

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS -  
MESTRADO  
AREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCÊNCIAS  
APLICADAS À FARMÁCIA

AMANDA MIGLIORINI URBAN

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E LIBERAÇÃO IN VITRO DE  
COMPLEXOS DE INCLUSÃO NISTATINA:β-CICLODEXTRINA OBTIDOS POR  
DIFERENTES MÉTODOS**

PONTA GROSSA

2016

AMANDA MIGLIORINI URBAN

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E LIBERAÇÃO IN VITRO DE  
COMPLEXOS DE INCLUSÃO NISTATINA:β-CICLODEXTRINA OBTIDOS POR  
DIFERENTES MÉTODOS**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas na Universidade Estadual de Ponta Grossa, Área de concentração em Fármacos, Medicamentos e Biociências aplicadas à Farmácia. Linha de pesquisa em Desenvolvimento e Controle de Fármacos, Medicamentos e Correlatos.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago

Coorientadora: Profa. Dra. Vanessa Migliorini Urban

PONTA GROSSA

2016

AMANDA MIGLIORINI URBAN

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E LIBERAÇÃO IN VITRO DE  
COMPLEXOS DE INCLUSÃO NISTATINA:β-CICLODEXTRINA OBTIDOS POR  
DIFERENTES MÉTODOS**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas na Universidade Estadual de Ponta Grossa, Área de concentração em Fármacos, Medicamentos e Biociências aplicadas à Farmácia. Linha de pesquisa em Desenvolvimento e Controle de Fármacos, Medicamentos e Correlatos.

Ponta Grossa, 15 de fevereiro de 2016.

---

Prof. Dr. Paulo Vitor Farago – Orientador  
Doutor em Química  
Universidade Estadual de Ponta Grossa

---

Profa. Dra. Karin Hermana Neppelenbroek  
Doutora em Reabilitação Oral  
Universidade de São Paulo

---

Profa. Dra. Josiane de Fátima Padilha de Paula  
Doutora em Química  
Universidade Estadual de Ponta Grossa

## **DADOS CURRICULARES**

### **Amanda Migliorini Urban**

|            |            |                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|------------|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| NASCIMENTO | 05.03.1988 | Franca – São Paulo                                                                                                                                                                                                                                                              |
| FILIAÇÃO   |            | Maria Angélica Migliorini Urban<br>Sérgio Paulo Migliorini Urban                                                                                                                                                                                                                |
| 2007-2010  |            | Curso de Graduação em Farmácia Generalista da Universidade de Franca (UNIFRAN) – Franca – São Paulo                                                                                                                                                                             |
| 2011-2012  |            | Curso de Especialização em Farmácia Clínica e Atenção Farmacêutica na Universidade de Franca (UNIFRAN) – Franca – São Paulo                                                                                                                                                     |
| 2014-2016  |            | Curso de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) Nível de Mestrado, Área de Concentração em Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia. Linha de pesquisa em Desenvolvimento e Controle de Fármacos, Medicamentos e Correlatos |

## *Dedicatória*

A *Deus*, por ter me carregado sempre nas mãos e nunca abandonado.

*“Grande coisa é haver recebido do céu uma partícula da sabedoria, o dom de achar as relações das coisas, a faculdade de as comparar e o talento de concluir!”*

*Machado de Assis*

Aos meus pais *Sérgio e Angélica*, pela vida, por terem me ensinado que tudo se consegue com esforço e sacrifício, por terem sempre a palavra certa para meu espírito, pelo colo, o abraço e o beijo a cada instante, por acompanharem meus passos e me acalmarem nas dificuldades. Amo muito!

*“Quem ama extremamente, deixa de viver em si e vive no que ama.”*

*Platão*

Às minhas irmãs *Vanessa e Tamara*, por todos os momentos fraternos, pelo apoio e amor. Adoro vocês!

*“Eu gosto de olhos que sorriem, de gestos que se desculpam, de toques que sabem conversar e de silêncios que se declaram.”*

*Machado de Assis*

Aos meus sobrinhos *Pedro Henrique e Matheus*, pelo carinho, pelo amor e por me trazerem inspiração e alegria de viver.

*“Eu sem você sou só desamor. Um barco sem mar, um campo sem flor. Tristeza que vai, tristeza que vem. Sem você, meu amor, eu não sou ninguém...”*

*Vinícius de Moraes*

À memória da minha avó *Lourdes*.

*“A vida não passa de uma oportunidade de encontro; só depois da morte se dá a junção; os corpos apenas têm o abraço, as almas têm o enlace.”*

*Victor Hugo*

*Dedico este trabalho*

*“E quando vejo, a vida espera mais de mim mais além, mais de mim  
O eterno aprendizado é o próprio fim  
Já nem sei se tem fim  
De elástica, minha alma dá de si  
Mais além, mais de mim  
Cada ano a vida pede mais de mim mais de nós, mais além”*

Parte da canção "*Eu e a vida*" interpretada pelo cantor *Jorge Vercillo*.

## *Agradecimentos especiais*

À minha coorientadora *Profa Dra Vanessa Migliorini Urban*, pela paciência, dedicação e tolerância, pela orientação minuciosa e detalhada desta Dissertação, por me ensinar que a paciência e a perseverança são fundamentais. A sua competência, como professora e pesquisadora, serve-me como exemplo e estímulo. Obrigada pela amizade e carinho.

Ao meu orientador *Prof. Dr. Paulo Vitor Farago*, pela disponibilidade para responder minhas dúvidas, recebendo-me com carinho e nunca medindo esforços para me ouvir, por me contagiar a paixão pelas coisas, pela valiosa contribuição científica no desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pelo carinho e amizade.

*Minha gratidão*

## *Agradecimentos*

À **Universidade Estadual de Ponta Grossa**, ao Secretário da Ciência, Tecnologia e do Ensino Superior do Paraná, **Prof. Dr João Carlos Gomes**, à Pró-Reitora de Pesquisa e Pós-Graduação da UEPG, **Profa Dra Osnara Maria Mongruel Gomes** e ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UEPG, **Prof Dr Daniel Fernandes**, pela oportunidade de realização do Curso de Mestrado.

Aos Professores dos Programas de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e Odontologia da UEPG, **Prof. Dr. Edmar Miyoshi**, **Prof. Dr. Flávio Luis Beltrame**, **Profa. Dra. Josiane de Fátima Padilha de Paula**, **Profa. Dra. Priscileila Colerato Ferrari**, **Prof. Ms. Luis Antônio Esmerino**, **Prof. Dr. Fábio André dos Santos**, **Profa. Dra. Maiza Taques Margraf Althaus** e **Profa. Dra. Nara Hellen Campanha Bombarda**, pelos ensinamentos, conselhos, orientações, sugestões e carinho.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pelo suporte financeiro concedido na forma de Bolsa de Mestrado durante o transcorrer do Curso.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, pelo Auxílio à Pesquisa para desenvolvimento deste trabalho (MCTI/CNPq/ Edital Universal 14/2014 – Faixa A – Processo nº 456403/2014-0).

À **Profa. Dra. Karin Hermana Neppelenbroek**, por disponibilizar materiais e recursos adquiridos com seu Auxílio Regular à Pesquisa obtido pela **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, permitindo que este trabalho pudesse ser realizado.

À **Profa. Dra. Andressa Novatski**, pela disponibilidade em compartilhar seus conhecimentos em análises térmicas e espectroscópicas.

Ao **Prof. Dr. César Augusto Galvão Arrais**, pelos ensinamentos, disponibilidade, conselhos e por sua amizade. Ao meu cunhado **César**, por me apoiar, ensinar, ajudar e por estar ao meu lado em todos os momentos difíceis durante esses dois anos de Mestrado.



À **mestre Simone Ferraz Sabino**, à **doutora Giselle Nathaly Calaça** e à **técnica de laboratório Vanessa Parise Chagury** do Complexo de Laboratórios Multiusuários da UEPG (CLABMU-UEPG), pelo auxílio nas análises de Ressonância Magnética Nuclear e Microscopia Eletrônica de Varredura de Alta Resolução.

À **pós-doutoranda Giselly Bianchi** do Grupo de Estudos em Fenômenos Fototérmicos do Departamento de Física da UEM, pelo auxílio nas medidas de Análise Térmica Diferencial e Termogravimétrica. E aos Professores responsáveis pelos equipamentos, **Prof. Dr. Antônio Medina Neto** e **Profa. Dra. Francielle Sato**.

À **Prof. Ms Jéssica Bitencourt**, pela disponibilidade e ensinamentos e pela amizade.

Às funcionárias **Valéria Ferreira Reis**, **Bernadete Munhoz** e **Luzia Chavez Simão**. Obrigada pela prontidão e ensinamentos.

Às minhas queridas amigas **Amanda Martinez Lyra**, **Amanda Cristina Schoeffel** e **Melissa Marques Gonçalves**, pela amizade e carinho, pelos momentos de felicidade, pelas conversas, por se importarem comigo e serem o conforto para a saudade. Vocês sempre estarão no meu coração.

*“Um amigo é aquele que sabe a canção de seu coração e pode cantá-la quando você tiver esquecido a letra.”*

*Julio Ramón Ribeyro*

Aos meus queridos amigos do Mestrado **Amanda Martinez Lyra**, **Ana Paula Prestes**, **Bruna Mikulis**, **Bruno Minozzo**, **Cristiane Rickli**, **Bárbara Paz**, **Melissa Marques Gonçalves**, **Leandro Ravski**, **Josyel Olszewski**, **Clarissa Elize Lopes**, **Paula Souza de Freitas** e **Flávia de Brito Pedroso**, pela amizade, pelas risadas e pela parceria.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão desta pesquisa.

Urban, A M. **Desenvolvimento, caracterização e liberação in vitro de complexos de inclusão nistatina:β-ciclodextrina obtidos por diferentes métodos** [Dissertação] Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2016.

## RESUMO

**Objetivo:** A proposta deste estudo foi elaborar complexos de inclusão (CI) entre nistatina (Nis) e β-ciclodextrina (βCD), para a posterior inclusão em material macio para reembasamento de prótese removível, visando promover liberação controlada e permitir efeito antifúngico prolongado. **Material e métodos:** Suspensões de Nis:βCD em proporções molares de 1:0,125, 1:0,25, 1:0,5, 1:0,625, 1:1, 1:2 e 1:4 foram preparadas em triplicata em água destilada, agitadas por 24 h e avaliadas com relação à solubilidade de fases. As proporções 1:1 e 1:2 foram selecionadas para obtenção de CI a partir dos seguintes métodos: mistura física (MF), liofilização (Lio) e *spray drying* (SP). A MF foi homogeneizada por 15 min com almofariz e pistilo. Os demais CI foram dissolvidos em solução de água/etanol (50:50 v/v), agitados por 24 h e, então, submetidos a um dos processos de secagem Lio ou SP. Fármaco, βCD e CI foram submetidos às seguintes caracterizações físico-químicas: microscopia eletrônica de varredura por emissão de efeito de campo (FEG), espectroscopia infravermelha por transformada de Fourier (FT-IR), análise térmica diferencial (DSC) e termogravimétrica (TGA), difração de raios X (DRX) e ressonância magnética nuclear (RMN). Para o estudo de dissolução in vitro, foram selecionados os CI 1:1 Lio e SP. Previamente, foi construída uma curva de calibração da Nis em água Milli-Q®. A dissolução foi realizada em triplicata utilizando o aparato pá do dissolutor de cubas a 37°C e 75 rpm durante 8 h para a Nis e 24 h para os CI. Os resultados obtidos foram avaliados com relação ao perfil, eficiência (ANOVA-1 fator) e cinética de dissolução. **Resultados:** A Nis apresentou morfologia cristalina e a βCD apresentou características mais amorfas em relação ao fármaco. A MF e os CI Lio e SP apresentaram características mais amorfas com pequenos cristais. A análise em FT-IR mostrou vários deslocamentos, reduções de intensidade e estreitamento de picos nos CI em relação aos fármacos não complexados. A análise de DSC mostrou diminuição da intensidade do pico de ponto de fusão da Nis nos CI, indicando complexação parcial. A análise em DRX mostrou que nos CI houve achatamento e desaparecimento de linhas espectrais (“amorfização”), sendo que no SP as alterações foram mais significantes. Foi comprovado que a molécula de Nis foi incluída parcialmente na cavidade da βCD no CI Lio 1:1, uma vez que foi observado grande deslocamento químico no H5' do interior da cavidade toroidal do oligossacarídeo. Apesar de não ter sido notada diferença estatisticamente significativa ( $p=0,1931$ ) entre os resultados de eficiência de dissolução ao final de 8 h, os CI Lio e SP 1:1 mostraram uma mecânica de liberação imediata do fármaco, sendo que o CI Lio 1:1 apresentou o perfil de liberação mais rápido. Tanto o perfil de liberação da Nis como dos CI Lio e SP 1:1 revelaram melhor ajuste cinético para o modelo biexponencial. **Conclusão:** A partir dos resultados obtidos pelas técnicas de caracterização, pôde ser concluído que a nistatina apresentou melhor complexação com a β-ciclodextrina na proporção molar 1:1 nos métodos de Lio e SP. O complexo de inclusão nistatina:β-ciclodextrina 1:1 obtido por Lio apresentou melhor perfil de

dissolução e cinética biexponencial, o que pode resultar em estratégias interessantes para o desenvolvimento de formas farmacêuticas que possibilitem uma liberação controlada quando incorporadas ao material macio para reembasamento de prótese dentária.

**Palavras-chave\*:** Estomatite sob Prótese. Nistatina. Solubilidade. Liofilização. Caracterização química.

---

\* Em acordo com os Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) disponível no domínio <http://decs.bvs.br>

Urban, A. M. **Development, characterization, and in vitro release of nystatin:β-cyclodextrin inclusion complexes obtained using different methods** [Dissertação] Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2016.

## ABSTRACT

**Purpose:** This study prepared inclusion complexes (IC) between nystatin (Nys) and β-cyclodextrin (βCD), for posterior incorporation into a soft liner denture material, aiming to promote controlled release and a prolonged antifungal effect. **Material and methods:** Suspensions of Nys:βCD in molar ratios of 1:0.125, 1:0.25, 1:0.5, 1:0.625, 1:1, 1:2, and 1:4 were prepared in triplicate in distilled water, stirred for 24 h, and evaluated regarding phase solubility. The 1:1 and 1:2 molar ratios were selected to obtain IC using the following methods: physical mixture (PM), freeze-drying (FD), and spray-drying (SP). PM was homogeneous blended in a mortar for 15 min. The other IC were dissolved in water/ethanol solution (50:50 v/v), stirred for 24 h, and then submitted to one of the drying methods FD or SP. Drug, βCD, and IC were submitted to the following physicochemical characterization: field emission electron gun microscopy (FEG), Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetry (TGA), X ray diffraction (DXR), and nuclear magnetic resonance (NMR). For the in vitro dissolution study, 1:1 FD and SP IC were selected. Previously, a calibration curve of Nys in Milli-Q® water was plotted. The dissolution was made in triplicate using paddle device at 37°C and 75 rpm during 8 h for Nys and 24 h for IC. The results were evaluated in relation to dissolution profile, efficiency (ANOVA-1 way) and kinetics. **Results:** Nys presented crystalline morphology and βCD presented more amorphous characteristics in comparison to the drug. PM and FD and SP IC presented more amorphous characteristics with small crystals. FT-IR analysis showed several shifts, reduction in intensity, and peak narrowing in the IC in relation to the non-complexed drugs. DSC analysis showed reduction in intensity of the fusion point peak of Nys in the IC, indicating partial complexation. DXR analysis showed peak size reduction and disappearance of spectral lines ("amorphization"), with SP showing more significant changes. It was proved that Nys was partially included into the βCD cavity in 1:1 FD IC, because a great chemical shift was observed for H5', which is within the toroidal cavity of the oligosaccharide. Despite there was no statistically significant difference ( $p=0.1931$ ) among the results of dissolution efficiency at 8 h, the 1:1 FD and SP IC showed an immediate release mechanics of the drug, with the 1:1 FD IC presenting the faster dissolution profile. The Nys and 1:1 FD and SP IC revealed the better kinetic adjustment for the biexponential model. **Conclusion:** Based on the results obtained by the characterization techniques, it was concluded that nystatin better complexed with β-cyclodextrin in 1:1 molar ratio in FD and SP methods. Freeze-drying inclusion complex 1:1 nystatin:β-cyclodextrin presented the better dissolution profile and biexponential kinetics, and this may result in interesting strategy to the development of pharmaceutical compounds that enable a controlled release when they are incorporated to the soft liner denture material.

**Keywords\*:** Denture Stomatitis. Nystatin. Solubility. Freeze Drying. Chemical Characterization.

---

\* Em acordo com os Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) disponível no domínio <http://decs.bvs.br>

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|           |                                                                                                                                                                   |    |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 1  | - Prótese dentária removível reembasada com material macio modificado pela incorporação de nistatina.....                                                         | 20 |
| FIGURA 2  | - Fórmula estrutural plana da Nis.....                                                                                                                            | 26 |
| FIGURA 3  | - Fórmulas estruturais planas das CD ( $\alpha$ , $\beta$ e $\gamma$ ).....                                                                                       | 28 |
| FIGURA 4  | - Representação esquemática da estrutura funcional das CD...                                                                                                      | 29 |
| FIGURA 5  | - Fluxograma das etapas experimentais do estudo.....                                                                                                              | 38 |
| FIGURA 6  | - Curva analítica da Nis em água.....                                                                                                                             | 45 |
| FIGURA 7  | - Representação gráfica dos tipos de diagramas de solubilidade de fases A e B com seus subtipos.....                                                              | 46 |
| FIGURA 8  | - Diagrama de solubilidade/estabilidade de fases da suspensão Nis: $\beta$ CD.....                                                                                | 47 |
| FIGURA 9  | - Pós da Nis <b>(A)</b> e $\beta$ CD <b>(B)</b> não complexadas e pós obtidos após os métodos de MF 1:1 <b>(C)</b> , CI Lio 1:1 <b>(D)</b> e CI SP 1:1 <b>(E)</b> | 48 |
| FIGURA 10 | - Fotomicrografias obtidas por FEG. <b>A</b> – Nis e <b>B</b> – $\beta$ CD não complexadas.....                                                                   | 50 |
| FIGURA 11 | - Fotomicrografias obtidas por FEG. <b>A</b> – MF 1:1 Nis: $\beta$ CD e <b>B</b> – MF 1:2 Nis: $\beta$ CD.....                                                    | 50 |
| FIGURA 12 | - Fotomicrografias obtidas por FEG. <b>A</b> – CI Lio 1:1 Nis: $\beta$ CD e <b>B</b> – CI Lio 1:2 Nis: $\beta$ CD.....                                            | 51 |
| FIGURA 13 | - Fotomicrografias obtidas por FEG. <b>A</b> – CI SP 1:1 Nis: $\beta$ CD e <b>B</b> – CI SP 1:2 Nis: $\beta$ CD.....                                              | 52 |
| FIGURA 14 | - Espectros de FT-IR das amostras de MF, CI Lio, CI SP, $\beta$ CD e Nis.....                                                                                     | 53 |
| FIGURA 15 | - Espectros de FT-IR – vista aproximada de 990 a 700 $\text{cm}^{-1}$ das amostras de MF, CI Lio, CI SP, $\beta$ CD e Nis.....                                    | 54 |
| FIGURA 16 | - Espectros de FT-IR – vista aproximada de 1500 a 1000 $\text{cm}^{-1}$ das amostras de MF, CI Lio, CI SP, $\beta$ CD e Nis.....                                  | 55 |
| FIGURA 17 | - Espectros de FT-IR – vista aproximada de 1800 a 1500 $\text{cm}^{-1}$ das amostras de MF, CI Lio, CI SP, $\beta$ CD e Nis.....                                  | 56 |
| FIGURA 18 | - Espectros de FT-IR – vista aproximada de 3800 a 2700 $\text{cm}^{-1}$ das amostras de MF, CI Lio, CI SP, $\beta$ CD e Nis.....                                  | 57 |

|           |   |                                                                                                                               |    |
|-----------|---|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 19 | - | Curvas de DSC das amostras de $\beta$ CD, Nis, MF, CI SP e CI Lio, considerando a reação endotérmica como sendo negativa..... | 59 |
| FIGURA 20 | - | Curvas TGA das amostras de $\beta$ CD, Nis, MF, CI SP e CI Lio....                                                            | 60 |
| FIGURA 21 | - | Difratogramas de raios X das amostras de CI Lio, CI SP, MF, Nis e $\beta$ CD.....                                             | 62 |
| FIGURA 22 | - | Espectro RMN de $^1\text{H}$ da Nis na presença e na ausência da $\beta$ CD.....                                              | 64 |
| FIGURA 23 | - | Esquema ilustrativo da região onde houve deslocamento de sinais $^1\text{H}$ na Nis.....                                      | 65 |
| FIGURA 24 | - | Esquema ilustrativo da região onde houve deslocamento de sinais $^1\text{H}$ na $\beta$ CD.....                               | 65 |
| FIGURA 25 | - | Perfis de dissolução in vitro da Nis e dos CI Lio e CI SP 1:1....                                                             | 69 |

## LISTA DE TABELAS

|           |                                                                                                                      |    |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1  | . Características das CD naturais.....                                                                               | 29 |
| Tabela 2  | . Dispersões Nis:βCD resultantes do teste de solubilidade/estabilidade de fases.....                                 | 39 |
| Tabela 3  | . Comparações entre os espectros de FT-IR da Nis e da βCD não complexadas e os espectros dos CI Nis:βCD obtidos..... | 58 |
| Tabela 4  | . Efeitos da βCD nos deslocamentos químicos do <sup>1</sup> H RMN da Nis em DMSO-d <sub>6</sub> .....                | 66 |
| Tabela 5  | . Deslocamentos químicos de <sup>1</sup> H da molécula de βCD nos diferentes métodos.....                            | 66 |
| Tabela 6  | . ANOVA-1 fator para comparação entre os resultados de eficiência de dissolução.....                                 | 69 |
| Tabela 7  | . Resultados médios (desvio padrão) percentuais de dissolução in vitro.....                                          | 70 |
| Tabela 8  | . Modelagem matemática pela equação monoexponencial para a Nis e os CI 1:1 Lio e SP.....                             | 70 |
| Tabela 9  | . Modelagem matemática pela equação ordem zero para a Nis e os CI 1:1 Lio e SP.....                                  | 70 |
| Tabela 10 | . Modelagem matemática pela equação biexponencial para a Nis e os CI 1:1 Lio e SP.....                               | 70 |



## SUMÁRIO

|          |                                                                                      |           |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO.....</b>                                                               | <b>18</b> |
| <b>2</b> | <b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>                                                    | <b>22</b> |
| 2.1      | ESTOMATITE PROTÉTICA.....                                                            | 22        |
| 2.2      | NISTATINA.....                                                                       | 25        |
| 2.3      | CICLODEXTRINAS.....                                                                  | 27        |
| 2.4      | COMPLEXOS DE INCLUSÃO (COM FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS).....                               | 30        |
| <b>3</b> | <b>OBJETIVOS.....</b>                                                                | <b>36</b> |
| 3.1      | OBJETIVO GERAL.....                                                                  | 36        |
| 3.2      | OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....                                                           | 36        |
| 3.3      | HIPÓTESES TESTADAS.....                                                              | 36        |
| <b>4</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                                                       | <b>37</b> |
| 4.1      | LISTA DE EQUIPAMENTOS.....                                                           | 37        |
| 4.2      | MATERIAIS.....                                                                       | 38        |
| 4.3      | MÉTODOS.....                                                                         | 38        |
| 4.3.1    | Teste de solubilidade/estabilidade de fases.....                                     | 38        |
| 4.3.2    | Obtenção de CI nas proporções molares selecionadas.....                              | 40        |
| 4.3.2.1  | <i>Mistura física (MF).....</i>                                                      | <i>40</i> |
| 4.3.2.2  | <i>Suspensão e secagem por liofilização (Lio).....</i>                               | <i>40</i> |
| 4.3.2.3  | <i>Suspensão e secagem por spray drying (SP).....</i>                                | <i>40</i> |
| 4.3.2.4  | <i>Rendimento dos métodos de obtenção dos CI.....</i>                                | <i>40</i> |
| 4.3.3    | Caracterização dos CI.....                                                           | 41        |
| 4.3.3.1  | <i>Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Efeito de Campo (FEG).....</i> | <i>41</i> |
| 4.3.3.2  | <i>Espectroscopia Infravermelha por Transformada de Fourier (FT-IR).....</i>         | <i>41</i> |
| 4.3.3.3  | <i>Análise Térmica Diferencial (DSC) e Termogravimétrica (TGA).....</i>              | <i>41</i> |
| 4.3.3.4  | <i>Difração de raios X (DRX).....</i>                                                | <i>42</i> |
| 4.3.3.5  | <i>Ressonância Magnética Nuclear (RMN – <sup>1</sup>H).....</i>                      | <i>42</i> |
| 4.3.4    | Teste de liberação in vitro.....                                                     | 42        |
| 4.3.4.1  | <i>Avaliação do perfil, eficiência e cinética de dissolução.....</i>                 | <i>43</i> |

|          |                                                      |           |
|----------|------------------------------------------------------|-----------|
| <b>5</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                   | <b>45</b> |
| 5.1      | TESTE DE SOLUBILIDADE/ESTABILIDADE DE FASES.....     | 45        |
| 5.2      | OBTENÇÃO DE CI NAS PROPORÇÕES MOLARES 1:1 E 1:2..... | 48        |
| 5.3      | CARACTERIZAÇÃO DOS CI.....                           | 48        |
| 5.3.1    | FEG.....                                             | 49        |
| 5.3.2    | FT-IR.....                                           | 52        |
| 5.3.3    | DSC.....                                             | 58        |
| 5.3.4    | TGA.....                                             | 60        |
| 5.3.5    | DRX.....                                             | 61        |
| 5.3.6    | RMN – <sup>1</sup> H.....                            | 63        |
| 5.4      | TESTE DE LIBERAÇÃO IN VITRO.....                     | 67        |
| <b>6</b> | <b>CONCLUSÕES.....</b>                               | <b>72</b> |
|          | <b>REFERÊNCIAS.....</b>                              | <b>73</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

A candidose bucal é considerada a infecção fúngica mais frequente entre humanos (AKPAN, MORGAN, 2002) e quando associada à utilização de próteses dentárias removíveis é denominada estomatite protética (COELHO, SOUSA, DARE, 2004). Apesar de sua etiologia ser considerada multifatorial, a infecção por *Candida* spp., especialmente *Candida albicans*, é considerada o principal fator etiológico (BANTING, HILL, 2001). O tratamento deve incluir, dentre outros, terapia antifúngica tópica, medicação antifúngica sistêmica, cuidados com a higiene bucal, procedimentos de limpeza e desinfecção das próteses, reembasamento ou substituição de próteses antigas e restituição nutricional (LOMBARDI, BUDTZ-JORGENSEN, 1993; NEPPELENBROEK et al., 2008).

