

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**INCLUSÃO MOLECULAR DA OLEUROPEÍNA E DO BUTIL  
HIDROXIANISOL (BHA) EM ALFA E BETA-CICLODEXTRINA**

CARLOS EDUARDO BARÃO

Engº de Alimentos, UEM, 2005.

Orientador: Prof. Flávio Faria de Moraes, PhD

Dissertação de Mestrado submetida à  
Universidade Estadual de Maringá,  
como parte dos requisitos necessários  
à obtenção do Grau de Mestre em  
Engenharia Química, área de  
Desenvolvimento de Processos.

Maringá – PR – Brasil

Julho de 2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Esta é a versão final da dissertação de Mestrado apresentado por Carlos Eduardo Barão perante a Comissão Julgadora do Curso de Mestrado em Engenharia Química em 11 de julho de 2008.


COMISSÃO JULGADORA



Prof. Dr. Flávio Faria de Moraes  
Orientador



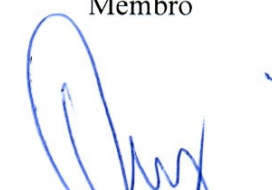
Prof.ª Dr.ª Graciete Matioli  
Membro



Dr. Paulo Waldir Tardioli  
Membro



Prof.ª Dr.ª Gisella Maria Zanin  
Membro



Dr. Marcos de Souza  
Membro

BARÃO, CARLOS EDUARDO

Inclusão molecular da  
oleuropeína e do Butil Hidroxianisol  
(BHA) em alfa e beta ciclodextrinas  
[Paraná] 2008

XIX, 123 p. 29,7 cm (PEQ/UEM. M.Sc.,  
Engenharia Química, 2008)

Dissertação – Universidade Estadual de  
Maringá-PEQ

1. Inclusão Molecular

2. Ciclodextrinas

3. Oleuropeína

4. BHA (Butil Hidroxianisol)

I. PEQ/UEM      II. Título (série)

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a DEUS, pela sua infinita bondade.

À MINHA FAMÍLIA, que sempre esteve ao meu lado, me ajudando e dando força para seguir em frente. Se hoje estou aqui foi graças a vocês que me incentivaram, sempre acreditando no meu potencial.

Ao Prof. Dr. FLÁVIO FARIA DE MORAES, pelo crédito que depositou em mim, incentivo, amizade e efetiva orientação, recebidos ao longo do trabalho.

À Prof<sup>a</sup> MARIA DE FÁTIMA A. B. A. PAIVA MARTINS, da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, pelo envio da oleuropeína e informações. Sem sua ajuda ficaria inviável a realização desse trabalho.

À Prof<sup>a</sup> Dra. GISELLA MARIA ZANIN, pela colaboração, sugestões e amizade.

Aos Eng<sup>os</sup> LAURO MITSUAKI KAMBARA e LUIZA PEDRINA VILXENSKI CALSAVARA, que me ajudaram desde o primeiro momento que entrei no laboratório e contribuíram de maneira essencial para o desenvolvimento desse projeto.

Aos meus AMIGOS, muito obrigado, vocês me ajudaram de maneira valiosa estando sempre ao meu lado.

Aos meus COLEGAS de pós-graduação do Departamento de Engenharia Química da UEM, pela simpatia, compreensão e por proporcionarem um bom ambiente de trabalho.

Aos técnicos ANTONIO FRIMMEL e IVÂNIA TEREZINHA ALBRECHT, do Laboratório de Química da UEM, pela ajuda e cooperação nos testes.

À CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - pela concessão da bolsa de estudo e suporte financeiro para a conclusão deste trabalho.

# **INCLUSÃO MOLECULAR DA OLEUROPEÍNA E DO BUTIL HIDROXIANISOL (BHA) EM ALFA E BETA-CICLODEXTRINAS**

**AUTOR: CARLOS EDUARDO BARÃO**

**ORIENTADOR: PROF. FLÁVIO FARIA DE MORAES, PhD**

Dissertação de Mestrado; Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química; Universidade Estadual de Maringá; Av. Colombo, 5790, BL E46 – 09; CEP: 87020-900 – Maringá – PR, Brasil, defendida em 11 de julho de 2008.

## **RESUMO**

O objetivo deste trabalho é promover a inclusão de dois antioxidantes, o BHA (Butil Hidroxianisol, antioxidante artificial muito utilizado em óleos) e a Oleuropeína (antioxidante natural extraído de folhas de oliveira) em alfa-ciclodextrina ( $\alpha$ -CD) e  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) e fazer a caracterização desses complexos, por meio do cálculo da constante de equilíbrio e análises térmicas de TGA e DSC.

Na primeira etapa, foram feitos os procedimentos para a obtenção da constante de equilíbrio entre o Alaranjado de Metila (AM) e as ciclodextrinas utilizadas ( $\alpha$ -CD e  $\beta$ -CD). Esse dado é utilizado na determinação da constante entre a Oleuropeína e as ciclodextrinas. Para a complexação entre o corante e as CDs verificou-se que o melhor pH de trabalho foi 3,0; utilizando-se tampão citrato/fosfato dissódico no comprimento de onda de 500nm e usando-se como concentração máxima  $0,045 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de corante nas soluções. As constantes obtidas nesses casos foram de  $4557,2 \text{ M}^{-1}$  para o complexo formado entre a  $\alpha$ -CD e o AM, e de  $952,00 \text{ M}^{-1}$  para o complexo formado entre a  $\beta$ -CD e o AM. Em ambos os casos verificou-se que a absorvidade molar dos complexos diminuiu, quase um terço, após a complexação com as ciclodextrinas.

Na segunda etapa, obteve-se o comprimento de onda de absorção máxima da solução aquosa de oleuropeína pura e complexada com  $\beta$ -CD, onde verificou-se que a absorvância da oleuropeína não muda quando complexada com a ciclodextrina. Logo em seguida, usando-se os dados obtidos no procedimento de complexação do alaranjado de

metila com as ciclodextrinas como parâmetro, foram determinadas as constantes de equilíbrio entre a oleuropeína e as ciclodextrinas. Para os complexos formados entre a  $\alpha$ -CD:oleuropeína e a  $\beta$ -CD:oleuropeína, foram obtidos os valores de  $1352,4 \text{ M}^{-1}$  e  $1827,9 \text{ M}^{-1}$  respectivamente.

Na terceira etapa foram realizados os estudos envolvendo o BHA com ambas as ciclodextrinas. Inicialmente obteve-se uma equação que relaciona a concentração da solução aquosa de BHA com sua respectiva absorvância e a solubilidade dele em água, que foi de  $0,1415 \text{ g L}^{-1}$ . Os testes para verificar se as ciclodextrinas influenciam no espectro de varredura das soluções de BHA com o tempo, mostraram que não ocorreram mudanças com o passar do tempo na absorção da solução de BHA. A partir do método do diagrama de solubilidade de fases, foram obtidos os valores da constante de equilíbrio entre o BHA e as ciclodextrinas, resultando em  $49,31 \text{ M}^{-1}$  e  $585,3 \text{ M}^{-1}$  para os complexos formados entre a  $\alpha$ -CD e a  $\beta$ -CD respectivamente, com um aumento de 621% e de 126% da solubilidade do BHA em água, quando estão na presença da  $\alpha$ -CD e a  $\beta$ -CD, respectivamente.

Na última etapa os complexos de inclusão foram preparados pelos métodos de amassamento e mistura-física, e em seguida caracterizados pelos testes de Análise Termogravimétrica (TGA) e Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).

Na interação entre  $\alpha$ -CD e a oleuropeína, os picos tanto de fusão, quanto de ebulição, correspondentes aos complexos apareceram um pouco atrasados, quando comparados com os da substância pura, indicando formação parcial do complexo. Nas misturas físicas os picos apareceram mais acentuados, mas novamente a interpretação ficou dificultada, pois ocorreu o mesmo comportamento da  $\alpha$ -CD. Pelo DSC do BHA e da  $\alpha$ -CD, pode-se verificar que não houve interação de nenhum tipo entre os compostos.

Já nas interações entre a oleuropeína e a  $\beta$ -CD, pode-se confirmar a formação do complexo na preparação 1:2, sendo que nos demais casos, ocorreram fracas interações. Nos termogramas do complexo de inclusão envolvendo o BHA e a  $\beta$ -CD (tanto na preparação 1:1, quanto 1:2), observa-se o desaparecimento do pico de fusão do BHA puro, enquanto para os termogramas das misturas físicas dos compostos este pico aparece bem definido (principalmente na preparação 1:1).

Pelos testes de análise termogravimétrica envolvendo a  $\alpha$ -CD, ou a  $\beta$ -CD, e a oleuropeína, a volatilização deste último composto parece ter ocorrido de forma mais lenta indicando a formação de complexo. Já no caso entre o BHA e a  $\alpha$ -CD, novamente parece haver pouca ou nenhuma interação entre ambos. Mas para o BHA e a  $\beta$ -CD verificou-se

que os complexos de inclusão não apresentam o estágio de volatilização do BHA livre (mais visível no complexo 1:1), demonstrando a formação do complexo de inclusão.

**MOLECULAR INCLUSION OF OLEUROPEIN AND BUTYLATED  
HIDROXYANISOLE (BHA) INTO ALPHA AND BETA CYCLODEXTRINS**

**AUTHOR: CARLOS EDUARDO BARÃO**

**SUPERVISOR: PROF. FLÁVIO FARIA DE MORAES, PhD**

Master Thesis; Chemical Engineering Graduate Program; State University of Maringá; Av. Colombo, 5790, BL E46 – 09; CEP: 87020-900 – Maringá – PR, Brazil, presented on July,11, 2008.

**ABSTRACT**

The objective of this work was to promote the inclusion of two antioxidants, the BHA (butylated hydroxyanisole, artificial antioxidant very used in oils) and the oleuropein (natural antioxidant extracted of olive leaves tree), with  $\alpha$ -cyclodextrin ( $\alpha$ -CD) and  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD) and make the characterization of those complex, through the calculation of the complexation constant and thermal analyses of TGA and DSC.

In the first stage, were they made the procedures for obtaining the constant of complexation between methylorange (MO) and cyclodextrins ( $\alpha$ - CD and  $\beta$ - CD), those data would be used in the determination of the constant between oleuropein and the cyclodextrins. For complexation between the dye and CDs were verified that the best pH to work was 3.0; being used citrate/sodium phosphate dibasic buffer, in the wavelength of 500nm and being used as maximum concentration  $0.045 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  of dye in the solutions. The complexation constants obtained in those cases went  $4557.2 \text{ M}^{-1}$  for the compound formed between  $\alpha$ - CD and MO, and  $952.00 \text{ M}^{-1}$  to the complex formed with  $\beta$ -CD:MO. In both cases it was verified that the molar absorptivity of the compounds decreased, almost third, after the complexation with cyclodextrins.

In the second stage, it was obtained the wavelength of maximum absorption of the aqueous solution of pure oleuropein and complexed with  $\beta$ -CD, being verified the absorbance of oleuropein does not change when complexed with this cyclodextrin. After that, being used the data obtained in the procedure of complexation of methylorange with the cyclodextrins as parameter, it were determined the constants of complexation between oleuropein and cyclodextrins. For the compounds done form among  $\alpha$ -CD:oleuropein and  $\beta$ -CD:oleuropein, it was obtained the values of  $1352.4 \text{ M}^{-1}$  and  $1827.9 \text{ M}^{-1}$  respectively.



In the third stage, were accomplished the studies involving BHA with both cyclodextrins. Initially it was obtained an equation that relates the concentration of the aqueous solution of BHA with its respective absorbance and its solubility in water, that was  $0.1415 \text{ g L}^{-1}$ . The tests to verify if the cyclodextrins influence in the spectrum of sweeping of the solutions of BHA with the time, showed that did not happen changes in the course of time in the absorption of the solution of BHA. Through the phase solubility studies, were obtained the values of the constant of complexation between BHA and cyclodextrins, resulting in  $49.31 \text{ M}^{-1}$  and  $585.3 \text{ M}^{-1}$  for the compounds form among the  $\alpha$ -CD and the  $\beta$ -CD respectively, with an increase of 621% and of 126% on the solubility of BHA in water, when are they in the presence of the  $\alpha$ -CD and the  $\beta$ -CD, respectively.

On the last stage the inclusion complex were prepared by kneading and physical mixtures following for the characterization tests of the compounds were accomplished for Thermogravimetric Analyses (TGA) and Differential Scanning Calorimetry (DSC).

The  $\alpha$ -CD: oleuropein interaction, the peaks of melting and boiling point, corresponding to the compounds did appear with little late, when compared with the pure substances, indicating partial formation of the complex. In the physical mixtures the peaks appeared more accentuated, but again the interpretation was hindered, because it happened the same behavior of  $\alpha$ -CD. To DSC of BHA and  $\alpha$ -CD, it can be verified that there was not interaction of any type between the compositions.

The interactions between oleuropein and  $\beta$ -CD, can be confirmed the formation of complex in the 1:2 preparation, and in the other cases, happened weak interactions. The thermograms of the inclusion complex involving BHA and the  $\beta$ -CD (in 1:1 preparation as much as in the 1:2 preparation), it was observed the disappearance of the melting peak of pure BHA, while for the thermograms of physical mixtures, this peak appears very defined (mainly in the preparation 1:1).

For the tests of thermogravimetric analyses involving  $\alpha$ -CD, or  $\beta$ -CD, with oleuropein, the volatilização of this last one compound seems to have happened in a slower way indicating the complex formation. In the case between BHA and  $\alpha$ -CD, it showed little or any interaction between both. But for BHA and  $\beta$ -CD verified the complex inclusion do not present the volatilization stage of free BHA (more visible in the 1:1 complex), demonstrating the formation of the complex inclusion.

## ÍNDICE DE TEXTO

<b>CAPÍTULO I .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUÇÃO E OBJETIVOS .....</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>4</b>
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1. CICLODEXTRINAS .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1.1. Métodos de Formação de Complexos .....</b>	<b>6</b>
<b>2.1.2. Caracterização dos Complexos de Inclusão .....</b>	<b>8</b>
<b>2.2. ANTIOXIDANTES .....</b>	<b>13</b>
<b>2.3. AZEITE DE OLIVA .....</b>	<b>14</b>
<b>2.4. OLEUROPEÍNA .....</b>	<b>15</b>
<b>2.4.1. Propriedades da oleuropeína.....</b>	<b>17</b>
<b>2.4.2. Estudos realizados com a oleuropeína.....</b>	<b>18</b>
<b>2.5. BHA (BUTIL HIDROXIANISOL).....</b>	<b>20</b>
<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>22</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
<b>3.1. MATERIAIS .....</b>	<b>22</b>
<b>3.1.1. Reagentes.....</b>	<b>22</b>
<b>3.1.2. Equipamentos .....</b>	<b>22</b>
<b>3.2. MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
<b>3.2.1. Primeira etapa – Determinação das constantes de equilíbrio de formação entre o Alaranjado de Metila e as ciclodextrinas.....</b>	<b>23</b>
<i>3.2.1.1. Influência do pH no espectro de absorção e determinação do comprimento de onda de absorção máxima das soluções de alaranjado de metila livre e complexado com ciclodextrinas .....</i>	<i>24</i>
<i>3.2.1.2. Determinação do limite de linearidade de absorção da solução pura de alaranjado de metila.....</i>	<i>26</i>
<i>3.2.1.3. Dosagem da concentração de ciclodextrinas na amostra e determinação da constante de complexação entre o alaranjado de metila e as ciclodextrinas .....</i>	<i>27</i>
<b>3.2.2. Segunda etapa – Determinação das constantes de equilíbrio de formação entre a oleuropeína e as ciclodextrinas.....</b>	<b>30</b>
<i>3.2.2.1. Obtenção do comprimento de onda de máxima absorção da solução de oleuropeína pura e complexada com <math>\beta</math>-CD.....</i>	<i>30</i>
<i>3.2.2.2. Determinação da constante de complexação entre a oleuropeína e a ciclodextrinas.....</i>	<i>31</i>
<b>3.2.3. Terceira etapa – Determinação da constante de equilíbrio de formação entre o BHA e as ciclodextrinas.....</b>	<b>33</b>
<i>3.2.3.1. Determinação do comprimento de onda de absorção máxima da solução aquosa de BHA.....</i>	<i>33</i>
<i>3.2.3.2. Determinação da solubilidade da solução aquosa de BHA.....</i>	<i>33</i>
<i>3.2.3.3. Influência das ciclodextrinas no espectro de varredura da solução de BHA .....</i>	<i>34</i>
<i>3.2.3.4. Determinação da constante de equilíbrio do complexo BHA:<math>\alpha</math>-CD.....</i>	<i>34</i>

3.2.3.5. <i>Determinação da constante de equilíbrio do complexo BHA:<math>\beta</math>-CD</i> .....	35
<b>3.2.4. Quarta etapa – Preparação e caracterização dos complexos de inclusão entre as ciclodextrinas e os antioxidantes</b> .....	<b>35</b>
3.2.4.1. <i>Preparação dos complexos de inclusão</i> .....	35
3.2.4.2. <i>Caracterização dos complexos de inclusão</i> .....	36
<b>CAPÍTULO IV</b> .....	<b>38</b>
<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>38</b>
<b>4.1. PRIMEIRA ETAPA - DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES DE EQUILÍBRIO DE FORMAÇÃO ENTRE O ALARANJADO DE METILA E AS CICLODEXTRINAS</b> .....	<b>38</b>
<b>4.1.1 Influência do pH no espectro de absorção e determinação do comprimento de onda de absorção máxima para soluções de alaranjado de metila livre e complexado com as ciclodextrinas utilizadas</b> .....	<b>38</b>
4.1.1.1 <i>Alaranjado de Metila puro e complexado com <math>\alpha</math>-ciclodextrina</i> .....	38
4.1.1.2 <i>Alaranjado de Metila puro e complexado com <math>\beta</math>-ciclodextrina</i> .....	43
<b>4.1.2. Determinação do limite de linearidade de absorção da solução pura de alaranjado de metila</b> .....	<b>47</b>
<b>4.1.3. Cálculo da concentração de <math>\alpha</math>-ciclodextrina na amostra e da constante de equilíbrio entre a <math>\alpha</math>-CD:AM</b> .....	<b>49</b>
<b>4.1.4. Cálculo da concentração de <math>\beta</math>-ciclodextrina na amostra e da constante de equilíbrio entre a <math>\beta</math>-CD:AM</b> .....	<b>53</b>
<b>4.2. SEGUNDA ETAPA - DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES DE EQUILÍBRIO DE FORMAÇÃO ENTRE A OLEUROPEÍNA E AS CICLODEXTRINAS</b> .....	<b>57</b>
<b>4.2.1. Obtenção dos espectros de absorção da solução de oleuropeína pura e complexada com <math>\beta</math>-CD</b> .....	<b>58</b>
<b>4.2.2 Teoria da complexação entre a oleuropeína e as ciclodextrinas na presença do alaranjado de metila</b> .....	<b>59</b>
4.2.2.1. <i>Cálculo da concentração de <math>\alpha</math>-CD na amostra e da constante de equilíbrio entre a oleuropeína e a <math>\alpha</math>-CD</i> .....	62
4.2.2.2. <i>Cálculo da concentração de <math>\beta</math>-CD na amostra e da constante de equilíbrio entre a oleuropeína e a <math>\beta</math>-CD</i> .....	65
<b>4.3. TERCEIRA ETAPA - DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE EQUILÍBRIO DE FORMAÇÃO ENTRE O BHA E AS CICLODEXTRINAS</b> .....	<b>69</b>
<b>4.3.1. Determinação do comprimento de onda máximo da solução aquosa de BHA</b> .....	<b>69</b>
<b>4.3.2. Determinação da solubilidade da solução aquosa de BHA</b> .....	<b>71</b>
<b>4.3.3. Influência das ciclodextrinas sobre o espectro de varredura da solução de BHA</b> .....	<b>71</b>
4.3.3.1. <i>Complexação do BHA com a <math>\alpha</math>-ciclodextrina</i> :.....	72
4.3.3.2. <i>Complexação do BHA com a <math>\beta</math>-ciclodextrina</i> :.....	73
<b>4.3.4 Determinação das constantes de equilíbrio entre a <math>\alpha</math>-CD e a <math>\beta</math>-CD com o BHA</b> .....	<b>76</b>
4.3.4.1. <i>Determinação da constante de formação do complexo BHA:<math>\alpha</math>-CD</i> .....	76
4.3.4.2. <i>Determinação da constante de equilíbrio de formação do complexo BHA:<math>\beta</math>-CD</i> .....	79
<b>4.4. QUARTA ETAPA - PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO ENTRE AS CICLODEXTRINAS E OS ANTIOXIDANTES</b> .....	<b>81</b>

<b>4.4.1. Calorimetria diferencial de varredura (DSC)</b> .....	<b>81</b>
4.4.1.1. <i>Complexos formados com a <math>\alpha</math>-ciclodextrina</i> .....	82
4.4.1.2. <i>Complexos formados com a <math>\beta</math>-ciclodextrina</i> .....	89
<b>4.4.2. Análise Termogravimétrica (TGA)</b> .....	<b>94</b>
4.4.2.1. <i>Para os complexos formados com a <math>\alpha</math>-ciclodextrina</i> .....	95
4.4.2.2. <i>Para os complexos formados com a <math>\beta</math>-ciclodextrina</i> .....	100
<b>CAPÍTULO V</b> .....	<b>106</b>
<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>106</b>
<b>CAPÍTULO VI</b> .....	<b>109</b>
<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b> .....	<b>109</b>
<b>CAPÍTULO VII</b> .....	<b>110</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>110</b>
<b>CAPÍTULO VIII</b> .....	<b>118</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>118</b>
<b>ANEXO 8.1. - TEORIA DA COMPLEXAÇÃO DO ALARANJADO DE METILA COM A <math>\alpha</math>-CD e <math>\beta</math>-CD</b> .....	<b>118</b>
<b>Cálculo da concentração de ciclodextrina de uma amostra</b> .....	<b>120</b>
<b>8.1.1. Ajuste do cálculo da constante de equilíbrio (<math>K_{CD}</math>) e da absorvância molar específica do complexo CD:AM</b> .....	<b>121</b>
8.1.1.1. <i>Etapas para determinação dos parâmetros da Equação (8.30) e obtenção da constante de equilíbrio</i> .....	123

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 - Sítios hidrofóbicos e sítios hidrofílicos das ciclodextrinas.....	4
Figura 2.2 - Perfis de solubilidade segundo a teoria de Higuchi e Connors.....	9
Figura 2.3 - Estrutura da $\beta$ -ciclodextrina e seus prótons nas respectivas posições de blindagem. ....	9
Figura 2.4 - Modelização molecular do complexo piroxicam: $\beta$ -CD.....	10
Figura 2.5 - Estrutura da oleuropeína (R=OH).....	16
Figura 2.6 - Estrutura do BHA .....	20
Figura 4.1 - Espectro de Varredura de solução $0,05 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de alaranjado de metila na presença e na ausência de $\alpha$ -ciclodextrina $0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , temperatura $25^{\circ}\text{C}$ , tampão citrato-fosfato dissódico, para os valores de pH entre 3 e 7 .....	40
Figura 4.2 - Espectro de Varredura de solução $0,05 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de alaranjado de metila na presença e na ausência de $\alpha$ -ciclodextrina $0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , temperatura $25^{\circ}\text{C}$ , tampão Tris-HCl, para os valores de pH entre 7,5 e 9,0.....	41
Figura 4.3 - Espectro de Varredura de solução $0,05 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de alaranjado de metila na presença e na ausência de $\alpha$ -ciclodextrina $0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , temperatura $25^{\circ}\text{C}$ , tampão carbonato-bicarbonato, para os valores de pH 9,5 e 10,0. ....	42
Figura 4.4 - Espectro de Varredura de solução $0,05 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de alaranjado de metila na presença e na ausência de $\beta$ -ciclodextrina $0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , temperatura $25^{\circ}\text{C}$ , tampão citrato-fosfato dissódico, para os valores de pH entre 3 e 7. ....	44
Figura 4.5 - Espectro de Varredura de solução $0,05 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de alaranjado de metila na presença e na ausência de $\beta$ -ciclodextrina $0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , temperatura $25^{\circ}\text{C}$ , tampão Tris-HCl, para os valores de pH entre 7,5 e 9,0.....	45
Figura 4.6 - Espectro de Varredura de solução $0,05 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de alaranjado de metila na presença e na ausência de $\beta$ -ciclodextrina $0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , temperatura $25^{\circ}\text{C}$ , tampão carbonato-bicarbonato, para os valores de pH 9,5 e 10,0. ....	46
Figura 4.7 - Limite de linearidade da absorção da solução de alaranjado de metila (AM) em função da concentração, medido no comprimento de onda de 500 nm.....	49
Figura 4.8 - Ajuste do polinômio do 2º grau para a obtenção da aproximação linear na origem ( $\Delta\text{ABS} = 0$ , conc. $\alpha$ -CD = 0), termo em x, da 1ª etapa da obtenção da curva padrão de dosagem da $\alpha$ -CD, com o corante alaranjado de metila. ....	51

Figura 4.9 - Curva padrão para a dosagem da $\alpha$ -CD com o corante alaranjado de metila, obtida pelo método da Teoria da Complexação. Condições: corante 0,045 mM, concentrações de $\alpha$ -CD nas amostras, 0 – 0,75 mM, pH 3,0, tampão citrato 0,05 mol/L, pH 3,0, temperatura ambiente.....	53
Figura 4.10 - Ajuste do polinômio do 2º grau, para a obtenção da aproximação linear na origem ( $\Delta$ ABS = 0, conc. $\beta$ -CD = 0), termo em x, da 1ª etapa da obtenção da curva padrão de dosagem da $\beta$ -CD com o corante alaranjado de metila. ....	55
Figura 4.11 - Curva padrão para a dosagem da $\beta$ -CD com o corante alaranjado de metila, obtida pelo método da Teoria da Complexação Condições: corante 0,045 mM, concentrações, concentração de $\beta$ -CD nas amostras, 0 – 6,0 mM, pH 3,0, tampão citrato 0,05 mol/L, pH 3,0, temperatura ambiente.....	56
Figura 4.12 - Espectro de Varredura de solução aquosa $1,0 \times 10^{-3}$ mol L <sup>-1</sup> de $\beta$ -CD .....	58
Figura 4.13 - Espectro de Varredura de solução aquosa $1,0 \times 10^{-3}$ mol L <sup>-1</sup> de oleuropeína	58
Figura 4.14 – Espectro de varredura das soluções aquosas $0,5 \times 10^{-3}$ mol L <sup>-1</sup> de oleuropeína pura e complexada com $\beta$ -CD $0,5 \times 10^{-3}$ mol L <sup>-1</sup> .....	59
Figura 4.15 - Comparação dos dados de complexação do corante alaranjado de metila (AM) com alfa-ciclodextrina ( $\alpha$ -CD), na ausência (o) e na presença ( ) de oleuropeína (OLE). Condições: temperatura ambiente, tampão citrato 0,05 mol/L, pH 3,0. A concentração do AM na cubeta foi $4,5 \times 10^{-5}$ mol L <sup>-1</sup> e da OLE foi $7,5 \times 10^{-4}$ mol L <sup>-1</sup> .....	65
Figura 4.16 - Comparação dos dados de complexação do corante alaranjado de metila (AM) com beta-ciclodextrina ( $\beta$ -CD), na ausência (o) e na presença ( ) de oleuropeína (OLE). Condições: temperatura ambiente, tampão citrato 0,05 mol/L, pH 3,0. A concentração do AM na cubeta foi $4,5 \times 10^{-5}$ mol L <sup>-1</sup> e da OLE foi $5,0 \times 10^{-4}$ mol L <sup>-1</sup> .....	68
Figura 4.17 - Espectro de varredura da solução aquosa de BHA $0,02$ g L <sup>-1</sup> . Temperatura 25°C e pH 6,5.....	70
Figura 4.18 - Influência da $\alpha$ -CD na absorvância de uma solução de BHA. Temperatura de 25°C. A composição de cada amostra é mostrada na tabela 3.1.....	72
Figura 4.19 - Influência da $\beta$ -CD na absorvância de uma solução de BHA. Temperatura de 25°C. A composição de cada amostra é mostrada na tabela 3.1.....	74
Figura 4.20 - Diagrama de solubilidade de fases para o BHA com a $\alpha$ -CD a 35°C.....	77
Figura 4.21 - Diagrama de solubilidade de fases para o BHA com a $\beta$ -CD a 35°C.....	79

Figura 4.22 - Curvas de DSC dos componentes puros, complexos de inclusão e misturas físicas, preparadas na proporção molar de preparação de 1:1 (oleuropeína: $\alpha$ -ciclodextrina).....	82
Figura 4.23 - Curvas de DSC dos componentes puros, complexos de inclusão e misturas físicas, preparadas na proporção molar de preparação de 1:2 (oleuropeína: $\alpha$ -ciclodextrina).....	83
Figura 4.24 - Curvas de DSC dos componentes puros, complexos de inclusão e misturas físicas, preparadas na proporção molar de 1:1 (BHA: $\alpha$ -ciclodextrina).....	86
Figura 4.25 - Curvas de DSC dos componentes puros, complexos de inclusão e misturas físicas, preparadas na proporção molar de 1:2 (BHA: $\alpha$ -ciclodextrina).....	86
Figura 4.26 - Curvas de DSC dos componentes puros, complexos de inclusão e misturas físicas, preparadas na proporção molar de 1:1 (oleuropeína: $\beta$ -ciclodextrina).....	89
Figura 4.27 - Curvas de DSC dos componentes puros, complexos de inclusão e misturas físicas, preparadas na proporção molar de 1:2 (oleuropeína: $\beta$ -ciclodextrina).....	90
Figura 4.28 - Curvas de DSC dos componentes puros, complexos de inclusão e misturas físicas, preparadas na proporção molar de 1:1 (BHA: $\beta$ -ciclodextrina).....	92
Figura 4.29 - Curvas de DSC dos componentes puros, complexos de inclusão e misturas físicas, preparadas na proporção molar de 1:2 (BHA: $\beta$ -ciclodextrina).....	92
Figura 4.30 - Curvas termogravimétricas dos componentes puros, complexos de inclusão e misturas físicas, preparadas na proporção molar de 1:1 (oleuropeína: $\alpha$ -CD). ....	95
Figura 4.31 - Curvas termogravimétricas dos componentes puros, complexos de inclusão e misturas físicas, preparadas na proporção molar de 1:2 (oleuropeína: $\alpha$ -CD). ....	96
Figura 4.32 - Curvas termogravimétricas dos componentes puros, complexos de inclusão e misturas físicas, preparadas na proporção molar de 1:1 (BHA: $\alpha$ -CD).....	98
Figura 4.33 - Curvas termogravimétricas dos componentes puros, complexos de inclusão e misturas físicas, preparadas na proporção molar de 1:2 (BHA: $\alpha$ -CD).....	98
Figura 4.34 - Curvas termogravimétricas dos componentes puros, complexos de inclusão e misturas físicas, preparadas na proporção molar de 1:1 (oleuropeína: $\beta$ -CD). ....	100
Figura 4.35 - Curvas termogravimétricas dos componentes puros, complexos de inclusão e misturas físicas, preparadas na proporção molar de 1:2 (oleuropeína: $\beta$ -CD). ....	101
Figura 4.36 - Curvas termogravimétricas dos componentes puros, complexos de inclusão e misturas físicas, preparadas na proporção molar de 1:1 (BHA: $\beta$ -CD).....	103
Figura 4.37 - Curvas termogravimétricas dos componentes puros, complexos de inclusão e misturas físicas, preparadas na proporção molar de 1:2 (BHA: $\beta$ -CD).....	103

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 - Utilização do BHA em alimentos.....	21
Tabela 3.1 - Preparação dos tubos de ensaio para o procedimento da Seção 3.2.3.3.....	34
Tabela 4.1 – Absorvâncias da solução de Alaranjado de Metila (AM) na presença e na ausência de $\alpha$ -CD para os valores de pH entre 3 a 7. ....	39
Tabela 4.2 – Absorvâncias da solução de Alaranjado de Metila (AM) na presença e na ausência de $\alpha$ -CD para os valores de pH entre 7,5 a 9. ....	41
Tabela 4.3 – Absorvâncias da solução de Alaranjado de Metila (AM) na presença e na ausência de $\beta$ -CD para os valores de pH entre 9,5 e 10. ....	42
Tabela 4.4 – Absorvâncias da solução de Alaranjado de Metila (AM) na presença e na ausência de $\beta$ -CD para os valores de pH entre 3 a 7. ....	43
Tabela 4.5 – Absorvâncias da solução de Alaranjado de Metila (AM) na presença e na ausência de $\beta$ -CD para os valores de pH entre 7,5 a 9. ....	45
Tabela 4.6 – Absorvâncias da solução de Alaranjado de Metila (AM) na presença e na ausência de $\beta$ -CD para os valores de pH entre 9,5 e 10. ....	46
Tabela 4.7 - Absorvância do Alaranjado de Metila em diferentes concentrações em tampão ácido cítrico-citrato de sódio pH 3,0, 0,05 mol L <sup>-1</sup> , no comprimento de onda de 500 nm. ....	48
Tabela 4.8 - Absorvâncias das soluções de alaranjado de metila com $\alpha$ -CD, medidas a 500 nm pelo método colorimétrico, com o corante a 0,045 mM em tampão citrato 0,05 M, pH 3,0 .....	50
Tabela 4.9 - Absorvâncias das soluções de alaranjado de metila com $\beta$ -CD, medidas a 500 nm pelo método colorimétrico, com o corante a 0,045 mM em tampão citrato 0,05 M, pH 3,0 .....	54
Tabela 4.10 - Determinação da absorção espectrofotométrica de soluções de AM na presença de $\alpha$ -CD. A concentração do AM na cubeta foi $0,045 \times 10^{-3}$ mol L <sup>-1</sup> , e da oleuropeína foi $0,75 \times 10^{-3}$ mol L <sup>-1</sup> , para todos os pontos. ....	63
Tabela 4.11 - Determinação da absorção espectrofotométrica de soluções de AM em mistura com $\beta$ -CD. A concentração da AM na cubeta foi $0,045 \times 10^{-3}$ mol L <sup>-1</sup> , e da oleuropeína foi $0,75 \times 10^{-3}$ mol L <sup>-1</sup> , para todos os pontos.....	66
Tabela 4.12 - Dados de Absorvância da solução aquosa de BHA .....	70



Tabela 4.13 – Dados de absorvância da solução de BHA na presença da $\alpha$ -CD para as diferentes amostras. ....	73
Tabela 4.14 – Dados de absorvância da solução de BHA na presença da $\beta$ -CD para as diferentes amostras. ....	75
Tabela 4.15 - Concentração de BHA solubilizada após complexação com a $\alpha$ -CD. Amostras filtradas e diluídas em 1:30 para leitura a da absorvância em espectrofotômetro. ....	77
Tabela 4.16 - Concentração de BHA solubilizadas após complexação com a solução de $\beta$ -CD. Amostras filtradas e diluídas em 1:10 para leitura da absorvância em espectrofotômetro. ....	80
Tabela 4.17 - Resultados das curvas de DSC para os componentes puros e para os produtos resultantes da preparação dos complexos de inclusão e misturas físicas. ....	85
Tabela 4.18 - Resultados das curvas de DSC para os componentes puros e para os produtos resultantes da preparação dos complexos de inclusão e misturas físicas. ....	88
Tabela 4.19 - Resultados das curvas de DSC para os componentes puros e para os produtos resultantes da preparação dos complexos de inclusão e misturas físicas. ....	91
Tabela 4.20 - Resultados das curvas de DSC para os componentes puros e para os produtos resultantes da preparação dos complexos de inclusão e misturas físicas. ....	94
Tabela 4.21 - Resultados das curvas termogravimétricas para os componentes puros e os produtos obtidos na preparação dos complexos de inclusão. ....	97
Tabela 4.22 - Resultados das curvas termogravimétricas para os componentes puros e os produtos obtidos na preparação dos complexos de inclusão. ....	99
Tabela 4.23 - Resultados das curvas termogravimétricas para os componentes puros e os produtos obtidos na preparação dos complexos de inclusão. ....	102
Tabela 4.24 - Resultados das curvas termogravimétricas para os componentes puros e os produtos obtidos na preparação dos complexos de inclusão. ....	104

## NOMENCLATURA

3,4-DHPEA → 3,4 dihidroxifenil etanol

3,4-DHPEA-EA → Forma esterificado do 3,4 dihidroxifenil etanol

3,4-DHPEA-EDA → 3,4- Dihidroxifeniletil 4 formil-3 formilmetil-4-hexenoato

AC → Ácido cítrico

AM → Alaranjado de Metila

ATC → Ácido trans-cinâmico

BHA → Butil Hidroxianisol

BHT → Butil Hidroxitolueno

CDs → Ciclodextrinas

CS → Citrato de sódio

DSC → Calorimetria Diferencial de Varredura

DTG → Termogravimetria Derivativa

FDA → Food and Drug Administration

FENF → Fenolftaleína

FTIR → Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

HEB → Hidroxietil- $\beta$ -ciclodextrina

HPB → Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina

K → constante de equilíbrio de formação do complexo entre a CD e o AM

OLE → Oleuropeína

RMN- $H^1$  → Ressonância Magnética Nuclear de Prótons

RMN- $C^{13}$  → Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

TBHQ → T-butilhidroquinona

TGA → Análise Termogravimétrica

Tris-HCl → Tris(hidroximetil)Aminometano

XRPD → Difração de raio X do pó

$\alpha$ -CD → Alfa ciclodextrina

$\beta$ -CD → Beta ciclodextrina

$\gamma$ -CD → Gama ciclodextrina

## CAPÍTULO I

### INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

#### 1.1. INTRODUÇÃO

Ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos, composto principalmente de seis, sete ou oito unidades de glicose unidas por ligações do tipo  $\alpha$ -1,4, denominadas respectivamente de  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -CD. Devido à sua estrutura cíclica com cavidade hidrofóbica, formam complexos de inclusão com vários compostos, modificando as características químicas e físicas dos mesmos. Proteção contra oxidação, contra degradação pela luz e pelo calor, contra perdas por volatilidade, redução ou eliminação de gostos ou odores desagradáveis, estabilização de princípios ativos, de cores, de vitaminas, de aromas, ou de emulsões, aumento de solubilidade de fármacos e alteração de características químicas são alguns dos efeitos resultantes da inclusão de compostos por CDs.

Os antioxidantes apresentam-se como alternativa para prevenir a deterioração oxidativa dos alimentos e minimizar os danos oxidativos nos seres vivos, uma vez que são substâncias capazes de retardar ou reduzir a velocidade da oxidação.

Do ponto de vista químico, os antioxidantes são compostos aromáticos que contêm pelo menos uma hidroxila, podendo ser sintéticos como o butilhidroxianisol (BHA) e o butilhidroxitolueno (BHT), largamente empregados pela indústria de alimentos, ou naturais, substâncias bioativas tais como a oleuropeína.

A oleuropeína é um glicosídeo amargo, que pode ser isolado das folhas verdes da oliveira. É o maior componente fenólico das azeitonas, mas é praticamente ausente no azeite de oliva devido à sua alta hidrossolubilidade, à sua baixa solubilidade no óleo e também a extensiva degradação enzimática durante a produção do azeite. Apresenta-se também como o precursor primário dos componentes que contribuem mais na atividade antioxidante do azeite de oliva, que são o 3,4 dihidroxifenil etanol e suas formas esterificadas (3,4-DHPEA e o 3,4-DHPEA-EDA).

O BHA é um antioxidante amplamente utilizado em alimentos gordurosos, biscoitos e cereais. É um antioxidante mais efetivo na supressão da oxidação em gorduras animais que em óleos vegetais. Como a maior parte dos antioxidantes fenólicos, sua eficiência é limitada em óleos insaturados de vegetais ou sementes. Apresenta pouca

estabilidade frente a elevadas temperaturas, mas é particularmente efetivo no controle de oxidação de ácidos graxos de cadeia curta.

