



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
CURSO DE FARMÁCIA

**ELUCIDAÇÃO DA FORMAÇÃO DE COMPLEXO INCLUSÃO ENTRE MORINA E  
HIDROXIPROPIL- $\beta$ -CICLODEXTRINA**

ANNA CLARA RAMOS DA SILVA SANTOS

SÃO CRISTOVÃO-SE  
2019

ANNA CLARA RAMOS DA SILVA SANTOS

**ELUCIDAÇÃO DA FORMAÇÃO DO COMPLEXO INCLUSÃO ENTRE MORINA E  
HIDROXIPROPIL- $\beta$ -CICLODEXTRINA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao  
Curso de Farmácia da Universidade Federal de  
Sergipe como requisito para conclusão de  
curso.

Orientador: Prof. MSc. Bruno dos Santos Lima

SÃO CRISTOVÃO-SE  
2019

ANNA CLARA RAMOS DA SILVA SANTOS

Área de concentração: Ciências da Saúde/Farmácia

Data da defesa:

Resultado: \_\_\_\_\_

---

ORIENTADOR: PROF. MSc. BRUNO DOS SANTOS LIMA

---

AVALIADOR: MSc. YASMIM MARIA BARBOSA G. DE CARVALHO

---

AVALIADOR: MSc. TATIANNY DE ARAÚJO ANDRADE

**"O saber a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria, se aprende é com a vida e com os humildes". (Cora Coralina)**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que permitiu que tudo isso acontecesse em minha vida;

Aos meus pais Rosângela e José Carlos, pelo amor incondicional, pelo apoio, pelo incentivo nas horas difíceis de desânimo e cansaço;

Ao meu irmão preferido Igor, pela amizade, companheirismo e todos os ensinamentos compartilhados;

Ao meu namorado Paulo, por todos os conselhos, toda paciência e todo amor dado a mim durante esta jornada;

A minha avó Neneu, por todo amor e preocupação, e as orações de madrugada;

A toda minha família, tios e tias, primos e primas, por todo cuidado comigo, por acreditar e por torcer para que tudo desse certo pra mim;

O Bruno, meu orientador, pela dedicação, por ter me acolhido no laboratório e me ensinar tudo que sei;

A Adriano, meu orientador de iniciação científica, por toda confiança renovada todos os anos;

A Mônica, Matheus, Ana Maria, Lívia e Heráclito, por ter caminhado comigo nessa graduação, sem muita paciência, mas com muito amor;

A todos os meus amigos e amigas, pela ajuda, torcida, vibração nas minhas conquistas, vocês tornaram o caminho mais leve;

A Família LeFT, por todo ensinamento compartilhado;

A todos do CAFCeR e a Atlética, por me levar além da vida acadêmica;

A melhor Chefa de departamento, Dulce, por ter me atendido em sua sala em todos os momentos de desespero;

A Universidade Federal de Sergipe por todo suporte e estrutura;

A todos, que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

Os produtos naturais têm sido alvo de incessantes estudos, pois oferecem potencial para inovação e desempenham um papel importante no tratamento da dor e inflamação. Os flavonoides é a classe de compostos polifenólicos mais encontrados na natureza e apresentam várias atividades farmacológicas descritas na literatura, como por exemplo, atividade antinociceptiva, anti-inflamatória, antiviral, antidiabética, anticâncer e antioxidante. Dentre os flavonoides podemos destacar a morina, que é considerada uma substância promissora para o desenvolvimento de formulações farmacêuticas. No entanto, assim como os demais flavonoides, a morina apresenta baixa solubilidade em água, que vai implicar diretamente na sua biodisponibilidade oral, limitando seus efeitos farmacológicos. Dessa forma, para melhorar suas características físico-químicas é necessário realizar sua complexação em ciclodextrinas (CDs). Dentre as CDs, a hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD) apresenta destaque, devido a sua baixa toxicidade e alta solubilidade em água. Diante do exposto, o objetivo desse trabalho é preparar e caracterizar complexos de inclusão de morina com HP- $\beta$ -CD. O complexo de morina/HP- $\beta$ -CD foi preparado pelo método de liofilização e após o preparo, o complexo foi caracterizado físico-quimicamente e morfologicamente. O estudo de dissolução *in vitro* do complexo morina/HP- $\beta$ -CD e da morina livre foram determinados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Nos resultados obtidos de DSC houve o desaparecimento do pico cristalino da substância devido a incorporação na CD, no FT-IR algumas bandas da morina tornaram-se ausentes provavelmente devido à restrição da vibração da molécula de morina, sugerindo que esta estava aprisionada na cavidade da molécula de HP- $\beta$ -CD. No DRX foi possível observar a ausência dos picos cristalinos da molécula hospede no CI demonstra que houve a complexação da molécula na cavidade interna da CD. O MEV o CI apresentou uma morfologia totalmente diferente, em formato de blocos com tamanhos irregulares. Já no RMN ocorreram algumas mudanças nos deslocamentos químicos da HP- $\beta$ CD em relação a sua forma livre, sugerindo a formação do CI, na eficiência de complexação A EC foi de  $98,3 \pm 0,36$  % (n=3) e a ECa  $17,63 \pm 0,17$  % (n=3), o valor da EC próximo à 100% demonstra que praticamente toda morina foi encapsulada na cavidade da HP- $\beta$ -CD, e a ECa de 17,63% refere-se a quantidade absoluta de morina em todo CI, por fim no estudo de dissolução *in vitro* os resultados demonstram que a HP- $\beta$ -CD foi capaz de aumentar a solubilidade e a velocidade de dissolução da morina. Conclui-se que as análises de caracterização físico-química e morfológica evidenciaram a formação do complexo de inclusão da morina com HP- $\beta$ -CD.

Palavras-chave: Morina; ciclodextrinas; hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina; flavonóides.

## ABSTRACT

Natural products have been the target of several studies, because they offer potential for innovation and execute an important role in the treatment of pain and inflammation. Flavonoids are the class of polyphenolic compounds most commonly found in nature and show several pharmacological activities described in the literature, such as antinociceptive, anti-inflammatory, antiviral, antidiabetic, anticancer and antioxidant activity. Morin is a flavonoid, which is considered a promising substance for the development of pharmaceutical formulations. However, like the other flavonoids, morin has low solubility in water, which will directly implicate in its oral bioavailability, limiting its pharmacological effects. Thus, to improve its physico-chemical characteristics is necessary to perform its complexation in cyclodextrins (CDs). Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD) is widely used because has low toxicity and high solubility in water. Therefore, the aim of this project is to prepare and characterize morin/HP- $\beta$ -CD inclusion complex. Morin/HP- $\beta$ -CD inclusion complex will be prepared by the freeze-drying method and will be characterized physically-chemically and morphologically. The *in vitro* dissolution study of the morin/HP- $\beta$ -CD complex and free morin will be determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). This work has the perspective to develop innovative pharmaceutical product with potential for the treatment of inflammatory and painful disorders. On the DSC results there was a disappearance of the substance crystalline peak due to incorporation in the CD. From the FT-IR results some bands of the morine became absent probably due to vibration restriction of the morine molecule, suggesting that it was trapped in the cavity of the molecule. Regarding to HP- $\beta$ -CD molecule, using XRD it was possible to observe the crystalline peaks absence of the host molecule in the CI, which shows that there was a molecule complexation in the internal cavity of the CD. In the MEV, the IC presented a totally different morphology, with irregular sizes. NMR showed few changes in the chemical displacements of HP- $\beta$ CD, relative to its free form, suggesting the formation of IC. In the complexation efficiency EC was  $98.3 \pm 0.36\%$  ( $n = 3$ ) and ECa  $17.63 \pm 0.17\%$  ( $n = 3$ ), the EC value close to 100% shows that almost all of the morine was encapsulated in the HP- $\beta$ -CD cavity, and the ECa of 17.63% refers the absolute amount of morine in all ICs. Finally, in the *in vitro* dissolution study, the results demonstrate that HP- $\beta$ -CD was able to increase the solubility and morine dissolution rate. In conclusion, the analyzes of physical-chemical and morphological characterization evidenced the formation of the inclusion complex of the morine with HP- $\beta$ -CD.

Keywords: Morin; Cyclodextrins; hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin; flavonoids.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esqueleto (estrutura) básica dos flavonoides.....	12
Figura 2 - Estrutura química da morina (C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub> ; 302,24 g/mol). ....	13
Figura 3 - Estruturas químicas da $\alpha$ , $\beta$ e $\gamma$ - CDs.....	16
Figura 4 - Estrutura química da $\beta$ -CD (grupo R = H) e da HP- $\beta$ -CD (grupo R = CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> )OH).....	17
Figura 5 - Curvas de DSC da morina (a), HP- $\beta$ -CD (b), mistura física (c) e do complexo de inclusão morina/HP- $\beta$ -CD (d). ....	28
Figura 6 - Espectros de FTIR da morina (a), HP- $\beta$ -CD (b), mistura física (c) e do complexo de inclusão morina/HP- $\beta$ -CD (d). ....	30
Figura 7 - Padrões de difração da morina (a), HP- $\beta$ -CD (b), mistura física (c) e do complexo de inclusão morina/HP- $\beta$ -CD (d). ....	32
Figura 8 - Fotomicrografias de MEV da morina (a), HP- $\beta$ -CD (b), mistura física (c) e do complexo de inclusão morina/HP- $\beta$ -CD (d) em aumento de 500x .....	34
Figura 9 - Espectros de <sup>1</sup> H RMN da HP- $\beta$ -CD (a) e do complexo Mo/HP- $\beta$ -CD (b). * Deslocamento químico da D <sub>2</sub> O (4,8 ppm).....	35
Figura 10 - Perfis de dissolução da morina complexada com HP- $\beta$ -CD e da morina livre no intervalo de tempo de 0 – 240 minutos.....	38

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	10
2. REFERENCIAL TEÓRICO .....	12
2.1 Flavonoides.....	12
2.2 Morina.....	13
2.3 Ciclodextrinas .....	15
2.4. Métodos de obtenção e caracterização de complexos de inclusão .....	18
3. OBJETIVOS.....	22
3.1. Geral .....	22
3.2. Específicos .....	22
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	23
4.1. Materiais .....	23
4.2. Preparo do complexo de inclusão morina/HP- $\beta$ -CD .....	23
4.3. Análises por CLAE .....	23
4.4.1. Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	24
4.4.2. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	24
4.4.3. Difração de Raios X (DRX) .....	24
4.4.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	25
4.4.5. Ressonância magnética nuclear (RMN) .....	25
4.5. Eficiência de complexação .....	25
4.6. Estudo de dissolução <i>in vitro</i> .....	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
5.1. Caracterização do complexo de inclusão morina/HP- $\beta$ -C.....	27
5.2.1. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) .....	27
5.2.2. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	29
5.2.3. Difração de Raios X (DRX) .....	31
5.2.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	32
5.3. Ressonância magnética nuclear (RMN) .....	34
5.4. Eficiência de complexação .....	36
5.4. Estudo de dissolução <i>in vitro</i> .....	37
6. CONCLUSÃO .....	40
7. REFERÊNCIAS.....	41

## 1. INTRODUÇÃO

A avaliação do potencial terapêutico de Produtos Naturais (PNs) tem sido alvo de incessantes estudos, pois oferecem potencial para inovação e desempenham um papel importante na prevenção e tratamento da dor/inflamação, atrelados a uma possível redução de efeitos adversos a curto e longo prazo, quando comparados com fármacos sintéticos clinicamente aceitos (FREITAS et al., 2012; DUTRA et al., 2016). Um grande número de moléculas derivadas de PNs, como os flavonoides, alcaloides, terpenos, taninos e saponinas esteroidais tem demonstrado embasamento para algumas ações farmacológicas, como por exemplo, atividade antinociceptiva, anti-inflamatória, antioxidante e anticancerígena (NDAGIJIMANA et al., 2013; LIMA et al., 2016; MAIER et al., 2017; SINGH et al., 2017; WANG; LI; BI, 2018).

A Morina (3,5,7,2',4'-pentahydroxyflavone), é um flavonoide encontrado em plantas da família Moraceae, podendo ser extraído de plantas como amêndoeira (*Prunus dulcis*) e amoreira (*Morus nigra*), e da família Myrtaceae, podendo ser encontrada na goiabeira (*Psidium guajava*), por exemplo (WIJERATNE et al., 2006). Com uma diversidade de propriedades farmacológicas, a morina pode atuar como um agente antioxidante, anti-inflamatório, antidiabético, dentre outros (MAHMOUD, 2014; VANITHA et al., 2014; LI et al., 2016). Porém, esse fármaco, como os outros flavonoides apresenta uma baixa solubilidade em água, afetando diretamente a sua biodisponibilidade oral, limitando dessa forma seu efeito farmacológico (JULLIAN et al., 2008; HEEBA; MAHMOUD, 2014).

Dentre as técnicas que estão sendo utilizadas para melhorar as propriedades físico-químicas, solubilidade e a biodisponibilidade oral de fármacos, destaca-se a formação de complexos de inclusão (CI) usando as ciclodextrinas (CDs). Diversos trabalhos confirmam que a formação do complexo de inclusão aumenta significativamente a estabilidade, solubilidade e biodisponibilidade dos fármacos complexados (JANSOOK; OGAWA; LOFTSSON, 2018).

As CDs são compostos obtidos por meio da degradação enzimática do amido, e possuem uma estrutura cíclica compostas por subunidades de D-Glicopiranosose. Existem três CDs consideradas naturais, sendo estas a alfa ( $\alpha$ -), beta ( $\beta$ -) e gama ( $\gamma$ -) CDs, as quais, possuem 6, 7 e 8 unidades de D-Glicopiranosose, respectivamente. As ciclodextrinas possuem conformação tronco-cônica, com cavidade interna hidrofóbica e a sua superfície externa hidrofílica (MURA, 2014). Essa cavidade fornece às CDs um poder de complexação com moléculas que apresentem estrutura e dimensão compatíveis, favorecendo que sofram alterações, como a solubilidade em água, estabilidade e até mesmo sua biodisponibilidade oral. A  $\beta$ -CD é a mais utilizada para

complexação devido seu custo e a seu diâmetro intermediário, que permite que um maior número de fármacos adentre a sua cavidade (LOFTSSON, 2018).

