



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

LOUHANA MOREIRA REBOUÇAS

**MICROCÁPSULAS POLISSACARÍDICAS À BASE DE HESPERIDINA E ÁCIDO
BETULÍNICO COENCAPSULADOS**

FORTALEZA

2022

LOUHANA MOREIRA REBOUÇAS

MICROCÁPSULAS POLISSACARÍDICAS À BASE DE HESPERIDINA E ÁCIDO
BETULÍNICO COENCAPSULADOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Química. Área de concentração: Química.

Orientadora: Profa. Dra. Nágila Maria Pontes
Silva Ricardo

Coorientadora: Profa. Dra. Nilce Viana
Gramosa Pompeu de Sousa Brasil

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- R24m Rebouças, Louhana Moreira.
 Microcápsulas polissacarídicas à base de hesperidina e ácido betulínico coencapsulados / Louhana
 Moreira Rebouças. – 2022.
 115 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em
 Química, Fortaleza, 2022.
 Orientação: Profa. Dra. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo.
 Coorientação: Profa. Dra. Nilce Viana Gramosa Pompeu de Sousa Brasil.
1. Ácido betulínico. 2. Hesperidina. 3. Microcápsulas. 4. Polissacarídeos. 5. Leucemia promielocítica. I.
 Título.

CDD 540

LOUHANA MOREIRA REBOUÇAS

MICROCÁPSULAS POLISSACARÍDICAS À BASE DE HESPERIDINA E ÁCIDO
BETULÍNICO COENCAPSULADOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Química.
Área de concentração: Química.

Aprovada em: 12/12/2022

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Mary Anne Sousa Lima
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Marcos Carlos de Mattos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Sílvia Stanisçuaski Guterres
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Profa. Dra. Sônia Maria Costa Siqueira
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

A minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo.

Aos meus pais (*in memoriam*) e a minha mãe Emília pelo amor, incentivo e pelo exemplo.

Ao meu esposo Carlos Helder pelo amor, extrema paciência, companheirismo e apoio e aos meus filhos que são meu incentivo diário para continuar trabalhando sempre pensando no futuro deles.

À professora e orientadora Nágila Maria Pontes Silva Ricardo pela orientação acadêmica, pelo incentivo, ensinamentos, amizade e principalmente por sempre acreditar que eu seria capaz. E a professora Nilce Viana Gramosa Pompeu de Sousa Brasil pelos ensinamentos, orientação, educação, apoio, incentivo, paciência e amizade.

À CAPES pelo apoio e à Universidade Federal do Ceará e ao Programa de Pós-Graduação em Química pela oportunidade.

À Central Analítica da Universidade Federal do Ceará pela realização das análises de microscopia.

À professora Larissa Moraes do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da UFC pelos testes de toxicidade realizados.

A Lorena e Kirley Canuto da Embrapa Agroindústria Tropical e ao professor Daniel do CENAUREMN pelas análises de Ressonância Magnética Nuclear realizadas.

Ao LAPRONAT por oferecer as dependências da unidade para a realização desta pesquisa.

Ao Pedro Mikael e à professora Cláudia do Ó Pessoa pelos testes no Laboratório de Oncologia Experimental do NPDM – UFC.

Aos colegas do LabPIM em especial à Ethanielda, Alexandre, Kamilla, Débora, Denise, Alessandro, Elano, Sarah, Arcelina e Deyse pelo apoio durante a realização deste trabalho.

À banca examinadora por aceitar avaliar e dar suas valiosas contribuições ao meu trabalho.

Aos amigos do IFCE Campus Maracanaú Emília Alves, Caroline Sampaio, Socorro Pinheiro e Aristênio Mendes pelo apoio, amizade e incentivo.

E a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos!!!

“A satisfação da própria curiosidade é uma das maiores fontes de felicidade na vida.” (Linus Carl Pauling)

RESUMO

O ácido betulínico é um antineoplásico promissor como quimioterápico de ação seletiva, no entanto possui baixa solubilidade em água o que dificulta sua veiculação em sistemas aquosos. Algumas substâncias podem potencializar a eficácia antitumoral de antineoplásicos, um exemplo é a hesperidina. Uma estratégia para a veiculação desses ativos é carregá-los na forma de microcápsulas. O objetivo do presente trabalho é desenvolver microcápsulas à base dos polissacarídeos goma guar, alginato de sódio para coencapsulação de hesperidina e ácido betulínico para aplicação antitumoral contra leucemia promielocítica. Foram formuladas microcápsulas com alginato de sódio e com alginato reticulado com íons Ca^{+2} . Também foram formuladas microcápsulas contendo os ativos em nanoemulsão à base de óleo de semente de linhaça em solução de polissacarídeos para posterior secagem. As microcápsulas foram preparadas pela técnica de secagem por *spray dryer* e caracterizadas por FTIR (Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier), MEV (Microscopia Eletrônica de Varredura), DSC (Calorimetria Diferencial Exploratória) e DRX (Difração de Raios X). A Eficiência de Encapsulação (EE) foi determinada. Foi realizado um estudo cinético de liberação do ácido betulínico e da hesperidina a partir das microcápsulas. As citotoxicidades *in vitro* contra a linhagem tumoral HL-60 (leucemia promielocítica) e não tumoral L-929 (fibroblasto de murino) foram avaliadas pelo teste do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). Para avaliar a segurança não clínica *in vivo* foi determinada a toxicidade aguda e avaliada a atividade locomotora em *zebrafish* (*Danio rerio*). Os resultados mostraram que as microcápsulas formuladas apresentaram EE entre 65,15% e 99,76%. As microcápsulas obtidas por secagem da nanoemulsão apresentaram-se amorfas e predominantemente esféricas. No estudo de liberação controlada o modelo matemático de Korsmeyer-Peppas foi utilizado para explicar o mecanismo de liberação das microcápsulas classificado como Super Caso II. Foi comprovado o aumento do efeito citotóxico do ácido betulínico quando associado a hesperidina contra a linhagem celular HL-60 e evidenciando também nas microcápsulas uma diminuição do efeito citotóxico do ácido betulínico contra células não tumorais quando comparado aos ativos livres. As microcápsulas foram consideradas seguras, pois não alteraram o sistema locomotor e nem foram tóxicas frente a *zebrafish* adulto. Portanto, as microcápsulas obtidas apresentaram-se promissoras no tratamento de leucemia promielocítica.

Palavras-chave: ácido betulínico; hesperidina; microcápsulas; polissacarídeos; leucemia promielocítica.

ABSTRACT

Betulinic acid is a promising antineoplastic agent as a selective chemotherapy, however it has low solubility in water, which makes its delivery difficult in aqueous systems. Some substances may potentiate the antitumor efficacy of antineoplastic agents, an example is hesperidin. One strategy for delivering these assets is to carry them in the form of microcapsules. The objective of the present work is to develop microcapsules based on polysaccharides, guar gum, sodium alginate for the coencapsulation of hesperidin and betulinic acid for antitumor application against promyelocytic leukemia. Microcapsules were formulated with sodium alginate and with alginate crosslinked with Ca^{+2} ions. Microcapsules were also formulated containing the active ingredients in a nanoemulsion based on linseed oil in a polysaccharide solution for subsequent drying. The microcapsules were prepared by spray drying technique and characterized by FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy), SEM (Scanning Electron Microscopy), DSC (Differential Scanning Calorimetry) and XRD (X-ray Diffraction). Encapsulation Efficiency (EE) was determined. A kinetic study of the simultaneous release of betulinic acid and hesperidin from the microcapsules was performed. The *in vitro* cytotoxicities against the tumor cell line HL-60 (promyelocytic leukemia) and non-tumor L-929 (murine fibroblast) were evaluated by the MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay. To assess non-clinical safety *in vivo*, acute toxicity was determined and locomotor activity was evaluated in zebrafish (*Danio rerio*). The results showed that the formulated microcapsules presented EE between 65.15% and 99.76%. The microcapsules obtained by drying the nanoemulsion were amorphous and predominantly spherical. In the controlled release study, the mathematical model of Korsmeyer-Peppas was used to explain the release mechanism of the microcapsules classified as Super Case II. The increase in the cytotoxic effect of betulinic acid when associated with hesperidin against the HL-60 cell line was proven and also showing in the microcapsules a decrease in the cytotoxic effect of betulinic acid against non-tumor cells when compared to the free actives. The microcapsules were considered safe, as they did not alter the locomotor system and were not toxic to adult zebrafish. Therefore, the microcapsules obtained showed promise in the treatment of promyelocytic leukemia.

Keywords: betulinic acid; hesperidin; microcapsules; polysaccharides; promyelocytic; leukemia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura molecular do ácido betulínico.....	14
Figura 2 – Estrutura molecular da hesperidina.....	15
Figura 3 – Quimioterápicos usados no tratamento de Leucemia.....	18
Figura 4 – Estrutura molecular do betulin.....	20
Figura 5 – Estruturas de microcápsulas e microesferas.....	28
Figura 6 – Esquema de processo de encapsulamento em <i>spray dryer</i>	28
Figura 7 – Concentração do fármaco em função do tempo na liberação convencional e controlada.....	30
Figura 8 – Estrutura molecular da goma guar.....	35
Figura 9 – Estrutura dos blocos homopoliméricos e heteropoliméricos da molécula de alginato.....	37
Figura 10 – Estrutura <i>Egg-box</i> do alginato reticulado com Ca^{+2}	38
Figura 11 – Gotícula de uma nanoemulsão do tipo óleo em água contendo ativo lipofílico encapsulado.....	40
Figura 12 – Mecanismos físicos de desestabilização de emulsões.....	45
Figura 13 – Quadro esquemático do preparo da nanoemulsão.....	50
Figura 14 – Quadro esquemático do preparo das microcápsulas MNED e MNEDr.....	52
Figura 15 – Quadro esquemático do preparo das microcápsulas MAQD e MAQDr.....	52
Figura 16 – Espectro de RMN de ^1H do alginato de sódio.....	59
Figura 17 – Espectro de RMN de ^1H da goma guar.....	61
Figura 18 – Distribuição da massa molecular do (a) alginato de sódio e da (b) goma guar.....	62
Figura 19 – Distribuição de tamanho das nanoemulsões. (a) NE-B (b) NE-D (c) NE-H (d) Controle-NE.....	64

Figura 20 – Distribuição de potencial zeta das nanoemulsões. (a) NE-B (b) NE-D (c) NE-H (d) Controle-NE.....	64
Figura 21 – Microcápsulas em pós (a) MNED (b) MAQD (c) dispersão aquosa da microcápsula MNED e (d) dispersão aquosa da microcápsula MAQD.....	65
Figura 22 – Micrografias obtidas por MEV (a) ácido betulínico (b) hesperidina (c) MAQD (d) MAQDr (e) MNED (f) MNEDr.....	67
Figura 23 – Espectros de transmitância na região do infravermelho das microcápsulas e alginato de sódio. MNED: Microcápsula com alginato não reticulado. MNEDr: Microcápsula com alginato reticulado.....	71
Figura 24 – Espectro de transmitância na região do infravermelho das microcápsulas, excipientes e ativos.....	72
Figura 25 – Termogramas de DSC das microcápsulas e componentes das formulações.....	74
Figura 26 – Difrátogramas de Raios-X dos ativos e microcápsulas.....	75
Figura 27 – Percentual liberado acumulado dos ativos livres e dos ativos nas microcápsulas.....	77
Figura 28 – Massa acumulada por área em função do tempo para cálculo de fluxo estacionário e <i>lag time</i>	78
Figura 29 – Testes dos modelos matemáticos de Korsmeyer-Peppas e Higuchi para a hesperidina e ácido betulínico. (a) liberação do ácido betulínico da microcápsula MNDEr (b) liberação do ácido betulínico da microcápsula MNED (c) liberação da hesperidina da microcápsula MNDEr (d) liberação da hesperidina da microcápsula MNDE.....	80
Figura 30 – Percentual de inibição de crescimento celular.....	82
Figura 31 – Efeito das amostras teste sob a atividade locomotora do <i>zebrafish</i> (<i>Danio rerio</i>) adulto no Teste de Campo Aberto (0-5 min). (a) MNED (b) MNEDr.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Microcápsulas obtidas por <i>spray drying</i> para aplicação anticâncer....	29
Tabela 2 – Mecanismo de transporte com base nos valores de coeficiente difusional....	34
Tabela 3 – Aplicação farmacêutica de ativos carregados em sistemas à base de alginato.....	39
Tabela 4 – Dados de estudos recentes que utilizam Pluronic® F127 como tensoativo em nanoemulsões e nanoemulgéis.....	41
Tabela 5 – Composição das nanoemulsões.....	49
Tabela 6 – Composição das microcápsulas.....	51
Tabela 7 – Deslocamento das frações dos prótons dos blocos de alginato de sódio.....	60
Tabela 8 – Resultados obtidos por cromatografia de permeação em gel e análise elementar.....	62
Tabela 9 – Resultados obtidos de diâmetro, potencial zeta e Pdi das nanoemulsões.....	63
Tabela 10 – Resultados obtidos da validação dos métodos analíticos de quantificação da hesperidina e ácido betulínico.....	68
Tabela 11 – Eficiência de Encapsulação da hesperidina e do ácido betulínico nas microcápsulas.....	69
Tabela 12 – Solubilidade e condição <i>sink</i> para o ácido betulínico e hesperidina no meio receptor.....	76
Tabela 13 – Percentuais liberados de ativos das microcápsulas em 48 h de liberação sob condição <i>sink</i>	77
Tabela 14 – Parâmetros cinéticos de liberação para o ácido betulínico nas microcápsulas.....	81
Tabela 15 – Parâmetros cinéticos de liberação para a hesperidina nas microcápsulas.....	81
Tabela 16 – Resultados de IC ₅₀ em células de HL-60 e L-929 obtido pelo método do MTT.....	83

Tabela 17 – Resultados dos testes de toxicidade aguda das amostras testes (MNED e MNEDr) frente ao <i>zebrafish</i> adulto.....	86
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a/o	Água em óleo
a/o/a	Água em óleo em água
AB	Ácido betulínico
AB-H	Ácido betulínico com hesperidina
AL	Atividade locomotora
ALG	Alginato
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
ATRA	Ácido <i>trans</i> -retinóico
CEUAP	Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção
CL	Cruzamento de linhas
CL ₅₀	Concentração Letal 50%
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
Dox	Doxorrubicina
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
DRX	Difração de Raios-X
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>
EE	Eficiência de Encapsulação
ELD	Espalhamento de luz dinâmico
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared</i>
GG	Goma Guar
GPC	<i>Gel Permeation Chromatography</i>
GRP78	78 kDa <i>Glucose-regulated Protein</i>
HCT-116	Linhagem celular de câncer colorretal
HepG2	Linhagem celular de câncer de fígado humano
Hesp.	Hesperidina
HL-60	Linhagem celular de leucemia promielocítica

HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
IC ₅₀	Concentração capaz de inibir em 50% o crescimento da linhagem celular
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
L-929	Linhagem celular de fibroblastos de murinos
LD	Limite de Detecção
LLA	Leucemia Linfocítica Aguda
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LMC	Leucemia Mieloide Crônica
LPA	Leucemia Promielocítica Aguda
LQ	Limite de Quantificação
MAQD	Microcápsula não reticulada preparada sem nanoemulsão contendo ácido betulínico e hesperidina
MAQDr	Microcápsula reticulada preparada sem nanoemulsão contendo ácido betulínico e hesperidina
MCF-7	Linhagem celular de câncer de mama
MCWO	<i>Molecular Weight Cut-Off</i>
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MNE	Microcápsula não reticulada preparada com nanoemulsão sem ativos
MNEB	Microcápsula não reticulada preparada com nanoemulsão contendo ácido betulínico
MNED	Microcápsula não reticulada preparada com nanoemulsão contendo ácido betulínico e hesperidina
MNEDr	Microcápsula reticulada preparada com nanoemulsão contendo ácido betulínico e hesperidina
MNEH	Microcápsula não reticulada preparada com nanoemulsão contendo hesperidina
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NE	Nanoemulsão
NE-A	Nanoemulsão contendo ácido betulínico
NE-D	Nanoemulsão contendo ácido betulínico e hesperidina
o/a	Óleo em água

o/a/o	Óleo em água em óleo
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
Pdi	<i>Polydispersity index</i>
PEG	Polietilenoglicol
PLGA	Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
UV	Ultravioleta
v.o.	Via oral
ZFa	<i>Zebrafish</i> adulto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	17
2.1	Objetivo geral	17
2.2	Objetivos específicos.....	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1	Leucemia Promielocítica Aguda.....	18
3.2	Ácido betulínico.....	20
3.3	Hesperidina.....	24
3.4	Microcápsulas poliméricas para a entrega de medicamentos.....	26
3.5	Liberação controlada de ativos.....	30
3.6	Goma guar.....	35
3.7	Alginato de sódio.....	36
3.8	Nanoemulsões.....	39
4	EXPERIMENTAL	46
4.1	Materiais.....	46
4.2	Linhagens e cultura de células.....	47
4.3	Caracterização dos polissacarídeos.....	47
4.3.1	<i>Ressonância Magnética Nuclear</i>	47
4.3.2	<i>Cromatografia de Permeação em Gel</i>	48
4.3.3	<i>Análise elementar</i>	48
4.4	Preparo e caracterização das nanoemulsões.....	48
4.5	Obtenção das microcápsulas por <i>spray drying</i>	50
4.6	Morfologia.....	53
4.7	Quantificação de hesperidina e ácido betulínico por HPLC.....	53
4.8	Eficiência de Encapsulação.....	54
4.9	Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	55
4.10	Análise térmica por Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC).....	55
4.11	Difração de Raios-X (DRX).....	55
4.12	Estudo do mecanismo de liberação <i>in vitro</i>	55
4.13	Ensaio MTT de citotoxicidade <i>in vitro</i>	56

4.14	Avaliação da Segurança não clínica em <i>zebrafish</i> (<i>Danio rerio</i>) adulto.....	57
4.14.1	<i>Atividade locomotora (Teste de Campo Aberto)</i>	58
4.14.2	<i>Toxicidade aguda 96 h</i>	58
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1	Caracterização dos polissacarídeos	59
5.2	Caracterização das nanoemulsões	62
5.3	Obtenção das microcápsulas	65
5.4	Morfologia	66
5.5	Quantificação dos ativos e Eficiência de Encapsulação	68
5.6	Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	70
5.7	Análise térmica por Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)	74
5.8	Difração de Raios-X (DRX)	75
5.9	Estudo do mecanismo de liberação <i>in vitro</i>	76
5.10	Ensaio MTT de citotoxicidade <i>in vitro</i>	82
5.11	Avaliação da Segurança não clínica	85
5.11.1	<i>Avaliação da atividade locomotora (Teste do Campo Aberto)</i>	85
5.11.2	<i>Toxicidade aguda em 96 h</i>	86
6	CONCLUSÃO	87
	REFERÊNCIAS	88
	APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO I	104
	APÊNDICE B – CARTA PATENTE CONCEDIDA	105
	APÊNDICE C – ARTIGO PUBLICADO II	106
	APÊNDICE D – PEDIDO DE PATENTE DEPOSITADO	107
	ANEXO A – RMN DE ¹³C DO ALGINATO DE SÓDIO	108
	ANEXO B – RMN HSQC ¹³C-¹H ALGINATO	109
	ANEXO C – RMN DE ¹³C DA GOMA GUAR	110
	ANEXO D – RMN HSQC ¹³C-¹H GOMA GUAR	111

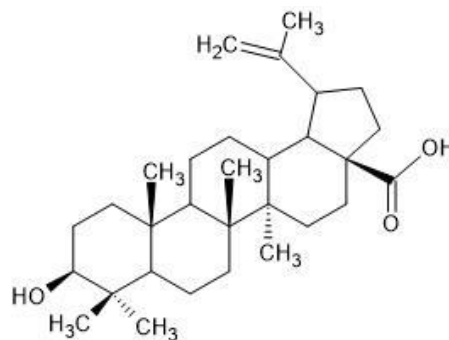
1 INTRODUÇÃO

A Leucemia Promielocítica Aguda (LPA) é um subtipo de Leucemia Mielóide Aguda (LMA) e é responsável por 10 a 15% dos casos de LMA (YLMAN *et al.*, 2018). No Brasil estima-se que entre os anos de 2020 até o fim de 2022 haverá 10.810 novos casos de leucemia no Brasil (INCA, 2020).

Atualmente, a combinação de ácido *trans*-retinóico (ATRA) e trióxido de arsênio (ATO) são utilizados no tratamento inicial da doença. Nos casos de alto risco combina-se o ATRA-ATO com a quimioterapia oral (FERRARA; MOLICA; BERNARDI, 2022) que causam efeitos adversos devido a toxicidade por também atacarem células não tumorais. Portanto, a busca por quimioterápicos de ação seletiva às células tumorais são relevantes para solucionar a problemática dos efeitos adversos dos quimioterápicos e outras substâncias utilizadas no tratamento de LPA.

Uma substância anticancerígena de ação seletiva relatada na literatura é o ácido betulínico (ácido 3- β -hidróxi-lup-20(29)-en-28-óico) (Figura 1), um triterpeno pentacíclico, considerado altamente promissor enquanto agente antineoplásico após a descoberta de sua indução de apoptose em linhagens celulares de melanoma *in vitro* e *in vivo* (PISHA *et al.*, 1995).

Figura 1 – Estrutura molecular do ácido betulínico



Fonte: Elaborada pela autora.

No entanto, o ácido betulínico apresenta algumas limitações, no que se refere à sua baixa solubilidade em água ($0,02 \mu\text{g mL}^{-1}$), o que restringe a aplicação e impede a utilização como medicamento anticâncer (JÄGER *et al.*, 2007). Porém, como forma de contornar esta problemática, novas estratégias de administração, como formulações nano e

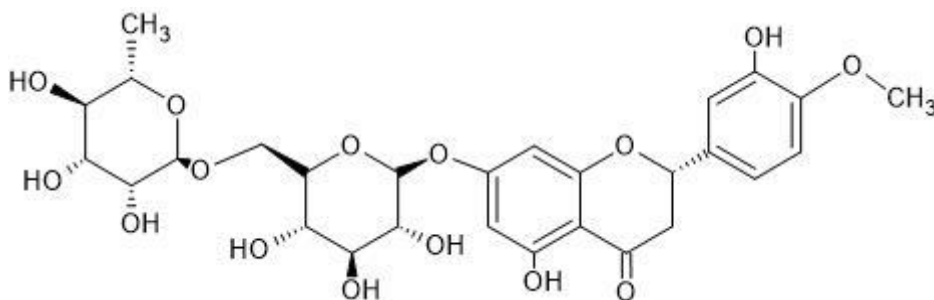
microestruturadas são apresentadas e como exemplo tem-se as microcápsulas poliméricas (CSUK, 2014).

Galactomanana é a denominação dada aos polissacarídeos neutros extraídos dos endospermas de algumas sementes de certas leguminosas e são utilizados como encapsulante em microcápsulas. Dentre uma centena de espécies de leguminosas, cujo endosperma é constituído de galactomanana, apenas a *Ceratonia siliqua* e a *Cyamopsis tetragonolobus* têm sido extensamente cultivadas para fins comerciais (AZERO; ANDRADE, 1999). O polissacarídeo da *Cyamopsis tetragonolobus* é a goma guar.

Outro polissacarídeo utilizado como encapsulante é o alginato de sódio ($\text{NaC}_6\text{H}_7\text{O}_6$)_n, derivado do ácido algínico, o qual é capaz de formar uma matriz altamente versátil, biocompatível, não tóxica para a proteção de componentes ativos (GOH *et al.*, 2012). Neste trabalho foi utilizado o método de gelificação ionotrópica interna através de íons Ca^{+2} para reticular o alginato em uma das formulações de microcápsulas com a finalidade de identificar diferenças nos perfis de liberação dos ativos e consequentemente em suas ações citotóxicas.

Há relatos que a o flavonoide hesperidina (hesperitina-7-rutinosídeo) (Figura 2), solubilidade em água a 25 °C de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, quando associado aos quimioterápicos ácido clorogênico e doxorubicina aumentam o efeito antitumoral de forma sinérgica em células MCF-7 e Hela, respectivamente (MAJUMDAR; SRIRANGAM, 2009; HSU *et al.*, 2021; KUSHARYANTI *et al.*, 2011).

Figura 2 – Estrutura molecular da hesperidina



Fonte: Elaborada pela autora.

Neste trabalho o ácido betulínico foi co-encapsulado com a hesperidina. Em busca nas bases de dados *Scopus*, *SciFinder* e *Web of Science* realizada em 17 de outubro de 2022,

não foram encontrados trabalhos de coencapsulação da hesperidina e ácido betulínico para aplicação antitumoral, confirmando o ineditismo da pesquisa.

Diante do exposto, como forma de solucionar o problema de veiculação do ácido betulínico em sistemas aquosos, melhorar sua seletividade citotóxica frente a células de HL-60 (leucemia promielocítica) e promover liberação controlada, o presente trabalho apresenta o coencapsulamento do ácido betulínico com o flavonoide hesperidina com o alginato e goma guar para aumentar seu potencial antitumoral seletivo na forma de microcápsula polimérica em pó de modo a promover a coliberação controlada destes ativos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Obter microcápsulas polissacarídicas à base de goma guar e alginato contendo hesperidina e ácido betulínico coencapsulados para aplicação antitumoral.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar os polissacarídeos por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C , massa molecular por GPC (Cromatografia de Permeação em Gel) e análise elementar;
- Preparar e caracterizar nanoemulsões contendo hesperidina e ácido betulínico;
- Obter as microcápsulas polissacarídicas pela técnica de *spray-drying*;
- Caracterizar as microcápsulas quanto a morfologia e tamanho por Microscopia Eletrônica de Varredura, Eficiência de Encapsulação, análise térmica por Calorimetria Diferencial Exploratória, Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier e cristalinidade por Difração de Raios-X;
- Realizar um estudo de liberação *in vitro* das microcápsulas;
- Avaliar a atividade citotóxica *in vitro* das microcápsulas contra a linhagem não tumoral L-929 (fibroblastos de murinos);
- Avaliar a atividade e seletividade citotóxica *in vitro* contra a linhagem tumoral HL-60 (Leucemia promielocítica).
- Avaliar a segurança não clínica *in vivo* quanto a toxicidade aguda e atividade locomotora em *zebrafish* (*Danio rerio*).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

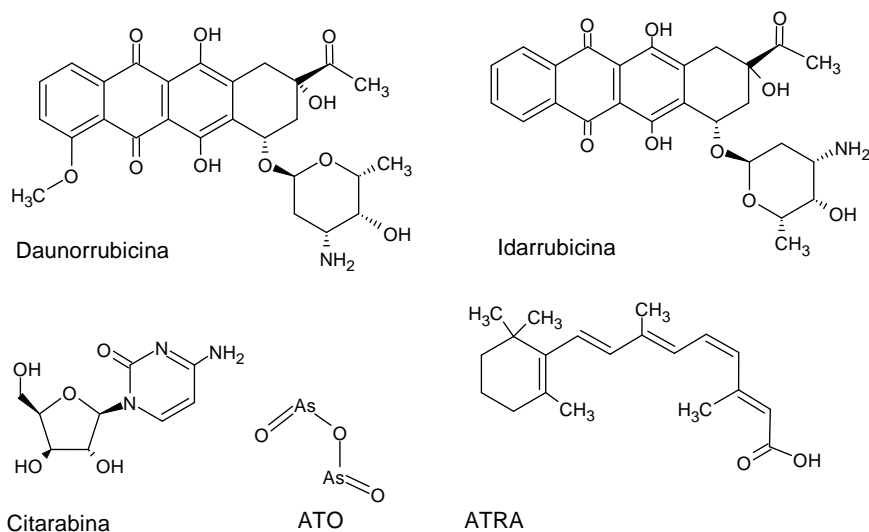
3.1 Leucemia Promielocítica Aguda

A leucemia é um tipo de câncer caracterizada como uma doença clonal dos progenitores hematopoiéticos que invadem o sangue e a medula óssea bloqueando a diferenciação celular e proliferando essas células de forma anormal. As leucemias podem ser classificadas como agudas ou crônicas levando em consideração a velocidade que evoluem. E ainda, de acordo com a linhagem celular acometida, são categorizadas como mieloides ou linfoides, quando atingem os precursores das linhagens granulocítica ou linfóide, respectivamente (HOFFBRAND; MOSS; PETTIT, 2011).

A Leucemia Promielocítica Aguda (LPA) corresponde a um subtipo das Leucemias Mieloides Agudas (LMA) e é caracterizada por acúmulo de promielócitos no sangue e na medula óssea. Os pacientes com LPA podem evoluir rapidamente ao óbito devido a fenômenos hemorrágicos e na maioria dos casos, os pacientes apresentam sintomas relacionados à anemia, trombocitopenia, organomegalia e distúrbios da coagulação. Outras características menos frequentes são observadas em 15% a 20% dos pacientes e infiltração no sistema nervoso central e na pele são achados raros. A LPA é responsável por 10% a 15% da incidência de leucemias mieloides aguda (SAGRILLO *et al.*, 2005).

A introdução do ácido *trans*-retinóico (ATRA) (Figura 3) associado ao trióxido de arsênio (ATO) no tratamento da LPA, foi importante para alcançar as notáveis taxas de cura.

Figura 3 – Quimioterápicos usados no tratamento de Leucemia



Fonte: Elaborada pela autora.

A evidência inicial das propriedades do ácido retinóico e seu potencial para ser usado terapêuticamente veio em 1980, usando pela primeira vez a linhagem celular HL-60 (células de LPA). Logo após a introdução do ácido retinóico no regime terapêutico da LPA, surgiu a necessidade de abordar a resistência ao ácido retinóico. A resistência ao ATRA foi parcialmente aliviada pelo advento do trióxido de arsênio; no entanto, a resistência ao tratamento continua sendo um problema até hoje. A LPA é atormentada por uma taxa de mortalidade precoce alta, bem como complicações hemorrágicas e toxicidades (JIMENEZ *et al.*, 2020).

Normalmente, os pacientes com LPA podem ser estratificados em três grupos de risco: baixo, intermediário e alto, de acordo com as contagens de leucócitos. Embora pacientes de risco baixo e intermediário possam ser tratados sem o uso de quimioterapia citotóxica, a combinação de ATRA e ATO isoladamente não é suficiente para tratar pacientes de alto risco. O tratamento de pacientes de alto risco envolve a administração de quimioterapia citotóxica (JIMENEZ *et al.*, 2020).

O protocolo de terapia PETHEMA para LPA descreve na fase de consolidação do tratamento os quimioterápicos citotóxicos idarrubicina, daunorubicina e ATRA (Figura 3). Para pacientes com alto risco idarrubicina ou daunorubicina associado a citarabina e ATRA (NETO *et al.*, 2013).

A daunorubicina é um antibiótico citotóxico que tem atividade potente contra leucemia aguda e foi aprovada para esta indicação nos Estados Unidos em 1979. A daunorubicina está disponível no mercado como solução ou pó para injeção na concentração de 5 mg mL⁻¹. A dosagem varia por indicação, área de superfície corporal, idade do paciente e função renal e hepática (NIDDK, 2012). Os efeitos adversos comuns da daunorubicina incluem supressão da medula óssea, náusea, vômito, mucosite, diarreia, alopecia, erupção cutânea, urina vermelha e febre. Doses elevadas ou terapia prolongada podem causar toxicidade cardíaca grave, que é um efeito colateral importante limitante da dose (NIDDK, 2012). Na literatura, há relatos de uma formulação lipossomal de daunorubicina disponível como terapia de primeira linha para o sarcoma de Kaposi avançado (NIDDK, 2012).

A idarrubicina é análogo da daunorubicina que se mostrou mais potente e mais ativa do que a daunorubicina em vários tipos de leucemia. A idarrubicina tem sido utilizada em combinação com doses de citarabina em leucemias mieloides agudas e 70% dos pacientes obtém remissão completa, no entanto, sua toxicidade inclui náuseas e vômitos leves, alopecia e disfunção hepática (CARELLA *et al.*, 1990).

A citarabina é usada isoladamente ou com outros medicamentos quimioterápicos

para tratar certos tipos de leucemia (câncer dos glóbulos brancos), incluindo leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia linfocítica aguda (LLA) e leucemia mieloide crônica (LMC). Apresenta-se como um pó misturado com líquido para ser injetado por via intravenosa (numa veia), subcutânea (sob a pele) ou intratecal (no espaço cheio de líquido do canal espinhal). A citarabina pode causar efeitos adversos como: náusea, vômito, diarreia, feridas na boca e garganta, perda de cabelo, dores musculares ou ósseas e cansaço. Pode ocorrer também anemia, leucopenia, trombocitopenia, megaloblastose e redução de reticulócitos como resultado de sua administração (NIDDK, 2012).

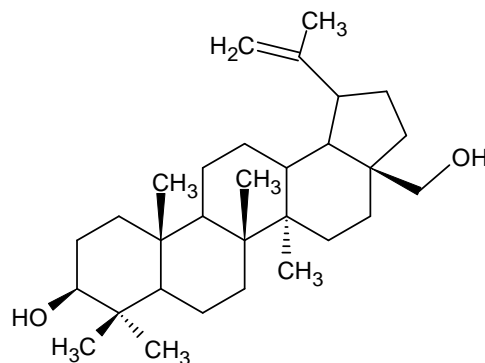
Portanto, observa-se uma necessidade de desenvolvimento de medicamentos contendo ativos menos citotóxicos, que causem menos efeitos adversos, para a terapia de leucemia promielocítica aguda.

3.2 Ácido betulínico

O ácido betulínico (AB) (ácido 3-β-hidróxi-lup-20(29)-en-28-óico) considerado um promissor agente antineoplásico por induzir apoptose em linhagens celulares de melanoma *in vitro* e *in vivo* (PISHA *et al.*, 1995).

Este composto é um triterpeno pentacíclico que pode ser obtido de fonte natural ou sintética. Sinteticamente, o betulin (Figura 4), extraído da *Betula alba* (vidoeiro), é comumente usado como material de partida para sintetizar o AB (ALAKURTTI *et al.*, 2006).

Figura 4 – Estrutura molecular do betulin



Fonte: Elaborada pela autora

O método mais direto de obtenção é a partir da extração em espécies vegetais. As principais matérias-primas incluem casca da *Betula alba*, casca do *Eucalyptus*, casca da *Eucommia ulmoides* e casca da *Morus alba* (JÄGER *et al.*, 2009; CICHEWICZ; KOUZI,

2004).