## **1.2. OBJETIVOS DO TRABALHO**

Neste estudo, o objetivo principal foi realizar a inclusão molecular da  $\alpha$ -CD e da  $\beta$ -CD com dois tipos de antioxidantes, um artificial, (BHA - Butil Hidroxianisol), e um natural (Oleuropeína), visando principalmente à proteção contra agentes externos (como calor, umidade e luminosidade) e melhoria das características físico-químicas dos supostos complexos de inclusão formados. Os objetivos específicos foram o desenvolvimento da modelagem do equilíbrio de formação dos complexos de inclusão com base na Teoria da complexação e verificação da estabilidade dos complexos formados pelo cálculo da constante de formação e testes de TGA e DSC.

Foram escolhidos esses antioxidantes por ser o BHA um dos mais utilizados em alimentos (principalmente nas indústrias de óleos) e a oleuropeína por ser um componente de difícil obtenção, com alto valor de mercado e por ser o precursor primário dos antioxidantes com maior atividade do azeite de oliva.

## **1.3. ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO**

Este trabalho foi dividido em oito capítulos, sendo que este primeiro proporciona uma visão geral do problema, os objetivos a serem atingidos, os métodos que serão utilizados e a sua contribuição científica.

No segundo capítulo, introduz-se a revisão bibliográfica, onde são comentados sobre as ciclodextrinas (citando os principais métodos de formação e caracterização dos complexos) e sobre antioxidantes, citando principalmente as características, propriedades e estudos dos compostos em estudo (oleuropeína e o butil hidroxianisol).

O terceiro capítulo apresenta os principais materiais, equipamentos utilizados e as metodologias realizadas para obtenção dos resultados propostos nos objetivos deste trabalho. Entre elas temos a determinação da constante de equilíbrio de formação dos complexos entre as ciclodextrinas ( $\alpha$ -CD e  $\beta$ -CD) com alaranjado de metila (AM), com a oleuropeína e com o BHA (butil hidroxianisol). A metodologia para preparação dos supostos complexos pelo método do amassamento e mistura-física, e caracterização dos mesmos por calorimetria diferencial de varredura (DSC) e análise termogravimétrica

(TGA) também foram apresentadas.

No quarto capítulo, trata-se da análise crítica e discussão dos resultados obtidos, fazendo análises e comparações com dados da literatura, para verificar a confiabilidade do estudo e propor a melhor alternativa de formação dos complexos.

No quinto capítulo encontram-se as conclusões obtidas no trabalho, com os resultados dos procedimentos realizados.

No sexto capítulo apresentam-se as recomendações para trabalhos futuros.

No sétimo capítulo encontram-se as principais referências que contribuíram para a concretização deste trabalho. E por fim, no capítulo oito, o anexo contendo a teoria da complexação do alaranjado de metila com a  $\alpha$ -CD e a  $\beta$ -CD.

## CAPÍTULO II

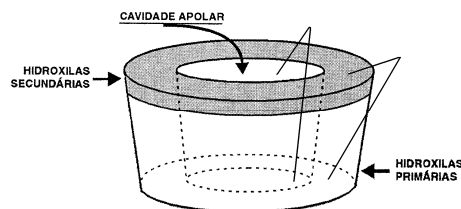
### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 2.1. CICLODEXTRINAS

Ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos, que consistem de 6 ( $\alpha$ -ciclodextrina), 7 ( $\beta$ -ciclodextrina), 8 ( $\gamma$ -ciclodextrina), ou mais unidades de glicopiranosose, unidas por ligações  $\alpha$ -(1-4). São produzidas como resultado da reação de transglicosilação intramolecular, a partir da degradação do amido pela enzima CGTase (DEL VALLE, 2004).

Uma das principais funções das ciclodextrinas é sua capacidade de formar complexos de inclusão com diferentes substâncias, modificando suas propriedades, sendo muito usada na seletividade, separação e solubilização de várias biomoléculas (BANERJEE et al, 2002).

Apresentam-se na forma de um cone truncado, no qual o lado externo é hidrofílico devido às hidroxilas primária e secundária das unidades de glicopiranosose e a cavidade interna tem caráter hidrofóbico, devido ao oxigênio das ligações glicosídicas e aos hidrogênios das unidades de glicopiranosose (Figura 2.1). Se uma molécula se adapta completamente, ou ao menos parcialmente, dentro da cavidade, um complexo de inclusão pode ser formado. Em geral, moléculas hidrofóbicas, ou parcialmente hidrofílicas, têm uma maior afinidade pela cavidade das CDs em soluções aquosas (BEKERS et al., 1991).



**Figura 2.1** - Sítios hidrofóbicos e sítios hidrofílicos das ciclodextrinas.

As ciclodextrinas são capazes de formar complexos de inclusão, alterando a intensidade e duração dos efeitos de fármacos complexados.

Após inclusão na cavidade das ciclodextrinas, a molécula complexada sofre mudanças em suas características físico-químicas, fornecendo meios para se detectar o fenômeno da complexação. Em solução, há um equilíbrio entre as moléculas complexadas; se ocorrer complexação há uma alteração no espectro de absorção UV/VIS (deslocamentos ou aumento/diminuição do pico de absorção máximo) que, muitas vezes, são similares aos efeitos causados por solventes com diferentes polaridades. Isso sugere que a molécula hóspede está sendo transferida de um meio polar para a cavidade apolar das ciclodextrinas.

Essas mudanças podem ser devidas a perturbações eletrônicas na molécula complexada causadas pela interação direta com a CD, pela exclusão de moléculas de água da cavidade ou por uma combinação desses dois efeitos. Embora seja difícil a detecção dessas alterações espectrais (quando observadas no UV), este método ainda é bastante utilizado (BEKERS et al, 1991).

Alguns requisitos para que ocorra a formação do complexo devem ser verificados, como a compatibilidade geométrica (pois as CDs são capazes de formar complexos somente com compostos que possuam dimensões compatíveis com a da sua cavidade), a polaridade ( já que devido ao seu interior hidrofóbico, moléculas fortemente hidrofílicas, hidratadas e com presença de grupos ionizáveis, são pouco ou não complexáveis, enquanto moléculas menos polares que a água podem ser complexadas com ciclodextrinas), o meio (onde pode ser necessária a presença ou não de um solvente para que a complexação ocorra), (SZEJTLI, 1988).

Não existe um método universal para a preparação dos complexos com ciclodextrinas. O método deve ser feito “sob medida” para o “hóspede”, e de acordo com a finalidade: preparação em laboratório em pequena escala, ou produção industrial em grande escala (SZEJTLI, 1988).

Para cada molécula a ser incluída é necessária a escolha de um método específico e de parâmetros de otimização, especialmente o teor de água, temperatura, tempo de agitação e pH, sendo que a falta de controle do pH pode favorecer a liberação de moléculas iônicas (MARTINS, 2002).



### 2.1.1. Métodos de Formação de Complexos

Complexos com CDs podem ser facilmente formados. Os métodos mais comumente utilizados são:

Co-precipitação: Este método é o mais amplamente usado em laboratório. A molécula “hóspede”, ou sua solução, é adicionada lentamente em uma solução aquosa de ciclodextrina. Se um solvente orgânico é necessário para a dissolução da molécula “hóspede”, esse deve ser preferencialmente solúvel em água ou volátil (MARTINS, 2002).

A molécula “hóspede” é geralmente adicionada a uma solução de ciclodextrina quente. O equilíbrio é alcançado com intensa agitação e sob resfriamento lento em poucas horas. Depois de atingido o equilíbrio, o precipitado pode ser recuperado por decantação, centrifugação ou filtração. O precipitado pode ser lavado com uma pequena quantidade de água ou um solvente solúvel em água, tal como metanol ou acetona. O solvente de lavagem pode ser prejudicial para alguns complexos, por isso deve ser previamente testado (MARTINS, 2002; SZEJTLI, 1988).

A principal desvantagem desse método está na ampliação de escala. Devido à solubilidade limitada da ciclodextrina, grandes volumes de água devem ser usados. A capacidade do tanque, tempo e energias de aquecimento e resfriamento podem se tornar importantes fatores de custo. Além disso, alguns complexos não precipitam e não podem ser separados dessa forma (CERESTAR, 2007; MARTINS, 2002).

Suspensão (slurry): Neste método, a ciclodextrina e o “hóspede” não estão dissolvidos, mas finamente suspensos em água à temperatura ambiente, com intensa agitação. Geralmente, uma parte de ciclodextrina é misturada com duas partes de água, formando uma suspensão. A molécula “hóspede”, para ser encapsulada, ou é dissolvida em um solvente adequado ou adicionada diretamente (sem uso de solvente) à suspensão de ciclodextrina (FRÖMMING & SZEJTLI, 1994).

Este método é o mais viável para propósitos industriais, pois a quantidade de água utilizada não é tão grande, o equipamento exigido é convencional e, raramente necessita de qualquer investimento adicional, sendo que a pasta obtida pode ser facilmente seca em *spray dryer* ou liofilizador (MARTINS, 2002).

Amassamento (kneading): Este método é aplicável a ingredientes ativos fracamente solúveis em água. A ciclodextrina é macerada intensamente com uma pequena quantidade de água, formando uma pasta, e o “hóspede” é adicionado diretamente, sem o

uso de qualquer solvente, seguindo-se um amassamento da mistura. O tempo de amassamento depende do “hóspede” (FRÖMMING & SZEJTLI, 1994).

O complexo resultante pode ser seco diretamente ou lavado com água ou solvente orgânico para remover o “hóspede” livre misturado ao complexo de inclusão. As pastas algumas vezes secam formando uma massa firme ao invés de um pó fino. Isto depende do hóspede e da quantidade de água (ou solvente) usada na pasta. Geralmente, a massa firme pode ser seca completamente e triturada para se obter uma forma em pó da mistura contendo o complexo (CERESTAR, 2002).

Este método, fácil para aplicações industriais, está longe de ser recomendado para a obtenção de uma inclusão pura. A lavagem com solvente orgânico pode remover uma quantidade variável do “hóspede” já incluído, devido ao seu coeficiente de partição em favor do solvente orgânico (DUCHÊNE, 1988).

Mistura Física: Alguns “hóspedes” podem ser complexados pela simples mistura do “hóspede” com a ciclodextrina. A mistura física é mais adequada a óleos ou “hóspedes” líquidos. O tempo de mistura exigido é variável e depende do “hóspede”. Geralmente, este método é realizado à temperatura ambiente e é uma variação do método do amassamento (CERESTAR, 2002).

A principal vantagem deste método é que não há adição de água, a menos que seja usada na lavagem do complexo. As desvantagens são os riscos de endurecimento em maior escala de processamento, resultando em uma mistura de qualidade insuficiente para a formação do complexo e, com muitos “hóspedes”, e a maior extensão do tempo exigido (CERESTAR, 2002).

Atomização: Representa um dos métodos mais empregados para produzir complexos de inclusão a partir de uma solução. A mistura parcial do sistema e a rápida eliminação de água propiciam uma eficiência de complexação elevada. Além disso, esta técnica permite controlar o tamanho de partículas obtido em intervalos bastante estreitos. O baixo rendimento e o estresse térmico são algumas das limitações desta técnica.

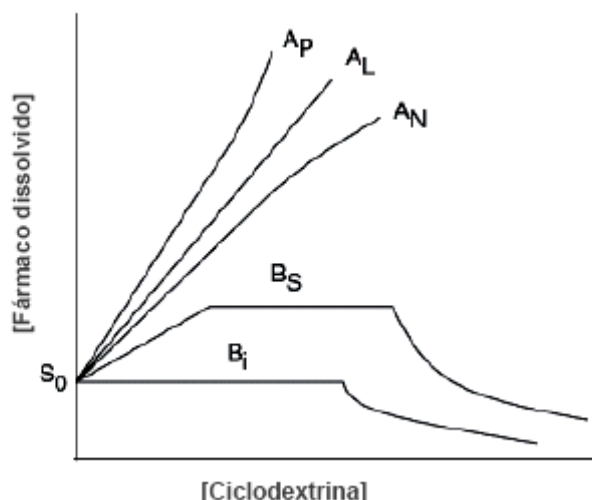
Liofilização: Consiste na eliminação de solvente dos sistemas em solução, por meio de um prévio congelamento e posterior secagem a pressões reduzidas. Esta técnica permite a obtenção de complexos de inclusão com elevado rendimento e um baixo estresse térmico. Geralmente se obtêm pós secos, amorfos e com elevado grau de interação hóspede-CD. Apresenta como desvantagens, o longo tempo de processamento e as más características de fluxo do material obtido (CUNHA-FILHO & SÁ BARRETO, 2007).

Fluidização supercrítica: Constitui um dos métodos mais inovadores de obtenção de complexos em estado sólido. O desenho de partículas empregando CO<sub>2</sub> em estado supercrítico confere aos materiais obtidos por esta técnica, características únicas quanto à interação (PALAKODATY & YORK, 1999). Apesar de ser um método atóxico (não utiliza solventes orgânicos), rápido, quimicamente estável (utiliza temperaturas moderadas), de baixo custo de manutenção e com promissores resultados descritos na literatura, ainda é uma técnica experimental e que apresenta um custo inicial bastante elevado (JUNCO et al., 2002; AL-MARZOUQI et al., 2007).

### 2.1.2. Caracterização dos Complexos de Inclusão

As propriedades das ciclodextrinas e das substâncias a serem incluídas são relativamente diferentes das que possuem esses compostos quando complexado. Alguns dos métodos utilizados atualmente para a caracterização desses complexos são:

Diagrama de solubilidade de fases: a teoria desenvolvida por HIGUCHI E CONNORS em 1965 constitui a aproximação mais utilizada na caracterização de complexos de inclusão em solução. Baseia-se na medição do efeito de complexação na solubilidade do substrato e permite fazer inferências sobre a estequiometria de inclusão e estimar uma constante relacionada com o grau de estabilidade do complexo formado (HIGUCHI & CONNORS, 1965). Segundo esta teoria, se classifica como perfis do tipo A, quando a solubilidade do substrato aumenta com o incremento da concentração de CD. Quando o complexo é de primeira ordem com respeito à CD e de primeira ou superior ordem com respeito ao substrato, um perfil tipo A<sub>L</sub> é obtido. Se o complexo formado é de primeira ordem em relação ao hospedeiro, mas de segunda ou superior ordem em relação à CD, o perfil de solubilidade obtido possui um desvio positivo da linearidade, sendo classificado como diagrama do tipo A<sub>P</sub>. Perfis do tipo A<sub>N</sub> possuem interpretação mais complexa devido à multiplicidade de fenômenos que podem ocorrer. Perfis do tipo B são obtidos com a formação de complexos de baixa solubilidade aquosa, em alguns casos, inclusive inferior à da molécula hospedeira e que precipitam à medida que há inclusão (Figura 2.2).



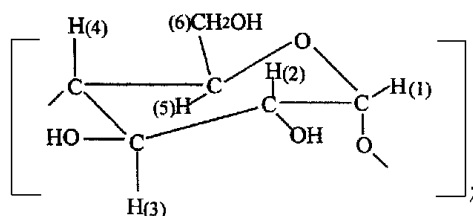
**Figura 2.2** - Perfis de solubilidade segundo a teoria de HIGUCHI E CONNORS (HIGUCHI E CONNORS, 1965).

Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN): a ressonância magnética nuclear de prótons (RMN- $H^1$ ) e do carbono 13 (RMN- $C^{13}$ ) é eficiente para a identificação e estudo dos compostos de inclusão com ciclodextrinas, seja no estado sólido ou líquido.

Esta técnica fornece informações estruturais únicas sobre estequiometria, constantes de estabilidade e orientação molecular do hóspede dentro da cavidade da CD (FIELDING, 2000).

Os prótons H(3) e H(5) são direcionados para o interior da cavidade da molécula, enquanto H(1), H(2) e H(4) estão localizados no seu exterior (Figura 2.3). Dessa forma, se a molécula “hóspede” está acomodada na cavidade, então os prótons localizados no interior da cavidade, H(3) e H(5), ou próximo a ela, H(6), devem estar deslocados.

Alternativamente, se a associação ocorrer no exterior da estrutura toroidal, H(1), H(2) e/ou H(4) devem ser afetados (LIMA, 2001; SZEJTLI, 1988).

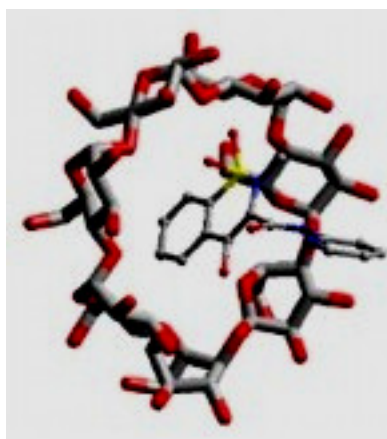


**Figura 2.3** - Estrutura da  $\beta$ -ciclodextrina e seus prótons nas respectivas posições de blindagem.

Espectroscopia de fluorescência e de UV-VIS: os métodos espectrofluorimétricos se caracterizam por conseguir realizar medidas quantitativas com elevada sensibilidade. Esta capacidade converte esta técnica em potencial candidata aos estudos dos fenômenos de inclusão. Correlações lineares têm sido conseguidas a partir das mudanças no sinal de fluorescência de fármacos encapsulados (MANZOORI et al., 2005). De forma menos freqüente podem-se encontrar mudanças detectáveis também nas medidas de absorvância do espectro UV-VIS para alguns princípios ativos na forma de complexo (ZIA et al., 2001).

Modelagem molecular: a aplicação da química computacional na simulação molecular ao nível atômico (modelagem molecular) está bastante desenvolvida e possui várias aplicações em química farmacêutica e no desenho de fármacos.

Esta aproximação teórica permite racionalizar e complementar a observação experimental com um enfoque molecular. Sua aplicação no estudo dos fenômenos de inclusão é relativamente recente e está limitada devido ao tamanho e flexibilidade das moléculas de CD e da multiplicidade de interações em meio aquoso, o que obriga introduzir um grande número de restrições aos modelos matemáticos utilizados pelos programas de computador. A figura 2.4 mostra o modelo teórico de maior estabilidade do complexo de piroxicam com a  $\beta$ -CD (CUNHA-FILHO & SÁ BARRETO, 2007).



**Figura 2.4** - Modelização molecular do complexo piroxicam: $\beta$ -CD

Técnicas cristalográficas com Raio X: entre as técnicas cristalográficas, a difração de raio X do pó (XRPD) é a mais empregada devido à sua simplicidade e rapidez. Uma

comparação dos difratogramas do sistema tratado com o perfil difratométrico dos seus componentes separados e em mistura física é realizada.

Diferenças nas amostras tratadas, como surgimento ou desaparecimento de picos ou mudanças nas intensidades relativas, constituem indícios de formação de complexos.

Outra técnica cristalográfica mais sofisticada, o ensaio de difração de raios X do monocristal, é o único capaz de estabelecer com precisão a estrutura geométrica do cristal formado (CUNHA-FILHO et al., 2006). No entanto, possui importantes limitações como a dificuldade de obtenção de um cristal isolado com tamanho adequado ao ensaio, a complexa análise dos dados e os elevados custos envolvidos.

*Técnicas espectroscópicas:* as técnicas de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e Raman são bastante utilizadas na caracterização de sistemas sólidos com CDs, por serem determinações rápidas e precisas, ainda que a informação conseguida por este ensaio apresente limitações.

Melhorias importantes na precisão e sensibilidade dos equipamentos mais recentes e a utilização de modelos matemáticos, como a integração das bandas por equações lorentzianas, tornam possível obter informações mais confiáveis sobre a conformação espacial dos complexos de inclusão (ILIESCU et al., 2004).

*Termogravimetria e Termogravimetria Diferencial:* estas técnicas fornecem dados quantitativos de perda de massa com o aumento da temperatura. A ciclodextrina perde seu teor de água quando a temperatura de aquecimento se aproxima de 100°C e começa a se decompor acima de 250°C. Este método é adequado para determinar se um produto particular é um complexo verdadeiro. Se a substância “hóspede” não está complexada, então, frequentemente sofre alguma alteração antes da degradação térmica da ciclodextrina (250-300°C). Esta alteração pode ser devido a evaporação, decomposição, oxidação, fusão ou transição polimórfica (SZEJTLI, 1988).

*Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC):* esta técnica pode ser usada para demonstrar a complexação de alguns “hóspedes”.

*Hóspede com alto ponto de fusão e ebulição:* a DSC revela dois picos para a ciclodextrina livre. A 100°C há um pico para a liberação de água, e a 300°C um pico aparece como a decomposição da ciclodextrina. Muitos complexos não têm pico, ou um

pico reduzido a 100°C que resulta do deslocamento das moléculas de água da cavidade pelo “hóspede”.

*Hóspedes voláteis:* a formação do complexo com “hóspedes” voláteis resulta em um aumento na temperatura de ebulição do “hóspede”. Assim, a temperatura de ebulição aumentada é uma indicação de complexação.

*Hóspedes com ponto de fusão baixo:* similarmente, a ausência de um pico de fusão para alguns “hóspedes” é uma indicação de complexação. Esta técnica é limitada para aqueles “hóspedes” que têm ponto de fusão ou ebulição menor que a temperatura de decomposição da ciclodextrina (300°C) ou que é maior ou menor que a da água (100°C) (CERESTAR, 2002).

*Determinação da constante de estabilidade:* As medidas das constantes de equilíbrio ou de dissociação do complexo hóspede-ciclodextrina são muito importantes, já que estes parâmetros caracterizam mudanças nas propriedades físico-químicas da molécula “hóspede” em função da inclusão. A maioria dos métodos para se determinar os valores de K é baseada em titularem-se certas propriedades física ou química da molécula “hóspede” com ciclodextrina, e analisar suas dependências de concentração (HIRAYAMA & UEKAMA, 1987; LOFTSSON, 1998).

## **2.2. ANTIOXIDANTES**

Segundo a ANVISA antioxidante é a substância que retarda o aparecimento de alteração oxidativa no alimento protegendo o organismo contra agentes externos e no desenvolvimento de doenças, principalmente as cardiovasculares e o câncer.

Nos alimentos o controle do processo oxidativo é feito pelo emprego de substâncias que apresentam a propriedade de retardar a oxidação lipídica, são normalmente utilizadas no processamento de óleos e gorduras e em alimentos que os contêm e são denominadas antioxidantes.

Do ponto de vista químico, os antioxidantes são compostos aromáticos que contêm pelo menos uma hidroxila, podendo ser sintéticos como o butil hidroxianisol (BHA) e o butil hidroxitolueno (BHT), largamente empregados pela indústria de alimentos, ou naturais, substâncias bioativas tais como organosulfurados, fenólicos e terpenos, que fazem parte da constituição de diversos alimentos. Segundo a FDA (Food and Drug Administration), antioxidantes são substâncias utilizadas para preservar alimentos retardando a deterioração, rancidez e descoloração decorrentes da autooxidação.

O interesse pelos antioxidantes naturais teve início nos anos 80 diante da comprovação de efeitos maléficos causados por doses elevadas de BHT, BHA e TBHQ (t-butilhidroquinona) sobre o peso do fígado e marcada proliferação do retículo endoplasmático, entre outras. Como consequência, ênfase foi dada à identificação e purificação de novos compostos com atividade antioxidante, provenientes de fontes naturais, que possam atuar sozinhos ou sinergicamente com outros aditivos, como alternativa para prevenir a deterioração oxidativa de alimentos e limitar o uso dos antioxidantes sintéticos.

A propriedade antioxidante das especiarias e de outros vegetais se deve principalmente a seus compostos fenólicos.

Os antioxidantes naturalmente presentes nos alimentos podem ser divididos em substâncias nutrientes onde se enquadram as vitaminas A, C, E, os carotenóides, a lecitina entre outras (RAMALHO & JORGE, 2006).



### 2.3. AZEITE DE OLIVA

A partir da prensagem de azeitonas maduras obtém-se o azeite de oliva virgem, que é tratado exclusivamente por processos físicos: lavagem, moagem, prensa fria e centrifugação. O resultado é um produto não fermentado de baixa acidez (no máximo 2%).

A União Européia classifica azeites de oliva da seguinte maneira:

São considerados azeites extravirgens aqueles cuja acidez é menor do que 0,8 % e que apresentaram atributos positivos suficientes em testes sensoriais. São produtos de alta qualidade gastronômica e no dia-a-dia são utilizados para finalização de pratos ou saladas. Industrialmente podem ser misturados com outros tipos de azeite.

Os azeites de oliva com acidez entre 0,8% e 2% são conhecidos como azeite de oliva virgem. Na sua comercialização podem receber o epíteto fino. Seu principal uso é o culinário e quando usados industrialmente são mesclados com outros tipos de azeite.

Os azeites com acidez maior do que 2% denominam-se azeite de oliva virgem lampante. Destinam-se exclusivamente para uso industrial na mistura com outros azeites de oliva.

Azeites que superam o grau de acidez de 2% ou que por problemas climáticos ou de processo apresentam defeitos sensoriais são destinados ao refino. O refino não modifica a estrutura química do azeite de oliva e elimina os seus defeitos resultando em um produto com acidez não superior a 0,3%. O azeite refinado não é vendido aos consumidores e destinam-se exclusivamente à utilização industrial, ou seja, são misturados com outros azeites de oliva.

A mistura de azeite refinado com azeites de oliva virgens (extra, fino ou lampante) recebe a denominação genérica azeite de oliva. O grau de acidez final não pode superar a 1%. Essa limitação modula a utilização dos azeites virgens na produção do azeite de oliva. Ou seja, para atendê-la, os fabricantes se obrigam a utilizar mais azeites de oliva extravirgem (ou fino) do que o lampante na elaboração do azeite de oliva. A principal utilização do azeite de oliva é culinária (<http://www.azeite.com.br>, consultado em 20/08/2007).

#### *Microcomponentes dos tipos de azeite de oliva*

O processamento do azeite de oliva influencia na concentração de antioxidantes. O azeite de oliva extravirgem contém uma maior concentração de antioxidantes do que os azeites de oliva refinados. Os principais antioxidantes do azeite de oliva são os derivados fenólicos (tirosol e hidroxitirosol), esteróis livres e seus precursores, como o esqualeno. O

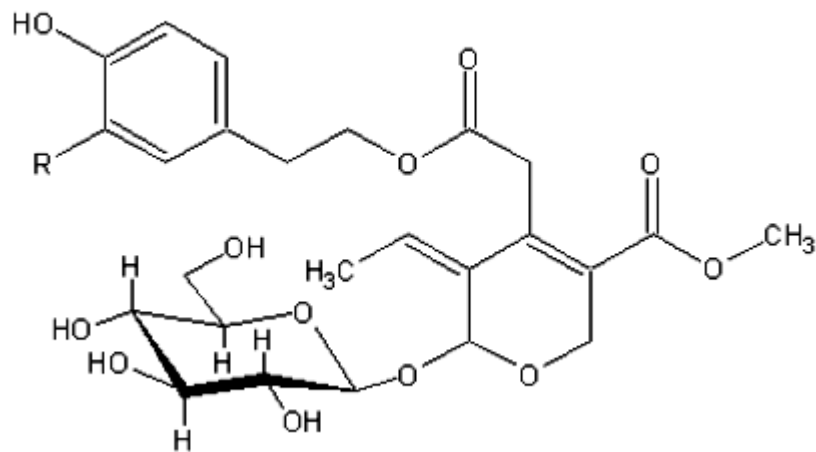
azeite refinado em função de seu processamento perde uma parte desses microcomponentes, mas mantém a mesma composição de ácidos graxos dos azeites virgens (<http://www.azeite.com.br>, consultado em 20/08/2007).

No caso do azeite de oliva os componentes que mais contribuem na atividade antioxidante e o 3,4 dihidroxifenil etanol, na forma simples e esterificada (3,4-DHPEA e o 3,4-DHPEA-EDA), ambos obtidos pela hidrólise da oleuropeína, que é um glicosídeo amargo presente principalmente em azeitonas verdes. Mas, sendo um antioxidante se decompõe facilmente quando exposto a luz, umidade e calor e uma das possibilidades de estabilização dessas moléculas é pelo processo de inclusão molecular, por exemplo, com ciclodextrinas (EFMORFOPOULOU & RODIS, 2004).

## **2.4. OLEUROPEÍNA**

A oleuropeína (figura 2.5) é um glicosídeo amargo, que pode ser isolado das folhas verdes da oliveira (WALTER et al, 1973). É especificado como sendo um éster heterosídico do ácido elenóico e dihidroxietanol (EFMORFOPOULOU & RODIS, 2004).

É o maior componente fenólico das azeitonas, mas é praticamente ausente no azeite de oliva devido à sua alta solubilidade em água, sua baixa solubilidade no óleo e à extensiva degradação enzimática que ocorre durante a produção do azeite de oliva (MARTINS & PINTO, 2008). De acordo com a Professora Maria de Fátima (informações pessoais), em estudos realizados, foi verificado que durante a produção de azeite, quando o mesmo é armazenado durante algum tempo em cubas para decantação visando diminuir a turbidez, também irá se perder oleuropeína, pois ocorrerá precipitação da mesma. Outro fato que também pode explicar a quase ausência da oleuropeína no azeite, é que durante o processamento da azeitona, como há um arrebentamento das células, a oleuropeína entra em contato com as glucosidases endógenas que a hidrolisam. Ao hidrolisar o anel secoiridoide fica muito instável, abre facilmente, podendo fechar novamente, mas de um modo diferente, dando outros compostos. Esses derivados de oleuropeína são então muito mais lipossolúveis e por isso ficam no azeite durante a extração.



**Figura 2.5** - Estrutura da oleuropeína (R=OH).

Para consumo do fruto, a azeitona é submetida a um tratamento com solução entre 1,0 e 2,0% de hidróxido de sódio, com o objetivo de eliminar o sabor amargo, que nesse caso é provocado pela oleuropeína. O tratamento mostra-se satisfatório quando a solução de hidróxido de sódio atinge 2 terços de profundidade na polpa, que pode ser verificado pela alteração da cor. Para eliminar o excesso de hidróxido de sódio, após o tratamento é necessário efetuar várias lavagens, de acordo com o processo de produção escolhido (GAVA, 2002).

De acordo com a Professora Fátima Martins, a oleuropeína não se mostra muito volátil (cristalino em sua forma pura e relativamente inodoro). É bastante estável à temperatura, e a planta aumenta sua biossíntese com aumentos de temperatura (cerca de 40°C). Mas, pelo fato de ser um antioxidante e um éster glicosídico, pode não ser muito estável ao oxigênio e à luz, por isso muito vezes, a oleuropeína é armazenada em dessecadores à temperatura ambiente, mas envolta em papel alumínio para proteção a luz. Estudos de estabilidade efetuados pela professora a 37°C em solução aquosa em pH 3,5 e 5,5 indicam boa estabilidade (existe cerca de 90% do inicial ao fim de 5 dias). Em pH 7,4 a estabilidade é menor, mas ainda relativamente boa, existindo cerca de 70% da quantidade inicial ao fim de 5 dias.

A estabilidade do azeite de oliva à auto-oxidação é devida aos componentes fenólicos que ocorrem naturalmente nele. GENNARO et al (1998) verificaram que por análise termogravimétrica era possível ter uma estimativa da resistência do azeite à oxidação. Nesse estudo, foram analisadas amostras de azeites de oliva virgem, azeite de

oliva e azeite de oliva com diferentes quantidades de antioxidantes, no caso o p-HPEA (p-hidroxifeniletanol), 3,4 DHPEA, 3,4 DHPEA-EA, ácido caféico, oleuropeína, BHA e BHT, com intuito de verificar a estabilidade dos azeites na presença desses compostos. Os autores confirmaram que a adição de alguns componentes (especialmente o 3,4 DHPEA, 3,4 DHPEA-EA e a oleuropeína), aumentam o tempo de vida de prateleira e protegem o azeite da decomposição natural durante o tratamento térmico. Ao contrário do que se pensava a adição de ácido caféico e BHT não diminuiu a oxidação lipídica de maneira significativa, pois verificou-se que a extensão de oxidação lipídica permanece praticamente inalterada. Nesse caso, os autores acreditaram que o BHT só agiria eficientemente na presença de tocoferóis e como no azeite de oliva há pouca quantidade do mesmo, é uma explicação pela sua ação ineficaz (GENNARO et al., 1998).

Na obtenção de um extrato para fortificação do azeite de oliva refinado, alguns fatores foram verificados por MARTINS & GORDON (2005), para a obtenção de um melhor extrato. Esse extrato era composto de hidroxitirosol, tirosol, acetato de hidroxitirosol, 3,4-DHPEA-EDA, oleuropeína, 3,4-DHPEA-EA e o 3,4 HPEA-EDA. Para maior quantidade de oleuropeína foi verificado que o melhor solvente era o metanol ao invés do etanol. O tempo de estocagem das folhas a 38°C por 18 horas antes da extração diminuía sua concentração, diferentes cultivares davam diferentes quantidades de oleuropeína e o melhor método de extração era a maceração seguida da trituração (MARTINS & GORDON, 2005).

Pelo fato da oleuropeína ser um produto de difícil obtenção (500 gramas de folhas fornecem aproximadamente de 5 a 10 gramas) e de elevado custo (cerca de 58 euros por apenas 500mg, dados obtidos na empresa Extrasynthese, França), a inclusão molecular com ciclodextrinas mostra-se vantajosa pois a mesma irá proteger a substância dos agentes externos (como luz, calor, oxigênio, entre outros).

#### **2.4.1. Propriedades da oleuropeína (MSDS OLEUROPEIN ROTICHROM®, 2007)**

Massa molecular: 540,54 g mol<sup>-1</sup>

Estado físico: sólidos finos

Cor: verde

Ponto de Fusão: 89°C

Ponto de ebulição: não determinado

\*Volume: 499,21 Å<sup>3</sup>

\*Área: 506,60 Å<sup>2</sup>

CAS N°. 32619-42-4

EINECS N°. 251-129-6,

\*Dados fornecidos pelo Professor Evagelos Gikas sobre a Oleuropeína em sua forma compactada (Universidade de Atenas).

#### 2.4.2. Estudos realizados com a oleuropeína

Estudos *in vivo* realizados em coelhos mostraram que a administração de oleuropeína (cerca de 10 a 20 mg/kg.dia), pode ajudar no tratamento da isquemia (ANDREADOU et al, 2008). Outro estudo revelou a atividade anti HIV, utilizando-se a oleuropeína, onde foi demonstrado o sinergismo entre as substâncias HAART (drogas empregadas para o tratamento contra o vírus do HIV) e a oleuropeína, informação está que pode auxiliar no tratamento da doença (HUANG et al, 2003).

A oleuropeína ainda estimula a formação do óxido nítrico que é um potente agente vasodilatador, um antioxidante envolvido em processos anti-inflamatórios e possui atividade antimicrobiana contra vírus, bactérias, fungos e outros parasitas (BENAVENTE-GARCIA et al, 2000)

Segundo VISIOLI et al. (1995), o hidroxitirosol e a oleuropeína são inibidores potentes da oxidação da LDL-colesterol induzida por sulfato de cobre.

EFMORFOPOULOU & RODIS (2004) estudaram a complexação da oleuropeína e do ácido trans-cinâmico com a  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -CD em sistema aquoso, levando em consideração vários parâmetros como pH, concentração, tempo de reação e tipo de CD. Nesse trabalho o objetivo era elaborar um método para otimizar a produção de complexos entre as ciclodextrinas e os antioxidantes do azeite de oliva, mas como os antioxidantes do azeite de oliva (no caso o 3,4-DHPEA e o 3,4-DHPEA-EDA) são de difícil extração do azeite, os autores utilizaram dois componentes como indicadores, no caso a oleuropeína e o ácido trans cinâmico. Para o complexo oleuropeína-CD, verificaram que a CD que melhor se ajustava era a  $\beta$ -CD (1:1) em pH neutro. Esse comportamento pode ser justificado pelo dobro do tamanho da cavidade, se comparado com a  $\alpha$ -CD (pois as moléculas poderiam se acomodar melhor na cavidade) e no caso da  $\gamma$ -CD, pelo fato da cavidade ser muito grande, muitas moléculas de água no interior da cavidade tornariam a complexação desfavorável. Em relação ao pH a turvação se mostrou maior em solução ácida para o ácido trans

cinâmico (pH 4) e soluções neutras para a oleuropeína (pH 7), que pode ser explicado pelo fato da oleuropeína sofrer hidrólise em soluções ácidas ou básicas.

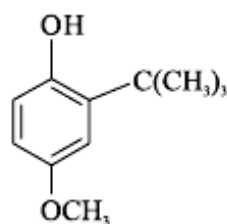
Em outro estudo feito por KARATHANOS et al (2007), os autores realizaram a inclusão de um extrato das folhas de oliveira (rico em oleuropeína, cerca de 90,2%) com  $\beta$ -ciclodextrina. Para a formação do complexo de inclusão o extrato foi disperso em uma solução de  $\beta$ -CD, na razão molar de 1:2 e deixados sobre agitação por 72 horas à temperatura ambiente. Logo depois a suspensão foi congelada a  $-40^{\circ}\text{C}$  por 24 horas e liofilizada em freeze-dryer. Foram realizados também testes de mistura física para verificar se haveria formação do complexo. Em ambos os testes foram feitos testes de calorimetria diferencial de varredura (DSC), que demonstraram que os picos endotérmicos causados pela oleuropeína estavam ausentes no complexo de inclusão (indicando formação), mas continuavam na mistura física. Além disso, estudos de DSC sobre condições oxidativas mostraram que o complexo de inclusão do extrato com a ciclodextrina estava protegido contra a oxidação. Foi feita também a caracterização por Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (RMN), que confirmou a formação do complexo de inclusão. Para o cálculo da constante de formação do complexo foram realizados testes de solubilidade de fases, onde foi obtido um gráfico do tipo  $A_L$ , de estequiometria 1:1, uma constante moderada (cerca de  $300\text{ M}^{-1}$ ) e um aumento de 50% na solubilidade do extrato em água.

As ciclodextrinas também já foram utilizadas para a extração de antioxidantes do azeite de oliva, tendo o ácido trans-cinâmico (ATC) como referência para avaliar as condições ótimas de complexação (EFMORFOPOULOU & RODIS, 2005). Na primeira parte, era conhecida a quantidade de ATC adicionada no azeite de oliva e suas porcentagens de liberação, quando complexados com  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -CD. Foram analisadas também a influência do solvente orgânico utilizado, a habilidade de inclusão com cada CD e o tempo de reação. O princípio foi determinar a taxa de recuperação dos antioxidantes pelo método proposto. Das três CDs utilizadas, cerca de 96% do ATC estava ligado à  $\beta$ -CD, contra 79% ligada à  $\alpha$ -CD e 88% à  $\gamma$ -CD. Para avaliar a influência do solvente orgânico na liberação de ATC a partir dos complexos de inclusão, os autores utilizaram etanol, metanol, clorofórmio e éter etílico, onde o etanol mostrou ser o melhor solvente utilizado na liberação do ATC das moléculas de ciclodextrinas. Isso pode ser devido ao menor tamanho do etanol em relação ao éter etílico e clorofórmio e à baixa polaridade comparada ao metanol, fazendo o mesmo penetrar mais facilmente na cavidade da CD. Foi estudada também a habilidade de inclusão da  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -CD, onde a quantidade de ATC complexada com CD tem uma relação linear com o tempo de reação, atingindo um platô de

1 hora no caso da  $\alpha$  e  $\beta$ -CD e de 2 horas no caso da  $\gamma$ -CD, correspondendo a 91% de ATC ligado à  $\beta$ -CD, 82% de ATC ligado à  $\gamma$ -CD e 72% de ATC ligado à  $\alpha$ -CD, onde se assumiu que a  $\beta$ -CD é a melhor para inclusão. Após ter verificado as melhores condições usando o ATC como referência, os autores estudaram a formação de complexos de inclusão entre os compostos antioxidantes do azeite de oliva (3,4 DHPEA, 3,4 DHPEA-EA e o 3,4 DHPEA-EDA) com a  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -CD, para fazer sua extração dos mesmos do azeite. As observações demonstraram que o fator predominante para a liberação dos compostos fenólicos do complexo de inclusão é a habilidade do solvente penetrar dentro da cavidade da ciclodextrina e não há afinidade de cada composto pelo solvente. Para o 3,4 DHPEA, 3,4 DHPEA-EA, e o 3,4 DHPEA-EDA, a liberação dos compostos antioxidantes teve uma relação linear atingindo valores máximos em uma hora no caso da  $\alpha$ -CD e  $\beta$ -CD e em duas horas no caso da  $\gamma$ -CD. Depois, as maiores taxas de antioxidantes foram obtidas no caso da complexação com  $\beta$ -CD, enquanto a complexação com  $\alpha$ -CD resultou na metade da quantidade e com a  $\gamma$ -CD obtiveram um valor intermediário. Esses resultados indicaram que o tamanho da cavidade da CD, e não o componente fenólico que é o parâmetro que determina a extensão e o tempo de complexação. Essa técnica para a extração dos antioxidantes do azeite de oliva mostrou-se satisfatória, na qual pode-se verificar facilmente a formação dos complexos de inclusão com ciclodextrinas e pelo uso da  $\beta$ -CD, eles podem ser liberados do azeite de oliva e recuperados em níveis maiores que 90% (EFMORFOPOULOU & RODIS, 2005).

