

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA - MESTRADO  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA INTEGRADA

AMANDA CRISTINA SCHOEFFEL

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

PONTA GROSSA  
2016

AMANDA CRISTINA SCHOEFFEL

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

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Odontologia na Universidade Estadual de Ponta Grossa, Área de concentração em Clínica Integrada. Linha de pesquisa em Propriedades Físico-Químicas e Biológicas dos Materiais.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Migliorini Urban  
Coorientadores: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago  
Profa. Dra. Andressa Novatski

PONTA GROSSA

2016

S364 Schoeffel, Amanda Cristina  
Desenvolvimento, caracterização e liberação in vitro de complexos de inclusão Clorexidina:β-ciclodextrina obtidos por diferentes métodos/ Amanda Cristina Schoeffel. Ponta Grossa, 2016. 75f.

Dissertação (Mestrado em Odontologia - Área de Concentração: Clínica Integrada), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vanessa Migliorini Urban.

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago.

Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Andressa Novatski.

1.Estomatite sob prótese.  
2.Clorexidina. 3.Solubilidade.  
4.Liofilização. 5.Caracterização química.  
I.Urban, Vanessa Migliorini. II. Farago, Paulo Vitor. III. Novatski, Andressa. IV. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em Odontologia. V. T.

CDD: 617.6

AMANDA CRISTINA SCHOEFFEL

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

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Odontologia na Universidade Estadual de Ponta Grossa, Área de concentração em Clínica Integrada. Linha de pesquisa em Propriedades Físico-Químicas e Biológicas dos Materiais.

Ponta Grossa, 12 de fevereiro de 2016.

---

Profa. Dra. Vanessa Migliorini Urban – Orientadora  
Doutora em Reabilitação Oral – Área de Prótese  
Universidade Estadual de Ponta Grossa

---

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

---

Profa. Dra. Priscileila Colerato Ferrari  
Doutora em Ciências Farmacêuticas  
Universidade Estadual de Ponta Grossa

## **DADOS CURRICULARES**

### **Amanda Cristina Schoeffel**

|            |            |                                                                                                                                                                                                                                                  |
|------------|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| NASCIMENTO | 26.03.1991 | Rio Negrinho - Santa Catarina                                                                                                                                                                                                                    |
| FILIAÇÃO   |            | Debora Cristina Peyerl<br>Sandro Luiz Schoeffel                                                                                                                                                                                                  |
| 2009-2013  |            | Curso de Graduação em Odontologia da<br>Universidade Estadual de Ponta Grossa<br>(UEPG) - Ponta Grossa - Paraná                                                                                                                                  |
| 2012-2013  |            | Curso de Aperfeiçoamento em Endodontia<br>em Molares da Associação Brasileira de<br>Odontologia – Regional de Ponta Grossa -<br>Seção Paraná (ABO-PR)                                                                                            |
| 2013-2013  |            | Curso de Aperfeiçoamento em Estética com<br>Ênfase em Prótese Metal-Free da<br>Associação Brasileira de Odontologia –<br>Regional de Ponta Grossa - Seção Paraná<br>(ABO-PR)                                                                     |
| 2014-2016  |            | Curso de Pós-Graduação em Odontologia<br>da Universidade Estadual de Ponta Grossa<br>(UEPG) Nível de Mestrado, Área de<br>Concentração em Clínica Integrada. Linha<br>de Pesquisa em Propriedades Físico-<br>Químicas e Biológicas dos Materiais |

## *Dedicatória*

*Dedico este trabalho a todos aqueles que me ajudaram nesta jornada, apoiando-me e incentivando-me, mesmo nos momentos mais difíceis. Fazendo-me crer que seria possível.*

*“Gracias a la vida que me ha dado tanto  
Me dio dos luceros que cuando los abro  
Perfecto distingo lo negro del blanco  
Y en el alto cielo su fondo estrellado  
Y en las multitudes el hombre que yo amo.”*

Parte da canção "Gracias a la vida" da compositora chilena Violeta Parra

## ***Agradecimentos***

À **Deus**, por me dar provas diárias da sua existência em minha vida. Obrigada por me carregar em Suas mãos e nunca me deixar cair.

*“O Senhor é meu pastor, nada me faltará.”*

Salmos 23 1:2

Aos meus avós, **Bernadete e Eládio**, sem os quais eu não seria metade da mulher que eu me tornei. Obrigada pelo apoio, pelos ensinamentos, pelo companheirismo, pela amizade e pelo incentivo. Obrigada por nunca deixar faltar nada em minha vida. Também aos meus avós Edi e Gertrudes Schoeffel (*in memoriam*) pelo amor e pela saudade que deixaram.

Às minhas bisavós, **Hildegard Gonçalves e Anita Peyerl (*in memoriam*)**, por todos os ensinamentos, pelo bolo de bolacha e pela grande amizade em todos estes anos. Saudades.

À minha mãe, **Débora**, por me ensinar muito mais que qualquer escola poderia ter ensinado. Obrigada pela sua paciência, pelas broncas, pela dedicação em ser uma excelente mãe, mesmo tendo que se manter uma excelente profissional. Obrigada por ser minha mulher exemplo, meu porto seguro e minha melhor amiga.

Ao meu pai, **Sandro**, por todas as vezes em que me fez sorrir. Obrigada por me mostrar que a vida não é fácil e por me fazer saber lidar com isso. Obrigada por me fazer forte e pronta pra resolver qualquer problema. Obrigada por me mostrar que distância é apenas um mero detalhe. Também agradeço à sua esposa, **Carla**, por ter se tornado uma grande amiga em minha vida e uma grande alegria em nossa família.

À minha irmã, **Manuela**, por trazer um brilho novo em minha vida. Obrigada por me lembrar da beleza de ser criança. Obrigada por me completar e por ser a parte mais fofa de mim.

À minha madrinha, **Diane**, por ser muito mais que madrinha. Obrigada por ter feito papel de minha irmã, confidente e amiga. Obrigada pelos inúmeros potes de feijoada e por sempre olhar por mim.

Ao **Junior**, por tantas vezes ter aguentado minhas quedas e tão amavelmente ter me ajudado a levantar. Obrigada por não me deixar desistir, por sempre me apoiar e sempre estar ao meu lado. Obrigada por tantas vezes ter colocado minha felicidade a frente de qualquer coisa. Obrigada por acreditar tanto em mim, mesmo quando eu mesma duvidei. Muito obrigada também a sua família amada que me acolheu tão bem. Por todo apoio e amizade, meu muito obrigada.

À toda minha grande família que, longe ou perto, sempre me apoiaram e participaram de minhas conquistas e me ajudaram nas minhas falhas.

Às minhas amigas de longa data, especialmente **Camila e Amanda**, por sempre estarem ao meu lado nestes longos anos que se passaram. Obrigada por ainda serem parte da minha vida.

Aos meus amigos da Universidade, em especial ao **Leomar, Raíssa, Stéfanie e Rafaela**, por manter a alegria daqueles bons tempos acesa em minha vida e sempre estarem ao meu lado.

Ao **Dr. Sandro**, por pacientemente me ensinar em seu consultório como ser uma boa dentista. Obrigada por todo apoio, desde um ano de idade até agora e por muitos anos a vir.

Aos meus colegas de turma do Mestrado, **Adrian, Alexander, Carolina, Cindy, Cinthia, Evelyn, Jorge, Kaprice, Luisa, Mariane, Felipe, Naiana, Pamela, Paula, Priscila, Thais**, e em especial à **Driellen, Marcella e Yan**, pelas incontáveis conversas e tardes na UEPG e por terem feito de lá um lar e da nossa turma uma família.

À **Universidade Estadual de Ponta Grossa**, ao Secretário da Ciência, da Tecnologia e do Ensino Superior do Paraná **Prof. Dr. João Carlos Gomes** e à Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UEPG **Profa. Dra. Denise Stadler Wambier**, pela oportunidade de realização do Curso de Mestrado.

Aos Professores da Pós-Graduação em Odontologia da UEPG, pelos ensinamentos, conselhos, orientações, sugestões e carinho.

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 **Prof. Dr. Cesar Augusto Galvão Arrais**, por todo apoio durante este trabalho.

Ao **Prof. Dr. Alexandre Camilo Junior** do Departamento de Física da UEPG, pelas imagens das moléculas complexadas.

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

A todos os funcionários da UEPG, em especial à **Morgana das Graças Procz dos Santos, Luiz Roberto Cantori** e à **Valeria Ferreira Reis**, pelo incrível apoio nestes dois anos.

Ao **C-Labmu**, pelas análises feitas, em especial à **Ms. Simone Ferraz Sabino**, pelo apoio e por sempre estar disposta a ajudar.

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

## ***Agradecimentos Especiais***

À minha orientadora, **Profa. Dra. Vanessa Migliorini Urban**, por desde os tempos de Faculdade ter acendido em mim a chama de querer ser melhor. Obrigada por me orientar da melhor maneira possível e nunca me deixar na mão. Obrigada pela incrível paciência comigo. Obrigada por todos os ensinamentos. Obrigada por ter me permitido a sua amizade. Sua competência como cirurgiã dentista, pesquisadora, professora e amiga me servem de exemplo.

À minha colega, **Amanda Migliorini Urban**, pela companhia nas incontáveis horas de laboratório. Obrigada por responder minhas dúvidas relacionadas à Área de Farmácia, por me acompanhar nos passos deste trabalho e por inúmeras vezes resolver os problemas que eu não pude. Obrigada pela amizade e por toda a sua ajuda.

À minha coorientadora, **Profa. Dra. Andressa Novatski**, por tão amavelmente se dispor a nos ajudar. Obrigada pela companhia durante as análises, pelas incontáveis risadas, por ser uma pessoa tão carinhosa e tão generosa. Obrigada, também, por abrir nossos olhos para a Física, por nos guiar nas análises mais difíceis, por fazer possível muitas delas e por sempre nos fazer sorrir.

Ao meu coorientador, **Prof. Dr. Paulo Vitor Farago**, pela disponibilidade para responder nossas dúvidas, por nos contagiar com a paixão pelas coisas, pela valiosa contribuição científica no desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pelo carinho e amizade.

Schoeffel, A. C. **Desenvolvimento, caracterização e liberação in vitro de complexos de inclusão clorexidina:β-ciclodextrina obtidos por diferentes métodos** [Dissertação] Mestrado em Odontologia. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2016.

## RESUMO

**Objetivo:** A proposta deste estudo foi elaborar complexos de inclusão (CI) entre clorexidina (Clx) e β-ciclodextrina (βCD) para a posterior incorporação em material condicionador de tecido, visando promover a liberação controlada e permitir um efeito antifúngico prolongado. **Material e métodos:** Suspensões de Clx: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* (Spray). 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 Spray. Clx, 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 1:2 MF, Lio e Spray. A dissolução foi realizada em triplicata utilizando o aparato pá do dissolutor de cubas a 37°C e 75 rpm durante 7 h para a Clx e os CI. Os resultados obtidos foram avaliados com relação ao perfil, eficiência (ANOVA-1 fator/Tukey,  $\alpha=0,05$ ) e cinética de dissolução. **Resultados:** Os métodos de complexação alteraram a morfologia das partículas não complexadas após a inclusão. A MF e o CI Lio apresentaram partículas irregulares e o CI Spray apresentou os menores tamanhos de partículas, com formato regular toroidal, a partir da análise em FEG. A análise em DRX mostrou que a MF 1:2 e o CI Lio 1:2 apresentaram perfil semi-cristalino e o CI Lio 1:1 e o CI Spray, em ambas proporções molares, apresentaram perfil amorfo. Pôde ser observado que as bandas relacionadas à βCD deslocaram para frequências maiores ou menores nos espectros FT-IR dos CI devido à interação Clx:βCD. As bandas características da Clx não apareceram nos espectros FT-IR dos CI, sugerindo a presença de Clx no interior da cavidade da βCD. Pelas análises térmicas em DSC e TGA, foi possível confirmar a formação de um novo composto após a inclusão devido às alterações observadas no comportamento térmico da Clx e da βCD nos CI. A complexação foi então comprovada pela análise do  $^1\text{H}$  RMN que mostrou grandes alterações nas regiões da guanidina e do anel aromático da Clx e nos hidrogênios da cavidade da βCD, confirmando que o fármaco foi incluído na βCD. O estudo de dissolução in vitro, por fim, mostrou uma mecânica de liberação imediata do fármaco a partir dos CI Lio e Spray 1:2. O CI Lio 1:2 apresentou o melhor perfil de dissolução e a maior ( $p=0,0105$ ) eficiência de dissolução ( $40,06\pm0,97\%$ ) em relação ao fármaco não complexado e demais CI em 7 h de avaliação. O perfil de liberação da Clx revelou melhor ajuste cinético para o modelo

de Weibull, enquanto os perfis dos CI ajustaram-se melhor para o modelo biexponencial. Assim, a complexação alterou a cinética de liberação do fármaco, resultando em duas etapas de liberação, rápida inicial e prolongada final. **Conclusão:** A partir dos resultados obtidos pelas técnicas de caracterização, pôde ser concluído que a clorexidina apresentou melhor complexação com a  $\beta$ -ciclodextrina na proporção molar 1:2 em todos os métodos testados. O complexo de inclusão clorexidina: $\beta$ -ciclodextrina 1:2 obtido por liofilização apresentou melhor eficiência 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 condicionador de tecido.

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

---

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

Schoeffel, A. C. **Development, characterization, and in vitro release of chlorhexidine:β-cyclodextrin inclusion complexes obtained using different methods** [Dissertação] Mestrado em Odontologia. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2016.

## ABSTRACT

**Purpose:** This study prepared inclusion complexes (IC) between chlorhexidine (Chx) and β-cyclodextrin (βCD) for posterior incorporation into tissue conditioner material, aiming to promote controlled release and a prolonged antifungal effect. **Material and methods:** Suspensions of Chx: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 (Spray). 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 Spray. Chx, 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, 1:2 PM, FD and Spray IC were selected. The dissolution was made in triplicate using paddle device at 37°C and 75 rpm during 24 h for Chx and IC. The results were evaluated in relation to profile, efficiency (ANOVA-1 way/Tukey,  $\alpha=0.05$ ) and dissolution kinetics. **Results:** Methods of IC preparation changed the non-complexed particle morphology after inclusion. PM and FD IC presented irregular-shaped particles and Spray IC showed the lowest particle sizes, with regular toroidal shape, by FEG analysis. DXR analysis showed that 1:2 PM and FD IC presented semi-crystalline and 1:1 FD IC and Spray IC, in both molar ratios, presented amorphous characteristics. Peaks related to βCD shifted to higher or lower frequency in FT-IR spectra upon inclusion due to the interaction Chx:βCD. Peaks of Chx did not appear in FT-IR spectra after inclusion, suggesting the presence of Chx within βCD cavity. DSC and TGA analyses indicated the formation of a new compound due to the changes observed in thermal characteristics of Chx and βCD upon inclusion. Complexation was then proved by  $^1\text{H}$  NMR analysis that showed several changes in guanidine and aromatic moiety of Chx and in hydrogens of βCD cavity, confirming that the drug was included into βCD. Finally, in vitro dissolution study showed an immediate release mechanics of the drug from 1:2 FD and Spray IC. FD IC also presented the better dissolution profile and the higher ( $p=0.0105$ ) dissolution efficiency ( $40.06\pm0.97\%$ ) in comparison to the non-complexed Chx and the other IC during 7 h. The Chx release profile revealed the better kinetic adjustment for Weibull model, while the IC release profiles best set to the biexponential model. Thus, the complexation changes the drug release kinetics, resulting in two stages, initial fast and final prolonged. **Conclusion:** Based on the results obtained by the characterization techniques, it was concluded that chlorhexidine better complexed with β-cyclodextrin in 1:2 molar ratio in all tested methods. Freeze-drying inclusion complex 1:2 chlorhexidine:β-cyclodextrin presented

the better dissolution efficiency 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 tissue conditioner material.

**Keywords\*:** Denture Stomatitis. Chlorhexidine. 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  | - Fórmulas estruturais planas e dimensões das cavidades das CD $\alpha$ , $\beta$ e $\gamma$ .....                                            | 20 |
| FIGURA 2  | - Fluxograma das etapas experimentais do estudo.....                                                                                          | 32 |
| FIGURA 3  | - Curva analítica da Clx em água.....                                                                                                         | 39 |
| FIGURA 4  | - Representação gráfica dos tipos de diagramas de solubilidade de fases A e B com seus subtipos.....                                          | 40 |
| FIGURA 5  | - Diagrama de solubilidade/estabilidade de fases da suspensão Clx: $\beta$ CD.....                                                            | 41 |
| FIGURA 6  | - Pós da Clx (A) e $\beta$ CD (B) não complexadas e pós obtidos após os métodos de MF (C), CI Lio (D) e CI Spray 1:2 (E).....                 | 42 |
| FIGURA 7  | - Fotomicrografias obtidas por FEG com as mensurações dos tamanhos de partículas. <b>A</b> – $\beta$ CD e <b>B</b> – Clx não complexadas..... | 44 |
| FIGURA 8  | - Fotomicrografias obtidas por FEG com as mensurações dos tamanhos de partículas. <b>A</b> – MF 1:1 e <b>B</b> – MF 1:2.....                  | 45 |
| FIGURA 9  | - Fotomicrografias obtidas por FEG com as mensurações dos tamanhos de partículas. <b>A</b> – CI Lio 1:1 e <b>B</b> – CI Lio 1:2.....          | 45 |
| FIGURA 10 | - Fotomicrografias obtidas por FEG com as mensurações dos tamanhos de partículas. <b>A</b> – CI Spray 1:1 e <b>B</b> – CI Spray 1:2.....      | 46 |
| FIGURA 11 | - Difrátogramas de raios X da $\beta$ CD, Clx, MF, CI Lio e CI Spray.....                                                                     | 48 |
| FIGURA 12 | - Espectros de FT-IR da $\beta$ CD, Clx, MF, CI Lio e CI Spray.....                                                                           | 50 |
| FIGURA 13 | - Espectros de FT-IR – vista aproximada de 1550 a 1450 $\text{cm}^{-1}$ da $\beta$ CD, Clx, MF, CI Lio e CI Spray.....                        | 51 |
| FIGURA 14 | - Espectros de FT-IR – vista aproximada de 1650 a 1500 $\text{cm}^{-1}$ da $\beta$ CD, Clx, MF, CI Lio e CI Spray.....                        | 52 |
| FIGURA 15 | - Espectros de FT-IR – vista aproximada entre 3500 e 3100 $\text{cm}^{-1}$ da $\beta$ CD, MF, CI Lio e CI Spray.....                          | 53 |
| FIGURA 16 | - Espectros de FT-IR – vista aproximada entre 3700 e 3000 $\text{cm}^{-1}$ da $\beta$ CD, Clx, MF, CI Lio e CI Spray.....                     | 54 |
| FIGURA 17 | - Curvas de DSC da $\beta$ CD, Clx, MF, CI Lio e CI Spray.....                                                                                | 55 |
| FIGURA 18 | - Curvas de termodecomposição da $\beta$ CD, Clx, MF, CI Lio e CI Spray                                                                       | 56 |

|           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 19 | - Fórmula estrutural plana da Clx.....                                                                                                                                                                                                                                                                   | 57 |
| FIGURA 20 | - Estrutura funcional da $\beta$ CD.....                                                                                                                                                                                                                                                                 | 58 |
| FIGURA 21 | - Espectros de $^1\text{H}$ RMN. <b>A</b> – Espectros comparados a uma mesma escala. <b>A1</b> - Espectros aproximados da região da guanidina da Clx. <b>A2</b> – Espectros aproximados da região correspondente à $\beta$ CD. <b>A3</b> – Espectros aproximados da região do anel aromático da Clx..... | 59 |
| FIGURA 22 | - Representação da possível complexação entre Clx e $\beta$ CD na proporção molar 1:2.....                                                                                                                                                                                                               | 61 |
| FIGURA 23 | - Imagem da complexação 1:2 Clx: $\beta$ CD (vista lateral) obtida por modelagem molecular pelo Prof. Dr. Alexandre Camilo Junior do Departamento de Física da UEPG.....                                                                                                                                 | 61 |
| FIGURA 24 | - Perfis de dissolução in vitro da Clx, MF, CI Lio e CI Spray 1:2 Clx: $\beta$ CD.....                                                                                                                                                                                                                   | 62 |

## LISTA DE TABELAS

|          |                                                                                             |    |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 | . Dispersões Clx:βCD resultantes do teste de solubilidade/estabilidade de fases.....        | 33 |
| Tabela 2 | . Deslocamentos químicos de <sup>1</sup> H da molécula de Clx nos diferentes métodos.....   | 60 |
| Tabela 3 | . Deslocamentos químicos de <sup>1</sup> H da molécula de βCD nos diferentes métodos.....   | 60 |
| Tabela 4 | . ANOVA-1 fator para comparação entre os resultados de eficiência de dissolução.....        | 63 |
| Tabela 5 | . Resultados médios (desvio padrão) percentuais de eficiência de dissolução.....            | 63 |
| Tabela 6 | . Modelagem matemática pela equação monoexponencial para a Clx e os CI 1:2 Lio e Spray..... | 64 |
| Tabela 7 | . Modelagem matemática pela equação biexponencial para a Clx e os CI 1:2 Lio e Spray.....   | 64 |
| Tabela 8 | . Modelagem matemática pela equação ordem zero para a Clx e os CI 1:2 Lio e Spray.....      | 64 |
| Tabela 9 | . Modelagem matemática pela equação Weibull para a Clx e os CI 1:2 Lio e Spray.....         | 64 |