Dentre os antifúngicos prescritos para o tratamento da candidose, a nistatina (Nis) apresenta uma ação de amplo espectro e é considerada fungicida. A sua alta efetividade na inibição de *Candida* spp. (DOUGLAS, CLARKE, 1975; GEERTS, STUHLINGER, BASSON, 2008), a rara detecção de cepas fúngicas resistentes e seu custo acessível são vantagens deste fármaco quando comparado a outros antifúngicos também indicados para tratar a estomatite protética (GEERTS, STUHLINGER, BASSON, 2008). Entretanto, fármacos da classe dos poliênicos, como a Nis, são praticamente insolúveis em água e, devido ao seu sabor amargo, esse medicamento pode produzir efeitos colaterais como náuseas, vômitos e intolerância (LOMBARDI, BUDTZ-JORGENSEN, 1993).

A velocidade de dissolução do fármaco é controlada por sua solubilização intrínseca, como é o caso da maior parte dos ativos pouco solúveis (BROW et al., 2004; STEGEMANNA et al., 2007). E a velocidade e a extensão da absorção de um fármaco podem ser alteradas devido à sua lipofilia e, principalmente, pelo estado de ionização e/ou tamanho de sua partícula (AUNGST, SHEN, 1986; AMIDON et al., 1995). Neste contexto de problemas relacionados à solubilidade, liberação e absorção de fármacos pouco solúveis, uma estratégia tem sido a formação de complexos de inclusão (CI) com ciclodextrinas (CD) com a finalidade de aumentar a estabilidade e otimizar a atividade antimicrobiana dos fármacos. Além do que uma formulação nanoestruturada poderia superar os problemas de solubilidade, criando um sistema de liberação controlada com excelente atividade antimicrobiana e poucos efeitos adversos (LOFTSSON, BREWSTER, 1996; HOPPE, 1997; UEKAMA, 2004). As CD apresentam-se no formato de um cone truncado com uma cavidade

hidrofóbica que possibilita o alojamento de uma molécula hóspede ou sua parte, formando, assim, um CI (DUCHÊNE, WOUESSIDJEW, 1990; FRÖMMING, SZEJTLI, 1993). Após a dissociação, o fármaco estará na forma livre e apto para ser absorvido e distribuído pelo organismo, uma vez que complexado ele não consegue atravessar as membranas plasmáticas devido à hidrofília da CD, característica que justifica sua baixa toxicidade (UEKAMA, HIRAYAMA, IRIE, 1998).

Tem sido demonstrado que a granulometria e a morfologia de partícula de um CI são fatores essenciais para sua taxa de dissolução (ZHANGA et al., 2004). O aumento da velocidade de dissolução resulta numa solubilização mais rápida do fármaco, que, por sua vez, acarreta aumento de sua biodisponibilidade. Estudos sugerem que a técnica utilizada para secagem do CI influencia diretamente no tamanho e morfologia da partícula (ZANG et al., 2009). O método de liofilização (Lio) permite a obtenção de CI amorfos, com elevado rendimento, baixo estresse térmico e elevado grau de interação fármaco-CD. Como desvantagens, apresenta longo tempo de processamento e más características de fluxo do material obtido (CARRIER, MILLER, AHMED, 2007). O método de *spray-drying* (SP) tem como vantagens a formação direta de precipitados sólidos, reduzindo o tempo necessário para o processamento, melhor controle das características físicas das partículas obtidas e eficiência elevada de complexação. Entretanto, baixo rendimento e estresse térmico são algumas de suas limitações (CABRAL-MARQUES, ALMEIDA, 2009).

Mesmo quando a terapia antifúngica é instituída para o tratamento da estomatite protética, tem sido comumente observado um quadro de reinfecção da mucosa bucal em até duas semanas após a finalização do tratamento. Essa reincidência tem sido atribuída à concentração insuficiente dos fármacos sobre a superfície protética que mantém contato com os tecidos bucais, uma vez que ocorre a formação de um complexo biofilme microbiano em profundidade no material para base de prótese (MATHABA, DAVIES, WARMINGTON, 1995; SATO et al., 1997). Materiais macios acrílicos, por sua vez, têm sido utilizados no tratamento da mucosa bucal traumatizada (NIKAWA et al., 1997) e alguns autores têm proposto a incorporação de fármacos antimicrobianos nesses materiais (SCHNEID, 1992; NIKAWA et al., 1997; BUENO et al., 2015) (Figura 1). Essa combinação pode ser uma terapêutica lógica no tratamento da estomatite protética devido à redução do trauma causado pela superfície interna de resina acrílica rígida das bases das

próteses removíveis; eliminação do contato da superfície contaminada com os tecidos bucais e, conseqüentemente, do ciclo de reinfecção, ação dos fármacos antimicrobianos incorporados ao material diretamente sobre os tecidos infectados (SCHNEID, 1992), reduzida frequência de aplicação (SCHNEID, 1992) e redução da necessidade de participação dos pacientes durante o tratamento (TRUHLAR, SHAY, SOHNLE, 1994). Além do fato de que o sucesso da aplicação tópica de fármacos na cavidade bucal pode ser comprometido pela falta de percepção da infecção pelos pacientes, necessidade de gastos com a medicação, uso contínuo das próteses, sabor desagradável do medicamento (TRUHLAR, SHAY, SOHNLE, 1994) e rigor na administração da posologia (SCHNEID, 1992). Também é difícil manter a concentração efetiva nos tecidos infectados em decorrência do fluxo salivar, dos movimentos da língua (BANTING, HILL, 2001) e da deglutição, que rapidamente dissolvem e eliminam qualquer fármaco da cavidade bucal (URBAN et al., 2006).

FIGURA 1 – Prótese dentária removível reembasada com material macio modificado pela incorporação de nistatina



Fonte: A autora.

Estudos anteriores avaliaram o efeito da incorporação direta (em pó) de alguns fármacos antifúngicos, dentre eles a Nis, sobre algumas propriedades de materiais macios para prótese. Nestas avaliações, a Nis liberada a partir destes materiais foi efetiva durante 14 dias na inibição do crescimento de biofilme de *C. albicans* em valores mais baixos de concentrações inibitórias mínimas (CIM) (BUENO et al., 2015) em relação aos demais fármacos avaliados e, como consequência, não alterou significativamente as propriedades avaliadas dos materiais (GALITESI et al., 2012; NEPPELENBROEK et al., 2012; BUENO et al.,

2015; NEPPELENBROEK et al., 2015; LIMA et al., 2016; SÁNCHEZ-ALIAGA et al., 2016).

Entretanto, levando-se em consideração os benefícios da utilização tanto de CI com CD como de materiais macios como auxiliares no tratamento da estomatite protética, inovação tecnológica poderia, portanto, ser obtida com essa associação. Frente ao exposto, a proposta deste estudo foi elaborar complexos de inclusão entre nistatina e ciclodextrina, para a posterior inclusão em material macio para reembasamento de prótese dentária, visando promover a liberação controlada e permitir um efeito antifúngico prolongado.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 ESTOMATITE PROTÉTICA

A infecção da cavidade bucal por *Candida* spp., denominada candidose bucal, é considerada a infecção fúngica mais comum entre humanos, principalmente em idosos e usuários de próteses dentárias removíveis (AKPAN, MORGAN, 2002). A candidose bucal relacionada à utilização dessas próteses é denominada estomatite protética e é a lesão mais comumente observada em seus usuários (BARBEAU et al., 2003; COELHO, SOUSA, DARE, 2004). A estomatite protética foi primeiramente classificada por Newton (NEWTON, 1962), de acordo com os sinais clínicos da infecção, em três estágios: (I) Hiperemia puntiforme: múltiplos pontos hiperêmicos nos ductos das glândulas salivares palatinas menores; (II) Hiperemia difusa: inflamação generalizada sobre uma mucosa lisa e atrófica recoberta pela prótese e (III) Hiperemia granular: mucosa hiperêmica com aparência nodular podendo abranger toda a região recoberta pela prótese ou ficar restrita à região central do palato.

Fatores locais associados às próteses têm sido considerados predisponentes no desenvolvimento dessa patologia, dentre os quais: presença de biofilme (BANTING, GREENHORN, MCMINN, 1995), trauma local causado por próteses antigas e mal adaptadas (BUDTZ-JORGENSEN, BERTRAM, 1970), uso contínuo das próteses (BARBEAU et al., 2003), hipossalivação (TORRES et al., 2002) e alteração do pH da saliva (LOMBARDI, BUDTZ-JORGENSEN, 1993). Fatores sistêmicos também podem predispor usuários de próteses dentárias removíveis ao desenvolvimento de estomatite protética, tais como debilidade física, alergias, idade avançada, gênero feminino, uso de tabaco, presença de endocrinopatologias, deficiências nutricionais, utilização de antibióticos de amplo espectro e/ou imunossupressores, terapias antineoplásicas e alterações nos mecanismos imunológicos (WILLIS et al., 2001; SALERNO et al., 2011).

Apesar de sua etiologia ser considerada multifatorial, espécies do gênero *Candida* têm sido relacionadas como o principal fator associado a essa patologia (BUDTZ-JORGENSEN, BERTRAM, 1970; BANTING, HILL, 2001; RAMAGE et al., 2001). Dentre essas espécies, a *Candida albicans* é a mais prevalente tendo sido identificada em 50 a 93% dos casos (MCMULLAN-VOGEL et al., 1999; BAENA-MONROY et al., 2005). Outras espécies como *C. krusei*, *C. dubliniensis*, *C.*

*parapsilosis*, *C. tropicalis* e, sobretudo, *C. glabrata* também têm sido encontradas com frequência em isolados clínicos (SALERNO et al., 2011).

As espécies do gênero *Candida* vivem em relação de comensalismo em diversas partes do organismo da maioria dos indivíduos saudáveis. Entretanto, sob determinadas condições ambientais, esses microrganismos podem atuar como patógenos oportunistas e colonizar mucosas e tecidos, causando infecções locais e sistêmicas (CALDERONE, FONZI, 2001; SALERNO et al., 2011). Ocorre inicialmente a adesão de células leveduriformes comensais (blastóporos) de *Candida* spp., que por apresentarem forma ovoide e tamanho reduzido se disseminam pela corrente sanguínea (JACOBSEN et al., 2012). Essa forma passa por uma transição para células patogênicas alongadas filamentosas, denominadas pseudohifas ou hifas, septadas ou não, respectivamente (SUDBERY, GOW, BERMAN, 2004). Isto porque na forma de hifas, as barreiras epiteliais protetoras do hospedeiro podem ser superadas, favorecendo o aparecimento de infecções (SUDBERY, GOW, BERMAN, 2004). Os microrganismos têm, ainda, a capacidade de se organizar em comunidades complexas e estruturadas, conhecidas como biofilmes, aderidas a superfícies e encapsuladas por uma matriz extracelular protetora composta principalmente por polissacarídeos (CHANDRA et al., 2001a). Em biofilmes complexos de bactérias e fungos, o tratamento das infecções apresenta maior dificuldade, uma vez que os microrganismos são menos susceptíveis a ação de fármacos antimicrobianos de ação local ou sistêmica como a Nis, o fluconazol e a clorexidina (CHANDRA et al., 2001a; CHANDRA et al., 2001b), havendo aumento do grau de resistência com a maturação do biofilme (MAH, O'TOOLE, 2001), e aos mecanismos de defesa do hospedeiro (COSTERTON, STEWART, GREENBERG, 1999). Dentre os substratos em que cepas patogênicas como *Candida* spp. podem se aderir, podem ser citados os dispositivos médicos implantados como catéteres vasculares ou urinários, próteses articulares, válvulas cardíacas, lentes de contato e próteses dentárias removíveis compostas basicamente por acrílicos (D'ENFERT, 2006).

Os microrganismos em biofilmes aderidos a próteses dentárias podem se desprender e se dispersar pela secreção salivar, podendo ser aspirados e disseminados para outros locais do corpo (SMITH et al., 2003). A candidose bucal pode evoluir para a região orofaríngea em pacientes imunocomprometidos, especialmente os portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA)



(AKPAN, MORGAN, 2002). Em caso de envolvimento do esôfago, os pacientes podem apresentar dificuldade de deglutição, acarretando deficiências nutricionais e debilidade sistêmica (DE REPENTIGNY, LEWANDOWSKI, JOLICOEUR, 2004). Além do que, a constante aspiração e deglutição das espécies fúngicas em indivíduos com a saúde geral comprometida tem sido associada à disseminação da candidose, podendo resultar em fungemia (KRCMERY, BARNES, 2002), infecção sistêmica relacionada com alta taxa de mortalidade (40 a 80%) (DIMOPOULOS et al., 2007).

Apesar de sua alta prevalência, a patogênese da estomatite protética e a função da resposta imune ainda não são compreendidos. Um dogma para uma das formas de candidíase oral, a orofaríngea, é que a deficiência ou a redução nas respostas das células protetoras auxiliares Th1 ou Th17, como em pacientes HIV positivos ou que receberam terapia imunossupressora, está associada com a susceptibilidade à infecção (CONTI et al., 2009). Em contrapartida, a maioria dos indivíduos com estomatite protética são imunocompetentes. Um dos poucos estudos imunológicos relatou citocinas Th1 na saliva de pacientes com estomatite protética, portanto, é pouco provável que a redução ou deficiência dogmática na resposta das células Th1 esteja associada com a susceptibilidade à estomatite protética (LEIGH et al., 2002). Além disso, níveis elevados de interleucina-2 (IL-2) ou fator de crescimento de células T têm sido observados em pacientes com estomatite protética (RODRIGUEZ-ARCHILLA et al., 1996). Assim, poderia ser hipotetizado que respostas de linfócitos T reativos na fase crônica podem estar associadas com estomatite protética sintomática (JOHNSON et al., 2012).

O tratamento convencional para infecções fúngicas orais está associado com um diagnóstico preciso e com a identificação e eliminação dos possíveis fatores predisponentes. A escolha de um tratamento ou associações são aspectos a serem considerados individualmente e poderá incluir, portanto, terapia antifúngica tópica, medicação antifúngica sistêmica, cuidados com a higiene bucal, procedimentos de limpeza e desinfecção das próteses, reembasamento ou substituição de próteses antigas e restituição nutricional (CARTER, KERR, SHEPHERD, 1986; LOMBARDI, BUDTZ-JORGENSEN, 1993). Além disso, com o objetivo de proteger e preservar a integridade do epitélio da mucosa, o paciente deve dormir sem as próteses (CARTER, KERR, SHEPHERD, 1986).

Para pacientes imunocomprometidos, a terapia antifúngica sistêmica para a estomatite protética pode ser recomendada (PEREZOUS et al., 2005). No entanto, é preciso considerar a possibilidade de esses fármacos induzirem efeitos hepatotóxicos e nefrotóxicos (LOMBARDI, BUDTZ-JORGENSEN, 1993), bem como apresentarem interação com outros medicamentos, resultando em efeitos sistêmicos potencialmente adversos à saúde (CHOI et al., 2010). Além disso, o uso descontrolado de antifúngicos sistêmicos tem resultado no aparecimento de resistência fúngica (LOMBARDI, BUDTZ-JORGENSEN, 1993; GOLDMAN et al., 2004).

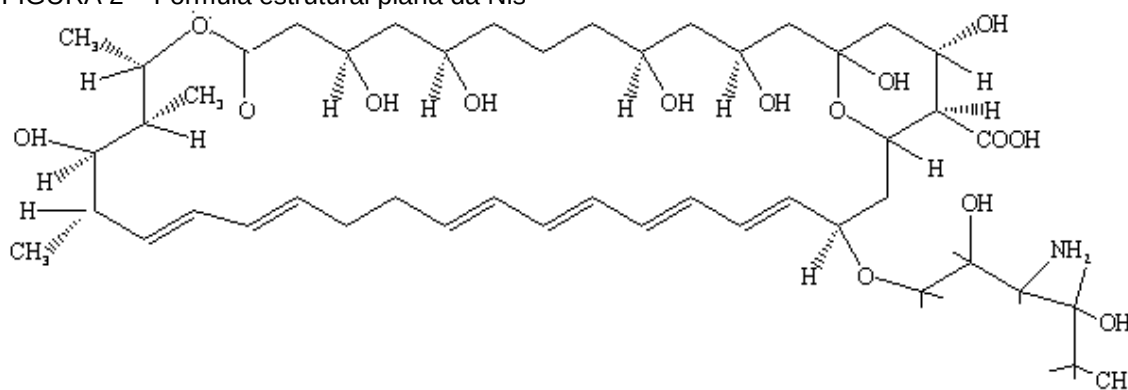
## 2.2 NISTATINA

Quando a terapia antifúngica tópica é instituída para o tratamento da estomatite protética, fármacos como a Nis, o miconazol e a clorexidina podem ser utilizados (LOMBARDI, BUDTZ-JORGENSEN, 1993; BANTING, HILL, 2001; NEPPELENBROEK et al., 2008). Especificamente, a Nis é um antibiótico macrolídeo poliênico, produzido pelo microrganismo *Streptomyces noursei* e utilizado na terapia humana e veterinária para tratamento de infecções fúngicas tópicas (BAGINSKI, CZUB, 2009). Foi descoberta no ano de 1950 por Hazen e Brown (TAVARES, 2001).

As vantagens de utilização de macrolídeos poliênicos como a Nis em comparação com antifúngicos de outras classes, como azóis e flucitozinas, são seu efeito fungicida rápido, baixa tendência ao desenvolvimento de resistência entre fungos patogênicos e amplo espectro de atividade. Uma de suas desvantagens, no entanto, é a toxicidade relativamente elevada (acima de 5 milhões por unidade), principalmente quando associada às células renais, as quais são vulneráveis à ação hemolítica dos macrolídeos poliênicos (ZOTCHEV, 2003; BAGINSKI, CZUB, 2009).

É considerada um macrolídeo, uma vez que possui uma estrutura química cíclica e grande (TAVARES, 2001; HAC-WYDRO, DYNAROWICZ-LATKA, 2006) como mostrado na Figura 2. Os poliênicos representam uma classe de substâncias formadas por átomos de carbono com ligação dupla; especificamente a Nis é um tetraeno e, portanto, possui quatro ligações duplas em sequência. Apresenta uma molécula anfótera, devido à presença dos grupos amino e carboxílicos (TAVARES, 2001; HAC-WYDRO, DYNAROWICZ-LATKA, 2006).

FIGURA 2 – Fórmula estrutural plana da Nis



Fonte: A autora.

Este agente antifúngico é utilizado para o tratamento tópico de primeira escolha para a estomatite protética e apresenta seu melhor efeito quando aplicado em contato direto com a *Candida* (SCULLY, 1992). Não estará biodisponível após administração oral e é eliminado pelas fezes (PAPPAS et al., 2009). Sua formulação para o tratamento de infecções bucais é na forma de suspensão e os pacientes devem fazer bochechos e, na sequência, cospir ou engolir a Nis (PAPPAS et al., 2009). Nesta forma, apresenta poucos efeitos colaterais, como sabor amargo e, conseqüentemente, náuseas (LOMBARDI, BUDTZ-JORGENSEN, 1993), o que pode diminuir a adesão dos pacientes ao tratamento (AKPAN, MORGAN, 2002).

A administração intravenosa da Nis ou de poliênicos em geral tem efeitos adversos relacionados com a perfusão, tais como calafrios, dor de cabeça, febre, náuseas, vômitos, hipóxia, hipertensão ou hipotensão e por efeitos crônicos tóxicos, nos quais a nefrotoxicidade é o mais importante (ARIKAN, REX, 2001). Por via intravenosa e intramuscular, a Nis é capaz de causar hemólise, necrose e abscessos “frios” nos locais da injeção, devido a sua ligação imediata com as membranas plasmáticas das hemácias, ocasionando sua destruição (TAVARES, 2001; HAC-WYDRO, DYNAROWICZ-LATKA, 2006). É pobremente absorvida pela pele, trato gastrointestinal ou mucosas (TAVARES, 2001).

Formulações de mucoadesivos foram desenvolvidas na tentativa de prolongar o contato do fármaco com a mucosa oral (LLABOT, MANZO, ALLEMANDI, 2009). O uso de lipossomas contendo Nis também tem sido investigado (LLABOT et al., 2007). Além disso, a Nis produz um efeito pós antifúngico biologicamente significativo (PONS et al., 1997). De fato, trinta minutos de exposição da *C. albicans*

à Nis de 25 a 100% da CIM causará um efeito pós antifúngico de 5-6 h (GUNDERSON et al., 2000).

A Nis possui uma excelente atividade antifúngica contra a *Candida* spp. (KOVACIC, COOKSY, 2012). Inicialmente, a Nis liga-se ao ergosterol da parede celular do microrganismo, formando poros na transmembrana o que, por sua vez, aumenta sua permeabilidade com consequente perda de íons citoplasmáticos como potássio, amônio, magnésio, fosfato e ésteres de fosfato, açúcares e nucleotídeos e água, acarretando morte celular (WHITE, MARR, BOWDEN, 1998; ANDRIOLE, 2000; ROGERS, 2002). Entretanto, ainda é controverso se o mecanismo de ação da Nis leva realmente à formação de poros na membrana plasmática (SILVA et al., 2006). Outra ligação que ocorre mais fracamente é a da Nis com o colesterol, outro tipo de esterol presente na membrana plasmática das células de mamíferos (SILVA et al., 2006).

Devido à sua sensibilidade ao calor (acima de 40°C), à luz e ao oxigênio, para manter sua função biológica e sua estrutura química, diversas dispersões de Nis, bem como comprimidos, pastilhas e pós têm sido utilizados para administração oral e cremes, para aplicação tópica.

Apesar de suas vantagens e mecanismo de ação, sua aplicação clínica pode ser limitada devido aos efeitos colaterais mencionados, toxicidade e baixa solubilidade em água (360 mg/L) (BRAYFIELD, 1999), saliva (TALLURY et al., 2007) e outros solventes como etanol e clorofórmio (BRAYFIELD, 1999) em temperatura ambiente. Apresenta alta solubilidade em dimetilsulfóxido (BRAYFIELD, 1999).

## 2.3 CICLODEXTRINAS

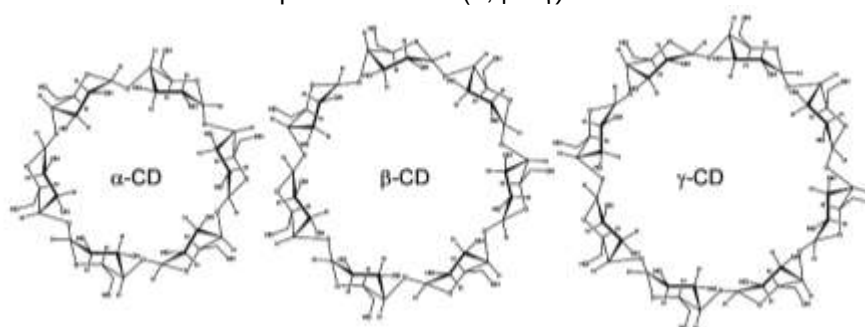
Em 1891, houve o primeiro registro de isolamento das substâncias denominadas ciclodextrinas (CD), as primeiras moléculas hospedeiras, por Villiers (VILLIERS, 1891). Em 1903, Schardinger foi o responsável pela primeira descrição detalhada da preparação e isolamento das CD (SCHARDINGER, 1903). Em 1940, a estrutura química das CD e sua capacidade de formar complexos de inclusão (CI) foi delineada (LOFTSSON, BREWSTER, 1996). As CD são compostos cíclicos obtidos a partir de degradação por hidrólise pelo microrganismo *Bacillus macerans*, através da enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase). Esse microrganismo é capaz de romper um segmento da hélice do amido e unir as duas porções terminais deste fragmento em uma única molécula cíclica. As fontes de amido utilizadas para a

produção de CD são, geralmente, derivadas do milho, podendo também ser obtidas a partir de batata ou outras fontes (MATIOLI, 2000).