Porém a  $\beta$ -CD apresenta nefrotoxicidade quando administrada pela via endovenosa, pois não é metabolizada e se acumula na forma de complexos cristalinos insolúveis nos rins, além da baixa solubilidade, por isso existiu a necessidade de alterar a sua conformação, por meio da inserção de grupamentos hidroxílicos (UEKAMA ET AL., 1998; LOFTSSON, 2018). Dessa forma, foi desenvolvido então um derivado semi-sintético, a hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD), sendo considerada mais solúvel que a  $\beta$ -CD natural, e, além disso, não tóxica.

Na perspectiva de melhorar a solubilidade, a dissolução e os efeitos farmacológicos da morina, a inclusão desta em CDs, torna-se promissora. Dessa forma, esse trabalho teve como objetivo preparar o CI da morina com a HP- $\beta$ -CD e elucidar a formação do complexo por meio da caracterização físico-química desse sistema. Trata-se de um trabalho que apresenta perspectivas para o desenvolvimento de um produto farmacêutico que possa ser utilizado para o tratamento de condições dolorosas e inflamatórias.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

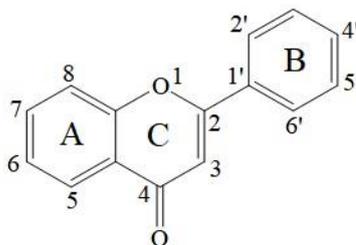
### 2.1 Flavonoides

As plantas podem sintetizar uma diversidade de substâncias de diferentes grupos funcionais por meio do seu metabolismo, que é uma característica comum a todas as células. O metabolismo pode ser tanto primário, que é responsável pelas funções essenciais no vegetal, tais como, a fotossíntese, a respiração e o transporte de solutos, quanto secundário, sendo esta variável de espécie para espécie (KUMAR & PANDEY, 2013).

Apesar do metabolismo secundário não ser essencial para o vegetal, apresenta um papel muito importante com o meio externo, sejam essas propriedades herbicidas, suprimento de água e luz, proteção contra radiação e até mesmo coloração. Os três principais grupos de metabólitos secundários são os compostos fenólicos, entre os quais os flavonoides recebem destaque, os alcaloides e os terpenos. (GILBERT, 2001; SELEEM, 2016). Os flavonoides são metabólitos secundários que ocorrem naturalmente em plantas e são encontrados em vários alimentos e bebidas, tais como: frutas, vegetais, cereais, chá, café e vinho tinto, sendo assim, amplamente distribuídos na dieta humana (SELEEM; PARDI; MURATA, 2016; WANG; LI; BI, 2018).

Apesar de sua diversidade estrutural, os flavonoides baseiam-se em uma estrutura base comum (Figura 1), constituídos de um esqueleto formado por 15 átomos de carbono, com dois anéis benzenos, interligado através de uma cadeia de três carbonos e um heteroátomo, que é o oxigênio (SIMÕES ET AL., 2007). A biossíntese dos flavonóides é por meio da via do ácido chiquímico ou do ácido mevalônico, sendo a primeira a via principal (GILBERT, 2001). Na sua derivação os flavonóides podem sofrer hidroxilação, metilação, acetilação, glicosilação e isoprenilação, isso explica a variedade desse metabólito em todo reino vegetal (TAHARA, 2007).

Figura 1 - Esqueleto (estrutura) básica dos flavonoides.



Fonte:. Desenhado no *ChemDrawn® Software versão 12.0*.

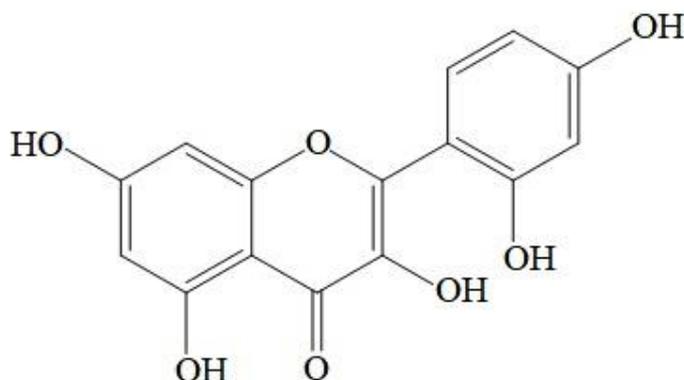
Os flavonoides apresentam subclasses, tendo como principais as flavanonas, flavonóis, isoflavonas, flavonas, auronas, antocianinas e antocianidinas (DAI & MUMPER, 2010). Suas propriedades físico-químicas são de compostos levemente ácidos, polares ou moderadamente polares, são pouco solúveis água, porém são mais solúveis em etanol e metanol, por exemplo (DORNAS et al., 2007).

Além das propriedades químicas e suas características relacionados ao meio ambiente, os flavonoides, apresentam ainda sua principal característica que é a de pigmentação, onde está diretamente relacionada a algumas de suas funções biológicas. Além disso, os flavonoides são de bastante interesse para pesquisas e indústria farmacêutica, devido a suas propriedades antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante, antibacteriana, dentre outras (ZHANG et al., 2018; MAHMOUD, 2014; LI et al., 2016; SIVARANJANI et al., 2016).

## 2.2 Morina

A Morina ( $C_{15}H_{10}O_7$ ; 302,24 g/mol) é um composto presente em frutas, vegetais, chás, vinhos e trata-se de um pigmento amarelado que é isolado principalmente de plantas pertencentes a família Moraceae, como a amora (*Chlorophoratinctoria*), amêndoa (*Prunusdulcis*), agrião (*Lepidium sativum*) e também de plantas da família Myrtaceae como a goiabeira (*Psidium guajava*). Sua estrutura química consiste em dois anéis aromáticos (A e B) que estão ligados por um oxigênio presente no heterociclo (anel C) (Figura 2) (WIJERATNE; ABOU-ZAID; SHAHIDI, 2006; XIE et al., 2006; DE MARTINO et al., 2012; NASO et al., 2013; SIVARANJANI et al., 2016).

Figura 2 - Estrutura química da morina ( $C_{15}H_{10}O_7$ ; 302,24 g/mol).



Fonte: Desenhado no *ChemDraw®Software versão 12.0*.

Devido a sua estrutura molecular, a morina apresenta um grande potencial antioxidante por ser um composto com múltiplas hidroxilas, sobretudo na posição C3, responsável pela

potência antioxidante de substâncias, pois são espécies altamente reativas que desempenham um papel de grande importância no início da peroxidação lipídica (SHIMMYO et al., 2008; LI et al., 2016; ZHANG et al., 2016). Além disso, é capaz de proteger as células contra os danos radicais de oxigênio, na atividade da xantina oxidase, uma enzima geradora de radicais livres, apresentando vários efeitos biológicos e bioquímicos, incluindo ação anti-inflamatória e inibidor de ácido graxo sintase (XIE et al., 2006; AL-NUMAIR et al., 2014).

Heeba e Mahmoud (2014) avaliaram a capacidade anti-inflamatória da morina e concluíram que essa substância é capaz de reduzir significativamente a expressão do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), inibindo a cascata inflamatória através da diminuição da enzima óxido nítrico sintase (iNOS), bem como, dos níveis hepáticos de TNF- $\alpha$  e óxido nítrico, evidenciando que a morina apresenta efeitos anti-inflamatórios satisfatórios (HEEBA; MAHMOUD, 2014).

Estudos prévios mostraram que o morina reduziu a expressão de mediadores inflamatórios como metaloproteinases, ciclooxigenase-2 (COX 2) e o fator de transcrição NF- $\kappa$ B durante a hepatocarcinogênese induzida por dietilnitrosamina em ratos, demonstrando seu potencial anti-inflamatório (SIVARAMAKRISHNAN; DEVARAJ, 2009, 2010). Lee e colaboradores (2008) relataram que a morina apresenta propriedades hepatoprotetoras, pois foi capaz de evitar o dano hepático por indução de tetrasol (CCl<sub>4</sub>) em ratos, através da inibição da produção de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , interleucina 6 (IL-6) e iNOS (LEE et al., 2008).

Dentre as atividades descritas na literatura destaca-se seu potencial para o tratamento de câncer, pois apresentou atividade antitumoral efetiva contra o câncer de fígado (HYUN et al., 2015), câncer de mama (JIN et al., 2014) e câncer de colo do útero (KARTHIK; VENNILA; NALINI, 2009). A morina apresenta efeito cardioprotetor, pois foi capaz de impedir o infarto do miocárdio de ratos através da indução de isoproterenol. Esse fármaco aumenta a frequência cardíaca (taquicardia), porém o tratamento dos animais com morina em diferentes doses reduziu a frequência cardíaca, mantendo-a em níveis normais (AL-NUMAIR; CHANDRAMOHAN; ALSAIF, 2012).

Estudos realizados por Vanitha e colaboradores (2014) demonstraram que a morina é capaz de prevenir a destruição de células  $\beta$ -pancreáticas em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina e, desse modo, exerce seu efeito anti-hiperglicêmico, podendo ser utilizada para o tratamento e controle da diabetes mellitus (VANITHA et al., 2014). A morina apresenta efeito anti-hiperuricêmico pois reduziu a produção de ácido úrico em ratos, através da inibição

da expressão de RNA mensageiro (RNAm) da xantina desidrogenase hepática / xantina oxidase, bem como a diminuição da reabsorção de urato através da modulação da alteração dos níveis de RNAm do transportador de glicose (mGLUT9) e do transportador de ácido úrico (mURAT1) (ZHANG et al., 2016).

Diversos trabalhos demonstram que a morina tem um potencial antibacteriano, pois mostrou-se eficaz na inibição de *Staphylococcus aureus* (WANG et al., 2015), *Streptococcus mutans* (HUANG et al., 2014), *Pseudomonas aeruginosa* (ANNAPOORANI et al., 2012a) e *Serratia marcescens* (ANNAPOORANI et al., 2012b). Além disso, a morina tem atividade antifúngica frente a algumas espécies de fungos, tais como: *Fusarium oxysporum*, *Chaetomium globosum* e *Alternaria alternata* (HUSSAIN et al., 2014).

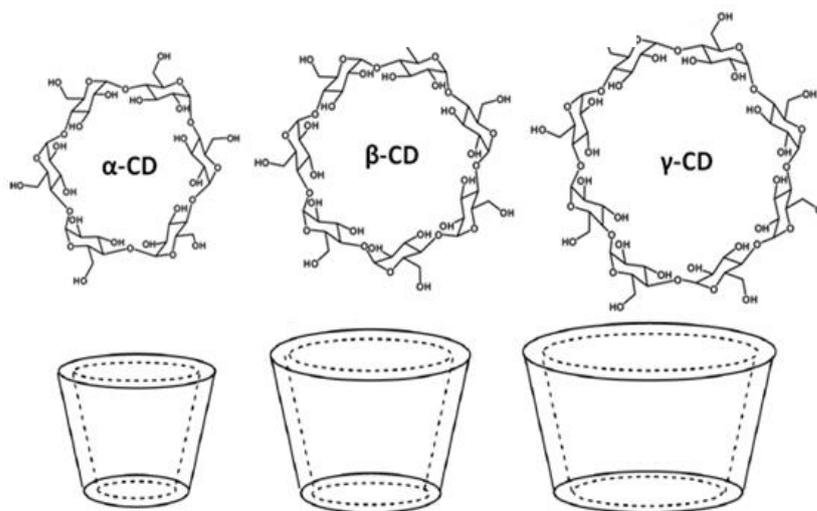
Diante de todas as atividades farmacológicas descritas na literatura, a morina pode ser considerada como uma substância promissora para futuras investigações. No entanto, assim como os demais flavonoides, a morina apresenta baixa solubilidade em água, que vai implicar diretamente na sua biodisponibilidade, limitando seus efeitos farmacológicos. Dessa forma, algumas técnicas podem ser utilizadas para manter e/ou aperfeiçoar o potencial terapêutico da morina, melhorar sua solubilidade em água e estabilidade, como por exemplo, a utilização de dispersões sólidas, encapsulação em nanopartículas (nanopartículas poliméricas, lipídicas e lipossomas) e a complexação com ciclodextrinas (MENEZES et al., 2017; PÉREZ-ABRIL et al., 2017).

### 2.3 Ciclodextrinas

Conhecidas há muitos anos, as ciclodextrinas (CDs) foram produzidas a primeira vez no ano de 1891 por Villiers, por meio do microrganismo *Bacillus amylobacter* que realizou a hidrólise do amido, porém, só em 1903, Schardinger representou a estrutura cíclica delas (SINGH et al., 2002). A enzima responsável por catalisar a conversão do amido em CDs é Ciclodextrina-glicosiltransferase (CGTase) através de reações de transglicosilação intramolecular, também conhecida como ciclização (CUCOLO et al., 2006).

As CDs são oligossacarídeos cíclicos, que apresentam em sua composição unidades D-glucopiranosídicas que se ligam através de ligações  $\alpha$ -1,4 glicosídicas. As suas macromoléculas dependem diretamente do microrganismo que produzirá a enzima e as condições da reação. Sendo as três principais CDs (Figura 3) as  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -CDs, tendo as respectivas quantidades de monômeros de D-Glicopiranoses, seis, sete ou oito (LOFTSSON; MASSON, 2001).

Figura 3 - Estruturas químicas da  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  - CDs.



Fonte: Adaptado de SUÁREZ-CERDA et al., 2014.

As CDs que contêm unidades de glicose abaixo de 6, não existem devido questões estequiométricas, e as que apresentam acima de 8 unidades de glicose obtém pouco rendimento com suas propriedades de complexação fraca, o que não torna-as interessantes para uso farmacêutico (LOFTSSON e BREWSTER, 1996). Estas macromoléculas possuem um arranjo estrutural em que torna a sua cavidade interna com caráter hidrofóbico, devido a presença de um esqueleto carbônico com hidrogênios e oxigênios glicosídicos, e a sua superfície externa de caráter hidrofílico, por conter grupos hidroxilas (LOFTSSON; BREWSTER, 1996; SZEJTLI, 1998).