## SUMÁRIO

|          |                                                                                      |           |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO.....</b>                                                               | <b>17</b> |
| <b>2</b> | <b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>                                                    | <b>22</b> |
| <b>3</b> | <b>OBJETIVOS.....</b>                                                                | <b>30</b> |
| 3.1      | OBJETIVO GERAL.....                                                                  | 30        |
| 3.2      | OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....                                                           | 30        |
| 3.3      | HIPÓTESES TESTADAS.....                                                              | 30        |
| <b>4</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                                                       | <b>31</b> |
| 4.1      | LISTA DE EQUIPAMENTOS.....                                                           | 31        |
| 4.2      | MATERIAIS.....                                                                       | 32        |
| 4.3      | MÉTODOS.....                                                                         | 32        |
| 4.3.1    | Teste de solubilidade/estabilidade de fases.....                                     | 32        |
| 4.3.2    | Obtenção de CI nas proporções molares selecionadas.....                              | 34        |
| 4.3.2.1  | <i>Mistura física (MF).....</i>                                                      | <i>34</i> |
| 4.3.2.2  | <i>Suspensão e secagem por liofilização (Lio).....</i>                               | <i>34</i> |
| 4.3.2.3  | <i>Suspensão e secagem por spray-drying (Spray).....</i>                             | <i>34</i> |
| 4.3.2.4  | <i>Rendimento dos métodos de obtenção dos CI.....</i>                                | <i>34</i> |
| 4.3.3    | Caracterização dos CI.....                                                           | 35        |
| 4.3.3.1  | <i>Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Efeito de Campo (FEG).....</i> | <i>35</i> |
| 4.3.3.2  | <i>Difração de raios X (DRX).....</i>                                                | <i>35</i> |
| 4.3.3.3  | <i>Espectroscopia Infravermelha por Transformada de Fourier (FT-IR).....</i>         | <i>35</i> |
| 4.3.3.4  | <i>Análise Térmica Diferencial (DSC) e Termogravimétrica (TGA).....</i>              | <i>36</i> |
| 4.3.3.5  | <i>Ressonância Magnética Nuclear (RMN – <sup>1</sup>H).....</i>                      | <i>36</i> |
| 4.3.4    | Teste de liberação in vitro.....                                                     | 36        |
| 4.3.4.1  | <i>Avaliação do perfil, eficiência e cinética de dissolução.....</i>                 | <i>37</i> |
| <b>5</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                                                   | <b>39</b> |
| 5.1      | TESTE DE SOLUBILIDADE/ESTABILIDADE DE FASES.....                                     | 39        |
| 5.2      | OBTENÇÃO DE CI NAS PROPORÇÕES MOLARES 1:1 E 1:2.....                                 | 42        |
| 5.3      | CARACTERIZAÇÃO DOS CI.....                                                           | 42        |
| 5.3.1    | FEG.....                                                                             | 43        |
| 5.3.2    | DRX.....                                                                             | 46        |

|          |                                  |           |
|----------|----------------------------------|-----------|
| 5.3.3    | FT-IR.....                       | 49        |
| 5.3.4    | DSC e TGA.....                   | 54        |
| 5.3.5    | RMN – <sup>1</sup> H.....        | 57        |
| 5.4      | TESTE DE LIBERAÇÃO IN VITRO..... | 62        |
| <b>6</b> | <b>CONCLUSÕES.....</b>           | <b>66</b> |
|          | <b>REFERÊNCIAS.....</b>          | <b>67</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

A candidose bucal é considerada a infecção fúngica mais frequente entre humanos<sup>1</sup> e quando associada à utilização de próteses removíveis é denominada estomatite protética.<sup>2</sup> Apesar de sua etiologia ser considerada multifatorial, a infecção por *Candida* spp., especialmente *Candida albicans*, é considerada o principal fator etiológico.<sup>3</sup> Presença de biofilme,<sup>4</sup> trauma local associado ao uso contínuo da prótese,<sup>5</sup> hipossalivação<sup>6</sup> e alteração do pH da saliva<sup>7</sup> são fatores locais predisponentes ao desenvolvimento desta patologia. Devido à etiologia multifatorial, o tratamento deve incluir terapia antifúngica tópica, medicação antifúngica sistêmica, cuidados com a higiene bucal, procedimentos de limpeza e desinfecção das próteses, substituição de próteses antigas, eliminação de irregularidades anatômicas, restabelecimento de oclusão não-traumática e restituição nutricional.<sup>7,8</sup> Além disso, com o objetivo de proteger e preservar a integridade do epitélio da mucosa, o paciente deve dormir sem as próteses.<sup>9</sup> Mesmo quando a terapia antifúngica é instituída, tem sido comumente observado um quadro de reinfecção da mucosa bucal em até duas semanas após o tratamento. Essa reincidência tem sido atribuída à concentração insuficiente dos fármacos sobre a superfície protética que mantém contato com os tecidos bucais, haja vista que ocorre a formação de um complexo biofilme microbiano em profundidade na resina acrílica.<sup>10,11</sup>

Materiais macios à base de resina acrílica têm sido utilizados amplamente para moldagem dinâmica, sendo essenciais adjuntos no tratamento da mucosa bucal traumatizada.<sup>12</sup> Isso se deve ao fato de absorverem parte das forças mastigatórias incididas sobre a prótese em função, reduzindo a energia transmitida aos tecidos paraprotéticos<sup>13</sup> e assegurando, portanto, conforto ao paciente.<sup>14</sup> No entanto, estes materiais são considerados temporários, pois perdem rapidamente suas propriedades viscoelásticas a partir da liberação de álcool e de plastificantes para o meio bucal.<sup>15</sup> Dessa forma, tornam-se suscetíveis à degradação superficial,<sup>16</sup> o que pode favorecer a instalação de processos patológicos como a estomatite protética bem como dificultar o tratamento de infecções presentes.<sup>17</sup> Ainda, somado à sua porosidade inerente, torna-se difícil sua higienização, uma vez que são significativamente menos resistentes à escovação que as resinas acrílicas convencionais<sup>18</sup> e incompatíveis com soluções de limpeza para próteses mesmo em curtos períodos de imersão.<sup>19</sup>

Para prolongar a longevidade clínica de condicionadores de tecido e reembasadores resilientes e reduzir a possibilidade de acúmulo de biofilme, alguns autores têm proposto a incorporação de fármacos antifúngicos nesses materiais.<sup>12,20,21</sup> Dentre os quais, têm sido utilizados agentes polienos ou azóis (imidazol ou triazol), além da utilização da bisguanida catiônica, a clorexidina (Clx). Essa combinação pode ser uma terapêutica lógica no tratamento da estomatite protética por vários fatores: redução do trauma causado pela superfície interna de resina acrílica rígida das próteses removíveis; eliminação do contato da superfície contaminada com os tecidos bucais e, conseqüentemente, do ciclo de reinfecção, ação dos fármacos antifúngicos incorporados ao material diretamente sobre os tecidos infectados, reduzida frequência de aplicação<sup>20</sup> e redução da necessidade de participação dos pacientes durante o tratamento.<sup>22</sup> 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<sup>22</sup> e rigor na administração da posologia.<sup>20</sup> Também é difícil manter a concentração efetiva nos tecidos infectados em decorrência do fluxo salivar, dos movimentos da língua<sup>3</sup> e da deglutição, que rapidamente dissolvem e eliminam qualquer fármaco da cavidade bucal.<sup>23</sup>

Neste contexto, a estomatite protética seria tratada durante duas semanas, previamente à confecção de novas próteses, período semelhante ao de um tratamento com antifúngico tópico convencional e período máximo que os materiais macios temporários suportam devido à sua degradação e enrijecimento gradual.<sup>20,22</sup> Mais vantajosa será ainda esta terapêutica para pacientes idosos que apresentam capacidade visual reduzida e destreza manual limitada, o que resulta em uma higienização das próteses menos eficiente<sup>24</sup> e para pacientes institucionalizados que podem apresentar perda de memória assim como coordenação motora e controle cognitivo reduzidos, dependendo de enfermeiros ou cuidadores para seguirem as instruções de administração dos medicamentos e de outros cuidados para o tratamento da candidose, dificultando sobremaneira a instituição de terapias convencionais.<sup>14</sup>

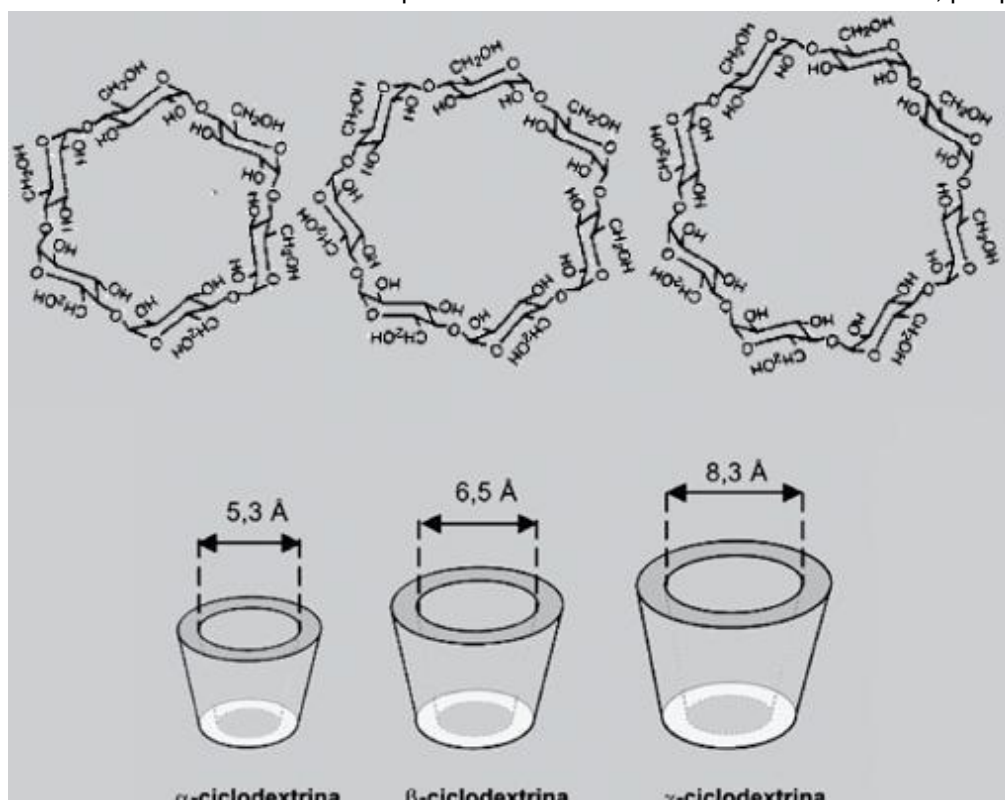
Estudos anteriores avaliaram o efeito da incorporação direta (em pó) dos fármacos antifúngicos nistatina, miconazol, cetoconazol, itraconazol e diacetato de Clx sobre algumas propriedades físicas e mecânicas de dois materiais macios

temporários para base de prótese, um condicionador de tecido (Softone) e um reembasador resiliente (Trusoft). Nestas avaliações, os fármacos nistatina e diacetato de Clx, liberados a partir destes materiais, foram altamente efetivos durante 14 dias na inibição do crescimento de biofilme de *C. albicans* em valores mais baixos de concentrações inibitórias mínimas<sup>21</sup> em relação aos demais fármacos avaliados e, como consequência, não resultaram em alterações consideradas significantes nas propriedades de dureza,<sup>25</sup> rugosidade,<sup>26</sup> resistência à tração<sup>27,28</sup> e resistência da união ao descolamento à resina acrílica para base de prótese.<sup>29</sup> Na sequência, outro estudo prévio<sup>30</sup> quantificou a liberação in vitro da nistatina e do diacetato de Clx em solução aquosa a partir desses materiais macios temporários por meio de espectrofotometria UV-visível. Foi observado que ambos os materiais apresentaram cinética de liberação biexponencial, sendo que o material Softone liberou maior concentração dos fármacos que o Trusoft e o diacetato de Clx foi liberado em maior concentração que a nistatina. Apesar disso, estes fármacos apresentam baixa solubilidade em meios aquosos.

A velocidade de dissolução do fármaco é controlada por sua solubilização intrínseca no caso da maior parte dos ativos pouco solúveis.<sup>31,32</sup> 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.<sup>33,34</sup> 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.<sup>35-37</sup> Um complexo no qual um dos componentes (a molécula hospedeira) forma uma cavidade em que as entidades moleculares de uma segunda espécie química (hóspedes) estão localizadas pode ser definido como um CI. As CD são oligossacarídeos cíclicos que contêm, pelo menos, seis unidades de D-(+)-glicopirranose unidas por ligações do tipo ( $\alpha$ -1,4). Sua configuração tridimensional mais estável apresenta-se no formato de um cone truncado e as CD mais comuns estão apresentadas na Figura 1. Estes açúcares apresentam uma cavidade interna apolar (hidrofóbica), devido ao posicionamento do oxigênio das ligações glicosídicas e aos hidrogênios das unidades glicopirranose, 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. A presença da cavidade hidrofóbica possibilita que as CD sejam capazes de alojar uma molécula hóspede ou sua parte, formando, assim, CI.<sup>38,39</sup> 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 hidrofilia da CD, característica que justifica sua baixa toxicidade.<sup>40</sup>

FIGURA 1 - Fórmulas estruturais planas e dimensões das cavidades das CD  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$



Fonte: 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, jul./set. 2005.<sup>41</sup>

Tem sido demonstrado que a granulometria e a morfologia de partícula de um CI são fatores essenciais para sua taxa de dissolução.<sup>42</sup> 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.<sup>43</sup> O método de liofilização (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.<sup>44</sup> O método de *spray-drying* (Spray) é automatizado e tem sido considerado mais versátil que as outras técnicas de secagem.<sup>45</sup> 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.<sup>46</sup>

Dessa forma, considerando a necessidade de otimização da solubilidade, biodisponibilidade e redução de efeitos colaterais dos fármacos antimicrobianos usados no tratamento da estomatite protética incorporados a materiais condicionadores de tecido, surge o interesse tecnológico de se obter, caracterizar e avaliar a liberação in vitro de complexos de inclusão contendo ciclodextrina.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

O levantamento bibliográfico deste estudo teve como bases de dados o *PubMed*, o *SciELO* e o *ScienceDirect* e foram selecionados trabalhos que caracterizaram físico-quimicamente e avaliaram a efetividade microbiológica de Clx:βCD, usando as seguintes palavras chaves: *chlorhexidine and cyclodextrin and inclusion complex*.

Cortés et al. (2001)<sup>47</sup> prepararam um CI Clx:βCD na proporção molar de 1:2 e o caracterizaram usando cristalografia de raios X, espectroscopia infravermelha por transformada de Fourier (FT-IR), análises térmicas, e ressonância magnética nuclear (RMN). Foi utilizado o cloridrato de Clx e a complexação foi obtida por Lio. A mistura física (MF) dos componentes também foi feita e usada como parâmetro de comparação. A análise de raios X mostrou que a βCD e a Clx apresentaram um padrão altamente cristalino. Já o CI mostrou um padrão mais amorfo quando comparado aos componentes livres e à MF, o que, de acordo com os autores, sugere um fenômeno de desordem durante a inclusão. No espectro de infravermelho, foi possível observar que o complexo apresentou um afilamento das bandas em 3500-3300 cm<sup>-1</sup> e 1100 cm<sup>-1</sup>, o que comprovou a quebra de algumas ligações de hidrogênio na inclusão. Por outro lado, a redução na intensidade da vibração aromática C=C foi observada quando comparados os espectros da MF com a Clx. Ou seja, houve interação hospedeiro/hóspede já no estado sólido, uma vez que o espectro da MF apresentou algumas alterações. A curva termogravimétrica (TGA) da Clx mostrou uma alta estabilidade entre 25°C e 200°C e, na sequência, um processo de decomposição térmica. As curvas TGA da MF e do CI foram similares e apresentaram menor estabilidade térmica quando comparadas às da Clx e βCD. No CI, a curva TGA apresentou uma perda de massa de 15% entre 25°C e 90°C e isto foi associado à perda de moléculas de água a partir da cavidade da βCD. Uma segunda perda de massa também ocorreu entre 220°C e 400°C. A análise térmica diferencial (DSC) mostrou que o pico referente ao ponto de fusão da Clx (139°C) desapareceu no complexo quando comparado à Clx pura e à MF. Um novo pico endotérmico a 239°C também foi observado e poderia estar associado com a formação de um novo composto supramolecular. As curvas DSC da MF foram diferentes do CI e dos componentes livres e isto sugere que uma interação entre as moléculas está presente na MF. As várias alterações observadas nos perfis de

ressonância de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  confirmação a inclusão da Clx na  $\beta\text{CD}$ . Pelo estudo microbiológico, foi verificado que a MF e o complexo apresentaram os menores valores de concentração inibitória mínima (CIM) em comparação com a  $\beta\text{CD}$  e a Clx. As medidas em ultravioleta (UV) mostraram que a fração de Clx no CI foi 50% menor por ser 1:2, assim sua concentração foi quatro vezes menor que a Clx pura. De acordo com os autores, a presença da  $\beta\text{CD}$  pode explicar a atividade antimicrobiana do complexo com Clx por duas razões: aderência à parede celular devido aos seus grupos OH, ocorrendo, assim, um aumento do grau de inibição do composto; e devido à  $\beta\text{CD}$  deixar a liberação da Clx mais lenta.

Em 2003, Franco et al.<sup>48</sup> avaliaram a substantividade, a atividade antimicrobiana e o efeito morfológico de um CI de Clx com hidroxipropil- $\beta\text{CD}$  em placas de dentina bovina. As placas foram armazenadas em água destilada. Os espécimes foram, então, mergulhados em 250  $\mu\text{L}$  de solução aquosa de Clx: $\beta\text{CD}$  em concentrações de 0,24%, 0,12%, 0,06%, 0,03%, 0,015% e 0,008% por 5 min a 37°C. Após isso, foram enxaguados por 5 min com solução tampão fosfato de pH 7,4. Solução de Clx 0,12% e água destilada foram usados como controle positivo e negativo, respectivamente. Os resultados deste estudo sugeriram fortemente que a CD modulou a cinética de liberação da dissociação da Clx por meio do complexo de inclusão, garantindo uma liberação lenta com baixa concentração e alta substantividade e atividade antimicrobiana. Foi mostrado também que a inclusão pode agir como uma proteção para a molécula do fármaco dentro da CD.

Para desenvolver um sistema de liberação antimicrobiana para o tratamento da doença periodontal, Yue et al. (2004)<sup>49</sup> desenvolveram um sistema de liberação polimérico e analisaram a eficiência de encapsulação, as características de liberação e a bioatividade do agente antimicrobiano. Para isso, fizeram a complexação de Clx base e de digluconato de Clx com derivados da  $\beta\text{CD}$ : metil- $\beta\text{CD}$  e hidroxipropil- $\beta\text{CD}$ . Estes complexos foram preparados pela técnica de Lio e incluídos em micropartículas poliméricas. Para o estudo de liberação, pastilhas de microesferas de poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) contendo os CI foram colocadas em tubos com 1 mL de água destilada como meio de liberação (pH 6–6,5 a 37°C) e então levadas a um agitador orbital para garantir a homogeneização. Em quantidades e tempos pré-determinados, o meio foi completamente retirado e

substituído por meio novo, e o estudo foi realizado por duas semanas. A encapsulação total do fármaco foi acessada após 90 dias, quando a matriz havia desintegrado completamente. A quantificação da Clx base e do digluconato de Clx liberados foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência a 280 nm. O estudo bacteriológico foi realizado para determinar a efetividade da complexação comparada ao fármaco sozinho. As pastilhas com os fármacos foram colocadas em poços em placas de cultura contendo água Milli Q®. Os halos de inibição ao crescimento de *Porphyromonas gingivalis* foram medidos diariamente por 10 dias. A complexação do fármaco foi avaliada por espectroscopia FT-IR, sendo que os espectros revelaram bandas fortes nas regiões de  $3400\text{ cm}^{-1}$  e  $1100\text{ cm}^{-1}$ , associadas com ligações –OH e C-O-C, respectivamente. Essas bandas foram mais estreitas do que a CD livre, o que sugere o rompimento das ligações de hidrogênio dentro da cavidade da CD na inclusão. A formação do CI foi confirmada por DSC pela ausência do ponto de fusão da Clx a  $133^{\circ}\text{C}$ . Foi observado que o efeito “burst” inicial de liberação pode ser diminuído com a complexação com CD. No estudo bacteriológico, as placas contendo Clx demonstraram halos de inibição a partir do primeiro dia. Os halos continuaram aumentando rapidamente em tamanho no decorrer do estudo, exceto no caso das Clx não complexadas, nas quais, os halos de inibição atingiram um platô após três dias. De acordo com os autores, um dos fatores que poderia contribuir para o halo de lise celular é o aumento da osmolaridade do meio devido à alta concentração de CD solúvel em água.