Em 1976, Trumbull *et al.* (1976) propuseram pela primeira vez a atividade biológica anti-leucemia linfocítica do AB. Faujan *et al.* (2010) comprovaram que o ácido betulínico isolado possui citotoxicidade seletiva para as linhagens celulares leucêmicas: HL-60, CEM-SS e WEHI-3B. Víctor *et al.* (2015) também comprovaram a citotoxicidade do ácido betulínico isolado contra células de HL-60. Muitos estudos subsequentes descobriram que o AB tem efeitos antitumorais significativos em melanoma, câncer de próstata, câncer de mama, câncer colorretal e câncer de pulmão (SANEJA *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2017; PATLOLLA; RAO, 2012; HSU *et al.*, 2012).

A principal vantagem do AB e seus derivados é que eles são citotóxicos para diferentes células tumorais humanas, enquanto a citotoxicidade é muito menor em células normais. O ácido betulínico pode matar células cancerosas mas não tem efeito óbvio em células normais e também não é tóxico para outros órgãos (ZUCO *et al.*, 2002). Além disso, o AB isoladamente ou combinado com algumas drogas quimioterápicas pode induzir apoptose em células tumorais (AISHA *et al.*, 2012; GAO *et al.*, 2011).

Até o momento, os estudos mostraram que a AB não tem efeitos adversos significativos (ZUCO *et al.*, 2002; ALI-SEYED *et al.*, 2016; XU *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2020). O AB a uma concentração de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ não inibiu o crescimento de linfócitos normais do sangue periférico, indicando que sua toxicidade foi pelo menos 1000 vezes menor do que a doxorrubicina, um medicamento antitumoral tradicional (IC_{50} é $0,058 \pm 0,008 \mu\text{g mL}^{-1}$) (ZUCO *et al.*, 2002). Pesquisadores usaram AB para testar a irritação da pele em animais saudáveis bem como monitoraram os efeitos na morfologia corporal, comportamento, estado nutricional, resposta neuromotora, massa dos órgãos e realizaram exames de sangue. Os resultados mostraram que o AB teve apenas um efeito fotossensível na pele do camundongo enquanto a irritação na pele foi insignificante. Doses repetidas não causaram mortalidade de camundongos, diarreia, convulsões, alterações neuromotoras ou alterações no estado nutricional (FERNANDES *et al.*, 2019).

Estudos atuais mostraram que o AB pode mediar o efeito anticancerígeno através da ligação direta ou interação com moléculas-alvo, como os receptores canabinóides e GRP78 (ZHENG *et al.*, 2019; LIU *et al.*, 2012; CAI *et al.*, 2018). O mecanismo anticancerígeno do AB inclui principalmente a indução do estresse oxidativo mitocondrial, a regulação do ciclo celular e a inibição da angiogênese (SHIN *et al.*, 2011; HSU *et al.*, 2012; XU *et al.*, 2017).

No entanto, a limitação para uso do AB contra leucemia e outros tipos de câncer

reside na sua baixa solubilidade em água ($0,02 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$) dificultando sua aplicação como fármaco anticancerígeno. Para superar esse inconveniente, além de modificações estruturais químicas, inúmeras estratégias são propostas na literatura para melhorar o perfil físico-químico e farmacocinético do AB.

Cocristais de crescimento lento de AB e ácido ascórbico em álcool isopropílico foram obtidos. Os efeitos biológicos, desses cocristais foram testados em linhas celulares HaCat (queratinócitos humanos imortalizados), B164A5 e B16F0 (melanoma murino), MCF7 e MDA-MB-231 (câncer de mama humano) e HeLa (câncer cervical). Os resultados do AB sobre as linhagens de células tumorais testadas, após co-cristalização com vitamina C, indicaram um efeito citotóxico superior com a preservação de um bom índice de seletividade presumivelmente devido a uma melhor solubilidade do AB em água e conseqüentemente uma biodisponibilidade otimizada (NICOLOV *et al.*, 2019).

Um lipossoma à base de AB modificado e ácido hialurônico foi desenvolvido para uso em terapia direcionada de câncer de fígado. O lipossoma inibiu a proliferação de células HepG2 e SMMC-7721 de maneira dependente da dose e do tempo demonstrando ser um excelente sistema de entrega intracelular. (WU *et al.*, 2022)

Magnetolipossomas à base de Fe_3O_4 com ácido betulínico foram testados em duas linhagens de células de melanoma - células A375 e B164A5 e uma linhagem de células saudáveis - células da epiderme de camundongos JB6Cl41-5a. Os lipossomas mostraram citotoxicidade significativa nas linhas celulares de melanoma, em comparação com as estruturas lipossomais em branco. Além disso, a linha celular saudável apresentou boa taxa de viabilidade após exposição ao magneto lipossoma com ácido betulínico (FARCAS *et al.*, 2019).

Nanoemulsões à base de óleo de linhaça e ácido betulínico, estabilizada com Pluronic® F127 e poliglicerol polirricinoleato, para aplicação contra câncer colorretal foram preparadas. A determinação da concentração inibitória de 50% (IC_{50}) pelo teste do MTT mostrou uma seletividade aumentada para o ácido betulínico emulsificado quando comparado à sua forma livre para as células HCT-116. Os valores de IC_{50} para as nanoemulsões sintetizadas mostraram uma faixa de $3,2$ a $3,7 \mu\text{M}$ para HCT-116 (carcinoma colorretal) e maior que $16,5 \mu\text{M}$ para fibroblastos normais. Nos ensaios de liberação *in vitro* de 48 h, apresentou liberação controlada também gerando perspectivas promissoras para a liberação prolongada de ácido betulínico em aplicações anticancerígenas (REBOUÇAS *et al.*, 2022).

Um complexo à base de γ -ciclodextrina contendo ácido betulínico foi preparado. O complexo foi testado *in vivo* usando um modelo animal de melanoma murino desenvolvido

em camundongos C57BL/6J, onde causou redução no volume e peso do tumor. O estudo revelou a influência benéfica da inclusão do ácido betulínico na ciclodextrina em termos de atividade antiproliferativa e desenvolvimento tumoral *in vivo* (ŞOICA *et al.*, 2014).

Outro trabalho mostra o desenvolvimento de nanopartículas de polímero PLGA-PEG com gencitabina e ácido betulínico co-encapsulados para aumentar a resposta quimioterapêutica. Esta nanopartícula de PLGA-PEG foi formulada usando emulsão e apresentava tamanho <200 nm. Os estudos de citotoxicidade *in vitro* em células Panc1 (câncer de pâncreas) usando ensaio MTT, produção de espécies reativas de oxigênio e ensaio apoptótico celular demonstraram que a nanopartícula foi mais citotóxica em comparação com a solução do fármaco livre. Além disso, a nanopartícula suprimiu o crescimento do tumor de forma mais eficiente do que a gencitabina isolada e o ácido betulínico isolado nas mesmas concentrações. Esses achados indicaram que a nanopartícula de PLGA-PEG pode ser usada para co-distribuir vários medicamentos quimioterápicos com diferentes propriedades para aumentar a eficácia antitumoral (SANEJA *et al.*, 2019).

Nanotubos de carbono funcionalizados com ácido carboxílico foram preparados. Nos estudos preliminares de citotoxicidade *in vitro*, o conjugado não foi tóxico em uma linha celular padrão de fibroblastos e apresentou atividade anticancerígena significativa em A549 (câncer pulmonar) (TAN *et al.*, 2021).

Também há relatos de nanopartículas de AB em γ -ciclodextrina à base de gelatina para aumentar sua solubilidade e prolongar o tempo de circulação *in vivo*, apresentando um melhor efeito de inibição tumoral do que o composto de inclusão de ácido betulínico/ γ -ciclodextrina (LU *et al.*, 2020).

Um estudo mostra o processo de incorporação de AB em dois tipos de sílica mesoporosa: esférica e em forma de bastonete. A caracterização do perfil de liberação do AB demonstrou que o provável mecanismo das nanopartículas com sílica esférica é um sistema de liberação de ordem zero, enquanto as nanopartículas com sílica em forma de bastonetes apresentaram uma difusão não Fickiana. Esses resultados mostram o potencial de uso dessas nanopartículas como mais uma abordagem em sistemas de liberação de fármacos para esses tipos de compostos (BOCALON *et al.*, 2022).

Essas estratégias mostraram características promissoras, como biocompatibilidade podendo aumentar a biodisponibilidade do AB, o que é de grande importância para melhorar sua atividade biológica antitumoral, no entanto, em comparação aos quimioterápicos atuais utilizados, sua ação citotóxica antitumoral é menor e estudos visando aumentar sua ação citotóxica antitumoral são relevantes.

Diante do exposto, o AB apresenta potencial para o tratamento de doenças tumorais pela sua ação antitumoral seletiva, biocompatibilidade e conseqüentemente a possibilidade de não apresentar efeitos adversos em organismos vivos.

3.3 Hesperidina

A hesperidina (hesperitina-7-ramnoglicosídeo) pertence à classe dos flavonoides. A hesperidina e seus derivados são compostos extraídos das cascas de frutas cítricas como laranja (*Citrus sinensis*), toranja (*Citrus paraiso*), tangerina (*Citrus reticulata*), lima (*Citrus aurantifolia*) e limão (*Citrus limon*) utilizando geralmente metanol como solvente de extração (GATTUSO *et al.*, 2007).

No entanto, a hesperidina exibe baixa solubilidade em água ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$ a 25°C) e conseqüente biodisponibilidade limitada (MAJUMDAR; SRIRANGAM, 2009). A fração biodisponível é comumente definida como a quantidade de uma determinada substância liberada do composto que é absorvida pela barreira intestinal e entra na corrente sanguínea, chegando à circulação sistêmica, que é então distribuída aos órgãos e tecidos e transformada em uma forma bioquimicamente ativa, que é efetivamente utilizada pelo organismo (EL-KATTAN; VARMA, 2012). Portanto, a biodisponibilidade da hesperidina é baixa devido à sua baixa solubilidade aquosa.

A hesperidina também possui a desvantagem de sofrer hidrólise em pH gástrico e degradação enzimática. Para aumentar sua biodisponibilidade e absorção após administração oral, é essencial preparar um sistema de transporte através do trato gastrointestinal, para proporcionar sua transferência direta para o intestino, onde é absorvida na circulação sistêmica (MAJUMDAR; SRIRANGAM, 2009). Sansone *et al.* (2009) microencapsularam a hesperidina em *spray-dryer* obtendo micropartículas gastrorresistentes à base de acetato ftalato de celulose e carboximetilcelulose (SANSONE *et al.*, 2009). Várias abordagens como a micronização, hidrogel à base de hesperidina e nano/microencapsulamento da hesperidina têm sido propostas, principalmente para a produção de medicamentos, para melhorar sua biodisponibilidade, sua estabilidade e promover liberação controlada (SANSONE *et al.*, 2009; TOMÁS-NAVARRO *et al.*, 2014; TSIRIGOTIS-MANIECKA *et al.*, 2021).

As propriedades biológicas e farmacológicas da hesperidina têm sido extensivamente estudadas para revelar seus efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, anticancerígenos, antivirais, protetores cardiovasculares, entre outros. A atividade biológica da hesperidina se deve a presença de grupos hidroxilas nos anéis heterocíclicos e aromáticos

(AGGARWAL *et al.*, 2020). A atividade anticancerígena da hesperidina está associada à citotoxicidade contra células de carcinoma hepático, câncer de mama, câncer de ovário, leucemia linfoblástica, câncer cervical, câncer renal e câncer pulmonar (AGGARWAL *et al.*, 2020).

Atualmente um medicamento à base de hesperidina associado a diosmina é vendido com os nomes comerciais Venaflon, Rovemax, Daflon, Flausiver, Vedipal, Benoril, Circuitast, Elatec e Diosmin na forma de comprimidos e suspensão para o tratamento de distúrbios venosos. No entanto, para terapia antitumoral clínica ainda não tem sido utilizado.

Recentemente, foi publicado um estudo sobre o mecanismo de atuação da hesperidina contra o câncer pulmonar. A hesperidina aumentou significativamente a expressão da proteína pinX1. Além disso, também se evidenciou que a hesperidina a 100 mg/kg é segura *in vivo*. Esses achados mostraram que a hesperidina é um potencial candidato terapêutico para prevenir a progressão do câncer de pulmão (YAO *et al.*, 2022).

Em outro estudo, o tratamento *in vitro* de células de câncer de próstata com hesperidina levou a uma diminuição significativa do crescimento celular e da viabilidade de uma maneira dependente da dose. Demonstrou-se que o declínio no crescimento de células cancerígenas resulta do início da parada do ciclo celular e da morte celular apoptótica semelhante à necrose. Além disso, a administração de hesperidina reduziu significativamente a migração e invasão dessas células cancerígenas (NING *et al.*, 2020).

Um trabalho foi publicado referente a investigação dos efeitos pró-apoptóticos da hesperidina em células KG1a (leucemia mieloide aguda). A hesperidina diminuiu a viabilidade das células leucêmicas KG1a, mas não a de HFF2, uma linha celular não cancerígena. Alterações morfológicas das células apoptóticas e aumento da atividade da caspase-3 foram observadas após o tratamento com hesperidina. Este estudo também revelou que a expressão dos genes anti-apoptóticos survivina e Bcl2 diminuiu significativamente com o tratamento com hesperidina, e o gene pró-apoptótico Bax aumentou em comparação ao grupo controle. Esses achados revelaram que a hesperidina pode ser um fator eficaz no início da via intrínseca da apoptose e pode ser um bom candidato para o tratamento da leucemia mieloide aguda (NOVINBAHADOR, ARAJ-KHODAEI; MAHDAVI, 2022).

As propriedades antioxidantes da hesperidina são expressas principalmente pela captura direta de radicais livres ou indiretamente pela inibição de enzimas pró-oxidativas que participam da geração desses radicais. A atividade antioxidante da hesperidina também se manifesta reduzindo a produção de espécies reativas de oxigênio (ESTRUEL-AMADES *et al.*, 2019).

Alguns relatos na literatura afirmam que a hesperidina também apresenta efeito cardioprotetor contra a cardiotoxicidade da doxorubicina, que é um fármaco anticancerígeno amplamente utilizado (ABDEL-RAHEEM; ABDEL-GHANY, 2009).

Há relatos que a associação da hesperidina com os quimioterápicos ácido clorogênico e doxorubicina aumentam o efeito antitumoral de forma sinérgica em células MCF-7 (câncer de mama) e Hela (câncer do colo uterino) (MAJUMDAR; SRIRANGAM, 2009; KUSHARYANTI *et al.*, 2011; HSU *et al.*, 2021).

Korga *et al.* (2019) relataram que a hesperidina revelou o efeito sobre a toxicidade da doxorubicina em células de HepG2 (câncer hepático), alterando simultaneamente a expressão dos genes da via glicolítica. Embora o tratamento separado com doxorubicina e hesperidina, no referido estudo, tenha levado a danos oxidativos significativos no DNA a administração simultânea de doxorubicina e hesperidina aboliu esses danos com o aumento simultâneo da toxicidade da doxorubicina (KORGA *et al.*, 2019).

Diante dos relatos, a hesperidina apresenta-se como candidata promissora como ativo co-quimioterápico de origem natural visando o aumento da eficiência da terapia. No entanto, estratégias para sua veiculação devem ser usadas para melhorar sua biodisponibilidade.

3.4 Microcápsulas poliméricas para entrega de medicamentos

Os sistemas de entrega de medicamentos estão se desenvolvendo rapidamente no campo farmacêutico. Com o objetivo de transportar e entregar medicamentos no momento certo, de forma segura e reprodutível, a um alvo específico, no nível exigido, mais esforços têm sido feitos em todos os aspectos dos sistemas de entrega de fármacos, incluindo o *design* de materiais, tecnologias de preparação e novas vias de administração (KOROLEVA *et al.*, 2016).

Os sistemas de liberação através de microcápsulas podem proteger o fármaco da degradação, promover liberação controlada ou sustentada e reduzir os efeitos adversos, o que contribui para a melhoria da eficácia do medicamento, segurança e adesão do paciente ao tratamento (LI *et al.*, 2019). Atualmente encontra-se no mercado farmacêutica vitaminas microencapsuladas para uso oral e ativos microencapsulados para uso tópico como forma de proteger o ativo.

Devido as características dos materiais utilizados (biocompatibilidade, biodegradabilidade e bioadesão) as microcápsulas, microsferas e micropartículas poliméricas

têm sido preferencialmente utilizadas. Particularmente, a microencapsulação pode proteger o ativo do medicamento do ambiente ácido do estômago e facilitar a liberação do fármaco no intestino (WANG *et al.*, 2006).

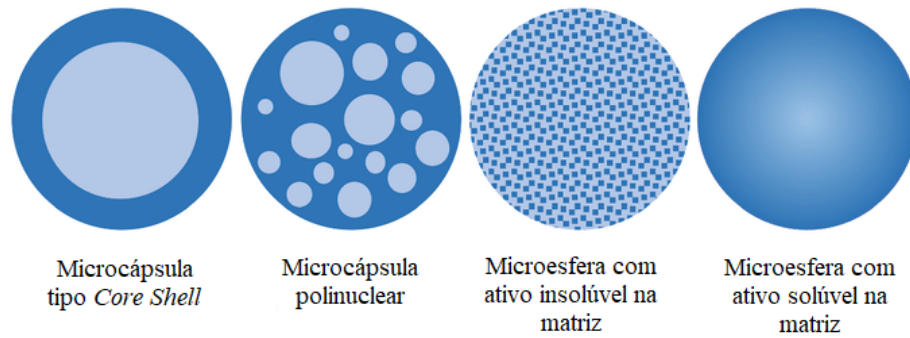
A administração oral ainda continua sendo preferida devido à sua natureza não invasiva, conveniência, segurança e adesão do paciente. No entanto, ainda existem vários obstáculos não resolvidos para a administração oral, como o ambiente ácido do estômago, enzimas, degradação e a barreira de penetração do epitélio intestinal para absorção eficaz. Baseado no fato de que partículas com um tamanho menor que 10 μm podem ser absorvidas através da penetração nas placas de Peyer do intestino, um dos desafios para realizar a administração oral de drogas é preparar partículas contendo o ativo com tamanho menor ou igual a 10 μm (WANG *et al.*, 2006).

Dentro da ampla categoria de micropartículas, as microcápsulas são micropartículas que possuem um núcleo cercado por um material que é distintamente diferente daquele do núcleo. O núcleo pode ser sólido, líquido ou dispersões. O material do núcleo é o material sobre o qual o revestimento deve ser aplicado para atender ao propósito específico. Microesferas são micropartículas na qual o ativo encontra-se disperso na matriz sem ser possível identificar um núcleo. O termo “microcápsula” ou “microesfera” é definido como uma partícula esférica com tamanho variando entre 50 nm a 2 mm contendo um ou mais núcleos (SINGH *et al.*, 2010).

Uma grande variedade de materiais poliméricos de revestimento está disponível para microencapsulação. Muitos materiais de revestimento tradicionais são satisfatórios para uso no trato gastrointestinal. Eles incluem polímeros inertes e sensíveis ao pH como os alginatos que intumescem ou se dissolvem de acordo com o grau de reticulação. O polímero deve ser capaz de formar um filme coesivo com o material do núcleo, deve ser quimicamente compatível e não reativo com nenhuma outra substância que compõe a cápsula (WANG *et al.*, 2006).

Geralmente, polímeros hidrofílicos, polímeros hidrofóbicos ou uma combinação de ambos são usados para o processo de microencapsulação. Vários materiais de revestimento foram usados com sucesso, exemplos destes incluem gelatina, álcool polivinílico, etilcelulose, alginato de sódio, galactomananas e acetato ftalato de celulose (SIMÕES *et al.*, 2020). A Figura 5 mostra as diferentes estruturas de microcápsulas e microesferas.

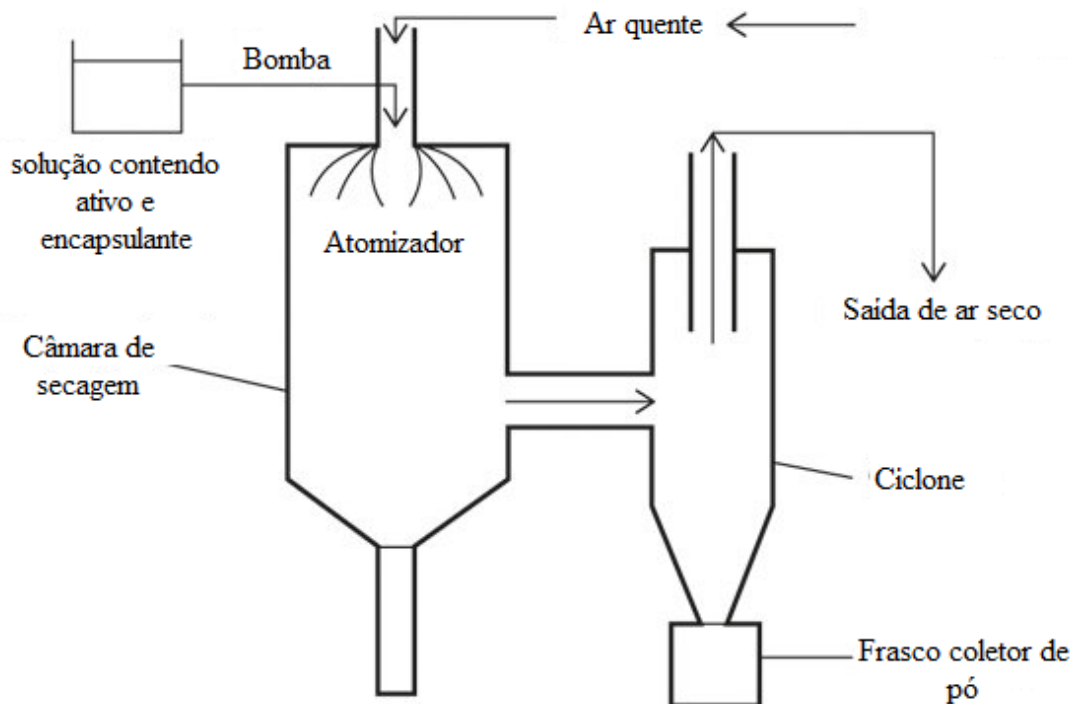
Figura 5 – Estruturas de microcápsulas e microesferas



Fonte: Arenas-Jal, Suñé-Negre e Garcia, 2020 adaptado.

Um método comumente empregado para obtenção de microcápsulas ou microesferas é o *spray drying* (secagem por pulverização). O processo de secagem por pulverização envolve a dispersão do material do núcleo e de revestimento em uma solução líquida a ser evaporada através de um equipamento *spray dryer*. Figura 6 mostra o esquema do processo de encapsulamento em um *spray dryer*.

Figura 6 – Esquema de processo de encapsulamento em *Spray dryer*



Fonte: Nguyen *et al.*, 2021 adaptado.

Após a secagem, o material aparece como um pó. O pó é adequado para formulação na forma de comprimidos, cápsulas de gelatina, suspensões e outras formas farmacêuticas sendo uma forma prática de manipular e transportar um medicamento além de outras vantagens já descritas da microencapsulação (SINGH *et al.*, 2010).

A Tabela 1 abaixo apresenta algumas informações referentes na literatura relacionadas a microencapsulação por *spray drying* de ativos anticâncer.

Tabela 1 – Microcápsulas obtidas por *spray drying* para aplicação anticâncer

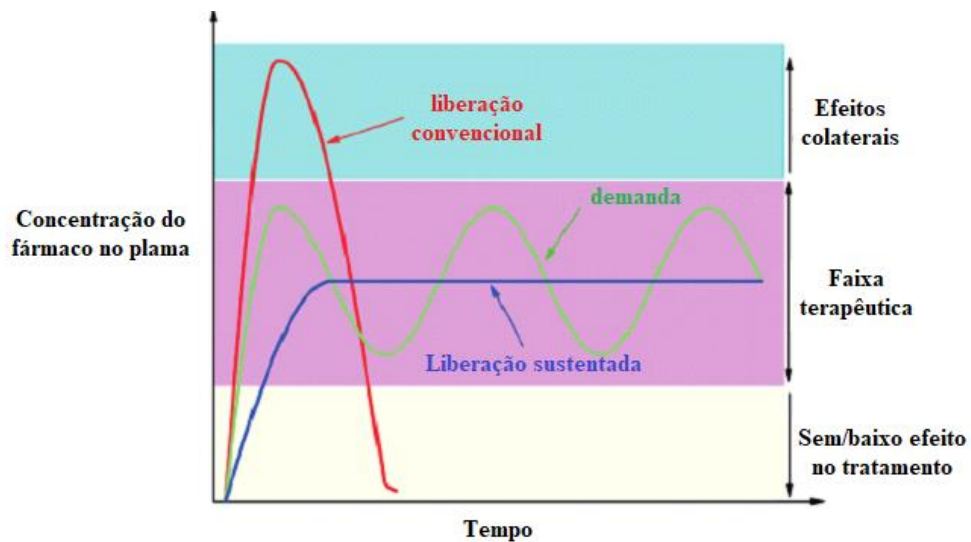
Ativo	Material de revestimento	Rota	Câncer	Referência
Capecitabina	Poliacrilamida e Goma Karaya	Oral	Colon	Alange, Birajdar e Kulkarni, 2017
5-Fluorouacil	Quitosana e gelatina	Tópica	Melanoma	Nawaz <i>et al.</i> , 2022
Ácido betulínico	β -ciclodextrina	Oral	Ovário	Serain <i>et al.</i> , 2021
Carboplatina	Gelatina	Intravenosa	Pulmonar	Harsha <i>et al.</i> , 2014
Doxorrubicina + Paclitaxel	Cremofor EL, Tween 80 e Tween 20	Inalação	Pulmonar	Kaur <i>et al.</i> , 2020
Lamivudine	Polietilacrilato, polimetilmetacrilato e clorotrimetilamônio metacrilato	Oral	Pulmonar	Öztürk <i>et al.</i> , 2020
Doxorrubicina	Alginato de sódio e sílica	N.D	Pulmonar	Mishra <i>et al.</i> , 2021
Quercetina Paclitaxel Cetuximabe	Quitosana	Inalação	Pulmonar	Cui <i>et al.</i> , 2022

N.D.: Não Disponível.
Fonte: A autora.

3.5 Liberação controlada de ativos

Nos métodos usuais de administração de medicamentos geralmente são empregados sistemas diluentes com o objetivo de dissolver o ativo e manter os níveis de sua concentração dentro da faixa terapêutica, o que constitui um grande desafio. Em tratamentos convencionais a concentração do ativo na corrente sanguínea aumenta até atingir o nível máximo de dissolução e então declina, sendo requerida a administração de nova dose para manter os níveis de concentração na faixa terapêutica como mostra a Figura 7.

Figura 7 – Concentração do fármaco em função do tempo na liberação convencional e controlada.



Fonte: Yi, Buttner e Foulds, 2015 (adaptada).

Elevadas concentrações acima da faixa terapêutica podem se tornar tóxicas, enquanto concentrações abaixo da faixa terapêutica são ineficazes e podem em alguns casos causar resistência ao fármaco (GRAHAM, 1978).

Com o objetivo de solucionar este problema, pesquisas recentes e o avanço da nanotecnologia tornaram possível o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada com o objetivo de modular a liberação do fármaco mantendo-o na faixa terapêutica por tempo prolongado utilizando-se o menor número de dosagens (SULTANA *et al.*, 2022).

A cinética de liberação do fármaco é dirigida por um ou mais mecanismos que dependem da composição da matriz, geometria e tamanho de partícula, método de preparação e meio de dissolução da liberação do fármaco, e pode ser explicada por modelos matemáticos.

A modelagem matemática da liberação tem um potencial significativo para facilitar desenvolvimento de produtos e ajuda a entender a liberação de ativos de formas farmacêuticas complexas (COLOMBO; COLOMBO, CAHYADI, 2011).

Ativos com alta solubilidade mostram liberação mais rápida, enquanto ativos com baixa solubilidade em água ($< 0,01 \text{ mg mL}^{-1}$) muitas vezes resultam em liberação incompleta. O coeficiente de difusão pode mudar de quase zero quando a matriz está seca até a um máximo quando a matriz está hidratada. O coeficiente de difusão depende da massa e tamanho da molécula do soluto e da viscosidade do meio de difusão (PAARAKH *et al.*, 2018).

Para que ocorra liberação, o ativo deve difundir-se através do polímero e/ou o polímero deve sofrer erosão. Os polímeros podem ser solúveis em água ou não. Um aumento na proporção de polímero aumenta a viscosidade do gel e, assim, aumenta o comprimento do caminho difusional, desta forma, o coeficiente de difusão diminui e a taxa de liberação do fármaco decresce (FORD *et al.*, 1987).

Os modelos matemáticos mais usados para explicar a cinética de liberação são: ordem zero, primeira ordem e Higuchi. Enquanto o mecanismo de liberação pode ser explicado pelo modelo de Korsmeyer-Peppas para matrizes poliméricas complexas (PAARAKH *et al.*, 2018).

Cinética de Ordem Zero

A cinética de liberação de ordem zero, refere-se ao processo de liberação constante do fármaco independente da concentração. Em sua forma mais simples, liberação de ordem zero pode ser representado como:

$$Q = Q_0 + K_0t$$

Onde Q é a quantidade de ativo liberado, Q_0 é a quantidade inicial de ativo em solução (geralmente é zero), e K_0 é a constante de liberação de ordem zero (DASH *et al.*, 2010).

A representação gráfica da fração do ativo liberado *versus* tempo será linear. A inclinação da curva fornece o valor de K_0 . Este é o comportamento ideal para uma forma farmacêutica e leva a flutuações mínimas de níveis de concentração do fármaco diminuindo os efeitos adversos (LI, LI e ZHAO, 2021).

Trojer *et al.* (2013) relataram que apenas no caso de um sistema transportador monodisperso com liberação constante, a verdadeira cinética de ordem zero pode ser alcançada. Eles alegaram que usar o termo "ordem zero" é um dos erros mais frequentes na literatura sobre liberação controlada. Normalmente, a cinética de liberação parece ser zero

ordem em um período de tempo limitado, seguido por um outro modelo cinético de liberação (TROJER *et al.*, 2013).

Cinética de Primeira Ordem

O modelo de primeira ordem foi aplicado por Gibaldi e Feldman (1967) baseado na lei de difusão de Fick. Neste tipo de cinética de liberação, a concentração de material liberado é proporcional à concentração de bioativo remanescente na matriz (BRUSCHI, 2015).

A cinética de liberação de primeira ordem descreve a liberação de um sistema onde a taxa de liberação depende da concentração, expresso pela equação:

$$\log Q = \log Q_0 - K_1 t / 2,303$$

Onde Q é a quantidade liberada no tempo t, Q_0 é a quantidade inicial de ativo em solução, K_1 é a constante de primeira ordem. A taxa de liberação diminui com o tempo e o log do percentual de ativo restante *versus* tempo, resulta em uma linha reta com uma inclinação de $-K_1/2,303$ (MERCHANT *et al.*, 2006).

Modelo de Higuchi

O modelo de Higuchi, foi o primeiro exemplo de um modelo matemático destinado a descrever a liberação de fármacos a partir de um sistema de matriz polimérica. Este modelo é aplicável para estudar a liberação de ativos solúveis ou pouco solúveis incorporadas em matrizes semissólidas e matrizes sólidas assumindo um mecanismo de liberação baseado na difusão Fickiana (HIGUCHI, 1963).

O modelo de Higuchi descreve a liberação de ativos em função da raiz quadrada do tempo:

$$Q = K_H t^{1/2}$$

Onde Q é a quantidade de ativo liberada no tempo t e K_H é a constante de Higuchi. Os dados obtidos quando plotados como percentual cumulativo de liberação do ativo *versus* raiz quadrada do tempo deve apresenta-se linear para atender ao modelo (PAARAKH *et al.*, 2018).

Vale ressaltar que o modelo cinético de ordem zero pode ser usado se a forma farmacêutica não desagregar. O modelo de primeira ordem pode descrever o estágio inicial de dissolução de um fármaco pouco solúvel em água incorporado em uma matriz solúvel em água.

A equação de Higuchi é baseada em várias suposições: a concentração inicial do

fármaco na formulação é maior que a solubilidade do fármaco; o fármaco se espalha apenas em uma dimensão; o intumescimento do sistema e sua dissolução são insignificantes; a difusividade do fármaco não muda e a condição *sink* é alcançada (WOJCIK-PASTUSZKA *et al.*, 2019).

Modelo de Korsmeyer-Peppas

Korsmeyer *et al.* (1983) deduziram uma relação simples que descreveu a liberação do fármaco a partir de um sistema polimérico. Posteriormente, Korsmeyer e Peppas (1984) e Ritger e Peppas (1987) desenvolveram um estudo empírico e uma equação para analisar tanto a liberação de ativo Fickiano como não Fickiano a partir de sistemas poliméricos intumescentes bem como os não intumescentes. Para identificar o mecanismo de liberação do fármaco, os primeiros 60% de ativo liberado são ajustados ao modelo de Korsmeyer – Peppas: $M_t / M_\infty = K_{KP} t^n$,

Onde M_t/M_∞ é a fração do fármaco liberado no tempo t , K_{KP} é a constante de Korsmeyer-Peppas incorporando características estruturais e geométricas do sistema de entrega, n é coeficiente difusional e indicativo do mecanismo de transporte do ativo através do polímero. O valor n é usado para caracterizar diferentes mecanismos de liberação. De acordo com os modelos de Ritger e Peppas (1987), para formas esféricas os mecanismos são explicados de acordo com os valores de coeficiente difusionais como mostra a Tabela 2:

Tabela 2 – Mecanismos de transporte com base nos valores de coeficiente difusional

Coeficiente difusional n	Mecanismo de transporte do ativo	Descrição do mecanismo
$\leq 0,45$	Difusão Fickiana	Difusão molecular do fármaco através da matriz polimérica.
$0,45 < n < 0,89$	Transporte não Fickiano	Difusão molecular do ativo com intumescimento da matriz polimérica.
0,89	Caso II de transporte	Intumescimento da matriz polimérica.
$> 0,89$	Super caso II de transporte	Difusão, intumescimento, relaxação e erosão da matriz polimérica ocorrendo de forma simultânea.

Fonte: A autora

Quando o mecanismo de liberação é ambíguo ou há vários fenômenos envolvidos no processo de liberação, a modelo de Korsmeyer-Peppas é útil (PEPPAS; NARASIMHAN, 2014).

Para encontrar o valor do expoente n, somente a porção da curva de liberação $M_t/M_\infty < 0,60$ deve ser usada (KORSMEYER; PEPPAS, 1984). O modelo é plotado como log porcentagem cumulativa de liberação do ativo *versus* o logaritmo do tempo.

