



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

FERNANDO JOSÉ DE LIMA RAMOS JÚNIOR

**Desenvolvimento e caracterização de complexos de inclusão com atividade  
antifúngica contendo derivado do ácido bifenílico e  $\beta$ -ciclodextrina**

Recife  
2018

FERNANDO JOSÉ DE LIMA RAMOS JÚNIOR

**Desenvolvimento e caracterização de complexos de inclusão com atividade antifúngica contendo derivado do ácido bifenílico e  $\beta$ -ciclodextrina**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, em cumprimento às exigências para obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêutica.

**Área de concentração:** Fármacos e Medicamentos.

**Orientador:** Prof. Dr. Rui Oliveira Macêdo.

**Coorientador:** Prof. Dr. Fábio Santos de Souza.

Recife  
2018

Catálogo na fonte  
Bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4:1895

- R175d Ramos Júnior, Fernando José de Lima.  
Desenvolvimento e caracterização de complexos de inclusão com atividade antifúngica contendo derivado do ácido bifenílico e  $\beta$ -ciclodextrina / Fernando José de Lima Ramos Júnior. – 2018.  
101 f.; il.; 30 cm.
- Orientador: Rui Oliveira Macêdo.  
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2018.
- Inclui referências e apêndices.
1. Cristalografia. 2. Microscopia eletrônica de varredura. 3. Difração de raios X . I. Macêdo, Rui Oliveira (orientador). II. Título.
- 615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2018 - 196)

FERNANDO JOSÉ DE LIMA RAMOS JÚNIOR

**Desenvolvimento e caracterização de complexos de inclusão com atividade antifúngica contendo derivado do ácido bifenílico e  $\beta$ -ciclodextrina**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, em cumprimento às exigências para obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêutica.

Aprovado em 17 de maio de 2018

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Rui Oliveira Macêdo (Presidente e Orientador)  
Universidade Federal da Paraíba

---

Prof. Dra. Beate Saegesser Santos (Avaliadora Interna)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dra. Maria do Carmo Alves de Lima (Avaliadora Interna)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dra. Ana Cláudia Dantas de Medeiros (Avaliadora Externa)  
Universidade Estadual da Paraíba

---

Prof. Dra. Marta Maria Conceição (Avaliadora Externa)  
Universidade Federal da Paraíba

*A meu Pai, minha mãe, meu irmão e  
minha tia Alaíde (in memoriam).*

*Por toda dedicação para comigo.*

*Dedico.*

# AGRADECIMENTOS

Ao grandioso DEUS, pela sua imensurável fidelidade, benignidade, misericórdia, proteção e pelo dom da vida.

Aos meus queridos pais, Fernando e Adeziva, pelos ensinamentos, carinho, amor, dedicação, paciência; por sempre acreditarem na minha capacidade, sendo, por isso, os principais responsáveis pelas minhas conquistas.

Ao meu irmão, Felipe, pela paciência e hombridade que sempre me dedicou.

A minha tia Alaíde (*in memoriam*), que assumiu a função de avó materna, dedicando-me amor, carinho e acolhimento.

Aos meus professores, por terem sido peças fundamentais das minhas vitórias.

Aos professores Fábio e Rui, pelos ensinamentos e o auxílio, dando-me o privilégio de aprender com os seus exemplos.

A professora Ana Cláudia e ao professor Germano, pela amizade, confiança e ensinamentos.

Aos meus amigos, Deysiane, Nathália, Monik, Cinthya e Fabrício pelos conselhos, hombridade, companheirismo, enfim, pela convivência.

A todos que fizeram e fazem parte do LUDEM, pelas amizades construídas e as experiências compartilhadas.

A equipe da secretaria do PPGCF, nas pessoas de Nerilin e Rilvan, por não medirem esforços para ajudar na conclusão desse trabalho.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para minhas conquistas.

“Posso todas as coisas naquele que me fortalece” (Filipenses 4:13)

“Porque para Deus nada é impossível” (Lucas 1:37)

# RESUMO

Nas últimas décadas o uso indiscriminado de agentes antifúngicos levou ao avanço de microrganismos tolerantes aos diversos fármacos conhecidos no mercado. Logo, a busca por novos compostos e novas tecnologias capazes de originar formulações mais estáveis e com melhores atividades farmacológicas é de suma importância como alternativa para o desenvolvimento de novas terapêuticas. Assim, o objetivo desse trabalho foi desenvolver e caracterizar complexos de inclusão contendo derivado do ácido bifenílico e  $\beta$ -ciclodextrina, determinando as características físico-químicas e a atividade antimicrobiana do produto obtido. Na avaliação da atividade antifúngica foi realizado o método de microdiluição em caldo de acordo com os procedimentos do Clinical and Laboratory Standards Institute procedures, para determinação da citotoxicidade foi realizado o teste de atividade hemolítica e na caracterização foram utilizadas diferentes técnicas analíticas (Diagrama de Solubilidade de Fases, Calorimetria Exploratória Diferencial, Termogravimetria, Pirólise, Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, Difração de Raios X e Microscopia Eletrônica de Varredura), a fim de gerar robusta carta de identidade do fármaco e seus complexos e inclusão. Devido à ausência de métodos analíticos foi desenvolvido e validado um método para doseamento do Bifenil-4-Carboxilato de Metila (B4CMET), utilizando cromatografia líquida de alta eficiência. Observou-se com os dados obtidos uma excelente atividade antifúngica e baixa citotoxicidade para o B4CMET; a caracterização forneceu especificações físico-químicas do fármaco e seus complexos e um método analítico por cromatografia líquida foi desenvolvido e validado, permitindo o doseamento do fármaco. Desse modo, os resultados obtidos permitiram identificar a formação de complexos de inclusão do B4CMET com a  $\beta$ CD e avaliar as características físico-químicas do estado sólido do IFA complexado, evidenciando sua maior estabilidade e potencial uso como agente antimicótico contra *Candida* spp. Neste sentido, os complexos de B4CMET serão promissores no desenvolvimento de futuras formas farmacêuticas estáveis e seguras, como uma nova perspectiva no tratamento de doenças fúngicas.

**Palavras-chave:** Cristalografia. Microscopia eletrônica de varredura. Difração de raios X.



# ABSTRACT

In recent decades the indiscriminate use of antifungal agents has led to the advancement of microorganisms tolerant to the various drugs known in the market. Therefore, the search for new compounds and new technologies capable of giving more stable formulations with better pharmacological activities is of paramount importance as an alternative for the development of new therapeutics. Thus, the objective of the study was develop and characterize inclusion complexes containing biphenylic acid and  $\beta$ -cyclodextrin, determining the physicochemical characteristics and antimicrobial activity of the product obtained. In the evaluation of the antifungal activity the microdilution method was carried out in broth according to the Clinical and Laboratory Standards Institute procedures, for the determination of the cytotoxicity the hemolytic activity test was performed and in the characterization, different analytical techniques were used (Solubility Diagram of Phases, Differential Scanning Calorimetry, Thermogravimetry, Pyrolysis, Fourier Transform Infrared Spectroscopy, X-Ray Diffraction and Scanning Electron Microscopy), in order to generate robust identity of the drug and its complexes inclusion. Due to the lack of analytical methods, a method for the determination of Biphenyl-4-Methyl Carboxylate (B4CMET) was developed and validated using high performance liquid chromatography. An excellent antifungal activity and a low cytotoxicity for B4CMET were observed with the obtained data; the characterization provided physico-chemical specifications of the drug and its complexes and an analytical method by liquid chromatography was developed and validated, allowing drug dosing. Thus, the obtained results allowed to identify the formation of inclusion complexes of B4CMET with  $\beta$ CD and to understand the physical-chemical characteristics of the solid state of the complexed IFA, evidencing its greater stability and potential use as an antifungal agent against *Candida* spp. In this context, B4CMET complexes will be promising in the development of future stable and safe pharmaceutical forms, as a new perspective in the treatment of fungal diseases.

**Keywords:** Crystallography. Microscopy electron scanning. X-ray diffraction.

# LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|                                                                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Modificações moleculares .....                                                                                                              | 22 |
| <b>Figura 2.</b> Microplaca .....                                                                                                                            | 23 |
| <b>Figura 3.</b> Estrutura molecular do Bifenil.....                                                                                                         | 24 |
| <b>Figura 4.</b> Estrutura da Ciclodextrina .....                                                                                                            | 25 |
| <b>Figura 5.</b> Modelos de diagramas de solubilidade de fases .....                                                                                         | 28 |
| <b>Figura 6.</b> Tipos de DSC: com compensação de potência (a), com fluxo de calor (b)<br>.....                                                              | 29 |
| <b>Figura 7.</b> Modelo de Termobalança.....                                                                                                                 | 31 |
| <b>Figura 8.</b> Tipos de pirolisadores: modo contínuo (a), modo pulsado (b).....                                                                            | 33 |
| <b>Figura 9.</b> Diagrama de solubilidade de fases dos CI .....                                                                                              | 53 |
| <b>Figura 10.</b> Curvas DSC do B4CMET em diferentes razões de aquecimento .....                                                                             | 55 |
| <b>Figura 11.</b> Curvas DSC do B4CMET (Rz 10 °C min <sup>-1</sup> ), βCD (Rz 10 °C min <sup>-1</sup> ) e dos CI<br>em diferentes razões de aquecimento..... | 58 |
| <b>Figura 12.</b> Curvas TG do B4CMET em diferentes razões de aquecimento .....                                                                              | 59 |
| <b>Figura 13.</b> Curvas TG do B4CMET (Rz 10 °C min <sup>-1</sup> ), βCD (Rz 10 °C min <sup>-1</sup> ) e dos CI<br>em diferentes razões de aquecimento.....  | 60 |
| <b>Figura 14.</b> Pirogramas do B4CMET e CI em diferentes temperaturas.....                                                                                  | 62 |
| <b>Figura 15.</b> Espectros FTIR do B4CMET, βCD e CI .....                                                                                                   | 63 |
| <b>Figura 16.</b> Difrátogramas do B4CMET, βCD e CI.....                                                                                                     | 64 |
| <b>Figura 17.</b> Fotomicrografias do B4CMET, βCD e CI.....                                                                                                  | 66 |
| <b>Figura 18.</b> Picos obtidos com as condições cromatográficas testadas.....                                                                               | 69 |
| <b>Figura 19.</b> Picos obtidos no teste da seletividade.....                                                                                                | 70 |
| <b>Figura 20.</b> Curva de Calibração do B4CMET .....                                                                                                        | 71 |
| <b>Figura 21.</b> Gráfico do Resíduo para o B4CMET .....                                                                                                     | 71 |

# LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b> Exemplos de mecanismos de resistência da <i>Candida</i> sp .....                                                       | 21 |
| <b>Tabela 2.</b> Exemplos de derivados do Bifenil e suas atividades farmacológicas.....                                                 | 24 |
| <b>Tabela 3.</b> Exemplos de aplicação das Ciclodextrinas na área farmacêutica.....                                                     | 26 |
| <b>Tabela 4.</b> Exemplos de aplicação da DSC na área farmacêutica .....                                                                | 30 |
| <b>Tabela 5.</b> Exemplos de aplicação da TG na área farmacêutica.....                                                                  | 32 |
| <b>Tabela 6.</b> Exemplos de aplicação da Pir na área farmacêutica .....                                                                | 34 |
| <b>Tabela 7.</b> Exemplos de aplicação da FTIR na área farmacêutica.....                                                                | 35 |
| <b>Tabela 8.</b> Exemplos de aplicação da DRX na área farmacêutica .....                                                                | 36 |
| <b>Tabela 9.</b> Exemplos de aplicação da MEV na área farmacêutica .....                                                                | 37 |
| <b>Tabela 10.</b> Parâmetros para validação de método analítico segundo à finalidade ...                                                | 38 |
| <b>Tabela 11.</b> Concentração inibitória mínima do B4CMET e CI testados contra <i>Candida</i> spp .....                                | 50 |
| <b>Tabela 12.</b> Resultado do ensaio de citotoxicidade .....                                                                           | 52 |
| <b>Tabela 13.</b> Valores da eficiência de complexação e espontaneidade da reação de formação dos complexos de inclusão .....           | 54 |
| <b>Tabela 14.</b> Resultados da Fusão do Bifenil-4-Carboxilato de Metila.....                                                           | 56 |
| <b>Tabela 15.</b> Pureza do Bifenil-4-Carboxilato de Metila baseado na equação de van't Hoff.....                                       | 57 |
| <b>Tabela 16.</b> Etapa de decomposição do B4CMET em diferentes razões de aquecimento.....                                              | 59 |
| <b>Tabela 17.</b> Parâmetros Cinéticos do B4CMET e CI pelo método Ozawa com frações de decomposição $\alpha_{01}$ e $\alpha_{09}$ ..... | 61 |
| <b>Tabela 18.</b> Ângulos de difração em $2\theta$ para os picos do B4CMET e $\beta$ CD.....                                            | 65 |
| <b>Tabela 19.</b> Condições cromatográficas testadas no desenvolvimento.....                                                            | 68 |
| <b>Tabela 20.</b> Resultados da precisão intra e intercorridas .....                                                                    | 72 |
| <b>Tabela 21.</b> Dados obtidos no teste de recuperação para o método desenvolvido....                                                  | 73 |
| <b>Tabela 22.</b> Robustez do método cromatográfico .....                                                                               | 73 |
| <b>Tabela 23.</b> Dados obtidos no doseamento do B4CMET complexado.....                                                                 | 74 |

# LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|        |                                                             |
|--------|-------------------------------------------------------------|
| ATCC   | <i>American Type Culture Collection</i>                     |
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária                    |
| B4CMET | Bifenil-4-Carboxilato de Metila                             |
| BPF    | Boas Práticas de Fabricação                                 |
| Ceme   | Central de Medicamentos                                     |
| CI     | Complexo de Inclusão                                        |
| CIM    | Concentração Inibitória Mínima                              |
| CLAE   | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência                    |
| CLSI   | Clinical and Laboratory Standards Institute procedures      |
| DRX    | Difração de Raios X                                         |
| DSC    | Calorimetria exploratória diferencial                       |
| FTIR   | Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier |
| IFAs   | Insumos farmacêuticos ativos                                |
| LD     | Limite de Detecção                                          |
| LQ     | Limite de Quantificação                                     |
| MEV    | Microscopia Eletrônica de Varredura                         |
| min    | Minuto                                                      |
| mL     | Mililitro                                                   |
| Pir    | Pirólise                                                    |
| TG     | Termogravimetria                                            |
| µL     | Microlitro                                                  |
| °C     | Graus Celsius                                               |

# SUMÁRIO

|                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 INTRODUÇÃO.....                                                              | 15 |
| 2 OBJETIVOS.....                                                               | 17 |
| 2.1 Objetivo geral .....                                                       | 17 |
| 2.2 Objetivos específicos.....                                                 | 17 |
| 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....                                                   | 18 |
| 3.1 Setor farmacêutico brasileiro .....                                        | 18 |
| 3.2 Antifúngicos e resistência de <i>Candida</i> sp.....                       | 20 |
| 3.3 Novos compostos farmacêuticos .....                                        | 22 |
| 3.4 Determinação da atividade farmacológica .....                              | 23 |
| 3.5 Bifenil e seus derivados .....                                             | 23 |
| 3.6 Ciclodextrinas.....                                                        | 25 |
| 3.7 Obtenção de complexos de Inclusão .....                                    | 26 |
| 3.8 Caracterização dos complexos de inclusão .....                             | 27 |
| 3.8.1 Diagramas de solubilidade de fases .....                                 | 28 |
| 3.8.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....                         | 29 |
| 3.8.2.1 Aplicações farmacêuticas da DSC.....                                   | 30 |
| 3.8.3 Termogravimetria (TG).....                                               | 31 |
| 3.8.3.1 Aplicações farmacêuticas da TG .....                                   | 32 |
| 3.8.4 Pirólise (Pir).....                                                      | 32 |
| 3.8.4.1 Aplicações farmacêuticas da Pir .....                                  | 33 |
| 3.8.5 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) ..... | 34 |
| 3.8.5.1 Aplicações farmacêuticas da FTIR .....                                 | 35 |
| 3.8.6 Difração de Raios X (DRX) .....                                          | 36 |
| 3.8.6.1 Aplicações farmacêuticas da DRX.....                                   | 36 |
| 3.8.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....                           | 37 |
| 3.8.7.1 Aplicações farmacêuticas da MEV .....                                  | 37 |
| 3.9 Validação de métodos analíticos.....                                       | 38 |
| 3.9.1 Especificidade e seletividade .....                                      | 39 |
| 3.9.2 Linearidade.....                                                         | 39 |
| 3.9.3 Intervalo .....                                                          | 39 |
| 3.9.4 Precisão.....                                                            | 39 |
| 3.9.5 Exatidão.....                                                            | 40 |
| 3.9.6 Limite de detecção e Limite de quantificação .....                       | 40 |

|                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.9.7 Robustez .....                                                                     | 40 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS .....                                                              | 42 |
| 4.1 Materiais .....                                                                      | 42 |
| 4.2 Métodos .....                                                                        | 42 |
| 4.2.1 Preparação dos complexos de inclusão (CI) .....                                    | 42 |
| 4.2.2 Determinação da atividade antifúngica.....                                         | 42 |
| 4.2.3 Determinação da citotoxicidade por hemólise .....                                  | 43 |
| 4.2.4 Caracterização.....                                                                | 44 |
| 4.2.4.1 Estudo de solubilidade de fases .....                                            | 44 |
| 4.2.4.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....                                 | 44 |
| 4.2.4.3 Termogravimetria (TG) .....                                                      | 45 |
| 4.2.4.4 Pirólise acoplada a cromatografia gasosa/espectrometria de massa (Pir-GC-MS) ... | 45 |
| 4.2.4.5 Espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) .....         | 46 |
| 4.2.4.6 Difração de Raios-X (DRX) .....                                                  | 46 |
| 4.2.4.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....                                   | 46 |
| 4.2.5 Validação de método cromatográfico para doseamento do B4CMET .....                 | 46 |
| 4.2.5.1 Condições cromatográficas .....                                                  | 47 |
| 4.2.5.2 Seletividade .....                                                               | 47 |
| 4.2.5.3 Linearidade .....                                                                | 47 |
| 4.2.5.4 Precisão .....                                                                   | 48 |
| 4.2.5.5 Exatidão .....                                                                   | 48 |
| 4.2.5.6 Robustez .....                                                                   | 49 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                                                           | 50 |
| 5.1 Determinação da atividade antifúngica.....                                           | 50 |
| 5.2 Determinação da citotoxicidade por hemólise .....                                    | 51 |
| 5.3 Caracterização.....                                                                  | 53 |
| 5.3.1 Estudo de solubilidade de fases do B4CMET- $\beta$ CD .....                        | 53 |
| 5.3.2 Calorimetria Exploratória Diferencial .....                                        | 54 |
| 5.3.2.1 Bifenil-4-Carboxilato de Metila .....                                            | 54 |
| 5.3.2.2 Complexos de inclusão.....                                                       | 57 |
| 5.3.3 Termogravimetria.....                                                              | 58 |
| 5.3.3.1 Bifenil-4-Carboxilato de Metila .....                                            | 58 |
| 5.3.3.2 Complexos de Inclusão.....                                                       | 59 |
| 5.3.4 Estudo cinético da degradação térmica .....                                        | 61 |

|                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.3.5 Pirólise acoplada à cromatografia gasosa/espectrometria de massa..... | 62 |
| 5.3.6 Espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier .....     | 62 |
| 5.3.7 Difração de Raios-X .....                                             | 64 |
| 5.3.8 Microscopia Eletrônica de Varredura.....                              | 65 |
| 5.4 Validação de método cromatográfico para doseamento do B4CMET .....      | 67 |
| 5.4.1 Seleção e otimização das condições cromatográficas .....              | 67 |
| 5.4.2 Validação do Método.....                                              | 69 |
| 5.4.2.1 Seletividade .....                                                  | 69 |
| 5.4.2.2 Linearidade .....                                                   | 70 |
| 5.4.2.3 Limite de Quantificação e Limite de Detecção .....                  | 72 |
| 5.4.2.4 Precisão .....                                                      | 72 |
| 5.4.2.5 Exatidão .....                                                      | 73 |
| 5.4.2.6 Robustez .....                                                      | 73 |
| 5.5 Análise Quantitativa do B4CMET nos complexos de inclusão .....          | 74 |
| 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....                                                | 75 |
| REFERÊNCIAS .....                                                           | 76 |
| APÊNDICE.....                                                               | 92 |
| Apêndice 1. Artigo publicado .....                                          | 92 |

## 1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas o uso indiscriminado de agentes antifúngicos levou ao avanço de microrganismos tolerantes aos diversos fármacos conhecidos no mercado, o que tem contribuído para o crescimento das infecções fúngicas causadas principalmente pelo gênero *Candida*. Logo, a busca por novos compostos e novas tecnologias capazes de originar formulações mais estáveis e com melhores atividades farmacológicas é de suma importância como alternativa para o desenvolvimento de novas terapêuticas (DEUS, ALVES, ARRUDA, 2011; MORACE, PERDONI, BORGHINI, 2014; MARTINS et al., 2015).

Nessa visão, portanto, destacam-se os derivados do ácido Bifenílico por apresentarem inúmeras atividades biológicas relatadas na literatura, dentre as quais antimicrobiana; podendo, dessa forma, serem utilizados como protótipos para insumos farmacêuticos ativos (IFA) podendo modular a atividade com o encapsulamento molecular utilizando ciclodextrinas, sendo amplamente relatadas na literatura com um dos principais adjuvantes tecnológicos para formação de complexos de inclusão que melhoram a solubilidade, a estabilidade e a atividade farmacológica dos IFAs. Todavia, a eficácia de um produto farmacêutico desenvolvido a partir desses compostos depende, dentre outros aspectos, da prévia garantia da qualidade com o conhecimento de suas propriedades físicas e químicas, fornecendo informações relevantes para o desenvolvimento da formulação (JAIN, GIDE, KANKATE, 2013; ZHANG et al., 2013; KUO et al., 2013; BRUDEL et al., 2013; GONG et al., 2016; ADEOYE, CABRAL-MARQUES, 2017; ARAÚJO et al., 2017; GUO et al., 2017).

Para tanto, diversas ferramentas analíticas aplicadas na caracterização a nível molecular e de partícula podem ser utilizadas; como, por exemplo, a Calorimetria Exploratória Diferencial, a Termogravimetria, a Pirólise, a Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, a Difração de Raios X e a Microscopia Eletrônica de Varredura (BÖER et al., 2013; DANIELUTI, MATOS, 2013; VIEIRA et al., 2014; MAGGIO et al., 2014; SANGEETHA et al., 2015).

As técnicas termoanalíticas (Calorimetria Exploratória Diferencial e Termogravimetria), desde 1950 são utilizadas com diferentes finalidades na tecnologia farmacêutica, sendo de fundamental importância na caracterização e



decomposição térmica de drogas, avaliação da estabilidade, determinação de pureza, estudos de compatibilidade de formulações farmacêuticas e detecção de polimorfismo (MEDEIROS et al., 2007; FREIRE et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011; FORD, MANN, 2012; GUAN et al., 2015).

A pirólise, por sua vez, quando acoplada à cromatografia gasosa e espectrometria de massas é uma das técnicas mais eficientes para o estudo da composição de volumes complexos de moléculas orgânicas, constituindo-se numa combinação poderosa na caracterização de diversos tipos de materiais (YANG, ZHAO, LIU, 2013; KUSCH et al., 2013; YANG et al., 2015; SANDOUK-LINCKE et al., 2014; HILTZ, 2014; TOLU et al., 2015; GE et al., 2015; KUSCH et al., 2015).

Do mesmo modo, a espectroscopia vibracional (Espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier), possibilita a análise de substâncias no estado amorfo ou cristalino, permitindo a identificação de matérias-primas farmacêuticas (FORATO et al., 2010; AMORIM, Klier, ANGELIS, 2013).

Associada a essas técnicas, a aplicação da Difração de Raios X em pó permite analisar os materiais a partir de todas as etapas do processamento; ao passo que a Microscopia Eletrônica de Varredura fornece informações detalhadas da topografia, composição e cristalografia, e a cromatografia Líquida de Alta Eficiência garante o isolamento e quantificação dos compostos (MOORE et al., 2009; DEDAVID; GOMES, MACHADO, 2007; MORAIS, 2011; CALLISTER JUNIOR, 2012; PRASNIEWSKI, AGUIAR, OLDONI, 2015).

Sendo assim, as técnicas de análises supracitadas podem ser aplicadas como ferramentas analíticas com o intuito de avaliar, através da correlação dos dados, as propriedades de um IFA, prevendo e/ou constatando as interações entre estes e os excipientes utilizados no desenvolvimento de uma forma farmacêutica (MOORE *et al.*, 2009, VIEIRA et al., 2014).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

- Desenvolver e caracterizar complexos de inclusão contendo derivado do ácido bifênlico e  $\beta$ -ciclodextrina, determinando as características físico-químicas e a atividade antimicrobiana do produto obtido.

### 2.2 Objetivos específicos

- ✓ Realizar um screening microbiológico dos diferentes lotes do composto em estudo e seus complexos de inclusão, definindo suas concentrações inibitórias mínimas;
- ✓ Avaliar a citotoxicidade por hemólise do Bifenil-4-Carboxilato de Metila (B4CMET) e dos complexos de inclusão;
- ✓ Caracterizar termicamente o B4CMET e os complexos de inclusão através da DSC e TG;
- ✓ Avaliar o mecanismo de degradação térmica do composto em estudo e seus complexos de inclusão através dos dados termogravimétricos dinâmicos;
- ✓ Elucidar os compostos de termodecomposição utilizando Pirólise acoplada a cromatografia gasosa/espectrometria de massa;
- ✓ Caracterizar através da espectroscopia de Infravermelho os diferentes lotes do B4CMET e seus complexos de inclusão;
- ✓ Estudar a cristalografia do B4CMET e seus complexos de inclusão por difração de raios-X e microscopia eletrônica de varredura;
- ✓ Desenvolver e validar um método por cromatografia líquida de alta eficiência para doseamento do B4CMET.

### **3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

#### **3.1 Setor farmacêutico brasileiro**

A indústria farmacêutica brasileira passou a existir em meados de 1930 com o surgimento das primeiras empresas com características industriais, logo em seguida, nas décadas de 1940 e 1950, o governo brasileiro incentivou a chegada de empresas internacionais, o que acarretou uma queda brusca nas importações de medicamentos, já que essas empresas produziam o produto final no país (FERST, 2013).

Com a promulgação da Lei 5.772 de 21/12/1971 que instituiu o Código de Propriedade Industrial, o qual não reconhecia patentes de produtos químicos e o decreto 68.806 de 25 de junho de 1971 que criou a Central de Medicamentos (Ceme), houve aumento na produção de cópias dos medicamentos patenteados, o que não foi suficiente para estimular a produção dos fármacos utilizados, que continuaram a ser importados (PORTELA et al., 2010; ISSE, 2011; BRASIL, 2013).

Assim, na tentativa de impulsionar a produção interna de fármacos houve em 1984 a edição da Portaria Interministerial nº 4, que acarretou na elevação de impostos e medidas de restrição a importação de alguns insumos. Paralelamente a isso foram adotadas medidas de controle nos preços dos medicamentos, que causaram o desabastecimento de alguns produtos avaliados como não-rentáveis e uma paralisação da indústria (ISSE, 2011; FERST, 2013).

Em função desse entrave, na década de 1990 foram adotadas medidas inversas às tomadas nos anos anteriores, a exemplo da adoção de política de redução dos impostos de importação, eliminação das restrições à importação de insumos farmacêuticos, liberação dos preços dos medicamentos, promulgação da Lei de Patentes no Brasil, da Portaria MS 3.916/98 que estabeleceu a Política Nacional de Medicamentos, destacando-se ainda a criação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e a promulgação da Lei 9.787 em 10/02/1999 (Lei dos Genéricos) (ISSE, 2011; FERST, 2013).

A ANVISA possibilitou elevar os padrões sanitários da produção nacional de medicamentos a partir da criação de leis e regulamentos que garantiram a eficácia, segurança e qualidade dos produtos farmacêuticos comercializados. Assim foram instituídas normas, a exemplo das Boas Práticas de Fabricação (BPF), com o que se

procurava estabelecer os requisitos mínimos a serem seguidos na fabricação de medicamentos, pretendendo-se, entre outras coisas, que houvesse diminuição dos riscos inerentes a qualquer produção farmacêutica (contaminação-cruzada, contaminação por partículas, troca ou mistura de produto), os quais poderiam ser detectados somente pela realização de ensaios nos produtos terminados (ANVISA, 2010; ISSE, 2011; FERST, 2013).

