

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Quercetina e sua associação à β -ciclodextrina: estudo de características físicas, químicas e biológicas de interesse para permeação cutânea

GREICE STEFANI BORGHETTI

PORTO ALEGRE, 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Quercetina e sua associação à β -ciclodextrina: estudo de características físicas, químicas e biológicas de interesse para permeação cutânea

Tese apresentada por **Greice Stefani Borghetti** para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Valquiria Linck Bassani
Co-orientador: Prof. Dr. José Claudio Fonseca Moreira

PORTO ALEGRE, 2009

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em nível de Doutorado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 28.08.2009 pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Elenara Lemos Senna
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Fábio Klamt
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Nereide Magalhães
Universidade Federal de Pernambuco

B732q Borghetti, Greice Stefani
Quercetina e sua associação à β -ciclodextrina: estudos de características físicas, químicas e biológicas de interesse para permeação cutânea / Greice Stefani Borghetti – Porto Alegre: UFRGS, 2009. – xxviii, 229 p. : il.

Tese (doutorado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Quercetina. 2. β -ciclodextrina. 3. Permeação cutânea. 4. Potencial antioxidante. I. Bassani, Valquíria Linck. II. Moreira, José Claudio Fonseca. III. Título.

CDU: 615.4

Bibliotecária responsável:
Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB 10/480

O presente trabalho foi elaborado na modalidade de transposição direta do nível mestrado para nível doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFRGS. Foi desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento Galênico e na Central Analítica do Programa. Algumas análises e/ou etapas foram realizadas no Laboratório de Difractometria de Raios-X do Instituto de Geociências, no Laboratório de Estresse Oxidativo do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, no Centro de Desenvolvimento Tecnológico Farmacêutico e no Centro Bioanalítico de Medicamentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, na cidade de Porto Alegre; no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear de Alta Resolução do Instituto de Ciências Exatas, da Universidade Federal de Minas Gerais, na cidade de Belo Horizonte; e no Laboratório de Espalhamento Raman do Centro de Ciências, da Universidade Federal do Ceará, na cidade de Fortaleza, que disponibilizaram os equipamentos e materiais necessários para a realização dos experimentos e com financiamento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). A autora recebeu bolsa de estudos do CNPq.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Valquiria Linck Bassani, pela confiança em mim depositada, pela atenção dispensada ao longo deste trabalho e pelas oportunidades oferecidas. És um exemplo profissional e de ética a ser seguido.

Ao Prof. Dr. José Claudio Fonseca Moreira, pela co-orientação deste trabalho.

Ao Laboratório de Desenvolvimento Galênico, é um orgulho poder vestir sua camiseta! Aos colegas, pelas trocas de conhecimento, pela companhia nas madrugadas de experimento e por terem tornado o ambiente de trabalho tão agradável com os momentos de descontração, começando com um cafezinho na bancada do laboratório e se estendendo com uma rodada de cerveja no Ashclin. Foram tantos...mas não poderia deixar de agradecer aos meus queridos amigos, Bárbara Spaniol, Cabral Pavei, Francilene Silva, Iguatinã Costa, Juliana Carini, Maria Paula Peixoto, Renata Longhini e Simone Verza, por terem compartilhado comigo conquistas e dificuldades nesses anos de convivência. É por vocês que me orgulho quanto ao caminho que escolhi!

Aos colegas do Laboratório de Estresse Oxidativo, pela acolhida, em especial à Fernanda Caregnato e ao Ricardo Rocha.

À bolsista de iniciação científica, Mariana Petry, pela dedicação.

Ao colega Liberato Brum Júnior, ao Prof. Dr. Pedro Ros Petrovick, ao Prof. Dr. Paulo Mayorga e ao Prof. Dr. Vitor Pereira, desta Universidade, à Profa. Dra. Ivana Lula e ao Prof. Dr. Ruben Sinisterra, da Universidade Federal de Minas Gerais, e ao Prof. Dr. Alejandro Ayala, da Universidade Federal do Ceará, pela colaboração científica.

À Faculdade de Farmácia e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, desta Universidade, pelos serviços gentilmente prestados pelos funcionários, pelos ensinamentos transmitidos pelo corpo docente e pela infraestrutura física disponibilizada para a realização deste trabalho.

Aos meus orientadores de iniciação científica, Prof. Dr. José Mario Barichello e Profa. Dra. Miriam Knorst, da Universidade de Passo Fundo, com quem descobri os desafios da ciência.

À Ângela, mais do que uma amiga, és minha irmã.

À tia Teca, pelo aconchego familiar nos finais de semana.

Ao meu alicerce: minha família. Meus pais, Luiz e Aurea, pela formação que me propiciaram e pela compreensão nos momentos de ausência. Mãe, obrigada pelo apoio emocional, por não ter me deixado desistir. Meus irmãos, Cibele, Vinicius e Gustavo, pelo amor incondicional. E minhas pitocas, Rafa, Bruna e Duda, por terem tornado a vida da tia tão mais colorida. Amo vocês!

À Deus, que mesmo parecendo ausente em alguns momentos, foram inúmeras as provas de que Ele sempre esteve ao meu lado.

E a todos aqueles que sempre torceram por mim e que, de alguma forma, tornaram possível essa conquista.

Essa vitória é nossa!

“Nunca ande pelo caminho traçado, pois ele conduz somente até onde os outros foram”

Alexandre Graham Bell

RESUMO

“Quercetina e sua associação à β -ciclodextrina: estudo de características físicas, químicas e biológicas de interesse para permeação cutânea”

No primeiro capítulo da tese, três amostras de quercetina, obtidas de diferentes fornecedores, foram caracterizadas no que se refere a suas propriedades físico-químicas e sua estabilidade térmica em estado sólido. As amostras apresentaram reduzida hidrossolubilidade e distinta estrutura cristalina, atribuídas à presença de diferentes quantidades de moléculas de água de hidratação em seus retículos cristalinos. A estabilidade em estado sólido desses hidratos de quercetina foi expressivamente dependente da temperatura. A amostra de quercetina que se mostrou termodinamicamente mais estável foi selecionada para ser empregada nas próximas etapas desse trabalho. No segundo capítulo do trabalho, a quercetina foi complexada com β -ciclodextrina a fim de aumentar a hidrossolubilidade da aglicona. Porém, o complexo sólido que foi preparado em solução e seco por nebulização apresentou uma baixa concentração de quercetina, denotando uma limitada eficiência de complexação. Por outro lado, a obtenção de complexo de inclusão pela simples mistura física entre a quercetina e a β -ciclodextrina (relação molar de 1:1) revelou ser possível e vantajosa, uma vez que nem água nem calor são necessários para formar o complexo sólido quercetina/ β -ciclodextrina. No terceiro capítulo, a estabilidade da quercetina frente à radiação UVA ou UVC, em mistura etanol:água, e a influência dos produtos de degradação sobre o teste de lipoperoxidação foram estudadas. Apesar da quercetina não ter sido estável frente à radiação UVA ou UVC, o flavonóide foi capaz de inibir a lipoperoxidação induzida por ambas radiações. A identificação dos principais produtos de fotodegradação, todos derivados polifenólicos, sugere que os mesmos podem ter contribuído para o efeito biológico. Finalmente, no quarto capítulo, o efeito promotor da β -ciclodextrina e a influência do veículo (hidrogel ou pomada contendo quercetina livre ou sua associação à β -ciclodextrina numa relação molar de 1:1) sobre a permeação cutânea *ex vivo*, bem como sobre o correspondente potencial antioxidante da quercetina, foram investigados. O ensaio de permeação foi avaliado usando células de difusão tipo Franz e pele de orelha de suíno como membrana. A maior concentração de quercetina retida na pele (epiderme e derme) e o maior potencial

antioxidante correspondente foram observados quando a pele foi tratada com a mistura quercetina: β -ciclodextrina incorporada no hidrogel. Esses resultados demonstram, portanto, o uso potencial de um hidrogel de HPMC contendo quercetina associada à β -ciclodextrina para a prevenção e o tratamento de danos cutâneos associados ao estresse oxidativo, especialmente aqueles que ocorrem na camada mais superficial da pele, a epiderme.

PALAVRAS-CHAVE: quercetina, β -ciclodextrina, permeação cutânea, potencial antioxidante

ABSTRACT

“Quercetin and its association to β -cyclodextrin: study of physical, chemical and biological properties of interest for cutaneous permeation”

In the first chapter of the thesis, three samples of quercetin raw materials, purchased from different suppliers, were characterized in order to know their physicochemical properties and thermal stability in solid state. The samples presented low aqueous solubility and distinct crystalline structure, ascribed to the presence of different amounts of hydration water molecules into their crystal lattice. The solid state stability of these quercetin hydrates was highly dependent on the temperature. The quercetin sample that was thermodynamically more stable was selected to be employed in the next steps of this work. In the second chapter of the work, quercetin was complexed with β -cyclodextrin in view to increase the aqueous solubility of the aglicone. However, the solid complex prepared in solution and spray-dried presented low quercetin concentration, denoting limited complexation efficiency. By the other hand, the obtention of inclusion complex by simple physical mixture between quercetin and β -cyclodextrin (molar ratio of 1:1) revealed to be possible and advantageous, since neither water nor heat are necessary to form quercetin/ β -cyclodextrin solid complex. In the third chapter, the stability of quercetin against UVA or UVC radiation, in ethanol:water mixture, and the influence of the degradation products on the lipid peroxidation test were studied. Although quercetin had not been stable against the UVA or UVC radiation, the flavonoid was able to inhibit the lipid peroxidation induced by both radiations. The identification of the main photodegradation products, all of them polyphenol derivatives, suggests that they could have contributed for the biological effect. Finally, in the fourth chapter, the enhancer effect of β -cyclodextrin and the influence of the vehicle (hydrogel or ointment containing free quercetin or its association to β -cyclodextrin at a molar ratio of 1:1) on the *ex vivo* skin permeation as well as on the corresponding antioxidant potential of quercetin were investigated. The permeation assay was evaluated using Franz diffusion cells and pig ear skin as membrane. The highest quercetin concentration retained in skin (epidermis and dermis) and the corresponding antioxidant potential were observed when the skin was treated with the quercetin: β -cyclodextrin mixture incorporated into the hydrogel. These findings demonstrate, therefore, the potential use of a HPMC hydrogel

containing quercetin associated to β -cyclodextrin for the prevention and the treatment of oxidative stress-mediated cutaneous damages, especially those occurring in the most superficial layer of the skin, the epidermis.

KEY-WORDS: quercetin, β -cyclodextrin, cutaneous permeation, antioxidant potential

LISTA DE FIGURAS

Figura 1a Configuração geométrica espacial da β -ciclodextrina	5
Figura 1b Formação de complexo de inclusão entre uma molécula-hóspede e uma molécula de ciclodextrina	6
Figura 1c Diagramas de solubilidade	12
Figura 1d Representação esquemática da difusão de substâncias bioativas através da pele	14
Figura 1e Estrutura da pele	15
Figura 1f Estrutura do estrato córneo e vias de penetração de substâncias	17
Figura 1g Modelo de célula de difusão tipo Franz	22
Figura 1.1 Estrutura química da quercetina	32
Figura 1.2 XRPD analysis of quercetin samples from different suppliers	40
Figura 1.3 Photomicrographs of quercetin samples	40
Figura 1.4 Photomicrographs of quercetin samples	63
Figura 1.5 Fourier Transform-Raman spectra of quercetin samples	64
Figura 1.6 Differential Scanning Calorimetry curves of quercetin samples	65
Figura 1.7 Thermogravimetric curves of quercetin samples	66
Figura 1.8 Room temperature X-ray diffraction patterns of quercetin samples	67
Figura 1.9 Variable temperature X-ray diffraction pattern of quercetin sample QCTa	68
Figura 1.10 Variable temperature X-ray diffraction pattern of quercetin sample QCTb	69
Figura 1.11 Variable temperature X-ray diffraction pattern of quercetin sample QCTc	70
Figura 1.12 Cromatograma de solução metanólica contendo quercetina substância de referência e de solução aquosa liofilizada contendo a amostra de quercetina apresentando grau farmacêutico QCTa	210

Figura 1.13 Espectro de varredura no ultravioleta/visível de solução metanólica contendo quercetina substância de referência	212
Figura 1.14 Espectro de varredura no ultravioleta/visível de solução metanólica contendo a impureza isolada	212
Figura 1.15 Espectro de varredura no ultravioleta/visível de solução metanólica contendo quercetina substância de referência, na presença de cloreto de alumínio e com posterior adição de ácido clorídrico	213
Figura 1.16 Espectro de varredura no ultravioleta/visível de solução metanólica contendo a impureza isolada, na presença de cloreto de alumínio e com posterior adição de ácido clorídrico	213
Figura 1.17 Espectro de varredura no ultravioleta/visível de solução metanólica contendo quercetina substância de referência, na presença de acetato de sódio e com posterior adição de ácido bórico	214
Figura 1.18 Espectro de varredura no ultravioleta/visível de solução metanólica contendo a impureza isolada, na presença de acetato de sódio e com posterior adição de ácido bórico	214
Figura 1.19 Espectro de varredura no ultravioleta/visível de solução metanólica contendo quercetina substância de referência, na ausência ou presença de metóxido de sódio	215
Figura 1.20 Espectro de varredura no ultravioleta/visível de solução metanólica contendo a impureza isolada, na ausência ou presença de metóxido de sódio	215
Figura 1.21 Espectro de massa de solução contendo quercetina substância de referência e de solução contendo amostra de quercetina grau farmacêutico QCTa	217
Figura 1.22 Espectros de infravermelho das amostras de quercetina apresentando grau farmacêutico, de diferentes procedências	221
Figura 2.1 Quercetin: chemical structure	86
Figura 2.2 Phase-solubility diagrams of quercetin/ β -cyclodextrin complexes obtained using a 2^3 factorial design	88
Figura 2.3 Phase-solubility diagram of quercetin/ β -cyclodextrin complex	88
Figura 2.4 Differential scanning calorimetry curves of β -cyclodextrin, quercetin, physical mixture of quercetin with β -cyclodextrin, quercetin/ β -cyclodextrin solid complex	89

Figura 2.5 ^1H NMR spectra of quercetin, stored physical mixture of quercetin with β -cyclodextrin, fresh physical mixture of quercetin with β -cyclodextrin	90
Figura 2.6 2D-ROESY spectrum of stored physical mixture of quercetin with β -cyclodextrin	90
Figura 2.7 Photomicrographs obtained by scanning electron microscopy of β -cyclodextrin, quercetin, physical mixture of quercetin with β -cyclodextrin, quercetin/ β -cyclodextrin solid complex	91
Figura 2.8 Estrutura química da quercetina, hidroxipropilmetilcelulose, β -ciclodextrina, hidroxipropil- β -ciclodextrina	96
Figura 2.9 Representação esquemática da metodologia empregada na preparação das amostras	97
Figura 2.10 Diagrama de solubilidade das amostras de quercetina em presença de β -ciclodextrina	98
Figura 2.11 Espectro de varredura no ultravioleta da quercetina	99
Figura 2.12 Diagrama de solubilidade da quercetina em presença de β -ciclodextrina ou hidroxipropil- β -ciclodextrina, na ausência ou presença de hidroxipropilmetilcelulose	99
Figura 3.1 Lipid peroxidation in egg yolk dispersions as a function of the exposure period to UVA or UVC radiation	131
Figura 3.2 Inhibition of the lipid peroxidation induced by exposure of egg yolk dispersions to UVA or UVC radiation as a function of the quercetin concentration	132
Figura 3.3 LC profiles of ethanol/water solutions containing quercetin: before irradiation, after exposure to UVA radiation, after exposure to UVC radiation	133
Figura 3.4 Chemical structures of the main degradation products formed by exposure of ethanol/water solutions containing quercetin to UVA or UVC radiation	134
Figura 3.5 Espectros de infravermelho da quercetina, da β -ciclodextrina, do complexo quercetina/ β -ciclodextrina em estado sólido obtido por meio da secagem por nebulização de complexos preparados em meio líquido e do complexo quercetina/ β -ciclodextrina em estado sólido obtido por simples mistura entre as duas substâncias	225

Figura 4.1 Cutaneous retention of quercetin in the epidermis or in the dermis after the application of the formulations on the skin surface	171
Figura 4.2 TRAP of quercetin in the epidermis or in the dermis after the application of the formulations on the skin surface	172
Figura 4.3 TAR index of quercetin in the epidermis or in the dermis after the application of the formulations on the skin surface	173
Figura 4.4 Potencial antioxidante reativo total da quercetina na epiderme ou na derme após a aplicação das formulações sobre a superfície da pele	229

LISTA DE TABELAS

Tabela 1a Propriedades físico-químicas das principais ciclodextrinas naturais	8
Tabela 1b Variações de espessura da epiderme entre humanos e diferentes espécies de roedores	21
Tabela 1.1 Relatos da caracterização físico-química, termo-analítica e espectroscópica da quercetina na literatura	34
Tabela 1.2 Main diffraction peaks of quercetin hydrates and their new crystalline forms observed by variable temperature X-ray diffraction analysis	71
Tabela 2.1 Relatos da formação de complexos quercetina/ciclodextrina na literatura	80
Tabela 2.2 Results obtained using the 2 ³ factorial design (ANOVA)	87
Tabela 2.3 Influência da associação da β -ciclodextrina a diferentes polimorfos de quercetina, sobre a hidrossolubilidade do flavonol	98
Tabela 2.4 Influência da associação de quercetina com ciclodextrinas, na ausência ou presença de hidroxipropilmetilcelulose, sobre a hidrossolubilidade do flavonol	99
Tabela 3.1 Relatos da estabilidade da quercetina em meio aquoso na literatura	109
Tabela 3.2 Data of degradation kinetic of quercetin by exposure to UVA or UVC radiation	135
Tabela 3.3 LC/DAD and MS/MS data of the main degradation products formed by exposure of quercetin to UVA or UVC radiation	136
Tabela 4.1 Relatos de difusão pela quercetina através de membranas na literatura	145
Tabela 4.2 Quercetin concentration found in each skin layer, epidermis or dermis, and in the acceptor phase of the diffusion cells after the application of the formulations on the skin surface	174

LISTA DE ABREVIATURAS

AC = análise colorimétrica

α CD = alfa-ciclodextrina

β CD = beta-ciclodextrina

BET = adsorção de nitrogênio (técnica de Brunauer-Emmett-Teller)

BG = butilenoglicol

CCD = cromatografia em camada delgada

CD = células de difusão

CLAE/DAD = cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de fotodiodos

CLAE-MS/MS = cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massa

CLAE/UV = cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta

DC = espectroscopia de dicroísmo circular

DMF = dimetilformamida

DRX (VT) = difratometria de raios-X (com variação de temperatura)

DSC = calorimetria exploratória diferencial

DTA = análise térmica diferencial

EC = estrato córneo

EV/D = epiderme viável/derme

G = glicerina

GC = cromatografia gasosa

γ CD = gama-ciclodextrina

HP β CD = hidróxi-propil-beta-ciclodextrina

HPMC = hidróxi-propilmetil-celulose (hipromelose)

IV-TF = espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

Ks = constante de estabilidade aparente do complexo

LE = lecitina

LIM = limoneno

M β CD = maltosil-beta-ciclodextrina

MEV = microscopia eletrônica de varredura

MF = mistura física

MI = miristato de isopropila

NC = suspensão de nanocápsulas

O/A = octanol/água

PEG = polietilenoglicol

PG = propilenoglicol

PT = pré-tratamento

Q = quantidade

QCT = quercetina

QCT⁻ = quercetina na forma ionizada (ânion)

RMN-H1 = espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio

SBE β CD = sulfo-butil-éter-beta-ciclodextrina

TA = temperatura ambiente

TAR = reatividade antioxidante total

TBARS = espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

TG = termogravimetria

TRAP = potencial antioxidante reativo total

UV (/VIS) = espectrofotometria no ultravioleta (/visível)

UVA/UVB/UVC = ultravioleta A/B/C

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS	xix
APRESENTAÇÃO	xxiii
OBJETIVO GERAL	1
REVISÃO DE LITERATURA	3
1. Ciclodextrinas	5
2. Permeação cutânea	15
CAPÍTULO 1. Caracterização físico-química, termo-analítica e espectroscópica de amostras de quercetina de diferentes procedências	27
Introdução	29
Objetivos específicos	35
<i>Publicação 1.</i> Characterization of different samples of quercetin in solid-state: indication of polymorphism occurrence	37
<i>Publicação 2.</i> Physicochemical characterization and thermal stability of quercetin hydrates	43
CAPÍTULO 2. Quercetina/ciclodextrina/polímero hidrofílico: preparação e caracterização de sistemas binários e ternários	75
Introdução	77
Objetivos específicos	81
<i>Publicação 3.</i> Quercetin/ β -Cyclodextrin Solid Complexes Prepared in Aqueous Solution Followed by Spray-drying or by Physical Mixture	83
<i>Publicação 4.</i> Influência de Ciclodextrinas e Polímero Hidrofílico sobre a Hidrossolubilidade de Diferentes Formas Polimórficas de Quercetina	93

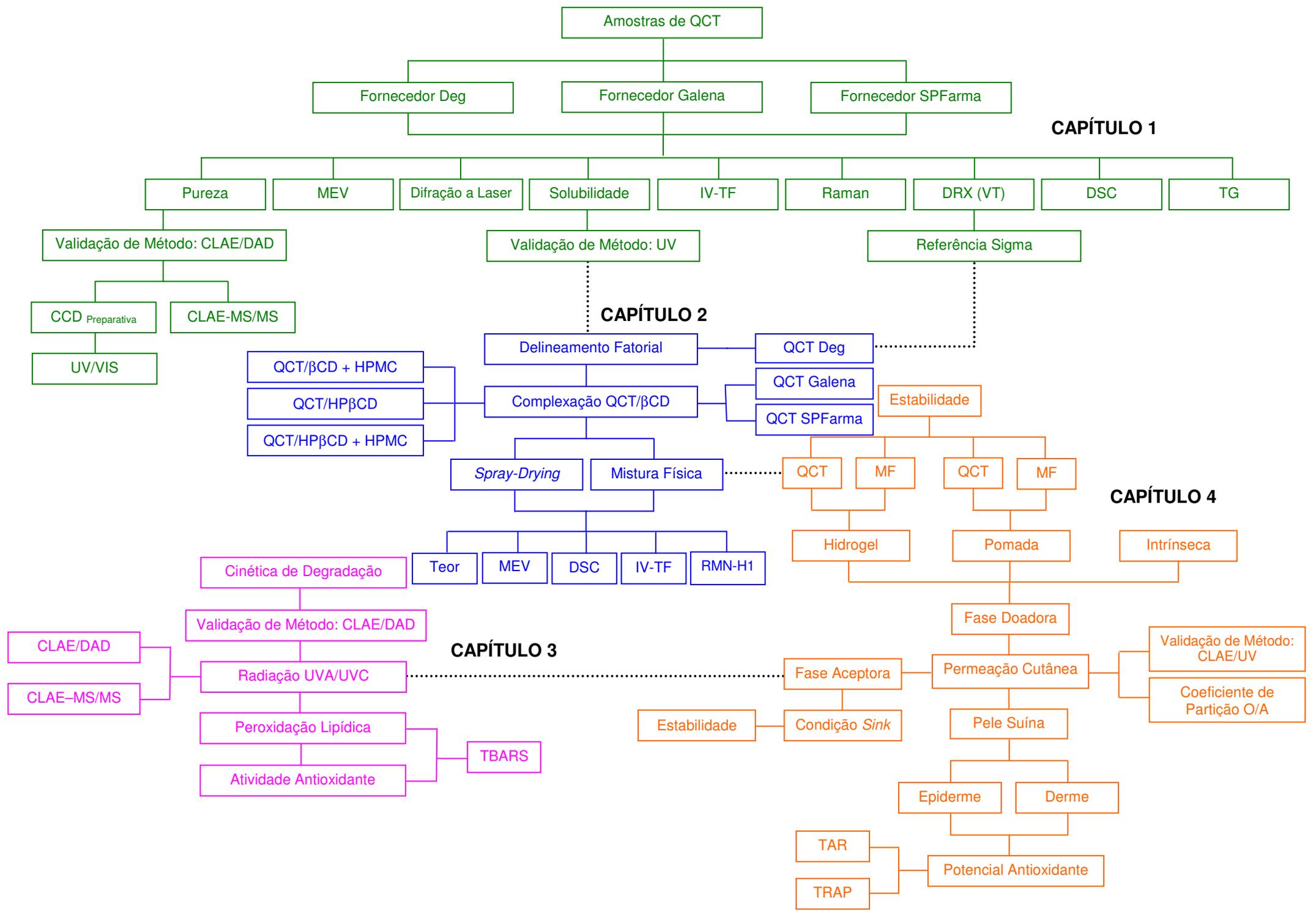
CAPÍTULO 3. Avaliação da fotoestabilidade da quercetina em meio aquoso e sua influência sobre a atividade antioxidante <i>in vitro</i> da aglicona	103
Introdução	105
Objetivos específicos	113
<i>Publicação 5. Stability of quercetin against ultraviolet radiation: influence of the degradation products on the lipid peroxidation test</i>	115
CAPÍTULO 4. Avaliação ex vivo da permeação e do potencial antioxidante cutâneo de formulações contendo quercetina ou a mistura física quercetina/β-ciclodextrina	139
Introdução	141
Objetivos específicos	147
<i>Publicação 6. Association of quercetin with β-cyclodextrin: ex vivo skin permeation and antioxidant potential studies</i>	149
DISCUSSÃO GERAL	177
CONCLUSÕES	187
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	193
ANEXOS	207

APRESENTAÇÃO

De acordo com as normas vigentes no Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, a presente tese foi redigida na forma de capítulos. Assim, este exemplar encontra-se organizado da seguinte forma:

- ✓ Objetivo geral;
- ✓ Revisão de literatura;
- ✓ Capítulos 1 a 4: introdução, objetivos específicos e artigos publicados ou submetidos a periódicos científicos;
- ✓ Discussão geral;
- ✓ Conclusões;
- ✓ Referências bibliográficas;
- ✓ Anexos

O esquema apresentado a seguir sumariza o conteúdo e as etapas experimentais contidos nos quatro capítulos da presente tese.



O **CAPÍTULO 1**, intitulado “Caracterização físico-química, termo-analítica e espectroscópica de amostras de quercetina de diferentes procedências”, é dedicado à caracterização de quatro amostras de quercetina, de diferentes procedências (três apresentando grau farmacêutico - Deg, Galena, SPFarma - e uma substância de referência - Sigma), quanto às suas propriedades:

✓ *físico-químicas*, no que se refere à hidrossolubilidade intrínseca; *físicas*, no que se refere ao tamanho e à forma das partículas (utilizando difração a laser e microscopia eletrônica de varredura); *químicas*, no que se refere à pureza (utilizando cromatografia em camada delgada, espectrofotometria no ultravioleta/visível, cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de fotodiodos e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massa);

✓ *termo-analíticas*, utilizando difratometria de raios-X com variação de temperatura, calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria;

✓ *espectroscópicas*, utilizando espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier e espectroscopia por espalhamento Raman

O **CAPÍTULO 2**, intitulado “Quercetina/ciclodextrina/polímero hidrofílico: preparação e caracterização de sistemas binários e ternários”, contempla as seguintes etapas:

- ✓ Desenvolvimento e validação de método analítico por espectrofotometria no ultravioleta para a quantificação de quercetina em estudos de associação com ciclodextrina e/ou polímero hidrofílico;
- ✓ Avaliação da influência das condições operacionais envolvidas na preparação, em meio líquido, de complexos quercetina/ β -ciclodextrina sobre a hidrossolubilidade da aglicona, utilizando delineamento fatorial;
- ✓ Determinação da relação molar quercetina: β -ciclodextrina a ser utilizada para a obtenção de associações (complexo em estado sólido, obtido por meio da secagem por nebulização de complexo preparado em meio líquido, e mistura física), utilizando diagrama de solubilidade;
- ✓ Obtenção de complexo quercetina/ β -ciclodextrina, em estado sólido, por meio da secagem por nebulização de complexo preparado em meio líquido;
- ✓ Avaliação da possibilidade de obtenção de complexo quercetina/ β -ciclodextrina, em estado sólido, por simples mistura física entre as duas substâncias;
- ✓ Caracterização das associações quercetina/ β -ciclodextrina quanto ao teor do flavonóide, bem como utilizando espectroscopia no infravermelho, calorimetria exploratória diferencial, microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de ressonância magnética nuclear;
- ✓ Comparação do efeito da complexação da β -ciclodextrina natural ao de um derivado mais solúvel, hidróxi-propil- β -ciclodextrina, na ausência ou presença de um polímero hidrofílico, hipromelose, sobre a hidrossolubilidade da aglicona;
- ✓ Comparação do efeito da complexação de três amostras de quercetina apresentando grau farmacêutico, de diferentes procedências - Deg, Galena, SPFarma, com β -ciclodextrina sobre a hidrossolubilidade das mesmas

O **CAPÍTULO 3**, intitulado “Avaliação da fotoestabilidade da quercetina em meio aquoso e sua influência sobre a atividade antioxidante *in vitro* da aglicona”, contempla as seguintes etapas:

- ✓ Avaliação do efeito do período de exposição de dispersão de gema de ovo à radiação UVA ou UVC sobre a indução da peroxidação lipídica, utilizando técnica que se baseia na medida de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico;
- ✓ Avaliação do efeito da concentração de quercetina, dissolvida em etanol:água (1:1), sobre a inibição da peroxidação lipídica;
- ✓ Desenvolvimento e validação de método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de fotodiodos para quantificação de quercetina em estudos de fotoestabilidade;
- ✓ Avaliação da estabilidade da quercetina, dissolvida em etanol:água (1:1), frente à radiação UVA ou UVC;
- ✓ Determinação da cinética de degradação da quercetina;
- ✓ Identificação dos produtos de degradação da quercetina, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de fotodiodos e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massa

O **CAPÍTULO 4**, intitulado “Avaliação *ex vivo* da permeação e do potencial antioxidante cutâneo de formulações contendo quercetina ou a mistura física quercetina/ β -ciclodextrina”, contempla as seguintes etapas:

- ✓ Desenvolvimento e validação de método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta para quantificação de quercetina no estudo de permeação cutânea;
- ✓ Determinação do coeficiente de partição octanol/água com vistas na avaliação do potencial de penetração cutânea da quercetina;
- ✓ Preparação de formulações (hidrogel e pomada) contendo quercetina, sob a forma livre ou de mistura física com β -ciclodextrina, e avaliação da estabilidade;
- ✓ Determinação da solubilidade da quercetina na solução aceptora (etanol:água 1:1) e avaliação da estabilidade;
- ✓ Avaliação da permeação cutânea intrínseca da quercetina, por meio da aplicação do flavonóide dissolvido em depósito volátil (acetona) sobre pele de orelha de suíno, utilizando células de difusão tipo Franz;
- ✓ Investigação da influência da base das formulações e do efeito promotor da β -ciclodextrina sobre:
 - a penetração cutânea da quercetina, por meio da avaliação da concentração do flavonóide retida em cada camada da pele (epiderme e derme);
 - o potencial antioxidante da quercetina, por meio da avaliação do potencial antioxidante reativo total (TRAP) e da reatividade antioxidante total (TAR) do flavonóide em cada camada da pele (epiderme e derme)

OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente trabalho consiste em estudar características físicas, químicas e biológicas de interesse para a permeação cutânea da quercetina e sua associação à β -ciclodextrina.

Os objetivos específicos estão apresentados em cada capítulo.

REVISÃO DE LITERATURA

1. CICLODEXTRINAS

Complexação de substâncias bioativas com ciclodextrinas

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos produzidos a partir da degradação do amido pela ação da enzima ciclodextrina-glicosiltransferase (BIWER *et al.*, 2002).

As ciclodextrinas apresentam a forma de um cone ao qual os grupos hidroxila primários encontram-se ligados na porção externa mais estreita, enquanto os grupos hidroxila secundários estão localizados na porção externa mais larga (Figura 1a). A orientação desses grupamentos define uma estrutura que se caracteriza por uma superfície externa hidrofílica, que confere a hidrossolubilidade da molécula, e uma cavidade interna hidrofóbica, formada por esqueletos de carbono e oxigênios etéreos (DEL VALLE, 2004).

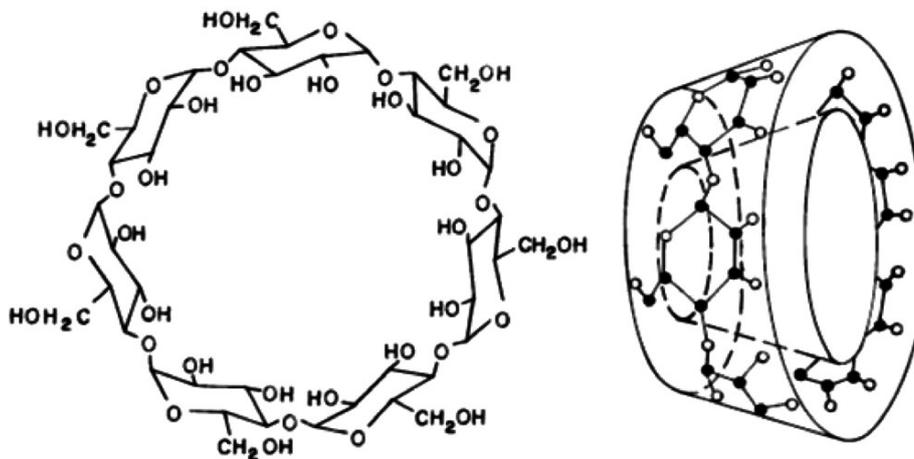


Figura 1a. Configuração geométrica espacial da β -ciclodextrina (CAL; CENTKOWSKA, 2008).

Em solução aquosa, a cavidade das ciclodextrinas é ocupada por moléculas de água de elevada entalpia e, portanto, seu deslocamento é termodinamicamente favorecido. Um estado de menor energia, portanto mais estável, é alcançado quando as moléculas de água são substituídas por moléculas-hóspedes que possuem maior afinidade pela cavidade hidrofóbica das ciclodextrinas do que pelo meio aquoso (PEREIRA *et al.*, 2007).

Para que ocorra a formação de complexos de inclusão, além da natureza lipofílica da molécula-hóspede, é necessário que a dimensão e a configuração espacial da mesma seja compatível com a cavidade da ciclodextrina. Da mesma forma, o estado não-ionizado de ambas moléculas ou a ionização das mesmas com cargas contrárias é importante para conferir maior estabilidade aos complexos (CHALLA *et al.*, 2005).

A complexação é um fenômeno estequiométrico molecular em que, geralmente, uma molécula-hóspede interage com uma molécula de ciclodextrina (Figura 1b). No entanto, para moléculas-hóspedes de baixa massa molecular, pode ocorrer a inclusão de mais de uma molécula na cavidade da ciclodextrina, assim como, para moléculas-hóspedes de alta massa molecular, a interação pode ocorrer com mais de uma molécula de ciclodextrina (DEL VALLE, 2004).

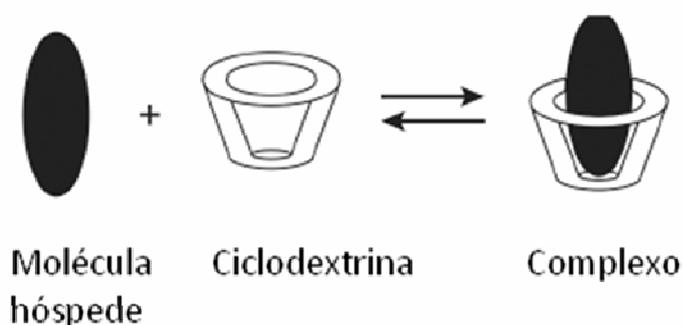


Figura 1b. Formação de complexo de inclusão entre uma molécula-hóspede e uma molécula de ciclodextrina (STELLA; HE, 2008).

As interações estabelecidas entre as ciclodextrinas e as moléculas-hóspedes durante a formação de complexos de inclusão não são do tipo covalentes e, por isso, as moléculas livres encontram-se em equilíbrio dinâmico com as moléculas complexadas. Dentre as principais interações estão ligações de hidrogênio, forças de Van der Waals e interações hidrofóbicas (DEL VALLE, 2004). A magnitude da interação estabelecida é representada pela constante de estabilidade aparente do complexo e tem influência significativa sobre a velocidade e extensão de liberação da molécula-hóspede da cavidade da ciclodextrina (STELLA *et al.*, 1999).

A liberação da molécula-hóspede da cavidade da ciclodextrina, por sua vez, pode ocorrer a partir dos seguintes mecanismos: diluição, deslocamento competitivo,

ligação a proteínas plasmáticas, transferência a tecidos por meio da extração de componentes lipofílicos das membranas biológicas, eliminação por meio de filtração renal e variações de pH e temperatura (STELLA *et al.*, 1999; STELLA; HE, 2008).

A preparação de complexos de inclusão entre moléculas-hóspedes e ciclodextrinas pode ser realizada em meio líquido (solução aquosa, co-precipitação, co-evaporação, pasta fluida ou *slurry* e camada delgada), semi-sólido (em pasta, também conhecida por *kneading*, *damp mixing and heating* e extrusão) ou sólido (mistura seca, comumente denominada mistura física). A seleção da técnica a ser utilizada está relacionada com as propriedades da substância de interesse a ser complexada, bem como com os objetivos propostos para a formulação (DEL VALLE, 2004; MILLER *et al.*, 2007).

Os complexos de inclusão entre moléculas-hóspedes e ciclodextrinas, por sua vez, podem ser caracterizados utilizando diversas técnicas, destacando-se estudos de solubilidade, difratometria de raios-X, técnicas espectroscópicas (espectroscopia no infravermelho, espectroscopia de ressonância magnética nuclear, espectroscopia de dicroísmo circular), técnicas de análise térmica (calorimetria exploratória diferencial, análise térmica diferencial, termogravimetria) e microscopia eletrônica de varredura (MILLER *et al.*, 2007).

A formação de complexos em que a molécula-hóspede não esteja inclusa na cavidade, a formação de agregados além da capacidade de formação e a estabilização de soluções supersaturadas também têm sido apontadas como formas de solubilização de substâncias lipofílicas pelas ciclodextrinas (BREWSTER; LOFTSSON, 2007).

Ciclodextrinas naturais

Dentre as ciclodextrinas naturais destacam-se a α -, a β - e a γ -ciclodextrina, constituídas, respectivamente, por 6, 7 e 8 unidades de glicose unidas por ligações do tipo α -(1,4) (SZEJTLI, 1998). A tabela 1a apresenta algumas propriedades físico-químicas das principais ciclodextrinas naturais.

Tabela 1a. Propriedades físico-químicas das principais ciclodextrinas naturais*.

Propriedade	Ciclodextrina natural		
	α	β	γ
Fórmula molecular	$C_{36}H_{60}O_{30}$	$C_{42}H_{70}O_{35}$	$C_{48}H_{80}O_{40}$
Massa molecular ($g \cdot mol^{-1}$)	972	1135	1297
Diâmetro da cavidade (Å)	4,7 - 5,3	6,0 - 6,5	7,5 - 8,3
Volume da cavidade em 1 mol de ciclodextrina (mL)	104	157	256
Altura do cone (Å)	7,9	7,9	7,9
Hidrossolubilidade (% , 25 °C)	14,5	1,85	23,2
pKa	12,33	12,20	12,08

* adaptada de SZEJTLI (1998)

A α -ciclodextrina é usada, principalmente, em formulações destinadas à via parenteral. Entretanto, por apresentar uma cavidade de diâmetro reduzido, é capaz de formar complexos de inclusão apenas com moléculas relativamente pequenas (DEL VALLE, 2004).

A γ -ciclodextrina, por outro lado, apresenta uma cavidade de diâmetro elevado e, por isso, é capaz de formar complexos de inclusão apenas com moléculas relativamente grandes. É usada principalmente em formulações destinadas à via parenteral. Seu alto custo, entretanto, tem limitado a sua aplicação (DEL VALLE, 2004).

A β -ciclodextrina, por sua vez, é amplamente utilizada pois apresenta baixo custo e, por apresentar uma cavidade de diâmetro intermediário, é capaz de formar complexos de inclusão com várias moléculas, como anéis aromáticos e heterocíclicos. É usada principalmente em formulações destinadas à via oral, especialmente sob a forma de comprimidos. Por não ser metabolizada pelas enzimas intestinais, sua absorção é mínima, o que explica a ausência de toxicidade quando administrada por via oral. Porém, quando administrada por via parenteral, produz efeitos hemolíticos e nefrotóxicos. Outra limitação da β -ciclodextrina refere-se à limitada solubilidade em água, a qual resulta da sua estrutura cristalina, bem como da formação de ligações de hidrogênio intramoleculares entre os grupos hidroxila secundários dos carbonos C2 e C3 de unidades de glicose consecutivas (SZEJTLI, 1998).

A limitada solubilidade em água e o potencial hemolítico e nefrotóxico da β -ciclodextrina, quando administrada por via parenteral, têm limitado o seu campo de aplicação, o que levou à síntese de derivados mais solúveis e menos tóxicos.

A substituição dos grupos hidroxila secundários por outros grupamentos químicos, além de levar à amorfização da estrutura da β -ciclodextrina, também promove o rompimento de suas ligações de hidrogênio intramoleculares. O grau de substituição molar, ou seja, o número de grupos hidroxila substituídos em cada unidade de glicose, bem como a posição dos grupamentos substituintes, influenciam as propriedades físico-químicas dos derivados de β -ciclodextrina (LOFTSSON; DUCHÊNE, 2007).

Os derivados de β -ciclodextrina são classificados em hidrofílicos, hidrofóbicos e ionizáveis. Os derivados hidrofílicos compreendem as ciclodextrinas metiladas, como a metil- β -ciclodextrina, hidróxi-alquiladas, como a hidróxi-propil- β -ciclodextrina, e ramificadas, como a glucoronil-glicosil- β -ciclodextrina. Os derivados hidrofóbicos, por sua vez, são utilizados principalmente na modulação da liberação de substâncias hidrofílicas e compreendem as ciclodextrinas etiladas e aciladas. Por fim, os derivados ionizáveis são subdivididos em aniônicos, como a sulfobutiléter- β -ciclodextrina e a carbóxi-metiletil- β -ciclodextrina, que são capazes de formar complexos de inclusão com moléculas de natureza básica, e catiônicos, como a hidróxi-propiltrimetilamônio- β -ciclodextrina, capaz de formar complexos de inclusão com moléculas de natureza ácida (UEKAMA, 2004).

Aplicações das ciclodextrinas

A capacidade de formar complexos de inclusão sem alterar a estrutura química e as propriedades biológicas de substâncias de interesse tem atraído a aplicação das ciclodextrinas como adjuvantes no campo farmacêutico. Além de substâncias bioativas, sua complexação com peptídeos, proteínas e oligonucleotídeos também tem sido relatada. Diversos produtos contendo ciclodextrinas já se encontram disponíveis no mercado (BREWSTER; LOFTSSON, 2007) para aplicação sob as mais diversas vias de administração: oral, bucal, sublingual, intravenosa, intramuscular, ocular, nasal, cutânea e retal.

As ciclodextrinas também são amplamente empregadas em biotecnologia, em cromatografia, no meio ambiente e nas indústrias cosmética e alimentícia.

Dentre as aplicações das ciclodextrinas, em geral, destacam-se (SINGH *et al.*, 2002; UEKAMA, 2002; DEL VALLE, 2004; UEKAMA, 2004; VENTURINI *et al.*, 2008):

- ✓ solubilização de substâncias lipofílicas em veículos aquosos;
- ✓ isolamento físico de substâncias incompatíveis;
- ✓ estabilização química, frente à oxidação pela luz, calor ou oxigênio, e enzimática;
- ✓ modulação da liberação de substâncias;
- ✓ vetorização a sítios específicos como, por exemplo, liberação gênica e colônica;
- ✓ alívio da irritação da pele e da mucosa gástrica;
- ✓ promoção da difusão através de membranas biológicas como pele, mucosas e córnea;
- ✓ solubilização de substratos lipofílicos e detoxificação de meios de fermentação;
- ✓ catálise de reações químicas;
- ✓ separação de isômeros e enantiômeros;
- ✓ remoção de contaminantes do solo, da água e da atmosfera;
- ✓ remoção de colesterol de produtos de origem animal;
- ✓ mascaramento de sabores e odores desagradáveis;
- ✓ controle da volatilização de flavorizantes, em alimentos, e fragrâncias, em perfumes

Solubilização de substâncias lipofílicas em veículos aquosos

O principal interesse farmacêutico no uso das ciclodextrinas está na solubilização de substâncias lipofílicas, destacando-se a formação de complexos de inclusão hidrossolúveis. Esses complexos são considerados verdadeiros carreadores e, por isso, quando inseridos em veículos aquosos, há a referência de maior biodisponibilidade da substância de interesse (LOFTSSON *et al.*, 2005; BREWSTER; LOFTSSON, 2007).

Entretanto, a eficácia da complexação é freqüentemente baixa. Por isso, quantidades relativamente altas de ciclodextrinas são necessárias para solubilizar pequenas quantidades da substância de interesse no veículo aquoso. Além do aumento de custo e do potencial tóxico, o uso de ciclodextrinas em excesso também pode deslocar o equilíbrio da reação para a forma complexada, de tal forma a resultar na redução da biodisponibilidade da substância. Considerando-se, ainda, a elevada massa molecular das ciclodextrinas (entre 1000 e 1500 g.mol⁻¹), o uso em quantidades altas pode limitar a sua incorporação em formulações (LOFTSSON *et al.*, 2005).

A medida da eficácia da complexação pode ser realizada por meio da determinação do incremento da solubilidade aparente da substância complexada e/ou da constante de estabilidade aparente do complexo substância/ciclodextrina (LOFTSSON *et al.*, 2005). Esses dois parâmetros são obtidos por meio da construção de diagramas de solubilidade, conforme ilustrado na figura 1c.

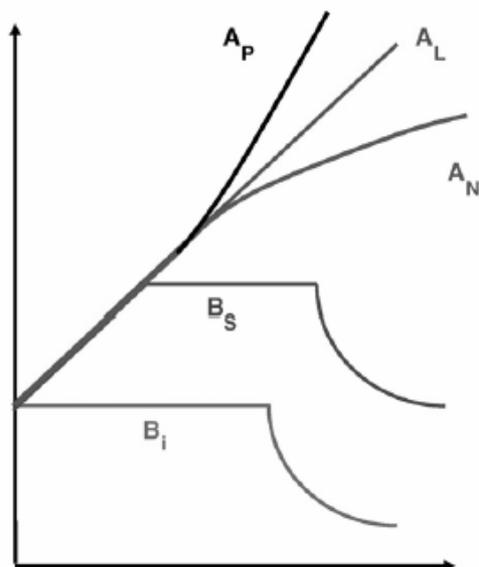


Figura 1c. Diagramas de solubilidade (HIGUCHI; CONNORS, 1965).

Os diagramas de solubilidade podem dar origem a dois tipos de isotermas: a isoterma tipo A, que indica a formação de complexos solúveis, e a isoterma tipo B, que indica a formação de complexos com solubilidade limitada. Essas isotermas, por sua vez, podem ser de diferentes tipos: A_L , A_P , A_N , B_S e B_I . No tipo A_L , observa-se um constante incremento linear de solubilidade da substância complexada em função do aumento da concentração da ciclodextrina. No tipo A_P , observa-se inicialmente um incremento linear de solubilidade da substância complexada, seguido de um desvio positivo que reflete a formação de complexos de maior ordem molecular. Na medida em que a concentração de ciclodextrina aumenta, mais de uma molécula de ciclodextrina é complexada com uma molécula da substância. No tipo A_N , observa-se inicialmente um incremento linear de solubilidade da substância complexada seguido de um desvio negativo na medida em que a concentração de ciclodextrina aumenta, que indica o aparecimento de interações soluto/soluto e/ou soluto/solvente. No tipo B_S , observa-se inicialmente um incremento linear de solubilidade da substância complexada, seguido de um platô e posterior diminuição de solubilidade da substância em altas concentrações de ciclodextrina, que reflete a formação de complexos pouco solúveis. No tipo B_I , não se observa incremento de solubilidade da substância complexada. Inicialmente há um platô seguido de

diminuição de solubilidade da substância em altas concentrações de ciclodextrina, que indica a formação de complexos insolúveis (HIGUCHI; CONNORS, 1965).

Várias estratégias vêm sendo empregadas na tentativa de aumentar a eficácia da complexação. A principal delas é a formação de sistemas ternários entre a substância de interesse, a ciclodextrina e um terceiro componente que pode ser um polímero hidrofílico, um íon metálico, um ácido ou uma base orgânica (LOFTSSON, 1998; REDENTI *et al.*, 2000).

Promoção da penetração de substâncias bioativas na pele

O emprego de ciclodextrinas como promotores de penetração cutânea de substâncias bioativas está relacionado à sua capacidade de extração de constituintes do estrato córneo, como lipídios intercelulares e/ou proteínas intracelulares, formando complexos. A desorganização da estrutura bilamelar do estrato córneo promove sua fluidização, diminuindo a função barreira. Neste caso, a ciclodextrina pode ser simplesmente incorporada à formulação sem prévia complexação com a substância de interesse (CAL; CENTKOWSKA, 2008).