## 2.5. BHA (BUTIL HIDROXIANISOL)

O BHA é um antioxidante amplamente utilizado em alimentos gordurosos, biscoitos e cereais. Apresenta fórmula química  $C_{11}H_{16}O_2$  e massa molecular de  $180,24 \text{ g mol}^{-1}$  (Figura 2.6). É um sólido branco, ligeiramente amarelo, com odor característico. É solúvel em álcool e propileno glicol e insolúvel em água.



**Figura 2.6** - Estrutura do BHA

O BHA é um antioxidante mais efetivo na supressão da oxidação em gorduras animais que em óleos vegetais. Como a maior parte dos antioxidantes fenólicos, sua eficiência é limitada em óleos insaturados de vegetais ou sementes. Apresenta pouca estabilidade frente a elevadas temperaturas, mas é particularmente efetivo no controle de oxidação de ácidos graxos de cadeia curta, como aqueles contidos em óleo de coco e palma.

O BHA e o BHT (butil hidroxitolueno) são sinergistas entre si. O BHA age como seqüestrante de radicais peróxidos, enquanto o BHT age como sinergista, ou regenerador de radicais BHA (RAMALHO & JORGE, 2006).

Na Tabela 2.1 encontram-se os alimentos nos quais o uso do BHA é permitido, com o respectivo código de rotulagem e limites máximos de adição, de acordo com a Resolução nº. 04/88 - CNS/MS23, de 24 de novembro de 1988.

**Tabela 2.1** - Utilização do BHA em alimentos.

Antioxidante	Código de rotulagem	Alimentos em que pode ser adicionados	Limite máximo (g/100g) ou (g/100mL)
BHA	320	Creme vegetal	0,02
		Óleos e gorduras	0,02
		Margarinas	0,02

Fonte: Anvisa.

A complexação do BHA com ciclodextrinas modificadas já foi realizado por VORA & BOROUJERDI, (1995). Esse estudo mostrou o processo de complexação entre antioxidantes fenólicos (BHA e BHT) com hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HPB) ou hidroxietil- $\beta$ -ciclodextrina (HEB) e sua caracterização pela análise de solubilidades de fases, difração de raio-X e espectro de infravermelho, mostrando o aumento da solubilidade dos mesmos em água e o valor da sua constante. O aumento de solubilidade foi mais pronunciado no complexo contendo o BHA se comparado ao BHT. As constantes de associação do BHA com HPB e HEB foi respectivamente  $32300 \text{ M}^{-1}$  e  $1470 \text{ M}^{-1}$ . O aumento significativo na solubilidade em água, a formação do complexo de inclusão do BHA de seu estado cristalino para seu estado amorfo e as mudanças em espectros de IR dos antioxidantes foi indicativo de formação de complexos com as ciclodextrinas modificadas.



## CAPÍTULO III

### MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são apresentados os principais materiais e equipamentos utilizados, assim como a metodologia empregada no desenvolvimento experimental do trabalho.

#### 3.1. MATERIAIS

Os principais materiais utilizados no desenvolvimento do trabalho são apresentados nessa seção

##### 3.1.1. Reagentes

Corante alaranjado de metila adquirido pela VETEC, com massa molar de 327,33 g mol<sup>-1</sup>.

β-ciclodextrina, fornecida pela Sigma Chemical Co., com massa molar de 1135,01 g mol<sup>-1</sup>, e teor de umidade de 16,3%.

α-ciclodextrina, fornecida pela Sigma Chemical Co., com massa molar de 972,85 g mol<sup>-1</sup>, e teor de umidade de 10,62.

Oleuropeína, isolada de folhas de oliveira, fornecida pela Professora Maria de Fátima Martins (Universidade do Porto), com massa molar de 540,53 g mol<sup>-1</sup>.

Butil Hidroxianisol (98%), fornecido pela Sigma Chemical Co., com massa molar de 180,24 g mol<sup>-1</sup>.

Membrana Millipore 0,22μm.

Os demais reagentes foram de grau analítico P.A.

##### 3.1.2. Equipamentos

Os principais equipamentos utilizados no desenvolvimento do trabalho foram:

Balança analítica METLER AE200;

Espectrofotômetro UV, marca SHIMADZU, modelo UV-1601PC;

Espectrofotômetro UV-VI, marca SHIMADZU, modelo UV-VIS 1203;

Espectrofotômetro de Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (RMN- $H^1$ ), marca VARIAN, modelo Mercury Plus BB, 300MHz;

Termobalança, marca SHIMADZU, modelo TGA-50;

Calorímetro diferencial de varredura, marca SHIMADZU, modelo DSC-50;

pHmetro TECNAL, modelo TEC-2;

Agitador de tubos PHOENIX AT 56.

## 3.2. MÉTODOS

O desenvolvimento desse trabalho foi realizado em quatro etapas:

Primeira etapa: Verificação das condições ótimas de inclusão e a determinação da constante de equilíbrio de formação do complexo entre o alaranjado de metila e as ciclodextrinas ( $\alpha$ -CD e  $\beta$ -CD).

Segunda etapa: Determinação da constante de equilíbrio de formação do complexo entre a oleuropeína e a  $\alpha$ -CD ou a  $\beta$ -CD, usando o método colorimétrico na presença do corante alaranjado de metila.

Terceira etapa: Determinação da constante de equilíbrio de formação do complexo entre a  $\alpha$ -CD ou a  $\beta$ -CD e o BHA (butil hidroxianisol) pelo método de HIGUCHI & CONNORS (1965).

Quarta etapa: Preparação e caracterização dos complexos de inclusão e mistura física entre as ciclodextrinas e os antioxidantes.

### 3.2.1. Primeira etapa – Determinação das constantes de equilíbrio de formação entre o Alaranjado de Metila e as ciclodextrinas

A teoria da complexação foi utilizada por HAMON & MORAES (1990) para dosagem de misturas de CDs e TARDIOLI (1998) a empregou na determinação da

concentração de  $\beta$ -CD usando o método de dosagem colorimétrica pela fenolftaleína (FENF). Este método baseia-se na formação de um complexo entre o corante e a molécula de  $\beta$ -CD, que causa redução da absorção colorimétrica da solução, no comprimento de onda de 550 nm. Nesse caso, a constante de formação do complexo entre o corante e a ciclodextrina fornece um valor na ordem de aproximadamente  $2,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ , mostrando que a fenolftaleína possui grande afinidade pela  $\beta$ -CD.

Neste trabalho buscou-se encontrar um corante que fornecesse um valor mais baixo para a constante de formação do complexo com as ciclodextrinas, de forma que na dosagem colorimétrica da constante dos complexos com ciclodextrinas e antioxidantes, houvesse maior separação entre as curvas de absorção na presença e na ausência do antioxidante, garantindo-se uma maior precisão nos resultados das constantes.

Para esse propósito foi selecionado o alaranjado de metila (AM) que é muito utilizado para a dosagem de  $\alpha$ -CD e possui menor afinidade pela  $\beta$ -CD que a fenolftaleína (MAKELA et al, 1988). Quando complexado com a  $\alpha$ -CD foram obtidos valores na ordem de  $550 \text{ M}^{-1}$  até  $850 \text{ M}^{-1}$ , e quanto menor a temperatura maior o valor da constante (YEUXICAN et al, 2005). Quanto à estequiometria, verificaram que o corante forma complexo do tipo 1:1 com a  $\beta$ -CD e do tipo 2:1 com a  $\gamma$ -CD e de acordo com os valores de constante obtidos, constatou-se também que o AM possui muito mais afinidade pela  $\beta$ -CD que pela  $\gamma$ -CD, fato que pode ser devido ao tamanho da pequena estrutura do corante, comparado à grande cavidade da  $\gamma$ -CD (HIRAI et al, 1985).

Para cálculo da constante de equilíbrio entre o AM e as ciclodextrinas foi utilizada uma equação apresentada por MORIWAKI (2001) baseada na Teoria da Complexação (SZEJTLI, 1988). A mesma equação foi utilizada por SOUZA & MORAES (2005) e desenvolvida uma forma mais eficaz para a obtenção da constante de equilíbrio, apresentada no anexo.

*3.2.1.1. Influência do pH no espectro de absorção e determinação do comprimento de onda de absorção máxima das soluções de alaranjado de metila livre e complexado com ciclodextrinas*

O espectro de absorção na presença e na ausência de  $\alpha$ -CD e  $\beta$ -CD foi realizado testando-se diferentes pHs para se observar a ocorrência da variação na amplitude dos picos de absorção, buscando-se os picos ou vales do espectro que apresentarem a maior variação na presença e na ausência das ciclodextrinas utilizadas.

A seguir serão descritos os diferentes tampões utilizados.

*a) Tampão citrato - fosfato dissódico, pH 3 a 7*

Uma gama de pH de 3,0 a 7,0 foi preparada com um tampão citrato-fosfato, a partir de uma solução de ácido cítrico (AC)  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (1,9213 g de ácido cítrico para um volume total de 100 mL com água destilada) e uma solução de fosfato dissódico  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (2,84 g de fosfato dissódico para um volume total de 100 mL com água destilada). As soluções foram misturadas de forma que o pH desejado fosse alcançado, de maneira que se obtivessem tampões de pHs 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0 (DDINE, 2003).

*b) Tampão tris-HCl, pH 7,5 a 9,0*

Uma gama de pH de 7,5 a 9,0 foi preparada com um tampão Tris-HCl, a partir de uma solução de tris(hidroximetil)aminometano  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (1,2114 g de tris(hidroximetil)aminometano para um volume total de 50 mL com água destilada) e uma solução de HCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . As soluções foram misturadas de forma que o pH desejado fosse alcançado, de maneira que se obtivesse tampões de pHs 7,5; 8,0; 8,5 e 9,0 (DDINE, 2003).

*c) Tampão carbonato – bicarbonato, pH de 9,5 a 10,5*

Uma gama de pH de 9,5 a 10,5 foi preparada com um tampão carbonato - bicarbonato, a partir de uma solução de carbonato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (0,530 g de carbonato de sódio para um volume total de 50 mL com água destilada) e uma solução de bicarbonato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (0,420 g de bicarbonato de sódio para um volume total de 50 mL com água destilada). As soluções foram misturadas de forma que o pH desejado fosse alcançado, de maneira que se obtivessem tampões de pHs 9,5; 10,0 e 10,5 (DDINE, 2003).

*d) Testes com diferentes tampões*

Preparou-se uma solução estoque de alaranjado de metila (AM) com concentração de  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  (0,0327 g de AM em 100 mL de água destilada). Após isto, fez-se uma diluição da solução estoque para se obter uma solução de trabalho com concentração de  $0,20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  (10 mL de solução estoque levado a um volume final de 50 mL com água destilada).

A solução de  $\alpha$ -CD  $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  contém 0,2177 g de  $\alpha$ -CD para um volume total de 100 mL de água (base seca, considerando-se a umidade obtida pelo método Karl-Fischer).

A solução de  $\beta$ -CD  $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  contém 0,2712g de  $\beta$ -CD para um volume total de 100 mL de água (base seca, considerando a umidade obtida pelo método Karl-Fischer).

O teste consiste em adicionar à cubeta, 1 mL da solução de trabalho de alaranjado de metila, 2 mL da solução contendo o tampão e 1 mL da solução de ciclodextrina ( $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ), ou 1 mL de água (para comparações), (DDINE, 2003).

*3.2.1.2. Determinação do limite de linearidade de absorção da solução pura de alaranjado de metila*

Foi feita a determinação do limite de linearidade para verificar em qual concentração os dados começavam a se afastar da reta ajustada aos dados de absorção fiquem em função da concentração do corante.

O tampão citrato–fosfato dissódico com o pH 3,0 foi determinado como o mais adequado para se desenvolver o método de dosagem das ciclodextrinas em estudo com o AM. Preparou-se uma solução estoque de AM  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  (0,0327 g de AM em 100 mL de água destilada). Logo em seguida preparou-se a solução de trabalho de AM  $0,1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  (5,0 mL de solução estoque de AM completado a um volume final de 50,0 mL com o tampão escolhido). Fez-se então um teste do limite de concentração do AM que fornecesse uma relação linear entre a absorção e a concentração, que foi testada até  $0,10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  (valor no interior da cubeta). O teste foi realizado com a solução de trabalho de AM convenientemente diluída de 0 a  $0,10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  com a solução tampão, e em seguida a absorção destas soluções foi determinada a 500 nm.

### 3.2.1.3. Dosagem da concentração de ciclodextrinas na amostra e determinação da constante de complexação entre o alaranjado de metila e as ciclodextrinas

O método de determinação da CD com AM baseou-se na formação de um complexo entre o corante AM e a molécula de ciclodextrina usando-se como tampão ácido cítrico-citrato de sódio em pH 3,0 com concentração de 0,05 mol L<sup>-1</sup>.

#### a) Preparação das soluções tampões

Foi preparado uma solução de ácido cítrico (AC) 0,1 mol L<sup>-1</sup> (3,8426 g de ácido cítrico em 200 mL de água) e uma solução de citrato de sódio dihidratado (CS) 0,1 mol L<sup>-1</sup> (0,735 g de citrato de sódio em 25 mL de água destilada). Para obtenção da solução estoque de tampão ácido cítrico-citrato de sódio em pH 3,0 e concentração 0,1 mol L<sup>-1</sup> foi adicionado em um balão volumétrico de 400 mL, cerca de 180 mL da solução de AC e aproximadamente 15 mL da solução de CS e completado o volume restante com água. Uma solução de trabalho do tampão ácido cítrico-citrato de sódio em pH 3,0 e concentração 0,05 mol L<sup>-1</sup> foi preparada adicionando em um balão de 100 mL, 50 mL da solução estoque do tampão e completando o volume com água.

#### b) Preparação da solução estoque de $\alpha$ -CD em tampão AC/CS 0,05 mol L<sup>-1</sup>, pH 3,0.

Uma solução estoque de 50 mL de  $\alpha$ -ciclodextrina 0,75 x 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> foi preparada em um balão volumétrico (0,0408 g de  $\alpha$ -CD em 25 mL da solução estoque de tampão AC/CS e completado o volume restante do balão com água).

#### c) Preparação da solução estoque de $\beta$ -CD em tampão AC/CS 0,05 mol L<sup>-1</sup>, pH 3,0.

Uma solução estoque de 50 mL de  $\beta$ -ciclodextrina 6,0 x 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> foi preparada em um balão volumétrico (0,407 g de  $\beta$ -CD em 25 mL da solução estoque de tampão AC/CS e completado o volume restante do balão com água).

*d) Preparação da solução estoque de alaranjado de metila em tampão AC/CS 0,05 mol L<sup>-1</sup>, pH 3,0.*

Uma solução estoque de 100 mL de AM  $0,9 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> foi preparada em um balão volumétrico (0,02946 g de AM em 50 mL da solução estoque de tampão AC/CS e completado o volume restante do balão com água).

*e) Preparação da solução de trabalho de alaranjado de metila em Tampão AC/CS 0,05 mol L<sup>-1</sup>, pH 3,0.*

Uma solução estoque de 50 mL de AM  $0,27 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> foi preparada em um balão volumétrico (15 mL da solução estoque de AM (preparada no subitem d) em 17,5 mL da solução estoque de tampão AC/CS e completado o volume restante do balão com água).

*f) Diluições da solução estoque de ciclodextrinas.*

Em 21 tubos de ensaio foram colocados de 0 a 4 mL da solução estoque de ciclodextrinas ( $\alpha$ -CD ou  $\beta$ -CD) e o volume foi completado com solução de trabalho do tampão AC/CS. Isto é: no primeiro tubo, colocou-se 4 mL do tampão e 0 mL da solução de CD, no segundo tubo 3,8mL da solução tampão e 0,2 mL da solução estoque de CD de e assim sucessivamente, sendo que no último tubo colocou-se 0mL de tampão e 4 mL de CD. Logo em seguida todos os tubos foram agitados em agitador tipo vórtice.

*g) Obtenção da curva de complexação entre o alaranjado de metila e as ciclodextrinas.*

Em 21 tubos de ensaio foram colocados 0,5 mL da solução de trabalho de AM (subitem d) e 2,5 mL das diferentes diluições de CD (subitem f). De maneira que a concentração na cubeta de AM fosse de  $0,045 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> e as concentrações de  $\alpha$ -CD variassem de 0 a  $0,625 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> e de  $\beta$ -CD variassem de 0 a  $5,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>. Os tubos foram agitados em vórtice e foram feitas as leituras de absorvância em 500 nm, zerando com água destilada.

## h) Determinação da constante de complexação AM:CD

A equação (8.20), (Anexo), baseada na Teoria da Complexação, foi ajustada aos dados de absorbância em função da concentração de CD, a fim de determinar a constante de formação do complexo entre o AM:CD.

$$C_{CD} = 1200 \cdot a \cdot \left( 1 - \frac{DABS + ABS_0 - a \cdot \sigma}{ABS_0 - a \cdot \sigma} \right) \cdot \left( 1 + \frac{ABS_0 - a \cdot \sigma}{K \cdot a \cdot (DABS + ABS_0 - a \cdot \sigma)} \right) \quad (8.20)$$

que após simplificada por SOUZA & MORAES (2005), como mostrado no Anexo 8.1, fornece a nova equação da curva padrão da CD, a ser ajustada:

$$C_{CD} = \frac{DABS(1200.DABS - \alpha.\Delta^2.a)}{\Delta(DABS - a.\Delta)} \quad (8.30)$$

onde:

$a$  = concentração total do corante na cubeta em mol/L;

$ABS$  = absorção de cada ponto da curva no comprimento de onda de 500 nm;

$ABS_0$  = absorção do ponto de concentração zero de CD;

$C_{CD}$  = concentração da CD na amostra, em mM;

$DABS = ABS - ABS_0$ ;

$\alpha$  = coeficiente angular da reta ajustada no passo 1 (Anexo);

$\Delta = \sigma - \frac{ABS_0}{a} = \sigma - \sigma_0$ , será o parâmetro de ajuste da Equação (8.30);

$\sigma_0$  = absorção molar específica do corante alaranjado de metila;

$\sigma$  = absorção molar específica do corante complexado com a CD;

Após o ajuste da Equação (8.30), usando os recursos do software Microsoft Excel® como indicado no Anexo, obtém-se os parâmetros,  $\Delta$  e  $\alpha$ , e aplica-se a Equação (8.32) para determinação da constante de equilíbrio de formação do complexo entre a CD e o AM:

$$K = \frac{1}{a \cdot \left( \frac{\alpha \cdot \Delta}{1200} - 1 \right)} \quad (8.32)$$

sendo  $K$  = constante de equilíbrio de formação do complexo entre a CD e o AM.



### 3.2.2. Segunda etapa – Determinação das constantes de equilíbrio de formação entre a oleuropeína e as ciclodextrinas.

Depois de verificadas as respectivas constantes de equilíbrio entre o alaranjado de metila com a  $\alpha$ -CD e a  $\beta$ -CD ( $K_1$ ), pode-se determinar a constante entre a oleuropeína com ambas as ciclodextrinas ( $K_2$ ).

A determinação da constante de formação do complexo de oleuropeína com as ciclodextrinas ( $\alpha$ -CD e  $\beta$ -CD) exigiu o desenvolvimento de uma equação teórica, baseada na Teoria da Complexação, que permitiu modelar a absorção de uma solução de alaranjado de metila (AM) na presença de oleuropeína e das CDs.

Assumiu-se a formação de dois complexos distintos do tipo 1:1, um apenas com o AM e a CD, e outro apenas com a oleuropeína e a CD. A formação destes complexos foi modelada como duas reações reversíveis, em paralelo, que estão em equilíbrio termodinâmico na solução de dosagem.

#### 3.2.2.1. Obtenção do comprimento de onda de máxima absorção da solução de oleuropeína pura e complexada com $\beta$ -CD

Preparou-se uma solução estoque de oleuropeína de  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  (0,054053 g de oleuropeína em 100 mL de água destilada). Logo em seguida a solução foi diluída de modo a obter uma concentração final de oleuropeína de  $0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  (2 mL da solução  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  em 2 mL de água destilada).

A solução de  $\beta$ -CD  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  contém 0,1356g de  $\beta$ -CD em um volume total de 100 mL com água (considerando a umidade obtida por Karl-Fischer).

Para esse teste, primeiramente foram realizados os espectros de varredura das soluções de  $\beta$ -CD pura, de oleuropeína pura  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  e de oleuropeína pura  $0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .

Para efeito de comparação foi realizado o espectro de varredura de uma solução contendo 2 mL da solução  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\beta$ -CD com 2 mL da solução  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de oleuropeína. Esse teste foi realizado para verificar se ocorreria mudança no pico de absorção obtido nesse teste, com o valor obtido pela solução  $0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de oleuropeína pura.

### 3.2.2.2. Determinação da constante de complexação entre a oleuropeína e a ciclodextrinas.

#### a) Preparação das soluções tampões

Foi preparado uma solução de ácido cítrico (AC)  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (3,8426 g de ácido cítrico em 200 mL de água) e uma solução de citrato de sódio (CS) dihidratado  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (0,735 g de citrato de sódio em 25 mL de água destilada). Para a obtenção da solução estoque de tampão ácido cítrico-citrato de sódio em pH 3,0 e concentração  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  foi adicionado em um balão volumétrico de 400 mL, cerca de 180 mL da solução de ácido cítrico e aproximadamente 15 mL da solução de citrato de sódio e completado o volume restante com água. Uma solução de trabalho do tampão ácido cítrico-citrato de sódio em pH 3,0 e concentração  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  foi preparada adicionando em um balão de 100 mL, 50 mL da solução estoque do tampão e completando o volume com água.

#### b) Preparação da solução estoque de $\alpha$ -CD em tampão AC/CS $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 3,0.

Uma solução estoque de 100 mL de  $\alpha$ -ciclodextrina  $1,25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  foi preparada em um balão volumétrico (0,1361 g de  $\alpha$ -CD em 50 mL da solução estoque de tampão AC/CS e completado o volume restante do balão com água).

#### c) Preparação da solução estoque de $\beta$ -CD em tampão AC/CS $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 3,0.

Uma solução estoque de 100 mL de  $\beta$ -ciclodextrina  $10,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  foi preparada em um balão volumétrico (1,356 g de  $\beta$ -CD em 50 mL da solução estoque de tampão AC/CS e completado o volume restante do balão com água).

#### d) Preparação da solução estoque de oleuropeína em tampão AC/CS $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 3,0.

Uma solução estoque de 50 mL de oleuropeína  $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  foi preparada em um balão volumétrico (0,08108 g de oleuropeína em 25 mL da solução estoque de tampão AC/CS e completado o volume restante do balão com água).

e) *Preparação da solução estoque de alaranjado de metila em tampão AC/CS 0,05 mol L<sup>-1</sup>, pH 3,0.*

Uma solução estoque de 100 mL de AM  $0,9 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> foi preparada em um balão volumétrico (0,02946 g de AM em 50 mL da solução estoque de tampão AC/CS e completado o volume restante do balão com água).

f) *Preparação da solução de trabalho de alaranjado de metila e oleuropeína em tampão AC/CS 0,05 mol L<sup>-1</sup>, pH 3,0.*

Uma solução estoque de 100 mL de AM  $0,09 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>, com a de oleuropeína  $1,5 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> foi preparada em um balão volumétrico (10 mL da solução estoque de AM (preparada no subitem e) em 20 mL da solução estoque de tampão AC/CS, mais 50 mL da solução de oleuropeína (preparada no subitem d) e completado o volume restante do balão com água).

g) *Diluições da solução estoque de CD*

Em 21 tubos de ensaio foram colocados de 0 a 4 mL da solução estoque de CD (subitem b para o  $\alpha$ -CD e subitem c para o  $\beta$ -CD) e o volume foi completado com solução de trabalho do tampão AC/CS. Isto é: no primeiro tubo, colocou-se 4 mL do tampão e 0 mL da solução de CD, no segundo tubo 3,8 mL da solução tampão e 0,2 mL da solução estoque de CD e assim sucessivamente, sendo que no último tubo colocou-se 0 mL de tampão e 4 mL de CD. Logo em seguida todos os tubos foram agitados em vórtice.

h) *Obtenção da curva de complexação entre o alaranjado de metila: oleuropeína:  $\alpha$ -ciclodextrina*

Em 21 tubos de ensaio foram colocados 1,5 mL da solução de trabalho de AM:oleuropeína (subitem f) e 1,5 mL das diferentes diluições de  $\alpha$ -CD (subitem g), de maneira que a concentração na cubeta de AM era de  $0,045 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>, as concentrações de  $\alpha$ -CD variavam de 0 a  $0,625 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> e a concentração de oleuropeína fosse  $0,75 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>. Os tubos foram agitados em vórtice e foram feitas as leituras de absorvância em 500 nm, zerando com água destilada.

*i) Obtenção da curva de complexação entre o alaranjado de metila: oleuropeína:  $\beta$ -ciclodextrina*

Em 21 tubos de ensaio foram colocados 1,5 mL da solução de trabalho de AM:oleuropeína (subitem f) e 1,5 mL das diferentes diluições de  $\beta$ -CD (subitem g), de maneira que a concentração na cubeta de AM fosse de  $0,045 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , as concentrações de  $\beta$ -CD variassem de 0 a  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  e a concentração de oleuropeína fosse  $0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Os tubos foram agitados em vórtex e foram feitas as leituras de absorvância em 500 nm, zerando com água destilada.

### **3.2.3. Terceira etapa – Determinação da constante de equilíbrio de formação entre o BHA e as ciclodextrinas**

Nessa etapa dos experimentos foram realizados testes com o BHA (butil hidroxianisol) juntamente com a  $\alpha$ -CD e a  $\beta$ -CD. Inicialmente foram verificadas algumas condições para melhor andamento dos testes e logo em seguida foram determinadas as constantes de equilíbrio entre o composto e as ciclodextrinas e o aumento de sua solubilidade em água quando o mesmo é complexado com as CDs pelo Método de HIGUCHI e CONNORS (HIGUCHI & CONNORS, 1965).

#### *3.2.3.1. Determinação do comprimento de onda de absorção máxima da solução aquosa de BHA*

Foi realizada uma varredura de 190 nm a 1100 nm de uma solução diluída de BHA ( $0,02 \text{ g L}^{-1}$ ). Logo em seguida uma alíquota dessa solução foi filtrada em membrana de  $0,22 \mu\text{m}$  e uma nova varredura foi realizada para efeitos de comparação. A partir dos dados obtidos foi possível obter o comprimento de onda de máxima absorção, e a equação linear que relaciona dados de absorvância com concentração de BHA.

#### *3.2.3.2. Determinação da solubilidade da solução aquosa de BHA*

Uma solução de BHA  $20 \text{ g L}^{-1}$  foi preparada com água destilada e colocada em uma incubadora durante cinco dias sob agitação a 150 rpm e  $30^\circ\text{C}$ . Após esse tempo a solução

resultante foi filtrada e pela Equação (4.18) obtida pelo método da Seção 3.2.3.1, foi determinada a solubilidade da solução aquosa de BHA.

### 3.2.3.3. Influência das ciclodextrinas no espectro de varredura da solução de BHA

Inicialmente foram preparadas as soluções de BHA ( $0,004 \text{ g L}^{-1}$ ) e uma solução de cada ciclodextrina ( $1,8 \text{ g L}^{-1}$ ). Seis tubos de ensaio foram preparados conforme a Tabela 3.1.

As amostras foram agitadas em vórtex e uma varredura espectrofotométrica das soluções foi realizada no primeiro e no terceiro dia para verificar se ocorriam diferenças nos espectros das respectivas soluções.

**Tabela 3.1** - Preparação dos tubos de ensaio para o procedimento da Seção 3.2.3.3

Amostras	Solução de BHA (mL)	Solução de CD (mL)	Água destilada (mL)
1	2,0	0,0	2,0
2	2,0	0,4	1,6
3	2,0	0,8	1,2
4	2,0	1,2	0,8
5	2,0	1,6	0,4
6	2,0	2,0	0,0

### 3.2.3.4. Determinação da constante de equilíbrio do complexo BHA: $\alpha$ -CD

Neste caso aplicou-se o método do diagrama de solubilidade de fases, subseção 2.1.2. Foi preparada uma solução de  $\alpha$ -CD na concentração de  $120 \text{ g L}^{-1}$  em água. Em 9 tubos de ensaio foram pesados cerca de 100 mg de BHA e adicionadas soluções de  $\alpha$ -CD em cada tubo, sendo colocado no primeiro: 10 mL de água e 0 mL da solução de  $\alpha$ -CD, e no último: 0 mL de água e 10 mL da solução de  $\alpha$ -CD, e para os outros tubos variou-se o volume de ambas soluções de 1 em 1 mL. Os tubos foram homogeneizados e colocados sobre agitação a 150 rpm durante cinco dias a  $30^\circ\text{C}$ . Decorrido esse tempo as amostras foram filtradas a vácuo em membrana Millipore ( $0,22\mu\text{m}$ ), diluídas em água destilada e analisadas em espectrofotômetro, no comprimento de onda de máxima absorção da solução de BHA. Com as leituras de absorvâncias obtidas, foi aplicada a equação obtida pelo método da Seção 3.2.3.1 e obteve-se o gráfico de concentração de BHA em função da

concentração de ciclodextrina ( $\times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>). Com a reta obtida calculou-se a constante de estabilidade do complexo formado (K) pelo método de HIGUCHI & CONNORS (1965).

#### 3.2.3.5. Determinação da constante de equilíbrio do complexo BHA: $\beta$ -CD

Foi preparada uma solução de  $\beta$ -CD na concentração de 1,8 g L<sup>-1</sup> em água. Em 11 tubos de ensaio foram pesados cerca de 100 mg de BHA e feitas diferentes diluições da solução de  $\beta$ -CD, onde colocou-se 10 mL de água e 0 mL da solução de  $\beta$ -CD, para o primeiro tubo, até atingir 0 mL de água e 10 mL da solução de  $\beta$ -CD, para o último tubo, e variando-se ambas as soluções de 1 em 1 mL, para os outros tubos. Os tubos foram homogeneizados e colocados sobre agitação a 150 rpm durante cinco dias a 30°C. Decorrido esse tempo as amostras foram filtradas a vácuo em membrana Millipore (0,22 $\mu$ m), diluídas em água destilada e analisadas em espectrofotômetro no comprimento de onda máximo da solução de BHA. Com as leituras de absorvâncias obtidas e a equação linear de absorvância em função da concentração de BHA obteve-se o gráfico de concentração de BHA em função da concentração de ciclodextrina ( $\times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>). Com a reta obtida calculou-se a constante de estabilidade do complexo formado (K) pelo método de HIGUCHI e CONNORS (1965).

### 3.2.4. Quarta etapa – Preparação e caracterização dos complexos de inclusão entre as ciclodextrinas e os antioxidantes

Após determinadas as constantes entre as ciclodextrinas e os compostos em estudo, foi realizada a preparação dos complexos obtidos ao final do procedimento, na forma sólida, e a caracterização dos complexos por análise termogravimétrica (TGA), e calorimetria diferencial de varredura (DSC).

#### 3.2.4.1. Preparação dos complexos de inclusão

Foram preparados complexos de inclusão colocando-se em contato a molécula hóspede (BHA ou Oleuropeína) e a molécula hospedeira ( $\alpha$ -CD ou  $\beta$ -CD), nas proporções

molares de 1:1 e 1:2 (hóspede: hospedeiro), utilizando-se os métodos de amassamento e mistura-física.

*a) Amassamento*

Misturou-se  $0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  em massa seca de CD (alfa ou beta-CD) com 1 mL de água a 25 °C em placa de petri. Macerou-se a pasta manualmente com espátula de inox, até a homogeneização (aproximadamente 15 min.).

Em seguida adicionou-se  $0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  em massa seca do composto em estudo (Oleuropeína ou BHA) e macerou-se por mais de 20 min.

Manteve-se a pasta em repouso por 24 horas em temperatura ambiente (25 °C), e em seguida secou-se em dessecador a vácuo, contendo sílica gel azul, até peso aproximadamente constante.

Para a proporção (1:2) misturou-se  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  em massa seca de CD (alfa ou beta-CD) com 1 mL de água a 25 °C em placa de petri e procedeu-se como no caso da preparação (1:1)

*b) Mistura Física*

Misturou-se  $0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  em massa seca de CD (alfa ou beta-CD) com  $0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  em massa seca do composto em estudo (oleuropeína ou BHA) em uma placa de petri à temperatura ambiente com o auxílio de uma espátula de inox, sem adição de qualquer solvente, durante 10 min.

Colocou-se a mistura final em repouso por 24 horas à temperatura ambiente e em seguida secou-se em dessecador a vácuo contendo sílica gel azul, até peso aproximadamente constante.

Para a proporção (1:2) adicionou-se  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  em massa seca de CD (alfa ou beta-CD) em placa de petri e procedeu-se como no caso da preparação (1:1)

### *3.2.4.2. Caracterização dos complexos de inclusão*

*a) Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)*

Massas de aproximadamente 6 mg das amostras dos produtos obtidos nos procedimentos descritos no item 3.2.4.1, e das substâncias puras, foram analisados em um calorímetro da marca SHIMADZU, modelo DSC-50, na faixa de temperatura de 25°C a

350°C, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (20 mL min<sup>-1</sup>), razão de aquecimento de 10°C min<sup>-1</sup>, e empregando-se cápsulas de alumínio.

*b) Análise Termogravimétrica (TGA)*

Os termogramas dos produtos e substâncias puras foram obtidos a partir de uma termobalança da marca SHIMADZU, modelo TGA-50, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (20 mL min<sup>-1</sup>), razão de aquecimento de 10°C min<sup>-1</sup>, utilizando-se um cadinho de platina, contendo massas de aproximadamente 6mg das amostras. A faixa de temperatura foi de 25° a 500°C.



## **CAPÍTULO IV**

### **RESULTADOS E DISCUSSÕES**

#### **4.1. PRIMEIRA ETAPA - DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES DE EQUILÍBRIO DE FORMAÇÃO ENTRE O ALARANJADO DE METILA E AS CICLODEXTRINAS**

Nesta primeira fase da pesquisa objetivou-se determinar a constante de equilíbrio de formação do complexo entre o alaranjado de metila (AM) e as ciclodextrinas ( $\alpha$ -CD e  $\beta$ -CD). Os ensaios foram realizados de acordo com o descrito no item 3.2.1.

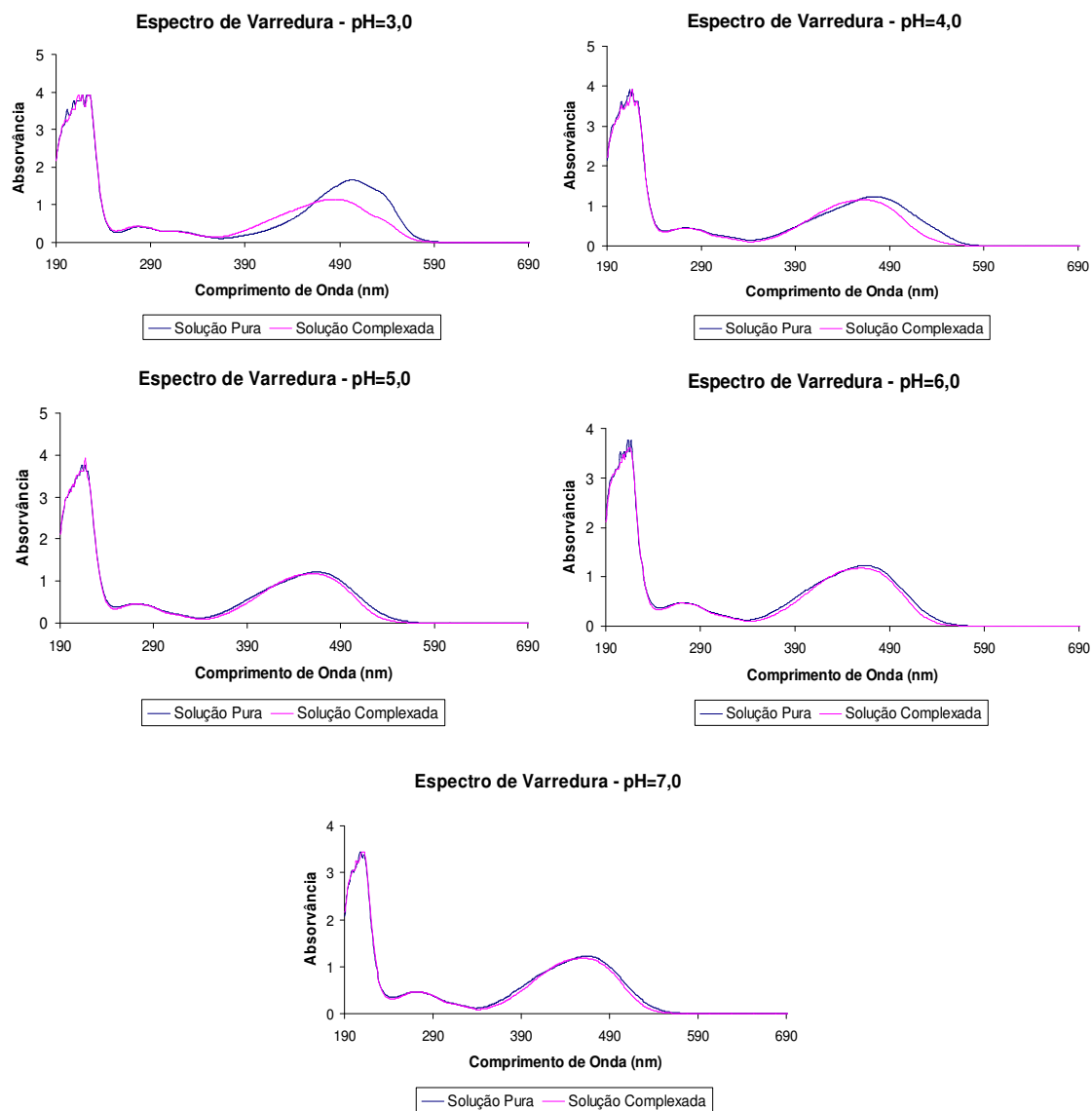
##### **4.1.1 Influência do pH no espectro de absorção e determinação do comprimento de onda de absorção máxima para soluções de alaranjado de metila livre e complexado com as ciclodextrinas utilizadas.**

Os resultados dos testes realizados relativos à metodologia descrita no item 3.2.1.1 são mostrados nas figuras 4.1 a 4.3, e tabelas 4.1 a 4.3 para a  $\alpha$ -CD, e nas figuras 4.4 a 4.6 e tabelas 4.4 e 4.6 para a  $\beta$ -CD.

###### *4.1.1.1 Alaranjado de Metila puro e complexado com $\alpha$ -ciclodextrina*

**Tabela 4.1** – Absorvâncias da solução de Alaranjado de Metila (AM) na presença e na ausência de  $\alpha$ -CD para os valores de pH entre 3 a 7.