Dessa forma, a partir da norma de Boas Práticas de Fabricação (BPF) passou-se a ser exigido que (BRASIL, 2010; MELO et al., 2013):

- todos os processos de fabricação fossem claramente definidos e sistematicamente revisados;
- as etapas que necessitassem de validação passem por esse procedimento;
- os procedimentos fossem desempenhados por pessoal qualificado e devidamente treinado, utilizando instalações e espaço adequados e identificados, munidos de equipamentos, sistemas computadorizados, serviços apropriados, materiais, recipientes e rótulos;
- fossem feitos registros durante a produção para demonstrar que todas as etapas constantes nos procedimentos e instruções tinham sido seguidas, bem como para possibilitar o rastreamento completo de um lote;
- se criasse um sistema eficiente para recolhimento de qualquer lote após sua comercialização ou distribuição;
- medidas para registrar e examinar reclamações sobre desvio da qualidade dos produtos fossem adotadas, procurando investigar as suas causas e tomando as medidas necessárias com relação a tais desvios, além de prevenir reincidências;
- os estabelecimentos com autorização para fabricar medicamentos tivessem um controle da qualidade independente dos demais setores, principalmente da produção.

O controle da qualidade na indústria estava relacionado com (GIL, 2010):

- a amostragem, especificações, ensaios, procedimentos de organização, documentação e procedimentos de liberação, com o intuito de assegurar que os ensaios importantes fossem efetuados e que a liberação dos materiais

para uso não fosse efetuada antes de terem uma qualidade considerada satisfatória;

- o estabelecimento, validação e implementação de seus procedimentos;
- a manutenção e o armazenamento dos padrões de referências das substâncias ativas utilizadas;
- a rotulagem correta dos recipientes de materiais e produtos;
- a avaliação dos produtos acabados, considerando as condições de produção, os documentos de fabricação, o cumprimento das especificações do produto terminado e o exame da embalagem final;
- a garantia de monitoramento da estabilidade das substâncias ativas e dos produtos;
- o monitoramento ambiental; e
- todas as decisões relacionadas a qualidade do produto.

Já a inserção dos medicamentos genéricos no mercado contribuiu para a expansão e fortalecimento do setor farmacêutico brasileiro e consequentemente para o aumento na oferta de medicamentos com preços em média 60 % mais baratos que os de referência. Dessa forma, a melhora na qualidade dos produtos farmacêuticos, associada a sua maior oferta e com preços mais acessíveis colaborou para o Brasil alcançar a sétima posição na classificação global de vendas de medicamentos no ano de 2015, com perspectiva de assumir o quinto lugar no ano de 2020 (PRÓ GENÉRICOS, 2015; IMS, 2015).

### **3.2 Antifúngicos e resistência de *Candida* sp**

Dentre as classes de medicamentos com uso difundido no Brasil estão os antifúngicos; como, por exemplo, polienos (Anfotericina B, Nistatina), Pirimidinas-fluorotinas (5-fluorocitosina), azóis (Miconazol, Cetoconazol, Fluconazol e Itraconazol), pneumocandinas-equinocandinas, pradimicinas-benanomicinas, nicomicinas, alilaminas e tiocarbamatos (PIRES, 2010).

Todavia, por serem utilizados de forma prolongada esses medicamentos tem contribuído para o surgimento de cepas resistentes; destacando-se, neste caso, o gênero *Candida*; o mais prevalente causador de infecções em humanos que apresenta diversos mecanismos de resistência (Tabela 1), e por isso, tem

aumentado consideravelmente a morbimortalidade de pacientes hospitalizados ou imunodeprimidos (WANG et al., 2015; LIU et al., 2015; SEDDIKI et al., 2015).

**Tabela 1.** Exemplos de mecanismos de resistência da *Candida* sp

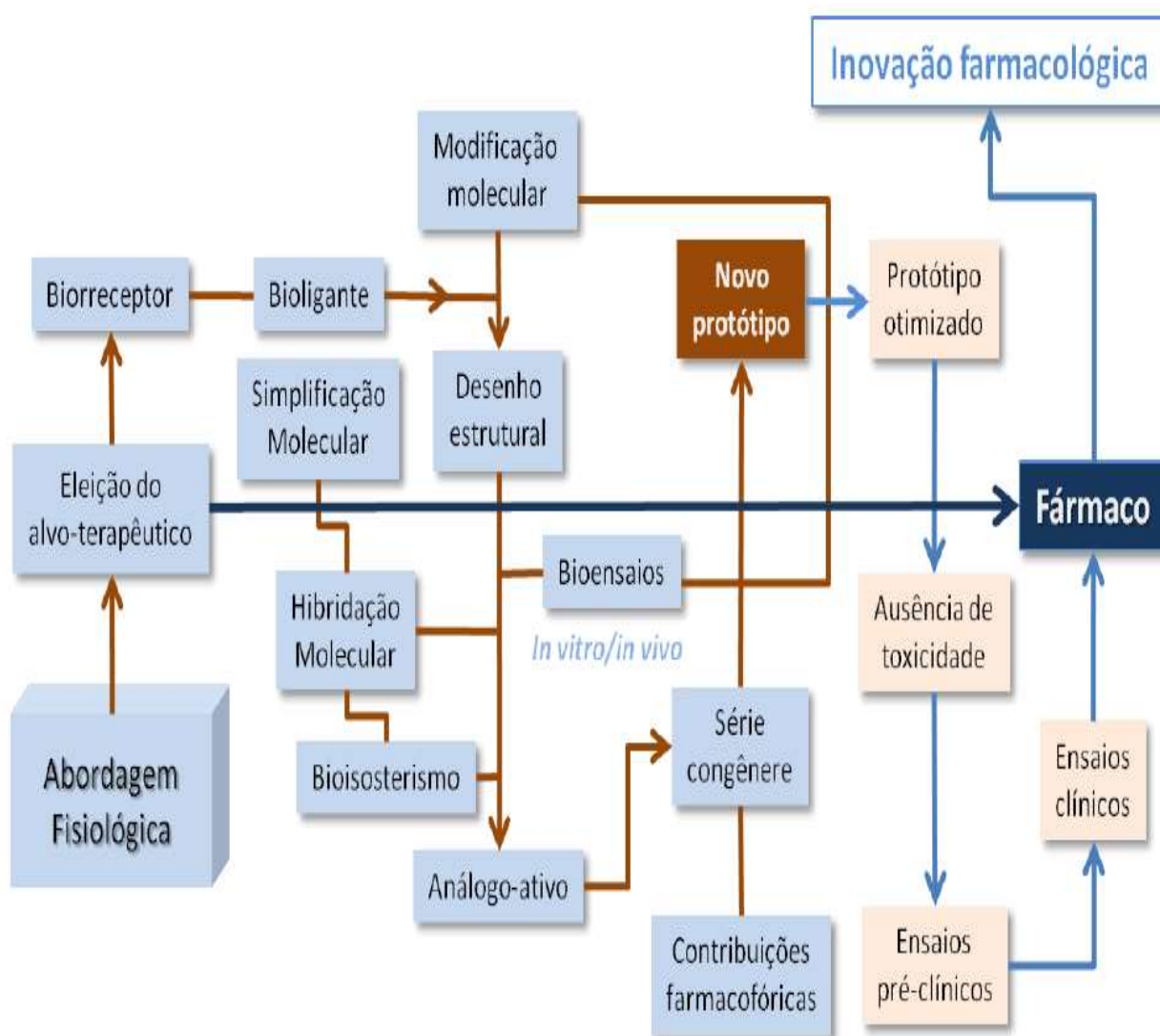
| <b>Antifúngico</b>                               | <b>Mecanismo</b>                                             | <b>Referência</b>      |
|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|------------------------|
| Miconazol, Cetoconazol, Fluconazol e Itraconazol | Diminuição na afinidade da enzima 14-Alfa-desmetilase        | (MORIO et al., 2013)   |
| Equinocandinas                                   | Diminuição na afinidade da enzima Beta-1-3-D-glucano sintase | (DANNAOUI, 2013)       |
| Alilaminas                                       | Mutação gênica da esqualeno-epoxidase                        | (MORAES et al., 2015)  |
| 5-Fluorocitosina                                 | Mutação (códon 122) e duplicação de sequência (códon 60)     | (SISSY et al., 2015)   |
| Anfotericina B                                   | Mudanças na biossíntese do Beta-1,6-Glucana                  | (IBRAHIM et al., 2015) |

Assim, há a necessidade da descoberta de novos fármacos, que sejam eficazes contra patologias causadas por *Candida* sp e que possam substituir os antifúngicos já existentes, de preferência com menores preços, baixos efeitos adversos e mecanismos de ação diferentes (ZHANG et al., 2015; BACKES, JURISIC, NEUMANNA, 2015; ŁĄCZKOWSKI et al., 2016).

### 3.3 Novos compostos farmacêuticos

A modificação molecular de agentes terapêuticos utiliza várias táticas baseando-se na ação farmacológica pretendida. Dessa forma, quando há conhecimento sobre a estrutura do alvo-terapêutico, as moléculas são desenvolvidas a partir de partes de compostos, buscando-se criar um ligante específico. Diferentemente, quando não há conhecimento sobre a composição estrutural utilizam-se moléculas completas, formando equivalentes-ativos (Figura 1) (BARREIRO, 2009; GUIDO, ANDRICOPULO, OLIVA, 2010).

**Figura 1.** Modificações moleculares



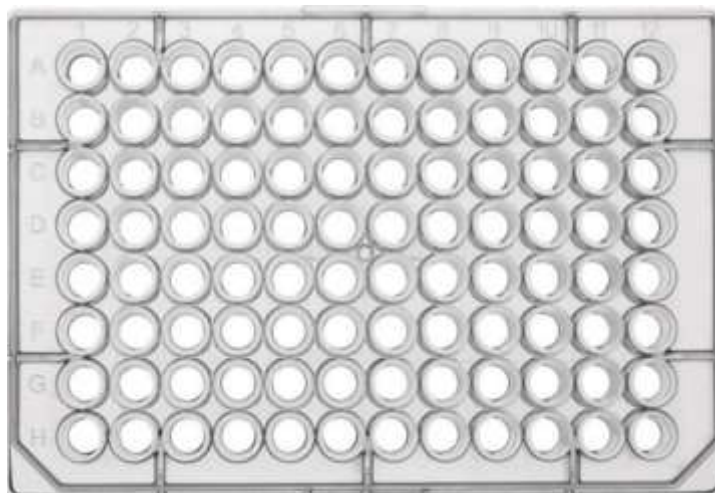
Fonte: Barreiro (2009)

### 3.4 Determinação da atividade farmacológica

Sequencialmente as etapas de modificação molecular, os compostos protótipos de IFAs são avaliados com intuito de detectar possíveis atividades biológicas (AMARAL et al., 2003). Assim, uma das técnicas utilizadas para determinar, por exemplo, a atividade antifúngica é a microdiluição; realizada de forma simples e com obtenção de resultados mais rápidos que outros métodos (CLSI, 2008).

Para execução desse teste são utilizadas placas com 96 poços (Figura 2), estéreis, descartáveis, que são incubadas a 25 °C e após 48 horas são observadas para avaliação da ausência ou presença de crescimento. Dessa forma, determina-se a menor concentração do antifúngico capaz de impedir o desenvolvimento do microrganismo testado (CLSI, 2008).

**Figura 2.** Microplaca



Fonte: Direct Industry (2016)

Posteriormente a determinação da atividade farmacológica, novos fármacos com atuação em qualquer alvo são desenvolvidos a partir do melhoramento de moléculas modelos (BARREIRO, 2009; GUIDO, ANDRICOPULO, OLIVA, 2010).

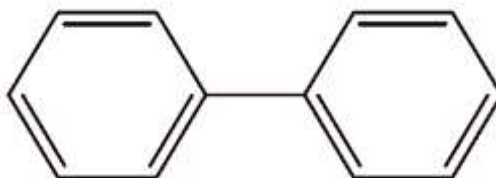
### 3.5 Bifenil e seus derivados

O Bifenil (Figura 3) destaca-se como uma das moléculas modelos que pode ser utilizada por não apresentar grupos funcionais, permitindo a adição de



grupamentos ativos; tornando-se, portanto, um importante precursor na síntese de diversas outras moléculas (JAIN, GIDE, KANKATE, 2013; HE et al., 2015).

**Figura 3.** Estrutura molecular do Bifenil



Fonte: Jain, Gide, Kankate (2013)

Consequentemente, a síntese de derivados do Bifenil tem sido largamente empregada, permitindo a obtenção de variados compostos com novas atividades farmacológicas (JAIN, GIDE, KANKATE, 2013), como os descritos na Tabela 2.

**Tabela 2.** Exemplos de derivados do Bifenil e suas atividades farmacológicas

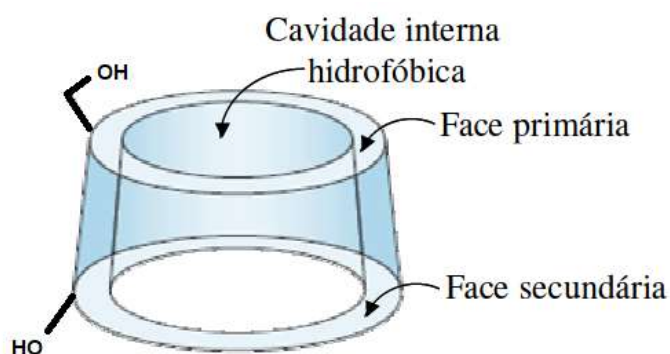
| Substâncias                                                        | Atividade farmacológica | Referência              |
|--------------------------------------------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Bifenil-4- ácido carboxílico 2-(aril)-4-oxo-tiazolidina-3-il-amida | Antimicrobiana          | (MADHUKAR et al., 2009) |
| Derivados substituídos de 1-bifenil-4-il-2-etanona                 | Hipoglicemiante         | (SACHAN et al., 2009)   |
| Bifenilas assimétricas (Nitrovinil bifenilas)                      | Antitumoral             | (YU et al., 2014)       |
| Bifenilas heterocíclicas aromáticas                                | Antileucêmico           | (DONG et al., 2015)     |
| Tris-bifenil triazina                                              | Fotoproteção            | (COUTEAU et al., 2015)  |

### 3.6 Ciclodextrinas

Com o objetivo de melhorar a qualidade dos insumos farmacêuticos ativos é cada vez mais comum à utilização das ciclodextrinas, que são oligossacarídeos cíclicos formados por ligações  $\alpha$ -1,4-glicosídicas entre dextroses, originados pela ação de glicosiltransferases que degradam o amido (LYRA et. al, 2010; LI et al, 2017).

Por possuírem hidroxilas primárias e secundárias voltadas para parte externa do anel, essas moléculas apresentam uma superfície externa hidrofílica e uma cavidade hidrofóbica, facilitando sua solubilidade em meios aquosos e a encapsulação de moléculas pouco solúveis ou insolúveis em água (Figura 4) (LYRA et. al, 2010; LI et al, 2017).

**Figura 4.** Estrutura da Ciclodextrina



Fonte: Adaptado de Lira et al. (2007)

Devido à solubilidade aquosa e facilidade de complexação com moléculas apolares, as ciclodextrinas tornaram-se um excipiente farmacêuticos de grande utilização; sendo a  $\beta$ -Ciclodextrina a mais empregada, por possuir uma cavidade ideal para encapsular a maioria das moléculas de interesse farmacêutico (AGUIAR et. al, 2014).

#### 3.6.1 Aplicações farmacêuticas das Ciclodextrinas

A utilização das ciclodextrinas tem contribuído para o aumento da solubilidade, da estabilidade, da biodisponibilidade, da atividade farmacológica, a

melhora de propriedades organolépticas e a redução de toxicidade dos mais variados IFA's (JADHAV; PORE, 2017; MENDES et al., 2016; XU et al., 2017) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Exemplos de aplicação das Ciclodextrinas na área farmacêutica

| <b>Tipo de Amostra</b>             | <b>Aplicação</b>                                                    | <b>Referência</b>      |
|------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|------------------------|
| Peptídeo<br>Catiônico<br>(ABP-CM4) | Proteção contra degradação                                          | (LI et al., 2017)      |
| Hidroclorotiazida                  | Melhoramento das propriedades<br>biofarmacêuticas e de estabilidade | (MENDES et al., 2016)  |
| Ácido laccaico                     | Incremento de solubilidade                                          | (LIU et al., 2017)     |
| Probenecida                        | Liberação controlada do IFA                                         | (ROY; SAHA; ROY, 2017) |

### 3.7 Obtenção de complexos de Inclusão

No setor farmacêutico este excipiente tem sido utilizado no encapsulamento de moléculas. Todavia, as peculiaridades inerentes a cada complexo IFA-ciclodextrina não permitem uniformizar sua obtenção através de uma única técnica de preparação; por isso, cada uma das moléculas hóspedes deve ser avaliada para identificação da melhor técnica (CUNHA-FILHO; SÁ-BARRETO, 2007).

Dentre os principais métodos utilizados para obtenção dos complexos de inclusão, podemos citar (CUNHA-FILHO; SÁ-BARRETO, 2007; MOHIT et al, 2010):

- **Mistura física:** mistura IFA-ciclodextrina sem água, considerado um método de baixa eficiência para formação de complexos;

- **Malaxagem:** mistura IFA-ciclodextrina com reduzida quantidade de líquido. É um método bastante utilizado na indústria farmacêutica, mas com baixa eficiência de complexação quando comparado com os demais;
- **Atomização:** solução ou suspensão IFA-ciclodextrina com rápida eliminação do solvente. Mesmo proporcionando acelerada e eficiente formação de complexos, apresentam restrições como pouco rendimento e aumentado estresse térmico.
- **Liofilização:** solução IFA-ciclodextrina congelada e liofilizada a baixas pressões. Proporciona elevado rendimento com reduzido estresse térmico, mas apresenta demora no processamento e os complexos obtidos têm más características de fluxo.
- **Co-precipitação:** solução IFA-ciclodextrina quase saturada com posterior modificação de temperatura ou acréscimo de solventes orgânicos, proporcionando a precipitação do complexo de inclusão. É uma técnica bastante utilizada em nível laboratorial, mas pouco empregada na indústria, pois tem reduzido rendimento em escalas maiores e necessita de dias para o processamento.
- **Co-evaporação:** solução IFA-ciclodextrina em água e solventes miscíveis em água, com agitação constante e posterior rota-evaporação. Também é bastante utilizada em escala laboratorial, por apresentar fácil processamento e baixo custo.

### 3.8 Caracterização dos complexos de inclusão

Nesse contexto, para avaliar a formação de complexos de inclusão e entender as características físico-químicas do estado sólido dos IFAs complexados é um importante passo no processo de desenvolvimento de novos medicamentos seguros e eficazes, pois aspectos como a biodisponibilidade e processamento industrial são modificados pelas propriedades do fármaco. Assim, o conjunto com as principais técnicas que evidenciam essa complexação e permitem caracterizar os sólidos farmacêuticos complexados é o diagrama de solubilidade de fases, a Calorimetria Exploratória Diferencial, a Termogravimetria, a Pirólise, a Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, a Difração de Raios X e a Microscopia Eletrônica de Varredura (LYRA et al., 2010; KORADIA et al.,

2010; MOURA et al., 2010; BÖER et al., 2013; DANELUTI, MATOS, 2013; MAGGIO et al., 2014; SANGEETHA et al., 2015).

### 3.8.1 Diagramas de solubilidade de fases

Considerado o primeiro método utilizado para comprovar a complexação IFA-Ciclodextrina, essa técnica permite verificar alteração na solubilidade do IFA com a adição de concentrações crescentes da ciclodextrina. Dessa forma, é possível calcular a constante de associação ( $K_{1:1}$ ), levando em consideração a solubilidade intrínseca do substrato ( $S_0$ ) e a inclinação da reta obtida no diagrama de solubilidade. Para tanto, utiliza-se a seguinte equação (LYRA et al., 2010):

$$K_{1:1} = \frac{\text{Inclinação}}{S_0 \times (1 - \text{Inclinação})}$$

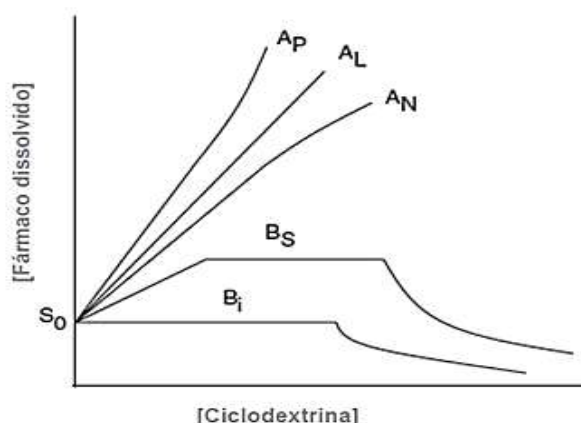
Já a mudança na energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) pode ser determinada a partir da temperatura ( $T$ , em Kelvin) e a constante de associação do complexo inclusão ( $K_{1:1}$ , em  $M^{-1}$ ), utilizando-se a seguinte equação (MOURÃO et al., 2016):

$$\Delta G = -RT \ln K_{1:1}$$

Onde:  $R$  é a constante universal dos gases ( $8.314472 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ).

De acordo com a teoria de Higuchi; Connors (1965), os complexos podem ser classificados como perfis do tipo A quando a solubilidade do substrato eleva-se com a adição de concentrações crescentes de ciclodextrina e do tipo B quando os complexos obtidos tem reduzida solubilidade aquosa (Figura 5).

**Figura 5.** Modelos de diagramas de solubilidade de fases



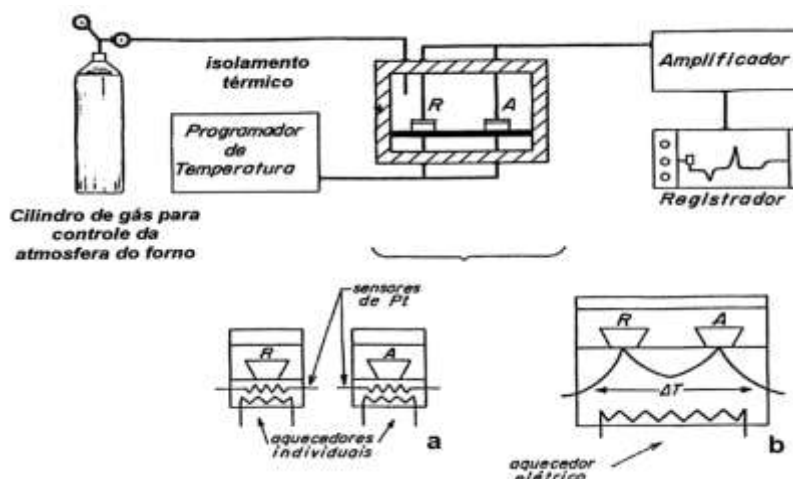
Fonte: Cunha-Filho; Sá-Barreto (2007)

### 3.8.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Em análise térmica sistemas foram criados para medir a variação de temperatura e de energia, quando uma substância é submetida a processos de aquecimentos e/ou resfriamentos, possibilitando a avaliação da tendência entálpica, o conteúdo de calor e o calor específico dos materiais estudados. Uma das técnicas desenvolvidas é a DSC, com a qual é possível medir a diferença de energia fornecida a uma substância e a um material de referência, enquanto ambos são submetidos a uma programação controlada de temperatura (STORPIRTIS et al., 2009).

Dois tipos de DSC foram criados, a com compensação de potência (Figura 6a) e a com fluxo de calor (Figura 6b). No primeiro tipo é possível manter a amostra e a referência em temperatura constante, pois ambas são aquecidas em fornos separados. Por exemplo, se a amostra sofre mudanças de temperatura procedentes de eventos endotérmicos ou exotérmicos, haverá modificação na potência de entrada do forno correspondente, para mantê-la em condição isotérmica com o material de referência; já no segundo tipo, a amostra e a referência são colocadas no mesmo forno e sofrem aquecimento por uma única fonte de calor (BERNAL et al., 2002; STORPIRTIS et al., 2009).

**Figura 6.** Tipos de DSC: com compensação de potência (a), com fluxo de calor (b)



Fonte: Adaptado de Bernal et al. (2002)

Distinções a parte, DSC mostra-se vantajosa em relação a diversas técnicas analíticas por (MATHKAR et al., 2009; MILTYK; ANTONOWICZ, KOMSTA, 2010):

- não requerer um padrão de referência para análise de pureza;

- apresentar um tempo total de análise menor quando comparado, por exemplo, aos métodos cromatográficos na determinação de pureza;
- necessitar de quantidades mínimas de amostra (~1-5 mg);
- exigir pouco trabalho manual, já que os materiais praticamente não sofrem tratamento prévio, passando apenas pelo processo de trituração e
- proporcionar baixo custo das análises, pois não são necessários solventes, colunas, placas, entre outras coisas.

### 3.8.2.1 Aplicações farmacêuticas da DSC

Os dados obtidos com as curvas DSC fornecem informações qualitativas e quantitativas de um material em relação à quantidade de calor envolvida em processos endotérmicos ou exotérmicos. Assim, há possibilidade de analisar mudança de estado físico, modificações na estrutura cristalina, reações de desidratação, de decomposição, de oxirredução, entre outras (STORPIRTIS et al., 2009), caracterizando, com isso, seu emprego em diversos estudos (Tabela 4).

**Tabela 4.** Exemplos de aplicação da DSC na área farmacêutica

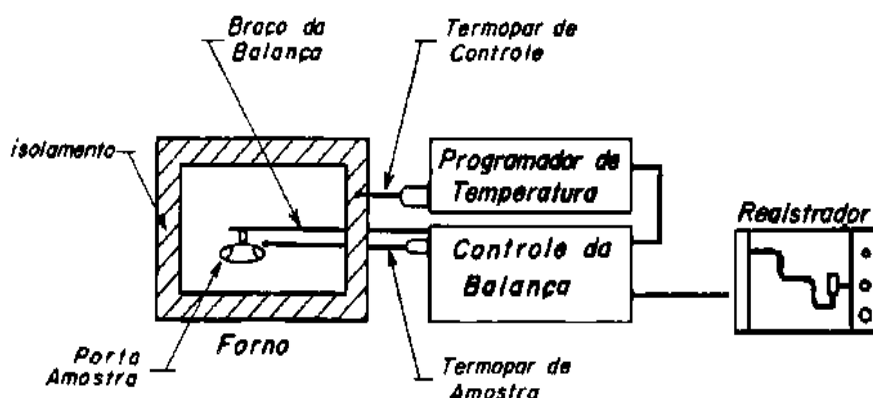
| <b>Tipo de Amostra</b> | <b>Aplicação</b>                                                         | <b>Referência</b>       |
|------------------------|--------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| IFA                    | Caracterização do tacrolimus.                                            | (BÖER et al., 2013)     |
| IFA                    | Avaliação da pureza polimórfica da nateglinida.                          | (BRUNI et al., 2011)    |
| Matéria-prima          | Avaliação da pureza de substâncias químicas de referência.               | (GAO, DING, HU, 2011)   |
| Matéria-prima          | Estudo de compatibilidade entre cetoprofeno e excipientes farmacêuticos. | (TIȚA et al., 2011)     |
| Comprimidos            | Caracterização da sinvastatina.                                          | (OLIVEIRA et al., 2010) |

### 3.8.3 Termogravimetria (TG)

A Termogravimetria diferentemente da DSC, permite que alterações da massa de uma substância sejam medidas em função do tempo e/ou da temperatura, determinando, por exemplo, as perdas de massa (PEREIRA et al., 2009).

Ferramenta utilizada para medir variações da massa, a termobalança (Figura 7), foi desenvolvida em 1915 pelo Prof. Kotaro Honda, sendo atualmente formada por um forno com temperatura e atmosfera controlada, sensor de temperatura (termopar), uma balança com alta sensibilidade e um sistema controlador-registrador (CRAIG, READING, 2007; SAITO, MORIKAWA, 2013).

**Figura 7. Modelo de Termobalança**



Fonte: Adaptado de Denari, Cavalheiro (2012).