Desta forma, pode-se compreender a importância da modelagem matemática de liberação de ativos facilitando o desenvolvimento de produtos. O estudo dos mecanismos de liberação e da sua cinética auxiliam na otimização da formulação de um medicamento.

Os modelos testados neste trabalho foram somente os modelos de Korsmeyer-Peppas e Higuchi pois considerando que as microcápsulas desenvolvidas neste trabalho são:

- (i) Constituídas de goma guar e alginato que no meio receptor intumescem e desagregam;
- (ii) Constituídas também por óleo, o qual é insolúvel em água, contendo os ativos solubilizados;

Portanto, não justificaria testar os modelos de ordem zero e primeira ordem devido as razões já explanadas.

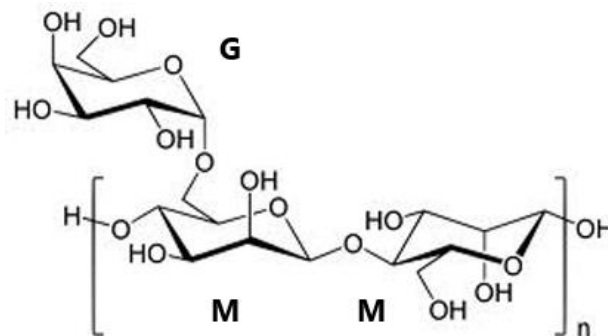
3.6 Goma Guar

A goma guar é uma das fontes mais acessíveis de galactomanana, obtida do endosperma da semente da *Cyamopsis tetragonolobus* ou *Cyamopsis psoraloides* que pertencem à família das leguminosas. É um polissacarídeo de alta massa molecular, solúvel em água, com coloração branca a amarelada e inodora (AZERO e ANDRADE, 1999).

Geralmente as espécies que produzem a goma guar são encontrados na Índia, Paquistão, em zonas semi-áridas do Brasil, África e Austrália ou na parte sul dos EUA, como Texas ou Arizona. Um total de 90% da goma guar é produzido apenas pela Índia e pelo Paquistão (SHARMA *et al.*, 2018).

A goma guar apresenta uma estrutura polimérica na qual as cadeias laterais de galactose (G) estão ligadas à cadeia principal de manose (M) com uma razão molecular média de 1:2 (Figura 8):

Figura 8 – Estrutura molecular da goma guar



Fonte: Elaborada pela autora.

Cadeias lineares de unidades de D-manose são ligadas por β (1-4) unidades de ligação glicosídica e D-galactose são unidas de maneira alternada através de (1-6) ligação glicosídica. Suas propriedades dependem principalmente das características químicas como comprimento da cadeia, quantidade de grupos hidroxilas e razão entre unidades de manose e galactose (M/G). Quanto maior a razão M/G mais viscosa e mais turvas são as soluções de goma guar (AZERO; ANDRADE, 1999).

Uma das características mais interessantes da goma guar em solução é sua natureza não tóxica além da estabilidade em uma ampla faixa de pH. A maior taxa de hidratação é atingida em pH 8-9 e a taxa de hidratação mais baixa ocorre em pH > 10 e < 4

(SHARMA *et al.*, 2018).

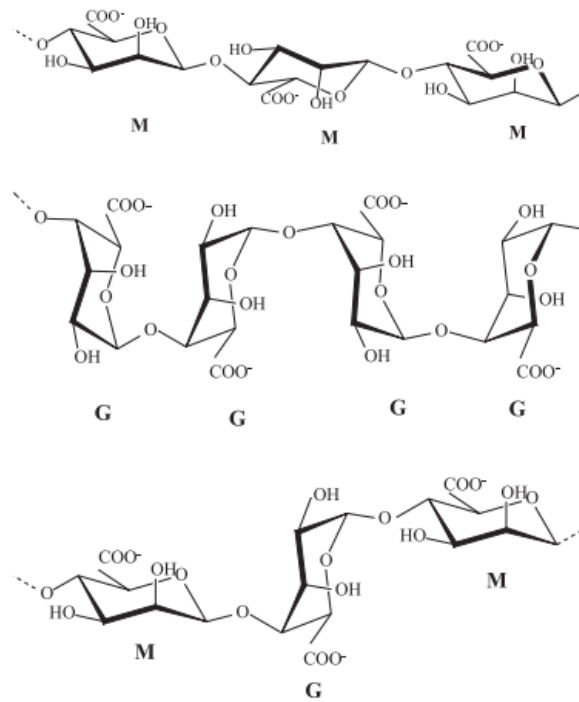
A goma guar e seus derivados são utilizados em muitas indústrias devido à combinação única de propriedades. A ligação glicosídica da goma guar pode ser facilmente degradada pelo intestino grosso pela ação de enzimas microbianas. Tem sido amplamente empregada em sistemas para liberação de fármacos devido à sua característica de intumescimento. Vale ressaltar que a goma guar possui propriedades mucoadesivas, fortes interações entre a goma guar e o revestimento mucoso de tecido aumenta o tempo de contato proporcionando a liberação de ativos farmacêuticos por mais tempo no local (SHARMA *et al.*, 2018; ANIL; SUDHEER, 2018).

Estudos recentes revelaram que micropartículas para câncer colorretal contendo o quimioterápico metotrexato com alginato de sódio, goma guar e polímero carboxivinílico apresentaram alta mucoadesividade, liberação controlada e alta eficiência de encapsulamento (DESHMUKH; HARWANSH; RAHMAN, 2021). Nanopartículas à base de goma guar foram desenvolvidas por Kaur *et al.* (2015) para imunização oral contra tuberculose e apresentaram proteção contra acidez estomacal e eficiência na entrega do antígeno na região intestinal (KAUR *et al.*, 2015). Nanopartículas à base de goma de guar contendo o anti-inflamatório celecoxibe em óleo para câncer colorretal foram preparadas com sucesso e mostraram potencial como agente profilático contra o câncer de intestino (CHANDEL *et al.*, 2020). Esses dados mostram o potencial da goma guar como encapsulante de fármacos para liberação controlada no intestino.

3.7 Alginato de sódio

Os alginatos são polissacarídeos compostos por unidades de ácido β -D-manurônico e α -L-gulurônico, (também representado por M e G, respectivamente) que formam regiões de blocos M e blocos G em sequências alternadas (blocos MG) (Figura 9).

Figura 9 - Estrutura dos blocos homopoliméricos e heteropoliméricos da molécula de alginato



Fonte: Elaborada pela autora.

O alginato de sódio ($\text{NaC}_6\text{H}_7\text{O}_6$)_n, é capaz de formar uma matriz altamente versátil, biocompatível, não tóxica para a proteção de componentes ativos (GOH *et al.*, 2012).

A organização estrutural do alginato depende da origem, por exemplo, folhas de *Laminaria hyperborea* contêm uma grande quantidade de ácido manurônico, ao contrário do estipe e do córtex externo, que contêm uma alta quantidade de ácido gulurônico (HAY *et al.*, 2013).

O alginato pode ser obtido de várias algas (principalmente *Laminaria hyperborean*, *Ascophyllum nodosum*, *Macrocystis pyrifera* e, em menor quantidade da *Laminaria digitate*, *Laminaria japonica*, *Lesonia negrescens*, *Sargassum* sp., *Eclonia maxima*) e fontes bacterianas (cepas mucóides de *Pseudomonas aeruginosa* e *Azotobacter vinelandii*). A característica especial dos alginatos bacterianos é que eles apresentam massas moleculares mais elevados em comparação com os obtidos de algas (LEE; MOONEY, 2012).

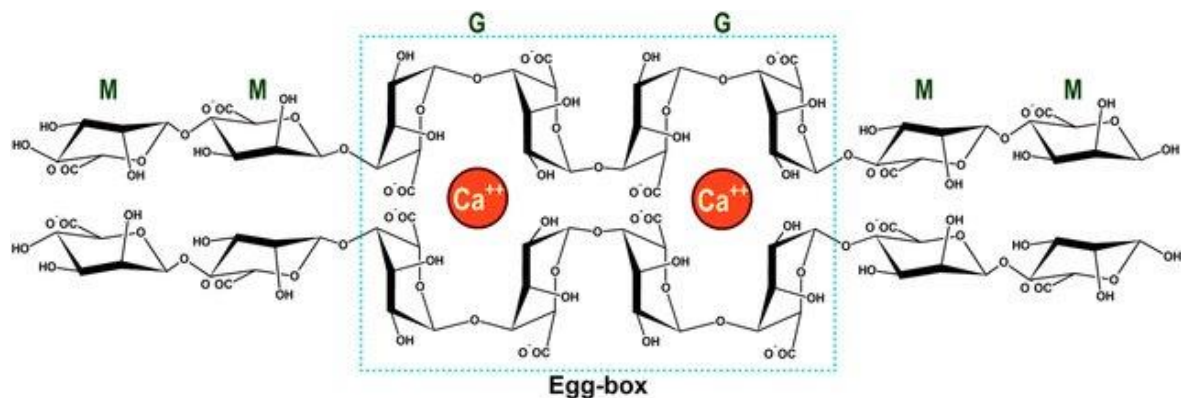
O alginato de sódio é de fácil aquisição, ecologicamente correto e relativamente barato de produzir. Isso, juntamente com várias outras vantagens como biocompatibilidade e não toxicidade, levou ao desenvolvimento de múltiplas aplicações nas indústrias alimentícia e biomédica para o alginato (SZEKALSKA *et al.*, 2016).

O ácido algínico e seus sais são praticamente não digeríveis em ambiente gástrico,

não absorvidos e são parcialmente fermentados pela microbiota intestinal em humanos. Devido às múltiplas aplicações do alginato na medicina, inúmeras metodologias de processamento foram desenvolvidas e implementadas.

Vários cátions possuem afinidade com o alginato formando uma estrutura de rede polimérica tridimensional através da reticulação (gelificação ionotrópica) tendo como exemplo os íons Ca^{+2} que se ligam aos blocos do ácido α -L-gulurônico formando uma estrutura conhecida como *Egg-box* como mostra a Figura 10.

Figura 10 – Estrutura *Egg-box* do alginato reticulado com Ca^{+2}



Fonte: Yoon *et al.* (2014).

Dependendo da sua aplicação, o alginato pode ser processado em microesferas ou microcápsulas, curativos, espumas e hidrogéis. Microcápsulas de alginato podem ser obtidas por secagem por pulverização (PUSCASELU *et al.*, 2020).

Alginatos precipitam em pH ácido e aumentam a solubilidade em água em meio alcalino, portanto, podem ser usados para a entrega de fármacos no intestino o qual tem um $\text{pH} > 6,7$ (LEE; MOONEY, 2012).

Os métodos de gelificação ionotrópica do alginato podem ser externa ou interna. Na gelificação externa gotículas de alginato são adicionadas a uma solução contendo excesso de íon reticulante. Na gelificação interna, íon reticulante é adicionado a uma solução aquosa de alginato (PAQUES *et al.*, 2014). Neste trabalho foi utilizado o método de gelificação ionotrópica interna através de íons Ca^{+2} para reticular o alginato em uma das formulações de microcápsulas com a finalidade de identificar diferenças nos perfis de liberação dos ativos e consequentemente sua ação citotóxica.

Na Tabela 3 são elencados algumas das aplicações do alginato para uso oral no carregamento de ativos para aplicação farmacêutica.

Tabela 3 – Aplicação farmacêutica de ativos carregados em sistemas à base de alginato

Forma de carregamento	Ativo	Aplicação	Referência
Micela em hidrogel de alginato reticulado com íons cálcio	Emodina	Tratamento de câncer de colon	Cong, Shi e Wang, 2017
Nanopartículas lipídicas à base de monoestearato de glicerila alginato reticulado com íons cálcio	Anfotecerina-B	Antileishmaniose	Barradas <i>et al.</i> , 2018
Nanocristais de alginato e celulose	Rifampicina	Antituberculose	Ooi <i>et al.</i> , 2015
Hidrogel a base de alginato de sódio	Diclofenaco de sódio	Antibacteriano contra <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> e <i>B. subtilis</i>	Ilgin, Ozay e Ozay, 2020
Nanopartículas de alginato tiolada a base de dissulfeto montada <i>layer-by-layer</i>	Paclitaxel	Antitumoral	Ayub <i>et al.</i> , 2019

Fonte: A autora

O alginato também é mucoadesivo e pode aderir à mucosa intestinal por períodos prolongados de tempo o que é desejável para prolongar a absorção do ativo no intestino. Estudos apresentam microesferas de alginato para o desenvolvimento de sistemas de liberação oral de proteínas e medicamentos (QURRAT-UL-AIN *et al.*, 2003).

Outros estudos relatam a eficácia terapêutica e os perfis de segurança do alginato comparáveis aos do omeprazol após duas semanas de tratamento em indivíduos com refluxo gastroesofágico não erosivo (SAIFULLAH *et al.*, 2018).

Assim, o alginato pode ser considerado como uma medicação alternativa para refluxo não erosivo e contra a azia que podem estar associados ao uso de fármacos agressivos a mucosa estomacal. Nesse contexto, o uso de alginato como excipiente nas formulações orais contendo ativos ácidos pode ser estratégico.

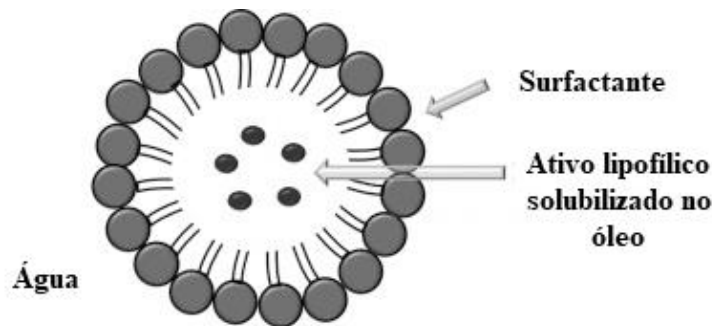
3.8 Nanoemulsões

As nanoemulsões são dispersões coloidais de dois líquidos imiscíveis

estabilizados por moléculas de tensoativo, são cineticamente estáveis e podem ser obtidas mesmo em baixas concentrações de tensoativos, sendo importante para diversos setores da indústria. Podem ser transparentes, translúcidas ou leitosas, dependendo do diâmetro das gotas e são classificadas em dois tipos, água-em-óleo (a/o), óleo-em-água (o/a) ou múltiplas (o/a/o ou a/o/a) de acordo com a proporção e a natureza química dos componentes (SHETH *et al.*, 2020).

O diâmetro das gotículas pode variar de 20 a 500 nm e são úteis para o encapsulamento de ativos lipofílicos como mostra a Figura 11 (SHARMA *et al.*, 2010).

Figura 11 – Gotícula de uma nanoemulsão do tipo óleo em água contendo ativo lipofílico encapsulado



Fonte: Elaborado pela autora.

Para dispersar as gotículas em uma fase aquosa, tensoativos são usados para estabilizar o sistema. Tensoativos são compostos com perfil anfifílico que reduzem a tensão interfacial entre as fases em uma emulsão (CAO *et al.*, 2021).

O tensoativo ideal para ser usado como emulsificante deve reduzir a tensão interfacial, ser rapidamente adsorvido na interface e estabilizar a superfície por interações eletrostáticas ou estéricas. Como exemplos tem-se o Tween® 80, proteínas anfílicas (caseinato), fosfolípidios (lecitina de soja), polissacarídeos (amido modificado) ou polímeros como polietilenoglicol (PEG) e Pluronic®. Nanoemulsões modificadas com PEG são usadas para permitir direcionamento específico e maior tempo de circulação (SHARMA *et al.*, 2010). Ésteres de ácidos graxos de sorbitano, como Spans®, também podem ser usados como tensoativo.

Na Tabela 4 são apresentados dados de estudos recentes de nanoemulsão e nanoemulgéis que fazem uso de Pluronic® F127 como tensoativo:

Tabela 4 – Dados de estudos recentes que utilizam Pluronic® F127 como tensoativo em nanoemulsões e nanoemulgéis

Tipo	Núcleo oleoso	Ativo	Aplicação	Referência
Nanoemulsão	Óleo de linhaça	AB	Antitumoral	Rebouças <i>et al.</i> , 2022
Nanoemulsão	Ácido oléico	Curcuminóides	Antitumoral	Coelho <i>et al.</i> , 2022
Nanoemulgel à base de goma guar	Ácido oléico	Hesperidina	Antioxidante	De Sousa <i>et al.</i> , 2022
Nanoemulsão à base de poli-L-lisina	Óleo de linhaça	Insulina e Peptídeo-C	Antiglicêmico	Harsiddharay <i>et al.</i> , 2022
Nanoemulsão e nanoemulgel	Oleato de etila e Lipoid S100	Extrato de <i>Artemisia dracunculus</i>	Antioxidante, antifúngico e anti-inflamatório	Atmaca <i>et al.</i> , 2022

Fonte: A autora

Como tensoativo para estabilizar a nanoemulsão microencapsulada neste trabalho foi utilizado o Pluronic® F127 que é um copolímero tribloco, não-tóxico, aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*) e é formado por um bloco central de poli(óxido de propileno) (P₆₅) com caráter lipofílico e nas extremidades por blocos de poli(óxido de etileno) (E₁₀₀) de caráter mais hidrofílico, sendo assim utilizados como tensoativos (GIOFFREDI *et al.*, 2016). As principais vantagens do uso do Pluronic® F127, além de sua não toxicidade, é o fato de partículas formadas com este copolímero não serem capturadas pelos macrófagos, aumentando seu tempo em contato com o sangue (LIN *et al.*, 2018). Além deste fato, em tumores multirresistentes a fármacos, os blocos dos Pluronicos® são capazes de atuar nas células tumorais, aumentando a sua permeabilidade aos fármacos antineoplásicos, aumentando a eficácia do tratamento, por isso foi utilizado no presente trabalho (DEVI; SANDHYA; HARY, 2013).

Caracterização das nanoemulsões

Diversas propriedades físicas e químicas podem influenciar o comportamento das nanoemulsões. O diâmetro médio das gotículas é um dos parâmetros cruciais em relação a este sistema, além disso a distribuição do diâmetro das gotículas medida pelo índice de

polidispersidade (Pdi), é de extrema relevância, uma vez que a faixa de tamanho da nanoemulsão deve ser conhecida para avaliar respostas biológicas adicionais. Ambos os parâmetros podem ser medidos por Espalhamento de Luz Dinâmico (ELD). Modificações da resposta celular devido à carga superficial também são fenômenos conhecidos, portanto a carga superficial das nanoemulsões deve ser caracterizada através da determinação do potencial zeta. A carga da superfície do sistema influencia a estabilidade e as interações eletrostáticas (ZHAO *et al.*, 2017).

Nanoemulsões para a entrega de fármacos anticancerígenos

A pesquisa em terapia do câncer tornou-se mais focada em nanoemulsões, uma vez que possuem características essenciais para alcançar um efeito terapêutico eficiente: grande área superficial, carga superficial e meia-vida de circulação elevada. Uma vez que as células cancerígenas são circundadas por tecidos vascularizados, as nanoemulsões podem facilmente acumular-se nestes tecidos podendo atravessar barreiras com seu pequeno tamanho. Elas também podem ser projetadas para definir sua função, encapsular tipos distintos de fármacos e selecionar alvos específicos (AZMI *et al.*, 2019).

Após administração sistêmica, as nanoemulsões precisam escapar do sistema fagocitário mononuclear e da via de depuração renal para atingir o tecido tumoral. O processo em que os anticorpos se ligam às nanogotículas da nanoemulsão e garante que estas sejam reconhecidas por macrófagos e neutrófilos, os quais farão sua fagocitose, pode ser diminuído pela adição de PEG, Pluronic® ou poloxamina à superfície da nanoemulsão, pois eles criam um “escudo estérico” ao redor da formulação (GANTA *et al.*, 2014).

Os inibidores de angiogênese são caracterizados por toxicidade acentuada, as nanoemulsões podem ser usadas para encapsular esses inibidores dentro de seu núcleo, reduzindo a toxicidade. A entrega direcionada do fármaco possibilitada pelas nanoemulsões diminui os efeitos adversos (SÁNCHEZ-LÓPEZ *et al.*, 2019).

Um estudo antitumoral *in vivo* demonstrou que as nanoemulsões de baicaleína-paclitaxel exibiram eficácia antitumoral muito maior do que outras formulações de paclitaxel não encapsulado. Esses achados sugerem que a co-entrega de paclitaxel e baicaleína em nanoemulsões pode ser uma estratégia terapêutica combinada para superar a resistência ao fármaco (MENG *et al.*, 2016).

As nanoemulsões lipídicas têm sido utilizadas por diversos autores como uma estratégia adequada para encapsulamento de fármacos para o tratamento do câncer. Winter *et*

al. (2014) colaboradores desenvolveram nanoemulsões encapsulando chalconas para leucemia. Os autores demonstraram que as nanoemulsões desenvolvidas causam apoptose das células cancerígenas *in vitro* apresentando efeitos antileucêmicos semelhantes tanto para as chalconas livres quanto para a nanoemulsão. No entanto, as chalconas livres induziram maior toxicidade em células não tumorais do que as nanoemulsões carregadas de chalconas. Resultados semelhantes foram observados *in vivo*. As chalconas livres induziram uma redução no ganho de peso e lesões hepáticas, evidenciadas pelo estresse oxidativo, bem como uma resposta inflamatória enquanto as encapsuladas em nanoemulsões não apresentaram esses efeitos (WINTER *et al.*, 2014).

Recentemente foi publicado um estudo referente a nanoemulsão contendo o ativo Plumbagina, à base de Labrasol, Capryol 90 (propileno glicol caprilato) e Kolliphor RH40, para aplicação contra células de leucemia promielocítica (PTEN-P2) apresentando IC₅₀ de 2,5 µmol L⁻¹ (CHRASTINA *et al.*, 2022).

De acordo com o exposto, nanoemulsões representam uma nova e promissora estratégia na terapia do câncer. O emprego de um núcleo hidrofóbico permite o encapsulamento de fármacos lipofílicos, apresentando uma solução para um dos principais problemas relacionados aos medicamentos para o tratamento do câncer. Nanoemulsões multifuncionais podem co-encapsular, ou se ligar à sua superfície, e podem diminuir os mecanismos de resistência ao fármaco.

As nanoemulsões podem ser produzidas por métodos de alta e baixa energia. Os métodos de baixa energia são: emulsificação espontânea, métodos de inversão de fase e método de remoção de solvente. Nos métodos de alta energia são usados homogeneizadores de alta pressão, microfluidizadores e ultrassonicadores. O tamanho da partícula está associado aos instrumentos e variáveis como energia, tempo, temperatura e composição da formulação. As operações de alta energia têm o lado positivo por produzirem menor tamanho de gotícula e serem mais rápidas, mas podem ser inadequadas para certos medicamentos sensíveis ao calor. Neste caso, métodos de baixa energia e temperatura devem ser usados (JASMINA *et al.*, 2017).

Estabilidade das nanoemulsões

As forças atrativas de Van der Waals e as interações repulsivas entre as gotas irão influenciar na estabilidade de uma emulsão. Esta estabilidade geralmente está relacionada a resistência à coalescência (fusão) das gotas dispersas. Isso é dependente da natureza física do

filme interfacial, da existência de barreira elétrica (potencial zeta) ou estérica, da viscosidade da fase contínua, da distribuição do tamanho de gota (diâmetro médio e índice de polidispersão), da temperatura, do volume de fase dispersa e da diferença de densidade entre as fases (TORRES *et al.*, 2020).

As gotas de uma emulsão colidem a todo momento, devido ao frequente movimento destas, desta forma o filme interfacial deve ser resistente a esses choques, para que este não se rompa e resulte na coalescência das gotas. Com isso o filme deve ter natureza física elástica para conseguir acompanhar as deformações das gotas (TORO-MENDOZA; PETSEV, 2010).

A presença de gotas carregadas na emulsão dificulta a aproximação destas, evitando a coalescência e a floculação, devido a formação de uma barreira elétrica. Em relação a distribuição de tamanho de gota, tem-se que quanto mais uniforme for esta distribuição, mais estável será a emulsão. As gotas maiores possuem área interfacial menor, são então mais estáveis e tendem a crescer mais que as menores (TADROS *et al.*, 2004).

A frequência de colisão também depende do volume da fase dispersa. Por exemplo, com o aumento da concentração de óleo mais gotas serão formadas, aumentando a probabilidade de choque entre as gotas, favorecendo assim a coalescência destas (TADROS *et al.*, 2004).

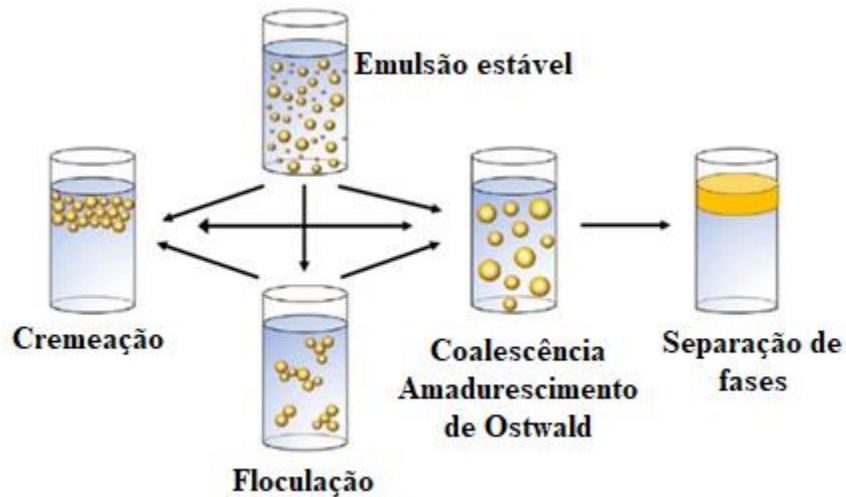
Outro fator importante é a diferença de densidade entre as fases, pois se essa diferença for muito significativa, pode ocorrer a separação de fases da emulsão. Para contornar este problema, faz-se uso de compostos que são conhecidos como “agentes de peso” que quando adicionados a uma das fases têm a função de deixar as densidades das duas fases mais próximas, como exemplo tem-se a mistura da fase oleosa com óleos ou silicones mais densos para aproximar do valor da densidade da fase aquosa (TADROS *et al.*, 2004; COSTA *et al.*, 2019).

Mecanismos de desestabilização de nanoemulsões

As emulsões podem desestabilizar devido a diversos mecanismos físico-químicos. Estabilidade da emulsão significa a capacidade de uma emulsão resistir a mudanças nas suas propriedades físico-químicas ao longo do tempo. Sendo importante identificar qual o mecanismo dominante responsável pela instabilidade de uma emulsão, pois esse conhecimento poderá ajudar a determinar uma estratégia para melhorar a sua estabilidade (McCLEMENTS, 2005).

Dentre os mecanismos físicos podem ser citados os seguintes: os processos de separação devido à ação da gravidade, cremação/sedimentação, floculação, coalescência, amadurecimento de Ostwald, como mostra a Figura 12.

Figura 12 – Mecanismos físicos de desestabilização de emulsões



Fonte: Liu *et al.* (2019) com adaptações.

No caso de emulsões óleo em água, a cremação ou sedimentação devido à ação da gravidade vai ocorrer quando a densidade do óleo for menor ou maior do que a densidade da água. Na maioria dos casos, o óleo possuirá uma densidade menor do que a da água, podendo resultar na cremação (TADROS *et al.*, 2004). Porém, este fenômeno pode ser prevenido com a adição de agentes de peso que aumentarão a densidade do óleo, igualando as duas densidades e evitando esses mecanismos de desestabilização por ação da gravidade.

O mecanismo de floculação é caracterizado pela aproximação das gotas, formando agregados, mantendo o filme interfacial e da individualidade das gotas. Na floculação, as gotas ficam próximas umas das outras por muito tempo, porém, as forças atrativas não são suficientemente significativas para que elas coalesçam formando uma única gota (TADROS *et al.*, 2004). A floculação antecede a coalescência e a ruptura do sistema. A floculação pode ser em vários casos um processo reversível, que pode ser revertido com o fornecimento de muito menos energia do que a requerida no processo original de emulsificação (MYERS, 1999) e está relacionada ao potencial zeta.

No mecanismo de coalescência ocorre a formação de uma única gota maior a partir de outras. Neste processo há a redução da área interfacial total e a ruptura do filme interfacial entre as gotas. Embora a coalescência resulte de mudanças microscópicas

significativas na condição da fase dispersa, ela pode não resultar imediatamente em uma separação de fases. A separação de fases, por outro lado, é macroscopicamente visível, e é uma consequência do processo microscópico de coalescência da gota. Nesse evento, a identidade individual da gota é perdida, assim como as propriedades físicas e químicas da emulsão (MYERS, 1999).

O envelhecimento de Ostwald resulta do fato de que as fases não são totalmente imiscíveis. As gotas menores possuem solubilidade maior quando comparadas com as gotas maiores. As gotas menores tendem a se incorporar às gotas maiores fazendo com que as gotas maiores cresçam em detrimento das menores (TADROS *et al.*, 2004) e está relacionado com o índice de polidispersão da nanoemulsão (Pdi).

Óleo de linhaça como núcleo oleoso em nanoemulsões

A semente de linhaça (*Linum usitatissimum* L.) popularmente conhecida como linhaça ou linho, é uma planta pertencente à família das *Linaceas* originária da Ásia (KAITHWAS; MAJUMDAR, 2013) é uma fonte vegetal rica em óleo polinsaturado contendo ácidos graxos ômega, sobretudo o ácido α -linolênico.

Em um trabalho recentemente publicado, o óleo de linhaça foi utilizado para encapsular o ácido betulínico em nanoemulsões. A IC₅₀ mostrou uma seletividade aumentada para o ácido betulínico emulsificado quando comparado à sua forma livre para as células HCT-116. Os valores de IC₅₀ para as nanoemulsões sintetizadas mostraram uma faixa de 3,2 a 3,7 μ M (carcinoma colorretal), 5,6 e 11,5 μ M (câncer de pulmão), 5,8 e 7,3 μ M (glioblastoma) e > 16,5 μ M para fibroblastos normais. Nos ensaios de liberação *in vitro* de 48 h, apresentou liberação controlada, gerando perspectivas promissoras para a liberação prolongada de ácido betulínico em aplicações anticancerígenas (REBOUÇAS *et al.*, 2022).

4 EXPERIMENTAL

4.1 Materiais

O alginato de sódio PA e a goma guar PA foram adquiridas da Êxodo Científica (São Paulo, Brasil). A hesperidina 95% e o ácido betulínico 98% foram adquiridos da Xi'an Quanao Biotech Co. (Xi'an, China). O óleo de linhaça previamente caracterizado foi cedido

Laboratório de Polímeros e Inovação de Materiais (LabPIM). O Pluronic® F127 foi adquirido da Sigma-Aldrich (Alemanha). O cloreto de cálcio PA, o clorofórmio PA e o Dimetil Sulfóxido (DMSO) PA foram adquiridos da Labsynth (São Paulo, Brasil). Metanol grau HPLC e a acetonitrila grau HPLC foram adquiridos da Tedia (EUA). O óxido de deutério (D₂O) e o MTT foi adquirido da Merck Millipore (Alemanha). A água utilizada foi obtida em purificador MilliQ e os demais reagentes utilizados nas análises eram PA.

4.2 Linhagens e cultura de células

As linhagens celulares usadas neste estudo HL-60 (leucemia promielocítica) foi fornecida pelo *National Cancer Institute* (NCI, EUA) e a linhagem não tumoral L929 (fibroblasto murino) foi fornecida pelo BCRJ (Banco de Células do Rio de Janeiro). Ambos cresceram em seus respectivos meios, *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 e *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Gibco®), suplementado com 10% fetal soro bovino (Gibco®) e antibiótico a 1% (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA), incubado sob 5% de CO₂.

4.3 Caracterização dos polissacarídeos

4.3.1 Ressonância Magnética Nuclear

As análises de RMN foram realizadas pela Embrapa e pelo CENAUREMN - Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear vinculado a Universidade Federal do Ceará e coordenado pelo Professor Dr. Edilberto Rocha Silveira.

Um total de 10 mg de polissacarídeo foi solubilizado em 0,6 mL de D₂O antes da análise de RMN. Os espectros unidimensionais de RMN de ¹H e de ¹³C foram obtidos usando o espectrômetro de RMN Agilent 600-MHz e RMN Bruker Avance DRX 500, a 70 °C (MUSCHIN; YOSHIDA, 2012). Os espectros bidimensionais de RMN foram obtidos através da técnica HSQC de ¹H-¹³C (ANEXO-A e ANEXO-B). Os dados foram processados e analisados no software MestReNova (versão 14.0.0).

A partir da identificação e integração dos sinais dos prótons do polissacarídeo em 5,189 ppm, 4,887 ppm, 4,843 ppm e 4,800 ppm foi determinada a razão entre ácido manurônico e ácido gulurônico do alginato e através da integração dos sinais e a razão entre

manose e galactose da goma guar através das integrações do sinal de hidrogênio do carbono anomérico M1 e G1 da manose e da galactose em 5,101 ppm e 5,413 ppm, respectivamente.

4.3.2 Cromatografia de Permeação em Gel

A cromatografia de permeação em gel (GPC) foi empregada para determinar a massa molecular média numérica (M_n) e a massa molecular média ponderal (M_w) do alginato de sódio e da goma guar. Os experimentos GPC foram realizados com um cromatógrafo de permeação em gel em um instrumento Shimadzu à temperatura ambiente usando uma coluna linear Ultrahydrogel (7,8 mm \times 300 mm), vazão de 0,5 mL min⁻¹, concentração de polissacarídeo de 0,1% (p/v) e água como o solvente. Um refratômetro diferencial foi usado como detector, usando nitrato de sódio 0,1 mol L⁻¹ contendo 200 mg mL⁻¹ de azida como eluente. A solução aquosa de polissacarídeo com concentração de 1 mg mL⁻¹ foi filtrada através de uma membrana de celulose de 0,22 μ m antes da injeção. Para a curva de calibração foram utilizados padrões de pululana (Fluka Analytical, St. Louis, EUA) variando massas moleculares de 6.000 a 2.560.000 Da (CUNHA, DE PAULA; FEITOSA, 2007).

4.3.3 Análise elementar

As composições elementares (CHN) foram analisadas usando analisador elementar (Elemental, Vario). O elemento correspondente foi determinado em percentagem. A partir do percentual de nitrogênio foi estimado o valor do percentual de proteínas utilizando o fator de conversão de 5,95.

4.4 Preparo e caracterização das nanoemulsões

Inicialmente foram testadas as solubilidades dos ativos em ácido oléico e óleo de linhaça obtendo-se os melhores resultados para o óleo de linhaça. As nanoemulsões foram preparadas para serem usadas no preparo das microcápsulas MNED, MNEDr, MNEH, MNEB e Controle-MNE conforme quantidades descritas na Tabela 5.