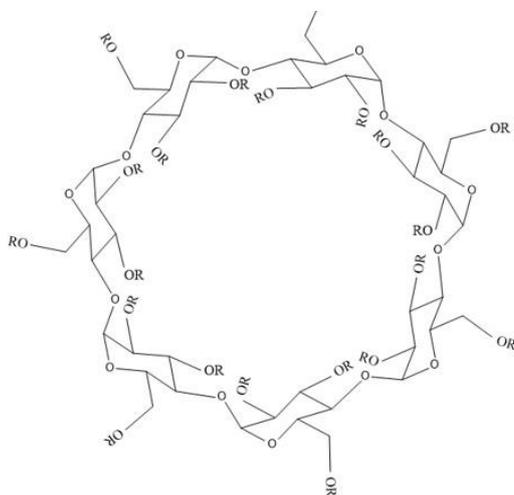
Sendo consideradas as propriedades físico-químicas da  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -CDs, a que obtém a menor solubilidade em água é a da  $\beta$ -CD. Isso ocorre devido a uma rede de hidrogênios no interior de sua cavidade que envolve as hidroxilas secundárias, fazendo com que a  $\beta$ -CD precipite quando em altas concentrações (Davis & Brewster, 2004). Dessa forma, muitas modificações vêm sendo feitas para melhorar a sua solubilidade e formação de complexo, como é o caso da HP- $\beta$ -CD, que tem as hidroxilas substituídas (Del Valle, 2004).

A estrutura molecular das CDs possibilita a sua utilização em diferentes áreas da ciência e da tecnologia (DODZIUK, 2006). Sendo comumente usada no melhoramento de propriedades físico-químicas de fármacos e como carreador deles (DE JESUS et al., 2006). Sua cavidade permite uma interação de forças moleculares com moléculas, íons ou radicais, tornando-a como substância hospedeira, esse sistema é conhecido como complexo de inclusão. O complexo de inclusão tem por finalidade promover o aumento de solubilidade de substâncias em água, a fim de melhorar a sua estabilidade química, conseqüentemente sua biodisponibilidade e a

diminuição dos efeitos adversos causados pelo composto utilizado (DEVARAKONDA et al., 2005).

A HP- $\beta$ -CD (Figura 4) é uma CD modificada, derivada da  $\beta$ -CD através da sua reação com óxido de propileno em solução alcalina. Nessa reação, um ou mais grupos hidroxilas da  $\beta$ -CD se ligam aos radicais hidroxipropil, reduzindo assim sua cristalinidade, tornando-se amorfa, resultando em uma melhor solubilidade aquosa e em perfis toxicológicos mais baixos. Essas características tornam a HP- $\beta$ -CD uma das CDs modificadas mais utilizadas, especialmente no desenvolvimento de formulações para administração oral ou parenteral (LOFTSSON; DUCHÊNE, 2007; PÉREZ-ABRIL et al., 2017; JANSOOK; OGAWA; LOFTSSON, 2018).

Figura 4 - Estrutura química da  $\beta$ -CD (grupo R = H) e da HP- $\beta$ -CD (grupo R = CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)OH).



Fonte: Adaptado de SUÁREZ-CERDA et al., 2014.

Diversos estudos relatados na literatura mostram que a complexação de produtos naturais (PNs) em CDs melhoram seus efeitos farmacológicos. Por exemplo, Carvalho e colaboradores (2017) demonstraram que o acetato de hecogenina, uma saponina esteroidal, apresentou efeito analgésico superior quando complexada em  $\beta$ -CD em relação a sua forma livre (CARVALHO et al., 2017), enquanto que, Quintans e colaboradores (2017) comprovou que essa saponina complexada em CDs apresenta efeito anti-hiperalgésico maior, em modelo animal de dor músculo-esquelética, do que a sua forma livre (QUINTANS et al., 2017).

Oliveira et al., 2016, relatou que o  $\alpha$ -terpineol complexado com  $\beta$ -CD apresentou atividade anti-hiperalgésica superior testada em modelo animal de fibromialgia, quando comparado com  $\alpha$ -terpineol livre (OLIVEIRA et al., 2016). Rakmai et al., 2017, mostrou que o

óleo essencial de pimenta preta encapsulado em HP- $\beta$ -CD apresentou efeito antibacteriano frente à *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* significativos, em relação ao óleo puro (RAKMAI et al., 2017). Silva et al., 2017, demonstrou que o CI formado entre o farnesol e  $\beta$ -CD apresentou um maior efeito antinociceptivo em modelos experimentais de dor orofacial *in vivo*, em relação a sua forma livre (SILVA et al., 2017).

Wei e colaboradores (2017) realizaram estudos com o flavonoide glabridina e relataram que esse composto complexado com HP- $\beta$ -CD apresentou um maior potencial antioxidante e anti-inflamatório (WEI et al., 2017a). Wei et al., 2017 também desenvolveu um estudo com a complexação de floretina e HP- $\beta$ -CD, demonstrando que esse flavonoide também apresentou maior efeito antioxidante e anti-inflamatório após a complexação com a HP- $\beta$ -CD (WEI et al., 2017b). Yao e colaboradores comprovaram que a miricetina após ser complexada com HP- $\beta$ -CD apresentou atividade antioxidante mais significativa em comparação a miricetina livre (YAO et al., 2014).

#### 2.4. Métodos de obtenção e caracterização de complexos de inclusão

Devido às características particulares inerentes à cada sistema binário entre fármaco e CD, não existe uma técnica geral de preparo dos complexos. As condições devem ser definidas para cada molécula hospede e a maioria dos métodos de obtenção de complexos sólidos inclui diferentes níveis de solubilização como etapa intermediária do processo, pois a presença da água solubiliza os componentes e favorece a interação hidrofóbica entre a molécula hospede e a CD. Dentre os métodos mais utilizados na obtenção de CI podemos citar a mistura física, malaxagem, liofilização, fluidização supercrítica, co-precipitação, co-evaporação e *spray drying* (CUNHA-FILHO; SÁ-BARRETO, 2007; MENEZES et al., 2014; CARVALHO et al., 2017).

O método da mistura física é baseado na simples mistura dos componentes sem adição de água. Geralmente é realizada com auxílio de almofariz e pistilo, sendo que, a mistura mecânica dura cerca de 5 - 10 minutos, que é uma faixa de tempo ideal para obter uma mistura homogênea entre a molécula hospede e CD. No entanto, a mistura física é um método de pouco eficiente, devido à baixa eficiência de complexação (EC) do fármaco na cavidade interna da CD. A malaxagem consiste na formação de uma pasta a partir da adição de uma pequena quantidade de líquido, geralmente água, suficiente para umedecer a mistura entre o pó do fármaco e a CD. Devido à praticidade, ao elevado rendimento e a facilidade de transposição de escala, esse método é um dos mais utilizados na indústria farmacêutica, ainda que sua EC seja

inferior à de outras técnicas (CUNHA-FILHO; SÁ-BARRETO, 2007; RIEKES et al., 2010; MENEZES et al., 2014).

O método da liofilização consiste na eliminação de solvente dos sistemas em solução, através de um prévio congelamento e posterior secagem sob pressões reduzidas. Essa técnica permite a obtenção de CI com elevado rendimento e um baixo estresse térmico. Geralmente, obtém-se pós secos, amorfos e com elevado grau de interação entre o fármaco e a CD. Além disso, na liofilização os cristais de água crescem rapidamente durante o congelamento, limitando a reorganização da estrutura do complexo. Dessa forma, os grandes cristais de água são formados dentro do material e a sublimação seguinte extrai a água deixando cavidades relativamente grandes, o que facilita a formação de CI, aumentando a EC (CARVALHO et al., 2017; CONZATTI et al., 2017).

A fluidização supercrítica constitui um dos métodos mais inovadores de obtenção de complexos em estado sólido. A utilização do CO<sub>2</sub> em estado supercrítico confere aos materiais obtidos características únicas quanto à interação. Apesar de todas as vantagens do método, ainda é uma técnica que apresenta um custo inicial bastante elevado (ZAFAR; FESSI; ELAISSARI, 2014). A técnica da co-precipitação parte de uma solução de fármaco e CD em condições muito próximas à saturação e através de mudanças bruscas de temperatura ou adição de solventes orgânicos, obtém-se a precipitação do material em forma de CI. Os cristais obtidos são coletados por centrifugação ou filtração (CUNHA-FILHO; SÁ-BARRETO, 2007). No método da co-evaporação é preparada uma suspensão do fármaco com a CD em determinada quantidade de água e após agitação por um determinado intervalo de tempo, a amostra é transferida para um dessecador onde é feita a secagem do solvente e posterior obtenção do CI (MENNINI et al., 2014; MENEZES et al., 2014).

A técnica de *spray drying* é viável do ponto de vista industrial e econômico. A obtenção dos complexos ocorre pela atomização (divisão do líquido em pequenas gotículas) da solução ou suspensão contendo fármaco, CD e outros adjuvantes, por ação de um dispositivo adequado, denominado *spray dryer* ou atomizador. O líquido atomizado é então lançado em uma câmara aquecida, o que resulta na secagem rápida do material. Com isso, ocorre a evaporação e separação do líquido das partículas sólidas, obtendo assim, o CI (TEODORO et al., 2017).

Diversas análises físico-químicas e morfológicas são realizadas para a caracterização de CI. Dentre as técnicas mais utilizadas, destacam-se a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Termogravimetria/Termogravimetria Derivada (TG/DTG), Espectrofotometria de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Difração de

Raios-X (DRX), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e técnicas de Modelagem Molecular como o *Docking*. É importante ressaltar que essas técnicas utilizadas em conjunto são capazes de evidenciar a formação de CI (MURA, 2015).

A obtenção de CI pode ser identificada nos perfis das curvas de DSC através da redução, desaparecimento ou deslocamento de picos endotérmicos ou exotérmicos e por variações relevantes na entalpia do fármaco puro ou complexado. As alterações observadas nas curvas DSC são consideradas indicativas de perda da estrutura cristalina do fármaco como consequência de interações entre os componentes no estado sólido. Porém, a presença residual do pico de fusão do fármaco, embora alargado ou deslocado para temperaturas mais baixas, é indicativo da existência de moléculas livres do fármaco no estado cristalino, sugerindo a inclusão parcial na CD ou até mesmo a não formação do CI, uma vez que, a formação do CI muitas vezes apresenta ausência do pico de fusão do fármaco, devido à perda da estrutura cristalina causada pela complexação (LYRA et al., 2010; MURA, 2015).

O TG/DTG é frequentemente utilizado em combinação com a análise de DSC e fornece dados quantitativos de perda de massa com o aumento da temperatura. O TG/DTG permite determinar mudanças no peso da amostra em relação à mudança de temperatura. A comparação das curvas TG/DTG de fármacos puros e dos CI devem evidenciar alterações no perfil de perda de massa do suposto complexo, sendo indicativo de interações entre as moléculas e formação do CI. Espera-se que nas curvas TG/DTG o fármaco incluído na cavidade da CD apresente comportamento diferente, quando comparado ao fármaco livre, porque a formação de CI deverá aumentar a estabilidade térmica do fármaco, por exemplo (GUIMARÃES et al., 2015; MURA, 2015).

O FTIR é amplamente utilizado nos estudos de complexos sólidos, pois é uma técnica útil para identificar os modos vibratórios do fármaco e da CD, os quais, são alterados durante o processo de inclusão, sugerindo interação entre essas moléculas. Os fenômenos envolvidos na complexação produzem desvios e mudanças de intensidade das bandas correspondentes aos grupos químicos (grupos funcionais) do fármaco ou da CD. Os espectros de FTIR possibilitam identificar as alterações vibracionais das moléculas ocasionadas pela sua inserção na cavidade das CDs ou por sua interação com grupamentos externos. Mudanças em suas bandas características, como o deslocamento, desaparecimento ou surgimento de novas bandas são indicativos da formação do CI (LYRA et al., 2010; MURA, 2015).

O DRX é uma técnica não destrutiva que mede a intensidade de raios X difratados por uma amostra sólida sob diferentes ângulos. Algumas CDs no seu estado cristalino formam ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares, as quais, estabilizam tanto a

conformação da molécula, como também a sua estrutura cristalina gerando padrões de difração com picos bem definidos. O emprego desta técnica se baseia na comparação dos padrões de difração das substâncias puras e dos complexos obtidos. A análise de um padrão de difração com características de material amorfo, sem picos bem definidos, pode ser indicativo da formação dos CI (RAOOV; MOHAMAD ABAS, 2013; RAJENDIRAN; MOHANDOSS; VENKATESH, 2014; MURA, 2015).

A técnica de MEV permite a análise dos aspectos morfológicos da superfície de CI sólidos e ajuda a evidenciar alterações morfológicas que podem estar relacionadas com as interações hóspede-hospedeiro, além de possibilitar informações sobre possíveis contaminações. Trata-se de um método qualitativo utilizado para visualizar a estrutura superficial de matérias-primas ou formulações preparadas. Nos estudos de CI, a técnica MEV geralmente avalia a redução da cristalinidade das partículas obtidas por diferentes métodos de preparo dos complexos, pois essa técnica permite a visualização e diferenciação das partículas de CDs e dos cristais dos fármacos. Alterações drásticas no formato das partículas, assim como, em seu aspecto e tamanho são fortes indicadores da complexação de substâncias em CDs (LYRA et al., 2010; MURA, 2015).

O RMN em comparação com outras técnicas, é a que mais se destaca na caracterização de CI, pois os espectros de RMN distinguem com clareza os CI formados de outras ligações possíveis entre o hóspede e o hospedeiro. A  $\beta$ -CD e os seus derivados, por exemplo, consiste de prótons H-1, H-2, H-3, H-4 e H-5, onde H-3 e H-5 estão localizados no interior da cavidade. Quando a molécula hóspede é introduzida na cavidade interna da CD perto dos prótons mencionados, os sinais são ligeiramente deslocados nos espectros de  $^1\text{H}$  RMN, confirmando a formação do CI. Todavia, se houver o deslocamento dos H-1, H-2 e H-4, é indicativo da não formação do CI, pois o fármaco se ligou a cavidade externa da CD, ou seja, a interação fármaco-CD foi pelo lado de fora da CD e assim, não é possível proteger o fármaco, nem aumentar a sua solubilidade (JAHED et al., 2014).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Geral

Elucidar a formação do complexo de inclusão de morina com HP- $\beta$ -CD.