Polissacarídeos como as CD são uma importante classe de biomacromoléculas com uma grande variedade estrutural. Muitos deles apresentam muitas aplicações, tais como: catalizadores na indústria química; inibidores de reação e em aplicações cromatográficas; na indústria de alimentos para a adição de vitaminas e aditivos sob a forma de CI; na agricultura como estabilizantes de fungicidas; na indústria farmacêutica para aumentar a estabilidade de moléculas inclusas contra a hidrólise, oxidação, fotodecomposição e desidratação, corrigir odor e sabor desagradável do fármaco, aumentar sua solubilidade e biodisponibilidade e aumentar sua atividade e reduzir efeitos colaterais e toxicidade (SZEJTLI, 2004; CUNHA-FILHO, SÁ-BARRETO, 2007). Por estes motivos, no Brasil há uma grande motivação para o estudo e produção de CD, já que há uma disponibilidade do substrato amido, de baixo custo, tornando atraente a perspectiva de produção de CD que são produtos de alto valor agregado (BERTOLINI, CEREDA, CHUZEL, 1998).

As CD naturais são compostos oligossacarídeos cíclicos e as mais comuns contêm 6, 7 e 8 unidades de glicose, conhecidas como  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  de D-(+)-glicopiranoses, respectivamente, como apresentado na Figura 3. São unidas por ligações do tipo  $\alpha$ -(1,4) (YANG et al., 2012).

FIGURA 3 – Fórmulas estruturais planas das CD ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ )



Fonte: BUDAL, R. M. **Estudos de formação de complexos de inclusão em ciclodextrinas**. 2003, 197 f. Doutorado (Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003 (BUDAL, 2003).

As CD possuem grupos hidroxilas nas suas extremidades, tornando-as solúveis em água (Tabela 1), devido à possibilidade de formação de ligações de hidrogênio com o solvente (MATIOLI, 2000). Mesmo não sendo moléculas perfeitamente cilíndricas, sua configuração tridimensional mais estável apresenta-se

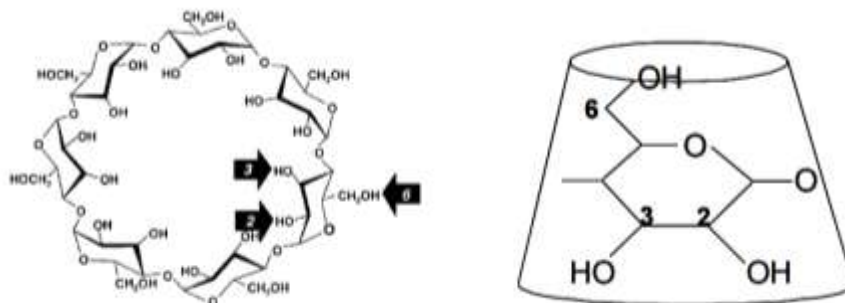
no formato de um cone truncado (MATIOLI, 2000), devido à presença de resíduos de  $\alpha$ -D-glicopiranosil em consequência da conformação do carbono C1 e da falta de rotação livre ao redor das ligações glicosídicas. Estes açúcares apresentam uma cavidade interna apolar (hidrofóbica), devido ao posicionamento do oxigênio das ligações glicosídicas e aos hidrogênios das unidades glicopiranosose, e uma superfície externa polar (hidrofílica), devido à posição ocupada pelas hidroxilas primárias unidas ao carbono C6 e hidroxilas secundárias ligadas aos carbonos C2 e C3. As hidroxilas secundárias estão situadas na parte onde o diâmetro do anel é maior, e as hidroxilas primárias, onde o diâmetro do anel é menor (Figura 4) (MATIOLI, 2000).

Tabela 1. Características das CD naturais

|                                      | $\alpha$ CD | $\beta$ CD | $\gamma$ CD |
|--------------------------------------|-------------|------------|-------------|
| Número de unidades de glicose        | 6           | 7          | 8           |
| Massa molecular (g/mol)              | 973         | 1135       | 1297        |
| Diâmetro interno da cavidade (nm)    | 0,45-0,57   | 0,62-0,78  | 0,79-0,95   |
| Diâmetro externo da cavidade (nm)    | 1,37        | 1,53       | 1,69        |
| Altura da cavidade (nm)              | 7,9         | 7,9        | 7,9         |
| Volume da cavidade (mL/mol)          | 174         | 262        | 472         |
| Solubilidade em água (25°C) g/100 mL | 14,5        | 1,85       | 23,2        |
| pKa (25°C)                           | 12,33       | 12,20      | 12,08       |

Fonte: BALTE, A. S. et al. Theoretical studies on the encapsulation of paracetamol in the  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ -cyclodextrins. **J Chem Pharm Res**, v. 4, n. 5, p. 2391-2399, 2012. (BALTE, GOYAL, GEJJI, 2012)

FIGURA 4 – Representação esquemática da estrutura funcional das CD



Fonte: KHAN, A. R. Methods for selective modifications of cyclodextrins. **Chem Rev**, v. 98, n. 5, p. 1977-1996, Jul. 1998 (KHAN et al., 1998).

A presença da cavidade hidrofóbica possibilita que as CD sejam capazes de alojar uma molécula hóspede ou sua parte, formando, assim, um CI (DUCHÊNE,

WOUESSIDJEW, 1990; FRÖMMING, SZEJTLI, 1993). Após a dissociação, o fármaco estará na forma livre e apto para ser absorvido e distribuído pelo organismo, uma vez que complexado ele não consegue atravessar as membranas plasmáticas devido à hidrofília da CD, característica que justifica sua baixa toxicidade (UEKAMA, HIRAYAMA, IRIE, 1998).

A velocidade de dissolução do fármaco é controlada por sua solubilização intrínseca, como é o caso da maior parte dos ativos pouco solúveis (BROW et al., 2004; STEGEMANNA et al., 2007). E a velocidade e a extensão da absorção de um fármaco podem ser alteradas devido à sua lipofilia e, principalmente, pelo estado de ionização e/ou tamanho de sua partícula (AUNGST, SHEN, 1986; AMIDON et al., 1995). Neste contexto de problemas relacionados à solubilidade, liberação e absorção de fármacos pouco solúveis, uma estratégia tem sido a formação de CI com CD com a finalidade de aumentar a estabilidade e otimizar a atividade antimicrobiana dos fármacos. Além do que uma formulação nanoestruturada poderia superar os problemas de solubilidade, criando um sistema de liberação controlada com excelente atividade antimicrobiana e poucos efeitos colaterais (LOFTSSON, BREWSTER, 1996; HOPPE, 1997; UEKAMA, 2004).

A  $\beta$ CD é a CD natural mais utilizada, uma vez que possui aproximadamente 6 Å de diâmetro em sua cavidade interna, acomodando, assim, grupos aromáticos encontrados na maioria dos fármacos (BALTE, GOYAL, GEJJI, 2012). A  $\beta$ CD apresenta maior rigidez, facilidade de obtenção de cristais e também se encontra em maior abundância no mercado, apresentando, portanto, melhor relação custo/benefício.

## 2.4 COMPLEXOS DE INCLUSÃO (COM FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS)

Um complexo no qual um dos componentes (a molécula hospedeira) forma uma cavidade ou, no caso de um cristal, uma estrutura cristalina contendo espaços em forma de túneis longos ou canais em que as entidades moleculares de uma segunda espécie química (hóspedes) estão localizadas pode ser definido como um complexo de inclusão. Neste caso, não há nenhuma ligação covalente entre hóspede e hospedeiro; a ligação é geralmente devido a forças de van der Waals. Se os espaços na estrutura hospedeira são fechados em todos os lados, como se a molécula hóspede estivesse “aprisionada”, tais compostos são conhecidos como clatratos ou compostos 'gaiola' (MCNAUGHT, WILKINSON, 1997). Se uma molécula

hospedeira se adequar completamente ou ao menos parcialmente dentro da cavidade, este CI pode ser formado.

A complexação ocorre geralmente em solução aquosa e moléculas de água preenchem inicialmente a cavidade interna das CD. Fármacos hidrofóbicos adicionados a esta solução promovem, na sequência, o deslocamento das moléculas de água. Isso acontece por haver um microambiente desfavorável na cavidade (interação polar-apolar) que faz com que as moléculas de água tenham a tendência de sair da cavidade da CD. Finalmente, ocorre o processo de encapsulação total ou parcial da molécula hóspede na cavidade da CD, tornando-a solúvel em água (SZEJTLI, 2005).

A estequiometria dos CI pode apresentar várias proporções molares, entretanto é mais frequente formar complexos 1:1 (uma molécula de CD para um mol de fármaco) quando em solução aquosa (VEIGA, PECORELLI, RIBEIRO, 2006).

Os métodos de obtenção dos CI geralmente são simples e sua escolha depende da natureza do substrato. Os métodos mais utilizados (DELL VALLE, 2004; SZEJTLI, 2005; VEIGA, PECORELLI, RIBEIRO, 2006) estão descritos a seguir:

- Mistura física: neste método, o fármaco é triturado junto com a ciclodextrina em um almofariz de porcelana, com o auxílio de um pistilo, sem adição de qualquer solvente, durante 15 min. Algumas moléculas podem ser complexadas pela simples mistura do hóspede com a ciclodextrina (VEIGA, PECORELLI, RIBEIRO, 2006; RIEKES et al., 2010).
- Co-precipitação: neste método, deve ser adicionada uma solução do hospedeiro a uma solução de CD. Caso seja preciso, pode ser utilizado um solvente diferente da água para solubilizar o hospedeiro. Entretanto, o solvente escolhido deve ser solúvel em água. A mistura é agitada até o equilíbrio e o complexo sólido será obtido por evaporação a vácuo ou liofilização.
- Empastagem (*kneading*): neste caso, a molécula hóspede sólida é adicionada a uma solução aquosa de CD formando uma suspensão sob agitação vigorosa. Na sequência, deve ser feita uma filtração. O complexo sólido, dissolvido no filtrado, é, então, coletado à vácuo ou liofilização.
- Liofilização (Lio): para este método, após o preparo de uma solução com ambos os componentes (hóspede e ciclodextrina), a água é removida em liofilizador, resultando em complexos com características mais amorfas.



- *Spray-drying* (SP): normalmente, neste método, o fármaco é dissolvido em etanol e a CD em água. A solução resultante é obtida sob agitação e levada ao equipamento *spray-dryer* para ser seca por pulverização.

Tem sido demonstrado que a granulometria e a morfologia de partícula de um CI são fatores essenciais para sua taxa de dissolução (ZHANGA et al., 2004). O aumento da velocidade de dissolução resulta numa solubilização mais rápida do fármaco, que, por sua vez, acarreta aumento de sua biodisponibilidade. Estudos sugerem que a técnica utilizada para secagem do CI influencia diretamente no tamanho e morfologia da partícula (ZANG et al., 2009). Especificamente, o método de Lio consiste na eliminação do solvente dos sistemas em solução por meio de congelamento prévio e posterior secagem a pressões reduzidas. Esta técnica permite a obtenção de CI amorfos, com elevado rendimento, baixo estresse térmico e elevado grau de interação fármaco-CD. Como desvantagens, apresenta longo tempo de processamento e más características de fluxo do material obtido (CARRIER, MILLER, AHMED, 2007). O método de SP é automatizado e tem sido considerado mais versátil que as outras técnicas de secagem (PILCER, VANDERBIST, AMIGHI, 2009). Tem como vantagens a formação direta de precipitados sólidos durante o processo, reduzindo o tempo necessário para o processamento, melhor controle das características físicas das partículas obtidas e eficiência de complexação elevada. Entretanto, baixo rendimento e estresse térmico são algumas de suas limitações (CABRAL-MARQUES, ALMEIDA, 2009).

Em 1991, van Doorne e Bosch desenvolveram um CI Nis: $\gamma$ -CD. Na presença de  $\gamma$ -CD, as células de *C. albicans* absorveram menos Nis que na sua ausência. O complexo isoladamente não demonstrou atividade antimicrobiana significativa. Após a difusão da Nis a partir do complexo, houve inibição do microrganismo. O teste de estabilidade aquosa da Nis demonstrou melhoria após a inclusão. A degradação do fármaco puro não mostrou cinética de primeira ordem. A perda do antifúngico foi mais rápida do que a diminuição da concentração calculada a partir dos dados espectrofotométricos para o antifúngico puro, assim como o seu CI com  $\gamma$ -CD (VAN DOORNE, BOSCH, 1991).

Miyake et al. (1999) verificaram a interação do agente antifúngico itraconazol com a 2-hidroxipropil- $\beta$ CD em água e em solução propilenoglicol/água (10:90 v/v) em pH 2,0. A solubilidade do itraconazol em água melhorou significativamente à medida que as concentrações da CD foram aumentadas. A melhor solubilidade foi definida em razão molar 1:2, a qual foi confirmada pelas caracterizações em Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectroscopia na região do Ultravioleta (MIYAKE et al., 1999).

Barillaro et al. (2007) estudaram a inclusão de miconazol na cavidade de CD. Foram utilizados vários complexos de CD ( $\beta$ CD, 2-hidroxipropil- $\beta$ CD e hidroxipropil- $\gamma$ CD) com miconazol e compostos ácidos (ácido maléico, fumárico e L-tartárico) como parceiros. Para os complexos binários, a inclusão do grupo  $\text{CH}_2\text{-O-diclorobenzeno}$  resulta em um complexo mais estável. Para os complexos ternários, dependendo da sua conformação e/ou das estruturas, os ácidos podem estabilizar ou desestabilizar o complexo. Todos os resultados teóricos foram em boa concordância com os dados experimentais de rendimentos de inclusão de miconazol em CD. Foi demonstrado claramente que a estrutura tanto da CD quanto dos ácidos desempenham um papel chave na formação de CI (BARILLARO et al., 2007).

Zhu et al. (2007) investigaram o efeito da  $\beta$ CD na melhoria da atividade fungicida da iprodiona. O CI iprodiona: $\beta$ CD foi preparado e caracterizado por diferentes técnicas. O complexo mostrou características espectroscópicas diferentes das propriedades da iprodiona. A proporção estequiométrica e a constante de estabilidade que descreve a extensão da formação dos CI foram determinados pelo estudo de estabilidade de fases. Os CI foram obtidos visando melhorar significativamente a solubilidade em água da iprodiona e os autores obtiveram um aumento de 4,7 vezes na presença de 13 mM de  $\beta$ CD em comparação com a solubilidade deste fármaco em água deionizada. O bioensaio demonstrou que o complexo resultou em um aumento de duas vezes da sua atividade fungicida (ZHU et al., 2007).

Cevher et al. (2008) desenvolveram novas fórmulas de comprimidos bioadesivos vaginais, nos quais a natamicina foi complexada com a  $\gamma$ CD para aumentar sua solubilidade e estabilidade em soluções aquosas, além de reduzir os efeitos colaterais do fármaco sem diminuir sua efetividade antifúngica. Interações favoráveis entre o antifúngico e a CD e a formação do CI na razão molar 1:1 foram observados. A concentração inibitória mínima 90 (CIM90) de ambos natamicina não

complexada e o complexo natamicina: $\gamma$ CD foi inferior a 0,0313  $\mu\text{g/mL}$ , sugerindo que a complexação resultou em uma melhora efetiva da atividade antifúngica da natamicina e, portanto, sugere a utilidade clínica deste complexo (CEVHER et al., 2008).

Alsarra et al. (2010) prepararam complexos sólidos de itraconazol usando a hidroxipropil- $\beta$ CD com 20% de polivinilpirrolidona pelo método de co-evaporação. O complexo melhorou a atividade antifúngica do itraconazol contra *C. parapilosis* e *C. albicans*. O complexo formulado como dosagem em cápsula demonstrou bom fluxo e características de compressibilidade. Sua liberação foi avaliada e cápsulas contendo o CI na razão molar 1:3 com 20% de polivinilpirrolidona teve uma dissolução mais rápida que as cápsulas comerciais. Cerca de 88% de itraconazol foram liberados em menos de 30 min e a taxa de dissolução inicial do CI foi 3,5 vezes melhor quando comparado ao produto comercial (ALSARRA et al., 2010).

Balakrishnan et al. (2012) estudaram o efeito do CI com  $\beta$ CD sobre a biodisponibilidade de supositórios a base de Poloxamer, formulações compostas de P188, propilenoglicol e diferentes razões molares de CI clotrimazol: $\beta$ CD para melhorar a solubilidade aquosa do clotrimazol. Foram preparadas soluções com razões molares de 1:0,25; 1:0,5; 1:1 e 1:2 e foram caracterizadas por diferentes métodos. Os supositórios contendo o CI na razão molar 1:1 mostraram grande potencial para aumentar a biodisponibilidade do fármaco hidrofóbico clotrimazol (BALAKRISHNAN et al., 2012).

Hbairb et al. (2012) realizaram estudos para a preparação e a caracterização de CI griseofulvina: $\beta$ CD enxertado em sílica nanoparticulada. Relataram que a solubilidade do fármaco em água é baixa e, portanto, a complexação com CD em meio aquoso foi uma tarefa difícil. A síntese da sílica modificada com aminopropil e com a CD enxertada foi um sucesso, obtida com altas densidades de enxertia (670 mol/g para a sílica com aminopropil e 57 mol/g para a sílica com CD). A CD enxertada em sílica é um material promissor para a liberação controlada de fármacos, particularmente, na aplicação cutânea pela vantagem de penetração de nanopartículas através dos folículos pilocebáceos. Essa complexação também previne a penetração em camadas mais profundas da pele e risco de atingir a circulação sistêmica (HBAIEB, KALFAT, CHEVALIER, 2012).

Alomrani et al. (2014) desenvolveram lipossomas deformáveis carregadas de itraconazol na presença de hidroxipropil- $\beta$ CD para aumentar a atividade

antifúngica. Essas formulações têm sido relatadas como concebíveis para entregar moléculas de fármacos para as camadas da pele. Verificou-se que a presença da CD desempenhou um papel significativo na redução do tamanho da vesícula a faixa nano. Concluíram que os lipossomas deformáveis, na presença de hidroxipropil- $\beta$ CD, podem ser veículos promissores para a entrega cutânea eficaz na zona de transição (ALOMRANI et al., 2014).

Cevher et al. (2014) estudaram a complexação do fármaco itraconazol com  $\gamma$ CD, hidropropil- $\beta$ CD, metil- $\beta$ CD e sulfobutil éter- $\beta$ CD para melhorar sua solubilidade e reduzir seus efeitos colaterais sem diminuir sua efetividade antifúngica. A atividade antifúngica dos complexos foi avaliada utilizando cepas de *C. albicans* e os resultados mostraram que a susceptibilidade das cepas foi mais elevada para o complexo itraconazol-sulfobutil éter- $\beta$ CD do que para os outros complexos com as outras CD (CEVHER et al., 2014).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi desenvolver, caracterizar e avaliar a liberação *in vitro* de complexos de inclusão nistatina: $\beta$ -ciclodextrina, visando a posterior incorporação em um material macio para prótese dentária para tratamento da estomatite protética.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

As propostas deste estudo foram:

- Obter complexos de inclusão nistatina: $\beta$ -ciclodextrina por meio de mistura física e suspensão seguida por secagem por liofilização ou *spray drying*;
- Caracterizar os complexos de inclusão obtidos por meio de análises espectroscópicas, térmicas e morfológica;
- Determinar o perfil, a eficiência e a cinética de dissolução da nistatina a partir dos complexos de inclusão por meio de análise em UV-Vis.

#### 3.3 HIPÓTESES TESTADAS

As hipóteses testadas neste estudo foram que:

1. o fármaco nistatina seria complexado à  $\beta$ -ciclodextrina por meio dos métodos de mistura física, liofilização e/ou *spray drying*;
2. a nistatina complexada à  $\beta$ -ciclodextrina apresentaria melhor solubilidade em água e perfil de dissolução mais favorável que o fármaco nistatina não complexado.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 LISTA DE EQUIPAMENTOS

- agitador magnético com aquecimento (modelo Q261-22, Quimis, Diadema, SP, Brasil);
- balança analítica de prato único (modelo FA21014N, Celtac, São Paulo, SP, Brasil);
- destilador de água (modelo 724/2-A, Fanem Ltda., São Paulo, SP, Brasil);
- difratômetro de raio X (modelo Ultima IV, Rigaku, Tóquio, Japão);
- dissolutor de cubas (modelo 299-6ATTS, Nova Ética, Vargem Grande Paulista, SP, Brasil);
- espectrômetro infravermelho por transformada de Fourier – FT-Raman (modelo IR Prestige-21, Shimadzu, Quioto, Japão);
- espectrômetro na região do ultravioleta-visível (modelo Genesys 10 UV Scanning, Thermo Fisher Scientific, Madison, EUA);
- espectrômetro Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (modelo Avance III 400, Bruker Optics, Ettlingen, Alemanha);
- estufa para secagem (modelo 311CG, Fanem Ltda., São Paulo, SP, Brasil);
- liofilizador (modelo LD1500A, Terroni, São Carlos, SP, Brasil);
- metalizador (modelo SC7620 Mini Sputter Coater/Glow Discharge System, Quorum Technologies, Inglaterra);
- microscópico eletrônico de varredura por emissão de efeito de campo (FEG-MEV) (modelo MIRA 3, LMH, Shimadzu, Quioto, Japão);
- sistema de análise térmica diferencial e termogravimétrica (modelo 409 PC/PG, NETZSCH do Brasil, Pomerode, SC, Brasil);
- *spray dryer* (modelo LM MSD 0.5, Labmaq do Brasil, Ribeirão Preto, SP, Brasil);
- termobalança (modelo TGA-50, Shimadzu, Quioto, Japão);
- ultra freezer (modelo Glacier -86°C, Nuaire, Plymouth, EUA).

## 4.2 MATERIAIS

O fármaco antifúngico selecionado para este estudo foi a nistatina (Nis) (Lote 4017179, teor 6.800,99 UI/mg, Fagron, Embu, SP, Brasil). A ciclodextrina (CD) selecionada para este estudo foi a  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD) (Lote MKBR3596V, teor >97%, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

## 4.3 MÉTODOS

O delineamento experimental deste estudo está ilustrado na Figura 5.

FIGURA 5 – Fluxograma das etapas experimentais do estudo



Fonte: A autora.

FEG: microscopia eletrônica de varredura por emissão de efeito de campo; FT-IR: espectroscopia infravermelha por transformada de Fourier; DSC: análise térmica diferencial; TGA: análise termogravimétrica; DXR: difração de raios X; RMN  $^1\text{H}$ : ressonância magnética nuclear de prótio.

### 4.3.1 Teste de solubilidade/estabilidade de fases

Para que fosse possível construir o diagrama de solubilidade/estabilidade de fases, foi construída inicialmente uma curva de calibração em triplicata do fármaco Nis em água Milli-Q® (Merck Millipore, Damstsd, Alemanha). Para isso, foram preparadas oito soluções analíticas com concentrações de 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 e 24  $\mu\text{g/mL}$ . Após o preparo, as concentrações foram filtradas (0,45  $\mu\text{m}$ ), colocadas em cubeta de quartzo retangular (1 cm de caminho óptico, altura de 45 mm, volume

de 3,5 mL, 2 janelas polidas) e, em seguida, analisadas em ordem crescente em espectroscopia UV-Vis a um comprimento de onda de 311 nm. O gráfico relacionando os valores em absorbância (mAbs) *versus* concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) foi construído e a equação da reta e o coeficiente de correlação puderam ser obtidos.

A partir daí, foi adicionada uma quantidade de Nis (0,38 mM) a 50 mL de água destilada (Fanem Ltda., modelo 724/2-A, São Paulo, SP, Brasil) contendo quantidades crescentes de  $\beta\text{CD}$  (0,0475; 0,095; 0,19; 0,2375; 0,38; 0,76 e 1,52 mM). As dispersões resultantes que apresentaram proporções molares de Nis: $\beta\text{CD}$  de 1:0,125; 1:0,25; 1:0,50; 1:0,625; 1:1; 1:2 e 1:4 (Tabela 2) foram agitadas por 24 h a 25°C. Cada proporção molar foi preparada em triplicata.

