



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

**STÉFANO ARRAIS PEREIRA**

**NANOCÁPSULAS DE AMIDO VIA NANOEMULSÕES MÚTIPLAS COMO  
CARREADORES DE DROGAS LIPOFÍLICAS**

**FORTALEZA**

**2019**

STÉFANO ARRAIS PEREIRA

NANOCÁPSULAS DE AMIDO *VIA* NANOEMULSÕES MÚLTIPLAS COMO  
CARREADORES DE DROGAS LIPOFÍLICAS

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre na área de concentração: Química.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo.

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nilce Viana Gramosa Pompeu de Sousa Brasil.

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

P495n Pereira, Stéfano Arrais.

Nanocápsulas de amido via nanoemulsões múltiplas como carreadores de drogas lipofílicas / Stéfano Pereira. – 2022.

73 f.: il. color.

Dissertação (mestrado) – 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. Hidroxietilamido. 2. Múltipla nanoemulsão. 3. *Syzygium aromaticum*. 4. Nanocápsulas. 5. Liberação sustentada. I. Título.

CDD 540

---

STÉFANO ARRAIS PEREIRA

NANOCÁPSULAS DE AMIDO VIA NANOEMULSÕES MÚLTIPLAS COMO  
CARREADORES DE DROGAS LIPOFÍLICAS

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

Aprovada em: 25/07/2019.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo (Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Maria Elenir Nobre Pinho Ribeiro

Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dra. Raquel Petrilli Eloy

Universidade Federal do Ceará (UECE)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por todas as conquistas proporcionadas durante essa caminhada.

Aos meus pais Estefânia e Benedito pelo incentivo dado e ao companheirismo sempre dado para mim, e o espelho de pessoas que ele são.

Ao CNPq pelo fomento dado ao desenvolvimento da pesquisa e ao custeio pessoal.

À Sarah Brenda pelo companheirismo, Amor e toda ajuda dada em todos os momentos, sendo bastante importante nesse processo.

À Prof<sup>a</sup> Dra. Nágila Ricardo, pela oportunidade de ter me acolhido quando cheguei, pela orientação dada e por toda estrutura fornecida, que foi vital no desenvolvimento da pesquisa.

À Prof<sup>a</sup> Dra. Nilce Gramosa, pelas contribuições valorosas na produção do trabalho, e por todo esforço dado nesse processo.

À Dra. Lillian Fachine que nos momentos mais importantes do trabalho deu contribuições decisivas que possibilitaram a sua realização.

Aos colegas de LABPIM, Karen, Elano, Celiane Ari, Pedro, Ellen, Alexandre, Camila, e em especial ao Alessandro que facilitou minha inserção no grupo, Neto que é um amigo de longa data, ao Rafael e Aiêrta pela amizade que construímos e sobretudo pelos momentos de companheirismo.

Ao LAFIPLAM pela estrutura cedida.

Ao PADETEC por ter cedido o lapachol, Fármaco utilizado no trabalho.

Ao LABIMAN pela parceria e realização das análises de atividade antifúngica.

Ao CENAUREMN por realizar as análises de RMN requeridas pelo trabalho.

A Central Analítica pela análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Ao CEDENNA da Universidad de Santiago de Chile, pela realização da análise de Microscopia Eletrônica de Transmissão.

Ao Programa de Pós-graduação em Química pela estrutura fornecida para o desenvolvimento da pesquisa.

À Universidade Federal do Ceará por possibilitar a me tornar um individuo melhor como profissional, e sobretudo como pessoa.

## RESUMO

As infecções fúngicas hospitalares oriundas de patógenos do gênero *Candida* estão associadas à formação de biofilmes, os quais estão relacionadas com o aumento na mortalidade de pacientes imunocomprometidos. O uso de formulações que apresentem perfil de liberação sustentada visa prolongar o período na faixa terapêutica de ativos. A partir dessa problemática, a síntese de nanocápsulas de hidroxietilamido *via* nanoemulsão múltipla se apresenta como alternativa, já que sua morfologia “*core-shell*” possibilita o encapsulamento de ativos que apresentam baixa solubilidade em água, como o óleo essencial do cravo (OEC) e o lapachol, que apresentam potencialidades terapêuticas, ressaltando a atividade microbiológica do OEC. O óleo do cravo bem como o lapachol foram caracterizados quanto à análise estrutural e composição, Cromatografia Gasosa acoplada a Espectro de Massa (CG-EM) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) respectivamente, além de Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FT-IR) e por Ressonância Magnética Nuclear (RMN), para ambos os bioativos. As nanocápsulas sintetizadas foram caracterizadas por FT-IR, onde observou-se bandas características da formação de poliuretano, oriundas da reação de reticulação do hidroxietilamido. Através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) pode-se observar a formação da estrutura “*core-shell*” das nanocápsulas, além disso, as análises de Espalhamento de Luz dinâmico (DLS) mostraram que as cápsulas sintetizadas apresentaram tamanho inferior a 350 nm, e moderada estabilidade coloidal. A eficiência de encapsulamento (EE%) dos nanosistemas foi calculada e os valores obtidos foram de 73,47% para os sistemas com o lapachol e 76,89% para os sistemas com OEC. Os ensaios de difusão dos sistemas mostraram que o lapachol livre difundiu 98,89% em 24 h e o mesmo encapsulado apresentou máximo de liberação de 47,56%, mostrando a eficácia do sistema em prolongar a liberação do fármaco. As nanocápsulas tiveram seu potencial antifúngico testados contra as cepas *cândida parapsopolis* e *cândida krusei*, na qual o lapachol livre não apresentou atividade. Todavia as nanocápsulas controle e nanocápsulas B e OEC apresentaram atividade com Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 0,78% e 3,14 ppm respectivamente e contra *Candida parapsopolis* e 0,74 % e 1,57 ppm contra *Candida krusei*. Mostrando a eficiência do sistema em potencializar a atividade antifúngica do fármaco.