#### 3.2. Específicos

- Preparar o complexo de inclusão de morina com HP- $\beta$ -CD;
- Caracterizar por parâmetros físicos, químicos e morfológicos o complexo de inclusão obtido, bem como, calcular a eficiência de complexação;
- Determinar o perfil de dissolução *in vitro* do complexo de inclusão de morina com HP- $\beta$ -CD e da morina livre;

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Materiais

Morina ( $C_{15}H_{10}O_7$ ; pureza  $\geq 95\%$ ) foi obtida da Sigma-Aldrich® (Darmstadt, Alemanha). A hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD;  $C_{54}H_{102}O_{39}$ ; pureza  $\geq 98\%$ ) foi obtida da Wacker® Chemie AG (Burghausen, Alemanha). Acetonitrila (HPLC grade, Honeywell®, Muskegon, EUA), água ultrapura (Milli-Q system, Millipore®, Bedford, MA, USA) e ácido orto-fosfórico (Neon®, São Paulo, Brasil) foram utilizados como fase móvel dos procedimentos analíticos. Tween 80 (Neon®, São Paulo, Brasil) foi utilizado como meio de dissolução no estudo de dissolução *in vitro*.

### 4.2. Preparo do complexo de inclusão morina/HP- $\beta$ -CD

O complexo de inclusão foi preparado na razão molar 1:1 de morina e HP- $\beta$ -CD, baseado nos pesos moleculares dessas substâncias, pelo método de liofilização adaptado de Menezes et al., 2012 e Carvalho et al., 2017. Inicialmente, HP- $\beta$ -CD (1380 mg) foi dissolvida em 20 mL de água ultrapura e a solução foi submetida a agitação magnética, sob temperatura de 40°C para a completa solubilização da HP- $\beta$ -CD. Em seguida, adicionou-se morina (302 mg) e a solução obtida foi submetida à agitação magnética por 36 horas com velocidade de 400 rpm sob temperatura ambiente. A solução foi congelada sob temperatura de -40°C por 24 horas e liofilizada. A amostra obtida foi armazenada em recipiente de vidro âmbar hermeticamente fechada e acondicionada em *Dry Box* eletrônico para evitar ganho de umidade. Para comparação, a mistura física de morina e HP- $\beta$ -CD foi preparada na razão molar de 1:1, através da agitação manual de ambas as substâncias com auxílio de almofariz e pistilo durante 10 minutos até obter uma mistura homogênea. A amostra de mistura física também foi armazenada em recipiente de vidro âmbar hermeticamente fechada e acondicionada em *Dry Box* eletrônico para evitar ganho de umidade.

### 4.3. Análises por CLAE

As análises foram realizadas em um cromatógrafo líquido Shimadzu®, equipado com um degaseificador DGU-20A3, duas bombas LC-20AD, um injetor automático SIL-20A HT, um forno CTO-20A, um detector de arranjo de diodos SPD20Avp, acoplados a um sistema controlador CBM-20A. Como fase estacionária, utilizou-se uma coluna analítica Ascentis® C18 de 250 x 4,6 mm de diâmetro com tamanho de partícula de 5  $\mu$ m, equipada com uma pré-coluna Ascentis® C18 de 20 x 4 mm de diâmetro com tamanho de partícula de 5  $\mu$ m. Os solventes utilizados na fase móvel foram: (A) ácido fosfórico (0,1%) em água ultrapura (v/v) e

(B) acetonitrila. O fluxo da fase móvel foi de 0,9 mL/min e o volume de injeção da amostra foi de 20 µL. O método consistiu de um sistema isocrático de eluição na proporção de 65/35 - A/B - v/v da fase móvel em um tempo de análise de 20 minutos. O comprimento de onda para detecção da morina foi de 360nm e as análises foram realizadas sob temperatura de 25°C.

#### 4.4. Caracterização do complexo de inclusão

##### 4.4.1. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As análises por DSC da morina, HP-β-CD, mistura física e do complexo de inclusão morina/HP-β-CD foram realizadas em uma faixa de temperatura de 30 – 300°C utilizando um equipamento DSC-60 *Shimadzu*®, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (100 mL/min) e razão de aquecimento de 10°C/min, em cápsulas de alumínio contendo aproximadamente 2 mg da amostra. O DSC-60 foi previamente calibrado com índio metálico padrão (pureza ≥ 99%) antes das análises, as quais foram realizadas em triplicata (n=3) (adaptado de LIU et al., 2013a; CARVALHO et al., 2017).

##### 4.4.2. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de absorção na região do infravermelho das amostras de morina, HP-β-CD, mistura física e do complexo de inclusão morina/HP-β-CD foram obtidos na região entre 4000 - 400 cm<sup>-1</sup>, utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr), em um FTIR da *Varian*® modelo 640-IR, sob temperatura ambiente. Antes das análises, aproximadamente 3 mg das amostras foram homogeneizadas com 300 mg de KBr (1:100) e em seguida foram comprimidas, formando uma pastilha. As análises foram realizadas em triplicata (n=3) (adaptado de LIU et al., 2013b).

##### 4.4.3. Difração de Raios X (DRX)

Os padrões de difração da morina, HP-β-CD, mistura física e do complexo de inclusão morina/HP-β-CD foram obtidos com radiação monocromática Cu Kα (comprimento de onda = 1,54056 Å), usando um difratômetro de raios X *Bruker*® modelo D8 *Advance Da Vinci*. As amostras em pó foram colocadas em um aparato retangular de alumínio antes da exposição ao feixe de raios X. As regiões de varredura do ângulo de difração 2θ, foram de 5 – 50° e a radiação foi detectada com um detector proporcional LYNXEYE, com abertura de 3,3° e fendas de 0,2° de divergência. As medidas foram realizadas em triplicata (n=3) com voltagem de 40 kV, corrente elétrica de 40 mA, passo de 0,02° com tempo de contagem 0,5 segundos/passos em temperatura ambiente (adaptado de YAO et al., 2014).

#### 4.4.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para avaliar a morfologia da morina, HP- $\beta$ -CD, mistura física e do complexo de inclusão morina/HP- $\beta$ -CD. As fotomicrografias eletrônicas foram obtidas utilizando microscópio eletrônico de varredura JEOL®, modelo JSM – 6610. Para a obtenção das imagens, as amostras foram posicionadas em fitas de dupla face colocadas sobre *stubs* metálicos de alumínio e revestidas com ouro metálico sob vácuo para tornarem-se condutoras. As amostras foram analisadas com um potencial de aceleração de 15 kV em aumento de 500x(adaptado de LIU et al., 2013b).

#### 4.4.5. Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de  $^1\text{H}$  NMR da morina, HP- $\beta$ -CD e do complexo de inclusão morina/HP- $\beta$ -CD foram obtidos em um espectrômetro Bruker® DRX *advance*, operando na frequência do hidrogênio de 400 MHz sob temperatura de 298 K. Antes das análises, HP- $\beta$ -CD e o complexo de inclusão de morina/HP- $\beta$ -CD foram diluídos em água deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ), que apresenta deslocamento químico de 4,8 ppm e a morina livre em DMSO deuterado ( $\text{C}_2\text{D}_6\text{OS}$ ), que apresenta deslocamento químico de 2,5 ppm. Os deslocamentos químicos foram relatados em ppm, usando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno.

#### 4.5. Eficiência de complexação

A quantidade de morina complexada na HP- $\beta$ -CD foi determinada por CLAE. Inicialmente, 10 mg do complexo de inclusão morina/HP- $\beta$ -CD foi dissolvido em 10 mL de acetonitrila e a solução obtida foi mantida por agitação magnética durante 24 horas, com velocidade de 400 rpm sob temperatura ambiente, para permitir que a morina encapsulada esteja presente em solução. Em seguida, a solução foi centrifugada (5000 rpm – 30 minutos) para remover a HP- $\beta$ -CD da solução, deixando apenas o composto ativo (ABARCA et al., 2016; CARVALHO et al., 2017). O sobrenadante foi coletado, filtrado em filtros de membrana (PTFE – 0,45  $\mu\text{m}$ ), submetido à ultrassom sonicator por 10 minutos e analisado por CLAE. As amostras foram preparadas e analisadas em triplicata (n=3). A eficiência de complexação (EC) foi calculada de acordo com a equação 1 e a eficiência de carga (ECa) foi determinada de acordo com a equação 2(HUANG et al., 2016; WEI et al., 2017a; WEI et al., 2017b).

$$EC = \frac{\text{Quantidade de morina encapsulada}}{\text{Quantidade inicial de morina}} * 100$$

$$ECa = \frac{\text{Quantidade de morina encapsulada}}{\text{Quantidade do complexo de inclusão}} * 100$$

#### 4.6. Estudo de dissolução *in vitro*

Para determinar o perfil de dissolução *in vitro* da morina livre e complexada, quantidades equivalentes de morina livre e do complexo de inclusão morina/HP- $\beta$ -CD foram pesadas e transferidas para cápsulas transparentes. Como meio de dissolução, foi utilizado uma solução aquosa de Tween 80 (0,1%), previamente submetida à banho de ultrassom por 60 minutos. Durante todo experimento, o meio de dissolução foi mantido sob temperatura de  $37 \pm 0,5$  °C. As cápsulas contendo as amostras equivalente a 10 mg de morina foram imersas em diferentes béqueres com 100 mL do meio de dissolução e foram mantidas em agitação magnética de 100 rpm. Ao mesmo tempo, alíquotas (2 mL) de cada solução foram coletadas em diferentes intervalos de tempo: 0, 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210 e 240 minutos (YAO et al., 2014). Na medida em que as alíquotas eram retiradas, o mesmo volume do meio de dissolução era repostado. Todas as amostras coletadas foram diluídas em 10 mL de acetonitrila, submetidas à banho de ultrassom por 30 minutos e filtradas em filtros de membrana (PTFE – 0,45  $\mu$ m). A quantidade de morina livre e de morina no complexo inclusão liberadas em cada intervalo de tempo foram determinadas por CLAE. As análises foram realizadas em triplicata (n=3).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Caracterização do complexo de inclusão morina/HP- $\beta$ -C

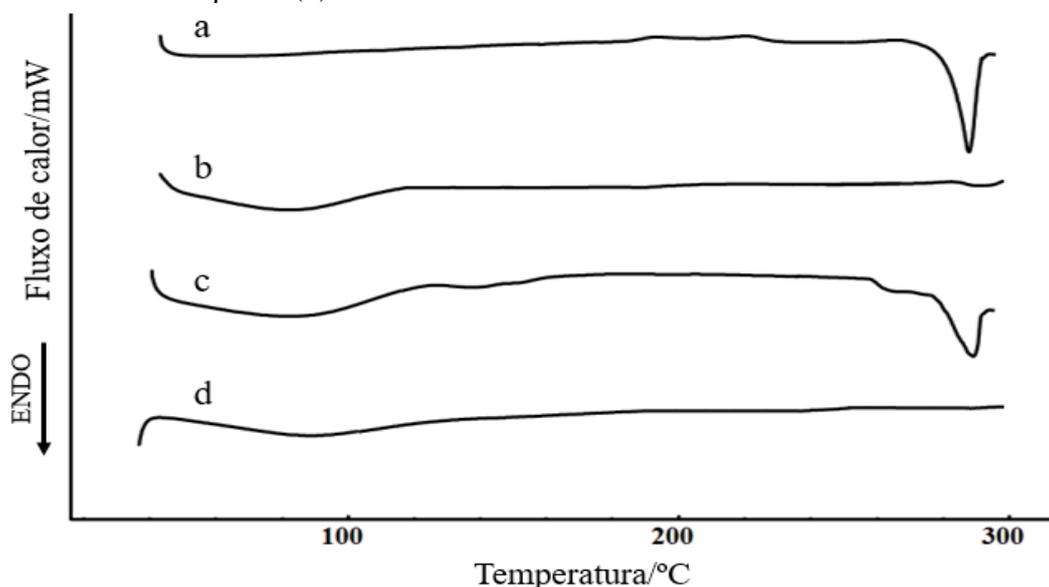
#### 5.2.1. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As alterações observadas nas curvas de DSC, tais como redução de tamanho, alargamento, mudança e/ou diminuição da temperatura do pico de fusão do fármaco, são consideradas indicativos de perda da estrutura cristalina do fármaco, como consequência de interações entre os componentes no estado sólido. Porém, a presença residual do pico de fusão do fármaco, embora alargado ou deslocado para temperaturas mais baixas, é indicativo da existência de moléculas livres do fármaco mesmo no estado cristalino, sugerindo a inclusão parcial do fármaco na CD ou até mesmo a não formação do complexo de inclusão, visto que, a formação do complexo muitas vezes apresenta ausência do pico de fusão do fármaco, devido à perda da estrutura cristalina causada pela complexação (MURA, 2015; CARVALHO et al., 2017).

Os perfis de comportamento térmico avaliados nas curvas de DSC de fármacos e CDs podem apresentar eventos endotérmicos que correspondem à sua desidratação, mudança de fase cristalina, fusão e decomposição. A Figura 5 apresenta as curvas de DSC da morina, HP- $\beta$ -CD, mistura física e do complexo de inclusão morina/HP- $\beta$ -CD. A morina demonstrou um pico endotérmico em 296,54 °C, correspondendo ao ponto de fusão da sua forma cristalina. A curva de DSC da HP- $\beta$ -CD exibiu o estado natural amorfo dessa CD, apresentando-se como uma linha plana com um evento térmico em torno de 95 °C, que está relacionado com a perda de água (HU et al., 2012; LIU et al., 2013a; LIU et al., 2013b; YANG et al., 2017).

A mistura física apresentou a presença do evento característico da HP- $\beta$ -CD relatado como perda de água e também, o pico cristalino da morina, que é indicativo do seu ponto de fusão. Dessa forma, a curva de DSC da mistura física foi basicamente uma sobreposição entre as curvas da morina e da HP- $\beta$ -CD, o que sugere uma fraca interação entre essas moléculas e assim, não houve a formação do complexo de inclusão. No entanto, na curva de DSC do complexo morina/HP- $\beta$ -CD, o pico endotérmico da morina desapareceu completamente, o que sugere que a morina foi incorporada dentro da cavidade da HP- $\beta$ -CD, formando o complexo de inclusão. Além disso, houve uma redução do evento relacionado com a perda de água, que também é um indicativo de complexação (CARVALHO et al., 2017).