A extração de constituintes do estrato córneo parece estar relacionada ao potencial efeito irritante cutâneo das ciclodextrinas, especialmente quando empregadas em altas concentrações (CAL; CENTKOWSKA, 2008).

As ciclodextrinas também são capazes de aumentar a disponibilidade tópica de substâncias lipofílicas, por meio da formação de complexos de inclusão, uma vez que a dissolução é um pré-requisito para a penetração cutânea. Esta característica deve-se ao fato das ciclodextrinas atuarem como verdadeiros carreadores, liberando as moléculas da substância complexada para a superfície cutânea e, assim, disponibilizando-as para difundir através da pele. Além disso, a possibilidade de incorporação de uma maior concentração da substância de interesse no veículo, por meio da complexação com ciclodextrinas, resulta no aumento da atividade termodinâmica da substância, promovendo sua partição para a superfície cutânea (LOFTSSON *et al.*, 2007).

Por apresentarem uma elevada massa molecular e uma superfície externa hidrofílica, a penetração cutânea das ciclodextrinas e de seus complexos é dificultada. Portanto, para que a substância complexada possa penetrar a pele é necessária a dissociação prévia do complexo (CAL; CENTKOWSKA, 2008), conforme ilustrado na figura 1d.

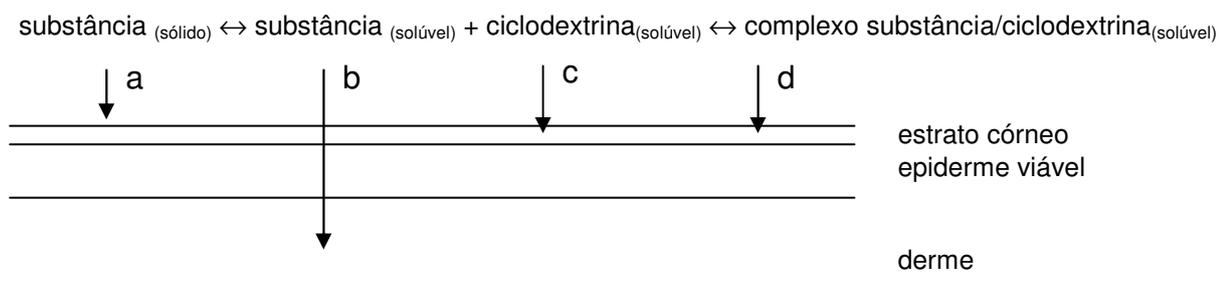


Figura 1d. Representação esquemática da difusão de substâncias bioativas através da pele: a) ausência de penetração; b) permeação; c) e d) mínima penetração.

Ainda, para se alcançar o efeito desejável das ciclodextrinas, é importante a escolha de um veículo adequado. Em emulsões, por exemplo, pode ocorrer uma competição entre a substância bioativa e os componentes lipofílicos do veículo pelo espaço na cavidade da ciclodextrina (DUCHÊNE *et al.*, 2003).

2. PERMEÇÃO CUTÂNEA

Anatomia e fisiologia da pele

A pele é o maior órgão do corpo humano. É dividida em três camadas: epiderme (subdividida em estrato córneo e epiderme viável), derme e hipoderme (WALTERS; ROBERTS, 2002). A estrutura da pele é ilustrada na figura 1e.

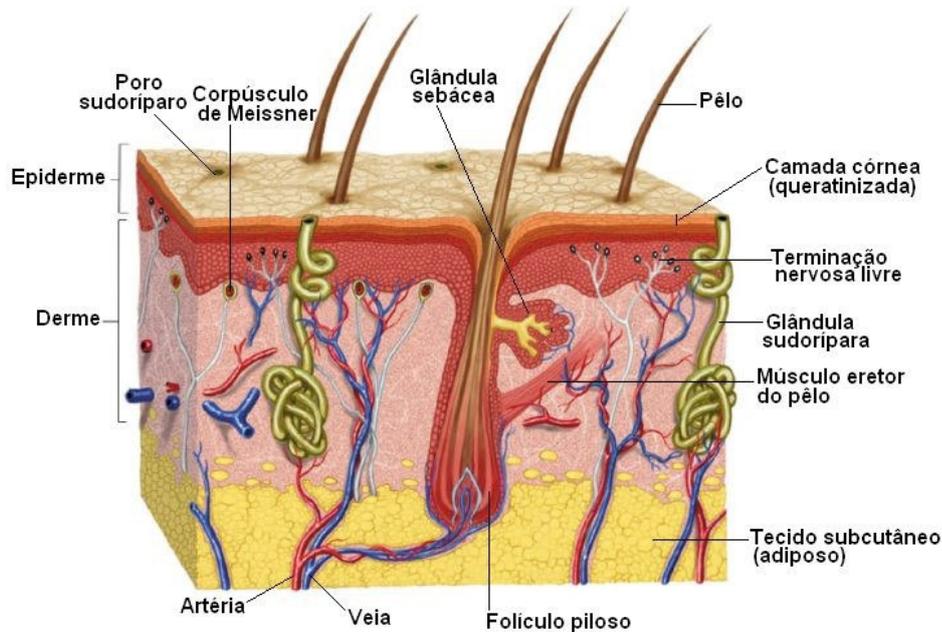


Figura 1e. Estrutura da pele (A Pele e o Sentido do Tato, 2009).

O estrato córneo, a camada mais externa da epiderme, possui 10 a 20 μm de espessura. É constituído por 15 a 25 camadas de células mortas, anucleadas e ricas em queratina, chamadas corneócitos, que se encontram interligadas por meio de desmossomas. Os espaços intercelulares são preenchidos por lipídios (ácidos graxos livres, ceramidas, colesterol) que se encontram organizados em bicamadas. O estrato córneo, devido à sua natureza impermeável, atua como uma barreira que protege o organismo contra a entrada de agentes externos, como substâncias químicas e microorganismos, e a perda de água por evaporação.

A epiderme viável, por sua vez, é subdividida em outras três camadas: granulosa (mais externa), espinhosa (intermediária) e basal (mais interna). É constituída por queratinócitos em diferentes estágios de diferenciação celular, melanócitos (envolvidos com a produção do pigmento melanina), células de

Langerhans (envolvidas com a resposta imune) e células de Merkel (envolvidas com a percepção sensorial).

A derme, ou tecido conectivo, possui 1 a 5 mm de espessura e é constituída por células (fibroblastos) e proteínas fibrosas (colágeno, elastina) envolvidas por uma matriz mucopolissacarídica. Também fazem parte da derme vasos sanguíneos e linfáticos, terminações nervosas e anexos cutâneos (folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas). É uma camada altamente vascularizada, atuando como um sistema *sink* envolvido com a regulação da temperatura do organismo, o fornecimento de nutrientes para a pele, a remoção de produtos de metabolização e a absorção de substâncias.

A hipoderme, ou tecido subcutâneo, é constituída por tecido conjuntivo frouxo preenchido por células adiposas que atuam como reserva energética e na proteção do organismo contra choques mecânicos.

Vias de penetração de substâncias através da pele

A figura 1f ilustra as duas possíveis vias de penetração de substâncias através do estrato córneo: a via transepidérmica e a via que utiliza os anexos cutâneos (MOSER *et al.*, 2001).

A via transepidérmica é classificada em via transcelular (ou intracelular) e via intercelular. No primeiro caso, a penetração de substâncias ocorre através dos corneócitos e, no segundo, entre os mesmos. Substâncias polares atravessam o estrato córneo preferencialmente pela via transcelular, enquanto substâncias lipofílicas o fazem principalmente pela via intercelular.

Os anexos cutâneos, por sua vez, compreendem os folículos pilosos, as glândulas sebáceas e sudoríparas. Representam uma fração desprezível da superfície cutânea, ocupando apenas 0,1 % da área total da pele, não se configurando numa via significativa para a penetração para a maioria das substâncias. Entretanto, essa via parece contribuir para a penetração cutânea de eletrólitos e moléculas polares grandes.

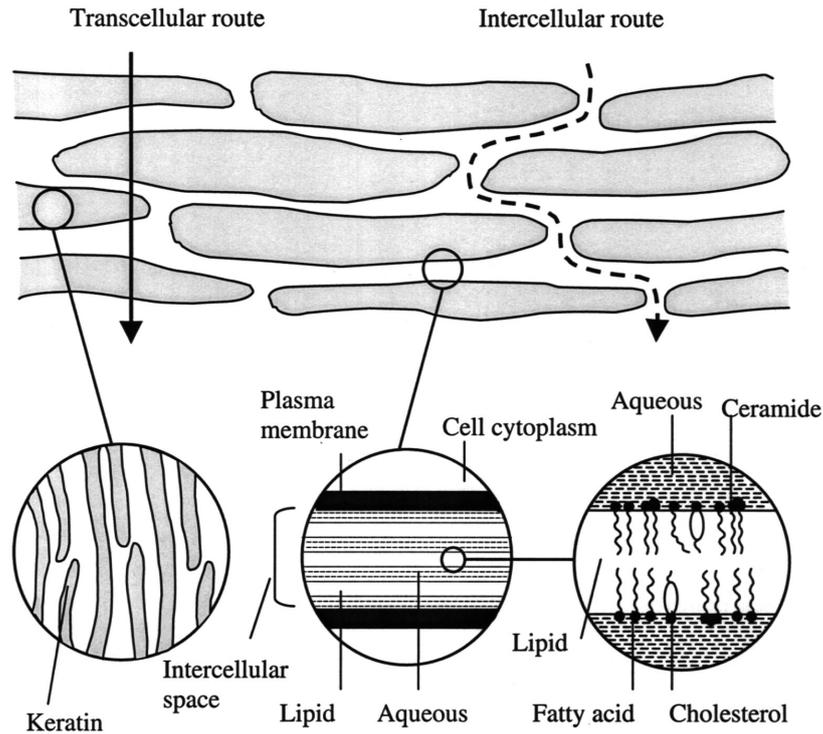


Figura 1f. Estrutura do estrato córneo e vias de penetração de substâncias (MOSER *et al.*, 2001).

A pele como via de administração de substâncias

O desenvolvimento de formulações destinadas ao uso tópico, tanto para fins cosméticos como terapêuticos, tem suscitado interesse crescente no campo farmacêutico nos últimos anos, pois constitui uma boa alternativa às vias convencionais de administração (oral e parenteral), quer direcionada para uma ação local, quer para uma ação sistêmica. Por tratar-se de uma via não-invasiva e de fácil acesso, a aplicação cutânea possui boa aceitação pelos usuários. Além disso, previne distúrbios gastrintestinais, evita o metabolismo de primeira passagem e diminui os riscos de toxicidade, restringindo os efeitos aos tecidos desejados (BARRY, 2005).

Entretanto, a eficácia de uma substância aplicada topicamente depende não só de suas propriedades biológicas, mas também da sua capacidade de penetrar a pele e alcançar o sítio de ação numa concentração em que é ativa. O sítio de ação pode ser o estrato córneo (emolientes, queratolíticos) ou uma das camadas mais profundas da pele, a derme ou a epiderme (antiinflamatórios, anestésicos,

antioxidantes). Neste caso, o processo é ainda mais complexo, pois depende da partição da substância do veículo para a superfície da pele e da sua partição e difusão no estrato córneo, na epiderme viável e, finalmente, na derme. No caso de filtros solares, por outro lado, a penetração cutânea não é desejável, devendo permanecer sobre a superfície da pele (BARRY, 2005).

O grau e a extensão com que o processo de difusão cutânea ocorre são controlados por diversos fatores, sobretudo pelas propriedades físico-químicas da substância bioativa, pelas características do veículo e pelas condições da pele na qual é aplicada.

Dentre as propriedades físico-químicas relacionadas à substância bioativa estão a massa molecular, a solubilidade, o grau de ionização e o coeficiente de partição octanol/água ($\log K$) (HADGRAFT, 2004). Substâncias que apresentam baixa massa molecular (inferior a 600 Da), que se encontram na forma dissolvida e não-ionizada e que, ao mesmo tempo, apresentam equilíbrio hidrofílico/lipofílico ($\log K$ entre 1 e 3) têm sua penetração favorecida através do estrato córneo. Para penetrar o estrato córneo, as substâncias têm que difundir através de domínios hidrofílicos e lipofílicos e, por isso, precisam apresentar uma solubilidade óleo/água adequada. Uma estratégia bastante empregada para substâncias que apresentam baixo coeficiente de partição é o desenvolvimento de pró-fármacos. Na epiderme viável, o pró-fármaco é metabolizado por enzimas que o convertem em uma espécie ativa (YAMASHITA; HASHIDA, 2003). A superfície da pele possui um pH que varia de 4 a 5, tolerando variações entre 4 e 7 (HADGRAFT, 2001).

O emprego de veículos com características apropriadas também é de grande relevância, visto que interações entre a substância e o veículo no qual encontra-se incorporada podem afetar suas características de liberação (HADGRAFT, 1999).

No que tange às condições da pele, deve-se ressaltar que a difusão de substâncias através da pele danificada ou acometida por um processo patológico é maior do que pela pele íntegra ou saudável. Ao mesmo tempo, a pele hidratada é, em geral, mais penetrável do que a pele ressecada. A hidratação da pele promove o intumescimento da estrutura compacta do estrato córneo, diminuindo sua função barreira. Um maior grau de hidratação pode ser obtido por meio da aplicação de

filmes oclusivos, como pomadas e adesivos transdérmicos, pois previnem a perda de água por evaporação (BARRY, 2005).

Promoção da penetração de substâncias através da pele

A impermeabilidade do estrato córneo constitui a principal limitação para o emprego de substâncias destinadas à aplicação tópica (HADGRAFT, 2001; MOSER *et al.*, 2001).

Segundo a primeira lei de *Fick*, o transporte de substâncias através da pele é controlado por um processo de difusão passiva e pode ser descrito pelo esquema 1a (MOSER *et al.*, 2001).

$$J = \frac{D_b \times C_{sb}}{L} \times \frac{C_v}{C_{sv}}$$

(Esquema 1a)

onde:

J = fluxo (massa de substância transportada por unidade de área e tempo);

D_b = coeficiente de difusão da substância na membrana;

C_{sb} = solubilidade da substância na membrana;

L = espessura da membrana;

C_v = concentração da substância dissolvida no veículo;

C_{sv} = solubilidade da substância no veículo

A força condutora para a difusão de uma substância através de uma membrana é o gradiente de concentração entre os dois lados da interface. Sendo assim, a difusão ocorre do lado de maior concentração para o lado de menor concentração, até que se estabeleça o equilíbrio dinâmico em ambos lados.

De acordo com a primeira lei de *Fick*, o incremento do fluxo pode ser obtido tanto pelo aumento do coeficiente de difusão como pelo aumento da solubilidade da substância na membrana. Da mesma forma, o fluxo pode ser incrementado tanto

pelo aumento da concentração como pela diminuição da solubilidade da substância no veículo.

O aumento do coeficiente de difusão ou o aumento da solubilidade da substância na membrana pode ser obtido por meio do uso de promotores de penetração, uma das estratégias mais empregadas atualmente no sentido de maximizar a penetração de substâncias através da pele. Estes podem atuar por um ou mais mecanismos: interação com os lipídios intercelulares do estrato córneo, interação com a queratina dos corneócitos e/ou modificação das propriedades solventes do estrato córneo. Dentre a vasta gama de promotores de penetração relatada na literatura, destacam-se o dimetilsulfóxido, a azona, a uréia, o miristato de isopropila, ciclodextrinas, ácidos graxos (ácido oléico), tensoativos (lauril sulfato de sódio), glicóis (propilenoglicol, polietilenoglicol), álcoois (etanol) e terpenos (HADGRAFT, 2001; MOSER *et al.*, 2001).

O aumento da concentração ou a diminuição da solubilidade da substância no veículo, por sua vez, resulta num maior grau de saturação da substância no veículo e, conseqüentemente, numa maior atividade termodinâmica, promovendo sua partição para a superfície cutânea. Condições cuja atividade termodinâmica é máxima são obtidas por meio do uso de soluções saturadas. O uso de sistemas supersaturados, por outro lado, é limitado, pois são termodinamicamente instáveis, havendo o risco de cristalização da substância ao longo do tempo (HADGRAFT, 2001; MOSER *et al.*, 2001).

Ensaio *in vitro* e *ex vivo* de penetração/permeação/absorção cutânea

Os ensaios *in vitro* e *ex vivo* de penetração, permeação e/ou absorção cutânea são, em geral, utilizados na investigação do comportamento difusional de substâncias através da pele, no desenvolvimento de formulações destinadas à aplicação tópica e na avaliação do potencial tóxico das mesmas.

Para isso, alguns parâmetros relevantes precisam ser considerados, como o modelo de membrana e de célula de difusão a serem empregados.

Modelo de membrana

As membranas podem ser de origem humana, animal ou sintética (GODIN; TOUITOU, 2007).

A disponibilidade de pele humana para a realização de ensaios é limitada, podendo ser obtida de cirurgias estéticas, amputações ou autópsias. Além disso, o uso de pele humana envolve questões éticas, o que torna o emprego de pele animal uma opção amplamente empregada em estudos preliminares. Outras alternativas são o uso de tecidos obtidos a partir de cultura de células humanas ou de sistemas lamelares que mimetizam os lipídios intercelulares do estrato córneo. Esses modelos, entretanto, além do elevado custo, não são tão complexos quanto à pele humana (os anexos cutâneos, por exemplo, encontram-se ausentes), o que limita o extrapolação dos resultados para situações clínicas.

As fontes de pele animal são suínos, roedores (rato, camundongo, porquinho-da-índia), cobras, cães, macacos e coelhos. O modelo de pele animal mais empregado é a pele suína, pois é facilmente obtida em frigoríficos e suas propriedades bioquímicas e histológicas são as que mais se assemelham à pele humana. Dentre as espécies de roedores, a pele de rato é a mais semelhante à pele humana. A pele de camundongo, por ser mais fina, em geral é mais permeável (tabela 1b). O uso de pele de ratos e camundongos sem pêlos (*hairless*) é preferível, pois não há necessidade de remoção de pêlos, diminuindo o risco de dano ao tecido cutâneo.

Tabela 1b. Variações de espessura da epiderme entre humanos e diferentes espécies de roedores*.

Pele	Humana	Rato	Camundongo
Espessura do estrato córneo (μm)	17	18	9
Espessura da epiderme viável (μm)	47	32	29

* adaptada de GODIN e TOUITOU (2007)

A permeabilidade da pele varia de acordo com a idade e o sítio de aplicação. A pele de adultos, por exemplo, em geral é menos permeável que a pele de jovens e idosos, da mesma forma que a pele da palma das mãos e da planta dos pés, onde o

estrato córneo é mais espesso e ocorre ausência de folículos pilosos nem glândulas sebáceas. Podem, ainda, ocorrer variações interpessoais e inter-espécies na espessura e na composição lipídica do estrato córneo, bem como na quantidade de anexos cutâneos, o que limitam a comparação do comportamento difusional de uma substância entre os diferentes modelos de membrana.

As membranas sintéticas, ou artificiais, face à ausência de interferência da espessura, são empregadas principalmente em estudos de triagem. As mais utilizadas são as de polimetilsiloxano e as de acetato de celulose.

Modelo de célula de difusão

Diferentes modelos de células de difusão são relatados na literatura. Entretanto, o princípio de funcionamento é o mesmo. As mais utilizadas são as células de difusão tipo Franz (HADGRAFT; LANE, 2005). O modelo empregado no presente trabalho é ilustrado na figura 1g.

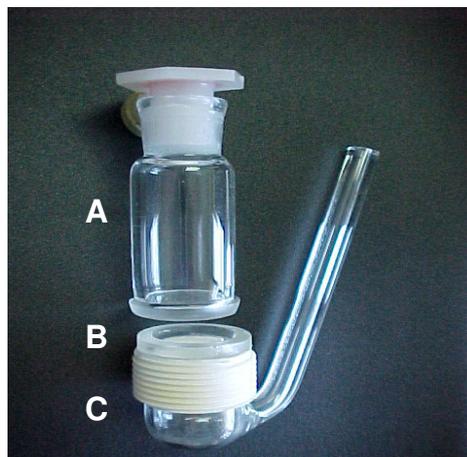


Figura 1g. Modelo de célula de difusão tipo Franz. A. compartimento doador, B. membrana, C. compartimento receptor.

No compartimento doador (A), uma formulação contendo a substância de interesse é aplicada sobre uma membrana (B) que serve como interface com o compartimento receptor (C), no qual uma solução sob condições *sink* é mantida sob agitação constante, simulando a circulação sanguínea. A formulação pode ser um sólido dissolvido em solvente volátil, um líquido, um semi-sólido ou um filme. A membrana, por sua vez, pode ser pele humana ou animal dissecada ou uma

membrana sintética. Esse sistema é mantido sob temperatura controlada (32 ou 37 °C) por um determinado período de tempo e, ao final do ensaio, a substância é quantificada na solução acceptora, no estrato córneo, nas camadas mais profundas da pele (epiderme e derme) e/ou na pele total.

A determinação da concentração da substância de interesse na solução acceptora, em função do tempo, é realizada especialmente para sistemas transdérmicos. A análise dos resultados permite a determinação de parâmetros cinéticos importantes, como fluxo ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$), tempo de latência (h), coeficiente de difusão ($\text{cm}^2\cdot\text{h}^{-1}$) e quantidade total permeada (μg) (MOSER *et al.*, 2001). O fluxo, que corresponde à inclinação da porção linear da curva, e o tempo de latência, que representa o tempo necessário para a substância alcançar o estado estacionário de difusão e corresponde à projeção da interseção da reta com o eixo da abscissa são determinados graficamente, plotando-se a quantidade cumulativa de substância permeada por unidade de superfície em função do tempo. O coeficiente de difusão (D), que representa a velocidade de difusão da substância através da pele, é determinado a partir do esquema 1b.

$$D = \frac{h^2}{6 \times T_L}$$

(Esquema 1b)

onde:

h = espessura da pele (cm)

T_L = tempo de latência (h)

A determinação da concentração da substância de interesse no estrato córneo é, em geral, realizada pela técnica conhecida por *tape-stripping*, que consiste na remoção do estrato córneo com o auxílio de fitas adesivas.

A separação das camadas mais profundas da pele, epiderme e derme, é geralmente realizada com o auxílio de micrótomo, por meio de imersão em água a 60 °C por um curto período de tempo (aproximadamente 1 min) ou em solução de tripsina. A quantificação da substância retida em cada uma das camadas pode ser posteriormente realizada por extração da mesma com um solvente adequado. Outra

técnica bastante empregada é a microdiálise, através da qual sondas são inseridas na derme e perfundidas com solução tampão. As moléculas da substância passam do fluido extracelular para o interior da sonda por meio de poros e, então, é coletada e analisada.

A quantificação da substância de interesse na pele total é geralmente realizada por meio de extração com solvente. Outra alternativa é a determinação da diferença entre a quantidade inicial de substância aplicada e a quantidade final de substância remanescente sobre a superfície da pele. A principal limitação dessa técnica é o fato do veículo poder sofrer modificações em virtude da evaporação ou diluição com suor ou água transepidérmica, e não simplesmente pela partição da substância na pele.

A avaliação da localização da substância penetrante, em diferentes profundidades, pode ser realizada por meio de análise histológica de secções de pele obtidas em micrótomo utilizando microscopia confocal, para substâncias fluorescentes, ou microscopia de força atômica. Para substâncias radiomarcadas é bastante relatado o uso de cintilografia.

Uma revisão detalhada a respeito das técnicas descritas acima, empregadas para a determinação da concentração e da localização de substâncias penetrantes na pele, é descrita por TOUITOU e colaboradores (1998) e SCHNETZ e FARTASCH (2001).

CAPÍTULO 1. Caracterização físico-química, termo-analítica e espectroscópica de amostras de quercetina de diferentes procedências

INTRODUÇÃO



A quercetina (3,3',4',5,7-pentahidróxi-flavona) é uma substância natural pertencente aos flavonóides, uma das classes mais importantes de compostos naturais biologicamente ativos e amplamente distribuída no reino vegetal. É um dos componentes encontrado frequentemente em plantas medicinais e produtos derivados como, por exemplo, soluções extrativas hidroetanólicas de sumidades floridas de *Achyrocline satureioides*, espécie popularmente conhecida como marcela, utilizada pela população na região meridional da América do Sul e, principalmente, no Rio Grande do Sul (BETTEGA *et al.*, 2004; POLYDORO *et al.*, 2004; DE SOUZA *et al.*, 2007).

A quercetina é um dos flavonóides mais abundantes na alimentação humana, estando presente em bebidas, como o vinho tinto e o chá verde, em frutas, como a maçã, e em vegetais, como a cebola. A sua presença em bebidas e alimentos comuns à dieta pressupõe seu consumo diário pela população. Entretanto, isso não garante que o efeito biológico desejado à saúde humana seja alcançado, face à concentração variável ingerida e às limitações de absorção atribuídas a esta molécula por via oral (MUROTA; TERAQ, 2003).

Em vegetais, assim como em bebidas e alimentos, a quercetina encontra-se geralmente na forma de glicosídeo (quercitrina, rutina, dentre outros) (HARWOOD *et al.*, 2007). No mercado, é disponível tanto na forma de heterosídeo como de aglicona.

O emprego da quercetina no desenvolvimento tecnológico de formas farmacêuticas tem sido foco de estudo no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas desta Universidade (VINADÉ, 1995; WEBBER, 2003; COSTA, 2005; DE MORAES, 2007; FASOLO, 2007; WEISS-ANGELI, 2007; DE MARCO, em andamento).

A molécula da quercetina é constituída por um anel benzeno condensado a um anel pirano, o qual possui um anel fenila ligado à posição 2 (Figura 1.1).

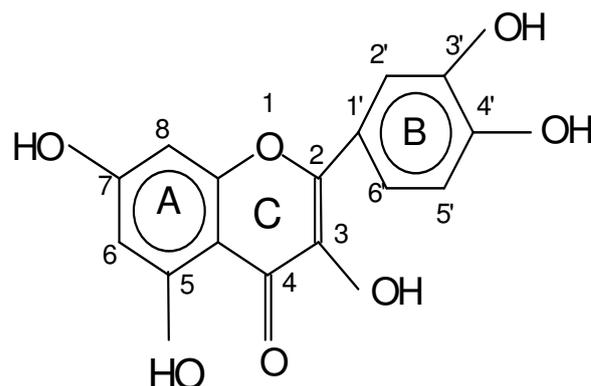


Figura 1.1. Estrutura química da quercetina.

A quercetina apresenta massa molecular de $302,24 \text{ g.mol}^{-1}$, na forma anidra ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$), e $338,24 \text{ g.mol}^{-1}$, na forma diidratada ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

Em análise por espectrofotometria no ultravioleta, a quercetina apresenta duas bandas de absorção máxima, localizadas em 258 e 375 nm, correspondentes, respectivamente, aos anéis A e B da molécula (MABRY *et al.*, 1970).

A quercetina apresenta três valores de constante de dissociação, sendo o pKa_1 igual a 7,7; o pKa_2 igual a 8,7 e o pKa_3 igual a 9,8; correspondentes, respectivamente, à desprotonação das hidroxilas em C3, C4' e C7 da molécula (KUNTIĆ *et al.*, 2003; MILANE *et al.*, 2004).

A atividade antioxidante da quercetina está fortemente relacionada à estrutura da molécula, sendo atribuída à presença das hidroxilas livres em posição *orto* em C3' e C4' (grupo catecol) no anel B, da ligação dupla entre C2 e C3 em conjugação com a carbonila em C4 e das hidroxilas livres em C3, no anel C, e em C5 e C7, no anel A (BOOTS *et al.*, 2008).

Diversos estudos descrevem as características físico-químicas, termo-analíticas e espectroscópicas da quercetina, os quais estão sumarizados na tabela 1.1. A existência de cristais de quercetina nas formas anidra e diidratada, bem como a influência do grau de hidratação do retículo cristalino sobre a configuração molecular do flavonóide é relatada por OLEJNICZAK e POTRZEBOWSKI (2004).

A importância da estrutura e da configuração molecular do flavonóide para as suas propriedades farmacotécnicas e biológicas representa a principal motivação

para o estudo de amostras de quercetina de diferentes procedências, em especial no que se refere a sua estabilidade térmica em estado sólido, fato ainda não investigado na literatura. Este estudo constitui o capítulo 1 da presente tese.

Tabela 1.1. Relatos da caracterização físico-química, termo-analítica e espectroscópica da quercetina na literatura.

Análise	Referência
Calorimetria Exploratória Diferencial / Termogravimetria	✓ ZHOU e colaboradores (2001)
	✓ DA COSTA e colaboradores (2002)
	✓ OLEJNICZAK e POTRZEBOWSKI (2004)
	✓ KOONTZ e colaboradores (2009)
	✓ ZHENG e CHOW (2009)
Difratometria de Raios-X	✓ OLEJNICZAK e POTRZEBOWSKI (2004)
	✓ PRALHAD e RAJENDRAKUMAR (2004)
	✓ KALE e colaboradores (2006)
	✓ SRI e colaboradores (2007)
	✓ WU e colaboradores (2008)
	✓ SCALIA e MEZZENA (2009)
Espectroscopia no Infravermelho	✓ ZHENG e CHOW (2009)
	✓ ZHOU e colaboradores (2001)
	✓ DE SOUZA e DE GIOVANI (2005)
	✓ FERRER e colaboradores (2006)
Espectroscopia por Espalhamento Raman	✓ BUKHARI e colaboradores (2009)
	✓ CORNARD e colaboradores (2005)
	✓ TESLOVA e colaboradores (2007)
Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	✓ ZHOU e colaboradores (2001)
	✓ OLEJNICZAK e POTRZEBOWSKI (2004)
	✓ DE SOUZA e DE GIOVANI (2005)
	✓ BUKHARI e colaboradores (2009)
Espectrometria de Massa	✓ BUCHNER e colaboradores (2006)
	✓ ZHOU e SADIK (2008)
Coeficiente de Partição Octanol/Água ($\log P$)	✓ ROTHWELL e colaboradores (2005)
Hidrossolubilidade	✓ AZUMA e colaboradores (2002)
	✓ LAURO e colaboradores (2002)
	✓ SAIJA e colaboradores (2003)
	✓ MONTENEGRO e colaboradores (2007)

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Caracterizar quatro amostras de quercetina, de diferentes procedências (três apresentando grau farmacêutico e uma substância de referência), quanto às suas propriedades:
 - Físico-químicas, no que se refere à hidrossolubilidade intrínseca; físicas, no que se refere ao tamanho e à forma das partículas; químicas, no que se refere à pureza;
 - Termo-analíticas;
 - Espectroscópicas;
- ✓ Selecionar uma amostra de quercetina apresentando grau farmacêutico para ser empregada nas etapas subsequentes do trabalho

PUBLICAÇÃO 1. Characterization of different samples of quercetin in solid-state:
indication of polymorphism occurrence

Publicado no Pharmazie

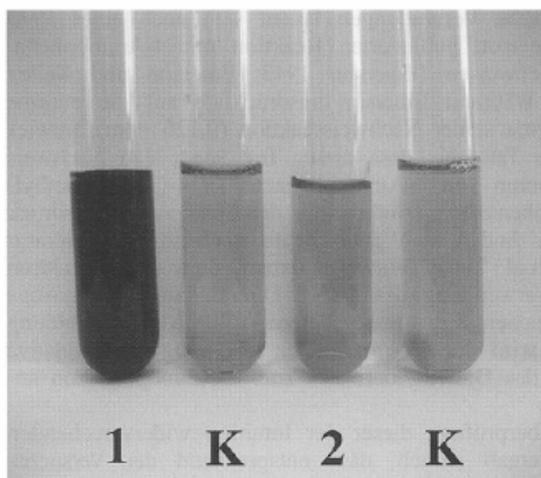


Abb: Farbreaktion nach Emerson
 1: 4-Aminophenazon
 2: 4-(*N,N*-Dimethylamino)phenazon
 K: Kontrolle

Tabelle: Trivial- und Handelsnamen der untersuchten Verbindungen

4-Aminophenazon (1)	4- <i>N,N</i> -Dimethylaminophenazon (2)
4-AAP	Aminophenazon(e)
4-Aminoantipyrene	Aminopyrine
Aminoantipyrin(e)	Amidopyrin(e)
4-Aminoantipyrene	Amidazophen(e)
Ampyrone	Amidofebrin
Metapirazone	Amidofen

Experimenteller Teil

Durchführung nach Emerson (1943): 15 mg Phenol werden in 10 ml H₂O gelöst und mit 3 Tropfen einer NH₄OH-Lsg. ($c = 6 \text{ mol/l}$) versetzt. Die Lösung wird in zwei gleiche Teile geteilt, von denen der eine mit 2 Tropfen einer 2%igen Aminophenazon-Lsg. versetzt wird und der andere als Kontrolle dient. Beide Lösungen werden mit 3 Tropfen einer 8%igen K₃[Fe(CN)₆]-Lsg. versetzt.

Literatur

- Eger K, Troschütz R, Roth HJ (2005) *Arzneistoffanalyse*, 5. Aufl., Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart, S. 40.
 Emerson E (1943) The condensation of aminoantipyrine, part II. *J Org Chem* 8: 417–428.
 Emerson E, Kelly K (1948) The condensation of aminoantipyrine, part VI. *J Org Chem* 13: 532–534.
 Göber B, Surmann P (2005) *Arzneimittelkontrolle – Drug Control*, 1. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, S. 446–449.

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Controle e Produção de Medicamentos¹, Faculdade de Farmácia, Departamento de Mineralogia e Petrologia², Instituto de Geociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

Characterization of different samples of quercetin in solid-state: indication of polymorphism occurrence

G. S. BORGHETTI¹, I. M. COSTA¹, P. R. PETROVICK¹,
 V. P. PEREIRA², V. L. BASSANI¹

Received August 24, 2005, accepted January 23, 2006

Prof. Dra. Valquiria Linck Bassani, Departamento de Controle e Produção de Medicamentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Nº 2752, Avenida Ipiranga, Porto Alegre, 90610-000, Brasil

valqui@farmacia.ufrgs.br

Pharmazie 61: 802–804 (2006)

The present work was designed to compare four commercial samples of quercetin, three of them presenting pharmaceutical grade (QPGa, QPGb and QPGc) and the other one pro-analytical grade (QPA) by means of different techniques. Physical and chromatographic characterization of these samples shows different properties following its origin, especially a clear evidence of polymorphism occurrence.

Quercetin belongs to the flavonoid class and its biological activities have been described extensively (Murota and Terao 2003; Moskaug et al. 2004; Okamoto 2005). However, few studies concerning solid-state properties of quercetin have been reported (Henczowski et al. 2001; Costa et al. 2002; Olejniczak and Potrzebowski 2004; Costa 2005). In the present work, three samples of quercetin presenting pharmaceutical grade were compared to a pro-analytical grade sample by means of Liquid Chromatography (LC), Ultraviolet Spectroscopy (UV), Infrared Spectroscopy (IR), Differential Scanning Calorimetry (DSC), X-Ray Powder Diffraction Analysis (XRPD), Scanning Electron Microscopy (SEM) techniques and aqueous solubility determination.

The LC profile of all quercetin samples showed peaks with very similar retention times (6.8 min). Considering the peak area of QPA as 100%, the lower concentration of QPGa (92.0% ± 0.4) and QPGc (93.6% ± 1.4) samples could be due to the residual water content. The concentration higher than 100% in QPGb (105.5% ± 0.4) sample could indicate the presence of impurities or lower residual water content than QPA.

For all samples coincident UV spectra were observed. Their maximum absorption wavelength values (256 and 372 nm) are in accordance with the spectra reported in the literature (Mabry et al. 1970; Budavari 1996).

Coincident IR spectra of QPA and QPGa samples were obtained, both presenting the main characteristic bands of the molecule: at 3408.6 cm⁻¹ (–OH deformation), 900 and 675 cm⁻¹ (–CH deformation), 1260 and 1000 cm⁻¹ (–CO deformation), 1150–1085 cm⁻¹ (C–O–C deforma-

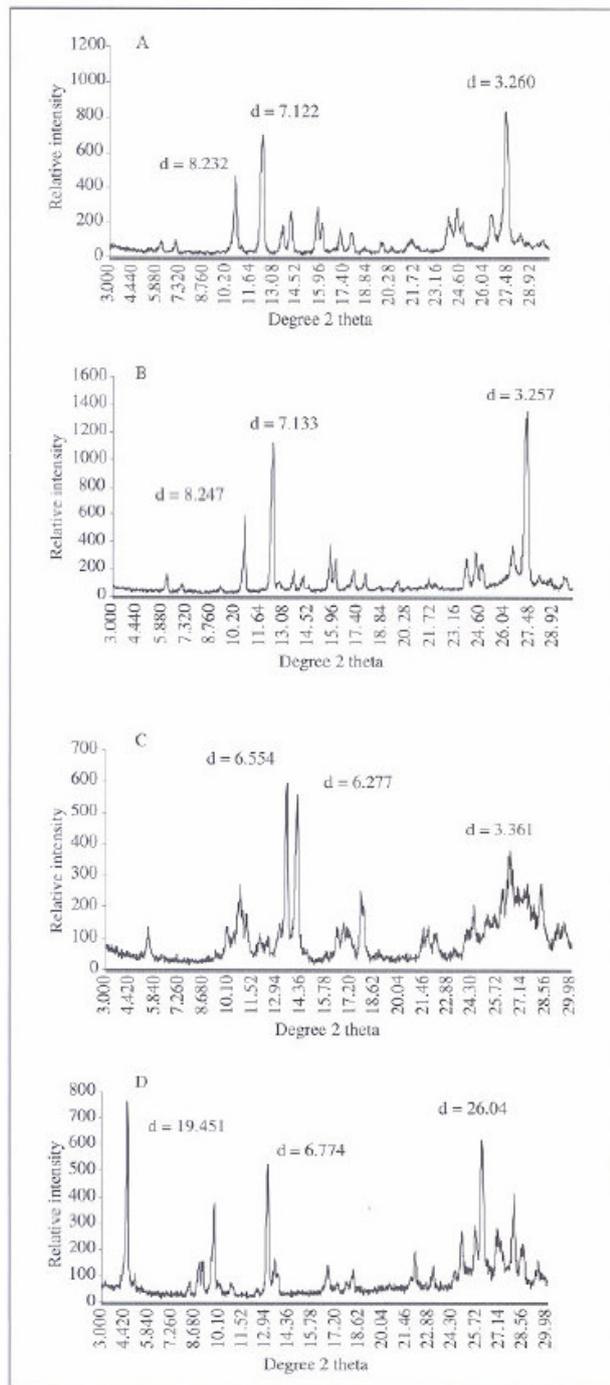


Fig. 1: XRPD analysis of quercetin samples from different suppliers (A) QPA, (B) QPGa, (C) QPGb and (D) QPGc

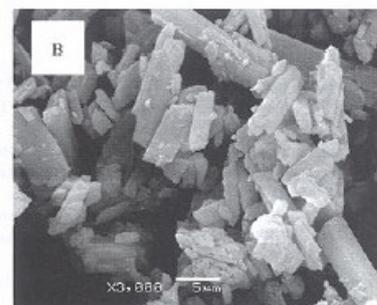
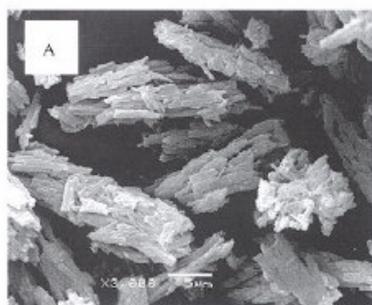
tion) and 1666.7 cm^{-1} ($=\text{CO}$ stretching). The IR spectra of QPGb and QPGc samples also were coincident, but they are not in accordance with the spectra related in the literature (Pouchert 1991). In this case, the band relative to $-\text{OH}$ deformation (3408.6 cm^{-1}) presents different shape when compared with the IR spectra of QPA and QPGa. The band correspondent to the $=\text{CO}$ stretching (1666.7 cm^{-1}) is in the same position in all recorded spectra. The main difference is found in the position and shape of the bands related to the $-\text{CO}$ deformation (1260 and 1000 cm^{-1}). Additionally some differences in the bands related to the $-\text{CH}$ deformation (900 and 675 cm^{-1}) were observed. These differences could be related to the presence of hydration water as well as differences between their crystal lattices.

In DSC analysis, the first endothermic event observed for QPA and QPGa samples corresponds to the loss of the bounded water. QPA and QPGa samples presented onset temperature values for this event of 114.20°C and 85.61°C , respectively. This peak is not present in the QPGb sample and, in the case of QPGc sample, such a peak is displaced to lower temperatures compared to QPA and QPGa samples (31.26°C), suggesting that this peak cannot be related to the loss of bounded water. In the same way, the peak corresponding to the melting point of the quercetin presented different onset temperature values for all samples. QPA, QPGa and QPGc samples presented onset temperature values of 322.57°C , 318.96°C and 315.31°C , respectively. The onset temperature differences for QPA and QPGa samples, upon to the presence of an exothermic signal on about 200°C in QPGa, which was not detected in the thermogram of QPA, could suggest differences in crystal lattice, size or morphology of particles of both samples. QPGb sample, on the other hand, presented two endothermic peaks between 314 and 320°C : the first one with an onset temperature of 314.54°C (similar to the value observed for QPGc sample) and the other one with an onset temperature of 319.86°C (similar to the values observed for QPA and QPGa samples).

The XRPD analysis (Fig. 1) showed that QPA and QPGa samples present the same XRPD pattern and, consequently, identical crystal lattices. QPGb and QPGc samples, on the other hand, presented two different XRPD patterns. These results indicate the occurrence of three different polymorphic forms of quercetin. Distinct crystal lattices of QPGb and QPGc samples, when compared to QPA and QPGa, could explain the results observed in DSC analysis. Nevertheless, the results obtained in thermal analysis of QPA and QPGa samples cannot be explained by XRPD data.

The aqueous solubility values observed for QPGa, QPGb and QPGc samples were, 1.69 ± 0.02 , 1.22 ± 0.05 and $2.97 \pm 0.27\text{ }\mu\text{g/mL}$, respectively. These values were higher than that observed for QPA ($0.48 \pm 0.03\text{ }\mu\text{g/mL}$). The dif-

Fig. 2: Photomicrographs of quercetin samples (A) QPA and (B) QPGa



ference in aqueous solubilities among QPA, QPGb and QPGc samples is probably due to their distinct crystal lattices. Nevertheless, comparing QPA and QPGa samples, the aqueous solubility differences could be caused by different particle morphology.

Effectively, the SEM photomicrographs of QPA and QPGa samples demonstrated the existence of differences in particle morphology and size between both samples (Fig. 2). In the QPA sample it is possible to observe the presence of euhedral particles (with size between 2 and 4 μm), whereas the QPGa sample is composed of particles presenting subhedral shape (the majority form is columnar and with size between 3 and 5 μm). The DSC analysis response and aqueous solubility of QPA and QPGa samples can be related to the particle morphology and particle size.

Taken together, physical and chromatographic characterization of four different commercial samples of quercetin shows different properties following its origin, which is a clear evidence of polymorphism occurrence.

Experimental

Quercetin pharmaceutical grade were purchased from DEG[®] (QPGa), Galena[®] (QPGb) and SPFarma[®] (QPGc) (Brazil) and quercetin pro-analysis grade (QPA) was obtained from Sigma[®] (USA). Liquid chromatography was performed using the method developed and validated by Webber (2003), in a Shimadzu LC-10A equipment and a Shimadzu CLC-ODS (M) RP 18.5 μm (250 \times 4 mm i.d.) column. Each sample was analysed in triplicate. The spectral analysis (200 to 500 nm) was performed in a Hewlett-Packard 8452A Scanning Spectrophotometer UV-VIS, using a methanolic solution containing 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of each sample, in quartz cell and path length of 1 cm. The IR spectra (4000 to 400 cm^{-1}) were obtained in a Shimadzu DR-8001 IR Spectrophotometer in KBr discs, using a resolution of 4 cm^{-1} and 40 accumulations. For differential scanning calorimetric analysis, samples corresponding to around 1 to 2 mg were placed in aluminum pans and crimped. The analysis were carried out in a Shimadzu DSC-60 equipment. The operating conditions were 10 $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ of heating rate, from 25 up to 350 $^{\circ}\text{C}$, N_2 dynamic atmosphere, 50 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ of flow. Temperature calibration was performed using Indium and Zinc. Diffractograms were obtained at room temperature in a Siemens D-5000 X-ray diffractometer. The setting parameters were Ni filtered Cu K α radiation ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$), high voltage of 40 kV, tube current of 30 mA, step of 0.02 $^{\circ}$ 2 θ ⁻¹ and angular range of 2 $^{\circ}$ < 2 θ < 72 $^{\circ}$. Aqueous solubility determination was carried out by adding an excess amount of sample (6 mM) to 10 mL of water. The suspensions resulting were stirred for 24 h, at 37 $^{\circ}\text{C}$. Samples were filtered and the quercetin content in the solutions was assayed by ultraviolet spectroscopy at 372 nm. Each sample was analysed in triplicate. The scanning electron microscopy analysis was performed in a JSM-6060 SEM, using a voltage of 20 kV. Samples were analyzed after gold sputtering.

Acknowledgement: This research was supported by the Brazilian Government (CAPES, CNPq and FAPERGS).

References

- Budavari S (ed.) (1996) *The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals*, 12th ed., Whitehouse Station.
- Costa EM, Barbosa-Filho JM, Nascimento TG, Macedo RO (2002) Thermal characterization of the quercetin and rutin flavonoids. *Thermochimica Acta* 392–393: 79–84.
- Costa IM (2005) Estudo de pré-formulação com o composto polifenólico quercetina. M.Sc. Thesis (Master in Pharmaceutical Sciences) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Henczowski M, Kopacz M, Nowak D, Kuzniar A (2001) Infrared spectrum analysis of some flavonoids. *Acta Pol Pharm* 58: 415–420.
- Mabry TJ, Markhan KR, Thomas MB (1970) *The systematic identification of flavonoids*. New York.
- Moskaug JO, Carlsen H, Myhrstad M, Blomhoff R (2004) Molecular imaging of the biological effects of quercetin and quercetin-rich foods. *Mech Ageing Dev* 125: 315–324.
- Murota K, Terao J (2003) Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. *Arch Biochem Biophys* 417: 12–17.
- Okamoto T (2005) Safety of quercetin for clinical application (Review). *Int J Mol Med* 16: 275–278.

Olejniczak S, Potrzebowski MJ (2004) Solid state NMR studies and density functional theory (DFT) calculations of conformers of quercetin. *Org Biomol Chem* 2: 2315–2322.

Pouchert CJ (ed.) (1991) *The Aldrich Library of Infrared Spectra*, 3rd ed., Wisconsin.

Webber C (2003) Avaliação do perfil de penetração cutânea da quercetina. M.Sc. Thesis (Master in Pharmaceutical Sciences) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

PUBLICAÇÃO 2. Physicochemical characterization and thermal stability of quercetin hydrates

Submetido ao Journal of Solid State Chemistry

Physicochemical characterization and thermal stability of quercetin hydrates

G.S. Borghetti^{a*}, J.P. Carini^a, S.B. Honorato^b, A.P. Ayala^b and V.L. Bassani^a

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, CEP 90.610-000, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, Caixa Postal 6030, CEP 60.455-970, Fortaleza, CE, Brazil

* **Corresponding author:** Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, CEP 90.610-000, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: (+55) 51 3308 5231; Fax: (+55) 51 3308 5437. E-mail address: greicefarm@yahoo.com.br (G.S. Borghetti)

Abstract

In the present work three samples of quercetin raw materials, purchased from different suppliers, were characterized employing particle size analysis, scanning electron microscopy, Raman spectroscopy, thermogravimetry, differential scanning calorimetry, and variable temperature-powder X-ray diffraction in order to know their physicochemical properties, specially the thermal stability in solid state. The results demonstrated that the analyzed quercetin raw materials present distinct crystalline structure, ascribed to the presence of different amounts of hydration water molecules into their crystal lattice. The solid state stability of these quercetin hydrates was highly dependent on the temperature. This characteristic is an important information for the processing control in the manufacturing of nutraceuticals, cosmetics or pharmaceuticals, since phase transitions resulting from heating may lead to changes in the physicochemical properties of the flavonoid, such as water solubility and, thus, in its bioavailability.

Key-words: hydrates, physicochemical characterization, quercetin, solid state, thermal stability

1. Introduction

Hydrates are crystalline forms containing either stoichiometric or non-stoichiometric amounts of water into the crystal lattice. They are also called pseudopolymorphs (Raw *et al.*, 2004). Their physicochemical properties, such as solubility in water and stability, can differ significantly (Sheng *et al.*, 1999).