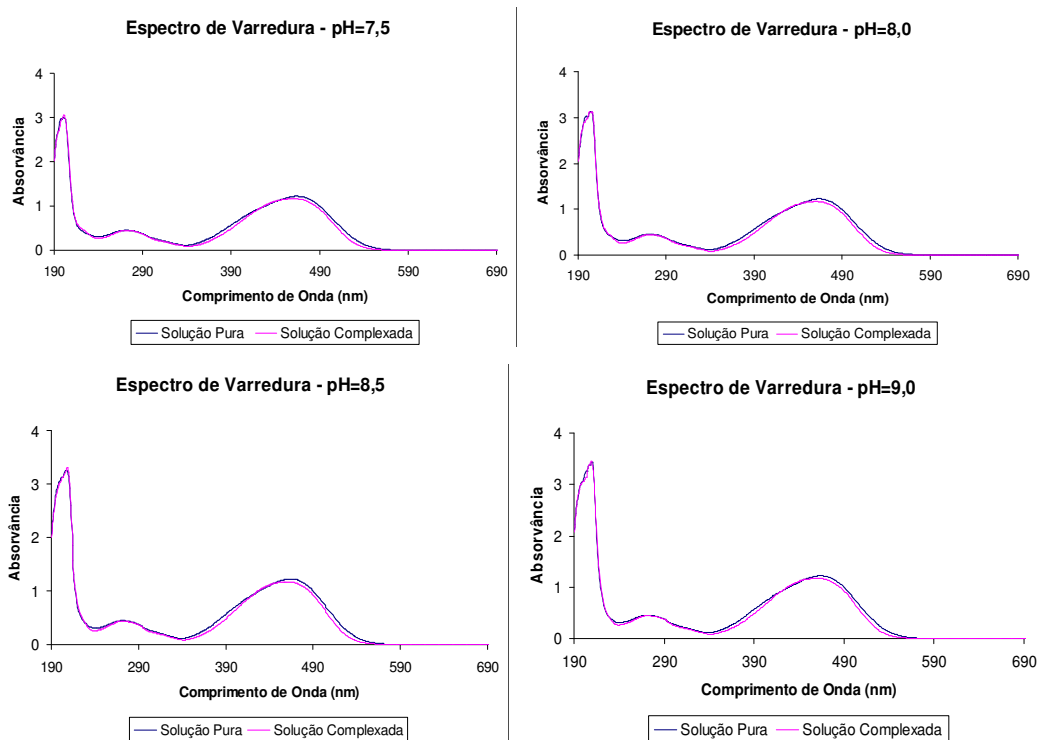
pH	Pico	Ausência de $\alpha$ -CD		Presença de $\alpha$ -CD	
		$\lambda_{\text{máx}}$	Absorvância	$\lambda_{\text{máx}}$	Absorvância
3,0	1	503,00	1,6631	482,00	1,1467
	2	315,00	0,3057	276,00	0,4250
	3	277,00	0,4176	213,00	3,9133
	4	217,00	3,9133	-	-
4,0	1	474,00	1,2286	462,00	1,1512
	2	274,00	0,4525	272,00	0,4457
	3	214,00	3,9133	216,00	3,6133
5,0	1	465,00	1,2161	461,00	1,1699
	2	271,00	0,4608	271,00	0,4576
	3	213,00	3,7628	217,00	3,9133
6,0	1	464,00	1,2310	459,00	1,1749
	2	271,00	0,4720	271,00	0,4666
	3	213,00	3,7628	214,00	3,6123
7,0	1	464,00	1,2239	459,00	1,1775
	2	271,00	0,4592	271,00	0,4641
	3	208,00	3,4362	210,00	3,4362



**Figura 4.1** - Espectro de Varredura de solução  $0,05 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de alaranjado de metila na presença e na ausência de  $\alpha$ -ciclodextrina  $0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , temperatura  $25^\circ\text{C}$ , tampão citrato-fosfato dissódico, para os valores de pH entre 3 e 7.

**Tabela 4.2** – Absorvâncias da solução de Alaranjado de Metila (AM) na presença e na ausência de  $\alpha$ -CD para os valores de pH entre 7,5 a 9.

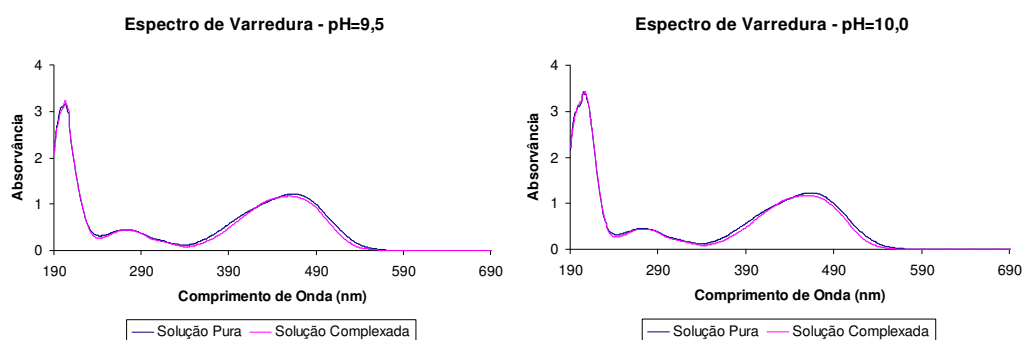
pH	Pico	Ausência de $\alpha$ -CD		Presença de $\alpha$ -CD	
		$\lambda_{\text{máx}}$	Absorvância	$\lambda_{\text{máx}}$	Absorvância
7,5	1	463,00	1,2196	461,00	1,1642
	2	271,00	0,4493	271,00	0,4446
	3	201,00	3,0103	201,00	3,0726
8,0	1	463,00	1,2239	459,00	1,1671
	2	272,00	0,4519	271,00	0,4426
	3	204,00	3,1351	203,00	3,1351
8,5	1	464,00	1,2266	460,00	1,1715
	2	272,00	0,4473	271,00	0,4386
	3	206,00	3,2631	208,00	3,3113
9,0	1	463,00	1,2225	460,00	1,1711
	2	271,00	0,4506	271,00	0,4435
	3	210,00	3,4362	209,00	3,4618



**Figura 4.2** - Espectro de Varredura de solução  $0,05 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de alaranjado de metila na presença e na ausência de  $\alpha$ -ciclodextrina  $0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , temperatura  $25^\circ\text{C}$ , tampão Tris-HCl, para os valores de pH entre 7,5 e 9,0.

**Tabela 4.3** – Absorvâncias da solução de Alaranjado de Metila (AM) na presença e na ausência de  $\beta$ -CD para os valores de pH entre 9,5 e 10.

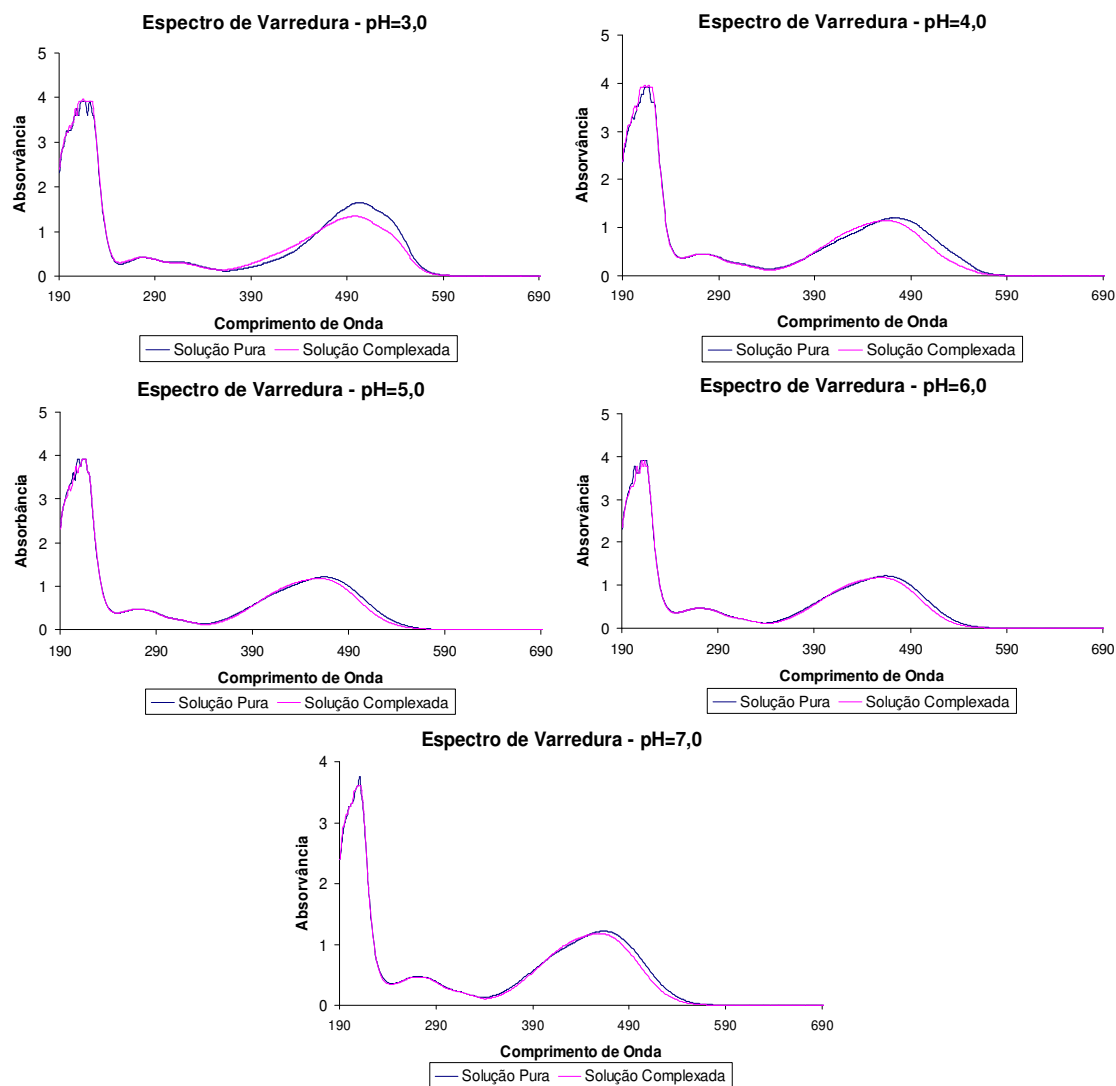
pH	Pico	Ausência de $\beta$ -CD		Presença de $\beta$ -CD	
		$\lambda_{\text{máx}}$	Absorvância	$\lambda_{\text{máx}}$	Absorvância
9,5	1	464,00	1,2213	460,00	1,1711
	2	272,00	0,4498	271,00	0,4435
	3	203,00	3,1749	202,00	3,2231
10,0	1	464,00	1,2283	460,00	1,1711
	2	272,00	0,4518	271,00	0,4431
	3	206,00	3,4362	207,00	3,4362



**Figura 4.3** - Espectro de Varredura de solução  $0,05 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de alaranjado de metila na presença e na ausência de  $\alpha$ -ciclodextrina  $0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , temperatura  $25^\circ\text{C}$ , tampão carbonato-bicarbonato, para os valores de pH 9,5 e 10,0.

4.1.1.2 Alaranjado de Metila puro e complexado com  $\beta$ -ciclodextrina**Tabela 4.4** – Absorvâncias da solução de Alaranjado de Metila (AM) na presença e na ausência de  $\beta$ -CD para os valores de pH entre 3 a 7.

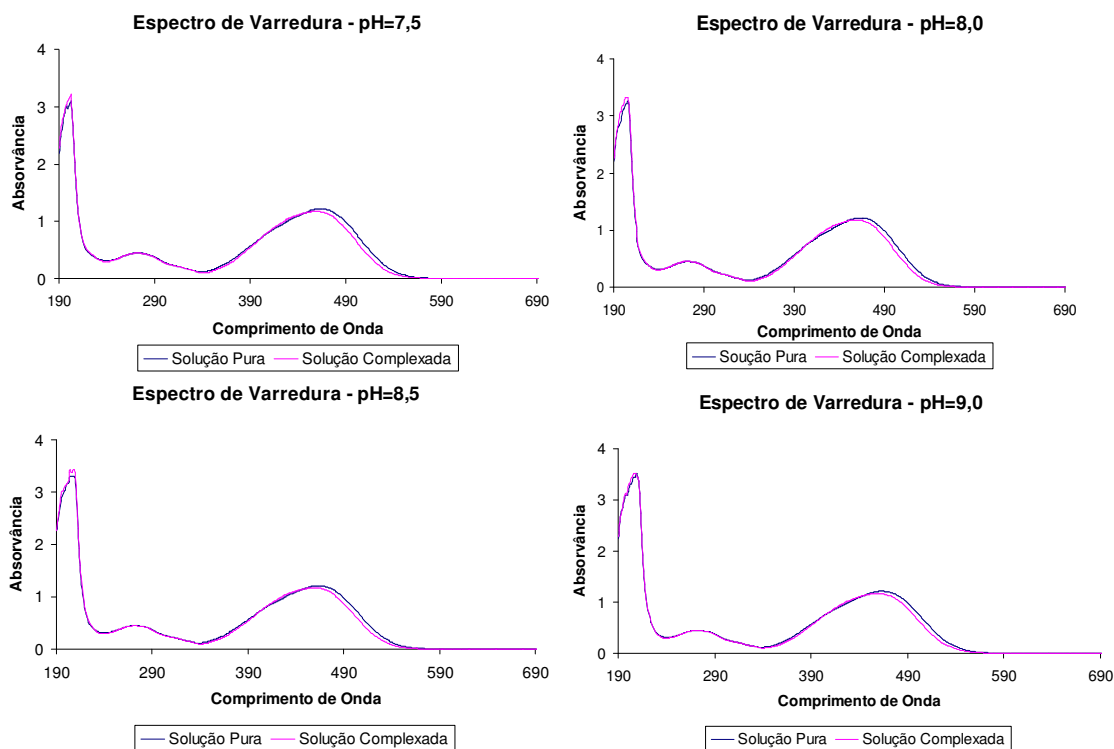
pH	Pico	Ausência de $\beta$ -CD		Presença de $\beta$ -CD	
		$\lambda_{\text{máx}}$	Absorvância	$\lambda_{\text{máx}}$	Absorvância
3,0	1	503,00	1,651	498,00	1,3435
	2	315,00	0,3127	277,00	0,4260
	3	277,00	0,4232	215,00	3,9565
	4	213,00	3,9133	-	-
4,0	1	473,00	1,2080	464,00	1,1542
	2	274,00	0,4569	273,00	0,4531
	3	213,00	3,9133	213,00	3,9565
5,0	1	464,00	1,2085	459,00	1,1758
	2	272,00	0,4647	271,00	0,4667
	3	208,00	3,9133	213,00	3,9133
6,0	1	463,00	1,2170	459,00	1,1790
	2	271,00	0,4650	270,00	0,4623
	3	210,00	3,9133	211,00	3,9133
7,0	1	463,00	1,2170	458,00	1,1775
	2	271,00	0,4692	271,00	0,4633
	3	210,00	3,7628	-	-



**Figura 4.4** - Espectro de Varredura de solução  $0,05 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de alaranjado de metila na presença e na ausência de  $\beta$ -ciclodextrina  $0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , temperatura  $25^\circ\text{C}$ , tampão citrato-fosfato dissódico, para os valores de pH entre 3 e 7.

**Tabela 4.5** – Absorvâncias da solução de Alaranjado de Metila (AM) na presença e na ausência de  $\beta$ -CD para os valores de pH entre 7,5 a 9.

pH	Pico	Ausência de $\beta$ -CD		Presença de $\beta$ -CD	
		$\lambda_{\text{máx}}$	Absorvância	$\lambda_{\text{máx}}$	Absorvância
7,5	1	464,00	1,2152	459,00	1,1758
	2	272,00	0,4481	271,00	0,4443
	3	202,00	3,1014	202,00	3,2148
8,0	1	464,00	1,2136	459,00	1,1790
	2	272,00	0,4473	271,00	0,4490
	3	206,00	3,2631	203,00	3,3113
8,5	1	463,00	1,2128	459,00	1,1758
	2	272,00	0,4476	271,00	0,4446
	3	205,00	3,3113	205,00	3,4362
9,0	1	464,00	1,2161	459,00	1,1735
	2	272,00	0,4482	271,00	0,4441
	3	209,00	3,5242	206,00	3,5242

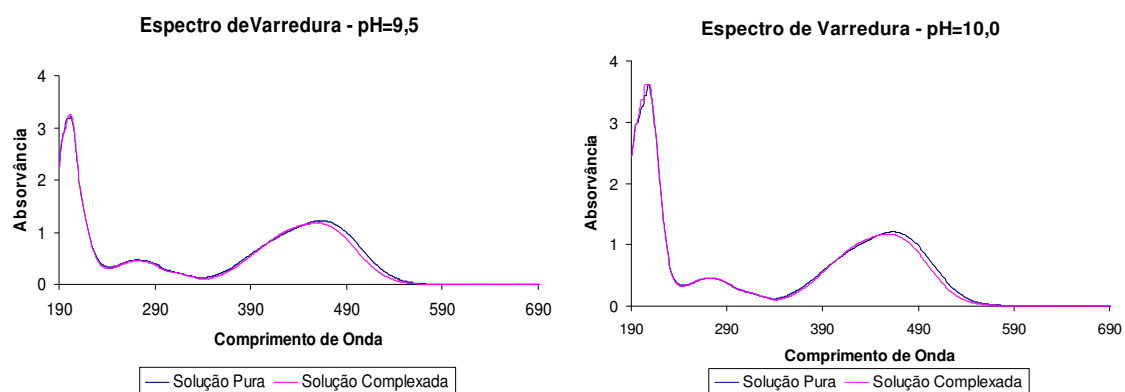


**Figura 4.5** - Espectro de Varredura de solução  $0,05 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de alaranjado de metila na presença e na ausência de  $\beta$ -ciclodextrina  $0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , temperatura  $25^\circ\text{C}$ , tampão Tris-HCl, para os valores de pH entre 7,5 e 9,0.



**Tabela 4.6** – Absorvâncias da solução de Alaranjado de Metila (AM) na presença e na ausência de  $\beta$ -CD para os valores de pH entre 9,5 e 10.

pH	Pico	Ausência de $\beta$ -CD		Presença de $\beta$ -CD	
		$\lambda_{\text{máx}}$	Absorvância	$\lambda_{\text{máx}}$	Absorvância
9,5	1	464,00	1,2203	459,00	1,1758
	2	272,00	0,4656	271,00	0,4476
	3	202,00	3,2148	202,00	3,2631
10,0	1	464,00	1,2094	458,00	1,1722
	2	272,00	0,4540	271,00	0,4536
	3	208,00	3,6123	205,00	3,6123



**Figura 4.6** - Espectro de Varredura de solução  $0,05 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de alaranjado de metila na presença e na ausência de  $\beta$ -ciclodextrina  $0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , temperatura  $25^\circ\text{C}$ , tampão carbonato-bicarbonato, para os valores de pH 9,5 e 10,0.

Pode-se observar a partir das figuras 4.1 a 4.6 e das tabelas 4.1 a 4.6 que para ambas as ciclodextrinas ( $\alpha$ -CD e  $\beta$ -CD) o comportamento foi muito semelhante, sendo que o pH 3,0 mostrou mais adequado para o trabalho de complexação, utilizando o tampão citrato-fosfato dissódico no comprimento de onda de 500 nm (Figuras 4.1 e 4.4), uma vez que nesse pH e comprimento de onda que verifica-se maiores diferenças entre os picos de absorvância na ausência e na presença da ciclodextrina. Quanto maior for a diferença entre estes picos de adsorção, mais sensível se torna o método colorimétrico para a detecção da CD. Para a  $\alpha$ -CD a diferença foi de cerca de 31% e para a  $\beta$ -CD foi de 18,6%, donde se conclui que houve a complexação entre os compostos e uma maior afinidade entre o corante AM e a  $\alpha$ -CD, o que justifica o uso do AM para a dosagem da  $\alpha$ -CD (MAKELA et al, 1988). A possível razão para o decréscimo na absorvância do alaranjado de metila ao

ser complexado, pode ser devido à diminuição na coplanaridade do corante causada pela conformação espacial restrita do AM, dentro das cavidades das CDs (YUEXIAN et al, 2005).

Os espectros das figuras apresentadas acima também mostram dois picos de absorção máxima, um entre 460-500 nm e outro entre 270-275 nm. O primeiro pode ser atribuído à forma tautômera do grupo azo e o segundo devido à forma tautômera do grupo amônia (TAWARAH & KHOURY, 2000).

As figuras 4.1 a 4.6 mostram também que houve um deslocamento no comprimento de onda máximo da solução de AM quando complexado com as ciclodextrinas, mostrando-se mais acentuado para a  $\alpha$ -CD que para a  $\beta$ -CD. As mudanças no espectro eletrônico da molécula hóspede, pela inclusão com CDs, são geralmente explicadas pelo efeito do ambiente em torno da molécula hóspede, também chamado de efeito solvente. Mas as mudanças que ocorrem com o AM, podem ter sido causadas por efeitos completamente diferentes, devido provavelmente à sobreposição de duas bandas referentes às formas monômerica e dimérica do AM (HIRAI et al, 1985).

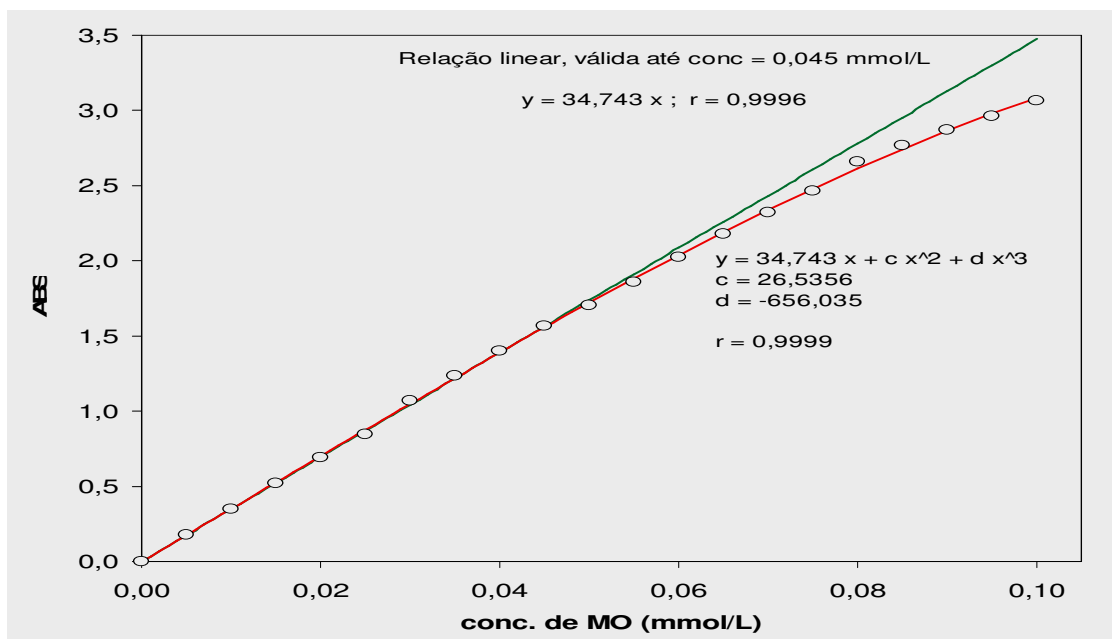
#### **4.1.2. Determinação do limite de linearidade de absorção da solução pura de alaranjado de metila**

Os dados para a determinação do limite de linearidade, seguindo o método proposto no procedimento 3.2.1.2, são apresentados na Tabela 4.7 e figura 4.7.

**Tabela 4.7** - Absorvância do Alaranjado de Metila em diferentes concentrações em tampão ácido cítrico-citrato de sódio pH 3, 0,05 mol L<sup>-1</sup>, no comprimento de onda de 500 nm.

Concentração de AM (x 10 <sup>3</sup> mol L <sup>-1</sup> )	Absorvância
0,00	0
0,005	0,177
0,010	0,348
0,015	0,521
0,020	0,692
0,025	0,847
0,030	1,072
0,035	1,234
0,040	1,402
0,045	1,565
0,050	1,707
0,055	1,856
0,060	2,027
0,065	2,181
0,070	2,323
0,075	2,466
0,080	2,659
0,085	2,767
0,090	2,872
0,095	2,96
0,100	3,068

A Figura 4.7, apresenta o limite de linearidade da absorção da solução de alaranjado de metila, nas condições realizadas nos procedimento 3.2.1.2.



**Figura 4.7** - Limite de linearidade da absorção da solução de alaranjado de metila (AM) em função da concentração, medido no comprimento de onda de 500 nm.

Como pode-se observar na Figura 4.7, a absorção da solução de alaranjado de metila demonstrou linearidade até a concentração de  $0,045 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , obtendo-se como ajuste:

$$ABS = 34,743 \cdot CONC , \quad R = 0,9996 \quad (4.1)$$

O valor limite de resposta linear da absorção em função da concentração foi utilizado como o limite máximo da concentração de AM para a realização dos testes seguintes, garantindo-se que as medidas de absorção refletiriam corretamente a concentração do corante livre.

#### 4.1.3. Cálculo da concentração de $\alpha$ -ciclodextrina na amostra e da constante de equilíbrio entre a $\alpha$ -CD:AM

Com os dados de absorvância em função da concentração de  $\alpha$ -CD (Tabela 4.8), utilizou-se a Equação (8.30) para a dosagem de  $\alpha$ -ciclodextrina e determinação dos parâmetros para cálculo da constante de equilíbrio, utilizando-se a Equação (8.32).

No caso da  $\alpha$ -ciclodextrina o máximo de concentração a ser considerada foi de  $0,75 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , pois foram realizados testes com maiores concentrações e verificou-se dispersão dos dados, o que poderia ocasionar falsos resultados.

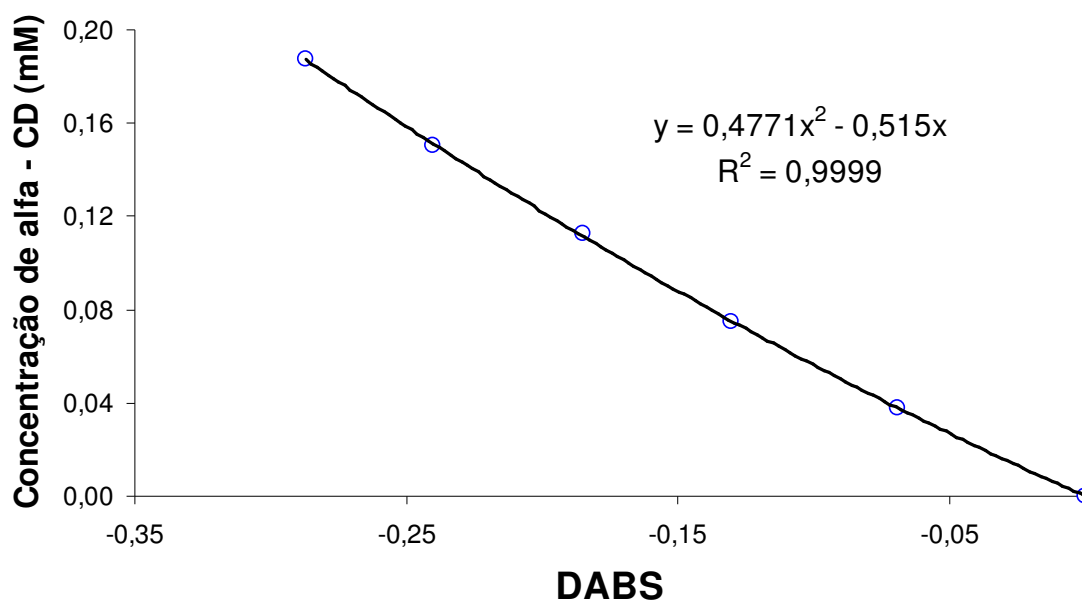
Os dados de absorvância das soluções de alaranjado de metila com a  $\alpha$ -CD são mostrados na tabela 4.8:

**Tabela 4.8** - Absorvâncias das soluções de alaranjado de metila com  $\alpha$ -CD, medidas a 500 nm pelo método colorimétrico, com o corante a 0,045 mM em tampão citrato 0,05 M, pH 3,0

Conc. $\alpha$ -CD na amostra (mmol/L)	ABS <sub>0</sub> = 1,474
	DABS
0,0000	0,000
0,0375	-0,069
0,0750	-0,130
0,1125	-0,185
0,1500	-0,240
0,1875	-0,287
0,2250	-0,323
0,2625	-0,357
0,3000	-0,401
0,3375	-0,421
0,3750	-0,444
0,4125	-0,481
0,4500	-0,493
0,4875	-0,510
0,5250	-0,521
0,5625	-0,541
0,6000	-0,560
0,6375	-0,575
0,6750	-0,590
0,7125	-0,600
0,7500	-0,615

Para o ajuste da Equação (8.30) aos dados experimentais da Tabela 4.8, foram utilizados os passos do procedimento de ajuste descritos no Anexo 8.1.

O ajuste linear na origem (**DABS** = 0, conc.  $\alpha$ -CD = 0), utilizado na 1ª etapa de obtenção da equação de ajuste, foi realizado com o auxílio do Microsoft EXCEL<sup>®</sup> tomando-se os sete primeiros pontos, ajustando-se um polinômio do 2º grau e tomando o coeficiente de x. Foi obtido  $C_{\alpha\text{-CD}} = -0.515 \text{ DABS mmol L}^{-1}$  (Figura 4.8), resultando  $\alpha = -0,515 \times 10^{-3} \text{ mol}_{\alpha\text{-CD}} \text{ L}^{-1} \text{ unidades de ABS}^{-1} \text{ cm}$ .



**Figura 4.8** - Ajuste do polinômio do 2º grau para a obtenção da aproximação linear na origem (**DABS** = 0, conc.  $\alpha$ -CD = 0), termo em x, da 1ª etapa da obtenção da curva padrão de dosagem da  $\alpha$ -CD, com o corante alaranjado de metila.

A segunda etapa do processo de ajuste fornece o limite superior de  $\Delta$ , diferença da absorção molar específica do corante livre e complexado,  $\Delta < -2330,1$  e a terceira  $\Delta < -13667$ , calculados como indicado no Anexo.

Na quarta etapa, o ajuste da Equação (8.30) foi realizado, usando-se o menor limite superior de  $\Delta$ ,  $\Delta < -13667$ , determinado na terceira etapa, como ponto de partida do ajuste. O valor ajustado para  $\Delta$  foi de  $\Delta = -22820,07$ .

Desta forma, substituindo-se os valores de  $\alpha$ ,  $\Delta$  e  $\alpha$  na Equação (8.30), obteve-se a equação da curva padrão AM: $\alpha$ -CD ajustada:

$$C_{\alpha\text{-CD}} = -\frac{DABS(0,052584 \cdot DABS + 0,52887)}{DABS + 1,0269} \quad R= 0,9994 \quad (4.2)$$

Com a etapa 6, utilizando-se as Equações 8.31 e 8.32, calcula-se a absorção molar específica do AM complexado nas condições do teste,  $\sigma$ , e a constante de equilíbrio de formação do complexo AM: $\alpha$ -CD,  $K_{\alpha\text{-CD}}$ , sendo  $ABS_0 = 1,474$  :

$$K_{\alpha\text{-CD}} = 4557,2 \text{ M}^{-1}$$

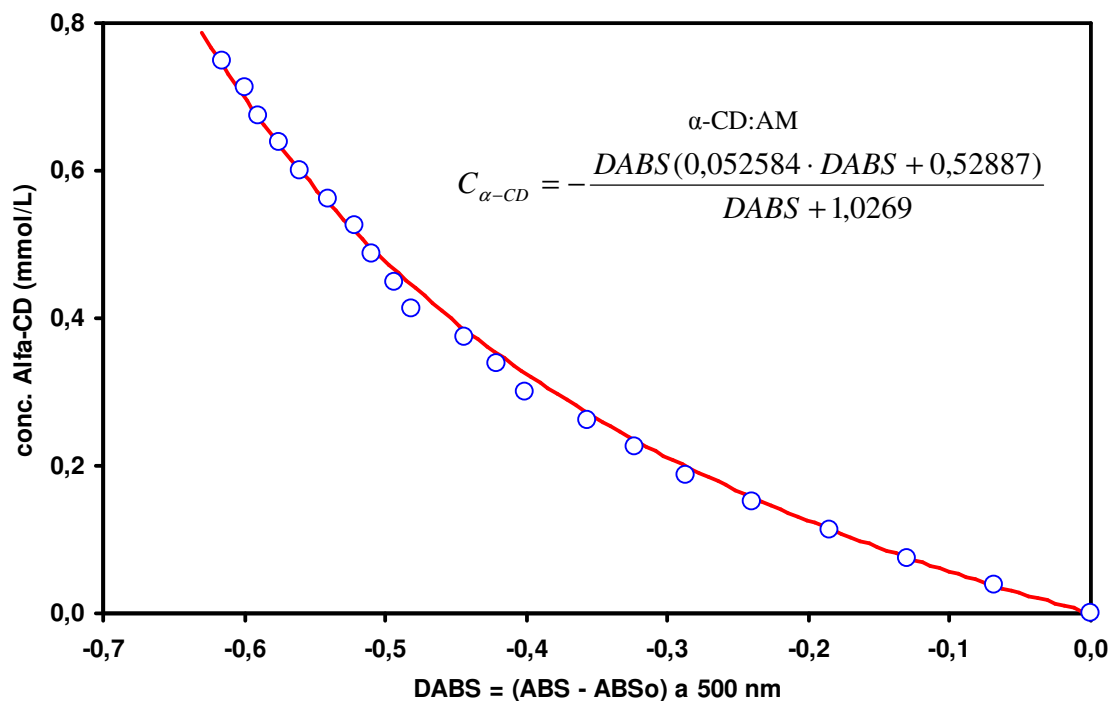
$$\sigma = 9934,86 \text{ unidades de ABS cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}_{\text{AM complexado}}$$

Enquanto,

$$\sigma_0 = 32775,56 \text{ unidades de ABS cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}_{\text{AM}}.$$

Logo, observa-se que a absorvância molar do corante AM diminui mais de um terço ao ser complexado.

A Figura 4.9 mostra o ajuste da Equação (8.30) aos dados experimentais da concentração de  $\alpha$ -CD em função da absorvância, plotados com o software EXCEL<sup>®</sup>:



**Figura 4.9** - Curva padrão para a dosagem da  $\alpha$ -CD com o corante alaranjado de metila, obtida pelo método da Teoria da Complexação. Condições: corante 0,045 mM, concentrações de  $\alpha$ -CD nas amostras, 0 – 0,75 mM, pH 3,0, tampão citrato 0,05 mol/L, pH 3,0, temperatura ambiente.

O ajuste obtido foi de excelente qualidade, como demonstra a Figura 4.9 e o valor da constante de equilíbrio de formação do complexo AM: $\alpha$ -CD,  $K_{\alpha-CD} = 4557,2 \text{ M}^{-1}$  foi muito maior que o obtido por YEUXICAN et al (2005) que obteve o valor de  $850 \text{ M}^{-1}$ . Acredita-se que o maior valor da constante de complexação seja devido ao tampão formado por ácido cítrico que ajuda a estabilizar a formação de complexos com ciclodextrinas (CASTILLO et al, 1999).

#### 4.1.4. Cálculo da concentração de $\beta$ -ciclodextrina na amostra e da constante de equilíbrio entre a $\beta$ -CD:AM

Com os dados de absorvância em função da concentração de  $\beta$ -CD (Tabela 4.9), utilizou-se a Equação (8.30) para a dosagem de  $\beta$ -ciclodextrina e a determinação dos parâmetros para cálculo da constante de equilíbrio de formação do complexo AM:  $\beta$ -CD.



No caso da  $\beta$ -ciclodextrina, o máximo de concentração de  $\beta$ -CD a ser considerada foi de  $6,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , pois assim como aconteceu com a  $\alpha$ -CD, foram realizados testes com maiores concentrações (até seu limite de solubilidade) e verificou-se dispersão dos dados, o que poderia comprometer os resultados das constantes calculadas.

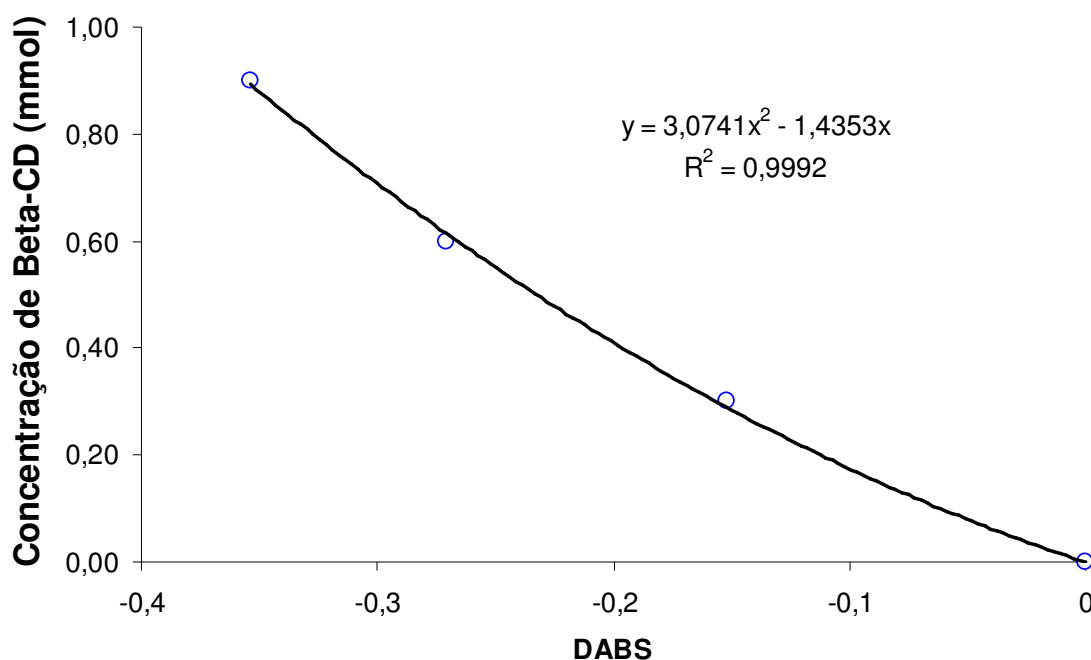
**Tabela 4.9** - Absorvâncias das soluções de alaranjado de metila com  $\beta$ -CD, medidas a 500 nm pelo método colorimétrico, com o corante a 0,045 mM em tampão citrato 0,05 M, pH 3,0

Conc. $\beta$ -CD na amostra (mmol/L)	<b>ABS<sub>0</sub> = 1,485</b>
	<b>DABS</b>
0,00	0,000
0,30	-0,152
0,60	-0,271
0,90	-0,354
1,20	-0,420
1,50	-0,473
1,80	-0,529
2,10	-0,561
2,40	-0,595
2,70	-0,617
3,00	-0,639
3,30	-0,659
3,60	-0,671
3,90	-0,684
4,20	-0,699
4,50	-0,715
4,80	-0,724
5,10	-0,732
5,40	-0,742
5,70	-0,751
6,00	-0,758

Para o ajuste da Equação (8.30) aos dados experimentais da Tabela 4.9, foram utilizados os mesmos passos do procedimento de ajuste para a  $\alpha$ -CD, Seção 4.1.3, descritos no Anexo.

O ajuste linear da primeira etapa foi realizado com o auxílio do Microsoft EXCEL<sup>®</sup>, sendo utilizados os quatro primeiros pontos até  $C_{\beta\text{-CD}} = 0,90 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  (Figura 4.10) para o ajuste do polinômio do 2º grau e, aproveitamento do termo em x. Obteve-se

$$\alpha = -1,4353 \text{ mmol}_{\beta\text{-CD}} \text{ L}^{-1} \text{ unidades de ABS}^{-1} \text{ cm.}$$



**Figura 4.10** - Ajuste do polinômio do 2º grau, para a obtenção da aproximação linear na origem ( $\text{DABS} = 0$ , conc.  $\beta\text{-CD} = 0$ ), termo em x, da 1ª etapa da obtenção da curva padrão de dosagem da  $\beta\text{-CD}$  com o corante alaranjado de metila.

A segunda etapa do processo de ajuste fornece o limite superior de  $\Delta$ ,  $\Delta < -836,1$  e a terceira  $\Delta < -16844$ .

Na quarta etapa, o ajuste da Equação (8.30) foi realizado, usando-se o menor limite superior de  $\Delta$ ,  $\Delta < -16844$ , determinado na terceira etapa, como ponto de partida do ajuste. O valor ajustado para  $\Delta$  foi de  $-20351,55$ .