**Palavras-chave:** hidroxietilamido; múltipla nanoemulsão; nanocápsulas; *Syzygium aromaticum*; lapachol; liberação sustentada.

## ABSTRACT

Hospital fungal infections from *Candida* pathogens are associated with the formation of biofilms, which are related to the increased mortality of immunocompromised patients. The use of formulations with sustained release profile aims to prolong the period in the active therapeutic range. From this problem, the synthesis of hydroxyethyl starch nanocapsules *via* multiple nanoemulsion is presented as an alternative, since its core-shell morphology enables the encapsulation of low water solubility actives, such as clove essential oil (CEO) and lapachol, which have therapeutic potentials, highlighting the microbiological activity of the OEC. Clove oil as well as lapachol were characterized for structural analysis and composition, Chromatography Gas coupled Mass Spectrum (CG-MS) and High Performance Liquid Chromatography (HPLC) respectively, as well as Fourier Transformation Infrared (FT-IR) and Nuclear Magnetic Resonance (NMR) for both bioactive. The synthesized nanocapsules were characterized by FT-IR, where characteristic bands of polyurethane formation from the hydroxyethyl starch crosslinking reaction were observed. By Scanning Electron Microscopy (SEM) and Transmission Electron Microscopy (TEM), it is possible to observe the formation of the core-shell structure of the nanocapsules. In addition, Dynamic Light Scattering (DLS) analysis showed that Synthesized capsules were less than 350 nm in size and had moderate colloidal stability. The encapsulation efficiency (EE%) of the nanosystems was calculated and the values obtained were 73.47% for lapachol systems and 76.89% for OEC systems. The diffusion tests of the systems showed that free lapachol diffused 98.89% in 24 h and the same encapsulated presented maximum release of 47.56%, showing the system efficacy in prolonging the drug release. The nanocapsules had their antifungal potential tested against the *candida parapsopolis* and *candida krusei* strains, in which the free lapachol showed no activity. However, nanocapsules control and nanocapsules B and OEC showed activity with Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of 0.78% and 3.14 ppm respectively and against *Candida parapsopolis* and 0.74% and 1.57 ppm against *Candida krusei*. Showing the efficiency of the system in potentiating the antifungal activity of the drug.

**Keywords:** hydroxyethyl starch; multiple nanoemulsion; nanocapsules; *Syzygium aromaticum*; lapachol; controlled release.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Representação da molécula de eugenol.....	14
Figura 2-	Representação estrutural : (a) Naftoquinona e (b) lapachol.....	15
Figura 3-	Estruturas químicas de: (a) amilose e (b) hidroxietilamido.....	17
Figura 4-	Esquema de tipos de nanocarreadores de fármacos.....	18
Figura 5-	Esquema representando os tipos de emulsões.....	20
Figura 6-	Representação dos tipos de distribuição de gotas em múltiplas emulsões.	21
Figura 7-	Sistema de hidrodestilação.....	24
Figura 8-	Preparação da nanoemulsão primária.....	25
Figura 9-	Representação esquemática da síntese das nanocápsulas.....	27
Figura 10-	Espectro obtido do óleo essencial do cravo através de FT-IR.....	33
Figura 11-	Espectro de RMN <sup>1</sup> H do óleo essencial do cravo .....	35
Figura 12-	Espectro de RMN <sup>13</sup> C do óleo essencial do cravo.....	36
Figura 13-	Cromatograma do lapachol realizado pela técnica CLAE.....	37
Figura 14-	Espectro no Infravermelho do lapachol.....	38
Figura 15-	RMN <sup>1</sup> H do lapachol.....	39
Figura 16-	Espectro de RMN <sup>13</sup> C do lapachol.....	40
Figura 17-	Espectro comparativo na região do Infravermelho, entre o hidroxietilamido (HEA) e as nanacápsulas sintetizadas (NC HEA).....	41
Figura 18-	Reação de reticulação do hidroxietilamido.....	43
Figura 19-	Gráficos de distribuições dos tamanhos de partícula e PDI das nanocápsulas sintetizadas .....	45
Figura 20-	Tamanho de partícula e potencial zeta em função da variação da taxa de surfactantes da emulsão primária.....	47
Figura 21-	MEV das nanocápsulas nas escalas: a) 1µm e b) 10 µm.....	48
Figura 22-	Imagens de MET das nanocápsulas NC B (a) e NC LPC (b).....	49
Figura 23-	Espectro de varredura do lapachol.....	51
Figura 24-	Curva de calibração do lapachol.....	52
Figura 25-	Espectro de varredura do óleo essencial do cravo.....	53
Figura 26-	Curva de calibração do óleo essencial do cravo.....	54
Figura 27-	Curva de calibração do lapachol em tampão 7,4 e 10% de etanol.....	55
Figura 28-	Perfil de difusão das nanocápsulas com lapachol e do lapachol livre.....	56