The physical stability of hydrates is highly dependent on the environmental conditions. During processing or storage, crystalline substances are often exposed to water, moisture and temperature changes and, thus, may be converted to other form (Raw *et al.*, 2004). The hydration and dehydration, which refers to the transition between anhydrides and hydrates or between lower hydrates and higher hydrates, may lead to formation of a more or less stable crystalline form, a mixture of crystalline forms or an amorphous form. Such phase transitions are often accompanied by changes in the physicochemical properties and are of major concern for insoluble molecules because they can affect their bioavailability (Zhang *et al.*, 2004). Therefore, the knowledge of the environmental conditions under which phase transitions occur is an essential preformulation step to assure the quality of the final product, including nutraceuticals, cosmetics or pharmaceuticals.

Quercetin (3,3',4',5,7-pentahydroxy-flavone) is one of the most biologically active and common dietary flavonoids. Its biological properties have been intensively investigated, which are very often related to its antioxidant activity (Bischoff, 2008). By the other hand, the bioavailability of quercetin is limited by its reduced solubility in water (Borghetti *et al.*, 2009). In Brazil, quercetin raw materials from different suppliers are commercially available as quercetin dihydrate ($C_{15}H_{10}O_7 \cdot 2H_2O$). The occurrence of quercetin raw materials presenting different crystalline structures in the Brazilian market have been found by preliminary studies of this work (Borghetti *et al.*,

2006). In the same way, the existence of dihydrated and anhydrated forms of quercetin in the solid state was reported by Olejniczak and Potrzebowski (2004). The authors reported that the presence of hydration water molecules into the crystal lattice of quercetin has great influence on its molecular geometry, because the hydrogen bonding pattern differs according to the crystalline form of the flavonoid. For the dihydrated form, intermolecular hydrogen bonds occur between hydration water molecules and hydroxyl groups of C3', C4' and C7. For the anhydrate form, the hydroxyl group of C3' is involved in the formation of an intramolecular hydrogen bond with the hydroxyl group of C4'. The presence of hydroxyl groups in 3'- and 4'- positions of the B ring, as well as a hydroxyl group in 3- position of the C ring in conjunction with a C2-C3 double bond, is related to the high antioxidant activity of quercetin (Boots *et al.*, 2008). In the same way, the oxidation of the flavonoid in aqueous media seems to involve the attack of the hydroxyl group of C3 (Smith *et al.*, 2000; Buchner *et al.*, 2006). Therefore, the variations of crystalline structure of quercetin may have great practical importance, especially considering its solubility in water, stability and biological properties.

In this context, the objective of the present work was to characterize three samples of quercetin raw materials presenting different crystalline structures by means of particle size analysis, scanning electron microscopy, Raman spectroscopy, differential scanning calorimetry, thermogravimetry, and variable temperature X-ray diffraction. For the first time, the physicochemical properties attributed to each crystalline form of the flavonoid, specially their thermal stability in the solid-state, were investigated.

2. Experimental

2.1. Materials

Three samples of pharmaceutical grade quercetin (QCT) were analyzed as supplied, without purification or recrystallization. QCTa, QCTb and QCTc were purchased from Deg (São Paulo, Brazil), Galena (São Paulo, Brazil) and SP Farma (São Paulo, Brazil), respectively.

2.2. Particle Size Analysis

The samples were dispersed in silicon oil and suspended with an ultrasonic system. The mean diameter of the particles was determined using a CILAS 1180 laser diffractometer (Madison, MO/MA, USA).

2.3. Scanning Electron Microscopy (SEM)

The samples were fixed on brass stubs using a double-sided adhesive tape and vacuum-coated with a thin layer of gold. The photomicrographs were taken at a voltage of 10 kV and a magnification of x3,000 using a Jeol JSM-6060 microscope (Tokyo, Japan).

2.4. Fourier Transform - Raman Spectroscopy

The FT-Raman spectra were acquired using a Bruker VERTEX-70 FTIR/FT-Raman spectrometer (Ettlingen, Germany) equipped with a Nd:YAG laser (1064 nm excitation line) and a liquid-nitrogen cooled Ge detector. The analysis were performed at room temperature in a frequency range between 2,000 and 100 cm^{-1} , with 1024 accumulations and a resolution of 4 cm^{-1} .

2.5. Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Thermogravimetry (TG)

Simultaneous differential scanning calorimetry and thermogravimetric experiments were performed using a Netzsch STA-409 PC/PG equipment (Selb, Germany), coupled to a Bruker TENSOR-27 Fourier Transformed Infrared spectrometer (Ettlingen, Germany). The analysis were performed from room temperature up to 500 °C, at 10 °C.min⁻¹, under nitrogen gas flow (60 mL.min⁻¹). Approximately 5 mg of the samples were accurately weighed in aluminum pans and crimped with a pinhole.

2.6. Variable Temperature X-Ray Diffraction (VTXRD)

The diffractograms were recorded using a Rigaku RINT-2000 equipment (Tokyo, Japan) under the following operating conditions: Cu K α radiation ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$), voltage of 40 kV, current of 40 mA, scanning rate of 0.5° 2 θ .min⁻¹, scanning step of 0.02° 2 θ , step exposure time of 3 s, heating rate of 5 °C.min⁻¹ over the angle range of 3 – 32° 2 θ , from room temperature (20 °C) up to 270 °C.

3. Results and discussion

XRD, one of the most reliable techniques for identification of crystalline structures, cannot easily differentiate between true polymorphs and pseudopolymorphs. Thus, the combination of several techniques has been employed for characterizing hydrates in the solid state. The combined use of thermogravimetry and infrared spectroscopy permits identification of the solvent incorporated into the crystal lattice. By the other hand, Raman spectroscopy is especially important because detects low energy vibrations of atoms caused by differences in crystal lattice packing. Additionally, the functional groups involved in hydrogen bonds can display shifts of

varying degrees (Vippagunta *et al.*, 2001; Rodríguez-Spong *et al.*, 2004; Ayala, 2007; Ayala *et al.*, 2007).

3.1. Particle Size Analysis and Scanning Electron Microscopy

QCTa and QCTc presented particles with similar mean diameter (0.65 μm and 3.65 μm , respectively), while QCTb exhibited the highest mean diameter (15.52 μm). The photomicrographs obtained for all samples of quercetin, illustrated in figure 1, corroborate these results and can explain, at least partially, the lower solubility in water, at 37 °C, for QCTb (2.6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) when compared with the other samples (3.7 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for QCTa and 6.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for QCTc) (Petry *et al.*, 2007). However, it is difficult to determine if these differences in particle size are caused by pseudopolymorphism or by changes in crystal growth conditions, such as degree of supersaturation, nature of crystallization solvent, speed of solution agitation, rate of cooling, or presence of impurities (Rodríguez-Spong *et al.*, 2004).

3.2. Fourier Transform - Raman Spectroscopy

The Raman spectrum of quercetin has been reported by several authors (Cornard *et al.*, 2005; Teslova *et al.*, 2007). The Raman spectra obtained for all samples of quercetin in the fingerprint region are presented in figure 2. By comparing our results with those reported by Cornard *et al.* (2005) and Teslova *et al.* (2007) it is possible to associate the previously reported spectrum with QCTa. The main features of the Raman spectrum of QCTa are $\nu(\text{C}=\text{O})$ stretching (1660 cm^{-1}), $\nu(\text{C}2=\text{C}3)$ stretching (1608 cm^{-1}), phenyl and benzo rings $\nu(\text{C}=\text{C})$ stretchings (1590 and 1549 cm^{-1}). The group of bands between 1300 and 1500 cm^{-1} cannot be described by a single internal coordinate but it is better described by a set of mechanical coupled vibrations of $\nu(\text{C}-$

C) stretchings and in-plane $\delta(\text{CH})$ and $\delta(\text{C-OH})$ bendings. Although it is not possible to associate a single band to the $\nu(\text{C2-C1}')$ stretching, contributions of interring bond are expected in this region.

As it will be shown later, QCTb seems to be a mixture of crystalline forms, due to that we will focus our discussion on the Raman spectra in the comparison between QCTa and QCTc. The most remarkable difference between the Raman spectra of QCTa and QCTc is the shift of the $\nu(\text{C2=C3})$ stretching mode from 1608 cm^{-1} to 1616 cm^{-1} . A similar effect was observed by comparing the Raman lines of quercetin in solid state and in solution (Cornard *et al.*, 1997). The observed frequency variations could be ascribed to modifications of the molecular structure due to the crystalline field. Thus, one of the more notable effects is the change of the interring torsion angle around the C2-C1' bond. Quantum mechanical calculations lead to a nonplanar structure with a torsion angle of about 28° (Cornard *et al.*, 1997), whereas the value determined by X-ray diffraction in the crystal line state is 5.5° (Rossi *et al.*, 1986; Jin *et al.*, 1990). Based on these results, the frequency shifts observed in the QCTa and QCTc hydrates could be explained as a change in the molecular conformation, mainly related to the relative orientation of the phenyl and pyrone rings. Additional support to this assumption is provided by the wavenumber shift of the QCTa bands around 1328 and 1439 cm^{-1} , which are related to the $\nu(\text{C2-C1}')$ stretching. On the other hand, bands related to the phenyl and benzo rings (1590 , 1549 , 1400 and 1370 cm^{-1}) remain unaltered showing that conformational changes are mostly located around the C2-C1' bond.

3.3. Differential Scanning Calorimetry

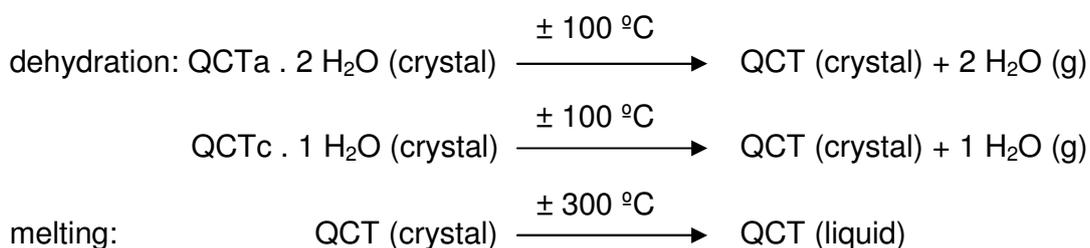
The DSC curves obtained for all samples of quercetin exhibited two main endothermic events, as illustrated in figure 3. The first one corresponds to the dehydration. For QCTa (approximately 105 °C, $\Delta H= 222 \text{ J.g}^{-1}$) and QCTb (approximately 119 °C, $\Delta H= 112 \text{ J.g}^{-1}$) the corresponding temperature was higher than the boiling point of water, which suggests that their hydration water molecules are strongly held by crystal lattice through hydrogen bonds. By the other hand, QCTc showed a broad endotherm at low temperature (approximately 82 °C, $\Delta H= 153 \text{ J.g}^{-1}$). The second endothermic event is related to the melting point of quercetin and it occurred at approximately 317 °C ($\Delta H= 91.8 \text{ J.g}^{-1}$) for QCTa, 323 °C ($\Delta H= 177 \text{ J.g}^{-1}$) for QCTb, and 318 °C ($\Delta H= 147 \text{ J.g}^{-1}$) for QCTc. An exothermic event following melting was observed at approximately 340 °C for QCTa, 350 °C for QCTb, and 345 °C for QCTc and corresponds to the decomposition of quercetin (Zhou *et al.*, 2001; Da Costa *et al.*, 2002; Olejniczak e Potrzebowski, 2004; Koontz *et al.*, 2009; Zheng e Chow, 2009). Additionally, a minor endothermic event was observed for QCTb and QCTc at approximately 272 °C ($\Delta H= 3.2 \text{ J.g}^{-1}$) and 231 °C ($\Delta H= 7.0 \text{ J.g}^{-1}$), respectively, suggesting that a solid-solid transition of the corresponding anhydrate forms has occurred. This phenomenon was not observed for QCTa.

3.4. Thermogravimetry

The TG curves obtained for all samples of quercetin exhibited a two-step weight loss within the same temperature range observed in DSC analysis, as illustrated in figure 4. The first one corresponds to the dehydration and it was approximately 10.5 % for QCTa, 2.9 % for QCTb, and 5.13 % for QCTc. The second weight loss is related to the decomposition of quercetin. The insets in figure 5 show the integrated intensity of

the infrared spectra of the evolved gases in the $\nu(\text{OH})$ and $\nu(\text{CO})$ stretching spectral regions of water and carbon dioxide, respectively. Thus, the corresponding plots provide informations on the characteristic temperatures in which these gases were released. The temperature evolution of the water vapor clearly confirms that the first anomaly observed in the DSC and in the TGA thermograms is associated with the dehydration process, since it was the only compound observed in the evolved gases. The simultaneous analysis by infrared spectroscopy confirmed the release of hydration water from the crystal lattice, excluding the occurrence of solvates in the samples of quercetin analyzed in this work. By the other hand, the second weight loss (approximately 14.7 %, 22.2 % and 19.9 % for QCTa, QCTb and QCTc, respectively) is followed by the release of water and carbon dioxide characterizing a decomposition process.

The comparison between the weight loss observed for QCTa during dehydration and that calculated for quercetin dihydrate (10.64 %), from its molecular weight ($338.24 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), suggests that QCTa corresponds to the dihydrated form, presenting two mol of water per mole of quercetin. The phase transitions of QCTa and QCTc on heating are summarized as follow:



By the other hand, QCTc seems to correspond to the monohydrated form, presenting one mol of water per mole of quercetin ($320 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), since the theoretical mass loss is 5.62 %, which is in accordance with the observed value. QCTb is probably a mixture between different crystalline forms of quercetin as it will be confirmed by X-ray powder diffraction.

3.5. Variable Temperature X-Ray Diffraction

VT-PXRD analysis was carried out to confirm the above-mentioned thermal behavior of the samples. The diffractograms and the main diffraction peaks of the three samples of quercetin, obtained by variable temperature X-ray diffraction analysis, are showed in figures 5, 6, 7 and 8 and summarized in table 1.

The diffractograms obtained at room temperature for all samples of quercetin (Figure 5) exhibited a series of sharp peaks, suggesting that the flavonoid is present as a crystalline material. However, the differences observed in the peak positions (Table 1), which correspond to the periodic packing of molecules in solid state, suggest that the samples of quercetin present distinct crystal lattices. QCTa exhibited a diffraction pattern characteristic of quercetin dehydrate (Rossi *et al.*, 1986; Jin *et al.*, 1990), in which peaks at a diffraction angle (2θ) of 10.6° , 12.3° and 27.3° were observed (Olejniczak e Potrzebowski, 2004; Pralhad e Rajendrakumar, 2004; Kale *et al.*, 2006; Sri *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2008; Scalia e Mezzena, 2009; Zheng e Chow, 2009). The diffractogram of QCTb exhibited a diffraction pattern similar that presented by QCTa (diffraction peaks at 10.70 , 12.34 , 13.48 , 14.02 , 24.26 , 26.41 , 27.34 , and $29.5^\circ 2\theta$), suggesting that QCTb exists as a mixture of dihydrate and other crystalline form. QCTc, by the other hand, exhibited a diffraction pattern too many different than that presented by QCTa and QCTb.

The diffractograms obtained during heating for all samples of quercetin are presented in figures 6, 7 and 8. The expected phase transition because of molecular rearrangement during the dehydration of quercetin molecule was observed at 110°C for QCTa (Figure 6) and QCTb (Figure 7), and 40°C for QCTc (Figure 8). The diffraction pattern of the corresponding anhydrated forms (transition 1 in table 1) was different from each other and from that obtained for the original forms, however, their

crystalline structure was maintained. In the same way, a second phase transition was observed for QCTb (at 270 °C) and QCTc (at 250 °C), confirming the occurrence of a solid-solid transition of the corresponding anhydrate forms. The diffraction patterns of both samples were identical, since they exhibited peaks in the same positions (transition 2 in table 1), which suggests that the new crystalline forms formed are the same for QCTb and QCTc. No phase transition was observed for QCTa on heating above 110 °C. Unfortunately, the diffraction pattern of the samples could not be monitored at temperatures above 270 °C, in which quercetin begins melting.

Taking together, the solid state stability of quercetin raw materials evaluated in the present study was highly dependent on the temperature, where QCTa was thermodynamically more stable than QCTb and QCTc. In QCTa the hydration water molecules are probably involved in stronger intermolecular hydrogen bonds that contribute to the coherence of the crystalline structure, resulting in a lower energy state. Based upon its minimal potential for transition, quercetin dihydrate seems to be the most appropriate crystalline form for the development of solid dosage forms. However, a less stable form can be necessary in view to improve the aqueous solubility and the bioavailability of the flavonoid. In this case, the crystalline form must be known during the manufacturing process (Raw *et al.*, 2004).

4. Conclusions

The present work was able to demonstrate that the analyzed quercetin raw materials present distinct crystalline structure, ascribed to the presence of different amounts of hydration water molecules into their crystal lattice. However, the more relevant finding is that the solid state stability of these crystalline forms of quercetin is highly dependent on the temperature. This characteristic is an important information for the

processing control in the manufacturing of nutraceuticals, cosmetics or pharmaceuticals, since phase transitions resulting from heating may lead to changes in the physicochemical properties of the flavonoid and, thus, in its bioavailability.

Acknowledgments

The authors are grateful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), and Instituto de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (IPDI) for the financial support and scholarships.

References

RAW, A.S.; FURNESS, M.S.; GILL, D.S.; ADAMS, R.C.; HOLCOMBE JR., F.O.; YU, L.X. Regulatory considerations of pharmaceutical solid polymorphism in Abbreviated New Drug Applications (ANDAs). *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 56, p. 397-414, 2004.

SHENG, J.; VENKATESH, G.M.; DUDDU, S.P.; GRANT, D.J.W. Dehydration behavior of eprosartan mesylate dehydrate. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 88, p. 1021-1029, 1999.

BORGHETTI, G.S.; LULA, I.S.; SINISTERRA, R.D.; BASSANI, V.L. Quercetin/ β -cyclodextrin solid complexes prepared in aqueous solution followed by spray-drying or by physical mixture. *AAPS PharmSciTech*, v. 10, p. 235-242, 2009.

ZHANG, G.G.Z.; LAW, D.; SCHMITT, E.A.; QIU, Y. Phase transformation considerations during process development and manufacture of solid oral dosage forms. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 56, p. 371-390, 2004.

BISCHOFF, S.C. Quercetin: potentials in the prevention and therapy of disease. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, v. 11, p. 733-740, 2008.

OLEJNICZAK, S.; POTRZEBOWSKI, M.J. Solid state NMR studies and density functional theory (DFT) calculations of conformers of quercetin. *Organic and Biomolecular Chemistry*, v. 2, p. 2315-2322, 2004.

BORGHETTI, G.S.; COSTA, I.M.; PETROVICK, P.R.; PEREIRA, V.P.; BASSANI, V.L. Characterization of different samples of quercetin in solid-state: indication of polymorphism occurrence. *Pharmazie*, v. 61, p. 802-804, 2006.

VIPPAGUNTA, S.R.; BRITAIN, H.G.; GRANT, D.J.W. Crystalline solids. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 48, p. 3-26, 2001.

RODRÍGUEZ-SPONG, B.; PRICE, C.P.; JAYASANKAR, A.; MATZGER, A.J.; RODRÍGUEZ-HORNEDO, N. General principles of pharmaceutical solid polymorphism: a supramolecular perspective. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 56, p. 241-274, 2004.

PETRY, M.; BORGHETTI, G.S.; BASSANI, V.L. Influência de ciclodextrinas e polímero hidrofílico sobre a hidrossolubilidade de diferentes formas polimórficas de quercetina. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 26, p. 831-836, 2007.

CORNARD, J.P.; DANGLÉTERRE, L.; LAPOUGE, C. Computational and spectroscopic characterization of the molecular and electronic structure of the Pb(II)-quercetin complex. *Journal of Physical Chemistry*, v. 109, p. 10044-10051, 2005.

TESLOVA, T.; CORREDOR, C.; LIVINGSTONE, R.; SPATARU, T.; BIRKE, R.L.; LOMBARDI, J.R.; CANAMARES, M.V.; LEONA, M. Raman and surface-enhanced Raman spectra of flavone and several hydroxyl derivatives. *Journal of Raman Spectroscopy*, v. 38, p. 802-818, 2007.

ZHOU, J.; WANG, L.-F.; WANG, J.-Y.; TANG, N. Synthesis, characterization, antioxidative and antitumor activities of solid quercetin rare earth(III) complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 83, p. 41-48, 2001.

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

KOONTZ, J.L.; MARCY, J.E.; O'KEEFE, S.F.; DUNCAN, S.E. Cyclodextrin inclusion complex formation and solid-state characterization of the natural antioxidants α -tocopherol and quercetin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, p. 1162-1171, 2009.

ZHENG, Y.; CHOW, A.H.L. Production and characterization of a spray-dried hydroxypropyl- β -cyclodextrin/quercetin complex. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 35, p. 727-734, 2009.

PRALHAD, T.; RAJENDRAKUMAR, K. Study of freeze-dried quercetin-cyclodextrin binary systems by DSC, FT-IR, X-ray diffraction and SEM analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 34, p. 333-339, 2004.

KALE, R.; SARAF, M.; JUVEKAR, A.; TAYADE, P. Decreased B16F10 melanoma growth and impaired tumour vascularization in BDF1 mice with quercetin-cyclodextrin binary system. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 58, p. 1351-1358, 2006.

SRI, K.V.; KONDAIAH, A.; RATNA, J.V.; ANNAPURNA, A. Preparation and characterization of quercetin and rutin cyclodextrin inclusion complexes. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 33, p. 245-253, 2007.

WU, T.-H.; YEN, F.-L.; LIN, L.-T.; TSAI, T.-R.; LIN, C.-C.; CHAM, T.-M. Preparation, physicochemical characterization, and antioxidant effects of quercetin nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 346, p. 160-168, 2008.

SCALIA, S.; MEZZENA, M. Incorporation of quercetin in lipid microparticles: effect on photo- and chemical-stability. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 49, p. 90-94, 2009.

BOOTS, A.W.; HAENEN, G.R.M.M.; BAST, A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology*, v. 585, p. 325-337, 2008.

SMITH, G.J.; THOMSEN, S.J.; MARKHAM, K.R.; ANDARY, C.; CARDON, D. The photostabilities of naturally occurring 5-hydroxyflavones, flavonols, their glycosides and their aluminium complexes. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, v. 136, p. 87-91, 2000.

BUCHNER, N.; KRUMBEIN, A.; ROHN, S.; KROH, L.W. Effect of thermal processing on the flavonols rutin and quercetin. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 20, p. 3229-3235, 2006.

AYALA, A.P. Polymorphism in drugs investigated by low wavenumber Raman scattering. *Vibrational Spectroscopy*, v. 45, p.112-116, 2007.

AYALA, A.P.; SIESLER, H.W.; WARDELL, S.M.S.V.; BOECHAT, N.; DABBENE, V.; CUFFINI, S.L. Vibrational spectra and quantum mechanical calculations of antiretroviral drugs: nevirapine. *Journal of Molecular Structure*, v. 828, p. 201-210, 2007a.

CORNARD, J.P.; MERLIN, J.C.; BOUDET, A.C.; VRIELYNCK, L. Structural study of quercetin by vibrational and electronic spectroscopies combined with semiempirical calculations. *Biospectroscopy*, v 3, p. 183-193, 1998.

JIN, G.-Z.; YAMAGATA, Y.; TOMITA, K. Structure of quercetin dehydrate. *Acta Crystallographica*, v. 46, p. 310-313, 1990.

ROSSI, M.; RICKLES, L.F.; HALPIN, W.A. The crystal and molecular structure of quercetin: a biologically active and naturally occurring flavonoid. *Bioorganic Chemistry*, v. 14, p. 55-69, 1986.

Figure captions

Figure 1. Photomicrographs of quercetin samples: (a) QCTa, (b) QCTb, (c) QCTc

Figure 2. Fourier Transform-Raman spectra of quercetin samples

Figure 3. Differential Scanning Calorimetry curves of quercetin samples. The insets show a magnified region (x 20) for better visualization

Figure 4. Thermogravimetric curves of quercetin samples. The insets show the integrated intensity of characteristic bands of water and carbon dioxide observed in the infrared spectra of the released gases

Figure 5. Room temperature X-ray diffraction patterns of quercetin samples

Figure 6. Variable temperature X-ray diffraction pattern of quercetin sample QCTa

Figure 7. Variable temperature X-ray diffraction pattern of quercetin sample QCTb

Figure 8. Variable temperature X-ray diffraction pattern of quercetin sample QCTc

Table captions

Table 1. Main diffraction peaks of quercetin hydrates and their new crystalline forms observed by variable temperature X-ray diffraction analysis

Figure 1.

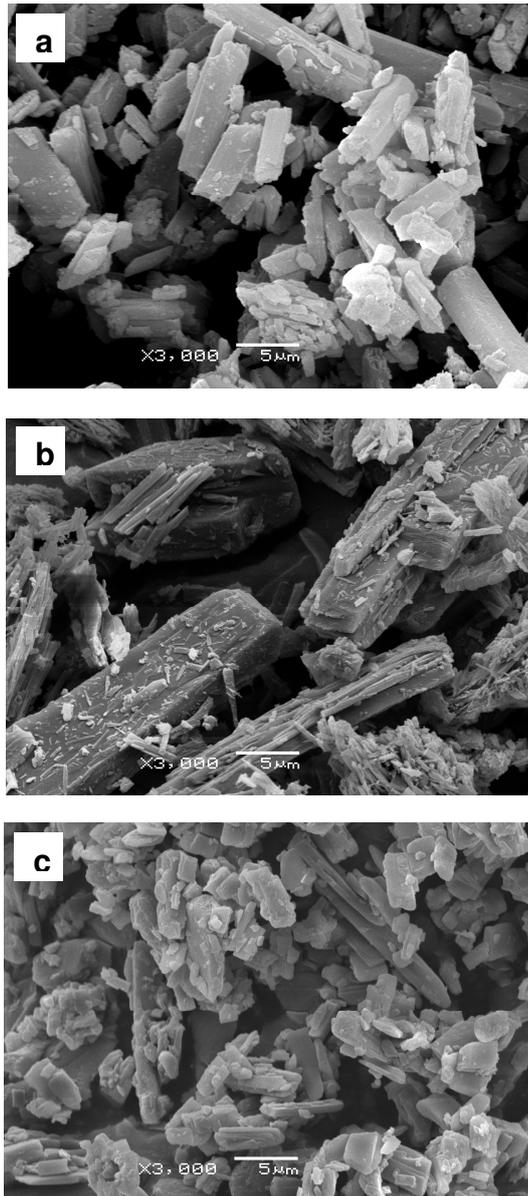


Figure 2.

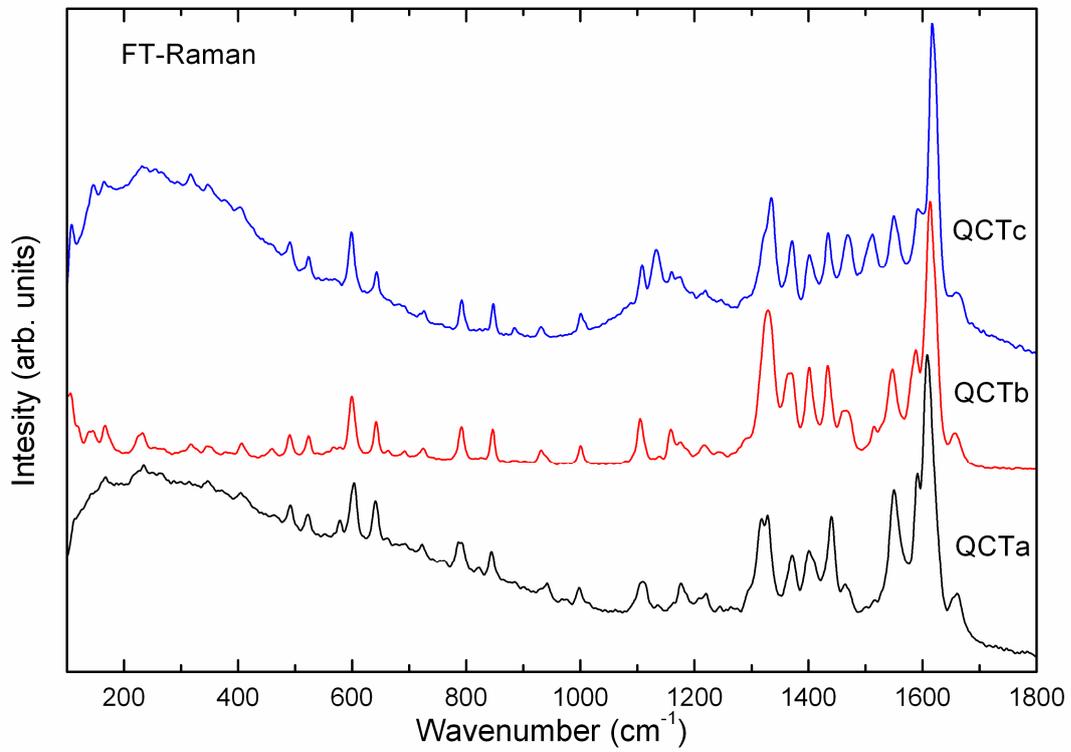


Figure 3.

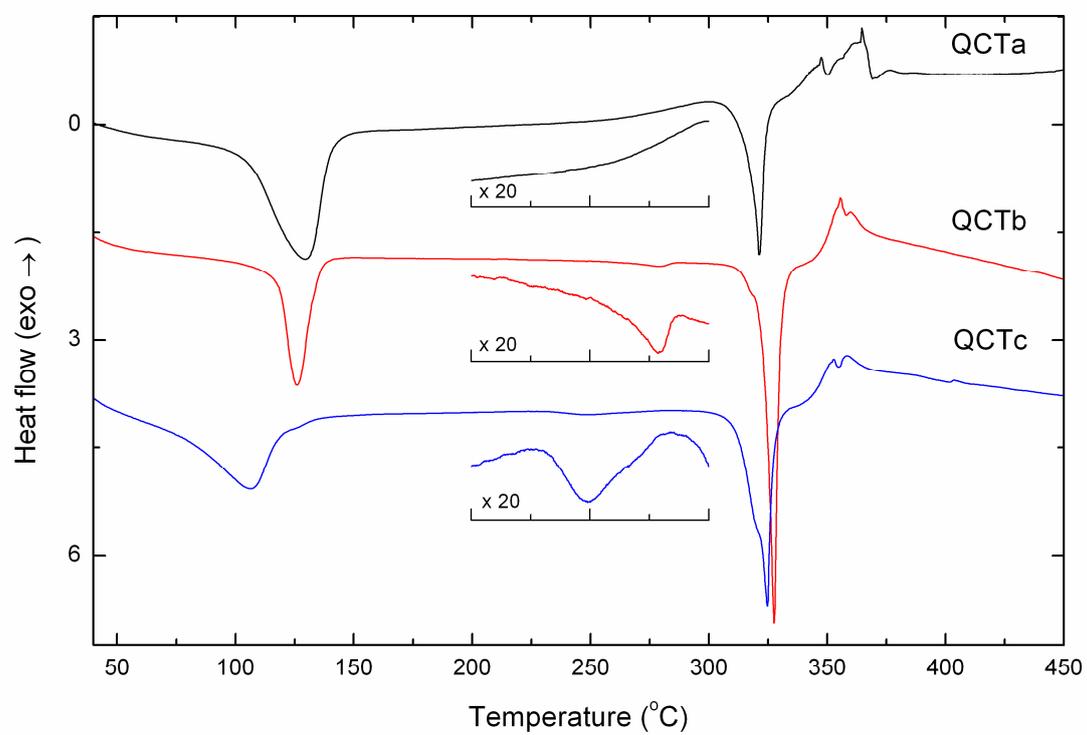


Figure 4.

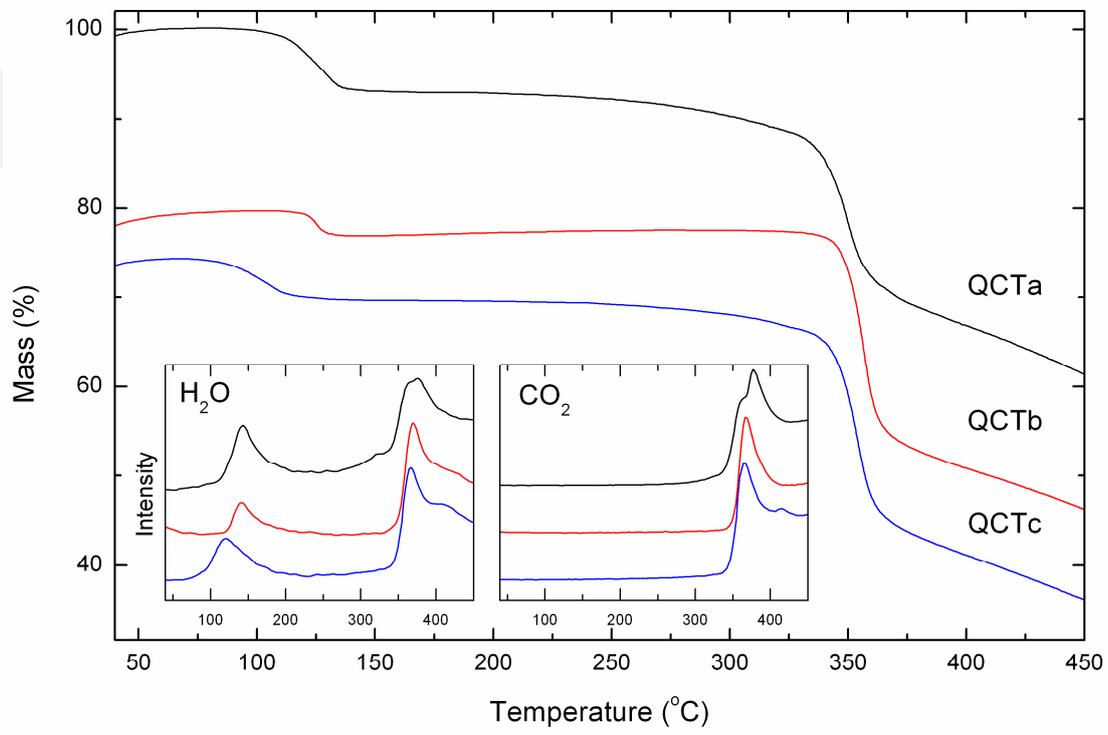


Figure 5.

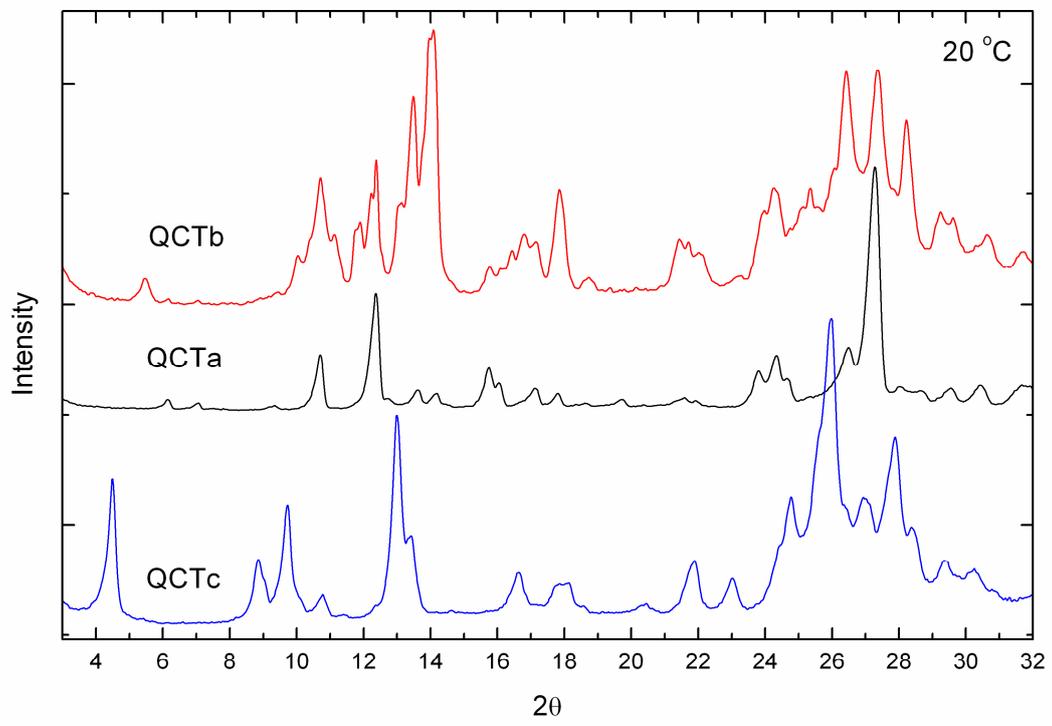


Figure 6.

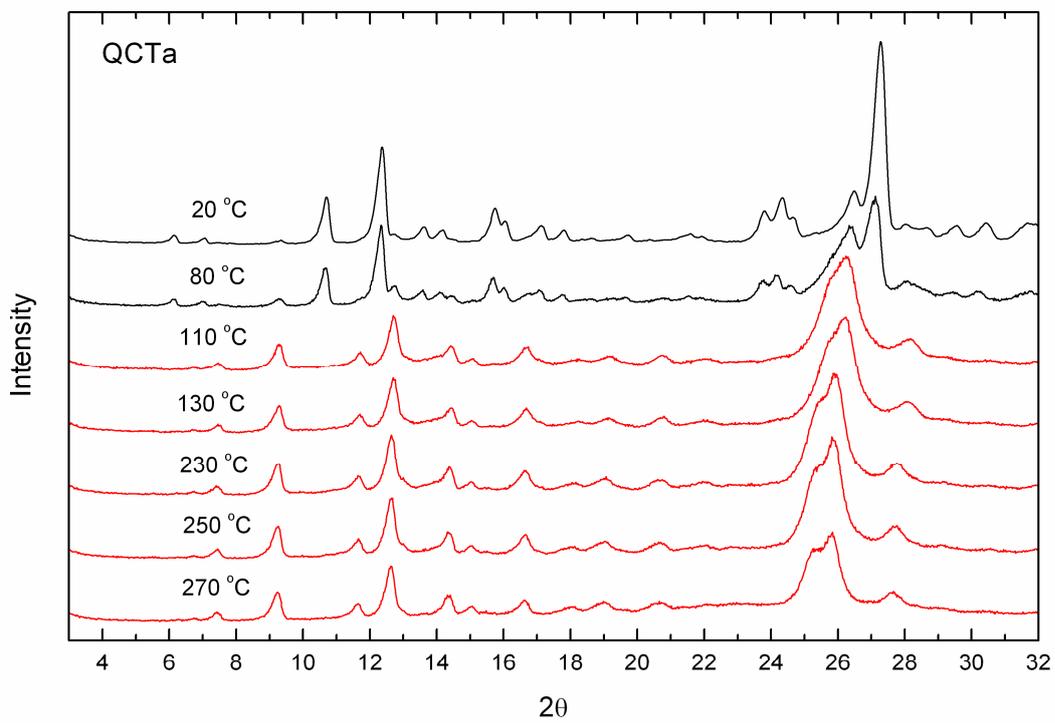


Figure 7.

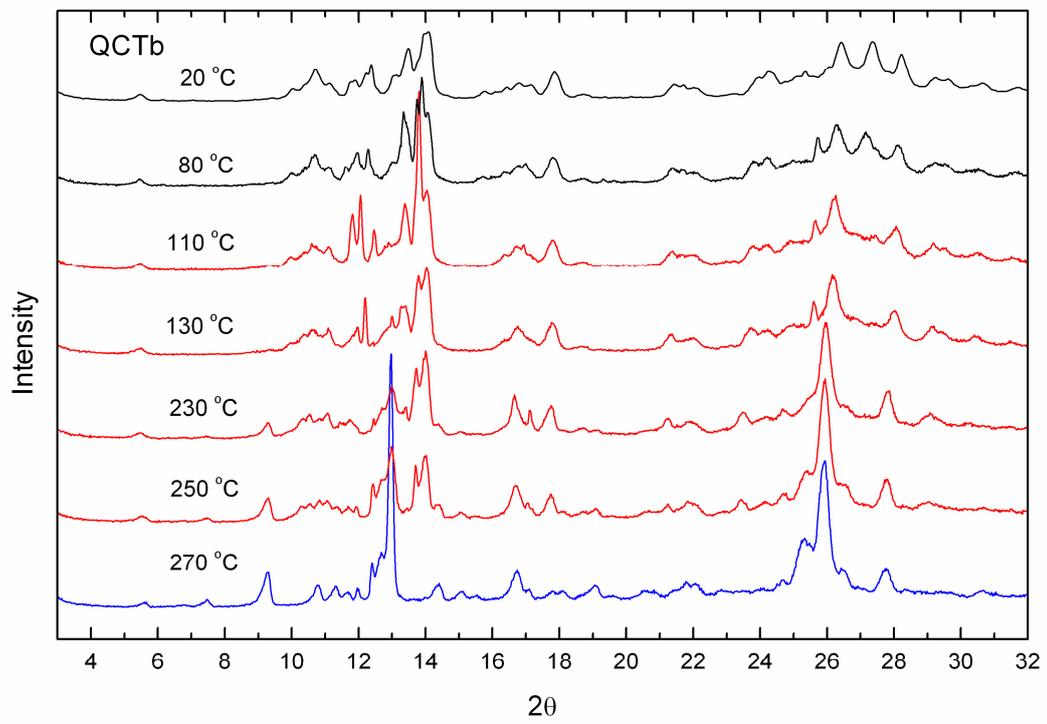


Figure 8.

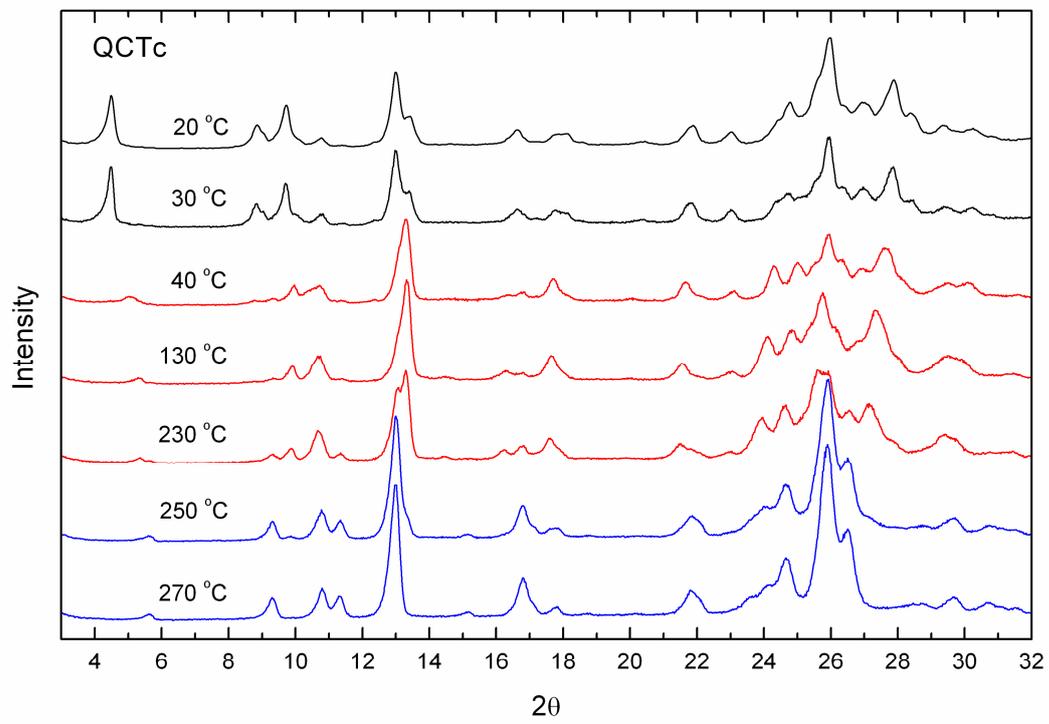


Table 1.

Quercetin samples	Diffraction peaks ($^{\circ}2\theta$)		
	Room temperature (20 $^{\circ}$ C)	Phase-transition 1 ^a (dehydration)	Phase-transition 2 ^b (solid-solid)
QCTa	10.65; 12.34; 13.51; 14.07; 15.76; 24.29; 26.52; 27.27; 29.54	7.47; 9.17; 10.77; 12.66; 14.36; 15.01; 16.71; 21.15; 25.86	-
QCTb	10.70; 12.34; 13.48; 14.02; 17.83; 24,26; 26.41; 27.34; 28.20; 29.5	11.79; 12.11; 12.44; 13.36; 13.75; 16.73; 17.77; 26.19; 28.04	7.47; 9.24; 10.77; 12.94; 14.36; 15.01; 16.71; 21.90; 25.92
QCTc	4.52; 8.86; 9.69; 13.00; 16.58; 21.86; 24.76; 25.94; 27.86	9.89; 10.72; 13.24; 17.71; 21.66; 24.31; 25.95; 27.57	7,50; 9.30; 10.83; 13.03; 14.45; 15.21; 16,71; 21.80; 25.86

^a Phase-transition 1 occurred at 110 $^{\circ}$ C for QCTa and QCTb, and at 40 $^{\circ}$ C for QCTc

^b Phase-transition 2 occurred at 270 $^{\circ}$ C for QCTb and at 250 $^{\circ}$ C for QCTc

CAPÍTULO 2. Quercetina/ciclodextrina/polímero hidrofílico: preparação e caracterização de sistemas binários e ternários

INTRODUÇÃO



O emprego da quercetina no campo farmacêutico e cosmético é limitado, sob o ponto de vista biofarmacêutico e tecnológico, pela reduzida hidrossolubilidade da aglicona, entre 0,2 e 7,7 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (AZUMA *et al.*, 2002; LAURO *et al.*, 2002; SAIJA *et al.*, 2003; MONTENEGRO *et al.*, 2007), sendo esta atribuída à formação de ligações de hidrogênio intramoleculares (OLEJNICZAK; POTRZEBOWSKI, 2004; CHEBIL *et al.*, 2007; KOONTZ *et al.*, 2009).

Diversas estratégias vêm sendo empregadas para a solubilização da quercetina em veículos aquosos:

- ✓ encapsulação em nanopartículas (BARRAS *et al.*, 2009);
- ✓ esterificação da molécula (SAIJA *et al.*, 2003; MONTENEGRO *et al.*, 2007);
- ✓ incremento de pH do meio (LAURO *et al.*, 2002);
- ✓ uso de polímeros hidrofílicos (ARCT *et al.*, 2002; SHIMOI *et al.*, 2003);
- ✓ uso de tensoativos (KIM *et al.*, 2004; CASAGRANDE *et al.*, 2007; GAO *et al.*, 2009);
- ✓ uso de emulsificantes (AZUMA *et al.*, 2002);
- ✓ uso de misturas hidroetanólicas (AZUMA *et al.*, 2002; CASAGRANDE *et al.*, 2007)

Outros estudos relatam a possibilidade de solubilização da quercetina, em veículos aquosos, por meio de sua complexação com ciclodextrinas. As condições experimentais empregadas nesses estudos são apresentadas na tabela 2.1. Porém, não foram encontrados na literatura, até o presente momento, relatos acerca da influência das condições operacionais envolvidas na preparação, em meio líquido, de complexos quercetina/ β -ciclodextrina sobre a hidrossolubilidade do flavonóide, tampouco sobre o efeito da associação desses complexos a polímeros hidrofílicos. Da mesma forma, a possibilidade de obtenção de complexos quercetina/ β -ciclodextrina, em estado sólido, por meio da secagem por nebulização de complexos preparados em meio líquido ou por simples mistura física entre as duas substâncias, ainda não foi investigada. O capítulo 2 é dedicado ao estudo destes aspectos.

Tabela 2.1. Relatos da formação de complexos quercetina/ciclodextrina na literatura.