Denadai et al. (2007)<sup>50</sup> avaliaram a união supramolecular da  $\beta\text{CD}$  com a Clx. Pela análise em RMN  $^1\text{H}$ , foi observada uma coalescência forte dos sinais aromáticos da Clx na presença da  $\beta\text{CD}$  e alterações nos deslocamentos químicos para outros prótons. Esses resultados foram atribuídos a distúrbios na densidade eletrônica do anel aromático da Clx causados por elétrons dos átomos de oxigênio C-1-O-5-C-4 de ligações glicosídicas da molécula de  $\beta\text{CD}$ , devido a formação de interações dipolares. Foram feitas medidas do tempo de relaxamento para monitorar a mobilidade molecular da Clx na presença ou ausência de  $\beta\text{CD}$ . Variações observadas foram atribuídas ao fenômeno de complexação entre os compostos, o que leva em redução da mobilidade da Clx devido à formação de novos compostos com novo tamanho, nova simetria e, conseqüentemente, nova dinâmica molecular. Foram observadas correlações entre os hidrogênios alifáticos e aromáticos da Clx

com os hidrogênios H-3' e H-5' dentro da cavidade da  $\beta$ CD. Também foram observadas correlações entre os hidrogênios aromáticos da Clx e os hidrogênios da parte externa da  $\beta$ CD, H-4' e H-6'. Estes dados mostraram que a Clx foi incluída dentro da cavidade da  $\beta$ CD e que há uma forma de interação com a região externa da  $\beta$ CD. Através das análises físico-químicas, foi possível observar que a estrutura do complexo Clx: $\beta$ CD é dependente da razão molar, assim a avaliação antimicrobiana foi realizada para as razões 1:1, 1:2, 1:3 e 1:4, contra *Enterococcus faecalis* ou *Actinobacillus actinomicetenumcomitans*. A razão molar de 1:4 foi a que apresentou melhor inibição quando comparada às outras razões molares e à Clx pura. Todas as razões molares mostraram atividade antimicrobiana satisfatória. Uma maior efetividade e atividade antimicrobiana a longo prazo da formulação foi observada para maiores concentrações de Clx e  $\beta$ CD. Os géis com complexo mostraram melhor atividade antimicrobiana a longo prazo do que a Clx pura.

Em 2009, Raso et al.<sup>51</sup> prepararam e caracterizaram um sistema de liberação controlada baseado em sílica porosa carregada com Clx e com seus CI com  $\beta$ CD, além de também avaliarem a atividade antimicrobiana. Assim, foram incorporados na sílica, acetato de Clx, gluconato de Clx e seus CI 1:2 com a  $\beta$ CD. Os complexos foram preparados por liofilização. Para a caracterização dos complexos, foram feitas análises em FT-IR, DSC, RMN  $^1\text{H}$ , RMN NOESY, difração de raios X e técnica BET para análise de superfície e porosidade. O carregamento da sílica porosa pelos fármacos foi confirmado pelo FT-IR e nenhuma banda nova significativa foi observada, indicando uma adsorção física da Clx. Pela difração de raios X, foi possível perceber que a sílica pura, o gluconato de Clx, os complexos e a sílica carregada com complexos apresentam um padrão predominantemente amorfo, enquanto o acetato de Clx e a  $\beta$ CD apresentam padrão policristalino. De acordo com os autores, o padrão mais amorfo dos CI Clx: $\beta$ CD sugere um fenômeno de desordem na complexação. Os estudos de liberação da Clx pura e complexada a partir da matriz de sílica foram realizados em água destilada a 37°C por 350 h para o gluconato de Clx e seu respectivo complexo e por 700 h para o acetato de Clx e seu respectivo complexo. Inicialmente, um efeito *burst* foi observado para todos os grupos nas primeiras 8 h. Analisando o perfil de liberação da Clx a partir da sílica, foi observado um padrão típico de liberação controlada. O efeito *burst* foi atribuído à quantidade excessiva do fármaco que foi adsorvida fracamente dentro dos poros ou

localizada na superfície externa da matriz. Na sequência, a liberação mais lenta da Clx foi atribuída à forte interação entre as moléculas do fármaco e os grupos SiOH na superfície dos poros da sílica. O estudo microbiológico mostrou que todos os sistemas de sílica porosa contendo Clx ou os complexos apresentaram inibição satisfatória contra *E. faecalis* e *C. albicans*, assim como os agentes antimicrobianos sem a sílica. A concentração inibitória de 50 µg/mL foi observada contra *C. albicans* para todos os sistemas, contrariamente à mais baixa concentração inibitória observada para os CI de 25 µg/mL, como era esperado, devido à sua maior solubilidade. Assim, um novo sistema de liberação de CI de Clx baseado em sílica porosa mostra um perfil de liberação controlada melhorado com atividade antimicrobiana efetiva.

A preparação por meio de liofilização e a avaliação da atividade antimicrobiana de nanosistemas para controle dos patógenos orais *Streptococcus mutans* e *C. albicans* foi o objetivo do estudo de Pupe et al. (2011).<sup>52</sup> Para isso, os nanosistemas foram preparados nas razões molares de 1:1, 1:2 e 1:3 por maceração e solubilização seguido por liofilização ou por meio do método de empastagem. Para comparação, foi preparada a mistura física das CD com a Clx liofilizada em um gral nas mesmas razões molares. Para a caracterização dos sistemas e dos componentes puros, foram feitas análises em difração de raios X, análise térmica diferencial e espectroscopia infravermelha por transformada de Fourier. Para a avaliação da atividade antimicrobiana, cepas de *S. mutans* e *C. albicans* foram colonizadas a 37°C por 24 h na presença do fármaco e dos carreadores isolados com comparação simultânea com os nanosistemas 1:1 e solução de formulação de Clx 0,12%. O inóculo contendo 10<sup>6</sup> células/mL foi uniformemente semeado em placas com meio BHI. Dez µL de cada amostra foram colocados na superfície do meio de cultura e as placas foram incubadas por 24 e 48 h a 37°C. O efeito de inibição foi verificado pela presença de halos de inibição. Na análise de difração de raios X, a Clx liofilizada mostrou um padrão amorfo, enquanto a βCD mostrou um padrão altamente cristalino. Os CI apresentaram um padrão de amorfização maior que a βCD pura e que as misturas físicas, como evidência da inclusão por um fenômeno de desordem. O espectro de FT-IR para os CI com βCD mostraram picos característicos da Clx em 1700-1500 cm<sup>-1</sup>, correspondentes ao alongamento C=C do anel aromático o qual é diferente dos picos da βCD. Os espectros de ambas misturas

físicas e complexos mostraram picos característicos de cada um dos componentes com significativa mudança de frequência, o que demonstra a eficiência do processo de inclusão. Pela análise térmica, pôde ser observado que a curva da Clx mostrou estabilidade entre 25°C a 174°C, após isso, houve uma sequência de eventos de decomposição térmica. As curvas de DSC mostraram que o pico de temperatura de degradação da Clx foi maior para todos os CI obtidos com  $\beta$ CD e seus derivados. Isso evidencia a formação de um novo composto supramolecular característico de complexos de inclusão com estabilidade melhorada. O desaparecimento ou afilamento do pico de ponto de fusão do fármaco é considerado evidência conclusiva da formação do complexo. Em todos os derivados de CD estudados, o método de maceração foi o escolhido para preparar os CI na razão molar de 1:1, devido ao seu baixo custo e à aplicabilidade industrial. A avaliação da atividade antimicrobiana mostrou que todas as amostras apresentaram atividade similar, porém os nanosistemas de Clx com  $\beta$ CD apresentaram os melhores resultados.

No ano seguinte, Teixeira et al.<sup>53</sup> examinaram as interações dos complexos de Clx: $\beta$ CD preparados em razões molares diferentes, com membranas de esterol e de leveduras. Para isso, CI Clx: $\beta$ CD foram preparados por liofilização de soluções aquosas em razões molares 1:1, 1:2, 1:3 e 1:4. Antes do ensaio microbiológico, células de *C. albicans* foram cultivadas por 24 h a 34°C em condições aeróbicas em SDB. As leveduras foram cultivadas e mantidas em caldo de Sabouraud dextrose e ágar Sabouraud dextrose. A cultura de leveduras foi então diluída para se obter a densidade de  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL para os inóculos. Também foi obtida a concentração inibitória mínima (CIM), que é a menor concentração em que o fármaco inibe mais de 90% do crescimento do microrganismo. A Clx sozinha apresentou uma CIM de 2  $\mu$ g/mL. A CIM dos complexos 1:4 foi de 0,5  $\mu$ g/mL com diferença estatisticamente significativa da Clx. Valores similares foram encontrados para as proporções molares 1:2 e 1:3, que apresentaram CIM de, aproximadamente, 1  $\mu$ g/mL. Os resultados da contagem de células viáveis mostraram que aumentando as concentrações de  $\beta$ CD nos complexos (1:1, 1:2, 1:3 e 1:4) houve diminuições concomitantes na viabilidade celular. Assim, foi observado que o complexo 1:4 resultou em uma redução no crescimento de *C. albicans* em quatro vezes em comparação com a Clx não complexada.

Em 2014, Lavoine et al.<sup>54</sup> objetivaram desenvolver um sistema de liberação de alta performance usando papéis revestidos com celulose microfibrilada como um sistema de liberação controlada combinado com a  $\beta$ CD. Para isso, quatro diferentes tipos de amostras foram preparados: papéis revestidos com Clx, papéis revestidos com celulose e Clx, papéis revestidos com Clx: $\beta$ CD e papéis revestidos com  $\beta$ CD:celulose:Clx. Para realizar o revestimento, foi utilizado um processo usando uma barra de 0,9 mm (Mayer) na velocidade de 5 cm/s. Cinco camadas sucessivas das soluções/suspensões foram revestidas na superfície não tratada do papel. Entre cada camada, o papel foi seco por 3 min a 105°C usando um sistema de secagem por contato. Após a última camada, uma secagem mais longa foi realizada por 1 h a 105°C. Para o estudo de liberação, as amostras foram fixadas em um suporte com fita para que somente a superfície revestida ficasse exposta ao meio de liberação, que consistiu de 500 mL de água deionizada continuamente agitada a aproximadamente 200 rpm. A cada hora, 3 mL da solução foram coletados para a análise em UV a 254 nm antes da renovação do meio liberado. A espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton e a espectroscopia FT-IR foram avaliadas para 3 e 24 h para os complexos e os componentes sozinhos também foram avaliados para comparação. O estudo de liberação mostrou que as amostras revestidas por Clx liberaram toda a quantidade carregada em 15 h, enquanto que as amostras revestidas por Clx:celulose liberaram quantidades reduzidas através do tempo. As amostras revestidas por Clx: $\beta$ CD prolongaram a liberação de Clx por 41 h e liberaram continuamente menores quantidades de Clx. A diferença foi explicada por dois mecanismos de liberação: a adição da  $\beta$ CD promove um sistema de reserva para as moléculas de Clx ou a  $\beta$ CD parece agir como uma estrutura de "casca de núcleo" da Clx, porém aberta e com apenas uma parte da molécula contida. Assim, o excesso da molécula de Clx não incluído na  $\beta$ CD ainda se mantém mais ou menos homogeneamente distribuído dentro da matriz de papel. A presença da  $\beta$ CD controlou e regulou as quantidades de Clx liberadas: quanto maior a quantidade de  $\beta$ CD, mais progressiva foi a liberação da Clx. Os excessos de  $\beta$ CD e de Clx foram liberados dentro de 3 h em contato com o meio aquoso, seguido pela liberação dos complexos. Comparado às interações entre as moléculas de Clx e celulose, as interações entre os complexos e a celulose foram bem mais fortes. Isto pode ser explicado pela configuração química nos Cl: ambos os anéis aromáticos da Clx estão incluídos na cavidade da  $\beta$ CD (1:2). Assim, as metades hidrofóbicas são

incluídas nas moléculas hospedeiras, onde a composição polissacarídea é favorável à união de hidrogênio com a celulose. Assim as interações entre o complexo Clx:βCD e a celulose foram muito mais intensas que as entre a Clx e a celulose.

No ano seguinte, Teixeira et al.<sup>55</sup> fizeram um novo estudo avaliando a atividade antimicrobiana e a citotoxicidade in vitro da Clx incluída nas CD, com o objetivo de reduzir seus efeitos adversos e manter sua atividade microbiológica. Complexos contendo razões molares 1:1, 1:2, 1:3 e 1:4 de α, β e hidroxipropil-βCD foram preparados por liofilização para as análises químicas e testes biológicos. Foi determinada a CIM dos CI para *C. albicans*, *S. mutans* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. As culturas foram então diluídas para obter a densidade de  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL para os inóculos. Na CIM, o complexo 1:4 apresentou maior efetividade que a Clx sozinha, os complexos 1:1 e 1:2 apresentaram boa efetividade contra a *C. albicans*, enquanto os complexos 1:3 e 1:4 foram mais efetivos contra as bactérias Gram-negativas. A adição da CD à Clx diminuiu a citotoxicidade nas células eucarióticas. Os CI Clx:CD inibiram o crescimento de microrganismos e aumentaram a solubilização do ergosterol de uma maneira dose-dependente com saturação na razão molar 1:3. O tratamento com CD pura estimula a proliferação de osteoblastos e fibroblastos, porém todos os complexos foram mais citotóxicos aos osteoblastos que aos fibroblastos.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

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

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

As propostas deste estudo foram:

1. Obter complexos de inclusão clorexidina: $\beta$ -ciclodextrina por meio de mistura física, suspensão seguida por secagem por liofilização ou por *spray-drying*;
2. Caracterizar os complexos de inclusão obtidos por meio de análises espectroscópicas, térmicas e morfológica;
3. Determinar o perfil, a eficiência e a cinética de dissolução da clorexidina 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 clorexidina seria complexado à  $\beta$ -ciclodextrina por meio dos métodos de mistura física, liofilização e/ou de *spray-drying*;
2. A clorexidina complexada à  $\beta$ -ciclodextrina apresentaria melhor solubilidade em água e perfil de dissolução mais favorável que a clorexidina não complexada.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 LISTA DE MATERIAIS E 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 STA 6000, Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA);
- *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).

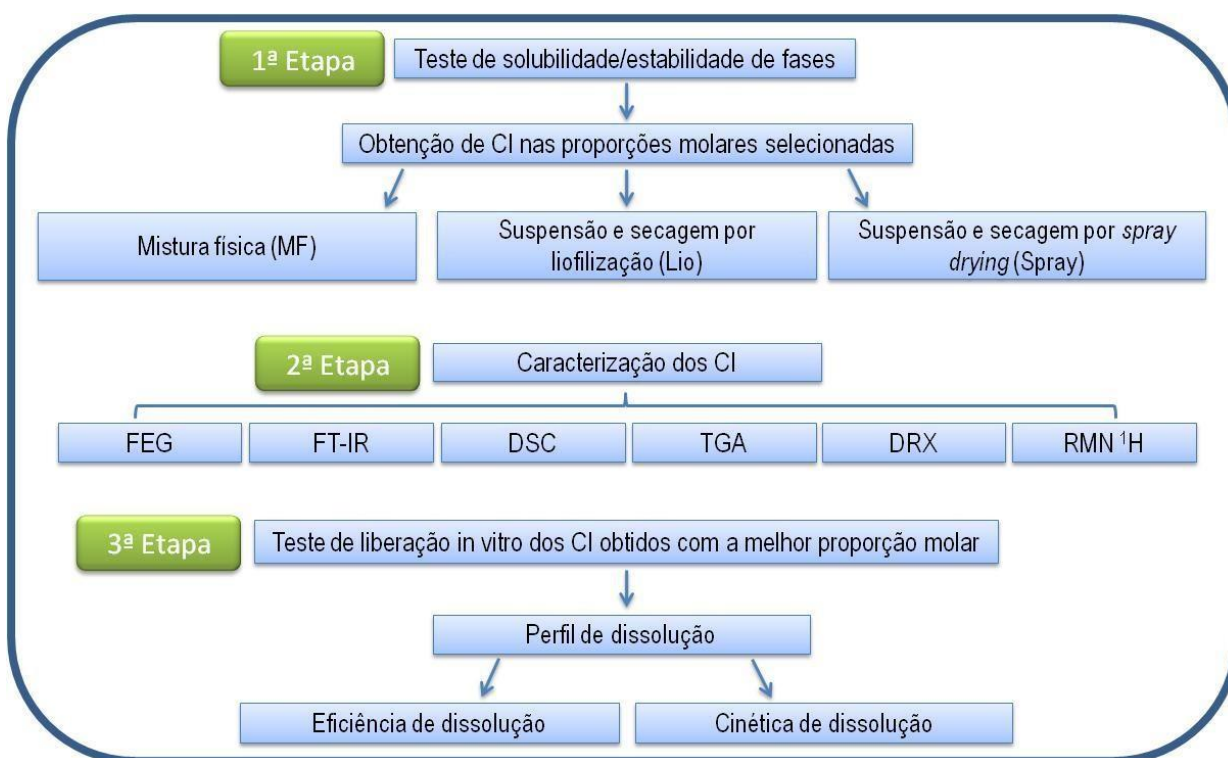
## 4.2 MATERIAIS

O fármaco antifúngico selecionado para este estudo foi a clorexidina (Clx) (Lote 1312398V, teor 99,9%, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). A ciclodextrina (CD) selecionada para este estudo foi a  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD) (Lote MKBR3596V, teor >97%, Sigma Aldrich).

## 4.3 MÉTODOS

O delineamento experimental deste estudo está ilustrado na Figura 2.

FIGURA 2 – 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; DRX: 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 Clx em água Milli-Q® (Milli-Q®, Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha). Para isso, foram preparadas oito soluções analíticas com concentrações de 35, 56, 77, 98, 119, 140, 161 e 185  $\mu\text{g/mL}$ . 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 300 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 Clx (1,5 mM) a 50 mL de água destilada (Fanem Ltda., modelo 724/2-A, São Paulo, SP, Brasil) contendo quantidades crescentes de  $\beta\text{CD}$  (0,1875; 0,375; 0,75; 0,9375; 1,5; 3 e 6 mM). As dispersões resultantes que apresentaram proporções molares de Clx: $\beta\text{CD}$  de 1:0,125; 1:0,25; 1:0,50; 1:0,625; 1:1; 1:2 e 1:4 (Tabela 1) foram agitadas por 24 h a 25°C. Cada proporção molar foi preparada em triplicata.

Tabela 1. Dispersões Clx: $\beta\text{CD}$  resultantes do teste de solubilidade/estabilidade de fases

| Dispersões | Proporção molar Clx: $\beta\text{CD}$ | Clx (g) | $\beta\text{CD}$ |
|------------|---------------------------------------|---------|------------------|
| 1          | 1:0,125                               | 0,0379  | 0,0106           |
| 2          | 1:0,25                                | 0,0379  | 0,0213           |
| 3          | 1:0,5                                 | 0,0379  | 0,0426           |
| 4          | 1:0,625                               | 0,0379  | 0,0532           |
| 5          | 1:1                                   | 0,0379  | 0,0851           |
| 6          | 1:2                                   | 0,0379  | 0,1702           |
| 7          | 1:4                                   | 0,0379  | 0,3405           |

Fonte: A autora.

Após este período, foram avaliadas com relação à fase obtida por meio de teste de solubilidade e estabilidade. 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 300 nm.

A constante de estabilidade aparente ( $K_c$ ) foi calculada pelo diagrama de solubilidade de fase usando a Equação 1 descrita por Higuchi e Connors.<sup>56</sup>

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

(1)

na qual: “**o coeficiente angular**” é obtido a partir da porção inicial linear do gráfico de absorbância em função da proporção molar de Clx:βCD; o “**S<sub>0</sub>**” é a solubilidade da Clx 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 Clx:βCD nas proporções molares de 1:1 e 1:2 foram preparadas por meio de homogeneização durante 15 min utilizando almofariz e pistilo.<sup>57,58</sup>

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

Suspensões de Clx: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 (Spray)*

Suspensões de Clx: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 Clx e da  $\beta$ CD não complexadas e dos CI Clx: $\beta$ 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. 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 *Difração de raios X (DRX)*

Amostras da Clx e da  $\beta$ CD não complexadas e dos CI Clx: $\beta$ 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 5° a 50°, radiação K $\alpha$  de cobre ( $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$ ), corrente de 40 mA e voltagem de 40 kV. Os difratogramas foram analisados utilizando o *software* OriginPro 9.0 (OriginLab®, Northampton, MA, EUA).

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

Amostras (1,5 mg) da Clx e da  $\beta$ CD não complexadas e dos CI Clx: $\beta$ CD nas proporções molares 1:1 e 1:2 foram previamente trituradas utilizando almofariz e pistilo e passadas em uma peneira de 53  $\mu\text{m}$ . Na sequência, foram misturadas a 100 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 de 4  $\text{cm}^{-1}$  e faixa de varredura/leitura de 4.000-400  $\text{cm}^{-1}$ . Os

espectros foram analisados utilizando o *software* IR Solution (Shimadzu, Quioto, Japão) e OriginPro 9.0 (OriginLab®, Northampton, MA, EUA).

#### 4.3.3.4 *Análise Térmica Diferencial (DSC) e Termogravimétrica (TGA)*

Amostras ( $15 \pm 5$  mg) da Clx e da  $\beta$ CD não complexadas e dos CI Clx: $\beta$ CD nas proporções molares 1:1 e 1:2 foram utilizadas para as análises térmicas. Para esta técnica, as amostras foram acondicionadas em microcadinhos cilíndricos de alumina (Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA). A rampa de aquecimento foi de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  em atmosfera dinâmica de nitrogênio (vazão de  $20\text{ mL}/\text{min}$ ) na faixa de  $20^\circ\text{C}$  a  $600^\circ\text{C}$ . Os termogramas 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 Clx e da  $\beta$ CD não complexadas e dos CI Clx: $\beta$ CD nas proporções molares 1:1 e 1:2 foi realizada em espectrômetro a 293 K em água deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ) (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 ( $\approx 12\text{ ppm}$ ) 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 Clx solubilizada no meio em cada um dos períodos avaliados, foi utilizada a curva de calibração do fármaco Clx em água Milli-Q® do teste de solubilidade/estabilidade de fases.

Os ensaios de dissolução in vitro foram conduzidos para a Clx e para os CI Clx: $\beta$ CD na proporção molar selecionada 1:2. Para o teste de dissolução do fármaco Clx, uma quantidade de 166,5 mg foi pesada e colocada na cuba do dissolutor. Foi, então, adicionado um volume de 900 mL 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 7 h. Para o teste de dissolução dos CI, foram utilizadas as mesmas condições experimentais, entretanto, a massa utilizada foi de 499,5 mg equivalente à 166,5 mg do fármaco.