Figura 5 - Curvas de DSC da morina (a), HP- $\beta$ -CD (b), mistura física (c) e do complexo de inclusão morina/HP- $\beta$ -CD (d).



A técnica de DSC é uma das mais utilizadas para a caracterização de complexos com CDs, pois é capaz de avaliar os eventos térmicos das amostras envolvidas no estudo e dessa forma, fornece informações para evidenciar a formação do complexo de inclusão. Os estudos apresentados na literatura apresentam discussão semelhante ao nosso trabalho, ao sugerir a complexação de produtos naturais, como ácido ferúlico, ácido gálico, miricetina, luteolina, daidzeína, naringenina, apigenina entre outros, em CDs modificadas. Nos trabalhos, a substância livre, apresenta um pico endotérmico, o qual, indica o ponto de fusão devido ao estado cristalino da amostra. A HP- $\beta$ -CD apresentam-se como uma linha plana, com ausência de picos endotérmicos devido ao seu estado amorfo (WANG et al., 2011; LIU et al., 2013a; LIU et al., 2013b; YAO et al., 2014; PAN et al., 2017; TEODORO et al., 2017; WU et al., 2017).

A mistura física de cada estudo apresentam-se como uma sobreposição das curvas de DSC da substância e da CD, pois na amostra obtida por essa metodologia de preparo não ocorre a complexação. Em relação aos complexos de inclusão obtidos por diferentes metodologias, ocorre o desaparecimento do pico cristalino da substância devido a incorporação na CD. Em todos os casos, os autores relatam que a ausência do pico cristalino é devido à complexação e a diminuição da cristalinidade, obtendo-se um complexo de inclusão amorfo (WANG et al., 2011; LIU et al., 2013a; LIU et al., 2013b; YAO et al., 2014; PAN et al., 2017; TEODORO et al., 2017; WU et al., 2017).

### 5.2.2. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

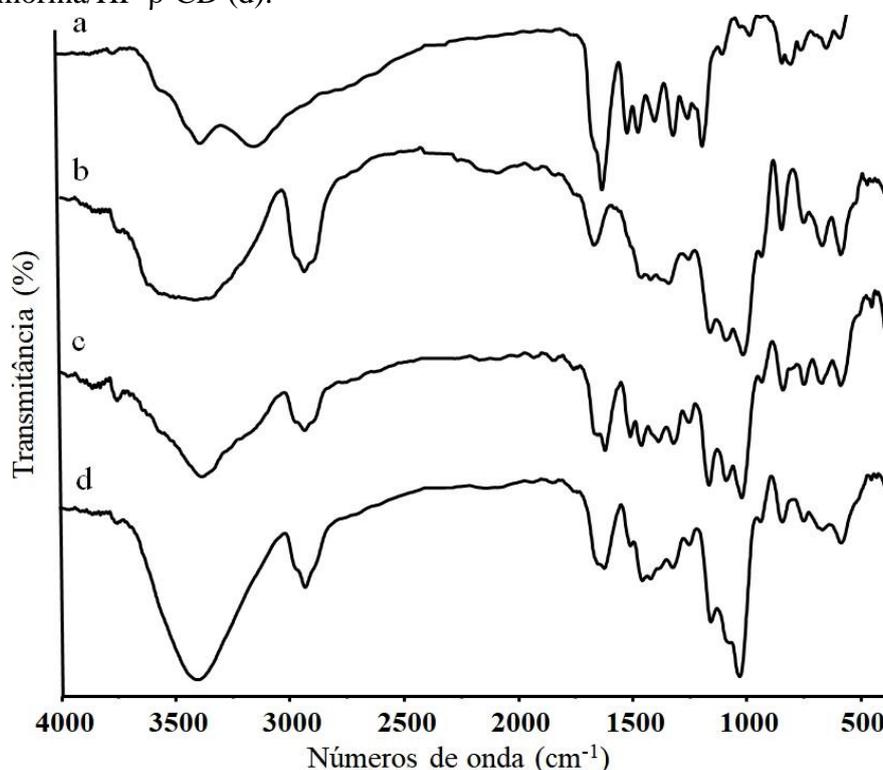
A técnica de FTIR é bastante utilizada durante a caracterização de sistemas sólidos com CDs, pois se apresentam como medidas rápidas e precisas, ainda que a informação obtida por este ensaio apresente algumas limitações. A natureza dos fenômenos envolvidos na complexação torna os desvios e mudanças de intensidade das bandas de absorção correspondentes aos grupos químicos do fármaco ou da CD bastante sutis, requerendo uma cuidadosa interpretação dos dados (CUNHA-FILHO; SÁ-BARRETO, 2007; LYRA et al., 2010).

Os espectros de FTIR da morina, HP- $\beta$ -CD, mistura física e do complexo de inclusão morina/HP- $\beta$ -CD estão apresentados na Figura 6. O espectro de FTIR da morina consistiu nas bandas de absorção proeminentes dos grupos hidroxila em 3387 e 3154  $\text{cm}^{-1}$  ( $-\text{OH}$  alongamento de vibração); do grupo carbonila em 1633  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{C}=\text{O}$  alongamento de vibração); dos grupamentos aromáticos em 1512 e 1455  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{C}=\text{C}$  alongamento de vibração dos anéis aromáticos) e também do grupo éter em 1316, 1251 e 1176  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{C}-\text{O}-\text{C}$  alongamento de vibração). O espectro de FTIR da morina foi semelhante aos espectros de outros flavonoides, tais como, luteolina, miricetina e daidzeína, os quais, apresentam estruturas e grupos funcionais semelhantes (LIU et al., 2013a; YAO et al., 2014; PAN et al., 2017).

O espectro da HP- $\beta$ -CD é caracterizado pela presença de uma banda de absorção dos grupos hidroxila em 3404  $\text{cm}^{-1}$  ( $-\text{OH}$  alongamento de vibração); grupos CH e  $\text{CH}_2$  atribuídos à banda de absorção em 2930  $\text{cm}^{-1}$  ( $-\text{CH}$  alongamento de vibração e  $-\text{CH}_2$  assimétrico alongamento de vibração); bandas proeminentes em 1661  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{H}-\text{O}-\text{H}$  alongamento de vibração) e outras bandas em 1157, 1092 e 1027  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{C}-\text{O}$  alongamento de vibração) (LIU et al., 2013b; YAO et al., 2014; WEI et al., 2017a; WEI et al., 2017b; GARRIDO et al., 2018). Na mistura física, as características das bandas de absorção da morina e da HP- $\beta$ -CD foram evidentes, ou seja, o espectro de FTIR foi praticamente uma combinação do espectro de ambas moléculas, demonstrando que não houve interação ou interação fraca entre os compostos quando submetidos à agitação mecânica.

Por outro lado, no complexo de inclusão morina/HP- $\beta$ -CD, algumas bandas da morina tornaram-se ausentes, como exemplo, as pequenas bandas de absorção características da morina de 400 à 1101  $\text{cm}^{-1}$  foram desaparecidas, assim como as bandas referentes aos grupamentos aromáticos (1512 e 1455  $\text{cm}^{-1}$ ) e do grupo carbonila (1633  $\text{cm}^{-1}$ ), provavelmente devido à restrição da vibração da molécula de morina, sugerindo que esta estava aprisionada na cavidade da molécula de HP- $\beta$ -CD. Além disso, houve um aumento na intensidade da banda de absorção em 3405  $\text{cm}^{-1}$ , indicando um aumento no número de grupos hidroxila, provavelmente devido à complexação da morina na cavidade da HP- $\beta$ -CD, sugerindo que o anel fenil da morina pode estar envolvido na formação do complexo de inclusão (LIU et al., 2013a).

Figura 6 - Espectros de FTIR da morina (a), HP- $\beta$ -CD (b), mistura física (c) e do complexo de inclusão morina/HP- $\beta$ -CD (d).



Diversos estudos realizaram a complexação de produtos naturais da classe dos flavonoides em HP- $\beta$ -CD e a maioria desses utilizou a técnica de FTIR para evidenciar a formação dos complexos de inclusão. Os resultados relatados nesses estudos foram similares aos obtidos em nosso trabalho, uma vez que, os espectros de FTIR da morina apresentaram, as bandas de absorção dos grupos hidroxilas, carbonila (grupo cetônico) e dos grupamentos aromáticos que são característicos dos flavonoides. Além disso, o espectro da HP- $\beta$ -CD foi semelhante aos descritos na literatura, a mistura física demonstrou uma combinação dos espectros da molécula hospedeira (flavonoide) - hospedeira (CDs) indicando ausência ou fraca interação entre eles e por fim, os espectros dos complexos de inclusão apresentaram ausência,

deslocamento ou mudança na intensidade de determinadas bandas de absorção, sugerindo a complexação da molécula em estudo na CD (LIU et al., 2013a; LIU et al., 2013b; YAO et al., 2014; QIU et al., 2014; WEI et al., 2017a; WEI et al., 2017b; PAN et al., 2017; GARRIDO et al., 2018).

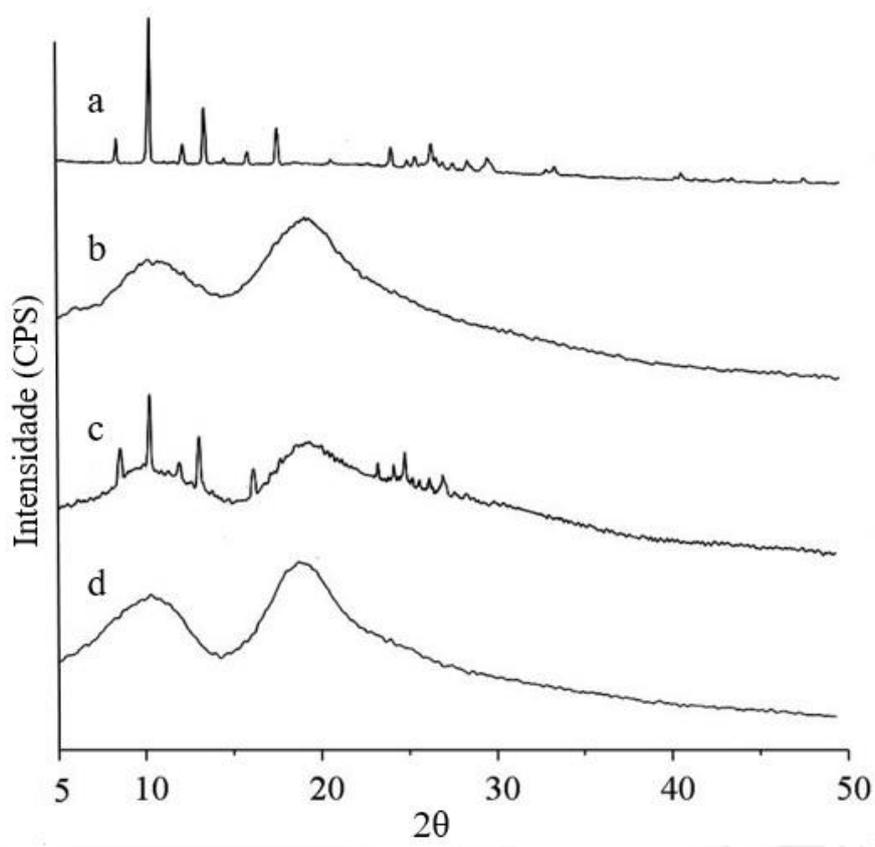
### 5.2.3. Difração de Raios X (DRX)

A difração de Raios X determina a natureza cristalina de sólidos e é uma das melhores técnicas para a caracterização físico-química de complexos de inclusão. A depender da forma cristalina da molécula hospede, haverá a formação de picos característicos de cristalinidade nos padrões de difração, obtidos após as medidas no DRX. Com isso, a complexação pode ser avaliada por alterações nos picos da molécula hospede e da CD envolvida no estudo (VEIGA; PECORELLI; RIBEIRO, 2006; CORTI et al., 2007).

Os padrões de difração da morina, HP- $\beta$ -CD, mistura física e do complexo de inclusão morina/HP- $\beta$ -CD estão apresentados na Figura 7. O padrão de difração da morina apresentou vários picos pontiagudos, característicos do seu estado natural cristalino, distribuídos em vários ângulos de difração: 8,4°; 10,2°; 12,8°; 14,3°; 16,8°; 18,6° e pequenos picos na faixa de 24 – 31°. O padrão de difração da morina foi similar à outros flavonoides presentes no estado cristalino descritos na literatura (LIU et al., 2013a; LIU et al., 2013b; QIU et al., 2014; YAO et al., 2014). Por outro lado, a HP- $\beta$ -CD apresentou um padrão de difração amorfo, ou seja, sem a presença de picos cristalinos, somente com dois halos de difração amplos, característicos dessa molécula em torno de 10 e 20° (LIU et al., 2013b; QIU et al., 2014; HUANG et al., 2016; YAO et al., 2014; CHEN et al., 2017; WEI et al., 2017a; WEI et al., 2017b).

O padrão de difração da mistura física exibiu característica amorfa da HP- $\beta$ -CD com alguns picos cristalinos característicos da morina claramente distinguidos, ou seja, o padrão de DRX da mistura física foi uma sobreposição dos padrões da morina e da HP- $\beta$ -CD, demonstrando que nenhuma interação foi formada entre essas moléculas durante agitação manual e ambas permaneceram com suas características físicas originais. No entanto, o complexo de inclusão morina/HP- $\beta$ -CD apresentou um padrão de difração com halos amorfos amplos similar a HP- $\beta$ -CD e os picos cristalinos da morina desapareceram completamente. Esse resultado indica que a morina foi encapsulada na cavidade da HP- $\beta$ -CD com conseqüente perda da sua cristalinidade, sugerindo a formação de um novo composto na forma de complexo de inclusão.

Figura 7 - Padrões de difração da morina (a), HP- $\beta$ -CD (b), mistura física (c) e do complexo de inclusão morina/HP- $\beta$ -CD (d).