Referências	Constantes de estabilidade aparente dos complexos (Ks, M ⁻¹)	Métodos de determinação de Ks	Métodos de preparação dos complexos em estado sólido	Técnicas para caracterização
VINADÉ (1995)	β CD = 709	Diagrama de solubilidade (A _L)	Solução aquosa+Liofilização	DRX, DSC, IV, RMN
SHAO e colaboradores (2002)	HP β CD = -	Diagrama de solubilidade (-)	Solução aquosa	DTA, IV
CALABRÒ e colaboradores (2004)	α CD = 19 β CD = 129	Diagrama de solubilidade (A _L)	Pasta/Co-evaporação/ Camada delgada	DRX, DSC, IV, RMN
PRALHAD e RAJENDRAKUMAR (2004)	β CD = 402 HP β CD = 532	Diagrama de solubilidade (A _L)	Co-evaporação+Liofilização	DRX, DSC, IV, MEV
ALVAREZ-PARRILLA e colaboradores (2005)	β CD = 1138	Fluorescência	Co-evaporação+Liofilização	DSC
KRISHNA e colaboradores (2005)	β CD	Não determinado	Pasta	-
ZHENG e colaboradores (2005)	β CD = 1028 HP β CD = 11048 SBE β CD = 25340	Diagrama de solubilidade (A _L)	Co-evaporação	Modelagem molecular, RMN
KALE e colaboradores (2006)	SBE β CD = 423	Diagrama de solubilidade (A _L)	Pasta/Co-evaporação	DC, Dissolução, DRX, DSC, IV, RMN
BERGONZI e colaboradores (2007)	α CD = 0 β CD = 396 γ CD = 0	Diagrama de solubilidade (A _L)	Pasta/Liofilização	DSC, IV, RMN
JULLIAN e colaboradores (2007)	β CD = 602 HP β CD = 1419 SBE β CD = 4032	Diagrama de solubilidade (A _L)	-	-
SRI e colaboradores (2007)	β CD = 251 HP β CD = 321	Diagrama de solubilidade (A _L)	Pasta/Co-evaporação	Dissolução, DRX, DSC, IV
DIAS e colaboradores (2008)	β CD	Não determinado	Co-precipitação	DTA, TG
LUCAS-ABELLÁN e colaboradores (2008)	β CD = 398 M β CD = 917 HP β CD = 950 β CD = 426 M β CD = 650 HP β CD = 1195	Diagrama de solubilidade (A _L) Enzimático	-	-
KOONTZ e colaboradores (2009)	γ CD	Não determinado	Co-precipitação	AC, DSC, IV, RMN, TG
ZHENG e CHOW (2009)	HP β CD	Não determinado	Solução aquosa+Nebulização	BET, Difração a laser, Dissolução, DRX, DSC, IV, MEV, TG

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Estudar a influência das condições operacionais envolvidas na preparação, em meio líquido, de complexos quercetina/ β -ciclodextrina sobre a hidrossolubilidade da aglicona;
- ✓ Estudar o efeito da associação de complexos quercetina/ β -ciclodextrina a polímero hidrofílico sobre a hidrossolubilidade da aglicona;
- ✓ Estudar a possibilidade de obtenção de complexo quercetina/ β -ciclodextrina, em estado sólido, por meio da secagem por nebulização de complexo preparado em meio líquido ou por simples mistura física entre as duas substâncias

PUBLICAÇÃO 3. Quercetin/ β -Cyclodextrin Solid Complexes Prepared in Aqueous Solution Followed by Spray-drying or by Physical Mixture

Publicado no AAPS PharmSciTech

Research Article

Quercetin/ β -Cyclodextrin Solid Complexes Prepared in Aqueous Solution Followed by Spray-drying or by Physical Mixture

Greice S. Borghetti,¹ Ivana S. Lula,² Ruben D. Sinisterra,² and Valquiria L. Bassani^{1,3}

Received 8 August 2008; accepted 31 January 2009; published online 12 March 2009

Abstract. The present study was designed to investigate the influence of operating conditions (temperature, stirring time, and excess amount of quercetin) on the complexation of quercetin with β -cyclodextrin using a 2^3 factorial design. The highest aqueous solubility of quercetin was reached under the conditions 37°C/24 h/6 mM of quercetin. The stoichiometric ratio (1:1) and the apparent stability constant ($K_s=230 \text{ M}^{-1}$) of the quercetin/ β -cyclodextrin complex were determined using phase-solubility diagrams. The semi-industrial production of a 1:1 quercetin/ β -cyclodextrin solid complex was carried out in aqueous solution followed by spray-drying. Although the yield of the spray-drying process was adequate (77%), the solid complex presented low concentration of quercetin (0.14%, w/w) and, thus, low complexation efficiency. The enhancement of aqueous solubility of quercetin using this method was limited to 4.6-fold in the presence of 15 mM of β -cyclodextrin. Subsequently, an inclusion complex was prepared via physical mixture of quercetin with β -cyclodextrin (molar ratio of 1:1 and quercetin concentration of 23% (w/w)) and characterized using infrared spectroscopy, differential scanning calorimetry, nuclear magnetic resonance spectroscopy, and scanning electron microscopy analyses. The enhancement of aqueous solubility of quercetin using this method was 2.2-fold, similar to that found in the complex prepared in aqueous solution before the spray-drying process (2.5-fold at a molar ratio of 1:1, i.e., 6 mM of quercetin and 6 mM of β -cyclodextrin).

KEY WORDS: β -cyclodextrin; complexation; physical mixture; quercetin; solubility.

INTRODUCTION

One of the main interests associated with cyclodextrins refers to the enhancement of solubility and/or dissolution rate of lipophilic drugs in aqueous media, very often resulting in improved bioavailability (1,2). β -cyclodextrin is the most useful parent cyclodextrin because of its commercial availability, low cost, and cavity size, which is suitable for complexing with aromatic and heterocyclic rings (3).

Quercetin (3,3',4',5,7-pentahydroxy flavone) (Fig. 1) belongs to the flavonoid class, naturally occurring in medicinal plants. It is also a frequent component of major dietary constituents, such as onions, apples, red wine, and green tea. Quercetin is also available in the market and can be used in the isolated form. In the literature, quercetin has been described extensively due to its broad biological properties, which are very often related to its antioxidant activity (4). On the other hand, the bioavailability of quercetin and its use in pharmaceuticals are limited by its low aqueous solubility (5–10).

Some studies have shown that the association of quercetin with cyclodextrins to form inclusion complexes

improves the aqueous solubility (5,11–17) and dissolution rate (16) of the flavonoid. Most quercetin/ β -cyclodextrin solid complexes are prepared in liquid media, (aqueous solution submitted to freeze-drying (12,14,18), co-evaporation (11,16), or thin layer (11) methods) or semisolid media (kneading method (11,14,16,19)). However, no study to date has used a factorial design to assess the influence of operating conditions such as temperature, stirring time, and excess amount of quercetin on the complexation of quercetin with β -cyclodextrin. The objective of the present study was to assess these aspects, as well as the possibility of preparing solid complexes using spray-drying or physical mixture methods.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Reference quercetin (purity 98%) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), and pharmaceutical grade quercetin was purchased from DEG (São Paulo, Brazil). β -cyclodextrin was supplied by Roquette Frères (Lestrem, France). Potassium bromide was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Water was purified using a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). Analytical grade methanol was purchased from Vetec (Rio de Janeiro, Brazil). Dimethylsulfoxide- d_6 was supplied by Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA).

¹Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

²Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

³To whom correspondence should be addressed. (e-mail: valquiria@pq.cnpq.br)

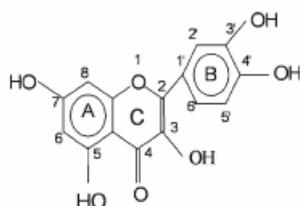


Fig. 1. Quercetin: chemical structure

Methods

Factorial design

A 2^3 factorial design was employed to obtain Higuchi and Connors phase-solubility diagrams (20). Excess amounts of quercetin (3 or 6 mM) were added to 10.0 mL of water or aqueous solutions containing increasing concentrations of β -cyclodextrin (0 to 9 mM). Flasks were covered with aluminum foil to protect quercetin from light. The resulting dispersions were magnetically stirred using an IKA HE4B-thermostated water bath for 24 or 48 h, at 25°C or 37°C. Dispersions were then filtered (25°C) through a 0.45- μ m membrane (Millipore HAWP). An aliquot of 4.0 mL of the supernatant was diluted with methanol to 10.0 mL and quercetin content was determined in duplicate by spectrophotometry at 372 nm (Hewlett-Packard 8452A UV-Vis Spectrophotometer). The ultraviolet spectrophotometry method was validated according to the parameters established in the International Conference on Harmonization (21) and in the US Pharmacopoeia (22) for specificity, linearity, intermediary precision, repeatability, and accuracy in the concentration range of 1.5 to 12.0 μ g mL⁻¹.

Phase-solubility study

Phase-solubility diagrams were obtained in triplicate, following the factorial design described above. Quercetin/ β -cyclodextrin molar ratios were 1:0, 1:0.5, 1:1, 1:1.5, 1:2, and 1:2.5. Temperature, stirring time, and excess amount of quercetin were set as defined in the factorial design (37°C/24 h/6 mM). The apparent stability constant (K_s , M⁻¹) of quercetin/ β -cyclodextrin complexes was calculated based on the phase-solubility diagram according to the following equation:

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

where S_0 is the intrinsic solubility of quercetin (quercetin solubility in the absence of β -cyclodextrin) (M). The enhancement of quercetin solubility in the presence of β -cyclodextrin in the complex prepared in aqueous solution, before the spray-drying process, was also calculated based on the phase-solubility diagram.

Preparation of solid complex in aqueous solution followed by spray-drying

Approximately 10 L of an aqueous solution containing quercetin/ β -cyclodextrin complex were prepared following the above-described phase-solubility study procedure, at a

molar ratio of 1:1 (6 mM of quercetin and 6 mM of β -cyclodextrin). The solution was spray-dried using a Niro Production Minor atomizer, under the following operating conditions: inlet air temperature, 175°C; outlet air temperature, 99°C; atomizer rotation rate, 10,900 rpm; and feed solution flow, 143 mL min⁻¹. The yield of the spray-drying process was measured as the powder weight percentage obtained at the end of the operation compared with the amount of solid materials (quercetin plus cyclodextrin) present in the sprayed solution. A solid complex sample was dissolved in methanol (1.4 mg mL⁻¹), filtered through a 0.45- μ m membrane (Millipore HVLP), and the quercetin content was determined in triplicate by spectrophotometry at 372 nm.

Preparation of solid complex by physical mixture

Accurately weighed amounts of quercetin and β -cyclodextrin were mixed at a molar ratio of 1:1 (6 mM of quercetin and 6 mM of β -cyclodextrin), using a cubic blender (Erweka AR400) at 25 rpm during 30 min. A sample of physical mixture was dissolved in methanol (0.4 mg mL⁻¹), filtered through a 0.45- μ m membrane (Millipore HVLP), and the quercetin content was determined in triplicate by spectrophotometry at 372 nm. The enhancement of aqueous solubility of quercetin in the presence of β -cyclodextrin in the solid complex prepared by physical mixture was determined following the above-described phase-solubility study procedure.

Characterization of quercetin/ β -cyclodextrin complexes

Quercetin/ β -cyclodextrin complexation was characterized by comparing infrared (IR) spectra, differential scanning calorimetry curves, nuclear magnetic resonance spectra, and scanning electron microscopy photomicrographs obtained for quercetin, β -cyclodextrin, and quercetin/ β -cyclodextrin solid complexes (prepared by physical mixture or in aqueous solution followed by spray-drying).

Infrared spectroscopy

IR spectra obtained for samples were recorded in a frequency range between 4,000 and 400 cm⁻¹, using a resolution of 4 cm⁻¹ and 40 accumulations, in a Shimadzu DR-8001 spectrometer. Discs were prepared by compressing blends corresponding to 1.5 mg of the samples and 150 mg of potassium bromide.

Differential scanning calorimetry

Thermal analysis of the samples was performed using a Shimadzu DSC-60 calorimeter. Samples of 1 to 2 mg were accurately weighed in aluminum pans and crimped. Operating conditions were 10°C min⁻¹ of heating rate (25°C to 350°C) and 50 mL min⁻¹ of nitrogen gas flow. Temperature was calibrated using indium (mp 157°C) and zinc (mp 420°C) as standards.

Nuclear magnetic resonance spectroscopy

Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra obtained for samples were recorded in a Bruker DRX400-Avance spec-

trometer equipped with a 5-mm diameter inverse probe head and a z-gradient coil and operating at 400 MHz, 27°C, using DMSO- d_6 as solvent. Chemical shifts were reported in parts per million, using tetramethylsilane (0 ppm) as internal standard. One-dimensional ^1H NMR spectra were obtained under standard conditions. Two-dimensional ^1H homonuclear 2D-ROESY spectra were obtained to get insights on the supramolecular geometry of the inclusion complexes (ROESY spinlock pulse=600 ms).

Scanning electron microscopy

Photomicrographs obtained for samples were taken at a voltage of 10 kV and $\times 1,000$ or $\times 3,000$ magnification using a JSM 6060 microscope. Samples were mounted on brass stubs using double-sided tape and vacuum-coated with a thin layer of gold.

Statistical analysis

ANOVA was used to evaluate the significance of the results obtained in the factorial design, namely quercetin concentration in the presence of 15 mM of β -cyclodextrin in each phase-solubility diagram. Significance level was set at $P < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Factorial Design

Knowledge of different factors that can influence drug/cyclodextrin complexation allows to select the best conditions for preparing complexes with the desirable properties and yield. Many studies assessing quercetin/cyclodextrin complexes (11–14,16,17) using the phase-solubility technique do not mention the exact amount of quercetin added to cyclodextrin solutions; neither do they inform the influence of the operating conditions employed, such as temperature and stirring time. This lack of information about the influence temperature, stirring time, and excess amount of quercetin on quercetin/ β -cyclodextrin complexation in aqueous media was the motivation of our investigation employing a 2^3 factorial design.

All the factors evaluated presented a significant influence ($P < 0.05$) on quercetin/ β -cyclodextrin complexation (Table I); the same was observed when the interaction

between temperature and stirring time was analyzed ($F^d = 14.9$). However, as shown in Fig. 2, the most important factor was temperature: all the curves obtained at 37°C resulted in an increased enhancement of quercetin solubility (continuous lines). Figure 2 also shows the influence of excess amount of quercetin (3 or 6 mM): the complex formation seems to occur faster when the amount is higher (6 mM). In more concentrated conditions, the interaction is easier. Once inside the cyclodextrin cavity, the drug molecule makes conformational adjustments to take maximum advantage of the interaction forces that exist. Thus, the final equilibrium to form the complex can take a long time to be reached (3). In summary, the factorial design showed that the enhancement of quercetin solubility was more significant under the following conditions: 37°C/48 h/6 mM or 37°C/24 h/6 mM. Taking into consideration that stirring time represents a cost factor in semi-industrial production, the operating conditions 37°C/24 h/6 mM were selected for the preparation of the solid complex in aqueous solution followed by spray-drying.

Phase-Solubility Study

The phase-solubility diagram obtained for the quercetin/ β -cyclodextrin complex (Fig. 3) showed a linear relationship between increases in the aqueous solubility of quercetin and β -cyclodextrin concentration ($R^2 = 0.978$). According to Higuchi and Connors (20), the curve obtained can be classified as type A_L .

The apparent stability constant of a drug/cyclodextrin complex represents the binding strength between the drug and cyclodextrin and has an important influence on the extent of drug release (23). The apparent stability constant determined for the quercetin/ β -cyclodextrin complex in our study was 230 M^{-1} , suggesting a relatively weak interaction between both molecules. This value is similar to those reported by Calabrò *et al.* (11), Sri *et al.* (16), Bergonzi *et al.* (14), Lucas-Abellán *et al.* (17), and Pralhad and Rajendrakumar (12): $K_s = 129 \text{ M}^{-1}/\text{unbuffered}/25^\circ\text{C}$; $K_s = 251 \text{ M}^{-1}/\text{unbuffered}/28^\circ\text{C}$; $K_s = 396 \text{ M}^{-1}/\text{unbuffered}/25^\circ\text{C}$; $K_s = 398 \text{ M}^{-1}/\text{pH } 4.5/25^\circ\text{C}$, and $K_s = 402 \text{ M}^{-1}/\text{unbuffered}/25^\circ\text{C}$, respectively; on the other hand, it is considerably lower than those reported by Jullian *et al.* (15), Vinadé and Petrovick (5), Zheng *et al.* (13), and Alvarez-Parrilla *et al.* (18): $K_s = 602 \text{ M}^{-1}/\text{unbuffered}/30^\circ\text{C}$; $K_s = 709 \text{ M}^{-1}/\text{unbuffered}/37^\circ\text{C}$; $K_s =$

Table I. Results Obtained Using the 2^3 Factorial Design (ANOVA)

Factor or interaction	Dof	SS	MS	F ^a
A (stirring time)	1	1.780×10^{-5}	1.780×10^{-5}	10.95
B (temperature)	1	2.763×10^{-4}	2.763×10^{-4}	170.01
C (quercetin concentration)	1	4.859×10^{-5}	4.859×10^{-5}	29.90
Interaction	1			
A×B	1	2.422×10^{-5}	2.422×10^{-5}	14.90
A×C	1	3.200×10^{-6}	3.200×10^{-6}	1.97
B×C	1	4.800×10^{-6}	4.800×10^{-6}	2.95
A×B×C	1	3.648×10^{-8}	3.648×10^{-8}	0.02
Error	8	1.300×10^{-5}	1.625×10^{-6}	
Total	15	3.880×10^{-4}		

dof degrees of freedom, SS sum of squares, MS mean square

^a $F_{(1,8)}$; α 0.05=5.32

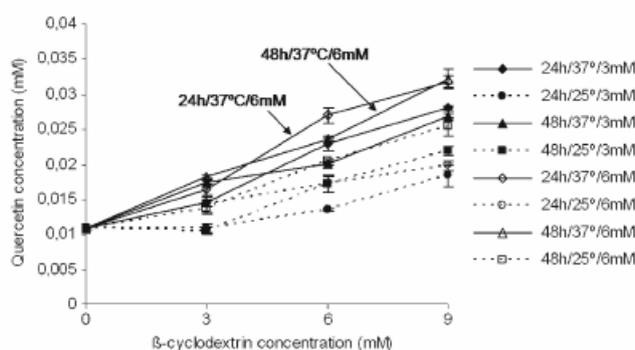


Fig. 2. Phase-solubility diagrams of quercetin/ β -cyclodextrin complexes obtained using a 2^3 factorial design ($n=2$). Stirring time of 24 or 48 h, temperature of 25°C or 37°C and excess amount of quercetin of 3 or 6 mM

$1,028 \text{ M}^{-1}/\text{pH } 3.0/24^\circ\text{C}$ and $K_s=1,138 \text{ M}^{-1}/\text{pH } 7.0/25^\circ\text{C}$, respectively. Although it is not possible to explain these differences, the influence of ionization of the quercetin molecule as a result of the media pH employed in those experiments [$\text{pK}_{a1}=7.0$ and $\text{pK}_{a2}=9.1$ (24–26)] cannot be ruled out. The ionized form of the drug usually yields less stable complexes than the unionized form. This is attributed to the increased hydrophilicity of the drug upon ionization, which reduces interaction between the drug and the hydrophobic cavity of cyclodextrin (e.g., Van der Waals and hydrophobic forces), thus, increasing the fraction of free drug molecules in the solution (23). The high apparent stability constant ($K_s=1,028 \text{ M}^{-1}$) reported by Zheng *et al.* (13), obtained in acidic aqueous media (phosphate buffer at pH 3.0), corroborates our hypothesis, while the unexpectedly high apparent stability constant ($K_s=1,138 \text{ M}^{-1}$) reported by Alvarez-Parrilla *et al.* (18) at pH 7.0 (phosphate buffer) is probably influenced by the spectroscopic method employed in that study, which usually provides higher values when compared with the phase-solubility method. On the other hand, Lucas-Abellán *et al.* (17) also employed acidic aqueous media (acetate buffer at pH 4.5) and found a lower apparent stability constant ($K_s=398 \text{ M}^{-1}$), which can possibly be explained by the use of an ultrasonic bath for 60 min in the phase-solubility study, a procedure that is well known to provide heat to the system. Since complexation is an exothermic process, the enthalpy of the system decreases during complex formation (23,27). Thus, in our study, in addition to pH value close to 6.0 (unbuffered aqueous media), the temperature of 37°C may also have contributed to the low apparent stability constant found for the quercetin/ β -cyclodextrin complex.

Aqueous solubility of quercetin in the absence of β -cyclodextrin was 0.011 mM. In the presence of 15 mM of β -cyclodextrin, the solubility enhanced significantly (4.6-fold; $P<0.05$). However, as shown in Fig. 3, complexation efficiency was not very high, because relatively large amounts of β -cyclodextrin are necessary to solubilize low amounts of quercetin in an aqueous media. This result can be related to the low apparent stability constant found in the quercetin/ β -cyclodextrin complex as well as to the occurrence of polymorphisms, since different intrinsic solubilities of polymorphic forms of quercetin have been reported by Borghetti *et al.* (28). Some strategies aimed at improving complexation efficiency between quercetin and β -cyclodextrin have been previously

tested in our laboratory, such as the use of hydrophilic polymers (hydroxypropylmethyl-cellulose (HPMC)) (29). While the association of quercetin with β -cyclodextrin (15 mM) yielded an aqueous solubility enhancement of 4.6-fold, the addition of HPMC (0.1 %, w/w) to the system resulted in a 6.5-fold enhancement. The association of quercetin with hydroxypropyl- β -cyclodextrin, in the presence or not of HPMC, has been also tested.

In addition to determining the apparent stability constant of drug/cyclodextrin complexes, the phase-solubility diagram can also be used to define the necessary cyclodextrin concentration to obtain the desired drug solubility in aqueous media. In our study, the molar ratio of 1:1 was chosen for the semi-industrial production of quercetin/ β -cyclodextrin solid complex in aqueous solution followed by spray-drying. It is worth mentioning that the minimum amount of cyclodextrin necessary to solubilize the drug in the aqueous medium should be used, since its excess can affect complex formation equilibrium and consequently reduce drug bioavailability (1). Moreover, considering the high molecular weight of cyclodextrin, an excess can pose limitations for its incorporation in a vehicle.

Preparation of Solid Complex in Aqueous Solution followed by Spray-Drying

The solid complex was prepared by spray-drying an aqueous solution containing 1:1 quercetin/ β -cyclodextrin. The presence of cyclodextrin resulted in low adherence of the powder to the spray-dryer wall, which explains the adequate yield obtained in the spray-drying process (77%). However, quercetin concentration in the solid complex was only 0.14 % (w/w). Although, in general, spray-drying is not a viable method for drying complexes containing heat-labile drugs (3), a study conducted by Costa (30) demonstrated that quercetin remained stable when submitted to spray-drying temperatures. In addition, no degradation was observed when we analyzed a spray-dried quercetin aqueous dispersion by liquid chromatography (data not shown). Therefore, the low quercetin concentration observed in the solid complex in our study is probably due to the low complexation efficiency between quercetin and β -cyclodextrin.

Infrared Spectroscopy

IR spectrum obtained for quercetin presented typical molecule bands and peaks: $3,409\text{--}3,144 \text{ cm}^{-1}$ (O–H),

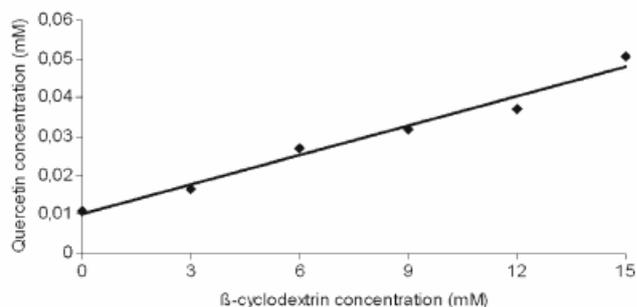


Fig. 3. Phase-solubility diagram of quercetin/ β -cyclodextrin complex ($n=3$). Stirring time of 24 h, temperature of 37°C, and excess amount of quercetin of 6 mM

1,667 cm^{-1} (C=O), 1,610 cm^{-1} (C=C), 1,381 cm^{-1} (C-OH), and 1,264 cm^{-1} (C-O-C; 31–35). IR spectrum obtained for β -cyclodextrin presented a large band and a peak in the region of 2,900 to 3,900 cm^{-1} , a short band between 1,600 and 1,700 cm^{-1} and a large band containing distinct peaks in the region of 900 to 1,200 cm^{-1} (36). IR spectrum obtained for quercetin/ β -cyclodextrin solid complex prepared in aqueous solution followed by spray-drying presented the same profile observed for β -cyclodextrin, probably due to the low quercetin concentration in the solid complex. An increased intensity of bands and peaks was also observed. In the IR spectrum obtained for quercetin/ β -cyclodextrin solid complex prepared by physical mixture, quercetin bands and peaks overlapped with most of β -cyclodextrin bands and peaks, except for those in the 3,000 cm^{-1} region and between 850 and 1,000 cm^{-1} . The increased intensity of bands and peaks, the presence of a new peak in the 2,500 cm^{-1} region, and the different band shapes observed between 1,000 and 1,150 cm^{-1} when compared with quercetin and β -cyclodextrin spectra suggest an interaction between quercetin and β -cyclodextrin.

Differential Scanning Calorimetry

The differential scanning calorimetry (DSC) curve obtained for quercetin (Fig. 4b) presented two endothermic events: the first one, with an onset temperature of 86°C, corresponds to the loss of bounded water; the other, with an onset temperature of 319°C, is related to the melting point, followed by decomposition (31,37). These events were also observed in the DSC curve obtained for β -cyclodextrin (Fig. 4a), where another endothermic event took place at approximately 220°C corresponding to an irreversible transformation process within the β -cyclodextrin molecule (16). The DSC curve obtained for quercetin/ β -cyclodextrin solid complex prepared in aqueous solution followed by spray-drying (Fig. 4d) presented the same thermal profile observed for β -cyclodextrin, probably due to the low concentration of quercetin in the solid complex. However, the endothermic event observed at approximately 220°C for β -cyclodextrin was not detected in the solid complex. The reduction of the endothermic event related to the loss of bounded water can

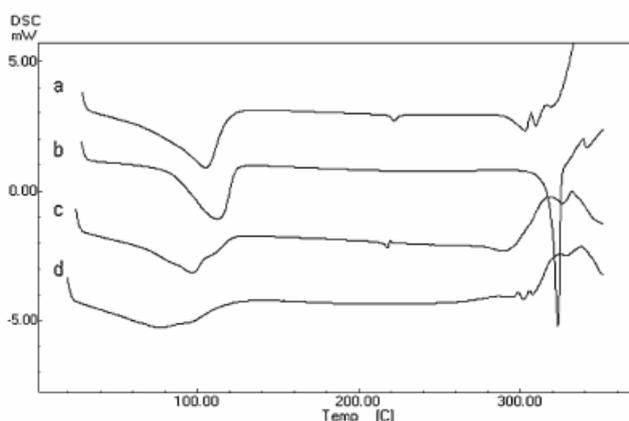


Fig. 4. Differential scanning calorimetry curves of β -cyclodextrin **a**; quercetin **b**; physical mixture of quercetin with β -cyclodextrin **c**; quercetin/ β -cyclodextrin solid complex **d**

be explained by the elimination of water during the spray-drying process. Finally, in the DSC curve obtained for quercetin/ β -cyclodextrin solid complex prepared by physical mixture (Fig. 4c), it is possible to observe the endothermic events corresponding to loss of bounded water in both molecules and the endothermic event related to the irreversible transformation process within the β -cyclodextrin molecule. However, the absence of the endothermic event corresponding to quercetin's melting point suggests an interaction between quercetin and β -cyclodextrin in the physical mixture.

Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

^1H NMR spectrum obtained for the quercetin/ β -cyclodextrin solid complex prepared in aqueous solution followed by spray-drying presented only β -cyclodextrin hydrogen signals (data not shown), probably due to the low quercetin concentration in the solid complex. On the other hand, ^1H NMR spectrum obtained for the fresh physical mixture (Fig. 5c) presented hydrogen signals of quercetin and β -cyclodextrin. The comparison between this spectrum and that obtained for quercetin (Fig. 5a) reveals: broadening of -OH signals ($\delta_{5\text{-OH}}$ 12.50, $\delta_{7\text{-OH}}$ 10.80, $\delta_{3\text{-OH}}$ 9.60, $\delta_{4\text{-OH}}$ 9.33 and $\delta_{3'\text{-OH}}$ 9.30) and loss of resolution in hydrogen signals of the B-ring of quercetin molecule [H-2' ($\delta_{7.69}$, d), H-6' ($\delta_{7.55}$, d) and H-5' ($\delta_{6.89}$, d)] (31,32,35). These differences suggest an interaction between quercetin and β -cyclodextrin in the fresh physical mixture. Nuclear Overhauser Effects (NOEs) between quercetin and β -cyclodextrin hydrogens were not observed in the fresh physical mixture. Thus, a new physical mixture was prepared following the same procedure and then stored during approximately 2 months. The ^1H NMR spectrum obtained for the stored physical mixture also presented hydrogen signals of both compounds (Fig. 5b), suggesting an interaction between quercetin and β -cyclodextrin. In the stored physical mixture, NOEs were observed between quercetin hydrogens H-2' ($\delta_{7.69}$, d), H-6' ($\delta_{7.55}$, d), H-5' ($\delta_{6.89}$, d), H-8 ($\delta_{6.42}$, d), and H-6 ($\delta_{6.20}$, d) (31,32,35) and β -cyclodextrin hydrogens H-3 ($\delta_{3.89}$, d) and H-6 ($\delta_{3.69\text{--}3.80}$, d) (11) (Fig. 6). These results suggest that the quercetin molecule was located inside the β -cyclodextrin cavity and, consequently, a quercetin/ β -cyclodextrin inclusion complex was formed in the stored physical mixture. The findings also suggest that inclusion complex formation between quercetin and β -cyclodextrin by physical mixture is a time-dependent process.

Scanning Electron Microscopy

The photomicrographs of the samples obtained by scanning electron microscopy (SEM) are shown in the Fig. 7. The β -cyclodextrin particles (Fig. 7a) presented a parallelogram shape, whereas quercetin (Fig. 7b) presented columnar crystals. The quercetin/ β -cyclodextrin solid complex prepared by physical mixture (Fig. 7c) did not suggest an interaction between both molecules, because quercetin crystals simply covered the surface of β -cyclodextrin particles. The quercetin/ β -cyclodextrin solid complex prepared in aqueous solution followed by spray-drying presented amorphous particles with shrunken spherical shape (Fig. 7d), a

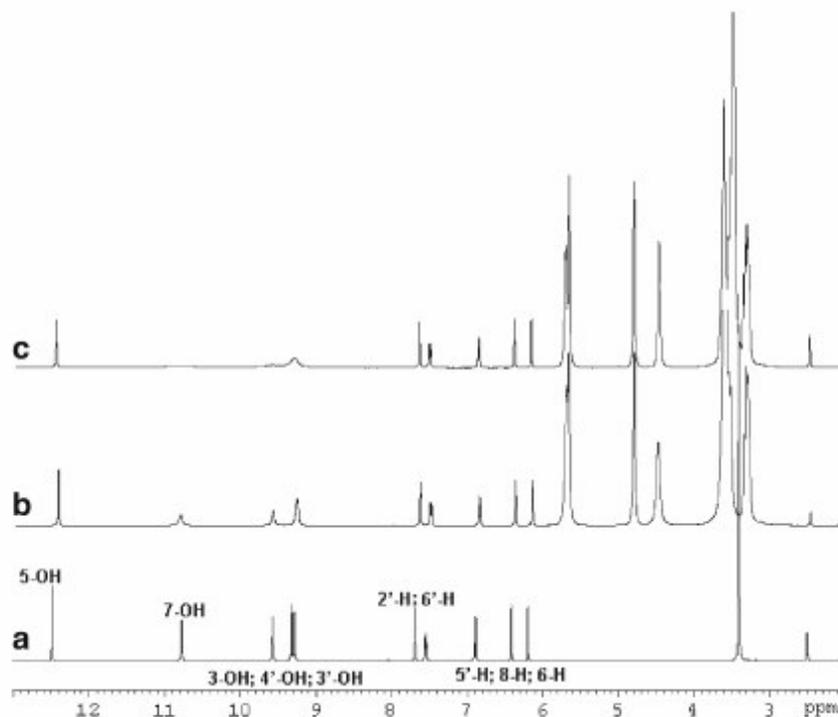


Fig. 5. ^1H NMR spectra of quercetin a; stored physical mixture of quercetin with β -cyclodextrin b; fresh physical mixture of quercetin with β -cyclodextrin c

finding that is in accordance with the studies conducted by Calabrò *et al.* (11), Pralhad and Rajendrakumar (12), and Sri *et al.* (16), which employed X-ray powder diffractometry to demonstrate that drug/cyclodextrin solid complexes exist in amorphous state. However, our study could not suggest an interaction between quercetin and β -cyclodextrin, because it was impossible to differentiate between the morphology of solid complex and that of the isolated compounds.

Taken together, our IR, DSC, NMR, and SEM analyses suggest the formation of a quercetin/ β -cyclodextrin solid complex by physical mixture, a different method when compared to others previously described, which employ

liquid or semisolid media (5,11–19). According to Zheng *et al.* (13) who elucidated the mode of interaction between quercetin and β -cyclodextrin using a molecular modeling study, the B-ring, the C-ring, and part of the A-ring (except C_6) of quercetin are positioned inside the β -cyclodextrin cavity. In the present study, indications of interaction between quercetin and β -cyclodextrin in the solid complex prepared in aqueous solution followed by spray-drying were absent both on the NMR (due to the low quercetin concentration) and SEM analyses (due to the impossibility to differentiate between the morphology of solid complex and that of the isolated compounds).

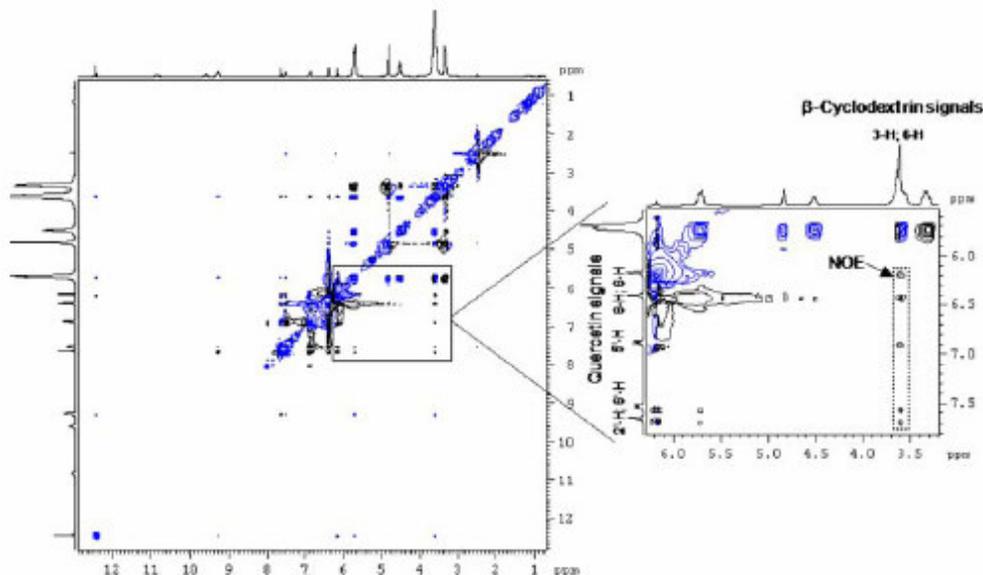


Fig. 6. 2D-ROESY spectrum of stored physical mixture of quercetin with β -cyclodextrin

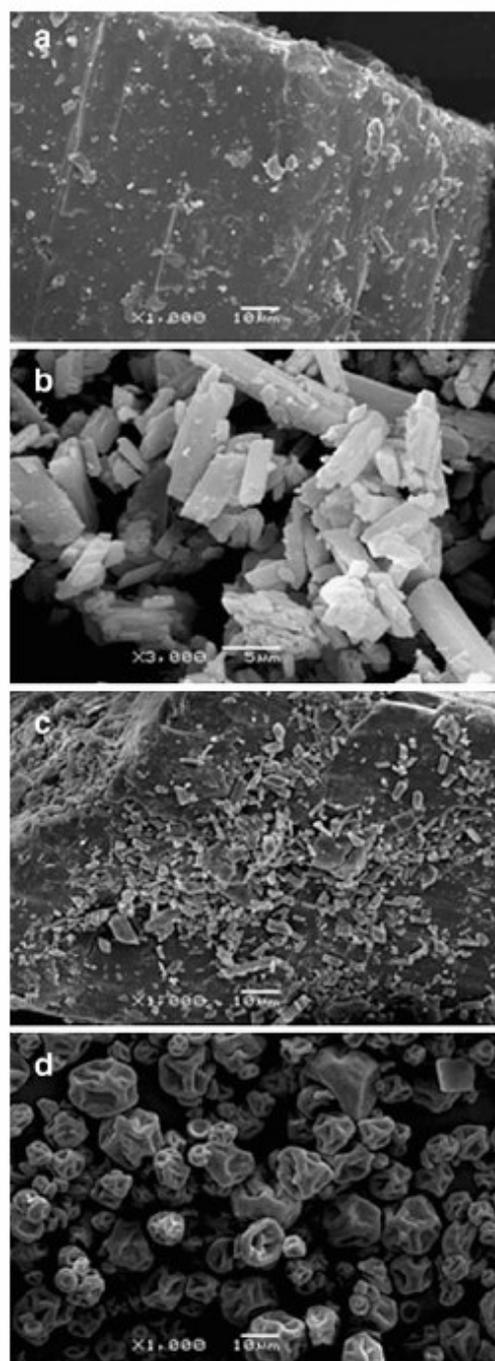


Fig. 7. Photomicrographs obtained by scanning electron microscopy of β -cyclodextrin a; quercetin b; physical mixture of quercetin with β -cyclodextrin c; quercetin/ β -cyclodextrin solid complex d

Drug/cyclodextrin complexation in physical mixtures has been previously reported by Del Valle (3). According to that author, drug/cyclodextrin complexes can be formed either in liquid or solid state by simply adding the drug to cyclodextrin and mixing both compounds together. The mixing time required to complete complexation and the effectiveness of the preparation method depend on the nature of the drug and cyclodextrin. In the present study, although the solid complex prepared by physical mixture showed a higher concentration

of quercetin (23 %, w/w), complexation efficiency, measured by the enhancement of quercetin solubility, was similar to that found in the complex prepared in aqueous solution before the spray-drying process: 2.2- and 2.5-fold, respectively, at a quercetin: β -cyclodextrin molar ratio of 1:1 (6 mM of quercetin and 6 mM of β -cyclodextrin).

Aqueous solution is the method most widely used in the preparation of drug/cyclodextrin complexes. In the liquid state, more cyclodextrin molecules are available for complexation when compared with solid-state preparations, in which only surface molecules of the cyclodextrin particles can form a complex with the drug. On the other hand, the main disadvantage associated with the aqueous media method regards scale-up. Because of the limited solubility of β -cyclodextrin, large volumes of water have to be used. Container capacity, time and energy for heating and cooling, and treatment of undissolved solids may generate cost impacts. Moreover, the aqueous solution method is not a continuous process because it depends on solvent removal (3).

In the present study, the physical mixture was prepared in a cubic blender, equipment commonly used in industrial scale. Physical mixture preparation in a mortar, as described by Pralhad and Rajendrakumar (12), Sri *et al.* (16), and Alvarez-Parrilla *et al.* (18), is only possible in laboratory scale. The preparation of drug/cyclodextrin solid complexes by physical mixture method has the advantage of being a one-step process, where neither water nor heat are necessary, resulting in a lower cost when compared with aqueous solutions (3).

CONCLUSIONS

The present report is the first to demonstrate the influence of the operating conditions for quercetin/ β -cyclodextrin complexation in aqueous media using a 2^3 factorial design. The best conditions were 37°C/24 h/6 mM of quercetin (stoichiometric ratio of 1:1 and $K_s=230 M^{-1}$). Enhancement of aqueous solubility of quercetin was limited to 4.6-fold in the presence of 15 mM of β -cyclodextrin. Although the yield of the spray-drying process of 1:1 quercetin/ β -cyclodextrin complex produced in aqueous solution was adequate (77 %), the solid complex presented a low concentration of quercetin (0.14 %, w/w) and, thus, low complexation efficiency. This is also the first study to report the formation of 1:1 quercetin/ β -cyclodextrin inclusion complex by physical mixture, using different analytical techniques. The physical mixture contained 23 % (w/w) of quercetin and presented an enhancement of quercetin solubility of 2.2-fold, similar to that obtained in the complex prepared in aqueous solution before the spray-drying process (2.5-fold) when quercetin and β -cyclodextrin concentrations were 6 mM (molar ratio of 1:1). Our findings suggest that the physical mixture method is an adequate alternative method for the preparation of quercetin/ β -cyclodextrin solid complexes, since it is a one step process as well as neither water nor heat are necessary.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho

Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and to Fundação de Amparo ao Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) for the financial support and scholarships.

REFERENCES

1. T. Loftsson, D. Hreinsdóttir, and M. Másson. Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs. *Intern J Pharm.* 302:18–28 (2005).
2. M. E. Brewster, and T. Loftsson. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv Drug Del Rev.* 59:645–666 (2007).
3. E. M. M. Del Valle. Cyclodextrins and their uses: a review. *Proc Biochem.* 39:1033–1046 (2004).
4. I. Erlund. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability and epidemiology. *Nutr Rev.* 24:851–874 (2004).
5. E. R. C. Vinadé, and P. R. Petrovick. Influência da adição de polissorbato 80 e de β -ciclodextrina sobre a solubilidade de quercetina. *Rev Port Farm.* XLVIII:149–152 (1998).
6. K. Azuma, K. Ippoushi, H. Ito, H. Higashio, and J. Terao. Combination of lipids and emulsifiers enhances the absorption of orally administered quercetin in rats. *J Agric Food Chem.* 50:1706–1712 (2002).
7. M. R. Lauro, M. L. Torre, L. Maggi, F. Simone, U. Conte, and R. P. Aquino. Fast- and slow-release tablets for oral administration of flavonoids: rutin and quercetin. *Drug Devel Ind Pharm.* 28:371–379 (2002).
8. A. Saija, A. Tomaino, D. Trombetta, M. L. Pellegrino, B. Tita, C. Messina, F. P. Bonina, C. Rocco, G. Nicolosi, and F. Castelli. "In vitro" antioxidant and photoprotective properties and interaction with model membranes of three new quercetin esters. *Eur J Pharm Biopharm.* 56:167–174 (2003).
9. A. Bertrand, S. Morel, F. Lefoulon, Y. Rolland, P. Monsan, and M. Remaud-Simeon. *Leuconostoc mesenteroides* glucanase synthesis of flavonoid glucosides by acceptor reactions in aqueous-organic solvents. *Carb Res.* 341:855–863 (2006).
10. L. Montenegro, C. Carbone, C. Maniscalco, D. Lambusta, G. Nicolosi, C. A. Ventura, and G. Puglisi. In vitro evaluation of quercetin-3-O-acyl esters as topical prodrugs. *Intern J Pharm.* 336:257–262 (2007).
11. M. L. Calabrò, S. Tommasini, P. Donato, D. Raneri, R. Stancanelli, P. Ficarra, R. Ficarra, C. Costa, S. Catania, C. Rustichelli, and G. Gamberini. Effects of α - and β -cyclodextrin complexation on the physico-chemical properties and antioxidant activity of some 3-hydroxyflavones. *J Pharm Biomed Anal.* 35:365–377 (2004).
12. T. Pralhad, and K. Rajendrakumar. Study of freeze-dried quercetin-cyclodextrin binary systems by DSC, FT-IR, X-ray diffraction and SEM analysis. *J Pharm Biomed Anal.* 34:333–339 (2004).
13. Y. Zheng, I. S. Haworth, Z. Zuo, M. S. S. Chow, and A. H. L. Chow. Physicochemical and structural characterization of quercetin-beta-cyclodextrin complexes. *J Pharm Sci.* 94:1079–1089 (2005).
14. M. C. Bergonzi, A. R. Bilia, L. Bari, G. Mazzi, and F. F. Vincieri. Studies on the interactions between some flavonols and cyclodextrins. *Bioorg Med Chem Let.* 17:5744–5748 (2007).
15. C. Jullian, L. Moyano, C. Yañez, and C. Olea-Azar. Complexation of quercetin with three kinds of cyclodextrins: an antioxidant study. *Spectr Acta Part A: Mol Biomol Spectrosc.* 67:230–234 (2007).
16. K. V. Sri, A. Kondaiah, J. V. Ratna, and A. Annapurna. Preparation and characterization of quercetin and rutin cyclodextrin inclusion complexes. *Drug Dev Ind Pharm.* 33:245–253 (2007).
17. C. Lucas-Abellán, I. Fortea, J. A. Gabaldón, and E. Núñez-Delgado. Encapsulation of quercetin and myricetin in cyclodextrins at acidic pH. *J Agric Food Chem.* 56:255–259 (2008).
18. E. Alvarez-Parrilla, L. A. La Rosa, F. Torres-Rivas, J. Rodrigo-García, and G. A. González-Aguilar. Complexation of apple antioxidants: chlorogenic acid, quercetin and rutin by β -cyclodextrin (β -CD). *J Incl Phenom Macr Chem.* 53:121–129 (2005).
19. K. M. Krishna, A. Annapurna, G. S. Gopal, C. R. V. Chalam, K. Madan, V. K. Kumar, and G. J. Prakash. Partial reversal by rutin and quercetin of impaired cardiac function in streptozotocin-induced diabetic rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 83:343–355 (2005).
20. T. Higuchi, and K. A. Connors. Phase-solubility techniques. *Adv Anal Chem Instr.* 4:117–212 (1965).
21. International Conference on Harmonization. (ICH). *Validation of analytical procedures*, ICH, Geneva, 2005.
22. US Pharmacopoeia (USP). *Validation of compendial methods*, 31rd ed., USP, Rockville, 2008.
23. V. J. Stella, V. M. Rao, E. A. Zannou, and V. Zia. Mechanisms of drug release from cyclodextrin complexes. *Adv Drug Deliv Rev.* 36:3–16 (1999).
24. N. Sauerwald, M. Schwenk, J. Polster, and E. Bengsch. Spectrometric pK determination of daphnetin, chlorogenic acid and quercetin. *Zeitschrift für Naturforschung.* 53:315–321 (1998).
25. V. Kuntic, N. Pesic, S. Micic, D. Malesev, and Z. Vujic. Determination of dissociation constants of quercetin. *Pharmazie.* 58:439–440 (2003).
26. H. A. Milane, G. Ubeaud, T. F. Vandamme, and L. Jung. Isolation of quercetin's salts and studies of their physicochemical properties and antioxidant relationships. *Bioorg Med Chem.* 12:3627–3635 (2004).
27. R. Challa, A. Ahuja, J. Ali, and R. K. Khar. Cyclodextrins in drug delivery: an update review. *AAPS PharmSciTech.* 6:E329–E351 (2005).
28. G. S. Borghetti, I. M. Costa, P. R. Petrovick, V. P. Pereira, and V. L. Bassani. Characterization of different samples of quercetin in solid-state: indication of polymorphism occurrence. *Pharmazie.* 61:802–804 (2006).
29. M. Petry, G. S. Borghetti, and V. L. Bassani. Influência de ciclodextrinas e polímero hidrofílico sobre a hidrossolubilidade de diferentes formas polimórficas de quercetina. *Lat Am J Pharm.* 26:831–836 (2007).
30. I. M. Costa. Estudo de pré-formulação com composto polifenólico utilizando como modelo a quercetina. *Dissertation*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (2005).
31. J. Zhou, L.-F. Wang, J.-Y. Wang, and N. Tang. Synthesis, characterization, antioxidative and antitumor activities of solid quercetin rare earth (III) complexes. *J Inorg Biochem.* 83:41–48 (2001).
32. R. F. V. Souza, and W. F. Giovani. Synthesis, spectral and electrochemical properties of Al (III) and Zn (II) complexes with flavonoids. *Spectr Acta Part A: Mol Biomol Spectrosc.* 61:1985–1990 (2005).
33. E. G. Ferrer, M. V. Salinas, M. J. Correa, L. Naso, D. A. Barrio, S. B. Etcheverry, L. Lezama, T. Rojo, and P. A. M. Williams. Synthesis, characterization, antitumor and osteogenic activities of quercetin vanadyl (IV) complexes. *J Biol Inorg Biochem.* 11:791–801 (2006).
34. K. Dias, S. Nicolaou, and W. F. Giovani. Synthesis and spectral investigation of Al(III) catechin/ β -cyclodextrin and Al(III) quercetin/ β -cyclodextrin inclusion compounds. *Spectr Acta Part A: Mol Biomol Spectrosc.* 70:154–161 (2008).
35. S. B. Bukhari, S. Memon, M. Mahroof-Tahir, and M. I. Bhangar. Synthesis, characterization and antioxidant activity copper-quercetin complex. *Spectr Acta Part A: Mol Biomol Spectrosc.* 715:1901–1906 (2008).
36. L. S. Koester, P. Mayorga, V. P. Pereira, C. L. Petzhokl, and V. L. Bassani. Carbamazepine/ β CD/HPMC solid dispersions: physical characterization. *Drug Devel Ind Pharm.* 29:145–154 (2003).
37. S. Olejniczak, and M. J. Potrzebowski. Solid state NMR studies and density functional theory (DFT) calculations of conformers of quercetin. *Org Biomol Chem.* 2:2315–2322 (2004).