Tabela 2. Dispersões Nis: $\beta\text{CD}$  resultantes do teste de solubilidade/estabilidade de fases

| Dispersões | Proporção molar Nis: $\beta\text{CD}$ | Nis (g) | $\beta\text{CD}$ |
|------------|---------------------------------------|---------|------------------|
| 1          | 1:0,125                               | 0,0176  | 0,0027           |
| 2          | 1:0,25                                | 0,0176  | 0,0054           |
| 3          | 1:0,5                                 | 0,0176  | 0,0108           |
| 4          | 1:0,625                               | 0,0176  | 0,0135           |
| 5          | 1:1                                   | 0,0176  | 0,0216           |
| 6          | 1:2                                   | 0,0176  | 0,0432           |
| 7          | 1:4                                   | 0,0176  | 0,0864           |

Fonte: A autora.

Após este período, foram avaliadas com relação à fase obtida por meio de teste de dissolução/solubilidade aparente. As dispersões foram filtradas (Filtro para seringa de membrana em celulose regenerada, 0,45  $\mu\text{m}$ , 0,45x25mm, marca J Filter), colocadas em uma cubeta de quartzo e, em seguida, analisadas seguindo a ordem crescente das proporções molares em espectroscopia UV-Vis a um comprimento de onda de 311 nm.

A constante de estabilidade aparente ( $K_c$ ) foi calculada pelo diagrama de solubilidade de fases usando a Equação 1 descrita por Higuchi e Connors (HIGUCHI, CONNORS, 1965).

$$Kc = \frac{\text{slope}}{S_0 (1 - \text{slope})}$$



(1)

na qual: a inclinação (“**slope**”) é obtida a partir da porção inicial linear do gráfico de absorbância em função da proporção molar de Nis:βCD; o “**S<sub>0</sub>**” é a solubilidade da Nis em água, na ausência de βCD.

#### 4.3.2 Obtenção de CI nas proporções molares selecionadas

##### 4.3.2.1 Mistura física (MF)

Misturas físicas de Nis:βCD nas proporções molares de 1:1 e 1:2 foram preparadas por meio de homogeneização durante 15 min utilizando almofariz e pistilo (VEIGA, PECORELLI, RIBEIRO, 2006; RIEKES et al., 2010).

##### 4.3.2.2 Suspensão e secagem por liofilização (Lio)

Suspensões de Nis:βCD nas proporções molares de 1:1 e 1:2 foram dissolvidas em solução de etanol (P.A. ACS, Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil)/água destilada 50:50 (v/v), agitadas a 25°C por 24 h, congeladas a -82°C e, então, liofilizadas por 72 h.

##### 4.3.2.3 Suspensão e secagem por spray drying (SP)

Suspensões de Nis:βCD nas proporções molares de 1:1 e 1:2 foram dissolvidas em solução de etanol/água destilada 50:50 (v/v), agitadas a 25°C por 24 h e, então, transferidas para o equipamento *spray dryer* e submetidas ao processo de secagem de acordo com as seguintes condições operacionais: temperatura de entrada de 90°C, velocidade de alimentação de 250 mL/h, fluxo de ar de 500 cm<sup>3</sup>/h e taxa de aspiração de 100%.

##### 4.3.2.4 Rendimento dos métodos de obtenção dos CI

O rendimento dos métodos de obtenção dos CI foi calculado utilizando a Equação 2:

$$\text{Rendimento da complexação (\%)} = 100 \times \frac{m_{\text{final}}}{m_{\text{inicial}}}$$

(2)

na qual:  $m_{final}$  é a massa da preparação recuperada após a realização do método de complexação e  $m_{inicial}$  é a massa resultante da soma das massas de cada composto utilizado na preparação.

#### 4.3.3 Caracterização dos CI

##### 4.3.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Efeito de Campo (FEG)

As avaliações morfológica e de superfície da Nis e da  $\beta$ CD não complexadas e dos CI Nis: $\beta$ CD nas proporções molares 1:1 e 1:2 foram feitas em microscópio eletrônico de varredura. Inicialmente, amostras de cada uma das substâncias em análise foram fixadas em suporte metálico para microscopia. Na sequência, foram submetidas ao processo de metalização com ouro no metalizador SC7620 Mini Sputter Coater/Glow Discharge System. As micrografias foram, então, obtidas após a visualização das amostras, empregando voltagens de aceleração de 15 kV e magnitude de 4000x. O registro das imagens ocorreu por meio da utilização do *software* específico (MIRA<sup>TC</sup>, Tescan Orsay Holding, República Tcheca).

##### 4.3.3.2 Espectroscopia Infravermelha por Transformada de Fourier (FT-IR)

Amostras (2 mg) da Nis e da  $\beta$ CD não complexadas e dos CI Nis: $\beta$ CD nas proporções molares 1:1 e 1:2 foram misturadas a 96 mg de brometo de potássio (KBr) grau espectroscópico ( $\geq 99\%$ , Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), prensadas na forma de pastilhas e, então, analisadas por espectroscopia na região do infravermelho no modo de absorbância a 32 *scans*/min, resolução espectral  $4\text{ cm}^{-1}$  e faixa de varredura/leitura de  $4.000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ . Os espectros foram analisados utilizando o *software* IR Solution (Shimadzu, Quioto, Japão) e OriginPro 9.0 (OriginLab®, Northampton, MA, EUA).

##### 4.3.3.3 Análise Térmica Diferencial (DSC) e Termogravimétrica (TGA)

Amostras (10 mg) da Nis e da  $\beta$ CD não complexadas e dos CI Nis: $\beta$ CD nas proporções molares 1:1 e 1:2 foram utilizadas para as análises térmicas. Foi utilizado um calorímetro do Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP) da UEM pela pós-doutoranda Giselly Bianchi do Departamento de Física da UEM. Para esta técnica, as amostras foram acondicionadas em cadinho de platina (NETZSCH do Brasil, Pomerode, SC, Brasil). A rampa de aquecimento foi de

10°C/min em atmosfera de nitrogênio (vazão de 20 mL/min) na faixa de 20°C a 500°C. Os termogramas foram analisados utilizando o *software* OriginPro 9.0 (OriginLab®, Northampton, MA, EUA).

#### 4.3.3.4 Difração de raios X (DRX)

Amostras da Nis e da  $\beta$ CD não complexadas e dos CI Nis: $\beta$ CD nas proporções molares 1:1 e 1:2 foram examinadas em difratômetro de raios X nas seguintes condições operacionais: *scan* de 2°/min e 2 $\theta$  de 3° a 90°, radiação K $\alpha$  de cobre ( $\lambda$  = 1.5418 Å), corrente de 40 mA e voltagem de 40 kV. Os difratogramas foram analisados utilizando o *software* OriginPro 9.0 (OriginLab®, Northampton, MA, EUA).

#### 4.3.3.5 Ressonância Magnética Nuclear (RMN – $^1\text{H}$ )

A transferência de diferença de saturação de  $^1\text{H}$  dos experimentos em RMN de amostras (30 mg) da Nis e da  $\beta$ CD não complexadas e dos CI Nis: $\beta$ CD nas proporções molares 1:1 e 1:2 foi realizada em espectrômetro a 293 K em DMSO- $d_6$  (99,9%, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) operado a 9,4 Tesla, observando  $^1\text{H}$  a 400 MHz. O espectrômetro foi equipado com uma sonda multinuclear de detecção direta de 5 mm e gradiente de campo no eixo z. Os espectros foram adquiridos com largura espectral de 4734,85 Hz ( $\approx$  12 ppm) e 64 K, proporcionando uma resolução digital de 0,06 Hz. Todos os deslocamentos químicos  $^1\text{H}$ -RMN foram registrados em ppm relacionados ao sinal TMS a 0,00 ppm como referência interna. Todos os programas de pulso foram fornecidos pela Bruker BioSpin. Os espectros foram analisados utilizando o *software* MestReNova (MestReLab Research SL, Santiago de Compostela, Espanha).

#### 4.3.4 Teste de liberação in vitro

Para a quantificação da concentração de Nis solubilizada no meio em cada um dos períodos avaliados, foi utilizada a curva de calibração do fármaco Nis em água Milli-Q® do teste de solubilidade/estabilidade de fases.

Os ensaios de dissolução in vitro foram conduzidos para a Nis e para os CI Nis: $\beta$ CD obtidos pelos métodos Lio e SP na proporção molar selecionada 1:1. Para o teste de dissolução do fármaco Nis, uma quantidade de 72 mg foi pesada e colocada

na cuba do dissolutor. Foi, então, adicionado um volume de 900 mL da solução de água Milli-Q® previamente fervida e resfriada, de modo a respeitar as condições “sink” do meio. Foi utilizado para este experimento, o aparato 2 (pá) do dissolutor de cubas e este equipamento foi mantido a uma temperatura de  $37,0 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$  e sob agitação de 75 rpm. Os experimentos foram realizados em triplicata durante um período total de 8 h. Para o teste de dissolução dos CI, foram utilizadas as mesmas condições experimentais, entretanto, a massa dos CI utilizada foi de 144 mg, equivalente a 72 mg do fármaco, e os experimentos foram feitos durante um período total de 24 h.

Em intervalos pré-determinados (5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 min, 1 h 30 min, 2 h, 2 h 30 min, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 h para o fármaco e, além destes, também 10, 12 e 24 h para os CI), amostras de 5 mL foram coletadas - tendo sido o meio de dissolução repostado com igual volume - filtradas ( $0,45 \mu\text{m}$ ), colocadas em cubeta de quartzo e, imediatamente, analisadas em espectroscopia UV-Vis a um comprimento de onda de 311 nm.

#### 4.3.4.1 Avaliação do perfil, eficiência e cinética de dissolução

Os perfis de dissolução in vitro foram obtidos a partir da porcentagem da Nis solubilizada em função do tempo. Após isso, esses resultados foram analisados por meio do teste da razão (eficiência de dissolução) e dos métodos modelo-dependentes.

O perfil de dissolução da Nis foi comparado com os perfis dos CI Nis: $\beta$ CD na proporção molar 1:1 selecionada. A eficiência de dissolução é modelo-independente, definida pela área sob a curva de dissolução até um certo tempo  $t$  e expressa em porcentagem da área de um retângulo, onde descreve 100% da dissolução no mesmo tempo (Equação 3).

$$ED = \frac{\int_0^t y \cdot dt}{y_{100} \cdot t} \times 100\%$$

(3)

na qual: “**ED**” é a eficiência de dissolução; “**y**” é a porcentagem de fármaco dissolvido no tempo “**t**”; “**y<sub>100.t</sub>**” é a área do retângulo para uma quantidade de 100% da dissolução no tempo total “**t**”.

Os resultados de eficiência de dissolução foram submetidos à análise estatística utilizando a ANOVA 1 fator ( $\alpha=0,05$ ), utilizando o *software* GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA).

A avaliação matemática da cinética de dissolução *in vitro* foi realizada pelo ajuste dos dados experimentais ao modelo monoexponencial (Equação 4), ao modelo biexponencial (Equação 5) e ao modelo de ordem zero (Equação 6), considerando os resultados do critério de seleção do modelo (MSC), do coeficiente de correlação, do ajuste gráfico e da coerência dos valores encontrados para as constantes de velocidade para cada modelo, utilizando o *software* GraphPad Prism 5.

$$\%D = 100(1 - e^{-kt})$$

(4)

$$\%D = 100[1 - (Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t})]$$

(5)

$$\%D = kt$$

(6)

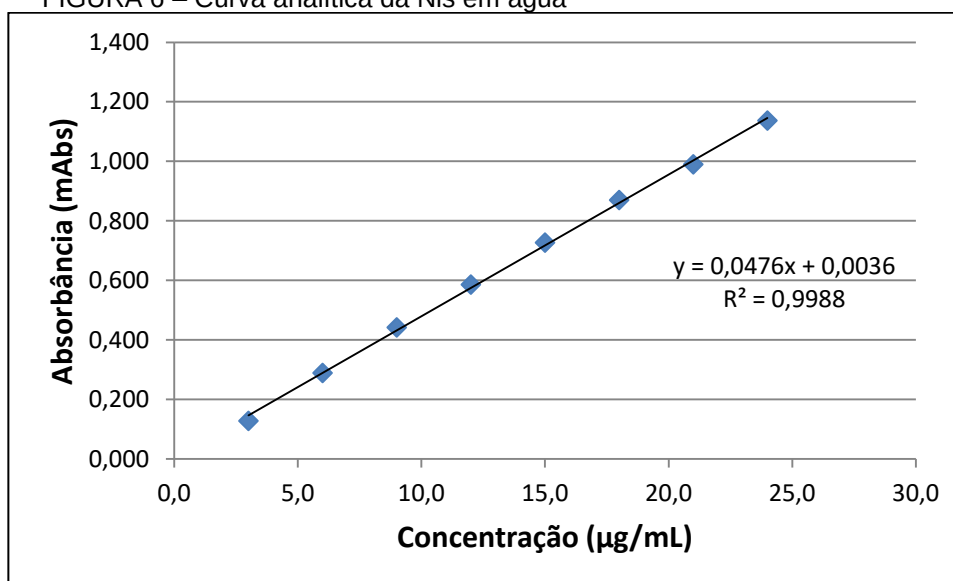
nas quais: “%D” é o percentual do fármaco dissolvido no tempo “t”, “k”, “ $\alpha$ ” e “ $\beta$ ” são constantes cinéticas de dissolução verificadas; “A” e “B” são concentrações iniciais do fármaco que contribuem para as duas fases de dissolução.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 TESTE DE SOLUBILIDADE/ESTABILIDADE DE FASES

A curva analítica do fármaco Nis em água confeccionada previamente à realização do teste de solubilidade/estabilidade de fases está representada na Figura 6. Podem ser observados o coeficiente de correlação de 0,9988 e a equação da reta que foi utilizada para a quantificação da concentração da Nis solubilizada em água em função do aumento crescente das concentrações de  $\beta$ CD.

FIGURA 6 – Curva analítica da Nis em água

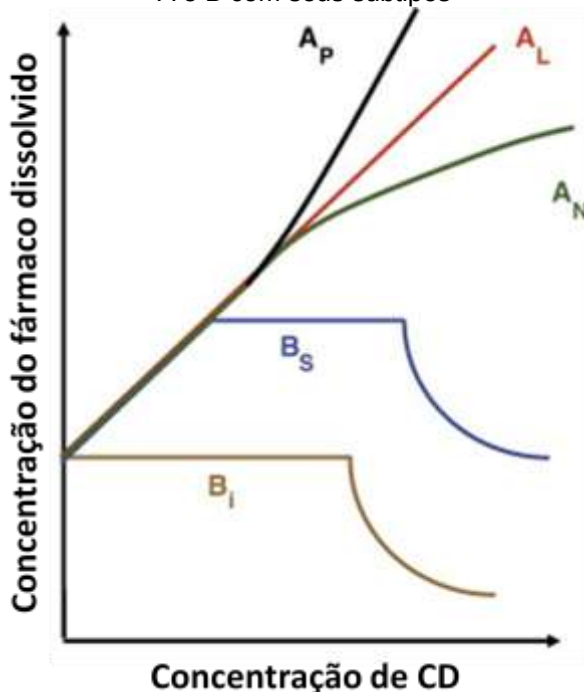


Fonte: A autora.

O diagrama de solubilidade representa a caracterização inicial dos CI em estado líquido (BREWSTER, LOFTSSON, 2007), sendo um dos métodos clássicos utilizados para constatar a formação do CI a partir da constante de estabilidade e de sua estequiometria. Permite avaliar a solubilidade e estabilidade dos fármacos adicionados em excesso a volumes fixos de soluções de CD em concentrações crescentes. Os sistemas obtidos podem ser classificados em A e B (Figura 7). Em A, ocorre um aumento gradual da solubilidade em relação à concentração da CD. Existem os subtipos  $A_L$ ,  $A_P$  e  $A_N$  que são classificados de acordo com a inclinação da reta. A curva de subtipo  $A_L$  apresenta estequiometria 1:1 fármaco:CD e demonstra solubilidade aumentada linearmente com o aumento das concentrações de CD. Curvas de subtipos  $A_P$  e  $A_N$  apresentam estequiometria superior e inferior a 1, respectivamente, devido às suas retas demonstrarem desvios, característicos da

menor ou maior solubilidade do CI em relação ao fármaco não complexado (BREWSTER, LOFTSSON, 2007). No sistema B, os CI apresentam solubilidade aquosa limitada e se subdivide em  $B_S$  e  $B_I$ . A curva  $B_S$  apresenta um aumento inicial da solubilidade, seguido por um equilíbrio e, ao atingir o limite de solubilidade, ocorre precipitação. A curva de subtipo  $B_I$  não apresenta solubilidade diferente do fármaco não complexado e mantém um equilíbrio até que ocorra a precipitação do CI formado (BREWSTER, LOFTSSON, 2007).

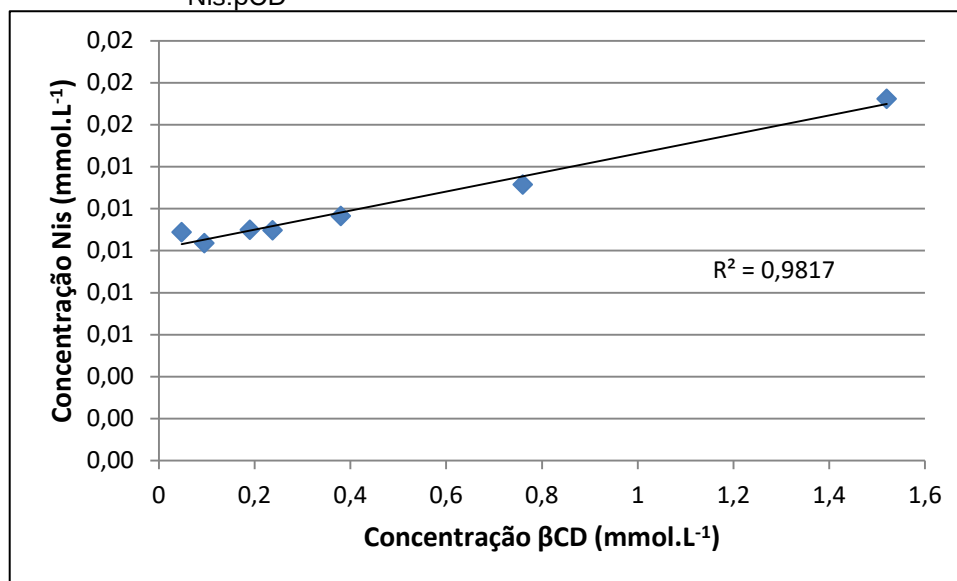
FIGURA 7 – Representação gráfica dos tipos de diagramas de solubilidade de fases A e B com seus subtipos



Adaptado de: BREWSTER, M. E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 59, p. 645-666, 2007. (BREWSTER, LOFTSSON, 2007)

A curva de solubilidade/estabilidade de fases da suspensão Nis: $\beta$ CD está apresentada na Figura 8.

FIGURA 8 – Diagrama de solubilidade/estabilidade de fases da suspensão Nis:βCD



Fonte: A autora.

Os resultados indicaram que há uma relação linear ( $r^2=0,9817$ ) entre o aumento da solubilidade da Nis e o aumento da concentração da βCD, o que indica a complexação do fármaco (RIEKES et al., 2010). A curva pôde, então, ser classificada como tipo A<sub>L</sub>: crescimento linear da solubilidade do fármaco em função da concentração da CD (RIEKES et al., 2010).

O valor da inclinação da reta foi inferior a 1 (0,045), indicando que, no mínimo, o CI na proporção molar 1:1 entre as moléculas de Nis e βCD foi obtido (RIEKES et al., 2010). Dessa forma, a proporção molar 1:1 (Nis:βCD) foi selecionada para preparar e caracterizar os CI através dos diferentes métodos. Além disso, a razão molar 1:2 também foi escolhida para preparar os CI por não se excluir a possibilidade da presença de CI de ordem superior em relação à molécula hóspede (BREWSTER, LOFTSSON, 2007).

A constante de estabilidade aparente ( $K_c$ ) é um parâmetro que avalia a proporção na qual a solução contendo CD e fármaco forma o CI. Rama et al. (2005) consideraram adequadas constantes com valores entre 100 e 1000 M<sup>-1</sup> (RAMA et al., 2005). Quanto maior a  $K_c$ , maior será a facilidade de formação do complexo de inclusão. Neste estudo, a  $K_c$  calculada a partir do diagrama de solubilidade de fases foi de 238,5 M<sup>-1</sup> indicando uma boa interação entre a Clx e a βCD, visto que formulações com  $K_c$  muito elevadas podem originar complexos muito estáveis (VEIGA, PECORELLI, RIBEIRO, 2006). Além do que, o objetivo deve ser melhorar o



incremento de solubilidade do fármaco na menor proporção de CD utilizada (LOFTSSON, HREINSDOTTIR, MASSON, 2005).

## 5.2. OBTENÇÃO DE CI NAS PROPORÇÕES MOLARES 1:1 E 1:2

Imagens ilustrativas dos CI obtidos pelos diferentes métodos podem ser visualizadas na Figura 9.

FIGURA 9 – Pós da Nis **(A)** e  $\beta$ CD **(B)** não complexadas e pós obtidos após os métodos de MF 1:1 **(C)**, CI Lio 1:1 **(D)** e CI SP 1:1 **(E)**



Fonte: A autora.

Como pode ser observado, a coloração dos pós obtidos após complexação (Figuras 9C a 9E) alterou em relação aos fármacos não complexados (Figuras 9A e 9B). Foi observado que a densidade do pó dos CI obtidos por Lio foi menor em relação aos demais pós.

Os valores de rendimento de complexação foram de 100% para a MF e o CI Lio em ambas proporções molares e de, aproximadamente, 43,50% para os CI Spray. Portanto, pode ser constatada esta desvantagem de baixo rendimento deste método de formação de complexos de inclusão por secagem por pulverização (CABRAL-MARQUES, ALMEIDA, 2009).

## 5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS CI

A molécula hóspede apresenta alterações nas suas propriedades físico-químicas quando incorporada à cavidade da CD, assim, torna-se importante a caracterização do material obtido, visando confirmar a formação do complexo e determinar suas propriedades (MEIRELLES, 2012). No estado sólido, o complexo pode ser caracterizado por meio de análise térmica, microscopia eletrônica de varredura, difração de raios X, teste de dissolução e espectroscopia no infravermelho. No estado líquido, técnicas eletroquímicas, diagrama de solubilidade de fases, métodos espectroscópicos, ressonância magnética nuclear e microcalorimetria são as mais utilizadas (BREWSTER, LOFTSSON, 2007; SINGH et al., 2010; MEIRELLES, 2012).

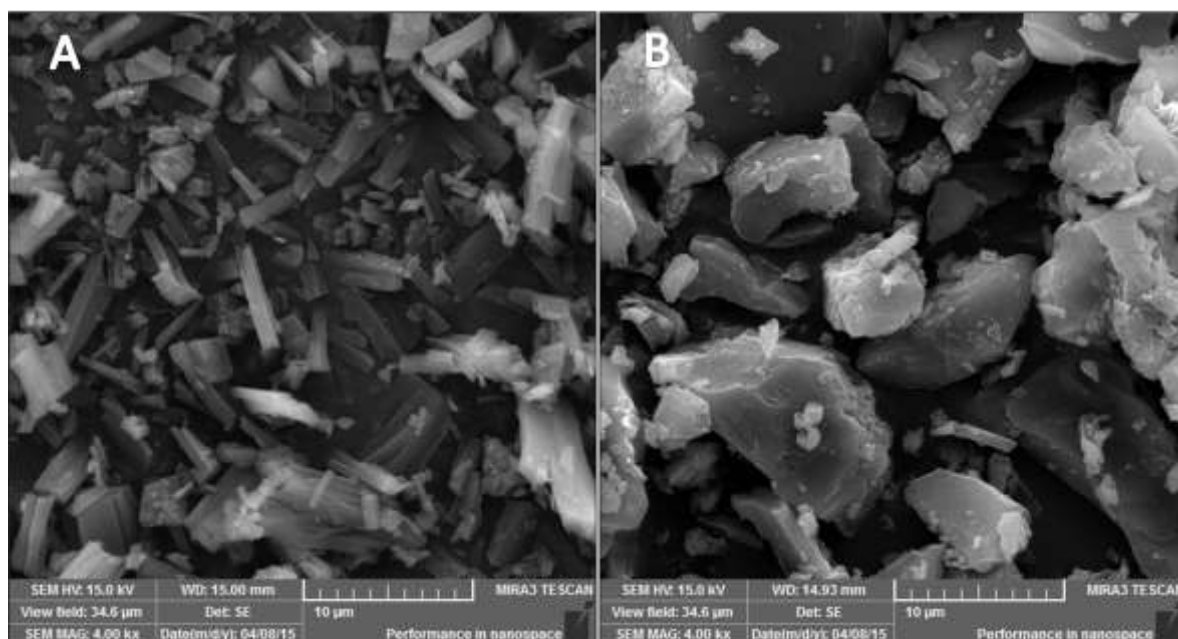
#### 5.3.1 FEG

A microscopia eletrônica de varredura tem sido amplamente utilizada para análise dos aspectos de superfície dos materiais e, no caso dos CI, por fornecer informações do estado de cristalização dos produtos obtidos a partir de técnicas de complexação (LYRA et al., 2010).