Desta forma, substituindo-se os valores de  $\alpha$ ,  $\Delta$  e  $\alpha$  na Equação (8.30), obteve-se a equação da curva padrão AM: $\beta$ -CD ajustada:

$$C_{\beta-CD} = -\frac{DABS(0,058 \cdot DABS + 1,314)}{DABS + 0,916} \quad R= 0,9996 \quad (4.3)$$

Com a etapa 6, utilizando-se as Equações (8.31) e (8.32), calcula-se  $\sigma$  e a constante de equilíbrio de formação do complexo AM: $\beta$ -CD,  $K_{\beta-CD}$ , sendo  $ABS_0 = 1,485$  :

$$K_{\beta-CD} = 952,00 \text{ M}^{-1}$$

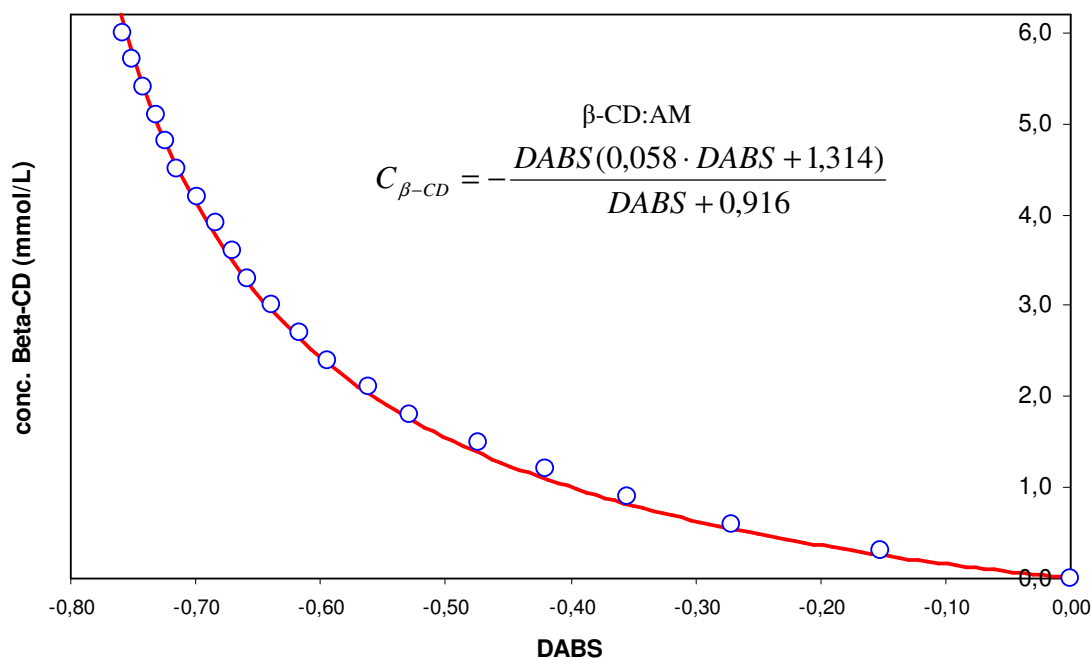
$$\sigma = 12.648,45 \text{ unidades de ABS cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}_{AM \text{ complexado}}$$

Enquanto,

$$\sigma_0 = 33.000 \text{ unidades de ABS cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}_{AM}.$$

Logo, observa-se que a absorvidade molar do corante AM, como no caso da  $\alpha$ -CD, diminui quase um terço ao ser complexado.

A Figura 4.11 mostra os dados experimentais ajustados de concentração de  $\beta$ -CD em função da absorvância, plotados com o software EXCEL<sup>®</sup> :



**Figura 4.11** - Curva padrão para a dosagem da  $\beta$ -CD com o corante alaranjado de metila, obtida pelo método da Teoria da Complexação Condições: corante 0,045 mM, concentrações, concentração de  $\beta$ -CD nas amostras, 0 – 6,0 mM, pH 3,0, tampão citrato 0,05 mol/L, pH 3,0, temperatura ambiente.

O ajuste obtido para a aplicação da Equação (8.30) à complexação da  $\beta$ -CD foi de excelente qualidade, como demonstra a Figura 4.11 e o valor da constante de equilíbrio de formação do complexo AM:  $\beta$ -CD,  $K_{\beta\text{-CD}} = 952,00 \text{ M}^{-1}$ , é da ordem de um quarto do valor obtido para a  $\alpha$ -CD,  $K_{\alpha\text{-CD}} = 4.557,2 \text{ M}^{-1}$ . Portanto, verifica-se que o corante alaranjado de metila possui mais afinidade pela  $\alpha$ -CD, como já havia sido constatado no testes para a determinação do pH ótimo para a complexação. Justifica-se este resultado pelo menor tamanho da cavidade da  $\alpha$ -CD, que pode acomodar de forma mais congruente a molécula do corante, em contraste com a maior cavidade da  $\beta$ -CD.

Outros valores de constante de equilíbrio entre as ciclodextrinas e o AM já foram encontrados, como  $26 \text{ mol L}^{-1}$  para o complexo 1:1 entre o AM: $\beta$ -CD, utilizando-se equação de Benesi-Hildebrand (HIRAI et al, 1985), e para o complexo entre o AM: $\alpha$ -CD foram obtidos o valor de  $850 \text{ M}^{-1}$ , onde o autor usou solução  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (para pH ácido) e verificou também que o aumento de temperatura diminuía o valor da constante de equilíbrio (YUEXIAN et al, 2005). Outro valor obtido para o complexo AM: $\alpha$ -CD a baixas temperaturas ( $16^\circ\text{C}$ ) e baixo pH (1,2) foi de  $7690 \text{ M}^{-1}$  (HIGUTI et al, 2004).

Os dados mostraram-se consistentes e também pelo método da Teoria da Complexação obtém-se a vantagem de permitir um ajuste de qualidade superior (isto é, maior coeficiente de correlação), bem como trabalhar com uma faixa de concentração mais ampla.

#### **4.2. SEGUNDA ETAPA - DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES DE EQUILÍBRIO DE FORMAÇÃO ENTRE A OLEUROPEÍNA E AS CICLODEXTRINAS.**

Nessa segunda fase do trabalho determinou-se a constante de equilíbrio de formação do complexo entre a oleuropeína e a  $\alpha$ -CD ou a  $\beta$ -CD.

#### 4.2.1. Obtenção dos espectros de absorção da solução de oleuropeína pura e complexada com $\beta$ -CD

Nesta etapa foram determinados os espectros de absorção das soluções puras e complexadas de oleuropeína com  $\beta$ -CD, para verificar se ocorriam diferenças nos picos de absorção. Os resultados são mostrados nas figuras 4.12 a 4.14.

Como pode ser constatado pela Figura 4.12 a  $\beta$ -CD pura não possui comprimento de onda com pico característico acima de 290 nm e dessa maneira não tem contribuição própria nos espectros de absorção de outras substâncias que possam interagir com ela.

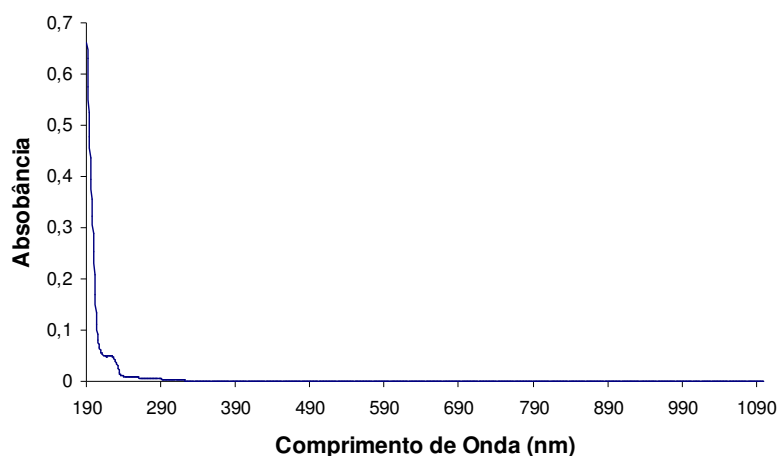


Figura 4.12 - Espectro de Varredura de solução aquosa  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\beta$ -CD

Na Figura 4.13 observa-se que a oleuropeína possui os picos mais característicos em 280 e 325 nm, com uma absorção de 2,799 e 0,5013 respectivamente.

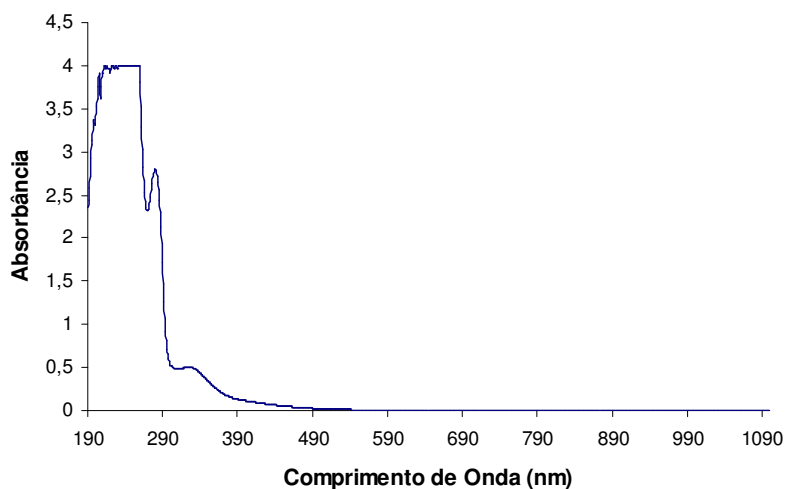
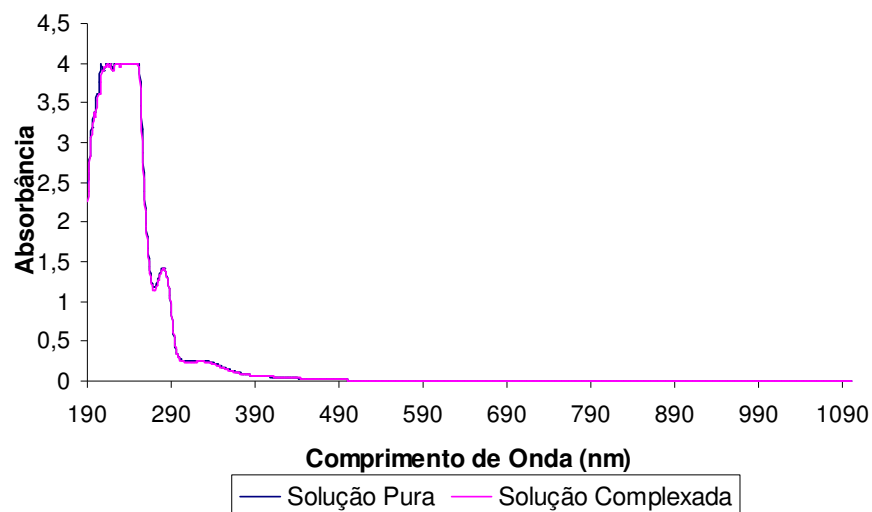


Figura 4.13 - Espectro de Varredura de solução aquosa  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de oleuropeína

Pela Figura 4.14, pode-se concluir que a adição de  $\beta$ -CD na solução de oleuropeína não provocou modificações no espectro de varredura da mesma, sendo dessa maneira necessário utilizar-se outro método para obtenção da constante de equilíbrio de formação do complexo entre estes compostos.

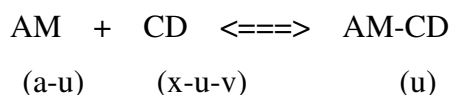


**Figura 4.14** – Espectro de varredura das soluções aquosas  $0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de oleuropeína pura e complexada com  $\beta$ -CD  $0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .

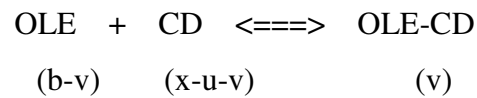
#### 4.2.2 Teoria da complexação entre a oleuropeína e as ciclodextrinas na presença do alaranjado de metila

A determinação da constante de formação do complexo da oleuropeína (OLE) com a ciclodextrina (CD) exigiu o desenvolvimento de uma nova equação teórica, baseada na Teoria da Complexação, que permitiu modelar a absorção de uma solução de alaranjado de metila (AM) na presença de OLE e da CD. Este modelo é uma extensão do modelo apresentado por WATANABE (2005) e WATANABE et. al (2005), sendo a principal diferença é que neste novo modelo a absorção do corante complexado não é nula, como era o caso anterior.

Assumiu-se a formação de dois complexos distintos do tipo 1:1, um apenas com o AM e a CD, e outro apenas com a OLE e a CD. A formação destes complexos foi modelada como duas reações reversíveis, em paralelo, que estão em equilíbrio termodinâmico na solução de dosagem.



(4.4)



onde:

$a$  = concentração total de alaranjado de metila em M;

$(a - u)$  = concentração de alaranjado de metila livre em M;

$b$  = concentração total da oleuropeína em M;

$(b - v)$  = concentração da oleuropeína livre em M;

$u$  = concentração do complexo ciclodextrina – alaranjado de metila em M;

$v$  = concentração do complexo ciclodextrina – oleuropeína em M.

$x$  = concentração total da ciclodextrina em M;

$(x - u - v)$  = concentração da ciclodextrina livre em M;

Estando a primeira reação de complexação na Equação (4.4) em equilíbrio, define-se a constante de equilíbrio termodinâmico ( $K_1$ ) de acordo com a Equação (4.5):

$$K_1 = \frac{u}{(a - u)(x - u - v)} \quad (4.5)$$

Onde  $K_1$  é a constante de complexação da  $\alpha$ -CD com OLE.

Da mesma forma, estando a segunda reação de complexação na Equação (4.4) em equilíbrio, define-se a constante de equilíbrio termodinâmica ( $K_2$ ) segundo a Equação (4.6):

$$K_2 = \frac{v}{(b - v)(x - u - v)} \quad (4.6)$$

onde  $K_2$  é a constante de complexação da oleuropeína com a  $\alpha$ -CD.

Em seguida, dividindo-se a Equação (4.5) pela Equação (4.6), resulta:

$$\frac{K_1}{K_2} = \frac{u(b - v)}{v(a - u)} \quad (4.7)$$

Isolando  $v$ :

$$v = \frac{u K_2 b}{K_1 (a - u) + u K_2} \quad (4.8)$$

Da Equação (4.5), isola-se  $x$ :

$$x = u \left( 1 + \frac{1}{K_1 (a - u)} \right) + v \quad (4.9)$$

Substitui-se a Equação (4.8) na (4.9):

$$x = u \left( 1 + \frac{1}{K_1 (a - u)} \right) + \frac{u K_2 b}{K_1 (a - u) + u K_2} \quad (4.10)$$

Rearranjando-se a Equação (4.10) obtém-se:

$$x = u \left( 1 + \frac{1}{K_1 (a - u)} + \frac{K_2 b}{K_1 (a - u) + u K_2} \right) \quad (4.11)$$

Assumindo que tanto o AM livre como o AM complexado (AM:CD) contribuem para a absorção, tem-se:

$$ABS = \sigma_0 * (\text{conc. AM livre não complexado}) + \sigma * (\text{conc. AM complexado})$$

$$\text{absorção molar específica do corante livre} = \sigma_0 = ABS_0/a$$

$$\text{absorção molar específica do corante complexado} = \sigma$$

$$\text{Diferença de absorção molar específica do AM livre e complexado: } \Delta = \sigma - \sigma_0 \rightarrow$$

$\sigma = \sigma_0 + \Delta \rightarrow \sigma = \frac{ABS_0}{a} + \Delta$ . Note que, no caso da absorvância reduzir após a complexação,  $\Delta$  é negativo.

$$\text{Então: } ABS = \sigma_0 (a - u) + \sigma \cdot u$$

Substituindo  $\sigma_0$ :

$$ABS = \frac{ABS_0}{a} (a - u) + \sigma u$$

$$ABS = \frac{ABS_0}{a} (a - u) + \left( \frac{ABS_0}{a} + \Delta \right) u$$

$$ABS = ABS_0 + \Delta u \quad , \text{ ou, } ABS - ABS_0 = \Delta u$$

$$ABS - ABS_0 = DABS$$

Obtém-se o valor de u:

$$u = \frac{DABS}{\Delta} \quad (4.12)$$

Substitui-se u da Equação (4.12) na Equação (4.11):



$$x = \left( \frac{DABS}{\Delta} \right) \left( 1 + \frac{1}{K_1 \left( a - \frac{DABS}{\Delta} \right)} + \frac{K_2 b}{K_1 \left( a - \frac{DABS}{\Delta} \right) + \frac{DABS}{\Delta}} \right) \quad (4.13)$$

A Equação (4.13) correlaciona x (concentração total de CD) em função de (a, b, K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>, Δ, DABS), sendo que são conhecidos (a, b, K<sub>1</sub>, Δ), ficando a constante K<sub>2</sub> a ser determinada por ajuste não-linear.

#### 4.2.2.1. Cálculo da concentração de α-CD na amostra e da constante de equilíbrio entre a oleuropeína e a α-CD

A partir dos procedimentos realizados na Seção 3.2.2.2, obteve-se os dados da curva de complexação entre o alaranjado de metila e a α-CD na presença do complexo da oleuropeína com a α-CD, e com os valores de absorvância em função da concentração de α-CD (Tabela 4.10), utilizou-se a Equação (4.13) para o cálculo da concentração de α-ciclodextrina e determinação dos parâmetros para a avaliação da constante de equilíbrio.

No caso da α-ciclodextrina o máximo de concentração a ser considerada foi de 3,75 x 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>.

**Tabela 4.10** - Determinação da absorção espectrofotométrica de soluções de AM na presença de  $\alpha$ -CD. A concentração do AM na cubeta foi  $0,045 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , e da oleuropeína foi  $0,75 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , para todos os pontos.

<b>Conc. <math>\alpha</math>-CD (mmol/L)</b>	<b>DABS</b>
0.000	0
0,1875	-0,06
0,3750	-0,114
0,5625	-0,18
0,7500	-0,221
0,9375	-0,272
1,1250	-0,317
1,3125	-0,363
1,500	-0,409
1,6875	-0,429
1,8750	-0,44
2,0625	-0,466
2,250	-0,492
2,4375	-0,506
2,6250	-0,523
2,8125	-0,554
3,000	-0,566
3,1875	-0,584
3,3750	-0,595
3,5625	-0,606
3,7500	-0,623

O ajuste não-linear da Equação (4.13) aos dados mostrados na Tabela 4.10, foi realizado com o auxílio do Solver do Microsoft Excel®.

A equação utilizada no ajuste foi a Equação (4.14), a qual contém o fator de 2000, referente à diluição de duas vezes da solução de  $\alpha$ -CD na cubeta e a conversão da concentração de  $\alpha$ -CD da M para mM.

$$C_{\alpha\text{-CD}} = 2000 \left( \frac{DABS}{\Delta} \right) \left( 1 + \frac{1}{K_1 \left( a - \frac{DABS}{\Delta} \right)} + \frac{K_2 b}{K_1 \left( a - \frac{DABS}{\Delta} \right) + \frac{DABS}{\Delta} K_2} \right) \quad (4.14)$$

Onde:

$a$  = concentração total do corante na cubeta em mol L<sup>-1</sup>, (0,045 x 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>);

ABS = absorção de cada ponto da curva no comprimento de onda de 500 nm;

ABS<sub>0</sub> = absorção do ponto de concentração zero de  $\alpha$ -CD;

$b$  = concentração total de oleuropeína em mol L<sup>-1</sup>, (0,75 x 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>);

$C_{\alpha\text{-CD}}$  = concentração da  $\alpha$ -CD na amostra, em mM;

DABS = ABS – ABS<sub>0</sub>;

$K_1$  = constante de equilíbrio entre o Alaranjado de Metila e a  $\alpha$ -CD, (4557,2 M<sup>-1</sup>);

$K_2$  = constante de equilíbrio entre a oleuropeína e a  $\alpha$ -CD;

$\Delta = \sigma - ABS_0 / a = \sigma - \sigma_0$ , (22820,07);

$\sigma_0$  = absorção molar específica do corante alaranjado de metila;

$\sigma$  = absorção molar específica do corante complexado com a  $\alpha$ -CD;

Dessa forma, substituindo-se os valores de  $a$ ,  $b$ ,  $K_1$  e  $\Delta$  na Equação (4.14), obtém-se a equação ajustada para a complexação simultânea AM: $\alpha$ -CD e OLE: $\alpha$ -CD:

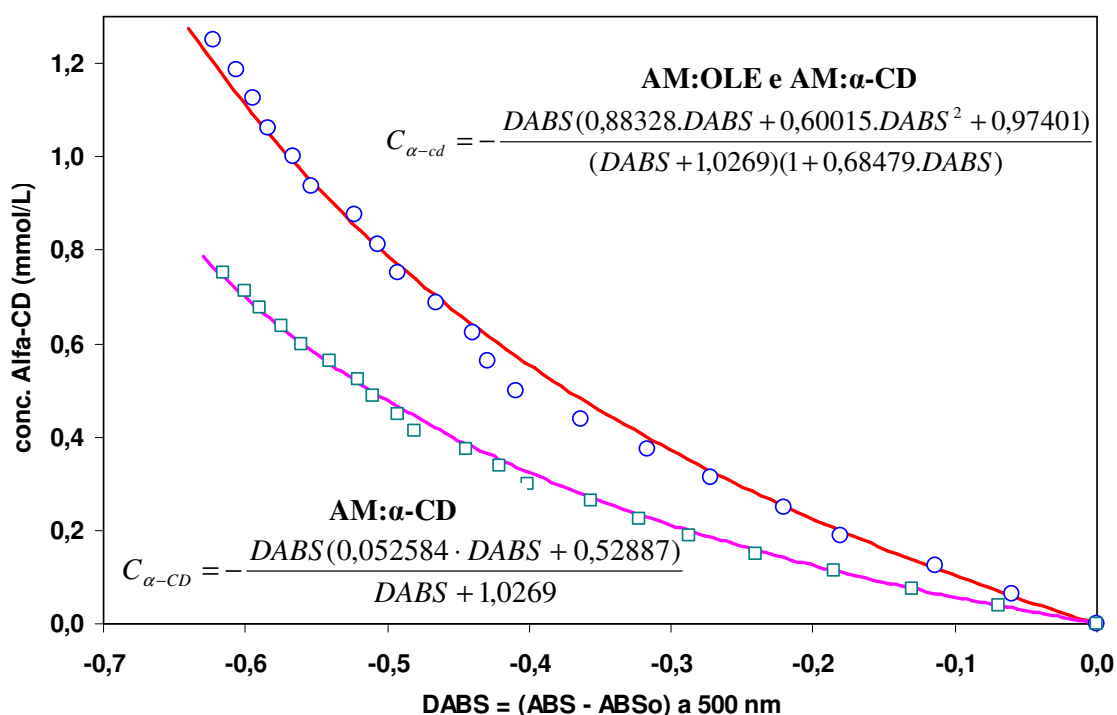
$$C_{\alpha\text{-cd}} = - \frac{DABS(0,88328 \cdot DABS + 0,60015 \cdot DABS^2 + 0,97401)}{(DABS + 1,0269)(1 + 0,68479 \cdot DABS)} \quad (4.15)$$

sendo o valor da constante de equilíbrio de formação do complexo entre a oleuropeína e a  $\alpha$ -CD:

$$K_2 = 1352,4 \text{ M}^{-1}$$

$$R = 0,9975$$

A Figura 4.15 mostra a relação entre as curvas para o cálculo de  $K_1$  (alaranjado de metila:  $\alpha$ -CD) e de  $K_2$  (oleuropeína:  $\alpha$ -CD).



**Figura 4.15** - Comparação dos dados de complexação do corante alaranjado de metila (AM) com alfa-ciclodextrina ( $\alpha$ -CD), na ausência (o) e na presença (□) de oleuropeína (OLE). Condições: temperatura ambiente, tampão citrato 0,05 mol/L, pH 3,0. A concentração do AM na cubeta foi  $4,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  e da OLE foi  $7,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .

#### 4.2.2.2. Cálculo da concentração de $\beta$ -CD na amostra e da constante de equilíbrio entre a oleuropeína e a $\beta$ -CD

Com os dados de absorvância em função da concentração de  $\beta$ -CD (Tabela 4.11), utilizou-se a Equação (4.16) para o cálculo da concentração de  $\beta$ -ciclodextrina e determinação dos parâmetros para o cálculo da constante de equilíbrio.

No caso da  $\beta$ -ciclodextrina o máximo de concentração a ser considerada foi de  $10,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .

**Tabela 4.11** - Determinação da absorção espectrofotométrica de soluções de AM em mistura com  $\beta$ -CD. A concentração da AM na cubeta foi  $0,045 \times 10^3 \text{ mol L}^{-1}$ , e da oleuropeína foi  $0,75 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , para todos os pontos.

<b>Conc. <math>\beta</math>-CD (mmol/L)</b>	<b>DABS</b>
0,00	1,522
0,50	1,39
1,00	1,29
1,50	1,202
2,00	1,143
2,50	1,077
3,00	1,011
3,50	0,975
4,00	0,945
4,50	0,917
5,00	0,892
5,50	0,868
6,00	0,856
6,50	0,837
7,00	0,829
7,50	0,807
8,00	0,796
8,50	0,788
9,00	0,774
9,50	0,77
10,0	0,748

O ajuste da Equação (4.16) aos dados da Tabela 4.11, foi realizado com o auxílio do Microsoft Excel®.

A equação utilizada no ajuste foi a Equação (4.16), a qual contém o fator de 2000, referente à diluição de duas vezes da solução de β-CD na cubeta e a conversão da concentração de β-CD da M para mM.

$$C_{\beta-CD} = 2000 \left( \frac{DABS}{\Delta} \right) \left( 1 + \frac{1}{K_1 \left( a - \frac{DABS}{\Delta} \right)} + \frac{K_2 b}{K_1 \left( a - \frac{DABS}{\Delta} \right) + \frac{DABS}{\Delta} K_2} \right) \quad (4.16)$$

Onde:

$a$  = concentração total do corante na cubeta em mol L<sup>-1</sup>, (0,045 x 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>);

ABS = absorção de cada ponto da curva no comprimento de onda de 500 nm;

ABS<sub>0</sub> = absorção do ponto de concentração zero de β-CD;

$b$  = concentração total de oleuropeína em mol L<sup>-1</sup>, (0,75 x 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>);

$C_{\beta-CD}$  = concentração da β-CD na amostra, em mM;

DABS = ABS – ABS<sub>0</sub>;

$K_1$  = constante de equilíbrio entre o Alaranjado de Metila e a β-CD, (952,00 M<sup>-1</sup>);

$K_2$  = constante de equilíbrio entre a Oleuropeína e a β-CD;

$\Delta = \sigma - ABS_0/a = \sigma - \sigma_0$ , (20351,55);

$\sigma_0$  = absorção molar específica do corante alaranjado de metila;

$\sigma$  = absorção molar específica do corante complexado com a β-CD;

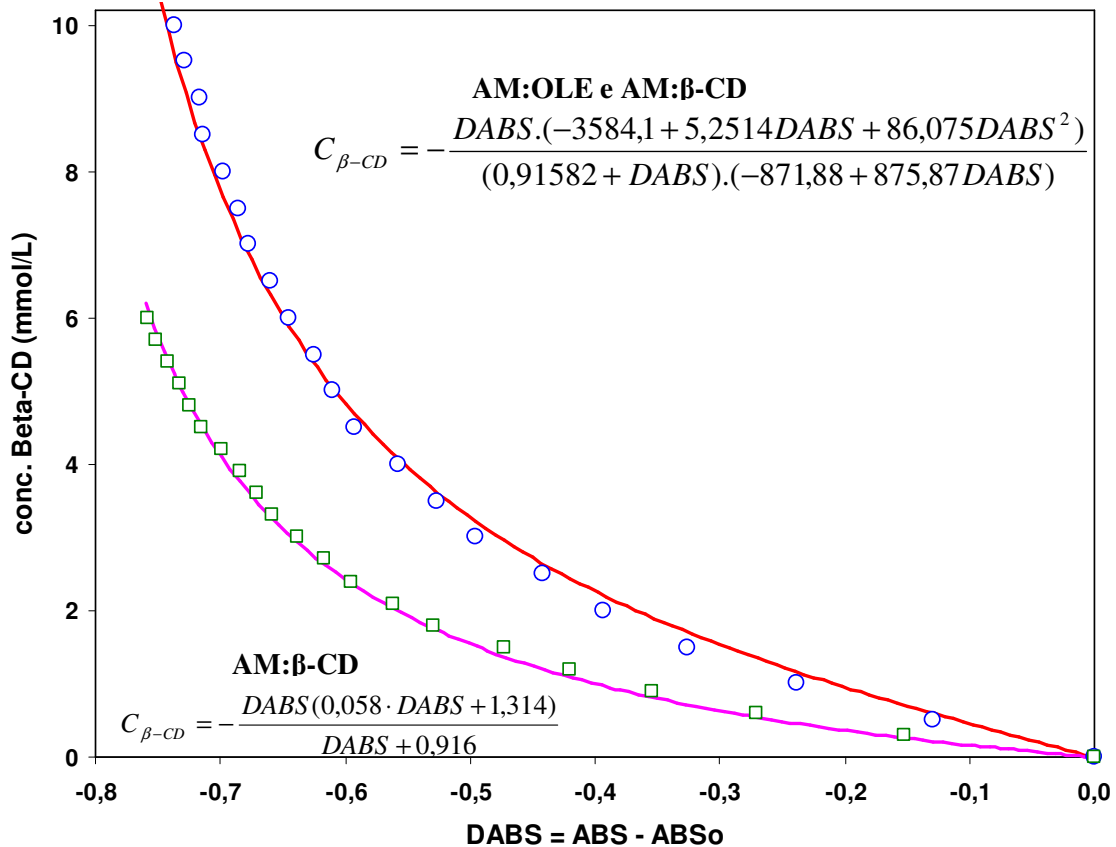
Dessa forma substituindo os valores de  $a$ ,  $b$ ,  $K_1$  e  $\Delta$  na Equação (4.16), obtemos a Equação da AM: OLE: β-CD, ajustada (4.17):

$$C_{\beta-CD} = - \frac{DABS \cdot (-3584,1 + 5,2514 \cdot DABS + 86,075 \cdot DABS^2)}{(0,91582 + DABS) \cdot (-871,88 + 875,87 \cdot DABS)} \quad (4.17)$$

sendo o valor da constante ( $K_2$ ) entre a Oleuropeína e a β-CD:

$$K_2 = 1827,89 \text{ M}^{-1} \qquad R=0,9991$$

A Figura 4.16 mostra a relação entre as curvas para o calculo de  $K_1$  (alaranjado de metila: β-CD) e de  $K_2$  (oleuropeína: β-CD).



**Figura 4.16** - Comparação dos dados de complexação do corante alaranjado de metila (AM) com beta-ciclodextrina ( $\beta$ -CD), na ausência (o) e na presença (□) de oleuropeína (OLE). Condições: temperatura ambiente, tampão citrato 0,05 mol/L, pH 3,0. A concentração do AM na cubeta foi  $4,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  e da OLE foi  $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .

A constante de complexação entre a  $\beta$ -CD e um extrato de folhas de oliveira (rico em oleuropeína, cerca de 90,2%) foi calculado pelo método de HIGUCHI & CONNORS (1965) por KARATHANOS et al (2007). Pelos diagramas de solubilidades de fase, os autores obtiveram um gráfico do tipo  $A_L$ , com uma estequiometria do tipo 1:1, uma constante de equilíbrio no valor de  $300 \text{ M}^{-1}$  e um aumento na solubilidade de 50%. Esse foi um dos primeiros trabalhos envolvendo o cálculo da constante de equilíbrio entre a oleuropeína e a  $\beta$ -CD, mas o método de HIGUCHI & CONNORS utiliza uma quantidade de oleuropeína muito grande (para cada ponto são necessários cerca de 100 mg de oleuropeína) para um produto que é de difícil obtenção e de elevado custo. Por isso, surgiu o interesse, nesta dissertação, de se desenvolver o método colorimétrico e a sua modelagem matemática, que utiliza corantes para determinação da constante de equilíbrio

de uma terceira substância, que não pode ser utilizada sozinha com as CDs, porque não sofre alteração no seu espectro de varredura, quando misturada com a solução de CD.

O fato da oleuropeína se ligar mais fortemente à  $\beta$ -CD, pode estar associado principalmente, ao tamanho da cavidade da ciclodextrina em questão.

Essa diferença nos valores obtidos no experimento com os da literatura podem ser explicados principalmente pela sensibilidade do método de análise e algumas condições próprias do experimento como pH, temperatura e outros fatores que influenciam nas constantes termodinâmicas.

Pode-se destacar pelos dados obtidos que é possível e relativamente fácil, a determinação da constante de complexação de uma substância que não sofre alterações no seu espectro de absorção ao ser complexada, empregando-se o método descrito neste trabalho, que consiste no uso de um corante que também competirá pela molécula complexante, mas que por sua vez, sofre alteração no seu espectro de absorção, e desta forma revela a quantidade de complexo formado com a primeira molécula, permitindo assim, calcular-se por meio da Teoria da Complexação, a constante de formação do complexo da primeira substância.

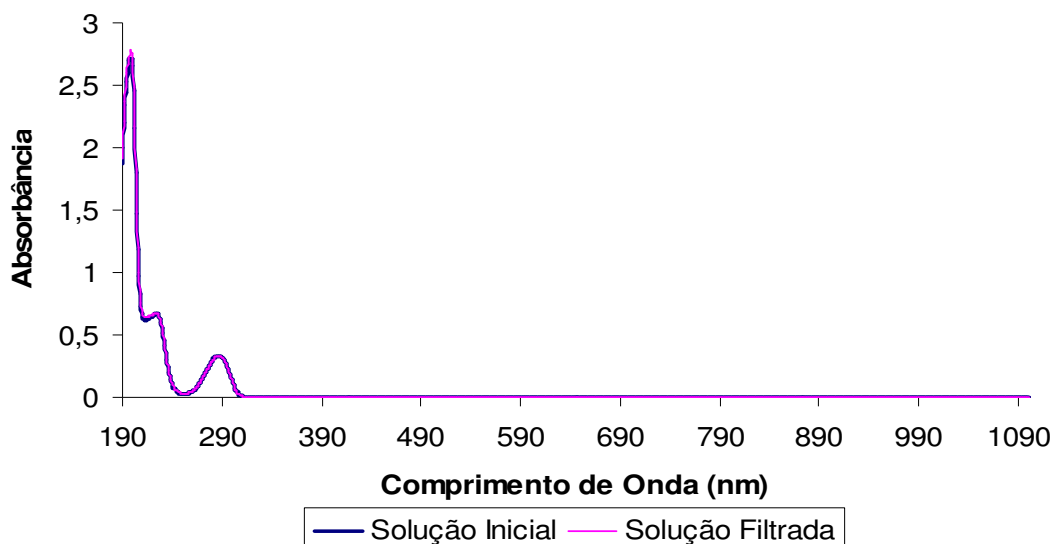
### **4.3. TERCEIRA ETAPA - DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE EQUILÍBRIO DE FORMAÇÃO ENTRE O BHA E AS CICLODEXTRINAS**

Esta etapa do trabalho teve por meta a determinação da constante de equilíbrio de formação do complexo entre a  $\alpha$ -CD ou  $\beta$ -CD com o butil hidroxianisol (BHA), empregando-se o método de HIGUCHI & CONNORS (1965).

#### **4.3.1. Determinação do comprimento de onda máximo da solução aquosa de BHA**

Para os próximos procedimentos fez-se necessário conhecer o comprimento de onda de máxima absorção da solução aquosa de BHA e como não se conhecia sua solubilidade em água, o teste foi realizado para a solução antes e depois de filtrada, para verificar se ocorriam diferenças significativas no espectro de varredura (Seção 3.2.3.1). O resultado do ensaio para a determinação da máxima absorção é mostrado na figura 4.17.





**Figura 4.17** - Espectro de varredura da solução aquosa de BHA  $0,02 \text{ g L}^{-1}$ . Temperatura  $25^\circ\text{C}$  e pH 6,5.

Na Figura 4.17, constata-se que praticamente não houve diferença entre os dois espectros e pela Tabela 4.12, confirma-se que houve uma diferença mínima, mas nada que poderia comprometer os próximos experimentos.

**Tabela 4.12** - Dados de absorvância da solução aquosa de BHA

Pico	Solução Inicial		Solução Filtrada	
	Comprimento de Onda	Absorvância	Comprimento de Onda	Absorvância
1	287,00	0,3350	286,00	0,3324
2	225,00	0,6719	225,00	0,6768
3	198,00	2,7102	199,00	2,7830

Utilizando-se então do comprimento de onda em 287 nm e sua respectiva absorvância, foi obtida a Equação (4.18), que relaciona a concentração de BHA com a absorvância da solução, e que será utilizada para a obtenção dos resultados nos ensaios seguintes.

**Dados:**

- Absorvância de  $0,02 \text{ g/L}$  de BHA lida no espectro de onda máximo ( $\sigma$ ): 0,3350
- Comprimento de onda máximo ( $\lambda$ ): 287 nm
- Concentração do BHA:  $0,02 \text{ g L}^{-1}$

$$C_{\text{BHA}} = 0,0597 \times \text{Abs} \times \text{Dil} \quad (4.18)$$

Onde:

Abs: Absorvância da amostra

BHA: Butil Hidroxianisol

$C_{\text{BHA}}$ : Concentração do BHA ( $\text{g L}^{-1}$ )

Dil: Diluição da amostra

#### 4.3.2. Determinação da solubilidade da solução aquosa de BHA

Com os dados de absorvância realizados segundo o procedimento da subseção (3.2.3.2) e utilizando-se da Equação (4.18), o valor da solubilidade do BHA foi determinado, obtendo-se  $0,1415 \text{ g L}^{-1}$ , pois:

$$C_{\text{BHA}} = 0,0597 \times \text{Abs} \times \text{Dil}$$

$$C_{\text{BHA}} = 0,0597 \times 2,370 \times 1$$

$$C_{\text{BHA}} = 0,1415 \text{ g L}^{-1}$$

#### 4.3.3. Influência das ciclodextrinas sobre o espectro de varredura da solução de BHA

Nesta etapa, foi verificado se a adição de  $\alpha$ -CD ou  $\beta$ -CD, influenciava o espectro de varredura da solução de BHA com o passar do tempo, já que no procedimento seguinte as amostras de BHA ficaram em contato com uma destas CDs por aproximadamente cinco dias.