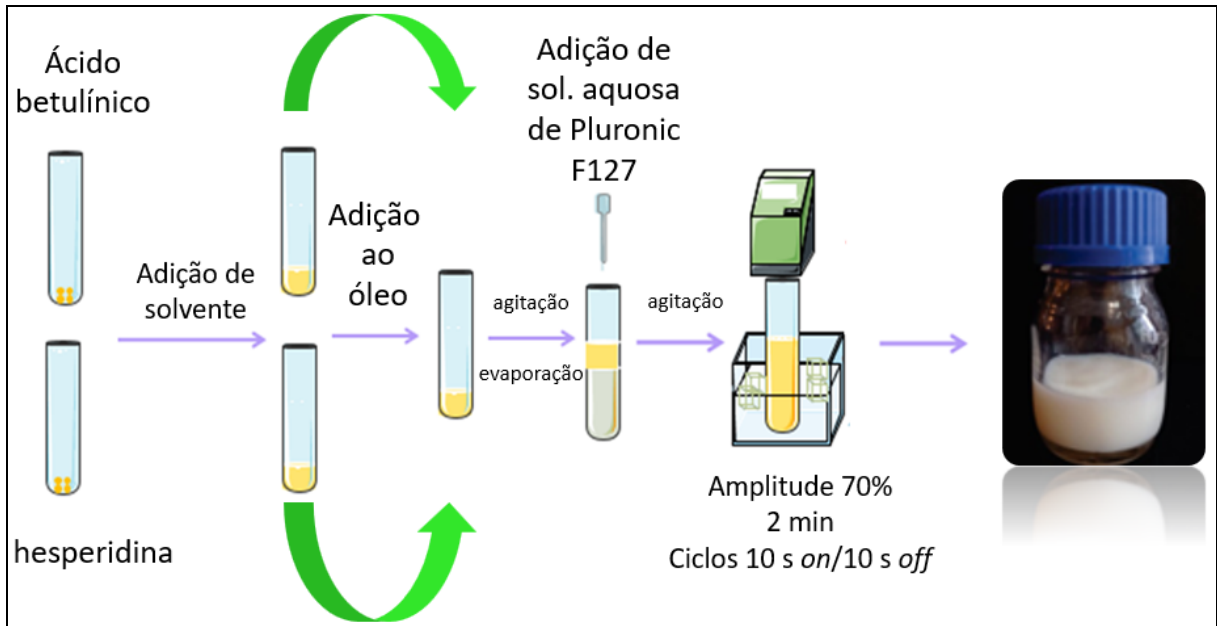
Tabela 5 - Composição das nanoemulsões

Formulações	AB (g)	Hesp (g)	Óleo de linhaça (g)	Pluronic® F127 (g)	Água (g)
NE-D	0,05	0,05	2,00	0,10	7,80
NE-B	0,05	-	2,00	0,10	7,85
NE-H	-	0,05	2,00	0,10	7,85
Controle-NE	-	-	2,00	0,10	7,90

NE-D: nanoemulsão contendo hesperidina e ácido betulínico, NE-B: nanoemulsão contendo ácido betulínico, NE-H: nanoemulsão contendo hesperidina, Controle-NE: nanoemulsão sem ativos, AB: ácido betulínico e Hesp: hesperidina. MNED: microcápsula contendo os dois ativos à base de nanoemulsão. MNEDr: microcápsula reticulada contendo os dois ativos à base de nanoemulsão. MNEH: microcápsula contendo como ativo somente hesperidina à base de nanoemulsão. MNEB: microcápsula contendo como ativo somente ácido betulínico à base de nanoemulsão. Controle-MNE: microcápsula sem ativo à base de nanoemulsão.

Inicialmente, o ácido betulínico foi solubilizado em 4 mL de clorofórmio e a hesperidina em 4 mL de metanol. Em seguida, essa solução foi adicionada ao óleo da semente de linhaça, homogeneizado e rotoevaporado a 40 °C, sob pressão reduzida até que o clorofórmio e metanol fosse completamente removido. Posteriormente, essa solução foi adicionada a uma solução contendo Pluronic® F127 e água nas quantidades conforme descritas na Tabela 2. As formulações foram então submetidas à sonicação em um sonicador Branson Sonifier W-450D (Teltow, Alemanha, Hielsher) com sonda, amplitude de 70% e potência de 100-103 W, por 2 min em 12 ciclos de 10 s ligado e 10 s desligado, em banho de gelo (REBOUÇAS *et al*, 2022) como mostra a Figura 13.

Figura 13 – Quadro esquemático do preparo da nanoemulsão



Fonte: Elaborada pela autora.

O tamanho das nanogotículas da emulsão, estimado pelo diâmetro médio hidrodinâmico, o índice de polidispersidade (Pdi) e o potencial zeta (ζ), foram determinados por espalhamento de luz dinâmico (EDL) usando um NanoZS® (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). As medidas foram feitas em um ângulo de 90° após dispersão de 50 μL das nanoemulsões em 5,0 mL de água Milli-Q. Todas as medidas foram realizadas em triplicata a 25 °C com condutividade comparável para determinar o potencial zeta.

4.5 Obtenção das microcápsulas por *spray drying*

As microcápsulas foram preparadas para apresentarem a mesma concentração de ácido betulínico e/ou hesperidina (45 mg g⁻¹) com exceção da cápsula Controle-MNE que não contém ativos. Essas concentrações foram adotadas após resultados de testes preliminares de citotoxicidade de modo que a microcápsula apresentasse concentração suficiente para conseguir determinar a IC₅₀ em célula tumoral de HL-60 (leucemia).

Foram obtidas microcápsulas à base de nanoemulsão e polissacarídeos (Controle-MNED, MNEH, MNEB, MNED e MNEDr) e à base somente de polissacarídeos e Pluronic® F127 (MAQD e MAQDr) conforme quantidades da Tabela 6.

Tabela 6 - Composição das microcápsulas

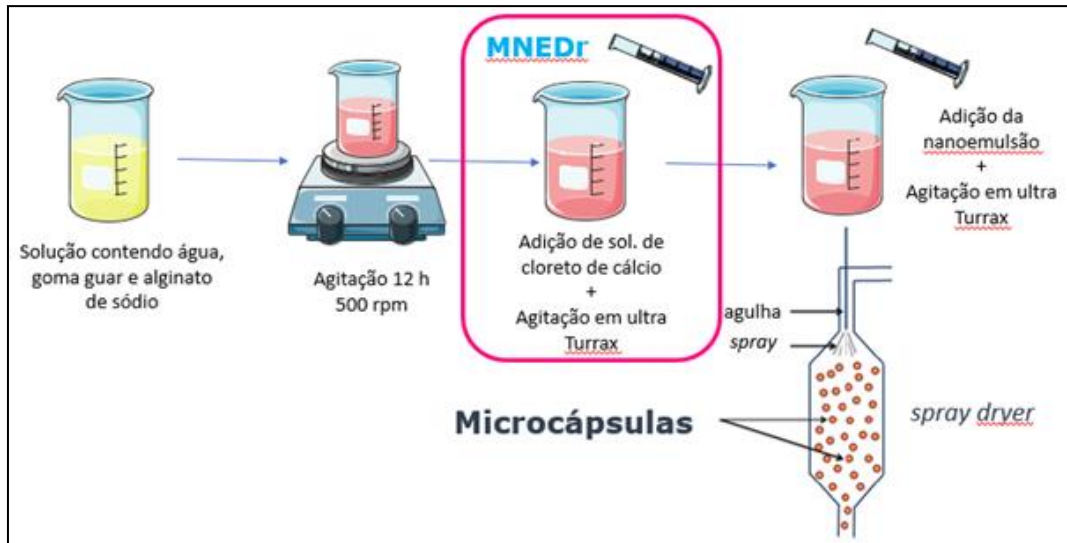
Microcápsulas	Composição / g								
	NE-D	NE-B	NE-H	Controle-NE	GG	ALG	AB	Hesp	Pluronic® F127
MAQD	-	-	-	-	0,605	0,300	0,050	0,050	0,100
MAQDr	-	-	-	-	0,600	0,300	0,050	0,050	0,010
MNED	2,000	-	-	-	0,369	0,300	-	-	-
MNEDr	2,000	-	-	-	0,364	0,300	-	-	-
MNEH	-	-	2,000	-	0,379	0,300	-	-	-
MNEB	-	2,000	-	-	0,379	0,300	-	-	-
Controle-MNE	-	-	-	2,000	0,465	0,300	-	-	-

NE-D: nanoemulsão contendo hesperidina e ácido betulínico, NE-B: nanoemulsão contendo ácido betulínico, NE-H: nanoemulsão contendo hesperidina, Controle-NE: nanoemulsão sem ativos, MAQD: microcápsula contendo hesperidina e ácido betulínico à base de solução aquosa polimérica, MAQDr: microcápsula contendo hesperidina e ácido betulínico à base de solução aquosa polimérica com alginato reticulado; MNED: microcápsula contendo hesperidina e ácido betulínico à base de nanoemulsão, MNEDr: microcápsula contendo hesperidina e ácido betulínico à base de nanoemulsão contendo alginato reticulado, Controle-MNE: microcápsula à base de nanoemulsão sem ativo, MNEB: microcápsula à base de nanoemulsão contendo ácido betulínico, MNEH: microcápsula à base de nanoemulsão contendo hesperidina, AB: ácido betulínico, ALG: alginato de sódio, GG: goma guar e Hesp: hesperidina.

Inicialmente foi preparado 100 mL de solução aquosa contendo os polímeros sob agitação a 500 rpm por 12 h. Posteriormente, somente no preparo das formulações, MAQDr e MNEDr, foi adicionado 1 mL de uma solução aquosa a 0,5% m/v de cloreto de cálcio à solução polimérica sob agitação em agitador Ultra Turrax a 15000 rpm, em banho de gelo durante 1 min para reticular o alginato de sódio pelo método de gelificação ionotrópica interna. Em seguida, foram adicionados mais 100 mL de água e agitado novamente nas mesmas condições.

Para o preparo das microcápsulas MNED, MNEDr MNEH, MNEB e Controle-MNE os demais componentes da formulação foram adicionados e homogeneizados por mais 1 min na mesma rotação em banho de gelo conforme Figura 14.

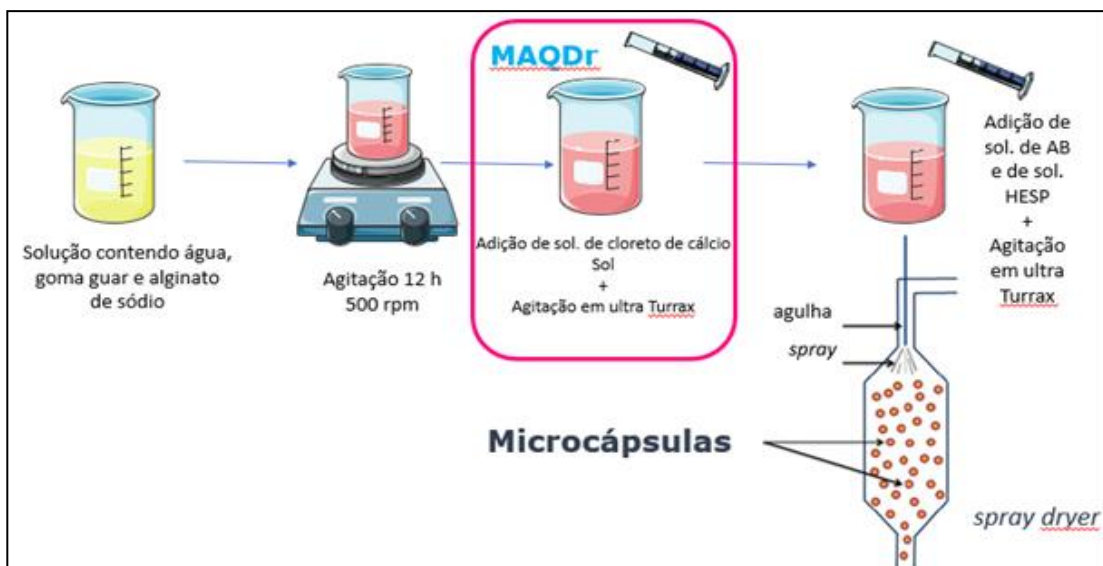
Figura 14 – Quadro esquemático do preparo das microcápsulas MNED e MNEDr.



Fonte: Elaborado pela autora.

Para as microcápsulas MAQD e MAQDr os ativos foram solubilizados inicialmente em 5 mL de metanol (hesperidina) e 5 mL de clorofórmio (ácido betulínico) e depois adicionados à solução polimérica e agitado em agitador Ultra Turrax a 15000 rpm por 1 min em banho de gelo conforme Figura 15.

Figura 15 – Quadro esquemático do preparo das microcápsulas MAQD e MAQDr.



Fonte: Elaborado pela autora.

As microcápsulas foram obtidas após secagem das soluções em secador Mini Spray Dryer B-290 (Büchi). Após vários testes com diferentes temperaturas de entrada e fluxo

de alimentação foram selecionadas as melhores condições para que não formasse película no corpo do equipamento prejudicando o rendimento e a formação de pó. As temperaturas de entrada e a saída foram de 170 e 91 °C, respectivamente (GALLARDO *et al.*, 2013). O fluxo de alimentação foi de 10 mL min⁻¹ e o fluxo de volume do aspirador foi de 35 m³ h⁻¹.

4.6 Morfologia

As microcápsulas, ativos cristalinos e polissacarídeos foram fixados em *stubs* metálicos e pulverizados com ouro por 20 s para a avaliação microscópica do aspecto e morfologia. A morfologia das microcápsulas foi observada usando um microscópio eletrônico de varredura (MEV) Quanta 400 FEG a 5-6 kV (FEI, Hillsboro, OR, América) com aumento de 5000 x.

4.7 Quantificação de ácido betulínico e hesperidina por HPLC

Padrões de ácido betulínico em metanol (para determinar a eficiência de encapsulamento) e em tampão DMSO:PBS pH 7,4 30:70 (para ensaio de liberação) foram analisados em HPLC Shimadzu CTO-20A (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) equipado com um detector ultravioleta (UV) a 210 nm para ácido betulínico através de uma coluna C-18 (4,6 × 150 mm × 5 µm) equipada com um módulo controlador de temperatura (± 0,1 °C) a 25 °C, usando como fase móvel acetonitrila:água:1% de ácido fosfórico (80:20:0,5 v/v/v) com vazão de 0,7 mL min⁻¹, volume de injeção 20 µL, modo isocrático, tempo de corrida 15 min de acordo com as condições do método de Wójciak-Kosior *et al.* (2016). O tempo de retenção encontrado foi de 9,6 min.

Padrões de hesperidina em metanol (para determinar a eficiência de encapsulamento) e em tampão DMSO:PBS pH 7,4 30:70 (para ensaio de liberação) foram analisados em HPLC Shimadzu CTO-20A (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) equipado com um ultravioleta (UV) a 286 nm para hesperidina através de uma coluna C-18 (4,6 × 150 mm × 5 µm) equipada com um módulo controlador de temperatura (± 0,1 °C) a 25 °C, utilizando como fase móvel água/acetonitrila/ácido acético (78:19:3, v/v) com vazão de 0,8 mL min⁻¹, volume de injeção de 20 µL, modo isocrático, tempo de corrida 25 min de acordo com as condições do método de Saeidi *et al.* (2011). O tempo de retenção encontrado foi de 14,8 min.

O método de quantificação para ácido betulínico e hesperidina foi validado usando soluções padrão dos ativos em metanol e em DMSO:tampão 7,4 30:70 de acordo com o guia de validação de métodos analíticos do INMETRO para obter os parâmetros de linearidade, precisão (repetibilidade), recuperação, limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD). O estudo de linearidade foi realizado nas concentrações de 0,5, 1,0, 5,0, 10,0, 20,0, 30,0 e 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em triplicata. A precisão foi avaliada quanto à repetibilidade. LD e LQ foi obtido pelo método do desvio padrão de acordo com as equações:

$LD = 3,3 \times DP/S$ e $LQ = 10 \times DP/S$, onde DP é o desvio padrão da resposta do solvente de diluição (em branco) e S = inclinação da linha de regressão.

4.8 Eficiência de Encapsulação

A quantificação da hesperidina e do ácido betulínico nas microcápsulas para obter o valor da Eficiência de Encapsulação (EE) foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

Para a quantificação dos ativos nas formulações foi seguido o método de Rehman *et al.* (2021) com adaptações para microcápsulas obtidas por *spray dryer*.

Para determinar a Eficiência de Encapsulação do ácido betulínico, 10 mg de microcápsulas foram adicionados a 5 mL de água. Em seguida, 5 mL de DMSO foram adicionados e agitados em vórtex por 10 min. À solução formada foram adicionados 10 mL de clorofórmio e agitados 20 min para extrair o ácido betulínico. Este procedimento foi repetido 2 vezes. A solução de clorofórmio obtida contendo os ativos foi separada por centrifugação e o solvente evaporado. O resíduo obtido foi solubilizado em metanol grau HPLC para obter uma solução com 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ativo e, antes de ser injetado, foi filtrado através de um filtro de seringa de 0,22 μm para ser analisada em HPLC.

Para determinar a eficiência de Encapsulação da hesperidina, 10 mg de microcápsulas foram adicionados a 5 mL de água. Em seguida, 5 ml de DMSO foram adicionados e agitados em vórtex por 10 min. À solução formada adicionou-se 10 mL de metanol e agitou-se durante 20 min. A solução foi centrifugada a 3500 rpm por 10 min e filtrada através de um filtro de seringa de 0,22 μm para ser analisada em HPLC.

A eficiência de encapsulamento para hesperidina e ácido betulínico foi calculada de acordo com a equação (1) (JOSINO *et al.*, 2021):

$$EE = [QTD / QTA] \times 100$$

Onde, EE = Eficiência de Encapsulamento; QTD = Quantidade de ativo determinada no sistema polimérico; QTA = Quantidade de ativo teoricamente adicionada ao sistema polimérico.

4.9 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Espectros infravermelhos foram obtidos em espectrômetro modelo Shimadzu IRTracer-100, na região do número de onda de 4000 a 400 cm^{-1} . Cerca de 5 mg de cada amostra foi misturado e prensada com KBr.

4.10 Análise térmica por Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)

As análises de DSC foram realizadas em um equipamento DSC-Q50 da Shimadzu em atmosfera inerte (N_2 , 50 mL min^{-1}). O programa teve uma corrida única de 25 a 350 $^{\circ}\text{C}$, a uma taxa de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$. A massa de cada amostra foi de 10 mg.

4.11 Difração de Raios X (DRX)

As amostras de microcápsulas controle e com ativos e os ativos AB e Hesp. foram analisadas usando um Difratorômetro D8 Advanced Bruker-AXS (Alemanha), equipado com um goniômetro θ/θ usando fonte de radiação $\text{Cu K}\alpha$, operando com geometria Bragg-Bentano, detector LynxEye. A varredura usada na região do ângulo de difração (2θ) de 5 $^{\circ}$ a 90 $^{\circ}$ com *step size* de 0,02 com 2 segundos. As amostras foram maceradas para obter um pó fino antes da análise.

4.12 Estudo do mecanismo de liberação *in vitro*

O estudo do mecanismo de liberação *in vitro* do ácido betulínico e da hesperidina co-encapsulados foi realizado com as microcápsulas com maiores Eficiências de Encapsulação (EE), ou seja, as microcápsulas MNED e MNEDr. Inicialmente, foi realizado um teste de solubilidade em triplicata para determinar a condição *sink* para o estudo de liberação *in vitro*. Um excesso de quantidade de ácido betulínico e hesperidina foram adicionadas a tubos contendo 3 mL de meio receptor DMSO: fosfato de potássio tamponado (PBS, pH = 7,4) nas proporções 10:90 e 30:70 (WENG; TONG; CHOW, 2020). As

suspensões foram agitadas por 72 h à temperatura ambiente, em seguida, filtrada através de uma membrana de 0,45 μm e diluída para análise em HPLC. Foi considerado como condição *sink* como a concentração máxima correspondendo a 10% da solubilidade no meio receptor (LIU *et al.*, 2013).

Os estudos de liberação do ácido betulínico e da hesperidina a partir das microcápsulas foram realizados em células de difusão do tipo Franz. Neste estudo, uma membrana de diálise (MCWO 12-14 kDa, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foi usada como uma membrana de difusão, que foi imersa em meio receptor por 24 h antes do experimento. A área de difusão foi de 1,55 cm^2 , o compartimento receptor foi preenchido com o volume de 9,5 mL de DMSO/pH do meio PBS tamponado com fosfato pH 7,4 30:70 e foi agitado magneticamente a 200 rpm. Uma massa de 0,01 g (contendo aproximadamente 450 μg de ativo) de microcápsulas foram colocados no compartimento doador com 1 mL de tampão. A temperatura foi mantida a $37,0 \pm 0,5$ °C por 48 h.

Para quantificar os ativos liberados, amostras de 1 mL foram retiradas do compartimento receptor em intervalos de tempo predeterminados para quantificação por HPLC e o mesmo volume removido foi substituído por meio receptor novo. O estudo foi realizado em triplicata para cada formulação e para os ativos livres.

Para o estudo do mecanismo de liberação, dois modelos matemáticos foram aplicados aos dados obtidos separadamente: o modelo Korsmeyer-Peppas e o modelo Higuchi. (CRACIUN *et al.*, 2019).

Os modelos mencionados são aplicáveis a partículas formadas por materiais encapsulantes poliméricos, como os utilizados nas formulações. Para os modelos aplicados, apenas os pontos das primeiras 6 h de liberação ($\leq 60\%$ do total liberado) foram utilizados nos cálculos.

O fluxo de estado estacionário (J) dos ativos foi calculado a partir da inclinação da seção linear da curva da quantidade cumulativa liberada por área pelo eixo do tempo. O *lag time* (tempo de latência) foi determinado como o intercepto do fluxo em $\mu\text{g cm}^{-2}$ pelo eixo do tempo (MACHERAS; ILIADIS, 2006).

4.13 Ensaio MTT de citotoxicidade *in vitro*

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados no NPDM - Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos no Laboratório de Oncologia Experimental vinculado à Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

O potencial citotóxico do ácido betulínico, da hesperidina, dos ativos combinados e das microcápsulas e microcápsulas controles foram determinados usando o ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (YE *et al.*, 2018). As células foram semeadas em concentrações de $0,7 \times 10^5$ células mL⁻¹ para HL-60 (leucemia promielocítica) e L-929 (fibroblasto não tumoral) em 7×10^4 células mL⁻¹ e cultivado por 72 h a 37 °C e CO₂ (5%). Após a exposição, o meio foi alterado seguido pela adição de 5 µL de reagente MTT (estoque de 5 mg mL⁻¹). As células foram incubadas por 3 h em em DMSO (100 µL por poço). A absorbância foi medida espectrofotometricamente usando o espectrofotômetro de microplacas Elisa (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EUA) a 570 nm. Foram calculados a viabilidade celular em concentração única de 500 µg mL⁻¹ e a IC₅₀ determinada pelo método gráfico e regressão linear a partir dos resultados obtidos das amostras diluídas.

4.14 Avaliação da Segurança não clínica em *zebrafish* (*Danio rerio*) adulto

Os testes de avaliação não clínica em *zebrafish* foram realizados no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará.

Foram analisadas 2 amostras de microcápsulas de goma guar e alginato contendo hesperidina e ácido betulínico: MNED e MNEDr. Todas as amostras foram preparadas sob condições assépticas e esterilizadas com membranas filtrantes Millipore. Como veículo das amostras, foi utilizado uma solução aquosa sem microcápsulas.

Foram utilizados *zebrafish* (*Danio rerio*) adulto (ZFa), selvagens, ambos os sexos com idade de 60-90 dias, tamanhos de $3,5 \pm 0,5$ cm e peso $0,4 \pm 0,1$ g, obtidos da Agroquímica: Comércio de Produtos Veterinários LTDA (Ceará, Brasil). Grupos de 50 peixes foram aclimatados por 24 h em aquários de vidro (40 x 20 x 25 cm), contendo água desclorada (anticloro *ProtecPlus*[®]) e bombas de ar com filtros submersos, a 25 °C e pH 7,0, com ciclo cicardiano de 14:10 h de claro/escuro. Os peixes receberam ração (*Spirulina*[®]) *ad libitum* 24 h antes dos experimentos.

Após os experimentos, os animais foram sacrificados por imersão em água gelada (2-4 °C), por 10 minutos, até a perda de movimentos operculares (CONCEA, 2018). Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética do Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUAP - UFC), sob protocolo nº 1806202101.

Os testes com *zebrafish* foram realizados baseando-se em metodologias propostas por Magalhães *et al.* (2017). No dia dos experimentos, os peixes foram selecionados randomicamente, transferidos para uma esponja úmida, tratados com as amostras testes ou controle, via oral (*v.o.*) (COLLYMORE; RASMUSSEN; TOLWANI, 2013). Em seguida, os animais foram acondicionados individualmente em copos de vidro (250 mL) contendo 150 mL de água do aquário para repouso. Para os tratamentos via oral foi usada pipeta automática variável de 20 μL com ponteiros estéreis.

4.14.1 Atividade locomotora (Teste de Campo Aberto)

Foi realizado o teste de campo aberto (AHMAD; RICHARDSON, 2013) para avaliar alteração ou não da coordenação motora dos animais, seja por sedação e/ou relaxamento muscular. Inicialmente, os animais ($n = 6$ /grupo) foram tratados com 20 μL , via oral, de MNED (2,5 ou 5,0 ou 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) ou MNEDr (2,5 ou 5 ou 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$), ou veículo (20 μL ; *v.o.*). Um grupo de animais sem tratamentos foi incluído (Naive). Após 1 hora dos tratamentos, os animais foram adicionados em placas de Petri de vidro (10 x 15 cm), contendo a mesma água do aquário, marcadas com quatro quadrantes e analisada a atividade locomotora através da contagem do número de cruzamento de linhas (CL) individualmente durante 0-5 minutos.

4.14.2 Toxicidade aguda 96 h

O estudo da toxicidade aguda foi realizado frente ao *zebrafish* (*Danio rerio*) adulto conforme metodologias propostas pela OECD (OECD, 1992) e Huang *et al.* (2014). Os animais ($n=6$ /cada) foram tratados com 20 μL , via oral, de MNED (2,5 ou 5,0 ou 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) ou MNEDr (2,5 ou 5 ou 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$), ou veículo (20 μL ; *v.o.*) e deixados em repouso para analisar a taxa de mortalidade. O grupo veículo foi utilizado como controle. Após 96 horas dos tratamentos, foi anotado o número de peixes mortos em cada grupo e determinado a concentração letal capaz de matar 50% dos animais (CL_{50}) através do método matemático Trimmed Spearman-Kärber com intervalo de confiança de 95% (ARELLANO-AGUILAR *et al.*, 2015).

4.15 Análise estatística

As avaliações estatísticas dos resultados foram analisadas por GraphPad Prism 5.0. Os valores IC_{50} são expressos como média \pm desvio padrão (DP). Para comparação de vários grupos, a análise de variância (ANOVA) foi aplicada considerando $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.

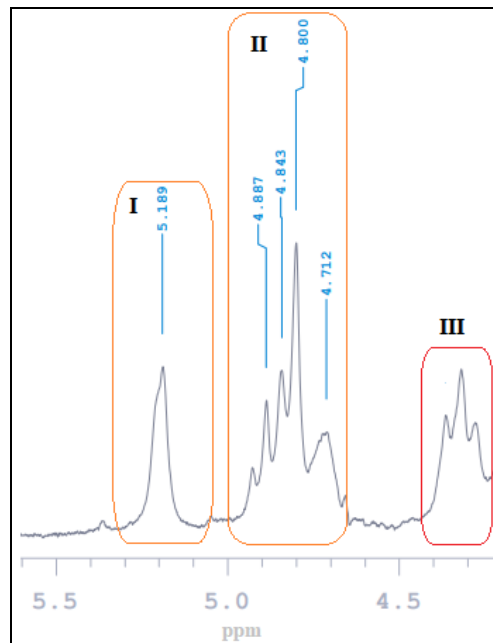
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização dos polissacarídeos

As propriedades físicas dos alginatos são amplamente determinadas pela quantidade relativa dos tipos de blocos presentes no copolímero. Portanto, a razão ácido manurônico/ácido gulurônico (M/G) é um valor importante para a natureza do gel formado a partir de alginatos.

A região do espectro de RMN de 1H da amostra de alginato de sódio utilizada neste estudo (Figura 16), mostra sinais específicos do próton anomérico confirmados pelos espectros de RMN de ^{13}C e HSQC 1H - ^{13}C (ANEXO A e ANEXO B).

Figura 16 – Espectro de RMN de 1H do alginato de sódio



Fonte: Elaborado pela autora.

A composição e também as estruturas em bloco das moléculas de alginato são frequentemente determinadas por espectroscopia de RMN de 1H permitindo calcular a razão M/G e determinar a estrutura do bloco. A razão M/G foi obtida através da integração de

três regiões do espectro: região I referentes à fração G1; região II referente às frações MG, MGM, GGM e MM; e à região III de acordo com Jensen, Larsen e Engelsen (2015):

$$M/G = (II + III - I) / I$$

Os deslocamentos observados nos espectros de RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e HSQC ^1H - ^{13}C estão de acordo com os dados encontrados por Huamani-Palomino *et al.* (2021) e são mostrados na Tabela 7:

Tabela 7 - Deslocamentos das frações dos prótons dos blocos do alginato de sódio

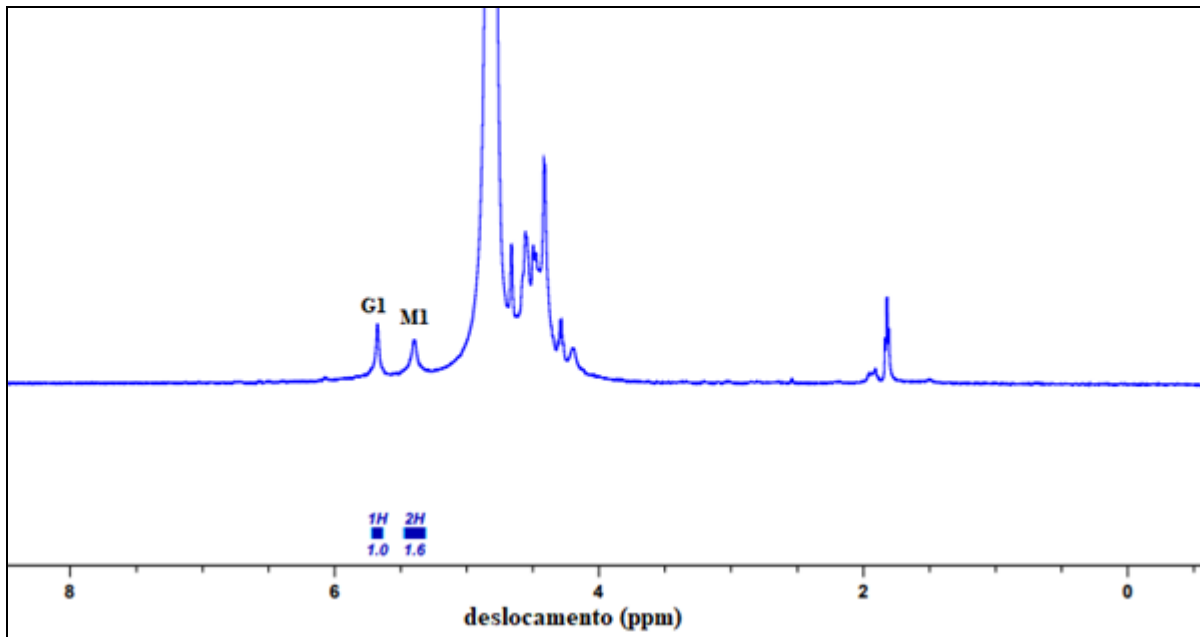
Frações	δ (ppm)	
	RMN ^1H	RMN ^{13}C
F _{G-1}	5,189	101,53
F _{GGM}	4,887	67,77
F _{MGM}	4,843	101,33
F _{MG}	4,800	100,53

Fonte: A autora

O valor encontrado da razão M/G do alginato de 1,36 está de acordo com dados da literatura. Valores M/G muito acima de 1 são característicos de alginato de sódio menos poroso e formam géis mais turvos (ANDRIAMANANTOANINA; RINAUDO, 2010; FERTAH *et al.*, 2017).

A solubilidade e viscosidade de galactomananas como a goma guar são dependentes especialmente da razão Manose/Galactose. Geralmente, galactomananas com razões M/G mais baixas (maiores teores de galactose) são facilmente dissolvidos em água fria, formam soluções menos viscosas, enquanto o aquecimento é necessário para solubilizar galactomananas com menores teores de galactose (LIU *et al.*, 2020).

A determinação da razão M/G da goma guar utilizada neste estudo foi obtida através da razão da integração dos sinais dos hidrogênios dos carbonos anoméricos M-1 e G-1 da estrutura da goma guar obtidos no espectro de RMN de ^1H (Figura 17) em 5,101 ppm e 5,413 ppm confirmados pelos espectros de RMN de ^{13}C e HSQC ^{13}C - ^1H (ANEXO C e ANEXO D), encontrando o valor de 1,60.

Figura 17 - Espectro de RMN ^1H da goma guar

Fonte: Elaborada pela autora.

A massa molecular numérica média, a massa molecular ponderal média e a dispersão do alginato de sódio e da goma guar foram determinadas através dos resultados das análises de Cromatografia de Permeação em Gel.

A Massa molecular numérica média (M_n), é definida como sendo a massa molecular de todas as cadeias, dividida pelo número total de cadeias, desta forma, essa massa molecular analisa o número de cadeias presentes na amostra geral.

A Massa molecular ponderal média (M_w) é outra forma de se calcular a massa molecular média, onde a massa molecular de cada fração contribui de maneira ponderada para o cálculo da média. Com base nos valores das massas moleculares médias (M_w e M_n) resultantes da distribuição de massa molecular determina-se a polidispersividade de massa molecular (M_w/M_n). Esse valor é sempre maior ou igual a 1. Quando M_w é igual M_n tem-se um polímero monodisperso, ou seja, todas as cadeias têm o mesmo comprimento (mesma concentração) (QUIRK, 1989).

Quando a diferença entre M_w e M_n é pequena, a dispersão de massa molecular é dita estreita e quando não, é dita larga. Na Tabela 8 estão sumariadas as massas moleculares médias e polidispersividade (M_n/M_w), os valores obtidos da análise elementar e o teor de proteína estimado.