No intuito de verificar a morfologia das partículas obtidas pelos diferentes métodos, MF, Lio e SP, foi feita a análise em FEG para a Nis e a  $\beta$ CD não complexadas e para os CI Nis: $\beta$ CD nas proporções molares 1:1 e 1:2. Todas as micrografias foram analisadas com a mesma magnitude com a finalidade de comparação entre as partículas.

Foi observado que a Nis apresentou uma morfologia cristalina com formatos alongados irregulares (Figura 10A), enquanto a  $\beta$ CD mostrou padrões mais amorfos, de diversos tamanhos, em relação ao fármaco como mostra a Figura 10B.

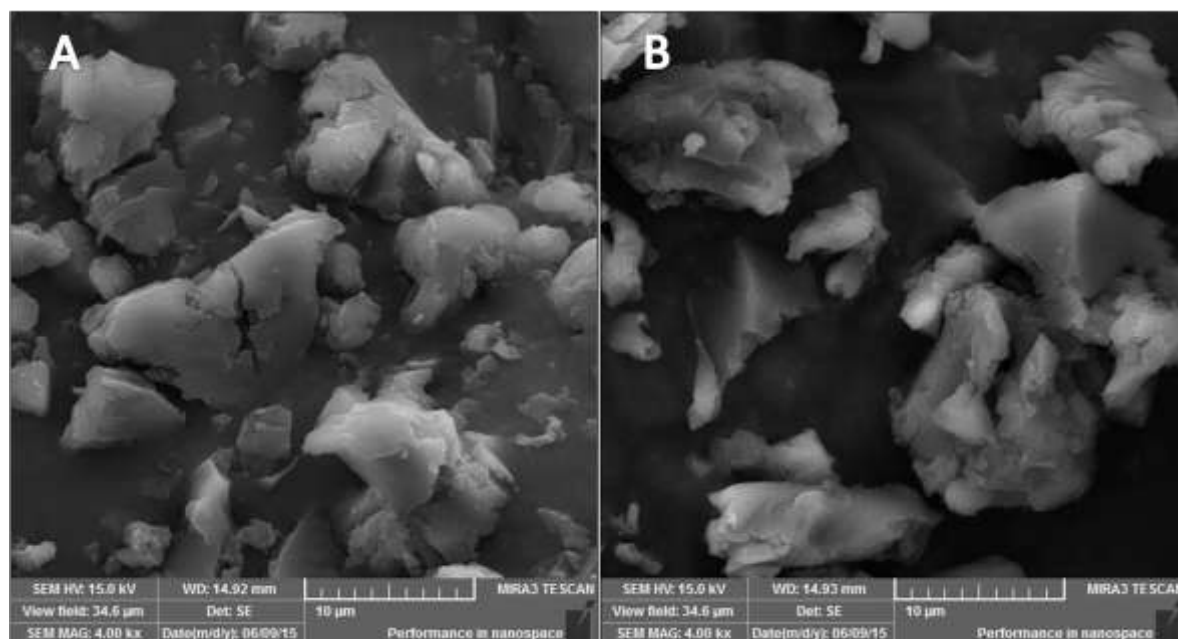
FIGURA 10 – Fotomicrografias obtidas por FEG. **A** – Nis e **B** –  $\beta$ CD não complexadas



Fonte: A autora.

Na Figura 11A, observou-se que a MF 1:1 Nis: $\beta$ CD apresentou características mais amorfas, entretanto, com a presença de cristais. Esta mesma morfologia foi encontrada para a MF na proporção molar 1:2 Nis: $\beta$ CD (Figura 11B).

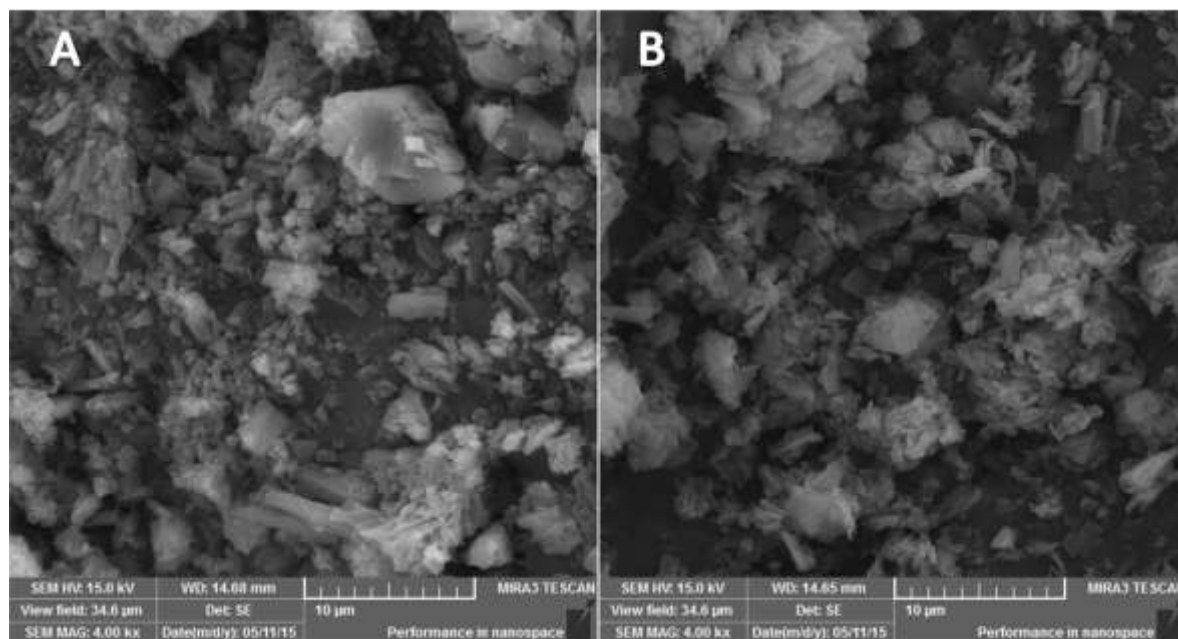
FIGURA 11 – Fotomicrografias obtidas por FEG. **A** – MF 1:1 Nis: $\beta$ CD e **B** – MF 1:2 Nis: $\beta$ CD



Fonte: A autora.

Os CI obtidos por secagem por Lio apresentaram aumento no tamanho e mostraram morfologias semelhantes entre as duas proporções molares avaliadas, porém, apresentaram muitas irregularidades (Figura 12).

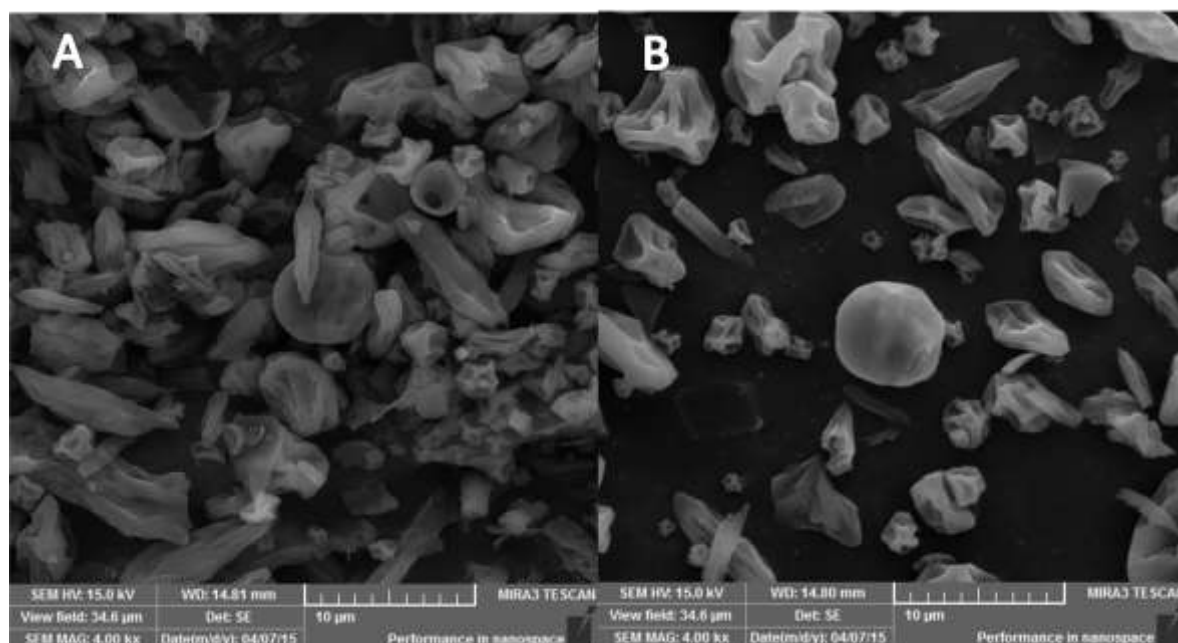
FIGURA 12 – Fotomicrografias obtidas por FEG. **A** – CI Lio 1:1 Nis:βCD e **B** – CI Lio 1:2 Nis:βCD



Fonte: A autora.

As partículas obtidas pelo método de SP apresentaram características amorfas, com formato toroidal devido à saída de água da molécula de CD que ocorre de forma rápida neste método, causando a colapso de suas paredes (FARAGO et al., 2007). Isto foi observado nas duas razões molares e as partículas obtidas apresentaram morfologias mais íntegras de tamanhos variados de 1,28 μm a 11 μm (Figura 13).

FIGURA 13 – Fotomicrografias obtidas por FEG. **A** – CI SP 1:1 Nis:βCD e **B** – CI SP 1:2 Nis:βCD



Fonte: A autora.

Os resultados sugeriram que os métodos utilizados para secagem Lio e SP influenciaram diretamente nas morfologias e alteraram os tamanhos das partículas. Tem sido relatado na literatura que o tempo e a velocidade de secagem podem modificar a morfologia dos compostos (ZANG et al., 2009). E, de acordo com Rusa et al. (2001), as CD possuem um caráter mais amorfo após a complexação (RUSA, LUCA, TONELLI, 2001).

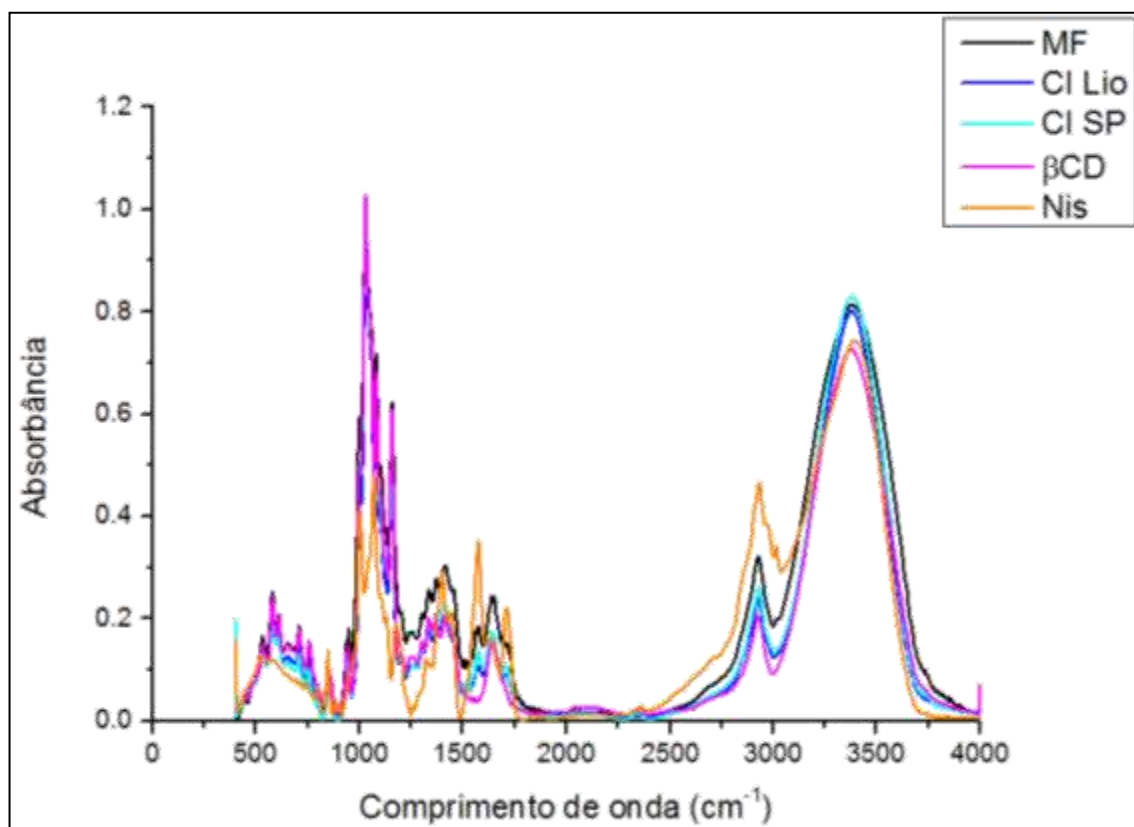
### 5.3.2 FT-IR

A espectroscopia de FT-IR é bastante utilizada na caracterização de CI com CD, uma vez que são análises rápidas e precisas, porém a informação obtida por esta técnica apresenta algumas limitações. Quando a molécula hóspede apresenta grupos funcionais característicos, como a carbonila, esta banda será significativamente encoberta e, em alguns casos, deslocada após a complexação. Os desvios e alterações de intensidade das bandas correspondentes aos grupos funcionais do fármaco e da CD são muito sutis e requerem, portanto, uma interpretação cuidadosa dos dados obtidos (CUNHA-FILHO, SÁ-BARRETO, 2007; LYRA et al., 2010).

Uma vez que não foram observadas diferenças significativas entre as duas razões molares testadas (1:1 e 1:2 Nis:βCD), os resultados de FT-IR estão apresentados sem comparações entre elas. A Figura 14 apresenta os espectros

obtidos da Nis e da  $\beta$ CD não complexadas e dos CI na faixa de varredura de 4.000-400  $\text{cm}^{-1}$ .

FIGURA 14 - Espectros de FT-IR das amostras de MF, CI Lio, CI SP,  $\beta$ CD e Nis

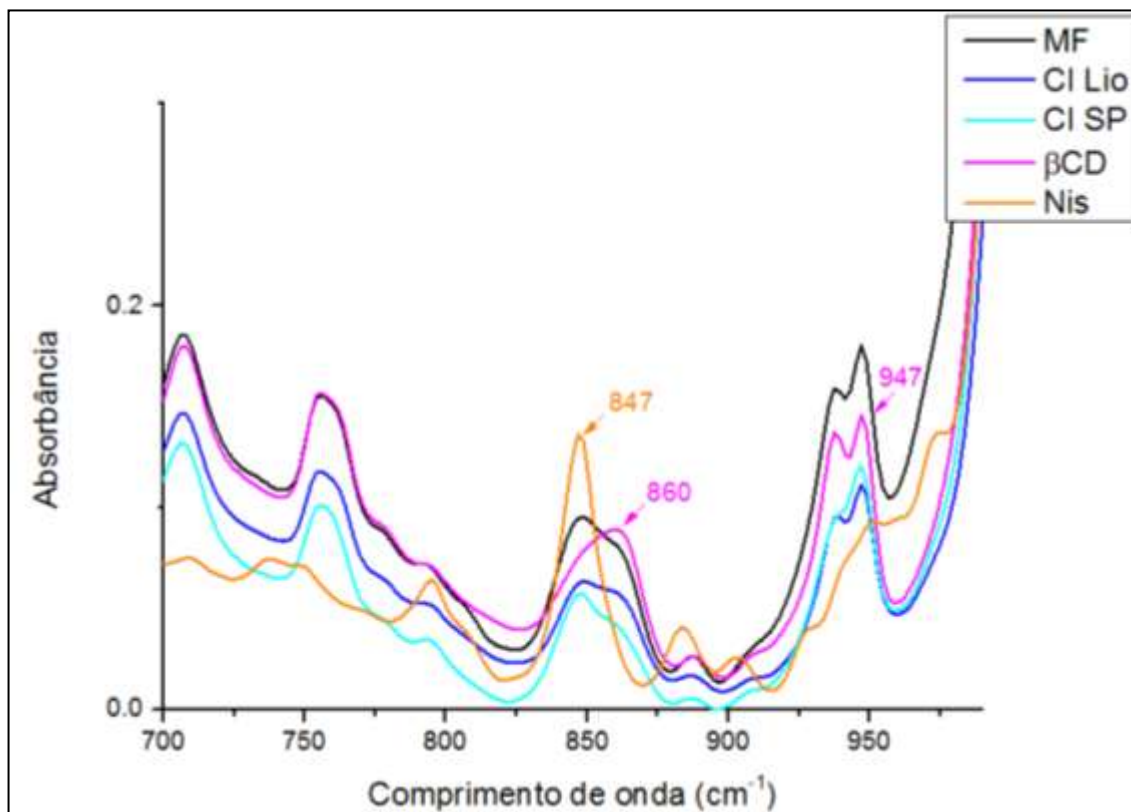


Fonte: A autora.

A Figura 15 mostra os espectros de absorção no infravermelho para as amostras da Nis e da  $\beta$ CD não complexadas e dos CI para o intervalo entre 990 e 700  $\text{cm}^{-1}$ . A banda encontrada em 847  $\text{cm}^{-1}$  no espectro da Nis representa a ligação dupla  $\text{CH}=\text{CH}$  (GAVRILIN, PODLUZHNYAYA, 2002). A absorção em 860  $\text{cm}^{-1}$  representa a região correspondente às vibrações das ligações assimétricas para grupos metilenos da  $\beta$ CD (CORCIOVA et al., 2015).

Ainda na Figura 15, na região de 947  $\text{cm}^{-1}$  houve uma redução na intensidade da banda para os espectros CI SP e CI Lio, correspondente à vibração do estiramento  $\text{C-O-C}$  envolvendo as ligações do tipo  $\alpha$ -1,4 da  $\beta$ CD, ligação considerada de interesse, pois está associada à cavidade interna da CD e possíveis alterações nesta banda vibracional são indicativos de complexação (MATIOLI, 2000).

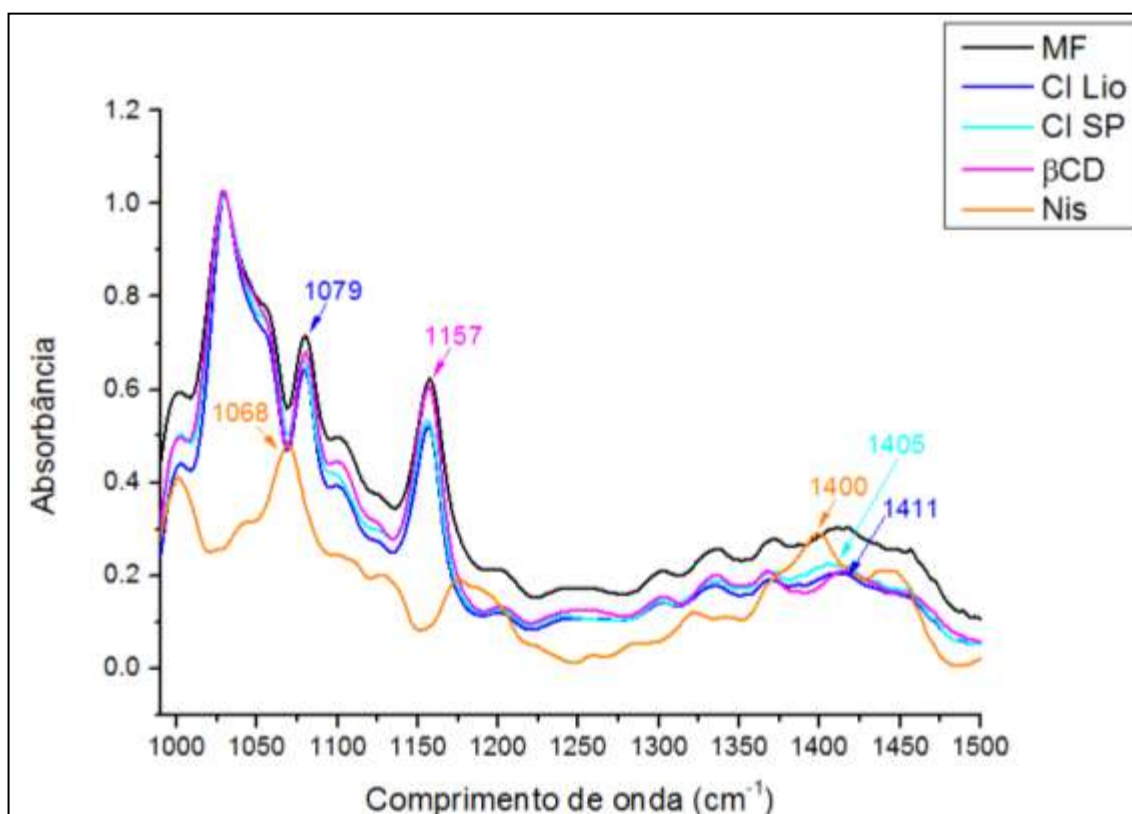
FIGURA 15 - Espectros de FT-IR – vista aproximada de 990 a 700  $\text{cm}^{-1}$  das amostras de MF, CI Lio, CI SP,  $\beta$ CD e Nis



Fonte: A autora.

A Figura 16 mostra a banda em 1068  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde aos grupos de hidroxilas da Nis, o qual apresentou um deslocamento na MF para 1079  $\text{cm}^{-1}$ , no CI SP para 1078  $\text{cm}^{-1}$  e no CI Lio para 1079  $\text{cm}^{-1}$ . Em 1157  $\text{cm}^{-1}$ , houve uma redução na intensidade das bandas para os CI correspondentes às ligações vibracionais de C-C da  $\beta$ CD (RUSA, LUCA, TONELLI, 2001). A banda de 1400  $\text{cm}^{-1}$  corresponde ao grupamento C-H da Nis. No CI SP, houve um deslocamento desta banda para 1405  $\text{cm}^{-1}$ , no CI Lio para 1411  $\text{cm}^{-1}$  e na MF para 1413  $\text{cm}^{-1}$  e também foi observada uma redução significativa na intensidade dessas bandas.

FIGURA 16 - Espectros de FT-IR – vista aproximada de 1500 a 1000  $\text{cm}^{-1}$  das amostras de MF, CI Lio, CI SP,  $\beta$ CD e Nis

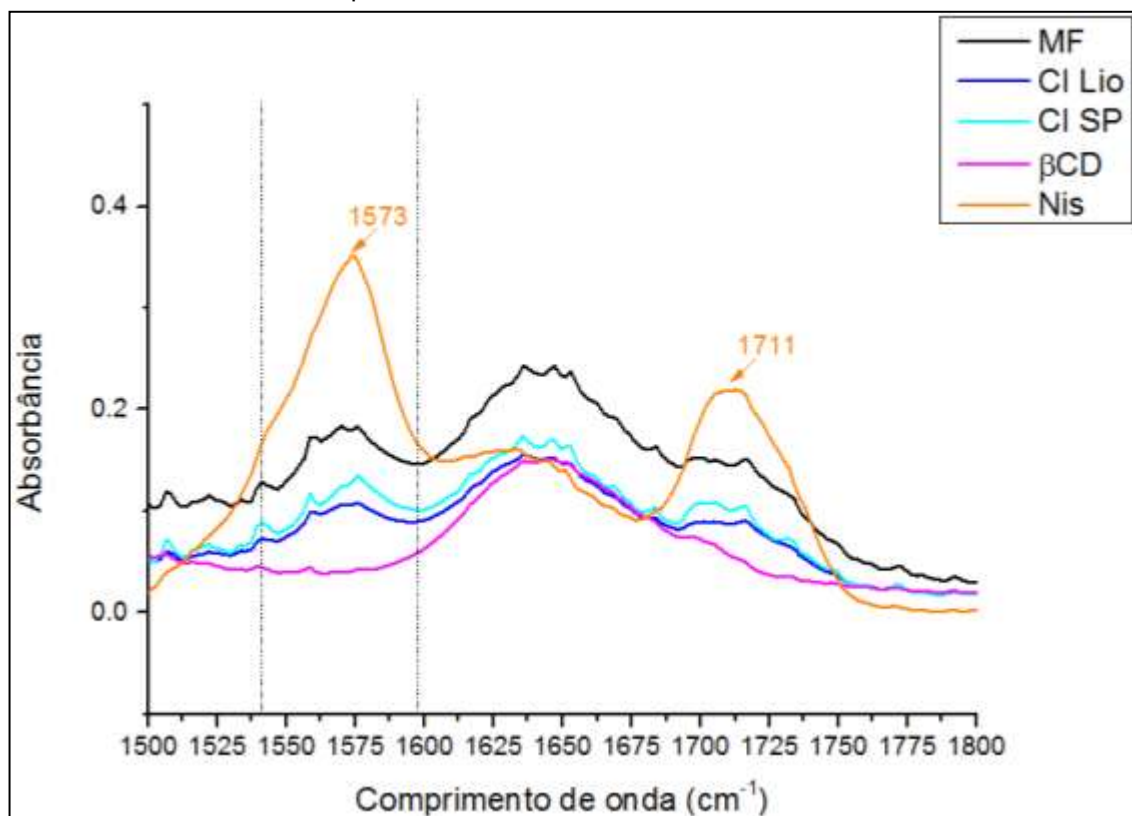


Fonte: A autora.