Assim, as curvas termogravimétricas podem ser obtidas de três formas distintas (STORPIRTIS et al., 2009):

- Dinâmica: a amostra é submetida a uma razão de aquecimento controlada;
- Quase-isoterma: a amostra é aquecida até a ocorrência de perda de massa, onde passará para o modo isotérmico por um determinado tempo, retornando, posteriormente, para o dinâmico até que ocorra outras perda de massa;
- Isoterma: a amostra é submetida a uma temperatura constante por um determinado tempo ou até a sua completa degradação;



### 3.8.3.1 Aplicações farmacêuticas da TG

Os resultados da TG permitem obter várias informações sobre propriedades físicas e/ou parâmetros cinéticos, o que faz essa técnica ser largamente utilizada com vários compostos farmacêuticos (AL-NAHARY et al., 2012), por exemplo, os observados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Exemplos de aplicação da TG na área farmacêutica

| <b>Tipo de Amostra</b> | <b>Aplicação</b>                                                                             | <b>Referência</b>                          |
|------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| IFA<br>Comprimidos     | Caracterização do Mesilato de<br>Doxazosina e Doxacor®                                       | (ATTIA, ABDEL-MOETY,<br>ABDEL-HAMID, 2012) |
| IFA                    | Caracterização do Sulfato de<br>Indinavir                                                    | (SILVA et al., 2012)                       |
| IFA                    | Caracterização do Naproxeno                                                                  | (ZAYED et al., 2013)                       |
| Sintético e IFA        | Caracterização                                                                               | (MAURYA et al., 2015)                      |
| Comprimidos            | Caracterização e comportamento<br>térmico de medicamentos contendo<br>ácido acetilsalicílico | (MORAIS et al., 2015)                      |

### 3.8.4 Pirólise (Pir)

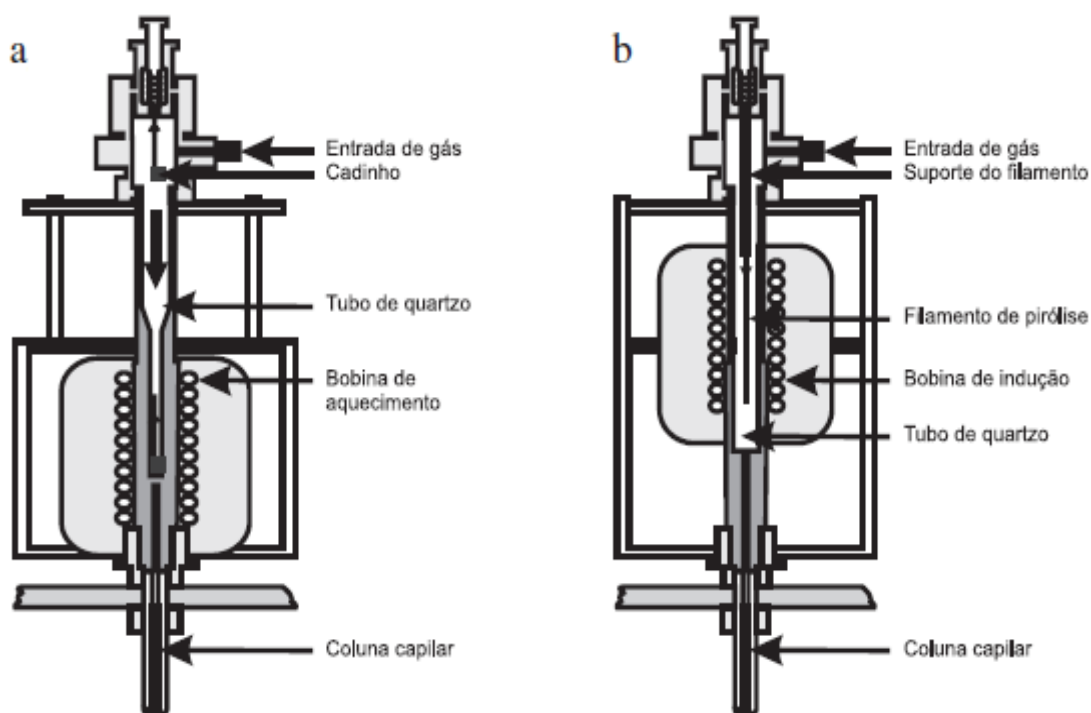
Utilizada pela primeira vez em 1948 como técnica analítica, a Pirólise ultimamente é bastante empregada na caracterização de compostos que passam por

decomposição na falta de oxigênio (SILVÉRIO; BARBOSA, PILÓ-VELOSO, 2008; WANG et al., 2011; AKALIN, KARAGÖZ, 2014).

Para tanto, são utilizados pirolisadores, que podem ser de modo contínuo (Figura 8a), como os de fornos ou microfornos, e modo pulsado (Figura 8b), como os de filamento resistivamente aquecido ou metal ferromagnético indutivamente aquecido com radiofrequência (SILVÉRIO; BARBOSA, PILÓ-VELOSO, 2008).

Dessa forma, são obtidos pirogramas com os picos característicos de cada amostra, possibilitando a obtenção da sua composição química a partir de comparações com pirogramas de referência (WANG et al., 2011; SILVÉRIO; BARBOSA, PILÓ-VELOSO, 2008; AKALIN, KARAGÖZ, 2014).

**Figura 8.** Tipos de pirolisadores: modo contínuo (a), modo pulsado (b)



Fonte: Silvério; Barbosa, Piló-Veloso (2008)

#### 3.8.4.1 Aplicações farmacêuticas da Pir

A pirólise acoplada à cromatografia em fase gasosa e à espectrometria de massas é uma importante ferramenta analítica com aproveitamento em vários campos da ciência, como o farmacêutico (SILVÉRIO; BARBOSA, PILÓ-VELOSO, 2008) (Tabela 6).

**Tabela 6.** Exemplos de aplicação da Pir na área farmacêutica

| <b>Tipo de Amostra</b> | <b>Aplicação</b>                                                                                           | <b>Referência</b>       |
|------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| Vegetal                | Avaliar a identidade e reprodutibilidade de diferentes marcas e lotes de <i>Cymbopogon citratus</i> Stapf. | (OLIVEIRA et al., 2008) |
| IFA                    | Caracterização do Fluconazol                                                                               | (MOURA et al., 2010)    |
| IFA                    | Caracterização da Sinvastatina                                                                             | (PROCÓPIO et al., 2011) |
| Vegetal                | Caracterizar o pó de <i>Erythrina velutina</i> Willd em diferentes tamanhos de partícula                   | (CORREIA et al., 2013)  |
| Vegetal                | Caracterizar o pó de <i>Sideroxylon obtusifolium</i> em diferentes tamanhos de partícula                   | (CORREIA et al., 2016)  |

### 3.8.5 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A radiação infravermelha é a parte do espectro eletromagnético situada entre as regiões visível e micro-ondas, sendo a porção mais utilizada de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , uma vez que a energia absorvida por uma molécula é convertida em vibrações quantizadas em bandas, as quais permitem a identificação de compostos ou a investigação da composição de uma amostra, já que as ligações químicas das substâncias possuem frequências vibracionais específicas (SILVERSTEIN et al. 2007; VIANNA-FILHO, et al., 2013).

Dessa forma, a FTIR é uma técnica de análise cujo espectro é obtido a partir do acúmulo de uma maior quantidade de dados, pois as informações são adquiridas com a ajuda de um interferômetro que admite a utilização de todos os comprimentos de onda da faixa; posteriormente o interferograma passa por uma transformada de Fourier e o sinal resultante é um espectro idêntico ao da espectroscopia IV convencional (dispersiva) (NUNES et al., 2009).

#### 3.8.5.1 Aplicações farmacêuticas da FTIR

A FTIR é utilizada no âmbito farmacêutico na solução de várias dificuldades, tendo sua importância confirmada por suas aplicações bem sucedidas como único método analítico ou em combinação com outras técnicas (KALINKOVA, 1999) (Tabela 7).

**Tabela 7.** Exemplos de aplicação da FTIR na área farmacêutica

| <b>Tipo de Amostra</b> | <b>Aplicação</b>                                                             | <b>Referência</b>             |
|------------------------|------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| Anestésicos            | Avaliação da interação da Lidocaína e Benzocaína com lipossomos unilamelares | (FRACETO, DE PAULA, 2006)     |
| Comprimidos            | Quantificação do teor de Azitromicina                                        | (ROBAINA et al., 2013)        |
| Urina<br>Comprimidos   | Determinação do teor de Ibuprofeno                                           | (KHASKHELI et al., 2013)      |
| Comprimidos            | Quantificação do teor de Eritromicina                                        | (ALI, SHERAZI, MAHESAR, 2014) |
| Comprimidos            | Quantificação do teor de Paracetamol                                         | (MALLAH et al., 2015)         |

### 3.8.6 Difração de Raios X (DRX)

A DRX é outra técnica de grande aplicação nos estudos de caracterização de produtos farmacêuticos, pois avalia a cristalinidade e o polimorfismo (CHADHA, BHANDARI, 2014).

Nessa técnica os difratogramas são obtidos através da emissão de raios X, que possibilita a determinação da estrutura cristalográfica a partir dos raios refletidos expressos em picos. Nas amostras cristalinas há um arranjo em células unitárias, que produz uma “impressão digital” com seus picos; já nas amorfas não ocorre esse arranjo e o difratograma apresenta-se com uma “aureola amorfa” (DONG, BOYD, 2011).

#### 3.8.6.1 Aplicações farmacêuticas da DRX

Por ser um método não destrutivo a utilização da DRX na área farmacêutica está aumentando, permitindo a análise de materiais farmacêuticamente importantes (DONG, BOYD, 2011; CHADHA, BHANDARI, 2014) (Tabela 8).

**Tabela 8.** Exemplos de aplicação da DRX na área farmacêutica

| <b>Tipo de Amostra</b> | <b>Aplicação</b>                                                                                        | <b>Referência</b>        |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| IFA                    | Avaliar o padrão de difração do Benznidazol                                                             | (MAXIMIANO et al., 2010) |
| IFA<br>Matéria-prima   | Avaliar o perfil cristalográfico da Sinvastatina e da mistura binária Sinvastatina: Butil-hidroxianisol | (OLIVEIRA et al., 2010)  |
| IFA<br>Comprimidos     | Avaliar a cristalinidade do lactato de cálcio                                                           | (SOUZA et al., 2012)     |
| Comprimidos            | Avaliar o polimorfismo da Espironolactona                                                               | (SALVI et al., 2015)     |
| IFA                    | Detectar a formação de cocristais de Cafeína, Carbamazepina e Lamotrigina                               | (DONG et al., 2015)      |

### 3.8.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia possibilita avaliar a morfologia, o tamanho e a distribuição granulométrica das partículas; tornando-se, portanto, a técnica mais versátil para análise das propriedades microestruturais dos compostos (DEDAVID, GOMES, MACHADO, 2007; CHADHA, BHANDARI, 2014).

Seu funcionamento consiste no uso de elétrons ao invés de luz, o que possibilita a medição e o registro das várias radiações derivadas das interações elétron-amostra. Todavia, para obtenção da imagem são utilizados apenas os sinais provenientes dos elétrons secundários e/ou retroespalhados (DEDAVID, GOMES, MACHADO, 2007; FONTANIVE et al., 2014).

Dessa forma, na MEV as imagens são adquiridas em três dimensões e as análises realizadas com aumentos e ampla profundidade de foco (DEDAVID, GOMES, MACHADO, 2007).

#### 3.8.7.1 Aplicações farmacêuticas da MEV

A obtenção instantânea de dados na MEV permite a avaliação da forma e a identificação dos compostos presentes numa amostra sólida. Por isso, sua utilização é corriqueira em diversas áreas, incluindo a farmacêutica (DEDAVID, GOMES, MACHADO, 2007) (Tabela 9).

**Tabela 9.** Exemplos de aplicação da MEV na área farmacêutica

| <b>Tipo de Amostra</b>  | <b>Aplicação</b>                                        | <b>Referência</b>                 |
|-------------------------|---------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| IFA                     | Caracterização da Glibenclamida                         | (NERY et al., 2008)               |
| IFA                     | Caracterização do ibuprofeno                            | (ANDRIOLI et al., 2014)           |
| Carreadores de fármacos | Caracterização da porosidade de materiais de sílica     | (NUMPILAI; MUENMEE, WITOON, 2016) |
| Nanopartículas          | Caracterização de nanoencapsulado contendo Sinvastatina | (FATTAHI et al., 2016)            |

### 3.9 Validação de métodos analíticos

A validação analítica é uma peça importante de garantia da qualidade que assegura a credibilidade dos dados, pois resultados duvidosos podem acarretar deliberações catastróficas e perdas financeiras. Assim, o objetivo da validação é assegurar a reprodutibilidade e estabelecer limites de aceitação do erro analítico. Por isso, antes de ser utilizado na rotina o método analítico deve primeiro ser validado para comprovar que é adequado ao seu propósito (BRASIL, 2003; ROZET et al, 2007; RIBEIRO et al., 2008).

No Brasil, a resolução RE nº 899 de 2003 apresenta-se como um guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, dividindo os ensaios em quatro categorias:

- ✓ Categoria I – Testes quantitativos para a determinação de substância ativa;
- ✓ Categoria II – Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impureza e produtos de degradação;
- ✓ Categoria III – Testes de performance;
- ✓ Categoria IV – Testes de identificação;

Posteriormente, dependendo de qual categoria foi escolhida, são selecionados os parâmetros a serem analisados (Tabela 10) (BRASIL, 2003).

**Tabela 10.** Parâmetros para validação de método analítico segundo à finalidade

| Parâmetro               | Categoria I | Categoria II |               | Categoria III | Categoria IV |
|-------------------------|-------------|--------------|---------------|---------------|--------------|
|                         |             | Quantitativo | Ensaio limite |               |              |
| Especificidade          | Sim         | Sim          | Sim           | *             | Sim          |
| Linearidade             | Sim         | Sim          | Não           | *             | Não          |
| Intervalo               | Sim         | Sim          | *             | *             | Não          |
| Precisão Repetibilidade | Sim         | Sim          | Não           | Sim           | Não          |
| Precisão Intermediária  | **          | **           | Não           | **            | Não          |
| Limite de detecção      | Não         | Não          | Sim           | *             | Não          |
| Limite de quantificação | Não         | Sim          | Não           | *             | Não          |
| Exatidão                | Sim         | Sim          | *             | *             | Não          |
| Robustez                | Sim         | Sim          | Sim           | Não           | Não          |

Fonte: Brasil (2003).

(\*) pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

(\*\*) se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da Precisão Intermediária.

### *3.9.1 Especificidade e seletividade*

Especificidade é a aptidão do método em separar o composto de interesse dos demais presentes na amostra. Já a seletividade é a competência que o método possui de aferir com exatidão um composto em presença de outras substâncias que podem causar interferências na sua determinação em amostras complexas. Assim, a seletividade assegura que os resultados sejam do composto analisado e caso não seja alcançada, parâmetros como a linearidade, a exatidão e a precisão serão afetados (BRASIL, 2003; RIBANI et al., 2004).

### *3.9.2 Linearidade*

É a capacidade do método de confirmar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais a concentração do analito em apreciação, dentro de uma variação determinada. Caso haja após avaliação visual uma relação linear, os resultados da análise devem passar por procedimentos estatísticos como, por exemplo, o método dos quadrados mínimos (BRASIL, 2003; RIBANI et al., 2004; VALENTINI, SOMMER, MATIOLI, 2007).

### *3.9.3 Intervalo*

O intervalo é a faixa entre o valor superior e inferior de quantificação do composto em exame. Dessa forma, por ser proveniente da linearidade e dependente da aplicação pretendida do método, esse parâmetro é a confirmação de que o método mostra-se exato, preciso e linear (BRASIL, 2003; RIBANI et al., 2004).

### *3.9.4 Precisão*

A precisão tem por finalidade obter o nível de dispersão de resultados de uma amostra homogeneizada analisada repetidas vezes, permitindo a avaliação da concordância dos valores de ensaios distintos. A partir dos resultados obtidos são calculados a média e o Desvio Padrão (DP), determinando-se o Coeficiente de Variação (CV), expresso em termos de percentagem de uma série de medidas, nas quais duas delas podem ser a reprodutibilidade e a repetibilidade do método



analítico sob condições normais de operação (BRASIL, 2003; RIBANI et al., 2004).

Neste caso, a reprodutibilidade refere-se ao uso de procedimentos analíticos em diferentes laboratórios, com diferentes analistas e em diferentes dias, enquanto que a repetibilidade refere-se ao uso de procedimentos analíticos num curto espaço de tempo utilizando os mesmos analistas e os mesmos equipamentos (BRASIL, 2003).

#### *3.9.5 Exatidão*

A exatidão de um método é a proximidade entre o valor aceito como verdadeiro e o valor determinado pelo método. A verificação desse parâmetro deve ser realizada utilizando-se, no mínimo, três concentrações (baixa, média e alta), com pelo menos cinco determinações por concentração (BRASIL, 2003).

A proximidade dos resultados encontrados ao valor aceito como verdadeiro é resultante da soma de erros sistemáticos e randômicos ou aleatórios, isto é, do erro total associado (HUBERT et al, 2007; ROZET et al, 2007).

#### *3.9.6 Limite de detecção e Limite de quantificação*

O limite de detecção (LD) é a menor concentração da espécie em análise que pode ser detectada, mas não essencialmente quantificada, pela técnica instrumental; enquanto o limite de quantificação (LQ) é a mais baixa concentração que pode ser quantificada dentro dos limites de precisão e exatidão do método analítico. Portanto, a sensibilidade da técnica experimental é obtida pelos limites de detecção e de quantificação (BRASIL, 2003; RIBANI et al., 2004, RIBEIRO et al., 2008).

Os LD e LQ podem ser medidos de três maneiras distintas: visual, relação sinal-ruído e baseada em parâmetros da curva analítica, levando-se em consideração a técnica utilizada e o grau de confiabilidade estatística (RIBANI et al., 2004; RIBEIRO et al., 2008).

#### *3.9.7 Robustez*

A robustez é a medida da suscetibilidade de um método a mínimas variações, indicando sua confiança durante o uso normal. Caso no desenvolvimento

da metodologia a avaliação da robustez constata sensibilidade do método à modificações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e prevenções devem ser incluídas no processo (BRASIL, 2003; RIBANI et al., 2004).

Em cromatografia líquida de alta eficiência, por exemplo, a robustez é avaliada a partir de modificações na temperatura da coluna, na proporção da fase móvel, no seu pH, no seu fluxo ou com a utilização de diferentes lotes ou fabricantes de colunas (BRASIL, 2003; RIBANI et al., 2004).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

$\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD) adquirida da SIGMA ALDRICH®, três lotes do Bifenil-4-Carboxilato de Metila (B4CMET) fornecidos pelo Laboratório de Química Medicinal/DCF/CCS/UFPB, metanol grau CLAE (JT. Baker, lote M30c08), etanol grau CLAE (Tédia, lote 9128); trietilamina (Sigma, lote 5HBG1702V); ácido ortofosfórico (Merck, lote 5798); ácido clorídrico (Vetec, lote 154); NaOH (Vetec, lote 1006730) e Peróxido (Labsynth, lote 189680).

### 4.2 Métodos

#### 4.2.1 Preparação dos complexos de inclusão (CI)

Quantidades equimolares dos três lotes do B4CMET e da  $\beta$ CD foram pesadas e solubilizadas separadamente sob agitação mecânica. O B4CMET foi solubilizado em álcool etílico e a  $\beta$ CD em água purificada. Após completa solubilização dos compostos, a solução de B4CMET foi vertida na solução de  $\beta$ CD e mantida sob agitação por 24 horas antes de ser submetida à evaporação sob pressão reduzida ( $- 800 \pm 20$  mbar) a  $45 \pm 5$  °C em evaporador rotativo. Após a evaporação dos solventes, os produtos foram colocados em estufa a 40 °C por 24 horas para secagem.

#### 4.2.2 Determinação da atividade antifúngica

Para avaliação da atividade antifúngica foram obtidas soluções dos três lotes do B4CMET e dos três lotes dos complexos de inclusão na concentração de 2000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  em Etanol 50% e utilizadas cepas padrão *American Type Culture Collection* (ATCC) de *Candida albicans* (ATCC 18804), *Candida tropicalis* (ATCC 13803) e *Candida parapsilosis* (ATCC 22009), disponibilizadas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ – RJ).

Os microrganismos foram mantidos em tubos de ensaios contendo ágar Sabouraud e, em seguida, cultivados em placas contendo o mesmo meio, a 25°C

durante 48 horas. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada pelo método de microdiluição em caldo, com a utilização de microplacas com 96 poços, de acordo com os procedimentos do Clinical and Laboratory Standards Institute procedures (CLSI) (2008). Os inóculos foram padronizados em tubos contendo 5 mL de solução salina estéril a 0,9% e a suspensão foi ajustada em espectrofotômetro a 580 nm, equivalente a  $10^3$  UFC.

100  $\mu$ L de cada solução a 2000  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> (2mg.mL<sup>-1</sup>), foram submetidos a diluição seriada em caldo Sabouraud nas microplacas, obtendo concentrações de 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,8125  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>. Posteriormente, 10  $\mu$ L de cada cultura de microrganismos foram adicionados em cada poço. O crescimento fúngico foi indicado pela adição de 20  $\mu$ L de solução aquosa de resazurina (Sigma Aldrich) a 0,01% com uma incubação adicional a 25 °C  $\pm$  1 °C durante 2 h. Em seguida, efetuou-se a leitura das placas, observando a mudança da coloração azul para rosa, indicando a presença de microrganismos viáveis. Portanto, a CIM foi definida pela menor concentração onde não ocorreu alteração de cor do corante.

#### *4.2.3 Determinação da citotoxicidade por hemólise*

Preparou-se uma suspensão de hemácias a 5% em solução salina 0,9%. Em seguida, 1mL desta suspensão foi distribuída em tubos de ensaio e homogeneizadas com 1 mL das soluções dos três lotes do B4CMET e dos três lotes dos complexos de inclusão, diluídas em diferentes concentrações a fim de se obter 1000, 500, 250, 125 e 62,5  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> para o B4CMET e 250, 125, 62,5, 31,25 e 15,62 para os complexos de inclusão. Após 1 hora, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm, durante 10 minutos e submetidas a leitura em espectrofotômetro (Shimadzu® UV mini – 1240), com comprimento de onda de 540nm, utilizando como branco a solução salina 0,9% e como controle positivo a solução hemolizante de Ácido Acético a 2%. A visualização da hemólise foi classificada como: – (<25% de hemólise), + (25% de hemólise), ++ (50% de hemólise), +++ (75% de hemólise) e ++++ (100% de hemólise) de acordo com Luize et al. (2005).

#### 4.2.4 Caracterização

##### 4.2.4.1 Estudo de solubilidade de fases

O diagrama de solubilidade de fases foi construído de acordo com a metodologia descrita por Higuchi e Connors (1965). Quantidades crescentes de  $\beta$ CD (0 a 30 mM) foram adicionadas a uma solução aquosa contendo o B4CMET em excesso (20 mM). As misturas foram mantidas sob agitação magnética e, após 24 h, centrifugadas (10 min, 3000 rpm) para eliminação do excesso de amostra insolúvel. Posteriormente, as soluções foram filtradas em membrana de 0,45  $\mu$ m de porosidade. A quantificação de B4CMET solúvel foi determinada utilizando a equação de regressão linear obtida durante a validação do método (4.2.5.3 Linearidade), sendo a solubilidade aparente de B4CMET avaliada em função das diferentes concentrações de  $\beta$ CD.

Complementarmente foram calculadas a constante de associação ( $K_{1:1}$ ) e a energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ), com as seguintes equações (LYRA et al., 2010; MOURÃO et al., 2016):

$$K_{1:1} = \frac{\text{Inclinação}}{S_0 \times (1 - \text{Inclinação})}$$

Onde:  $S_0$  é a solubilidade intrínseca do substrato.

$$\Delta G = -RT \ln K_{1:1}$$

Onde: R é a constante universal dos gases (8.314472 J K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>) e T é a temperatura em Kelvin.

##### 4.2.4.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas DSC foram obtidas em equipamento Shimadzu, modelo DSC-50, usando um cadinho de alumínio hermeticamente fechado, com aproximadamente 2,0 mg da amostra. As análises foram realizadas na faixa de temperatura de 25 a 150 °C (B4CMET) e 25 a 450 °C ( $\beta$ CD e CI), nas razões de aquecimento 10 °C min<sup>-1</sup> ( $\beta$ CD) e 2, 5, 10 e 15 °C min<sup>-1</sup> (B4CMET e CI), fluxo de nitrogênio de 50 mL min<sup>-1</sup>.

Adicionalmente, foi calculada a pureza do B4CMET, tomando como base a Equação de van't Hoff (KESTENS et al., 2011):

$$T_s = T_o - \frac{X_1 \cdot R \cdot T_o^2}{\Delta H_f} \cdot \frac{1}{F}$$

Onde:  $T_s$  = temperatura da amostra (K);  $T_o$  = ponto de fusão teórico do composto puro;  $X_1$  = fração molar da impureza;  $R$  = constante dos gases ( $8,314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ );  $\Delta H_f$  = calor de fusão do composto principal puro ( $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$ );  $F$  = fração da amostra que fundiu em  $T_s$ .

Os dados DSC e a pureza foram analisados utilizando o software TasyS® da Shimadzu.

#### 4.2.4.3 Termogravimetria (TG)

As curvas termogravimétricas dinâmicas foram obtidas com uma termobalança Shimadzu, modelo TGA-50, sob atmosfera de ar sintético e nitrogênio numa vazão de  $20 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . As amostras foram colocadas em cadinho de alumina, aquecido nas razões de 10, 20 e  $40 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$  até  $900 \text{ }^\circ\text{C}$ . A massa utilizada nas análises foi de  $5,0 \pm 0,003 \text{ mg}$ .

#### 4.2.4.4 Pirólise acoplada a cromatografia gasosa/espectrometria de massa (Pir-GC-MS)

Os processos pirolíticos foram conduzidos em um pirolisador acoplado num sistema de cromatografia gasosa, diretamente interfaciado a um espectrômetro de massa com uma fonte de ionização de elétrons (Shimadzu, GCMS-QP5050A). A amostra correspondente a uma partícula de pó do B4CMET e dos complexos de inclusão foram colocadas num cadinho de platina e introduzidas no pirolisador nas temperaturas de  $250 \text{ }^\circ\text{C}$  (B4CMET),  $350$  e  $600 \text{ }^\circ\text{C}$  (CI). A separação foi conseguida utilizando uma coluna capilar com fase estacionária fenil:dimetilpolissiloxano (5:95), com  $30 \text{ m}$  de comprimento,  $0,25 \text{ mm}$  de diâmetro interno e  $0,25 \text{ }\mu\text{m}$  de tamanho de partícula. A coluna capilar do cromatógrafo de gás foi operada num programa de temperatura, que consistia em duas etapas: na primeira, a coluna foi aquecida a

partir da temperatura inicial de 70 °C, com uma taxa de aquecimento de 10 ° C/min, até a temperatura final de 280 ° C, e, na segunda foi mantida na temperatura isotérmica de 280 ° C por 5 min. O gás Hélio foi usado como gás de arraste com fluxo de 1,5 mL.min<sup>-1</sup> e razão de split 1:10.

#### *4.2.4.5 Espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)*

Os espectros de FTIR foram obtidos usando um equipamento Shimadzu, modelo IR Prestige-21. As amostras foram previamente preparadas com brometo de potássio numa proporção de cerca de 2:100 (amostras/KBr), os discos foram preparados por compressão do pó em prensa hidráulica, a uma pressão de 9 toneladas, e digitalizados em números de onda de 400–4000 cm<sup>-1</sup>, utilizando o KBr como branco.

#### *4.2.4.6 Difração de Raios-X (DRX)*

Os espectros de DRX foram registrados com difratômetro Shimadzu XRD 600, com fonte de radiação Cu K $\alpha$ . As condições das medições foram as seguintes: geometria, 2 $\theta$ ; voltagem, 40 kV; corrente, 30 mA;  $\theta_i$ , 5;  $\theta_f$ , 30; tamanho do passo, 0,02; e velocidade, 20° min<sup>-1</sup>.

#### *4.2.4.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)*

As análises microscópicas foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura (Hitachi, modelo TM-1000), utilizando voltagem de aceleração do feixe de elétron de 15 kV. As amostras foram submetidas à metalização com ouro para tornar a superfície condutora e colocadas em porta amostra para avaliação com aumentos de 500 e 1000 vezes.

#### *4.2.5 Validação de método cromatográfico para doseamento do B4CMET*

A validação do método foi realizada conforme as especificações contidas na Resolução RE n° 899, de 29 de maio de 2003, que trata do guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.

#### 4.2.5.1 Condições cromatográficas

As condições cromatográficas definidas a partir do desenvolvimento do método foram: coluna Phenomenex C18 (250x3,0mm 3 $\mu$ m), fase móvel Metanol:água (70:30) mais 0,1% de Trietilamina e pH ajustado para 3,5, fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>, temperatura do forno de 40 °C e volume de injeção de 20  $\mu$ L.

#### 4.2.5.2 Seletividade

Foi preparada solução de ácido clorídrico 0,1 mol.L<sup>-1</sup> e Peróxido a 3%, conforme Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2010), com adaptações. Como o B4CMET apresentava baixa solubilidade em água, as soluções ácida, oxidativa e neutra foram preparadas com solução hidroalcolica 50%.

Foram pesados 25 mg do B4CMET em triplicata, transferidos para balões volumétricos de 50 mL, solubilizados nas respectivas soluções de degradação (ácida e oxidativa), seguido de sonicação até completa solubilização, obtendo-se desse modo três soluções mãe para cada condição de degradação, as quais foram armazenadas em recipientes adequados e fechados, durante todo o estudo. No tempo de 24 h, foram coletadas alíquotas de 400  $\mu$ L para balão de 10 mL, completado com o diluente a fim de se obter uma concentração final de 20  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>, que foi filtrada, transferida para vials e analisada por CLAE–DAD.

#### 4.2.5.3 Linearidade

Foram pesados 25 mg do B4CMET, transferidos para balão volumétrico de 50 mL, solubilizado com aproximadamente 30 mL de solução hidroalcolica (50%), sonicado até completa solubilização e por fim, aferiu-se o balão obtendo-se solução mãe na concentração de 500  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>. O procedimento de preparo das amostras foi realizado em triplicata.

Da solução mãe retirou-se alíquotas que foram transferidas para balão de 10 mL, obtendo-se soluções com concentrações de 10, 16, 20, 24 e 30  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> (em triplicata), para a construção da curva de calibração, onde foram analisadas a área do pico e a concentração do fármaco.



A curva de calibração foi obtida pelo método do ajuste por mínimos quadrados, com os dados plotados no Microsoft Excel e o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados por meio das equações:

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC} \quad e \quad LQ = \frac{DPa \times 10}{IC}$$

Em que, DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próxima ao suposto limite de quantificação e IC é a inclinação da curva de calibração.