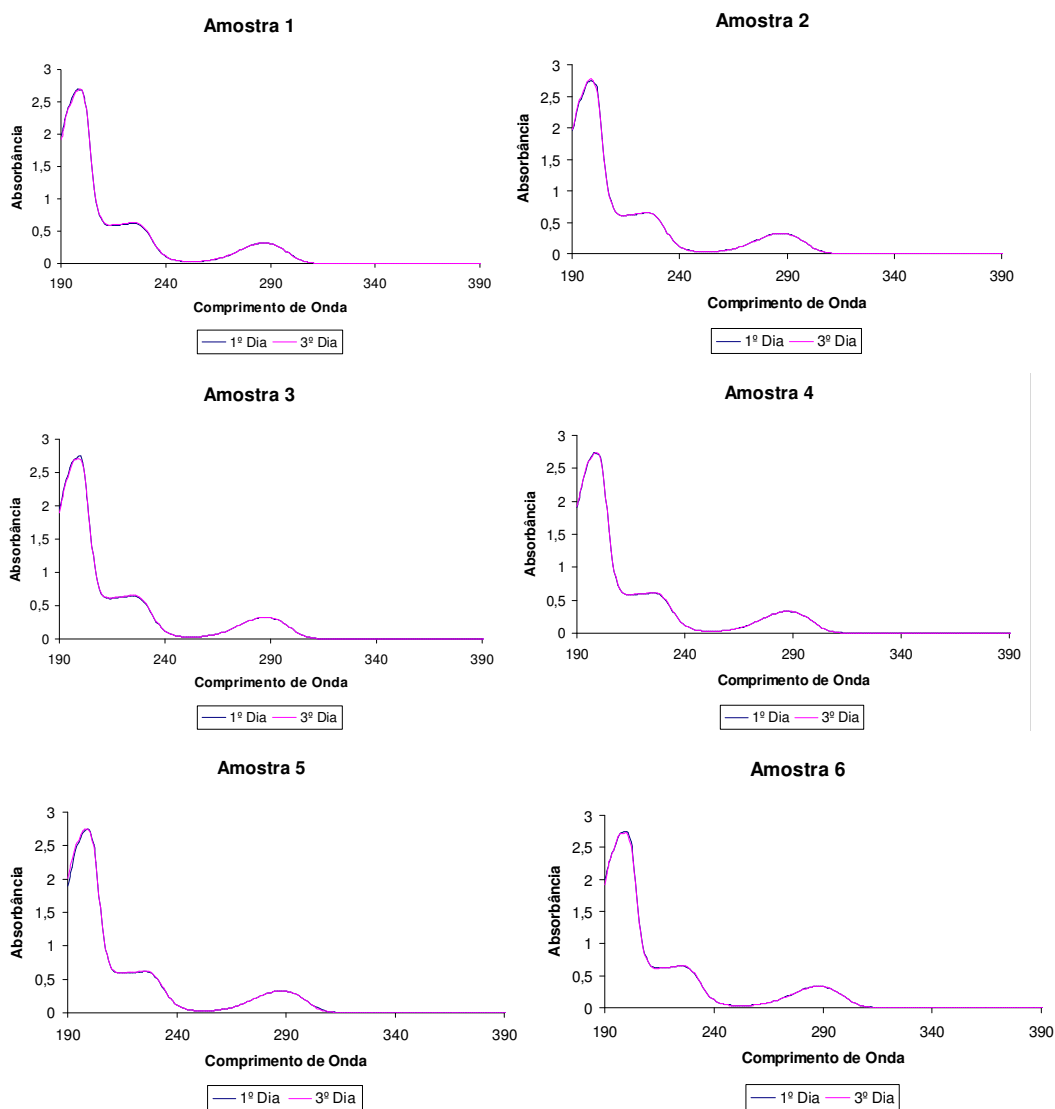
Muitas substâncias, após inclusão em ciclodextrinas, sofrem mudanças em suas propriedades físico-químicas, que podem se refletir no espectro de absorção UV/Visível, causando modificações nos comprimentos de onda ou aumento/diminuição do pico de absorção máxima. Estas modificações são, muitas vezes, similares ao efeito causado por solventes de diferentes polaridades, sugerindo que a molécula complexada foi transferida de um meio polar para a cavidade apolar das ciclodextrinas. Essas mudanças podem ser causadas por perturbação da nuvem eletrônica da molécula complexada - causada pela

interação direta com as CD, pela exclusão de moléculas de água da cavidade ou por uma combinação desses dois efeitos (BEKERS et al, 1991).

Foram feitas as varreduras no primeiro dia de preparação da amostra e após três dias do mesmo. Os testes foram realizados na presença de  $\alpha$ -CD (Figura 4.18 ) e para a  $\beta$ -CD (Figura 4.19).

#### 4.3.3.1. Complexação do BHA com a $\alpha$ -ciclodextrina:

A figura 4.18 e a tabela 4.13 mostram os resultados para a formação do complexo entre o BHA e a  $\alpha$ -CD, para diferentes concentrações de amostras (tabela 3.1).



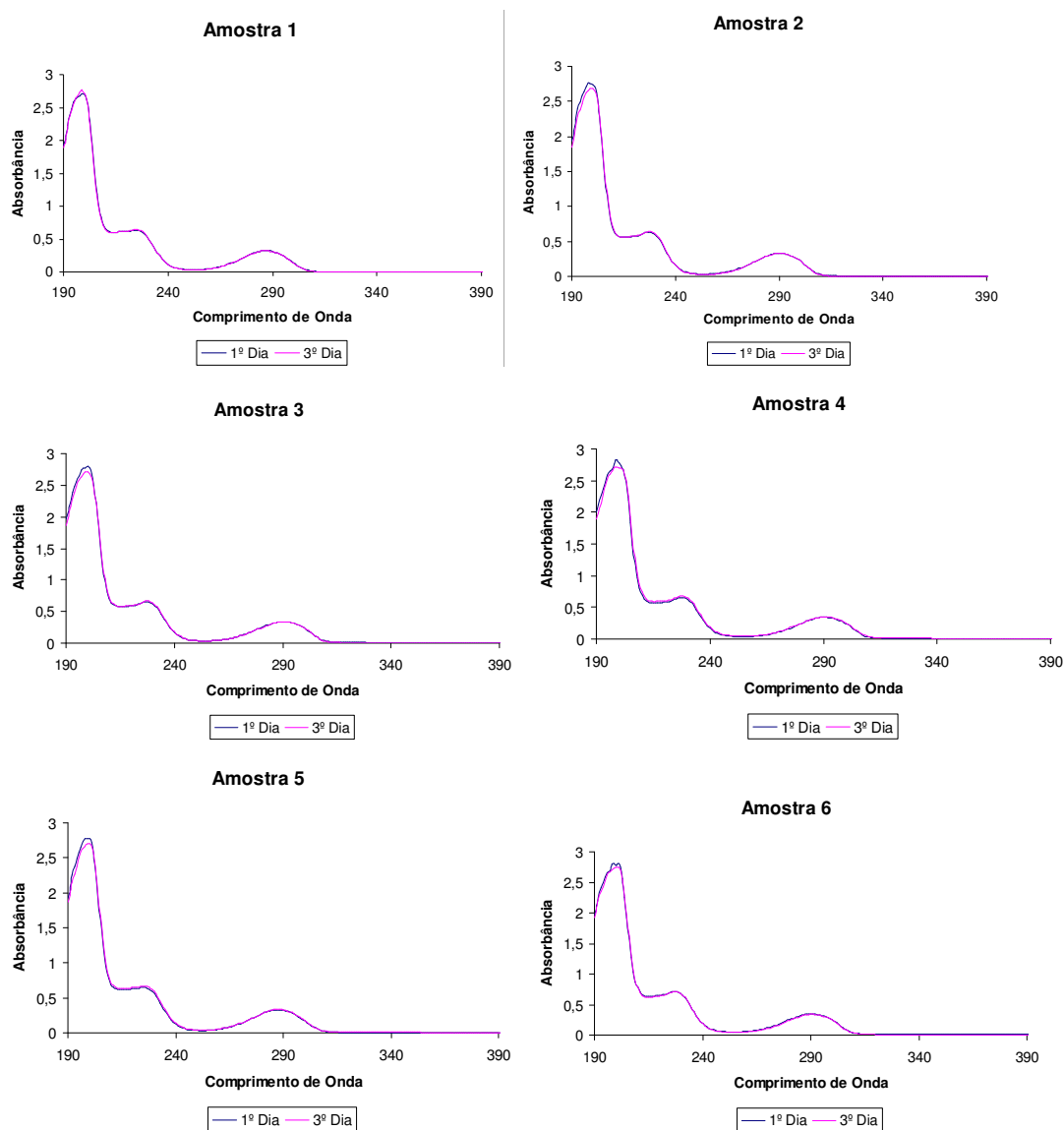
**Figura 4.18** - Influência da  $\alpha$ -CD na absorvância de uma solução de BHA. Temperatura de 25°C. A composição de cada amostra é mostrada na tabela 3.1.

**Tabela 4.13** – Dados de absorvância da solução de BHA na presença da  $\alpha$ -CD para as diferentes amostras.

Amostra	Pico	Inicial - 1º Dia		Final – 3º Dia	
		$\lambda_{\text{máx}}$	Absorvância	$\lambda_{\text{máx}}$	Absorvância
1	1	287,00	0,3184	287,00	0,3209
	2	225,00	0,6234	225,00	0,6400
	3	198,00	2,6963	199,00	2,6963
2	1	287,00	0,3247	287,00	0,3229
	2	225,00	0,6472	225,00	0,6522
	3	199,00	2,7520	199,00	2,7830
3	1	287,00	0,3292	287,00	0,3298
	2	225,00	0,6505	225,00	0,6608
	3	200,00	2,7520	199,00	2,7102
4	1	287,00	0,3306	288,00	0,3311
	2	225,00	0,6097	226,00	0,6165
	3	198,00	2,7372	199,00	2,7372
5	1	288,00	0,3292	288,00	0,3293
	2	226,00	0,6177	226,00	0,6279
	3	199,00	2,7520	198,00	2,7520
6	1	288,00	0,3342	288,00	0,3333
	2	225,00	0,6509	226,00	0,6545
	3	199,00	2,7520	200,00	2,7231

#### 4.3.3.2. Complexação do BHA com a $\beta$ -ciclodextrina:

A figura 4.19 e a tabela 4.14 mostram os resultados para a formação do complexo entre o BHA e a  $\beta$ -CD, para diferentes concentrações de amostras (tabela 3.1).



**Figura 4.19** - Influência da  $\beta$ -CD na absorvância de uma solução de BHA. Temperatura de 25°C. A composição de cada amostra é mostrada na tabela 3.1.

**Tabela 4.14** – Dados de absorvância da solução de BHA na presença da  $\beta$ -CD para as diferentes amostras.

Amostra	Pico	Inicial - 1º Dia		Final – 3º Dia	
		$\lambda_{\text{máx}}$	Absorvância	$\lambda_{\text{máx}}$	Absorvância
1	1	287,00	0,3230	287,00	0,3218
	2	225,00	0,6338	225,00	0,6410
	3	199,00	2,7102	199,00	2,7682
2	1	290,00	0,3350	290,00	0,3322
	2	227,00	0,6376	228,00	0,6438
	3	198,00	2,7668	199,00	2,6833
3	1	290,00	0,3416	290,00	0,3396
	2	227,00	0,6554	228,00	0,6669
	3	200,00	2,7992	199,00	2,7092
4	1	290,00	0,3425	290,00	0,3480
	2	228,00	0,6527	228,00	0,6768
	3	199,00	2,8341	199,00	2,7231
5	1	287,00	0,3322	288,00	0,3369
	2	225,00	0,6439	226,00	0,6671
	3	198,00	2,7668	198,00	2,6963
6	1	290,00	0,3500	291,00	0,3425
	2	227,00	0,7180	227,00	0,7118
	3	201,00	2,8167	200,00	2,7520

Como se pode verificar pelos gráficos das Figuras 4.18 a 4.19, a adição tanto de  $\alpha$ -CD quanto de  $\beta$ -CD, não ocasionou mudanças significativas com o tempo, no espectro de varredura das soluções de BHA, demonstrando que não houve precipitação de complexo. ZIA et. al (2001) comenta que são raras as vezes que se podem encontrar mudanças detectáveis nas medidas de absorvâncias em espectro UV-VIS para princípios ativos na forma de complexo, mas elas podem ocorrer em alguns casos.

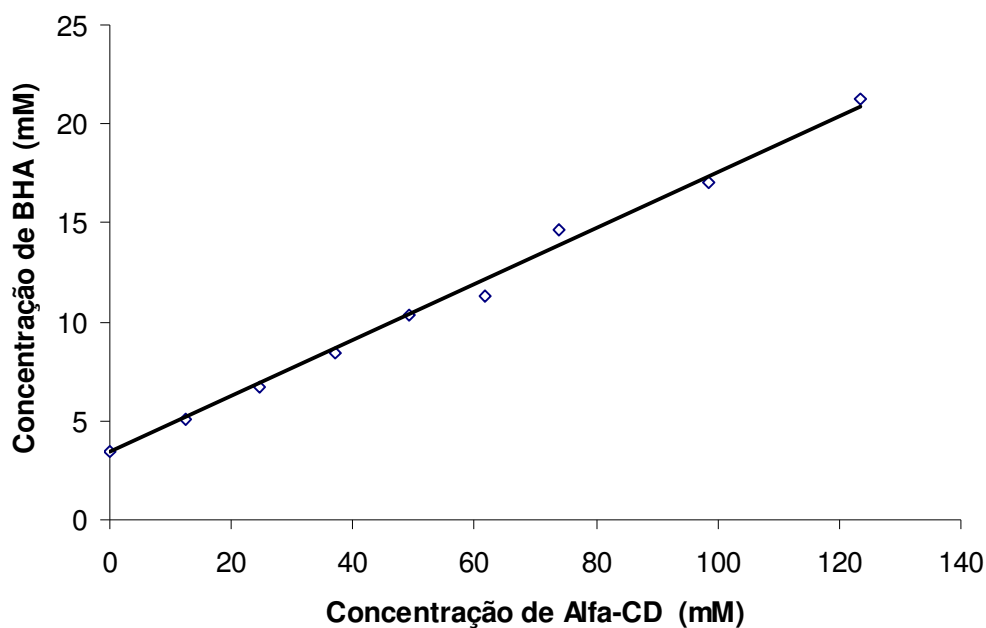
#### 4.3.4 Determinação das constantes de equilíbrio entre a $\alpha$ -CD e a $\beta$ -CD com o BHA

Os estudos para a determinação da constante de equilíbrio entre as ciclodextrinas e o BHA, foram realizados utilizando-se os procedimentos do diagrama de solubilidade de fases proposto por HIGUCHI & CONNORS (1965). Essa teoria baseia-se na medição do efeito de complexação na solubilidade do substrato e permite fazer inferências sobre a estequiometria de inclusão e estimar uma constante relacionada com o grau de estabilidade do complexo formado.

Preferiu-se neste trabalho o método de solubilidade de fases de HIGUCHI & CONNORS para a determinação da constante de complexação do BHA, por ser um método de fácil realização e também porque havia grande quantidade de BHA, ao contrário da oleuropeína, que havia pequena quantidade, fato esse que determinou a escolha do método colorimétrico para esta última.

##### 4.3.4.1. Determinação da constante de formação do complexo BHA: $\alpha$ -CD

O gráfico do diagrama de solubilidade de fases correspondendo ao sistema BHA: $\alpha$ -CD está representado na Figura 4.20. A solubilidade cresce linearmente com a concentração de  $\alpha$ -CD (que teve como limite a sua solubilidade máxima em água, aproximadamente  $120 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ), sendo a curva de solubilidade classificada como do tipo  $A_L$ . Nesse caso, como a concentração de BHA cresceu linearmente com a concentração de  $\alpha$ -CD, a estequiometria resultante foi do tipo 1:1. Já a constante de equilíbrio foi calculada a partir do ponto de interceptação no eixo y e da inclinação da reta obtida (Equação 4.19). A tabela 4.15 mostra os dados que permitem a construção da curva de solubilidade (Figura 4.20)



**Figura 4.20** - Diagrama de solubilidade de fases para o BHA com a  $\alpha$ -CD a 35°C

**Tabela 4.15** - Concentração de BHA solubilizada após complexação com a  $\alpha$ -CD. Amostras filtradas e diluídas em **1:30** para a leitura da absorvância em espectrofotômetro.

Amostra	Concentração de $\alpha$ -CD		Abs (287 nm)	Concentração de BHA no filtrado	
	(g L <sup>-1</sup> )	(mM)		(g L <sup>-1</sup> )	(mM)
1	0,0	0,0	0,345	0,617895	3,4282
2	12,00	12,33	0,508	0,909828	5,0479
3	24,00	24,67	0,671	1,201761	6,6676
4	36,00	37,00	0,846	1,515186	8,4065
5	48,00	49,33	1,041	1,864431	10,3442
6	60,00	61,67	1,142	2,045322	11,3478
7	72,00	73,99	1,476	2,643516	14,6666
8	96,00	98,66	1,718	3,076938	17,0713
9	120,0	123,33	2,142	3,836322	21,2845

Obs: as concentrações de BHA foram calculadas a partir da Equação (4.18) obtida no procedimento 4.3.1

A equação da reta obtida a partir dos pontos mostrados na tabela 4.15 foi representada pela Equação (4.19)



$$C_{\text{BHA}} = 0,1446 \cdot C_{\alpha\text{-CD}} + 3,1928 \quad R^2 = 0,9946 \quad (4.19)$$

Para o cálculo da constante de equilíbrio, utilizou-se a Equação (4.20):

$$K_{\text{CD}} = \frac{I}{S_0(1-I)} \quad (4.20)$$

Sendo:

$K_{\text{CD}}$  = constante de formação do complexo

$I$  = Inclinação da reta obtida

Foi obtido o valor para a constante de equilíbrio de formação do complexo BHA: $\alpha$ -CD:

$$K_{\text{BHA}:\alpha\text{-CD}} = 49,31 \text{ M}^{-1}$$

A partir dos dados de solubilidade apresentados na tabela 4.15 obteve-se o aumento da solubilidade do BHA em água com a adição de  $\alpha$ -CD, encontrado pela divisão entre a concentração final de BHA na presença da máxima concentração de  $\alpha$ -CD, pela concentração inicial do BHA na ausência total de  $\alpha$ -CD, que nesse caso forneceu um aumento de cerca de 620% ( $n=6,21$ ).

$$n = \frac{S_{\text{max}}}{S_0} \quad (4.21)$$

Sendo:

$n$  = Número de vezes que a solubilidade aumenta com a adição da ciclodextrina

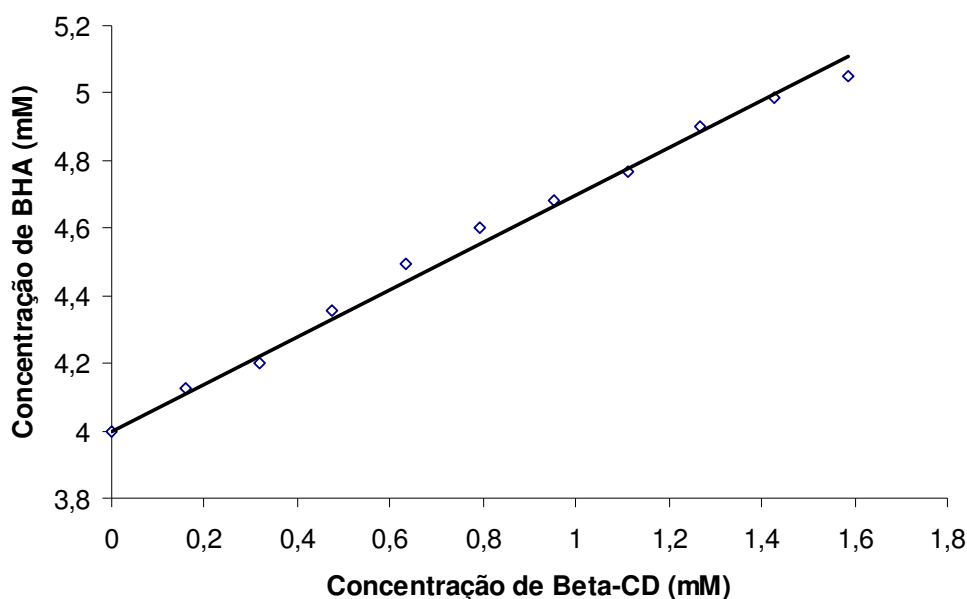
$S_0$  = Quantidade de BHA que é solúvel na ausência de ciclodextrina ( $3,4282 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ )

$S_{\text{max}}$  = Máxima concentração de BHA obtida no filtrado após a adição de ciclodextrina ( $21,2845 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ )

A partir desses resultados verifica-se que a afinidade entre o BHA e a  $\alpha$ -CD é baixa (devido à sua baixa constante de equilíbrio), mas a sua adição mostra-se vantajosa em alguns casos, uma vez que a sua solubilidade em água aumenta de maneira significativa quando na presença da  $\alpha$ -ciclodextrina.

#### 4.3.4.2. Determinação da constante de equilíbrio de formação do complexo BHA: $\beta$ -CD

O gráfico do diagrama de solubilidade de fases correspondendo ao sistema BHA: $\beta$ -CD está representado na Figura 4.21. A solubilidade cresce linearmente com a concentração de  $\beta$ -CD (que foi variada de 0 –  $1,58 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , já que foi nessa concentração máxima que se verificou um comportamento linear, e em medidas de concentrações superiores ocorria dispersão dos dados), sendo a curva de solubilidade classificada do tipo  $A_L$ . Nesse caso como a concentração de BHA cresceu linearmente com a concentração de  $\beta$ -CD, a estequiometria resultante foi do tipo 1:1. Já a constante de equilíbrio foi calculada a partir do ponto de interceptação no eixo y e da inclinação da reta obtida (Equação 4.22). Na tabela 4.16 são mostrados os dados para o cálculo da curva de solubilidade.



**Figura 4.21** - Diagrama de solubilidade de fases para o BHA com a  $\beta$ -CD a 35°C

**Tabela 4.16** - Concentração de BHA solubilizadas após complexação com a solução de  $\beta$ -CD. Amostras filtradas e diluídas em **1:10** para leitura da absorvância em espectrofotômetro.

Amostra	Concentração de $\beta$ -CD		Abs (287 nm)	Concentração de BHA no filtrado	
	(g L <sup>-1</sup> )	(mM)		(g L <sup>-1</sup> )	(mM)
1	0,0	0	1,207	0,720579	3,9979
2	0,18	0,15860	1,245	0,743265	4,1238
3	0,36	0,31718	1,269	0,757593	4,2032
4	0,54	0,47577	1,315	0,785055	4,3556
5	0,72	0,63436	1,357	0,810129	4,4947
6	0,90	0,79295	1,39	0,82983	4,604
7	1,08	0,95154	1,413	0,843561	4,6802
8	1,26	1,11014	1,444	0,85968	4,7696
9	1,44	1,26872	1,48	0,88356	4,9021
10	1,62	1,42731	1,505	0,898485	4,9849
11	1,80	1,58590	1,525	0,910425	5,0512

Obs: as concentrações de BHA foram calculadas a partir da Equação (4.18), obtida no procedimento 4.3.1.

A equação da reta obtida a partir dos pontos mostrados na Tabela 4.16 foi representada pela Equação (4.22)

$$C_{\text{BHA}} = 0,7005 \cdot C_{\beta\text{-CD}} + 3,9979 \quad R^2 = 0,9919 \quad (4.22)$$

Para o cálculo da constante de equilíbrio, utilizou-se a Equação (4.20):

Resultando no seguinte valor para constante de equilíbrio de formação do complexo BHA: $\beta$ -CD:

$$K_{\text{BHA}:\beta\text{-CD}} = 585,03 \text{ M}^{-1}$$

A partir do gráfico também obteve-se o aumento da solubilidade do BHA em água com a adição de  $\beta$ -CD, que no caso pode ser encontrado pela Equação (4.21), que nesse caso forneceu um aumento de cerca de 126% na solubilidade, onde:

$$n = 1,26$$

$$S_0 = 3,9979 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$$

$$S_{\text{max}} = 5,0512 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$$

A partir desses resultados verifica-se que a afinidade entre o BHA e a  $\beta$ -CD é alta, se comparada com a  $\alpha$ -CD e está próxima dos valores obtidos para outras substâncias quando complexadas com  $\beta$ -CD. Já a sua solubilidade em água aumenta, mas não tanto quanto o obtido com a adição da  $\alpha$ -CD. Esse fato pode ser explicado principalmente pela baixa solubilidade da  $\beta$ -CD em água. Caso conseguíssemos preparar soluções com maiores concentrações dessa CD obteríamos também um maior aumento de solubilidade do BHA em água.

#### **4.4. QUARTA ETAPA - PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO ENTRE AS CICLODEXTRINAS E OS ANTIOXIDANTES**

Essa fase do trabalho objetivou preparar e caracterizar os complexos de inclusão entre as CDs e os antioxidantes, obtidos de acordo com a metodologia apresentada na seção 3.2.4.

Nessa etapa são mostrados os termogramas e as curvas de DSC, dos complexos e das misturas físicas obtidas no procedimento de complexação das duas ciclodextrinas utilizadas ( $\alpha$ -CD e  $\beta$ -CD) com os dois compostos em estudo (oleuropeína e BHA), apresentado na Seção 3.2.4.1.

##### **4.4.1. Calorimetria diferencial de varredura (DSC)**

Segundo SZEJTLI (1988), as ciclodextrinas não apresentam ponto de fusão definido e, acima de 200°C começam a se decompor. As propriedades termoanalíticas observadas dependem de, pelo menos quatro fatores: teor de água, da estrutura cristalina, velocidade de aquecimento e atmosfera gasosa dos ensaios. Os termogramas de DSC representam as medidas de fluxos de calor gerados e absorvidos pela amostra, durante o

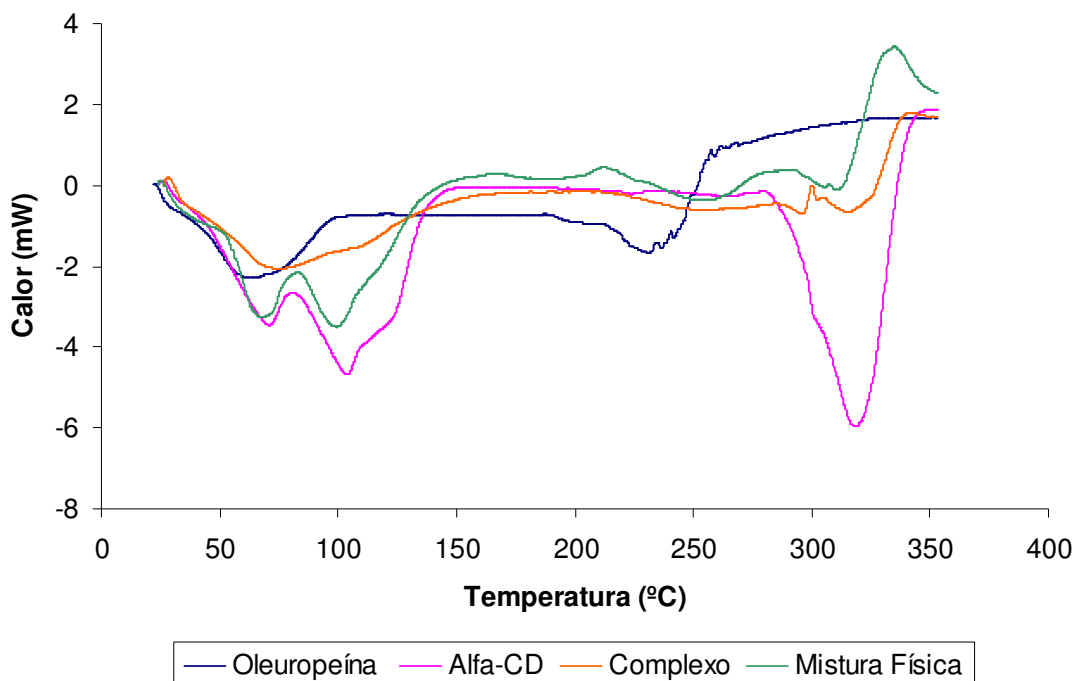
aquecimento programado. Em geral, a complexação é verificada pelo desaparecimento do pico endotérmico característico da molécula encapsulada.

#### 4.4.1.1. Complexos formados com a $\alpha$ -ciclodextrina

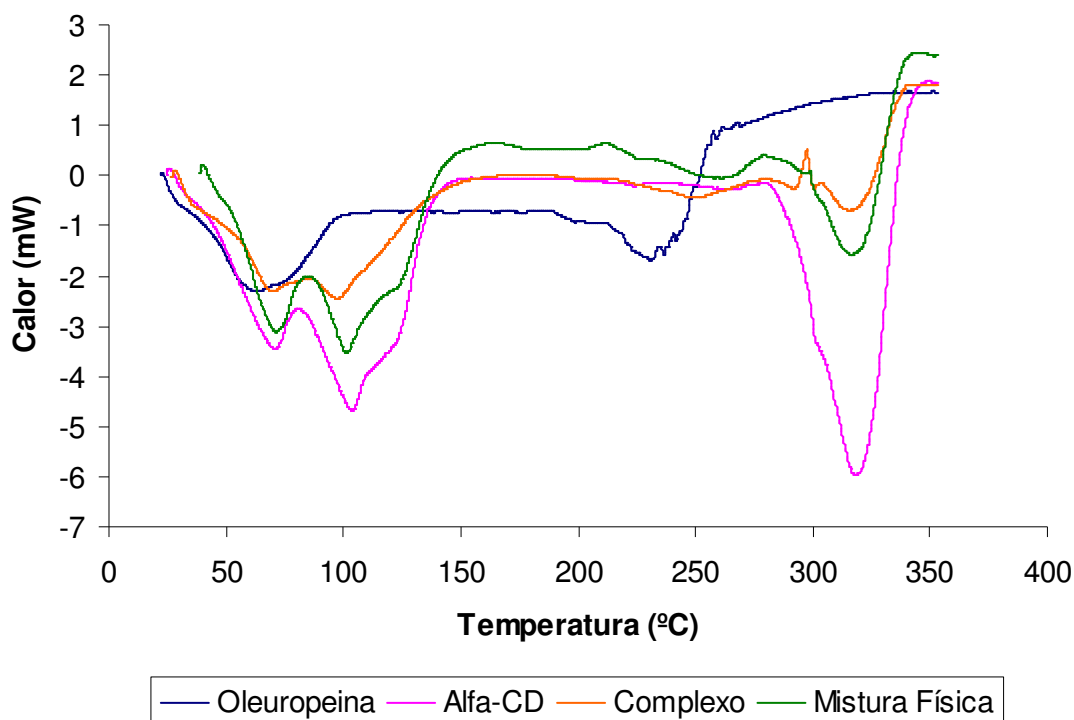
Pelo padrão do gráfico de DSC obtido nas figuras 4.22 e 4.23 verifica-se que a  $\alpha$ -CD em estudo está na sua forma hexahidratada. Os dois primeiros picos a 69,37°C e 103,41°C, sem perda de massa significativa, são característicos da forma hexahidratada, onde o primeiro pode ser atribuído à transição de fase da forma anidra para outra forma, enquanto o outro reflete a desidratação da molécula. Já o terceiro pico a 317,74°C refere-se à degradação térmica da  $\alpha$ -CD.

##### a) Complexo formado entre a oleuropeína e a $\alpha$ -CD

As curvas de DSC da oleuropeína e da  $\alpha$ -CD, complexos e misturas físicas são apresentadas nas Figuras 4.22 e 4.23. A oleuropeína apresenta dois picos endotérmicos, não tão acentuados em 62,04°C, correspondente à fusão do composto e o segundo a 229,85, referente ao ponto de ebulição.



**Figura 4.22** - Curvas de DSC dos componentes puros, complexos de inclusão e misturas físicas, preparadas na proporção molar de preparação de 1:1 (oleuropeína:  $\alpha$ -ciclodextrina).



**Figura 4.23** - Curvas de DSC dos componentes puros, complexos de inclusão e misturas físicas, preparadas na proporção molar de preparação de 1:2 (oleuropeína:  $\alpha$ -ciclodextrina).

A interpretação dos resultados da complexação envolvendo a oleuropeína e a  $\alpha$ -CD, ficou dificultada, pois um dos picos da  $\alpha$ -CD aparece próximo ao pico de fusão da oleuropeína (Tabela 4.17).

Para o complexo de inclusão na proporção molar de preparação de 1:1, verifica-se o desaparecimento do pico de fusão da oleuropeína livre e um pequeno achatamento a 74,24°C, que pode ser devido à fusão da  $\alpha$ -CD. Em relação ao ponto de ebulição, foi verificado o mesmo comportamento, uma vez que o pico da oleuropeína (229,85°C) aparece com um atraso no complexo (próximo a 249°C). Com estas observações pode-se considerar que ocorreu a inclusão, mas provavelmente com fracas interações entre a oleuropeína e a ciclodextrina. No caso da mistura física 1:1, os picos correspondentes à  $\alpha$ -CD aparecem bem característicos, mas o pico que corresponde à fusão da oleuropeína não pode ser observado. A interpretação pode somente ser feita em torno do ponto de ebulição que nesse caso também aparece atrasado (em 253,82°C), indicando uma provável interação entre os compostos.

Para o complexo de inclusão na proporção molar de 1:2, os picos de fusão novamente seguem o comportamento semelhante com o da  $\alpha$ -CD (desta vez aparecem mais definidos, já que na formação do complexo os dois picos da  $\alpha$ -CD são visualizados),

impossibilitando a interpretação. Mas pelo ponto de ebulição, verifica-se novamente que para a oleuropeína este ocorre com um atraso de aproximadamente 22°C, comprovando novamente uma interação entre os compostos. Para a mistura física o comportamento é semelhante ao obtido na formação do complexo, mas os picos são mais acentuados.

Outro fato (com exceção do complexo na preparação 1:1) é que, as temperaturas e entalpias de desidratação dos produtos são menores que a temperatura e entalpia de desidratação da  $\alpha$ -CD pura, indicando que a inclusão da oleuropeína na cavidade da  $\alpha$ -CD resulta na redução da força de ligação entre as moléculas de água remanescentes e a ciclodextrina. Nota-se também que o complexo preparado na proporção molar de 1:2 apresenta uma menor temperatura e entalpia de desidratação em relação ao preparado na proporção molar de 1:1, resultando em uma maior quantidade de oleuropeína incluída na cavidade da  $\alpha$ -CD.

**Tabela 4.17** - Resultados das curvas de DSC para os componentes puros e para os produtos resultantes da preparação dos complexos de inclusão e misturas físicas.

Sistema	Técnica	Pico (°C)	Calor (J/g)
Oleuropeína	Puro	62,04	-83,39
		229,85	-61,31
$\alpha$ -ciclodextrina	Puro	69,57	-32,93
		103,41	-90,79
		317,74	-204,11
Oleuropeína: $\alpha$ -CD (1:1)*	Amassamento	74,27	-153,70
		249,12	-10,41
		295,18	-1,84
		315,4	-29,47
Oleuropeína: $\alpha$ -CD (1:2)*	Amassamento	69,57	-25,65
		96,63	-1,83
		251,9	-12,04
		291,42	-2,56
		315,86	-42,95
Oleuropeína: $\alpha$ -CD (1:1)*	Mistura	66,75	-41,34
	Física	98,24	-40,04
		253,82	-29,15
		309,28	-41,99
Oleuropeína: $\alpha$ -CD (1:2)*	Mistura	71,45	-36,58
	Física	101,83	-50,66
		259,93	-19,08
		316,18	-81,42

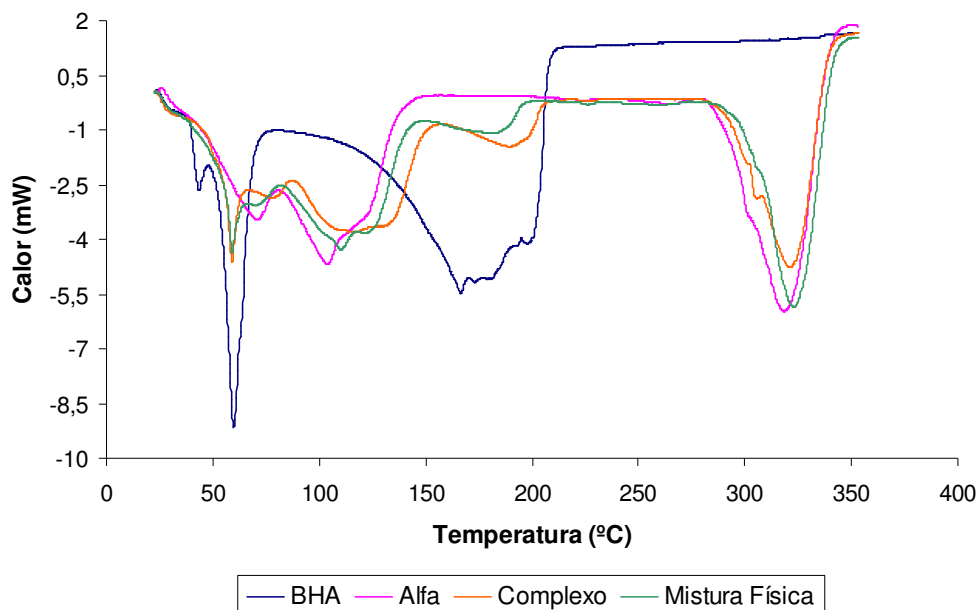
\* razão molar usada na preparação do complexo

#### b) Complexo formado entre o BHA e a $\alpha$ -CD

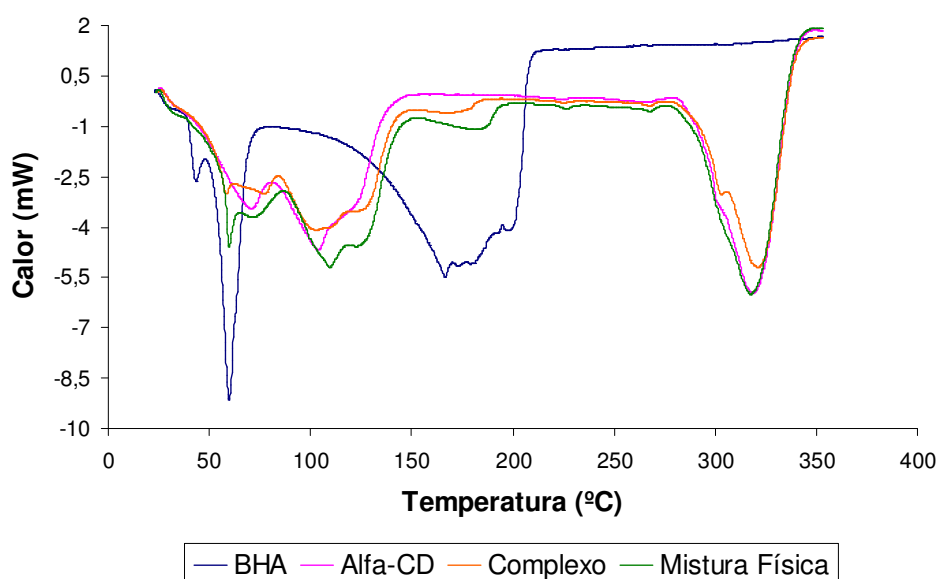
As curvas de DSC do BHA com a  $\alpha$ -CD, complexos e misturas físicas são apresentadas nas Figuras 4.24 e 4.25. O BHA apresenta três picos endotérmicos, o primeiro não tão acentuado em 43,24°C (que pode ser devido a alguma transformação



sofrida pelo composto), o segundo em 59,22 °C, correspondente à fusão do composto e o terceiro a 165,45 °C, referente ao ponto de ebulição.



**Figura 4.24** - Curvas de DSC dos componentes puros, complexos de inclusão e misturas físicas, preparadas na proporção molar de 1:1 (BHA:  $\alpha$ -ciclodextrina).



**Figura 4.25** - Curvas de DSC dos componentes puros, complexos de inclusão e misturas físicas, preparadas na proporção molar de 1:2 (BHA:  $\alpha$ -ciclodextrina).

Pelos termogramas obtidos (Figuras 4.24 e 4.25), verifica-se que não houve interação de nenhum tipo entre o BHA e a  $\alpha$ -ciclodextrina, isto provavelmente deve-se ao fato da molécula de BHA não conseguir se acomodar na cavidade da ciclodextrina em estudo.

Na interação do tipo 1:1, em ambos os casos (complexo de inclusão e mistura física) os intervalos de temperaturas em que aparecem os picos de fusão e ebulição do BHA aparecem bem definidos, indicando nenhuma interação entre os compostos (Figura 4.24).

Na formação do complexo 1:2 (Figura 4.25), o pico de fusão e ebulição do BHA diminui, se comparado com a formação 1:1, o que realmente indica que o BHA não consegue se acomodar na cavidade da  $\alpha$ -CD, indicando que provavelmente haverá a formação do complexo entre o BHA e a  $\beta$ -ciclodextrina (devido ao maior tamanho da molécula) (Tabela 4.18).

No cálculo da constante de equilíbrio do complexo BHA: $\alpha$ -CD, também já havia sido verificado que a afinidade entre ambos era baixa, se comparada com a  $\beta$ -CD (Seção 4.3).

**Tabela 4.18** - Resultados das curvas de DSC para os componentes puros e para os produtos resultantes da preparação dos complexos de inclusão e misturas físicas.