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 e 7 h), 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 300 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 Clx 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 Clx foi comparado com os perfis dos CI Clx:βCD na proporção molar 1:2 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</sub>.t**” 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 (“grupo experimental”) seguida pelo teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ), 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), ao modelo de ordem zero (Equação 6) e ao modelo de Weibull (Equação 7), 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)

$$\%D = 100[1 - e^{-(\frac{t}{Td})^b}]$$

(7)

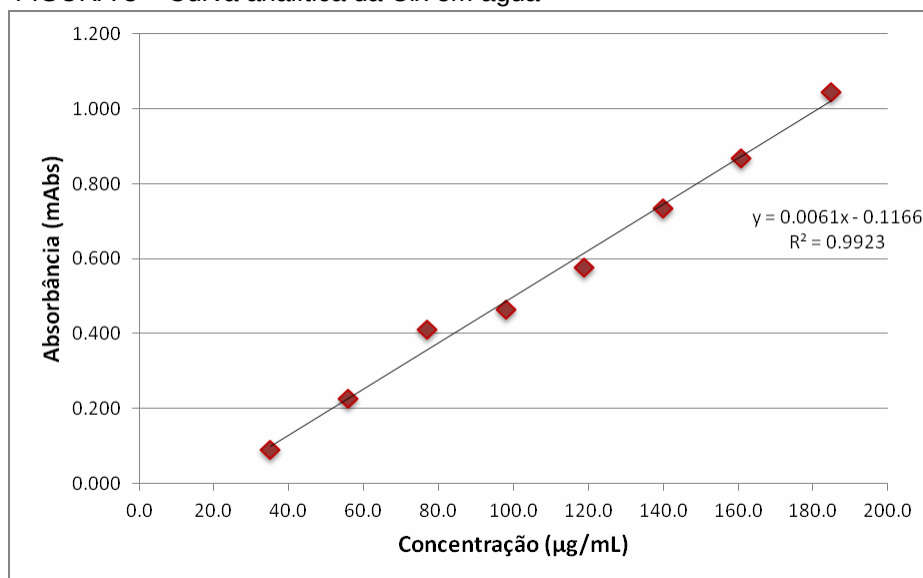
nas quais: “%D” é o percentual do fármaco dissolvido no tempo “t”, “k”, “α” e “β” são constantes cinéticas de dissolução verificadas; “A” e “B” são concentrações iniciais do fármaco que contribuem para as duas fases de dissolução; “Td” é o tempo no qual 63,2% do fármaco são dissolvidos; “b” é o parâmetro relacionado às características estruturais e geométricas da forma farmacêutica.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 TESTE DE SOLUBILIDADE/ESTABILIDADE DE FASES

A curva analítica do fármaco Clx em água confeccionada previamente à realização do teste de solubilidade/estabilidade de fases está representada na Figura 3. Podem ser observados o coeficiente de correlação de 0,9923 e a equação da reta que foi utilizada para a quantificação da concentração da Clx solubilizada em água em função do aumento crescente das concentrações de  $\beta$ CD.

FIGURA 3 – Curva analítica da Clx em água

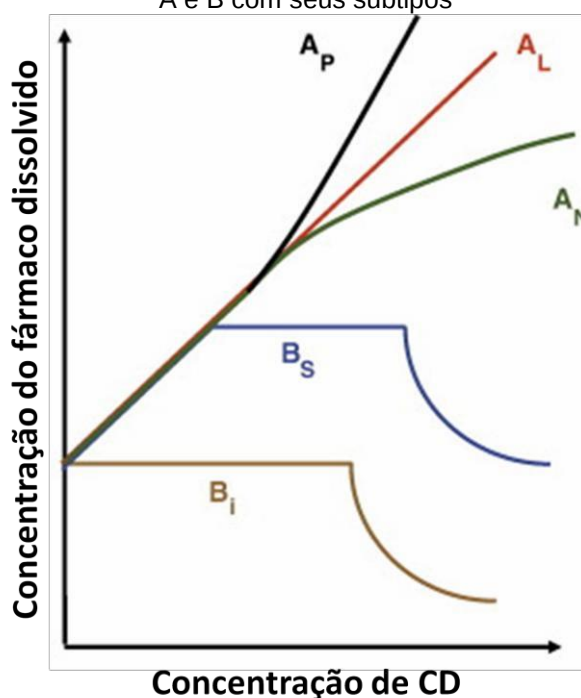


Fonte: A autora.

O diagrama de solubilidade representa a caracterização inicial dos CI em estado líquido,<sup>59</sup> 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 4). 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.<sup>59</sup> 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.<sup>59</sup>

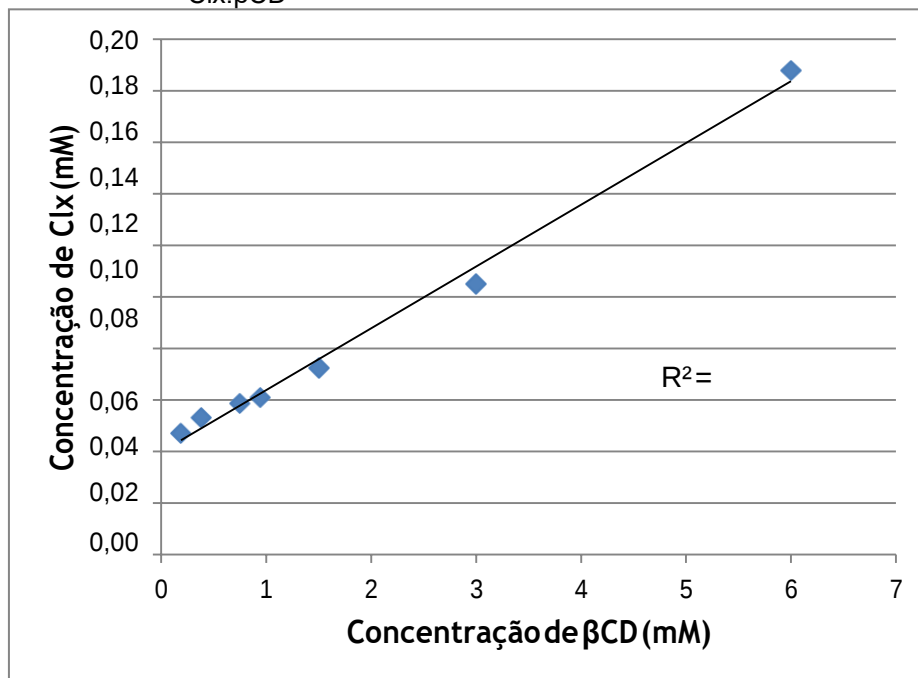
FIGURA 4 – Representação gráfica dos tipos de diagramas de solubilidade de fases A e B com seus subtipos



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

A curva de solubilidade/estabilidade de fases da suspensão Clx: $\beta$ CD está representada na Figura 5.

FIGURA 5 – Diagrama de solubilidade/estabilidade de fases da suspensão Clx:βCD



Fonte: A autora.

Os resultados indicaram que há uma relação linear ( $r^2=0,9931$ ) entre o aumento da solubilidade da Clx e o aumento da concentração da βCD, o que indica a complexação do fármaco.<sup>58</sup> A curva pôde, então, ser classificada como tipo A<sub>L</sub>: crescimento linear da solubilidade do fármaco em função da concentração da CD.<sup>58</sup>

O valor da inclinação da reta foi inferior a 1 (0,024), indicando que, no mínimo, o CI na proporção molar 1:1 entre as moléculas de Clx e βCD foi obtido.<sup>58</sup> Dessa forma, a proporção molar 1:1 (Clx: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.<sup>59</sup>

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)<sup>41</sup> consideraram adequadas constantes com valores entre 100 e 1000 M<sup>-1</sup>. 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 164,3 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.<sup>57</sup> Além do que, o objetivo deve ser melhorar o incremento de solubilidade do fármaco na menor proporção de CD utilizada.<sup>60</sup>

## 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 6.

FIGURA 6 – Pós da Clx (A) e  $\beta$ CD (B) não complexadas e pós obtidos após os métodos de MF (C), CI Lio (D) e CI Spray 1:2 (E)



Fonte: A autora.

Como pode ser observado, a coloração dos pós obtidos após complexação (Figuras 6C a 6E) pouco alterou em relação aos fármacos não complexados (Figuras 6A e 6B). O aspecto físico dos CI (Figuras 6C a 6E) ficou mais próximo do aspecto da  $\beta$ CD (Figura 6B). Foi observado que o peso do pó dos CI obtidos por Lio foi mais leve 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, 36,62% 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.<sup>46</sup>

## 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.<sup>61</sup> 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.<sup>59,61,62</sup>

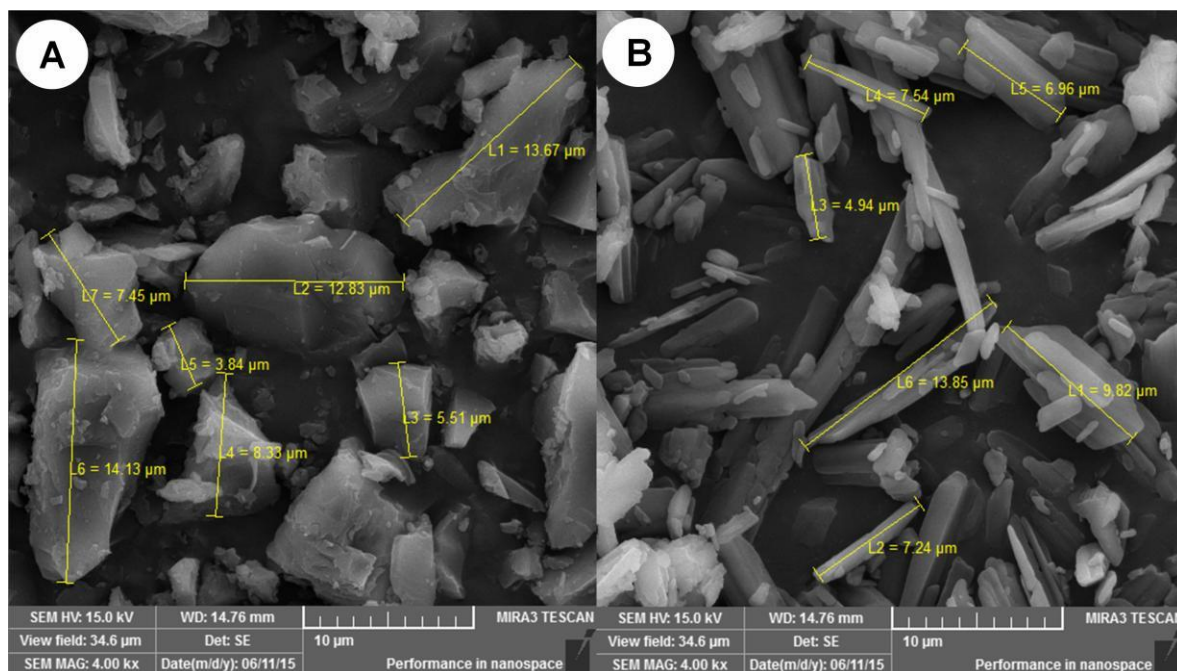
### 5.3.1 FEG

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.<sup>63</sup>

Inicialmente, com o intuito de caracterizar morfologicamente as amostras selecionadas para este estudo, foram obtidas imagens em FEG. Todas fotomicrografias foram analisadas a uma mesma magnificação (4.000x) para se estabelecer um padrão para comparação. Esta magnificação foi utilizada com o intuito de mensurar os tamanhos das partículas obtidas.

As partículas de  $\beta$ CD apresentaram morfologia irregular e formato de cristais robustos com partículas volumosas de diversos tamanhos, menores que 15  $\mu\text{m}$  (Figura 7A). As partículas de Clx, também cristalinas, apresentaram formas mais alongadas e afiladas com tamanhos variando também até 15  $\mu\text{m}$  (Figura 7B).

FIGURA 7 – Fotomicrografias obtidas por FEG com as mensurações dos tamanhos de partículas.  
**A** –  $\beta$ CD e **B** – Clx não complexadas

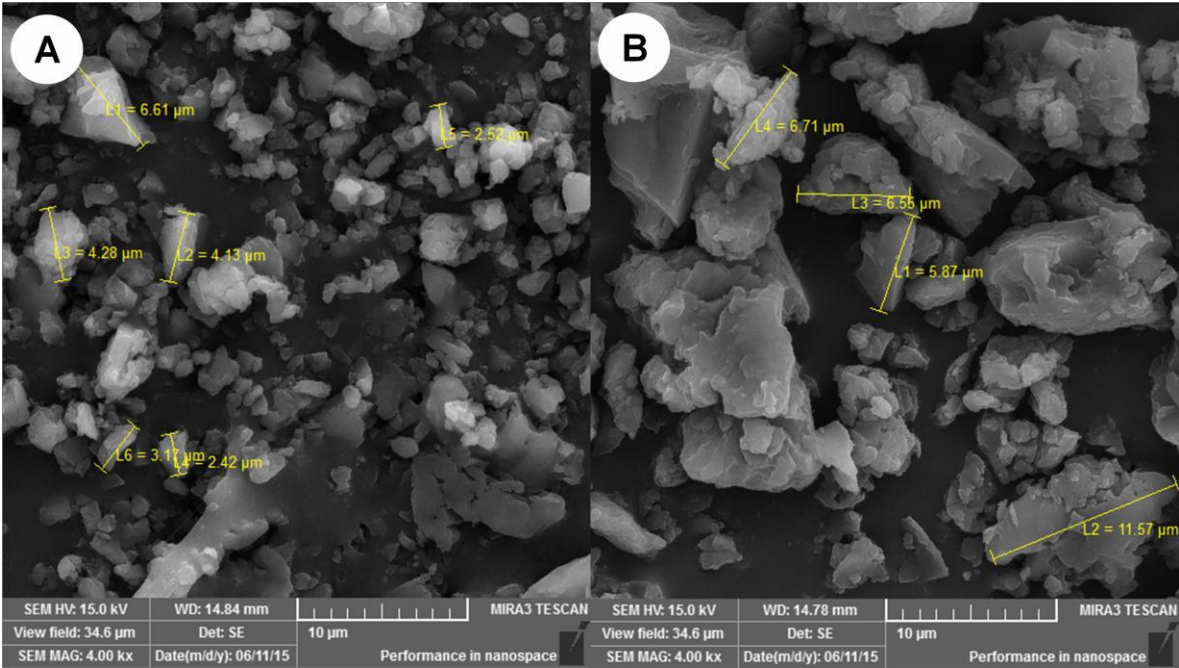


Fonte: A autora.

Em relação aos métodos de complexação, nota-se grande diferença entre as três técnicas, não alterando muito sua morfologia em relação à proporção molar Clx: $\beta$ CD (1:1 e 1:2).

A MF apresentou diversos tipos de formatos irregulares e partículas mais robustas, com a superfície irregular e tamanhos variados de 2 a 7  $\mu$ m (Figuras 8A e 8B).

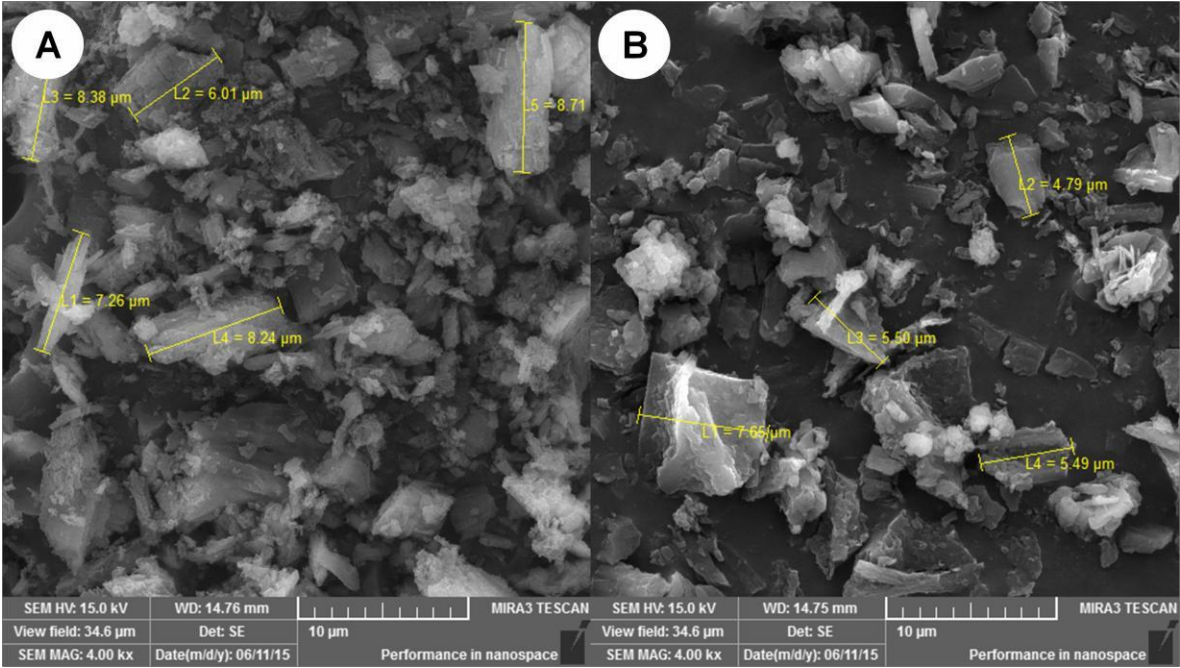
FIGURA 8 – Fotomicrografias obtidas por FEG com as mensurações dos tamanhos de partículas.  
A – MF 1:1 e B – MF 1:2



Fonte: A autora.

A complexação por Lio também apresentou partículas irregulares, com tamanhos de suas partículas variando até 9  $\mu\text{m}$  (Figuras 9A e 9B).

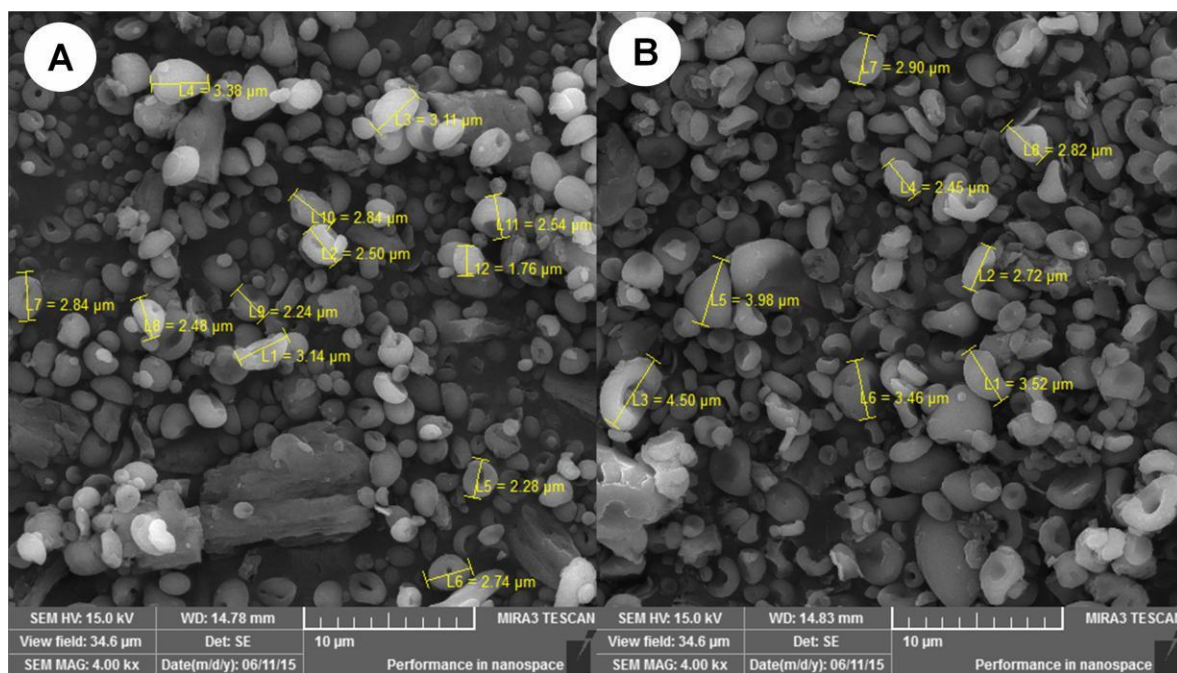
FIGURA 9 – Fotomicrografias obtidas por FEG com as mensurações dos tamanhos de partículas.  
A – CI Lio 1:1 e B – CI Lio 1:2



Fonte: A autora.

Os menores tamanhos de partículas observados foram dos métodos de complexação em Spray. Estas partículas mostraram-se regulares com tamanhos aproximados de 2  $\mu\text{m}$ , superfície lisa e morfologia bem definida em formato toroidal, devido à saída rápida de água a partir da molécula de  $\beta\text{CD}$  nesta técnica, causando a colapso de suas paredes<sup>64</sup> (Figuras 10A e 10B).

FIGURA 10 – Fotomicrografias obtidas por FEG com as mensurações dos tamanhos de partículas.  
A – CI Spray 1:1 e B – CI Spray 1:2



Fonte: A autora.