#### 4.2.5.4 Precisão

As amostras foram obtidas pesando-se 25 mg do B4CMET, transferidos para balão de 50 mL, solubilizadas com o diluente, seguido de sonicação até completa solubilização; obtendo-se solução na concentração de 500 µg.mL<sup>-1</sup>, da qual foi coletada alíquotas, transferida para balão de 10 mL, obtendo-se soluções com concentrações finais de 10, 20 e 30 µg.mL<sup>-1</sup>, equivalentes aos níveis baixo (75%), médio (100%) e alto (125%), da curva de calibração. As amostras foram filtradas, transferidas para vials e analisadas em triplicata.

Para determinação da precisão intercorrida, as análises descritas acima foram repetidas em dias diferentes e com analistas diferentes.

#### 4.2.5.5 Exatidão

As amostras foram obtidas pesando-se 25 mg do B4CMET, transferidos para balão de 50 mL, solubilizadas com o diluente, seguido de sonicação até completa solubilização; obtendo-se solução na concentração de 500 µg.mL<sup>-1</sup>, da qual foi coletada alíquotas, transferida para balão de 10 mL, obtendo-se soluções com concentrações finais de 10, 20 e 30 µg.mL<sup>-1</sup>, equivalentes aos níveis baixo (75%), médio (100%) e alto (125%), da curva de calibração. As amostras foram filtradas, transferidas para vials e analisadas em triplicada.

#### 4.2.5.6 Robustez

A robustez do método foi avaliada por meio de discretas modificações na proporção da fase móvel (68,6:31,4 e 71,4:28,6 – metanol:água), fluxo (0,9 e 1,1 mL.min<sup>-1</sup>) e temperatura do forno (38 e 42°C).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Determinação da atividade antifúngica

No *screening* microbiológico foi verificada a atividade contra cepas padrões de *Candida*, sendo possível observar que o B4CMET isolado apresentou valores de CIM na ordem de 125 a 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e quando complexado teve sua ação com CIM entre 31.25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 62.50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Tabela 11).

**Tabela 11.** Concentração inibitória mínima do B4CMET e CI testados contra *Candida spp*\*\*

|                |                | Microrganismos testados      |                              |                              |
|----------------|----------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
|                |                | <i>Candida albicans</i>      | <i>Candida tropicalis</i>    | <i>Candida parapsilosis</i>  |
| <b>B4CMET</b>  | <b>Lote 1</b>  | 250.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | 125.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | 125.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ |
|                | <b>Lote 2</b>  | 250.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | 125.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | 125.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ |
|                | <b>Lote 3</b>  | 250.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | 125.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | 125.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ |
| <b>CI</b>      | <b>Lote 1*</b> | 62.50 $\mu\text{g mL}^{-1}$  | 31.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$  | 31.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$  |
|                | <b>Lote 2*</b> | 62.50 $\mu\text{g mL}^{-1}$  | 31.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$  | 31.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$  |
|                | <b>Lote 3*</b> | 62.50 $\mu\text{g mL}^{-1}$  | 31.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$  | 31.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$  |
| <b>Valor-p</b> | <b>Lote 1</b>  | < 0,0001                     | < 0,0001                     | < 0,0001                     |
|                | <b>Lote 2</b>  | < 0,0001                     | < 0,0001                     | < 0,0001                     |
|                | <b>Lote 3</b>  | < 0,0001                     | < 0,0001                     | < 0,0001                     |

\* A CIM dos CI foram obtidas a partir da concentração teórica do B4CMET nesses complexos.

\*\* Também foram testados o etanol a 50% e a  $\beta$ CD, ambos não apresentaram atividade antifúngica.

A análise comparativa dos dados da tabela 11 permitiu observar uma atividade antifúngica aumentada com os complexos de inclusão do B4CMET para as diferentes cepas testadas. Isto pode ser explicado pelo incremento da sua solubilidade no meio de cultura (Ágar), pois uma maior solubilidade do composto contribui para elevar a área de contato da substância com o microrganismo, favorecendo sua ação (CUNHA-FILHO; SÁ-BARRETO, 2007).

A ação observada com os complexos de inclusão do B4CMET corrobora os resultados de Kfoury et al. (2016), que, ao avaliarem a atividade antifúngica de várias substâncias isoladas e encapsuladas com ciclodextrina, observaram melhora na inibição quando os complexos de inclusão foram testados.

Percebeu-se, ainda, que houve aumento da concentração inibitória mínima de todos os lotes do B4CMET e do CI frente às cepas de *Candida albicans*. Essa redução na atividade biológica pode estar associada a modificações morfológicas apresentadas pela *Candida albicans*, pois segundo Barbedo, Sgarbi (2010), diferentemente de outros fungos, esse patógeno tem a capacidade de apresentar diversas morfologias, as quais contribuem para sua patogenicidade.

Deve-se ressaltar, todavia, que mesmo com a presença de diferentes respostas antifúngicas, os lotes 1, 2 e 3 do B4CMET e CI podem ser classificados como detentores de ótima atividade farmacológica; pois de acordo com Sartoratto et al. (2004), são considerados como de elevada atividade, valores de CIM entre 50-500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Madhukar et al. (2009), ao avaliarem o potencial antimicrobiano de derivados do Bifenil também obtiveram atividade expressiva contra cepas de *Candida albicans*, o que sugere que essas moléculas podem ser agentes terapêuticos promissores contra o gênero *Candida*; levando-se em consideração que esse microrganismo tem elevado índice de resistência aos antifúngicos atualmente utilizados (PFALLER et al., 2015).

## 5.2 Determinação da citotoxicidade por hemólise

O resultado do teste de atividade hemolítica permitiu visualizar que nenhum dos três lotes do B4CMET e do CI foi citotóxico, pois em todas as concentrações testadas o grau de hemólise não ultrapassou 25% em relação ao controle positivo (Tabela 12).

Identificou-se, igualmente, que o B4CMET complexado apresentou redução do poder hemolítico quando testado nas mesmas concentrações do B4CMET isolado; confirmando estudos de Tang et al. (2015), que ao analisarem a citotoxicidade da Cloroxazona isolada e complexada com ciclodextrina, perceberam diminuição da toxicidade nos complexos de inclusão.

**Tabela 12.** Resultado do ensaio de citotoxicidade

| <b>Amostra</b>           | <b>Concentração (<math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math>)</b> | <b>Absorbância</b> | <b>Intensidade da hemólise</b> |
|--------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------|--------------------------------|
| <b>B4CMET</b>            |                                                        |                    |                                |
| <b>Lote 1</b>            | 1000                                                   | 0,2950             | —                              |
|                          | 500                                                    | 0,0458             | —                              |
|                          | 250                                                    | 0,0435             | —                              |
|                          | 125                                                    | 0,0239             | —                              |
|                          | 62,5                                                   | 0,0190             | —                              |
| <b>Lote 2</b>            | 1000                                                   | 0,2042             | —                              |
|                          | 500                                                    | 0,0452             | —                              |
|                          | 250                                                    | 0,0403             | —                              |
|                          | 125                                                    | 0,0215             | —                              |
|                          | 62,5                                                   | 0,0184             | —                              |
| <b>Lote 3</b>            | 1000                                                   | 0,2050             | —                              |
|                          | 500                                                    | 0,0499             | —                              |
|                          | 250                                                    | 0,0410             | —                              |
|                          | 125                                                    | 0,0236             | —                              |
|                          | 62,5                                                   | 0,0187             | —                              |
| <b>CI</b>                |                                                        |                    |                                |
| <b>Lote 1</b>            | 250                                                    | 0,0166             | —                              |
|                          | 125                                                    | 0,0124             | —                              |
|                          | 62,5                                                   | 0,0071             | —                              |
|                          | 31,25                                                  | 0,0056             | —                              |
|                          | 15,62                                                  | 0,0008             | —                              |
| <b>Lote 2</b>            | 250                                                    | 0,0158             | —                              |
|                          | 125                                                    | 0,0145             | —                              |
|                          | 62,5                                                   | 0,0130             | —                              |
|                          | 31,25                                                  | 0,0094             | —                              |
|                          | 15,62                                                  | 0,0047             | —                              |
| <b>Lote 3</b>            | 250                                                    | 0,0150             | —                              |
|                          | 125                                                    | 0,0148             | —                              |
|                          | 62,5                                                   | 0,0125             | —                              |
|                          | 31,25                                                  | 0,0028             | —                              |
|                          | 15,62                                                  | 0,0016             | —                              |
| <b>Controle Positivo</b> |                                                        | <b>1,2170</b>      | <b>++++</b>                    |

— (<25% de hemólise), + (25% de hemólise), ++ (50% de hemólise), +++ (75% de hemólise) e ++++ (100% de hemólise).

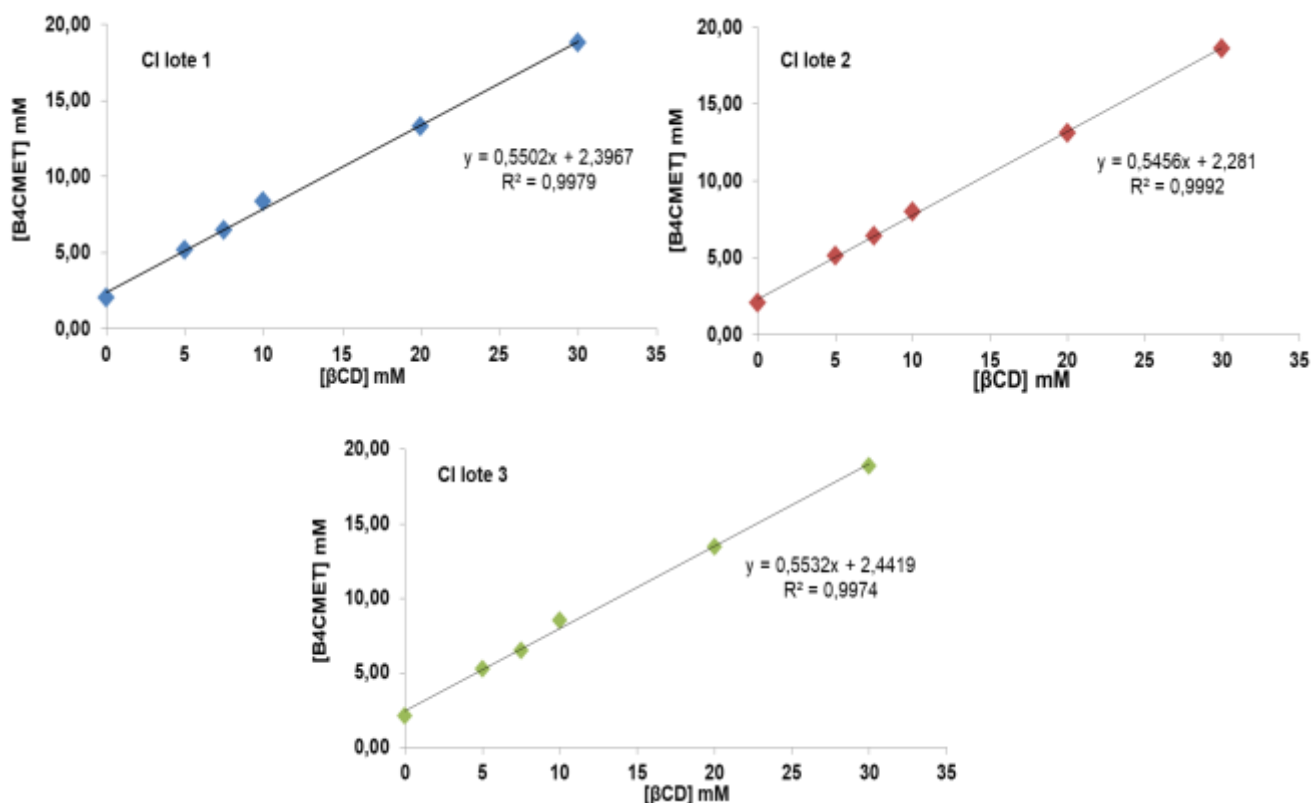
### 5.3 Caracterização

#### 5.3.1 Estudo de solubilidade de fases do B4CMET- $\beta$ CD

Com os resultados do ensaio de solubilidade de fases, representados na Figura 9, foi possível verificar que houve um incremento linear na solubilidade do B4CMET completamente dependente da concentração de  $\beta$ CD; correspondendo, de acordo com Higuchi e Connors (1965), a formação de um complexo de inclusão solúvel do tipo A.

Higuchi e Connors (1965) também afirmam que perfis com coeficiente linear superior a 0,99 e coeficiente angular menor que um, indicam estequiometria molar 1:1 (fármaco:ciclodextrina) para formação dos complexos. Assim, considerando os coeficientes de correlação linear e os coeficientes angulares obtidos com o diagrama de solubilidade de fases (Figura 9), identificou-se que os complexos de inclusão B4CMET: $\beta$ CD podem ser formados a partir dessa estequiometria.

**Figura 9.** Diagrama de solubilidade de fases dos CI



Para avaliar com mais detalhes a interação molecular entre B4CMET/ $\beta$ CD foram calculadas a constante de associação ( $K_{1:1}$ ) e a energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ), cujos resultados são apresentados na tabela 13.

**Tabela 13.** Valores da eficiência de complexação e espontaneidade da reação de formação dos complexos de inclusão

| Complexo de inclusão | $K_{1:1}(M^{-1})$ | $\Delta G (KJ mol^{-1})$ |
|----------------------|-------------------|--------------------------|
| <b>Lote 1</b>        | 590,92            | - 15,82                  |
| <b>Lote 2</b>        | 588,58            | - 15,80                  |
| <b>Lote 3</b>        | 589,58            | - 15,81                  |

Os valores de  $K_{1:1}$ , na Tabela 13, sugerem a formação de complexos de inclusão com estabilidade adequada e viabilidade para incremento da solubilidade do B4CMET, permitindo sua utilização no desenvolvimento de formas farmacêuticas. Esses resultados são apoiados por pesquisa de Rama et al. (2005), que considera como úteis para uso farmacêutico os complexos cujas constantes de estabilidade situam-se entre 100 e 1000  $M^{-1}$ , uma vez que constantes inferiores a 100  $M^{-1}$  indicam a formação de sistemas instáveis e superiores a 1000  $M^{-1}$  dificultam a liberação do fármaco.

Lyra et. al, (2010) afirmam que comumente a formação de complexos está relacionada a valores negativos de energia livre de Gibbs. Sendo assim, quanto mais negativo for a variação de energia de Gibbs, melhor o efeito solubilizante. Logo, com a avaliação da energia livre de Gibbs (Tabela 13), foi possível identificar a espontaneidade do processo de complexação ( $\Delta G < 0$ ), que favorece a solubilização aquosa do B4CMET.

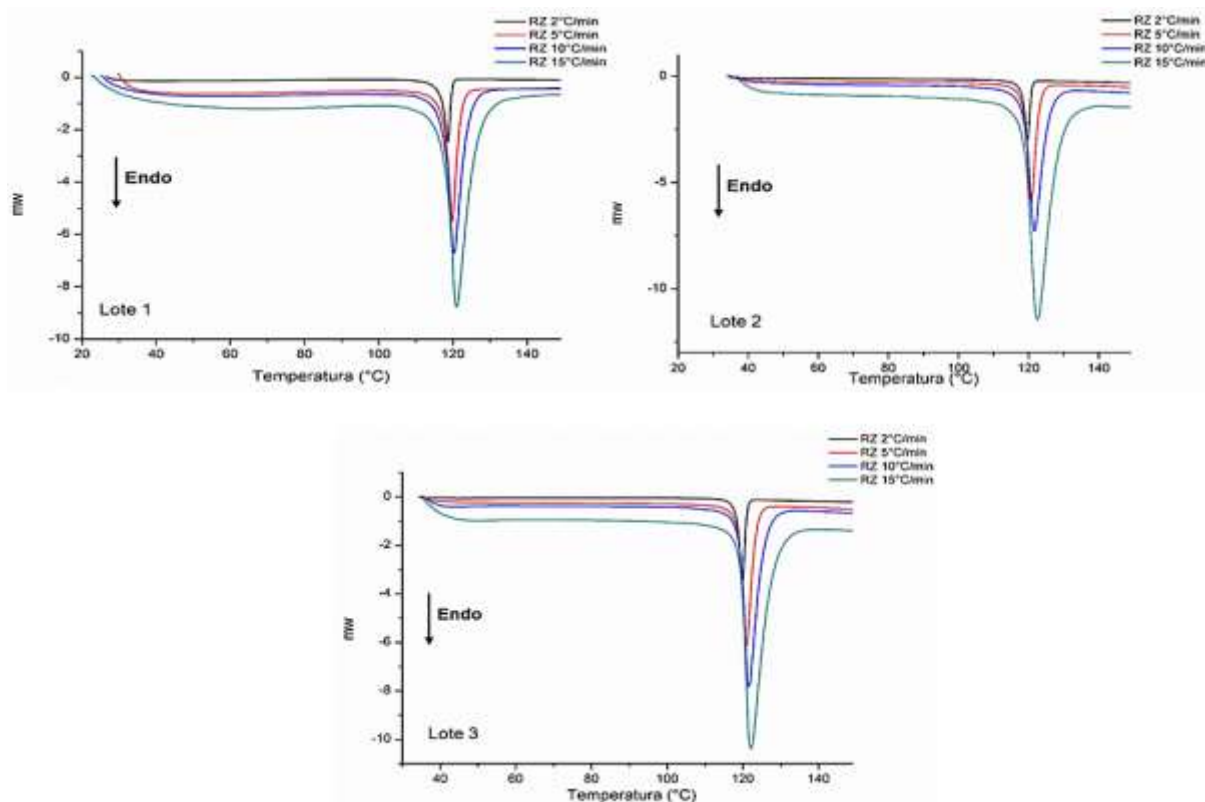
### 5.3.2 Calorimetria Exploratória Diferencial

#### 5.3.2.1 Bifenil-4-Carboxilato de Metila

Em todas as curvas DSC do B4CMET (Figura 10), visualizou-se um pico endotérmico em cuja temperatura não foi observada perda de massa na análise

Termogravimétrica. Assim, segundo Alves et al. (2010), eventos dessa natureza podem ser considerados como processo de fusão.

**Figura 10.** Curvas DSC do B4CMET em diferentes razões de aquecimento



Na tabela 14 é possível observar os resultados DSC do B4CMET em diferentes razões de aquecimento, percebendo-se pequenas variações intra e interlote.

De forma análoga, Bernal et al. (2002), ao avaliarem a influência de alguns fatores sobre resultados DSC da Sacarina, observaram que variações na razão de aquecimento são responsáveis pelo alargamento do pico de fusão, pois como a temperatura observada neste evento corresponde ao equilíbrio entre a quantidade de calor fornecida e absorvida; razões de aquecimento mais altas contribuem para ocorrência de maior número de processos na mesma faixa de tempo, com consequente aumento na temperatura do pico. Por outro lado, a volta para linha de base depende do tempo e da variação de temperatura, por isso, acontecerá em temperaturas maiores.



**Tabela 14.** Resultados da Fusão do Bifenil-4-Carboxilato de Metila

| B4CMET | Razões (°C.min <sup>-1</sup> ) | T <sub>Pico</sub> (°C) | T <sub>Onset</sub> (°C) | T <sub>Endset</sub> (°C) | Entalpia (J.g <sup>-1</sup> ) |
|--------|--------------------------------|------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------------|
| Lote 1 | 2,00                           | 118,61                 | 117,28                  | 119,64                   | 82,68                         |
|        | 5,00                           | 119,74                 | 117,72                  | 121,99                   | 93,82                         |
|        | 10,00                          | 120,30                 | 117,65                  | 123,91                   | 83,92                         |
|        | 15,00                          | 120,78                 | 117,93                  | 127,54                   | 88,58                         |
| Lote 2 | 2,00                           | 119,64                 | 118,67                  | 120,83                   | 88,38                         |
|        | 5,00                           | 120,74                 | 118,38                  | 123,13                   | 107,21                        |
|        | 10,00                          | 121,78                 | 118,88                  | 125,66                   | 97,22                         |
|        | 15,00                          | 121,78                 | 118,91                  | 126,93                   | 91,44                         |
| Lote 3 | 2,00                           | 119,85                 | 118,65                  | 120,97                   | 95,67                         |
|        | 5,00                           | 120,96                 | 118,91                  | 123,39                   | 103,99                        |
|        | 10,00                          | 121,67                 | 119,33                  | 125,82                   | 89,96                         |
|        | 15,00                          | 122,12                 | 119,62                  | 128,51                   | 95,96                         |

A pureza dos diferentes lotes do B4CMET foi obtida com os dados DSC, considerando que Oliveira et al. (2011) entendem que a determinação da pureza de um IFA não farmacopeico pode ser realizada por DSC com a utilização da Equação de van't Hoff e Macêdo et al. (2000), ao compararem as técnicas oficiais com a DSC para determinação da pureza do captopril, propranolol e nifedipina, perceberam que não havia diferença entre os resultados obtidos.

Identificou-se, nas razões de aquecimento mais baixas (2 e 5 °C.min<sup>-1</sup>), um grau de pureza mais elevado, quando comparado aos obtidos nas razões mais altas (10 e 15 °C.min<sup>-1</sup>) (Tabela 15).

Araújo et al. (2010), ao estudarem a Zidovudina também observaram diminuição na pureza com o aumento da razão de aquecimento; porque, segundo esses autores, a equação de van't Hoff é apropriada para condições de equilíbrio, que são obtidas nas razões mais baixas.

**Tabela 15.** Pureza do Bifenil-4-Carboxilato de Metila baseado na equação de van't Hoff

| Razões<br>(°C.min <sup>-1</sup> ) | Bifenil-4-Carboxilato de Metila |               |               |
|-----------------------------------|---------------------------------|---------------|---------------|
|                                   | Lote 1<br>(%)                   | Lote 2<br>(%) | Lote 3<br>(%) |
| 2,00                              | 99,04                           | 99,09         | 99,19         |
| 5,00                              | 99,00                           | 99,01         | 99,08         |
| 10,00                             | 98,37                           | 98,44         | 98,78         |
| 15,00                             | 98,03                           | 98,37         | 98,50         |

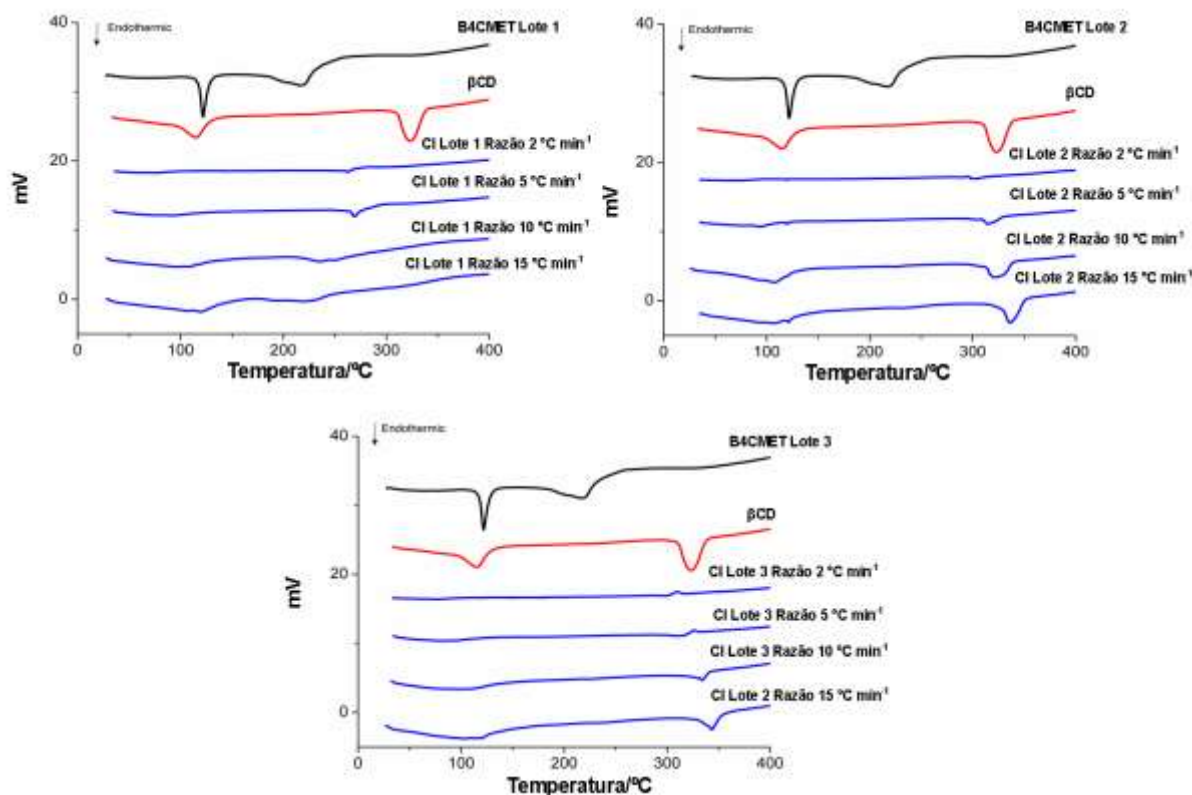
### 5.3.2.2 Complexos de inclusão

A análise das curvas DSC dos complexos de inclusão e dos componentes isolados (Figura 11), permitiu verificar para  $\beta$ CD um evento endotérmico na faixa de temperatura de 99,11-127,25 °C ( $T_{\text{pico}} = 115,03$  °C) que pode estar relacionado à desidratação da molécula; de 218,69-224,21 °C ( $T_{\text{pico}} = 221,08$  °C) uma transição de fase cristalina, já relatado por Serafini et al. (2012) e Menezes et al. (2014); e de 311,16-336,78 °C ( $T_{\text{pico}} = 323,09$  °C) ocorreu um evento endotérmico característico da fusão da molécula, seguido de sua termodecomposição e eliminação do material carbonáceo.

Com o B4CMET, como não ocorreram modificações significativas no seu ponto de fusão com a variação das razões de aquecimento (Tabela 14), realizou-se uma análise na razão de 10 °C min<sup>-1</sup> até 450 °C, observando-se um evento endotérmico associado à fusão (Figura 11), na faixa de 117,65-123,91 °C ( $T_{\text{pico}} = 120,30$  °C) para o lote 1, de 118,88-125,66 °C ( $T_{\text{pico}} = 121,78$  °C) para o lote 2 e de 119,33-125,82 °C ( $T_{\text{pico}} = 121,67$  °C) para o lote 3.

Por fim, verificou-se em todos os complexos de inclusão o desaparecimento do pico de fusão do B4CMET (Figura 11), o que evidencia o encapsulamento dessa molécula na cavidade da  $\beta$ CD, comprovando a formação de complexos e não de mistura física. Segundo Abarca et al. (2016); Jadhav; Pore (2017); Xua et al. (2017), esse processo ocorre porque as moléculas hospedeiras ao serem incorporadas na cavidade da  $\beta$ CD deixam de interagir umas com as outras no estado sólido e eventos como ponto de fusão, ebulição e sublimação são modificados ou simplesmente desaparecem.

**Figura 11.** Curvas DSC do B4CMET (Rz 10 °C min<sup>-1</sup>),  $\beta$ CD (Rz 10 °C min<sup>-1</sup>) e dos CI em diferentes razões de aquecimento



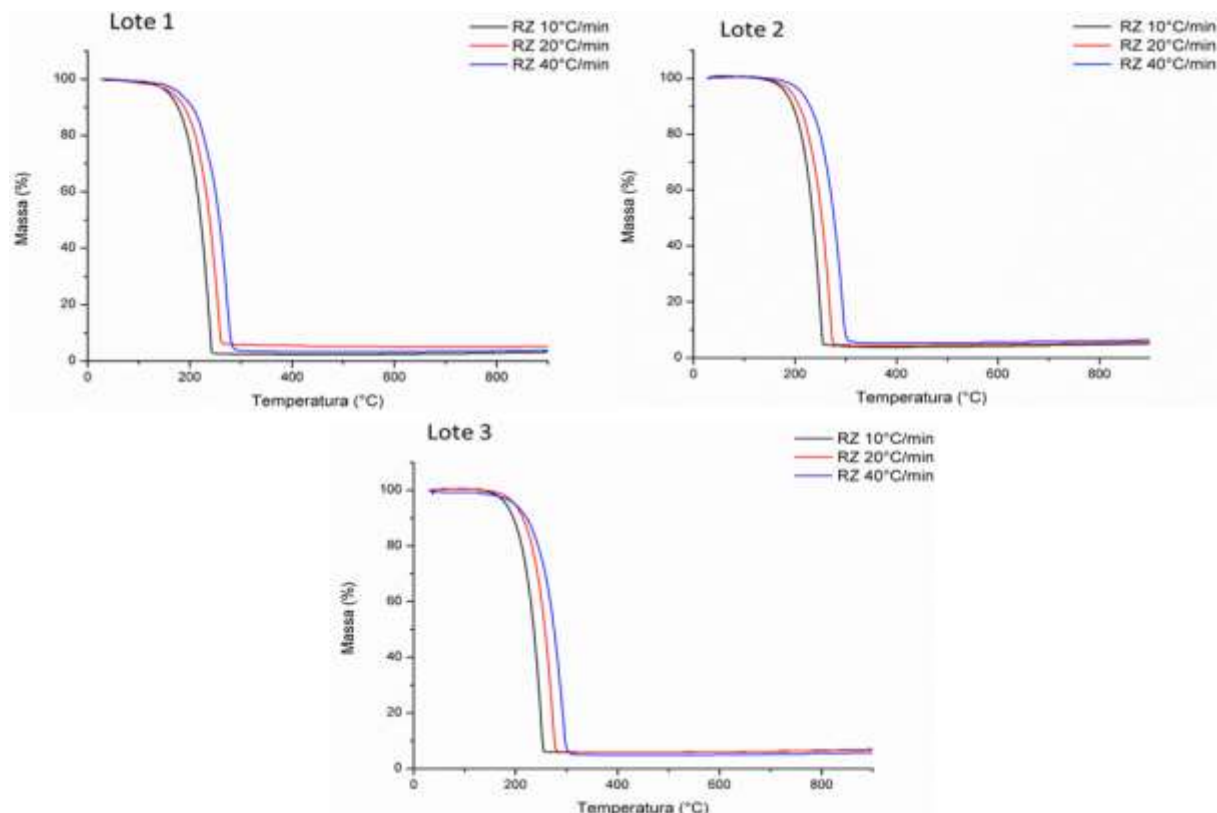
### 5.3.3 Termogravimetria

#### 5.3.3.1 Bifenil-4-Carboxilato de Metila

Nas curvas TG (Figura 12), visualizou-se uma única etapa de perda de massa nos três lotes do B4CMET, cujos resultados em diferentes razões de aquecimento encontram-se na Tabela 16.