Sistema	Técnica	Pico (°C)	Calor (J/g)
BHA	Puro	43,48	-2,31
		59,34	-66,61
		165,69	-351,71
$\alpha$ -ciclodextrina	Puro	69,57	-32,93
		103,41	-90,79
		317,74	-204,11
BHA: $\alpha$ -CD (1:1)*	Amassamento	58,75	-12,47
		78,5	-2,90
		115,16	-89,47
		188,95	-27,74
		320,09	-167,53
BHA: $\alpha$ -CD (1:2)*	Amassamento	57,81	-1,34
		78,03	-4,05
		102,47	-92,20
		173,91	-5,31
		320,56	-180,63
BHA: $\alpha$ -CD (1:1)*	Mistura Física	57,81	-8,53
		70,98	-1,02
		109,52	-86,08
		184,72	-17,76
		322,44	-174,94
BHA: $\alpha$ -CD (1:2)*	Mistura Física	59,69	0,0174
		70,04	-3,13
		108,58	103,76
		181,61	-13,39
		316,32	-202,35

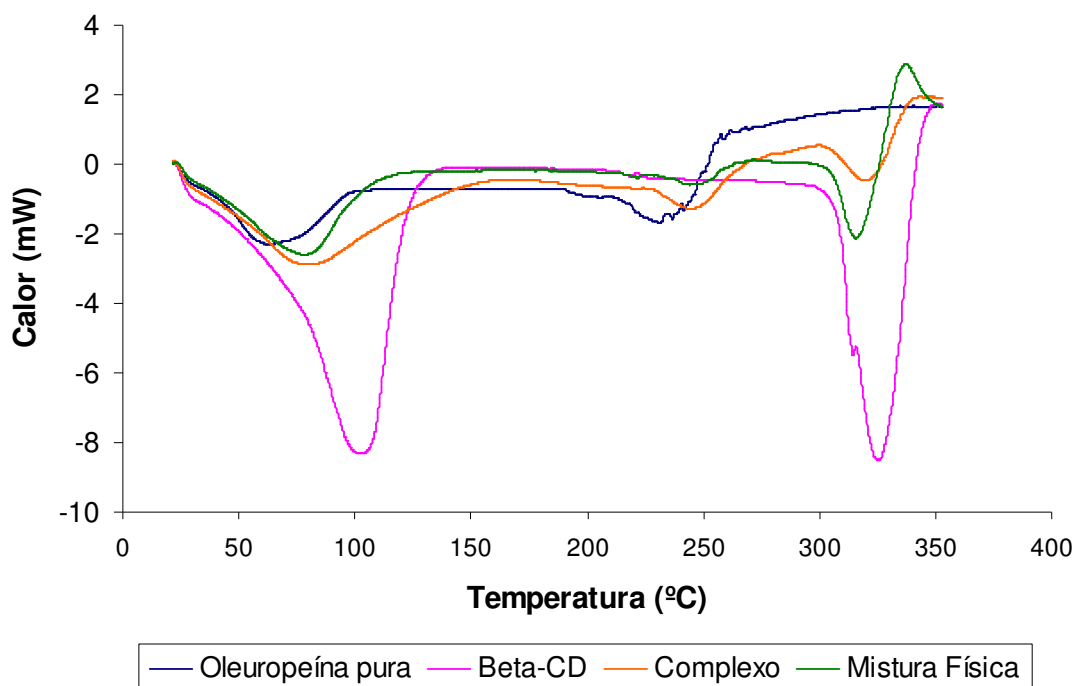
\* razão molar usada na preparação do complexo

#### 4.4.1.2. Complexos formados com a $\beta$ -ciclodextrina

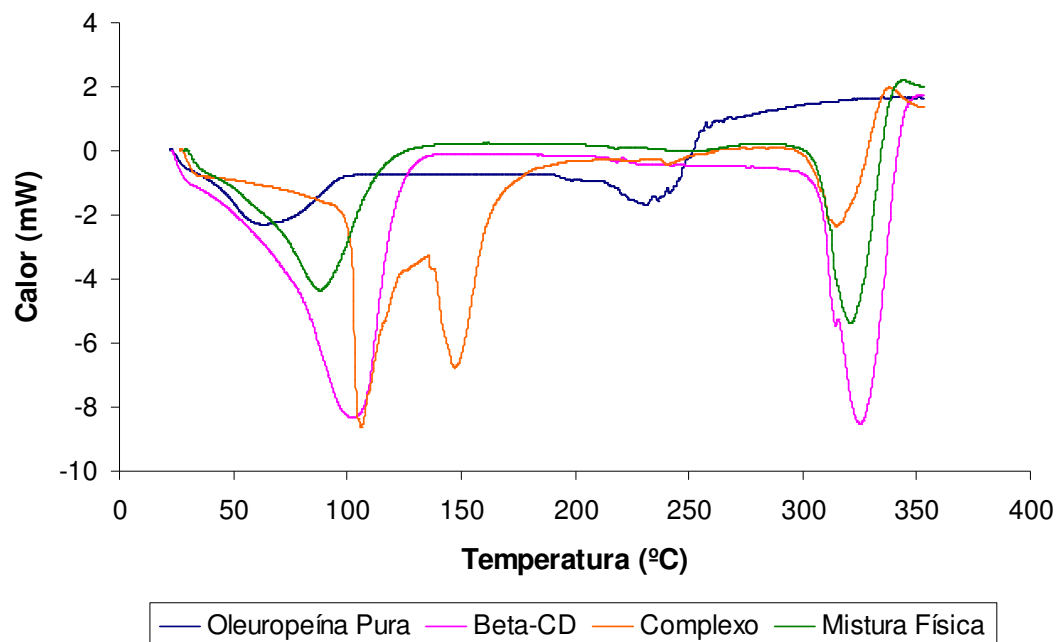
Ao contrário da  $\alpha$ -CD, a  $\beta$ -CD, apresenta somente dois picos endotérmicos. O primeiro a 102°C, referente à evaporação da água presente na amostra, e o segundo a 324,78°C correspondente a degradação térmica da  $\beta$ -CD (Figuras 4.26 e 4.27).

##### a) Complexo formado entre a oleuropeína e a $\beta$ -CD

As curvas de DSC da oleuropeína com a  $\beta$ -CD, complexos e misturas físicas são apresentadas nas Figuras 4.26 e 4.27. Como já foi dito, a oleuropeína apresenta dois picos endotérmicos, não tão acentuados em 62,04°C, correspondente a fusão do composto e o segundo a 229,85°C, referente ao ponto de ebulição.



**Figura 4.26** - Curvas de DSC dos componentes puros, complexos de inclusão e misturas físicas, preparadas na proporção molar de 1:1 (oleuropeína:  $\beta$ -ciclodextrina).



**Figura 4.27** - Curvas de DSC dos componentes puros, complexos de inclusão e misturas físicas, preparadas na proporção molar de 1:2 (oleuropeína:  $\beta$ -ciclodextrina).

Pode-se observar que houve uma fraca interação na formação de complexo e da mistura física na preparação 1:1, pois o pico de fusão da oleuropeína pura, que é próximo de 62,04°C se desloca para 78,97°C, para o complexo e para 79,44°C na a mistura física. Entretanto não definiu se o pico se refere à  $\beta$ -CD ou à oleuropeína pura. O mesmo comportamento se verificou para o ponto de ebulição, o qual aparece com atraso nas preparações, comparado com a oleuropeína pura (Tabela 4.19).

Na preparação 1:2, pode-se comprovar a formação do complexo, uma vez que o pico de fusão relativo ao da oleuropeína desaparece por completo, assim como o de ebulição. Um fato interessante observado é a ocorrência de um pico não característico de nenhum composto em 146,18°C, que pode ser devido a alguma transformação ocorrida entre as duas substâncias (pois não houve perda de massa significativa nesse intervalo). Na mistura física, ocorre novamente um atraso no ponto de fusão (aparece em 86,49°C), mas este desaparece quase que por completo, onde novamente pode-se comprovar a interação entre os compostos.

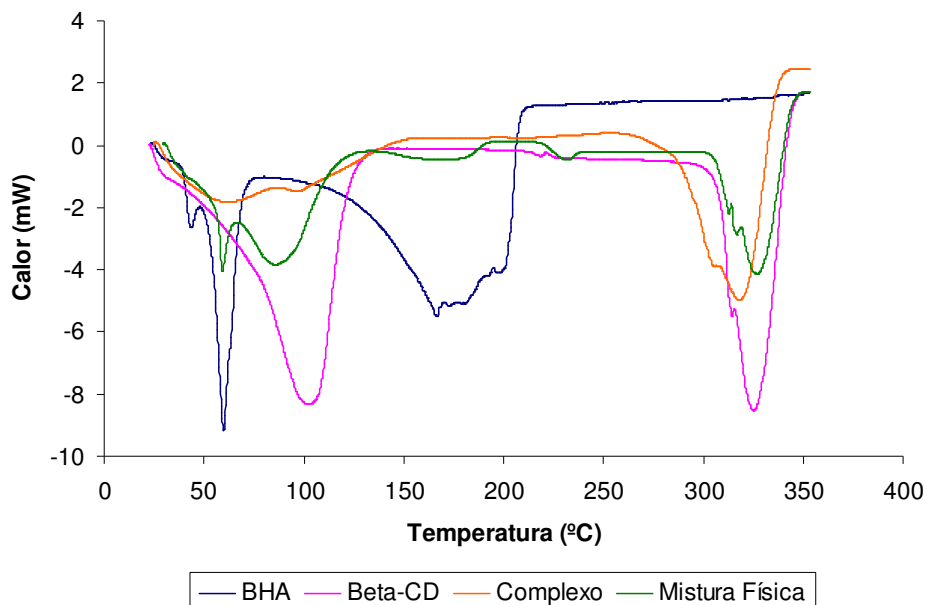
**Tabela 4.19** - Resultados das curvas de DSC para os componentes puros e para os produtos resultantes da preparação dos complexos de inclusão e misturas físicas.

Sistema	Técnica	Pico (°C)	Calor (J/g)
Oleuropeína	Puro	62,04	-83,39
		229,85	-61,31
β-ciclodextrina	Puro	102	-368,65
		324,78	-206,86
Oleuropeína: β-CD (1:1)*	Amassamento	78,97	-178,52
		244,89	-52,53
		319,62	-31,13
Oleuropeína: β-CD (1:2)*	Amassamento	105,76	-85,58
		146,18	-46,20
		314,45	-80,74
Oleuropeína: β-CD (1:1)*	Mistura	79,44	-121,81
	Física	246,77	-12,92
		314,45	-75,61
Oleuropeína: β-CD (1:2)*	Mistura	86,49	-193,58
	Física	319,62	-141,12

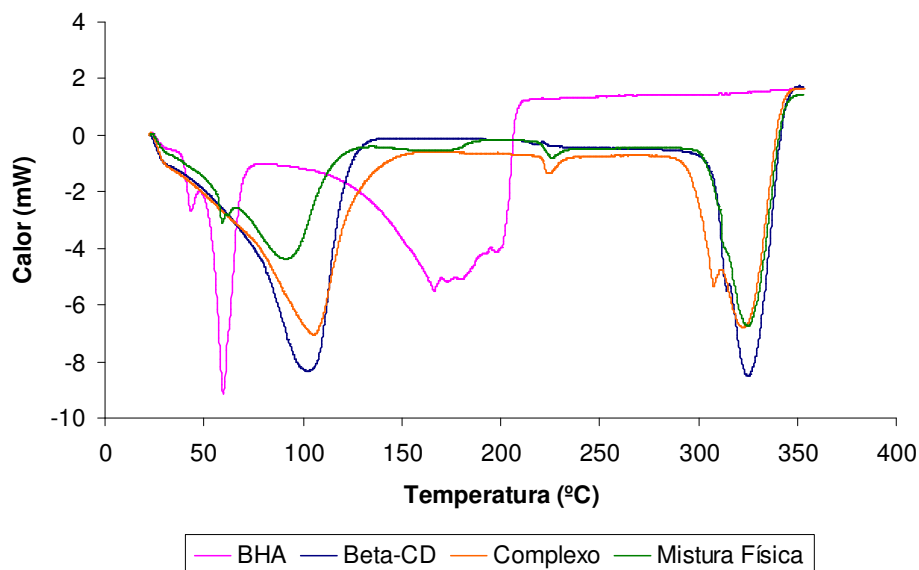
\* razão molar usada na preparação do complexo

### **b) Complexo formado entre o BHA e a β-CD**

As curvas de DSC do BHA com a β-CD, complexos e misturas físicas, são apresentadas nas Figuras 4.28 e 4.29. Como foi dito, o BHA apresenta três picos endotérmicos, o primeiro não tão acentuado em 43,24°C (que pode ser devido a alguma transformação sofrida pelo composto), o segundo em 59,22 °C correspondente a fusão do composto e o terceiro a 165,45 °C, referente ao ponto de ebulição.



**Figura 4.28** - Curvas de DSC dos componentes puros, complexos de inclusão e misturas físicas, preparadas na proporção molar de 1:1 (BHA:  $\beta$ -ciclodextrina).



**Figura 4.29** - Curvas de DSC dos componentes puros, complexos de inclusão e misturas físicas, preparadas na proporção molar de 1:2 (BHA:  $\beta$ -ciclodextrina).

Nesse caso, a interação entre o BHA e a  $\beta$ -CD mostra-se bem visível. Nos termogramas do complexo de inclusão (tanto na preparação 1:1, quanto 1:2), observa-se o desaparecimento do pico de fusão do BHA puro, enquanto para os termogramas das misturas físicas dos compostos, este pico aparece bem definido (principalmente na preparação 1:1). Portanto, a ausência do pico de fusão do composto é uma indicação de formação do complexo de inclusão (Tabela 4.20).

Como ocorreu anteriormente entre a  $\alpha$ -CD e a oleuropeína, as temperaturas e entalpias de desidratação dos produtos (com exceção do complexo na preparação 1:2) são menores que a temperatura e entalpia de desidratação da  $\beta$ -CD pura, indicando que a inclusão do BHA na cavidade da  $\beta$ -CD resulta na redução da força de ligação entre as moléculas de água remanescentes e a ciclodextrina.

É interessante notar que as curvas de DSC do complexo de inclusão (1:2) e das misturas físicas apresentam pequenos picos endotérmicos entre 220°C e 230°C, o que pode ser a evaporação do BHA puro, contudo as curvas termogravimétricas dos complexos não apresentaram qualquer perda de massa nessa temperatura. Portanto, este pico pode ser referente a uma transformação reversível sofrida pela  $\beta$ -CD (YILMAZ et al., 1995).



**Tabela 4.20** - Resultados das curvas de DSC para os componentes puros e para os produtos resultantes da preparação dos complexos de inclusão e misturas físicas.

Sistema	Técnica	Pico (°C)	Calor (J/g)
BHA	Puro	43,48	-2,31
		59,34	-66,61
		165,69	-351,71
β-ciclodextrina	Puro	102	-368,65
		324,78	-206,86
BHA: β-CD (1:1)*	Amassamento	63,45	-40,33
		96,83	-8,17
		317,27	-230,84
BHA: β-CD (1:2)*	Amassamento	105,29	-359,60
		224,68	-3,86
		306,97	-3,45
		321,63	-61,09
BHA: β-CD (1:1)*	Mistura	58,75	-16,06
		84,61	-46,60
	Física	173,91	-16,31
		231,26	-4,76
		326,6	-111,96
BHA: β-CD (1:2)*	Mistura	58,75	-9,51
		89,31	-73,09
	Física	224,68	-3,80
		325,26	-160,63

\*razão molar usada na preparação do complexo

#### 4.4.2. Análise Termogravimétrica (TGA)

As Figuras de 4.30 a 4.37, apresentam as curvas termogravimétricas dos componentes puros, complexos e misturas físicas entre as ciclodextrinas ( $\alpha$ -CD e  $\beta$ -CD) e os compostos em estudo (oleuropeína e BHA).

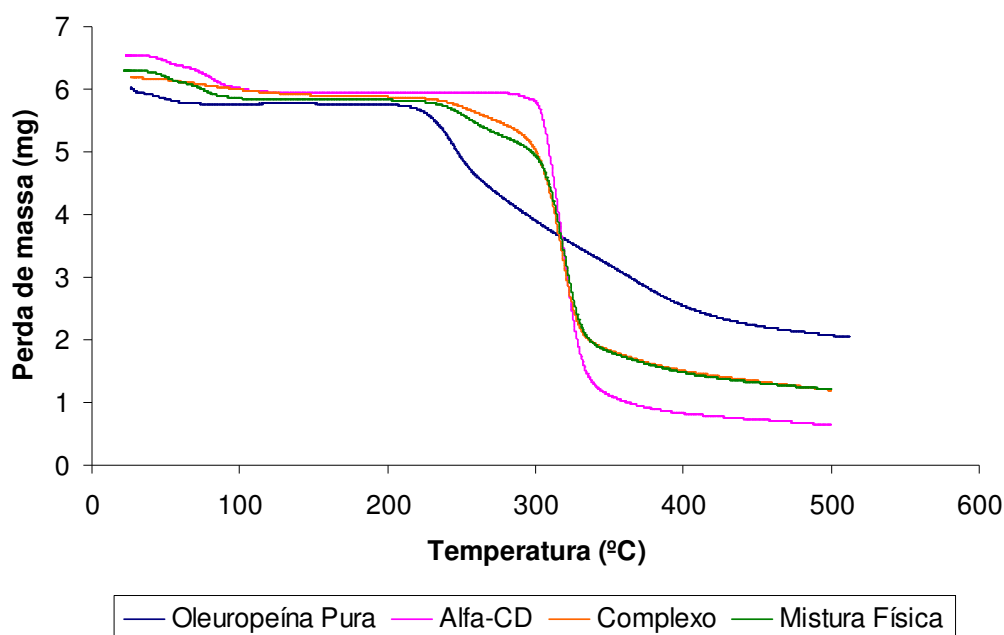
Geralmente, os termogramas com ciclodextrinas exibem de 3 a 4 estágios que correspondem a: (1) perda das moléculas de água, (2) volatilização do componente em estudo, (3) liberação do componente incluído e (4) decomposição da ciclodextrina.

#### 4.4.2.1. Para os complexos formados com a $\alpha$ -ciclodextrina

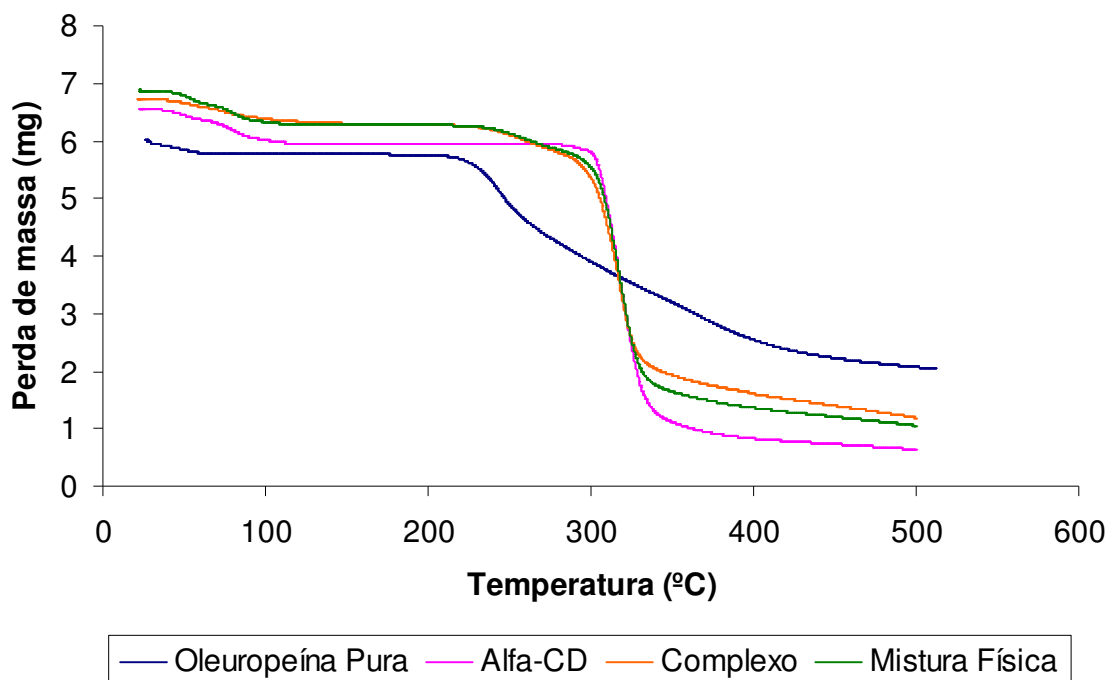
A  $\alpha$ -CD apresenta três estágios de perda de massa: o primeiro corresponde a um rearranjo estrutural que pode ser atribuído à mudança de fase para a sua forma anidra, (devida à baixa perda de massa, cerca de 2,7%), que vai da faixa de 21,56 a 60,02°C, o segundo devido à desidratação da molécula, na faixa de temperatura de 60,02 – 114,22°C, com resultante perda de 6,2%, e o terceiro relacionado à decomposição da estrutura da  $\alpha$ -CD, que vai da faixa de 269,8 a 500°C, exibindo uma perda de massa considerável de 81,1% (Figura 4.30).

##### a) Complexo formado entre a oleuropeína e a $\alpha$ -CD

A oleuropeína exhibe três estágios de decomposição (Tabela 4.21). O primeiro estágio se refere a perda de água, a 203°C, a oleuropeína começa a se decompor e a 330°C, grande quantidade de oleuropeína já é volatilizada (Figura 4.30 e 4.31).



**Figura 4.30** - Curvas termogravimétricas dos componentes puros, complexos de inclusão e misturas físicas, preparadas na proporção molar de 1:1 (oleuropeína:  $\alpha$ -CD).



**Figura 4.31** - Curvas termogravimétricas dos componentes puros, complexos de inclusão e misturas físicas, preparadas na proporção molar de 1:2 (oleuropeína:  $\alpha$ -CD).

Pela análise dos termogramas, pode-se verificar que ocorreu uma complexação parcial, já que os estágios de decomposição dos produtos estão próximos ao da substância pura, mas com um atraso, não muito significativo (Figuras 4.30 e 4.31). Os gráficos, tanto dos complexos quanto das misturas físicas, se comportaram de forma semelhante, mas observa-se que para a preparação 1:2 a perda de massa comportou-se de maneira mais satisfatória, uma vez que esta acompanha a perda de massa da  $\alpha$ -CD, sendo que dessa maneira pode-se afirmar que houve a formação do complexo.

Na Tabela 4.21 são apresentados os estágios de decomposição, faixas de temperaturas e perda de massa dos componentes puros, complexos de inclusão e misturas físicas.

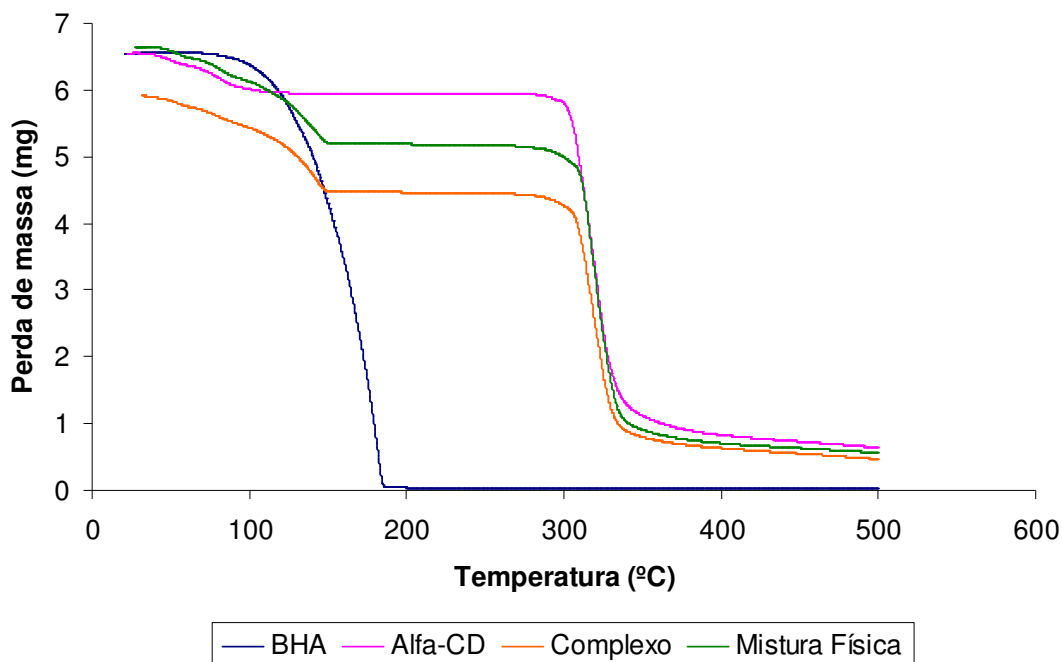
**Tabela 4.21** - Resultados das curvas termogravimétricas para os componentes puros e os produtos obtidos na preparação dos complexos de inclusão

Sistema	Técnica	Estágio	TGA (faixa de temperatura, °C).	DTG	Perda de massa (%)
<b>Oleuropeína</b>	Puro	1	26,18 – 87,25	43,71	4,13
		2	182,18 – 329,65	243,95	38,17
		3	329,65 – 511,1	369,45	23,59
<b><math>\alpha</math>-ciclodextrina</b>	Puro	1	21,56 – 60,02	49,48	2,7
		2	60,02 – 114,22	82,07	6,2
		3	269,8 – 500	318,98	81,1
<b>Oleuropeína: <math>\alpha</math>-CD (1:1)*</b>	Amassamento	1	30,03 – 236,6	-	5,99
		2	237,0 – 281,0	256,4	6,43
		3	281,0 – 500,0	318,35	68,23
<b>Oleuropeína: <math>\alpha</math>-CD (1:2)*</b>	Amassamento	1	20,9 – 62,9	52,4	2,1
		2	63,0 – 224,3	73,92	4,85
		3	224,9 – 279	257,86	6,76
		4	280,3 – 500,0	317,23	68,51
<b>Oleuropeína: <math>\alpha</math>-CD (1:1)*</b>	Mistura	1	21,56 – 61,2	50,06	3,18
	Física	2	61,7 – 108,4	76,83	4,12
		3	199,3 – 283,3	253,78	10,1
		4	283,8 – 500,0	320,14	63,17
<b>Oleuropeína: <math>\alpha</math>-CD (1:2)*</b>	Mistura	1	21,6 – 65,9	53,5	3,63
	Física	2	66,0 – 114,8	80,3	4,9
		3	213,8 – 283,8	254,9	6,62
		4	284,0 – 500,0	317,81	69,4

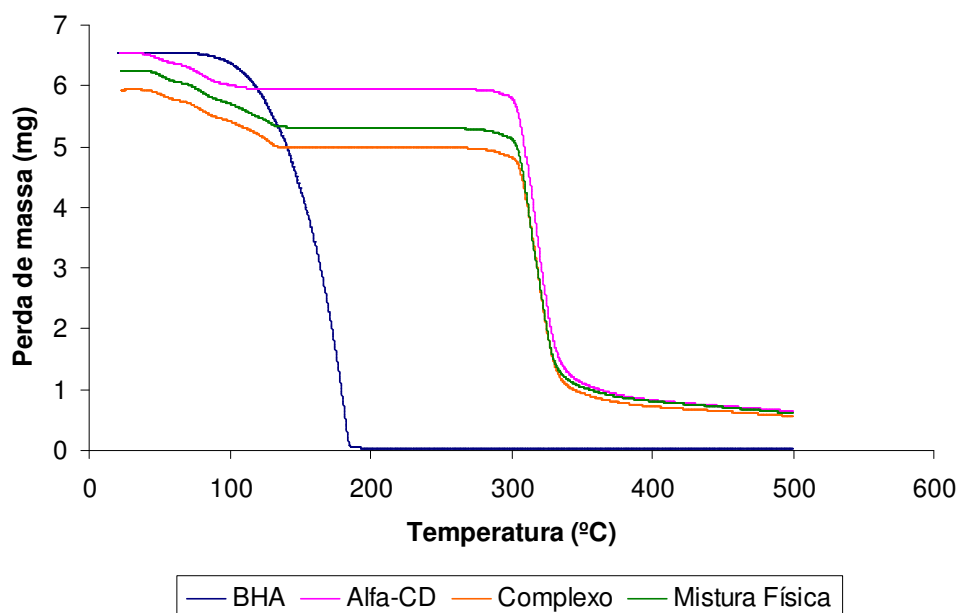
\*razão molar usada na preparação do complexo

*b) Complexo formado entre o BHA e a  $\alpha$ -CD:*

O BHA exibe um único estágio de decomposição, devido à sua volatilização. A 185°C, o BHA é totalmente volatilizado (Figuras 4.32 e 4.33).



**Figura 4.32** - Curvas termogravimétricas dos componentes puros, complexos de inclusão e misturas físicas, preparadas na proporção molar de 1:1 (BHA:α-CD).



**Figura 4.33** - Curvas termogravimétricas dos componentes puros, complexos de inclusão e misturas físicas, preparadas na proporção molar de 1:2 (BHA:α-CD).

Os termogramas obtidos (Figuras 4.32 e 4.33) demonstram haver pouca (pois pode haver uma quantidade de BHA não complexado que se volatilizou) ou nenhuma formação do complexo entre o BHA e a α-CD. Mas como foi dito pelos testes anteriores a afinidade entre o BHA e a α-ciclodextrina era baixa (comprovado pela sua baixa constante de

equilíbrio) e os testes de DSC também não puderam ser totalmente conclusivos a respeito da complexação entre os dois.

Na Tabela 4.22, são apresentados os estágios de decomposição, faixas de temperaturas e perda de massa dos componentes puros, complexos de inclusão e misturas físicas.

**Tabela 4.22** - Resultados das curvas termogravimétricas para os componentes puros e os produtos obtidos na preparação dos complexos de inclusão

Sistema	Técnica	Estágio	TGA (faixa de temperatura, °C).	DTG	Perda de massa (%)
<b>BHA</b>	Puro	1	73,92 – 500	183,56	99,85
<b><math>\alpha</math>-ciclodextrina</b>	Puro	1	21,56 – 60,02	49,48	2,7
		2	60,02 – 114,22	82,07	6,2
		3	269,8 – 500	318,98	81,1
<b>BHA: <math>\alpha</math>-CD (1:1)*</b>	Amassamento	1	30,9 – 62,4	51,22	2,82
		2	62,4 – 100,2	77,42	5,13
		3	100,2 – 165,5	143,7	16,2
		4	259,3 – 500	318,4	67,3
<b>BHA: <math>\alpha</math>-CD (1:2)*</b>	Amassamento	1	22,1 – 64,7	53,55	3,14
		2	64,8 – 96,7	79,74	5,27
		3	96,7 – 140,0	128,06	7,62
		4	263,4 – 500,0	317,8	74,4
<b>BHA: <math>\alpha</math>-CD (1:1)*</b>	Mistura	1	26,8 – 65,8	51,22	2,82
	Física	2	65,8 – 96,7	80,3	4,71
		3	96,7 – 160,8	141,4	14,3
		4	263,9 – 500	320,7	69,3
<b>BHA: <math>\alpha</math>-CD (1:2)*</b>	Mistura	1	22,7 – 65,8	53,5	3,16
	Física	2	65,8 – 96,2	80,3	5,02
		3	96,2 – 139,8	127,4	6,55
		4	226,7 – 500	318,9	75,3

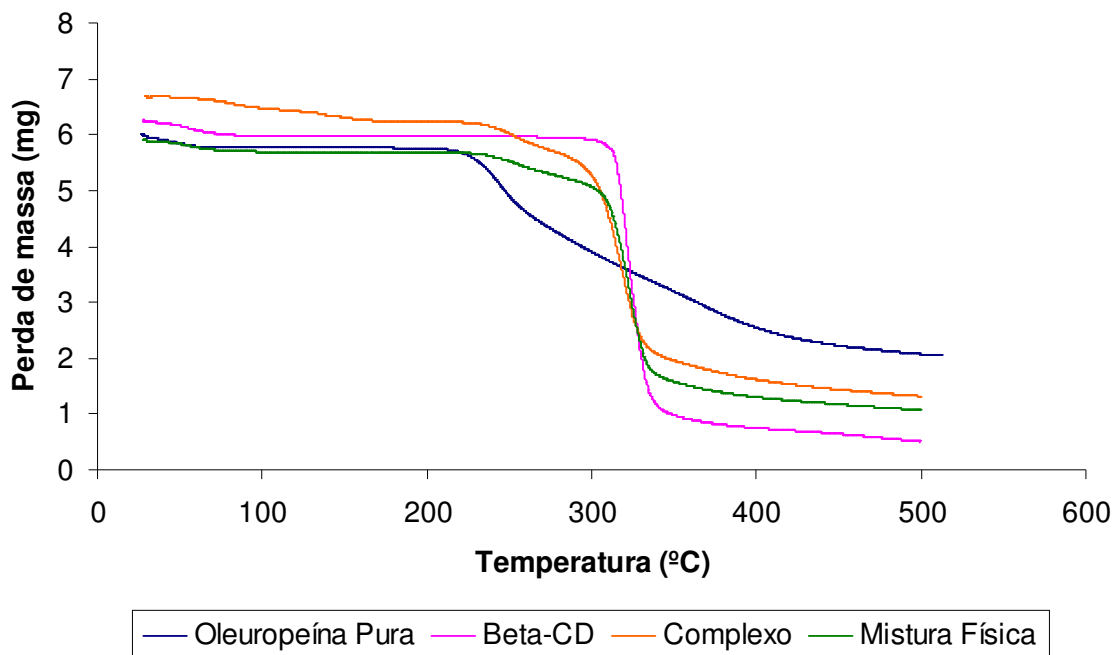
\* razão molar usada na preparação do complexo

#### 4.4.2.2. Para os complexos formados com a $\beta$ -ciclodextrina

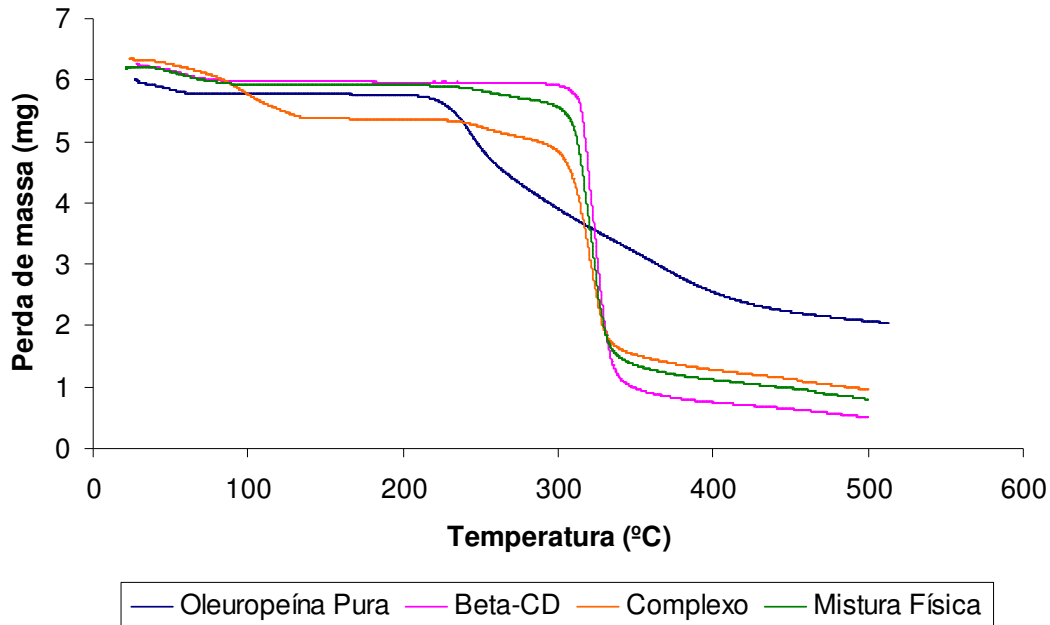
A  $\beta$ -CD apresenta dois estágios de perda de massa: o primeiro correspondente à desidratação da molécula, na faixa de temperatura de 27,39 a 92,07°C, com resultante perda de 4,43% de umidade; e o segundo, relacionado à decomposição da estrutura da  $\beta$ -CD, com perda de 87,1% de massa, na faixa de temperatura de 280,3 a 500°C (Figuras 4.34 e 4.35).

##### a) Complexo formado entre a oleuropeína e a $\beta$ -CD

A oleuropeína exibe três estágios de decomposição (Tabela 4.23). O primeiro estágio se refere à perda de água, a 203°C, a oleuropeína começa a se decompor e a 330°C, grande quantidade de oleuropeína já é volatilizada (Figura 4.34 e 4.35).



**Figura 4.34** - Curvas termogravimétricas dos componentes puros, complexos de inclusão e misturas físicas, preparadas na proporção molar de 1:1 (oleuropeína: $\beta$ -CD).



**Figura 4.35** - Curvas termogravimétricas dos componentes puros, complexos de inclusão e misturas físicas, preparadas na proporção molar de 1:2 (oleuropeína:  $\beta$ -CD).

Pela análise das curvas na preparação 1:1, observa-se a formação do complexo, já que o pico da degradação do produto está em temperaturas maiores se comparado com a substância pura, mas no caso da mistura física se houve a interação, foi mais fraca. As quedas iniciais de massa podem ter ocorrido por ter alguma oleuropeína que não estava complexada ou devido à perda de água (Figuras 4.34 e 4.35).

Na preparação 1:2, como foi dito, algum tipo de reação ocorreu na formação do complexo, constatado pelos termogramas de DSC, e pelas análises de TGA no intervalo onde esse pico ocorre, verifica-se que não há perda de massa significativa confirmando a formação do complexo.

Na Tabela 4.23, são apresentados os estágios de decomposição, faixas de temperaturas e perda de massa dos componentes puros, complexos de inclusão e misturas físicas.



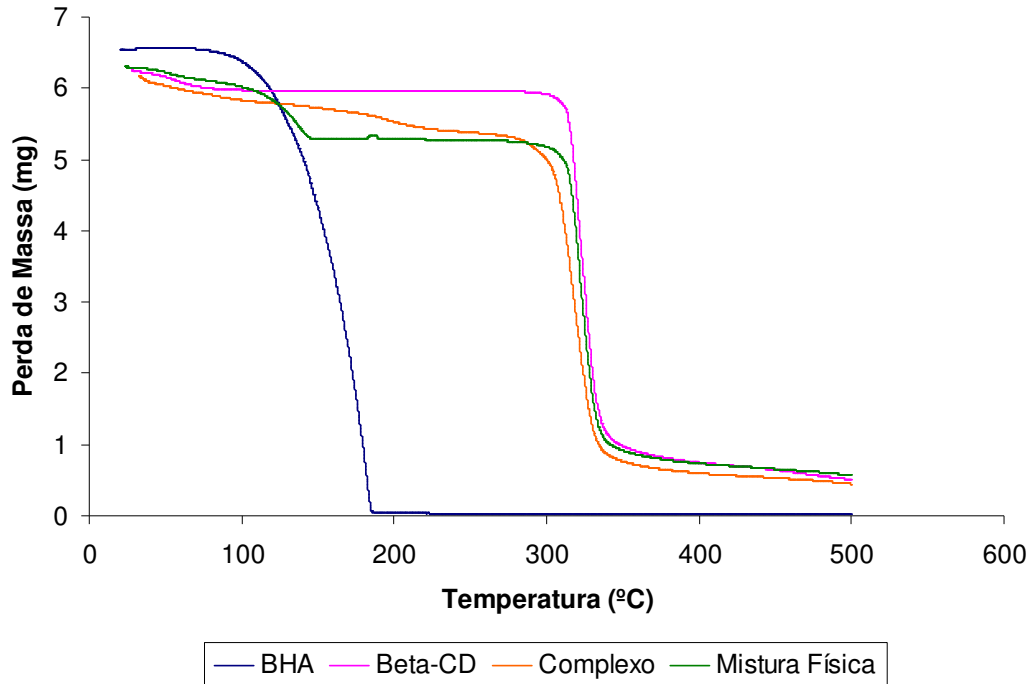
**Tabela 4.23** - Resultados das curvas termogravimétricas para os componentes puros e os produtos obtidos na preparação dos complexos de inclusão.