Figura 29-	Modelos cinéticos de ordem zero e primeira ordem.....	57
Figura 30-	Modelos cinéticos de Higuchi e Peppas.....	59

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Denotação dos sistemas nanoemulsionados primários de acordo com sua composição em percentagem e/ou massa.....	26
Tabela 2-	Composição química do óleo essencial da espécie <i>Syzygium aromaticum</i> ..	32
Tabela 3-	Atribuições das bandas do espectro na região do Infravermelho para o óleo de cravo.....	33
Tabela 4-	Atribuições das bandas do espectro na região do Infravermelho para o lapachol.....	38
Tabela 5-	Atribuições das bandas do espectro na região do Infravermelho para o HEA e para as nanocápsulas sintetizadas.....	42
Tabela 6-	Tamanho de partícula e índice de polidispersividade das nanoemulsões primárias e das nanocápsulas.....	44
Tabela 7-	Resultados de potencial zeta para nanoemulsões primárias e nanocápsulas...	46
Tabela 8-	Resultados obtidos para o Teor de Sólidos das nanocápsulas.....	50
Tabela 9-	Expressão e coeficiente de correlação obtidos a partir dos modelos cinéticos de Zero e Primeira ordem.....	58
Tabela 10-	Expressão e coeficiente de correlação obtidos a partir dos modelos cinéticos de Higuchi e Peppas.....	59
Tabela 11-	Avaliação do efeito antifúngico do lapachol e óleo de cravo isolados e encapsulados frente a isolados de <i>Candida spp</i> .....	60

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A/O/A	Emulsão do tipo água em óleo em água
B 5	Emulsão primária com 5% de surfactante em relação a fase orgânica.
B 7,5	Emulsão primária com 7,5% de surfactante em relação a fase orgânica.
B 10	Emulsão primária com 10% de surfactante em relação a fase orgânica.
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectro de Massa
EE%	Eficiência de Encapsulamento
ELD	Espalhamento de Luz Dinâmica
FT-IR	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectro de Massa
HEA	Hidroxietilamido
LPC	lapachol
NC HEA	Nanocápsulas de Hidroxietilamido
NC OEC	Nanocápsulas contendo óleo essencial do cravo
NC LPC	Nanocápsulas contendo lapachol
O/A/O	Emulsão do tipo óleo em água em óleo
O 5	Emulsão primária com 5% de surfactante em relação a fase orgânica, contendo o ativo.
O 7,5	Emulsão primária com 7,5 % de surfactante em relação a fase orgânica, contendo o ativo
O 10	Emulsão primária com 10% de surfactante em relação a fase orgânica, contendo o ativo
nm	Nanômetros
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MV	Milivolts
OEC	óleo essencial do cravo
PGPR	Polirricinoleato de Poliglicerol
PPM	Partes por milhão
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
TDI	Tolueno Diisocianato
TS%	Teor de Sólidos
UV- VIS	Espectroscopia de Absorção na região do Ultravioleta Visível

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>1.1</b>	<b>Bioativos.....</b>	<b>13</b>
<b>1.1.1</b>	<b><i>Óleo essencial do cravo.....</i></b>	<b>13</b>
<b>1.1.2</b>	<b><i>Lapachol.....</i></b>	<b>14</b>
<b>1.2</b>	<b>Atividade antimicrobiana dos bioativos.....</b>	<b>15</b>
<b>1.3</b>	<b>Amido.....</b>	<b>16</b>
<b>1.4</b>	<b>Sistemas nanocarreadores de fármacos.....</b>	<b>18</b>
<b>1.5</b>	<b>Nanoemulsões múltiplas.....</b>	<b>19</b>
<b>1.6</b>	<b>Síntese <i>via</i> miniemulsão.....</b>	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>23</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>23</b>
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>24</b>
<b>3.1</b>	<b>Materiais.....</b>	<b>24</b>
<b>3.2</b>	<b>Métodos.....</b>	<b>24</b>
<b>3.2.1</b>	<b><i>Extração de óleo essencial do cravo.....</i></b>	<b>24</b>
<b>3.2.2</b>	<b><i>Obtenção das nanoemulsões primárias.....</i></b>	<b>25</b>
<b>3.2.3</b>	<b><i>Preparação das nanocápsulas via múltipla nanoemulsão inversa.....</i></b>	<b>26</b>
<b>3.3</b>	<b>Caracterização .....</b>	<b>27</b>
<b>3.3.1</b>	<b><i>Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectro de Massa (CG-EM).....</i></b>	<b>27</b>
<b>3.3.2</b>	<b><i>Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FT-IR).....</i></b>	<b>28</b>
<b>3.3.3</b>	<b><i>Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....</i></b>	<b>28</b>
<b>3.3.4</b>	<b><i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....</i></b>	<b>28</b>
<b>3.3.5</b>	<b><i>Tamanho de partícula e índice de polidispersividade.....</i></b>	<b>28</b>
<b>3.3.6</b>	<b><i>Potencial zeta.....</i></b>	<b>29</b>
<b>3.3.7</b>	<b><i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....</i></b>	<b>29</b>
<b>3.3.8</b>	<b><i>Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....</i></b>	<b>29</b>
<b>3.4</b>	<b>Teor de sólidos.....</b>	<b>29</b>
<b>3.5</b>	<b>Eficiência de encapsulamento e capacidade de carregamento dos ativos.....</b>	<b>29</b>
<b>3.6</b>	<b>Ensaio de difusão.....</b>	<b>30</b>
<b>3.7</b>	<b>Teste de atividade antifúngica.....</b>	<b>31</b>