A análise comparativa dos resultados permitiu identificar comportamentos distintos para cada lote do B4CMET. Nas razões de 20 e 40 °C.min<sup>-1</sup> foi possível observar um deslocamento nas temperaturas de decomposição térmica para valores superiores as visualizadas a 10 °C.min<sup>-1</sup>, com perfis de perda de massa semelhantes.

Ionashiro (2004) considera que esse fenômeno geralmente ocorre porque a diminuição nas razões de aquecimento provocam reduções nas temperaturas das reações de decomposição das amostras, causando alterações nas curvas termogravimétricas.

**Figura 12.** Curvas TG do B4CMET em diferentes razões de aquecimento**Tabela 16.** Etapa de decomposição do B4CMET em diferentes razões de aquecimento

| B4CMET | Razões (°C.min <sup>-1</sup> ) | Onset (°C) | Endset (°C) | Perda de massa (%) |
|--------|--------------------------------|------------|-------------|--------------------|
| Lote 1 | 10,00                          | 213,27     | 241,21      | 94,15              |
|        | 20,00                          | 220,78     | 260,61      | 94,20              |
|        | 40,00                          | 233,59     | 280,86      | 94,68              |
| Lote 2 | 10,00                          | 220,79     | 254,13      | 94,11              |
|        | 20,00                          | 237,87     | 273,72      | 94,18              |
|        | 40,00                          | 256,98     | 299,26      | 94,24              |
| Lote 3 | 10,00                          | 220,20     | 254,00      | 94,10              |
|        | 20,00                          | 241,61     | 277,48      | 94,25              |
|        | 40,00                          | 256,08     | 299,29      | 94,76              |

### 5.3.3.2 Complexos de Inclusão

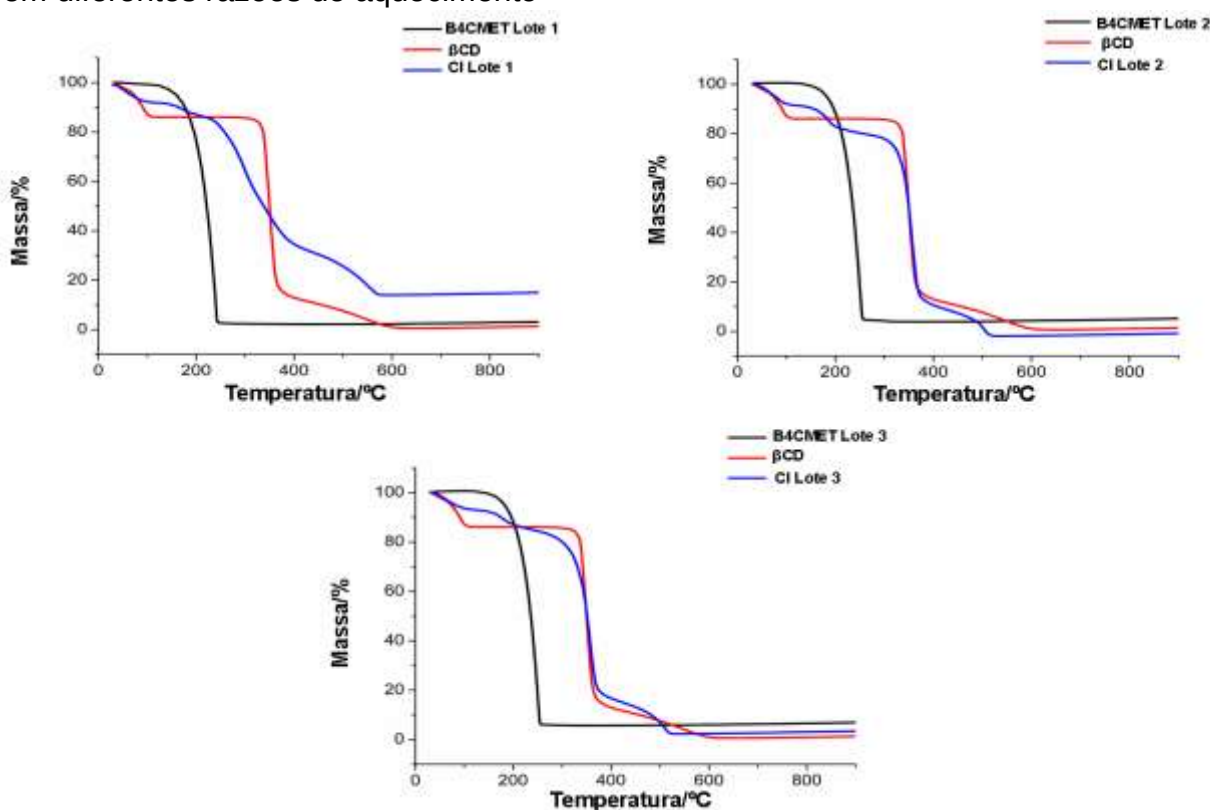
Nas curvas TG, representadas na Figura 13, foi possível identificar para  $\beta$ CD na faixa de temperatura de 99,11-127,25 °C um evento de perda de massa de 12,34% referente à liberação de moléculas de água da cavidade da  $\beta$ CD,

confirmando os resultados obtidos na curva DSC (Figura 11). Em seguida, foi verificado um patamar de estabilidade térmica entre 128-311,16 °C, uma perda de massa de 69,03 % na faixa de temperatura de 311,16-361,85 °C, relacionada à rápida fusão/decomposição da  $\beta$ CD e outro evento de perda de massa de 5,70 %, referente ao final de sua decomposição entre 518-900 °C.

Para o B4CMET foi utilizada a curva TG na razão de 10 °C min<sup>-1</sup> e observou-se um único evento de perda de massa associado à volatilização da molécula (Figura 13).

Em todos os complexos de inclusão (Figura 13), verificaram-se dois eventos de perda de massa na faixa de temperatura de 44,11-178,41 °C, indicando a perda de água de solvatação da cavidade do complexo e à liberação de uma pequena quantidade do B4CMET, respectivamente. Na faixa de 259,64-367,30 °C ocorreu um evento de perda de massa mais acentuado com a liberação do B4CMET incluso. Por fim, na faixa de 486,06-900 °C uma perda de massa adicional foi detectada, sendo 11,17% para o lote 1, 4,4% para o lote 2 e 6,75% para o lote 3. Isto evidencia um aumento da estabilidade térmica para o B4CMET encapsulado, como resultado de interações intermoleculares com a cavidade da  $\beta$ CD.

**Figura 13.** Curvas TG do B4CMET (Rz 10 °C min<sup>-1</sup>),  $\beta$ CD (Rz 10 °C min<sup>-1</sup>) e dos CI em diferentes razões de aquecimento



#### 5.3.4 Estudo cinético da degradação térmica

A determinação de parâmetros cinéticos é de fundamental importância para aplicação nos processos tecnológicos, pois a cinética de decomposição térmica é utilizada para avaliação da estabilidade de fármacos e de formulações farmacêuticas (VYAZOVKIN, WIGHT, 1997; OLIVEIRA et al., 2011).

Na tabela 17 é possível visualizar os parâmetros cinéticos para o B4CMET e os CI. No estudo da cinética de decomposição não isotérmica do B4CMET, percebeu-se que os diferentes lotes da molécula analisada apresentaram cinética de degradação semelhante, com destaque para o modelo cinético de ordem zero que corrobora os resultados da perda de massa identificada nas curvas TG (Figura 12), confirmando o evento de volatilização da molécula.

Analisando-se de modo comparativo os dados (tabela 16), percebeu-se que os valores da energia de ativação encontrados para os três lotes do B4CMET isolado foram inferiores aos valores obtidos para essa substância quando associada a  $\beta$ CD (complexos de inclusão). Deste modo, a entalpia do B4CMET associado a  $\beta$ CD apresentou uma maior energia em relação a B4CMET isolado, o que confirma o aumento na estabilidade térmica do B4CMET nos complexos de inclusão, que foi observado nas curvas TG.

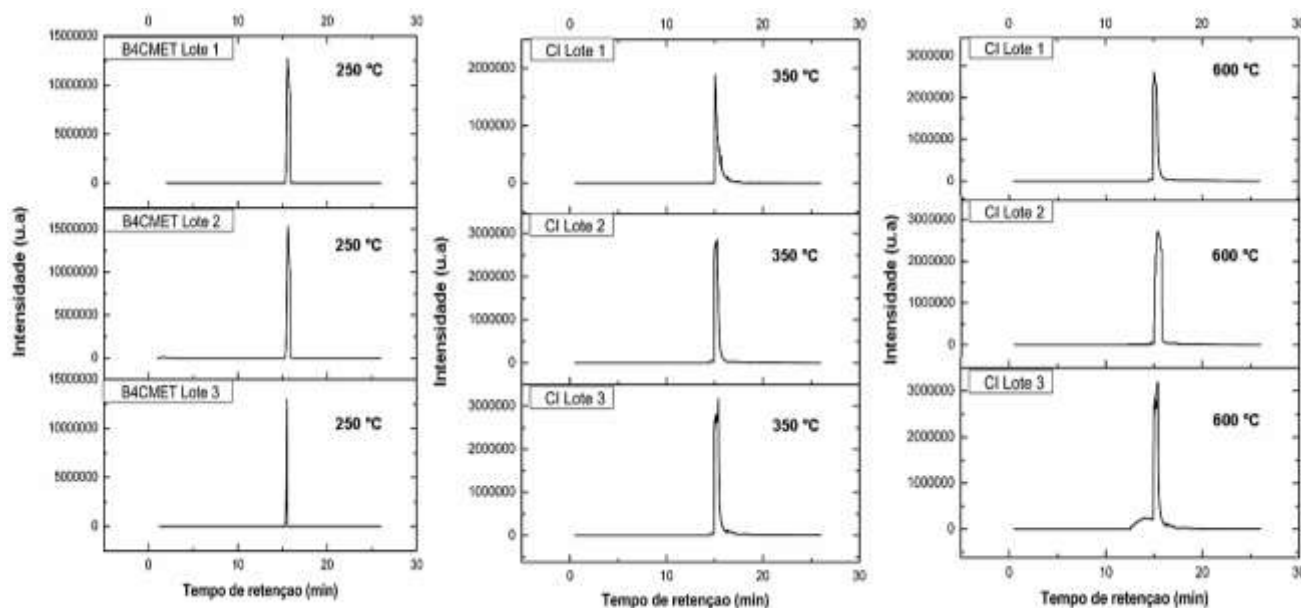
**Tabela 17.** Parâmetros Cinéticos do B4CMET e CI pelo método Ozawa com frações de decomposição  $\alpha_{01}$  e  $\alpha_{09}$

|               |               | Parâmetros cinéticos                           |                    |                                             |
|---------------|---------------|------------------------------------------------|--------------------|---------------------------------------------|
|               |               | Energia de ativação<br>(kJ.mol <sup>-1</sup> ) | Ordem de<br>reação | Fator de frequência<br>(min <sup>-1</sup> ) |
| <b>B4CMET</b> | <b>Lote 1</b> | 78,64                                          | 0                  | 4,50x10 <sup>7</sup>                        |
|               | <b>Lote 2</b> | 72,29                                          | 0                  | 5,22x10 <sup>6</sup>                        |
|               | <b>Lote 3</b> | 75,21                                          | 0                  | 1,07x10 <sup>7</sup>                        |
| <b>CI</b>     | <b>Lote 1</b> | 126,98                                         | 0                  | 2,394x10 <sup>7</sup>                       |
|               | <b>Lote 2</b> | 121,82                                         | 0                  | 1,030x10 <sup>10</sup>                      |
|               | <b>Lote 3</b> | 120,73                                         | 0                  | 8,765x10 <sup>8</sup>                       |

### 5.3.5 Pirólise acoplada à cromatografia gasosa/espectrometria de massa

Para reforçar os resultados obtidos na termogravimetria, o B4CMET e os complexos de inclusão foram submetidos a processos pirolíticos, sendo possível visualizar na Figura 14 os pirogramas nas temperaturas de 250, 350 e 600 °C.

**Figura 14.** Pirogramas do B4CMET e CI em diferentes temperaturas



Percebeu-se para os três lotes do B4CMET a presença de um único pico na temperatura de 250°C (Figura 14), confirmando que a única etapa de perda de massa na curva termogravimétrica (Figura 12), caracteriza-se como processo de volatilização da molécula.

Semelhantemente, nas temperaturas de 350 e 600 °C, para os três lotes dos complexos de inclusão foi visualizado um único pico (Figura 14), indicando que as perdas de massas entre 259,64-367,30 °C e 486,06-900 °C (Figura 13), evidenciando uma redução da velocidade de volatilização demonstrada pela ampla faixa de temperatura do B4CMET incluso na curva termogravimétrica.

### 5.3.6 Espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier

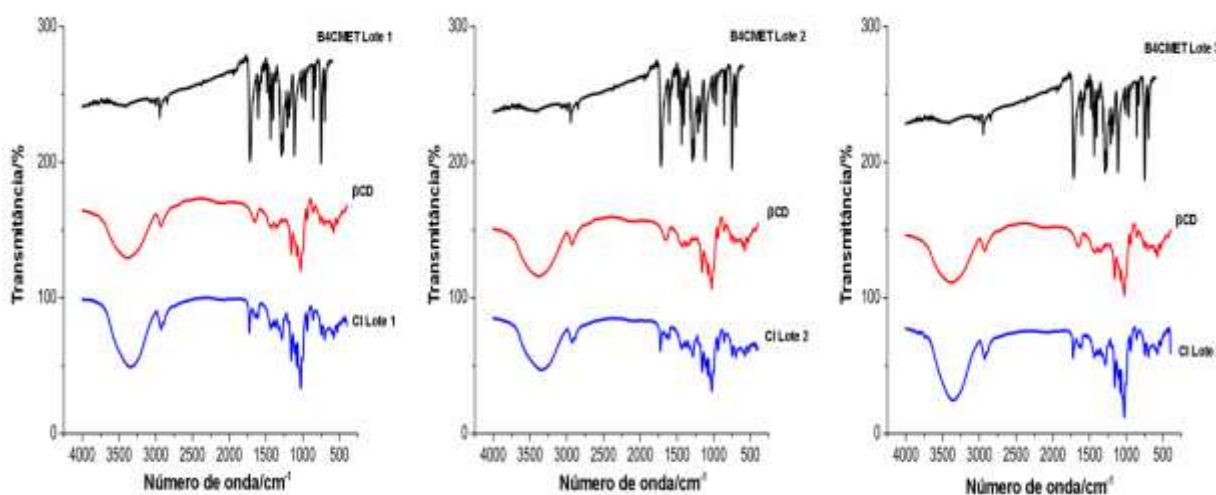
Nos espectros FTIR (Figura 15), foi possível visualizar para a  $\beta$ CD uma banda em 3346  $\text{cm}^{-1}$  (estiramento simétrico e assimétrico do grupo OH), em 2928  $\text{cm}^{-1}$  (estiramento da ligação C-H), em aproximadamente 1640  $\text{cm}^{-1}$  (deformação do

grupo  $\text{-OH}$  de moléculas de água complexadas com  $\beta$ -ciclodextrina), em 1200 a 1500  $\text{cm}^{-1}$  (absorção C- OH que correspondem aos modos de deformação O-H no plano da  $\beta$ CD), em 800 a 1200  $\text{cm}^{-1}$  (estiramento assimétrico de C-O-C) e em 400 a 800  $\text{cm}^{-1}$  (vibrações do anel da  $\beta$ CD).

Para o B4CMET (Figura 15), nos três lotes, foram observadas bandas de absorção em aproximadamente 3000  $\text{cm}^{-1}$  (vibrações de deformação axial de C-H aromático), em 1740 a 1750  $\text{cm}^{-1}$  (vibrações de deformação axial da dupla ligação de C=O), em 1450 a 1600  $\text{cm}^{-1}$  (vibrações de C=C dos núcleos aromáticos), em 1250 a 1300  $\text{cm}^{-1}$  e 1200 a 1050  $\text{cm}^{-1}$  (deformação da ligação C-O do éster), em 710, 750 e 810  $\text{cm}^{-1}$  (deformação angular de 3H adjacentes dos anéis aromático meta-substituído). Ademais, houve ausência de alargamento e deslocamento de bandas, indicando reprodutibilidade entre os três lotes.

Todos os espectros dos complexos de inclusão (Figura 15) assemelharam-se com o espectro da  $\beta$ CD, sendo possível observar bandas características do B4CMET em aproximadamente 3000, 1745, 1460, 1292, 1273, 750  $\text{cm}^{-1}$ , com menor intensidade quando comparadas aos espectros da molécula isolada, podendo ser atribuído a inserção do B4CMET na cavidade da  $\beta$ CD, o que causa uma restrição conformacional que reduz o movimento livre do B4CMET e, por sua vez, diminui a intensidade do sinal. Juntamente com esse efeito, as bandas de estiramento de OH e C-H de  $\beta$ CD foram deslocadas de 3346  $\text{cm}^{-1}$  para 3340  $\text{cm}^{-1}$  e 2928  $\text{cm}^{-1}$  para 2920  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente.

**Figura 15.** Espectros FTIR do B4CMET,  $\beta$ CD e CI





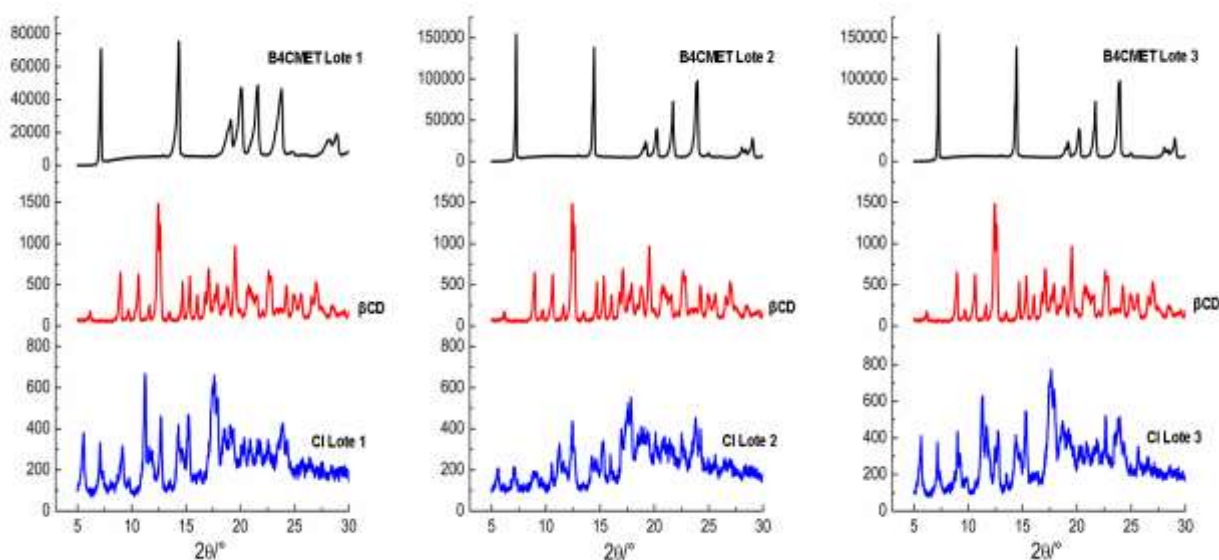
Os resultados alcançados reforçam os dados obtidos nas análises DSC e TG quanto à formação dos complexos de inclusão, pois segundo Barbetta; Magini (2006) e Abarca (2016), a técnica de espectroscopia no infravermelho fornece informações sobre as estruturas das moléculas analisadas, permitindo a constatação da complexação através da observação de mudanças na posição e intensidade dos picos.

### 5.3.7 Difração de Raios-X

Informações complementares sobre a estrutura do B4CMET e CI foram obtidas com a utilização de DRX (Figura 16 e Tabela 18), sendo observado para o B4CMET isolado e a  $\beta$ CD picos de difração intensos e bem definidos, revelando a característica cristalina das moléculas.

Através da análise dos difratogramas dos complexos de inclusão (Figura 16), foi possível perceber que houve o desaparecimento dos picos característicos de difração do B4CMET e da  $\beta$ CD (Tabela 18), evidenciando modificação da cristalinidade. Essa diferença representa mudanças na estrutura do B4CMET com o desenvolvimento de um novo sistema, indicando que ocorreu formação de complexos de inclusão com a interação entre o B4CMET e a  $\beta$ CD.

**Figura 16.** Difratogramas do B4CMET,  $\beta$ CD e CI



**Tabela 18.** Ângulos de difração em  $2\theta$  para os picos do B4CMET e  $\beta$ CD

| $\beta$ CD | Valores $2\theta$ (graus) |        |        |        |        |        |
|------------|---------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
|            | B4CMET                    |        |        | CI     |        |        |
|            | Lote 1                    | Lote 2 | Lote 3 | Lote 1 | Lote 2 | Lote 3 |
| 8,96       | 7,17                      | 7,30   | 7,24   | 11,24  | 11,32  | 11,28  |
| 9,68       | 14,37                     | 14,44  | 14,44  | 12,72  | 12,82  | 12,75  |
| 10,64      | 19,20                     | 19,20  | 19,20  | 14,24  | 14,30  | 14,30  |
| 12,44      | 20,15                     | 20,28  | 20,22  | 15,26  | 15,30  | 15,25  |
| 15,34      | 21,64                     | 21,78  | 21,64  | 17,42  | 17,52  | 17,49  |
| 22,62      | 23,82                     | 23,95  | 23,88  | 19,08  | 19,15  | 19,10  |
| 26,96      | 28,23                     | 28,30  | 28,17  | 23,82  | 23,90  | 23,79  |

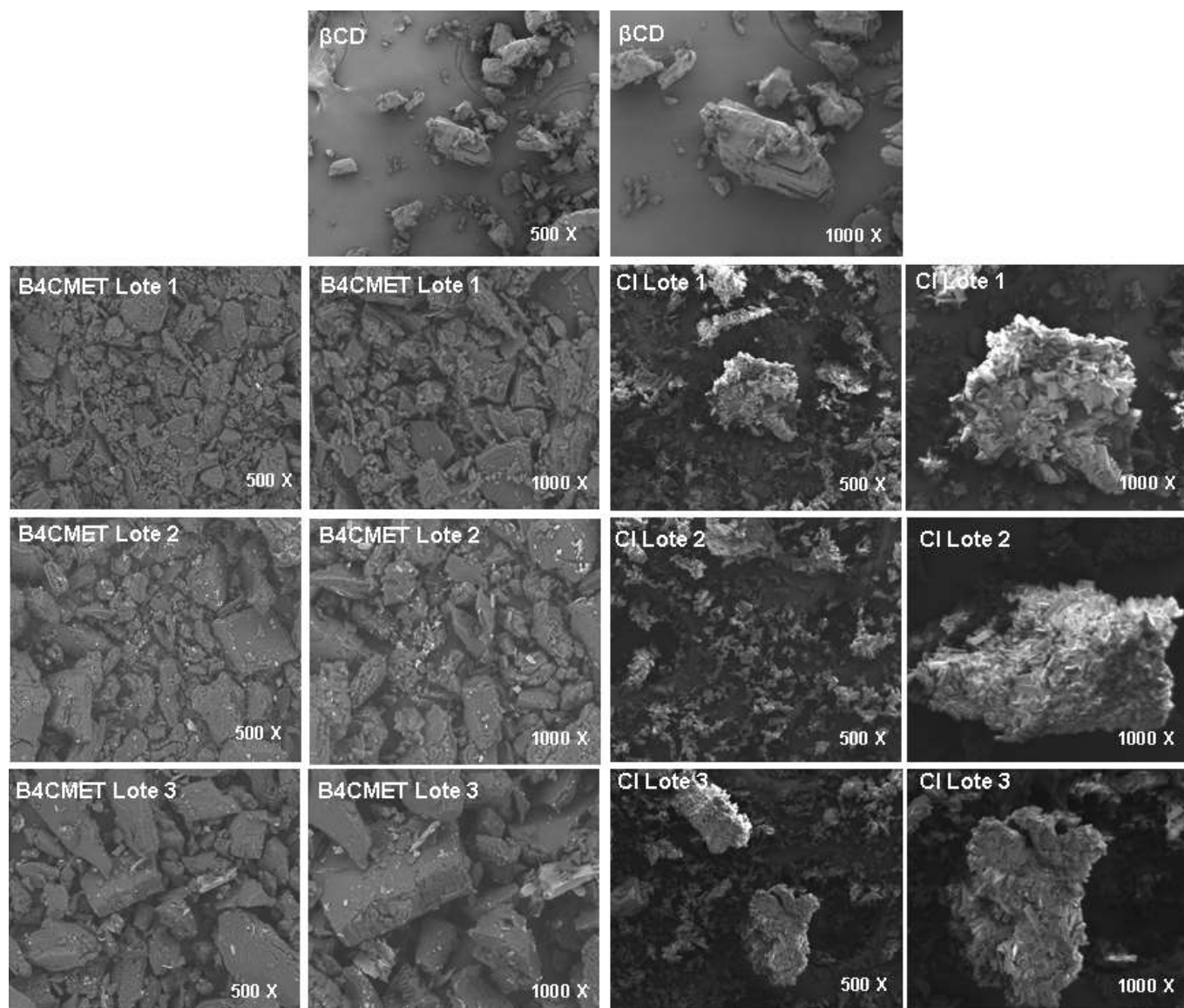
### 5.3.8 Microscopia Eletrônica de Varredura

As análises por MEV foram realizadas para visualização da morfologia das substâncias isoladas e dos complexos de inclusão, sendo possível observar que o B4CMET era constituído por cristais de formato lamelar assemelhando-se a cubos, a  $\beta$ CD era composta de cristais retangulares de diferentes tamanhos e o CI era formado por grandes aglomerações de pequenas partículas em formato de retângulos.

As alterações na cristalinidade do CI, quando comparada à das substâncias isoladas, indicam que a interação entre o B4CMET e a  $\beta$ CD promove mudança na estrutura cristalina devido à formação de complexo de inclusão. Evento corroborado por Lyra et. al. (2010); Jadhav; Pore (2017), ao afirmarem que a formação de complexos promove a formação de um novo estado cristalino, com mudanças radicais das formas e aspectos das partículas nas substâncias isoladas.

Os resultados do MEV são apoiados pelas análises do DRX, que permitiram identificar nova estrutura cristalina para os complexos de inclusão. Convém destacar, também, que o novo estado cristalino obtido no CI apresenta melhores propriedades para desenvolvimento de formulações sólidas, pois de acordo com Saifee et al. (2009); Vieira et al. (2014), estruturas cristalinas na forma de cubos, retângulo ou esferas, quando comparadas aquelas com morfologia de agulhas, apresentam melhores propriedades de fluxo, o que facilita sua utilização para o desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas.

**Figura 17.** Fotomicrografias do B4CMET,  $\beta$ CD e CI



## 5.4 Validação de método cromatográfico para doseamento do B4CMET

### 5.4.1 Seleção e otimização das condições cromatográficas

Primeiramente foi realizada uma varredura da solução do B4CMET na concentração de  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ , obtendo-se como comprimento de onda ideal 273 nm, que foi utilizado para o desenvolvimento do método.

Por ser prática comum a utilização da vazão de  $1 \text{ mL min}^{-1}$  e o volume de  $20 \mu\text{L}$  (SILVA et al., 2007), o fluxo e o volume de injeção foram mantidos nesses valores durante os testes preliminares e a validação.

Como o B4CMET apresentava caráter hidrofóbico, a coluna escolhida foi a Phenomenex C18 (250 x 3,0mm  $3 \mu\text{m}$ ), pois alterações na sílica com o grupamento octadecil proporcionam uma melhor resolução dos picos com a utilização de colunas C18, uma vez que composto hidrofóbico ficam mais tempo retidos (SILVA et al., 2007).