A Figura 17 apresenta a banda em 1573  $\text{cm}^{-1}$  da ligação CH-CH da Nis, mostrando uma redução em sua intensidade para a MF e para os CI (SAKEER et al., 2010). Foi observado um estreitamento da banda da Nis de 1542  $\text{cm}^{-1}$  – 1593  $\text{cm}^{-1}$  para 1552  $\text{cm}^{-1}$  – 1586  $\text{cm}^{-1}$  em relação aos CI. A banda encontrada em 1711  $\text{cm}^{-1}$ , que corresponde à carboxila do éter e do ácido carboxílico, mostrou uma redução significativa em sua intensidade.



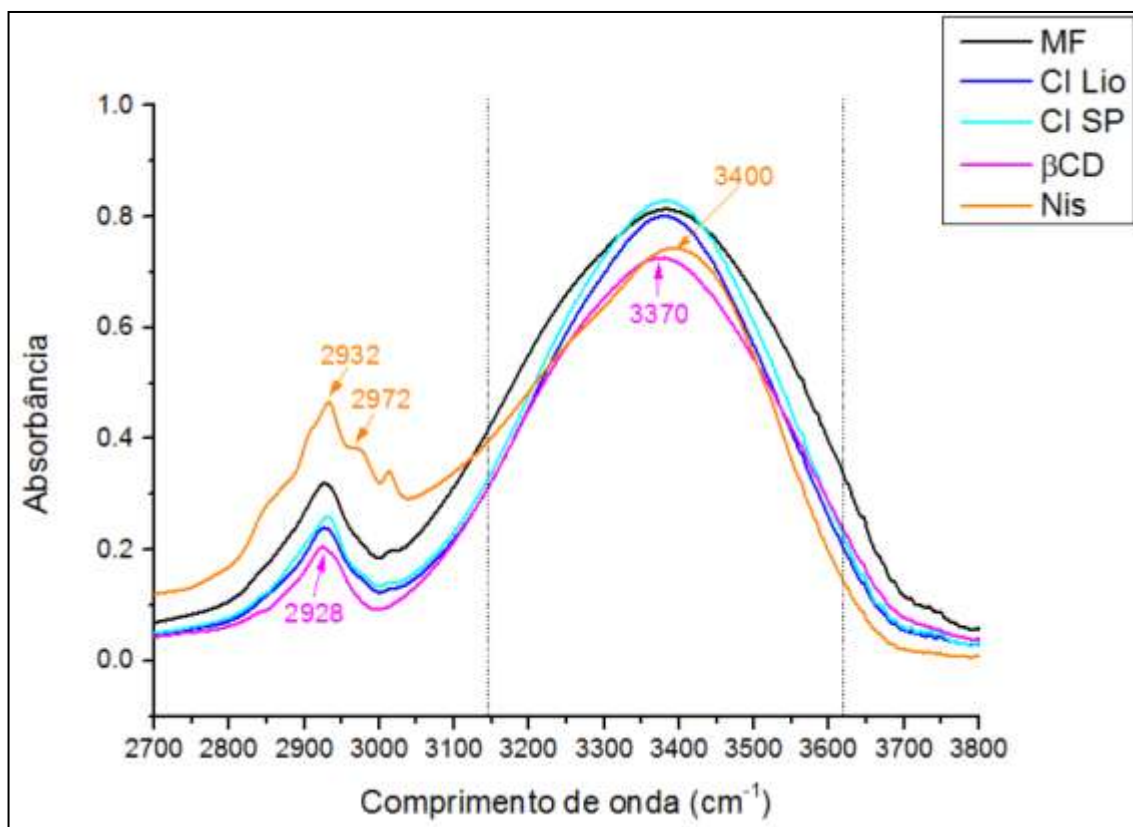
FIGURA 17 - Espectros de FT-IR – vista aproximada de 1800 a 1500  $\text{cm}^{-1}$  das amostras de MF, CI Lio, CI SP,  $\beta$ CD e Nis



Fonte: A autora.

A Figura 18 mostra um aumento na intensidade da banda em 2928  $\text{cm}^{-1}$  da  $\beta$ CD, que corresponde ao grupo C-H<sub>2</sub>, para os CI e as MF. Em 2932  $\text{cm}^{-1}$  (grupo C-H<sub>2</sub>), houve uma redução de intensidade da Nis em relação aos CI e às MF. O “ombro” em 2972  $\text{cm}^{-1}$  que desaparece nos CI e nas MF corresponde às ligações C-H da Nis. Houve um estreitamento de 3144  $\text{cm}^{-1}$  – 3536  $\text{cm}^{-1}$  para 3173  $\text{cm}^{-1}$  – 3560  $\text{cm}^{-1}$  e isto é um bom indicativo de complexação. Este é um fenômeno comumente observado quando um CI entre  $\beta$ CD (hospedeiro) e moléculas hóspedes é sintetizado (DENADAI et al., 2007). A banda em 3370  $\text{cm}^{-1}$ , correspondente à ligação O-H da  $\beta$ CD, aumentou sua intensidade nos CI e nas MF. Também foi verificado que a absorção máxima da Nis foi em 3400  $\text{cm}^{-1}$  devido à ligação vibracional do hidrogênio ligado.

FIGURA 18 - Espectros de FT-IR – vista aproximada de 3800 a 2700  $\text{cm}^{-1}$  das amostras de MF, CI Lio, CI SP,  $\beta$ CD e Nis



Fonte: A autora.

As diferenças encontradas nos espectros da Nis e da  $\beta$ CD não complexadas em relação aos CI foram sumarizadas na Tabela 3.

Tabela 3. Comparações entre os espectros de FT-IR da Nis e da  $\beta$ CD não complexadas e os espectros dos CI Nis: $\beta$ CD obtidos

| Amostra    | Ligação vibracional/estiramento* ( $\text{cm}^{-1}$ ) | Tipo de ligação                     | Alteração observada nos CI |
|------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------|
| Nis        | 847                                                   | CH=CH                               | -                          |
| $\beta$ CD | 860                                                   | grupos metilenos                    | -                          |
| $\beta$ CD | 947                                                   | C-O-C*                              | Redução                    |
| Nis        | 1068                                                  | hidroxila                           | Deslocamento               |
| $\beta$ CD | 1157                                                  | C-C                                 | Redução                    |
| Nis        | 1400                                                  | C-H                                 | Deslocamento/Redução       |
| Nis        | 1573                                                  | CH-CH                               | Redução                    |
| Nis        | 1542-1593 para 1552-1586                              |                                     | Estreitamento              |
| Nis        | 1711                                                  | Carboxila do éter/ácido carboxílico | Redução                    |
| $\beta$ CD | 2928                                                  | C-H <sub>2</sub>                    | Aumento                    |
| Nis        | 2932                                                  | C-H <sub>2</sub>                    | Redução                    |
| Nis        | 2972                                                  | C-H                                 | Desaparecimento            |
| $\beta$ CD | 3144-3536 para 3173-3560                              |                                     | Estreitamento              |
| $\beta$ CD | 3370                                                  | O-H                                 | Aumento                    |
| Nis        | 3400                                                  | H ligado                            | Absorção máxima            |

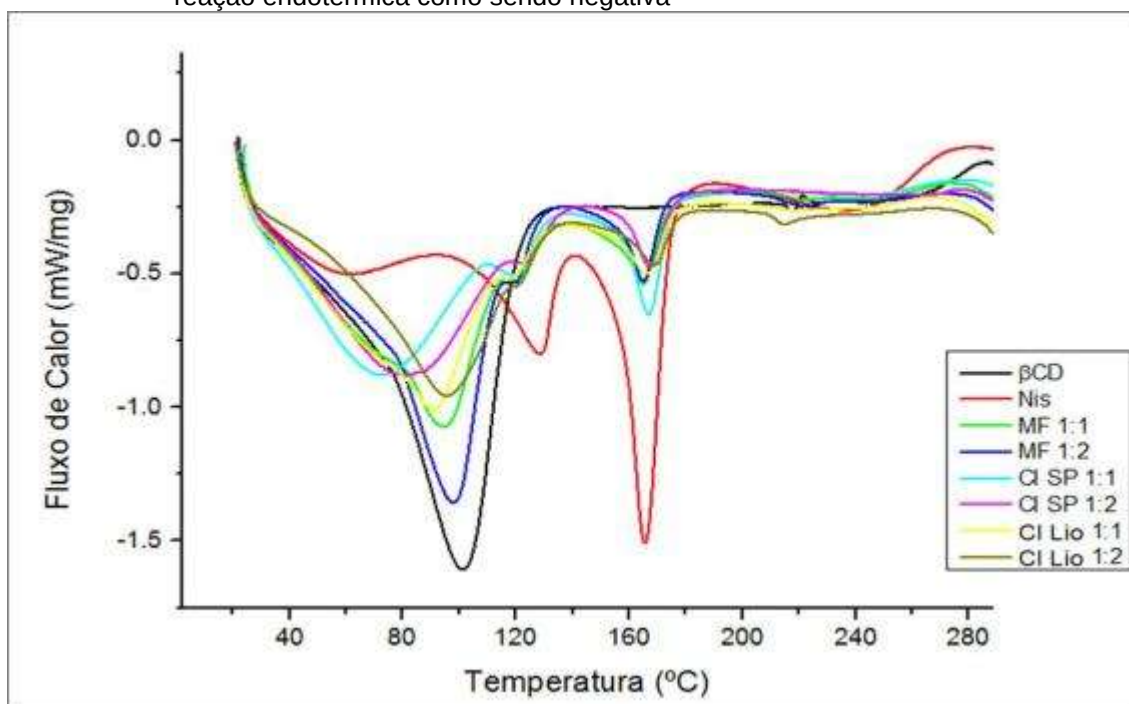
Fonte: A autora.

### 5.3.3 DSC

As análises térmicas são técnicas confiáveis que possibilitam a avaliação rápida e simples da complexação, a partir de alterações nas propriedades térmicas da molécula complexada. Quando ocorre inclusão, características como os pontos de fusão, ebulição e/ou degradação deslocam para uma temperatura diferente ou desaparecem (MENDONÇA et al., 2012).

Na Figura 19, estão apresentadas as curvas de DSC obtidas para a Nis e a  $\beta$ CD não complexadas e para os CI Nis: $\beta$ CD 1:1 e 1:2.

FIGURA 19 – Curvas de DSC das amostras de  $\beta$ CD, Nis, MF, CI SP e CI Lio, considerando a reação endotérmica como sendo negativa



Fonte: A autora.

O termograma da  $\beta$ CD apresentou pico endotérmico em 100°C associado à perda de água em sua cavidade interna (RIEKES et al., 2010) e outro entre 317°C – 330°C causado pela degradação térmica das CD. O termograma da Nis mostrou dois picos endotérmicos, sendo que o pico em 165°C corresponde ao seu ponto de fusão e o pico em 126°C corresponde ao seu ponto de fulgor.

Os termogramas dos CI mostraram uma redução na intensidade do pico correspondente ao ponto de fusão da Nis. Essa redução foi parcialmente dependente da quantidade molar da  $\beta$ CD em relação à da Nis; maior quantidade molar (1:2), maior redução da intensidade do pico, variando a entalpia desta reação de 30 mW/mg (Nis) para 13 mW/mg (MF e CI 1:2).

Além disso, houve também uma redução significativa do pico do ponto de fusão do fármaco para as MF, porém inferior à encontrada nos CI. Isto é um possível indicativo de início de complexação parcial já nas MF. Esse tipo de complexação foi evidenciado na literatura para o cilostazol complexado com a  $\beta$ CD (PATEL, RAJPUT, 2009).

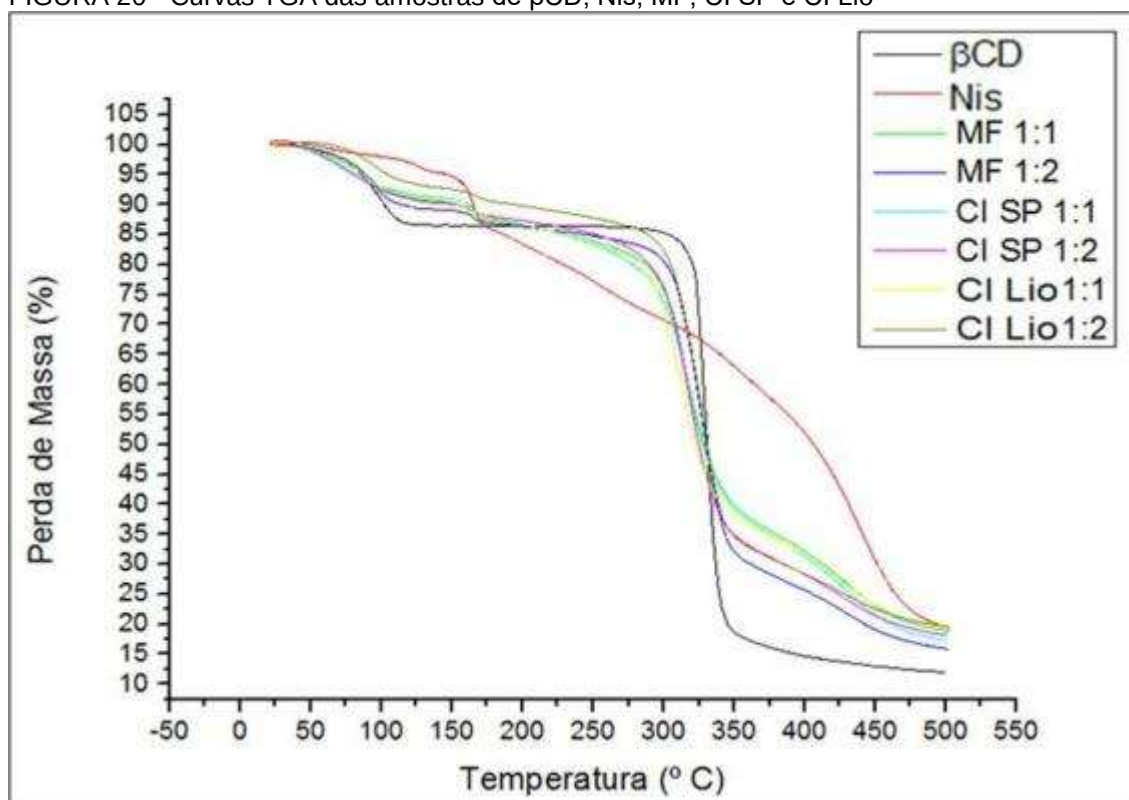
Os termogramas evidenciaram maior complexação pelo método de Lio, uma vez que foi onde se obteve as maiores reduções do ponto de fusão da Nis. Essas

modificações encontradas evidenciam que ocorreu formação parcial dos CI (PATEL, RAJPUT, 2009).

#### 5.3.4 TGA

Na Figura 20, estão representadas as curvas de termodecomposição da Nis e da  $\beta$ CD não complexadas e dos CI Nis: $\beta$ CD nas duas razões molares. Analisando a curva de TGA da Nis, observou-se uma perda de massa inicial de 5% em torno de 130°C, sugerindo a saída da água de hidratação da mesma (DENADAI et al., 2007). Em seguida, observou-se um perfil de termodecomposição caracterizado por vários eventos térmicos, evidenciados por picos em 150°C, 170°C, 340°C e 410°C observados na curva TGA.

FIGURA 20 - Curvas TGA das amostras de  $\beta$ CD, Nis, MF, CI SP e CI Lio



Fonte: A autora.

A curva TGA da  $\beta$ CD tem uma perda gradual de 13% de sua massa inicial desde os 62°C até 116°C. Essa massa se mantém constante até 297°C, onde ocorre um evento de degradação, e até 341°C, onde ocorre um novo evento de degradação de 79% de sua massa inicial.

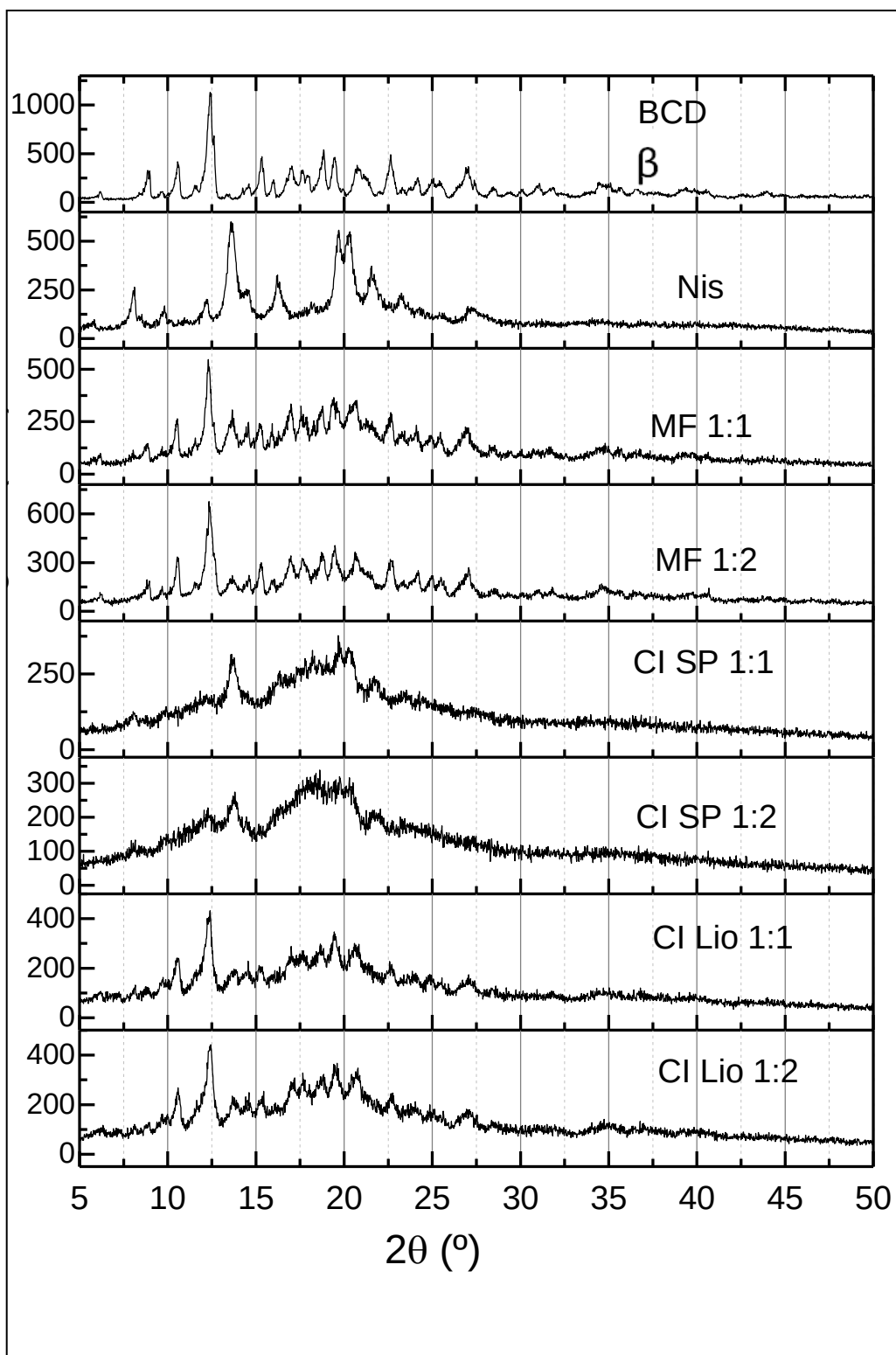
Nota-se que a curva TGA das MF começa a mostrar perda de massa inicial de 1% em torno de 51°C. De acordo com os resultados de Denadai et al. (2007), que realizaram a caracterização físico-química de MF, os resultados da análise térmica evidenciaram que não há formação de um CI puro. Na análise termogravimétrica, ocorre a perda de massa abrupta associada à termodecomposição completa da MF. Por volta de 287°C, ocorre a degradação restando 18% da massa inicial da MF.

Já nos CI Lio e SP, a perda inicial de massa é um pouco mais atenuada em comparação às MF, indicando que houve melhora na estabilidade do fármaco (RIEKES et al., 2010). A primeira alteração de massa ocorre em 74°C com 2% de perda. A degradação ocorre por volta dos 272°C com perda de 19% da massa total.

#### 5.3.5 DRX

A DRX determina a natureza cristalina de sólidos e é considerada uma das melhores técnicas para caracterização de CI (VEIGA, PECORELLI, RIBEIRO, 2006). No difratograma, haverá a formação de picos característicos dependendo da forma cristalina da molécula hóspede. A complexação será, portanto, avaliada de acordo com as alterações nos picos característicos da molécula hóspede e da CD com o CI. Um difratograma de um material amorfo (sem picos bem definidos) pode ser um indicativo de complexação (CORTI et al., 2007). Também é possível avaliar a formação de CI pela comparação do tamanho dos picos característicos da molécula hóspede com os picos nos difratogramas dos CI. A redução da altura dos picos pode significar uma complexação parcial devido ao fato do material complexado não permanecer na forma cristalina (PATEL et al., 2007).

Os difratogramas das amostras da Nis e da  $\beta$ CD não complexadas e dos CI Nis: $\beta$ CD 1:1 e 1:2 estão apresentados na Figura 21.

FIGURA 21 - Difratoogramas de raios X das amostras de CI Lio, CI SP, MF, Nis e  $\beta$ CD

Fonte: A autora.

Os dados mostraram que tanto a Nis como a  $\beta$ CD exibiram uma série de linhas finas e intensas, as quais indicam cristalinidade. Os difratogramas das MF representaram uma somatória das linhas espectrais de ambos os compostos presentes, sendo que a cristalinidade ainda foi observada.

A amostra do CI Nis: $\beta$ CD SP 1:1 apresentou em seu difratograma o achatamento de algumas das linhas espectrais da Nis em 8°, 9°, 12°, 14,5° e 16° e o desaparecimento do pico em 23° (2 $\theta$ ). Pelo mesmo método, entretanto, na molaridade 1:2, o difratograma apresentou-se mais amorfo com o achatamento de algumas linhas espectrais da Nis em 13°, 21° e 27° e o desaparecimento em 8°, 9°, 14°, 16°, 19°, 20° e 23° (2 $\theta$ ). Essa “amorfização” da banda espectral é associada à presença de ligações de hidrogênio estabelecidas entre fármaco e carreador. Quando ocorre essa “amorfização”, os fármacos exibem um aumento significativo na sua solubilidade em água e velocidade de dissolução (RIEKES et al., 2010).

Já pelo método Lio, os picos de difração se mantiveram sobre o halo amorfo nas duas razões molares testadas, isso pode ser relacionado à formação parcial de CI (PATEL, RAJPUT, 2009).

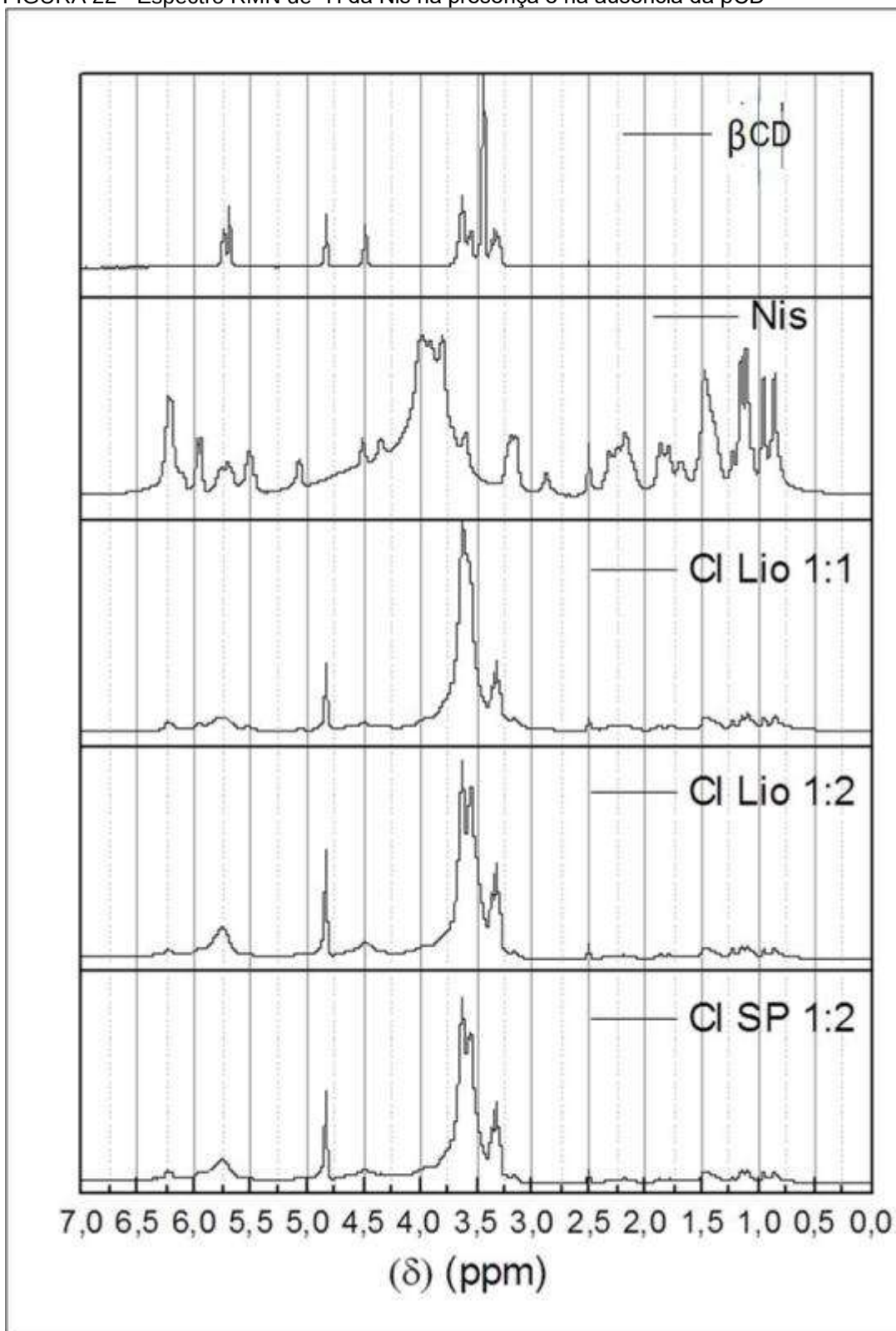
Estes resultados apresentados pela técnica de difração de raios X indicaram, portanto, a complexação da Nis com a  $\beta$ CD.