<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	32
<b>4.1</b>	<b>Caracterização do óleo essencial do cravo</b> .....	32
<b>4.1.1</b>	<i>Cromatografia gasosa acoplada a espectro de massa (CG-EM)</i> .....	32
<b>4.1.2</b>	<i>Espectro infravermelho referente ao óleo essencial do cravo</i> .....	33
<b>4.1.3</b>	<i>Ressonância Magnética Nuclear</i> .....	34
<b>4.1.3.1</b>	<i>RMN <sup>1</sup>H do óleo essencial do cravo</i> .....	34
<b>4.1.3.2</b>	<i>RMN <sup>13</sup>C do óleo essencial do cravo</i> .....	35
<b>4.2</b>	<b>Caracterização do Lapachol</b> .....	36
<b>4.2.1</b>	<i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</i> .....	36
<b>4.2.2</b>	<i>Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FT-IR)</i> .....	37
<b>4.2.3</b>	<i>Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</i> .....	39
<b>4.2.3.1</b>	<i>RMN <sup>1</sup>H</i> .....	39
<b>4.2.3.2</b>	<i>RMN <sup>13</sup>C</i> .....	40
<b>4.3</b>	<b>Caracterizações das nanocápsulas sintetizadas</b> .....	40
<b>4.3.1</b>	<i>Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho</i> .....	40
<b>4.3.2</b>	<i>Tamanho de partícula e índice de polidispersidade</i> .....	43
<b>4.3.3</b>	<i>Potencial zeta</i> .....	46
<b>4.3.4</b>	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i> .....	48
<b>4.3.5</b>	<i>Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)</i> .....	49
<b>4.4</b>	<b>Teor de sólidos</b> .....	50
<b>4.5</b>	<b>Eficiência de encapsulamento e capacidade de carregamento</b> .....	50
<b>4.5.1</b>	<i>Eficiência de encapsulamento do lapachol</i> .....	50
<b>4.5.2</b>	<i>Eficiência de encapsulamento do óleo essencial do cravo</i> .....	52
<b>4.6</b>	<b>Ensaio de difusão</b> .....	55
<b>4.6.1</b>	<i>Ensaio de difusão do lapachol</i> .....	55
<b>4.6.2</b>	<i>Estudos de Modelos Cinéticos</i> .....	57
<b>4.7</b>	<b>Teste de atividade antifúngica</b> .....	60
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	62
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	64

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, as infecções fúngicas hospitalares têm sido estudadas devido a sua maior prevalência, além de elevadas taxas de mortalidade, que variam entre 40 e 70%, sendo esse percentual atrelado ao fator de risco envolvido (CORZO-LEÓN et al., 2015). Entre as leveduras clinicamente importantes, as do gênero *Candida* são patógenos relevantes oportunistas encontrados em pacientes hospitalizados, particularmente de indivíduos imunocomprometidos (PFALLER et al., 2014).

Algumas espécies de fungos e em especial do gênero *Candida* são responsáveis por infecções relacionadas à formação de biofilmes, que estão relacionadas com maior mortalidade dos pacientes. O risco de infecções por *Candida* está associado ao biofilme que pode ser formado em dispositivos médicos, como cateteres, implantes, endopróteses, fixação e válvulas artificiais (RAJKOWSKA; NOWICKA-KRAWCZYK; KUNICKA-STYCZYŃSKA, 2019). Os problemas clínicos decorrentes da formação dos biofilmes está presumivelmente correlacionada com a baixa permeabilidade da matriz a drogas antifúngicas (TASCINI et al., 2018).

Para o tratamento de infecções graves por *Candida*, existem três classes de antibióticos antifúngicos disponíveis: azólicos (fluconazol, itraconazol, voriconazol e posaconazol), as equinocandinas (anidulafungina, caspofungina e micafungina) e os polienos (nistatina e anfotericina B) (RAJKOWSKA; KUNICKA-STYCZYŃSKA; MAROSZYŃSKA, 2017). Todavia a elevada incidência de infecções fúngicas causadas por *Candida spp* e o aumento das cepas resistentes ao tratamento principal (fluconazol), vinculado à capacidade desses micro-organismos formarem biofilmes, levaram a um número crescente de falhas no tratamento, requerendo, portanto, novos agentes anti-*Candida* eficazes (COSTA SILVA et al., 2017).