Parâmetros como temperatura do forno e composição da fase móvel foram analisados através de testes com diversas condições de análise (Tabela 19), com o objetivo de proporcionar um melhor tempo de retenção, fator de cauda e assimetria de pico do B4CMET.

A concentração de cada componente do eluente foi a primeira modificação realizada, sendo testadas várias combinações desde 50 até 90% da proporção de metanol, com posteriores mudanças na temperatura do forno.

Como não ocorreu melhora na resolução do pico, foi adicionado Trietilamina a fase móvel para obtenção de picos simétricos com maior resolução cromatográfica (Figura 18). Todavia, o acréscimo desse pareador iônico elevou significativamente o pH, o que resultaria em maior retenção do B4CMET na coluna cromatográfica prolongando o tempo da análise. Assim, tornou-se necessária a correção do pH até 3,5 com o ácido ortofosfórico concentrado para diminuir o tempo de retenção do composto.

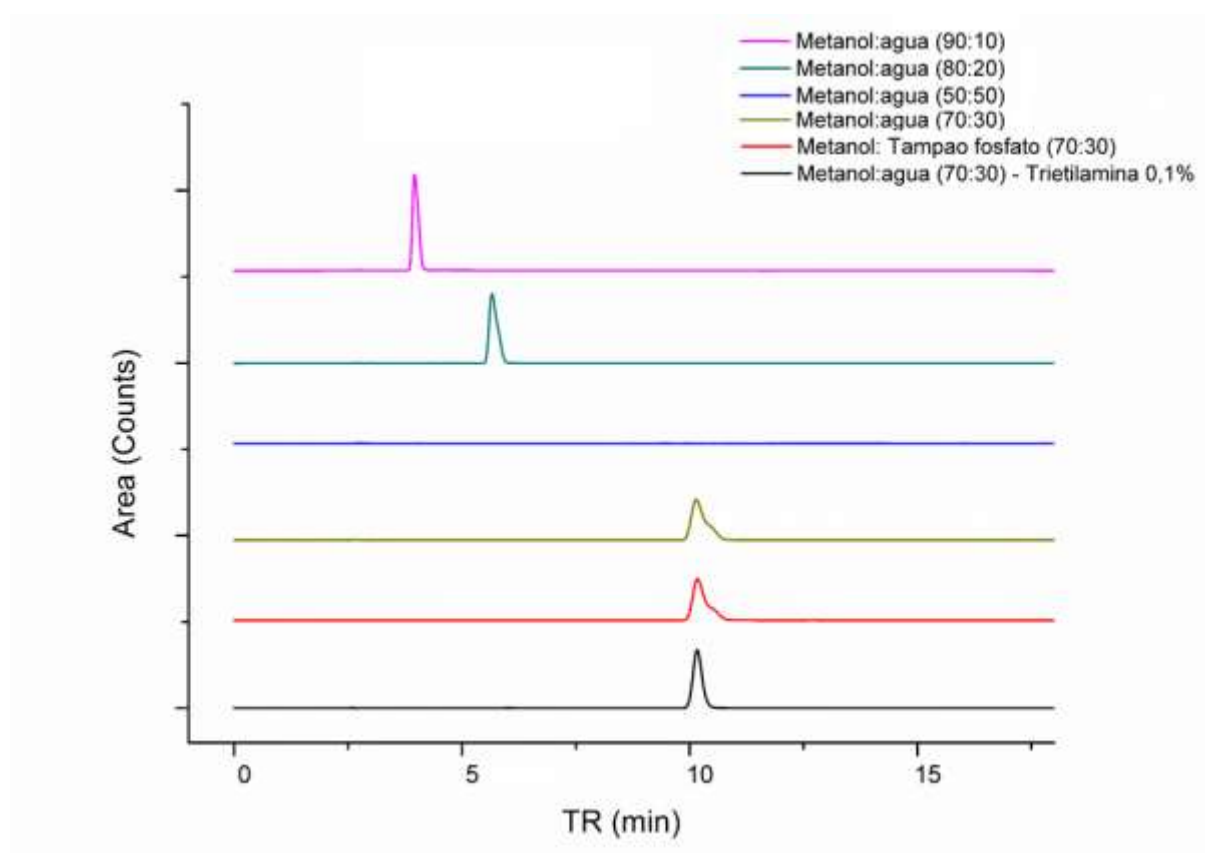
A temperatura do forno, para este método, não influenciou na resolução do pico.

Determinou-se, finalmente, que o método era mais eficiente para análise com a fase móvel Metanol:água (70:30) mais 0,1% de Trietilamina e pH ajustado para 3,5 com ácido ortofosfórico concentrado; temperatura do forno de  $40^\circ\text{C}$ , fluxo de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$  e volume de injeção de  $20 \mu\text{L}$ .

**Tabela 19.** Condições cromatográficas testadas no desenvolvimento

| <b>Condições Cromatográficas</b>                |            |                                                      |                                              |                                                   |                                         |                                                     |
|-------------------------------------------------|------------|------------------------------------------------------|----------------------------------------------|---------------------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| <b>Composição da fase móvel</b><br><b>(%/%)</b> | <b>Ph</b>  | <b>Temperatura</b><br><b>do forno</b><br><b>(°C)</b> | <b>Fluxo</b><br><b>(mL min<sup>-1</sup>)</b> | <b>Volume</b><br><b>de injeção</b><br><b>(µL)</b> | <b>Coluna</b><br><b>(250x3,0mm 3µm)</b> | <b>Comprimento</b><br><b>de onda</b><br><b>(nm)</b> |
| Metanol:água (50:50)                            | –          | 30 / 40                                              | 1,0                                          | 20                                                | Phenomenex C18                          | 273                                                 |
| Metanol:água (60:40)                            | –          | 30 / 40                                              | 1,0                                          | 20                                                | Phenomenex C18                          | 273                                                 |
| Metanol:água (70:30)                            | –          | 30 / 40                                              | 1,0                                          | 20                                                | Phenomenex C18                          | 273                                                 |
| Metanol:água (80:20)                            | –          | 30 / 40                                              | 1,0                                          | 20                                                | Phenomenex C18                          | 273                                                 |
| Metanol:água (90:10)                            | –          | 30 / 40                                              | 1,0                                          | 20                                                | Phenomenex C18                          | 273                                                 |
| Metanol:Tampão Fosfato (70:30)                  | 3,5 / 6,8  | 30 / 40                                              | 1,0                                          | 20                                                | Phenomenex C18                          | 273                                                 |
| <b>Metanol:água (70:30) - Trietilamina 0,1%</b> | <b>3,5</b> | <b>40</b>                                            | <b>1,0</b>                                   | <b>20</b>                                         | <b>Phenomenex C18</b>                   | <b>273</b>                                          |

**Figura 18.** Picos obtidos com as condições cromatográficas testadas



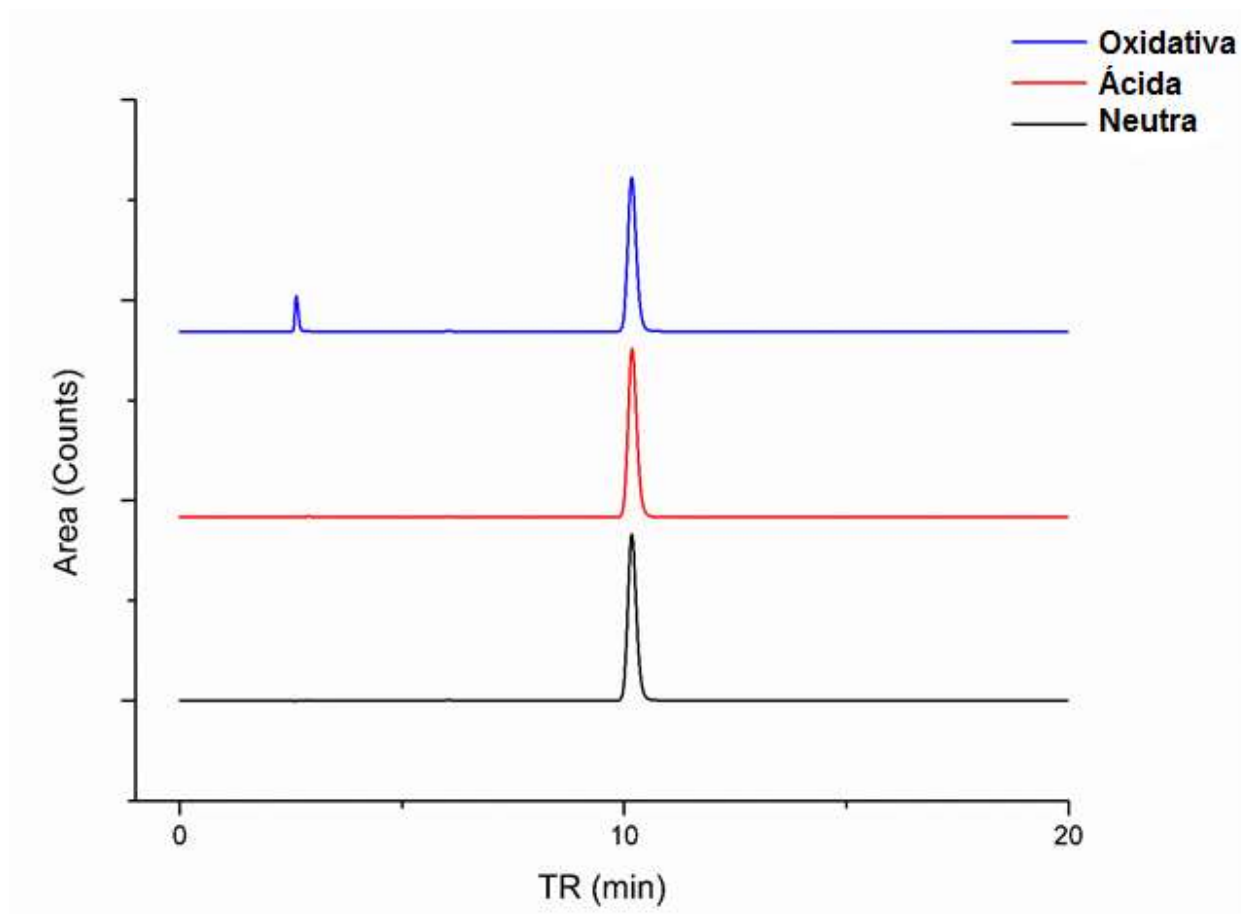
#### 5.4.2 Validação do Método

##### 5.4.2.1 Seletividade

A partir da determinação das condições cromatográficas foi iniciada a validação do método com a análise da seletividade, que buscou estudar o nível de interferência de possíveis compostos; como, por exemplo, impurezas e produtos de degradação, presentes na solução amostra (neutra) e nas soluções ácidas e oxidativa, para assegurar que os resultados obtidos eram unicamente do B4CMET.

Através da injeção, no sistema cromatográfico, das soluções na concentração de  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  foi observado que a técnica desenvolvida demonstrava seletividade, uma vez que no tempo de retenção encontrado para o B4CMET (10,17 minutos), não foram evidenciados picos interferentes (Figura 19). Além disso, a análise de pureza do pico realizada em detector com arranjo de diodo (DAD) comprovou que a resposta era da substância em análise.

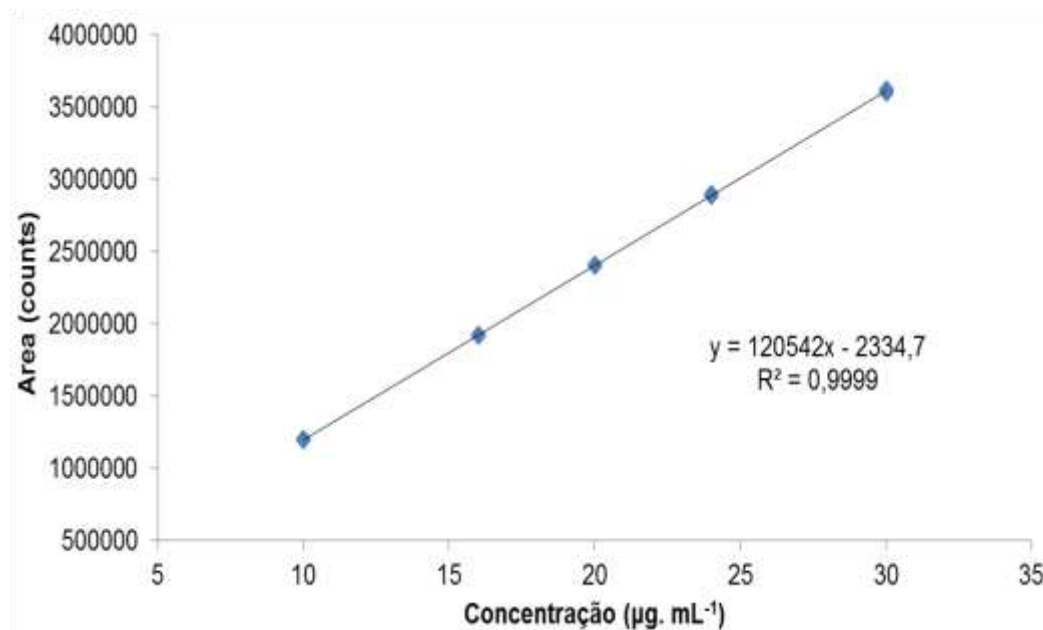
**Figura 19.** Picos obtidos no teste da seletividade



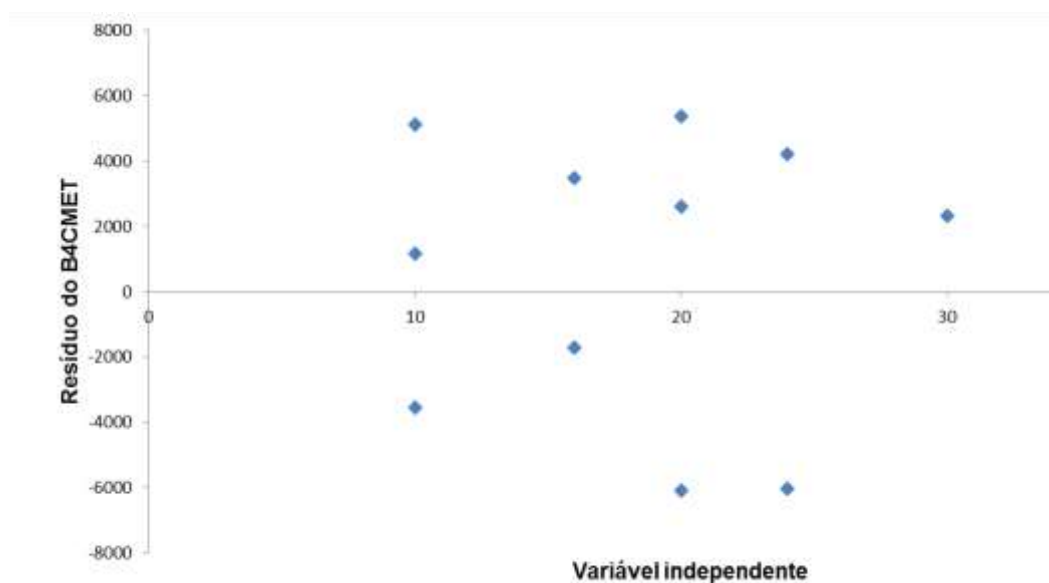
#### 5.4.2.2 Linearidade

Segundo a RDC 899/2003 (BRASIL, 2003), a linearidade deve ser capaz de estabelecer uma relação diretamente proporcional entre sinal analítico e concentração. Assim, este parâmetro foi estudado com a injeção do B4CMET nas concentrações de 10, 16, 20, 24 e 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , posterior construção da curva de calibração e comprovação pelo coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ).

A linearidade do método foi comprovada pelo coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ), que foi igual a 0,9999 (Figura 20); estando, portanto, de acordo com a RDC 899/2003 (BRASIL, 2003), para a qual o valor mínimo de  $R^2$  deve ser 0,99. Essa variação linear também foi explicada pelo teste da falta de ajuste, apresentando um valor igual a 0,275 abaixo do valor tabelado (3,708).

**Figura 20.** Curva de Calibração do B4CMET

No gráfico do resíduo (Figura 21), foi visualizada uma distribuição normal (homocedástica), onde 99,99% da variação de área pode ser explicada pelo modelo de regressão, com correlação positiva significativa, pois o valor de F crítico (4,667) foi menor que o F calculado (184229,797), significando que quando a concentração aumenta a área tende a aumentar.

**Figura 21.** Gráfico do Resíduo para o B4CMET



#### 5.4.2.3 Limite de Quantificação e Limite de Detecção

Os valores calculados para o limite de detecção e de quantificação demonstram a alta sensibilidade e especificidade do método para a determinação do B4CMET. Desse modo, pela análise da curva de calibração foi possível determinar com 95% de confiança, o limite de detecção ( $LD = 0,01936 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e o limite de quantificação ( $LQ = 0,01936 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

#### 5.4.2.4 Precisão

Foram avaliadas a precisão intracorrida (repetitividade) e intercorridas (precisão intermediária), com os valores de desvio padrão e coeficiente de variação sendo considerados para determinação desses parâmetros (Tabela 20), não admitindo valores superiores a 5% de acordo com a RE 899/2003 (BRASIL, 2003).

**Tabela 20.** Resultados da precisão intra e intercorridas

|                               | Precisão                 |                          |                          |
|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                               | $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ | $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ | $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ |
| <b>1º dia (intracorrida)</b>  |                          |                          |                          |
| Média da área (counts)        | 1203992,333              | 2409136,667              | 3612623,667              |
| DP                            | 4343,713                 | 5982,359                 | 12724,961                |
| CV (%)                        | 0,361                    | 0,248                    | 0,352                    |
| <b>2º dia (intercorridas)</b> |                          |                          |                          |
| Média da área (counts)        | 1233406,000              | 2470740,000              | 3704643,167              |
| DP                            | 32595,931                | 68115,758                | 101709,760               |
| CV (%)                        | 2,643                    | 2,757                    | 2,745                    |

DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação

Os resultados apresentados revelaram valores do coeficiente de variação abaixo de 5%; indicando, portanto, que o método desenvolvido é preciso e apresenta baixa variabilidade.

#### 5.4.2.5 Exatidão

Para avaliar a exatidão três níveis de concentração foram verificados, sendo nove determinações, três réplicas da concentração baixa ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), três da concentração média ( $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e três da concentração alta ( $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), descrito na Tabela 21.

**Tabela 21.** Dados obtidos no teste de recuperação para o método desenvolvido

| Níveis | Concentração teórica<br>( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) | Concentração encontrada<br>( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) | Exatidão<br>(%) | CV<br>(%) |
|--------|---------------------------------------------------|------------------------------------------------------|-----------------|-----------|
| Baixo  | 10,00                                             | 10,01                                                | 100,10          | 0,071     |
| Médio  | 20,00                                             | 20,00                                                | 100,00          | 0,000     |
| Alto   | 30,00                                             | 29,99                                                | 99,97           | 0,024     |

CV: coeficiente de variação

O método foi considerado exato, uma vez que os resultados estão de acordo com as especificações exigidas na RE 899/2003 (BRASIL, 2003).

#### 5.4.2.6 Robustez

Para avaliar a robustez do método foram testadas alterações na temperatura do forno, fluxo e proporção da fase móvel; sendo verificado que a técnica permaneceu inalterada em relação a valores da área e tempo de retenção do B4CMET, com CV abaixo de 5%, apenas no parâmetro temperatura (Tabela 22).

**Tabela 22.** Robustez do método cromatográfico

| Parâmetros                                                  | Área        | CV (%) | TR (min) | CV (%) |
|-------------------------------------------------------------|-------------|--------|----------|--------|
| <b>Fluxo (<math>\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}</math>)</b> |             |        |          |        |
| 0,9                                                         | 2547861,333 | 5,994  | 10,399   | 2,416  |
| 1,1                                                         | 2314961,500 | 4,519  | 9,458    | 8,327  |
| <b>Temperatura do forno (<math>^{\circ}\text{C}</math>)</b> |             |        |          |        |
| 38                                                          | 2433306,500 | 1,784  | 9,988    | 2,227  |
| 42                                                          | 2396553,500 | 0,757  | 9,964    | 2,500  |
| <b>Proporção FM (metanol:água)</b>                          |             |        |          |        |
| 68,60: 31,40                                                | 2438781,000 | 1,419  | 9,368    | 14,932 |
| 71,40: 28,60                                                | 2437318,833 | 1,362  | 9,371    | 9,893  |

CV: coeficiente de variação; TR: tempo de retenção, FM: fase móvel.

O fluxo e proporção da fase móvel podem ter influenciado na pressão interna da coluna cromatográfica, o que por sua vez influenciou no tempo de retenção e na área do pico (MARQUES et al., 2013).

### 5.5 Análise Quantitativa do B4CMET nos complexos de inclusão

O teor do B4CMET incorporado aos complexos de inclusão foi determinado através da metodologia de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) desenvolvida e validada neste estudo.

Na tabela 23 são visualizados os dados relacionados ao doseamento dos complexos de inclusão, sendo possível perceber que o B4CMET foi incorporado de forma eficiente.

**Tabela 23.** Dados obtidos no doseamento do B4CMET complexado

| CI            | Concentração teórica<br>( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) | Concentração encontrada<br>( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) | Teor<br>(%) | CV<br>(%) |
|---------------|---------------------------------------------------|------------------------------------------------------|-------------|-----------|
| <b>Lote 1</b> | 10,00                                             | $9,98 \pm 0,015$                                     | 99,79       | 0,146     |
|               | 20,00                                             | $20,01 \pm 0,005$                                    | 100,04      | 0,025     |
|               | 30,00                                             | $29,95 \pm 0,036$                                    | 99,83       | 0,119     |
| <b>Lote 2</b> | 10,00                                             | $10,04 \pm 0,030$                                    | 100,42      | 0,300     |
|               | 20,00                                             | $20,02 \pm 0,015$                                    | 100,11      | 0,077     |
|               | 30,00                                             | $30,02 \pm 0,014$                                    | 100,06      | 0,045     |
| <b>Lote 3</b> | 10,00                                             | $10,01 \pm 0,007$                                    | 100,10      | 0,068     |
|               | 20,00                                             | $19,95 \pm 0,036$                                    | 99,75       | 0,179     |
|               | 30,00                                             | $29,87 \pm 0,091$                                    | 99,57       | 0,303     |

CI: Complexo de Inclusão, CV: coeficiente de variação.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos permitiram identificar a formação de complexos de inclusão do B4CMET com a  $\beta$ CD e conhecer as características físico-químicas do estado sólido do IFA complexado, evidenciando sua maior estabilidade, baixa citotoxicidade e potencial uso como agente antimicótico contra *Candida* spp.

O método analítico desenvolvido para quantificação do B4CMET foi eficiente, cumprindo satisfatoriamente os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão e exatidão exigidos pela legislação brasileira; por isso, torna-se uma importante ferramenta para o controle de qualidade dos produtos tecnológicos intermediários, que podem ser obtidos a partir do Bifenil-4-Carboxilato de Metila durante o processo de desenvolvimento de um novo medicamento.

Os lotes obtidos através do processo de complexação apresentaram características semelhantes em relação às propriedades avaliadas, comprovando que é possível a reprodutibilidade na sua preparação, o que possibilita uma utilização em escala piloto com transposição para nível industrial.

Neste sentido, os complexos de B4CMET serão promissores produtos intermediários no desenvolvimento de futuras formas farmacêuticas estáveis e seguras, como uma nova perspectiva no tratamento de doenças fúngicas.

## REFERÊNCIAS

ABARCA R.L. et al. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing an essential oil component. **Food Chemistry**, v.196, p.968-975, 2016.

ADEOYE, O.; Cabral-Marques, H. Cyclodextrin nanosystems in oral drug delivery: A mini review. **International Journal of Pharmaceutics**, v.531, n.2, p.521-531, 2017.

AGUIAR, U.N. Preparação e caracterização do complexo de inclusão do óleo essencial de *Croton zehntneri* com  $\beta$ -ciclodextrina. **Química Nova**, v.37, n.1, p.50-55, 2014.

AKALIN, M. K.; KARAGÖZ, S. Analytical pyrolysis of biomass using gas chromatography coupled to mass spectrometry. **Trends in Analytical Chemistry**, v.61, p.11-16, 2014.

ALI, M.; SHERAZI, S. T. H.; MAHESAR, S. A. Quantification of erythromycin in pharmaceutical formulation by transmission Fourier transform infrared spectroscopy. **Arabian Journal of Chemistry**, v.7, p.1104-1109, 2014.

AL-NAHARY, T. T. et al. Thermal stability of anti-rheumatic pharmaceutical drugs parecoxib sodium and valdecoxib. **Journal of Saudi Chemical Society**, v.16, p.177-182, 2012.

ALVES, R. et al. Thermal behavior and decomposition kinetics of rifampicin polymorphs under isothermal and non-isothermal conditions. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.46, n.2, p.343-351, 2010.

AMARAL, P. A. et al. Química Combinatória: moderna ferramenta para a obtenção de candidatos a protótipos de novos fármacos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.39, n.4, p.351-363, 2003.

AMORIM, S. R.; KLIER, A. H.; ANGELIS, L. H. Controle de qualidade na indústria farmacêutica: identificação de substâncias por espectroscopia no infravermelho. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.94, n.3, p.234-242, 2013.

ANDRIOLI, A. et al. Caracterização do insumo ibuprofeno e a correlação com propriedades de dissolução e de fluxo. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v.35, n.3, p.401-411, 2014.

ARAÚJO, A. A. S. et al. Determination of the melting temperature, heat of fusion, and purity analysis of different samples of zidovudine (AZT) using DSC. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.46, n.1, p.37-43, 2010.

ARAÚJO, E. J. F. et al. Synthesis, characterization and cytotoxic evaluation of inclusion complexes between Riparin A and  $\beta$ -cyclodextrin. **Journal of Molecular Structure**, v.1142, p.84-91, 2017.

ATTIA, A. L.; ABDEL-MOETY, M. M.; ABDEL-HAMID, S. G. Thermal analysis study of antihypertensive drug doxazosin mesilate. **Arabian Journal of Chemistry**, Article in press, 2012.

BACKES, G. L.; JURISIC, B. S.; NEUMANNA, D. M. Potent antimicrobial agentes against azole-resistant fungi based on pyridinohydrazide and hydrazomethylpyridine structural motifs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.23, p.3397-3407, 2015.

BARBEDO, L. S.; SGARBI, D. B. G. Candidíase. **DST – Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v.22, n.1, p.22-38, 2010.

BARBETTA, C.M.; MAGINI, M.R. **Espectros eletromagnéticos na região do infravermelho: utilização na caracterização de novos materiais**. In: X Encontro Latino 156 Americano de Iniciação Científica e VI Encontro Latino Americano de Pós-Graduação, 2006. Anais Universidade do Vale do Paraíba, v. 13, 2006.

BARREIRO, E. J. A Química medicinal e o paradigma do composto-protótipo. **Revista Virtual de Química**, v.1, n.1, p.26-34, 2009.

BERNAL, C. et al. Influência de alguns parâmetros experimentais nos resultados de análises calorimétricas diferenciais – DSC. **Química Nova**, v.25, n.5, p.849-855, 2002.

BÖER, T.M. et al. Correlation of thermal analysis and pyrolysis coupled to GC–MS in the characterization of tacrolimus. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.73, p.18-23, 2013.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC 899 de 29 de maio de 2003. **Guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos**, 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC nº 17**, 16 de abril de 2010.

BRASIL. Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo. **Indústria**. São Paulo: Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo, 2013.

**Brazilian Chemical Society**, v.24, n.6, p.991-997, 2013.

BRUDELI, B. et al. Acidic biphenyl derivatives: Synthesis and biological activity of a new series of potent 5-HT<sub>4</sub> receptor antagonists. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 21, p.7134–7145, 2013.

BRUNI, G. et al. Determination of the nateglinide polymorphic purity through DSC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.54, p.1196-1199, 2011.

CALLISTER JUNIOR, W. D. **Ciência Engenharia de Materiais – Uma Introdução**. 8ª ed. São Paulo: LTC, 2012.

CHADHA, R.; BHANDARI, S. Drug–excipient compatibility screening—Role of thermoanalytical and spectroscopic techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.87, p.82-97, 2014.

CLSI. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**. CLSI Document M27A3, 3 ed., v.28, n.14. Wayne, PA, USA, 2008.

CORREIA, L. P. et al. Characterization of herbal medicine with different particle sizes using pyrolysis GC/MS, SEM, and thermal techniques. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.111, n.3, p.1691-1698, 2011.

CORREIA, L. P. et al. Sideroxylon obtusifolium herbal medicine characterization using pyrolysis GC/MS, SEM and different thermoanalytical techniques. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.123, n.2, p.993-1001, 2016.

COUTEAU, C. et al. Tris-biphenyl triazine, a new ultravioleta filter studied in terms of 2 photoprotective efficacy. **International Journal of Pharmaceutics**, Article in press, 2015.

CRAIG, D.Q.M., READING, M. **Thermal analysis of Pharmaceutical**. 1 ed. CRC Press: New York, 2007.