PUBLICAÇÃO 4. Influência de Ciclodextrinas e Polímero Hidrofílico sobre a Hidrossolubilidade de Diferentes Formas Polimórficas de Quercetina

Publicado no Latin American Journal of Pharmacy

Influência de Ciclodextrinas e Polímero Hidrofílico sobre a Hidrossolubilidade de Diferentes Formas Polimórficas de Quercetina

Mariana PETRY, Greice Stefani BORGHETTI & Valquiria Linck BASSANI*

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, UFRGS,
Av. Ipiranga 2752, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil

RESUMO. Os incrementos de hidrossolubilidade de diferentes formas polimórficas de quercetina (QCTa, QCTb e QCTc), determinados pela complexação com β CD, são comparados. Diferentes capacidades de complexação das amostras de quercetina com β CD foram observadas, características provavelmente relacionadas com as diferentes solubilidades intrínsecas dos polimorfos. Uma das amostras, QCTa, foi adicionalmente complexada com uma ciclodextrina mais solúvel, HP β CD, na ausência ou presença de polímero hidrofílico, HPMC. Enquanto a associação da QCTa à β CD resultou num incremento de hidrossolubilidade de 4,6 vezes, esta associação, em presença de HPMC, alcançou um incremento de 6,5 vezes. A associação da QCTa à HP β CD resultou num incremento de hidrossolubilidade de cerca de 38 vezes e esta associação, em presença de HPMC, incrementou a hidrossolubilidade em cerca de 62 vezes. A presença de HPMC resultou, portanto, num incremento de hidrossolubilidade de cerca de 1,5 vezes para ambos os complexos QCTa/ β CD e QCTa/HP β CD. A simples associação da QCTa à HPMC resultou num incremento de hidrossolubilidade de apenas 2,8 vezes. Em suma, os resultados evidenciam um efeito sinérgico entre as ciclodextrinas e a HPMC sobre a hidrossolubilidade da quercetina, caracterizado pela influência do hidrogel sobre a constante de estabilidade aparente dos complexos QCT/CD.

SUMMARY. "The influence of cyclodextrins and hydrophilic polymer on the aqueous solubility of different polymorphic forms of quercetin". The aqueous solubility enhancements of different polymorphic forms of quercetin (QCTa, QCTb and QCTc) determined by their complexation with β CD are compared. Different complexation abilities of the quercetin samples with β CD were observed, characteristic probably related to the different intrinsic solubility presented by the polymorphic forms. One of the samples, QCTa, was also complexed with a more soluble cyclodextrin, HP β CD, in the absence or presence of an hydrophilic polymer, HPMC. While the association of QCTa to β CD yielded an aqueous solubility enhancement of 4.6 times, the addition of HPMC to the system resulted in an enhancement of 6.5 times. The complexation of QCTa with HP β CD yielded an aqueous solubility enhancement of approximately 38 times and of approximately 62 times when it was associated to HP β CD and HPMC. Therefore, the presence of HPMC resulted in an aqueous solubility enhancement of approximately 1.5 times for both complexes QCTa/ β CD and QCTa/HP β CD. The simple association of QCTa to HPMC yielded an aqueous solubility enhancement of only 2.8 times. In summary, the results demonstrate a synergic effect between the cyclodextrins and HPMC on the quercetin aqueous solubility, characterized by the influence of the hydrogel on the apparent stability constant of the complexes QCT/CD.

INTRODUÇÃO

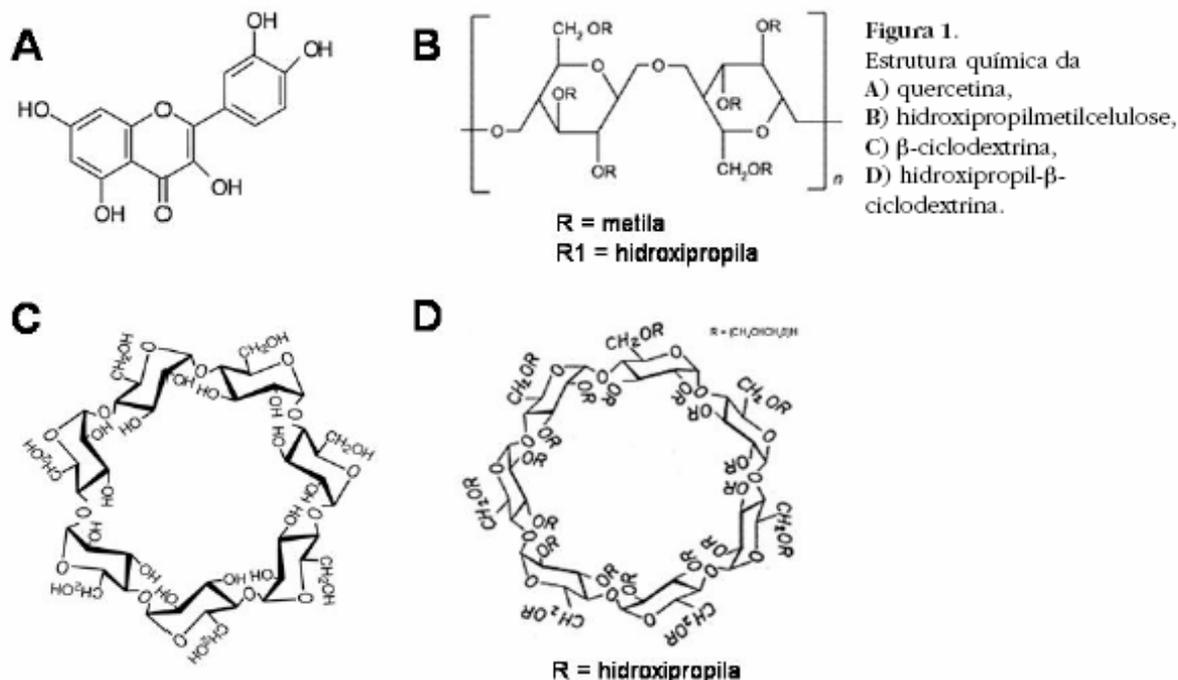
A quercetina (QCT, Fig.1A) é um flavonóide amplamente distribuído no reino vegetal e abundante na alimentação humana. Também encontra-se disponível no mercado, o que permite seu uso na forma isolada. Apresenta inúmeras propriedades biológicas, as quais são atri-

buídas, principalmente, a sua atividade antioxidante¹. No entanto, sua limitada biodisponibilidade e restrições de emprego em produtos farmacêuticos e cosméticos têm sido frequentemente relacionados à sua reduzida hidrossolubilidade²⁻⁹.

PALAVRAS-CHAVE: β -ciclodextrina, Complexação, Hidroxipropil- β -ciclodextrina, Hidroxipropil-metilcelulose, Quercetina, Solubilidade.

KEY WORDS: β -cyclodextrin, Complexation, Hydroxypropyl- β -cyclodextrin, Hydroxypropylmethyl-cellulose, Quercetin, Solubility.

* Autor a quem correspondência deve ser enviada. E-mail: proreitorpg@ufrgs.br



As ciclodextrinas, por sua vez, são oligossacarídeos cíclicos que apresentam uma face externa hidrofílica e uma cavidade interna hidrofóbica, capazes de formar complexos de inclusão com moléculas lipofílicas, resultando em associações de melhor hidrossolubilidade e, em geral, melhor biodisponibilidade. A β -ciclodextrina (β CD, Fig. 1C), composta por sete unidades de glicose, é a ciclodextrina natural mais empregada pois apresenta baixo custo, prazo de vigência de patente já expirado e tamanho de cavidade adequado para incluir anéis aromáticos e heterocíclicos. Porém, sua reduzida hidrossolubilidade e seu potencial nefrotóxico e hemolítico, quando utilizada por via parenteral, levaram à síntese de derivados mais hidrossolúveis e de menor toxicidade, como a hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD, Fig. 1D) ¹⁰⁻¹³. O efeito solubilizante das ciclodextrinas pode, adicionalmente, ser potencializado pelo uso de polímeros hidrofílicos, como a hidroxipropilmetilcelulose (HPMC, Fig. 1B), em baixas concentrações ¹⁴.

A ocorrência de diferentes formas polimórficas para a quercetina, bem como a influência do polimorfismo sobre sua hidrossolubilidade foram pela primeira vez relatados por Borghetti & colaboradores ¹⁵. A formação de complexos de inclusão entre a quercetina e ciclodextrinas foi previamente descrita por Vinadé & Petrovick ², Calabrò *et al.* ⁵, Pralhad & Rajendrakumar ⁶, Zheng *et al.* ⁷, Jullian *et al.* ⁸ e Sri *et al.* ⁹. Porém, não foram encontrados relatos na literatura so-

bre a complexação de diferentes formas polimórficas da quercetina com ciclodextrinas, tampouco sobre a associação de complexos quercetina/ciclodextrina a polímeros hidrofílicos.

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo comparar os incrementos de hidrossolubilidade de diferentes formas polimórficas encontradas em amostras comerciais de quercetina (QCTa, QCTb e QCTc), determinados pela complexação com β CD. Além disso, os efeitos da β CD ou de uma ciclodextrina mais solúvel, HP β CD, na ausência ou presença de um polímero hidrofílico, HPMC, sobre a hidrossolubilidade de uma das amostras, QCTa, foram avaliados.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Amostras de quercetina, grau farmacêutico, designadas QCTa, QCTb e QCTc, foram adquiridas, respectivamente, da DEG (São Paulo, Brasil), Galena (São Paulo, Brasil) e SP Farma (São Paulo, Brasil). Quercetina Sigma Aldrich Co (St Louis, MO, USA) foi utilizada como referência (98% de pureza). β CD foi fornecida pela Roquette Frères (Labonathus, São Paulo, Brasil) e HP β CD pela Aldrich-Chemie (Alemanha). HPMC (Methocel® K4M) foi fornecida pela Blanver Farmoquímica (São Paulo, Brasil). Metanol, grau analítico, foi adquirido da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Água purificada foi obtida pelo sistema Milli-Q® (Millipore, Bedford, MA, USA).

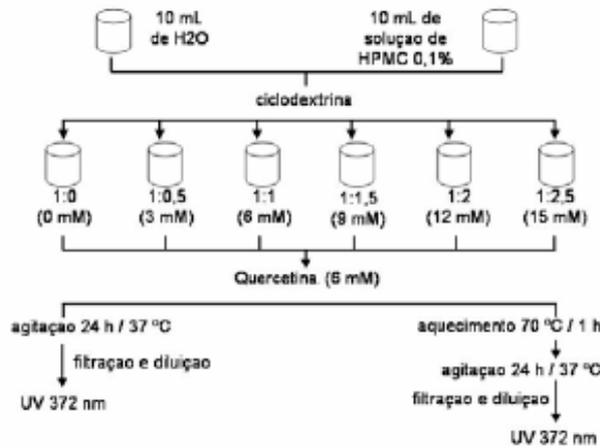


Figura 2. Representação esquemática da metodologia empregada na preparação das amostras.

Estudo de solubilidade dos complexos QCT/ β CD

Os diagramas de solubilidade foram obtidos de acordo com metodologia descrita por Higuchi & Connors¹⁶. Os fatores temperatura, tempo de agitação e quantidade em excesso de quercetina empregados foram pré-estabelecidos por delineamento fatorial do tipo 2³¹⁷. A Fig. 2 apresenta um esquema geral da metodologia empregada. Uma quantidade em excesso de quercetina (6 mM) foi dispersa em 10,0 mL de soluções aquosas contendo concentrações crescentes de β CD (0 a 15 mM), compondo relações molares de QCT: β CD de 1:0; 1:0,5; 1:1; 1:1,5; 1:2 e 1:2,5. As suspensões foram mantidas sob agitação, em banho de água termostaticado IKA HE4B, em 37 °C, durante 24 h. As suspensões foram resfriadas até temperatura ambiente e filtradas por meio de membrana com diâmetro nominal de poro de 0,45 μ m (Millipore HAWP 02500). Uma alíquota de 4,0 mL do sobrenadante foi diluída com metanol a 10,0 mL e o teor de quercetina foi medido por espectrofotometria no ultravioleta, em 372 nm (Espectrofotômetro UV-Vis Hewlett-Packard 8452A®). Os resultados foram expressos pela média de três determinações. O método foi validado segundo as diretrizes estabelecidas pela ICH¹⁸ e USP¹⁹, por meio da determinação dos parâmetros de linearidade, repetibilidade, precisão intermediária, exatidão e especificidade, na faixa de 1,5 a 12 μ g.mL⁻¹.

A magnitude de associação da quercetina com a β CD foi medida pela constante de estabilidade aparente do complexo (Ks), calculada a partir do diagrama de solubilidade, de acordo com a seguinte equação:

$$K_s = \frac{tg\alpha}{S_o \times (1-tg\alpha)}$$

onde: S_o = solubilidade intrínseca da quercetina (M), $tg\alpha$ = tangente do ângulo (α) de inclinação da curva.

Estudo de solubilidade das associações QCTa/ β CD e QCTa/HP β CD, na ausência ou presença de HPMC

Uma quantidade em excesso da amostra de quercetina QCTa (6 mM) foi dispersa em 10,0 mL de água ou dispersão aquosa de HPMC (0,1%), ambas contendo concentrações crescentes de ciclodextrina (β CD ou HP β CD, 0 a 15 mM). As suspensões foram mantidas sob agitação, em 37 °C, durante 24 h (somente aquelas contendo o polímero hidrofílico foram submetidas a um aquecimento prévio em 70 °C, durante 1 h) e, posteriormente, resfriadas e filtradas. Uma alíquota do sobrenadante foi diluída com metanol a 10,0 mL, e o teor de quercetina foi medido por espectrofotometria no ultravioleta, em 372 nm. A Fig. 2 apresenta um esquema geral da metodologia empregada. Os resultados foram expressos pela média de três determinações.

A magnitude de associação da QCTa com as ciclodextrinas (β CD ou HP β CD), na ausência ou presença do polímero hidrofílico (HPMC), foi medida pela constante de estabilidade aparente do complexo (Ks), conforme descrito anteriormente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O diagrama de solubilidade obtido para as amostras de quercetina em presença de β CD (Fig. 3) revela uma relação linear entre o incremento da concentração de β CD e o incremento da hidrossolubilidade das três amostras. As curvas obtidas podem ser classificadas como do tipo A_L, denotando a formação de complexos solúveis nesta faixa de concentração (3 a 15 mM).

Os valores de solubilidade intrínseca obtidos para as amostras QCTa, QCTb e QCTc foram, respectivamente, de 3,7; 2,6 e 6,5 μ g.mL⁻¹. Quando complexadas com 15 mM de β CD, o incremento de hidrossolubilidade da quercetina foi de 4,6; 8,5 e 4 vezes. Os valores de constante de estabilidade aparente obtidos para os complexos QCT/ β CD foram de 230, 502 e 187 M⁻¹ (Tabela 1), sugerindo uma interação relativamente fraca entre as amostras de quercetina e

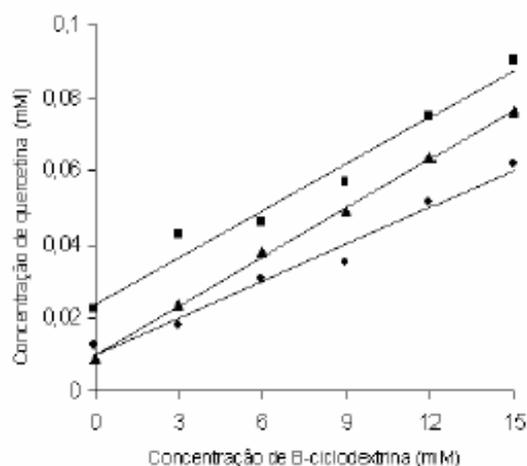


Figura 3. Diagrama de solubilidade das amostras de quercetina, QCT, em presença de β-ciclodextrina, segundo Higuchi & Connors¹⁶ (n=3).

a βCD. O maior incremento de hidrossolubilidade da quercetina, decorrente de sua complexação com βCD, foi observado para a amostra QCTb, a qual apresentou o menor valor de solubilidade intrínseca e o maior valor de Ks.

Conforme pode ser observado pelo diagrama de solubilidade (Fig. 3), quantidades relativamente elevadas de βCD foram necessárias para solubilizar pequenas quantidades de quercetina em solução aquosa, demonstrando uma baixa eficiência de complexação. Este resultado pode estar relacionado ao baixo valor da constante de estabilidade aparente obtido para os complexos QCT/βCD, bem como à reduzida hidrossolubilidade da βCD (18 mg.mL⁻¹)²⁰.

O reduzido incremento de hidrossolubilidade alcançado com a complexação das amostras de quercetina com βCD motivou a investigação do efeito da βCD ou da HPβCD, na ausência ou presença de HPMC, sobre a hidrossolubilidade de uma das amostras, QCTa. Esta amostra foi selecionada pois apresenta a mesma forma polimórfica da amostra de quercetina utilizada como referência¹⁵, empregada para a obtenção da curva de calibração por espectrofotometria no ultravioleta, em 372 nm (Fig. 4).

Observando-se as curvas obtidas para as associações QCTa/ciclodextrina (βCD ou HPβCD), na ausência ou presença do polímero hidrofílico (HPMC, Fig. 5), estas podem ser igualmente classificadas como do tipo A_L, nesta faixa de concentração (3 a 15 mM).

A simples associação da QCTa à HPMC resultou em incremento de hidrossolubilidade de apenas 2,8 vezes. Enquanto a associação da QCTa à 15 mM de βCD resultou em incremento de hi-

Amostra	Solubilidade intrínseca (ug.mL ⁻¹)	Incremento de solubilidade (vezes)	Ks* (M ⁻¹)
QCTa	3,7	4,6	230
QCTb	2,6	8,5	502
QCTc	6,5	4	187

Tabela 1. Influência da associação da β-ciclodextrina a diferentes polimorfos de quercetina, sobre a hidrossolubilidade do flavonol (n=3). *Ks: constante de estabilidade aparente dos complexos quercetina/β-ciclodextrina. QCTa: polimorfo de quercetina proveniente de DEG (São Paulo, Brasil)¹⁵. QCTb: polimorfo de quercetina proveniente de Galena (São Paulo, Brasil)¹⁵. QCTc: polimorfo de quercetina proveniente de SP Farma (São Paulo, Brasil)¹⁵.

drossolubilidade de 4,6 vezes e, de 6,5 vezes, quando associada à βCD e à HPMC, a associação da QCTa à 15 mM de HPβCD resultou em incremento de hidrossolubilidade de cerca de 38 vezes e, de cerca de 62 vezes, quando associada à HPβCD e à HPMC. Tais resultados denotam que a presença de HPMC resultou num incremento de hidrossolubilidade de cerca de 1,5 vezes para ambos os complexos QCTa/βCD e QCTa/HPβCD. Os valores de constante de estabilidade aparente obtidos para as associações QCTa/βCD, QCTa/βCD/HPMC, QCTa/HPβCD e QCTa/HPβCD/HPMC foram, respectivamente, de 230, 295, 2512 e 4412 M⁻¹ (Tabela 2), denotando uma clara influência da HPMC sobre a estabilidade dos complexos QCTa/CD.

O maior incremento de hidrossolubilidade da amostra de quercetina QCTa foi obtido por meio da sua associação à HPβCD e à HPMC. Esse resultado está provavelmente relacionado a diversos possíveis fatores: à forma amorfa do derivado de βCD, HPβCD, que lhe confere maior solubilidade¹³, à influência da HPMC, polímero hidrofílico capaz de aumentar a capacidade complexante das ciclodextrinas, aumentando a constante de estabilidade aparente dos complexos formados, bem como à capacidade da HPMC de formar complexos solúveis com moléculas de baixa massa molecular em soluções aquosas¹⁴.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstraram diferentes capacidades de complexação dos diferentes polimorfos, encontrados em amostras comerciais de quercetina, com βCD, características provavelmente relacionadas com suas diferentes solubilidades intrínsecas. A associação da amostra

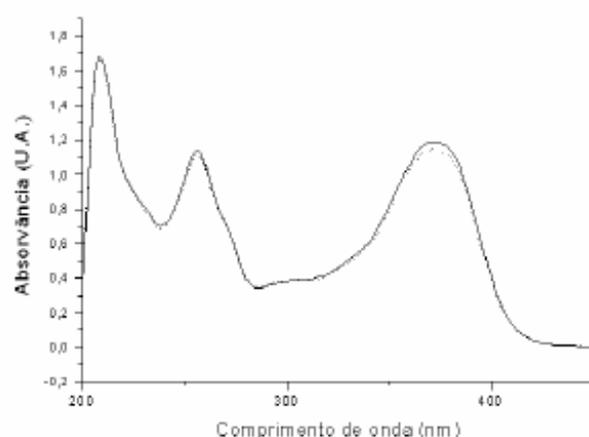


Figura 4. Espectro de varredura no ultravioleta da quercetina.

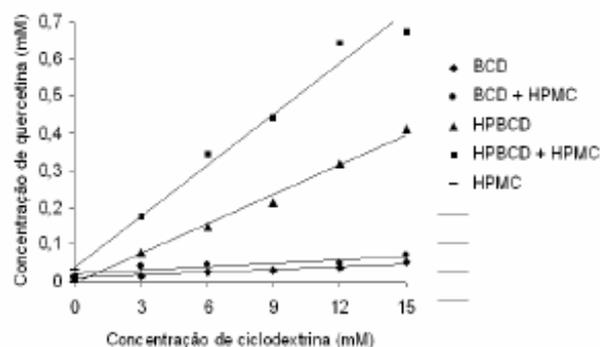


Figura 5. Diagrama de solubilidade da quercetina, QCTa, em presença de β -ciclodextrina, BCD, ou hidroxipropil- β -ciclodextrina, HPBCD, na ausência ou presença de hidroxipropilmetilcelulose, HPMC, segundo Higuchi & Connors¹⁶ (n=3).

Amostra	Solubilidade (ug.mL ⁻¹)	Incremento de solubilidade (vezes)	Ks* (M ⁻¹)
QCTa	3,7	-	-
QCTa+HPMC	10,36	2,8	-
QCTa+ β CD	16,65	4,6	230
QCTa+ β CD+HPMC	24,05	6,5	295
QCTa+HP β CD	140,23	37,9	2512
QCTa+HP β CD+HPMC	229,03	61,9	4412

Tabela 2. Influência da associação de quercetina, QCTa, com ciclodextrinas (β CD ou HP β CD), na ausência ou presença de hidroxipropilmetilcelulose, HPMC, sobre a hidrossolubilidade do flavonol (n=3). *Ks: constante de estabilidade aparente dos complexos QCTa/ciclodextrina. QCTa: polimorfo de quercetina proveniente de DEG (São Paulo, Brasil)¹⁵.

QCTa à β CD resultou em incremento de hidrossolubilidade de 4,6 vezes e, de 6,5 vezes, quando associada à β CD e à HPMC, polímero hidrofílico. A associação da QCTa à HP β CD, uma ciclodextrina mais solúvel, resultou em incremento de hidrossolubilidade de cerca de 38 vezes e, de cerca de 62 vezes, quando o complexo foi associado, adicionalmente, à HPMC. A presença de HPMC resultou num incremento de hidrossolubilidade de cerca de 1,5 vezes para ambos os complexos QCTa/ β CD e QCTa/HP β CD. A simples associação da QCTa à HPMC resultou em incremento de hidrossolubilidade de apenas 2,8

vezes, o que claramente evidencia um efeito sinérgico entre as ciclodextrinas e a HPMC sobre a hidrossolubilidade da quercetina.

Agradecimentos. Os autores agradecem ao Governo Brasileiro (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq), pelo suporte financeiro e pelas bolsas de estudo e de produtividade em pesquisa, à Labonathus e à Blanver Farmoquímica, respectivamente, pelo fornecimento de β -ciclodextrina e hidroxipropilmetilcelulose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Erlund, I. (2004) *Nutr. Res.* 24: 851-74.
- Vinadé, E.R.C. & P.R. Petrovick (1998) *Revista Portuguesa de Farmácia* 48: 149-52.
- Saija, A., A. Tomaino, D. Trombetta, M.L. Pellegrino, B. Tita, C. Messina, F.P. Bonina, C. Rocco, G. Nicolosi & F. Castelli (2003) *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 56: 167-74.
- Webber, C. (2003) Avaliação do perfil de penetração cutânea da quercetina. Dissertação de mestrado - Programa de Pós-graduação em Ciências farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.
- Calabrò, M.L., S. Tommasini, P. Donato, D. Raneri, R. Stancanelli, P. Ficarra, R. Ficarra, C.

- Costa, S. Catania, C. Rustichelli & G. Gamberini (2004) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **35**: 365-77.
6. Pralhad, T. & K. Rajendrakumar (2004) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **34**: 333-9.
7. Zheng, Y., I.S. Haworth, Z. Zuo, M.S.S. Chow & A.H.L. Chow (2005) *J. Pharm. Sci.* **94**: 1079-89.
8. Jullian, C., L. Moyano, C. Yañez & C. Oleazar (2007) *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **67**: 230-4.
9. Sri, K.V., Kondaiah, A., Ratna, J.V. & A. Annapurna (2007) *Drug Dev. Ind. Pharm.* **33**: 245-53.
10. Rao, V.M. & V.J. Stella (2003) *J. Pharm. Sci.* **92**: 927-32.
11. Del Valle, E.M.M. (2004) *Process Biochem.* **39**: 1033-46.
12. Challa, R., A. Ahuja, J. Ali & R.K. Khar (2005) *AAPS PharmSciTech.* **6**: E329-E51.
13. Gould, S. & R.C. Scott (2005) *Food Chem. Toxicol.* **43**: 1451-9.
14. Loftsson, T. (1998) *Pharmazie* **53**: 733-40.
15. Borghetti, G.S., I.M. Costa, P.R. Petrovick, V.P. Pereira & V.L. Bassani (2006) *Pharmazie* **61**: 802-4.
16. Higuchi, T. & K.A. Connors (1965) *Adv. Anal. Chem. Instr.* **4**: 117-212.
17. Borghetti, G.S., M. Petry, I.S. Lula, R.D. Sinisterra & V.L. Bassani *Drug Dev. Ind. Pharm.* (submitted).
18. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use(1996) Q2B. Guideline on Validation of Analytical Procedures - Methodology .
19. United States Pharmacopoeia, Validation of Compendial Methods (2007) 30th ed.
20. Loftsson, T. & M.E. Brewster (1996) *J. Pharm. Sci.* **85**: 1017-25.

CAPÍTULO 3. Avaliação da fotoestabilidade da quercetina em meio aquoso e sua influência sobre a atividade antioxidante *in vitro* da aglicona

INTRODUÇÃO



A maioria das propriedades biológicas da quercetina (prevenção e tratamento de aterosclerose, hipertensão, agregação plaquetária, catarata, diabetes, alergias, inflamações, infecções por microorganismos, doenças neurodegenerativas, dentre outras) parece estar, pelo menos em parte, relacionada à sua atividade antioxidante (BISCHOFF, 2008).

A atividade antioxidante da quercetina está relacionada à sua capacidade sequestrante de espécies reativas de oxigênio, quelante de íons metálicos, de interagir com os lipídios que constituem as membranas celulares e de inibir a peroxidação lipídica (BOOTS *et al.*, 2008). Alguns estudos relatam, por exemplo, o efeito protetor da quercetina sobre a peroxidação lipídica *in vitro*, em suspensão de lipossomas, induzida por radiação ultravioleta A, $\lambda = 365$ nm, radiação ultravioleta B, $\lambda = 310$ nm (FAHLMAN; KROL, 2009) ou radiação ultravioleta C, $\lambda = 254$ nm (BONINA *et al.*, 1996; SAIJA *et al.*, 2003; YAMAGUCHI *et al.*, 2005; GABRIELSKA *et al.*, 2006).

A maior estabilidade de flavonóides cuja hidroxila em C3 do anel C encontra-se ausente, como a luteolina; substituída por uma unidade de açúcar, como a rutina; ou por um grupo metoxila, como a 3-O-metil-quercetina, sugere que a hidroxila livre nesta posição da quercetina seja o principal grupamento envolvido na oxidação da molécula (SMITH *et al.*, 2000; BUCHNER *et al.*, 2006). Este grupamento, ao mesmo tempo, parece estar fortemente relacionado à atividade antioxidante do flavonóide (BOOTS *et al.*, 2008).

Apenas um estudo, realizado por ROHN e colaboradores (2007), avaliou a estabilidade da quercetina em estado sólido, frente ao calor. Após o tratamento da aglicona por sapeco (180 °C), por 1 h, a quercetina se manteve estável. Por outro lado, diversos estudos referem a instabilidade da quercetina em meio aquoso (tabela 3.1), sob diferentes condições oxidantes, tais como aquecimento, perfusão com oxigênio atmosférico ou variações de pH.

A maioria dos estudos que avaliaram a estabilidade da quercetina em meio aquoso, frente à radiação ultravioleta, são preliminares, pois sugerem a degradação do flavonóide baseando-se apenas em análises por espectrofotometria no ultravioleta/visível, nos quais alterações expressivas no espectro de absorção da

aglicona foram observadas (BONINA *et al.*, 1996; SMITH *et al.*, 2000; SAIJA *et al.*, 2003). Apenas outros dois estudos utilizaram cromatografia líquida de alta eficiência, método mais sensível e específico. Num deles, realizado por FAHLMAN e KROL (2009), a quercetina se manteve estável sob as condições experimentais empregadas, provavelmente em função do reduzido período de irradiação da amostra (1 h). No outro estudo, realizado por WEISS-ANGELI e colaboradores (2008), uma significativa redução de teor da amostra foi observada. Entretanto, a cinética de degradação da quercetina, a identificação de seus produtos de degradação, bem como a influência desses sobre a inibição da peroxidação lipídica induzida por radiação ultravioleta ainda não foram investigados.

Face ao exposto e à importância da estabilidade do flavonóide para a sua atuação como antioxidante sobre os sistemas biológicos, a avaliação da fotoestabilidade da quercetina em meio aquoso ou no meio em que os testes de atividade antioxidante são realizados, frente à radiação ultravioleta, se torna necessária. Nesta perspectiva, no capítulo 3 será avaliada a atividade antioxidante *in vitro* da quercetina frente à radiação UVA ou UVC, com ênfase em sua estabilidade no meio utilizado nos testes, mistura etanol:água (1:1), e na identificação de seus produtos de degradação.

Tabela 3.1. Relatos da estabilidade da quercetina em meio aquoso na literatura.

Referência	Condições oxidativas	Análise	Observações
BONINA e colaboradores (1996)	solução aquosa contendo QCT (6,24 μ M); exposição à radiação UVC ($\lambda = 254$ nm); 1,5 h	UV/VIS	✓ alterações no espectro de absorção: redução na absorvância em $\lambda = 372$ nm nova banda entre $\lambda = 300$ e 350 nm
KITSON e KITSON (2000)	solução tampão fosfato (50 mM) contendo QCT (20 μ M); pH 5,5 / 7,4 / 9,1; 25 °C	UV/VIS	✓ estável em pH 5,5 ✓ alterações no espectro de absorção (deslocamento batocrômico): redução na absorvância em $\lambda = 367$ nm (pH 9,1 > pH 7,4) aumento na absorvância em $\lambda = 270$ e 405 nm (pH 9,1 > pH 7,4)
MAKRIS e ROSSITER (2000)	solução tampão fosfato (50 mM) contendo QCT (1 mM); pH 8,0; 97 °C; perfusão com O ₂ ou gás argônio; 4 h	CLAE/UV UV/VIS	✓ redução de teor: 98 % com O ₂ / 16 % com gás argônio ✓ alterações no espectro de absorção: desaparecimento da banda em $\lambda = 372$ nm aumento na absorvância em $\lambda = 261$ e 291 nm ✓ produto de degradação: ác. 3,4-diidróxi-benzóico
SMITH e colaboradores (2000)	solução metanol:água (1:1) contendo QCT (100 μ M); exposição à radiação UV ($\lambda = 300$ a 400 nm); 15 h	UV/VIS	✓ alteração no espectro de absorção: redução na absorvância em $\lambda = 372$ nm
ZHU e colaboradores (2000)	solução tampão fosfato de Na (10 mM) contendo QCT (0,5 mM); pH 7,4; 1 h	CLAE/UV	✓ redução de teor: 20 %
GOMATHI e colaboradores (2003)	solução aquosa (ác. oléico 0,1 M) contendo QCT (0,1 mM); pH 5,0 a 9,0	UV/VIS	✓ estável em meio ácido (pH 5,0 a 6,0): $\lambda_{\text{máximo}} = 370$ nm ✓ pH 7,0: deslocamento batocrômico: $\lambda_{\text{máximo}} = 381$ nm nova banda em $\lambda = 321$ nm ✓ instável em meio básico (pH 8,0 a 9,0): deslocamento batocrômico: $\lambda_{\text{máximo}} > 381$ nm aumento na absorvância da nova banda ($\lambda = 321$ nm)
SAIJA e colaboradores (2003)	solução etanol:água (5:95) contendo QCT (18 μ M); exposição à radiação UVC ($\lambda = 254$ nm); 1,5 h	UV/VIS	✓ alterações no espectro de absorção: redução na absorvância em $\lambda = 372$ nm nova banda entre $\lambda = 300$ e 350 nm
VAN DER WOUDE e colaboradores (2003)	solução tampão fosfato de K (0,1 M) contendo QCT (50 μ M); pH 7,4; 37 °C; 5 % CO ₂ ; 24 h	CLAE/DAD	✓ instável: T _{50%} = 10 h

Tabela 3.1. Continuação.

Referência	Condições oxidativas	Análise	Observações
ZHENG e colaboradores (2005)	solução tampão fosfato de Na (50 mM) contendo QCT (6 μ M): - pH 3,0; 24 a 48 °C; 24 h - pH 7,4; 37 °C; 0,5 h - pH 9,0; 37 °C; 0,5 h	CLAE/DAD UV/VIS	✓ estável em pH 3,0 (não ionização: QCT) ✓ instável em: pH 7,4 (ionização parcial: QCT ⁻ + QCT): < velocidade de reação pH 9,0 (ionização total: QCT ⁻): > velocidade de reação ✓ produto de degradação: ác. 3,4-diidroxi-benzóico
BUCHNER e colaboradores (2006)	solução aquosa contendo QCT (1 mM); pH 5,0 ou 8,0; 100 °C; perfusão com O ₂ ou N ₂ ; 5 h	CLAE/DAD CLAE/MS UV/VIS	✓ redução de teor: 25 % com ar em pH 5,0 por 5 h / 100 % com ar em pH 8,0 por 4 h 25 % com N ₂ em pH 8,0 por 5 h / não mencionado com N ₂ em pH 5,0 ✓ produtos de degradação: 2,3-diidroxi-(3',4'-diidroxi-fenil)-prop-2-en-1-al; ác. 3,4-diidroxi-benzóico; 2,5,7,3',4'-pentahidroxi-3,4-flavandiona; 2,2,5,7-tetraidroxi-benzofuran-3-ona; 2-(3',4'-diidroxi-fenil)-3,3,5,7-tetraidroxi-2-metóxi-2,3-diidrocromen-4-ona; 2-(3'-metóxi-4-hidroxi-fenil)-3,5,7-triidróxi-3-metóxi-2,3-diidrocromen-4-ona
MARINIC e colaboradores (2006)	solução tampão cacodilato de Na (50 mM) contendo QCT (20 μ M); pH 7,0; 25 a 90 °C; 1 h	UV/VIS	✓ 25 °C: T _{50%} = 20 h redução proporcional na absorvância em λ = 256 e 372 nm: hipótese de lenta precipitação ✓ 90 °C: alterações no espectro de absorção desaparecimento da banda em λ = 372 nm redução na absorvância em λ = 256 nm nova banda em λ = 290 nm
LEE e colaboradores (2007)	solução tampão fosfato de Na (polissorbato 80; 1 %) contendo QCT (1,65 mM); pH 7,4; 25 ou 42 °C; 28 d	CLAE/DAD	✓ redução de teor: 19 % em 25 °C / 82 % em 42 °C
VICENTINI e colaboradores (2007)	solução em propilenoglicol contendo QCT (5 mg.mL ⁻¹); exposição à radiação UVB (λ = 313 nm); 7 d	CLAE/UV UV/VIS	✓ estável
ZENKEVICH e colaboradores (2007)	solução etanol:água (70:30) contendo QCT (7,4 mM); pH 10,0; 21 °C; perfusão com O ₂ ; 3,5 h seguido de evaporação do solvente (100° C)	CLAE/UV UV/VIS GC/MS	✓ pico referente à QCT não detectado no cromatograma ✓ cor da solução e do resíduo sólido: marrom-avermelhada ✓ produtos de degradação: 1,3,5-triidróxi-benzeno; ác. 3,4-diidroxi-benzóico; ác. 2,4,6-triidróxi-benzóico; CO ₂
	solução etanol:água (30:70) contendo QCT (60 μ M) titulada com NaOH (ácido/base/ácido: pH 2,0 / pH 10,0 / pH 4,0)	UV/VIS	✓ alterações no espectro de absorção: pH 2,0: $\lambda_{\text{máximo}}$ = 255 e 372 nm pH 2,0 para pH 10,0: $\lambda_{\text{máximo}}$ = 323 nm pH 10,0 para pH 4,0: $\lambda_{\text{máximo}}$ = 294 nm

Tabela 3.1. Continuação.

Referência	Condições oxidativas	Análise	Observações
MOON e colaboradores (2008)	solução aquosa contendo QCT (5 μ M): - -80 °C, -20 °C, 4 °C ou TA; 196 h - pH 2,7; -20 °C, 4 °C ou TA; 96 h - pH 7,0 ; -20 °C, 4 °C ou TA; 96 h - pH 10,0 ; -20 °C, 4 °C ou TA; 96 h	CLAE/UV	✓ temperatura: estável em -80 °C, -20 °C e 4 °C estável em TA por período de tempo curto ✓ pH: estável em meio ácido (pH 2,7) em -20 °C, 4 °C e TA instável em pH 7,0 apenas em TA instável em meio básico (pH 10,0): -20 °C < 4 °C < TA (velocidade de reação)
WEISS-ANGELI e colaboradores (2008)	solução metanol:água (80:20) contendo QCT; exposição à radiação UVA; 15 d	CLAE/DAD	✓ redução de teor: 65 %
ZHOU e SADIK (2008)	solução tampão fosfato de Na:etanol (1:1) contendo QCT (20 μ M); pH 7,4; perfusão com O ₂ ; 24 h	CLAE/DAD CLAE/MS UV/VIS GC/MS RMN-H1	✓ redução de teor: 76,5 % ✓ alteração de cor da solução: amarelo para marrom ✓ alterações no espectro de absorção: desaparecimento da banda em $\lambda = 380$ nm redução na absorvância em $\lambda = 257$ nm novas bandas em $\lambda = 290$ e 330 nm ✓ produtos de degradação: ác. 1,3,5-triidróxi-benzóico; 5,7,4',5'-tetrahidróxi-2-etóxi-3,4-flavandiona (+ metanol); ác. 3,4-diidroxi-benzóico; 2,4,6-benzenotriol
FAHLMAN e KROL (2009)	solução tampão Tris-HCl (10 mM) contendo QCT (5 μ M); pH 7,0; exposição à radiação UVA ($\lambda = 365$ nm) ou UVB ($\lambda = 310$ nm); 1 h	CLAE/DAD	✓ estável

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Estudar o efeito da quercetina, dissolvida em etanol:água (1:1), sobre a inibição da peroxidação lipídica induzida por radiação UVA ou UVC;
- ✓ Estudar a estabilidade da quercetina, dissolvida em etanol:água (1:1), frente à radiação UVA ou UVC;
- ✓ Estudar a cinética de degradação da quercetina;
- ✓ Identificar os produtos de degradação da quercetina

PUBLICAÇÃO 5. Stability of quercetin against ultraviolet radiation: influence of the degradation products on the lipid peroxidation test

Submetido ao Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry

Stability of quercetin against ultraviolet radiation: influence of the degradation products on the lipid peroxidation test

Greice S. Borghetti^{a,*}, Cabral Pavei^a, Liberato Brum Júnior^a, Fernanda F. Caregnato^b, José Claudio F. Moreira^b, Valquiria L. Bassani^a

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos 2600, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil

**Corresponding author:* Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil. Telephone: (+55) 51 3308 5231, Fax: (+55) 51 3308 5437. E-mail address: greicefarm@yahoo.com.br (Greice S. Borghetti)

Abstract

The inhibition effect of quercetin dissolved in 50 % (v/v) ethanol/water on the lipid peroxidation in egg yolk dispersions induced by UVA or UVC radiation, as well as the quercetin photostability in the solvent employed in the antioxidant activity test were investigated. The degradation kinetic of quercetin against both radiations was determined and the corresponding degradation products were identified using liquid chromatography with diode array detection and mass spectrometry analysis. Quercetin was not stable against UVA and UVC radiations and its degradation followed, respectively, a first-order and a zero-order kinetic. By the other hand, it was able to inhibit the lipid peroxidation induced by both radiations. This contradiction can be explained by the contribution of the degradation products for the biological effect measured, all of them polyphenol derivatives presenting potential property of scavenging reactive oxygen species and free radicals. These findings show the relevance of investigating the stability of quercetin under the same experimental conditions employed in lipid peroxidation tests for enlightening its photoprotective effect in this kind of biological test.

Key-words: antioxidant activity, lipid peroxidation, photostability, quercetin, ultraviolet radiation

1. Introduction

The main cause of structural and functional changes induced in biological membranes by ultraviolet radiation is the lipid peroxidation. Previous studies have reported the ability of quercetin in inhibiting the lipid peroxidation induced by ultraviolet radiation by scavenging reactive oxygen species and free radicals [1-5].

Quercetin is one of the most biologically active and common dietary flavonoids and it has been described extensively due to its broad biological properties [6], which are very often related to its antioxidant activity [7]. The knowledge of the stability of flavonoids in the media employed in biological tests is relevant because their antioxidant activity is strictly related to their chemical structure. Some preliminary studies have suggested that quercetin is not stable against ultraviolet radiation in aqueous media [1,2,8,9]. However, more detailed investigations concerning quercetin photostability, under the same experimental conditions employed in lipid peroxidation tests, have not been reported to date and, thus, they are necessary for enlightening the photoprotective effect of quercetin in this kind of biological test.

In this context, the present work was designed for investigating the inhibition effect of quercetin dissolved in 50 % (v/v) ethanol/water on the lipid peroxidation in egg yolk dispersions induced by UVA or UVC radiation as well as for evaluating the quercetin photostability in the solvent employed in the antioxidant activity test. For the first time, the degradation kinetic of quercetin against both radiations was determined and the corresponding degradation products were identified using liquid chromatography with diode array detection and mass spectrometry analysis. Finally, a relationship between the inhibition effect of quercetin on the lipid peroxidation induced by ultraviolet radiations and its photostability was established.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Reference quercetin (purity 98 %) and thiobarbituric acid were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Pharmaceutical grade quercetin was purchased from Deg (São Paulo, Brazil). Water was purified using a Milli-Q system (Millipore[®], Bedford, MA, USA). Analytical grade ethanol and trichloroacetic acid were purchased from Synth (São Paulo, Brazil). Formic acid was purchased from Vetec (Rio de Janeiro, Brazil). Liquid chromatography grade acetonitrile was purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

2.2. Evaluation of the antioxidant activity of quercetin on the lipid peroxidation induced by ultraviolet radiations

2.2.1. Effect of the exposure period to UVA or UVC radiation on the lipid peroxidation

1 % (w/v) egg yolk dispersions (1.0 mL) were added from 50 % (v/v) ethanol/water (0.1 mL), vortex-mixed and exposed in 1 cm quartz cells to UVA (Osram[®] lamp, 30 W, 360 nm) or UVC (Ecolume[®] ZW lamp, 30 W, 254 nm) radiation for different periods: 15, 20 and 25 h or 15, 30 and 45 min, respectively. Each lamp was fixed to a chamber (100 x 16 x 16 cm) in horizontal position, at a distance of approximately 10 cm. The chambers were internally coated with mirrors in order to distribute the radiation uniformly. Unirradiated samples were used as controls. After irradiation, 0.3 mL of the samples (and the controls) were added from 0.6 mL of 15 % (v/v) trichloroacetic acid, vortex-mixed and centrifuged at 11,000 rpm for 10 min. The supernatant (0.5 mL) was added from 0.5 mL of 0.67 % (w/v) thiobarbituric acid and vortex-mixed. The reaction mixture was incubated in a boiling water bath for 20 min and then allowed to cool to room temperature. The amount of malondyaldeide (MDA)

formed was measured in triplicate, at 532 nm, using a spectrophotometer (Pharmacia Biotech Novaspec II, Cambridge, England).

2.2.2. Effect of the quercetin concentration on the lipid peroxidation

1 % (w/v) egg yolk dispersions (1.0 mL) were added from 50 % (v/v) ethanol/water in the absence (controls) or in the presence of different concentrations of quercetin (0.1 mL) and vortex-mixed. The final concentration of quercetin in the samples was 0.5, 2.5, 5.0, 7.5, 15.0, and 25.0 μ M. The samples and the controls were exposed in 1 cm quartz cells to ultraviolet radiations for a fixed period (25 h for UVA or 30 min for UVC) and analyzed in triplicate according to the above-described procedure.

The percentage of inhibition of the lipid peroxidation induced by ultraviolet radiations was calculated based on the equation 1:

$$\% \text{ inhibition} = (1 - A_a/A_o) \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

where A_a is the absorbance in the presence of quercetin and A_o is the absorbance in the absence of quercetin.

2.3. Chromatographic conditions and method validation

A liquid chromatography (LC) method was developed for quercetin analysis in the photostability studies. The analysis was carried out using a Shimadzu Prominence LC-20AT equipment (Kyoto, Japan) coupled to a SPD-M20A diode array detector (DAD). The detection was set at 290 nm. The stationary phase was a Phenomenex Synergi Fusion RP C_{18} column (150 x 4.6 mm i.d.; 5 μ m particle size). The mobile phase was 0.01 % (v/v) formic acid (A) and acetonitrile (B). Gradient elution was performed as follow: 15 - 60 % B (0 to 14 min), 60 - 15 % B (14 to 17 min) and 15 % B until the end of the run (20 min). The injection volume was 20 μ L and the flow rate

was 0.8 mL.min⁻¹. The analysis was performed at 30 °C. The LC method was validated for specificity, linearity, precision, accuracy, and detection and quantitation limits [10].

2.4. Photostability study of quercetin

Two light sources were used: a UVA lamp (Osram[®], 30 W, 360 nm) and a UVC lamp (Ecolume[®] ZW, 30 W, 254 nm). Each lamp was fixed to a chamber (100 x 16 x 16 cm) in horizontal position, at a distance of approximately 10 cm. The chambers were internally coated with mirrors in order to distribute the radiation uniformly. The temperature into the chambers (approximately 27 °C) was controlled using a digital thermometer. Aliquots of 3.0 mL of 50 % (v/v) ethanol/water solutions containing quercetin (25 µM) were exposed to ultraviolet radiations in 1 cm quartz cells for different periods: 0, 6, 12, 25, and 48 h (for UVA) or 0, 15, 30, 60, and 120 min (for UVC). After irradiation, the samples exposed to UVA were transferred to 5.0 mL volumetric flasks and the volume was made up with 50 % (v/v) ethanol/water due to the evaporation of the solvent. The samples were filtered through a membrane (Millipore[®] HVLP, 0.45 µm pore diameter) and the quercetin concentration was measured in triplicate using the above-described LC method.

2.5. Determination of the degradation kinetic

The mathematical modeling of the degradation profiles of quercetin was performed to fit a zero-order (Eq. 2), a first-order (Eq. 3) or a second-order (Eq. 4) kinetic. The best models were chosen based on the highest regression coefficient (R²):

$$C = C_0 - K \times t \quad (\text{Eq. 2})$$

$$\log C = \log C_0 - K \times t \quad (\text{Eq. 3})$$

$$1/C = 1/C_0 + K \times t \quad (\text{Eq. 4})$$

where C is the residual concentration of quercetin ($\mu\text{g.mL}^{-1}$), C_0 is the initial concentration of quercetin ($\mu\text{g.mL}^{-1}$), K is the rate constant of the reaction (slope of the curve; $\mu\text{g.min}^{-1}$ or $\mu\text{g.h}^{-1}$) and t is the exposure time to ultraviolet radiations (min or h).

The exposure time to ultraviolet radiations necessary to obtain a decrease of 10 % of the initial concentration of quercetin ($T_{90\%}$; min or h) was calculated based on the equation 5:

$$T_{90\%} = 1 / (9 \times K \times C_0) \quad (\text{Eq. 5})$$

2.6. Characterization of the degradation products

The main degradation products formed by exposure of quercetin dissolved in 50 % (v/v) ethanol/water to UVA or UVC radiation were characterized on the basis of the LC/DAD and mass spectrometry (MS/MS) analysis. The absorption spectra were recorded from 200 to 500 nm using the above-described LC/DAD equipment. A triple quadrupole mass spectrometer (Micromass Quattro LC, Manchester, UK) equipped with an ESI source using a crossflow counter electrode run in positive mode was used. In order to optimize the analytical conditions, quercetin dissolved in 50 % (v/v) acetonitrile/water ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) was directly introduced into the spectrometer and the following parameters were selected: cone gas, 50 L.h^{-1} ; desolvation gas (nitrogen), 400 L.h^{-1} ; capillary voltage, 2.5 kV; extractor voltage, 2 V; RF lens voltage, 0.3 V; source temperature, $120 \text{ }^\circ\text{C}$; desolvation temperature, $350 \text{ }^\circ\text{C}$; collision gas pressure (argon), $2.3 \times 10^{-3} \text{ mbar}$; cone voltage, 30 V; collision energy, 15 eV. The mass spectra were recorded from 100 to 500 m/z and compared with those reported in the literature [11].