Os resultados de caracterização físico-química obtida por DRX com as amostras de morina, HP- $\beta$ -CD, mistura física e com o complexo de inclusão foram semelhantes à diversos estudos com produtos naturais e sintéticos complexados com HP- $\beta$ -CD descritos na literatura. Nesses estudos, os autores relatam que a ausência dos picos cristalinos da molécula hospede no complexo de inclusão demonstra que houve a complexação da molécula na cavidade interna da CD, ou seja, um padrão de difração com características de um material amorfo é indicativo da formação de complexos com HP- $\beta$ -CD (LIU et al., 2013b; QIU et al., 2014; HUANG et al., 2016; YAO et al., 2014; CHEN et al., 2017; WEI et al., 2017a; WEI et al., 2017b).

#### 5.2.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A técnica de MEV é um método qualitativo usado para visualizar a estrutura superficial de matérias-primas ou formulações preparadas. Nos estudos de complexos de inclusão com CDs, a MEV geralmente avalia a redução da cristalinidade das partículas obtidas por diferentes métodos de preparo dos complexos, pois essa técnica permite a visualização e diferenciação das partículas de CDs e dos cristais dos fármacos. Alterações drásticas no formato das

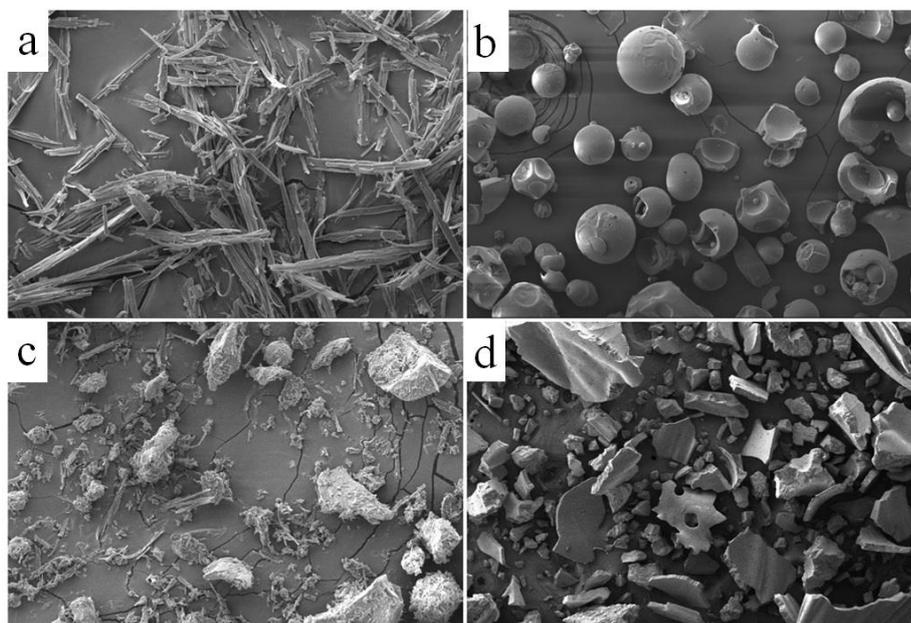
partículas, assim como, em seu aspecto e tamanho são fortes indicadores da complexação de substâncias em CDs (LYRA et al., 2010; QIU et al., 2014). A Figura 8 mostra as fotomicrografias de MEV da morina, HP- $\beta$ -CD, mistura física e do complexo de inclusão morina/HP- $\beta$ -CD.

A morina apresentou formato acicular, isto é, forma semelhante a pequenas agulhas cristalinas com diferentes tamanhos, enquanto que a HP- $\beta$ -CD apresentou sua estrutura típica, ou seja, partículas esféricas, amorfas e com cavidades (YAO et al., 2014; HUANG et al., 2016; WEI et al., 2017a; WEI et al., 2017b). Na mistura física, os pequenos cristais em forma de agulha característicos da morina e as partículas esféricas (ou fragmentos dessas partículas) da HP- $\beta$ -CD estão presentes concomitantemente, demonstrando que não houve mudanças nas formas dessas substâncias, devido à ausência ou fraca interação entre os compostos durante a agitação manual.

Por outro lado, o complexo de inclusão morina/HP- $\beta$ -CD, apresentou-se como partículas irregulares de tamanhos variados, com aspecto interno uniforme em formato de pequenos blocos. No complexo, a morfologia original de ambos os componentes desapareceu completamente, tornando-se impossível diferenciar a morina e a HP- $\beta$ -CD. Essa mudança drástica na morfologia das partículas demonstra uma forte interação entre a morina e a HP- $\beta$ -CD sugerindo a formação do complexo de inclusão.

As fotomicrografias obtidas das análises de MEV demonstraram que quando os pós de morina e HP- $\beta$ -CD foram simplesmente misturados por agitação manual (mistura física), eles não formaram nenhuma associação próxima e continuaram a existir em seus estados originais separadamente ou com morina na superfície da HP- $\beta$ -CD. No entanto, na medida em que as soluções dos dois compostos foram liofilizadas, eles formaram uma associação próxima na forma de complexo de inclusão, e assim, a morina não existia mais no estado cristalino (LIU et al., 2013b; QIU et al., 2014). Dessa forma, as imagens de MEV corroboram com os resultados obtidos com as análises de DSC e DRX mencionadas anteriormente, as quais também demonstraram que a morina perde sua característica cristalina com a formação do complexo de inclusão.

Figura 8 - Fotomicrografias de MEV da morina (a), HP- $\beta$ -CD (b), mistura física (c) e do complexo de inclusão morina/HP- $\beta$ -CD (d) em aumento de 500x



A maioria dos estudos que evidenciaram a complexação de flavonoides com HP- $\beta$ -CD utilizaram a técnica de MEV durante a caracterização do complexo. Os resultados obtidos por esses estudos foram semelhantes ao do complexo de morina/HP- $\beta$ -CD, ou seja, os compostos na forma livre apresentaram uma estrutura cristalina, sendo que na maioria equivalente a pequenas agulhas, a HP- $\beta$ -CD com formato esférico e amorfo, as misturas físicas com características de ambas moléculas (composto livre e HP- $\beta$ -CD) e por fim, os complexos de inclusão com uma morfologia totalmente diferente, em formato de blocos com tamanhos irregulares. Em todos os estudos, os autores relataram que a mudança na morfologia das partículas é indicativa da formação do complexo de inclusão, devido à interação entre o composto em estudo com a HP- $\beta$ -CD (LIU et al., 2013b; QIU et al., 2014; SONGNGAM et al., 2014; YAO et al., 2014; PAN et al., 2017; WEI et al., 2017a; WEI et al., 2017b).

### 5.3. Ressonância magnética nuclear (RMN)

Na investigação de complexos de inclusão a ressonância magnética nuclear (RMN) é uma das mais utilizadas, sendo objetiva no que se diz respeito à estrutura e dinâmica de complexos supramoleculares no nível atômico. A observação do núcleo do hidrogênio ( $^1\text{H}$ ) é a metodologia mais aplicada nesse tipo de sistema, isso ocorre por meio da sua abundância natural e alta magnetorífica. Além de determinar a estrutura molecular, o RMN também é

utilizado para verificar o teor de pureza de uma amostra, acompanhar rendimento de reações (PAULI, 2005).

Figura 9 - Espectros de  $^1\text{H}$  RMN da HP- $\beta$ -CD (a) e do complexo Mo/HP- $\beta$ -CD (b). \* Deslocamento químico da D<sub>2</sub>O (4,8 ppm)

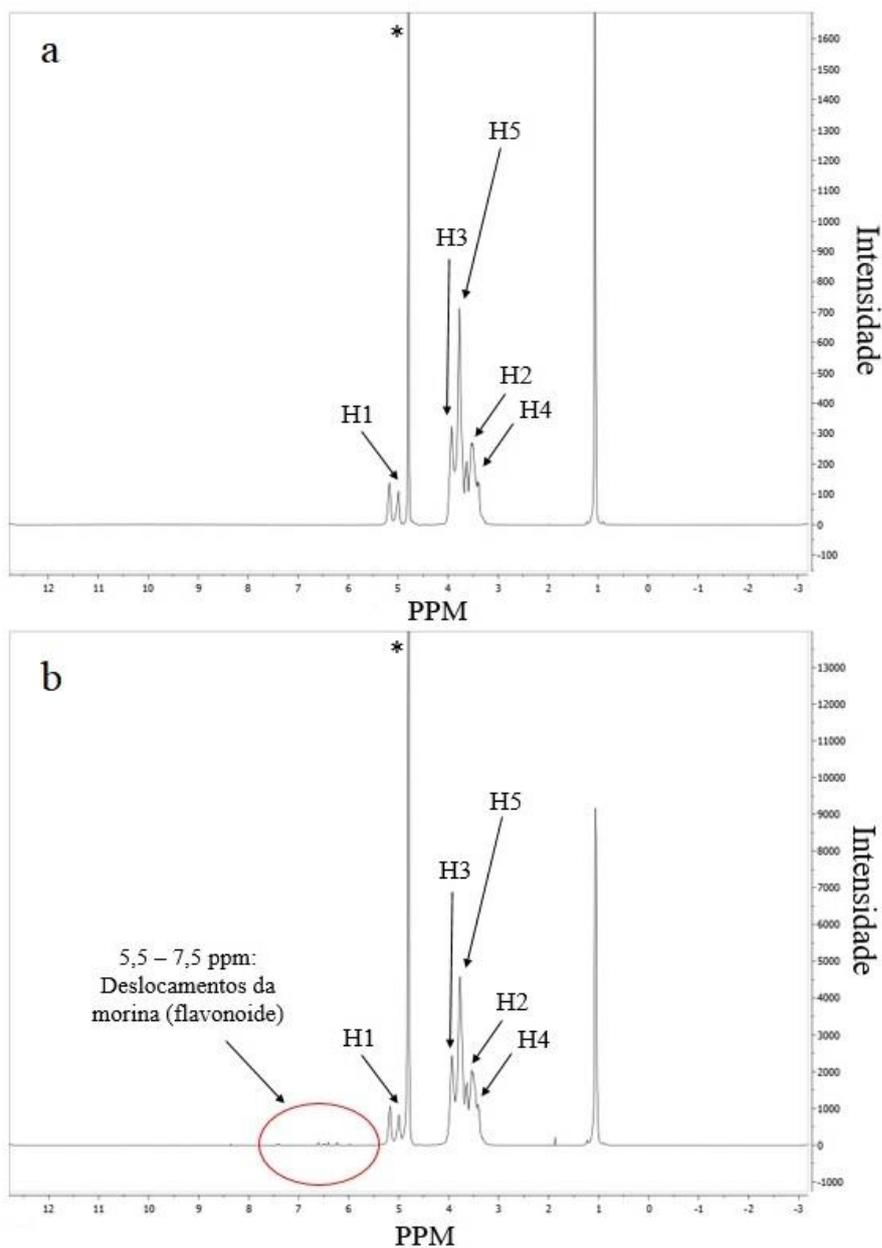


Tabela 1: Espectros de  $^1\text{H}$  RMN da HP- $\beta$ -CD e do complexo de inclusão morina/HP- $\beta$ -CD.

$\delta(\text{ppm})$ HP- $\beta$ -CD	$\delta(\text{ppm})$ morina/HP- $\beta$ -CD	$\Delta\delta$
H1: 4,994	H1: 4,985	- 0,009
H2: 3,535	H2: 3,523	- 0,012
H3: 3,935	H3: 3,902	- 0,033
H4: 3,473	H4: 3,458	- 0,015
H5: 3,774	H5: 3,722	- 0,052

A Figura 9 apresenta os espectros de  $^1\text{H}$  RMN da HP- $\beta$ -CD e do complexo de inclusão morina/HP- $\beta$ -CD diluídos em  $\text{D}_2\text{O}$ . É importante ressaltar que no espectro do complexo de inclusão, os deslocamentos relacionados a morina (5,5 – 7,5 ppm) estão com baixa intensidade devido a eficiência de carga da morina após a complexação com a ciclodextrina. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) dos prótons de HP- $\beta$ -CD livre e no complexo estão descritos na tabela 1. No espectro da HP- $\beta$ -CD, o deslocamento de H-1, H-2, H-3, H-4 e H-5 foram de 4,994; 3,535; 3,935; 3,473 e 3,774 ppm, respectivamente, os quais, são valores equivalentes aos encontrados na literatura (MA et al., 2012; QIU et al., 2014; YANG et al., 2016). No espectro do complexo de inclusão, ocorreram algumas mudanças nos deslocamentos químicos da HP- $\beta$ -CD em relação a sua forma livre. Os valores da diferença de deslocamentos químicos ( $\Delta\delta = \delta_{\text{morina/HP-}\beta\text{-CD}} - \delta_{\text{HP-}\beta\text{-CD}}$ ) entre os prótons de HP- $\beta$ -CD na presença e na ausência de morina estão mostrados na tabela 1. De acordo com a tabela 1, podemos perceber que os H-1, H-2 e H-4 apresentaram uma pequena diferença de deslocamento com valores de -0,009; -0,012 e -0,015 ppm, respectivamente. Por outro lado, Os H-3 e H-5 apresentaram um deslocamento relativamente alto com valores de -0,033 e -0,052 ppm, respectivamente. Sabe-se, que os H-2 e H-4 estão localizados na superfície externa da HP- $\beta$ -CD, enquanto que os H-3 e H-5 estão localizados na cavidade interna da ciclodextrina. Dessa forma, a grande alteração nos deslocamentos químicos de H-3 e de H-5 foram provavelmente devido à presença da molécula hóspede (morina) na cavidade da HP- $\beta$ -CD, evidenciando a formação do complexo de inclusão. Além disso, Como o H-3 está próximo do lado largo da cavidade e o H-5 está próximo do lado estreito, sugere-se que a morina seja incorporada na HP- $\beta$ -CD pelo lado estreito da cavidade.

#### 5.4. Eficiência de complexação

A eficiência de complexação (EC), também chamada de eficiência de encapsulação ou incorporação, é um parâmetro quantitativo utilizado para determinar a quantidade do princípio ativo encapsulado na cavidade da CD. A eficiência de carga (ECa) corresponde a quantidade individual do princípio ativo presente em todo complexo de inclusão. Os valores obtidos por esses estudos são expressos em porcentagem. A EC foi de  $98,3 \pm 0,36 \%$  ( $n=3$ ) e a ECa  $17,63 \pm 0,17 \%$  ( $n=3$ ). O valor da EC próximo à 100% demonstra que praticamente toda morina foi encapsulada na cavidade da HP- $\beta$ -CD, sendo assim, o método de obtenção do complexo de inclusão morina/HP- $\beta$ -CD por liofilização é adequado e eficiente, obtendo-se um grande rendimento e grande interação entre as duas moléculas. Além disso, o alto valor da EC pode ser atribuído a estrutura química e propriedades físico-químicas da HP- $\beta$ -CD, a qual, apresenta alta

solubilidade e diâmetro de cavidade interna e externa adequado para a incorporação de moléculas de baixo, médio e alto peso molecular.