CUNHA-FILHO, M.S.S.; SÁ-BARRETO, L.C.L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v.28, n.1, p.1-9, 2007.

DANELUTI, A. L. M.; MATOS, J. R. Study of thermal behavior of phytic acid. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.49, n.2, 2013.

DANNAOUI, E. Résistance des *Candida* aux antifongiques: détection et mécanismes. **Revue Francophone des Laboratoires**, v.2013, n.450, p.71-77, 2013.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura: aplicação e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**. Porta Alegre: EDIPUCRS, 60p. 2007.

DENARI, G. B.; CAVALHEIRO, E. T. G. **Princípios e aplicações de análise térmica**. São Carlos: IQSC, 40p., 2012.

DEUS, R. J. A.; ALVES, C. N.; ARRUDA, M. S. P. Avaliação do efeito antifúngico do óleo resina e do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.13, n.1, p.1-7, 2011.

DIRECT INDUSTRY. **Microplaca para ensayos de absorción**. Disponível em: <<http://www.directindustry.es/prod/eppendorf/product-22548-1479257.html>>. Acesso em 06 de janeiro de 2016.

DONG, J. et al. Synthesis and biological evaluation of novel aromatic-heterocyclic biphenyls as potent anti-leukemia agentes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.101, p.780-789, 2015.

DONG, P. et al. In-situ synchrotron wide-angle X-ray diffraction as a rapid method for cocrystal/salt screening. **International Journal of Pharmaceutics**, v.496, p.107-116, 2015.

DONG, Y.-D.; BOYD, B. J. Applications of X-ray scattering in pharmaceutical Science. **International Journal of Pharmaceutics**, v.417, p.101-111, 2011.  
emprego em formulações semi-sólidas fitoterápicas. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.28, n.3, p.344-350, 2009.

FATTAHI, A. et al. Preparation and characterization of simvastatin nanoparticles using rapid expansion of supercritical solution (RESS) with trifluoromethane. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.107, p.469-478, 2016.



FERST, G. C. **Análise da indústria farmacêutica no Brasil: surgimento e desenvolvimento da indústria nacional**. Trabalho de Conclusão de Curso. 66p. Porto Alegre-RS, 2013.

FONTANIVE, V. C. P. et al. Aspectos físicos e biológicos de nanopartículas de ferritas magnéticas. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v.35, n.4, p.549-558, 2014.

FORATO, L. A. et al. **A Espectroscopia na região do Infravermelho e algumas aplicações**. São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 14 p. Embrapa Instrumentação. Documentos 51, ISSN 1518-7179, 2010.

FORD, J.L.; MANN, T.E. Fast-Scan DSC and its role in pharmaceutical physical form characterisation and selection. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.64, p.422-430, 2012.

FRACETO, L. F.; DE PAULA, E. Interação de anestésicos locais com lipossomos determinada por espectroscopia de infravermelho. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v.27, n.1, p.27-35, 2006.

FREIRE, F.D. et al. Compatibility study between chlorpropamide and excipientes in their physical mixtures. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.97, p.355-357, 2009.

GAO, J.-M.; DING, L.-X.; HU, C.-Q. A comparative uncertainty study of the purity assessment of chemical reference substances using differential scanning calorimetry (DSC) and mass balance method. **Thermochimica Acta**, v.525, p.1-8, 2011.

GE, S. et al. Pyrolysis study of pectin by tunable synchrotron vacuum ultraviolet photoionization mass spectrometry. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.120, p.1399–1405, 2015.

GIL, E.S. **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos**, 3 ed., São Paulo: Pharmabooks, 2010, cap.4.

GONG, L. et al. An inclusion complex of eugenol into  $\beta$ -cyclodextrin: Preparation, and physicochemical and antifungal characterization. **Food Chemistry**, v.196, p.324-330, 2016.

GUAN, Y. et al. High transparent polyimides containing pyridine and biphenyl units: Synthesis, thermal, mechanical, crystal and optical properties. **Polymer**, v.62, p. 1-10, 2015.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. **Estudos Avançados**, v.24, n.70, p.81-98, 2010.

GUO, Z. et al. Host-guest kinetic interactions between HP- $\beta$ -cyclodextrin and drugs for prediction of bitter taste masking. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.140, p.232-238, 2017.

HE, H. et al. Synthesis, characterization and biological evaluation of fluorescent biphenyl-furocoumarin derivatives. **Dyes and Pigments**, v.113, p.174-180, 2015.

HIGUCHI T.; CONNORS K. A. **Phase-solubility techniques**. In: Reilly CN. editor. *Advances in analytical chemistry and instrumentation*. New York, NY: Wiley-Interscience; 1965. p.117-212.

HILTZ, J. A. Characterization of fluoroelastomers by various analytical techniques including pyrolysis gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v.109, p.283–295, 2014.

HUBERT, P. et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures A SFSTP proposal – Part II. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.45, p.70-81, 2007.

IBRAHIM, N. H. et al. The effect of antifungal combination on transcripts of a subset of drug-resistance genes in clinical isolates of *Candida* species induced biofilms. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v.23, p.55-66, 2015.

IMS. Institute for Healthcare Informatics. **Global Medicines Use in 2020: Outlook and Implications**. Report by the IMS Institute for Healthcare Informatics, 44p., 2015.  
IONASHIRO, M. **Giolito, fundamentos da termogravimetria, análise térmica diferencial, calorimetria exploratória diferencial**, Araraquara, Giz Editorial, 2004.

ISSE, K. F. **A indústria farmacêutica nacional e a importância dos medicamentos genéricos no seu desenvolvimento**. Dissertação de Mestrado. 83p. Porto Alegre-RS, 2011.

JADHAV, P.; PORE, Y. Physicochemical, thermodynamic and analytical studies on binary and ternary inclusion complexes of bosentan with hydroxypropyl- $\beta$ -

cyclodextrin. **Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University**, v.55, n.1,p.147-154, 2017.

JAIN, Z. J.; GIDE, P. S.; KANKATE, R. S. Biphenyls and their derivatives as synthetically and pharmacologically important aromatic structural moieties. **Arabian Journal of Chemistry**. Article in press, 2013.

KALINKOVA, G. N. Infrared spectroscopy in pharmacy. **Vibrational Spectroscopy**, v.19, n.2, p.307-320, 1999.

KESTENS, V. et al. Differential scanning calorimetry method for purity determination: A case study on polycyclic aromatic hydrocarbons and chloramphenicol. **Thermochimica Acta**, v.524, p.1-6, 2011.

KFOURY M. et al. Solubility, photostability and antifungal activity of phenylpropanoids encapsulated in cyclodextrins. **Food Chemistry**, v.196, p.518–25, 2016.

KHASKHELI, A. R. et al. Estimation of ibuprofen in urine and tablet formulations by transmission Fourier Transform Infrared spectroscopy by partial least square. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.102, p.403-407, 2013.

KORADIA, V. et al. Solid Forms of Amlodipine Besylate: Physicochemical, Structural, and Thermodynamic Characterization. **Crystal Growth & Design**, v.10, n.12, 2010.

KUO, W.-L. et al. Biphenyl-type neolignans from *Magnolia officinalis* and their anti-inflammatory activities. **Phytochemistry**, v.85, p.153–160, 2013.

KUSCH, P. et al. Application of pyrolysis – Gas chromatography/mass spectrometry for the identification of polymeric materials in failure analysis in the automotive industry. **Engineering Failure Analysis**, v.35, p.114–124, 2013.

KUSCH, P. et al. Characterization of copolymers of methacrylic acid with poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate macromonomers by analytical pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry (Py-GC/MS). **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, article in press, 2015.

ŁĄCZKOWSKI, K. Z. et al. Synthesis, antimicrobial evaluation and theoretical prediction of NMR chemical shifts of thiazole and selenazole derivatives with high

antifungal activity against *Candida* spp. **Journal of Molecular Structure**, v.1108, p.427-437, 2016.

LI, J.-F. et al. Identification of a cyclodextrin inclusion complex of antimicrobial peptide CM4 and its antimicrobial activity. **Food Chemistry**, v.221, p.296-301, 2017.  
LIRA, M. C. B. **Complexo de inclusão ácido Úsnico:β-ciclodextrina: preparação, caracterização e nanoencapsulação em lipossomas**. Dissertação de Mestrado. 90p. Recife-PE, 2007.

LIU, J.-Y. et al. Mechanisms of azole resistance in *Candida albicans* clinical isolates from Shanghai, China. **Research in Microbiology**, v.166, p.153-161, 2015.

LIU, L. et al. Inclusion complexes of laccaic acid A with β-cyclodextrin or its derivatives: Phase solubility, solubilization, inclusion mode, and characterization. **Dyes and Pigments**, v.139, p.737-746, 2017.

LUIZE, P. S. et al. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania* (L.) amazonensis and *Trypanosoma cruzi*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.41, n.1, 2005.

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

MACEDO, R. O. et al. Application of thermal analysis in the characterization of anti-hypertensive drugs. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.59, p. 657-661, 2000.

MADHUKAR, A. et al. Synthesis and antimicrobial studies of Biphenyl-4-Carboxylic Acid 2-(aryl)-4-oxo-thiazolidin-3-yl-amide. **International Journal of ChemTech Research**, v.1, n.4, p.1376-1380, 2009.

MAGGIO, R. M. et al. Pharmaceutical impurities and degradation products: Uses and applications of NMR techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.101, p.102-122, 2014.

MALLAH, M. A. et al. A rapid Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopic method for direct quantification of paracetamol content in solid pharmaceutical formulations. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.141, p.64-70, 2015.

MARQUES, G.S. et al. Comparative evaluation of UV/VIS and HPLC analytical methodologies applied for quantification of flavonoids from leaves of *Bauhinia forficata*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.23, n.1, p.51-57, 2013.

MARTINS, N. et al. Activity of phenolic compounds from plant origin against *Candida* species. **Industrial Crops and Products**, v.74, p.648–670, 2015.

MATHKAR, S. et al. The use of differential scanning calorimetry for the purity verification of pharmaceutical reference standards. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.49, p.627-631, 2009.

MAURYA, R. C. et al. Synthesis, characterization, and 3D-molecular modeling and analysis of some copper(II) chelates in O,N-donor coordination pattern involving Schiff bases derived from 4-butyryl-3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one and some sulfa drugs. **Arabian Journal of Chemistry**, v.8, p.143-154, 2015.

MAXIMIANO, F. P. et al. Caracterização físico-química do fármaco antichagásico Benznidazol. **Química Nova**, v.33, n.8, p.1714-1719, 2010.

MEDEIROS, A. C. D. et al. Technological quality determination of pharmaceutical disintegrant by DSC cooling and DSC photovisual. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, vol.88, p.311-315, 2007.

MELO, C. A. D. et al. Classification of Tablets containing dipyrone, caffeine and orphenadrine by near infrared spectroscopy and chemometric tools. **Journal of the**

MENDES, C. et al. Inclusion complexes of hydrochlorothiazide and  $\beta$ -cyclodextrin: Physicochemical characteristics, in vitro and in vivo studies. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.83, p. 71–78, 2016.

MENEZES P.P. et al. Inclusion complex of (2)-linalool and  $\beta$ -cyclodextrin. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.115, p.2429-2437, 2014.

MILTYK, W.; ANTONOWICZ, E.; KOMSTA, Ł. Recognition of tablet content by chemometric processing of differential scanning calorimetry curves – An acetaminophen example. **Thermochimica Acta**, v.507-508, p.146-149, 2010.

MOHIT, V. et al. Effect of preparation method on complexation of Cefdinir with  $\beta$ -cyclodextrin. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v.67, n.1–2, p. 39-47, 2010.

MOORE, M. D. et al. A structural investigation into the compaction behavior of pharmaceutical composites using powder X-ray diffraction and total scattering analysis. **Pharmaceutical Research**, v.26, n.11, p.2429-2437, 2009.

MORACE G.; PERDONI, F.; BORGHI, E. Antifungal drug resistance in *Candida* species. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v.2, p.254–259, 2014.

MORAES, R. C. et al. Antifungal activity of *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C. against resistant non-*albicans* *Candida* isolates. **Industrial Crops and Products**, v.69, p.7-14, 2015.

MORAIS, F. E. **Estudo termoanalítico de medicamentos de referência, genérico e similar**. Dissertação de Mestrado. 117p. Natal-RN, 2011.

MORAIS, F. E. et al. Caracterização e avaliação do comportamento térmico dos medicamentos de referência, genérico e similar contendo o ácido acetilsalicílico como princípio ativo. **Brazilian Journal of Thermal Analysis**, v.4, n.1-2, p.1-5, 2015.

MORIO, F. et al. Deciphering azole resistance mechanisms with a focus on transcription factor-encoding genes *TAC1*, *MRR1* and *UPC2* in a set of fluconazole-resistant clinical isolates of *Candida albicans*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.42, p.410-415, 2013.

MOURA, E. A. et al. Thermal characterization of the solid state and raw material fluconazole by thermal analysis and pyrolysis coupled to GC/MS. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.100, p.289-293, 2010.

MOURÃO, L. C. S. Effect of hydroxypropyl methylcellulose on beta cyclodextrin complexation of praziquantel in solution and in solid state. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v.85, p.151-160, 2016.

NERY, C. G. C. et al. Caracterização do fármaco hipoglicemiante glibenclamida. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.44, n.1, p.61-73, 2008.

NUMPILAI, T.; MUENMEE, S.; WITOON, T. Impact of pore characteristics of silica materials on loading capacity and release behavior of ibuprofen. **Materials Science and Engineering: C**, v.59, p.43–52, 2016.

NUNES, K. M. et al. Padronização da tintura de Calendula officinalis L. para seu OLIVEIRA, A.H. et al. Thermal characterization of raw material pentoxifylline using thermoanalytical techniques and Pyr-GC/MS. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.106, p.763-766, 2011.

OLIVEIRA, E. J. et al. Usefulness of pyrolysis coupled to gas chromatography/mass spectrometry for evaluating the reproducibility of comercial samples of Cymbopogon citratus Stapf., Poaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.20, n.1, p.93-99, 2010.

OLIVEIRA, et al. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Química Nova**, v.34, n.7, p.1224-1230, 2011.

OLIVEIRA, M. A. et al. Análise térmica aplicada à caracterização da Sinvastatina em formulações farmacêuticas. **Química Nova**, v.33, n.8, p.1653-1657, 2010.

OZAWA, T. A new method of analyzing thermogravimetric data. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v.38, n.11, p.1881-1886, 1965.

PEREIRA, J. G. et al. Termogravimetria: um novo enfoque para a clássica determinação de cálcio em cascas de ovos. **Química Nova**, v.32, n.6, p.1661-1666, 2009.

PFALLER, M. A. et al. Isavuconazole, micafungin, and 8 comparator antifungal agents' susceptibility profiles for common and uncommon opportunistic fungi collected in 2013: temporal analysis of antifungal drug resistance using CLSI species-specific clinical breakpoints and proposed epidemiological cutoff values. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.82, p.303-313, 2015.

PIRES, R. H. **Formação de biofilmes e resistência a antifúngicos e biocidas em *Candida parapsilosis* e *C. orthopsilosis* isoladas de águas usadas para hemodiálise**. Tese de Doutorado. 172p. Araraquara-SP, 2010.

PORTELA, A.S. et al. Políticas públicas de medicamentos: trajetória e desafios. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v.31, n.1, p.09-14, 2010.

PRASNIEWSKI, A.; AGUIAR, L. M.; OLDONI, T. L. C. Determinação de cafeína em chá preto (*Camellia sinensis*) por métodos cromatográficos: CCD, CLAE-DAD e CG-EM. **Synergismus scientifica UTFPR**, v.10, n.1, 2015.

PRÓ GENÉRICOS. Mercado: **Raio-X do setor no Brasil**. Disponível em: <<http://www.progenericos.org.br/index.php/mercado>>. Acessado em 27 de novembro de 2015.

PROCÓPIO, J. V. V. et al. Application of thermal analysis and pyrolysis coupled to GC/MS in the qualification of simvastatin pharmaceutical raw material. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.106, n.3, p.665-670, 2011.

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. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.41, p.281-299, 2005.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, n.5, p.771-780, 2004.

RIBEIRO, F. A. L. et al. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v.31, n.1, p.164-171, 2008.

ROBAINA, N. F. et al. Novel approach for the determination of azithromycin in pharmaceutical formulations by Fourier transform infrared spectroscopy in film-through transmission mode. **Microchemical Journal**, v.110, p.301-307, 2013.

ROY A.; SAHA, S.; ROY, M. N. Exploration of inclusion complexes of probenecid with  $\alpha$  and  $\beta$ -cyclodextrins: Enhancing the utility of the drug. **Journal of Molecular Structure**, v.1144, p.103-111, 2017.

ROZET, E. et al. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. **Journal of Chromatography A**, v.1158, p.111-125, 2007.

SACHAN, N. et al. Substituted biphenyl ethanones as antidiabetic agents: Synthesis and in-vivo screening. **International Journal of PharmTech Research**, v.1, n.4, p.1625-1631, 2009.



SAIFEE, M. et al. Drug Polymorphism: A Review. **International Journal of Health Sciences and Research**, v.2, n.4, 291-306, 2009.

SAITO, Y.; MORIKAWA, J. Honda's thermobalance. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.113, p.1157-1168, 2013.

SALVI, S. T. B. et al. Análise de polimorfismo em comprimidos de Espironolactona, por difração de raios X, método de Rietveld e ensaios de dissolução. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 36, s.1, 2015.

SANDOUK-LINCKE, N. A. et al. The effect of different pyrolysis temperatures on organic microfossils, vitrain and amber—A comparative study between laser assisted- and Curie Point pyrolysis–gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v.107, p.211–223, 2014.

SANGEETHA, M. K. et al. TG–DTA, XRD, SEM, EDX, UV, and FT-IR spectroscopic studies of L-valine thiourea mixed crystal. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.119, p.907–913, 2015.

SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, p.275-280, 2004.

SEDDIKI, S. M. L. et al. Infectivités fongiques des cathéters implantés dues à *Candida* sp. Formation des biofilms et résistance. **Journal de Mycologie Médicale**, v.25, p.130-135, 2015.

SERAFINI M.R. et al. Interaction of p-cymene with b-cyclodextrin. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.109, p.951-955, 2012.

SILVA, A. L. M. et al. Desenvolvimento de método analítico por clae em comprimidos de Benznidazol para a doença de chagas. **Química Nova**, v.30, n.5, p.1163-1166, 2007.

SILVA, R. M. F. et al. Caracterização do sulfato de indinavir para a certificação dos fornecedores na produção de medicamentos antirretroviral. **Brazilian Journal of Pharmacy**, v.93, n.4, p.439-443, 2012.

SILVÉRIO, F. O.; BARBOSA, L. C. A.; PILÓ-VELOSO, D. A pirólise como técnica analítica. **Química Nova**, v.31, n.6, p.1543-1552, 2008.

SILVERSTEIN, R.M. et al. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SISSY, C. E. et al. Acquisition de résistance à la 5-fluorocytosine chez deux patients atteints de candidurie à *Candida glabrata*. **Journal of Medical Mycology**, v., n.3, p.224, 2015.

SOUZA, S. P. M. C. et al. Determinação do teor de cálcio em comprimido à base de lactato de cálcio utilizado no tratamento da osteoporose. **Química Nova**, v.35, n.7, p.1355-1359, 2012.

STORPIRTIS, S. et al. **Ciências Farmacêuticas: Biofarmacotécnica**, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2009.

TANG, P. et al. Inclusion complexes of chlorzoxazone  $\beta$ - and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin: Characterization, dissolution, and cytotoxicity. **Carbohydrate Polymers**, v.131, p.297-305, 2015.

TIȚA, B. et al. Compatibility study between ketoprofen and pharmaceutical excipients used in solid dosage forms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.56, p.221-227, 2011.

TOLU, J. et al. High-throughput characterization of sediment organic matter by pyrolysis–gas chromatography/mass spectrometry and multivariate curve resolution: A promising analytical tool in (paleo)limnology. **Analytica Chimica Acta**, article in press, 2015.

VALENTINI, S. R.; SOMMER, W.A.; MATIOLI G. Validação de Métodos Analíticos. **Arquivos do MUDI**, v.11, n.2, p.26-31, 2007.

VIANNA-FILHO, R. et al. Rheological characterization of O/W emulsions incorporated with neutral and charged polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v.93, p.266-272, 2013.

VIEIRA, A. C. Q. M. et al. Physical–chemical characterization of new anti-inflammatory agent (LPSF/GQ-130) and evaluation of its thermal compatibility with pharmaceutical excipients. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.115, p.2339–2349, 2014.

VYAZOVKIN, S.; WIGHT, C. A. Kinetics in solids. **Annual Review of Physical Chemistry**, v.48, p.125-149, 1997.

WANG, L. et al. Application of pyrolysis-gas chromatography and hierarchical cluster analysis to the discrimination of the Chinese traditional medicine *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v.90, p.13-17, 2011.

WANG, Y. et al. Mutations in transcription factor Mrr2p contribute to fluconazole resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.46, p.552-559, 2015.

XU, J. et al. Inclusion complex of nateglinide with sulfobutyl ether  $\beta$ -cyclodextrin: Preparation, characterization and water solubility. **Journal of Molecular Structure**, v.1141, p.328-334, 2017.

XUA J. et al. Inclusion complex of nateglinide with sulfobutyl ether  $\beta$ -cyclodextrin: preparation, characterization and water solubility. **Journal of Molecular Structure**, v.1141, p.328-334, 2017.

YANG, H. et al. Characterization of Chinese crude propolis by pyrolysis gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, vol. 113, 158-164, 2015.

YANG, R.; ZHAO, J.; LIU, Y. Oxidative degradation products analysis of polymer materials by pyrolysis gas chromatography/mass spectrometry. **Polymer Degradation and Stability**, v.98, p.2466-2472, 2013.

YU, F.-L. et al. Discovery of novel antitumor dibenzocyclooctatetraene derivatives and related biphenyls as potent inhibitors of NF- $\kappa$ B signaling pathway. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.22, p.325-333, 2014.

ZAYED, M. A. et al. Investigation of naproxen drug using mass spectrometry, thermal analyses and semi-empirical molecular orbital calculation. **Arabian Journal of Chemistry**, Article in press, 2013.

ZHANG, A. et al. Synthesis and antimicrobial activities of acrylamide polymers containing quaternary ammonium salts on bacteria and phytopathogenic fungi. **Reactive & Functional Polymers**, v.88, p.39-46, 2015.

ZHANG, Y. et al. Substituted 1,6-diphenylnaphthalenes as FtsZ-targeting antibacterial agentes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.23, p.2001–2006, 2013.

## APÊNDICE

### Apêndice 1. Artigo publicado

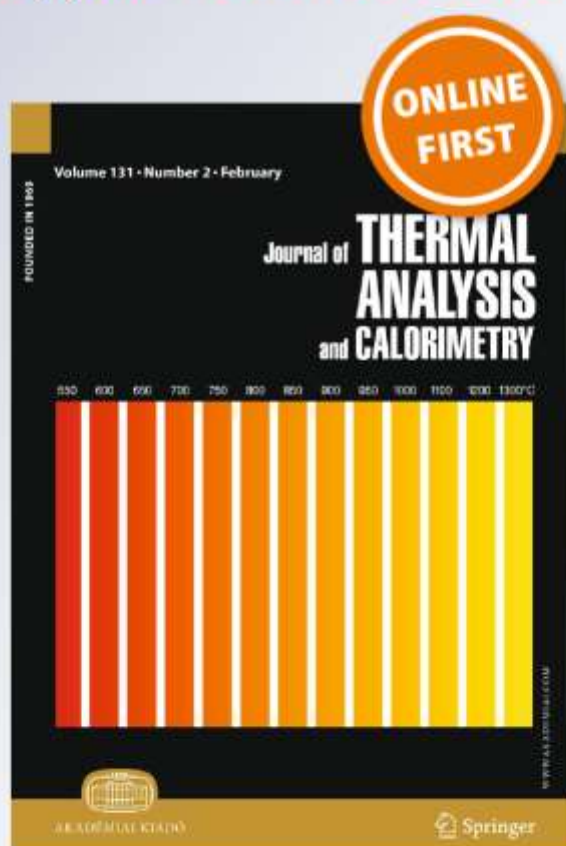
# *Investigation of the thermal behavior of inclusion complexes with antifungal activity*

**Fernando José de Lima Ramos Júnior,  
Karla Monik Alves da Silva, Deysiane  
Oliveira Brandão, José Venâncio Chaves  
Junior, et al.**

**Journal of Thermal Analysis and  
Calorimetry**  
An International Forum for Thermal  
Studies

ISSN 1388-6150

J Therm Anal Calorim  
DOI 10.1007/s10973-018-7040-2





## Investigation of the thermal behavior of inclusion complexes with antifungal activity

Fernando José de Lima Ramos Júnior<sup>1,2</sup> · Karla Monik Alves da Silva<sup>1,2</sup> · Deysiane Oliveira Brandão<sup>1,2</sup> · José Venâncio Chaves Junior<sup>2</sup> · Jonh Anderson Borges dos Santos<sup>2</sup> · Fabrício Havy Dantas de Andrade<sup>1,2</sup> · Rayanne Sales de Araújo Batista<sup>2</sup> · Taynara Batista Lins<sup>2</sup> · Damião Pergentino de Sousa<sup>3</sup> · Ana Cláudia Dantas Medeiros<sup>4</sup> · Marta Maria Conceição<sup>5</sup> · Rui Oliveira Macêdo<sup>1,2</sup> · Fábio Santos de Souza<sup>1,2</sup>

Received: 12 August 2017 / Accepted: 25 January 2018  
 © Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary 2018

### Abstract

The indiscriminate use of antifungal agents has led to the advancement of microorganisms tolerant to the various drugs known in the market. Therefore, the search for new compounds and new technologies capable of giving more stable formulations and better pharmacological activities is of paramount importance as an alternative for the development of new therapeutics. However, its effectiveness is directly related to the knowledge of its characteristics in the solid state. Thus, the objective of this work was evaluating the thermal behavior, physicochemical aspects and microbiological of the complexes of inclusion of  $\beta$ -cyclodextrin (BCD) and biphenyl-4-methyl carboxylate (B4CMET). Therefore, differential scanning calorimetry, thermogravimetry, Fourier-transformed infrared spectroscopy, X-ray diffraction and microbiological assay were used to generate robust fingerprint of the inclusion complexes. The results showed the formation of inclusion complexes of B4CMET with  $\beta$ CD, thereby stressing its greater stability and potential use as an antifungal agent against *Candida* spp. Thus, with thermoanalytical techniques it was possible to observe the increased thermal stability, with FTIR changes of characteristic bands were verified, with XRD the disappearance of diffraction peaks of the B4CMET was verified, and with the microbiological assay it was possible to visualize increased antifungal activity.

**Keywords**  $\beta$ -Cyclodextrin · Thermoanalytical techniques · Antifungal agent · Biphenyl-4-methyl carboxylate

✉ Fernando José de Lima Ramos Júnior  
 fjdjrjunior@gmail.com

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Artur de Sá, Cidade Universitária, Recife, PE 50740-521, Brasil

<sup>2</sup> Laboratórios Unificados de Desenvolvimento e Ensaios de Medicamentos, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB 58059-900, Brasil

<sup>3</sup> Laboratório de Química Medicinal, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB 58059-900, Brasil

<sup>4</sup> Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, PB 58429-500, Brasil

<sup>5</sup> Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB 58055000, Brasil





## Introduction

The increase in the incidence diseases caused by genus *Candida*, the high toxicity of the commercial antifungals and the high degree of fungal resistance have contributed to the research of new drugs, in which it becomes alternatives to recent therapeutics. However, its effectiveness is directly related to the knowledge of its characteristics in the solid state [1–3].

In this way, the control and the knowledge of the characteristics of active pharmaceutical ingredient (API) as products formulated or pure substances is an important step in the development of safe and effective new medicines; thus, aspects as the bioavailability, expiration date of a formulation and its industrial processing are modified by the drug properties [3–8].

In the pharmaceutical sector, the use of cyclodextrin as a good and promising tool in order to control the API characteristics has been widely employed because it shows complexing properties that result in higher solubility, dissolution and bioavailability of poor soluble drugs and also improves stability and organoleptic properties, reduces adverse effects and prevents interactions between some drugs and/or between drug and excipients [9].

On the other hand, for knowledge of characteristics of solid pharmaceuticals, methods such as differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetry (TG), Fourier-transformed infrared (FTIR) spectroscopy and X-ray diffraction can be employed [3–8].

The differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetry (TG) contribute to obtaining important information that makes it possible to evaluate the thermal stability, polymorphisms, incompatibility and degradation kinetics of the pharmaceutical products, and the Fourier-transformed infrared spectroscopy provides information about the identification of compounds or the investigation of a sample, since the chemical bonds of the substances have specific vibrational frequencies [10–18].

Thus, the objective of this work was evaluating the thermal behavior, physicochemical aspects and microbiological of the complexes of inclusion of  $\beta$ -cyclodextrin and biphenyl-4-methyl carboxylate.