Nessa perspectiva de tratamento, os produtos naturais são uma importante fonte de agentes anti-infecciosos (RAJESHKUMAR; SUNDARARAMAN, 2012). No entanto, devido à complexidade estrutural e às vezes limitada disponibilidade de compostos puros, seu uso torna-se limitado, requerendo assim a utilização de sistemas de carreamento que minimizem as problemáticas relacionadas ao emprego de produtos naturais, tais como a alta volatilidade, baixa solubilidade em água, para o óleo de cravo (LI et al., 2015), e baixa disponibilidade em via oral (TABOSA et al., 2018).

Dentre esses sistemas, as nanopartículas poliméricas são agora amplamente reconhecidas, como capazes de conceber transportadores de fármacos e sistemas de liberação

controlada devido à sua versatilidade e características únicas, tais como: diferentes composições, morfologias, tamanhos reduzidos de partículas e alta área superficial, modificação da superfície (STEINMACHER et al., 2017).

O campo de aplicação para materiais nanométricos se mostra bastante crescente em termos de aplicações biomédicas. Entre as diferentes técnicas para síntese desses materiais, com intuito do encapsulamento de fármacos, o processo de miniemulsão mostrou-se ser altamente adaptável a essas necessidades específicas. O recente desenvolvimento dos estudos sobre miniemulsão possibilita a utilização de uma vasta quantidade de monômeros, de acordo com as aplicações biomédicas. São demonstrados, dentre suas propriedades, fatores importantes tais como: tamanho, forma, degradação, cinética de liberação, assim como, a funcionalização da superfície pode ser ajustada.

Além disso, a inclusão de marcadores de ressonância magnética e bioativos quimioterápicos, não só hidrofílicas, mas substâncias também de substâncias hidrofóbicas m sido empregadas para tratamento de patologias (LANDFESTER; MAILA, 2013). Com base nessas propriedades, o vigente estudo objetiva a obtenção de formulações com intuito de propiciar liberação sustentada frente aos microorganismos da *candida spp*.

As nanoemulsões com sua capacidade de revestir os fármacos fornecem uma plataforma para proteger contra enzimas hidrolíticas ou pH agressivo e outras condições encontradas na via oral (SINGH et al., 2017). A utilização dessa via, contribui para a absorção mais rápida de fármacos, além de não gerar restrições quanto ao tamanho de partícula.

## **1.1 Bioativos**

### ***1.1.1 Óleo essencial do cravo***

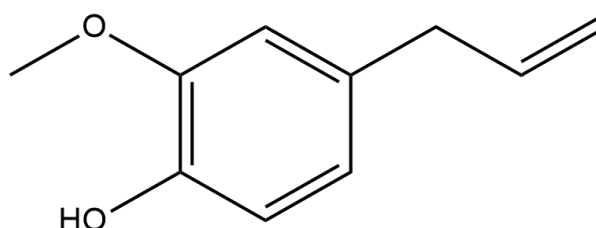
O nome cravo deriva da palavra latina *clavus*, que significa prego, devido a sua aparência física. No inglês o nome *clove* derivou do francês *old clou*, que está relacionado ao verbo unir (função exercida pelo prego). O cravo da Índia pertence à família das mirtáceas (*Myrtaceae*) conhecida cientificamente pelo nome de *Syzygium aromaticum* (MAEDA et al 1990).

O óleo essencial extraído dos botões do cravo é amplamente utilizado, pelo fato de apresentar propriedades medicinais bastante conhecidas como: antibacteriana (MITLE et al, 2006), antifúngica (RAJKOWSKA; KUNICKA-STYCZYŃSKA; MAROSZYŃSKA., 2017), antioxidante (OGATA et al, 2000) e repelente (CHAIEB et al., 2007).

Segundo Simões e colaboradores 2007, os óleos essenciais ou óleos etéreos,

podem ser definidos como misturas complexas de substâncias voláteis lipofílicas, com características odoríferas, sabor acre (ácido) e consistência oleosa. Possuem atividade óptica e índice de refração, sua coloração pode ser levemente amarelada ou até incolor, e quando recém extraídos, podem apresentar uma baixa estabilidade na presença de luz, calor, ar e umidade. Embora seja normalmente uma mistura de vários compostos orgânicos, muitas vezes apresentam um composto majoritário. Para o óleo essencial do cravo em questão o composto majoritário é o 4-alil-2-metoxifenol, cujo nome trivial é eugenol.

Figura 1 – Representação da molécula de Eugenol.



Fonte: Elaborado pelo autor, (2018).

As propriedades terapêuticas desses voláteis em geral, são atribuídas aos compostos majoritários. O eugenol em questão apresenta inúmeras propriedades descritas na literatura, tais como: antiviral (HUSSEIN et al, 2000), antiúlcera (MAGAJI; OKASHA; ABUBAKAR; 2007), antidiabético (SHUKRI; MOHAMED; MUSTAPHA, 2010) , afrodisíaco, antitumoral (ZHENG et al, 1992), anestésico (MARKOWITZ et al, 1992) e anti-inflamatório (DANIEL et al, 2009), inseticida e repelente (VITERI JUMBO et al, 2018) e antimicrobiano (AFFONSO, 2012).