A ECa de 17,63% refere-se a quantidade absoluta de morina em todo complexo de inclusão, ou seja, da quantidade de complexo obtida após a secagem por liofilização, 17,63% é de morina. O valor da morina é menor que a HP- $\beta$ -CD, pois o complexo é preparado na razão molar 1:1 em relação ao peso molecular de ambas substâncias. Dessa forma, a quantidade individual de HP- $\beta$ -CD na formulação final será maior. O valor de ECa é geralmente utilizado para “correção de dose” em casos de estudos para a avaliação de uma atividade farmacológica *in vitro* ou *in vivo*.

Carvalho e colaboradores (2017) realizaram um estudo de eficiência de complexação do acetato de hecogenina com a  $\beta$ -CD e obtiveram EC de 92%. Filho e colaboradores (2018) demonstraram que EC da diosmina em  $\beta$ -CD foi de 61,6%. Os autores de ambos os estudos relatam que o alto valor da EC é devido a interação obtida entre o princípio ativo e a CD durante a formação do complexo de inclusão, o que permitiu que grandes quantidades do fármaco fosse complexado (CARVALHO et al., 2017; FILHO et al., 2018).

Huang e colaboradores (2016), Wei e colaboradores (2017 a, b) determinaram a EC e ECa da apigenina, glabridina e floretina em complexos de inclusão com HP- $\beta$ -CD, respectivamente. Os valores de EC desses flavonoides foram 93,2%; 74,3% e 88,1% e de ECa foram 13,9%; 12,9% e 16,8%, respectivamente (HUANG et al., 2016; WEI et al., 2017a; WEI et al., 2017b). Em nosso estudo, os resultados de EC e ECa da morina em complexos com HP- $\beta$ -CD foram maiores. Esses valores podem estar relacionados com o grau de interação entre o flavonoide e a HP- $\beta$ -CD durante a formação do complexo e também com o método utilizado no preparo das formulações. Em nosso caso, utilizou-se o método de liofilização, obtendo-se complexos com alto rendimento, EC, ECa e com grau de interação forte entre o composto ativo e a CD.

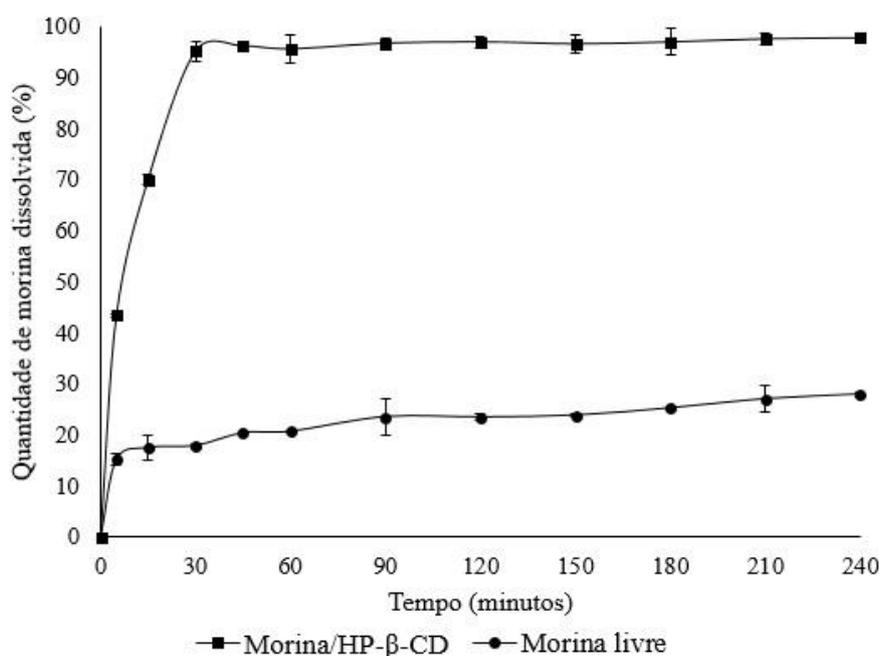
#### 5.4. Estudo de dissolução *in vitro*

O estudo de dissolução *in vitro* determina a quantidade de substância ativa dissolvida no meio de dissolução em determinados intervalos de tempo. Dessa forma, esse ensaio simula a quantidade de fármaco que será liberado/absorvido pelo organismo. Os ensaios de dissolução são essenciais para a garantia da qualidade de formulações sólidas de uso oral, pois permitem avaliar a cinética de liberação e a eficiência da dissolução. A velocidade pela qual este processo

ocorre é um dos fatores que possibilita determinar a liberação do fármaco e a sua absorção pelo organismo (VENTURINI et al., 2008; PIRES; ALMEIDA; MEIRELLES, 2016).

Os perfis de dissolução da morina complexada na HP- $\beta$ -CD e da morina livre estão apresentados na Figura 10. Devido à baixa solubilidade da morina, uma solução aquosa de Tween 80 (0,1%) foi utilizada como meio de dissolução (YAO et al., 2014; WU et al., 2017). A morina livre demonstrou uma taxa de dissolução limitada, uma vez que, somente  $28,01 \pm 0,5\%$  foi dissolvida em 240 minutos. O baixo percentual de dissolução da morina livre pode ser associado a baixa solubilidade dessa molécula, que não estava encapsulada em nenhum sistema de liberação capaz de aumentar a sua solubilidade (PÉREZ-ABRIL et al., 2017).

Figura 10 - Perfis de dissolução da morina complexada com HP- $\beta$ -CD e da morina livre no intervalo de tempo de 0 – 240 minutos.



Os resultados foram expressos de acordo com a média e o desvio padrão (n=3) das análises.

YAO et al., 2014 realizaram um estudo de dissolução da miricetina livre e complexada com HP- $\beta$ -CD utilizando Tween 80 (0,1%) como meio de dissolução. Nesse estudo, os autores relataram que o composto livre apresentou uma dissolução de 75% e o complexado 98% em 240 minutos de experimento (YAO et al., 2014). WU et al., 2017 evidenciaram a formação do complexo de inclusão da apigenina com a HP- $\beta$ -CD e determinaram o perfil de dissolução da apigenina livre e complexada em Tween 80 (0,4%). A apigenina livre apresentou uma taxa de dissolução de 6,01% e a complexada de 74,46% em 24 horas de estudo (WU et al., 2017).

ZHOU et al., 2013 estudaram o perfil de dissolução da baicaleína livre e complexada com HP- $\beta$ -CD em dodecil sulfato de sódio como meio de dissolução e destacaram que a baicaleína livre apresentou dissolução de 20% e a complexada de 95% em 60 minutos de experimento (ZHOU et al., 2013).

Além dos trabalhos citados acima, outros demonstram o perfil de dissolução de flavonoides complexados com CDs, como por exemplo, quercetina, pinostrobin, hesperitina, naringenina e daidzeína. Em todos os trabalhos, os compostos complexados apresentaram maior percentual de dissolução e os autores relatam que o aumento da dissolução do composto em estudo é devido à formação do complexo de inclusão com a CD, a qual, aumenta a solubilidade do fármaco (ZHENG; CHOW, 2009; KICUNTOD et al., 2015; SANGPHEAK et al., 2015; PAN et al., 2017).

Um dos principais objetivos e vantagens do uso de CDs são melhorar a solubilidade de produtos naturais e de fármacos sintéticos. Os resultados obtidos com o ensaio de dissolução *in vitro* demonstram que a HP- $\beta$ -CD foi capaz de aumentar a solubilidade e a velocidade de dissolução da morina. Sendo assim, espera-se que o aumento da solubilidade e dissolução da morina ocorra em modelos *in vivo*, melhorando a biodisponibilidade e conseqüentemente, os efeitos farmacológicos dessa substância (MURA, 2015; JANSOOK; OGAWA; LOFTSSON, 2018).

## 6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos até o presente momento, conclui-se que as análises de caracterização físico-química e morfológica evidenciaram a formação do complexo de inclusão da morina com HP- $\beta$ -CD, preparado pelo método de liofilização na proporção 1:1. Além disso, o estudo de dissolução *in vitro* demonstrou o aumento da solubilidade da morina após a complexação com a HP- $\beta$ -CD. O presente trabalho pretende ainda avaliar a toxicidade, o perfil farmacocinético e a atividade anti-inflamatória para desenvolvimento de um produto farmacêutico contendo morina complexada em HP- $\beta$ -CD para o tratamento de distúrbios dolorosos e inflamatórios. Além disso, devido ao potencial da morina de atuar no sistema cardiovascular, serão realizados estudos *in vivo* do complexo de inclusão da morina com HP- $\beta$ -CD nesse sistema.

## 7. REFERÊNCIAS

- ABARCA, R.L. et al. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing an essential oil component. **Food Chem**, v. 196, 968-975, 2016.
- AL-NUMAIR, K.S. et al. Morin, a flavonoid, on lipid peroxidation and antioxidant status in experimental myocardial ischemic rats. **Tradity Complement Altern Med**, v. 11, p. 14-20, 2014.
- AL-NUMAIR, K.S.; CHANDRAMOHAN, G.; ALSAIF, M.A. Pretreatment with morin, a flavonoid, ameliorates adenosinetriphosphatases and glycoproteins in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. **J Nat Med**, v. 66, p. 95–101, 2012.
- ANNAPOORANI, A. et al. Methods to determine antipathogenic potential of phenolic and flavonoid compounds against urinary pathogen *Serratia marcescens*. **J Microbiol Methods**, v. 91, p. 208-211, 2012b.
- BERNINI, A. et al. NMR studies of the inclusion complex between beta-cyclodextrin and paroxetine. **Eur J Pharm Sci**, v. 22, n. 5, p. 445-450, 2004.
- CARVALHO, Y.M.B.G. et al. Inclusion complex between  $\beta$ -cyclodextrin and hecogenin acetate produces superior analgesic effect in animal models for orofacial pain. **Biomed Pharmacother**, v. 93, p. 754-762, 2017.
- CONZATTI, G. et al. Alginate/ chitosan polyelectrolyte complexes: a comparative study of the influence of the drying step on physicochemical properties. **Carbohyd Polym**, v. 172, 142-151, 2017.
- CORTI, G. et al. Physical-chemical characterization of binary systems of metformin hydrochloride with triacetyl-beta-cyclodextrin. **J Pharm Biomed Anal**, v. 45, n. 3, p. 480-486, 2007.
- CUCOLO, G.R.; ALVEZ-PRADO, H.F.; SILVA, E.G.R. Otimização da Produção de CGTase de *Bacillus SP* Subgrupo alcalophilus E16 em Polvilho Doce em Fermentação submersa. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 9, n.3, p. 201-208, 2006.
- CUNHA-FILHO, M.S.S.; SÁ-BARRETO, L.C.L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v. 28, n. 1, p. 1-9, 2007.
- DAI J, Mumper RJ. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15: 7313–7352, 2010.
- DAVIS, M. E.; BREWSTER, M. E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. **Nature Review Drug Discovery**. London, v. 3, n. 12, p. 1023-1035, Dec. 2004.
- DE JESUS, M. B. et al. Improvement of the oral praziquantel anthelmintic effect by cyclodextrin complexation. **Journal of Drug Targeting**, Yverdon, v. 18, n. 1, p. 21–26, Jan. 2010.
- DE MARTINO, L. et al. In vitro phytotoxicity and antioxidant activity of selected flavonoids. **Int J Mol Sci**, v. 13, n. 5, p. 5406-5419, 2012.
- DEL VALLE, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**, London, v. 39, n. 9, p. 1033-1046, May 2004.
- DEVARAKONDA, B.; HILL, A.R.; LIEBENBERG, W.; BRITS, M.; VILLIERS, M.M. Comparison of the aqueous solubilization of practically insoluble niclosamide by polyamidoamine (PAMAM) dendrimers and cyclodextrins. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 304, p. 193-209, 2005.

- DODZUIK, H. Cyclodextrins and their complexes: chemistry, analytical methods, applications. Weinheim: Wiley & Sons, 2006.
- DORNAS, W. C. et al. Flavonoides: Potential terapeutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 28, n. 3, p. 241–249, 2007.
- DUTRA, R.C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacol Res**, v. 112, p. 4-29, 2016.
- FERNANDES, L.P. et al. Solid state studies on molecular inclusions of Lippia sidoides essential oil obtained by spray drying. **J Therm Anal Calorim**, v. 95, n. 3, p. 855-863, 2009.
- FILHO, L.F.S. et al. Effect of Pulsed Therapeutic Ultrasound and Diosmin on Skeletal Muscle Oxidative Parameters. **Ultrasound Med Biol**, v. 44, n. 2, p. 359-367, 2018.
- FREITAS, A.C. et al. Biological Activities of Libidibia (Caesalpinia) ferrea var. parvifolia (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz Pod Preparations. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2012, p. 1-7, 2012.
- GARRIDO, E.M.P.J. et al. Microencapsulation of caffeic acid phenethyl ester and caffeic acid phenethyl amide by inclusion in hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. **Food Chem**, v. 254, p. 260-265, 2018.
- GILBERT, K. G.; COOKE, D. T. Dyes from plants: past usage, present understanding and potential. *Plant Growth Regulation*, v. 34, p. 57-69, 2001.
- GUIMARÃES, A. G. et al. Encapsulation of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano, with  $\beta$ -cyclodextrin, improves the pharmacological response on cancer pain experimental protocols. **Chem Biol Interact**, v. 227, p. 69-76, 2015.
- HEEBA, G.H.; MAHMOUD, M. E. Therapeutic potential of morin against liverfibrosis in rats: Modulation of oxidative stress, cytokine production and nuclear factor kappa B. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 37, p. 662-671, 2014.
- HU, L. et al. Investigation of inclusion complex of cilnidipine with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. **Carbohydr Polym**, v. 90, n. 4, p. 1719-1724, 2012.
- HUANG, Y. et al. Preparation of inclusion complex of apigenin-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin by using supercritical antisolvent process for dissolution and bioavailability enhancement. **Int J Pharm**, v. 511, n. 2, p. 921-930, 2016.
- HUSSAIN, J. et al. Isolation and bioactivities of the flavonoids morin and morin-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside from *Acridocarpus orientalis*- A wild Arabian medicinal plant. **Molecules**, v. 19, n. 11, p. 17763-17772, 2014.
- HYUN, H.B. et al. The flavonoid morin from Moraceae induces apoptosis by modulation of Bcl-2 family members and Fas receptor in HCT 116 cells. **Int J Oncol**, v. 46, n. 6, p. 2670-2678, 2015.
- JAHED, V. et al. NMR (1H, ROESY) spectroscopic and molecular modelling investigations of supramolecular complex of  $\beta$ -cyclodextrin and curcumin. **Food Chem**, v. 165, p. 241-246, 2014.
- JANSOOK, P.; OGAWA, N.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. **Int J Pharm**, v. 535, n. 1, p. 272-284, 2018.
- KARTHIK, K.V.; VENNILA, S.; NALINI, N. Modifying effects of morin on the development of aberrant crypt foci and bacterial enzymes in experimental colon cancer. **Food Chem Toxicol**, v. 47, n. 2, p. 309-315, 2009.
- KICUNTOD, J. et al. Inclusion complexation of pinostrobin with various cyclodextrin derivatives. **J Mol Graph Model**, v. 63, p. 91-98, 2015.