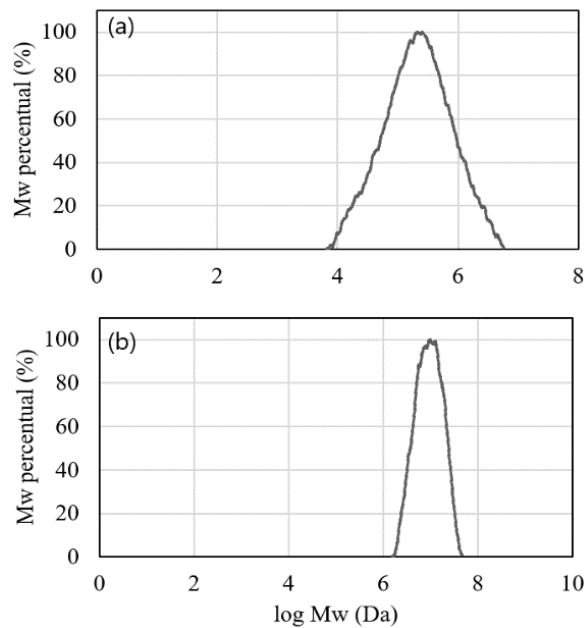
Tabela 8 - Resultados obtidos por cromatografia de permeação em gel e análise elementar

Polissacarídeos	M_n	M_w	M_w/M_n	% C	%H	%N	% Proteína
Goma Guar	$7,3 \times 10^6$	$11,2 \times 10^6$	1,52	38,44	6,49	0,89	5,29
Alginato de sódio	$9,6 \times 10^4$	$45,6 \times 10^4$	4,72	28,68	4,87	0,18	1,07

M_n : massa molecular numérica média, M_w : massa molecular ponderal média, M_w/M_n : polidispersividade, C: carbono, H: hidrogênio e N: nitrogênio.

Os resultados de GPC indicaram polissacarídeos com elevadas massas moleculares de acordo com dados encontrados na literatura característicos do alginato de sódio e da goma guar, observando uma maior polidispersividade para o alginato de sódio com valor de 4,72 podendo ser observado também pela largura da curva de distribuição da massa molecular na Figura 18 (LIU *et al.*, 2016; RAMOS *et al.*, 2018).

Figura 18 - Distribuição da massa molecular do (a) alginato de sódio e da (b) goma guar.



Fonte: Elaborada pela autora.

5.2 Caracterização das nanoemulsões

As nanoemulsões preparadas apresentaram resultados de tamanho menores que 250 nm, potencial zeta e índice de polidispersividade (Pdi) característicos de sistemas estáveis como mostra a Tabela 9.

Tabela 9 - Resultados obtidos de diâmetro, potencial zeta e Pdi das nanoemulsões.

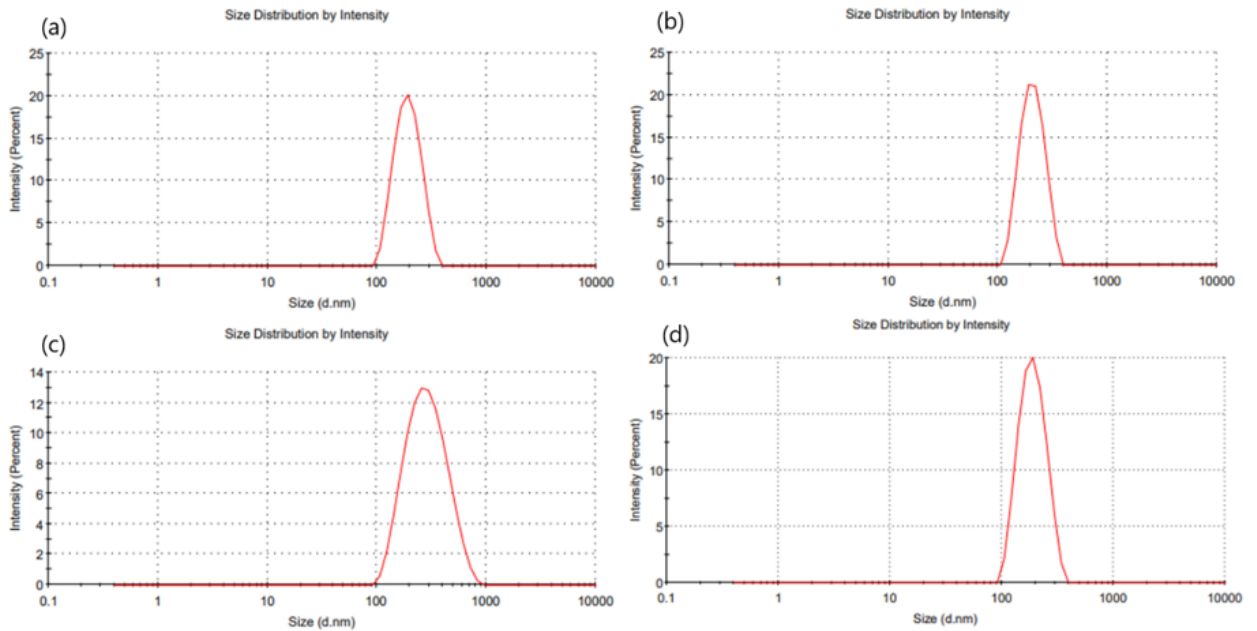
Nanoemulsão	Diâmetro (nm)	Potencial Zeta (mV)	Pdi
NE-D	201 ± 5	-29,4 ± 0,8	0,09 ± 0,02
NE-B	195 ± 7	-26,9 ± 1,1	0,08 ± 0,03
NE-H	238 ± 4	-24,1 ± 1,0	0,21 ± 0,02
Controle-NE	179 ± 3	-35,7 ± 1,7	0,09 ± 0,04

NE-D: nanoemulsão contendo hesperidina e ácido betulínico, NE-B: nanoemulsão contendo ácido betulínico, NE-H: nanoemulsão contendo hesperidina, Controle-NE: nanoemulsão sem ativos.

O Pdi fornece informações sobre a homogeneidade da distribuição dos tamanhos, segundo Yakoubi *et al.* (2021) as nanopartículas que possuem valor de Pdi entre 0 e 0,1 podem ter distribuição de tamanho de partícula estreitamente monodispersa, moderadamente polidispersa entre 0,1 e 0,4 ou amplamente polidispersa quando o Pdi > 0,4. Valores de Pdi acima de 0,4 favorecem os mecanismos de desestabilização por amadurecimento de Ostwald e posterior coalescência. As nanoemulsões NE-D, NE-B e Controle-NE se apresentaram estreitamente monodispersa enquanto a nanoemulsão NE-H se apresentou moderadamente polidispersa.

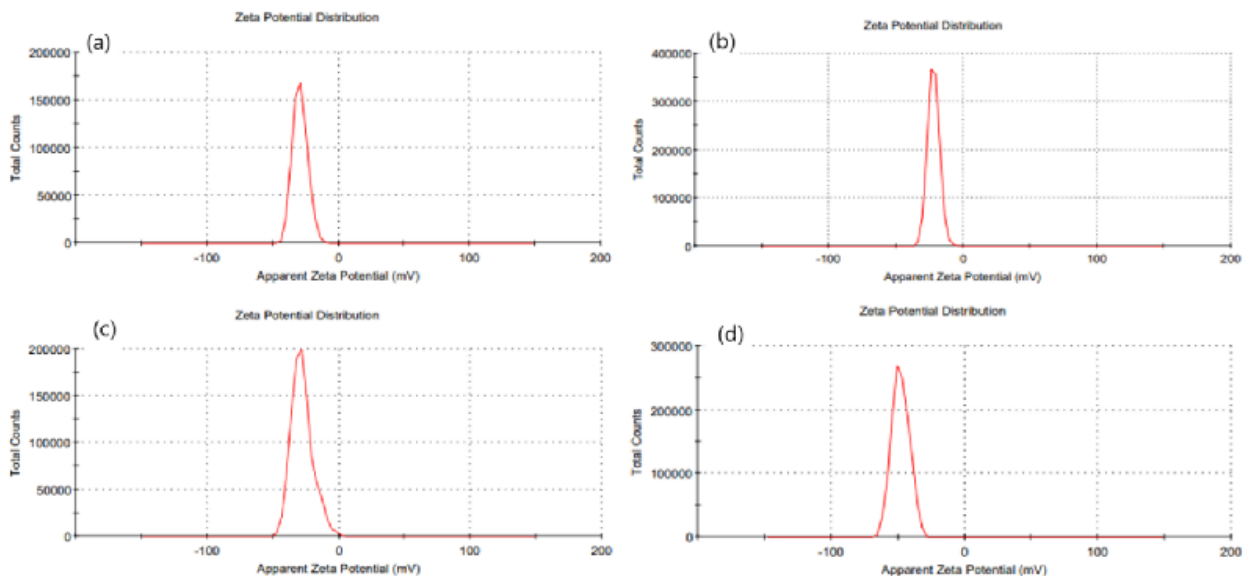
Os gráficos de distribuição de diâmetro e de potencial zeta mostraram-se monomodais (Figuras 19 e 20).

Figura 19 - Distribuição de tamanho das nanoemulsões. (a) NE-B (b) NE-D (c) NE-H (d) Controle-NE



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 20 - Distribuição de potencial zeta das nanoemulsões. (a) NE-B (b) NE-D (c) NE-H (d) Controle-NE



Fonte: Elaborada pela autora.

O potencial zeta reflete o potencial de superfície das partículas, este potencial é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no

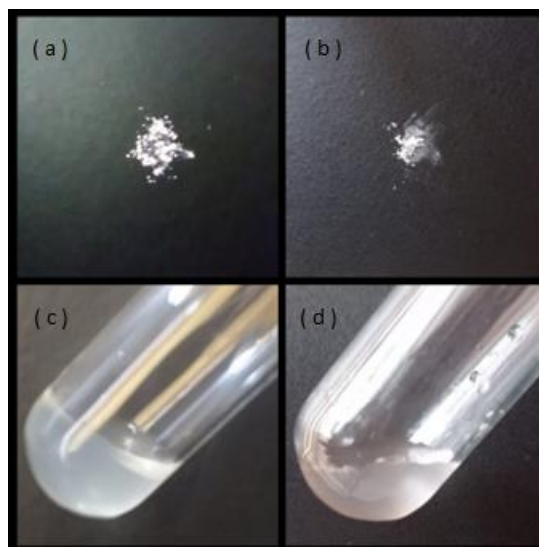
meio aquoso de dispersão (MAGENHEIM; BENITA, 1991). O potencial zeta pode ser usado também como indicador de estabilidade pois uma carga mais alta impede a agregação de partículas dificultando a ocorrências dos fenômenos de instabilidade.

Como regra geral, valores absolutos de potencial zeta acima de 30 mV proporcionam boa estabilidade e acima de 60 mV, em valor absoluto, excelente estabilidade. No entanto, quando são usados tensoativos de alta massa molar como o usado neste trabalho (Pluronic® F127), que atuam principalmente por estabilização estérica, valores de potencial zeta de apenas 20 mV em módulo ou muito menor podem fornecer estabilidade (HONARY; ZAHIR, 2013). Valores de potencial zeta próximos a zero favorecem o mecanismo de desestabilização da nanoemulsão por floculação. A partir dos resultados encontrados constatou-se que as nanoemulsões apresentavam resultados desejáveis para a incorporação nas soluções poliméricas a serem secas para obter as microcápsulas.

5.3 Obtenção das microcápsulas

As microcápsulas MNED e MAQD em pó e suas dispersões a $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ em meio aquoso são mostradas na Figura 21.

Figura 21 - Microcápsulas em pós (a) MNED (b) MAQD (c) dispersão aquosa da microcápsula MNED e (d) dispersão aquosa da microcápsula MAQD.



Fonte: Elaborado pela autora

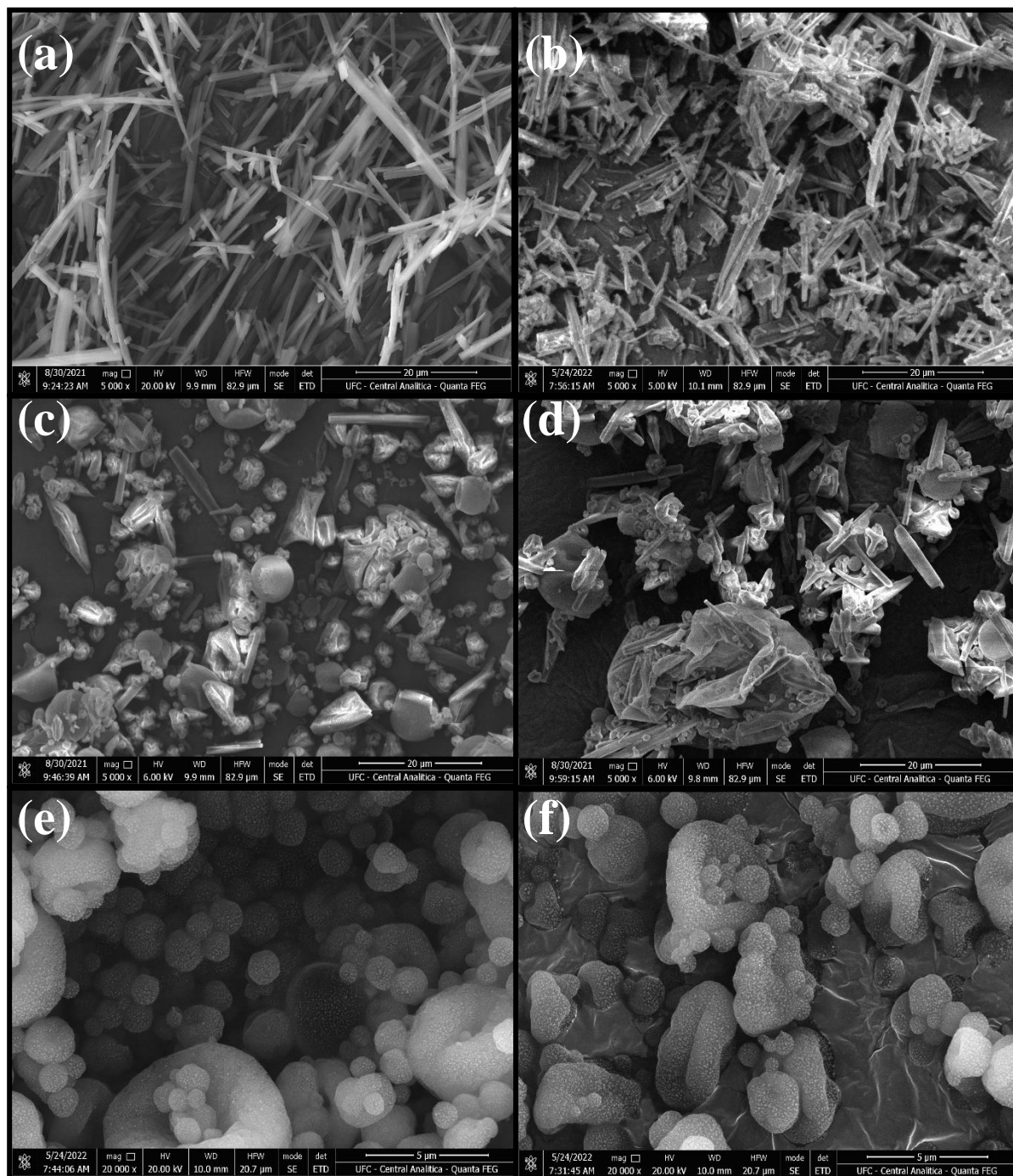
O rendimento obtido após a secagem em relação a massa de microcápsula foi entre 36 e 41%, estes valores estão associados ao tipo de equipamento, concentração dos polímeros, natureza do polímero e condições de secagem (MAGRI *et al.*, 2019). Valores semelhantes foram encontrados na obtenção de microcápsulas a base de galactomanana utilizando o mesmo equipamento (JOSINO *et al.*, 2021).

As microcápsulas obtidas apresentaram-se como um pó fino. A microcápsula MNED apresentou coloração levemente amarelada devido a presença do óleo de linhaça enquanto a microcápsula MAQD apresentou coloração branca.

5.4 Morfologia

As micrografias dos ativos, polissacarídeos e microcápsulas foram obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (Figura 22).

Figura 22 – Micrografias obtidas por MEV (a) ácido betulínico (b) hesperidina (c) MAQD (d) MAQDr (e) MNED (f) MNEDr.



Fonte: Elaborada pela autora.

Através das imagens identifica-se o aspecto cristalino dos ativos ácido betulínico e hesperidina. As formulações MAQD e MAQDr apresentaram grande quantidade de cristais na parte externa das microcápsulas indicando que a encapsulação dos ativos não foi completa possivelmente pela não adequação do método de preparo da solução a ser seca. A hesperidina

e o ácido betulínico possuem solubilidade baixa em meio aquoso e o tensoativo e solvente utilizados não foram suficientes para promover a total solubilização dos ativos no meio. No entanto, as microcápsulas MNED e MNEDr, as quais utilizaram o método de encapsulação através de nanoemulsão seguida de secagem, não apresentaram microscopicamente cristais não encapsulados, podendo-se afirmar que este método foi mais eficiente na encapsulação dos ativos. Não foi identificada diferenças consideráveis microscópicas quanto a morfologia e tamanho entre as microcápsulas contendo alginato reticulado (MAQDr e MNEDr) e não reticulado (MAQD e MNED). As microcápsulas MAQD e MAQDr não se apresentaram esféricas, com formas irregulares e com tamanho variando entre 1 e 25 μm , enquanto as microcápsulas MNED e MNEDr apresentaram tamanho aproximado em torno de 0,75 μm e 6 μm com forma predominantemente esférica.

5.5 Quantificação dos ativos e Eficiência de encapsulação

Os resultados obtidos da validação do método de quantificação da hesperidina e ácido betulínico por HPLC (Tabela 10) mostraram valores aceitáveis de acordo com o guia de validação de métodos analíticos do INMETRO nas concentrações testadas.

Tabela 10 – Resultados obtidos da validação dos métodos analíticos de quantificação da hesperidina e ácido betulínico.

Parâmetros	Hesperidina		Ácido Betulinico	
	Metanol	DMSO:Tampão pH 7,4	Metanol	DMSO:Tampão pH 7,4
LD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,026	0,016	0,018	0,037
LQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,078	0,048	0,054	0,111
R ² (linearidade)	0,9978	0,9904	0,9907	0,9903
Repetibilidade n=6 (DPR %)	2,1	4,2	1,9	2,7
Recuperação % \pm DP n=3	97,8 \pm 3,1	98,1 \pm 1,9	96,7 \pm 3,6	97,9 \pm 1,7
Equação da regressão	y = 8627 x + 31052	y = 9466 x + 19787	y = 10313 x + 4911	y = 11344 x + 3923

LD: limite de detecção, LQ: limit de quantificação, DPR: desvio padrão relativo, DP: desvio padrão.

A Eficiência de Encapsulação (EE) constitui uma ferramenta útil para avaliar o processo de encapsulação dos ativos. Os valores obtidos de EE (Tabela 11) mostraram diferença significativas ($p < 0,05$) entre as microcápsulas de nanoemulsões e as microcápsulas contendo somente ativos e polímeros.

Tabela 11 – Eficiência de Encapsulação da hesperidina e do ácido betulínico nas microcápsulas

Microcápsula	Eficiência de Encapsulação (EE)	
	Hesperidina	Ácido betulínico
MAQD	65,15 ± 0,39 ^a	68,17 ± 0,58 ^d
MAQDr	71,57 ± 1,21 ^b	74,96 ± 0,52 ^f
MNED	98,15 ± 0,34 ^c	99,76 ± 0,22 ^e
MNEDr	99,58 ± 0,43 ^e	98,87 ± 0,29 ^e
MNEH	99,53 ± 0,59 ^e	-
MNEB	-	99,23 ± 0,24 ^e

MAQD: microcápsula contendo hesperidina e ácido betulínico à base de solução aquosa polimérica, MAQDr: microcápsula contendo hesperidina e ácido betulínico à base de solução aquosa polimérica com alginato reticulado; MNED: microcápsula contendo hesperidina e ácido betulínico à base de nanoemulsão, MNEDr: microcápsula contendo hesperidina e ácido betulínico à base de nanoemulsão contendo alginato reticulado, MNEB: microcápsula à base de nanoemulsão contendo ácido betulínico e MNEH: microcápsula à base de nanoemulsão contendo hesperidina. Letras diferentes indicam diferença significativa com $p < 0,05$.

Observa-se maiores valores de EE para as microcápsulas à base de nanoemulsões, este fato pode ser explicado pela total solubilidade dos ativos hidrofóbicos no óleo de semente de linhaça. As microcápsulas preparadas a base de solução aquosa de polissacarídeos e tensoativo polimérico que não continham os ativos completamente solubilizados na solução, apresentaram menores valor de EE, o que pode ser confirmado avaliando as micrografias obtidas por MEV (Microscopia Eletrônica de Varredura) através da identificação de cristais de ativos fora da cápsula. Além disso, durante o processo de secagem no *spray dryer* parte dos ativos podem decantar no recipiente contendo a solução polimérica e não ser encapsulado.

Para ativos hidrofóbicos o método de obtenção de microcápsulas por secagem de nanoemulsão apresenta melhores valores de eficiência de encapsulação. Rehman *et al.* (2021) encontraram valores de EE semelhantes (93,05%) às microcápsulas MNED, MNEDr, MNEH

e MNEB em microcápsulas a base de nanoemulsões de curcumina (insolúvel em água) encapsulada em óleo de semente de *Borago officinalis* utilizando gomas comerciais *Hicap 100* e *Purity Gum 2000*. Guo *et al.* (2020) obtiveram valores de EE de microcápsulas contendo curcumina sem a utilização de óleo, utilizando como encapsulantes goma de tamarindo, pectina e gelatina, semelhantes (entre 41,0 e 82,5%) às microcápsulas MAQD e MAQDr.

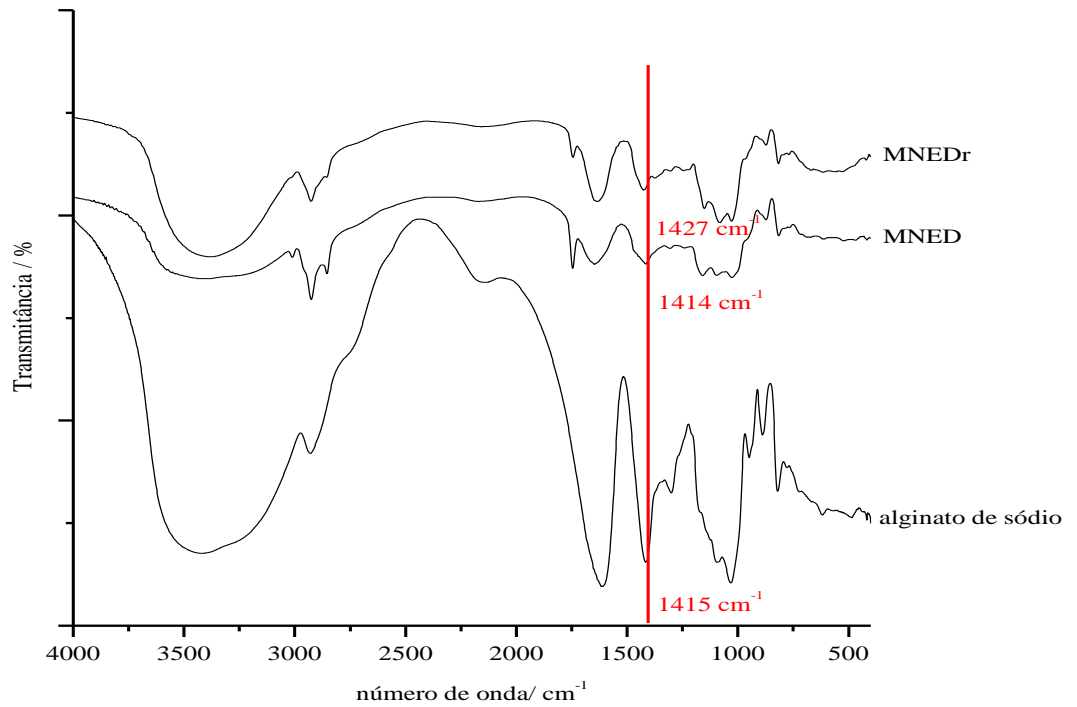
Josino *et al.* (2021), encapsularam por *spray dryer* fluoxetina (solúvel em água) utilizando como polissacarídeo encapsulante a galactomanana sem a utilização de óleo e obteve o valor de 98% de EE. Sansone *et al.* (2009), encapsularam hesperidina sem utilização de óleo utilizando acetato ftalato de celulose e carboximetilcelulose reticulado com diversos tensoativos em diversas concentrações obtendo valores de EE entre 49,0% e 76,2%,

Com base nos resultados obtidos, foi dada continuidade ao trabalho somente para as formulações de microcápsulas à base de nanoemulsões que obtiveram os melhores resultados de EE.

5.6 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Para identificar a reticulação do alginato com os íons Ca^{+2} (Figura 23) e confirmar a composição majoritária das microcápsulas foram obtidos os espectros de transmitância de FTIR (Figura 24).

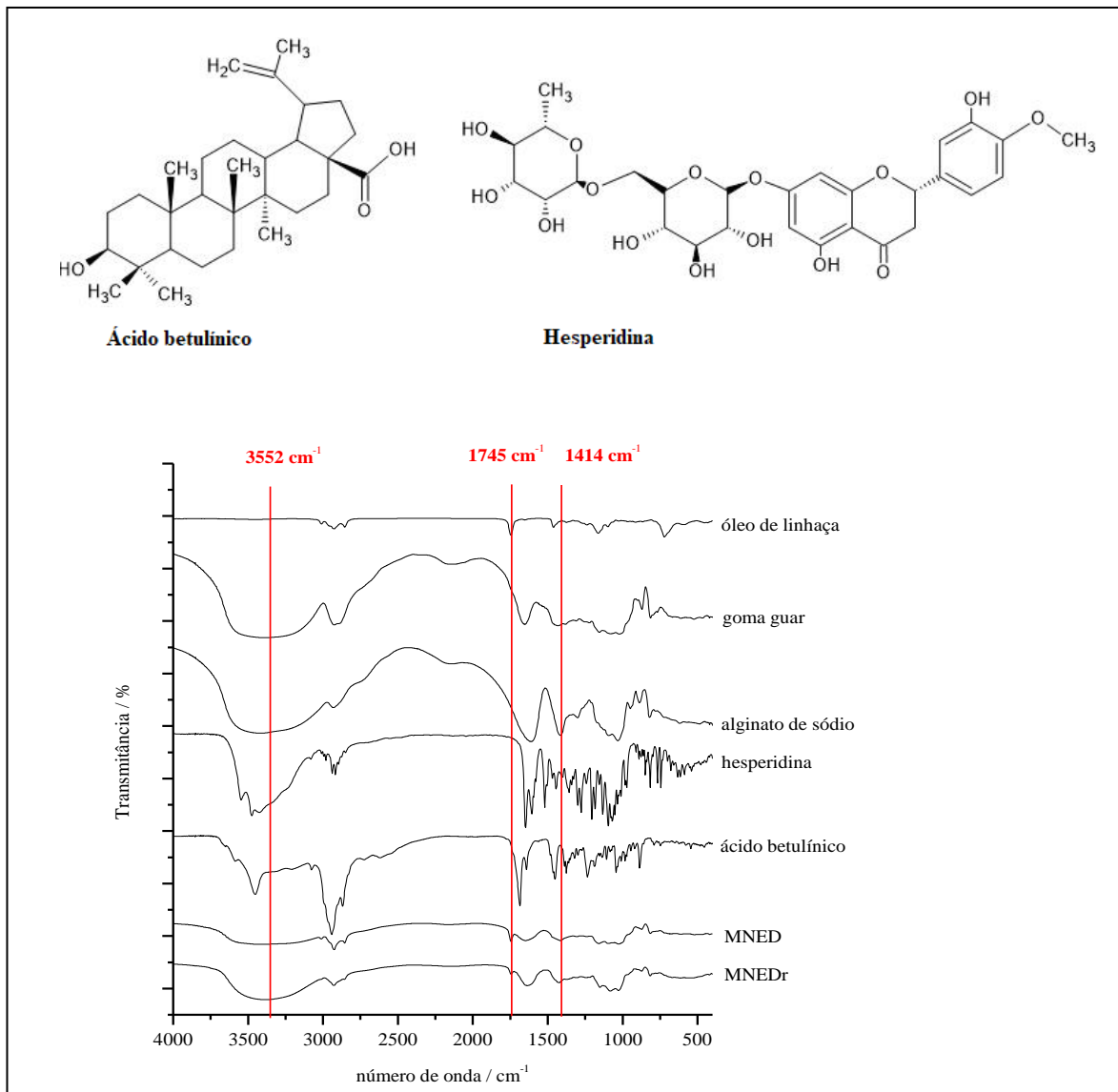
Figura 23 - Espectros de transmitância na região do infravermelho das microcápsulas e alginato de sódio. MNEDr: Microcápsula com alginato não reticulado. MNED: Microcápsula com alginato reticulado.



Fonte: Elaborada pela autora.

Para identificar nas microcápsulas os componentes da formulação e diferenças após reticulação foram obtidos os espectros da hesperidina, ácido betulínico, alginato de sódio, goma guar, óleo de linhaça e microcápsulas MNEDr e MNED como mostra a Figura 24.

Figura 24 - Espectro de transmitância na região do infravermelho das microcápsulas, excipientes e ativos.



Fonte: Elaborada pela autora.

No espectro obtido da hesperidina observa-se a banda em 3421 cm^{-1} correspondente às vibrações de estiramento das ligações O-H dos grupos hidroxila. A banda em 2940 cm^{-1} corresponde a vibração de estiramento das ligações C-H alifático. A banda que aparece em 1647 cm^{-1} corresponde ao estiramento da ligação C=O da carbonila conjugada com insaturação (anel benzênico). A banda em 1519 cm^{-1} é atribuída ao estiramento da ligação C=C em aromáticos, as bandas entre 1271 e 1207 cm^{-1} à vibração do grupamento C-O e em 1095 cm^{-1} devido ao estiramento da ligação C-O (BALAKRISHNAN *et al.*, 2020).

O espectro obtido do ácido betulínico apresentou um perfil típico de estruturas terpênicas. Duas bandas, uma intensa e larga com máximo de absorção em 3448 cm^{-1} característica do estiramento de hidroxila; um grupo de bandas de absorção para estiramentos C-H na região de 2941 cm^{-1} , cuja intensidade indica a presença de uma grande quantidade de carbono sp^3 . Além disso, observou-se uma banda fina e intensa em 1685 cm^{-1} , correspondente a absorção de estiramento de ligação (C=O) do ácido carboxílico. Observou-se sinais em 1448 cm^{-1} referente a deformação angular simétrica da ligação C-H ($-\text{CH}_2-$) (CÎNTĂ-PÎNZARU *et al.*, 2012).

No espectro do óleo de linhaça identifica-se o pico característico intenso do estiramento de carbonila de éster em 1745 cm^{-1} e em 2924 cm^{-1} referente ao estiramento assimétrico de C-H.

Analisando o espectro da goma guar identifica-se a banda larga em 3400 cm^{-1} correspondendo as vibrações de estiramento da ligação O-H dos grupos hidroxila. As vibrações das ligações C-H aparecem em 2920 cm^{-1} . Em 1649 cm^{-1} identifica-se a presença de água adsorvida (RÉBUFA *et al.*, 2019).

O espectro do alginato de sódio revela uma banda larga em 3390 cm^{-1} correspondendo ao estiramento da ligação O-H dos grupos hidroxilas presentes na cadeia polimérica do alginato. A intensa banda observada em 1414 cm^{-1} está correlacionada ao estiramento do $-\text{COO}^-$. Em 1604 cm^{-1} identifica-se uma banda de estiramento assimétrico do carboxilato (PILIPENKO *et al.*, 2019).

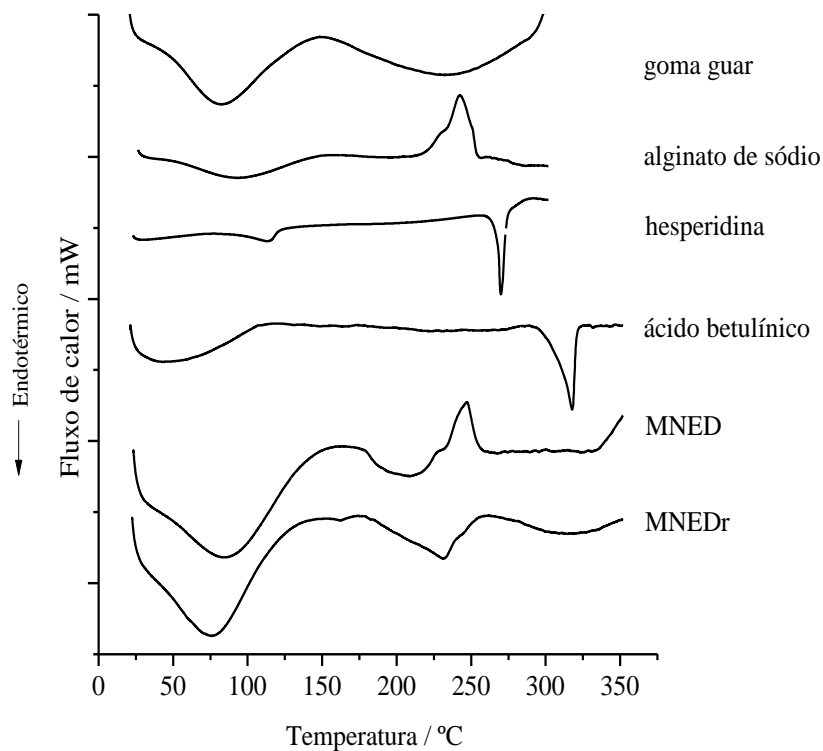
Na microcápsula contendo alginato de sódio reticulado (MNEDr), observa-se um deslocamento do número de onda correspondente ao carboxilato do alginato quando comparado ao alginato de sódio. O deslocamento de 1414 cm^{-1} do alginato de sódio para 1427 cm^{-1} da microcápsula contendo alginato reticulado, enquanto a microcápsula MNED que não contém alginato reticulado apresentou valores próximos ao alginato de sódio referente a este sinal, este fato caracteriza a reticulação do alginato na microcápsula MNEDr (PILIPENKO *et al.*, 2019). Em 1743 e 2924 cm^{-1} identifica-se os sinais característicos do óleo de linhaça.