### 1.1.2 Lapachol

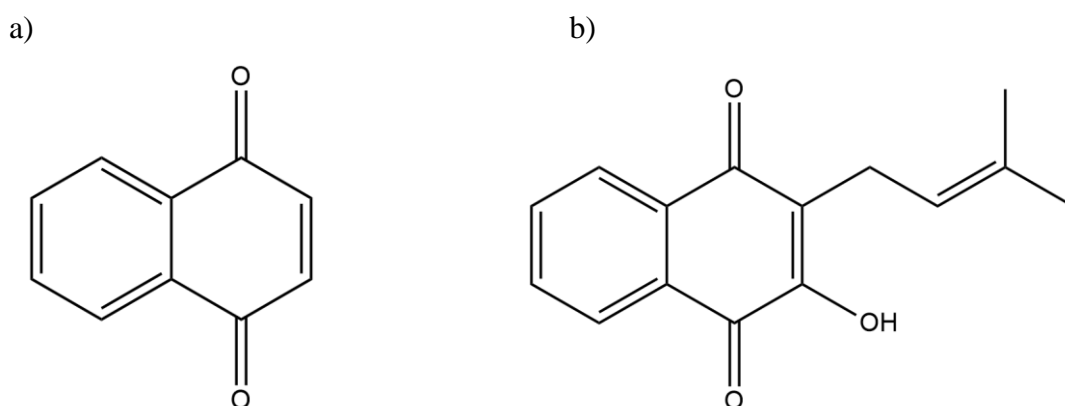
As 1,4-naftoquinonas representam uma grande classe de compostos e são encontradas em uma gama de famílias botânicas, bem como em fungos e bactérias. Exemplos representativos de 1,4-naftoquinonas com ocorrência natural incluem as vitaminas K, juglona (isolado do preto noz, *Juglans nigra* L., Juglandaceae) e plumbagina (obtido de *Plumbago*, *Drosera* e *Nepenthes spp.*). Derivados da naftoquinona apresentam valiosos efeitos farmacológicos, atuando sobretudo como citotóxico e antiviral (OLIVEIRA et al., 2002), antibacteriano, antiprotozoário, inseticida (MARTÍNEZ e BENITO, 2005), antiinflamatório (DE ALMEIDA et al., 1990), e como agentes antipiréticos (EPIFANO et al., 2014).

O (2-hidroxi-3-(3-metilbut-2-enil) naftaleno-1,4-diona), usualmente conhecido



como lapachol, é uma importante naftoquinona natural que pode ser obtida a partir da casca da *Tabebuia avellanedae*, popularmente conhecido como ipê-roxo. O lapachol quando isolado apresenta aspecto cristalino amarelo, com um pKa de 6,15, ponto de fusão na faixa de 141–143 °C. Este composto possui uma baixa solubilidade em água que pode ser influenciada pelo pH, onde a mesma em pH 4,0 é de 1,51 µg/mL, e em pH 10 igual a 5 µg/mL. Os comprimentos de onda com absorção máxima desse bioativo na região do UV podem ser encontrados em 251, 278 e 331 nm (SEGOLONI; DI MARIA, 2018).

Figura 2: Representação estrutural: (a) Naftoquinona e (b) Lapachol.



Fonte: elaborado pelo autor, (2018).

O lapachol tem apresentado várias atividades biológicas que incluem atividades farmacológicas, além de atividades antimicrobiana, antifúngica (PORTILLO et al., 2001), leishmanicida (LIMA et al., 2004), tripanocida, antimalariana, antitumoral (SANTANA e SILVA, 1980), anti-úlceras, além de efeitos contraceptivos e imunossupressores (TABOSA et al., 2018).

## 1.2 Atividade antimicrobiana dos bioativos

Conforme Antunes e colaboradores (2006), o uso constante de antibióticos vem provocando uma série de problemas, dentre os quais se destacam o desequilíbrio microbiológico humano e a resistência, motivando a busca por novos antibióticos que sejam mais eficazes, e conseqüentemente forneçam perspectivas para a evolução das pesquisas (MOLLERING JR, 2000).

Com a perspectiva de encontrar novos fármacos com propriedades antimicrobianas, os produtos naturais ganharam importância nesse tipo de abordagem. As plantas medicinais são potenciais acumuladores de várias moléculas com potencial

antimicrobiano e podem servir como fontes alternativas às terapias antibióticas convencionais (VAZIRIAN et al., 2019).

O óleo essencial do cravo, que tem como principal componente o eugenol, respondendo de 60 a 90% da composição total, é fonte de propriedades antifúngicas, anestésicas e antissépticas. Da mesma forma o lapachol, que exhibe interessantes propriedades antimicrobianas, que tratam doenças atreladas a ação dos microorganismos. (RAVELO; ESTÉVEZ-BRAUN; PÉREZ-SACAU, 2003).

