International Journal of Cosmetic Science**, v.23, n.3, p.153-160, 2001.
- PERES, D. D.; SARRUF, F. D.; OLIVEIRA, C. A.; VELASCO, M. V. R.; BABY, A. R. Ferulic acid photoprotective properties in association with UV filters: multifunctional sunscreen with improved SPF and UVA-PF. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 185, p.46-49, 2018.
- PETRAZZUOLI, M. Advances in sunscreen. **Current Problems in Dermatology Home**, v.12, n.6, p.287-290, 2000.
- PITHA, J.; HARMAN, S. M. MICHEL, M. E. Hydrophilic cyclodextrins derivatives enable effective oral administration of steroidal hormones. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.75, n.2, p.165-167, 1986.
- PITHA, J.; SZENTE, L.; GREENBERG, J. Oly-L-methionine sulfoxide: A biologically inert analogue of dimethyl sulfoxide with solubilizing potency. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.72, n.6, p.665-668, 1983.
- RAMA, A. C. R.; VEIGA, F.; FIGUEIREDO, I. V.; SOUSA, A.; CARAMONA, M. Aspectos biofarmacêuticos da formulação de medicamentos para neonatos. Fundamentos da complexação de indometacina com hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina para tratamento oral do fechamento do canal arterial. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**, v.41, n.3, p.281-299, 2005.
- ROZOU, S.; ANTONIADOU-VYZA, E. An improved HPLC method overcoming Beer's law derivations arising from supramolecular interactions in tolfenamic acid and cyclodextrin complexes. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.18, n.4-5, p.899-905, 1998.
- SATHIGARI, S.; CHADHA, G.; LEE, Y. H. P.; WRIGHT, N.; PARSONS, D. L.; RANGARI, V. K.; FASINA, O.; BABU, R. J. Physicochemical characterization of efavirenz-cyclodextrin inclusion complexes. **American Association of Pharmaceutical Sciences**, v.10, n.1, p.81-87, 2009.
- SCALIA, S.; MOLINARI, A.; CASOLARI, A.; MALDOTTI, A. Complexation of the sunscreen agente, phenylbenzimidazole sulphonic acid with cyclodextrins: effect on stability and photo-induced free radical formation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, n.22, n.4, p.241-249, 2004.
- SCALIA, S.; VILLANI, S.; SCATTURIN, A.; VANDELLI, M.A.; FORNI, F. Complexation of the sunscreen agente, butyl-methoxydibenzoylmethane, with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. **International Journal of Pharmaceutics**, v.175, n.2, p.205-213, 1998.
- SCALIA, S.; SIMEONI, S.; BARBIERI, A.; SOSTERO, S. Influence of hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin on photo-induced free radical production by the sunscreen agent, butyl-methoxydibenzoylmethane. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, n.54, n.11, p.1553-1558, 2002.

SCALIA, S.; TURSILLI, R.; BIANCHI, A.; NOSTRO, P.L.; BOCCI, E.; RIDI, F.; BAGLIONI, P. Incorporation of the sunscreen agente, octyl methoxycinnamate in a cellulosic fabric grafted with  $\beta$ -cyclodextrin. **International Journal of Pharmaceutics**, v.308, n.1-2, p.155-159, 2006.

SKLAR, L. R.; ALMUTAWA, F.; LIM, H. W.; HAMZAVI, I. Effects of ultraviolet radiation, visible light, and infrared radiation on erythema and pigmentation: a review. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v.12, n.1, p.54-64, 2013.

SZEJTLI, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. **Chemical Reviews**, v.98, n.5, p.1743-1754, 1998.

TROTTA, F.; ZANETTI, M.; CAMINO, G. Thermal degradation of cyclodextrins. **Polymer Degradation and Stability**, v.69, n.3, p. 373–379, 2000.

VEIGA, F.; TEIXEIRA-DIAS, J. J. C.; KEDZIEREWICZ, F.; MAINCENT, P. Inclusion complexation of tolbutamide with  $\beta$ -cyclodextrin and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. **International Journal of Pharmaceutics**, v.129, n.1-2, p.63-71, 1996.

VEIGA, F.; PECORELLI, C.; RIBEIRO, L. **As ciclodextrinas em Tecnologia Farmacêuticas**.1. Ed. Coimbra: MinervaCoimbra, 2006.

VELASCO, M.V.R.; BALOGH, T.S.; PEDRIALI, C.A.; SARRUF, F.D.; PINTO, C.A.S.O.; KANEKO, T.M.; BABY, A.R. Associação da rutina com *p*-metoxicinamato de octila e benzofenona-3: Avaliação *in vivo* da eficácia fotoprotetora por espectrofotometri de reflectância. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.27, n.1, p.23-27, 2008.

WEN, X.; LIU, Z.; ZHU, T. Mass spectrometry and molecular modeling studies on the inclusion complexes between  $\alpha$ ,  $\beta$ -cyclodextrins and simvastatin. **Chemical Physics Letters**, v.405, n.1-3, p.114-117, 2005.