Os espectros das microcápsulas mostram a presença da goma guar na composição, sendo possível identificar a presença do alginato pelos sinais referentes ao estiramento de $-\text{COO}^-$ e do óleo de linhaça através do sinal da carbonila não sendo possível visualizar sinais inconfundíveis da presença dos ativos hesperidina e ácido betulínico devido à baixa concentração destes na composição.

5.7 Análise térmica por Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)

As análises de Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC) foram realizadas para compreender o comportamento térmico das amostras e evidenciar o encapsulamento como mostra a Figura 25.

Figura 25 - Termogramas de DSC das microcápsulas e componentes das formulações.



Fonte: Elaborada pela autora.

As curvas de DSC do ácido betulínico e da hesperidina são típicas de material cristalino apresentando pico endotérmico em 316 °C e 269 °C correspondendo aos seus pontos de fusão, respectivamente.

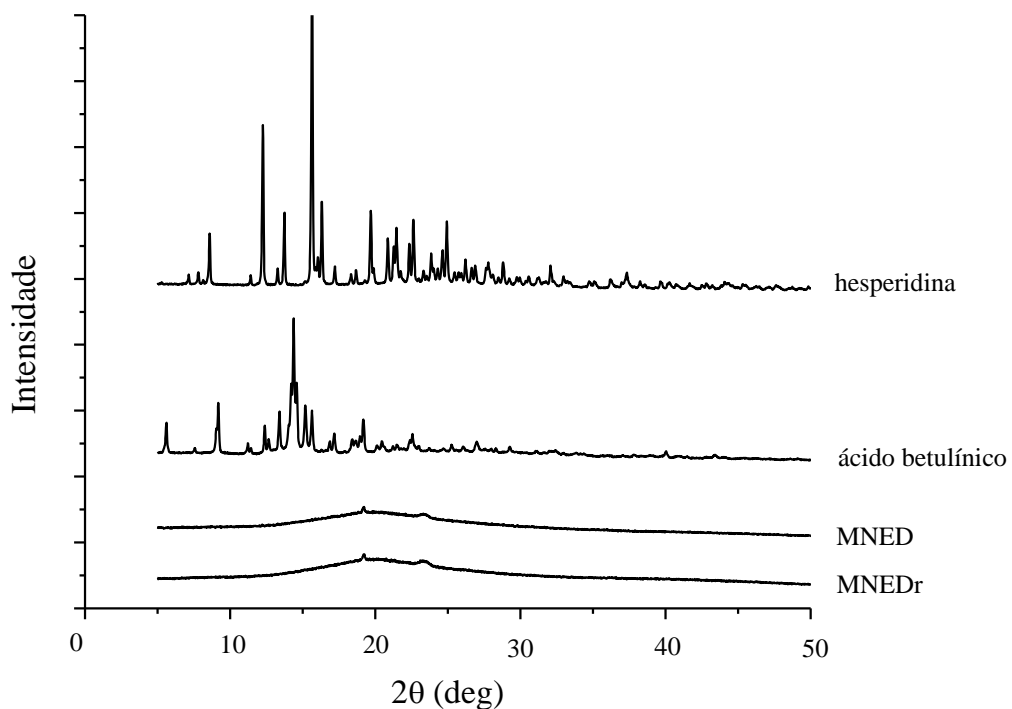
A curva de DSC da goma guar mostra um evento a 80 °C nos polissacarídeos evidenciado também nas microcápsulas referente a presença de água. Analisando os termogramas das microcápsulas observa-se um evento exotérmico iniciado próximo a 240 °C característico da decomposição do alginato de sódio, no entanto, na microcápsula MNEDr, contendo alginato reticulado com cálcio, este evento foi observado como um pico mais alargado (ABULATEEFEH; TAHA, 2015).

Os eventos presentes nos termogramas da hesperidina e ácido betulínico puros desapareceram nas microcápsulas, este fato evidencia que os ativos perderam sua estrutura cristalina encontrando-se dispersos no sistema polimérico amorfo sugerindo que estão encapsulados (JOSINO *et al.*, 2021).

5.8 Difração de Raios-X (DRX)

Foram obtidos os difratogramas de Raios-X da hesperidina, ácido betulínico e microcápsulas MNED e MNEDr com a finalidade de avaliar a cristalinidade (Figura 26). A hesperidina livre apresentou picos de 2θ de $8,5^\circ$, $12,2^\circ$, $13,7^\circ$, $15,7^\circ$, $19,7^\circ$, $21,4^\circ$, $22,6^\circ$ e $24,9^\circ$.

Figura 26 - Difratogramas de Raio X dos ativos e microcápsulas.



Fonte: Elaborada pela autora.

O ácido betulínico também apresentou picos intensos com valores de 2θ de $5,6^\circ$, $9,1^\circ$, $23,3^\circ$, $13,4^\circ$, $14,3^\circ$, $15,6^\circ$, $17,1^\circ$, $18,4^\circ$ e $18,9^\circ$. Os dois ativos, portanto, apresentaram estrutura com alta cristalinidade. Nas microcápsulas não foram identificados picos intensos característicos de cristalinidade. Os difratogramas das microcápsulas MNED e MNEDr evidenciam o estado amorfo dos sistemas microestruturados.

Esses dados confirmam que a hesperidina e ácido betulínico não estão no estado cristalino nas microcápsulas, ou seja, foram molecularmente dispersos no óleo de linhaça e este disperso na matriz polimérica. Esta observação sugere que o método de encapsulação por secagem em *spray dryer* da nanoemulsão foi bastante satisfatório para encapsular os ativos hidrofóbicos trabalhados neste estudo.

5.9 Estudo do mecanismo de liberação *in vitro*

Em estudos de liberação *in vitro* a determinação da condição *sink* é importante para que a solubilidade no meio receptor não seja um fator limitante para a difusão do ativo através da membrana. Os resultados dos testes de solubilidade nos meios receptores e a condição *sink* para cada ativo são mostrados na Tabela 12.

Tabela 12 - Solubilidade e condição *sink* para o ácido betulínico e hesperidina no meio receptor.

DMSO: tampão PBS pH 7,4	Ácido betulínico		Hesperidina	
	Solubilidade ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Condição <i>sink</i> ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Solubilidade ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Condição <i>sink</i> ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
10:90	318	31,8	512	51,2
30:70	780	78,0	843	84,3

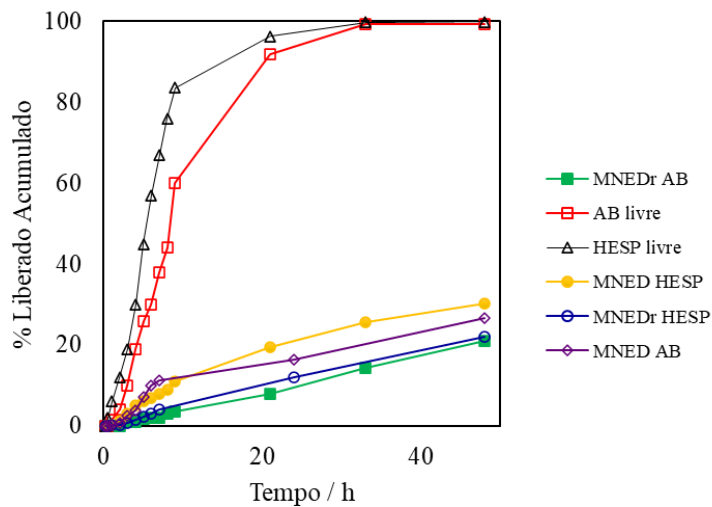
Fonte: A autora

Em testes anteriores não se obteve sucesso em solubilizar ácido betulínico e hesperidina em tampão PBS 7,4 e em soluções hidroalcoólicas de forma que fosse possível atingir a condição *sink* para este experimento considerando os limites de quantificação do método analítico utilizado.

Considerando que em uma liberação de 100% de cada ativo a concentração seria de aproximadamente $47,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ no meio receptor, o único meio receptor em que os ativos estariam com solubilidade abaixo da condição *sink* é o DMSO: tampão PBS pH 7,4 30:70. De acordo com Weng, Tong e Chow (2020), DMSO pode ser usado como meio receptor em estudos de liberação de fármacos.

A partir dos dados obtidos de percentual acumulado liberado dos ativos em função do tempo foi plotado um gráfico como mostra a Figura 27:

Figura 27 - Percentual liberado acumulado dos ativos livres e dos ativos nas microcápsulas



Fonte: Elaborado pela autora.

Observa-se pela inclinação da reta na Figura 26 que nas primeiras 7 horas de experimento a liberação do ácido betulínico e hesperidina a partir das microcápsulas tem uma taxa maior especialmente para a formulação não reticuladas MNED. Este fato pode ser explicado pela maior resistência imposta pela reticulação do alginato de sódio nas microcápsulas MNEDr que diminui o fluxo de liberação.

Os ativos livres apresentaram inclinações maiores por não estarem encapsulados, liberando a totalidade em aproximadamente 33 h. A Tabela 13 mostra os percentuais acumulados em 48 horas de liberação.

Tabela 13 - Percentuais liberados de ativos das microcápsulas em 48 h de liberação sob condição *sink*

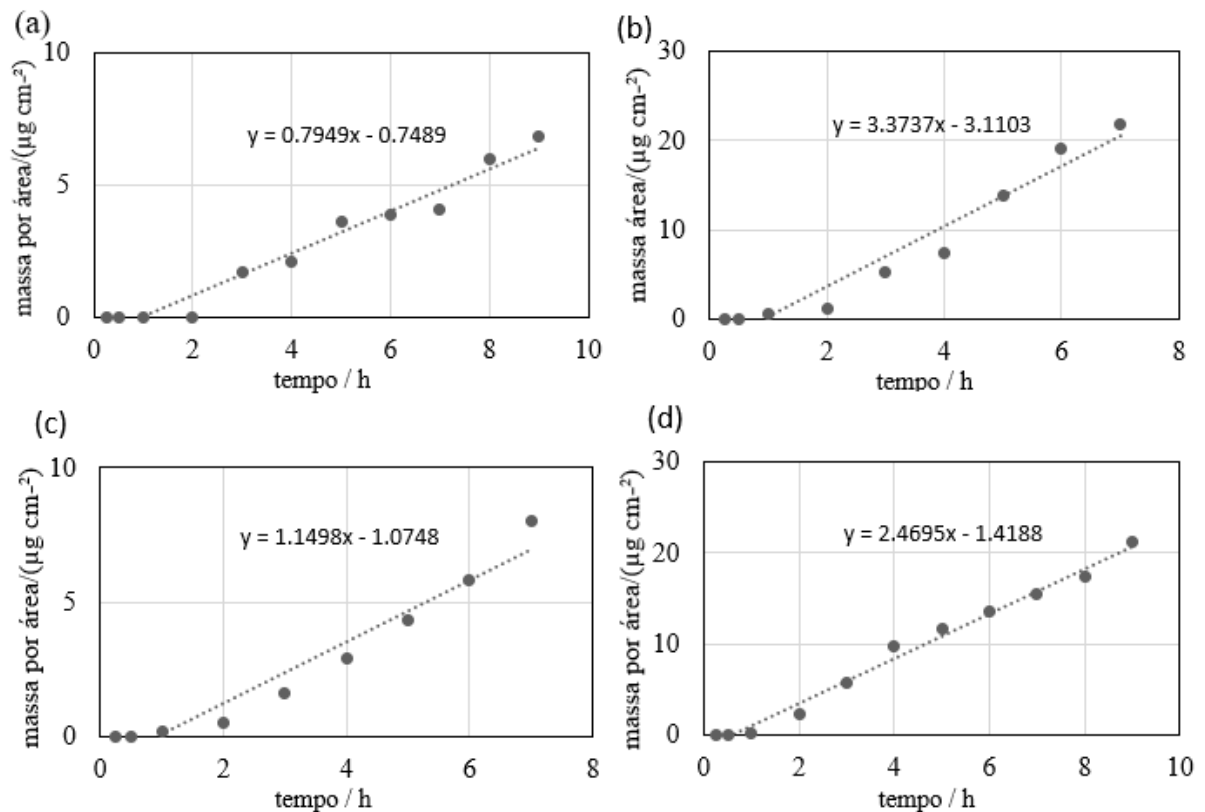
Microcápsula	% liberado acumulado em 48h
MNED - ácido betulínico	26,69 ± 0,93 ^a
MNEDr - ácido betulínico	21,47 ± 0,74 ^b
MNED - hesperidina	30,35 ± 1,51 ^c
MNEDr - hesperidina	22,11 ± 1,04 ^b
Hesperidina livre	99,93 ± 0,71 ^d
Ácido betulínico livre	99,34 ± 0,82 ^d

Letras diferentes indicam diferença significativa com $p < 0,05$.

A partir dos resultados do percentual liberado em 48 h que a microcápsula MNEDr liberou os menores percentuais de hesperidina e ácido betulínico em relação a microcápsula MNED por razões já explicadas anteriormente. Entre os ativos na forma livre e associados o percentual foi semelhante.

Para determinar o fluxo estacionário J e o *lag time* (tempo de latência) foram plotados gráficos (Figura 28) de massa acumulada liberada por área em função do tempo para cada ativo em cada microcápsula. Foram determinadas as equações da reta, onde J corresponde o valor da tangente e o *lag time* corresponde ao coeficiente linear obtido quando $y = 0$ (ZHOU *et al.*, 2010).

Figura 28 - Massa acumulada por área em função do tempo para cálculo de fluxo estacionário e *lag time*. (a) liberação do ácido betulínico da microcápsula MNDEr (b) liberação do ácido betulínico da microcápsula MNED (c) liberação da hesperidina da microcápsula MNDEr (d) liberação da hesperidina da microcápsula MNDE.



Fonte: Elaborado pela autora.

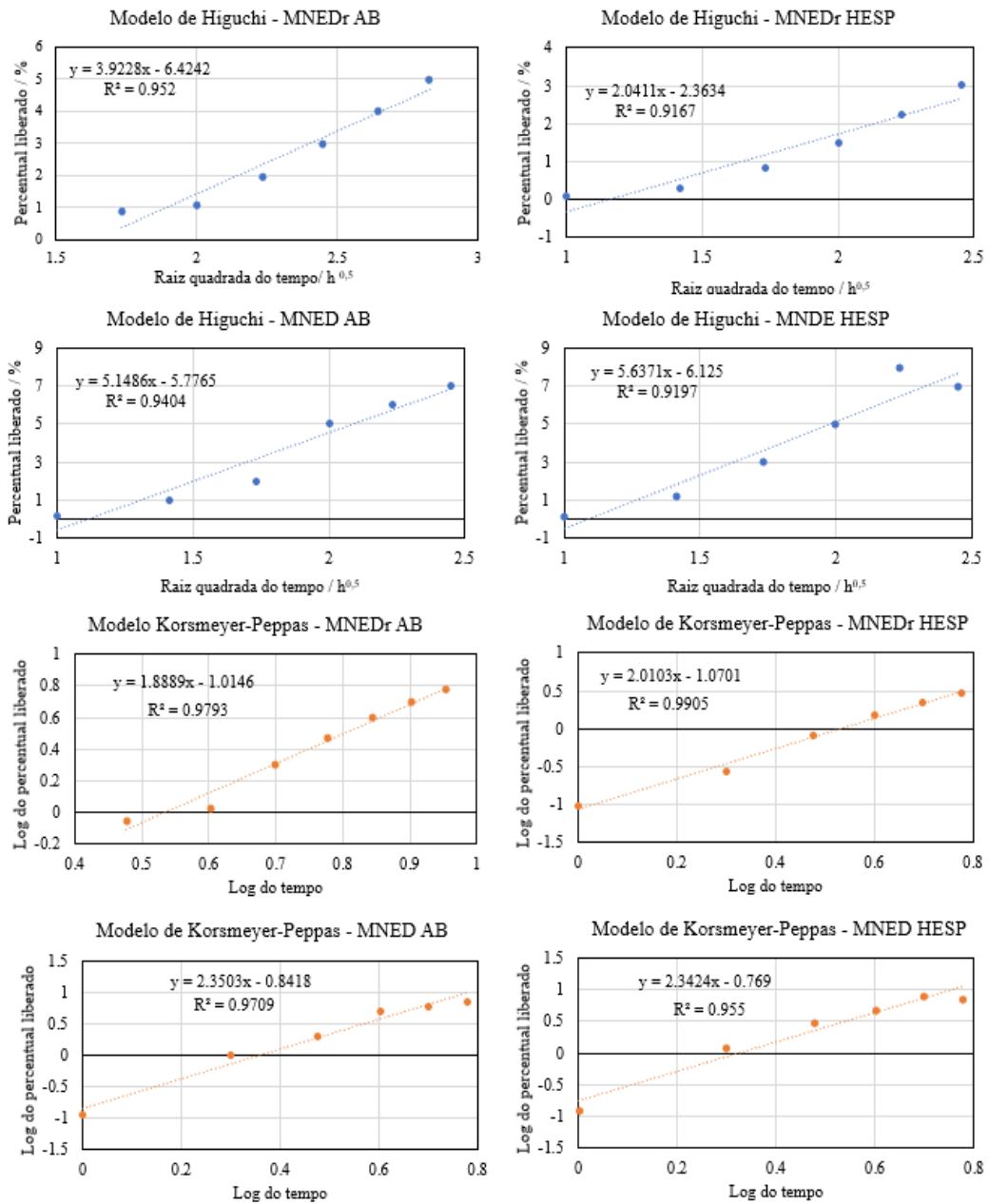
Para testar os modelos matemáticos de liberação, foram plotados gráficos de percentual liberado em função da raiz quadrada do tempo de acordo com o modelo de Higuchi

e foram plotados gráficos de logaritmo do percentual liberado em função do logaritmo do tempo de acordo com Korsmeyer-Peppas para cada ativo em cada microcápsula com os dados das primeiras horas de liberação.

Os modelos cinéticos de ordem zero e primeira ordem não foram testados pois pela complexidade do sistema polimérico formulado somente forneceria uma relação matemática, mas não explicariam o mecanismo e os fenômenos envolvidos durante a liberação para o tipo de polímero usado na matriz das microcápsulas. Neste caso os modelos de Korsmeyer-Peppas e Higuchi poderiam fornecer informações mais realistas e são mais adequados para o sistema de microcápsulas preparados.

A partir das retas obtidas foi determinada a equação da reta e o valor do coeficiente de determinação R^2 para encontrar o modelo que mais se adequa a liberação, ou seja, o modelo com maior valor de R^2 como mostra a Figura 29 (FOULADIAN *et al.*, 2020).

Figura 29 - Testes dos modelos matemáticos de Korsmeyer-Peppas e Higuchi para a hesperidina e ácido betulínico,



Fonte: Elaborado pela autora.

A partir dos valores de R² foi identificado o modelo de Korsmeyer-Peppas como o mais adequado para explicar o mecanismo de liberação. A partir desse modelo foi calculado o valor da constante k_{KP} e o valor do expoente de difusão n . Na Tabela 14 é apresentado os valores de R², k_{KP} , n , J e *lag time* para a liberação do ácido betulínico.

Tabela 14 - Parâmetros cinéticos de liberação para o ácido betulínico nas microcápsulas

Microcápsula	Modelo Korsmeyer-Peppas			Modelo Higuchi	J / ($\mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$)	Lag time / h
	k _{KP}	n	R ²	R ²		
MNED	0,143	2,35	0,9709	0,9404	3,37 ± 0,08	0,92 ± 0,07
MNEDr	0,097	1,89	0,9793	0,9520	0,79 ± 0,04	0,94 ± 0,03

Fonte: A autora

Observa-se que de acordo com dados dos parâmetros cinéticos de liberação do ácido betulínico a microcápsula MNEDr apresentou um menor fluxo estacionário de liberação (J) como observado na Figura 28 que pode ser explicado pela reticulação com o íon Ca^{+2} que aumenta a resistência a liberação. No entanto, não foram observadas diferenças significativas no *lag time* ($p > 0,05$). Na Tabela 15 é apresentado os valores de R², k_{KP}, n, J e *lag time* para a liberação da hesperidina.

Tabela 15 - Parâmetros cinéticos de liberação para a hesperidina nas microcápsulas

Microcápsula	Modelo Korsmeyer-Peppas			Modelo Higuchi	J / ($\mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$)	Lag time / h
	k	n	R ²	R ²		
MNED	0,170	2,34	0,9555	0,9197	2,46 ± 0,06	0,57 ± 0,03
MNEDr	0,085	2,01	0,9905	0,9167	1,14 ± 0,05	0,93 ± 0,06

Fonte: A autora

Da mesma forma, observa-se que de acordo com dados dos parâmetros cinéticos de liberação da hesperidina a microcápsula MNEDr apresentou um menor fluxo estacionário de liberação (J), no entanto, o tempo de latência para a liberação da hesperidina na cápsula MNED foi menor que para a microcápsula MNEDr.

Os valores de expoente de difusão variaram entre 1,89 e 2,35, de acordo com Korsmeyer-Peppas, o tipo de liberação é o Super Caso II o qual é caracterizado quando $n > 0,89$ para partículas com geometria esférica, constituindo uma forma extrema de transporte (TSIRIGOTIS-MANIECKA *et al.*, 2021). De acordo com esse tipo de mecanismo de liberação, durante o processo de liberação ocorrem os fenômenos de sorção, tensão e relaxação das cadeias poliméricas e intumescimento. Desta forma, a camada externa de gel limita o núcleo vítreo produzindo tensão de compressão no núcleo. À medida que a interface

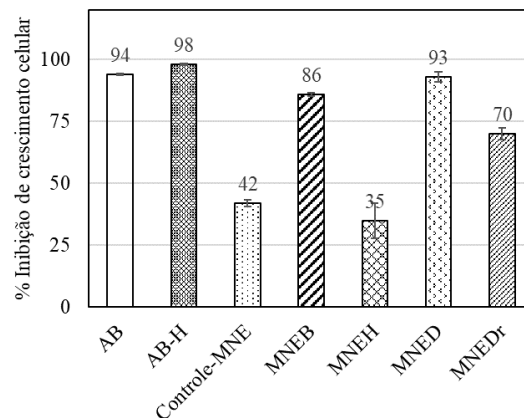
polimérica gel-vítrea se move para o núcleo, a tensão aumenta até que o núcleo se rompe e inicia o processo de liberação do ativo. Além disso, simultaneamente ocorre difusão e dissolução. O mecanismo Super Caso II é predominante em polímeros que sofrem intumescimento em meio aquoso (TEIMOURI; KASAPIS, 2022).

5.10 Ensaio MTT de citotoxicidade *in vitro*

A eficácia das microcápsulas foi investigada na linhagem celular de HL-60 (leucemia promielocítica). Inicialmente foram determinados o percentual de inibição de crescimento celular em concentração única para o ácido betulínico livre (AB), ácido betulínico associado com hesperidina livres (AB-H), microcápsula contendo como ativo a hesperidina (MNEH), microcápsula contendo somente ácido betulínico como ativo (MNEB), microcápsula contendo hesperidina e ácido betulínico como ativos (MNED) e microcápsula contendo hesperidina e ácido betulínico como ativos com o alginato reticulado (MNEDr).

As amostras de microcápsulas contendo os dois ativos foram selecionadas de acordo com o percentual de inibição do crescimento tumoral, maior que 75%, nas linhagens de celulares utilizadas no teste MTT, em concentração única para serem determinadas as IC_{50} . Os resultados obtidos de percentual de inibição do crescimento celular são mostrados na Figura 30.

Figura 30 - Percentual de inibição de crescimento celular.



Fonte: Elaborado pela autora.

De acordo com os resultados, foi identificado que a microcápsula MNEDr foi a única contendo os dois ativos que não apresentou percentual de inibição de crescimento celular maior que 75%. As microcápsulas MNEH e Controle-MNE foram selecionadas para o teste de IC_{50} somente para comparar com os demais resultados, embora tenham apresentado

percentual de inibição de crescimento celular abaixo de 75%. Vale ressaltar que a cápsula MNEDr continha em sua formulação alginato reticulado e de acordo com os testes de liberação, foi a microcápsula contendo ácido betulínico que apresentou menor percentual liberado em 48 h ($p < 0,05$) e menor fluxo estacionário de liberação ($p < 0,05$), em relação a MNED.

Estes fatos podem estar relacionados com o valor de percentual de inibição de crescimento celular pelo teste MTT apresentado. E apesar de o ácido betulínico livre ter apresentado maior percentual de inibição do que nas microcápsulas a IC_{50} foi avaliada para se determinar a concentração em que as microcápsulas foram citotóxicas em células tumorais expressa em concentração de ácido betulínico, sendo vantajoso desde que haja redução da atividade citotóxica frente às células não tumorais.

Nos testes para obter a IC_{50} em células de HL-60 (leucemia promielocítica), os resultados mostraram um aumento da citotoxicidade com o aumento da concentração. Os valores obtidos das IC_{50} em células de HL-60 e L-929 (fibroblastos de murino não tumoral) são apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 - Resultados de IC_{50} em células HL-60 e L-929 obtidas pelo método do MTT

Amostras	IC_{50} / ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
	HL-60	L-929
AB	$0,41 \pm 0,06^a$	$158,42 \pm 20,16^f$
HESP	>500	>500
AB-H	$0,31 \pm 0,01^b$	$118,73 \pm 12,59^g$
MNEH	>500	>500
MNEB	$5,11 \pm 1,31^c$	>500
Controle-MNE	>500	>500
MNED	$2,52 \pm 0,23^d$	>500
Dox (controle positivo)	$0,02 \pm 0,01^e$	$0,99 \pm 0,08^h$

Controle-MNE: microcápsula sem ativo, MNED: microcápsula contendo hesperidina e ácido betulínico à base de nanoemulsão, MNEB: microcápsula à base de nanoemulsão contendo ácido betulínico e MNEH: microcápsula à base de nanoemulsão contendo hesperidina, AB: ácido betulínico livre, AB-H: ácido betulínico associado a hesperidina na forma livre, Dox: doxorubicina e HESP: hesperidina livre. Letras diferentes indicam diferença significativa com $p < 0,05$.

O ácido betulínico livre apresentou IC_{50} de $0,41 \pm 0,06 \mu\text{g mL}^{-1}$ enquanto este associado a hesperidina apresentou IC_{50} menor de $0,31 \pm 0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$, ou seja, a hesperidina

aumentou a citotoxicidade do ácido betulínico em células de HL-60. Da mesma forma foi observado este fato quando compara-se as IC_{50} da MNEB (microcápsula contendo somente ácido betulínico como ativo) com IC_{50} de $5,11 \pm 1,31 \mu\text{g mL}^{-1}$ e microcápsula MNED (microcápsula com hesperidina e ácido betulínico) com IC_{50} de $2,52 \pm 0,23 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Hsu *et al.* (2021) relataram uma melhora da atividade citotóxica do ácido clorogênico quando associado a hesperidina frente células de MCF-10A (câncer de mama), da mesma forma Korga *et al.* (2019) mostraram que a hesperidina aumentou o efeito citotóxico da doxorubicina em células de HepG2 (câncer hepático).

No entanto, observa-se que a hesperidina livre e sua microcápsula (MNEH) não apresentaram IC_{50} detectável na máxima concentração testada nas células HL-60. Fernández-Bedmar *et al.* (2011) encontraram valor de IC_{50} em HL-60 após 72 h de 12,5 mM (7,6 mg mL^{-1}) de hesperidina, ou seja, maior que a concentração máxima testada neste trabalho. Podendo-se afirmar que agiu de forma sinérgica sobre o ácido betulínico sendo uma substância promissora como co-quimioterápico, porém o mecanismo de atuação da hesperidina neste caso deve ser explorado posteriormente.

Atualmente, muitos estudos objetivam a diminuição da atividade citotóxica de anticancerígenos em células não tumorais e a encapsulação de ativos, algumas vezes, tem mostrado uma melhora neste aspecto. É desejável que para uma mesma concentração de ativo a citotoxicidade seja menor em células não tumorais do que em células tumorais afim de diminuir os efeitos adversos dos quimioterápicos.

Em testes de citotoxicidade de nanoemulsões de ácido betulínico foram mostrados que há aumento de seletividade citotóxica quando se compara células de HCT-116 e L-929, da mesma forma, nanotubos de carbono contendo ácido betulínico encapsulado também mostrou melhora na seletividade citotóxica (TAN *et al.*, 2014; REBOUÇAS *et al.*, 2022).

No presente trabalho, observa-se que para as microcápsulas MNED e MNEB, na máxima concentração testada frente às células não tumorais L-929, não foi possível detectar a IC_{50} , enquanto nas células tumorais de HL-60 obteve-se os valores de $2,52 \pm 0,23 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $5,11 \pm 1,31 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, mostrando que a forma microencapsulada com os polissacarídeos goma guar e alginato de sódio diminuíram a citotoxicidade do ácido betulínico frente células não tumorais.

Este fato pode ser correlacionado com os resultados de liberação *in vitro*, já apresentados neste trabalho, os quais mostram a liberação lenta e controlada do ácido betulínico e hesperidina através da resistência imposta pela rede polimérica dos polissacarídeos utilizados, impedindo a exposição direta e imediata do ativo em concentrações

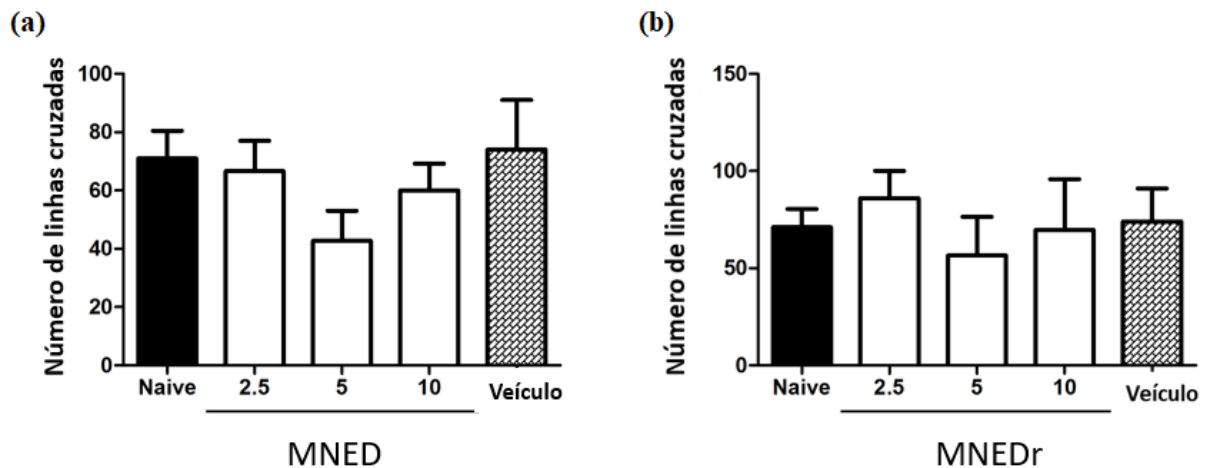
mais altas nas linhagens celulares utilizadas.

5.11 Avaliação da segurança não clínica

5.11.1 Avaliação da atividade locomotora (Teste de Campo Aberto)

Como resultado do teste de avaliação da atividade locomotora, nenhuma amostra testada causou efeito sedativo e/ou comprometimento locomotor dos animais, pois apresentaram atividade locomotora (AL) significativamente ($p > 0,05$) semelhante entre cada grupo de amostra, bem como em relação aos controles, naive e veículo, como mostra a Figura 31.

Figura 31 - Efeito das amostras teste sob a atividade locomotora do *zebrafish* (*Danio rerio*) adulto no Teste de Campo Aberto (0-5min). (a) MNED (b) MNEDr.



Naive - animais não tratados, Veículo - microcápsula sem ativos em água ultrapura (20 μ L; *v.o.*). Os valores representam a média \pm erro padrão da média (EPM) para 6 animais/grupo, ANOVA seguida de Tukey.

Fonte: Elaborada pela autora.

Atualmente diversas pesquisas vêm utilizando *Danio rerio* (*zebrafish*) como modelo animal para avaliar a segurança não clínica de novos produtos farmacêuticos e alimentícios. Moura *et al.* (2021) encapsularam óleo essencial de *Siparuna guianensis* e constataram que na exposição em embriões de *zebrafish* as amostras foram consideradas seguras. Coradini *et al.* (2021) avaliaram a segurança de nanopartículas de curcumina, onde os autores não constataram alteração da atividade locomotora dos animais, caracterizando as amostras avaliadas como seguras.

5.11.2 Toxicidade aguda em 96h

O *zebrafish* adulto foi utilizado como modelo animal para avaliar a toxicidade aguda das amostras teste (MNED e MNEDr). Como resultado, constatou-se que todas as amostras testadas se mostraram seguras, pois não foram tóxicas frente ao ZFa em até 96 h de análise (Tabela 17).

Tabela 17 - Resultados dos testes de toxicidade aguda das amostras teste (MNED e MNEDr) frente ao *zebrafish* adulto.

Amostra	Mortalidades do Zebrafish Adulto				96h
	CN	C1	C2	C3	CL ₅₀ (µg mL ⁻¹)
MNED	0	0	0	0	> 10
MNEDr	0	0	0	0	> 10
Veículo	0	0	0	0	> 10

Fonte: Autora; CN- Grupo controle negativo: água destilada estéril, MNED ou MNEDr sem ativo. C1 – concentração 1 (2,5 µg mL⁻¹; 20 µL; v.o.); C2 – concentração 2 (5 µg mL⁻¹; 20 µL; v.o.), C3 – concentração 3 (10 µg mL⁻¹; 20 µL; v.o.), CL₅₀-concentração letal para matar 50% dos *Zebrafish* adulto.

Os dados obtidos no presente trabalho revelaram que MNED e MNEDr são consideradas seguros, pois não alteraram sistema locomotor e nem foram tóxicas frente a *zebrafish* adulto até 96 h de análise.