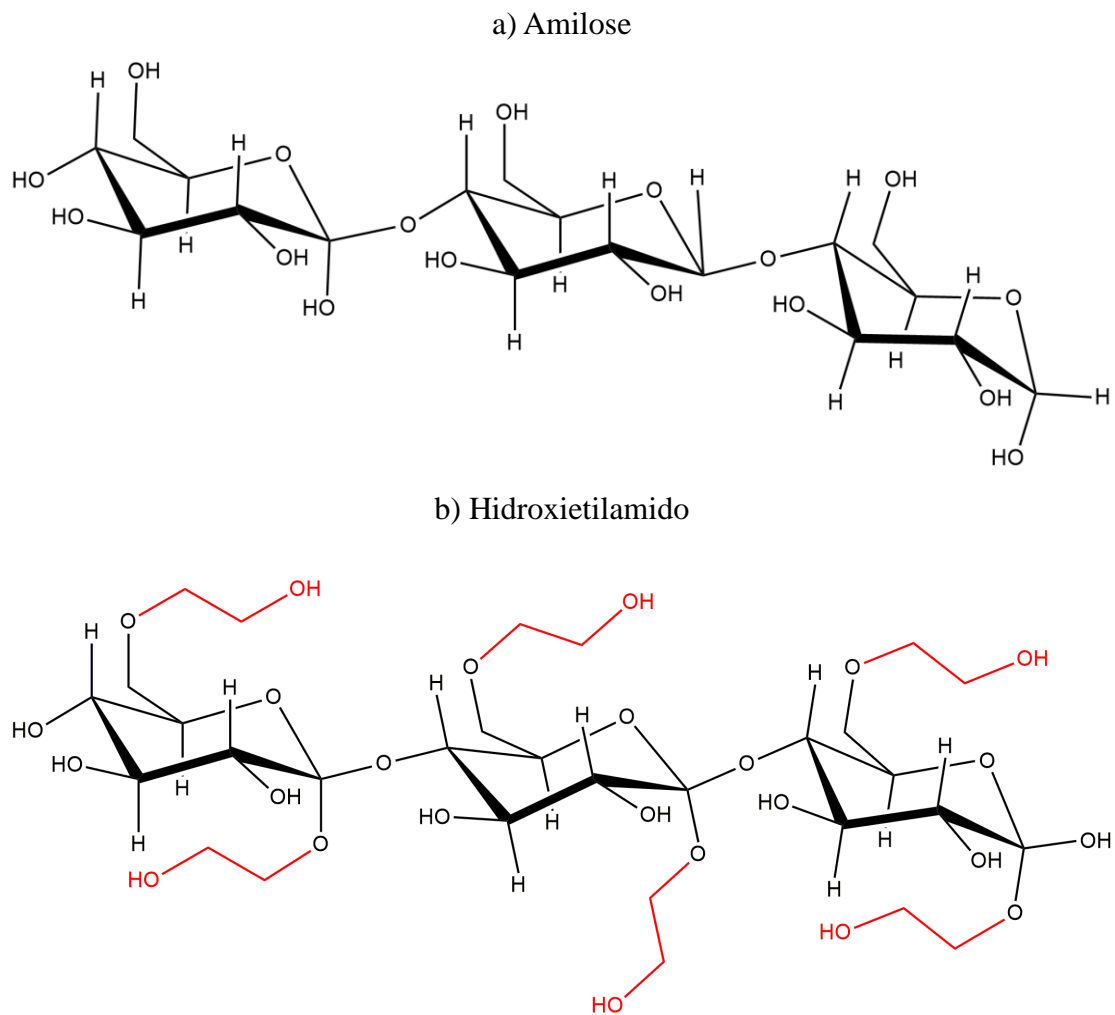
A atividade antifúngica do óleo de cravo, foi avaliada em estudo realizado por Pinto et al, (2009), utilizando cepas de *Candida*, *Aspergillus* e outros gêneros. Os resultados mostraram que o óleo de cravo e o eugenol possuem boa resposta quanto a atividade antifúngica (HUSSAIN et al., 2007). Enquanto que para o lapachol, foi relatado que o mesmo apresenta potencial antifúngico significativo contra *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Cryptococcus neoformans* cuja atividade antifúngica do lapachol é creditada ao processo de interação com a porção polar da bicamada fosfolipídica da membrana celular desses microorganismos (PORTILLO et al., 2001).

### 1.3 Amido

O amido é um polissacarídeo de baixo custo, biodegradável, abundante e renovável, o que torna esse biopolímero um material efetivo para o carreamento de compostos lipofílicos (DAVOODI., KAVOOSI e SHAKERI., 2017). Sendo constituído majoritariamente por amilose e amilopectina, as nanopartículas à base de amido são veículos adequados para sistemas de administração farmacológica devido à sua biocompatibilidade, estabilidade da vida útil, alta capacidade de carga, biodegradabilidade e liberação controlada do medicamento encapsulado (STURESSON e WIKINGSSON, 2000).

Entretanto as modificações físicas e químicas propiciam alterações na estrutura do amido, e em seus propósitos funcionais, para torná-lo mais adequado para aplicações específicas, como a hidroxietilação que é realizada através da reação de amido com óxido de etileno em meio básico (PALEOS; SIDERATOU; TSIOURVAS, 2017). Essa reação garante ao amido uma menor susceptibilidade a degradação enzimática e maior solubilidade em água.