2.7. Statistical analysis

One-way analysis of variance followed by Tukey's test was employed in the comparison of the experimental data for significance at p -values less than 0.05.

3. Results and discussion

3.1. Evaluation of the antioxidant activity of quercetin on the lipid peroxidation induced by ultraviolet radiations

A method based on the formation of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) was employed to evaluate the lipid peroxidation induced by ultraviolet radiations. The effect of the exposure period of 1 % (w/v) egg yolk dispersions against UVA or UVC radiation on the lipid peroxidation is presented in figure 1. The amount of MDA formed, final product of the lipid peroxidation, was time-dependent for both radiations. However, as expected, UVC radiation (200 to 290 nm) was more effective than UVA radiation (320 to 400 nm) since it is the most energetic. While for UVC radiation it was necessary only 30 min of exposure, for UVA radiation it was necessary a period of 25 h for reaching identical effect ($P < 0.05$) on the lipid peroxidation.

Thus, the exposure periods of 25 h, against UVA radiation, and 30 min, against UVC radiation, were chosen to evaluate the effect of quercetin at different concentrations on the lipid peroxidation (Fig. 2). The addition of quercetin dissolved in 50 % (v/v) ethanol/water to 1 % (w/v) egg yolk dispersions inhibited the lipid peroxidation induced by both radiations in a dose-dependent manner at quercetin concentrations up to 5 μ M. However, at this concentration, the inhibition effect of quercetin on the lipid peroxidation induced by UVA radiation reached its maximum, remaining in approximately 58 % ($P < 0.05$). In contrast, against UVC radiation, the presence of

higher quercetin concentrations (7.5 to 25 μM) resulted in additional inhibition on the lipid peroxidation. The inhibition effect was more pronounced, reaching its maximum in 92 % when quercetin concentration was 25 μM .

3.2. Liquid chromatography

The chromatograms obtained for 50 % (v/v) ethanol/water solutions containing quercetin before irradiation and after exposure to UVA or UVC radiation are presented in figure 3. The purity of quercetin peak showed that the method was specific (data not shown). The regression coefficient ($R^2 = 0.9992$) confirmed that the calibration curve was linear over the concentration range of quercetin (1.0 to 10.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). The repeatability (RSD = 2.15 %) and the intermediate precision (RSD = 1.68 %) were adequate. The quercetin recovery (from 99.4 to 104.8 %) at low, medium and high concentrations (1.0, 5.0 and 10.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) showed that the method was accurate. The detection and quantitation limits (0.09 and 0.27 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively) showed the sensitivity of the method.

3.3. Photostability study of quercetin

In order to understand the varying effectiveness of quercetin in inhibiting the lipid peroxidation in 1 % (w/v) egg yolk dispersions induced by UVA or UVC radiation, we investigated its photostability under the same experimental conditions employed in the antioxidant activity tests. Thus, we exposed 50 % (v/v) ethanol/water solutions containing quercetin (25 μM) to UVA (for 48 h) or UVC (for 120 min) radiation and monitored quercetin concentration by LC analysis. The corresponding chromatograms are shown in figure 3. At the beginning (unirradiated samples), only the peak corresponding to quercetin (peak 7) was detected (Fig. 3a), which

concentration was considered 100 %. The exposure of 50 % (v/v) ethanol/water solutions containing quercetin to UVA or UVC radiation generated similar LC profiles. Simultaneously to the decrease of the peak area of quercetin, six new peaks (1 to 6) were detected in the chromatograms, indicating the degradation of quercetin. The appearance of several additional peaks suggests the formation of a very complex mixture of substances, although no color change of the solutions had been observed. The retention times (Rt) of the peaks 1 to 6, situated between 5.2 and 12.8 min, suggest that all of them correspond to more polar substances than quercetin (peak 7, Rt = 13.3 min). After 30 min of exposure to UVC radiation, approximately 75 % of the original concentration of quercetin remained in the media (Fig. 3c). When exposed to UVA radiation for 25 h, the quercetin concentration in the media was reduced to approximately 52 % (Fig. 3b). The lower areas of the peaks 1 to 6 in this chromatogram, when compared with those observed for the sample exposed to UVC radiation, can be explained by the dilution of the sample before LC analysis due to the evaporation of the solvent during UVA irradiation (section 2.4).

3.4. Determination of the degradation kinetic

The results revealed that quercetin degradation induced by UVC radiation followed a zero-order kinetic, which means that the rate of the reaction is a constant. By the other hand, quercetin degradation induced by UVA radiation followed a first-order kinetic, indicating that the rate of the reaction is directly proportional to the logarithm of the quercetin concentration in the media. The comparison between the exposure time necessary to obtain a decrease of 10 % of the initial concentration of quercetin ($T_{90\%}$) and the rate constant of the reaction (K), presented in table 1, reveals that

quercetin degradation induced by UVC radiation is much faster than that induced by UVA radiation.

3.5. Characterization of the degradation products

The characterization of the main degradation products formed by exposure of 50 % (v/v) ethanol/water solutions containing quercetin (25 μ M) to UVA or UVC radiation, on the basis of the LC/DAD and MS/MS analysis, is presented in table 2. The peak 4 (Rt = 8.1 min), namely 5,7,4',5'-tetrahydroxy-2-methoxy-3,4-flavandione, was the major degradation product of quercetin when it was exposed to UVA radiation for 25 h, whereas the peak that eluted at 5.2 min (peak 1), identified as phloroglucinol carboxylic acid, was the major degradation product of quercetin when it was exposed to UVC radiation for 30 min. The reduction of the original pH of this media (from 6.4 to 3.8) corroborates this finding. The peaks marked with *x* in the chromatogram presented in figure 3 could not be identified because they produced no signal in the MS/MS system employed.

Taken together, quercetin dissolved in 50 % (v/v) ethanol/water (25 μ M) showed higher inhibition effect on the lipid peroxidation induced by UVC radiation (92 %), after 30 min of exposure, than that induced by UVA radiation (inhibition of 58 %), after a period of 25 h. This behavior is probably due to the higher residual concentration of quercetin (75 %) in the media exposed to UVC radiation than that exposed to UVA radiation (52 %). The contradictory fact that quercetin had not been stable against UVA and UVC radiations and, by the other hand, it had presented high inhibition effect on the lipid peroxidation induced by both radiations can be explained by the contribution of the corresponding degradation products for the biological effect measured. The chemical structures of the main degradation products of quercetin

formed under the experimental conditions employed in this study, all of them polyphenol derivatives, are presented in figure 4 and suggest their potential property of scavenging reactive oxygen species and free radicals. Additionally, the degradation reaction seems to involve the attack of the C3 hydroxyl group at the C-ring of quercetin molecule. The blockage of this position by a sugar moiety is the main reason for the higher stability of rutin against oxidation than its aglicone quercetin [8,12].

4. Conclusions

Although quercetin had not been stable against UVA and UVC radiations, it was able to inhibit the lipid peroxidation induced by both radiations, which suggests that the corresponding degradation products, all of them polyphenol derivatives, could have contributed for the biological effect measured. These findings show the relevance of investigating the stability of quercetin under the same experimental conditions employed in lipid peroxidation tests for enlightening its photoprotective effect in this kind of biological test.

Acknowledgements

The authors are grateful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the financial support and scholarships.

References

- [1] F. Bonina, M. Lanza, L. Montenegro, C. Puglisi, A. Tomaino, D. Trombetta, F. Castelli, A. Saija, Flavonoids as potential protective agents against photo-oxidative skin damage, *Intern. J. Pharm.* 145 (1996) 87-94.
- [2] A. Saija, A. Tomaino, D. Trombetta, M.L. Pellegrino, B. Tita, C. Messina, F.P. Bonina, C. Rocco, G. Nicolosi, F. Castelli, "In vitro" antioxidant and photoprotective properties and interaction with model membranes of three new quercetin esters, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 56 (2003) 167-174.
- [3] L.F. Yamaguchi, D.G. Vassão, M.J. Kato, P. Di Mascio, Biflavonoids from Brazilian pine *Araucaria angustifolia* as potentials protective agents against DNA damage and lipoperoxidation, *Phytochem.* 66 (2005) 2238-2247.
- [4] J. Gabrielska, M. Soczynska-Kordala, J. Hladyszowski, R. Zylka, J. Miskiewicz, S. Przystalski, Antioxidative effect of quercetin and its equimolar mixtures with phenyltin compounds on liposome membranes, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 7735-7746.
- [5] B.M. Fahlman, E.S. Krol, Inhibition of UVA and UVB radiation-induced lipid oxidation by quercetin, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 5301-5305.
- [6] S.C. Bischoff, Quercetin: potentials in the prevention and therapy of disease, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 11 (2008) 733-740.
- [7] A.W. Boots, G.R.M.M. Haenen, A. Bast, Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical, *Eur. J. Pharmacol.* 585 (2008) 325-337.
- [8] G.J. Smith, S.J. Thomsen, K.R. Markham, C. Andary, D. Cardon, The photostabilities of naturally occurring 5-hydroxyflavones, flavonols, their glycosides and their aluminium complexes, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 136 (2000) 87-91.
- [9] V. Weiss-Angeli, F.S. Poletto, L.R. Zancan, F. Baldasso, A.R. Pohlmann, S.S. Guterres, Nanocapsules of octyl methoxycinnamate containing quercetin delayed the photodegradation of both components under ultraviolet A radiation, *J. Biomed. Nanotechnol.* 4 (2008) 1-10.
- [10] I.C.H., International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, Validation of analytical procedures: text and methodology, Q2 (R1) (2005).
- [11] A. Zhou, O.A. Sadik, Comparative analysis of quercetin oxidation by electrochemical, enzymatic, autoxidation, and free radical generation techniques: a mechanistic study, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 12081-12091.
- [12] N. Buchner, A. Krumbein, S. Rohn, L.W. Kroh, Effect of thermal processing on the flavonols rutin and quercetin, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20 (2006) 3229-3235.

Figure captions

Fig. 1. Lipid peroxidation in 1 % (w/v) egg yolk dispersions as a function of the exposure period to UVA or UVC radiation

Fig. 2. Inhibition of the lipid peroxidation induced by exposure of 1 % (w/v) egg yolk dispersions to UVA (for 25 h) or UVC (for 30 min) radiation as a function of the quercetin concentration dissolved in 50 % (v/v) ethanol/water

Fig. 3. LC profiles of 50 % (v/v) ethanol/water solutions containing quercetin (25 μ M): before irradiation (a); after exposure to UVA radiation for 25 h (b); after exposure to UVC radiation for 30 min (c)

Fig. 4. Chemical structures of the main degradation products formed by exposure of 50 % (v/v) ethanol/water solutions containing quercetin to UVA or UVC radiation

Fig. 1.

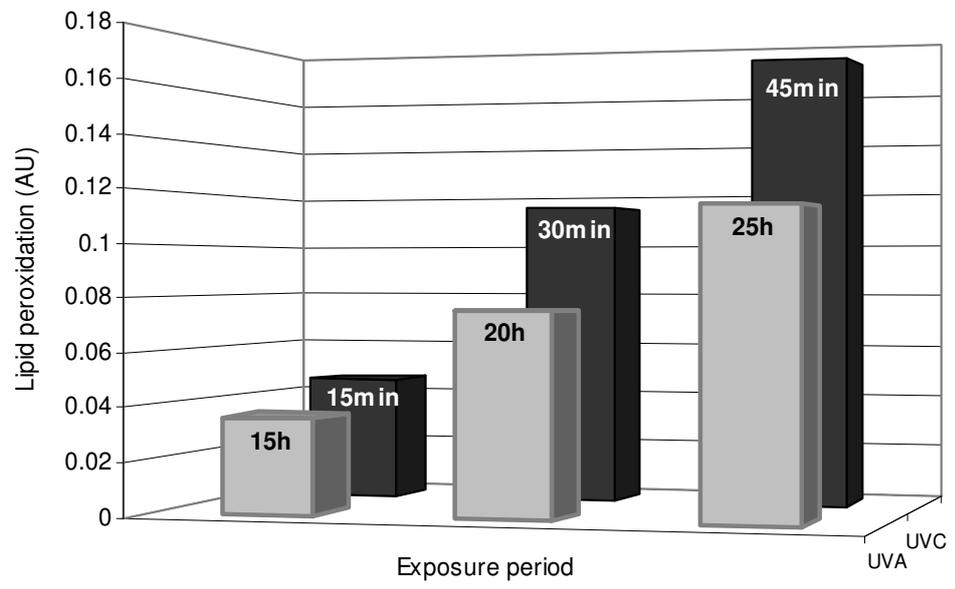


Fig. 2.

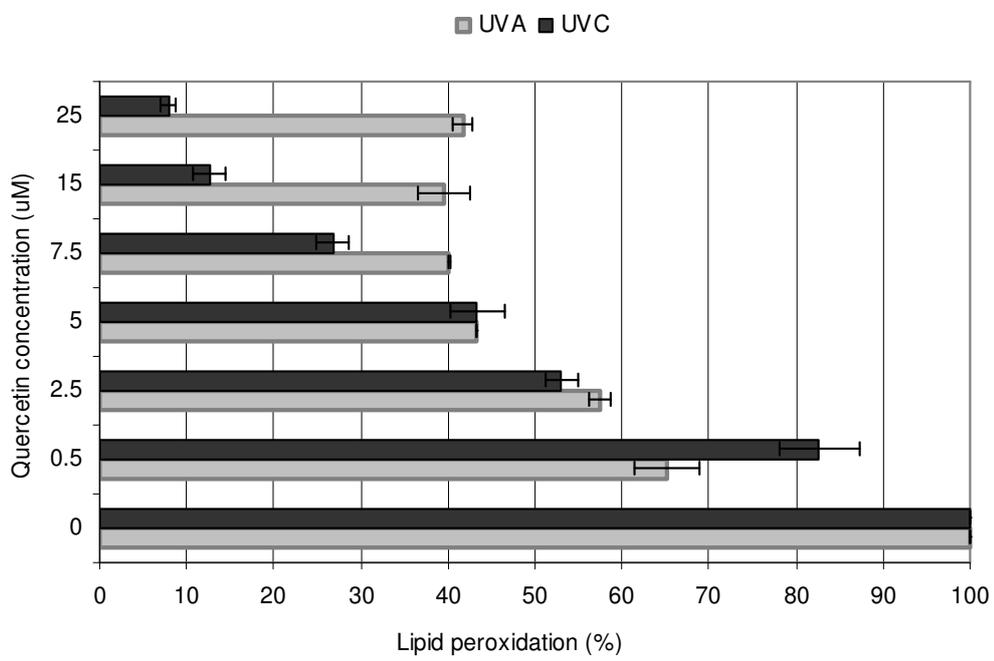


Fig. 3.

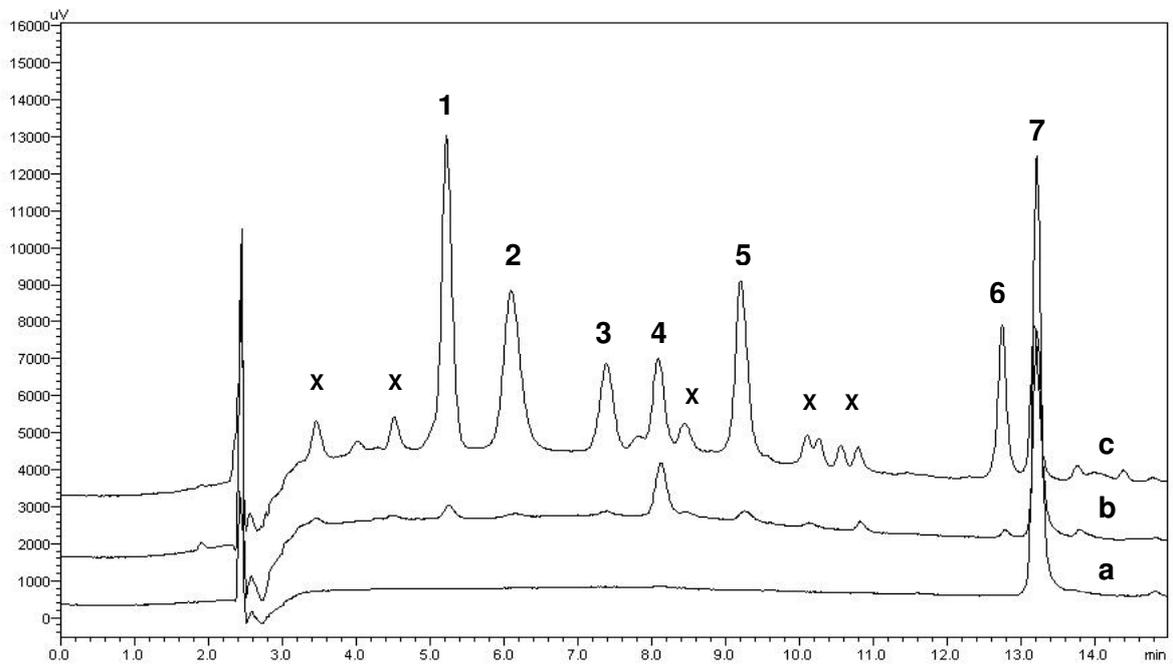


Fig. 4.

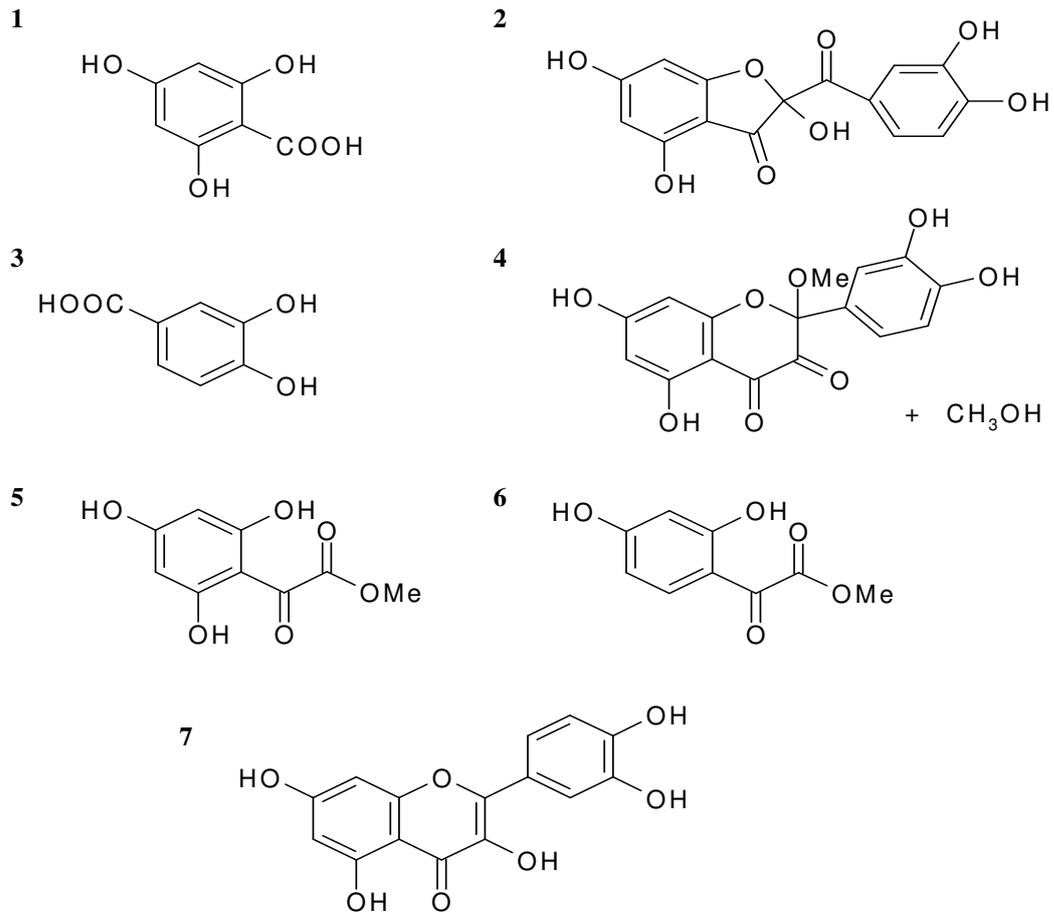


Table 1. Data of degradation kinetic of quercetin dissolved in 50 % (v/v) ethanol/water by exposure to UVA or UVC radiation

UVA					UVC				
exposure time (h)	residual concentration ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	residual concentration (%)	K^* ($\mu\text{g.h}^{-1}$)	$T_{90\%}^*$ (h)	exposure time (min)	residual concentration ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	residual concentration (%)	K^* ($\mu\text{g.min}^{-1}$)	$T_{90\%}^*$ (min)
0	7.49	100			0	8.01	100		
6	5.86	78			15	6.82	85		
12	5.31	71	0.0132	1.12	30	6.05	75	0.0543	0.25
25	3.91	52			60	4.24	53		
48	1.67	22			120	1.37	17		

* K = rate constant of the reaction; $T_{90\%}$ = exposure time necessary to obtain a decrease of 10 % of the initial concentration of quercetin

Table 2. LC/DAD and MS/MS data of the main degradation products formed by exposure of 50 % (v/v) ethanol/water solutions containing quercetin to UVA or UVC radiation

peak	retention time (min)	λ_{\max} (nm)	molecular ion (m/z)	photodegradation products
1	5.2	292	169	phloroglucinol carboxylic acid (2,4,6-trihydroxybenzoic acid)
2	6.1	294 (320 _{sh} *)	317	2-(3,4-dihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxybenzofuran-3(2 <i>H</i>)-one
3	7.4	258 / 292	153	protocatechuic acid (3,4-dihydroxybenzoic acid)
4	8.1	292	363	5,7,4',5'-tetrahydroxy-2-methoxy-flavan-3,4-dione (+ methanol)
5	9.2	274 (290 _{sh} *)	211	methyl ester of 2,4,6-trihydroxyphenylglyoxylic acid
6	12.8	274 (290 _{sh} *)	195	methyl ester of 2,4-dihydroxyphenylglyoxylic acid
7	13.3	255 / 370	301	quercetin (3,3',4',5,7-pentahydroxy-flavone)

*sh = shoulder

CAPÍTULO 4. Avaliação *ex vivo* da permeação e do potencial antioxidante cutâneo de formulações contendo quercetina ou a mistura física quercetina/ β -ciclodextrina

INTRODUÇÃO



O expressivo interesse científico pela quercetina é decorrente de suas inúmeras propriedades biológicas, a maioria das quais parece estar, pelo menos em parte, relacionada à sua atividade antioxidante, aspecto de interesse em preparações destinadas à aplicação tópica (PINNELL, 2003; KAUR *et al.*, 2007; YAAR; GILCHREST, 2007).

Alguns estudos sugerem uma promissora atividade antioxidante cutânea da quercetina. CASAGRANDE e colaboradores (2007), por exemplo, observaram uma inibição da peroxidação lipídica em homogenato de pele suína, induzida pelo sistema Fe^{2+} /citrato, após tratamento *ex vivo* da pele, por 12 horas, com 1,0 g de emulsões O/A contendo 1,0 % de quercetina. Em outros estudos, realizados pelo mesmo grupo, o efeito *in vivo* da aplicação de 0,5 g de emulsões O/A, contendo 1,0 % de quercetina (CASAGRANDE *et al.*, 2006), ou 0,3 g de microemulsões A/O, contendo 0,3 % de quercetina (VICENTINI *et al.*, 2008), sobre a pele do dorso de camundongos, 1 hora antes, 5 minutos antes e logo após a exposição dos animais à radiação UVB, foi avaliado quanto ao dano oxidativo 6 horas após a irradiação. Um efeito de inibição da atividade da mieloperoxidase e da atividade/secreção de proteinases cutâneas, bem como sobre a depleção dos níveis de glutathiona reduzida na pele, foram observados.

Entretanto, o emprego em potencial da quercetina na profilaxia e no tratamento de distúrbios cutâneos associados ao estresse oxidativo é limitado pela sua baixa capacidade de penetração cutânea (tabela 4.1), a qual tem sido atribuída, principalmente, à reduzida hidrossolubilidade da molécula (AZUMA *et al.*, 2002; LAURO *et al.*, 2002; SAIJA *et al.*, 2003; MONTENEGRO *et al.*, 2007).

Nesse sentido, diversas estratégias vêm sendo empregadas na tentativa de facilitar a difusão da quercetina através de membranas:

- ✓ esterificação da molécula (MONTENEGRO *et al.*, 2007);
- ✓ incorporação em nanoemulsões (FASOLO, 2007);
- ✓ encapsulação em nanopartículas (WEBBER, 2003);
- ✓ uso de promotores de penetração (SAIJA *et al.*, 1998; ARCT *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2004; OLIVELLA *et al.*, 2007);

- ✓ complexação com β -ciclodextrina (VINADÉ, 1995)

A estratégia de complexação da quercetina com β -ciclodextrina, no entanto, encontra uma grande limitação que é a baixa concentração de quercetina na referida associação. Assim, o presente capítulo é dedicado à avaliação da influência da β -ciclodextrina, sob a forma de mistura física com a quercetina, na promoção da penetração da aglicona na pele. A concentração do flavonóide retido em cada camada da pele, epiderme e derme, bem como o correspondente potencial antioxidante cutâneo são medidos para o dimensionamento desta influência.

Tabela 4.1. Relatos de difusão pela quercetina através de membranas na literatura.

Referência	Modelo	Membrana	Fase doadora	Q _{QCT} aplicada	Fase aceptora	Tempo (h)	Análise	Q absorvida ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)	Q retida
VINADÉ (1995)	CD <i>in vitro</i>	filme polimérico	a: dispersão aquosa b: solução aquosa β CD	sistema fechado	a: água b: solução aquosa β CD	4	UV	a: 2,5 % b: 40,0 %	-
BONINA e colaboradores (1996)	CD <i>ex vivo</i>	pele humana	solução acetona	0,2 mg	etanol 50 %	24	CLAE	1,82	-
SAIJA e colaboradores (1998)	CD <i>ex vivo</i>	pele humana	a: solução acetona b: solução acetona (+PT LIM) c: solução acetona (+PT LE)	0,4 mg	etanol 50 %	24 (+6 PT)	CLAE	a: 2,18 b: 2,54 c: 2,66	-
ARCT e colaboradores (2002)	CD <i>in vitro</i>	lipofílica	a: tampão fosfato b: tampão fosfato (+PEG ₄₀₀ , PEG ₁₅₀₀ , PG, G ou BG)	não mencionado	tampão fosfato	72	UV	(a \approx bBG > bPG \approx bPEG ₄₀₀ \approx bG > bPEG ₁₅₀₀)	-
WEBBER (2003)	CD <i>ex vivo</i>	pele suína	a: solução acetona b: emulsão iônica com NC (+MI+PG)	20 mg	etanol 50 %	12	CLAE	a: 0,67 b: 3,34	-
KIM e colaboradores (2004)	CD <i>ex vivo</i>	pele camundongo	adesivos transdérmicos (+ácidos graxos)	15/30/60 mg	solução salina de PEG ₄₀₀ (40 %)	24	CLAE	liberação controlada	-
CASAGRANDE e colaboradores (2007)	CD <i>ex vivo</i>	pele suína	emulsões O/A (não-iônica e aniônica)	10 mg	tampão fosfato (pH 7,6) + 0,5 % tween ₂₀	12	CLAE	não detectado	-
FASOLO (2007)	CD <i>ex vivo</i>	pele suína	a: solução acetona b: nanoemulsão c: nanoemulsão catiônica	1 mg	etanol 50 %	8	CLAE	a: 0,42 b: 0,60 c: 1,54	a: - b: 254 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ c: 231 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
MONTENEGRO e colaboradores (2007)	CD <i>ex vivo</i>	pele humana	a: solução aquosa QCT b: solução aquosa éster 2 c: solução aquosa éster 3 d: solução aquosa éster 5	a: 1,44 μg b: 12,8 μg c: 92,4 μg d: 1,02 μg	etanol 50 %	22	CLAE	a: 0,45 b: 1,77 c: 5,37 d: não detectado	-
OLIVELLA e colaboradores (2007)	CD <i>ex vivo</i>	pele suína	a: gel carbopol b: gel carbopol (+DMF) c: gel carbopol (+mentol)	22,25 mg	tampão fosfato (pH 7,4)	2	UV	a: \pm 200 b: \pm 400 c: \pm 400	-
VICENTINI e colaboradores (2008)	CD <i>ex vivo</i>	pele suína	microemulsão A/O	0,3 mg	tampão fosfato (pH 7,2) + 0,5 % tween ₂₀	12	CLAE	não detectado	EC: 16,9 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ EV/D: 2,5 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$
	<i>in vivo</i>	pele camundongo			-	6		-	EC: 21,5 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ EV/D: 11,3 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$
KITAGAWA e colaboradores (2009)	CD <i>ex vivo</i>	pele porquinho-da-índia	microemulsão A/O	6 mg	tampão fosfato (pH 7,4) + 1,0 % albumina	30	CLAE	não detectado	\pm 3,7 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ Maior distribuição nas camadas mais profundas (criomicrotomo)

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Estudar a influência do veículo de formulações (hidrogel e pomada contendo quercetina, sob a forma livre ou de mistura física com β -ciclodextrina) e do efeito promotor da β -ciclodextrina sobre:
 - a penetração cutânea da quercetina em cada camada da pele (epiderme e derme);
 - o potencial antioxidante da quercetina em cada camada da pele (epiderme e derme)

PUBLICAÇÃO 6. Association of quercetin with β -cyclodextrin: *ex vivo* skin permeation and antioxidant potential studies

Submetido ao Skin Pharmacology and Physiology

Association of quercetin with β -cyclodextrin: ex vivo skin permeation and antioxidant potential studies

Greice Stefani Borghetti^a, Ricardo Fagundes da Rocha^b, Paulo Mayorga^a, Jose Claudio Fonseca Moreira^b and Valquiria Linck Bassani^{a*}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos 2600, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil

Short title: **Quercetin/ β -cyclodextrin skin permeation and antioxidant potential**

* **Corresponding author:** Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: (+55) 51 3308 3004; Fax: (+55) 51 3308 5437. E-mail address: valquiria@pq.cnpq.br (V. L. Bassani).

Abstract

The enhancer effect of β -cyclodextrin and the influence of the vehicle (hydrogel or ointment) on the *ex vivo* skin permeation as well as on the antioxidant potential of quercetin were investigated. The cutaneous permeation assay was evaluated using Franz diffusion cells. When quercetin was associated to β -cyclodextrin and incorporated into the hydrogel, it was observed an increase of the quercetin concentration retained in the epidermis and in the dermis. The highest antioxidant potential and reactivity, evaluated by TRAP and TAR assays, respectively, were observed when the skin was treated with the quercetin: β -cyclodextrin mixture incorporated into the hydrogel. These findings demonstrate the potential of the hydrogel containing quercetin associated to β -cyclodextrin for the prevention of oxidative stress-mediated cutaneous damages.

Key-words: antioxidant activity, β -cyclodextrin, HPMC, quercetin, skin permeation

1. Introduction

The exposure of the skin to environmental factors, such as sun radiation and air pollution, produces reactive oxygen species (ROS) which can induce cutaneous damages, such as ageing, inflammation, cancer, and immunosuppression. The topical administration of formulations containing antioxidants represents an interesting strategy for enriching the endogenous defense system and, thus, for protecting the skin against oxidative stress-mediated damages [1,2]. Topical delivery systems of bioactive substances have been of great interest as a cosmetic or a therapeutic approach for the prevention and the treatment of skin damages because they restrict the effects to specific tissues and, at the same time, avoid possible systemic toxicity. However, the success of a topical delivery system depends on the ability of the bioactive substance to be released from the vehicle in which it is applied, reaching the skin surface, and to penetrate the skin in a manner that allows it to reach in sufficient amount the desired site of action [3].

Quercetin is a flavonoid aglycon presenting a well known antioxidant activity, which results from its ability of scavenging ROS, chelating metal ions, and inhibiting the lipid peroxidation [4]. The beneficial effects of quercetin on oxidative skin damages, induced by Fe^{2+} /citrate system (*ex vivo* [5,6]) or UVB radiation (*in vivo* [7,8]), have been reported. In some of these studies, the quercetin concentration which was active in the whole skin was measured using *ex vivo* [8,6] or *in vivo* [8] models, suggesting that the flavonoid presents a reduced ability to penetrate through the skin. The enhancer effect of cyclodextrins on the skin penetration of quercetin has not been investigated to date and, thus, their use represents an interesting strategy to overcome this limitation.

In this context, the present work was designed for investigating the enhancer effect of β -cyclodextrin and the influence of the vehicle (hydrogel or ointment) on the *ex vivo* cutaneous permeation of quercetin as well as on the antioxidant potential of the flavonoid. For the first time, the quercetin concentration is determined separately in the epidermis and in the dermis and a relationship between the quercetin concentration retained in each skin layer and the corresponding antioxidant potential of the flavonoid is established.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Reference quercetin (purity 98 %), luminol (3-aminophthalhydrazide), AAPH (2,2'-azo-bis(2-amidinopropane)) hydrochloride and bovine serum albumin were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Pharmaceutical grade quercetin was purchased from Deg (São Paulo, Brazil). β -cyclodextrin was kindly supplied by Roquette Frères (Lestrem, France). Hydroxypropyl-methyl-cellulose (HPMC, Methocel[®] K4M) was purchased from Blanver (São Paulo, Brazil). Water was purified using a Milli-Q system (Millipore[®], Bedford, MA, USA). Acetone, *n*-octanol, ethylic ether, solid and liquid paraffin, propyleneglycol, sodium phosphate and acetate and phosphate buffers were purchased from Synth (São Paulo, Brazil). Liquid chromatography grade acetonitrile, ethanol and phosphoric acid were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Pig ears were kindly supplied by Cosuel (Encantado, Brazil).

2.2. Chromatographic conditions and analytical method validation

A liquid chromatography (LC) method was developed for quercetin analysis in the skin permeation studies. The analysis was performed using a Shimadzu Prominence LC-10A equipment (Kyoto, Japan) coupled to an UV/VIS detector SPD-20AV. The detection was set at 372 nm. The stationary phase was a Phenomenex RP C₁₈ column (150 x 4.6 mm i.d., 5 µm particle size) guarded by a Lichrosorb precolumn (4 x 3 mm i.d., 10 µm particle size). The mobile phase was a mixture of 0.05 % phosphoric acid and acetonitrile (60:40, v/v). Isocratic elution was performed under a flow rate of 0.8 mL.min⁻¹. The injection volume was 20 µL and the runtime was 10 min. The analysis was performed at room temperature.

The LC method was validated for specificity, linearity, precision, accuracy, and detection (DL) and quantitation (QL) limits [9]. The specificity of the method was evaluated by analyzing acceptor solutions or skin extracts in order to confirm that the biological matrix does not interfere on the quercetin analysis during the cutaneous permeation studies. For this, formulations without quercetin were applied on the skin surface and the diffusion cells were kept under stirring at 37 ± 0.5 °C for 8 h. The linearity of the method was evaluated by regression analysis using the least square method. Three calibration curves were obtained by plotting the peak area *versus* the quercetin concentration in ethanol:water (50 %, v/v) mixtures (0.4, 0.8, 1.2, 1.6 and 2.0 µg.mL⁻¹), each one prepared in triplicate. The DL and the QL of the method were calculated based on the standard deviation of the intercept and on the slope of the calibration curve. The repeatability of the method was evaluated by analyzing nine aliquots of ethanol:water (50 %, v/v) mixture containing quercetin (1.2 µg.mL⁻¹) during the same day. For the intermediary precision evaluation, three aliquots of ethanol:water (50 %, v/v) mixture containing quercetin (1.2 µg.mL⁻¹) were analyzed

during three consecutive days, under the same experimental conditions. A fresh solution was prepared at each day. The accuracy of the method was evaluated by adding known amounts of ethanol:water (50 %, v/v) mixture containing quercetin to the acceptor solution or to the skin extract at the following concentration levels: low ($0.4 \mu\text{g.mL}^{-1}$), medium ($1.2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and high ($2.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

2.3. Determination of the partition coefficient of quercetin in octanol/water

Six milliliters of water and 6 mL of *n*-octanol were mixed and kept under stirring at room temperature for 24 h to achieve the equilibrium. An excess amount of quercetin (3 mg) was added to a 3 mL aliquot of each phase and the mixture of both phases was kept under stirring for further 12 h. The mixture was centrifuged at 10,000 rpm for 15 min. The supernatant of each phase was diluted with ethanol:water (50 %, v/v) mixture and then filtered through a $0.45 \mu\text{m}$ pore diameter membrane (Millipore[®] HVLP). The quercetin content was measured in triplicate using the above-described LC method.

The partition coefficient was determined and the logarithm of the quotient between the saturation concentration of quercetin ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) in the octanol and aqueous phases, respectively, was calculated ($\log K_p$).

2.4. Determination of the quercetin solubility and stability in the acceptor solution

An excess amount of quercetin (20 mg) was added to 10 mL of ethanol:water (50 %, v/v) mixture. The resulting dispersion was stirred at $37 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ for 24 h using a water bath and then filtered through a $0.45 \mu\text{m}$ pore diameter membrane (Millipore[®] HVLP). The supernatant was diluted with ethanol:water (50 %, v/v) mixture and the quercetin content was measured in triplicate using the above-described LC method.

The quercetin stability in the acceptor solution was also evaluated. For this, ethanol:water (50 %, v/v) mixture containing quercetin ($2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) was kept under stirring at 37 ± 0.5 ° using a water bath for 8 h. At pre-determined time intervals (0, 2, 4 and 8 h), aliquots were collected and filtered through a $0.45 \mu\text{m}$ pore diameter membrane (Millipore® HVL P). The quercetin content was measured in triplicate using the above-described LC method.

2.5. Preparation and stability evaluation of formulations containing quercetin

In view to evaluate the effect of the vehicle on the cutaneous permeation and on the antioxidant potential of quercetin, two formulations were prepared: a hydrogel and an ointment. For the hydrogel preparation, HPMC was dispersed in water (2 %) and kept under occasional stirring for 24 h at room temperature. For the ointment preparation, solid paraffin (50 %) was melted at 70 ± 0.5 °C using a water bath and added from liquid paraffin (50 %). The mixture was stirred and allowed to cool to room temperature. Quercetin or quercetin: β -cyclodextrin physical mixture (1:1 molar ratio) was incorporated into the vehicles (corresponding to 1 % of quercetin) with previous solubilization in sufficient amount of propylene glycol. The formulations were allowed to equilibrate for 24 h before use.

For the stability tests, the formulations (hydrogel or ointment containing quercetin or quercetin: β -cyclodextrin mixture) were stored at room temperature for 48 h. At pre-determined time intervals (0, 12, 24 and 48 h), samples of 100 mg were collected, kept under stirring at room temperature for 30 min with adequate solvent (ethanol:water 50 % v/v mixture, for the hydrogel, and ethilic ether, for the ointment), diluted with ethanol:water (50 %, v/v) mixture until the theoretical quercetin concentration of $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, and filtered. The quercetin content was measured in

triplicate using the above-described LC method. The pH of the formulations was determined using pH meter calibrated with acetate (pH 4.0) and phosphate (pH 7.0) buffers.

2.6. Skin treatment

The *ex vivo* cutaneous permeation of quercetin was investigated using modified Franz type diffusion cells [10] with approximately 2.54 cm² of interface area and 10 mL of acceptor volume. Hairless pig ear skin with approximately 1 mm of thickness was used as membrane.

The pig ears were stored at -18 °C before use. The whole skin on the back of the defrosted ear was removed from the underlying cartilage using a scalpel. The blood vessels and the subcutaneous fat were also removed. Circular disks of skin were hygienized with running water and adhered to the acceptor phase containing a magnetic stirrer, with the stratum corneum facing the donor phase, which was then mounted. The acceptor and donor phases were filled with phosphate buffer (0.2 M, pH 7.4) and the skin was hydrated for 12 h under refrigeration at 4 °C.

2.7. Evaluation of the ex vivo skin permeation of quercetin

In the acceptor phase, the phosphate buffer was replaced by ethanol:water (50 %, v/v) mixture. In the donor phase, it was replaced by approximately 200 mg of the formulations (hydrogel or ointment containing quercetin or quercetin:β-cyclodextrin mixture) or by 50 μL of quercetin solution in acetone (after which the volatile solvent was allowed to evaporate), both corresponding to 2 mg of quercetin, or by the controls (vehicles or acetone), which were uniformly applied on the skin surface. The application of quercetin:β-cyclodextrin mixture on the skin surface using acetone was

not performed due to the low solubility of β -cyclodextrin in this solvent. The diffusion cells were kept under stirring at 37 ± 0.5 °C using a water bath during the experiment (8 h). After this period, the skin and the acceptor solution were removed from the diffusion cells.

The acceptor solution was filtered through a 0.45 μm pore diameter membrane (Millipore[®] HVLP) and the quercetin content was measured using the above-described LC method. The results were expressed as quercetin amount permeated by area ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$). All measurements were performed in tetraplicate.

The skin surface was wiped with a cotton swab, washed with ethanol:water (50 %, v/v) mixture and stripped by the application of one adhesive tape (3M[®]) to remove the sample excess remaining. The skin disks were immersed in water at 60 ± 0.5 °C for 1 min and then the epidermis was separated from the dermis by sliding it off with a scalpel blade. Each skin layer was separately weighed, cut in small pieces with a scalpel, and then transferred to a glass tissue homogenator. The quercetin extraction from each skin layer was performed by trituration for 2 min with 1 mL of ethanol:water (50 %, v/v) mixture followed by shaking in ultrasound bath for 2 min, and trituration for further 2 min. The extraction procedure was carried out in triplicate. The total volume (3 mL) of homogenate was transferred to a volumetric flask and made up to 5.0 mL with ethanol:water (50 %, v/v) mixture. The supernatant was filtered through a 0.45 μm pore diameter membrane (Millipore[®] HVLP) and the quercetin content was measured using the above-described LC method. The results were expressed as quercetin amount retained by tissue mass ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). All measurements were performed in tetraplicate.

2.8. Evaluation of the ex vivo antioxidant potential of quercetin in the skin

The reaction was initiated by adding 10 μ L of 4 mM luminol and 4 mL of 10 mM AAPH. The mixture was incubated at room temperature for 2 h, resulting in steady chemiluminescence emission. Forty microliters of the samples, epidermis or dermis homogenate obtained from the skins (corresponding to approximately 8 μ g of protein) previously treated with the formulations (hydrogel or ointment containing quercetin or quercetin: β -cyclodextrin mixture; with quercetin dissolved in acetone; or with the controls, vehicles or acetone), were added to the system and the chemiluminescence emission at 575 nm was monitored for 60 min in a liquid scintillation counter (Wallac 1409, Turku, Finland). The protein amount in the homogenates was measured by the Lowry et al. method [11], using bovine serum albumin as standard. All measurements were performed in tetraplicate.

The TRAP (total reactive antioxidant potential) profiles of the samples were obtained by measuring the chemiluminescence emission as counts per minute (CPM). The percentage of the corresponding values was calculated and the areas under the curves were compared with the control (skin not treated). The TAR (total antioxidant reactivity) index was determined by measuring the initial decrease of the chemiluminescence. It was calculated as the ratio l_0/l , where l_0 is the emission of the chemiluminescence before the quercetin addition and l is the instantaneous emission of the chemiluminescence after the quercetin addition to the system.

2.9. Statistical analysis

One-way analysis of variance followed by Tukey's test was employed in the comparison of the experimental data for significance at P -values less than 0.05.

3. Results and discussion

3.1. Liquid chromatography

The purity of the quercetin peak in the presence of the biological matrix (acceptor solution or skin extract) showed that the method was specific (data not shown). The regression coefficient ($R^2 = 0.9995$) confirmed that the calibration curve was linear over the quercetin concentration range (0.4 to $2.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$). The relative standard deviation (R.S.D.) of the slope of the three curves was 1.14% . The equation obtained was $y = 98384 x + 1899.6$, where y is the peak area and x is the quercetin concentration. The confidence intervals for the intercept included zero ($-3311;7110$), confirming the absence of constant systematic error. The DL ($0.05 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and the QL ($0.17 \mu\text{g.mL}^{-1}$) showed the sensitivity of the method. The repeatability (R.S.D. = 0.97%) and the intermediate precision (R.S.D. = 2.06%) were adequate. The quercetin recovery from the acceptor solution (96.8 to 99.6%) and from the skin extract (91.6 to 98.1%) showed that the method was accurate.

3.2. Determination of the partition coefficient of quercetin in octanol/water

The log K_p is an indicator of the affinity of a compound by lipid membranes. In the present study, quercetin presented a log K_p of 2.13 ± 0.01 . This value is similar to that reported in the literature (1.82) [12] and it characterizes quercetin as a lipophilic molecule with adequate potential to penetrate through the skin.

3.3. Determination of the quercetin solubility and stability in the acceptor solution

The low solubility of biologically active substances in water, such as the aglycon quercetin ($3.7 \mu\text{g.mL}^{-1}$ [13]), has determined the use of ethanol:water (50% , v/v) mixture as acceptor phase for obtaining the *sink* condition during skin permeation

studies. In this solvent, at 37 ± 0.5 °C, the quercetin solubility was 0.65 ± 0.01 mg.mL⁻¹.

No quercetin degradation was observed during 8 h of stirring at 37 ± 0.5 °C (data not shown), suggesting that quercetin remained stable in ethanol:water (50 %, v/v) mixture under the evaluated conditions. These results demonstrate the adequacy of this solvent as acceptor phase to investigate the skin permeation of quercetin.

3.4. Preparation and stability evaluation of formulations containing quercetin

Before evaluating the cutaneous permeation of quercetin, the stability of this flavonoid was investigated in all formulations (hydrogel and ointment containing quercetin or quercetin:β-cyclodextrin mixture). The pH of the formulations (between 5.0 and 5.5) remained unaltered as well as no quercetin degradation was observed during 48 h of storage at room temperature (data not shown). These results suggest that quercetin remained stable in the formulations after their preparation.

3.5. Evaluation of the ex vivo skin permeation of quercetin

The evaluation of the permeation of formulations containing antioxidants is an important step for the development of new pharmaceutical or cosmetic products, since oxidative stress-mediated cutaneous damages occur in the epidermis and/or in the dermis. Thus, we investigated the enhancer effect of β-cyclodextrin and the influence of two different vehicles (hydrogel and ointment) on the cutaneous permeation of quercetin. For comparison purpose, the intrinsic permeation of quercetin was also evaluated, where the flavonoid dissolved in acetone was applied on the skin surface.

The test of intrinsic permeation demonstrated that the quercetin concentration retained in the epidermis ($703.37 \pm 25.24 \mu\text{g.g}^{-1}$) was significantly ($P < 0.05$) higher than that found in the dermis ($3.14 \pm 0.19 \mu\text{g.g}^{-1}$) and in the acceptor phase of the diffusion cell ($2.56 \pm 0.15 \mu\text{g.cm}^{-2}$), suggesting that the flavonoid is able to penetrate the stratum corneum, the main barrier to drugs penetration through the skin. These results are in accordance with some physicochemical characteristics of quercetin which are favorable for its cutaneous penetration, such as the partition coefficient (2.13) and its low molecular weight (302.24). However, these results also suggest a reduced ability of quercetin permeating through the deeper skin layers.

In order to know the influence of β -cyclodextrin and of the vehicles on the cutaneous permeation of quercetin, this flavonoid was incorporated into a hydrogel or into an ointment at a concentration of 1 %, in the presence or in the absence of β -cyclodextrin. The absence of quercetin in the acceptor phase 8 h after the application of the formulations on the skin surface, in all of the cases, showed that two hypothesis are possible. The first one, the vehicles did not release quercetin to the skin surface or, the second one, quercetin was retained in the skin, tending to form a reservoir in the epidermis and/or in the dermis lipid domains. The presence of quercetin in the epidermis and/or in the dermis was then analyzed and the corresponding concentrations are presented in Table 1 and Fig. 1. The ranking of the quercetin (QCT) concentration retained in the epidermis from the different formulations was as follow: QCT in ointment = quercetin: β -cyclodextrin (QCT: β CD) mixture in ointment $<$ QCT in hydrogel $<$ QCT: β CD mixture in hydrogel ($P < 0.05$). The quercetin concentration found in the dermis was as follow: QCT in ointment = QCT: β CD mixture in ointment = QCT in hydrogel $<$ QCT: β CD mixture in hydrogel ($P < 0.05$).

When quercetin was incorporated into both vehicles, ointment or hydrogel, in the absence of β -cyclodextrin, the quercetin concentration found was 109 or 165 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, in the epidermis, and 1.1 or 1.4 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, in the dermis, respectively. These differences may be explained by the high affinity of quercetin by the lipophilic excipients present in the ointment and the consequent low release of the aglycon, contrarily to the hydrogel.