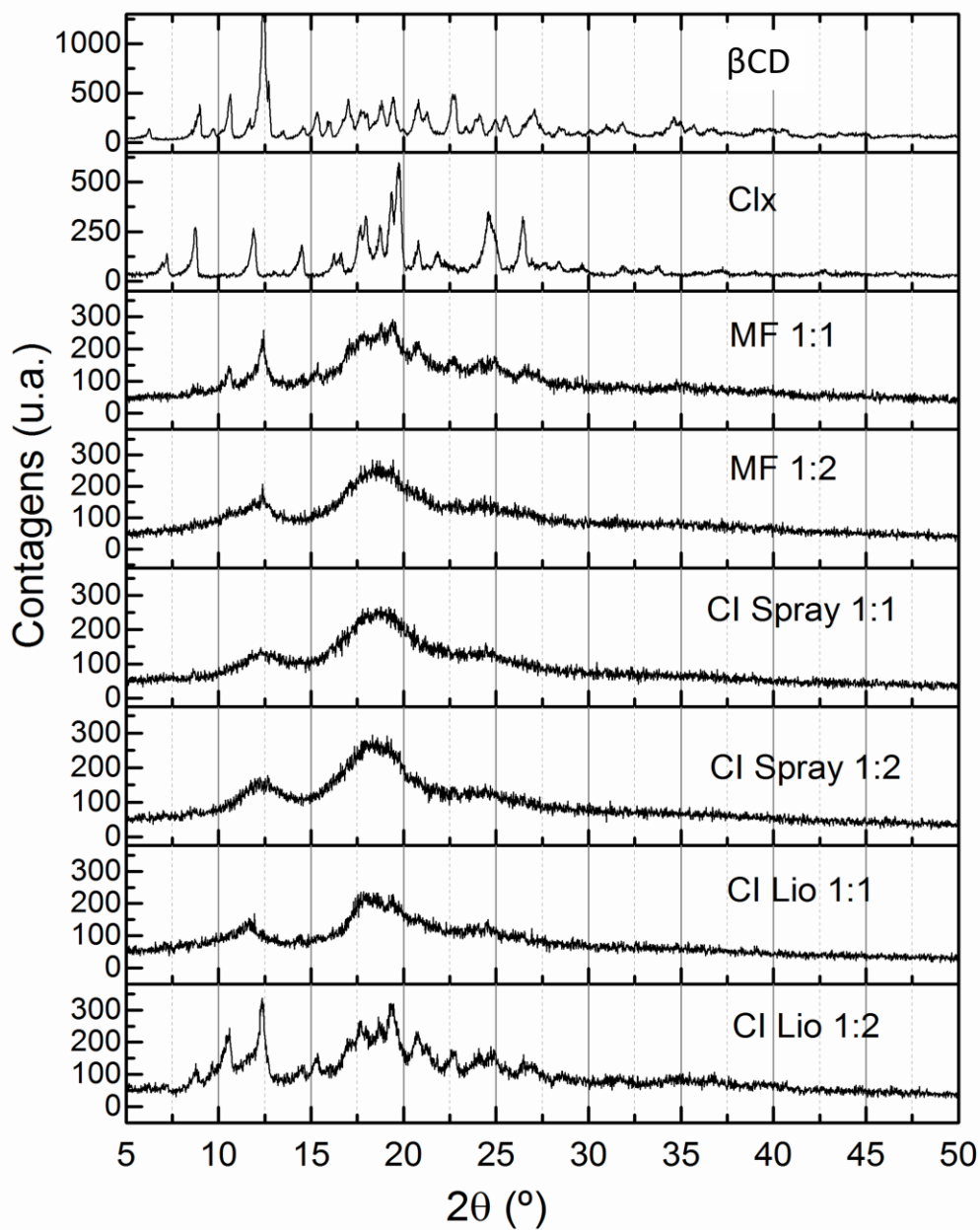
O tamanho e o formato das partículas de Clx e  $\beta\text{CD}$  não complexadas foram diferentes das partículas dos CI. Estes resultados comprovam que os métodos utilizados para secagem influenciam diretamente nas morfologias e alteram os tamanhos das partículas. Tem sido relatado na literatura que o tempo e a velocidade de secagem podem modificar a morfologia dos compostos.<sup>43</sup> E, de acordo com Rusa et al. (2001),<sup>65</sup> as CD possuem um caráter mais amorfo após a complexação.

### 5.3.2 DRX

A DRX determina a natureza cristalina de sólidos e é considerada uma das melhores técnicas para caracterização de CI.<sup>57</sup> 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.<sup>66</sup> 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.<sup>67</sup>

Na Figura 11, estão apresentados os difratogramas de raios X da  $\beta$ CD e da Clx não complexadas e dos CI.

FIGURA 11 – Difratomogramas de raios X da  $\beta$ CD, Clx, MF, CI Lio e CI Spray

Fonte: A autora.

A forma do fármaco no estado sólido, cristalino, polimorfo, solvato ou sólido amorfo, pode ter um impacto significativo na sua solubilidade, seu perfil de dissolução, sua estabilidade em uma formulação farmacêutica e sua biodisponibilidade.<sup>68</sup> Um cristal apresenta um arranjo ordenado de moléculas e átomos, mantido em contato por ligações não covalentes. Por outro lado, um sólido amorfo é caracterizado por um estado aleatório. Apesar do sólido amorfo ser mais suscetível a alterações durante o armazenamento, esta forma geralmente é mais solúvel, devido às energias livres envolvidas no processo de dissolução.<sup>58</sup>

A comparação de difratogramas de raios X faz-se sobre a formação ou não de novas fases cristalinas após a interação Clx:βCD. Pode ser observado que a βCD e a Clx apresentam um perfil poli-cristalino com seus maiores picos de intensidade em 8°, 10°, 12° e 22° no difratograma da βCD e em 8°, 11°, 14°, 17°, 19°, 24° e 26° no difratograma da Clx.

Os difratogramas das MF nas duas proporções molares bem como o do CI Lio 1:2 apresentaram perfil semi-cristalino, ou seja, apresentaram uma parte amorfa com alguns sinais de cristalinidade. Nas MF, os picos principais encontrados nos difratogramas são característicos da βCD, não apresentando nenhum referente à Clx. Porém, o difratograma do CI Lio 1:2 apresentou picos característicos dos dois componentes. Por fim, os difratogramas dos CI Lio 1:1 e CI Spray nas duas proporções molares apresentaram perfil amorfo.

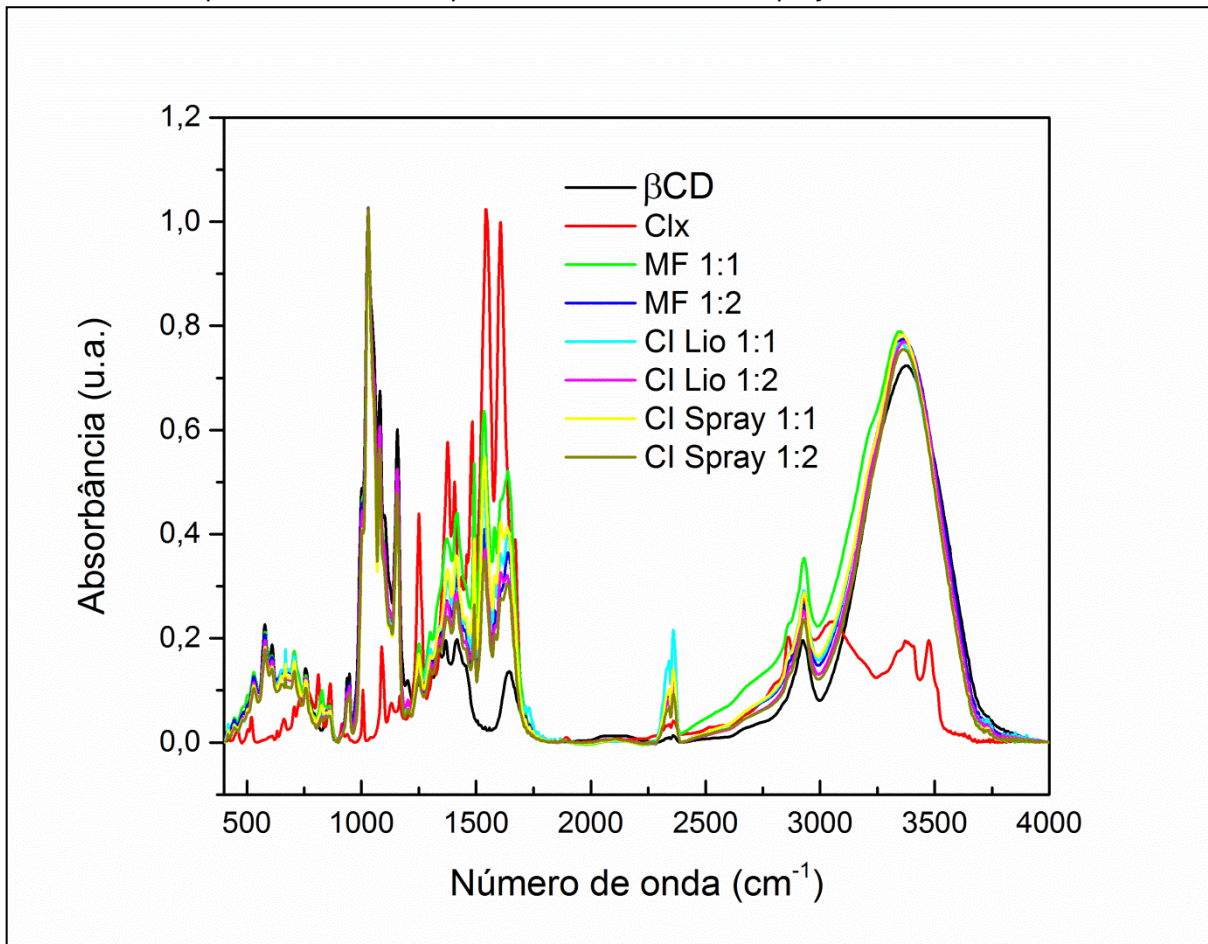
Apesar de, geralmente, os compostos com βCD apresentarem padrões cristalinos, outros estudos encontraram que os complexos Clx:βCD mostram um padrão mais amorfo quando comparados aos componentes puros, sugerindo um fenômeno de desordem na inclusão.<sup>51</sup>

### 5.3.3 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.<sup>63,69</sup>

As espectroscopias de absorção na região do infra-vermelho da  $\beta$ CD e da Clx não complexadas foram comparadas às dos CI (Figura 12).

FIGURA 12 – Espectros de FT-IR da  $\beta$ CD, Clx, MF, CI Lio e CI Spray



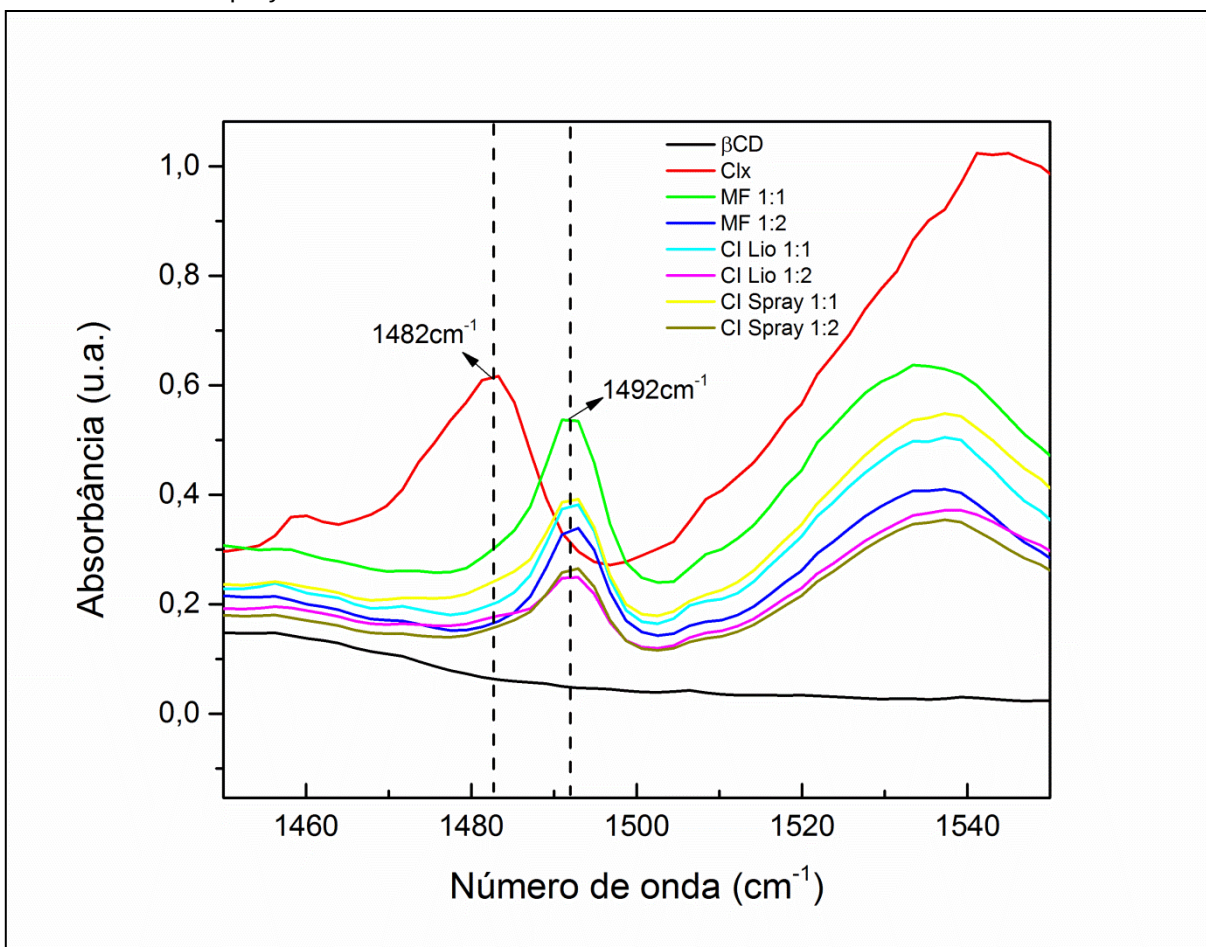
Fonte: A autora.

O espectro da  $\beta$ CD apresentou bandas largas características em 3000-3700  $\text{cm}^{-1}$  e em 1000-1100  $\text{cm}^{-1}$  associadas aos estreitamentos assimétricos -OH e C-O-C, respectivamente.<sup>47</sup>

O espectro da Clx pura apresentou uma região de bandas intensas entre 1300-1700  $\text{cm}^{-1}$  característica do alongamento C=C de seu anel aromático.<sup>47</sup>

Os espectros dos CI Clx: $\beta$ CD foram muito semelhantes. A banda característica da Clx em 1482  $\text{cm}^{-1}$ , associada à ligação C-Cl do anel aromático da Clx<sup>51</sup>, deslocou para 1492  $\text{cm}^{-1}$  nos CI, sugerindo uma interação entre  $\beta$ CD e Clx nas extremidades da molécula da Clx (Figura 13).

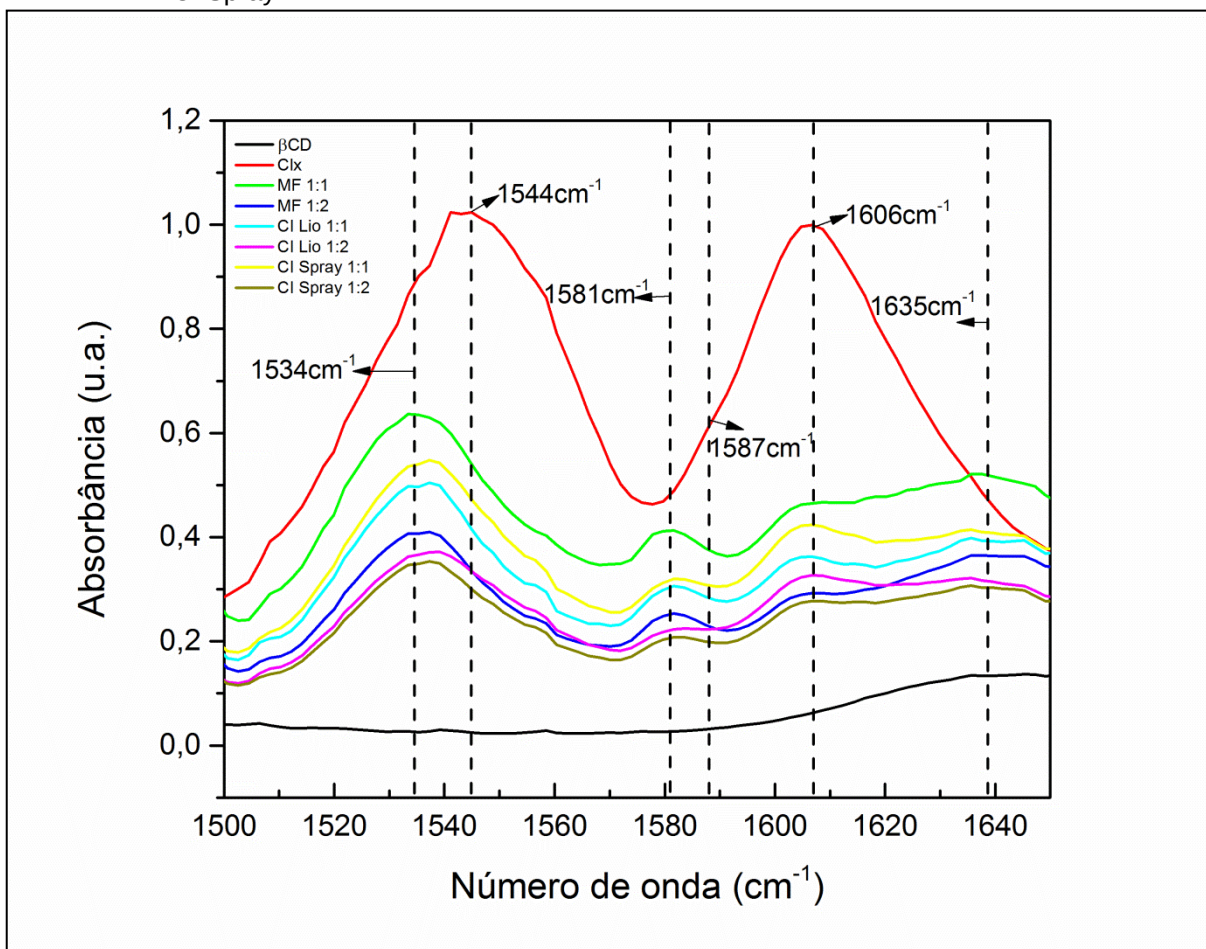
FIGURA 13 – Espectros de FT-IR – vista aproximada de 1550 a 1450  $\text{cm}^{-1}$  da  $\beta$ CD, Clx, MF, CI Lio e CI Spray



Fonte: A autora.

Além disso, a região associada ao alongamento C=C ( $1500\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$ ) do anel aromático da Clx<sup>47</sup> apareceu nos espectros dos CI com intensidade menor. A banda de  $1606\text{ cm}^{-1}$  do espectro da Clx apareceu com intensidade menor e o ombro em  $1587\text{ cm}^{-1}$  do espectro da Clx desapareceu nos espectros de todos os CI. Nesta região, porém, os CI apresentaram uma nova banda em  $1581\text{ cm}^{-1}$  e um novo ombro em  $1635\text{ cm}^{-1}$ . Ainda, a banda de  $1544\text{ cm}^{-1}$  do espectro da Clx deslocou para  $1534\text{ cm}^{-1}$  nos CI. Todos estes resultados, portanto, indicam uma possível interação da  $\beta$ CD com a Clx nesta região<sup>47</sup> (Figura 14).

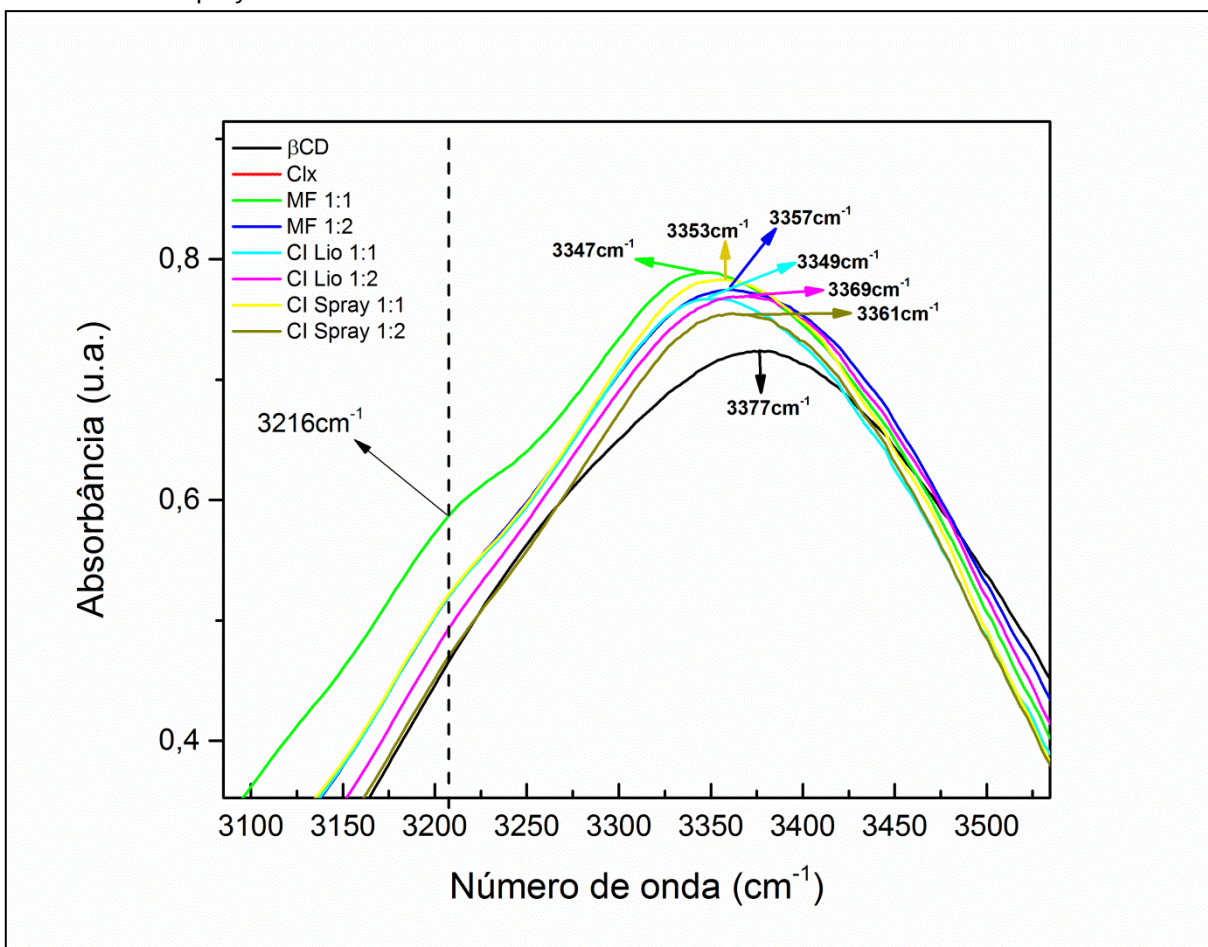
FIGURA 14 – Espectros de FT-IR – vista aproximada de 1650 a 1500  $\text{cm}^{-1}$  da  $\beta$ CD, Clx, MF, CI Lio e CI Spray



Fonte: A autora.