- KUMAR S, Pandey AK. Review Article Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. **Sci. World J** 4: 32–48, 2013
- LEE, H.S. et al. Morin protects acute liver damage by carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) in rat. **Arch Pharm Res**, v. 31, p. 1160-1165, 2008.
- LI, H.W. et al. Anticancer effects of morin-7-sulphate sodium, a flavonoid derivative, in mouse melanoma cells. **Biomed Pharmacother**, v. 84, p. 909-916, 2016.
- LIMA, P.S.S. et al. Inclusion of terpenes in cyclodextrins: Preparation, characterization and pharmacological approaches. **Carbohydr Polym**, v. 151, p. 965-987, 2016.
- LIU. B. et al. Physicochemical characterisation of the supramolecular structure of luteolin/cyclodextrin inclusion complex. **Food Chem**, v. 141, n. 2, p. 900-906, 2013a.
- LIU. B. et al. Preparation and physicochemical characterization of the supramolecular inclusion complex of naringin dihydrochalcone and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. **Food Res Int**, v. 54, n. 1, p. 691-696, 2013b.
- LOFTSSON, T.; BREWSTER, M. E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: drug solubilization and stabilization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, v. 85, n. 10, p. 1017-1025, Oct. 1996.
- LOFTSSON, T.; DUCHÊNE D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **Int J Pharm**, v. 329, n. 1, p. 1-11, 2007.
- LOFTSSON, T.; MASSON, M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 225, n. 1-2, p. 15-30, Aug. 2001.
- LYRA, M.A.M. et al. Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v. 31, n. 2, p. 117-124, 2010.
- MA, S.X. et al. Alpinetin/hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin host–guest system: Preparation, characterization, inclusion mode, solubilization and stability. **J Pharm Biomed Anal**, v. 67, p. 193-200, 2012.
- MAIER, M. et al. Screening of European medicinal herbs on their tannin content—New potential tanning agents for the leather industry. **Ind Crops Prod**, v. 99, p. 19-26, 2017.
- MARKHAM, K. R. Techniques of flavonoid identification. **New York: Academic Press**, 1982. 113p.
- MENEZES, P.P. et al. Inclusion complex of (-)-linalool and  $\beta$ -cyclodextrin. **J Therm Anal Calorim**, v. 115, p. 2429-2437, 2014.
- MENEZES, P.P. et al. Solid-state  $\beta$ -cyclodextrin complexes containing geraniol. **Thermochim Acta**, v. 548, p. 45-50, 2012.
- MENNINI, N. et al. Physico-chemical characterization in solution and in the solid state of clonazepam complexes with native and chemically-modified cyclodextrins. **J Pharm Biomed Anal**, v. 89, p. 142-149, 2014.
- MURA, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in the solid state: A review. **J Pharm Biomed Anal**, v. 113, p. 226-238, 2015.
- MURA, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 101, p. 238-250, 2014.
- NASO, L.G. et al., Biological evaluation of morin and its new oxovanadium (IV) complex as 4 antioxidant and specific anti-cancer agents. **Chem Biol Interact**, v. 206, n. 2, p. 1-13, 2013.

- NDAGIJIMANA, A. et al. A review on indole alkaloids isolated from *Uncaria rhynchophylla* and their pharmacological studies. **Fitoterapia**, v. 86, p. 35-47, 2013.
- OLIVEIRA, M.G.B. et al.  $\alpha$ -Terpineol, a monoterpene alcohol, complexed with  $\beta$ -cyclodextrin exerts antihyperalgesic effect in animal model for fibromyalgia aided with docking study. **Chem Biol Interact**, v. 254, p. 54-62, 2016.
- PACKER, L.; HIRAMATSU, M.; YOSHIKAWA, T. Antioxidant food supplements in human health. **Orlando: Academic Press, 1999**. 511 p.
- PAN, H. et al. A superior preparation method for daidzein-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin complexes with improved solubility and dissolution: Supercritical fluid process. **Acta Pharm**, v. 67, p. 85-97, 2017.
- PAULI, G. F.; JAKI, B. U.; LANKIN, D. C. Quantitative  $^1\text{H}$  NMR: development and potential of a method for natural products analysis. **J. Nat. Prod.** v. 68, p. 133-149, 2005.
- PÉREZ-ABRIL, M. et al. Systematic investigation and molecular modelling of complexation between several groups of flavonoids and HP- $\beta$ -cyclodextrins. **J Funct Foods**, v. 36, p. 122-131, 2017.
- PIRES, Y.M.S.; ALMEIDA, L.R.; MEIRELLES, L.M.A. Perfil de dissolução do tenoxicam em complexos de inclusão de beta ciclodextrinas. **Electronic Journal of Pharmacy**, v. 13, n. 2, p. 64-70, 2016.
- QIU, N. et al. Inclusion complex of barbigerone with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin: preparation and in vitro evaluation. **Carbohydr Polym**, v. 101, n. 623-630, 2014.
- QUINTANS, J.S.S. et al. Host-guest inclusion complexation of  $\beta$ -cyclodextrin and hecogenin acetate to enhance anti-hyperalgesic effect in an animal model of musculoskeletal pain. **Process Biochem**, v. 59, p. 123-131, 2017.
- RAFFA, D. et al. Recent discoveries of anticancer flavonoids. **Eur J Med Chem**, v. 142, n. 15, p. 213-228, 2017.
- RAJENDIRAN, N.; MOHANDOSS, T.; VENKATESH, G. Investigation of inclusion complexes of sulfamerazine with  $\alpha$ - and  $\beta$ -cyclodextrins: An experimental and theoretical study. **Spectrochim Acta A**, v. 124, p. 441-450, 2014.
- RAKMAI, J. et al. Physico-chemical characterization and evaluation of bio-efficacies of black pepper essential oil encapsulated in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. **Food Hydrocoll**, v. 65, p. 157-164, 2017.
- RAOOV, M.; MOHAMAD, S.; ABAS, M.R. Synthesis and Characterization of  $\beta$ -Cyclodextrin Functionalized Ionic Liquid Polymer as a Macroporous Material for the Removal of Phenols and As(V). **Int J Mol Sci**, v. 15, n. 1, p. 100-119, 2013.
- RIEKES, M. K. et al. Enhanced solubility and dissolution rate of amiodarone by complexation with  $\beta$ -cyclodextrin through different methods. **Mater Sci Eng C**, v. 30, n. 7, p. 1008-1013, 2010.
- SANGPHEAK, W. et al. Physical properties and biological activities of hesperetin and naringenin in complex with methylated  $\beta$ -cyclodextrin. **Beilstein J Org Chem**, v. 11, p. 2763-2773, 2015.
- SHIMMYO, Y. et al. Flavonols and flavones as BACE-1 inhibitors: structure-activity relationship in cell-free, cell-based and in silico studies reveal novel pharmacophore features. **Biochim Biophys Acta**, v. 1780, p. 819-825, 2008.
- SILVA, J.C. et al. Docking, characterization and investigation of  $\beta$ -cyclodextrin complexed with farnesol, an acyclic sesquiterpene alcohol, produces orofacial antinociceptive profile in experimental protocols. **Process Biochem**, v. 62, p. 193-204, 2017.

- SINGH, B. et al. Saponins in pulses and their health promoting activities: A review. **Food Chem**, v. 233, p. 540-549, 2017.
- SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFSC e UFRGS, 2007
- SINGH, M.; SHARMA, R.; BANERJEE, U. C. Biotechnological applications of cyclodextrins. **Biotechnology Advances**, v. 29, 0. 341-359, 2002.
- SIVARAMAKRISHNAN, V.; DEVARAJ, S.N. Morin fosters apoptosis in experimental hepatocellular carcinogenesis model. **Chem Biol Interact**, v. 183, p. 284-292, 2010.
- SIVARAMAKRISHNAN, V.; DEVARAJ, S.N. Morin regulates the expression of NF-kB-p65 COX-2 and matrix metalloproteinases in diethylnitrosamine induced rat hepatocellular carcinoma. **Chem Biol Interact**, v. 180, p. 353-359, 2009.
- SIVARANJANI, M. et al. Morin inhibits biofilm production and reduces the virulence of *Listeria monocytogenes* - An *in vitro* and *in vivo* approach. **Int J Food Microbiol**, v. 237, p. 73-82, 2016.
- SZEJTLI, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. **Chemical Reviews**, Washington, v. 98, n. 5, p. 1743-1753, July 1998.
- TAHARA, S. Biosci., Biotechnol., **Biochem**. 2007, 71, 1387
- TEODORO, G.R. et al. Gallic acid/hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin complex: Improving solubility for application on *in vitro*/*in vivo* *Candida albicans* biofilms. **Plos One**, v. 12, n. 7, p. 181-199, 2017.
- UEKAMA K.; HIRAYAMA, F.; IRIE, T. Cyclodextrin drug carrier system. **Chemical Reviews**, v. 98, p. 2045-2076, 1998
- VANITHA, P. et al. Modulatory effects of morin on hyperglycemia by attenuating the hepatic key enzymes of carbohydrate metabolism and  $\beta$ -cell function in streptozotocin-induced diabetic rats. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 37, n. 1, p. 326-335, 2014.
- VEIGA, F.; PECORELLI, C.; RIBEIRO, L. As ciclodextrinas na tecnologia farmacêutica. **Minerva Coimbra Editora**, 2006.
- VENTURINI, C.G. et al. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Quim Nova**, v. 31, n. 2, p. 360-368, 2008.
- WANG, J. et al. Characterisation of inclusion complex of trans-ferulic acid and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. **Food Chem**, v. 124, p. 1069-1075, 2011.
- WANG, L. et al. Leoligin, the Major Lignan from Edelweiss (*Leontopodium nivale* subsp. *alpinum*), Promotes Cholesterol Efflux from THP-1 Macrophages. **J Nat Prod**, v. 79, n. 6, p. 1651-1657, 2016.
- WEI, Y. et al. Characterization of glabridin/hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex with robust solubility and enhanced bioactivity. **Carbohydr Polym**, v. 159, p. 152-160, 2017a.
- WEI, Y. et al. Molecular model and *in vitro* antioxidant activity of a water-soluble and stable phloretin/hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex. **J Mol Liq**, v. 236, p. 68-75, 2017b.
- WIJERATNE, S.S.K.; ABOU-ZAID, M.M.; SHAHIDI, F. Antioxidant polyphenols in almond and its coproducts. *J. Agric. Food Chem.* 54: 312–318, 2006.
- WU, W. et al. Solubility and dissolution rate improvement of the inclusion complex of apigenin with 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin prepared using the liquid antisolvent precipitation and solvent removal combination methods. **Drug Dev Ind Pharm**, v. 43, n. 8, p. 1366-1377, 2017.
- XIE, M.X. et al. Characterization of the interaction between human serum albumin and morin. **Biochim Biophys Acta**, v. 1760, p. 1184-1191, 2006.

YANG, L.J. et al. Host-guest system of hesperetin and  $\beta$ -cyclodextrin or its derivatives: Preparation, characterization, inclusion mode, solubilization and stability. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v. 59, p. 1016-1024, 2016.

YANG, L.J. et al. Supramolecular system of podophyllotoxin and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin: Characterization, inclusion mode, docking calculation, solubilization, stability and cytotoxic activity. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v. 76, p. 1136-1145, 2017.

YAO, L. H.; JIANG, Y. M.; SHI, J.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; DATTA, N.; SINGANUSONG, R.; CHEN, S. S. Flavonoids in Food and their Health Benefits. *Plant Foods for Human Nutrition*, v. 59, p. 113-122, 2004.

YAO, Y. et al. Development of a myricetin/hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex: Preparation, characterization, and evaluation. **Carbohydr Polym**, v. 110, p. 329-337, 2014.

ZAFAR, N.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Cyclodextrin containing biodegradable particles: From preparation to drug delivery applications. **Int J Pharm**, v. 461, n. 1, p. 351-366, 2014.

ZENG, J. et al. Preparation and physicochemical characteristics of the complex of edaravone with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. **Carbohydr Polym**, v. 83, n. 3, p. 1101-1105, 2011.

ZHANG, J. et al. Biodistribution, hypouricemic efficacy and therapeutic mechanism of morin phospholipid complex loaded self-nanoemulsifying drug delivery systems in an experimental hyperuricemic model in rats. **J Pharm Pharmacol** v. 68, n. 1, p. 14-25, 2016.

ZHENG, Y.; CHOW, A.H. Production and characterization of a spray-dried hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin/quercetin complex. **Drug Dev Ind Pharm**, v. 35, n. 6, p. 727-734, 2009.

ZHOU, Q. et al. Preparation and characterization of inclusion complexes formed between baicalein and cyclodextrins. **Carbohydr Polym**, v. 95, n. 2, p. 733-739, 2013.