When quercetin was associated to β -cyclodextrin, the flavonoid concentration found in the epidermis increased to 116 or 322 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ from the ointment or the hydrogel, respectively. Similarly, the quercetin concentration found in the dermis increased to 1.3 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (from the ointment) or 2.7 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (from the hydrogel). The enhancer effect of cyclodextrins on the skin permeation of drugs is already well described in the literature [14]. Here we are able to demonstrate it for quercetin. Besides that, our results reveal clearly the influence of the vehicle on this effect, since β -cyclodextrin was able to enhance the quercetin permeation especially in the hydrophilic matrix. The hypothesis that the vehicle nature modulates the release of the own cyclodextrin, as previously demonstrated by Koester et al. [15] in HPMC solid matrix (tablets), seems to be probable. In the present study, a similar matrix (HPMC) was employed in semi-solid state and, therefore, the diffusion mechanism should be also involved. By the other hand, in the ointment the enhancer effect of β -cyclodextrin is quite not observed. The hypothesis that β -cyclodextrin has been associated with the lipophilic excipients from the ointment and, thus, it may not being available for acting as permeation enhancer on the skin surface can not be ruled out. These results corroborate the importance of choosing an adequate vehicle for incorporating quercetin.

3.6. Evaluation of the ex vivo antioxidant potential of quercetin in the skin

The non-enzymatic antioxidant cellular defenses of the skin extracts were estimated by TRAP and TAR assays [16]. AAPH was used as a source that produces, at a constant rate, peroxy radicals which react with luminol yielding chemiluminescence. The addition of a bioactive substance to the system decreases the chemiluminescence proportionally to its antioxidant potential. The TRAP and the TAR index of quercetin in the epidermis or in the dermis 8 h after the application of the formulations on the skin surface are presented in Fig. 2 and in Fig. 3, respectively.

All the formulations were significantly ($P < 0.05$) active in reducing the chemiluminescence when compared with the control (skin not treated), demonstrating the ability of quercetin in scavenging peroxy radicals. Similarly to the cutaneous permeation results, the highest ($P < 0.05$) antioxidant potential and reactivity were observed for the epidermis and for the dermis treated with quercetin: β -cyclodextrin mixture incorporated into the hydrogel.

4. Conclusions

The present study demonstrated that the enhancer effect of β -cyclodextrin on the skin permeation of quercetin and on the corresponding cutaneous antioxidant potential were strongly increased when the flavonoid aglycon was incorporated into a HPMC hydrogel. This effect was observed both in the epidermis and in the dermis and it was not observed when the ointment vehicle was used. These findings demonstrate, therefore, the potential use of a HPMC hydrogel containing quercetin: β -cyclodextrin mixture for the prevention of oxidative stress-mediated cutaneous damages, especially those occurring in the most superficial layers of the skin.

Acknowledgements

The authors thanks the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the financial support and the scholarships; to Roquette Frères for supplying the β -cyclodextrin and to Cosuel for supplying the pig ears.

References

- [1] Pinnell SR: Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. *J Am Acad Dermatol* 2003; 48: 1-19.
- [2] Yaar M, Gilchrest BA: Photoageing: mechanism, prevention and therapy. *Br J Dermatol* 2007; 157: 874-887.
- [3] Kaur IP, Kapila M, Agrawal R: Role of novel delivery systems in developing topical antioxidants as therapeutics to combat photoageing. *Ageing Res Rev* 2007; 6: 271-288.
- [4] Boots AW, Haenen GRMM, Bast A: Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *Eur J Pharmacol* 2008; 585: 325-337.
- [5]. Casagrande R, Georgetti SR, Verri Jr WA, Borin MF, Lopez RF, Fonseca MJ: *In vitro* evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical formulations and its functional stability by antioxidant activity. *Int J Pharm* 2007; 328: 183-190.
- [6] Kitagawa S, Tanaka Y, Tanaka M, Endo K, Yoshii A: Enhanced skin delivery of quercetin by microemulsion. *J Pharm Pharmacol* 2009; 61: 855-860.
- [7] Casagrande R, Georgetti SR, Verri Jr WA, Dorta DJ, dos Santos AC, Fonseca MJ: Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. *J Photochem Photobiol B* 2006; 84: 21-27.
- [8] Vicentini FTMC, Simi TRM, Del Ciampo JO, Wolga NO, Pitol DL, Iyomasa MM, Bentley MVLB, Fonseca MJV: Quercetin in w/o microemulsion: *in vitro* and *in vivo* skin penetration and efficacy against UVB-induced skin damages evaluated *in vivo*. *Eur J Pharm Biopharm* 2008; 69: 948-957.
- [9] ICH: International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, Validation of analytical procedures: text and methodology, Q2, R1, 2005.
- [10] FDA: Food and drug administration guidance for industry: nonsterile semisolid dosage forms, 1997.
- [11] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
- [12] Rothwell JA, Day AJ, Morgan MRA: Experimental determination of octanol-water partition coefficients of quercetin and related flavonoids. *J Agric Food Chem* 2005; 53: 4355-4360.
- [13] Borghetti GS, Lula IS, Sinisterra RD, Bassani VL: Quercetin/beta-cyclodextrin solid complexes prepared in aqueous solution followed by spray-drying or by physical mixture. *AAPS PharmSciTech* 2009; 10: 235-42.
- [14] Loftsson T, Masson M: Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. *Int J Pharm* 2001; 225: 15-30.

[15] Koester LS, Xavier CR, Mayorga P, Bassani VL: Influence of β -cyclodextrin complexation on carbamazepine release from hydroxypropyl methylcellulose matrix tablets. *Eur J Pharm Biopharm* 2003; 55: 85-91.

[16] Kappel VD, Costa GM, Scola G, Silva FA, Landell MF, Valente P, Souza DG, Vanz DC, Reginatto FH, Moreira JC: Phenolic content and antioxidant and antimicrobial properties of fruits of *Capsicum baccatum* L. var. *pendulum* at different maturity stages. *J Med Food* 2008; 11: 267-274.

Table caption

Table 1. Quercetin concentration found in each skin layer, epidermis or dermis, and in the acceptor phase of the diffusion cells 8 h after the application of the formulations on the skin surface (n = 4)

Figure captions

Figure 1. Cutaneous retention of quercetin in the epidermis (a) or in the dermis (b) 8 h after the application of the formulations on the skin surface (n = 4). The bars marked with the same letter indicate no significant difference by Tukey's test ($P < 0.05$)

Figure 2. TRAP of quercetin in the epidermis (a) or in the dermis (b) 8 h after the application of the formulations on the skin surface (n = 4). The bars marked with the same letter indicate no significant difference by Tukey's test ($P < 0.05$)

Figure 3. TAR index (I_0/I) of quercetin in the epidermis (a) or in the dermis (b) 8 h after the application of the formulations on the skin surface (n = 4). I_0 is the emission of the chemiluminescence before the quercetin addition. I is the instantaneous emission of the chemiluminescence after the quercetin addition to the system. The bars marked with the same letter indicate no significant difference by Tukey's test ($P < 0.05$)

Figure 1.

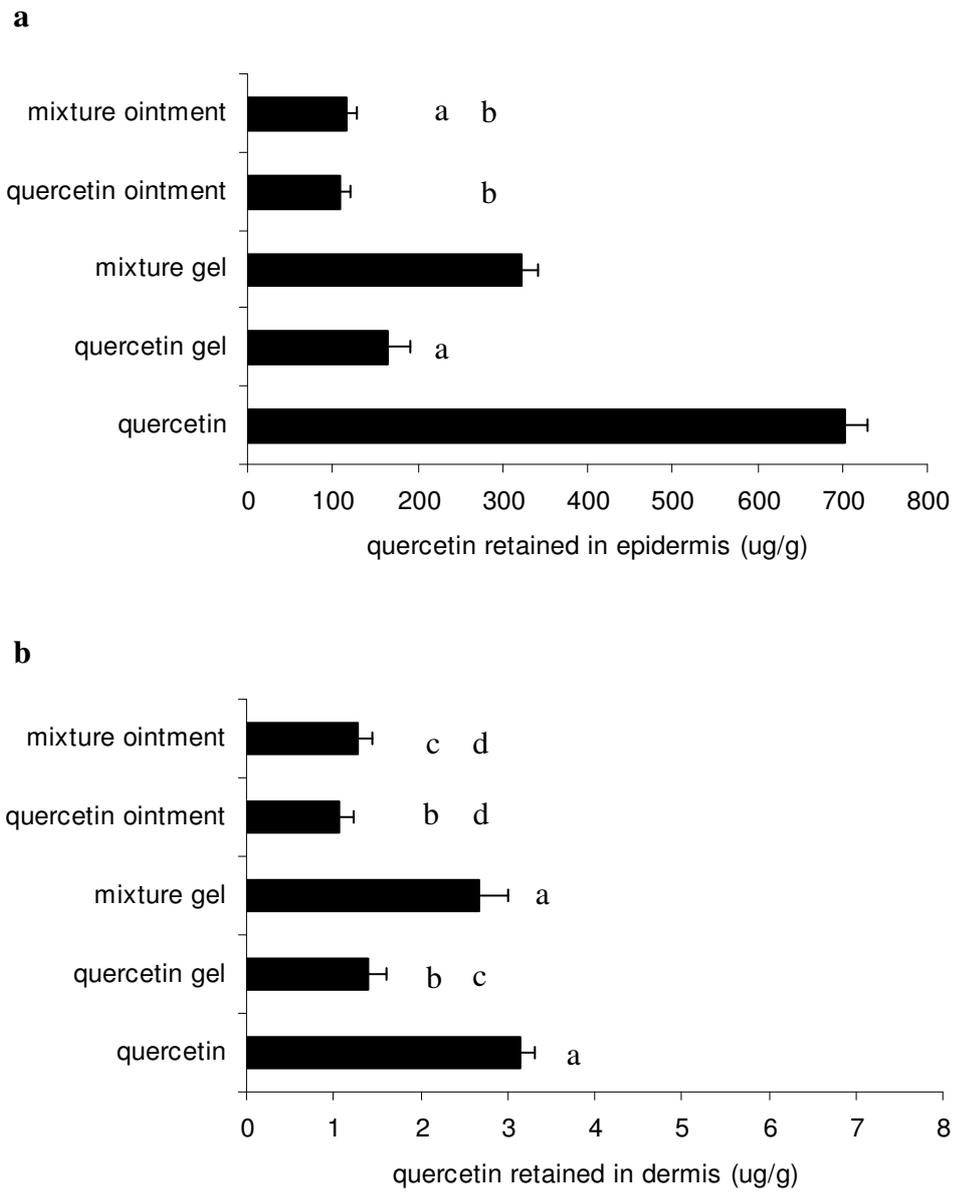


Figure 2.

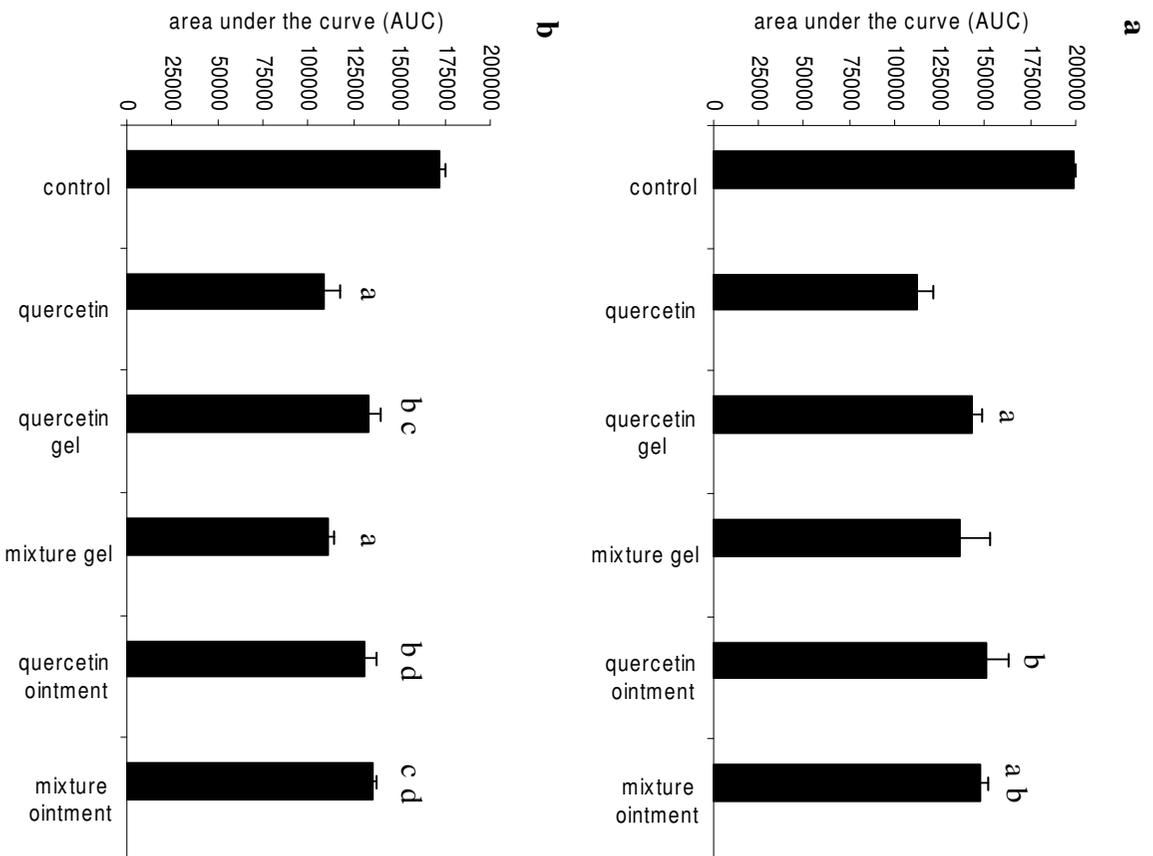


Figure 3.

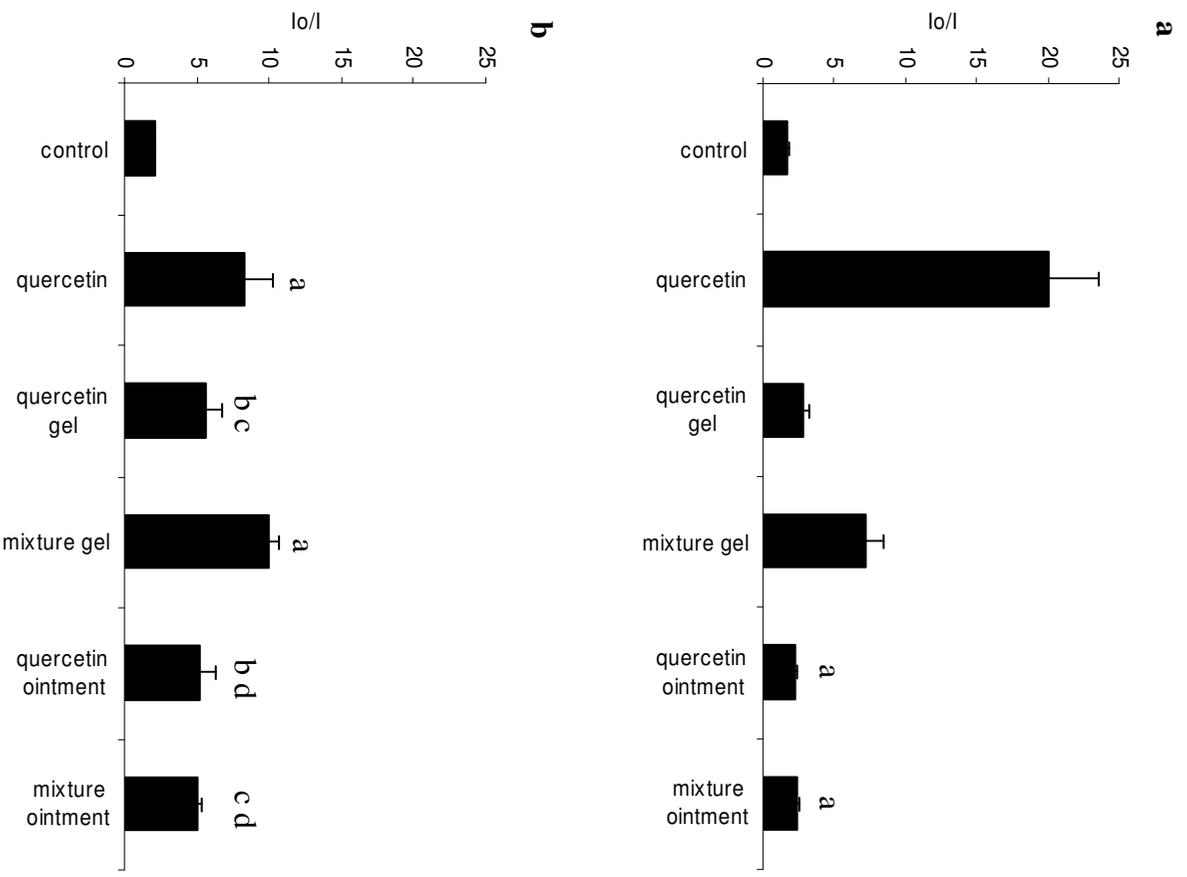


Table 1.

Formulations	Skin QCT ^a concentration ($\mu\text{g.g}^{-1}$)		QCT ^a concentration in acceptor phase
	Epidermis	Dermis	($\mu\text{g.cm}^{-2}$)
QCT ^a in ointment	109.0 \pm 12.21	1.1 \pm 0.3	ND ^c
QCT: β CD ^b mixture in ointment	116.3 \pm 12.41	1.3 \pm 0.2	ND ^c
QCT ^a in hydrogel	165.3 \pm 26.12	1.4 \pm 0.2	ND ^c
QCT: β CD ^b mixture in hydrogel	322.6 \pm 19.37	2.7 \pm 0.3	ND ^c

^aQCT = quercetin; ^bQCT: β CD mixture = quercetin: β -cyclodextrin mixture; ^cND = not detected

Quercetin concentration in all of the formulations was 1 %.

DISCUSSÃO GERAL



O presente trabalho foi realizado com o objetivo de estudar características físicas, químicas e biológicas de interesse para a permeação cutânea do flavonóide quercetina e de sua associação com β -ciclodextrina.

Sabe-se que o grau de hidratação de substâncias fenólicas exerce grande influência sobre a configuração molecular e, por conseqüência, sobre a geometria do retículo cristalino das mesmas. Assim, o padrão das ligações de hidrogênio das hidroxilas das moléculas difere entre suas formas cristalinas. Esta propriedade é especialmente relevante para substâncias bioativas como a quercetina, pois estes grupamentos podem estar fortemente relacionados com suas propriedades físicas e químicas e conseqüentes propriedades biológicas, farmacotécnicas e biofarmacêuticas. A preocupação com estes aspectos motivou o estudo de amostras de quercetina de diferentes procedências.

Neste sentido, a etapa inicial do trabalho (**Capítulo 1**) foi dedicada à caracterização físico-química, termo-analítica e espectroscópica de quatro amostras comerciais de quercetina. No que se refere ao grau de pureza, as amostras analisadas apresentaram-se diferentes. A presença do contaminante rutina, um glicosídeo de quercetina, foi observada em todas as amostras (anexo 1).

As análises realizadas por difratometria de raios-X em temperatura ambiente, espectroscopia no infravermelho (anexo 2) e espectroscopia por espalhamento Raman revelaram que as três amostras de quercetina apresentando grau farmacêutico, QCTa, QCTb e QCTc, possuem distintas estruturas cristalinas. Essas diferenças, quando analisadas por termogravimetria acoplada a espectroscopia no infravermelho, foram atribuídas à presença de moléculas de água de hidratação no retículo cristalino das amostras: a amostra QCTa correspondendo a um dihidrato, a amostra QCTc a um monohidrato e a amostra QCTb a uma mistura entre as formas dihidratada e anidra. Além da diferença no grau de hidratação dos cristais, o tamanho e à forma das partículas, também distintos, parecem ter contribuído para os diferentes valores de hidrossolubilidade intrínseca obtidos para as amostras. As diferenças na estrutura cristalina das amostras de quercetina sugerem que as mesmas tenham sido submetidas a distintas condições de cristalização durante o processo de síntese. Infelizmente, nossas tentativas de obtenção de cristais únicos

(*single crystal*) com qualidade adequada para refinamento das amostras pelo método de Rietveld não foram efetivas.

Em seqüência, a estabilidade térmica dos hidratos de quercetina, em estado sólido, foi avaliada utilizando-se as técnicas de calorimetria exploratória diferencial e difratometria de raios-X com variação de temperatura. Os resultados demonstraram que as amostras QCTb e QCTc, quando submetidas ao aquecimento (em temperaturas abaixo do ponto de fusão da molécula), sofreram duas transições de fases: a primeira, correspondente à liberação de água de hidratação do retículo cristalino e, a segunda, uma transição sólido-sólido das correspondentes formas anidras. A amostra QCTa, onde apenas a transição de fase relacionada à perda de água de hidratação foi observada, mostrou-se termodinamicamente mais estável em relação às amostras QCTb e QCTc.

As novas fases cristalinas formadas, em geral, apresentam propriedades físico-químicas distintas em relação às formas originais. Baseado no menor potencial de conversão da amostra de quercetina QCTa frente a alterações de temperatura, e por apresentar a mesma estrutura cristalina da substância de referência (a qual foi utilizada na validação dos métodos analíticos), essa amostra foi considerada a forma cristalina mais apropriada para ser empregada nas etapas subsequentes do trabalho.

Em suma, esta etapa do trabalho demonstrou o fato inédito de que a quercetina pode apresentar-se sob diferentes formas cristalinas e a relevância da análise deste parâmetro quando da aquisição de amostras no mercado, tendo em vista as diferentes hidrossolubilidades apresentadas pelas mesmas. Os principais resultados obtidos nesta etapa do trabalho foram publicados no periódico *Pharmazie* (v. 61, p. 802-804, 2006) e submetidos para publicação no periódico *Journal of Solid State Chemistry*.

A reduzida hidrossolubilidade da quercetina, sob a forma de aglicona ($3,7 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para a amostra selecionada, QCTa), limita o seu emprego no campo farmacêutico e cosmético, tanto sob o ponto de vista biofarmacêutico como tecnológico. Sendo assim, na seqüência do trabalho (**Capítulo 2**), a complexação

entre quercetina e β -ciclodextrina foi estudada visando à solubilização do flavonóide em veículo aquoso.

Inicialmente, estudou-se a influência das condições operacionais envolvidas na preparação, em meio líquido, de complexos quercetina/ β -ciclodextrina sobre a hidrossolubilidade da aglicona, utilizando-se um delineamento fatorial 2^3 . Os três fatores avaliados, quantidade em excesso de quercetina, temperatura e período de agitação exerceram influência significativa sobre a complexação entre a quercetina e a β -ciclodextrina. Na etapa seguinte, um diagrama de solubilidade foi construído utilizando-se as condições (6 mM de quercetina, 37 °C e 24 horas de agitação) nas quais um maior incremento de solubilidade da quercetina foi observado. Um reduzido incremento de solubilidade da quercetina (4,6 vezes) foi obtido na presença de 15 mM de β -ciclodextrina, sugerindo uma baixa eficiência de complexação, provavelmente atribuída à baixa constante de estabilidade aparente do complexo (230 M^{-1}). A eficiência de complexação foi aumentada quando os complexos quercetina/ β -ciclodextrina foram associados ao polímero hidrofílico hipromelose (0,1 %), em que a formação de sistemas ternários resultou num incremento de solubilidade do flavonóide de 6,5 vezes.

Posteriormente, associações quercetina/ β -ciclodextrina (complexo em estado sólido, obtido por meio da secagem por nebulização de complexo preparado em meio líquido, e mistura física) foram preparadas na relação molar de 1:1 (6 mM de quercetina e 6 mM de β -ciclodextrina). Esta relação, diferente daquela de maior hidrossolubilidade, que empregou 15 mM de β -ciclodextrina, foi baseada na viabilidade tecnológica, visto ser esta uma concentração excessiva de ciclodextrina para uma preparação farmacêutica no que se refere à massa correspondente da mesma. A caracterização da mistura física, utilizando-se espectroscopia no infravermelho (anexo 3), calorimetria exploratória diferencial e espectroscopia de ressonância magnética nuclear, sugeriu a formação de complexo de inclusão, sendo este um processo tempo-dependente. Apenas foram observados indícios de interação entre a quercetina e a β -ciclodextrina no complexo preparado em meio líquido e seco por *spray-drying*, provavelmente devido à baixa concentração de quercetina no referido complexo (0,14 %).

A eficiência de complexação (incremento de solubilidade de 2,2 vezes) do complexo quercetina/ β -ciclodextrina em estado sólido, obtido por simples mistura entre as duas substâncias, foi similar àquela encontrada no complexo preparado em meio líquido numa relação molar de 1:1 (6 mM de quercetina e 6 mM de ciclodextrina), antes de ser submetido à secagem (incremento de solubilidade de 2,5 vezes). Entretanto, o fato da simples mistura entre a quercetina e a β -ciclodextrina ser um processo contínuo e que não utiliza água nem calor, bem como a possibilidade de transposição de escala, resultam em menor custo de obtenção destes complexos por este método quando comparado àqueles descritos na literatura, que empregam meio líquido ou semi-sólido. Ainda, a elevada concentração de quercetina na mistura física (23 %) também representa uma vantagem tecnologicamente relevante para este método de complexação, especialmente visando à via de administração cutânea. Os principais resultados obtidos nesta etapa do trabalho foram publicados nos periódicos *Latin American Journal of Pharmacy* (v. 26, p. 831-836, 2007) e *AAPS PharmSciTech* (v. 10, p. 235-242, 2009).

Assim, o conjunto de estudos realizados no capítulo 2 revelou que a estratégia de associação da quercetina à β -ciclodextrina resultou em baixa eficiência de complexação e, por consequência, num incremento de hidrossolubilidade da aglicona limitado. Essa limitação determinou o uso de mistura etanol:água 1:1 nas etapas subsequentes do trabalho, meio usualmente empregado em ensaios de atividade antioxidante (capítulo 3) e como solução aceptora em estudos de permeação cutânea do flavonóide (capítulo 4).

A instabilidade da quercetina em meio aquoso, sob distintas condições oxidantes (aquecimento, perfusão com oxigênio atmosférico e variações de pH) é bem descrita na literatura científica. Ainda, considerando-se apenas a referência de estudos preliminares acerca da estabilidade do flavonóide em meio aquoso, frente à radiação ultravioleta, e a importância da sua estabilidade para a atuação sobre os sistemas biológicos, a etapa seguinte do trabalho (**Capítulo 3**) foi destinada ao estudo da estabilidade da quercetina, frente à radiação UVA ou UVC, em mistura etanol:água 1:1.

A atividade antioxidante *in vitro* da quercetina, dissolvida em etanol:água (1:1), foi avaliada por meio da indução da peroxidação lipídica em dispersão de gema de ovo pela radiação UVA ou UVC. O meio foi exposto à radiação UVA, por 25 horas, ou à radiação UVC, por 30 minutos, período necessário para induzir a formação de mesma quantidade de malondialdeído, produto final da peroxidação lipídica. Um efeito inibitório dose-dependente foi observado frente a ambas radiações na presença de quercetina em concentrações de 0,5 a 5,0 μM . Porém, em concentrações superiores (7,5 a 25,0 μM), um comportamento distinto foi observado frente a cada uma das radiações. Enquanto a inibição sobre a peroxidação lipídica induzida pela radiação UVA alcançou seu máximo (58 %) na concentração da quercetina de 5,0 μM , o efeito inibitório sobre a peroxidação lipídica induzida pela radiação UVC foi aumentada com o uso de concentrações crescentes de quercetina, alcançando seu máximo (92 %) em 25,0 μM .

Na tentativa de compreender os resultados obtidos, a fotoestabilidade da quercetina foi investigada sob as mesmas condições experimentais empregadas no ensaio de peroxidação lipídica, ou seja, dissolvendo a aglicona em etanol:água (1:1), numa concentração de 25 μM , e expondo a solução à radiação UVA, por 25 horas, ou à radiação UVC, por 30 minutos. A quercetina mostrou-se instável às radiações, sendo a velocidade de degradação do flavonóide frente à radiação UVC (cinética de ordem zero; $K = 0,0543 \mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$; $T_{90\%} = 0,25 \text{ min}$) maior do que frente à radiação UVA (cinética de primeira-ordem; $K = 0,0132 \mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}$; $T_{90\%} = 1,12 \text{ h}$). O teor de quercetina no meio foi significativamente reduzido, respectivamente, para 75 % e 52 % da concentração original. Tais resultados parecem, num primeiro momento, contraditórios ao efeito de inibição observados, em que a quercetina na solução exposta à radiação UVC apresentou efeito inibitório mais pronunciado (92 %) do que quando exposta à radiação UVA (58 %).

O fato de a quercetina ter sido instável frente às radiações UVA e UVC e, por outro lado, ter sido capaz de inibir a peroxidação lipídica induzida por ambas radiações motivou a identificação dos produtos de degradação, que foi realizada utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de fotodiodos e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massa. O principal produto de degradação da quercetina, quando

exposta à radiação UVA, foi 5,7,4',5'-tetrahidróxi-2-metóxi-3,4-flavandiona, enquanto o ácido carboxílico do floroglucinol foi o principal produto de degradação da quercetina quando exposta à radiação UVC. A estrutura polifenólica dos produtos de degradação sugere, além do potencial sequestrante de radicais livres, que a hidroxila livre na posição C3 no anel C da quercetina seja o principal grupamento envolvido na oxidação da molécula, nas condições experimentais empregadas. Os principais resultados obtidos nesta etapa do trabalho foram submetidos para publicação no periódico *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* e sugerem que, nas condições experimentais empregadas, a quercetina gera um sistema antioxidante mais complexo que merece estudos mais aprofundados.

Alguns estudos relatam os efeitos benéficos da quercetina quando empregada em danos cutâneos associados ao estresse oxidativo, aspecto de interesse em preparações destinadas à aplicação tópica. Entretanto, o emprego em potencial da quercetina na prevenção e no tratamento de tais distúrbios é limitado pela sua reduzida capacidade de penetração cutânea. Neste sentido, a etapa final do trabalho (**Capítulo 4**) foi dedicada à avaliação da influência da β -ciclodextrina, sob a forma de mistura física com a quercetina, na promoção da penetração da aglicona na pele. Devido à baixa concentração de quercetina em complexos quercetina/ β -ciclodextrina em estado sólido, essa estratégia de associação não foi investigada, apenas a correspondente mistura física.

O ensaio de permeação cutânea *ex vivo* foi realizado utilizando-se células de difusão tipo Franz e pele de orelha de suíno como modelo de membrana. No ensaio de permeação intrínseca de quercetina, avaliada por meio da aplicação do flavonóide (2 mg) dissolvido em depósito volátil (acetona) sobre a superfície da pele, a concentração de quercetina retida na epiderme ($703,37 \mu\text{g.g}^{-1}$) foi significativamente superior àquela encontrada na derme ($3,14 \mu\text{g.g}^{-1}$) e na fase aceptora da célula de difusão ($2,56 \mu\text{g.cm}^{-2}$).

A literatura científica relata que a quercetina apresenta uma reduzida capacidade de penetração cutânea. Os resultados obtidos na presente etapa do trabalho, por outro lado, sugerem que, apesar da reduzida hidrossolubilidade, o flavonóide é capaz de penetrar a barreira do estrato córneo. A limitação está na sua difusão para camadas mais profundas da pele, fato este provavelmente atribuído à

interação da quercetina com os domínios lipofílicos da pele. Esta hipótese é corroborada pelas características físico-químicas apresentadas pelo flavonóide, tais como o coeficiente de partição octanol/água (2,13) e a baixa massa molecular (302,24), que são favoráveis à sua penetração cutânea.

A fim de avaliar a influência do veículo sobre a permeação cutânea e o potencial antioxidante da quercetina, duas formulações contendo o equivalente a 1 % de quercetina, sob a forma livre ou de mistura física com β -ciclodextrina (relação molar de 1:1), foram preparadas: um hidrogel (de hipromelose) e uma pomada. Quando as formulações foram aplicadas sobre a pele, na ausência de β -ciclodextrina, a concentração de quercetina retida na epiderme ($165 \mu\text{g.g}^{-1}$) e na derme ($1,4 \mu\text{g.g}^{-1}$) revelou ser superior para o hidrogel, quando comparado com a pomada ($109 \mu\text{g.g}^{-1}$ e $1,1 \mu\text{g.g}^{-1}$, respectivamente). Essas diferenças são provavelmente devido à afinidade da quercetina pelos excipientes lipofílicos da pomada, resultando numa menor partição da aglicona/estrato córneo.

Na presença de β -ciclodextrina, um incremento significativo da concentração de quercetina retida na pele, tanto na epiderme ($322 \mu\text{g.g}^{-1}$) quanto na derme ($2,7 \mu\text{g.g}^{-1}$), foi observado quando incorporadas no hidrogel. O efeito promotor da β -ciclodextrina não foi observado quando a mistura física foi incorporada na pomada, ($116 \mu\text{g.g}^{-1}$ na epiderme e $1,3 \mu\text{g.g}^{-1}$ na derme), ao contrário do hidrogel. A natureza do veículo das formulações, portanto, exerce influência sobre a liberação da ciclodextrina. As hipóteses sugeridas são: o envolvimento de um mecanismo de difusão da β -ciclodextrina na matriz hidrofílica (HPMC), e a associação da β -ciclodextrina aos excipientes lipofílicos da pomada, não estando disponível na superfície da pele para atuar na promoção da penetração cutânea da quercetina.

O fato da quercetina não ter sido detectada na fase aceptora das células de difusão, 8 horas após a aplicação das formulações sobre a superfície da pele (tanto na ausência quanto na presença de β -ciclodextrina), reforçam o fato de que a aglicona tenha sido retida na pele, sugerindo a formação de um reservatório em seus domínios lipídicos.

Por fim, a atividade antioxidante *ex vivo* da quercetina nas peles tratadas com as formulações foi investigado para cada uma das camadas, epiderme e derme.

Como nossas tentativas de indução de dano oxidativo na pele empregando radiação ultravioleta não obtiveram sucesso, o potencial antioxidante reativo total (TRAP) e a reatividade antioxidante total (TAR) do flavonóide foram avaliados. A concentração de quercetina alcançada nas camadas da pele, para todas as formulações, foi suficiente para o flavonóide exercer sua atividade sequestrante sobre radicais livres, fato este observado por meio da redução da quimiluminescência do sistema (anexo 4). Entretanto, de maneira similar aos resultados obtidos nos ensaios de permeação, o maior potencial e a maior reatividade antioxidante da quercetina foram observados na epiderme e na derme em cuja pele havia sido tratada com o hidrogel contendo quercetina associada à β -ciclodextrina.

Em suma, para todas as formulações empregadas, a concentração de quercetina retida na epiderme foi significativamente superior àquela encontrada na derme, o que resultou num maior potencial antioxidante do flavonóide nessa camada. Este efeito foi mais expressivo quando a pele foi tratada com o hidrogel contendo a quercetina sob a forma associada à β -ciclodextrina. Estes resultados revelam o uso promissor de gel de hipromelose contendo quercetina, associada à β -ciclodextrina, na prevenção e no tratamento de distúrbios cutâneos associados ao estresse oxidativo, especialmente aqueles que ocorrem na camada mais superficial da pele, a epiderme. Os principais resultados obtidos nesta etapa do trabalho foram submetidos para publicação no periódico *Skin Pharmacology and Physiology*.

CONCLUSÕES



CONCLUSÕES PARCIAIS

✓ As amostras de quercetina apresentando grau farmacêutico, QCTa, QCTb e QCTc, revelaram distintas propriedades físico-químicas, físicas, químicas, termo-analíticas e espectroscópicas, sendo estas atribuídas a diferentes graus de hidratação dos correspondentes retículos cristalinos;

✓ A amostra de quercetina QCTa, de procedência Deg, foi selecionada para ser empregada nas etapas subsequentes do trabalho, pois apresentou estrutura cristalina idêntica à da substância de referência e revelou ser termodinamicamente mais estável, em estado sólido, em relação às amostras QCTb e QCTc;

✓ As condições operacionais envolvidas na preparação, em meio líquido, de complexos quercetina/ β -ciclodextrina exerceram influência significativa sobre a hidrossolubilidade da aglicona. Muito embora o maior incremento de solubilidade tenha sido observado utilizando a quantidade em excesso de quercetina de 6 mM, a temperatura de 37 °C, o período de agitação de 24 horas e a concentração de β -ciclodextrina de 15 mM, a proporção de 6 mM de ambas foi selecionada com base na viabilidade tecnológica;

✓ A associação de complexos quercetina/ β -ciclodextrina ao polímero hidrofílico hipromelose resultou em aumento da eficiência de complexação;

✓ Apenas foram observados indícios de interação entre a quercetina e a β -ciclodextrina no complexo em estado sólido obtido por meio da secagem por nebulização de complexo preparado em meio líquido na relação molar de 1:1, provavelmente devido à baixa concentração de quercetina no referido complexo;

✓ A simples mistura física entre as duas substâncias na relação molar de 1:1 revelou ser suficiente para a obtenção de complexo de inclusão quercetina/ β -ciclodextrina, de maneira tempo-dependente. A elevada concentração de flavonóide e o baixo custo de preparação de complexos quercetina/ β -ciclodextrina em estado sólido, por simples mistura física entre as duas substâncias, representam vantagens deste método quando comparado àqueles descritos na literatura, que empregam meio líquido ou semi-sólido;

✓ A quercetina, dissolvida em etanol:água (1:1), mostrou-se instável quando exposta à radiação ultravioleta, sendo a velocidade de degradação frente à radiação UVC (cinética de ordem zero) maior do que frente à radiação UVA (cinética de primeira-ordem);

✓ O efeito inibitório da quercetina sobre a peroxidação lipídica induzida pela radiação UVC foi mais pronunciado do que aquele observado quando a peroxidação lipídica foi induzida pela radiação UVA. Os produtos de degradação identificados apresentam estrutura polifenólica, o que sugere que os mesmos tenham contribuído para o efeito antioxidante observado, mais proeminente quando a quercetina foi exposta à radiação UVC;

✓ Para todas as formulações empregadas, hidrogel e pomada contendo quercetina sob a forma livre ou de mistura física com β -ciclodextrina (relação molar de 1:1), a concentração de quercetina retida na epiderme foi significativamente superior àquela encontrada na derme. Este efeito foi mais expressivo quando a quercetina foi incorporada no hidrogel sob a forma associada à β -ciclodextrina;

✓ O efeito promotor da β -ciclodextrina sobre a penetração cutânea da quercetina não foi observado quando a mistura física foi incorporada na pomada, ao contrário do hidrogel, sugerindo uma forte influência do veículo das formulações sobre a partição, tanto do flavonóide como da ciclodextrina, para a superfície da pele;

✓ O maior potencial antioxidante da quercetina foi observado na epiderme das peles tratadas com o hidrogel contendo o flavonóide associado à β -ciclodextrina

CONCLUSÃO GERAL

A quercetina, especialmente sob a forma associada à β -ciclodextrina, apresentou propriedades físicas, químicas e biológicas de interesse para a permeação cutânea, revelando seu uso promissor na prevenção e no tratamento de distúrbios associados ao estresse oxidativo, principalmente aqueles que ocorrem na camada mais superficial da pele, a epiderme.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A Pele e o Sentido do Tato. Disponível em <<http://www.afh.bio.br>> Acesso em julho de 2009.

ALVAREZ-PARRILLA, E.; DE LA ROSA, L.A.; TORRES-RIVAS, F.; RODRIGO-GARCIA, J.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G.A. Complexation of apple antioxidants: chlorogenic acid, quercetin and rutin by β -cyclodextrin (β -CD). **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 53, p. 121-129, 2005.

ARCT, J.; OBORSKA, A.; MOJSKI, M.; BINKOWSKA, A.; SWIDZIKOWSKA, B. Common cosmetic hydrophilic ingredients as penetration modifiers of flavonoids. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 24, p. 357-366, 2002.

AZUMA, K.; IPPOUSHI, K.; ITO, H.; HIGASHIO, H.; TERAOKA, J. Combination of lipids and emulsifiers enhances the absorption of orally administered quercetin in rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 1706-1712, 2002.

BARRAS, A.; MEZZETTI, A.; RICHARD, A.; LAZZARONI, S.; ROUX, S.; MELNYK, P.; BETBEDER, D.; MONFILLIETTE-DUPONT, N. Formulation and characterization of polyphenol-loaded lipid nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, *IN PRESS*, 2009.

BARRY, B. Liberação transdérmica de fármacos. In: AULTON, M.E. (Ed.). **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. Porto Alegre: Artmed. 2005. 2 ed. p. 504-536.

BERGONZI, M.C.; BILIA, A.R.; DI BARI, L.; MAZZI, G.; VINCIERI, F.F. Studies on the interactions between some flavonols and cyclodextrins. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, p. 5744-5748, 2007.

BETTEGA, J.M.; TEIXEIRA, H.; BASSANI, V.L.; BARARDI, C.R.; SIMÕES, C.M. Evaluation of the antiherpetic activity of standardized extracts of *Achyrocline satureioides*. **Phytoterapy Research**, v. 18, p. 819-823, 2004.

BISCHOFF, S.C. Quercetin: potentials in the prevention and therapy of disease. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 11, p. 733-740, 2008.

BIWER, A.; ANTRANIKIAN, G.; HEINZLE, E. Enzymatic production of cyclodextrins. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 609-617, 2002.

BONINA, F.; LANZA, M.; MONTENEGRO, L.; PUGLISI, C.; TOMAINO, A.; TROMBETTA, D.; CASTELLI, F.; SAIJA, A. Flavonoids as potential protective agents against photo-oxidative skin damage. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 145, p. 87-94, 1996.

BOOTS, A.W.; HAENEN, G.R.M.M.; BAST, A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. **European Journal of Pharmacology**, v. 585, p. 325-337, 2008.

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

BUCHNER, N.; KRUMBEIN, A.; ROHN, S.; KROH, L.W. Effect of thermal processing on the flavonols rutin and quercetin. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 20, p. 3229-3235, 2006.

BUKHARI, S.B.; MEMON, S.; MAHROOF-TAHIR, M.; BHANGER, M.I. Synthesis, characterization and antioxidant activity copper-quercetin complex. **Spectrochimica Acta Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 71, p. 1901-1906, 2009.

CAL, K.; CENTKOWSKA, K. Use of cyclodextrins in topical formulations: practical aspects. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, p. 467-478, 2008.

CALABRÒ, M.L.; TOMMASINI, S.; DONATO, P.; RANERI, D.; STANCANELLI, R.; FICARRA, P.; FICARRA, R.; COSTA, C.; CATANIA, S.; RUSTICHELLI, C.; GAMBERINI, G. Effects of α - and β -cyclodextrin complexation on the physico-chemical properties and antioxidant activity of some 3-hydroxyflavones. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 35, p. 365-377, 2004.

CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S.R.; VERRI JR., W.A.; DORTA, D.J.; DOS SANTOS, A.C.; FONSECA, M.J.V. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 84, p. 21-27, 2006.

CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S.R.; VERRI JR., W.A.; BORIN, M.F.; LOPEZ, R.F.V.; FONSECA, M.J.V. *In vitro* evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical formulations and its functional stability by antioxidant activity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 328, p. 183-190, 2007.

CHALLA, R.; AHUJA, A.; ALI, J.; KHAR, R.K. Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. **AAPS PharmSciTech**, v. 6, p. E329-E351, 2005.

CHEBIL, L.; ANTHONI, J.; HUMEAU, C.; GERARDIN, C.; ENGASSER, J.M.; GHOU, M. Enzymatic acylation of flavonoids: effect of the nature of the substrate, origin of lipase, and operating conditions on conversion yield and regioselectivity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 9496-9502, 2007.

CORNARD, J.P.; DANGLETERRE, L.; LAPOUGE, C. Computational and spectroscopic characterization of the molecular and electronic structure of the Pb(II)-quercetin complex. **Journal of Physical Chemistry**, v. 109, p. 10044-10051, 2005.

COSTA, I.M. **Estudo de pré-formulação com composto polifenólico utilizando como modelo a quercetina**. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

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

DE MARCO, S.L. **Estudo comparativo de nanocápsulas e nanoemulsões, contendo um antioxidante e um filtro solar químico co-encapsulados, preparadas por método convencional e por método de homogeneização de alta pressão**. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, em andamento.

DE MORAES, R.H. **Avaliação do comportamento de flavonas e flavonóis frente à celulose microcristalina em estado sólido**. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

DE SOUZA, R.F.V.; DE GIOVANI, W.F. Synthesis, spectral and electrochemical properties of Al(III) and Zn(II) complexes with flavonoids. **Spectrochimica Acta Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 61, p. 1985-1990, 2005.

DE SOUZA, K.C.; BASSANI, V.L.; SCHAPOVAL, E.E. Influence of excipients and technological process on anti-inflammatory activity of quercetin and *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. extracts by oral route. **Phytomedicine**, v. 14, p. 102-108, 2007.

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

DIAS, K.; NICOLAOU, S.; DE GIOVANI, W.F. Synthesis and spectral investigation of Al(III) catechin/ β -cyclodextrin and Al(III) quercetin/ β -cyclodextrin inclusion compounds. **Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 70, p. 154-161, 2008.

DUCHÊNE, D.; BOCHOT, A.; YU, S.-C.; PÉPIN, C.; SEILLER, M. Cyclodextrins and emulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 266, p. 85-90, 2003.

FAHLMAN, B.M.; KROL, E.S. Inhibition of UVA and UVB radiation-induced lipid oxidation by quercetin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 5301-5305, 2009.

FASOLO, D. **Nanoemulsões contendo quercetina e 3-o-metilquercetina: estudos de formulação e permeação cutânea**. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

FERRER, E.G.; SALINAS, M.V.; CORREA, M.J.; NASO, L.; BARRIO, D.A.; ETCHEVERRY, S.B.; LEZAMA, L.; ROJO, T.; WILLIAMS, P.A.M. Synthesis, characterization, antitumoral and osteogenic activities of quercetin vanadyl(IV) complexes. **Journal of Biology and Inorganic Biochemistry**, v. 11, p. 791-801, 2006.

GABRIELSKA, J.; SOCZYNSKA-KORDALA, M.; HLADYSZOWSKI, J.; ZYLKA, R.; MISKIEWICZ, J.; PRZESTALSKI, S. Antioxidative effect of quercetin and its equimolar mixtures with phenyltin compounds on liposome membranes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 7735-7746, 2006.

GAO, Y.; WANG, Y.; MA, Y.; YU, A.; CAI, F.; SHAO, W.; ZHAI, G. Formulation optimization and in situ absorption in rat intestinal tract of quercetin-loaded microemulsion. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 71, p. 306-314, 2009.

GODIN, B.; TOUITOU, E. Transdermal skin delivery: predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 1152-1161, 2007.

GOMATHI, K.; GOPINATH, D.; AHMED, M.R.; JAYAKUMAR, R. Quercetin incorporated collagen matrices for dermal wound healing process in rat. **Biomaterials**, v. 24, p. 2767-2772, 2003.

HADGRAFT, J. Passive enhancement strategies in topical and transdermal drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 184, p. 1-6, 1999.

HADGRAFT, J. Skin, the final frontier. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 224, p. 1-18, 2001.

HADGRAFT, J. Skin deep. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, p. 291-299, 2004.

HADGRAFT, J.; LANE, M.E. Skin permeation: the years of enlightenment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 305, p. 2-12, 2005.

HARWOOD, M.; DANIELEWSKA-NIKIEL, B.; BORZELLECA, J.F.; FLAMM, G.W.; WILLIAMS, G.M.; LINES, T.C. A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of *in vivo* toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 2179-2205, 2007.

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

JULLIAN, C.; MOYANO, L.; YAÑEZ, C.; OLEA-AZAR, C. Complexation of quercetin with three kinds of cyclodextrins: an antioxidant study. **Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 67, p. 230-234, 2007.

KALE, R.; SARAF, M.; JUVEKAR, A.; TAYADE, P. Decreased B16F10 melanoma growth and impaired tumour vascularization in BDF1 mice with quercetin-cyclodextrin binary system. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 58, p. 1351-1358, 2006.

KAUR, I.P.; KAPILA, M.; AGRAWAL, R. Role of novel delivery systems in developing topical antioxidants as therapeutics to combat photoageing. **Ageing Research Reviews**, v. 6, p. 271-288, 2007.

KIM, H.W.; GWAK, H.S.; CHUN, I.K. The effect of vehicles and pressure sensitive adhesives on the percutaneous absorption of quercetin through the hairless mouse skin. **Archives of Pharmacal Research**, v. 27, p. 763-768, 2004.

KITAGAWA, S.; TANAKA, Y.; TANAKA, M.; ENDO, K.; YOSHII, A. Enhanced skin delivery of quercetin by microemulsion. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, p. 855-860, 2009.

KITSON, T.M.; KITSON, K.E. The effect of quercetin, a widely distributed flavonoid in food and drink, on cytosolic aldehyde dehydrogenase: a comparison with the effect of diethylstilboestrol. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1481, p. 247-254, 2000.