Já na região de 3216  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 15), pode ser observado um novo ombro nos CI em relação ao espectro da  $\beta$ CD e a banda característica da  $\beta$ CD em 3377  $\text{cm}^{-1}$ , referente à vibração de estiramento do O-H, foi deslocada para valores mais baixos nos espectros dos CI. Isto sugere o rompimento de ligações de hidrogênio dentro da cavidade da  $\beta$ CD após a inclusão.<sup>49</sup>

FIGURA 15 – Espectros de FT-IR – vista aproximada entre 3500 e 3100  $\text{cm}^{-1}$  da  $\beta$ CD, MF, CI Lio e CI Spray

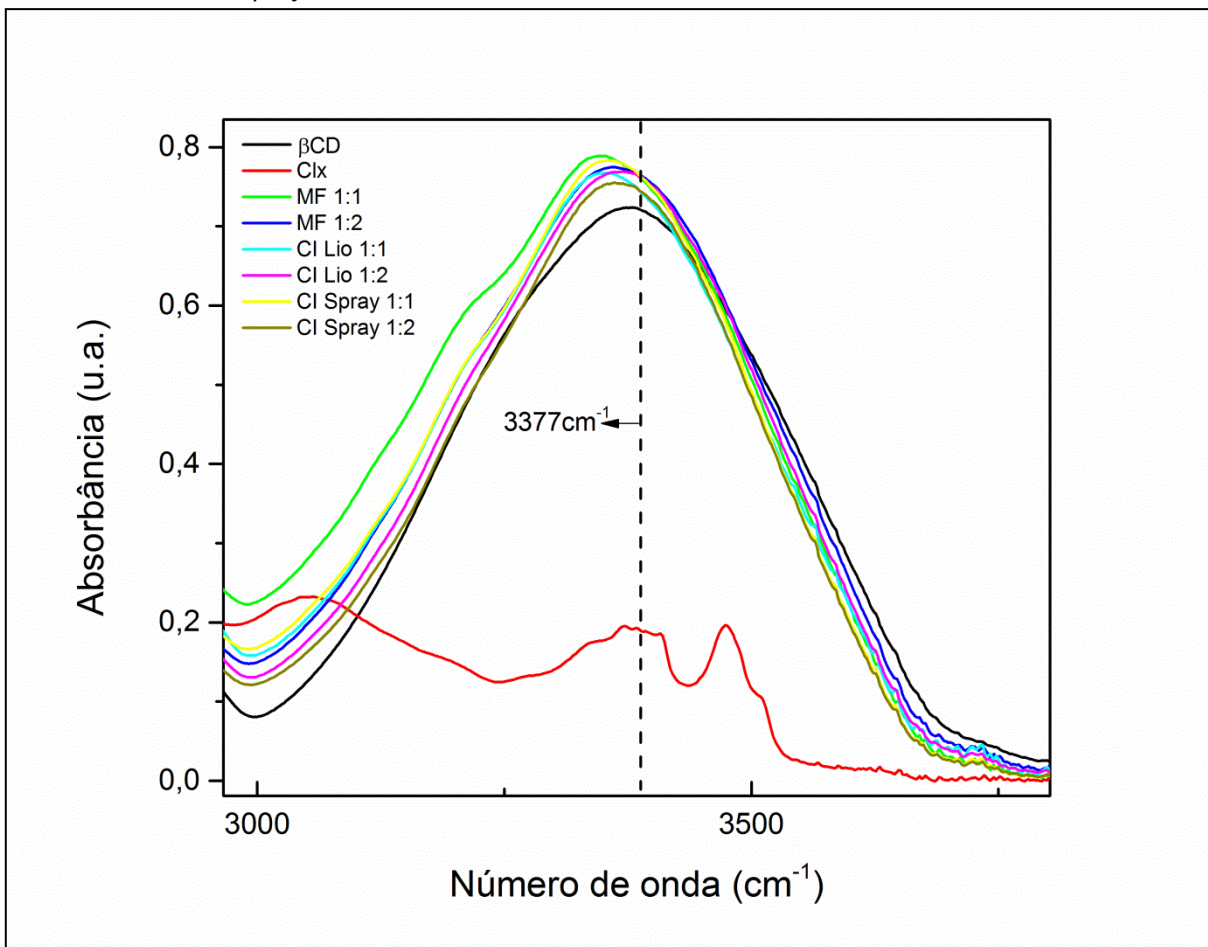


Fonte: A autora.

É possível observar que as bandas relacionadas à  $\beta$ CD deslocaram para frequências maiores ou menores nos espectros dos CI devido à interação Clx: $\beta$ CD. Quando os espectros dos CI foram analisados, foi verificado que as bandas características da Clx não apareceram, sugerindo a presença de Clx no interior da cavidade da  $\beta$ CD.

Outro indicativo da complexação nos métodos por Spray e Lio foi observado na região de 3000-3700  $\text{cm}^{-1}$ . Ao ajustar uma gaussiana para comparação das larguras nesta banda característica (3377  $\text{cm}^{-1}$ ) do espectro da  $\beta$ CD, pôde ser notado um afinamento das mesmas quando comparadas aos espectros dos CI 1:2 Lio e 1:2 Spray de 21  $\text{cm}^{-1}$  e 33  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente (Figura 16). Esta banda está associada à ligação O-H<sup>47</sup> e seu afinamento sugere a saída da molécula de água do interior da cavidade da  $\beta$ CD a partir do rompimento de ligações de hidrogênio dentro de sua cavidade<sup>47</sup>, evidenciando, portanto, a complexação.

FIGURA 16 – Espectros de FT-IR – vista aproximada entre 3700 e 3000  $\text{cm}^{-1}$  da  $\beta$ CD, Clx, MF, CI Lio e CI Spray

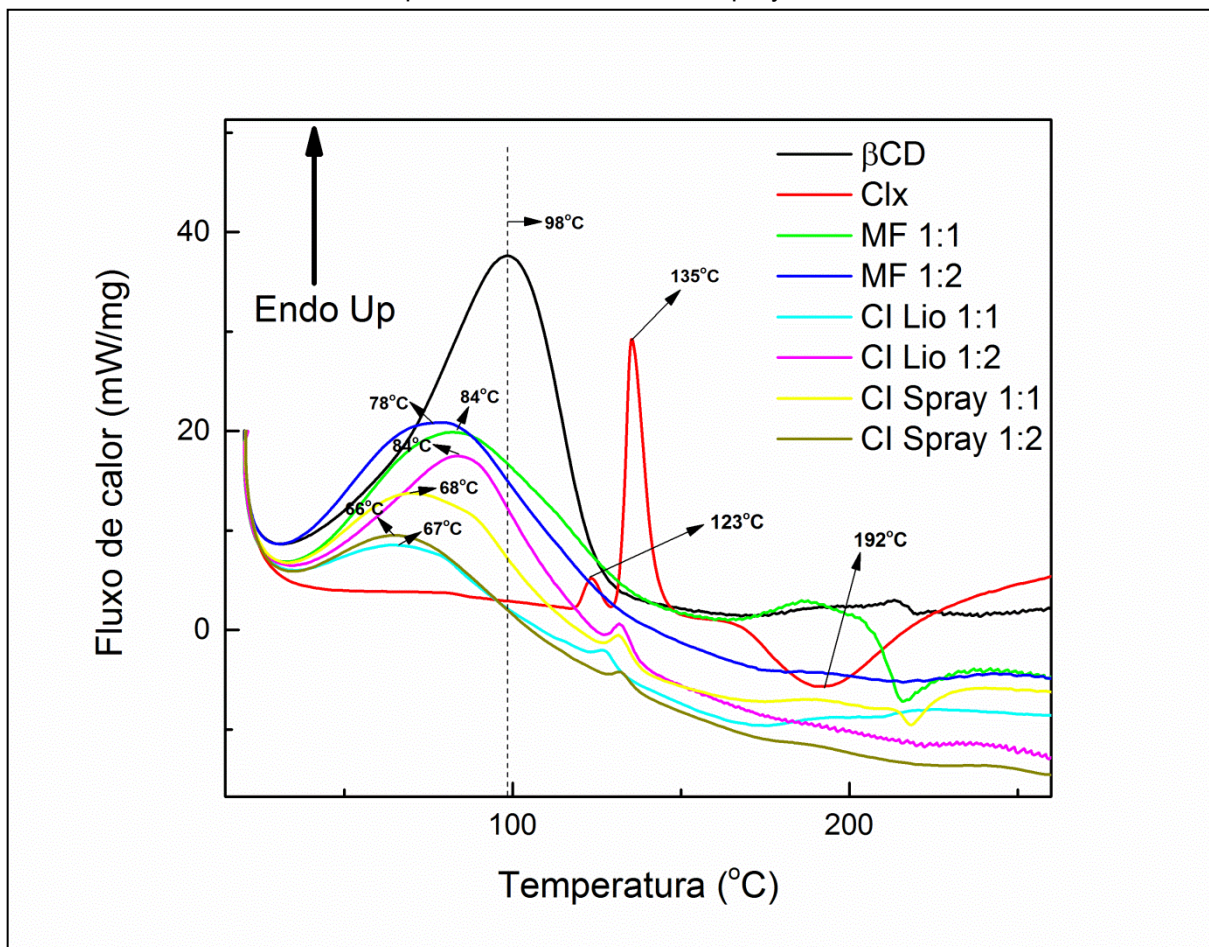


Fonte: A autora.

#### 5.3.4 DSC e TGA

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.<sup>70</sup>

Na Figura 17, estão apresentadas as curvas de DSC obtidas para a  $\beta$ CD e a Clx não complexadas e para os CI nas duas proporções molares.

FIGURA 17 – Curvas de DSC da  $\beta$ CD, Clx, MF, CI Lio e CI Spray

Fonte: A autora.

O termograma da  $\beta$ CD apresentou pico endotérmico em 98°C associado à perda de água de sua cavidade interna.<sup>58</sup> Esse pico da  $\beta$ CD apareceu nos termogramas dos CI com uma intensidade muito mais baixa e com seus centros deslocados em relação ao termograma da  $\beta$ CD. Estas mudanças são sugestivas de complexação com a molécula de Clx, devido ao fato dos CI terem alterado a estrutura a ponto de também alterarem seu comportamento térmico.

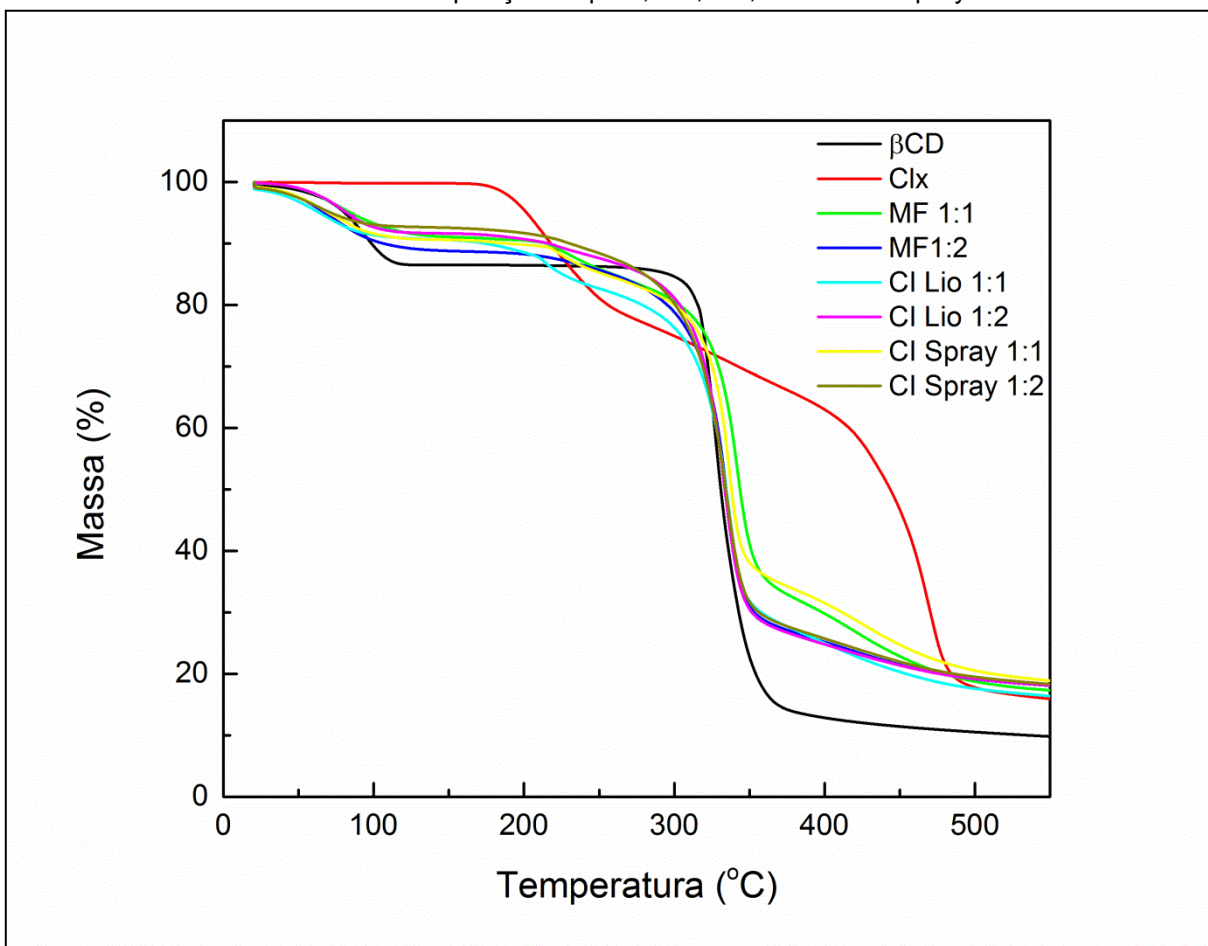
O termograma da Clx mostrou dois períodos de fusão a 123°C e a 135°C (endotérmicos).<sup>71</sup> Estes picos endotérmicos desapareceram em todos os CI. O desaparecimento ou o achatamento do pico do ponto de fusão do fármaco são considerados evidências conclusivas de complexação.<sup>52</sup>

Os CI apresentaram, ainda, um pico endotérmico a 132°C (CI Lio 1:2 e CI Spray 1:1 e 1:2) e a 127°C (CI Lio 1:1), que não apareceu nos termogramas das MF. O fato de os CI por suspensão seguida por secagem (Lio ou Spray) mostrarem este

novo pico endotérmico também sugere que a estrutura molecular foi modificada pela complexação, apresentando, deste modo, um novo comportamento térmico.

Na Figura 14, podem ser observadas as curvas de termodecomposição da  $\beta$ CD, Clx e dos processos nas duas proporções molares.

FIGURA 18 – Curvas de termodecomposição da  $\beta$ CD, Clx, MF, CI Lio e CI Spray



Fonte: A autora.

Nota-se que a Clx apresentou estabilidade até a temperatura de 176°C, na qual perdeu então 20% de sua massa gradualmente até 255°C, e, a partir desta temperatura, perdeu gradualmente mais 20% de massa até 406°C, onde, finalmente, apresentou degradação até a temperatura de 500°C.

A  $\beta$ CD apresentou uma perda gradual de 14% da sua massa inicial desde 20°C até a temperatura de 120°C. Sua massa manteve-se constante até 287°C e, então, ocorreu degradação até a temperatura final de 500°C.

Comparando o comportamento de termodecomposição dos componentes livres em relação aos CI, ficou claro que houve interação entre as moléculas. Esta

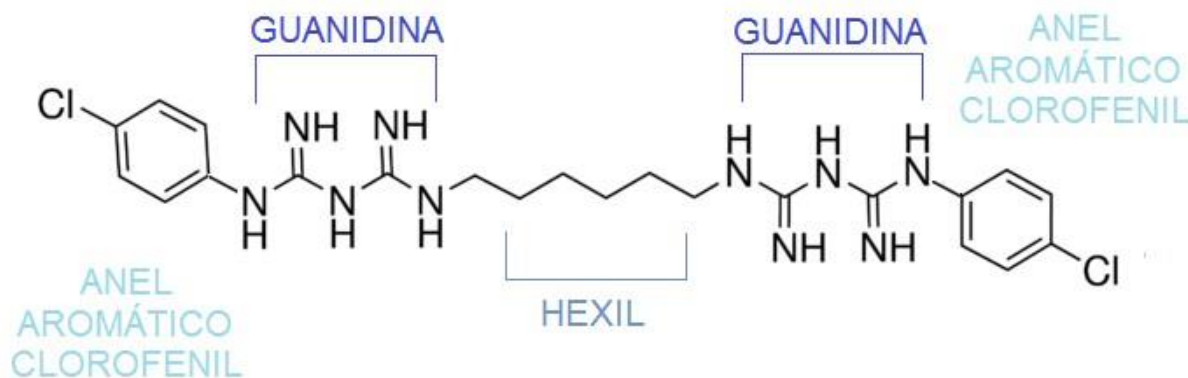
interação alterou o perfil de termodecomposição da  $\beta$ CD, fazendo com que ocorresse menor perda de massa nos complexos. Os valores de  $\Delta m$  observados foram: 90,66%, 85,03%, 84,28%, 83,39%, 82,50%, 82,50%, 82,36% e 81,91% para  $\beta$ CD, Clx, Cl Lio 1:1, MF 1:1, MF 1:2, Cl Lio 1:2, Cl Spray 1:2 e Cl Spray 1:1, respectivamente. Estes resultados sugerem que a complexação com a  $\beta$ CD promoveu um aumento da estabilidade térmica dos complexos.<sup>58</sup>

### 5.3.5 RMN - $^1\text{H}$

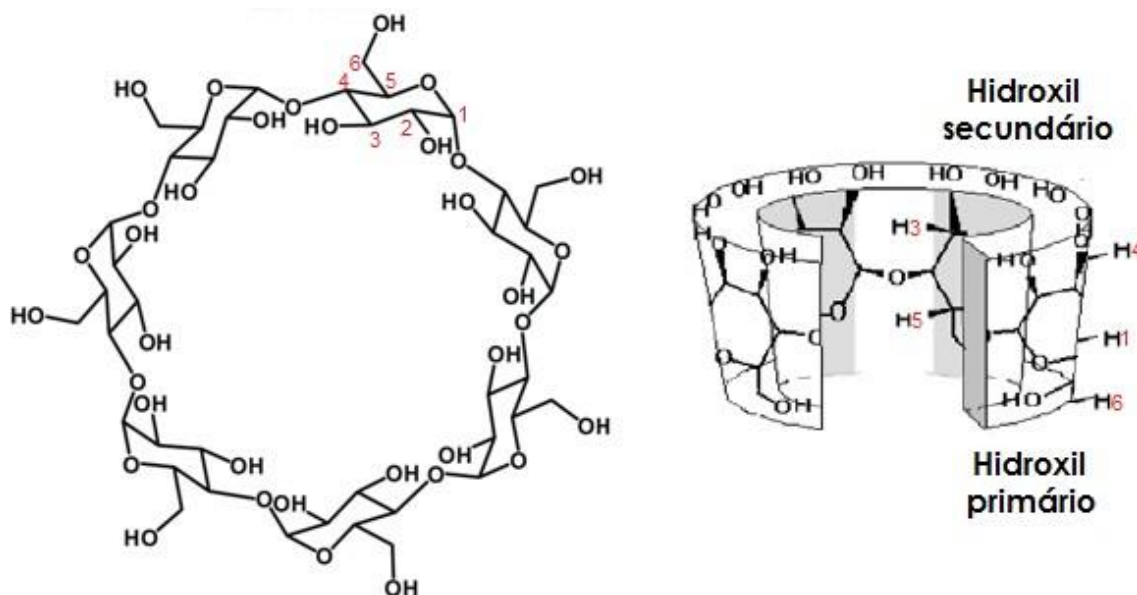
A espectroscopia de RMN é uma das técnicas mais informativas para a avaliação de CI com CD, uma vez que fornece evidências diretas da formação dos CI. Isto porque a presença da molécula hóspede no interior da cavidade da CD provoca alterações no ambiente químico dos hidrogênios internos (H-3' e H-5'), mas não nos externos (H-1', H-2' e H-4').<sup>72</sup> Além disso, a interação entre as moléculas pode provocar alterações no deslocamento químico dos hidrogênios da molécula hóspede.<sup>73</sup>

Para avaliar a interação entre a Clx (Figura 19) e a  $\beta$ CD (Figura 20), primeiramente, é preciso entender as moléculas dos dois componentes e associá-las aos resultados de  $^1\text{H}$  RMN (Figura 21 e Tabelas 2 e 3), conseguindo, assim, informações de como e onde ocorreu a complexação. O pico correspondente a 4,7 ppm é referente ao solvente utilizado,<sup>74</sup> assim, este pico não será considerado na avaliação.