6 CONCLUSÃO

As microcápsulas na forma de pó contendo ácido betulínico e hesperidina co-encapsulados à base dos polissacarídeos goma guar e alginato de sódio foram preparadas com sucesso usando a técnica de secagem de nanoemulsão em *spray dryer*. As microcápsulas promoveram a liberação controlada dos ativos simultaneamente devido a resistência imposta pela composição dos polissacarídeos goma guar e alginato de sódio. Além disso, as microcápsulas foram capazes, mesmo com a liberação lenta e controlada, de serem citotóxicas contra células de HL-60 (leucemia promielocítica), melhorando a atuação do ácido betulínico pela associação com a hesperidina e simultaneamente se apresentaram menos citotóxica a células não tumorais quando comparado aos ativos na forma não encapsulada. Também se mostraram seguras por não serem tóxicas e nem alteraram o sistema locomotor em *zebrafish* (*Danio rerio*). Portanto, as microcápsulas de goma guar e alginato apresentam-se como uma nova estratégia para co-liberação controlada de hesperidina e ácido betulínico e são promissoras para o tratamento de leucemia promielocítica devendo seus mecanismos de atuação citotóxica serem investigados em estudos posteriores.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAHEEM, I. T.; ABDEL-GHANY, A. A. Hesperidin alleviates doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. **Journal of the Egyptian National Cancer Institute**, v. 21, n. 2, p. 175-184, 2009.
- ABULATEEFEH, S. R.; TAHA, M. O. Enhanced drug encapsulation and extended release profiles of calcium–alginate nanoparticles by using tannic acid as a bridging cross-linking agent. **Journal of Microencapsulation**, v. 32, n. 1, p. 96-105, 2015.
- AGGARWAL, V.; TULI, H. S.; THAKRAL, F.; SINGHAL, P.; AGGARWAL, D.; SRIVASTAVA, S.; PANDEY, A.; SAK, K.; VAROL, M.; KHAN, M. A.; SETHI, G. Molecular mechanisms of action of hesperidin in cancer: Recent trends and advancements. **Experimental Biology and Medicine**, v. 245, n. 5, p. 486-497, 2020.
- AHMAD, F.; RICHARDSON, M. K. Exploratory behaviour in the open field test adapted for larval zebrafish: impact of environmental complexity. **Behavioural Processes**, v. 92, p. 88-98, 2013.
- AISHA, A. F.; ABU-SALAH, K. M.; ISMAIL, Z.; MAJID, A. M. α -Mangostin enhances betulinic acid cytotoxicity and inhibits cisplatin cytotoxicity on HCT 116 colorectal carcinoma cells. **Molecules**, v. 17, n. 3, p. 2939-2954, 2012.
- ALAKURTTI, S.; MÄKELÄ, T.; KOSKIMIES, S.; YLI-KAUHALUOMA, J. Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 29, n. 1, p. 1-13, 2006.
- ALANGE, V. V., BIRAJDAR, R. P., & KULKARNI, R. V. Functionally modified polyacrylamide-graft-gum karaya pH-sensitive spray dried microspheres for colon targeting of an anti-cancer drug. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 829–839, 2017.
- ALI-SEYED, M.; JANTAN, I.; VIJAYARAGHAVAN, K.; BUKHARI, S. N. Betulinic acid: recent advances in chemical modifications, effective delivery, and molecular mechanisms of a promising anticancer therapy. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 87, n. 4, p. 517-536, 2016.
- ANDRIAMANANTOANINA, H.; RINAUDO, M. Relationship between the molecular structure of alginates and their gelation in acidic conditions. **Polymer International**, v. 59, n. 11, p. 1531-1541, 2010.
- ANIL, A.; SUDHEER, P. Mucoadhesive Polymers: A Review. **Journal of Pharmaceutical Research**, v. 17, n. 1, p. 47-55, 2018.
- ARELLANO-AGUILAR, O.; SOLIS-ANGELES, S.; SERRANO-GARCÍA, L.; MORALES-SIERRA, E.; MENDEZ-SERRANO, A.; MONTERO-MONTOYA, R. Use of the zebrafish embryo toxicity test for risk assessment purpose: case study. **Journal of Fisheries Sciences.com**, v. 9, n. 4, p. 0-0, 2015.
- ARENAS-JAL, M.; SUÑÉ-NEGRE, J. M.; GARCÍA-MONTOYA, E. An overview of

microencapsulation in the food industry: Opportunities, challenges, and innovations. **European Food Research and Technology**, v. 246, n. 7, p. 1371-1382, 2020.

ATMACA, A. S.; KILINBOZ, Y. F.; KAPLAN, A. B. U.; ÇETIN, M. Development and *in vitro* characterization of nanoemulsion and nanoemulsion based gel containing *Artemisia dracunculus* ethanol extract. **International Journal of PharmATA**, v. 2, p. 2791-9196, 2022.

AYUB, A. D.; CHIU, H. I.; YUSUF, S. N. A. M.; KADIR, E. A.; NGALIM, S. H.; LIM, V. Biocompatible Disulphide Cross-Linked Sodium Alginate Derivative Nanoparticles for Oral Colon-Targeted Drug Delivery. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 47, p. 353–369, 2019.

AZERO, E. G.; ANDRADE, C. T. Extração e caracterização da Galactomanana de sementes de *Caesalpinia pulcherrima*. **Polímeros**, v. 9, p. 54-59, 1999.

AZMI, N.A.N.; ELGHARBAWY, A.A.M.; MOTLAGH, S.R.; SAMSUDIN, N.; SALLEH, H.M. Nanoemulsions: Factory for food, pharmaceutical and cosmetics. **Processes**, v. 7, n. 9, p. 617, 2019.

BALAKRISHNAN, K.; CASIMEER, S.C.; GHIDAN, A.Y.; GHETHAN, F.Y.; VENKATACHALAM, K.; SINGARAVELU, A. Bioformulated hesperidin-loaded PLGA nanoparticles counteract the mitochondrial-mediated intrinsic apoptotic pathway in cancer cells. **Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials**, v. 31, n. 1, p. 331-343, 2020.

BARRADAS, N.; CARDOSO, S.; CASTIGLIONE, T.C.; MICHAEL, J.; GYSELLE, K.; HOLANDA, D.; REGINA, C.; MANSUR, E. Dual Alginate-Lipid Nanocarriers as Oral Delivery Systems for Amphotericin B. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 166, p. 187–194, 2018.

BOCALON, L. G.; TOZATTI, M. G.; JANUÁRIO, A. H.; PAULETTI, P. M.; SILVA, M. L. A.; ROCHA, L. A.; MOLINA, E. F.; SANTOS, M. F. C.; CUNHA, W. R. Incorporation of Betulinic Acid into Silica-Based Nanoparticles for Controlled Phytochemical Release. **Analytical Letters**, p. 1-15, 2022.

BRUSCHI, M. L. Mathematical models of drug release. In M. L. Bruschi (Ed.), *Strategies to modify the drug release from pharmaceutical systems*, Cambridge, UK: **Woodhead Publishing**, pp. 63–86, 2015.

CAI, Y.; ZHENG, Y.; GU, J.; WANG, S.; WANG, N.; YANG, B.; ZHANG, F.; WANG, D.; FU, W.; WANG, Z. Betulinic acid chemosensitizes breast cancer by triggering ER stress-mediated apoptosis by directly targeting GRP78. **Cell Death & Disease**, v. 9, n. 6, p. 1-16, 2018.

CAO, Y.; YANG, S.; LI, Y.; SHI, J. Cooperative organizations of small molecular surfactants and amphiphilic block copolymers: Roles of surfactants in the formation of binary co-assemblies. **Aggregate**, v. 2, n. 6, p. e49, 2021.

CARELLA, A. M.; BERMAN, E.; MARAONE, M. P.; GANZINA, F. Idarubicin in the treatment of acute leukemias. An overview of preclinical and clinical studies. **Haematologica**, v. 75, n. 2, p. 159-169, 1990.

CHANDEL, D.; UPPAL, S.; MEHTA, S. K.; SHUKLA, G. Preparation and characterization of celecoxib entrapped guar gum nanoparticles targeted for oral drug delivery against colon cancer: an in-vitro study. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 10, n. 2-s, p. 14-21, 2020.

CHRASTINA, A.; WELSH, J.; BORGSTRÖM, P.; BARON, V. T. Propylene Glycol Caprylate-Based Nanoemulsion Formulation of Plumbagin: Development and Characterization of Anticancer Activity. **BioMed Research International**, 3549061, 2022.

CICHEWICZ, R. H.; KOUZI, S. A. Chemistry, biological activity, and chemotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and HIV infection. **Medicinal Research Reviews**, v. 24, n. 1, p. 90-114, 2004.

CÎNTĂ-PÎNZARU, S.; DEHELEAN, C. A.; SOICA, C.; CULEA, M.; BORCAN, F. Evaluation and differentiation of the Betulaceae birch bark species and their bioactive triterpene content using analytical FT-vibrational spectroscopy and GC-MS. **Chemistry Central Journal**, v. 6, n. 1, p. 1-12, 2012.

COELHO, E.; DE FRANÇA, F.; REBOUÇAS, L. M.; UCHOA, A.; SEMIÃO, L.; MAIA, D.; MOREIRA, D.; PINHEIRO, D.; DA SILVA, L.; PESSOA, C.; RIBEIRO, M. E.; RICARDO, N. Application of curcuminoids-loaded nanoemulsion for cancer therapy. **Journal of Applied Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 5, n. 3, p. 34-39, 2022.

COLLYMORE, C.; RASMUSSEN, S.; TOLWANI, R. J. Gavaging adult zebrafish. **Journal of Visualized Experiments**, n. 78, p. e50691, 2013.

COLOMBO, P.; COLOMBO, G.; CAHYADI, C. Geometric release systems: principles, release mechanisms, kinetics, polymer science, and release-modifying material. In: **Controlled Release in Oral Drug Delivery**. Springer, Boston, MA, p. 221-237, 2011.

CONCEA-CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. Resolução Normativa n. 37 de 15 de fevereiro de 2018. Diretrizes da prática de eutanásia. 2018. Disponível em www.mctic.gov.br/.../concea/...normativas/RN-37-Eutanasia-secao-1-22_02_18.pdf. Acesso em: 20 de outubro de 2022.

CONG, A.Z.; SHI, Y.; WANG, Y. A Novel Controlled Drug Delivery System Based on Alginate Hydrogel / Chitosan Micelle Composites. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 855–864, 2017.

CORADINI, K.; DE ANDRADE, D.F.; ALTENHOFEN, S.; REOLON, G.K.; NERY, L.R.; SILVA, N.E.; VIANNA, M.R.; BONAN, C.D.; BECK, R.C. Free and nanoencapsulated curcumin prevents scopolamine-induced cognitive impairment in adult zebrafish. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 66, p. 102781, 2021.

COSTA, C.; MEDRONHO, B.; FILIPE, A.; MIRA, I.; LINDMAN, B.; EDLUND, H.; NORGRÉN, M. Emulsion Formation and Stabilization by Biomolecules: The Leading Role of Cellulose. **Polymers**, v. 11, n. 10, p. 1570, 2019.

CRACIUN, A.; BARHALESCU, M. L.; AGOP, M.; OCHIUZ, L. Theoretical Modeling of Long-Time Drug Release from Nitrosalicyl-Imine-Chitosan Hydrogels through Multifractal Logistic Type Laws. **Computational and Mathematical Methods in Medicine**, v. 2019,

2019.

CSUK, R. Betulinic acid and its derivatives: A patent review (2008–2013). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v, 24, n, 8, p, 913-923, 2014.

CUI, X.; ZHANG, F.; ZHAO, Y.; LI, P.; WANG, T.; XU, Z.; ZHANG, J.; ZHANG, W. A. novel ligand-modified nanocomposite microparticles improved efficiency of quercetin and paclitaxel delivery in the non-small cell lung cancer. **Drug delivery**, v. 29, n. 1, p. 3123–3133, 2022.

CUNHA, P. L. R., PAULA, R. C. M., FEITOSA, J. P. A, Purification of guar gum for biological applications, **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 41, n. 3, p. 324–331, 2007.

DASH, S.; MURTHY, P. N.; NATH, L.; CHOWDHURY, P. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 67, n. 3, p. 217-223, 2010.

DE SOUSA, I.; REBOUÇAS, L.; SAMPAIO, C.; RICARDO, N.; SANTOS, E.; DA SILVA, A. Nanoemulgel based on guar gum and Pluronic F127 containing encapsulated hesperidin with antioxidant potential. **Journal of Applied Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 5, n. 2, p. 28-32, 2022.

DESHMUKH, R.; HARWANSH, R. K.; RAHMAN, M. A. Sodium alginate-guar gum and carbopol based methotrexate loaded mucoadhesive microparticles for colon delivery: An in vitro evaluation. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 57, 2021.

DEVI, D. R.; SANDHYA, P.; HARI, B. N. V., Poloxamer: a novel functional molecule for drug delivery and gene therapy, **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v, 5, n, 8, p. 159, 2013.

EL-KATTAN, A.; VARMA, M. Oral absorption, intestinal metabolism and human oral bioavailability. **Topics on Drug Metabolism**, v. 10, p. 31087, 2012.

ESTRUEL-AMADES, S.; MASSOT-CLADERA, M.; GARCIA-CERDÀ, P.; PÉREZ-CANO, F. J.; FRANCH, À.; CASTELL, M.; CAMPS-BOSSACOMA, M. Protective effect of hesperidin on the oxidative stress induced by an exhausting exercise in intensively trained rats. **Nutrients**, v. 11, n. 4, p. 783, 2019.

FARCAS, C. G.; DEHELEAN, C.; PINZARU, I. A.; MIOC, M.; SOCOLIUC, V.; MOACA, E. A.; AVRAM, S.; GHIULAI, R.; CORICOVAC, D.; PAVEL, I.; ALLA, P. K.; CRETU, O. M.; SOICA, C.; LOGHIN, F. Thermosensitive Betulinic Acid-Loaded Magnetoliposomes: A Promising Antitumor Potential for Highly Aggressive Human Breast Adenocarcinoma Cells Under Hyperthermic Conditions. **International Journal of Nanomedicine**. v. 15, p. 8175-8200, 2020.

FAUJAN, N.H.; ALITHEEN, N.B.; YEAP, S.K.; ALI, A.M.; MUHAJIR, A.H.; AHMAD, F.B. Cytotoxic effect of betulinic acid and betulinic acid acetate isolated from *Melaleuca cajuput* on human myeloid leukemia (HL-60) cell line. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 38, p. 6387-6396, 2010.

FERNANDES, F. S.; DA SILVA, G. S.; HILEL, A. S.; CARVALHO, A. C.; REMOR, K. V. T.; SCHLINDWEIN, A. D.; KANIS, L. A.; MARTINS, D. F.; KVIECINSKI, M. R. Study of the potential adverse effects caused by the dermal application of *Dillenia indica* L. fruit extract standardized to betulinic acid in rodents. **Plos one**, v. 14, n. 5, p. e0217718, 2019.

FERNÁNDEZ-BEDMAR, Z.; ANTER, J.; DE LA CRUZ-ARES, S.; MUÑOZ-SERRANO, A.; ALONSO-MORAGA, A.; PÉREZ-GUISADO, J. Role of citrus juices and distinctive components in the modulation of degenerative processes: Genotoxicity, antigenotoxicity, cytotoxicity, and longevity in *Drosophila*. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 74, n. 15-16, p. 1052-1066, 2011.

FERRARA, F.; MOLICA, M.; BERNARDI, M. Drug treatment options for acute promyelocytic leukemia. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 23, n. 1, p. 117-127, 2022.

FERTAH, M.; BELFKIRA, A.; DAHMANE, E. M.; TAOURIRTE, M.; BROUILLETTE, F. Extraction and characterization of sodium alginate from *Moroccan Laminaria digitata* brown seaweed. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, n. 2, p. 3707-3714, 2017.

FORD, J. L.; RUBINSTEIN, M. H.; MCCAUL, F.; HOGAN, J. E. EDGAR, P. J. Importance of drug type, tablet shape and added diluents on drug release kinetics from hydroxypropylmethylcellulose matrix tablets. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 40, n. 3, p. 223-234, 1987.

FOULADIAN, P.; AFINJUOMO, F.; ARAFAT, M.; BERGAMIN, A.; SONG, Y.; BLENCOWE, A.; GARG, S. Influence of Polymer Composition on the Controlled Release of Docetaxel: A Comparison of Non-Degradable Polymer Films for Oesophageal Drug-Eluting Stents. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 5, p. 444, 2020.

GALLARDO, G.; GUIDA, L.; MARTÍNEZ, V.; LÓPEZ, M.C.; BERNHARDT, D.C.; BLASCO, R.; PEDROZA-ISLAS, R.; HERMIDA, L.G. Microencapsulation of linseed oil by spray drying for functional food application. **Food Research International**, v. 52, n. 2, p. 473-482, 2013.

GANTA, S.; TALEKAR, M.; SINGH, A.; COLEMAN, T. P.; AMIJI, M. M. Nanoemulsions in translational research - opportunities and challenges in targeted cancer therapy. **Aaps Pharmscitech**, v. 15, n. 3, p. 694-708, 2014.

GAO, Y.; JIA, Z.; KONG, X.; LI, Q.; CHANG, D. Z.; WEI, D.; LE, X.; SUYUN, H.; HUANG, S.; WANG, L.; XIE, K. Combining betulinic acid and mithramycin a effectively suppresses pancreatic cancer by inhibiting proliferation, invasion, and angiogenesis. **Cancer Research**, v. 71, n. 15, p. 5182-5193, 2011.

GATTUSO, G.; BARRECA, D.; GARGIULLI, C.; LEUZZI, U.; CARISTI, C. Flavonoid composition of citrus juices. **Molecules**, v. 12, n. 8, p. 1641-1673, 2007.

GIBALDI, M.; FELDMAN, S. Establishment of sink conditions in dissolution rate determinations. Theoretical considerations and application to nondisintegrating dosage forms. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 56, n. 10, p. 1238-1242, 1967.

GIOFFREDI, E.; BOFFITO, M.; CALZONE, S.; GIANNITELLI, S.M.; RAINER, A.;

TROMBETTA, M.; MOZETIC, P.; CHIONO, V. Pluronic F127 hydrogel characterization and biofabrication in cellularized constructs for tissue engineering applications. **Procedia Cirp**, v. 49, p. 125-132, 2016.

GOH, C. H.; HENG, P. W. S.; CHAN, L. W. Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications, **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 1, p. 1-12, 2012.

GRAHAM, N. B. Polymeric inserts and implants for the controlled release of drugs. **British Polymer Journal**, v. 10, n. 4, p. 260-266, 1978.

GUO, Q.; SU, J.; SHU, X.; YUAN, F.; MAO, L.; LIU, J.; GAO, Y. Production and characterization of pea protein isolate-pectin complexes for delivery of curcumin: Effect of esterified degree of pectin. **Food Hydrocolloids**, v. 105, p. 105777, 2020.

HARSHA, S.; AL-KHARS, M.; AL-HASSAN, M.; KUMAR, N. P.; NAIR, A. B.; ATTIMARAD, M.; AL-DHUBIAB, B. Pharmacokinetics and tissue distribution of spray-dried carboplatin microspheres: lung targeting via intravenous route. **Archives of pharmaceutical research**, v. 37, n. 3, p. 352–360, 2014.

HAY, I. D.; UR REHMAN, Z.; MORADALI, M. F.; WANG, Y.; REHM, B. H. Microbial alginate production, modification and its applications. **Microbial Biotechnology**, v. 6, n. 6, p. 637-650, 2013.

HIGUCHI, T. Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, n. 12, p. 1145-1149, 1963.

HOFFBRAND, V.; MOSS, P. A. H.; PETTIT, J. E. Essential haematology. Livro impresso, inglês e Edição:6th ed., Editora:Wiley-Blackwell, Malden, 2011.

HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review (Part 1), **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 2, p. 255-264, 2013.

HSU, P. H.; CHEN, W. H.; JUAN-LU, C.; HSIEH, S. C.; LIN, S. C.; MAI, R. T.; CHEN, S. Y. Hesperidin and Chlorogenic Acid Synergistically Inhibit the Growth of Breast Cancer Cells via Estrogen Receptor/Mitochondrial Pathway. **Life**, v. 11, n. 9, p. 950, 2021.

HSU, T. I.; WANG, M. C.; CHEN, S. Y.; HUANG, S. T.; YEH, Y. M.; SU, W. C.; CHANG, W. C.; HUNG, J. J. Betulinic acid decreases specificity protein 1 (Sp1) level via increasing the sumoylation of sp1 to inhibit lung cancer growth. **Molecular Pharmacology**, v. 82, n. 6, p. 1115-1128, 2012.

HUAMANI-PALOMINO, R. G.; CORDOVA, B. M.; PICHILINGUE L, E. R.; VENÂNCIO, T.; VALDERRAMA, A. C. Functionalization of an alginate-based material by oxidation and reductive amination. **Polymers**, v. 13, n. 2, p. 255, 2021.

HUANG, Y.; ZHANG, J.; HAN, X.; HUANG, T. The use of zebrafish (*Danio rerio*) behavioral responses in identifying sublethal exposures to deltamethrin. **International**

Journal of Environmental Research and Public Health, v. 11, n. 4, p. 3650-3660, 2014.

ILGIN, P.; OZAY, H.; OZAY, O. Synthesis and Characterization of PH Responsive Alginate Based-Hydrogels as Oral Drug Delivery Carrier. **Journal of Polymer Research**. v. 27, p. 251, 2020.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. Leucemia. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/assuntos/leucemia>. Acesso em: 22 de dezembro de 2020.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial; Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2020.

JÄGER, S.; TROJAN, H.; KOPP, T.; LASZCZYK, M. N.; SCHEFFLER, A. Pentacyclic triterpene distribution in various plants–rich sources for a new group of multi-potent plant extracts. **Molecules**, v. 14, n. 6, p. 2016-2031, 2009.

JÄGER, S.; WINKLER, K.; PFÜLLER, U.; SCHEFFLER, A. Solubility studies of oleanolic acid and betulinic acid in aqueous solutions and plant extracts of *Viscum album L*, **Planta Medica**, v. 73, n. 02, p. 157-162, 2007.

JASMINA, H.; DŽANA, O.; ALISA, E.; EDINA, V.; OGNJENKA, R. Preparation of nanoemulsions by high-energy and lowenergy emulsification methods. In: Badnjevic, A. (eds) **CMBEBIH IFMBE Proceedings**, v. 62., Springer, Singapore, 2017.

JENSEN, H. M.; LARSEN, F. H.; ENGELSEN, S. B. Characterization of alginates by nuclear magnetic resonance (NMR) and vibrational spectroscopy (IR, NIR, Raman) in combination with chemometrics, In: **Natural Products from Marine Algae**, Humana Press, New York, NY, p. 347-363. 2015.

JIMENEZ, J. J.; CHALE, R. S.; ABAD, A. C.; SCHALLY, A. V. Acute promyelocytic leukemia (APL): a review of the literature. **Oncotarget**, v. 11, n. 11, p. 992, 2020.

JOSINO, M. A. A.; ROCHA DA SILVA, C.; DE ANDRADE NETO, J. B.; BARROSO, F. D. D.; JUVÊNCIO DA SILVA, L.; CAVALCANTI, B. C.; DE MORAES, M. O.; BRITO, D. H. A.; RICARDO, N. M. P. S.; JÚNIOR, H. V. N. Development and in vitro evaluation of microparticles of fluoxetine in galactomannan against biofilms of *S. aureus* methicilin resistant. **Carbohydrate Polymers**, v. 252, p. 117184, 2021.

KAUR, M.; MALIK, B.; GARG, T.; RATH, G.; GOYAL, A. K. Development and characterization of guar gum nanoparticles for oral immunization against tuberculosis. **Drug delivery**, v. 22, n. 3, p. 328-334, 2015.

KAUR, P.; MISHRA, V.; SHUNMUGAPERUMAL, T.; GOYAL, A. K.; GHOSH, G.; RATH, G. Inhalable spray dried lipidnanoparticles for the co-delivery of paclitaxel and doxorubicin in lung cancer. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 56, p. 101502, 2020.

KORGA, A.; OSTROWSKA, M.; JOZEFczyk, A.; IWAN, M.; WOJCIK, R.; ZGORKA, G.; HERBET, M.; VILARRUBLA, G. G.; DUDKA, J. Apigenin and hesperidin augment the toxic effect of doxorubicin against HepG2 cells. **BMC Pharmacology and Toxicology**, v. 20,

n. 1, p. 1-13, 2019.

KOROLEVA, M.Y.; NAGOVITSINA, T.Y.; BIDANOV, D.; GORBACHEVSKI, O.S.; YURTOV, E.V. Nano- and microcapsules as drug-delivery systems. **Resource-Efficient Technologies**, v. 2, n. 4, p. 233-239, 2016.

KORSMEYER, R. W.; PEPPAS, N. A. Solute and penetrant diffusion in swellable polymers. III. Drug release from glassy poly (HEMA-co-NVP) copolymers. **Journal of Controlled Release**, v. 1, n. 2, p. 89-98, 1984.

KORSMEYER, R.W.; GURNY, R.; DOELKER, E.; BURI, P.; PEPPAS, N.A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 15, n. 1, p. 25-35, 1983.

KUSHARYANTI, I.; LARASATI, L.; SUSIDARTI, R. A.; MEIYANTO, E. Hesperidin Increase Cytotoxic Activity of Doxorubicin on HeLa Cell Line Through Cell Cycle Modulation and Apoptosis Induction. **Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention**, v. 2, n. 2, p. 267-273, 2011.

LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Alginate: properties and biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 37, n. 1, p. 106-126, 2012.

LI, C.; WANG, J.; WANG, Y.; GAO, H.; WEI, G., HUANG Y., YU, H.; GAN, Y.; WANG, Y.; MEI, L.; CHEN, H.; HU, H.; ZHANG, Z.; JIN, Y. Recent progress in drug delivery. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 9, n. 6, p. 1145-1162, 2019.

LI, X.; LI, Q.; ZHAO, C. Zero-order controlled release of water-soluble drugs using a marker pen platform. **ACS Omega**, v. 6, n. 21, p. 13774-13778, 2021.

LIU, F.; WEI, C., CHEN, M.; XU, F.; MA, J.; ZHONG, F. Film-forming properties of guar gum, tara gum and locust bean gum. **Food Hydrocolloids**, v. 98, p. 105007, 2020.

LIU, P.; DE WULF, O.; LARU, J.; HEIKKILÄ, T.; VAN VEEN, B.; KIESVAARA, J.; HIRVONEN, J.; PELTONEN, L.; LAAKSONEN, T. Dissolution studies of poorly soluble drug nanosuspensions in non-sink conditions. **Aaps Pharmscitech**, v. 14, n. 2, p. 748-756, 2013.

LIU, Q.; HUANG, H.; CHEN, H.; LIN, J.; WANG, Q. Food-grade nanoemulsions: preparation, stability and application in encapsulation of bioactive compounds. **Molecules**, v. 24, n. 23, p. 4242, 2019.

LIU, X.; JUTOORU, I.; LEI, P.; KIM, K.; LEE, S.; BRENTS, L.K.; PRATHER, P.L.; SAFE, S.H. Betulinic Acid Targets YY1 and ErbB2 through Cannabinoid Receptor-Dependent Disruption of MicroRNA-27a: ZBTB10 in Breast Cancer. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 11, n. 7, p. 1421-1431, 2012.

LIU, Y.; JIANXIONG, X.; LIU, J.; CHEN, J.; WANG, K.; JIANG, J.; SUN, R. Physicochemical Characteristics of Gradual Fractionation Ingredients of Industrial Galactomannan Gums from *Gleditsia microphylla* and *Cyamopsis tetragonoloba*. **BioResources**, v. 11, n. 3, p. 7046-7060, 2016.

LU, S.; FAN, X.; WANG, H.; ZHAO, Y.; ZHAO, W.; LI, M.; LV, R.; WANG, T.; SUN, T. Synthesis of gelatin-based dual-targeted nanoparticles of betulinic acid for antitumor therapy. **ACS Applied Bio Materials**, v. 3, n. 6, p. 3518-3525, 2020.

MACHERAS, P.; ILIADIS, A. **Athanasios, Modeling in Biopharmaceutics, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics: homogeneous and heterogeneous approaches**, v. 29, n. 00, p. 57, 2006.

MAGALHÃES, F. E. A.; DE SOUSA, C. Á. P. B.; SANTOS, S. A. A. R.; MENEZES, R. B.; BATISTA, F. L. A.; ABREU, Â. O.; DE OLIVEIRA, M. V.; MOURA, L. F. W. G.; RAPOSO, R. D. S.; CAMPOS, A. R. Adult zebrafish (*Danio rerio*): an alternative behavioral model of formalin-induced nociception. **Zebrafish**, v. 14, n. 5, p. 422-429, 2017.

MAGENHEIM, B.; BENITA, S. Nanoparticle characterization: a comprehensive physicochemical approach. **Pharma Sciences**, v. 1, p. 221-241, 1991.

MAGRI, G., FRANZÉ, S.; MUSAZZI, U. M.; SELMIN, F.; CILURZO, F. Data on spray-drying processing to optimize the yield of materials sensitive to heat and moisture content. **Data in Brief**, v. 10, p. 37-92, 2019.

MAJUMDAR, S.; SRIRANGAM, R. Solubility, stability, physicochemical characteristics and in vitro ocular tissue permeability of hesperidin: a natural bioflavonoid, **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 5, p. 1217-1225, 2009.

MCCLEMENTS, D.J. *Food Emulsions: Principles, Practice, and Techniques*. CRC Press Inc., Boca Raton, 2005.

MENG, L.; XIA, X.; YANG, Y.; YE, J.; DONG, W.; MA, P.; JIN, Y.; LIU, Y. Co-encapsulation of paclitaxel and baicalein in nanoemulsions to overcome multidrug resistance via oxidative stress augmentation and P-glycoprotein inhibition. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 513, n. 1-2, p. 8-16, 2016.

MERCHANT, H. A.; SHOAIB, H. M; TAZEEN, J.; YOUSUF, R. Once-daily tablet formulation and in vitro release evaluation of cefpodoxime using hydroxypropyl methylcellulose: a technical note. **AAPS Pharmscitech**, v. 7, n. 3, p. E178-E183, 2006.

MISHRA, A.; PANDEY, V. K.; SHANKAR, B. S.; MELO, J. S. Spray drying as an efficient route for synthesis of silica nanoparticles-sodium alginate biohybrid drug carrier of doxorubicin. **Colloids and surfaces. B Biointerfaces**, v. 197, p. 111445, 2021.

MOURA, W. S.; OLIVEIRA, E. E.; HADDI, K.; CORRÊA, R. F.; PIAU, T. B.; MOURA, D. S.; SANTOS, S. F.; GRISOLIA, C. K.; RIBEIRO, B. M.; AGUIAR, R.W. Cassava starch-based essential oil microparticles preparations: Functionalities in mosquito control and selectivity against non-target organisms. **Industrial Crops and Products**, v. 162, p. 113289, 2021.

MUSCHIN, T.; YOSHIDA, T. Structural analysis of galactomannans by NMR spectroscopy. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 3, p. 1893-1898, 2012.

MYERS, D. *Surfaces, Interfaces, and Colloids: Principles and Applications*. 2nd Edition, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1999.

NAWAZ, A.; ULLAH, S.; ALNUWAISER, M. A.; REHMAN, F. U.; SELIM, S.; AL JAOUNI, S.K.; FARID, A. Formulation and Evaluation of Chitosan-Gelatin Thermosensitive Hydrogels Containing 5FU-Alginate Nanoparticles for Skin Delivery. **Gels**, v. 8, n. 9, p. 537, 2022.

NETO, M. C. Guia de protocolos e medicamentos para tratamento em oncologia e hematologia. **São Paulo, Hospital Albert Einstein**, 2013. Disponível em: https://medicalsuite.einstein.br/pratica-medica/guias-e-protocolos/Documents/Guia_Oncologia_Einstein_2013.pdf Acesso em 20 de setembro de 2022.

NGUYEN, T. T.; LE, T. V.; DANG, N. N.; NGUYEN, D. C.; NGUYEN, P. T.; TRAN, T. T.; NGUYEN, Q.; BACH, L. G.; THUY, D. Microencapsulation of Essential Oils by Spray-Drying and Influencing Factors. **Journal of Food Quality**, v. 2021, p. 1-15, 2021.

NICOLOV, M.; GHIULAI, R. M.; VOICU, M.; MIOC, M.; DUSE, A. O.; ROMAN, R.; AMBRUS, R.; ZUPKO, I.; MOACA, E. A.; CORICOVAC, D. E.; FARCAS, C.; RACOVICIANU, R. M.; DANCIU, C.; DEHELEAN, C. A.; SOICA, C. Cocrystal formation of betulinic acid and ascorbic acid: Synthesis, physico-chemical assessment, antioxidant, and antiproliferative activity. **Frontiers in Chemistry**, v. 7, p. 92, 2019.

NIDDK - National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury. Bethesda (MD), 2012.

NING, L.; ZHAO, W.; GAO, H.; WU, Y. Hesperidin induces anticancer effects on human prostate cancer cells via ROS-mediated necrosis like cell death. **Official Journal of the Balkan Union of Oncology**, v. 25, n. 6, p. 2629–2634, 2020.

NOVINBAHADOR, T.; ARAJ-KHODAEI, M.; MAHDAVI, M. Evidence for Hesperidin as an Effective Factor in Initiating the Intrinsic Pathway of Apoptosis in KG1a Leukemia Cells. **International Journal of Toxicology**, v. 2022, n. 1, 2022.

OECD, Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, 1992.

OOI, S.Y.; AHMAD, I.; CAIRUL, M.; MOHD, I. Cellulose Nanocrystals Extracted from Rice Husks as a Reinforcing Material in Gelatin Hydrogels for Use in Controlled Drug Delivery Systems. **Industrial Crops and Products**, v. 93, p. 227–234, 2015.

ÖZTÜRK, A. A.; NAMLI, İ.; GÜLEÇ, K.; GÖRGÜLÜ, Ş. Design of Lamivudine Loaded Nanoparticles for Oral Application by Nano Spray Drying Method: A New Approach to use an Antiretroviral Drug for Lung Cancer Treatment. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 23, n. 10, p. 1064-1079, 2020.

PAARAKH, M. P.; JOSE, P. A.; SETTY, C. M.; CHRISTOPER, G.V. Release kinetics—concepts and applications. **International Journal of Pharmacy Research & Technology**, v. 8, n. 1, p. 12-20, 2018.

PAQUES, J. P.; VAN DER LINDEN, E.; VAN RIJN, C. J.; SAGIS, L. M. Preparation methods of alginate nanoparticles. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 209, p. 163-171, 2014.