KOONTZ, J.L.; MARCY, J.E.; O'KEEFE, S.F.; DUNCAN, S.E. Cyclodextrin inclusion complex formation and solid-state characterization of the natural antioxidants α -tocopherol and quercetin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1162-1171, 2009.

KRISHNA, K.M.; ANNAPURNA, A.; GOPAL, G.S.; CHALAM, C.R.V.; MADAN, K.; KUMAR, V.K.; PRAKASH, G.J. Partial reversal by rutin and quercetin of impaired cardiac function in streptozotocin-induced diabetic rats. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 83, p. 343-355, 2005.

KUNTIC, V.; PESIC, N.; MICIC, S.; MALESEV, D.; VUJIC, Z. Determination of dissociation constants of quercetin. **Pharmazie**, v. 58, p. 439-440, 2003.

LAURO, M.R.; TORRE, M.L.; MAGGI, L.; DE SIMONE, F.; CONTE, U.; AQUINO, R.P. Fast- and slow-release tablets for oral administration of flavonoids: rutin and quercetin. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 28, p. 371-379, 2002.

LEE, D.-H.; SIM, G.-S.; KIM, J.-H.; LEE, G.-S.; PYO, H.-B.; LEE, B.-C. Preparation and characterization of quercetin-loaded polymethyl methacrylate microcapsules using a polyol-in-oil-in-polyol emulsion solvent evaporation method. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, p. 1611-1620, 2007.

LOFTSSON, T. Increasing the cyclodextrin complexation of drugs and drug bioavailability through addition of water-soluble polymers. **Pharmazie**, v. 53, p. 733-740, 1998.

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

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

LOFTSSON, T.; VOGENSEN, S.B.; BREWSTER, M.E.; KONRÁSDÓTTIR, F. Effects of cyclodextrins on drug delivery through biological membranes. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, p. 2532-2542, 2007.

LUCAS-ABELLÁN, C.; FORTEA, I.; GABALDÓN, J.A.; NÚÑEZ-DELICADO, E. Encapsulation of quercetin and myricetin in cyclodextrins at acidic pH. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 255-259, 2008.

MABRY, T.J.; MARKHAN, K.R.; THOMAS, M.B. **The Systematic Identification of Flavonoids**. New York: Springer-Verlag. 1970. 354 p.

MAKRIS, D.P.; ROSSITER, J.T. Heat-induced, metal-catalyzed oxidative degradation of quercetin and rutin (quercetin 3-*O*-rhamnosylglucoside) in aqueous model systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3830-3838, 2000.

MARINIC, M.; PIANTANIDA, I.; RUSAK, G.; ZINIC, M. Interactions of quercetin and its lanthane complex with double stranded DNA/RNA and single stranded RNA: spectrophotometric sensing of poly G. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 100, p. 288-298, 2006.

MILANE, H.A.; UBEAUD, G.; VANDAMME, T.F.; JUNG, L. Isolation of quercetin's salts and studies of their physicochemical properties and antioxidant relationships. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 3627-3635, 2004.

MILLER, L.A.; CARRIER, R.L.; AHMED, I. Practical considerations in development of solid dosage forms that contain cyclodextrin. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, p. 1691-1707, 2007.

MONTENEGRO, L.; CARBONE, C.; MANISCALCO, C.; LAMBUSTA, D.; NICOLOSI, G.; VENTURA, C.A.; PUGLISI, G. In vitro evaluation of quercetin-3-*O*-acyl esters as topical prodrugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 336, p. 257-262, 2007.

MOON, Y.J.; WANG, L.; DICENZO, R.; MORRIS, M.E. Quercetin pharmacokinetics in humans. **Biopharmaceutics and Drug Disposition**, v. 29, p. 205-217, 2008.

MOSER, K.; KRIWET, K.; NAIK, A.; KALIA, Y.N.; GUY, R.H. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 52, p. 103-112, 2001.

MUROTA, K.; TERAOKA, J. Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 417, p. 12-17, 2003.

OLEJNICZAK, S.; POTRZEBOWSKI, M.J. Solid state NMR studies and density functional theory (DFT) calculations of conformers of quercetin. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 2, p. 2315-2322, 2004.

OLIVELLA, M.S.; LHEZ, L.; PAPPANO, N.B.; DEBATTISTA, N.B. Effects of dimethylformamide and L-menthol permeation enhancers on transdermal delivery of quercetin. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 12, p. 481-484, 2007.

PEREIRA, C.S.; DE MOURA, A.F.; FREITAS, L.C.G.; LINS, R.D. Revisiting the internal conformational dynamics and solvation properties of cyclodextrins. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, p. 951-961, 2007.

PINNELL, S.R. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 48, p. 1-19, 2003.

POLYDORO, M.; DE SOUZA, K.C.; ANDRADES, M.E.; DA SILVA, E.G.; BONATTO, F.; HEYDRICH, J.; DAL-PIZZOL, F.; SCHAPOVAL, E.E.; BASSANI, V.L.; MOREIRA, J.C. Antioxidant, a pro-oxidant and cytotoxic effects of *Achyrocline satureioides* extracts. **Life Sciences**, v. 74, p. 2815-2826, 2004.

PRALHAD, T.; RAJENDRAKUMAR, K. Study of freeze-dried quercetin-cyclodextrin binary systems by DSC, FT-IR, X-ray diffraction and SEM analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 34, p. 333-339, 2004.

RENTI, E.; SZENTE, L.; SZEJTLI, J. Drug/cyclodextrin/hydroxy acid multicomponent systems. Properties and pharmaceutical applications. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 89, p. 1-8, 2000.

ROHN, S.; BUCHNER, N.; DRIEMEL, G.; RAUSER, M.; KROH, L.W. Thermal degradation of onion quercetin glucosides under roasting conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 1568-1573, 2007.

ROTHWELL, J.A.; DAY, A.J.; MORGAN, M.R.A. Experimental determination of octanol-water partition coefficients of quercetin and related flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4355-4360, 2005.

SAIJA, A.; TOMAINO, A.; TROMBETTA, D.; GIACCHI, M.; DE PASQUALE, A.; BONINA, F. Influence of different penetration enhancers on in vitro skin permeation and in vivo photoprotective effect of flavonoids. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 175, p. 85-94, 1998.

SAIJA, A.; TOMAINO, A.; TROMBETTA, D.; PELLEGRINO, M.L.; TITA, B.; MESSINA, C.; BONINA, F.P.; ROCCO, C.; NICOLOSI, G.; CASTELLI, F. "In vitro" antioxidant and photoprotective properties and interaction with model membranes of three new quercetin esters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 56, p. 167-174, 2003.

SCALIA, S.; MEZZENA, M. Incorporation of quercetin in lipid microparticles: effect on photo- and chemical-stability. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, p. 90-94, 2009.

SCHNETZ, E.; FARTASCH, M. Microdialysis for the evaluation of penetration through the human skin barrier – a promising tool for future research? **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 12, p. 165-174, 2001.

SHAO, W.; XIE, Q.; WANG, C.; MI, G.; WANG, D. Study on the inclusion compound of quercetin with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. **Journal of Chinese Medicinal Materials**, v. 25, p. 121-123, 2002.

SHIMOI, K.; YOSHIZUMI, K.; KIDO, T.; USUI, Y.; YUMOTO, T. Absorption and urinary excretion of quercetin, rutin, and α G-rutin, a water soluble flavonoid, in rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 2785-2789, 2003.

SINGH, M.; SHARMA, R.; BANERJEE, U.C. Biotechnological applications of cyclodextrins. **Biotechnology Advances**, v. 20, p. 341-359, 2002.

SMITH, G.J.; THOMSEN, S.J.; MARKHAM, K.R.; ANDARY, C.; CARDON, D. The photostabilities of naturally occurring 5-hydroxyflavones, flavonols, their glycosides and their aluminium complexes. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 136, p. 87-91, 2000.

SRI, K.V.; KONDAIAH, A.; RATNA, J.V.; ANNAPURNA, A. Preparation and characterization of quercetin and rutin cyclodextrin inclusion complexes. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 33, p. 245-253, 2007.

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

STELLA, V.J.; HE, Q. Cyclodextrins. **Toxicologic Pathology**, v. 36, p. 30-42, 2008.

SZEJTLI, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. **Chemical Review**, v. 98, p. 1743-1753, 1998.

TESLOVA, T.; CORREDOR, C.; LIVINGSTONE, R.; SPATARU, T.; BIRKE, R.L.; LOMBARDI, J.R.; CANAMARES, M.V.; LEONA, M. Raman and surface-enhanced Raman spectra of flavone and several hydroxyl derivatives. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 38, p. 802-818, 2007.

TOUITOU, E.; MEIDAN, V.M.; HORWITZ, E. Methods for quantitative determination of drug localized in the skin. **Journal of Controlled Release**, v. 56, p. 7-21, 1998.

UEKAMA, K. Recent aspects of pharmaceutical application of cyclodextrins. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 44, p. 3-7, 2002.

UEKAMA, K. Design and evaluation of cyclodextrin-based drug formulation. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 52, p. 900-915, 2004.

VAN DER WOUDE, H.; GLISZCZYNSKA-SWIGLO, A.; STRUIJS, K.; SMEETS, A.; ALINK, G.M.; RIETJENS, I.M.C.M. Biphasic modulation of cell proliferation by quercetin at concentrations physiologically relevant in humans. **Cancer Letters**, v. 200, p. 41-47, 2003.

VENTURINI, C.G.; NICOLINI, J.; MACHADO, C.; MACHADO, V.G. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Química Nova**, v. 31, p. 360-368, 2008.

VICENTINI, F.T.M.C.; GEORGETTI, S.R.; JABOR, J.R.; CARIS, J.A.; BENTLEY, M.V.L.B.; FONSECA, M.J.V. Photostability of quercetin under exposure to UV irradiation. **Latin American journal of Pharmacy**, v. 26, p. 119-124, 2007.

VICENTINI, F.T.M.C.; SIMI, T.R.M.; DEL CIAMPO, J.O.; WOLGA, N.O.; PITOL, D.L.; IYOMASA, M.M.; BENTLEY, M.V.L.B.; FONSECA, M.J.V. Quercetin in w/o microemulsion: *in vitro* and *in vivo* skin penetration and efficacy against UVB-induced skin damages evaluated *in vivo*. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, p. 948-957, 2008.

VINADÉ, E.R.C. **Características de solubilidade e de passagem de quercetina através de membranas poliméricas**. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1995.

WALTERS, K.A.; ROBERTS, M.S. The structure and function of skin. In: WALTERS, K.A. (Ed.). **Dermatological and Transdermal Formulations**. New York: Marcel Dekker. 2002.

WEBBER, C. **Avaliação do perfil de penetração cutânea da quercetina**. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

WEISS-ANGELI, V. **Desenvolvimento e caracterização de formulações fotoprotetoras contendo nanocápsulas**. Tese (Doutorado), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

WEISS-ANGELI, V.; POLETTO, F.S.; ZANCAN, L.R.; BALDASSO, F.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Nanocapsules of octyl methoxycinnamate containing quercetin delayed the photodegradation of both components under ultraviolet A radiation. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 4, p. 1-10, 2008.

WU, T.-H.; YEN, F.-L.; LIN, L.-T.; TSAI, T.-R.; LIN, C.-C.; CHAM, T.-M. Preparation, physicochemical characterization, and antioxidant effects of quercetin nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 346, p. 160-168, 2008.

YAAR, M.; GILCHREST, B.A. Photoageing: mechanism, prevention and therapy. **British Journal of Dermatology**, v. 157, p. 874-887, 2007.

YAMASHITA, F.; HASHIDA, M. Mechanistic and empirical modeling of skin permeation of drugs. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, p. 1185-1199, 2003.

YAMAGUCHI, L.F.; VASSÃO, D.G.; KATO, M.J.; DI MASCIO, P. Biflavonoids from Brazilian pine *Araucaria angustifolia* as potentials protective agents against DNA damage and lipoperoxidation. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2238-2247, 2005.

ZENKEVICH, I.G.; ESHCHENKO, A.Y.; MAKAROVA, S.V.; VITENBERG, A.G.; DOBRYAKOV, Y.G.; UTSAL, V.A. Identification of the products of oxidation of quercetin by air oxygen at ambient temperature. **Molecules**, v. 12, p. 654-672, 2007.

ZHENG, Y.; HAWORTH, I.S.; ZUO, Z.; CHOW, M.S.S.; CHOW, A.H.L. Physicochemical and structural characterization of quercetin- β -cyclodextrin complexes. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 94, p. 1079-1089, 2005.

ZHENG, Y.; CHOW, A.H.L. Production and characterization of a spray-dried hydroxypropyl- β -cyclodextrin/quercetin complex. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 35, p. 727-734, 2009.

ZHOU, J.; WANG, L.-F.; WANG, J.-Y.; TANG, N. Synthesis, characterization, antioxidative and antitumor activities of solid quercetin rare earth(III) complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 83, p. 41-48, 2001.

ZHOU, A.; SADIK, O.A. Comparative analysis of quercetin oxidation by electrochemical, enzymatic, autoxidation, and free radical generation techniques: a mechanistic study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 12081-12091, 2008.

ZHU, Q.Y.; HUANG, Y.; CHEN, Z.-Y. Interaction between flavonoids and α -tocopherol in human low density lipoprotein. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 11, p. 14-21, 2000.

ANEXO 1. Pureza das amostras de quercetina apresentando grau farmacêutico

As três amostras de quercetina apresentando grau farmacêutico, de diferentes procedências (QCTa, Deg; QCTb, Galena e QCTc, SPFarma), foram caracterizadas quanto às suas propriedades químicas, no que se refere à pureza. As impurezas foram identificadas utilizando cromatografia em camada delgada, espectrofotometria no ultravioleta/visível e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massa.

Análise por cromatografia em camada delgada

Para a análise por cromatografia em camada delgada analítica, duas soluções foram preparadas:

- ✓ uma solução metanólica contendo quercetina substância de referência - Sigma ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$);

- ✓ uma dispersão aquosa de cada amostra de quercetina apresentando grau farmacêutico (6 mM) foi mantida sob agitação, em temperatura ambiente, sob proteção da luz, durante 24 horas e, posteriormente, filtrada em membrana hidrofílica (HAWP, $0,45 \mu\text{m}$ de diâmetro de poro, Millipore®). A solução aquosa resultante foi congelada, liofilizada e o resíduo sólido obtido ressuspenso em mistura metanol:água (1:1, v/v), com auxílio de ultrassom.

As soluções foram aplicadas em placas cromatográficas com auxílio de tubos capilares de vidro, a uma distância de 1,0 cm das bordas lateral e inferior da placas e entre as mesmas. As placas foram depositadas em cuba de vidro saturada em sistema eluente composto por acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético glacial e água (130:11:11:27, v/v). Após secagem das placas, estas foram reveladas com reagente natural A (ácido difenilbórico 2-aminoetil éster e polietilenoglicol 4000). As manchas foram visualizadas sob luz ultravioleta ($\lambda = 254 \text{ nm}$).

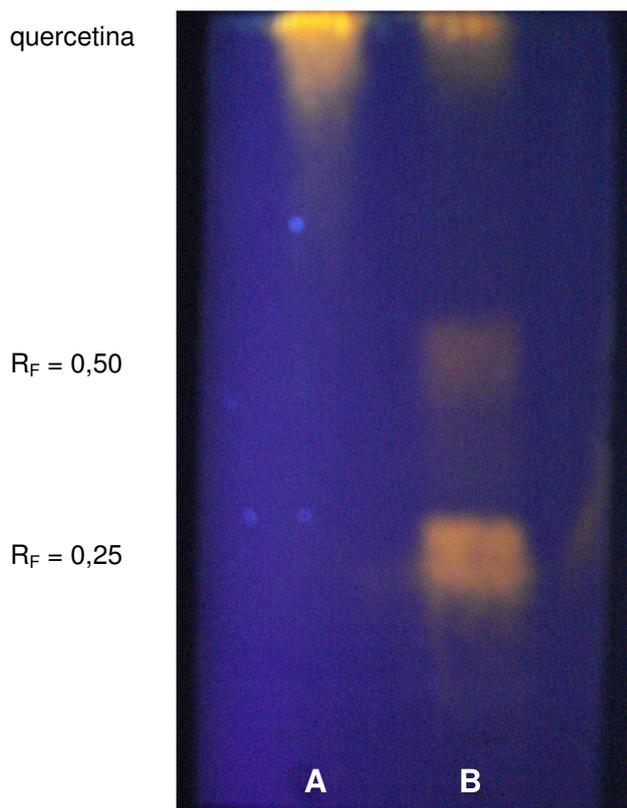


Figura 1.12. Cromatograma de solução metanólica contendo quercetina substância de referência (A) e de solução aquosa liofilizada contendo a amostra de quercetina apresentando grau farmacêutico QCTa (B).

No cromatograma da solução aquosa liofilizada contendo a amostra de quercetina QCTa (Figura 1.13B), observa-se a presença de 3 manchas. A mancha superior, com fator de retenção (R_F) de aproximadamente 1,0, corresponde à quercetina, pois apresenta o mesmo valor obtido para a solução metanólica contendo quercetina substância de referência (Figura 1.13A). As duas manchas inferiores, com fator de retenção de aproximadamente 0,5 e 0,25, correspondem a impurezas.

As outras duas amostras de quercetina apresentando grau farmacêutico, QCTb e QCTc, revelaram o mesmo comportamento cromatográfico da amostra QCTa e, por isso, seus resultados não foram apresentados.

Análise por espectrofotometria no ultravioleta/visível

Para a análise por espectrofotometria no ultravioleta/visível, procedeu-se inicialmente o isolamento da impureza cuja mancha apresentou maior rendimento ($R_F = 0,25$). Para isso, o resíduo sólido obtido por meio da liofilização da solução aquosa contendo a amostra de quercetina apresentando grau farmacêutico QCTa foi ressuspensão em mistura metanol:água (1:1, v/v) e aplicado em placas cromatográficas preparativas. Após secagem das placas, a mancha correspondente à impureza de interesse foi marcada e a sílica raspada das placas. A sílica foi ressuspensa em metanol, sob agitação por 24 horas em temperatura ambiente, filtrada em membrana hidrofílica (HVLP, 0,45 μm de diâmetro de poro, Millipore[®]) e a solução metanólica resultante analisada por espectrofotometria no ultravioleta/visível.

Os espectros de varredura no ultravioleta/visível da quercetina substância de referência e da impureza isolada foram obtidos entre 200 e 500 nm empregando-se metanol; solução metanólica de cloreto de alumínio 3 % (AlCl_3), na ausência ou presença de solução de ácido clorídrico 50 % (HCl); acetato de sódio (NaOAc), na ausência ou presença de ácido bórico (H_3BO_3), e solução metanólica de metóxido de sódio (NaOMe).

Os espectros de varredura no ultravioleta/visível da quercetina e da impureza isolada, em metanol, apresentaram duas bandas de máxima absorção. Para a quercetina, em 256 e 372 nm (Figura 1.14), e, para a impureza isolada, em 260 e 360 nm (Figura 1.15). O perfil apresentado pelas duas substâncias é característico de flavonol, em que comprimentos de onda entre 300 e 380 nm e entre 240 e 280 nm referem-se, respectivamente, às bandas I (anel B) e II (anel A) da molécula (MABRY *et al.*, 1970).

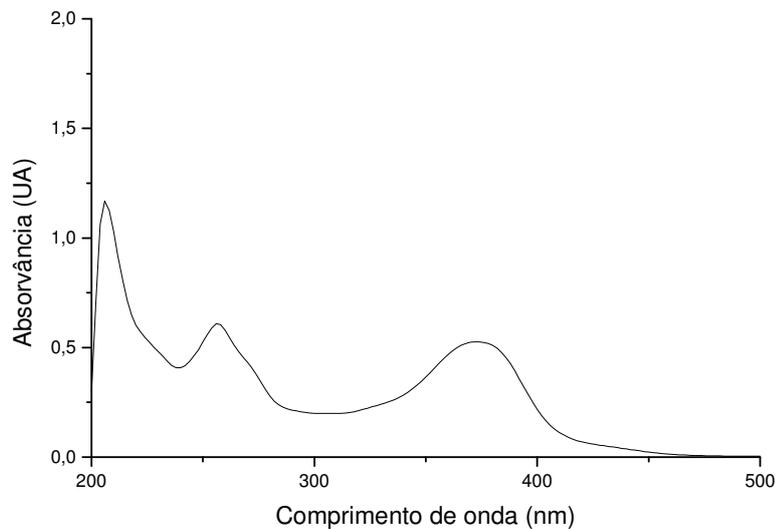


Figura 1.13. Espectro de varredura no ultravioleta/visível de solução metanólica contendo quercetina substância de referência.

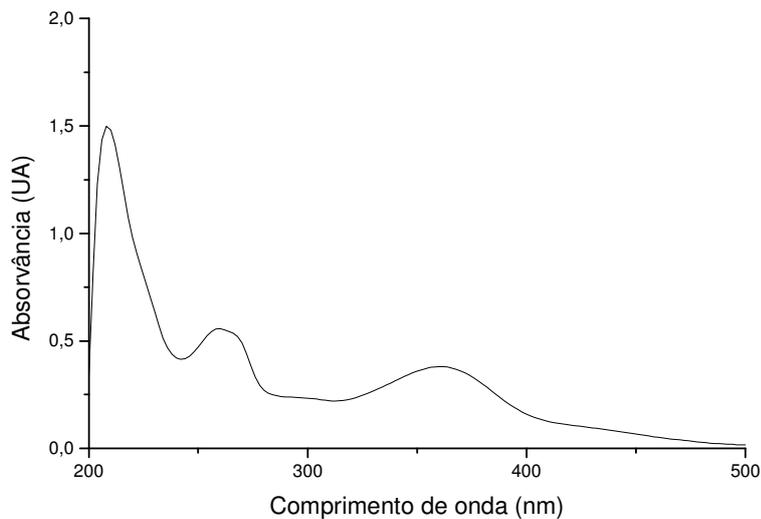


Figura 1.14. Espectro de varredura no ultravioleta/visível de solução metanólica contendo a impureza isolada.

Na presença de cloreto de alumínio, observa-se um deslocamento batocrômico da banda I da quercetina ($\lambda = 452$ nm) (Figura 1.16) e da impureza isolada ($\lambda = 410$ nm) (Figura 1.17), em relação ao espectro obtido em metanol. A manutenção do deslocamento batocrômico da banda I ($\lambda = 428$ nm para a quercetina e $\lambda = 402$ nm para a impureza isolada), observada com a posterior adição de ácido clorídrico, sugere que os complexos formados são ácido-estáveis. O deslocamento de 56 nm para a quercetina, confirma a presença de grupamentos hidroxila livres nas posições C3 e C5 da molécula e de 42 nm para a impureza isolada, sugere a presença de grupamento hidroxila livre na posição C5 da molécula (MABRY *et al.*, 1970).

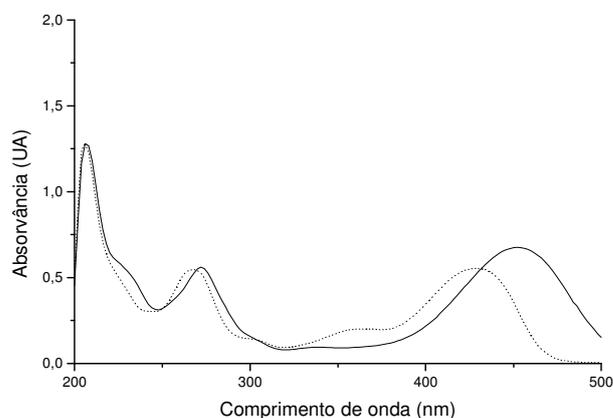


Figura 1.15. Espectro de varredura no ultravioleta/visível de solução metanólica contendo quercetina substância de referência, na presença de cloreto de alumínio (linha contínua) e com posterior adição de ácido clorídrico (linha pontilhada).

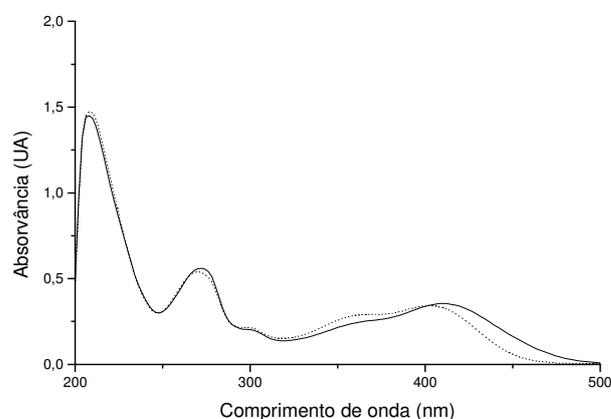


Figura 1.16. Espectro de varredura no ultravioleta/visível de solução metanólica contendo a impureza isolada, na presença de cloreto de alumínio (linha contínua) e com posterior adição de ácido clorídrico (linha pontilhada).

A alteração do espectro da quercetina (Figura 1.18), na presença de acetato de sódio, confirma a presença de grupamentos hidroxila livres nas posições C3, C3' e C4' da molécula. O deslocamento batocrômico de 10 nm da banda II observado para a impureza isolada ($\lambda = 270$ nm) (Figura 1.19), em relação ao espectro obtido em metanol, sugere a presença de grupamento hidroxila livre na posição C7 da molécula. O deslocamento batocrômico de 16 nm (em relação ao espectro obtido em metanol) da banda I observado para a quercetina ($\lambda = 388$ nm), com a posterior adição de ácido bórico, confirma a presença de grupamentos hidroxila livres em posição *orto* no anel B da molécula. Para a impureza isolada, o deslocamento batocrômico de 22 nm da banda I ($\lambda = 382$ nm) sugere interpretação análoga (MABRY *et al.*, 1970).

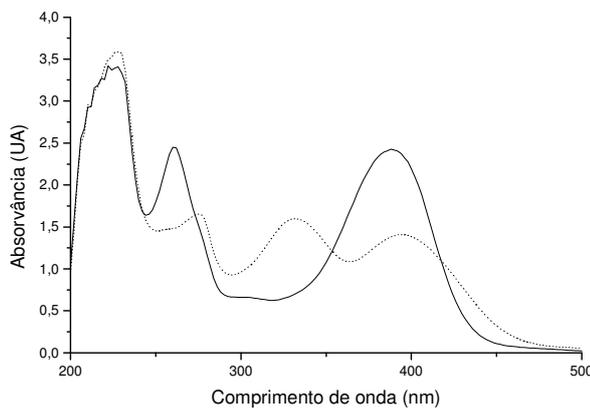


Figura 1.17. Espectro de varredura no ultravioleta/visível de solução metanólica contendo quercetina substância de referência, na presença de acetato de sódio (linha pontilhada) e com posterior adição de ácido bórico (linha contínua).

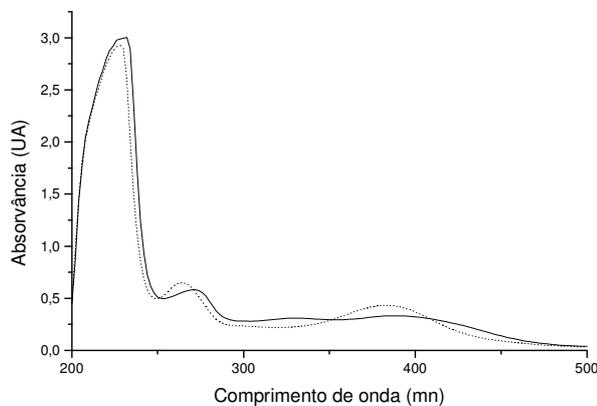


Figura 1.18. Espectro de varredura no ultravioleta/visível de solução metanólica contendo a impureza isolada, na presença de acetato de sódio (linha contínua) e com posterior adição de ácido bórico (linha pontilhada).

Da mesma forma, a alteração do espectro da quercetina (Figura 1.20), na presença de metóxido de sódio, confirma a presença de grupamentos hidroxila livres nas posições C3 e C4' da molécula. O deslocamento batocrômico de 64 nm da banda I, sem diminuição de intensidade em relação ao espectro obtido em metanol, observado para a impureza isolada ($\lambda = 424$ nm) (Figura 1.21), sugere a presença de grupamento hidroxila livre na posição C4' desta molécula (MABRY *et al.*, 1970).

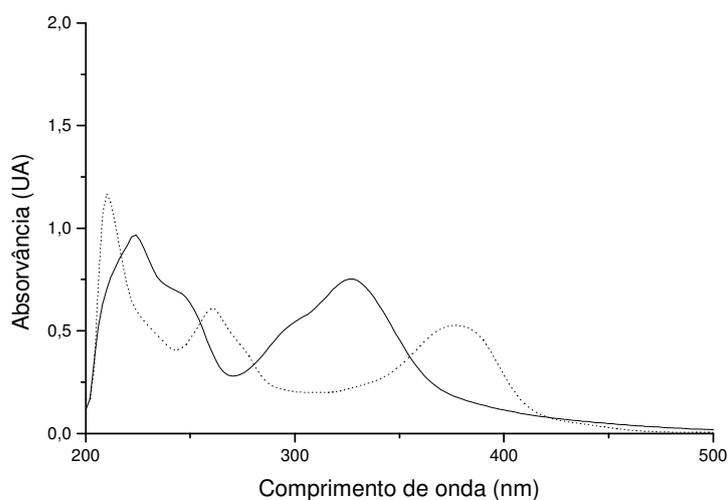


Figura 1.19. Espectro de varredura no ultravioleta/visível de solução metanólica contendo quercetina substância de referência, na ausência (linha pontilhada) ou presença de metóxido de sódio (linha contínua).

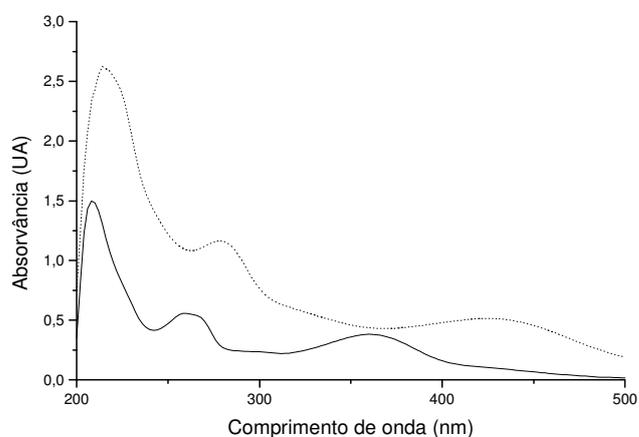


Figura 1.20. Espectro de varredura no ultravioleta/visível de solução metanólica contendo a impureza isolada, na ausência (linha contínua) ou presença de metóxido de sódio (linha pontilhada).

Análise por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massa

Para a análise por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massa, duas soluções foram injetadas no equipamento: uma solução contendo quercetina substância de referência (Sigma) em acetonitrila:água 1:1 ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e uma solução contendo a amostra de quercetina grau farmacêutico QCTa em acetonitrila:água 1:1. Esta solução foi obtida por meio da agitação de uma dispersão aquosa (6 mM) da referida amostra em temperatura ambiente, sob proteção da luz, durante 24 horas, e posterior filtração em membrana hidrofílica (HAWP, $0,45 \mu\text{m}$ de diâmetro de poro, Millipore[®]), sendo a solução aquosa resultante diluída em acetonitrila na proporção de 1:1. As condições de análise empregadas foram as mesmas descritas na publicação 5.

O padrão de fragmentação obtido para a solução contendo quercetina substância de referência, demonstrado na figura 1.22A, confirmou a identidade da amostra. Conforme ilustrado na figura 1.22B, o espectro de massa da solução contendo a amostra de quercetina grau farmacêutico QCTa revelou a presença de dois principais íons moleculares: um com $m/z = 301,67$, correspondente à aglicona quercetina e, o outro, com $m/z = 610,08$ muito provavelmente correspondente à rutina, um glicosídeo da quercetina (BUCHNER *et al.*, 2006).

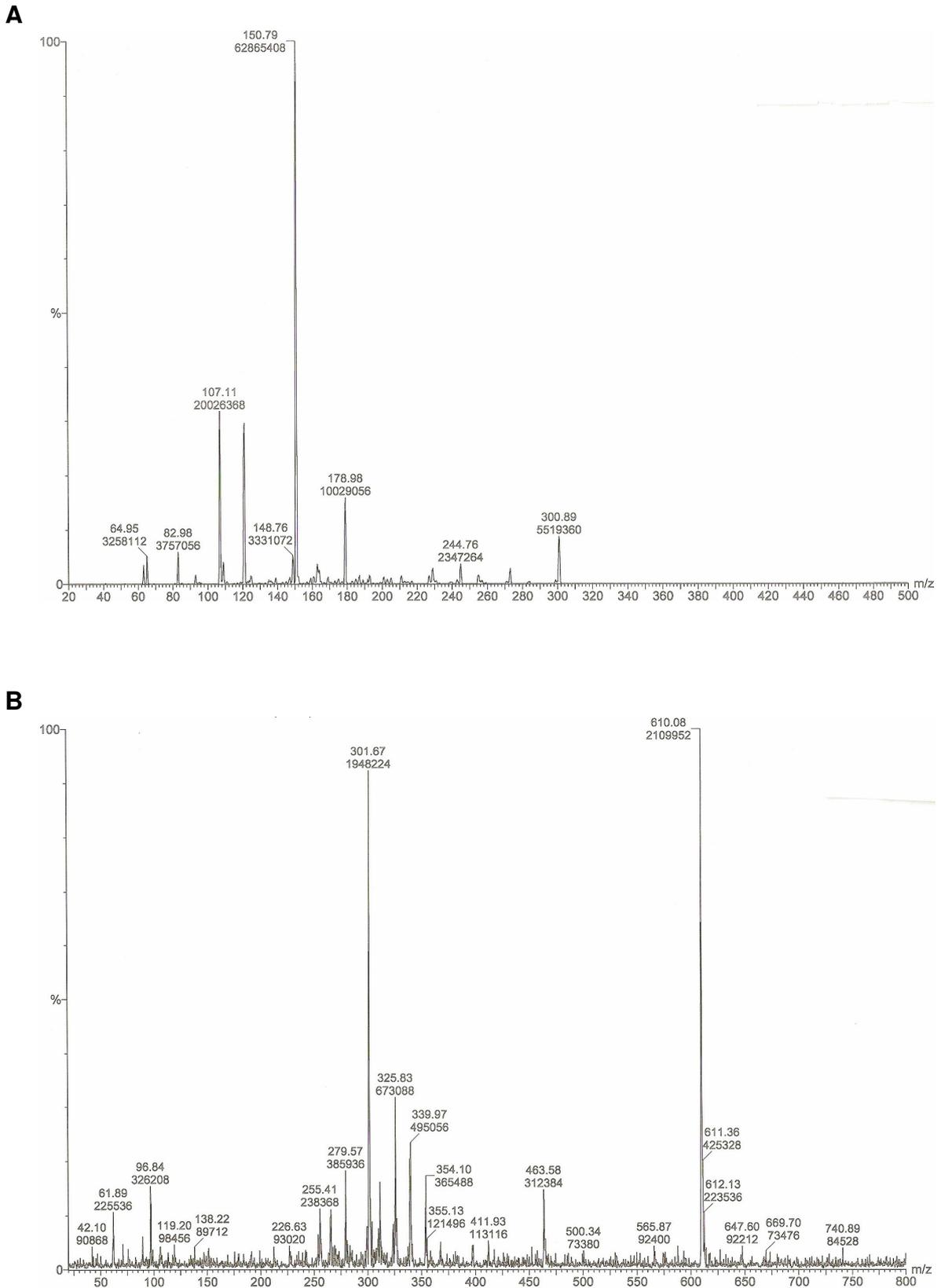


Figura 1.21. Espectro de massa de solução contendo quercetina substância de referência (padrão de fragmentação) (A) e de solução contendo amostra de quercetina grau farmacêutico QCTa (ion molecular) (B).

O conjunto de resultados obtidos pelas análises utilizando espectrofotometria no ultravioleta/visível e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massa sugerem a presença de rutina como uma das principais impurezas da amostra de quercetina QCTa. As outras duas amostras de quercetina apresentando grau farmacêutico, QCTb e QCTc, revelaram idêntico comportamento espectroscópico e cromatográfico ao da amostra QCTa e, por isso, seus resultados não foram apresentados.

No reino vegetal, bem como em bebidas e alimentos, a quercetina se encontra, em geral, na forma de glicosídeo, sendo a rutina o mais comum deles. Entretanto, a obtenção das amostras de quercetina analisadas por meio de isolamento a partir de produtos naturais parece menos provável, em função do baixíssimo custo das mesmas. Portanto, a hipótese mais provável é de que as referidas amostras de quercetina tenham sido obtidas por hidrólise da rutina.

ANEXO 2. Espectros de infravermelho das amostras de quercetina apresentando grau farmacêutico

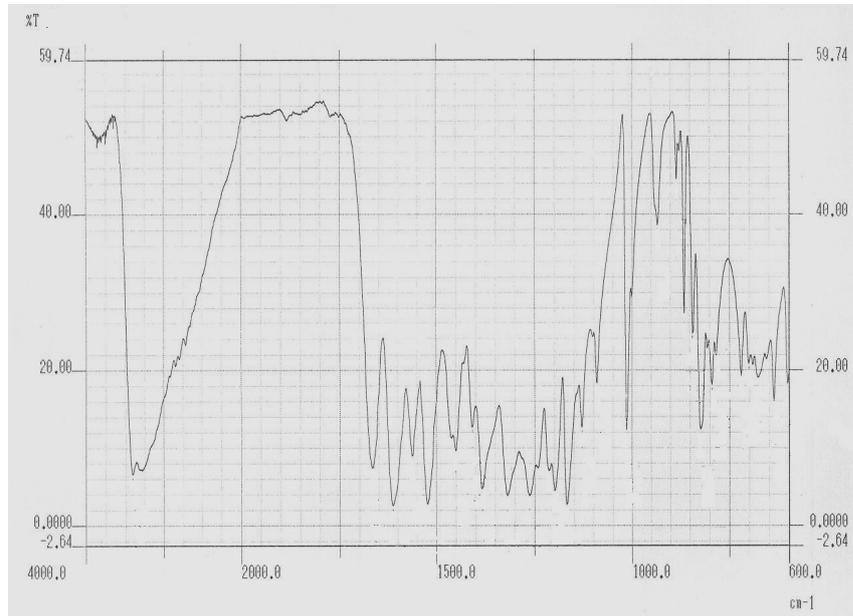
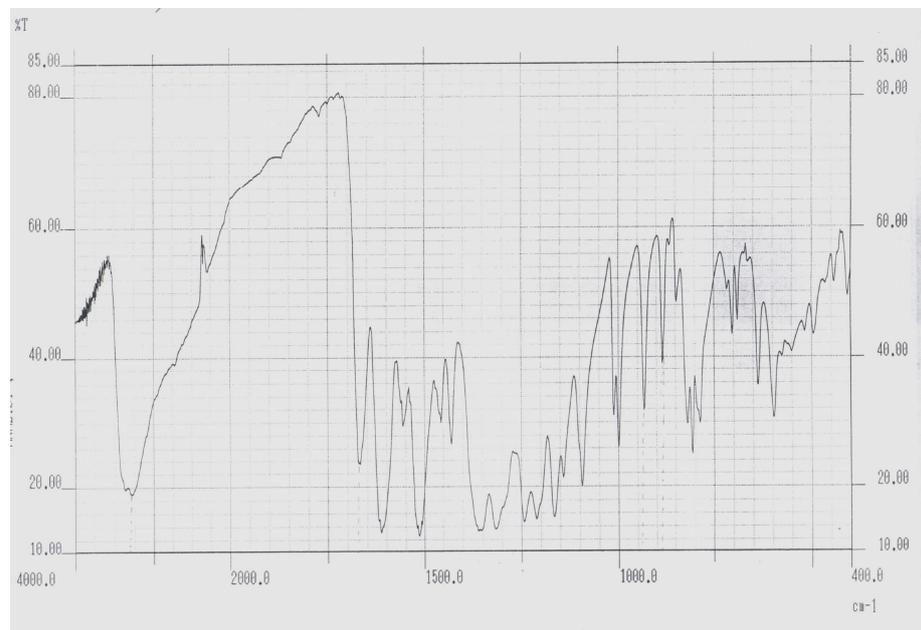
A**B**

Figura 1.22. Espectros de infravermelho das amostras de quercetina (QCT) apresentando grau farmacêutico, de diferentes procedências. A: QCTa (Deg), B: QCTb (Galena) e QCTc (SPFarma).

ANEXO 3. Espectros de infravermelho da quercetina, da β -ciclodextrina e das associações quercetina/ β -ciclodextrina

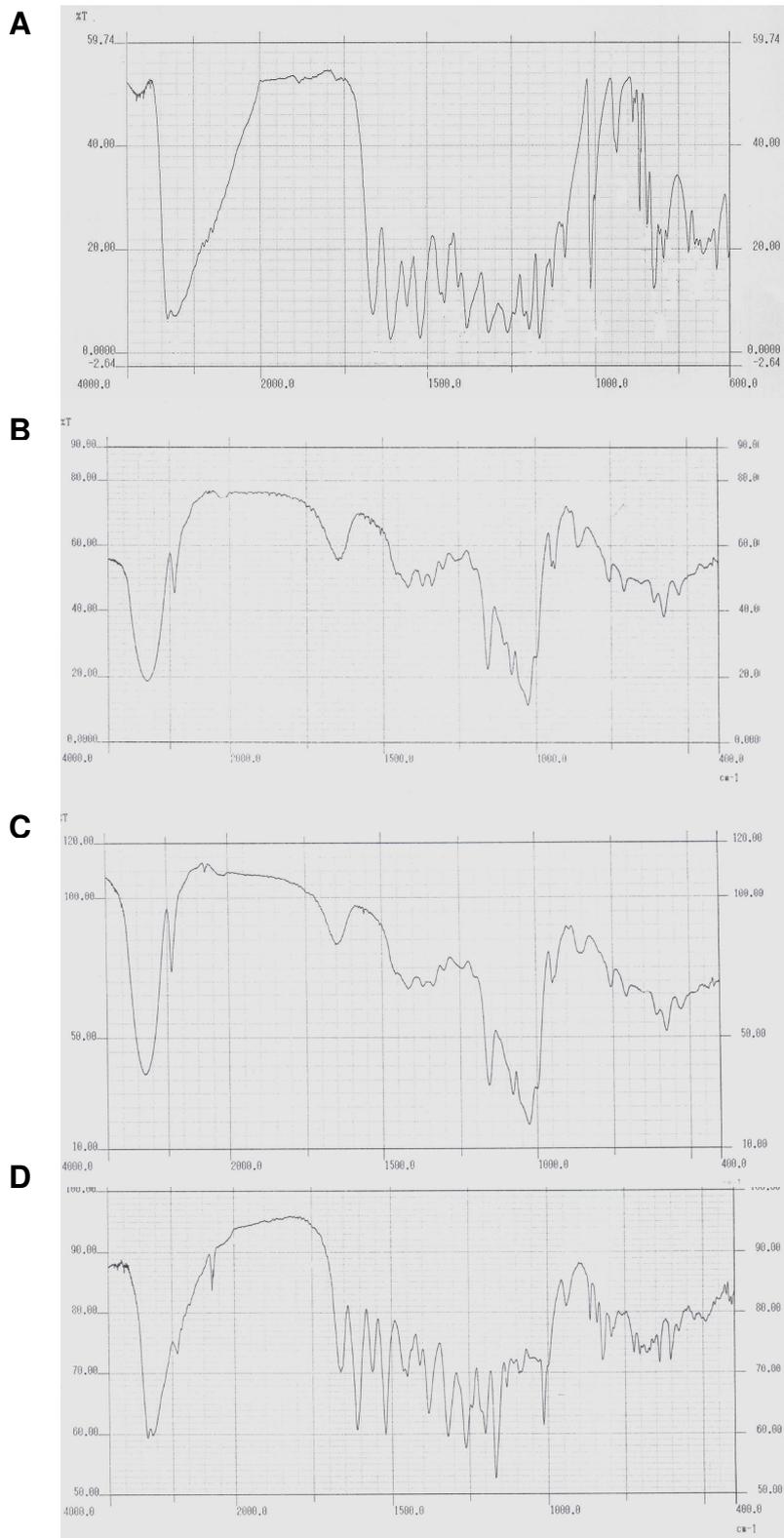
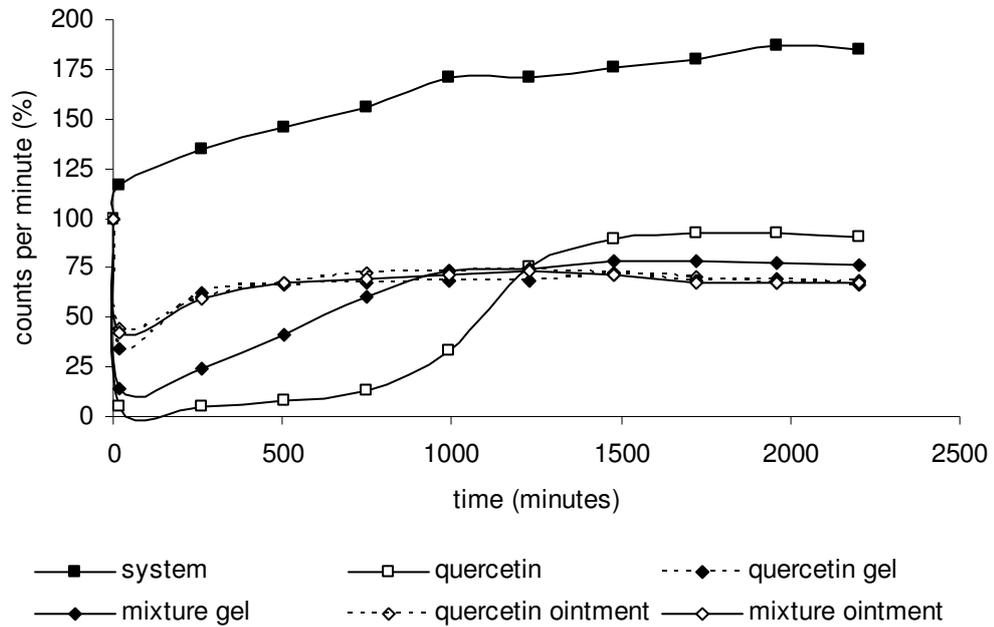


Figura 3.5. Espectros de infravermelho da quercetina (A), da β -ciclodextrina (B), do complexo quercetina/ β -ciclodextrina em estado sólido obtido por meio da secagem por nebulização de complexos preparados em meio líquido (C) e do complexo quercetina/ β -ciclodextrina em estado sólido obtido por simples mistura entre as duas substâncias (D).

ANEXO 4. Potencial antioxidante reativo total de formulações contendo quercetina na pele



A



B

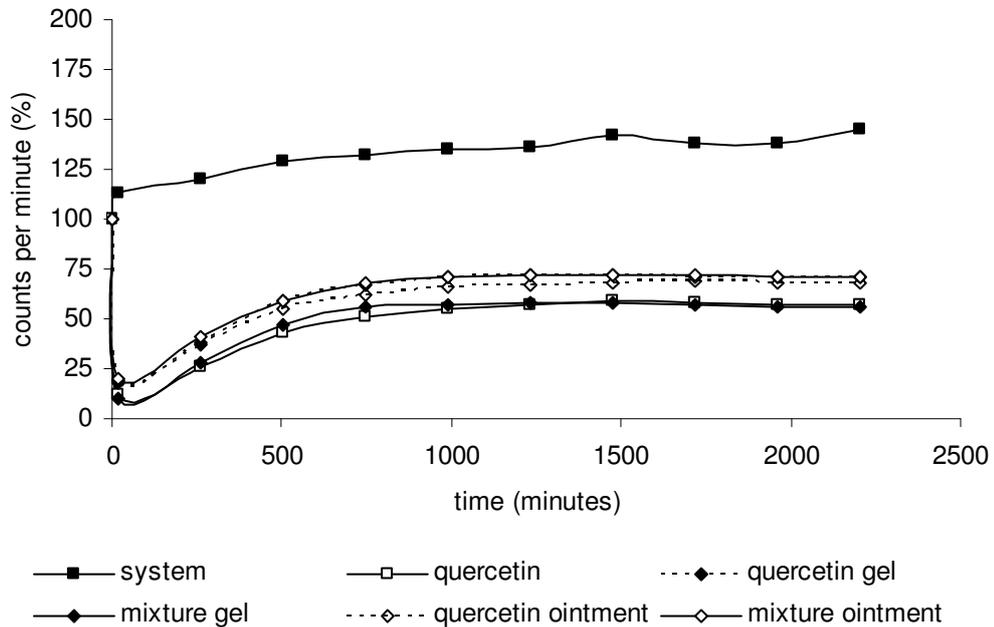


Figura 4.4. Potencial antioxidante relativo total (TRAP) da quercetina na epiderme (A) ou na derme (B) 8 h após a aplicação das formulações sobre a superfície da pele (n = 4).