#### 5.3.6 RMN – $^1\text{H}$

A espectroscopia de RMN é uma das técnicas mais informativas para a avaliação de CI com CD, uma vez que fornece evidências diretas da formação dos CI. Isto porque a presença da molécula hóspede na cavidade da CD provoca alterações no ambiente químico dos prótons internos (H-3' e H-5') ou daqueles próximos ao interior da cavidade da CD (H-6'), mas não nos externos (H-1', H-2' e H-4') (PINTO et al., 2005; BARÃO, 2008). Alternativamente, se a associação entre as moléculas acontecer no exterior da estrutura toroidal, deverá ocorrer deslocamentos nos prótons externos (BARÃO, 2008). Além disso, a interação entre as moléculas pode provocar alterações no deslocamento químico dos prótons da molécula hóspede (BRATU, GAVIRA-VALLEJO, HERNANZ, 2005).

A Figura 22 mostra os espectros de RMN na região do  $^1\text{H}$  da Nis na presença e na ausência da  $\beta$ CD.

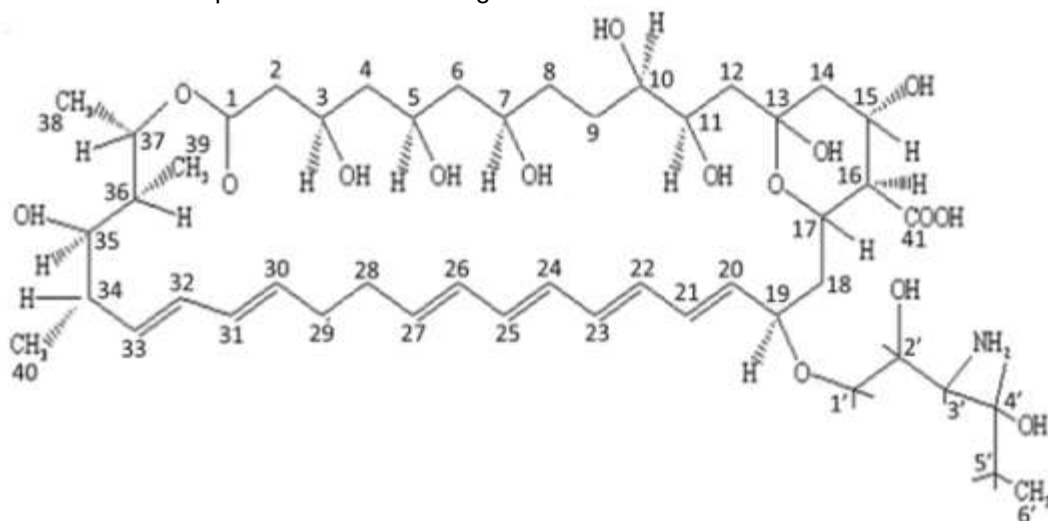


FIGURA 22 - Espectro RMN de  $^1\text{H}$  da Nis na presença e na ausência da  $\beta\text{CD}$ 

Fonte: A autora.

Para avaliar a interação entre a Nis (Figura 23) e a  $\beta$ CD (Figura 24), primeiramente, é preciso entender as moléculas dos dois componentes e associá-las aos resultados de  $^1\text{H}$  RMN (Figura 22 e Tabelas 4 e 5), conseguindo, assim, informações de como e onde ocorreu a complexação. As Figuras 23 e 24 apresentam as atribuições dos hidrogênios da Nis e da  $\beta$ CD, respectivamente, que apresentaram deslocamentos químicos nos espectros de RMN.

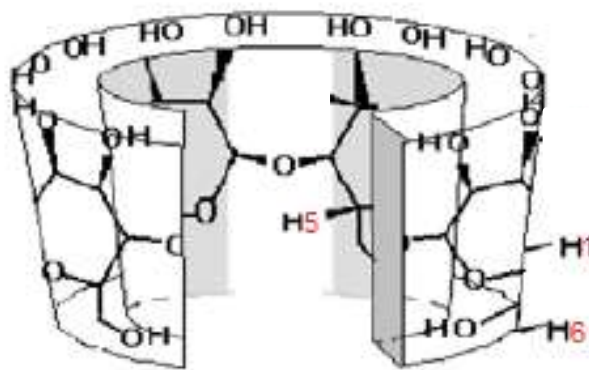
FIGURA 23 – Esquema ilustrativo da região onde houve deslocamento de sinais  $^1\text{H}$  na Nis



Fonte: A autora

FIGURA 24 – Esquema ilustrativo da região onde houve deslocamento de sinais  $^1\text{H}$  na  $\beta$ CD

## Hidroxila secundária



## Hidroxila primária

Fonte: Adaptado de: Denadai A. M. et al. Supramolecular self-assembly of  $\beta$ -cyclodextrin: an effective carrier of the antimicrobial agent chlorhexidine. **Carbohydr Res.**, Amsterdam, v. 342, n. 15, p. 2286-2296, May. 2007 (DENADAI et al., 2007).

As Tabelas 4 e 5 apresentam os deslocamentos químicos dos prótons das moléculas de Nis e  $\beta$ CD, respectivamente, nos diferentes métodos de complexação.

Tabela 4. Efeitos da  $\beta$ CD nos deslocamentos químicos do  $^1\text{H}$  RMN da Nis em DMSO- $d_6$

| Próton | $\delta \text{ } ^1\text{H}$ (ppm) | $\Delta\delta \text{ } ^1\text{H}$ (ppm) |               |               |
|--------|------------------------------------|------------------------------------------|---------------|---------------|
|        | Nis                                | CI Lio 1:1                               | CI Lio 1:2    | CI SP 1:2     |
| 2      | 2,1801                             | -0,0024                                  | -0,0099       | -0,0099       |
| 3      | 4,3510                             | 0,0119                                   | Ombro         | 0,0024        |
| 4      | 1,4813                             | 0,0113                                   | 0,0009        | 0,0018        |
| 6      | 1,2288                             | 0,0051                                   | 0,0018        | -0,0012       |
| 10     | 1,4813                             | 0,0113                                   | 0,0009        | 0,0018        |
| 14     | 1,1498                             | 0,0080                                   | 0,0051        | 0,0068        |
| 18     | 1,8034                             | 0,0134                                   | 0,0134        | 0,0134        |
| 19     | 3,7975                             | Desapareceu                              | Desapareceu   | Desapareceu   |
| 34     | 2,3242                             | 0,0005                                   | -0,0058       | <b>0,0242</b> |
| 35     | 3,1491                             | <b>-0,0205</b>                           | -0,0091       | -0,0063       |
| 36     | 1,8034                             | <b>0,0134</b>                            | <b>0,0134</b> | <b>0,0134</b> |
| 38     | 1,1498                             | 0,0080                                   | 0,0051        | 0,0068        |
| 39     | 1,0930                             | 0,0082                                   | 0,0061        | 0,0057        |
| 40     | 0,9595                             | 0,0109                                   | 0,0091        | 0,0080        |

Fonte: A autora.

TABELA 5 – Deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  da molécula de  $\beta$ CD nos diferentes métodos

| $^1\text{H}$ | $\delta \text{ } ^1\text{H}$ (ppm) | $\Delta\delta \text{ } ^1\text{H}$ (ppm) |               |                |
|--------------|------------------------------------|------------------------------------------|---------------|----------------|
|              | $\beta$ CD                         | CI Lio 1:1                               | CI Lio 1:2    | CI SP 1:2      |
| 1'           | 4,8272                             | -0,0016                                  | -0,0034       | <b>-0,0182</b> |
| 4'           | 3,3474                             | 0,0021                                   | -0,0004       | -0,0004        |
| 5'           | 3,5704                             | <b>-0,0056</b>                           | 0,0004        | 0,0004         |
| 6'           | 4,4864                             | *                                        | <b>0,3643</b> | *              |

Fonte: A autora.

Na Tabela 4, foram observados diversos deslocamentos químicos dos prótons da molécula de Nis na presença da  $\beta$ CD. Podem ser observados grandes deslocamentos químicos (em negrito) nos prótons H35 e H36 no CI Lio 1:1, H36 no CI Lio 1:2 e H34 e H36 no CI SP 1:2. Essa mudança drástica deste perfil de  $^1\text{H}$  RMN comprova a complexação (CORTÉS et al., 2001; BRATU, GAVIRA-VALLEJO, HERNANZ, 2005), sugerindo a formação de novas ligações de hidrogênio da Nis com a  $\beta$ CD nesta região da molécula do fármaco.

A Tabela 5 comprova os locais de complexação da Nis com a  $\beta$ CD. Para o CI SP 1:2, o maior deslocamento de sinal de  $^1\text{H}$  RMN foi no H1' correspondente à região externa da estrutura toroidal da  $\beta$ CD. No caso do CI Lio 1:2, a maior alteração foi no H6', hidrogênio externo, porém, próximo à região interna da hidroxila primária. Finalmente, o CI Lio 1:1 resultou no maior deslocamento químico no H5' que se encontra no interior da cavidade da  $\beta$ CD. Assim, é possível concluir que houve interação externa entre as moléculas para o CI SP 1:2 e a formação de complexos de inclusão entre as moléculas de Nis e  $\beta$ CD para os CI Lio 1:2 e CI Lio 1:1, sendo que a molécula de Nis encontrou-se mais internamente na cavidade da  $\beta$ CD no caso do CI Lio 1:1. Portanto, a primeira hipótese do estudo foi parcialmente aceita.

#### 5.4 TESTE DE LIBERAÇÃO IN VITRO

Para o estudo de liberação in vitro, foram selecionados os CI 1:1 obtidos pelos dois métodos de secagem Lio e SP por terem apresentado características que evidenciaram a formação de um CI mais amorfo observado nas análises em DSC e DRX, com maior estabilidade térmica evidenciado na análise TGA e mais puro devido à maior redução do ponto de fusão da Nis apresentado na análise em DSC. Além disso, a análise em RMN mostrou a inclusão da Nis no interior da cavidade da  $\beta$ CD para o CI 1:1 Lio.

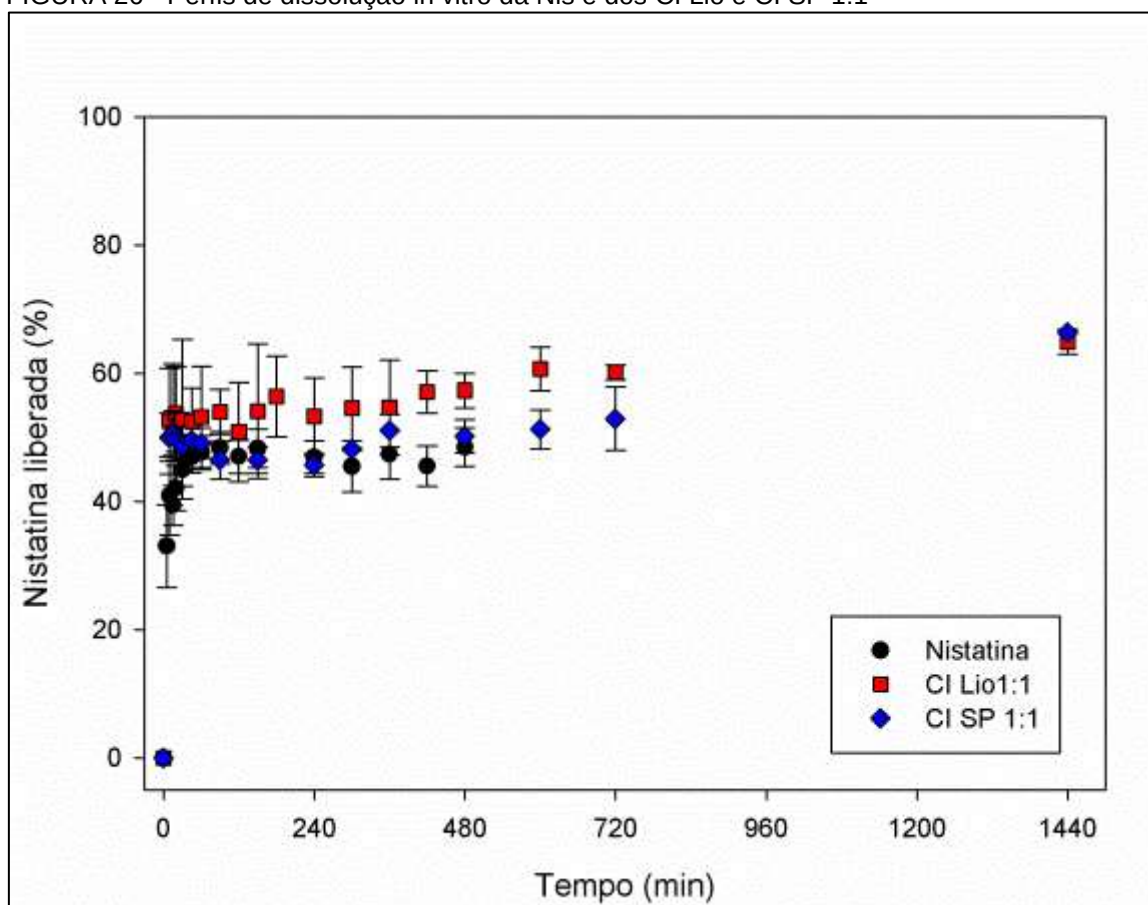
Diversos fatores relacionados ao fármaco e a sua formulação tornam o processo de absorção complexo e variável. Alguns fatores podem afetar a dissolução ou a biodisponibilidade do fármaco, tais como aqueles que afetam sua degradação, por exemplo (DOKOUMETZIDIS, MACHERAS, 2006). A importância do teste de dissolução para formas sólidas tem aumentado, uma vez que fornece informações úteis tanto para a pesquisa e o desenvolvimento quanto para a produção e o controle de qualidade de medicamentos. Os resultados deste teste,

portanto, auxiliam no desenvolvimento e avaliação de novas formulações, permitem verificar a estabilidade das formulações, possibilitam a avaliação da possível correlação in vivo/in vitro e fazem parte da documentação para registro de novos produtos junto às autoridades regulatórias (MARQUES, BROWN, 2002).

O teste de dissolução in vitro avalia a quantidade de fármaco dissolvido, em um volume de meio, durante determinado período de tempo à temperatura de  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , utilizando-se equipamento com dispositivo para promover agitação do meio a uma dada velocidade de agitação (USP, 2005). Para formulações de liberação imediata, a porcentagem dissolvida de fármaco é determinada, normalmente, após um único tempo de coleta. A avaliação da porcentagem dissolvida em vários tempos de coleta (perfil de dissolução) é, no entanto, mais conclusiva em relação à coleta em um único ponto (ADAMS et al., 2001; MARCOLONGO, 2002).

A Figura 25 apresenta os perfis de dissolução in vitro em água da Nis e dos CI Lio e SP 1:1. Quando da avaliação da dissolução do fármaco Nis, uma liberação de 45,33% foi obtida nos primeiros 90 min. O CI SP 1:1 demonstrou uma liberação de 50,08% em 15 min e o CI 1:1 Lio demonstrou uma liberação de 52,87% em 20 min. Portanto, a matriz oligossacarídea utilizada resultou em uma mecânica de liberação imediata do fármaco a partir dos CI. Ainda pode ser visualizado na Figura 26 que o perfil de liberação mais rápido foi o do CI 1:1 Lio em relação ao da Nis.

FIGURA 26 - Perfis de dissolução in vitro da Nis e dos CI Lio e CI SP 1:1



Fonte: A autora.

Considerando a Equação 3, os resultados de eficiência de dissolução foram analisados estatisticamente por meio de ANOVA 1-fator (“grupo experimental”) seguida pelo teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). O resultado da análise de variância pode ser observado na Tabela 6. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados de eficiência de dissolução da Nis e dos CI Lio e SP 1:1 ( $p=0,1931$ ). A Tabela 7 apresenta os resultados médios percentuais de eficiência de dissolução in vitro.

Tabela 6. ANOVA-1 fator para comparação entre os resultados de eficiência de dissolução

| Fonte de variação  | Graus de liberdade | Soma de quadrados | Quadrados médios | F     | p      |
|--------------------|--------------------|-------------------|------------------|-------|--------|
| Grupo experimental | 2                  | 72,64             | 36,32            | 2,552 | 0,1931 |
| Resíduo            | 4                  | 56,93             | 14,23            |       |        |
| Total              | 6                  | 129,6             |                  |       |        |

Fonte: A autora.

Tabela 7. Resultados médios (desvio padrão) percentuais de dissolução in vitro

| Nis         | CI Lio 1:1  | CI SP 1:1   |
|-------------|-------------|-------------|
| 46,3 (3,0)% | 47,8 (0,2)% | 53,9 (6,2)% |

Fonte: A autora.

Os modelos matemáticos, representados pelas Equações de 4 a 6, foram aplicados aos perfis de dissolução do fármaco e dos CI 1:1. Os resultados obtidos podem ser visualizados nas Tabelas 8 a 10.

Tabela 8. Modelagem matemática pela equação monoexponencial para a Nis e os CI 1:1 Lio e SP

| Material   | Modelo monoexponencial |        |        |
|------------|------------------------|--------|--------|
|            | MSC                    | R      | K      |
| Nis        | -1,8716                | 0,3589 | 0,0023 |
| CI 1:1 Lio | -2,0924                | 0,3365 | 0,0028 |
| CI 1:1 SP  | -1,9815                | 0,3297 | 0,0019 |

Fonte: A autora.

Tabela 9. Modelagem matemática pela equação ordem zero para a Nis e os CI 1:1 Lio e SP

| Material   | Modelo ordem zero |        |        |
|------------|-------------------|--------|--------|
|            | MSC               | R      | K      |
| Nis        | -2,0411           | 0,3075 | 0,1363 |
| CI 1:1 Lio | -2,4775           | 0,3018 | 0,0779 |
| CI 1:1 SP  | -2,2632           | 0,3695 | 0,0720 |

Fonte: A autora.

Tabela 10. Modelagem matemática pela equação biexponencial para a Nis e os CI 1:1 Lio e SP

| Material   | Modelo biexponencial |        |        |                               |        |                              |
|------------|----------------------|--------|--------|-------------------------------|--------|------------------------------|
|            | MSC                  | R      | A      | $\alpha$ (min <sup>-1</sup> ) | B      | $\beta$ (min <sup>-1</sup> ) |
| Nis        | 2,6949               | 0,9786 | 0,5838 | 1,2528                        | 0,4106 | 0,2006                       |
| CI 1:1 Lio | 2,5829               | 0,9743 | 0,4842 | 0,0001                        | 0,5157 | 2,1940                       |
| CI 1:1 SP  | 1,2882               | 0,9028 | 0,5459 | 0,0001                        | 0,4540 | 2,9379                       |

Fonte: A autora.

A seleção do melhor modelo foi empregada, considerando os dados obtidos para o coeficiente de correlação (R) e para o critério de seleção do modelo (MSC). Deste modo, foi analisada a coerência dos valores encontrados para as constantes

cinéticas de liberação e o ajuste gráfico verificado para cada equação. Os perfis de liberação da Nis e dos complexos testados revelaram um melhor ajuste dos dados experimentais para o modelo biexponencial (Tabela 10) em relação aos outros modelos testados. Assim, foi possível estabelecer que no comportamento de liberação do fármaco a partir de ambos os CI (CI Lio e CI SP 1:1), a Nis que se encontra dissociada da  $\beta$ CD sofre inicialmente uma liberação rápida ( $\alpha$ ; constante cinética da etapa rápida de liberação – efeito *burst*), enquanto que a Nis associada à  $\beta$ CD apresenta uma liberação mais lenta ( $\beta$ ; constante cinética da etapa lenta de liberação) (MELO et al., 2007).

Os resultados obtidos no teste de dissolução confirmam a segunda hipótese do estudo, uma vez que os CI Nis: $\beta$ CD por Lio e SP 1:1 prolongaram a liberação da Nis sem, no entanto, alterar sua cinética de liberação biexponencial. Os CI 1:1 apresentaram mecânica de liberação imediata da Nis. Além disso, o CI Lio 1:1 apresentou um perfil mais rápido de dissolução *in vitro*. Isto pode resultar em estratégias interessantes para o desenvolvimento de formas farmacêuticas que possibilitem uma liberação rápida inicial, atingindo rapidamente os níveis terapêuticos, e modificada do tipo controlada (PENG et al., 2010) até o final do tratamento da estomatite protética, quando incorporadas ao material macio para prótese dentária. Com isso, a baixa biodisponibilidade da Nis pode ser parcialmente melhorada com a complexação com a  $\beta$ CD, prolongando, assim, sua meia vida *in vivo*.



## 6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos pelas técnicas de caracterização físico-químicas avaliadas, pôde ser concluído que o fármaco nistatina foi complexado parcialmente com o oligossacarídeo  $\beta$ -ciclodextrina em todas as condições experimentais testadas, proporções molares (1:1 e 1:2) e métodos de obtenção e secagem de complexos de inclusão (mistura física, liofilização e *spray drying*). Entretanto, os melhores resultados nesta etapa foram verificados para os complexos 1:1 obtidos por liofilização ou *spray drying*.

O complexo de inclusão nistatina: $\beta$ -ciclodextrina obtido por liofilização na proporção molar 1:1 apresentou um perfil de liberação mais rápido que o fármaco não complexado e cinética de liberação biexponencial, o que pode resultar em estratégias interessantes para o desenvolvimento de formas farmacêuticas que possibilitem uma liberação controlada do fármaco quando incorporadas ao material macio para reembasamento de prótese dentária removível.

## REFERÊNCIAS

ADAMS, E. et al. Application of linear mixed effects models to the evaluation of dissolution profiles. **Int J Pharm**, v. 226, n. 1-2, p. 107-125, Sep 11. 2001.

AKPAN, A.; MORGAN, R. Oral candidiasis. **Postgrad Med J**, London, v. 78, n. 922, p. 455-459, Aug. 2002.

ALOMRANI, A. H. et al. Itraconazole-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin loaded deformable liposomes: in vitro skin penetration studies and antifungal efficacy using *Candida albicans* as model. **Colloids Surf B Biointerfaces**, Amsterdam, v. 121, n. p. 74-81, Sep. 2014.

ALSARRA, I. A. et al. Comparative study of itraconazole-cyclodextrin inclusion complex and its commercial product. **Arch Pharm Res**, Seoul, v. 33, n. 7, p. 1009-1017, Jul. 2010.

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

ANDRIOLE, V. T. Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal therapy. **Int J Antimicrob Agents**, Amsterdam, v. 16, n. 3, p. 317-321, Nov. 2000.

ARIKAN, S.; REX, J. H. Nystatin LF (Aronex/Abbott). **Curr Opin Investig Drugs**, London, v. 2, n. 4, p. 488-495, Apr. 2001.

BAENA-MONROY, T. et al. *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* colonization in patients wearing dental prosthesis. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, Valencia, v. 10, n. Suppl 1, p. E27-39, Apr. 2005.

BAGINSKI, M.; CZUB, J. Amphotericin B and its new derivatives - mode of action. **Curr Drug Metab**, Hilversum, v. 10, n. 5, p. 459-469, Jun. 2009.

BALAKRISHNAN, P. et al. Inclusion complex effect on the bioavailability of clotrimazole from poloxamer-based solid suppository. **Arch Pharm Res**, Seoul, v. 35, n. 7, p. 1169-1175, Jul. 2012.