- PATLOLLA, J. M. R.; RAO, C. Triterpenoids for cancer prevention and treatment: current status and future prospects. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 147-155, 2012.
- PEPPAS, N. A.; NARASIMHAN, B. Mathematical models in drug delivery: How modeling has shaped the way we design new drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 75-81, 2014.
- PILIPENKO, N.; GONÇALVES, O. H.; BONA, E.; FERNANDES, I. P.; PINTO, J. A.; SORITA, G. D.; LEIMANN, F. V.; BARREIRO, M. F. Tailoring swelling of alginate-gelatin hydrogel microspheres by crosslinking with calcium chloride combined with transglutaminase. **Carbohydrate Polymers**, v. 223, p. 115035, 2019.
- PISHA, E.; CHAI, H.; LEE, I. S.; CHAGWEDERA, T. E.; FARNSWORTH, N. R.; CORDELL, G. A.; BEECHER, C. W.; FONG, H. H.; KINGHORN, A. D.; BROWN, D. M. Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis, **Nature Medicine**, v. 1, n. 10, p. 1046-1051, 1995.
- PUSCASELU, R. G.; LOBIUC, A.; DIMIAN, M.; COVASA, M. Alginate: From food industry to biomedical applications and management of metabolic disorders. **Polymers**, v. 12, n. 10, p. 2417, 2020.
- QUIRK, R. P. Anionic Synthesis of Polymers with Functional Groups. **Comprehensive Polymer Science and Supplements**, p. 83-106, 1989.
- QURRAT-UL-AIN; SHARMA, S.; KHULLER, G. K.; GARG, S. K. Alginate-based oral drug delivery system for tuberculosis: pharmacokinetics and therapeutic effects. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 4, p. 931-938, 2003.
- RAMOS, P. E.; SILVA, P.; ALARIO, M. M.; PASTRANA, L. M.; TEIXEIRA, J. A.; CERQUEIRA, M. A.; VICENTE, A. A. Effect of alginate molecular weight and M/G ratio in beads properties foreseeing the protection of probiotics. **Food Hydrocolloids**, v. 77, p. 8-16, 2018.
- REBOUÇAS, L. M.; SOUSA, A. C.; GRAMOSA, N. V.; DE ARAÚJO, T. G.; DE OLIVEIRA, F. C.; DO Ó PESSOA, C.; ARAÚJO, R. S.; SANTOS, E. M.; RICARDO, N. M. Linseed Oil Nanoemulsion with Pluronic F127 Loaded with Betulinic Acid: Preparation, Rheology, MTT Assay and in vitro Release Kinetics. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 33, n.11, p. 1319-1331, 2022.
- RÉBUFA, C.; GIRARD, F.; ARTAUD, J.; DUPUY, N. Discrimination by Infrared Spectroscopy: Application to Micronized Locust Bean and Guar Gums. **Modern Spectroscopic Techniques and Applications**, IntechOpen, 2019. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/68158> Acesso em: 12 de outubro de 2022.
- REHMAN, A.; TONG, Q.; JAFARI, S. M.; KORMA, S. A.; KHAN, I. M.; MOHSIN, A.; MANZOOR, M. F.; ASHRAF, W.; MUSHTAQ, B. S.; ZAINAB, S.; CACCIOTTI, I. Spray dried nanoemulsions loaded with curcumin, resveratrol, and borage seed oil: The role of two different modified starches as encapsulating materials. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 186, p. 820-828, 2021.

- RITGER, P. L.; PEPPAS, N.A. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. **Journal of Controlled Release**, v. 5, n.1, p. 37- 42, 1987.
- SAEIDI, I.; HADJMOHAMMADI, M. R.; PEYROVI, M.; IRANSHAHI, M.; BARFI, B.; BABAEI, A. B.; DUST, A. M. HPLC determination of hesperidin, diosmin and eriocitrin in Iranian lime juice using polyamide as an adsorbent for solid phase extraction. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 56, n. 2, p. 419-422, 2011.
- SAGRILLO, M. R.; CARDOSO, S. H.; SILVA, L. R. J.; GRAÇA, C. H. N.; FERREIRA, E.; HAMERSCHLAK, N.; GUERRA, J. C. C.; BACAL, N. S.; ANDRADE, J. A. D.; BOROVIK, C. L. Leucemia promielocítica aguda: caracterização de alterações cromossômicas por citogenética tradicional e molecular (FISH). **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 27, p. 94-101, 2005.
- SAIFULLAH, A. M.; AHMED, F.; SHIL, B. C.; BANIK, R. K.; SAHA, S. K.; CHOWDHURY, M.; HAQUE, A.; ALAM, M. S.; AKHTER, A. Comparative study of alginate and omeprazole in symptomatic treatment of non-erosive gastroesophageal reflux disease. **Mymensingh Medical Journal**, v. 27, n. 4, p. 771-775, 2018.
- SÁNCHEZ-LÓPEZ, E.; GUERRA, M.; DIAS-FERREIRA, J.; LOPEZ-MACHADO, A.; ETTCHETO, M.; CANO, A.; ESPINA, M.; CAMINS, A.; GARCIA, M. L.; SOUTO, E. B. Current applications of nanoemulsions in cancer therapeutics. **Nanomaterials**, v. 9, n. 6, p. 821, 2019.
- SANEJA, A.; ARORA, D.; KUMAR, R.; DUBEY, R. D.; PANDA, A. K.; GUPTA, P. N. Therapeutic applications of betulinic acid nanoformulations. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1421, n. 1, p. 5-18, 2018.
- SANEJA, A.; KUMAR, R.; MINTOO, M. J.; DUBEY, R. D.; SANGWAN, P. L.; MONDHE, D. M.; PANDA, A. K.; GUPTA, P. N. Gemcitabine and betulinic acid co-encapsulated PLGA– PEG polymer nanoparticles for improved efficacy of cancer chemotherapy. **Materials Science and Engineering: C**, v. 98, p. 764-771, 2019.
- SANSONE, F.; ROSSI, A.; DEL GAUDIO, P.; DE SIMONE, F.; AQUINO, R. P.; LAURO, M. R. Hesperidin gastroresistant microparticles by spray-drying: preparation, characterization, and dissolution profiles. **Aaps PharmSciTech**, v. 10, n. 2, p. 391-401, 2009.
- SERAIN, A. F.; MOROSI, L.; CERUTI, T.; MATTEO, C.; MERONI, M.; MINATEL, E.; ZUCCHETTI, M.; SALVADOR, M. J. Betulinic acid and its spray dried microparticle formulation: In vitro PDT effect against ovarian carcinoma cell line and in vivo plasma and tumor disposition. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 224, p. 112328, 2021.
- SHARMA, G.; SHARMA, S.; KUMAR, A.; AL-MUHTASEB, A. H.; NAUSHAD, M.; GHAFAR, A. A.; MOLA, G. T.; STADLER, F. J. Guar gum and its composites as potential materials for diverse applications: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 199, p. 534-545, 2018.
- SHARMA, N.; BANSAL, M.; VISHT, S.; SHARMA, P.; KULKARNI, G.T. Nanoemulsion: A new concept of delivery system. **Chronicles of Young Scientists**, v. 1, n. 2, p. 2-6, 2010.

SHETH, T.; SESHADRI, S.; PRILESZKY, T.; HELGESON, M. E. Multiple nanoemulsions. **Nature Reviews Materials**, v. 5, n. 3, p. 214-228, 2020.

SHIN, J.; LEE, H. J.; JUNG, D. B.; JUNG, J. H.; LEE, H. J.; LEE, E. O.; LEE, S. G.; SHIM, B. S.; CHOI, S. H.; KO, S. G.; AHN, K. S.; JEONG, S. J.; KIM, S. H. Suppression of STAT3 and HIF-1 alpha mediates anti-angiogenic activity of betulinic acid in hypoxic PC-3 prostate cancer cells. **PloS one**, v. 6, n. 6, p. e21492, 2011.

SIMÕES, M.G.; COIMBRA, P.; CARREIRA, A.S.; FIGUEIREDO, M. M.; GIL, M. H.; SIMÕES, P. N. Eugenol-loaded microspheres incorporated into textile substrates. **Cellulose**, v. 27, n. 7, p. 4109-4121, 2020.

SINGH, M. N.; HEMANT, K. S.; RAM, M.; SHIVAKUMAR, H. G. Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 2, p. 65-77, 2010.

ȘOICA, C.; DANCIU, C.; SAVOIU-BALINT, G.; BORCAN, F.; AMBRUS, R.; ZUPKÓ, I.; BOJIN, F. M.; CORICOVAC, D. E.; CIURLEA, S.; AVRAM, Ș.; DEHELEAN, C. A.; OLARIU, T.; MATUSZ, P. L. Betulinic Acid in Complex with a Gamma-Cyclodextrin Derivative Decreases Proliferation and in Vivo Tumor Development of Non-Metastatic and Metastatic B164A5 Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 5, p. 8235 – 8255, 2014.

SULTANA, A.; ZARE, M.; THOMAS, V.; KUMAR, T. S. S; RAMAKRISHNA, S. Nano-based drug delivery systems: conventional drug delivery routes, recent developments and future prospects. **Medicine in Drug Discovery**, v. 15, p. 100134, 2022.

SZEKALSKA, M.; PUCIŁOWSKA, A.; SZYMAŃSKA, E.; CIOSEK, P.; WINNICKA, K. Alginate: current use and future perspectives in pharmaceutical and biomedical applications. **International Journal of Polymer Science**, v. 2016, 2016. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/ijps/2016/7697031/> Acesso em: 11 de outubro de 2022.

TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 18, p. 108-109, 2004.

TAN, J. M.; BULLO, S.; FAKURAZI, S.; HUSSEIN, M. Z. Characterization of betulinic acid-multiwalled carbon nanotubes modified with hydrophilic biopolymer for improved biocompatibility on NIH/3T3 cell line. **Polymers**, v. 13, n. 9, p. 1362, 2021.

TAN, J. M.; KARTHIVASHAN, G.; ARULSELVAN, P.; FAKURAZI, S.; HUSSEIN, M. Z. Characterization and in vitro studies of the anticancer effect of oxidized carbon nanotubes functionalized with betulinic acid. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 8, p. 2333, 2014.

TEIMOURI, S.; KASAPIS, S. Mechanistic interpretation of vitamin B6 transport from swelling matrices of genipin-crosslinked gelatin, BSA and WPI. **Food Hydrocolloids**, v. 123, p. 107-195, 2022.

TOMÁS-NAVARRO, M.; VALLEJO, F.; BORREGO, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Encapsulation and micronization effectively improve orange beverage flavanone bioavailability in humans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 39, p. 9458-9462, 2014.

- TORO-MENDOZA, J.; PETSEV, D. N. Brownian dynamics of emulsion film formation and droplet coalescence. **Physical review E Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics**, v. 81, 051404, 2010.
- TORRES, J. J.; TINJACA, C. D.; ALVAREZ, O.; GÓMEZ, J. M. Optimization proposal for emulsions formulation considering a multiscale approach. **Chemical Engineering Science**, v. 212, 115326, 2020.
- TROJER, M. A.; NORDSTIERNA, L.; NORDIN, M.; NYDÉN, M.; HOLMBERG, K. Encapsulation of actives for sustained release. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 15, n. 41, p. 17727-17741, 2013.
- TRUMBULL, E. R.; BIANCHI, E.; ECKERT, D. J.; WIEDHOPF, R. M.; COLE, J. R. Tumor Inhibitory Agents from *Vauquelinia corymbosa* (Rosaceae). **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 65, n. 9, p. 1407-1408, 1976.
- TSIRIGOTIS-MANIECKA, M.; SZYK-WARSZYŃSKA, L.; MANIECKI, Ł.; SZCZĘSNA, W.; WARSZYŃSKI, P.; WILK, K. A. Tailoring the composition of hydrogel particles for the controlled delivery of phytopharmaceuticals. **European Polymer Journal**, v. 151, p. 110429, 2021.
- VÍCTOR, M. M.; DAVID, J. M.; SAKUKUMA, M. C.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MOURA, A. F.; ARAÚJO, A. J. Terpene Esters from Natural products: Synthesis and Evaluation of Cytotoxic Activity. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 3, p. 1369-1379, 2015.
- WANG, H.; DONG, F.; WANG, Y.; WANG, X.; HONG, D.; LIU, Y.; ZHOU, J. Betulinic acid induces apoptosis of gallbladder cancer cells via repressing SCD1. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 52, n. 2, p. 200-206, 2020.
- WANG, S.; WANG, K.; ZHANG, C.; ZHANG, W.; XU, Q.; WANG, Y.; ZHANG, Y.; LI, Y.; ZHANG, Y.; ZHU, H.; SONG, F.; LEI, Y.; BU, Y. Overaccumulation of p53-mediated autophagy protects against betulinic acid-induced apoptotic cell death in colorectal cancer cells. **Cell Death & Disease**, v. 8, n. 10, p. e3087, 2017.
- WANG, W.; LIU, X.; XIE, Y.; ZHANG, H.; YU, W.; XIONG, Y.; XIE, W.; MA, X. Microencapsulation using natural polysaccharides for drug delivery and cell implantation. **Journal of Materials Chemistry**, v. 16, n. 32, p. 3252-3267, 2006.
- WENG, J.; TONG, H. H. Y.; CHOW, S. F. In vitro release study of the polymeric drug nanoparticles: development and validation of a novel method, **Pharmaceutics**, v. 12, n. 8, p. 732, 2020.
- WINTER, E.; PIZZOL, C. D.; LOCATELLI, C.; SILVA, A. H.; CONTE, A.; CHIARADIA-DELATORRE, L. D.; NUNES, R. J.; YUNES, R. A.; CRECKZYNSKI-PASA, T. B. In vitro and in vivo effects of free and chalcones-loaded nanoemulsions: insights and challenges in targeted cancer chemotherapies. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 11, n. 10, p. 10016-10035, 2014.
- WÓJCIAK-KOSIOR, M.; SOWA, I.; PUCEK, K.; SZYMCZAK, G.; KOCJAN, R.; LUCHOWSKI, P. Evaluation of seasonal changes of triterpenic acid contents in *Viscum*

album from different host trees. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 1- 4, 2016.

WOJCIK-PASTUSZKA, D.; KRZAK, J.; MACIKOWSKI, B.; BERKOWSKI, R.; OSIŃSKI, B.; MUSIAŁ, W. Evaluation of the release kinetics of a pharmacologically active substance from model intra-articular implants replacing the cruciate ligaments of the knee. **Materials**, v. 12, n. 8, p. 1202, 2019.

WU, X.; WEI, Z.; FENG, H.; CHEN, H.; XIE, J.; HUANG, Y.; WANG, M.; YAO, C.; HUANG, J. Targeting Effect of Betulinic Acid Liposome Modified by Hyaluronic Acid on Hepatoma Cells In Vitro. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 111, n. 11, p. 3047–3053, 2022.

XU, Y.; LI, J.; LI, Q. J.; FENG, Y. L.; PAN, F. Betulinic acid promotes TRAIL function on liver cancer progression inhibition through p53/Caspase-3 signaling activation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 88, p. 349-358, 2017.

YAKOUBI, S.; KOBAYASHI, I.; UEMURA, K.; NAKAJIMA, M.; ISODA, H.; KSOURI, R.; SAIDANI-TOUNSI, M.; NEVES, M. A. Essential-Oil-Loaded Nanoemulsion Lipidic-Phase Optimization and Modeling by Response Surface Methodology (RSM): Enhancement of Their Antimicrobial Potential and Bioavailability in Nanoscale Food Delivery System. **Foods**, v. 10, n. 12, p. 3149, 2021.

YAO, Y.; LIN, M.; LIU, Z.; LIU, M.; ZHANG, S.; ZHANG, Y. Hesperidin Inhibits Lung Cancer In Vitro and In Vivo Through PinX1. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 918665, 2022.

YE, Q.; WANG, X.; JIN, M.; WANG, M.; HU, Y.; YU, S.; YANG, Y.; YANG, J.; CAI, J. Effect of RSK4 on biological characteristics of colorectal cancer. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 16, n. 1, p. 1-9, 2018.

YILMAZ, M.; KANTARJIAN, H.; RAVANDI-KASHANI, F.; SHORT, N. J.; JABBOUR, E. Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia in adults: current treatments and future perspectives. **Clinical Advances in Hematology & Oncology**, v. 16, n. 3, p. 216-223, 2018.

YOON, J.; OH, D. X.; JO, C.; LEE, J.; HWANG, D. S. Improvement of desolvation and resilience of alginate binders for Si-based anodes in a lithium ion battery by calcium-mediated cross-linking. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 16, n. 46, p. 25628-25635, 2014.

ZHAO, X.; YANQIU, Y.; ZHU, CHENHUI, Z.; ZHANG, C.; JINMEI, J.; LEI, Y.; MA, Y.; FENGPEI, D. Positive charge pesticide nanoemulsions prepared by the phase inversion composition method with ionic liquids. **RSC advances**, v. 7, n. 77, p. 48586-48596, 2017.

ZHENG, Y.; LIU, P.; WANG, N.; WANG, S.; YANG, B.; LI, M.; CHEN, J.; SITU, H.; XIE, M.; LIN, Y.; WANG, Z. Betulinic acid suppresses breast cancer metastasis by targeting GRP78-mediated glycolysis and ER stress apoptotic pathway. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, 2019.

ZHOU, Y.; CHU, J. S.; LI, J. X.; WU, X. Y. Theoretical analysis of release kinetics of coated tablets containing constant and non-constant drug reservoirs. **International Journal of**

Pharmaceutics, v. 385, n. 1-2, p. 98-103, 2010.

ZUCO, V.; SUPINO, R.; RIGHETTI, S. C.; CLERIS, L.; MARCHESI, E.; GAMBACORTI-PASSERINI, C.; FORMELLI, F. Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. **Cancer Letters**, v. 175, n. 1, p. 17-25, 2002.

APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO I

Article

<https://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20220063>J. Braz. Chem. Soc., Vol. 33, No. 11, 1319-1331, 2022
©2022 Sociedade Brasileira de Química**Linseed Oil Nanoemulsion with Pluronic® F127 Loaded with Betulinic Acid: Preparation, Rheology, MTT Assay and *in vitro* Release Kinetics**

Louhana M. Rebouças,^a Alexandre C. C. Sousa,^a Nilce V. Gramosa,^a
Tamara G. de Araújo,^b Fátima de Cássia E. de Oliveira,^c Cláudia do Ó Pessoa,^c
Rinaldo S. Araújo,^d Emília M. A. Santos^d and Nágila M. P. S. Ricardo^{*,a}

^aDepartamento de Química Orgânica e Inorgânica, Centro de Ciências,
Universidade Federal do Ceará, 60440-900 Fortaleza-CE, Brazil

^bDepartamento de Farmácia, Universidade Federal do Ceará (UFC),
Campus do Porangabaçu, 60430-170 Fortaleza-CE, Brazil

^cDepartamento Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará,
Campus do Porangabaçu, 60431-970 Fortaleza-CE, Brazil

^dDepartamento de Química e Meio Ambiente,
Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Ceará,
60040-215 Fortaleza-CE, Brazil

The main objective of this work was to develop a nanoemulsion based on linseed oil and betulinic acid, stabilized with Pluronic F127 and polyglycerol polyricinoleate, for anticancer applications. The nanoemulsions were synthesized by ultrasound and evaluated for *in vitro* cytotoxicity, particle size, polydispersity index, zeta potential, morphology, encapsulation efficiency, storage stability, rheology and *in vitro* release kinetics. *In vitro* cytotoxicity assays were performed by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay (72 h) against HCT-116 (colorectal carcinoma), SNB-19 (glioblastoma), NCI-H460 (lung carcinoma) and L-929 (normal fibroblasts) cells. The determination of 50% inhibitory concentration (IC₅₀) showed an increased selectivity for the emulsified betulinic acid when compared to its free form for the HCT-116 cells. The IC₅₀ values for the synthesized nanoemulsions showed a range from 3.2 to 3.7 μM (HCT-116), 5.6 and 11.5 μM (NCI-H460), 5.8 and 7.3 μM (SNB-19) and > 16.5 μM for normal fibroblasts. In the 48 h *in vitro* release assays, it presented controlled release explained by the Korsmeyer-Peppas model, releasing 572.25 and 619.95 μg of betulinic acid in a controlled way, generating promising perspectives for the prolonged release of betulinic acid in anticancer applications.

APÊNDICE B – CARTA PATENTE CONCEDIDA

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102021018167-2

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: BR 102021018167-2

(22) Data do Depósito: 13/09/2021

(43) Data da Publicação Nacional: 07/12/2021

(51) Classificação Internacional: A61K 9/02; A61K 31/33; A61P 35/00.



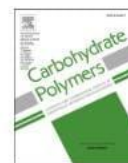
APÊNDICE C – ARTIGO PUBLICADO II



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Carbohydrate Polymers

journal homepage: www.elsevier.com/locate/carbpol



Microcapsules based on alginate and guar gum for co-delivery of hydrophobic antitumor bioactives

Louhana M. Rebouças^{a,b}, Alexandre C.C. Sousa^{a,b}, Caroline G. Sampaio^b, Larissa M.R. Silva^c, Pedro M.S. Costa^d, Cláudia Pessoa^d, Nilce V.G.P.S. Brasil^a, Nágila M.P.S. Ricardo^{a,*}

^a Laboratory of Polymers and Materials Innovation, Department of Organic and Inorganic Chemistry, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE 60440-900, Brazil

^b Federal Institute of Education, Science and Technology of Ceará, Fortaleza, CE 60410-426, Brazil

^c Department of Food Engineering, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE 60356-000, Brazil

^d Laboratory of Experimental Oncology, Center for Research and Drug Development, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE 60430-275, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Betulinic acid
Hesperidin
Polysaccharide microcapsules
Guar gum
Alginate
HL-60

ABSTRACT

The main goal was the development of a polysaccharide microcapsule for anticancer application based on guar gum and sodium alginate for the controlled release of hesperidin and betulinic acid by spray drying technique. The microcapsule showed an Encapsulation Efficiency of $98.15 \pm 0.34\%$ for hesperidin and $99.76 \pm 0.22\%$ for betulinic acid. In the release study, the Korsmeyer-Peppas mathematical model was identified as the most adequate to explain the observed release mechanism. *In vivo* tests were performed in zebrafish model, revealing that the microcapsules did not alter the locomotor activity and were not toxic within 96 h by oral administration, suggesting their biological safety. *In vitro* cytotoxic activity against HL-60 cells confirmed an IC_{50} value of $2.52 \pm 0.23 \mu\text{g mL}^{-1}$ in 72 h. Additionally, a decrease in the cytotoxic activity of betulinic acid against L-929 (non-tumor) cells was evidenced. Therefore, the microcapsules synthesized in this work represent a promising formulation for anticancer applications.

APÊNDICE D – PEDIDO DE PATENTE DEPOSITADO



01/06/2022 870220048215
16:28
29409161948757990

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2022 010749 1

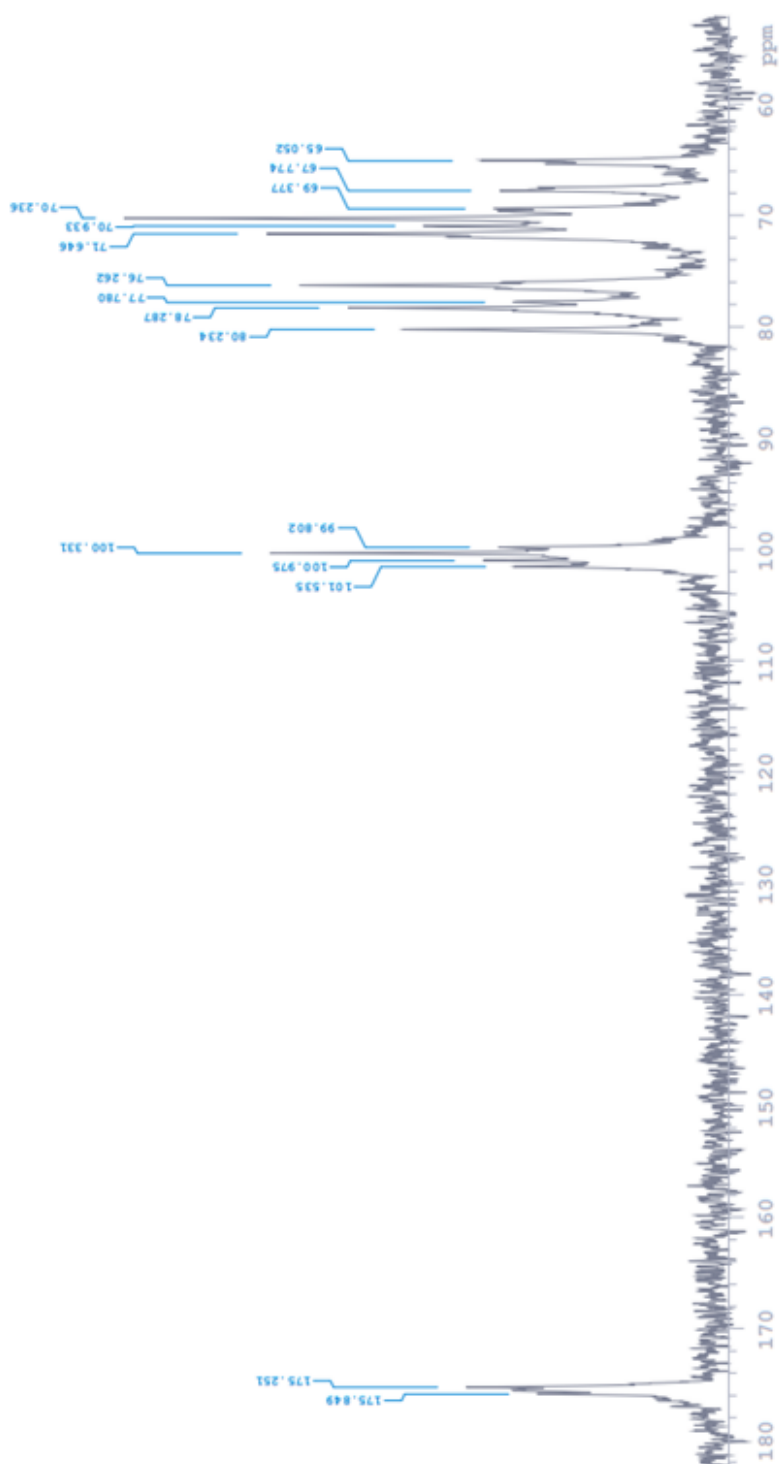
Dados do Pedido

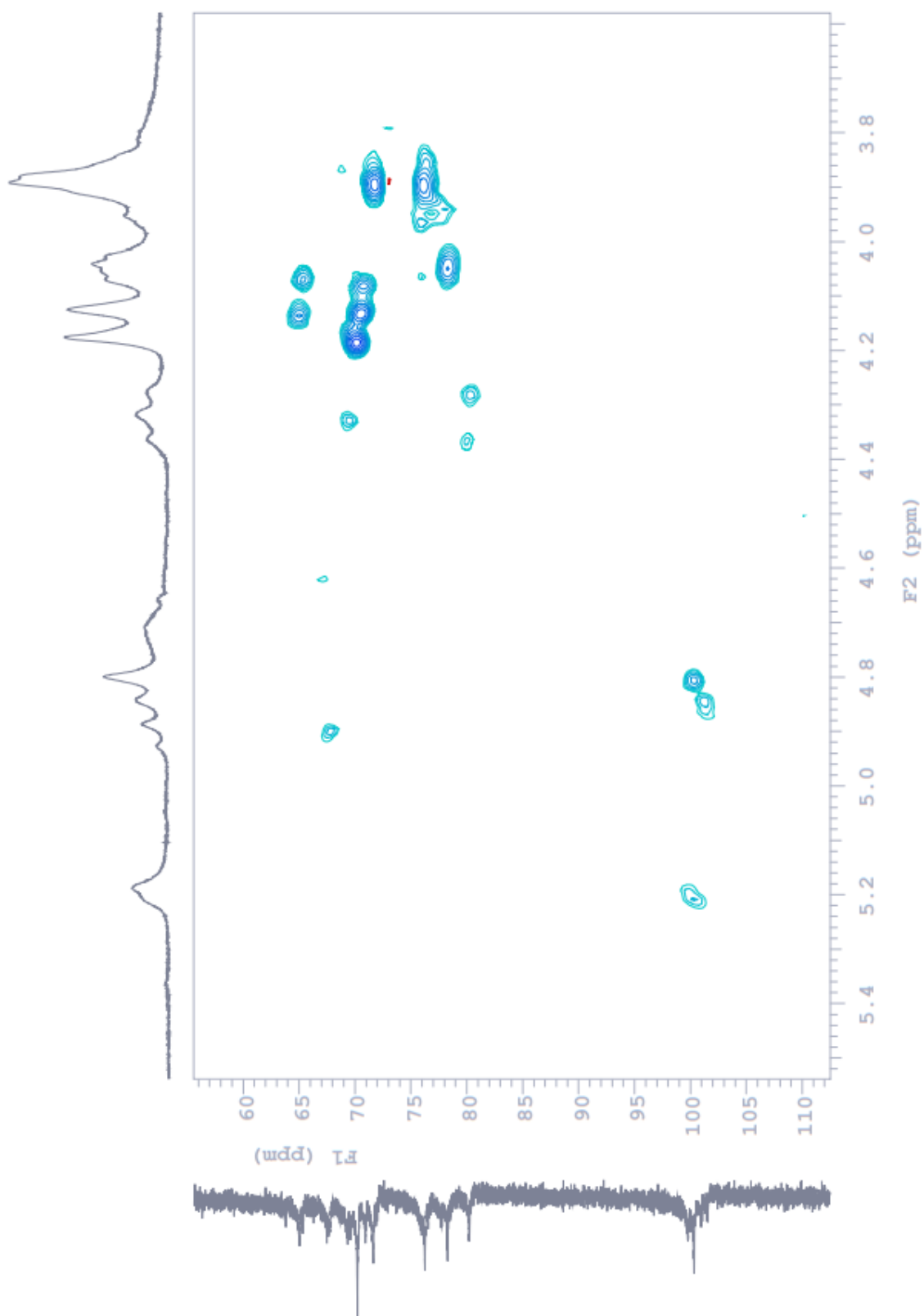
Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

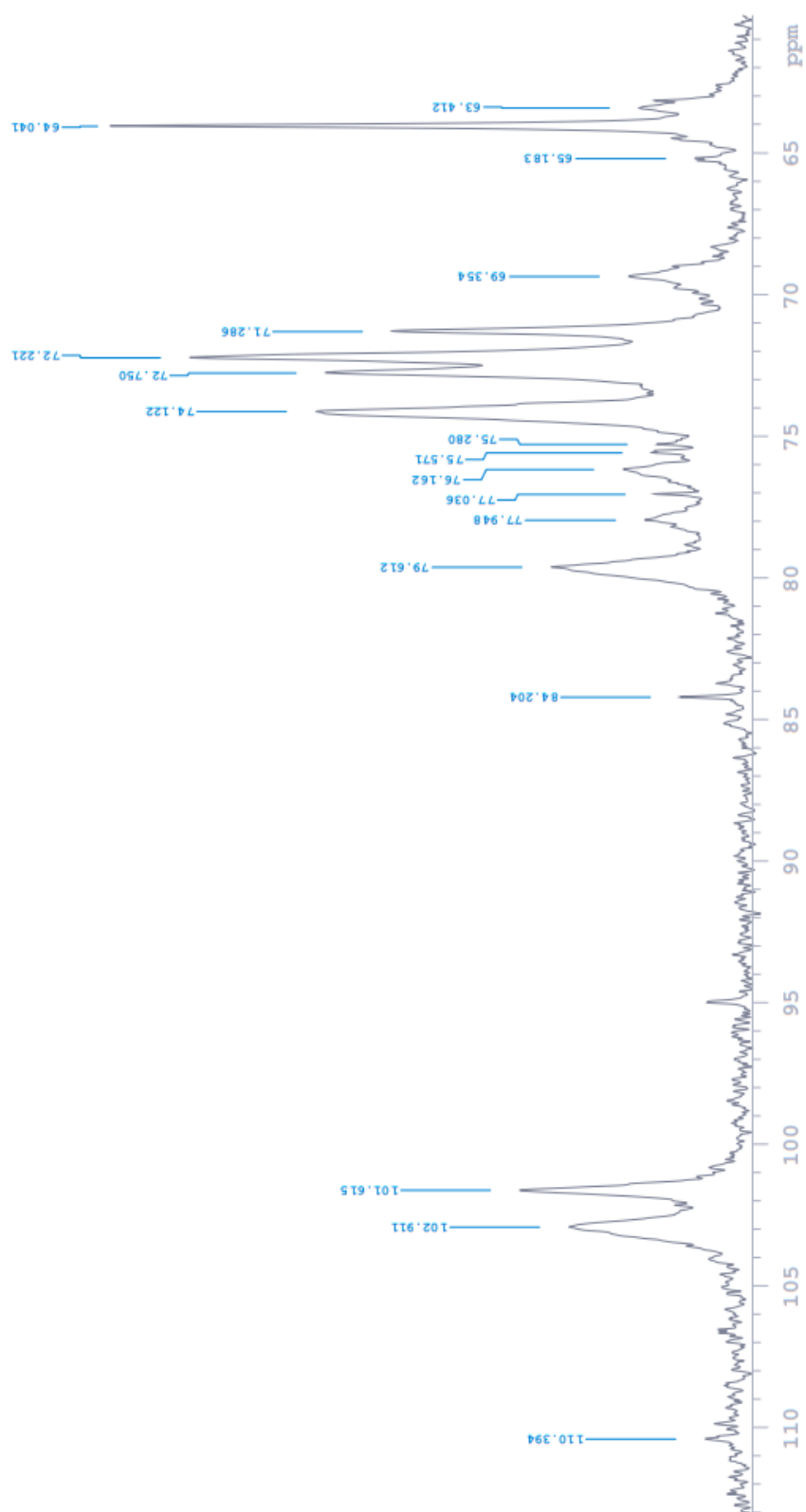
Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): MICROCÁPSULA POLIMÉRICA À BASE DE ÁCIDO BETULÍNICO E HESPERIDINA COENCAPSULADOS PARA APLICAÇÃO EM TERAPIA DE LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA

Resumo: A presente invenção trata-se de uma microcápsula polimérica à base de ácido betulínico e hesperidina coencapsulados para aplicação em terapia de leucemia promielocítica caracterizada por compreender: galactomanana, alginato de sódio reticulado, óleo de semente de *Linum usitatissimum*, copolímero em bloco de poli(óxido de etileno) poli(óxido de propileno), ácido betulínico e hesperidina. Este sistema possui ação comprovada *in vitro* contra células de HL-60 (leucemia promielocítica) além do fato de apresentar liberação controlada também evidenciada em testes cinéticos de liberação *in vitro*. Possuindo como diferencial o aumento do efeito citotóxico antitumoral pela associação estratégica do ácido betulínico com a hesperidina em uma microcápsula na forma de pó podendo ser dispersa em água.

Figura a publicar: 2

ANEXO A – RMN DE ^{13}C DO ALGINATO DE SÓDIO

ANEXO B – RMN HSQC ^{13}C - ^1H DO ALGINATO

ANEXO C – RMN DE ^{13}C DA GOMA GUAR

ANEXO D – RMN HSQC ^{13}C - ^1H DA GOMA GUAR