FIGURA 19 – Fórmula estrutural plana da Clx



Fonte: Adaptado de: <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/chlorhexidine505455556111?lang=pt&region=BR>>. Acesso em 5 set. 2015.

FIGURA 20 – Estrutura funcional da  $\beta$ CD

Fonte: Adaptado de: Denadai AM, et al. Supramolecular self-assembly of  $\beta$ -cyclodextrin: an effective carrier of the antimicrobial agent chlorhexidine. Carbohydr Res. 2007;342(15):2286-96.<sup>50</sup>

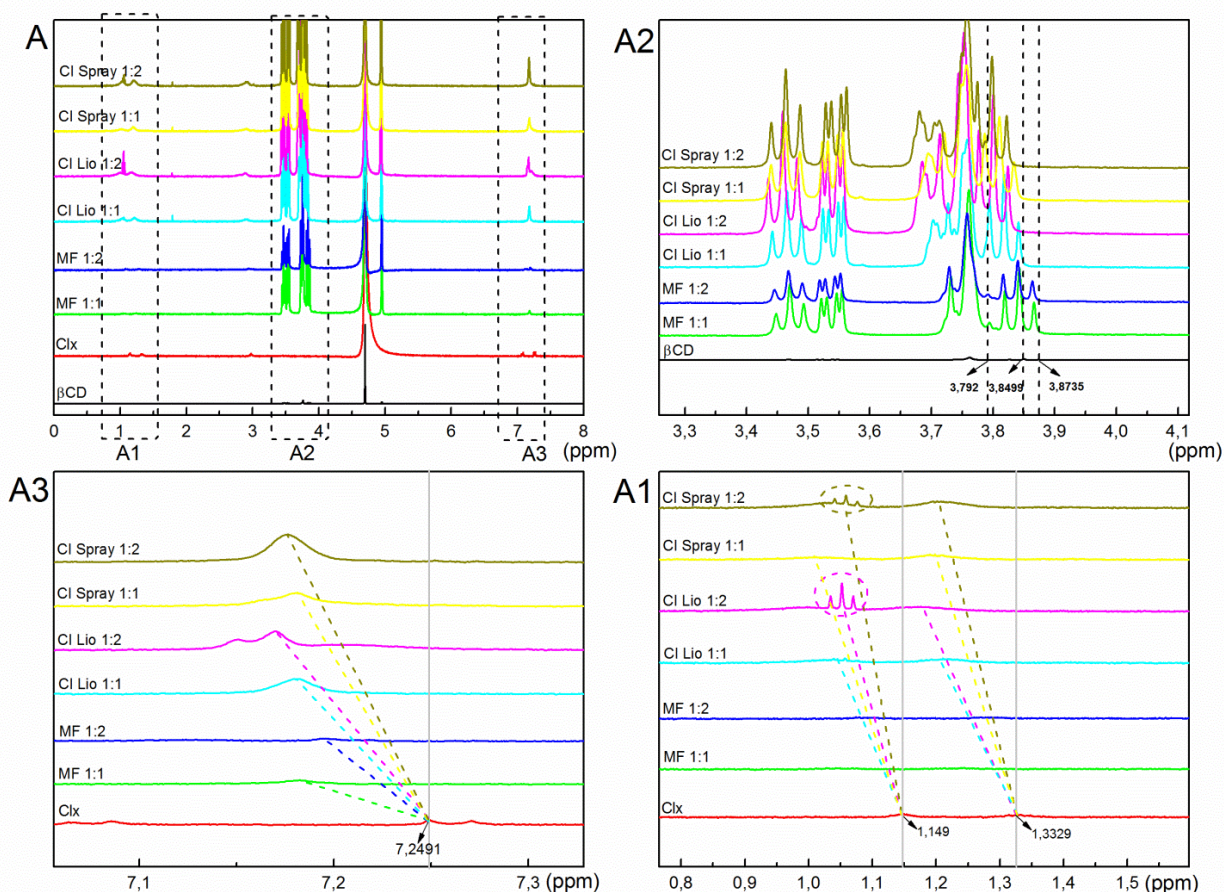
Na Figura 21A1, estão apresentados os espectros aproximados para a região da guanidina da Clx (H-4' e H-5').<sup>54,75</sup> Pode ser observado um grande deslocamento dos picos característicos da Clx em todos os CI (Tabela 2 - H-4' e H-5'). Nota-se que o H-5' passou a ser em um tripleto após a inclusão da Clx na  $\beta$ CD nos CI Lio e CI Spray 1:2. Essa mudança drástica deste perfil de  $^1\text{H}$  RMN comprova a complexação,<sup>47</sup> além de mostrar que os NH apresentam um efeito “escudo” após a inclusão, sugerindo a formação de uma nova ligação de hidrogênio da Clx com a  $\beta$ CD.<sup>47</sup> Portanto, a primeira hipótese do estudo foi aceita.

A Figura 21A2 é correspondente à região característica dos picos da  $\beta$ CD (Tabela 3). Enquanto os picos referentes aos hidrogênios externos à molécula, H-1' e H-4',<sup>54,76</sup> deslocaram muito pouco, os hidrogênios internos, H-3' e H-5',<sup>54,76</sup> apresentaram grandes alterações, principalmente nos CI Lio e CI Spray. Estas alterações comprovaram que a molécula da Clx está no interior da cavidade da  $\beta$ CD e sugere a formação de um efeito “escudo” dos elétrons aromáticos, confirmando, assim, a presença do anel aromático da Clx na cavidade da  $\beta$ CD.<sup>47,76</sup> O fato de as alterações dos picos referentes ao H-3' terem sido maiores do que as alterações ocorridas no H-5' (o H-3' desapareceu com a complexação), sugere que a molécula da Clx entra pela região da hidroxila secundária na cavidade da  $\beta$ CD.<sup>76</sup> Porém, o H-

6' apresentou grandes alterações após a complexação 1:2, comprovando que, apesar de a Clx entrar pela região da hidroxila secundária, a hidroxila primária interage também com a molécula, com o efeito “escudo” dos elétrons aromáticos.<sup>76</sup>

A Figura 21A3 corresponde à região do anel aromático da Clx (Tabela 2 – H-1' e H-2').<sup>54</sup> O pico referente ao hidrogênio H-1' do anel aromático desapareceu em todos os CI, enquanto que o referente ao H-2' do anel aromático apresentou deslocamentos e mudanças na sua intensidade. Estes resultados são relatados como distúrbios na densidade eletrônica do anel aromático da Clx causado pelos elétrons não unidos dos oxigênios da  $\beta$ CD, devido à formação de interações dipolares.<sup>50,51</sup>

FIGURA 21 – Espectros de  $^1\text{H}$  RMN. **A** – Espectros comparados a uma mesma escala. **A1** – Espectros aproximados da região da guanidina da Clx. **A2** – Espectros aproximados da região correspondente à  $\beta$ CD. **A3** – Espectros aproximados da região do anel aromático da Clx



Fonte: A autora.

TABELA 2 – Deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  da molécula de Clx nos diferentes métodos

| $^1\text{H}$ | $\delta \text{ } ^1\text{H}$ (ppm) | $\Delta\delta \text{ } ^1\text{H}$ (ppm) |        |            |            |              |              |
|--------------|------------------------------------|------------------------------------------|--------|------------|------------|--------------|--------------|
|              |                                    | MF 1:1                                   | MF 1:2 | CI Lio 1:1 | CI Lio 1:2 | CI Spray 1:1 | CI Spray 1:2 |
| 1'           | 7,27                               | *                                        | *      | *          | *          | *            | *            |
| 2'           | 7,24                               | 0,0671                                   | 0,0311 | 0,0695     | 0,0793     | 0,0686       | 0,0729       |
| 3'           | 2,97                               | *                                        | 0,0467 | 0,0742     | 0,0844     | 0,0772       | 0,0645       |
| 4'           | 1,33                               | 0,0929                                   | 0,0629 | 0,1219     | 0,1583     | 0,1423       | 0,1317       |
| 5'           | 1,14                               | 0,1090                                   | 0,0690 | 0,0921     | 0,0968***  | 0,1416       | 0,0904***    |

\* Pico que desapareceu após a inclusão. \*\*\* Tripleto após a inclusão.

Fonte: A autora.

TABELA 3 – Deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  da molécula de  $\beta\text{CD}$  nos diferentes métodos

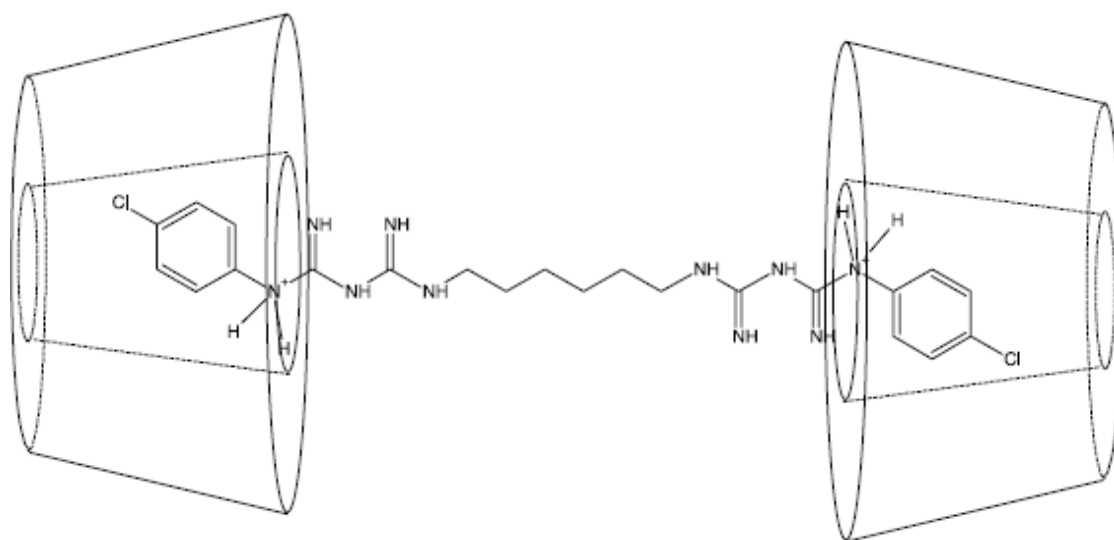
| $^1\text{H}$ | $\delta \text{ } ^1\text{H}$ (ppm) | $\Delta\delta \text{ } ^1\text{H}$ (ppm) |         |            |            |              |              |
|--------------|------------------------------------|------------------------------------------|---------|------------|------------|--------------|--------------|
|              |                                    | MF 1:1                                   | MF 1:2  | CI Lio 1:1 | CI Lio 1:2 | CI Spray 1:1 | CI Spray 1:2 |
| 1'           | 4,9571                             | -0,0019                                  | 0,0007  | 0,0049     | 0,0123     | 0,0079       | 0,0077       |
| 3'           | 3,8735                             | 0,0069                                   | 0,0097  | *          | *          | *            | *            |
| 4'           | 3,5478                             | -0,0074                                  | -0,0046 | -0,0012    | 0,0005     | 0,0000       | -0,0056      |
| 5'           | 3,7920                             | -0,0024                                  | 0,0007  | -0,0021    | -0,0085    | 0,0055       | -0,0064      |
| 6'           | 3,8499                             | 0,0070                                   | 0,0097  | 0,0086     | *          | 0,0161       | *            |

\* Pico que desapareceu após a inclusão. \*\*\* Tripleto após a inclusão.

Fonte: A autora.

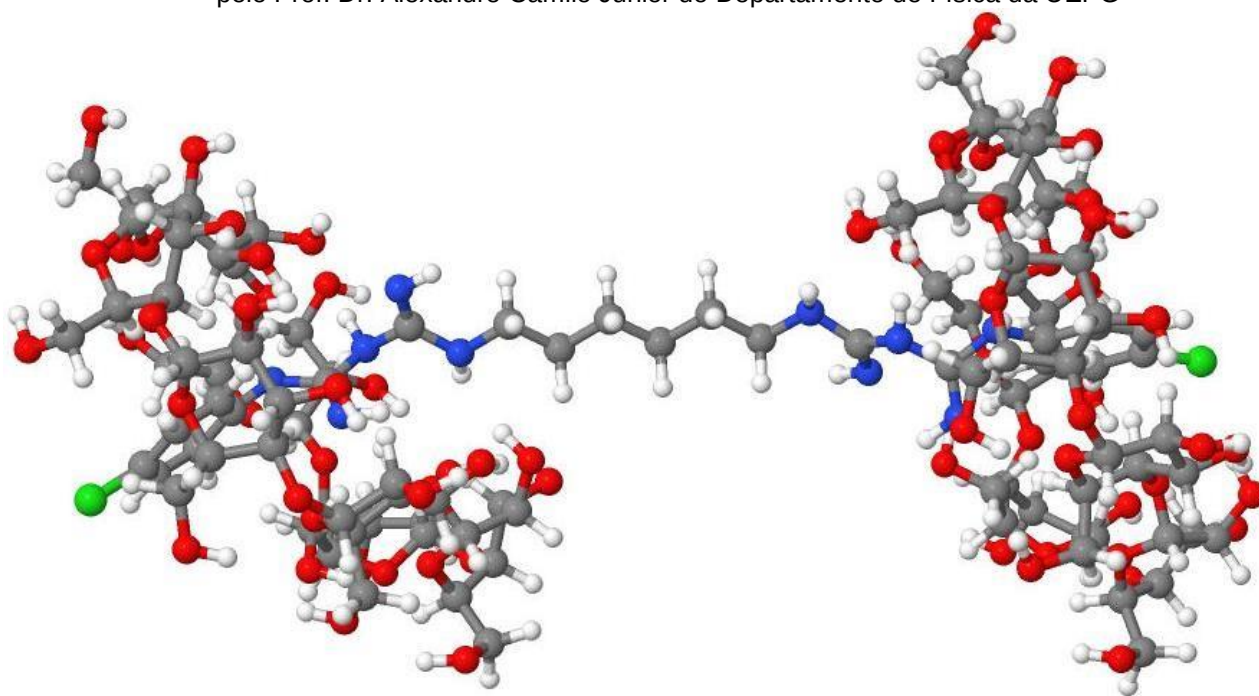
Com base nos resultados obtidos por  $^1\text{H}$  RMN, pôde ser verificado que os CI 1:2 apresentaram melhor complexação devido às maiores alterações encontradas nos picos referentes às moléculas de Clx e  $\beta\text{CD}$ . Foi possível concluir que a molécula da Clx entra na cavidade da  $\beta\text{CD}$  pela região do hexil secundário e entra até a região da guanidina. A hidroxila primária também apresenta interação com o anel aromático da Clx. Com base nestes resultados, as Figuras 22 e 23 mostram a possível interação ocorrida entre a  $\beta\text{CD}$  e a Clx na complexação 1:2.

FIGURA 22 – Representação da possível complexação entre Clx e  $\beta$ CD na proporção molar 1:2



Fonte: Denadai AM, et al. Supramolecular self-assembly of  $\beta$ -cyclodextrin: an effective carrier of the antimicrobial agent chlorhexidine. Carbohydr Res. 2007;342(15):2286-96.<sup>50</sup>

FIGURA 23 – Imagem da complexação 1:2 Clx: $\beta$ CD (vista lateral) obtida por modelagem molecular pelo Prof. Dr. Alexandre Camilo Junior do Departamento de Física da UEPG



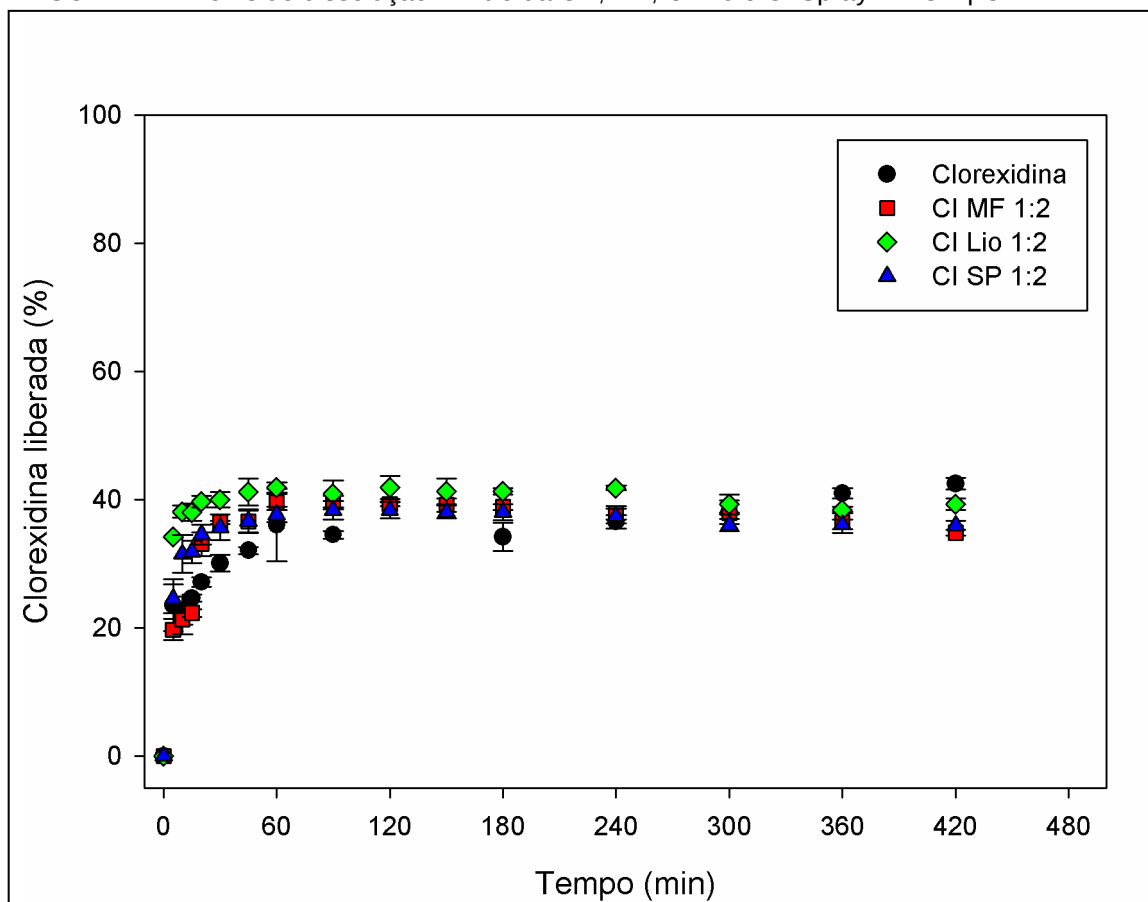
Fonte: Imagem cedida pelo Prof. Dr. Alexandre Camilo Junior

#### 5.4 TESTE DE LIBERAÇÃO IN VITRO

Para o estudo de dissolução in vitro, foram selecionados todos os métodos (MF, Lio e Spray) na proporção molar 1:2 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 com melhor complexação devido ao desaparecimento do ponto de fusão da Clx na análise em DSC. Além disso, nesta proporção molar foram observadas as maiores alterações de prótio evidenciadas nas análises em  $^1\text{H}$  RMN.

A Figura 24 representa os perfis de dissolução in vitro em água da Clx e dos CI 1:2. Os resultados de dissolução in vitro obtidos nos primeiros 60 min foram os seguintes: 35,98%, 39,60%, 41,86% e 37,66% para a Clx, MF 1:2, CI 1:2 Lio e CI 1:2 Spray, respectivamente. Portanto, a matriz oligossacarídea utilizada resultou em uma mecânica de liberação imediata do fármaco a partir dos CI.

FIGURA 24 – Perfis de dissolução in vitro da Clx, MF, CI Lio e CI Spray 1:2 Clx:βCD



Fonte: A autora.

Considerando a Equação 3, os resultados de eficiência de dissolução ao final de 420 min 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 4.

Tabela 4. 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             | 3                  | 23,2              | 7,7              | 8,3 | 0,0105 |
| Resíduo           | 7                  | 6,5               | 0,9              |     |        |
| Total             | 10                 | 29,8              |                  |     |        |

Fonte: A autora.

Uma vez que a análise de variância mostrou que houve diferença estatisticamente significativa ( $p=0,0105$ ), foi realizado o teste complementar paramétrico de Tukey para verificar entre quais grupos houve diferença. O resultado da análise de Tukey pode ser visualizado na Tabela 5.

Tabela 5. Resultados médios (desvio padrão) percentuais de eficiência de dissolução

| Clx            | MF 1:2         | CI Lio 1:2     | CI Spray 1:2   |
|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 35,85 (1,09) B | 36,94 (0,80) B | 40,06 (0,97) A | 36,53 (0,99) B |

Fonte: A autora. Letras iguais indicam valores médios sem diferença estatisticamente significativa ( $\alpha=0,05$ ).