BALTE, A. S.; GOYAL, P. K.; GEJJI, S. P. Theoretical studies on the encapsulation of paracetamol in the  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ -cyclodextrins. **J Chem Pharm Res**, Pune, v. 4, n. 5, p. 2391-2399, Jun. 2012.

BANTING, D. W.; GREENHORN, P. A.; MCMINN, J. G. Effectiveness of a topical antifungal regimen for the treatment of oral candidiasis in older, chronically ill, institutionalized, adults. **J Can Dent Assoc**, Ottawa, v. 61, n. 3, p. 199-200, 203-195, Mar. 1995.

BANTING, D. W.; HILL, S. A. Microwave disinfection of dentures for the treatment of oral candidiasis. **Spec Care Dentist**, Chicago, v. 21, n. 1, p. 4-8, 2001.

BARÃO, C. E. **Inclusão molecular da oleuropeína e do butil hidroxianisol (BHA) em alfa e beta-ciclodextrina**. 2008, 123 f. Mestrado (Engenharia Química) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2008.

BARBEAU, J. et al. Reassessing the presence of *Candida albicans* in denture-related stomatitis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, St. Louis, v. 95, n. 1, p. 51-59, Jan. 2003.

BARILLARO, V. et al. Theoretical and experimental investigations on miconazole/cyclodextrin/acid complexes: molecular modeling studies. **Int J Pharm**, Amsterdam, v. 342, n. 1-2, p. 152-160, Sep. 2007.

BERTOLINI, A. C.; CEREDA, M. P.; CHUZEL, G. Fécula e farelo de mandioca como substrato na produção de ciclodextrinas. **Ciênc Tecnol Aliment**, Campinas, v. 18, n. 2, p. 224-229, mai/jul. 1998.

BRATU, I.; GAVIRA-VALLEJO, J. M.; HERNANZ, A.  $^1\text{H}$ -NMR study of the inclusion processes for  $\alpha$ - and  $\gamma$ -cyclodextrin with fenbuten. **Biopolymers**, v. 77, n. 6, p. 361-367, Apr. 2005.

BRAYFIELD, A. **Martindale: the complete drug reference**. ed. London: Pharmaceutical Press, 1999. 386 p.

BREWSTER, M. E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 59, n. p. 645-666, 2007.

BROW, C. K. et al. Acceptable analytical practices for dissolution testing of poorly soluble compounds. **Pharm Technol**, v. 28, n. 12, p. 58-65, Dec. 2004.

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

BUDTZ-JORGENSEN, E.; BERTRAM, U. Denture stomatitis. I. The etiology in relation to trauma and infection. **Acta Odontol Scand**, London, v. 28, n. 1, p. 71-92, Mar. 1970.

BUENO, M. et al. Effect of antimicrobial agents incorporated into resilient denture relines on the *Candida albicans* biofilm. **Oral Dis**, Copenhagen, v. 21, n. 1, p. 57-65, Jan. 2015.

CABRAL-MARQUES, H.; ALMEIDA, R. Optimisation of spray-drying process variables for dry powder inhalation (DPI) formulations of corticosteroid/cyclodextrin inclusion complexes. **Eur J Pharm Biopharm**, Amsterdam, v. 73, n. 1, p. 121-129, Sep. 2009.

CALDERONE, R. A.; FONZI, W. A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends Microbiol**, Cambridge, v. 9, n. 7, p. 327-335, Jul. 2001.

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

CARTER, G. M.; KERR, M. A.; SHEPHERD, M. G. The rational management of oral candidosis associated with dentures. **N Z Dent J**, Dunedin, v. 82, n. 369, p. 81-84, Jul. 1986.

CEVHER, E. et al. Bioadhesive tablets containing cyclodextrin complex of itraconazole for the treatment of vaginal candidiasis. **Int J Biol Macromol**, Amsterdam, v. 69, n. p. 124-136, Aug. 2014.

CEVHER, E. et al. Preparation and characterisation of natamycin: gamma-cyclodextrin inclusion complex and its evaluation in vaginal mucoadhesive formulations. **J Pharm Sci**, New York, v. 97, n. 10, p. 4319-4335, Oct. 2008.

CHANDRA, J. et al. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **J Bacteriol**, Washington, v. 183, n. 18, p. 5385-5394, Sep. 2001a.

CHANDRA, J. et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. **J Dent Res**, Thousand Oaks, v. 80, n. 3, p. 903-908, Mar. 2001b.

CHOI, Y. H. et al. Pharmacokinetic interaction between itraconazole and metformin in rats: competitive inhibition of metabolism of each drug by each other via hepatic and intestinal CYP3A1/2. **Br J Pharmacol**, London, v. 161, n. 4, p. 815-829, 2010.

COELHO, C. M.; SOUSA, Y. T.; DARE, A. M. Denture-related oral mucosal lesions in a Brazilian school of dentistry. **J Oral Rehabil**, Oxford, v. 31, n. 2, p. 135-139, Feb. 2004.

CONTI, H. R. et al. Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. **J Exp Med**, New York, v. 206, n. 2, p. 299-311, Feb 16. 2009.

CORCIOVA, A. et al. Influence of hydroxypropyl-beta-cyclodextrin on the physicochemical and biological characteristics of a flavone with important pharmacological properties. **Environ Eng Manag J**, v. 14, n. 2, p. 311-319, Feb. 2015.

CORTÉS, M. E. et al. The chlorhexidine:β-cyclodextrin inclusion compound: preparation, characterization and microbiological evaluation. **J Inklus Phenom Macrocyc Chem**, v. 40, n. 4, p. 297-302, Aug. 2001.

CORTI, G. et al. Physical-chemical characterization of binary systems of metformin hydrochloride with triacetyl-b.cyclodextrin. **J Pharm Biomed Anal**, v. 45, n. p. 480-486, 2007.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, Washington, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, May 21. 1999.

CUNHA-FILHO, M. S. S.; SÁ-BARRETO, L. C. L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. **Rev Ciênc Farm Basica Apl**, v. 28, n. 1, p. 1-9, 2007.

D'ENFERT, C. Biofilms and their role in the resistance of pathogenic Candida to antifungal agents. **Curr Drug Targets**, Hilversum, v. 7, n. 4, p. 465-470, 2006.

DE REPENTIGNY, L.; LEWANDOWSKI, D.; JOLICOEUR, P. Immunopathogenesis of oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus infection. **Clin Microbiol Rev**, Washington, v. 17, n. 4, p. 729-759, table of contents, Oct. 2004.

DELL VALLE, M. Cyclodextrin and their uses: a review. **Proc Biochem**, v. 39, n. p. 1033-1046, 2004.

DENADAI, A. M. et al. Supramolecular self-assembly of β-cyclodextrin: an effective carrier of the antimicrobial agent chlorhexidine. **Carbohydr Res.**, Amsterdam, v. 342, n. 15, p. 2286-2296, May. 2007.

DIMOPOULOS, G. et al. Candidemia in immunocompromised and immunocompetent critically ill patients: a prospective comparative study. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, Berlin, v. 26, n. 6, p. 377-384, Jun. 2007.

DOKOUMETZIDIS, A.; MACHERAS, P. A century of dissolution research: from Noyes and Whitney to the biopharmaceutics classification system. **Int J Pharm**, v. 321, n. 1-2, p. 1-11, Sep 14. 2006.

DOUGLAS, W. H.; CLARKE, D. A. Physical and mechanical properties of nystatin-containing denture liners. **J Prosthet Dent**, St. Louis, v. 34, n. 4, p. 428-434, Oct. 1975.

DUCHÊNE, D.; WOUESSIDJEWE, D. Physicochemical characteristics and pharmaceutical uses of cyclodextrin derivatives, part I. **Pharm Technol**, v. 6, n. p. 26-34, 1990.

FARAGO, P. V. et al. Sistema reticulado constituído por poli(álcool vinílico),  $\beta$ -ciclodextrina e glutaraldeído na microencapsulação do cloridrato de metformina. In: 9º Congresso Brasileiro de Polímeros, 2007, Campina Grande. **Anais**. Campina Grande, 2007.

FRÖMMING, K. L.; SZEJTLI, J. **Cyclodextrins in pharmacy**. ed. Dordrecht: Klumer Academic Publishers, 1993. 225 p.

GALITESI, L. L. et al. Resistência à tração de reembasador temporário modificado com antimicrobianos. In: 25º Congresso Odontológico de Bauru, 2012, Bauru. **Resumos**. Bauru: 2012. p.

GAVRILIN, M. V.; PODLUZHNYA, A. V. Poly(ethylene oxide)-based nystatin ointment. **Pharm Chem J**, v. 36, n. 3, p. 159-161, Mar. 2002.

GEERTS, G. A.; STUHLINGER, M. E.; BASSON, N. J. Effect of an antifungal denture liner on the saliva yeast count in patients with denture stomatitis: a pilot study. **J Oral Rehabil**, Oxford, v. 35, n. 9, p. 664-669, Sep. 2008.

GOLDMAN, G. H. et al. Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in candida albicans clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. **Diagn Microbiol Infect Dis**, New York, v. 50, n. 1, p. 25-32, Sep. 2004.

GUNDERSON, S. M. et al. In vitro pharmacodynamic characteristics of nystatin including time-kill and postantifungal effect. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v. 44, n. 10, p. 2887-2890, Oct. 2000.

HAC-WYDRO, K.; DYNAROWICZ-LATKA, P. Interaction between nystatin and natural membrane lipids in Langmuir monolayers--the role of a phospholipid in the mechanism of polyenes mode of action. **Biophys Chem**, Amsterdam, v. 123, n. 2-3, p. 154-161, 2006.

HBAIEB, S.; KALFAT, R.; CHEVALIER, Y. Loading antifungal drugs onto silica particles grafted with cyclodextrins by means of inclusion complex formation at the solid surface. **Int J Pharm**, Amsterdam, v. 439, n. 1-2, p. 234-245, Dec 15. 2012.

HIGUCHI, T.; CONNORS, K. A. Phase-solubility techniques. **Adv Anal Chem Instr**, v. 4, n. p. 117-122, 1965.

HOPPE, J. E. Treatment of oropharyngeal candidiasis in immunocompetent infants: a randomized multicenter study of miconazole gel vs. nystatin suspension. The Antifungals Study Group. **Pediatr Infect Dis J**, Baltimore, v. 16, n. 3, p. 288-293, Mar. 1997.

JACOBSEN, I. D. et al. Candida albicans dimorphism as a therapeutic target. **Expert Rev Anti Infect Ther**, Oxford, v. 10, n. 1, p. 85-93, Jan. 2012.



JOHNSON, C. C. et al. Development of a contemporary animal model of *Candida albicans*-associated denture stomatitis using a novel intraoral denture system. **Infect Immun**, Washington, v. 80, n. 5, p. 1736-1743, May. 2012.

KHAN, A. R. et al. Methods for Selective Modifications of Cyclodextrins. **Chem Rev**, v. 98, n. 5, p. 1977-1996, Jul. 1998.

KOVACIC, P.; COOKSY, A. Novel, unifying mechanism for amphotericin B and other polyene drugs: electron affinity, radicals, electron transfer, autoxidation, toxicity, and antifungal action. **Med Chem Commun**, v. 3, n. p. 274-280, 2012.

KRCMERY, V.; BARNES, A. J. Non-*albicans* *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. **J Hosp Infect**, London, v. 50, n. 4, p. 243-260, Apr. 2002.

LEIGH, J. E. et al. Salivary cytokine profiles in the immunocompetent individual with *Candida*-associated denture stomatitis. **Oral Microbiol Immunol**, Copenhagen, v. 17, n. 5, p. 311-314, Oct. 2002.

LIMA, J. F. M. et al. Effect of the incorporation of antifungal agents on the water sorption and solubility of temporary soft materials for denture base relining. **J Prosthet Dent**, v. n. p. 2016.

LLABOT, J. M.; MANZO, R. H.; ALLEMANDI, D. A. Novel mucoadhesive extended release tablets for treatment of oral candidosis: "in vivo" evaluation of the biopharmaceutical performance. **J Pharm Sci**, New York, v. 98, n. 5, p. 1871-1876, May. 2009.

LLABOT, J. M. et al. Design of novel antifungal mucoadhesive films. Part II. Formulation and in vitro biopharmaceutical evaluation. **Int J Pharm**, Amsterdam, v. 336, n. 2, p. 263-268, May 24. 2007.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M. E. Pharmaceutical applications of cyclodextrin I. Drug solubilization and stabilization. **J Pharm Sci**, Hoboken, v. 85, n. 10, p. 1017-1025, 1996.

LOFTSSON, T.; HREINSDOTTIR, D.; MASSON, M. Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs. **Int J Pharm**, v. 302, n. 1-2, p. 18-28, Sep. 2005.

LOMBARDI, T.; BUDTZ-JORGENSEN, E. Treatment of denture-induced stomatitis: a review. **Eur J Prosthodont Restor Dent**, Mumbai, v. 2, n. 1, p. 17-22, Sep. 1993.

LYRA, M. A. M. et al. Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina. **Rev Cienc Farmac Bas Apl**, v. 31, n. p. 117-124, 2010.

MAH, T. F.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends Microbiol**, Cambridge, v. 9, n. 1, p. 34-39, Jan. 2001.

MARCOLONGO, R. **Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica**. 2002, 117 f. Mestrado (Fármaco e Medicamentos) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

MARQUES, M. R. C.; BROWN, E. Desenvolvimento e validação de métodos de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais. **Rev Anal**, v. 1, n. p. 48-51, 2002.

MATHABA, L. T.; DAVIES, G.; WARMINGTON, J. R. The genotypic relationship of *Candida albicans* strains isolated from the oral cavity of patients with denture stomatitis. **J Med Microbiol**, Reading, v. 42, n. 5, p. 372-379, May. 1995.

MATIOLI, G. **Ciclodextrinas e suas aplicações: alimentos, fármacos, cosméticos, agricultura, biotecnologia, química analítica e produtos gerais**. ed. Maringá: EdUEM, 2000. 124 p.

MCMULLAN-VOGEL, C. G. et al. Serotype distribution and secretory acid proteinase activity of *Candida albicans* isolated from the oral mucosa of patients with denture stomatitis. **Oral Microbiol Immunol**, v. 14, n. 3, p. 183-189, Jun. 1999.

MCNAUGHT, A. D.; WILKINSON, A. **IUPAC. Compendium of chemical terminology**. ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1997. p.

MEIRELLES, L. M. A. **Incremento de solubilidade do fármaco rifampicina por complexo de inclusão e dispersão sólida**. 2012, 80 f. Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2012.

MELO, N. F. S. et al. Preparação e caracterização inicial de complexo de inclusão entre nitrofurazona e 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v. 28, n. 1, p. 35-44, 2007.

MENDONÇA, E. A. M. et al. Enhanced antiproliferative activity of the new anticancer candidate LPSF/AC04 in cyclodextrin inclusion complexes encapsulated into liposomes. **AAPS PharmSciTech**, v. 13, n. 14, p. 1355-1366, 2012.

MIYAKE, K. et al. Characterization of itraconazole/2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin inclusion complex in aqueous propylene glycol solution. **Int J Pharm**, Amsterdam, v. 179, n. 2, p. 237-245, Mar 15. 1999.

NEPPELENBROEK, K. H. et al. Incorporation of fungal MICs on roughness of denture liners. In: IADR 90th General Session, 2012, Foz do Iguaçu. **Resumos**. Foz do Iguaçu: 2012. p.

NEPPELENBROEK, K. H. et al. Porosity of temporary denture soft liners containing antifungal agents. In: 93rd General Session & Exhibition of the IADR, 2015, Cape Town. **Resumos**. Cape Town: 2015. p.

NEPPELENBROEK, K. H. et al. Effectiveness of microwave disinfection of complete dentures on the treatment of Candida-related denture stomatitis. **J Oral Rehabil**, Oxford, v. 35, n. 11, p. 836-846, Nov. 2008.

NEWTON, A. V. Denture sore mouth as possible etiology. **Br Dent J**, London, v. 1, n. p. 357-360, 1962.

NIKAWA, H. et al. Antifungal effect of zeolite-incorporated tissue conditioner against Candida albicans growth and/or acid production. **J Oral Rehabil**, Oxford, v. 24, n. 5, p. 350-357, May. 1997.

PAPPAS, P. G. et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis**, Oxford, v. 48, n. 5, p. 503-535, Mar 1. 2009.

PATEL, H. M. et al. Preparation and characterization of etoricoxib-b-cyclodextrin complexes prepared by the kneading method. **Acta Pharm**, v. 57, n. p. 351-359, 2007.

PATEL, S. G.; RAJPUT, S. J. Enhancement of oral bioavailability of cilostazol by forming its inclusion complexes. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, n. 2, p. 660-669, Jun. 2009.

PENG, H. et al. Vanilla cross-linked chitosan micropheres for controlled release of resveratrol. **Food Chem**, v. 121, n. p. 23-28, Nov. 2010.

PEREZOUS, L. F. et al. Colonization of Candida species in denture wearers with emphasis on HIV infection: a literature review. **J Prosthet Dent**, St. Louis, v. 93, n. 3, p. 288-293, Mar. 2005.

PILCER, G.; VANDERBIST, F.; AMIGHI, K. Preparation and characterization of spray-dried tobramycin powders containing nanoparticles for pulmonary delivery. **Int J Pharm**, v. 365, n. 1-2, p. 162-169, Jan. 2009.

PINTO, L. M. A. et al. Physico-chemical characterization of benzocaine- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes. **J Pharm Biomed Anal**, v. 39, n. p. 956-963, 2005.

PONS, V. et al. Oropharyngeal candidiasis in patients with AIDS: randomized comparison of fluconazole versus nystatin oral suspensions. **Clin Infect Dis**, Oxford, v. 24, n. 6, p. 1204-1207, Jun. 1997.

RAMA, A. C. R. et al. 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. **Rev Bras Cienc Farm**, São Paulo, v. 41, n. 3, p. 281-299, July/Sept. 2005.

RAMAGE, G. et al. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. **Rev Iberoam Micol**, v. 18, n. 4, p. 163-170, Dec. 2001.

RIEKES, M. K. et al. Enhanced solubility and dissolution rate of amiodarone by complexation with  $\beta$ -cyclodextrin through different methods. **Mat Sci Engineering C**, v. n. p. 1008-1013, 2010.

RODRIGUEZ-ARCHILLA, A. et al. Denture stomatitis: quantification of interleukin-2 production by mononuclear blood cells cultured with *Candida albicans*. **J Prosthet Dent**, St. Louis, v. 75, n. 4, p. 426-431, Apr. 1996.

ROGERS, T. R. Antifungal drug resistance: does it matter? **Int J Infect Dis**, Hamilton, v. 6, n. 1, p. S47-53, Mar. 2002.

RUSA, C. C.; LUCA, C.; TONELLI, A. E. Polymer-cyclodextrin inclusion compounds: toward new aspects of their inclusion mechanism. **Macromolecules**, v. 34, n. 5, p. 1318-1322, Jan. 2001.

SAKEER, K. et al. Enhancement of dissolution of nystatin from buccoadhesive tablets containing various surfactants and a solid dispersion formulation. **Arch Pharm Res**, Seoul, v. 33, n. 11, p. 1771-1779, Nov. 2010.

SALERNO, C. et al. Candida-associated denture stomatitis. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 16, n. 2, p. e139-143, Mar. 2011.

SÁNCHEZ-ALIAGA, A. et al. Peel bond strength of soft lining with antifungal to a denture base acrylic resin. **Dent Mater J**, Tokyo, v. 35, n. 2, p. 194-203, 2016.

SATO, M. et al. Growth inhibition of oral bacteria related to denture stomatitis by anti-candidal chalcones. **Aust Dent J**, Sydney, v. 42, n. 5, p. 343-346, Oct. 1997.

SCHARDINGER, F. Thermophile bakterien aus verschiedenen nahrungsmitteln und Milch und die gebildeten produkte, wenn diese bakterien in nahrolosungen kultiviert warden, die kohlenhydrate enthalten. **Z. Untersuch. Nahr. Genussm.**, v. 6, n. p. 865-880, 1903.

SCHNEID, T. R. An in vitro analysis of a sustained release system for the treatment of denture stomatitis. **Spec Care Dentist**, Chicago, v. 12, n. 6, p. 245-250, Nov-Dec. 1992.

SCULLY, C. **Atlas de diagnóstico bucal**. ed. São Paulo: Editora Santos, 1992. 48 p.

SILVA, L. et al. Nystatin-induced lipid vesicles permeabilization is strongly dependent on sterol structure. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, v. 1758, n. 4, p. 452-459, 2006.

SINGH, K. et al. Study of the effect of surface treatment on the long term effectiveness of tissue conditioner. **J Oral Sci**, Tokyo, v. 52, n. 2, p. 261-265, Jun. 2010.

SMITH, A. J. et al. Staphylococcus aureus in the oral cavity: a three-year retrospective analysis of clinical laboratory data. **Br Dent J**, London, v. 195, n. 12, p. 701-703; discussion 694, Dec 20. 2003.

STEGEMANNA, S. et al. When poor solubility becomes an issue: from early stage to proof of concept european. **J Pharm Sci**, v. 31, n. p. 249-261, 2007.

SUDBERY, P.; GOW, N.; BERMAN, J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. **Trends Microbiol**, Cambridge, v. 12, n. 7, p. 317-324, Jul. 2004.

SZEJTLI, J. Cyclodextrin complexed generic drugs are generally not bio-equivalent with the reference products: therefore the increase in number of marketed drug/cyclodextrin formulations is so slow. **J Incl Phenom Macrocycl Chem**, v. 52, n. p. 1-11, 2005.

SZEJTLI, J. Past, present, and future of cyclodextrin research. **Pure Appl Chem**, v. 76, n. 10, p. 1825-1845, 2004.

TALLURY, P. et al. Effects of solubilizing surfactants and loading of antiviral, antimicrobial, and antifungal drugs on their release rates from ethylene vinyl acetate copolymer. **Dent Mater**, Kidlington, v. 23, n. 8, p. 977-982, Aug. 2007.

TAVARES, W. **Manual de antibiótico e quimioterápicos antiinfeciosos**. ed. São Paulo: Atheneu, 2001. 792 p.

TORRES, S. R. et al. Relationship between salivary flow rates and *Candida* counts in subjects with xerostomia. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, St. Louis, v. 93, n. 2, p. 149-154, Feb. 2002.

TRUHLAR, M. R.; SHAY, K.; SOHNLE, P. Use of a new assay technique for quantification of antifungal activity of nystatin incorporated in denture liners. **J Prosthet Dent**, St. Louis, v. 71, n. 5, p. 517-524, May. 1994.

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

UEKAMA, K.; HIRAYAMA, F.; IRIE, T. Cyclodextrin drug carrier systems. **Chem Rev**, Washington, v. 98, n. 5, p. 2045-2076, Jul. 1998.

URBAN, V. M. et al. Effect of the association of nystatin with a tissue conditioner on its ultimate tensile strength. **J Prosthodont**, Hoboken, v. 15, n. 5, p. 295-299, Sep-Oct. 2006.

USP. **United States Pharmacopeia**. 29 ed. Rockvielle: United States Pharmacopeial Convention, 2005. p.

VAN DOORNE, H.; BOSCH, E. H. Stability and in vitro activity of nystatin and its  $\gamma$ -cyclodextrin complex against *Candida albicans*. **Int J Pharm**, v. 73, n. p. 43-49, 1991.

VEIGA, F.; PECORELLI, C.; RIBEIRO, L. **As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica**. ed. Coimbra: Editora Minerva, 2006. 228 p.

VILLIERS, A. Sur la fermentation de la fécule par l'action du ferment butyrique. **C R Hebd Sesances Acad Sci**, Paris, v. 112, n. p. 536-538, 1891.

WHITE, T. C.; MARR, K. A.; BOWDEN, R. A. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. **Clin Microbiol Rev**, Washington, v. 11, n. 2, p. 382-402, Apr. 1998.

WILLIS, A. M. et al. The influence of antifungal drugs on virulence properties of *Candida albicans* in patients with diabetes mellitus. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, St. Louis, v. 91, n. 3, p. 317-321, Mar. 2001.

YANG, H. et al. A thermodynamic study of the cyclodextrin-UC781 inclusion complex using a HPLC method. **J Incl Phenom Macrocycl Chem**, Boston, v. 72, n. 3-4, p. 459-465, Apr. 2012.

ZANG, X. et al. Piroxicam/2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex prepared by a new fluid-bed coating techning. **J Pharm Sci**, New York, v. 98, n. 2, p. 665-675, Feb. 2009.



ZHANGA, G. G. Z. et al. Phase transformation considerations during process development and manufacture of solid oral dosage forms. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 56, n. p. 371-390, 2004.

ZHU, X. L. et al. Preparation and characterization of inclusion complex of iprodione and beta-cyclodextrin to improve fungicidal activity. **J Agric Food Chem**, Washington, v. 55, n. 9, p. 3535-3539, May. 2007.

ZOTCHEV, S. B. Polyene macrolide antibiotics and their applications in human therapy. **Curr Med Chem**, Schiphol, v. 10, n. 3, p. 211-223, Feb. 2003.