Sistema	Técnica	Estágio	TGA (faixa de temperatura, °C).	DTG	Perda de massa (%)
<b>Oleuropeína</b>	Puro	1	26,18 – 87,25	43,71	4,13
		2	329,65 – 511,1	243,95	38,17
		3	329,65 - 500	369,45	23,59
<b>β-ciclodextrina</b>	Puro	1	27,39 – 92,07	54,13	4,43
		2	280,3 – 500	321,89	87,10
<b>Oleuropeína: β-CD (1:1)*</b>	Amassamento	1	27,9 – 116,5	82,07	3,76
		2	117,0 – 182,4	136,8	2,83
		3	182,5 – 275,6	252,04	7,8
		4	275,7 – 500,0	317,8	65,8
<b>Oleuropeína: β-CD (1:2)*</b>	Amassamento	1	23,3 – 135,7	96,6	15,43
		2	136,0 – 230,0	165,7	0,75
		3	230,0 – 290,2	253,2	6,0
		4	290,2 – 500	320,72	63,14
<b>Oleuropeína: β-CD (1:1)*</b>	Mistura	1	26,8 – 96,1	52,4	3,49
	Física	2	201,6 – 285,5	252,6	8,1
		3	286,0 – 500,0	321,9	70,2
<b>Oleuropeína: β-CD (1:2)*</b>	Mistura	1	20,4 – 99,1	59,95	4,30
	Física	2	207,5 – 297,2	264,26	5,28
		3	297,3 – 500	320,72	77,5

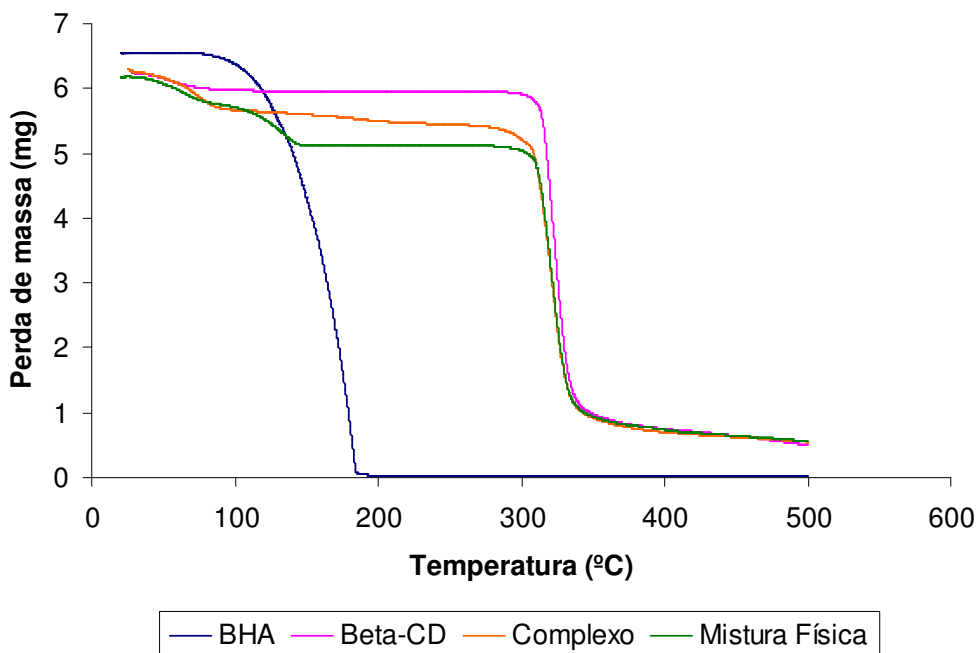
\*razão molar usada na preparação do complexo

*b) Complexo formado entre o BHA e a β-CD*

O BHA exibe um único estágio de decomposição, devido a sua volatilização. A 185°C, o BHA é totalmente volatilizado (Figuras 4.36 e 4.37).



**Figura 4.36** - Curvas termogravimétricas dos componentes puros, complexos de inclusão e misturas físicas, preparadas na proporção molar de 1:1 (BHA:β-CD).



**Figura 4.37** - Curvas termogravimétricas dos componentes puros, complexos de inclusão e misturas físicas, preparadas na proporção molar de 1:2 (BHA:β-CD).

A partir dos termogramas mostrados nas Figuras 4.36 e 4.37, pode-se verificar que os complexos de inclusão não apresentam o estágio de volatilização do BHA livre (mais

visível no complexo 1:1), o que demonstra a formação do complexo de inclusão. A liberação do BHA da cavidade da  $\beta$ -ciclodextrina ocorre na mesma faixa de decomposição da  $\beta$ -CD, sendo portanto, quase impossível distinguir as decomposições das moléculas hóspede e hospedeira. Já os termogramas das misturas físicas aparentemente demonstram não ter ocorrido formação.

Na Tabela 4.24, são apresentados os estágios de decomposição, faixas de temperaturas e perda de massa dos componentes puros, complexos de inclusão e misturas físicas.

**Tabela 4.24** - Resultados das curvas termogravimétricas para os componentes puros e os produtos obtidos na preparação dos complexos de inclusão.

Sistema	Técnica	Estágio	TGA (faixa de temperatura, °C).	DTG	Perda de massa (%)
<b>BHA</b>	Puro	1	73,92 – 500	183,56	99,85
<b><math>\beta</math>-CD</b>	Puro	1	27,39 – 92,07	54,13	4,43
		2	280,3 – 500	321,89	87,10
<b>BHA: <math>\beta</math>-CD (1:1)*</b>	Amassamento	1	30,9 – 225,84	195,58	12,18
		2	226,0 – 500,0	317,81	80,44
<b>BHA: <math>\beta</math>-CD (1:2)*</b>	Amassamento	1	24,5 – 104,9	73,9	10,26
		2	124,1 – 264,0	-	1,24
		3	264,1 – 500	320,72	77,4
<b>BHA: <math>\beta</math>-CD (1:1)*</b>	Mistura Física	1	22,7 – 146,2	135,6	15,9
		2	173,7 – 208,0	187,4	0,17
		3	287,3 – 500	319,6	73,9
<b>BHA: <math>\beta</math>-CD (1:2)*</b>	Mistura Física	1	19,9 – 92,1	64,61	7,07
		2	92,1 – 150,35	133,28	9,87
		3	261,1 – 500,0	320,7	74,0

\*razão molar usada na preparação do complexo

Pelas análises das figuras podemos então confirmar os resultados anteriores que nos mostraram a maior afinidade da oleuropeína com as ciclodextrinas, principalmente pela  $\beta$ -

CD (conforme verificado pelo cálculo da constante de equilíbrio de formação), e também da não afinidade do BHA com a  $\alpha$ -CD, já que obtivemos uma baixa constante de equilíbrio e também nenhuma interação entre os gráficos de TGA e DSC entre esses compostos. Para o BHA e a  $\beta$ -CD além do maior valor da constante de equilíbrio obtida, ainda verificamos a interação entre ambos os compostos pelos testes de TGA e DSC.

Dessa maneira, verificamos que a formação do complexo de inclusão entre os antioxidantes com a  $\beta$ -CD, além de ser de fácil preparação, mostra-se vantajosa, principalmente se levarmos em conta o preço da  $\beta$ -CD quando comparada com a  $\alpha$ -CD e também o alto valor comercial da oleuropeína.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSÃO

As principais conclusões obtidas com a realização deste trabalho são apresentadas a seguir:

- A técnica de determinação da constante de complexação de uma substância, pela competição com outra que também forma complexo, permitindo a determinação da quantidade de complexo formado, é relativamente fácil de ser aplicada e produz resultados confiáveis, já que dentro de faixas adequadas de concentrações há uma boa concordância entre a Teoria da Complexação e os resultados experimentais obtidos.
- As condições ótimas para a determinação da constante de equilíbrio entre o corante alaranjado de metila e as ciclodextrinas foram obtidas. O comprimento de onda máximo utilizado deve ser em 500 nm com as soluções em pH 3,0 e concentração máxima de corante de  $0,045 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .
- A constante de complexação do alaranjado de metila (AM) com as ciclodextrinas (CDs) foram estimadas usando-se a Teoria da Complexação, obtendo os valores de  $4577,2 \text{ M}^{-1}$  e  $952,00 \text{ M}^{-1}$  para as constantes entre o AM: $\alpha$ -CD e AM: $\beta$ -CD, respectivamente. Em ambos os casos, a absorvidade molar do corante AM diminuiu mais de um terço ao ser complexado e verificamos também a maior afinidade entre o corante alaranjado de metila pela  $\alpha$ -CD.
- As constantes de complexação da oleuropeína com a  $\alpha$ -CD e a  $\beta$ -CD foram estimadas usando-se a Teoria da Complexação, obtendo-se os valores de  $1352,4 \text{ M}^{-1}$  e  $1827,89 \text{ M}^{-1}$ , respectivamente. Este valor foi estimado ajustando-se o modelo proposto neste trabalho Equação (4.13) aos dados de absorvância de soluções de diferentes concentrações das CDs, na presença do alaranjado de metila. Nesse teste verificamos a maior afinidade entre a oleuropeína com a  $\beta$ -CD, provavelmente ao melhor ajuste da molécula de oleuropeína na cavidade da  $\beta$ -CD.
- Para o cálculo da constante de equilíbrio entre as ciclodextrinas e o butil hidroxianisol (BHA), utilizando-se a metodologia de diagrama de solubilidade de fases proposta por HIGUCHI & CONNORS (1965), foram obtidos os valores de 49,31

$M^{-1}$  e 585,03 para a  $\alpha$ -CD e a  $\beta$ -CD, respectivamente.

- Utilizando-se o mesmo método, observou-se que na presença da CD a solubilidade do BHA aumenta 620% na presença de  $\alpha$ -CD e 126% na presença de  $\beta$ -CD.
- Nos testes envolvendo os complexos entre o BHA com as CDs, deve-se levar em consideração qual será a finalidade do BHA. Caso queria proteger a molécula de agentes externos a utilização da  $\beta$ -CD mostra-se mais adequada, mas caso queria aumentar a solubilidade do BHA em água é preferível à utilização da  $\alpha$ -CD.
- Obtidos os supostos complexos de inclusão, esses foram caracterizados por calorimetria diferencial de varredura (DSC), análise termogravimétrica (TGA) e termogravimetria derivativa (DTG).
- Os termogramas de DSC entre a oleuropeína e a  $\alpha$ -CD mostraram fracas interações e a interpretação ficou dificultada, pois os picos relativos ao ponto de fusão das substâncias eram muito próximos. Mas na análise dos picos de ebulição houve o desaparecimento dos picos dos complexos de inclusão, indicando formação do complexo. Nos termogramas de mistura física observou-se uma queda mais acentuada dos picos, mas a interpretação ficou dificultada novamente.
- Pelo DSC do BHA e da  $\alpha$ -CD, pôde-se verificar que não houve interação de nenhum tipo entre os compostos, já que os picos, tanto do complexo quanto das misturas físicas mostraram-se bem acentuados. Na preparação 1:2, pode-se observar uma menor formação do pico, o que indica que com as ciclodextrinas com cavidades maiores ou aumentando-se a proporção de  $\alpha$ -CD, poderia ocorrer a formação do complexo (como foi confirmado com a  $\beta$ -CD).
- Nas interações entre a oleuropeína e a  $\beta$ -CD, pôde-se confirmar a formação do complexo na preparação 1:2, pois os picos de fusão e ebulição desaparecem por completo. Nos demais casos, ocorreram fracas interações novamente, uma vez que os picos correspondentes apareceram atrasados quando comparados com os da substância pura. Na análise entre o BHA e a  $\beta$ -CD, no complexo de inclusão (tanto na preparação 1:1, quanto 1:2), observou-se o desaparecimento do pico de fusão do BHA puro (indicação de formação do complexo), enquanto para os termogramas das misturas físicas dos compostos este pico aparece bem definido (principalmente na preparação 1:1).

- Pelos testes de análise termogravimétrica (TGA) envolvendo a  $\alpha$ -CD, ou a  $\beta$ -CD, e a oleuropeína, a volatilização deste último composto ocorreu de forma mais lenta em temperaturas maiores, indicando a formação de complexo.
- Já no caso entre o BHA e a  $\alpha$ -CD, novamente parece haver pouca ou nenhuma interação entre ambos. Mas para o BHA e a  $\beta$ -CD verificou-se que os complexos de inclusão não apresentaram o estágio de volatilização do BHA livre (mais visível no complexo 1:1), o que demonstra a formação do complexo de inclusão.
- E finalizando, a partir de todos esses resultados obtidos, podemos concluir que a complexação mostra-se vantajosa já que protege os compostos de aumentos de temperaturas (ainda mais para a oleuropeína, devido a ser um produto de elevado custo e difícil obtenção). As melhores preparações envolveram a utilização da  $\beta$ -CD, que do ponto de vista econômico também é vantajoso já que é a ciclodextrina com menor valor de venda no mercado.

## CAPÍTULO VI

### SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A seguir são apresentadas algumas sugestões que poderão ser estudadas dando continuidade a esse trabalho:

- ✓ Utilizar a  $\gamma$ -ciclodextrina ou as ciclodextrinas modificadas e verificar o comportamento da oleuropeína e do BHA.
- ✓ Utilizar outros métodos de preparação dos complexos, como a liofilização e a atomização.
- ✓ Realizar testes para verificar a influência da luz e do oxigênio nas substâncias puras e nos complexos obtidos.
- ✓ Utilizar a técnica com corantes na determinação da constante de equilíbrio entre o BHA e as ciclodextrinas.
- ✓ Fazer a adição dos componentes puros e complexados em alimentos (por exemplo, em óleos, azeites e derivados) e verificar o comportamento relacionado à estabilidade e melhoria na qualidade dos produtos alimentícios.
- ✓ Estudos “in vitro” de aplicação na área farmacológica, principalmente com a oleuropeína.



## CAPÍTULO VII

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em 17 de janeiro de 2008.

AL-MARZOUQI AH, JOBE B, DOWAIDAR A, MAESTRELLI F, MURA P. *Evaluation of supercritical fluid technology as preparative technique of benzocaine-cyclodextrin complexes- Comparison with conventional methods*. J Pharm Biomed Anal, vol. 43, p. 566-74, 2007.

ANDREADOU, I., ILIODROMITIS, E. K., MIKROS, E., CONSTANTINO, M., AGALIAS A., MAGIATIS, P., SKALTSOUNIS, A. L., KAMBER, E., TSANTILIKAKOULIDOU, A. & DIMITRIOS TH KREMASTINOS. *The olive constituent oleuropein exhibits Anti-Ischemic, antioxidative, and hypolipidemic effects in anesthetized rabbits*. J. Nutr., vol. 138, p. 1074 – 1078, 2008.

Azeite de Oliva Espanhol. *Classificação dos azeites de oliva virgem*. Disponível em: <http://www.azeite.com.br>. Acesso em 20 de agosto de 2007.

BANERJEE, U. C; & SINGH, M. SHARMA, R. *Biotechnological applications of cyclodextrins*. Biotechnol. Adv., vol. 20, p. 341-359, 2002.

BEKERS, O.; UIJTENDAAL, E.V.; BEIJNEN, J. H.; BULT, A.; UNDERBERG, W. J. M. *Cyclodextrins in the pharmaceutical field*. Drug Development and Industrial Pharmacy, vol.17. p. 1503-1549, 1991.

BENAVENTE-GARCIA O, CASTILLO, J., LORENTE, J., ORTUÑO, A. & DEL RIO, J. A. *Antioxidant activity of phenolics extracted from Olea europaea leaves*. Food Chemistry, vol. 68, p. 457-462, 2000.

CERESTAR. *CDs – a unique form of starch*. Disponível em: <http://www.betacyclodextrin.com>. Consultado em: 12 de dezembro de 2007.

CASTILLO, J.A., PALOMO-CANALES, J., GARCIA, J.J., LASTRES, J.L., BOLAS, F., TORRADO, J.J., *Preparation and Characterization of Albendazole  $\beta$ -Cyclodextrin Complexes*, Drug Dev. Ind. Pharm., vol. 25, p. 1241-1248, 1999.

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

CUNHA-FILHO MSS, LANDÍN M, MARTÍNEZ-PACHECO R, DACUNHA-MARINHO B.  $\beta$  Lapachone. *Acta Crystallogr C.*, vol. 62(Pt 8), p. 473-547, 2006.

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

DDINE, S. C., *Desenvolvimento do método de dosagem colorimétrica da  $\gamma$ -ciclodextrina com alfa-naphtholphthaleína*. Relatório Final do PIBIC-UEM, Maringá – Paraná, 2003.

DUCHÊNE, D. *New trends in pharmaceutical applications of cyclodextrin inclusion compounds*. In: Huber, O. e Szejtli, J (eds). Proceedings of the Fourth International Symposium on Cyclodextrins. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 265-275, 1988.

EFMORFOPOULOU, E. & RODIS P. *Complexation of oleuropein and trans-cinnamic acid with cyclodextrins*. Chemistry of Natural Compounds, vol. 40, nº. 4, p. 362-366, 2004.

EFMORFOPOULOU, E. & RODIS P. *Application of cyclodextrins to the extraction of antioxidant compounds from olive oil*. Chemistry of Natural Compounds, vol. 41, nº. 1, p. 22-26, 2005

EXTRASYNTHÈSE. *Pure chemical manufacturer*. Disponível em: <http://www.extrasynthese.com/catalogue/iridoids/oleuropein,r21,p10461.html>. Acesso em 17 de novembro de 2007.

FIELDING L. *Determination of Association Constant (Ka) from Solution NMR Data*. Tetrahedron, vol. 56; p. 6151-70, 2000.

FRÖMMING, K. & SZEJTLI, J. *Cyclodextrins in Pharmacy*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 1-104, 1994.

GAVA, A. J. *Princípios da Tecnologia de Alimentos*. Editora Nobel, p. 284, 2002.

GIKAS, E. *Informações pessoais*. Universidade de Atenas, email: [vgik@gnhm.gr](mailto:vgik@gnhm.gr). 2007

GENNARO, L., BOCCA, A. P., MODESTI, D. MASELLA, R. & CONI, E. Effect of biophenols on olive oil stability evaluated by thermogravimetric analysis. J. Agric. Food Chem., vol. 46, p. 4465-4469, 1998.

HAMON, V. & MORAES, F. F., *Etude Preliminare a L'Immobilisation de L'Enzime CGTase WACKER*. Relatório de Pesquisa. Laboratoire de Techonologie Enzymatique, Université de Techonologie de Compiègne, Compiègne, France, p. 234, 1990.

HIGUCHI, T., CONNORS, K. A. *Phase solubility techniques (Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation)*. Wiley Interscience, p. 117-212, 1965.

HIGUTI, I. H. & SILVA, P. A., PAPP, J. *Colorimetric determination of alpha and beta-cyclodextrins and studies on optimization of CGTase production from B. firmus using factorial designs*. Braz. Arch. Biol. Technol. [online]. vol. 47, nº. 6, p. 837-841, 2004.

HIRAI, H. TOSHIMA, N. & UENOYAMA, S. *Inclusion complex formation of  $\gamma$  Cyclodextrin. One host-two guest complexation with water-soluble dyes in ground state*. Bull. Chem. Soc. Japan, vol. 58, p. 1156-1164, 1985.

HIRAYAMA, F. & UEKAMA, K. *Cyclodextrins and their Industrial Uses*. Ed. D. Duchêne. Chap 4. Paris: Editions de Santé, p. 133-172, 1987.

HUANG, S. L., ZHANG, L., HUANG, P. L., CHANG, Y. & HUANG, P. L. *Anti-HIV activity of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression by HIV-Infection and OLE treatment*. Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 307, p. 1029–1037, 2003

ILIESCU T, BAIA M, MICLAUS V. *A Raman spectroscopic study of the diclofenac sodium-b-cyclodextrin interaction*. Eur J Pharm Sci, vol. 22, p. 487-495, 2004.

JUNCO S, CASIMIRO T, RIBEIRO N, DA PONTE MN, MARQUES HC. *A comparative study of naproxen - beta cyclodextrin complexes prepared by conventional methods and using supercritical carbon dioxide*. J Incl Phenom Mol Recognit Chem, vol. 44, p.117-121, 2002

KARATHANOS V. T., MOURTZINOS, I., SALTA, F., YANNAKOPOULOU, K. & CHIOU, A. *Encapsulation of Olive Leaf Extract in  $\beta$ -Cyclodextrin*. J. Agric. Food Chem, vol. 55, p.8088–8094, 2007.

LIMA, H.O.S. *Estudo da encapsulação de fármacos de primeira linha no tratamento da tuberculose em lipossomas e ciclodextrinas*. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, p. 34 – 42, 2001.

LOFTSSON, T. *Cyclodextrins in Pharmaceutical Formulations*. A report prepared for Nordic Industrial Fund, p. 35, 1998.

MAKELA, M. J. KORPELA, T. K., PUISTO, J. & LAAKSO V. S. *Nonchromatographic Cyclodextrin Assays: Evaluation of Sensitivity, Specificity, and Conversion Mixture Applications*. J. Agric. Food Chem., vol. 36, p.83-88, 1988.

MANZOORI JL, ABDOLMOHAMMAD-ZADEH H, AMJADI M. *Study on the inclusion complex between  $\beta$ -cyclodextrin and celecoxib by spectrofluorimetry and its analytical application*. Farmaco, vol. 60, p. 575-581, 2005.

MARTINS, F. *Estudo do processo de encapsulação do bioaroma de gorgonzola por  $\beta$ -ciclodextrina e por lipossomas*. Exame da Qualificação para o Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, p. 142, 2002.

MARTINS, F. P. *Informações pessoais*. Universidade do Porto, email: mpmartin@fc.up.pt, 2007.

MARTINS, F. P. & GORDON, M. *Isolation and Characterization of the Antioxidant Component 3,4-Dihydroxyphenylethyl 4-formyl-3-formylmethyl-4-hexenoate from Olive (*Olea europaea*) Leaves*. J. Agric. Food Chem., vol. 49, p. 4214-4219, 2001.

MARTINS, F. P. & GORDON, M. *Enriched refined olive oil with olive tree phenolic compounds*. Anais do 7º Encontro de Química de Alimentos, Viseu, 2005.

MARTINS, F. P. & PINTO, M. *Isolation and Characterization of a new hydroxytyrosol derivative from olive (Olea europaea) leaves*. J. Agric. Food Chem., vol. 56, p. 5582-5588, 2008.

MORIWAKI, C. FREGADOLLI, P.H. *Estudo da dessorção da  $\gamma$ -ciclodextrina em coluna cromatográfica contendo glicirrizina como ligante*. Relatório do PIBIC.UEM Maringá, Paraná, 2001.

PALAKODATY S. & YORK P. *Phase behavioral effects on particle formation processes using supercritical fluids*. Pharm Res, vol 16, nº 7, p.976-85, 1999.

RAMALHO, V. & JORGE, N. *Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos*. Quim. Nova, vol. 29, nº. 4, p. 755-760, 2006.

WALTER, W. M., FLEMING, H. P., ETCHELLS, J. L. *Preparation of antimicrobial compounds by hydrolysis of oleuropein from green olives* Applied Microbiology, vol. 26, nº 5, p. 773-776, 1973.

WATANABE, S. *Determinação da Constante de Complexação da Glicirrizina com a  $\gamma$ -Ciclodextrina*. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Maringá, p. 46 a 50, 2005.

WATANABE, S., ZANIN, G. M., MORAES, F. F de, VIII SEMINÁRIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS, Maringá, 5 a 9 de dezembro de 2005, Trabalho Oral nº 50, p. 14, 2005.

SOUZA, E. C. M. & MORAES, F.F. *Separação de ciclodextrinas*. Relatório Parcial do PIBIC-UEM, Maringá Paraná, 2005.

SZEJTLI, J. *Cyclodextrin Technology*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 1-185, 1988.

TARDIOLI, P. W. *Produção de ciclodextrinas em reator de leito fluidizado com a enzima ciclodextrina glicosiltransferase imobilizada*. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Maringá, p. 66, 67, 85-87, 1998.

TAWARAH, K. & KHOURY, S. *Determination of the stability and stoichiometry of p-methyl red inclusion complexes with  $\gamma$ -cyclodextrin*. *Dyes and Pigments*, vol. 45, p. 229-233, 2000.

VISIOLI F., BELLOMO G., MONTEDORO G., GALLI C. *Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents*. *Atherosclerosis*, vol. 117, p. 25-32, 1995.

VORA, J., BOROUJERDI, M. *Enhanced aqueous solubility of phenolic antioxidants using modified  $\beta$ -cyclodextrins*. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, vol. 21, p. 495-502, 1995.

WALTER W. M. FLEMING, H. P. & ETCHELLS J. P. *Preparation of antimicrobial compounds by hidrolysis of oleuropein from green olives*. *Applied Microbiology*, vol 26, nº05, p. 773-779, 1973.

YILMAZ , V. T.; KARADAG, A.; IÇBUDAK, H. *Thermal decomposition of  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes of ferrocene and their derivatives*. *Thermochimica Acta*, vol. 261, p. 107-118, 1995.

YUEXIAN, F. YU, Y., SHAOMIN, S. & CHUAN, D. Molecular recognition of  $\alpha$ -cyclodextrin (CD) to choral amino acids bases on methyl orange as a molecular probe. *Spectrochimica Acta, Part A*, vol 61, p 953-959, 2005.

ZIA V, RAJEWSKI RA, STELLA VJ. *Effect of cyclodextrin charge on complexation of neutral and charged substrates: comparison of sulfobutyl ether- $\beta$ -cyclodextrin to hydroxypropyl  $\beta$ -cyclodextrin*. *Pharm Res*, vol 18(5), p. 667-673, 2001.



## CAPÍTULO VIII

### ANEXO

#### ANEXO 8.1. - TEORIA DA COMPLEXAÇÃO DO ALARANJADO DE METILA COM A $\alpha$ -CD e $\beta$ -CD

A determinação da concentração de  $\alpha$ -CD e  $\beta$ -CD utilizando o método de dosagem colorimétrico pelo alaranjado de metila (AM), baseia-se na formação de um complexo entre o corante e a molécula de CD, que causa diminuição da absorção colorimétrica da solução no comprimento de onda de 500 nm.

Como os complexos CD-AM possuem uma absorvância diferente do AM livre, é possível quantificar a CD presente na amostra. No entanto, a relação entre a absorvância e a concentração de CD, somente permanece linear para baixas concentrações. Acima deste limite, faz-se necessário o uso da Teoria da Complexação, que fornece a relação não-linear entre a absorvância e a concentração de CD, como descrito por HAMON & MORAES (1990). No entanto, é também viável a utilização da teoria da complexação mesmo abaixo desses limites com o objetivo de se alcançar uma precisão ainda maior na dosagem da CD que aquela obtida pela relação linear.

Essa teoria foi utilizada por TARDIOLI (1998) para a determinação da concentração de  $\beta$ -CD usando-se o método colorimétrico com fenolftaleína, com algumas modificações propostas por SOUZA & MORAES (2005), para determinação da concentração de  $\gamma$ -CD, com o verde de bromocresol.

Assumindo-se a formação de um complexo com apenas uma molécula hóspede (o AM) e uma molécula hospedeira (a  $\alpha$ -CD ou a  $\beta$ -CD), e tratando-se a formação do complexo como uma reação reversível que está em equilíbrio na solução de dosagem, obtém-se:



onde:

c = concentração total de alaranjado de metila em M;

(c - t) = concentração de alaranjado de metila livre em M;

t = concentração do complexo ciclodextrina – alaranjado de metila em M;

$x$  = concentração total da ciclodextrina em M;

$(x - t)$  = concentração da ciclodextrina livre em M.

Estando a reação de complexação na Equação (8.1) em equilíbrio, define-se a constante de equilíbrio termodinâmico ( $K_{CD}$ ) segundo a Equação (8.2):

$$K_{CD} = t / [ (c-t) (x-t) ] \quad (8.2)$$

Isolando-se  $t$  e  $x$  a partir da Equação (8.2), resulta:

$$t = (1/2)\{(c + x + 1 / K_{CD}) - [(c + x + 1/K_{CD})^2 - 4 c x]^{1/2}\} \quad (8.3)$$

e:

$$x = t \{ 1 + 1 / [K_{CD} (c - t)] \} \quad (8.4)$$

Chamando-se a concentração de alaranjado de metila livre de  $y$ , isto é,

$$y = c - t \quad (8.5)$$

e sabendo-se que o complexo CD-AM é de cor menos intensa, isto é, sua absorvância molar específica,  $\sigma$ , é menor que a absorvância molar específica do AM puro,  $\sigma_0 = (ABS_0 / c)$ , ou seja:

$$\sigma < [ \sigma_0 = (ABS_0 / c) ] \quad (8.6)$$

conclui-se que a absorvância da solução de dosagem é devida a duas contribuições, a primeira proporcional à concentração de alaranjado de metila livre, e a segunda, proporcional à concentração do complexo CD-AM<sup>1</sup>:

Concentração da solução de AM		Absorvância da solução de AM
AM total = $c$	→	$ABS_0 = c \sigma_0 = c (ABS_0 / c) = ABS_0$
Concentração da solução de AM e CD		Absorvância da solução de AM e CD
AM livre = $y$ ; AM complexado = $t$	→	$ABS = y \sigma_0 + t \sigma \quad (8.7)$

logo:

$$ABS = y (ABS_0 / c) + t \sigma \quad (8.8)$$

Isolando-se  $t$  da Equação (8.5) e substituindo na Equação (8.8), fornece:

$$ABS = y (ABS_0 / c) + \sigma (c - y) \quad (8.9)$$

Agora, isolando-se  $y$ , obtém-se:

$$y = c (ABS - c \sigma) / (ABS_0 - c \sigma) \quad (8.10)$$

onde:

$ABS$  = absorvância da solução de dosagem na presença de ciclodextrina

$ABS_0$  = absorvância da solução de dosagem na ausência de ciclodextrina

cxix \_\_\_\_\_

<sup>1</sup> OBS: A absorvância das outras espécies químicas em solução é desprezível.

$\sigma$  = absorvância molar específica do complexo CD-AM

Substituindo-se  $t = (c - y)$  e  $(c - t) = y$  nas Equações (8.3) e (8.4) tem-se:

$$y = \frac{1}{2} \{ [c - (x + 1/K_{CD})] + [(c + x + 1/K_{CD})^2 - 4cx]^{1/2} \} \quad (8.11)$$

ou equivalentemente:

$$y = (1/2K_{CD}) \{ -[1 + K_{CD}(x - c)] + [(1 + K_{CD}(x - c))^2 + 4K_{CD}c]^{1/2} \} \quad (8.12)$$

e:

$$x = (c - y) [1 + 1/(Ky)] \quad (8.13)$$

Substituindo a Equação (8.10) nas Equações (8.11) e (8.13) obtém-se, respectivamente:

$$ABS = c\sigma + \{ (ABS_0 - c\sigma)(c - (x + 1/K_{CD}) + [(c + (x + 1/K_{CD})^2 - 4cx]^{1/2}) / (2c) \} \quad (8.14)$$

e:

$$x = c [1 - (ABS - c\sigma) / (ABS_0 - c\sigma)] \{ 1 + (ABS_0 - c\sigma) / [K_{CD}c(ABS - c\sigma)] \} \quad (8.15)$$

As Equações (8.14) e (8.15) servem respectivamente para o cálculo da absorvância da solução de dosagem ou da concentração de CD na amostra.

No método de determinação da CD, a leitura da absorvância da solução nas condições de dosagem é realizada usando-se como referência uma amostra que contenha somente o tampão, logo sem CD, e por isso a medida é de fato:

$$DABS = ABS - ABS_0 \quad (8.16)$$

Isolando-se ABS da Equação (8.16) e aplicando-se nas Equações (8.14) e (8.15) resulta, respectivamente:

$$DABS = (c\sigma - ABS_0) + \{ (ABS_0 - c\sigma)(c - (x + 1/K_{CD}) + [(c + (x + 1/K_{CD})^2 - 4cx]^{1/2}) / (2c) \} \quad (8.17)$$

e:

$$x = c [1 - (DABS + ABS_0 - c\sigma) / (ABS_0 - c\sigma)] \{ 1 + (ABS_0 - c\sigma) / [K_{CD}c(DABS + ABS_0 - c\sigma)] \} \quad (8.19)$$

### **Cálculo da concentração de ciclodextrina de uma amostra**

Toma-se a amostra na qual se deseja determinar a concentração de CD e segue-se o procedimento de dosagem descrito no item 3.2.1.3, obtendo-se o valor da absorvância para a amostra (DABS). Em seguida, aplica-se à Equação (8.20), obtida pela multiplicação do valor de x da Equação (8.19) por 1200, resultante da diluição da amostra nas condições do teste de 2,5 a 3,0 mL, isto é 5:6, e da expressão da concentração de CD da mesma amostra em mM.

$$C_{CD} = 1200 \cdot a \cdot \left( 1 - \frac{DABS + ABS_0 - a \cdot \sigma}{ABS_0 - a \cdot \sigma} \right) \cdot \left( 1 + \frac{ABS_0 - a \cdot \sigma}{K \cdot a \cdot (DABS + ABS_0 - a \cdot \sigma)} \right) \quad (8.20)$$

onde:

$c$  = concentração total de alaranjado de metila nas condições de dosagem. A solução de alaranjado de metila  $0,27 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  sofre uma diluição de 6,0 vezes nas condições de dosagem, sendo, portanto, sua concentração final igual a  $0,045 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ;

DABS = absorvância da amostra nas condições de dosagem, lida a 500 nm, usando-se como referência uma amostra que contenha somente o tampão, logo sem CD;

$C_{CD}$  = concentração de CD na amostra, expressa em  $\times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ;

$K_{CD}$  = constante de equilíbrio da formação do complexo CD – AM;

SOUZA & MORAES (2005) aperfeiçoaram o procedimento de ajuste dos dados para obtenção da curva de calibração da dosagem. O novo processo de cálculo será descrito na seção seguinte, 8.1.1.

### 8.1.1. Ajuste do cálculo da constante de equilíbrio ( $K_{CD}$ ) e da absorvância molar específica do complexo CD:AM

A seguir apresenta-se o novo procedimento de ajuste que pode ser utilizado para a obtenção dos valores da constante de equilíbrio ( $K_{CD}$ ) e da Absorvância Molar Específica do Complexo CD-AM ( $\sigma$ ).

Simplificando a Equação (8.20), obtém-se:

$$C_{CD} = -1200 c \left( \left[ \frac{DABS}{(ABS_0 - c \sigma)} \right] \left\{ 1 + \frac{(ABS_0 - c \sigma)}{[K_{CD} c (DABS + ABS_0 - c \sigma)]} \right\} \right) \quad (8.21)$$

A Equação (8.20) ainda pode ser adicionalmente simplificada, resultando:

$$C_{CD} = -1200 c DABS \left\{ \frac{1}{(ABS_0 - c \sigma)} + \frac{1}{[K_{CD} c (DABS + ABS_0 - c \sigma)]} \right\} \quad (8.22)$$

Quando DABS tende a 0, para baixas concentrações de CD, a Equação (8.22) tende a forma:

$$C_{CD} = -1200 c DABS \left\{ \frac{1}{(ABS_0 - c \sigma)} + \frac{1}{[K_{CD} c (ABS_0 - c \sigma)]} \right\} \quad (8.23)$$

Colocando-se em evidência o termo  $(c\sigma - ABS_0)$ , resulta:

$$C_{CD} = 1200 c DABS / (c \sigma - ABS_0) [1 + 1 / (K_{CD} c)] \quad (8.24)$$

Efetuando-se a multiplicação da constante  $c$  no numerador, tem-se:

$$C_{CD} = 1200 [(c + 1 / K_{CD}) / (c \sigma - ABS_0)] DABS \quad (8.25)$$

Logo, o coeficiente angular,  $\alpha$ , da reta ajustada,  $y = \alpha x$ , quando DABS tende a 0, onde  $y = C_{CD}$  e  $x = DABS$ , será:

$$\alpha = 1200 (c + 1 / K_{CD}) / (c \sigma - ABS_0) \quad (8.26)$$

Portanto, os valores de  $K_{CD}$  e  $\sigma$  não podem ser independentemente estabelecidos, e a Equação (8.26) define uma relação entre a constante de equilíbrio de formação do complexo AM:CD,  $K_{CD}$ , e a absorção molar específica do complexo,  $\sigma$ .

Reescrevendo a Equação (8.26) como:

$$1/K_{CD} = \alpha (c \sigma - ABS_0) / 1200 - c \quad (8.27)$$

a substituição desta relação na Equação (8.22) elimina um parâmetro a ser determinado:

$$C_{CD} = -1200 c DABS \{ 1/(ABS_0 - c \sigma) + [\alpha (c \sigma - ABS_0) / 1200 - c] / [c (DABS + ABS_0 - c \sigma)] \} \quad (8.28)$$

Simplificando a Equação (8.28), obtém-se:

$$C_{CD} = -DABS [-1200 c DABS + \alpha (c \sigma - ABS_0)^2] / [(c \sigma - ABS_0) (-DABS - ABS_0 + c \sigma)] \quad (8.29)$$

Chamando:

$$\Delta = \sigma - ABS_0 / c = \sigma - \sigma_0 \quad (8.29)$$

a Equação (8.28) pode ser reescrita na forma:

$$C_{CD} = DABS (1200 DABS - \alpha \Delta^2 c) / [\Delta (DABS - c \Delta)] \quad (8.30)$$

onde:

ABS = absorção das amostras com diferentes concentrações de CD, medidas a 500 nm;

ABS<sub>0</sub> = absorção da solução de referência, alaranjado de metila sem CD;

C<sub>CD</sub> = concentração total da CD na amostra;

c = concentração total do corante na cubeta em mol L<sup>-1</sup>;

DABS = ABS – ABS<sub>0</sub>;

$\alpha$  = coeficiente angular da reta ajustada no passo 1, abaixo;

$\Delta = \sigma - \sigma_0$ , o parâmetro de ajuste da Equação. (8.30);

$\sigma$  = absorção molar específica do complexo CD-AM;

$\sigma_0$  = absorção molar específica do corante AM,  $\sigma_0 = ABS_0 / c$ ;

A seguir são apresentadas as etapas para a obtenção do parâmetro  $\Delta$ .

8.1.1.1. *Etapas para determinação dos parâmetros da Equação (8.30) e obtenção da constante de equilíbrio*

**1ª etapa:** para os primeiros pontos da curva, onde a  $C_{CD}$  e a  $DABS$  são pequenas e se observa uma relação linear entre a  $C_{CD}$  e a  $DABS$ , ajusta-se uma reta do tipo  $y = \alpha x$ , onde  $y = C_{CD}$  e  $x = DABS$ .

Este passo fornece o coeficiente angular  $\alpha$ .

**2ª etapa:** com o valor de  $\alpha$  calcula-se o primeiro dos valores limites superiores de  $\Delta$ , dado pela relação:

$$\Delta < 1200 / \alpha$$

**3ª etapa:** o segundo limite superior de  $\Delta$  é dado por

$$\Delta < DABS_{\max} / c$$

onde  $DABS_{\max}$  é o valor de  $DABS$  para o ponto de máxima concentração de  $CD$  e  $c$  é a concentração total do corante na cubeta em  $\text{mol L}^{-1}$ .

Esta última condição surge da análise do denominador da Equação (8.30) que não pode passar pelo valor zero, pois se isto ocorresse, a concentração de  $CD$  tenderia a infinito.

**4ª etapa:** em seguida, substitui-se o valor de  $\alpha$  ajustado no passo 1 e o valor de  $c$  na equação da curva padrão, Equação (8.30), para fazer o ajuste de  $\Delta$ , utilizando-se o maior dos valores, das condições de restrição para  $\Delta$  determinadas nos passos 2 e 3.

**5ª etapa:** a substituição dos valores de  $\Delta$ ,  $c$  e  $\alpha$ , na Equação (8.30), e sua simplificação fornece a curva padrão ajustada.

**6ª etapa:** Pode-se ainda calcular os valores ajustados para a absorção molar específica do complexo,  $\sigma$ , e para a constante de equilíbrio de complexação,  $K_{CD}$ , com as Equações (8.31 e 8.32):

$$\sigma = \Delta + \sigma_0 \tag{8.31}$$

$$K_{CD} = \frac{1}{c \left( \frac{\alpha \cdot \Delta}{1200} - 1 \right)} \tag{8.32}$$