A Tabela 5 mostra que o CI Lio 1:2 apresentou a mais alta eficiência de dissolução ( $p<0,05$ ) em relação à Clx não complexada e aos demais CI, os quais não demonstraram diferenças significantes entre si ( $p>0,05$ ) durante o período de 420 min da análise de liberação in vitro. Além disso, o CI 1:2 Lio também apresentou um perfil de liberação mais rápido em relação ao da Clx.

Os modelos matemáticos, representados pelas Equações de 4 a 7, foram aplicados aos perfis de dissolução do fármaco e dos CI 1:2. Os resultados obtidos podem ser visualizados nas Tabelas 6 a 9.

Tabela 6. Modelagem matemática pela equação monoexponencial para a Clx e os CI 1:2 Lio e Spray

| Material     | R      | MSC   | k      |
|--------------|--------|-------|--------|
| Clx          | 0,7247 | -1,22 | 0,0020 |
| MF 1:2       | 0.5255 | -1.37 | 0.0022 |
| CI 1:2 Lio   | 0.3250 | -1.95 | 0.0025 |
| CI 1:2 Spray | 0.4266 | -1.79 | 0.0021 |

Fonte: A autora.

Tabela 7. Modelagem matemática pela equação biexponencial para a Clx e os CI 1:2 Lio e Spray

| Material     | R      | MSC  | A    | $\alpha$ (min <sup>-1</sup> ) | B    | $\beta$ (min <sup>-1</sup> ) |
|--------------|--------|------|------|-------------------------------|------|------------------------------|
| Clx          | 0,9726 | 2,34 | 0,70 | 0,0004                        | 0,28 | 0,2062                       |
| MF 1:2       | 0,9742 | 2,47 | 0,61 | 2,1312                        | 0,36 | 0,0829                       |
| CI 1:2 Lio   | 0,9926 | 3,72 | 0,59 | 1,1823                        | 0,40 | 0,3571                       |
| CI 1:2 Spray | 0,9905 | 3,46 | 0,63 | 1,2921                        | 0,36 | 0,1916                       |

Fonte: A autora.

Tabela 8. Modelagem matemática pela equação ordem zero para a Clx e os CI 1:2 Lio e Spray

| Material     | R      | MSC   | K      |
|--------------|--------|-------|--------|
| Clx          | 0,6983 | -1,36 | 0,1351 |
| MF 1:2       | 0,4593 | -1,56 | 0,0140 |
| CI 1:2 Lio   | 0,2716 | -2,11 | 0,1521 |
| CI 1:2 Spray | 0,3736 | -1,95 | 0,1394 |

Fonte: A autora.

Tabela 9. Modelagem matemática pela equação Weibull para a Clx e os CI 1:2 Lio e Spray

| Material     | R      | MSC  | B    | t (min)        | Td (min)       |
|--------------|--------|------|------|----------------|----------------|
| Clx          | 0,9848 | 3,07 | 0,13 | 3.53362365E-16 | 338939.3866    |
| MF 1:2       | 0,9084 | 1,36 | 0,10 | 9.68880072E-14 | 1498043.9121   |
| CI 1:2 Lio   | 0,9493 | 1,88 | 0,06 | 1.29241201E-11 | 174772814.8491 |
| CI 1:2 Spray | 0,9674 | 2,37 | 0,05 | 5.10615698E-14 | 1.53305189E+10 |

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. O perfil de liberação da Clx revelou um melhor ajuste dos dados experimentais para o modelo de Weibull (Tabela 9), enquanto todos os CI foram melhor ajustados ao modelo biexponencial (Tabela 7) em relação aos outros modelos testados.

Assim, foi possível estabelecer que no comportamento de liberação do fármaco a partir de todos os CI (MF, CI Lio e CI Spray 1:2), a Clx que se encontra livre da cavidade da  $\beta$ CD sofre inicialmente uma liberação rápida ( $\alpha$ ; constante cinética da etapa rápida de liberação), enquanto que a Clx associada à cavidade da  $\beta$ CD apresenta uma liberação mais lenta ( $\beta$ ; constante cinética da etapa lenta de liberação).<sup>77</sup> Esta alteração do modelo cinético de liberação de Weibull descrevendo uma sigmoide com liberação lenta inicial para biexponencial também é um indicativo de complexação. Os resultados obtidos no teste de dissolução confirmam a segunda hipótese do estudo.

Na proporção 1:2 Clx: $\beta$ CD, há um deslocamento no equilíbrio de complexação em função da formação do complexo. Deste modo, a liberação da Clx é mais lenta em função do tempo, ou seja, modificada pela complexação.<sup>77</sup> 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<sup>78</sup> até o final do tratamento da estomatite protética, quando incorporadas ao material condicionador de tecido. Com isso, a baixa biodisponibilidade da Clx 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 clorexidina foi complexado 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 1:2.

O complexo de inclusão clorexidina: $\beta$ -ciclodextrina obtido por liofilização na proporção molar 1:2 apresentou melhor eficiência de dissolução que a clorexidina não complexada e uma 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 condicionador de tecido.

## REFERÊNCIAS

1. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J*. 2002 Aug;78(922):455-9.
2. Coelho CM, Sousa YT, Dare AM. Denture-related oral mucosal lesions in a Brazilian school of dentistry. *J Oral Rehabil*. 2004 Feb;31(2):135-9.
3. Banting DW, Hill SA. Microwave disinfection of dentures for the treatment of oral candidiasis. *Spec Care Dentist*. 2001 21(1):4-8.
4. Banting DW, Greenhorn PA, McMinin JG. Effectiveness of a topical antifungal regimen for the treatment of oral candidiasis in older, chronically ill, institutionalized, adults. *J Can Dent Assoc*. 1995 Mar;61(3):199-200, 3-5.
5. Barbeau J, Seguin J, Goulet JP, de Koninck L, Avon SL, Lalonde B, et al. Reassessing the presence of *Candida albicans* in denture-related stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003 Jan;95(1):51-9.
6. Torres SR, Peixoto CB, Caldas DM, Silva EB, Akiti T, Nucci M, et al. Relationship between salivary flow rates and *Candida* counts in subjects with xerostomia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002 Feb;93(2):149-54.
7. Lombardi T, Budtz-Jorgensen E. Treatment of denture-induced stomatitis: a review. *Eur J Prosthodont Restor Dent*. 1993 Sep;2(1):17-22.
8. Neppelenbroek KH, Pavarina AC, Palomari Spolidorio DM, Sgavioli Massucato EM, Spolidorio LC, Vergani CE. Effectiveness of microwave disinfection of complete dentures on the treatment of *Candida*-related denture stomatitis. *J Oral Rehabil*. 2008 Nov;35(11):836-46.
9. Carter GM, Kerr MA, Shepherd MG. The rational management of oral candidosis associated with dentures. *N Z Dent J*. 1986 Jul;82(369):81-4.
10. Mathaba LT, Davies G, Warmington JR. The genotypic relationship of *Candida albicans* strains isolated from the oral cavity of patients with denture stomatitis. *J Med Microbiol*. 1995 May;42(5):372-9.

11. Sato M, Tsuchiya H, Akagiri M, Takagi N, Iinuma M. Growth inhibition of oral bacteria related to denture stomatitis by anti-candidal chalcones. *Aust Dent J*. 1997 Oct;42(5):343-6.
12. Nikawa H, Yamamoto T, Hamada T, Rahardjo MB, Murata H, Nakanoda S. Antifungal effect of zeolite-incorporated tissue conditioner against *Candida albicans* growth and/or acid production. *J Oral Rehabil*. 1997 May;24(5):350-7.
13. McCabe JF, Carrick TE, Kamohara H. Adhesive bond strength and compliance for denture soft lining materials. *Biomaterials*. 2002 Mar;23(5):1347-52.
14. Urban VM, Seo RS, Giannini M, Arrais CA. Superficial distribution and identification of antifungal/antimicrobial agents on a modified tissue conditioner by SEM-EDS microanalysis: a preliminary study. *J Prosthodont*. 2009 Oct;18(7):603-10.
15. Jones DW, Hall GC, Sutow EJ, Langman MF, Robertson KN. Chemical and molecular weight analyses of prosthodontic soft polymers. *J Dent Res*. 1991 May;70(5):874-9.
16. Makila E, Hopsu-Havu VK. Mycotic growth and soft denture lining materials. *Acta Odontol Scand*. 1977 35(4):197-205.
17. Nikawa H, Iwanaga H, Kameda M, Hamada T. In vitro evaluation of *Candida albicans* adherence to soft denture-lining materials. *J Prosthet Dent*. 1992 Nov;68(5):804-8.
18. Makila E, Honka O. Clinical study of a heat-cured silicone soft lining material. *J Oral Rehabil*. 1979 Apr;6(2):199-204.
19. Nikawa H, Iwanaga H, Hamada T, Yuhta S. Effects of denture cleansers on direct soft denture lining materials. *J Prosthet Dent*. 1994 Dec;72(6):657-62.
20. Schneid TR. An in vitro analysis of a sustained release system for the treatment of denture stomatitis. *Spec Care Dentist*. 1992 Nov-Dec;12(6):245-50.

21. Bueno M, Urban V, Barberio G, da Silva W, Porto V, Pinto L, et al. Effect of antimicrobial agents incorporated into resilient denture relines on the *Candida albicans* biofilm. *Oral Dis.* 2015 Jan;21(1):57-65.
22. Truhlar MR, Shay K, Sohnle P. Use of a new assay technique for quantification of antifungal activity of nystatin incorporated in denture liners. *J Prosthet Dent.* 1994 May;71(5):517-24.
23. Urban VM, de Souza RF, Arrais CA, Borsato KT, Vaz LG. Effect of the association of nystatin with a tissue conditioner on its ultimate tensile strength. *J Prosthodont.* 2006 Sep-Oct;15(5):295-9.
24. Hoad-Reddick G, Grant AA, Griffiths CS. Investigation into the cleanliness of dentures in an elderly population. *J Prosthet Dent.* 1990 Jul;64(1):48-52.
25. Bueno MG, Lima JFM, Sousa EJB, Soares S, Urban VM, Neppelenbroek KH. Hardness of temporary liners modified by antimicrobial MICs for *C. albicans*. In: IADR 90th General Session; 2012; Foz do Iguaçu; 2012.
26. Neppelenbroek KH, Bueno MG, Sousa EJB, Hotta J, Soares S, Urban VM. Incorporation of fungal MICs on roughness of denture liners. In: IADR 90th General Session; 2012; Foz do Iguaçu; 2012.
27. Galitesi LL, Lima JFM, Urban VM, Hotta J, Souza RF, Neppelenbroek KH. Resistência à tração de reembasador temporário modificado com antimicrobianos. In: 25º Congresso Odontológico de Bauru; 2012; Bauru; 2012.
28. Neppelenbroek KH, Galitesi LL, Bueno MG, Soares S, Freitas R, Oliveira PCG, et al. Ultimate tensile strength of temporary liners after addition of antimicrobials. In: Sixth International Association for Dental Research Pan-European Region Meeting (IADR/PER); 2012; Helsinki; 2012.
29. Sánchez-Aliaga A, Pellissari CVG, Arrais CAG, Michel MD, Neppelenbroek KH, Urban VM. Peel bond strength of soft lining with antifungal to a denture base acrylic resin. *Dent Mater J.* 2016 35(2):194-203.

30. Sánchez-Aliaga A. Efeito da incorporação de fármacos antifúngicos sobre a morfologia de superfície e a liberação in vitro de materiais macios temporários para base de prótese. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2014.
31. Brow CK, Nickerson HPCB, Reed RA, Rohrs BR, Shah PA. Acceptable analytical practices for dissolution testing of poorly soluble compounds. *Pharm Technol.* 2004 Dec;28(12):58-65.
32. Stegemanna S, Leveiller FB, Franchic D, Jongd H, Lind'ene H. When poor solubility becomes an issue: from early stage to proof of concept european. *J Pharm Sci.* 2007 31:249-61.
33. Amidon GL, Lennernas H, Shah VP, Crison JR. A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution an in vivo bioavailability. *Pharm Res.* 1995 Mar;12(3):413-20.
34. Aungst B, Shen DD. Gastrointestinal absorption of toxic agents. In: Rozman K, Hanninen O, editors. *Gastrointestinal toxicology.* Amsterdam: Elsevier; 1986. p. 29-56.
35. Loftsson T, Brewster ME. Pharmaceutical applications of cyclodextrin I. Drug solubilization and stabilization. *J Pharm Sci.* 1996 85(10):1017-25.
36. Hoppe JE. 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.* 1997 Mar;16(3):288-93.
37. Uekama K. Design and evaluation of cyclodextrin-based drug formulation. *Chem Pharm Bull.* 2004 Aug;52(8):900-15.
38. Duchêne D, Wouessidjewe D. Physicochemical characteristics and pharmaceutical uses of cyclodextrin derivates, part I. *Pharm Technol.* 1990 6:26-34.
39. Frömming KL, Szejtli J. *Cyclodextrins in pharmacy.* Dordrecht: Klumer Academic Publishers; 1993.

40. Uekama K, Hirayama F, Irie T. Cyclodextrin drug carrier systems. *Chem Rev.* 1998 Jul;98(5):2045-76.
41. Rama ACR, Veiga F, Figueiredo IV, Caramona M. Aspectos biofarmacêuticos da formulação de medicamentos para neonatos. Fundamentos da complexação de indometacina com hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina para tratamento oral do fechamento do canal arterial. *Rev Bras Cienc Farm.* 2005 July/Sept.;41(3):281-99.
42. Zhang GGZ, Law D, Schmitt EA, Qiu Y. Phase transformation considerations during process development and manufacture of solid oral dosage forms. *Adv Drug Deliv Rev.* 2004 Feb;56(3):371-90.
43. Zang X, Wu D, Lai J, Lu Y, Yin Z, Wu W. Piroxicam/2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex prepared by a new fluid-bed coating techning. *J Pharm Sci.* 2009 Feb;98(2):665-75.
44. Carrier RL, Miller LA, Ahmed I. The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. *J Control Release.* 2007 Nov;123(2):78-99.
45. Pilcer G, Vanderbist F, Amighi K. Preparation and characterization of spray-dried tobramycin powders containing nanoparticles for pulmonary delivery. *Int J Pharm.* 2009 Jan;365(1-2):162-9.
46. 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.* 2009 Sep;73(1):121-9.
47. Cortés ME, Sinisterra RD, Avila-Campos MJ, Tortamano N, Rocha RG. The chlorhexidine: $\beta$ -cyclodextrin inclusion compound: preparation, characterization and microbiological evaluation. *J Inclus Phenom Macrocyc Chem.* 2001 Aug;40(4):297- 302.

48. Franco CF, Pataro AL, E. Souza LC, Santos VR, Cortés ME, Sinisterra RD. In vitro effects of a chlorhexidine controlled delivery system. *Artif Organs*. 2003 May;27(5):486-91.
49. Yue IC, Poff J, Cortes ME, Sinisterra RD, Faris CB, Hildgen P, et al. A novel polymeric chlorhexidine delivery device for the treatment of periodontal disease. *Biomaterials*. 2004 Aug;25(17):3743-50.
50. Denadai AM, Teixeira KI, Santoro MM, Pimenta AMC, Cortés ME, Sinisterra RD. Supramolecular self-assembly of  $\beta$ -cyclodextrin: an effective carrier of the antimicrobial agent chlorhexidine. *Carbohydr Res*. 2007 May;342(15):2286-96.
51. Raso EMG, Cortés ME, Teixeira KI, Franco MB, Mohallem NDS, Sinisterra RD. A new controlled release system of chlorhexidine and chlorhexidine: $\beta$ cd inclusion compounds based on porous silica. *J Incl Phenom Macrocycl Chem*. 2010 Jun;67(1):159-68.
52. Pupe CG, Villardi M, Rodrigues CR, Rocha HV, Maia LC, de Sousa VP, et al. Preparation and evaluation of antimicrobial activity of nanosystems for the control of oral pathogens *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *Int J Nanomedicine*. 2011 6:2581-90.
53. Teixeira KIR, Araújo PV, Sinisterra RD, Cortés ME. Chlorhexidine:beta-cyclodextrin inhibits yeast growth by extraction of ergosterol. *Braz J Microbiol*. 2012 Apr- Jun;43(2):810-8.
54. Lavoine N, Tabary N, Desloges I, Martel B, Bras J. Controlled release of chlorhexidine digluconate using beta-cyclodextrin and microfibrillated cellulose. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2014 Sep;121:196-205.
55. Teixeira KI, Denadai AM, Sinisterra RD, Cortes ME. Cyclodextrin modulates the cytotoxic effects of chlorhexidine on microorganisms and cells in vitro. *Drug Deliv*. 2015 May;22(3):444-53.

56. Higuchi T, Connors KA. Phase-solubility techniques. *Adv Anal Chem Instr.* 1965 4:117- 22.
57. Veiga F, Pecorelli C, Ribeiro L. *As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica.* 1 ed. Coimbra: Editora Minerva; 2006.
58. Riekes MK, Tagliari MP, Granada A, Kuminek G, Silva MAS, Stulzer HK. Enhanced solubility and dissolution rate of amiodarone by complexation with  $\beta$ -cyclodextrin through different methods. *Mat Sci Engineering C.* 2010:1008-13.
59. Brewster ME, Loftsson T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007 59:645-66.
60. Loftsson T, Hreinsdottir D, Masson M. Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs. *Int J Pharm.* 2005 Sep;302(1-2):18-28.
61. Meirelles LMA. *Incremento de solubilidade do fármaco rifampicina por complexo de inclusão e dispersão sólida.* Teresina: Universidade Federal do Piauí; 2012.
62. Singh K, Chand P, Singh BP, Patel CB. Study of the effect of surface treatment on the long term effectiveness of tissue conditioner. *J Oral Sci.* 2010 Jun;52(2):261-5.
63. Lyra MAM, Alves LDS, Fontes DAF, Soares Sobrinho JL, Rolim Neto PJ. Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina. *Rev Cienc Farmac Bas Apl.* 2010 31:117-24.
64. Farago PV, Cruz L, Rodrigues LNC, Pohmann AR, Guterres SS, Zawadzki SF. Sistema reticulado constituído por poli(álcool vinílico),  $\beta$ -ciclodextrina e glutaraldeído na microencapsulação do cloridrato de metformina. In: 9º Congresso Brasileiro de Polímeros. Campina Grande; 2007.
65. Rusa CC, Luca C, Tonelli AE. Polymer-cyclodextrin inclusion compounds: toward new aspects of their inclusion mechanism. *Macromolecules.* 2001 Jan;34(5):1318-22.

66. Corti G, Capasso G, Maestrelli F, Cirri M, Mura P. Physical-chemical characterization of binary systems of metformin hydrochloride with triacetyl- $\beta$ -cyclodextrin. *J Pharm Biomed Anal.* 2007 45:480-6.
67. Patel HM, Suhagia BN, Shah SA, Rathod IS, Parmar VK. Preparation and characterization of etoricoxib- $\beta$ -cyclodextrin complexes prepared by the kneading method. *Acta Pharm.* 2007 57:351-9.
68. Markovich RJ, Evans CA, Coscolluela CB, Zibas SA, Rosen J. Spectroscopic identification of an amorphous-to-crystalline drug transition in a solid dispersion SCH 48461 capsule formulation. *J Pharm Biomed Anal.* 1997 Dec;16(4):661-73.
69. Cunha-Filho MSS, Sá-Barreto LCL. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. *Rev Ciênc Farm Basica Apl.* 2007 28(1):1-9.
70. Mendonça EAM, Lira MCB, Rabello MM, Cavalcanti IMF, Galdino SL, Pitta IR, et al. Enhanced antiproliferative activity of the new anticancer candidate LPSF/AC04 in cyclodextrin inclusion complexes encapsulated into liposomes. *AAPS PharmSciTech.* 2012 13(14):1355-66.
71. Oliveira RA. Avaliação do efeito antimicrobiano in vitro de quitosana e da associação quitosana/clorexidina sobre saliva e *Streptococcus mutans*. São Carlos: Escola de Engenharia de São Carlos/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Instituto de Química de São Carlos; 2004.
72. Pinto LMA, Fraceto LF, Santana MHA, Pertinhez TA, Junior SO, de Paula E. Physico- chemical characterization of benzocaine- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes. *J Pharm Biomed Anal.* 2005 39:956-63.
73. Bratu I, Gavira-Vallejo JM, Hernanz A.  $^1\text{H}$ -NMR study of the inclusion processes for  $\alpha$ - and  $\gamma$ -cyclodextrin with fenbuten. *Biopolymers.* 2005 Apr;77(6):361-7.
74. Gottlieb HE, Kotlyar V, Nudelman A. NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities. *J Org Chem.* 1997 62:7512-5.

75. Fraceto LF, Gonçalves MM, Moraes CM, Araújo DR, Zanella L, de Paula E. Caracterização do complexo de inclusão ropivacaína:β-ciclodextrina. Quim Nova. 2007 30(5):1203-7.
76. Qi H, Nishihata T, Rytting JH. Study of the interaction between beta-cyclodextrin and chlorhexidine. Pharm Res. 1994 11(8):1207-10.
77. Melo NFS, Grillo R, Moraes CM, Brito CL, Trossini GHG, Menezes CMS, et al. Preparação e caracterização inicial de complexo de inclusão entre nitrofurazona e 2- hidroxipropil-β-ciclodextrina. Rev Ciênc Farm Basica Apl. 2007 28(1):35-44.
78. Peng H, Xiong H, Li J, Xie M, Liu Y, Bai C, et al. Vanilla cross-linked chitosan micropheres for controlled release of resveratrol. Food Chem. 2010 Nov;121:23-8.