## Materials and methods

### Materials

$\beta$ -Cyclodextrin ( $\beta$ CD) was purchased from SIGMA ALDRICH®, and three batches of the biphenyl-4-methyl carboxylate (B4CMET) were provided by the Medicinal Chemical Laboratory/DCF/CCS/UFPB.

### Preparation of the inclusion complexes (IC)

Equimolar amounts of the three batches of B4CMET and  $\beta$ CD were weighed and solubilized separately under mechanical stirring. B4CMET was solubilized in ethyl alcohol and  $\beta$ CD in purified water. After complete solubilization of the compounds, the B4CMET solution was poured into the  $\beta$ CD solution and kept under stirring for 24 h before being subjected to evaporation under reduced pressure ( $-800 \pm 20$  mbar) at  $45 \pm 5$  °C in a rotary evaporator. After evaporation of the solvents, the products were placed in a drying oven at 40 °C for 24 h.

### Thermal behavior

#### Differential scanning calorimetry

The DSC curves were obtained in a calorimeter equipment (Shimadzu, DSC-50), using a hermetically sealed aluminum crucible, with approximately 2.0 mg of the sample. The analysis was performed in the temperature range of 25–450 °C, at heating rates of 10 °C min<sup>-1</sup> (B4CMET and  $\beta$ CD) and 2, 5, 10 and 15 °C min<sup>-1</sup> (IC), under nitrogen atmosphere (flow rate of 50 mL min<sup>-1</sup>). DSC data were analyzed by the software Tassys® (Shimadzu).

#### Thermogravimetry

Dynamic thermogravimetric curves were obtained using a Shimadzu thermobalance, 50H TGA under an atmosphere of synthetic air at a flow rate of 20 mL min<sup>-1</sup>. The samples were placed in an alumina crucible, heated at a heating rate of 10 °C min<sup>-1</sup> (B4CMET and  $\beta$ CD) and heating rate of 10, 20 and 40 °C min<sup>-1</sup> (IC) up to 900 °C. The mass was 5.0 mg ( $\pm 0.003$ ).

### Physicochemical aspects

#### Fourier-transformed infrared spectroscopy

FTIR spectra were obtained by using a Shimadzu IR Prestige-21. The samples were previously prepared with potassium bromide in a ratio of about 2:100 (samples/KBr). The KBr disks were prepared by powder compression in a hydraulic press, at a pressure of 9 tons, and scanned against the KBr white in wave numbers in the range of 400–4000 cm<sup>-1</sup>.

#### X-ray diffraction

XRD spectra were recorded with a Shimadzu XRD 600 diffractometer, with Cu K $\alpha$  radiation source. The



measurement conditions were as follows: geometry, 2 $\theta$ ; voltage, 40 kV; current, 30 mA;  $\theta_i$ , 5;  $\theta_f$ , 30; step size, 0.02; and speed, 20° min<sup>-1</sup>.

## Microbiological aspects

### Determination of the antifungal activity

In order to evaluate the antifungal activity, solutions of the three batches of B4CMET and of the three batches of the inclusion complexes (IC) at the concentration of 2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  in 50% ethanol were obtained and standard strains American Type Culture Collection (ATCC) *Candida albicans* (ATCC 18804), *Candida tropicalis* (ATCC 13803) and *Candida parapsilosis* (ATCC 22009) were used, which were made available by the Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz, RJ).

The microorganisms were maintained in test tubes containing Sabouraud agar, and then, they were cultured in plates containing the same medium, at 25 °C for 48 h. The determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) was performed by the broth microdilution method, using 96-well microplates according to the procedures of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [19]. The inoculum was standardized into tubes containing 5 mL of sterile saline solution at 0.9%. The suspension was adjusted by spectrophotometer at 580 nm in a concentration equivalent to 10<sup>3</sup> UFC. Hundred microliters of each solution to 2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  was subjected to serial dilution on Sabouraud broth in the microplates, obtaining concentrations of 1000 to 7.81  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Subsequently, 10  $\mu\text{L}$  of each microorganism culture was added to each well. Fifty percent ethanol was used as a negative control, and Nystatin oral suspension 100,000 U l mL<sup>-1</sup> as positive control. Fungal growth was indicated by the addition of 20  $\mu\text{L}$  of aqueous resazurin (Sigma-Aldrich®) to 0.01%, with an additional incubation at 25 °C  $\pm$  1 °C for 2 h. The viable microorganisms modify the dye color from blue to pink. Thus, the MIC was defined as the lowest concentration in which no change of the color was noted in the dye.

## Results and discussion

### Thermal behavior

#### Differential scanning calorimetry

It was observed in the DSC curves of the inclusion complexes and their isolated components (Fig. 1) three events: one endothermic event to the  $\beta$ CD in the range of 99.11–127.25 °C ( $T_{\text{peak}}$  = 115.03 °C), this finding can be related to dehydration of the molecule; another in the range

of de 218.69–224.21 °C ( $T_{\text{peak}}$  = 221.08 °C), related to the glass transition, this fact is already reported by Serafini [20] and Menezes [21], and another in the range of 311.16–336.78 °C ( $T_{\text{peak}}$  = 323.09 °C) in which it was related to the  $\beta$ CD melting followed by its thermodecomposition. In the DSC curves of the B4CMET, only one endothermic event was observed that was related to the molecule melting. This event was found in the range of 117.65–123.91 °C ( $T_{\text{peak}}$  = 120.30 °C) for the batch 1, in the range of 118.88–125.66 °C ( $T_{\text{peak}}$  = 121.78 °C) for the batch 2 and in the range of 119.33–125.82 °C ( $T_{\text{peak}}$  = 121.67 °C) for the batch 3. Additionally, in the inclusion complexes, the drug melting was not viewed, evidencing the encapsulation of this molecule in the cavity of the  $\beta$ CD with the formation of the complexes and not of a physical mixture.

The DSC technique is employed as an important analytical tool in the characterization of drug and  $\beta$ CD interactions. Moreover, it is known that the molecules when are incorporation into the  $\beta$ CD cavity cease to interact with each other in the solid state and events such as melting point, boiling and sublimation are modified or simply disappear [22–24].

#### Thermogravimetry

In the TG curves (Fig. 2), it was possibly viewed to the  $\beta$ CD that in the range of 99.11–127.25 °C occurred a mass loss event of 12.34%, this loss was related to the release of water molecules from the  $\beta$ CD cavity, confirming the results obtained in the DSC curve (Fig. 1). Then, it was checked a thermal stability in the range of 128.00–311.16 °C. However, above 311.00 °C in the range of 311.16–361.85 °C, it was found a mass loss of 69.03%, in which it was related to the fast melting/decomposition of the  $\beta$ CD. Additionally, in the range of 518.00–900.00 °C it was observed a mass loss of 5.70%, related to the final decomposition.

It was observed in Fig. 2 that the B4CMET showed a mass loss event related to the volatilization of the molecule in the range of 213.27–241.21 °C ( $\Delta m$  = 94.15%) to the batch 1, in the range of 220.79–254.13 °C ( $\Delta m$  = 94.11%) to the batch 2 and in the range of 220.20–254.00 °C ( $\Delta m$  = 94.10%) to the batch 3. This research finding indicated that three batches of B4CMET showed the same thermal behavior.

According to Fig. 2, in the all inclusion complexes two mass loss events can be observed in the temperature range of 44.11–178.41 °C, indicating the loss of water from the solvation of the complex cavity and the release of a small amount of B4CMET, respectively. In the range of 259.64–367.30 °C occurred a higher mass loss event probably with the release of B4CMET included. Finally, in

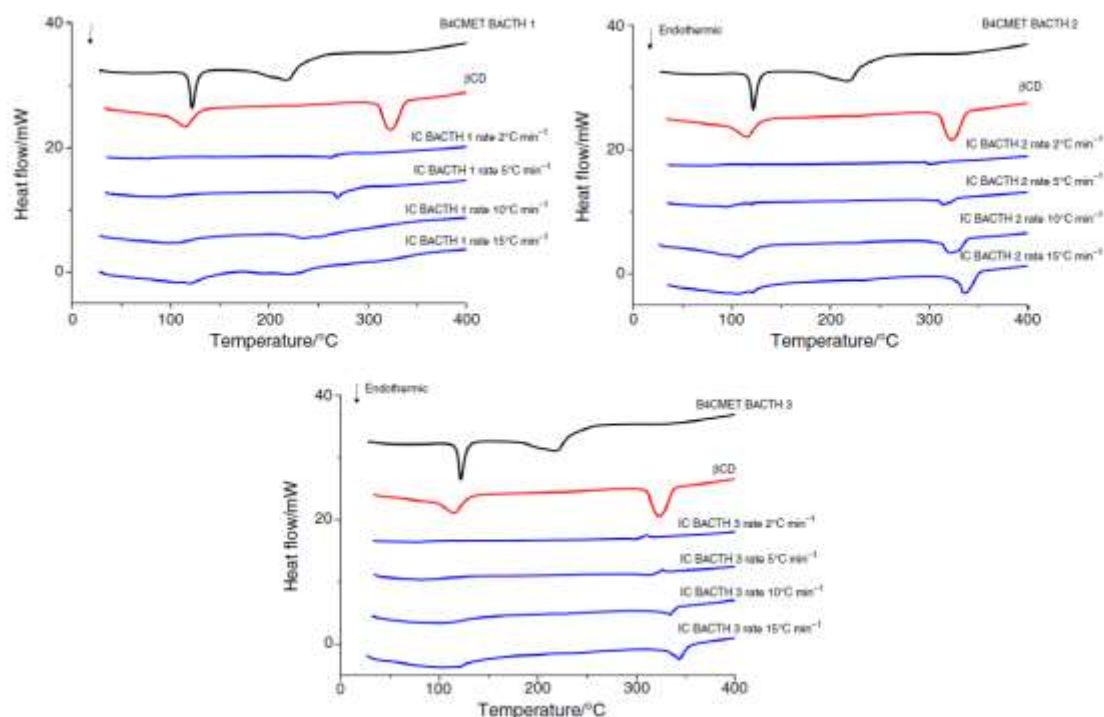


Fig. 1 DSC curves of the biphenyl-4-methyl carboxylate,  $\beta$ -cyclodextrin and inclusion complexes at different heating rates

the range of 486.06–900.00 °C an additional mass loss was detected, 11.17% for the batch 1, 4.4% for the batch 2 and 6.75% for the batch 3. This shows an increase in thermal stability for the encapsulated B4CMET, probably as a result of intermolecular interactions with the  $\beta$ CD cavity.

#### Kinetic study of thermal degradation

Table 1 shows the kinetic parameters for B4CMET and ICs. Comparison of the activation energy values for the three batches of pure B4CMET was found to be lower than the values obtained for this substance when associated with  $\beta$ CD (inclusion complexes). Thus, the energy barrier to the B4CMET volatilization reaction became relatively higher when that substance was associated with  $\beta$ CD, which confirms the increase in the thermal stability of B4CMET in the inclusion complexes, which was observed in the TG curves.

#### Physicochemical aspects

##### Fourier-transformed infrared spectroscopy

Infrared spectroscopy allows to determine the complexation of guest molecules with cyclodextrin by observing

changes in their peaks in terms of shape, position and intensity [22].

In the FTIR spectra (Fig. 3), it was possible to visualize for  $\beta$ CD, symmetric and asymmetric stretch of the OH group at 3346  $\text{cm}^{-1}$ , stretch of the C–H bond at 2928  $\text{cm}^{-1}$ , deformation of the -OH group of water molecules complexed with  $\beta$ CD at approximately 1640  $\text{cm}^{-1}$ , C–OH absorption corresponding to the modes of OH deformation in the plane of  $\beta$ CD at 1200–1500  $\text{cm}^{-1}$  and asymmetric stretching of COC at 800–1200  $\text{cm}^{-1}$  and  $\beta$ CD ring vibrations at 400–800  $\text{cm}^{-1}$ .

For the B4CMET (Fig. 3), in the three batches, were observed axial deformation vibrations of aromatic CH at approximately 3000  $\text{cm}^{-1}$ , axial deformation vibrations of the double bond of C=O at 1740–1750  $\text{cm}^{-1}$ , C=C vibrations of the aromatic nuclei at 1450–1600  $\text{cm}^{-1}$ , deformation of the C–O bond of the ester at 1050–1300  $\text{cm}^{-1}$  and the angular deformation of adjacent 3H of metasubstituted aromatic rings 710, 750 and 810  $\text{cm}^{-1}$ .

All spectra of inclusion complexes (Fig. 3) showed a strong similarity to the free  $\beta$ CD spectrum, although the existence of bands characteristic of B4CMET at approximately 3000, 1745, 1460, 1292, 1273 and 750  $\text{cm}^{-1}$  was also observable, with exhibited markedly less intensity than



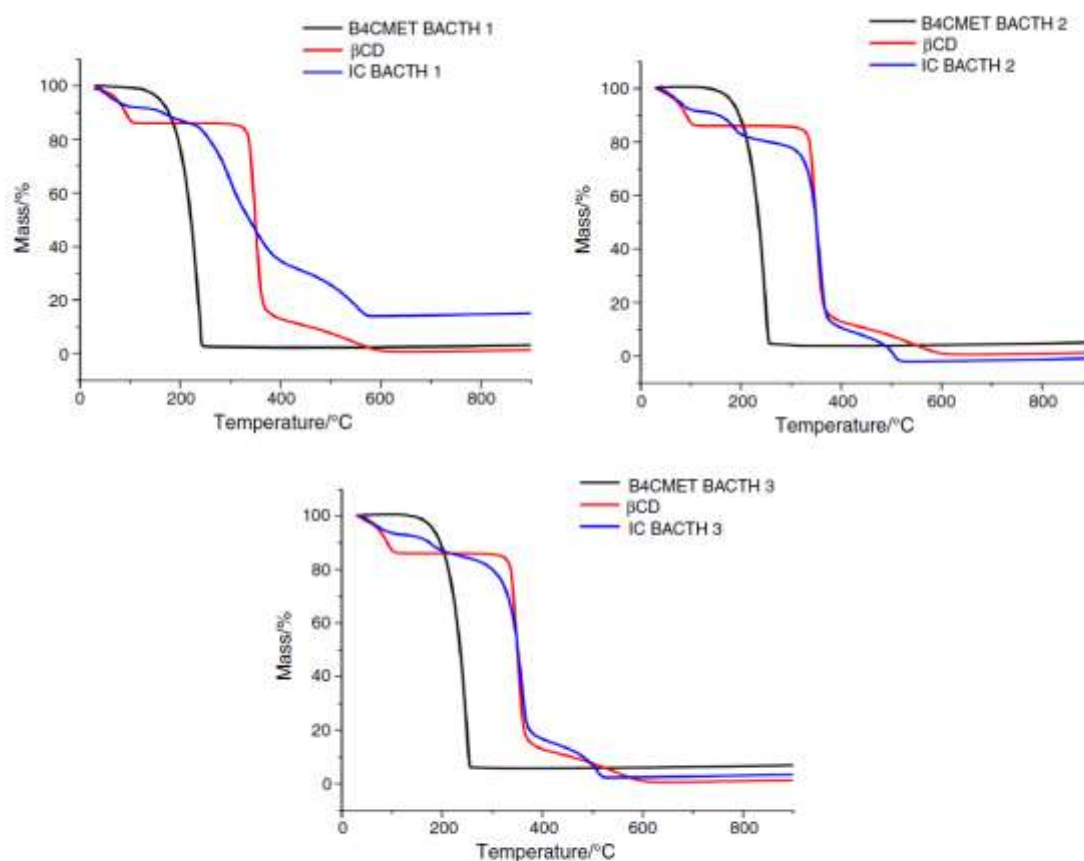


Fig. 2 TG curves of the biphenyl-4-methyl carboxylate,  $\beta$ -cyclodextrin and inclusion complexes at a heating rate of  $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$

**Table 1** Kinetic parameters of the B4CMET and IC by Ozawa method with decomposition fractions  $\alpha_{0.1}$  and  $\alpha_{0.9}$

|         | Activation energy/ $\text{kJ mol}^{-1}$ | Order reaction | Frequency factor/min   |
|---------|-----------------------------------------|----------------|------------------------|
| B4CMET  |                                         |                |                        |
| Batch 1 | 78.64                                   | 0              | $4.50 \times 10^7$     |
| Batch 2 | 72.29                                   | 0              | $5.22 \times 10^6$     |
| Batch 3 | 75.21                                   | 0              | $1.07 \times 10^7$     |
| IC      |                                         |                |                        |
| Batch 1 | 126.98                                  | 0              | $2.394 \times 10^7$    |
| Batch 2 | 121.82                                  | 0              | $1.030 \times 10^{10}$ |
| Batch 3 | 120.73                                  | 0              | $8.765 \times 10^8$    |

spectra of the isolated molecule. That result could relate to the insertion of the B4CMET molecule into the  $\beta$ CD cavity, which causes a conformational restriction that reduces its free movement and, in turn, the signal intensity. Along with that effect, the OH and C–H stretching bands of  $\beta$ CD were displaced at  $3346\text{--}3340$  and  $2928\text{--}2920\text{ cm}^{-1}$ ,

respectively. Such results reinforce data obtained in DSC and TG regarding the formation of inclusion complexes.

#### X-ray diffraction

Further information on the structure of the inclusion complexes was obtained with the use of XRD (Fig. 4). It

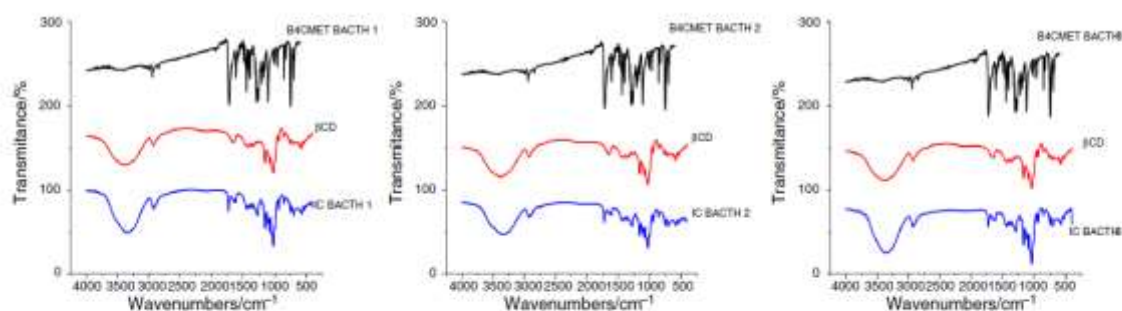


Fig. 3 FTIR spectra of the biphenyl-4-methyl carboxylate,  $\beta$ -cyclodextrin and inclusion complexes

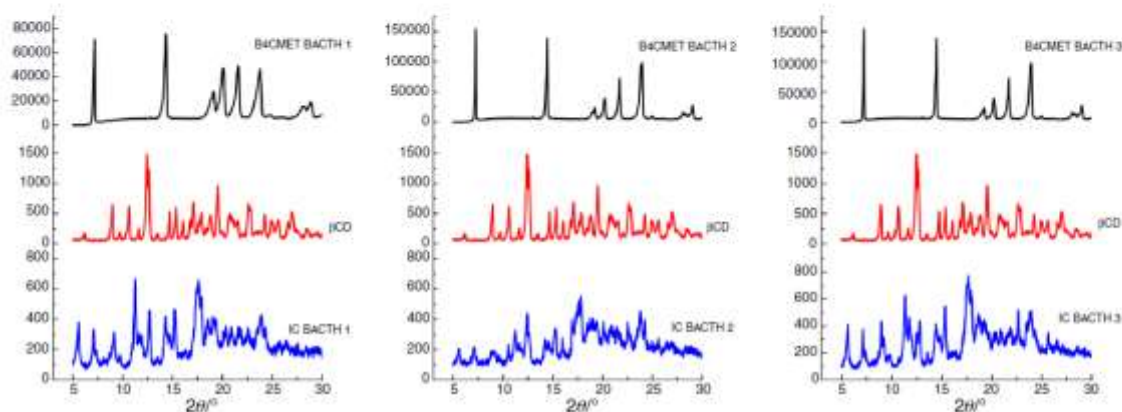


Fig. 4 Diffractogram of the biphenyl-4-methyl carboxylate,  $\beta$ -cyclodextrin and inclusion complexes

was observed that the pure B4CMET presented a more crystalline structure when compared to the inclusion complexes, since in the complexes occurred the disappearance of the peaks of diffraction of B4CMET. This difference represents a loss of crystallinity with the formation of a less organized system, indicating that the formation of inclusion complexes occurred with the interaction between B4CMET and  $\beta$ CD.

## Microbiological aspects

### Antifungal activity

In evaluating antifungal activity, it was possible to observe a considerable improvement of antimicrobial activity in the inclusion complexes compared to that presented by the

**Table 2** Minimum inhibitory concentration of the B4CMET and IC tested against *Candida* spp

|               | Microorganisms tested                        |                                                |                                                  |
|---------------|----------------------------------------------|------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
|               | <i>Candida albicans</i> /μg mL <sup>-1</sup> | <i>Candida tropicalis</i> /μg mL <sup>-1</sup> | <i>Candida parapsilosis</i> /μg mL <sup>-1</sup> |
| <b>B4CMET</b> |                                              |                                                |                                                  |
| Batch 1       | 250.00                                       | 125.00                                         | 125.00                                           |
| Batch 2       | 250.00                                       | 125.00                                         | 125.00                                           |
| Batch 3       | 250.00                                       | 125.00                                         | 125.00                                           |
| <b>IC</b>     |                                              |                                                |                                                  |
| Batch 1       | 62.50                                        | 31.25                                          | 31.25                                            |
| Batch 2       | 62.50                                        | 31.25                                          | 31.25                                            |
| Batch 3       | 62.50                                        | 31.25                                          | 31.25                                            |



isolated B4CMET, as evidenced by the decreased minimum inhibitory concentration (Table 2).

The increased activity of IC may be due to the higher solubility in culture medium (agar) of B4CMET from IC, since a compound's increased solubility contributes to raising the substance's area of contact with the microorganism, thereby favoring its action [25].

The increased action observed with the inclusion complexes of B4CMET corroborates the results of Kfoury et al. [26], who, when assessing the antifungal activity of several free substances and in complexes with cyclodextrin, observed improved inhibition when the inclusion complexes were tested. Similarly, Zang et al. [27] observed the antioxidant activity of inclusion complexes of extracts of *Chimonanthus praecox*, which marked an improvement in pharmacological activity.

## Conclusions

The results showed the formation of inclusion complexes of B4CMET with  $\beta$ CD, thereby stressing its greater stability and potential use as an antifungal agent against *Candida* spp. Thus, with thermoanalytical techniques it was possible to observe the increased thermal stability, with FTIR changes of characteristic bands were verified, with XRD the disappearance of diffraction peaks of the B4CMET was verified, and with the microbiological assay it was possible to visualize increased antifungal activity. Such results suggest that inclusion complexes of B4CMET with  $\beta$ CD can be promising aids for developing future stable and effective pharmaceutical forms, representative of an alternative treatment for fungal disease.

## References

- Ferronato R, Marchesan ED, Pezenti E, Bednarski F, Onofre SB. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). *Rev Bras Farmacogn*. 2007;17:224–30.
- Deus RJA, Alves CN, Arruda MSP. Avaliação do efeito antifúngico do óleo resina e do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne). *Bras Pi Med*. 2011;13:1–7.
- Maggio RM, Calvo NL, Vignaduzzo SE, Kaufman TS. Pharmaceutical impurities and degradation products: uses and applications of NMR techniques. *J Pharm Biomed Anal*. 2014;101:102–22.
- Koradia V, Diego HL, Frydenvang K, Ringkjøbing-Ellegaard M, Bond A, Müllertz A, Rantanen J. Solid forms of amlodipine besylate: physicochemical, structural and thermodynamic characterization. *Cryst Growth Des*. 2010;10:5279–90.
- Moura EA, Correia LP, Pinto MF, Procópio JVV, Souza PS, Macedo RO. Thermal characterization of the solid state and raw material fluconazole by thermal analysis and pyrolysis coupled to GC/MS. *J Therm Anal Calorim*. 2010;100:289–93.
- Böer TM, Procópio JV, Nascimento TG, Macêdo RO. Correlation of thermal analysis and pyrolysis coupled to GC–MS in the characterization of tacrolimus. *J Pharm Biomed*. 2013;73:18–23.
- Daneluti ALM, Matos JR. Study of thermal behavior of phytic acid. *Braz J Pharm Sci*. 2013;49:275–83.
- Sangeetha MK, Mariappan M, Madhuranbal G, Mojudar SC. TG–DTA, XRD, SEM, EDX, UV, and FT-IR spectroscopic studies of L-valine thiourea mixed crystal. *J Therm Anal Calorim*. 2015;119:907–13.
- Lyra MAM, Alves LDS, Fontes DAF, Soares-Sobrinho JL, Rolim-Neto PJ. Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina. *Rev Ciênc Farm Básica Apl*. 2010;31:117–24.
- Ford JL, Mann TE. Fast-scan DSC and its role in pharmaceutical physical form characterisation and selection. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012;64:422–30.
- Guan Y, Wang C, Wang D, Dang G, Chen C, Zhou H, Zhao X. High transparent polyimides containing pyridine and biphenyl units: synthesis, thermal, mechanical, crystal and optical properties. *Polymer*. 2015;62:1–10.
- Silva Júnior WF, Pinheiro JGO, Pinheiro CDLFAM, Barbosa ALREG, Lima ES, Veiga Júnior VF, Silva Júnior AA, Aragão CFS, Lima AAN. Thermal behavior and thermal degradation kinetic parameters of triterpene  $\alpha$ ,  $\beta$  amyrin. *J Therm Anal Calorim*. 2017;127:1757–66.
- Yang H, Huang Z, Huang Y, Dong W, Pan Z, Wang L. Characterization of Chinese crude propolis by pyrolysis–gas chromatography/mass spectrometry. *J Anal Appl Pyrolysis*. 2015;113:158–64.
- Tolu J, Gerber L, Boily J-F, Bindler R. High-throughput characterization of sediment organic matter by pyrolysis–gas chromatography/mass spectrometry and multivariate curve resolution: a promising analytical tool in (paleo)limnology. *Anal Chim Acta*. 2015;880:93–102.
- Ge S, Xu Y, Tian Z, She S, Huang L, Zhang Z, Hu Y, Weng J, Cao M, Sheng L. Pyrolysis study of pectin by tunable synchrotron vacuum ultraviolet photoionization mass spectrometry. *J Therm Anal Calorim*. 2015;120:1399–1405.
- Kusch P, Rieser C, Knupp G, Mang T. Characterization of copolymers of methacrylic acid with poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate macromonomers by analytical pyrolysis–gas chromatography/mass spectrometry (Py–GC/MS). *J Anal Appl Pyrolysis*. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2015.03.003>.
- Vianna-Filho RP, Petkowicz CL, Silveira JL. Rheological characterization of O/W emulsions incorporated with neutral and charged polysaccharides. *Carbohydr Polym*. 2013;93:266–72.
- Amorim SR, Klier AH, Angelis LH. Controle de qualidade na indústria farmacêutica: identificação de substâncias por espectroscopia no infravermelho. *Rev Bras Farm*. 2013;94:234–42.
- CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. CLSI Document M27A3. 3 ed. v.28. n.14. Wayne, PA, USA, 2008.
- Serafini MR, Menezes PP, Costa LP, Lima CM, Quintans LJ Jr, Cardoso JC, Matos JR, Soares-Sobrinho JL, Grangeiro S Jr, Nunes PS, Bonjadin LR, Araújo AAS. Interaction of p-cymene with  $\beta$ -cyclodextrin. *J Therm Anal Calorim*. 2012;109:951–5.
- Menezes PP, Serafini MR, Quintans-Júnior LJ, Silva GF, Oliveira JF, Carvalho FMS, Souza JCC, Matos JR, Alves PB, Matos IL, Hádárugá DI, Araújo AAS. Inclusion complex of (2)-linalool and  $\beta$ -cyclodextrin. *J Therm Anal Calorim*. 2014;115:2429–37.
- Abarca RL, Rodríguez FJ, Guarda A, Galotto MJ, Bruna JE. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing an essential oil component. *Food Chem*. 2016;196:968–75.
- Jadhav P, Pore Y. Physicochemical, thermodynamic and analytical studies on binary and ternary inclusion complexes of

- bosentan with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. Bull Fac Pharm Cairo Univ. 2017;55:147–84.
24. Xua J, Zhanga Y, Lia X, Zheng Y. Inclusion complex of nateglinide with sulfobutyl ether  $\beta$ -cyclodextrin: preparation, characterization and water solubility. J Mol Struct. 2017;1141:328–34.
  25. Cunha-Filho MSS, Sá-Barreto LCL. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. Rev Ciênc Farm Básica Apl. 2007;28:1–9.
  26. Kfoury M, Sahraoui AL-H, Bourdon N, Laruelle F, Fontaine J, Auezova L, Greige-Gerges H, Fourmentin S. Solubility, photostability and antifungal activity of phenylpropanoids encapsulated in cyclodextrins. Food Chem. 2016;196:518–25.
  27. Zhang S, Zhang H, Xu Z, Wu M, Xia W, Zhang W. *Chimonanthus praecox* extract/cyclodextrin inclusion complexes: selective inclusion, enhancement of antioxidant activity and thermal stability. Ind Crop Prod. 2017;95:60–5.