Figura 3 – Estruturas químicas de (a) amilose e (b) hidroxietilamido.



Fonte: (KHLESTKIN; PELTEK; KOLCHANOV, 2018).

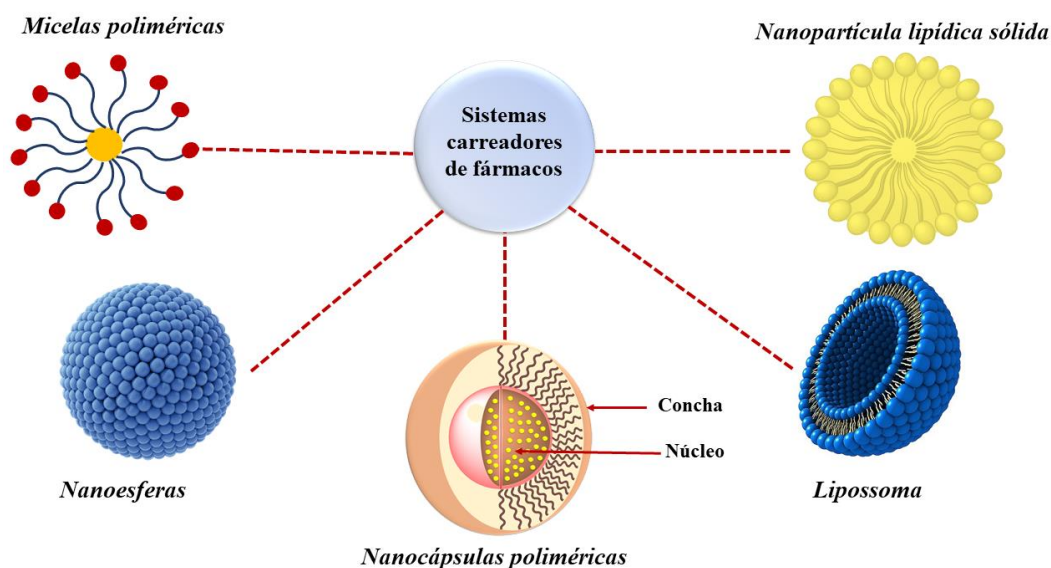
A reticulação do amido é um dos métodos mais comuns de modificação, em que consiste basicamente de uma reação de um agente reticulante com cadeias de polímero, resultando na formação de cadeias químicas intra ou intermoleculares (SHAH; MEWADA e MEHTA, 2016). Durante o processo de reticulação, o reticulante introduz pontes intermoleculares entre camadas de biopolímero, que podem alterar as propriedades de textura geral e a química superficial da estrutura de polímero. Além disso, para melhorar a afinidade dos adsorventes, a funcionalização do polímero de amido reticulado provou ser uma abordagem viável. No entanto, os agentes de reticulação vulgarmente utilizados, com grupos multifuncionais geralmente possuem flexibilidade estrutural atribuída a sua estrutura molecular menos rígida, resultando em polímeros de amido reticulado (CHAI et al 2018).

#### 1.4 Sistemas nanocarreadores de fármacos

Durante anos, os medicamentos são fabricados com o intuito de atender a demanda populacional, além disso, cresce o interesse pela segurança e qualidade dos medicamentos e produtos farmacêuticos, juntamente com a diminuição do custo dos produtos, através da aplicação de métodos de fabricação, baseados no desenvolvimento da pesquisa científica. Além disso, há uma necessidade essencial de aumentar a eficácia de uma droga e simultaneamente diminuir seus efeitos colaterais. Portanto, encontrar um método para potencializar a biodisponibilidade desses medicamentos torna-se necessário (OKSANEN; GARCÍA MUÑOZ, 2010).

O nanocarreamento de fármacos objetiva a adequada administração e entrega de fármacos com eficiência (MUSYANOVYCH et al., 2008). Para alcançar tal objetivo, pesquisadores de diferentes áreas estão desempenhando um papel muito útil no desenvolvimento de sistemas carreadores de drogas. Por exemplo, lipossomas, micelas poliméricas, nanopartículas lipídicas sólidas (NLSs), nanocápsulas, nanosuspensões/nanoemulsões (RANTANEN; KHINAST, 2015). Na Figura 4 são mostrados os principais tipos de carreadores de materiais.

Figura 4 – Esquema de tipos de nanocarreadores de fármacos.



Fonte: Adaptado de RANTANEN; KHINAST., (2015).

Várias nanopartículas têm sido aprovadas pela Food and Drug Administration (FDA) dos EUA para comercialização na indústria farmacêutica (VIEIRA; GAMARRA, 2016). Entre as formulações aprovadas, destacam-se a doxorrubicina lipossômica, o DOXIL<sup>®</sup>, que foi o primeiro medicamento nano tecnológico aprovado pela FDA. Outro exemplo é o

Abraxane®, o paclitaxel, um medicamento quimioterápico, que é eficientemente associado com nanopartículas de albumina (GRADISHAR, 2006).

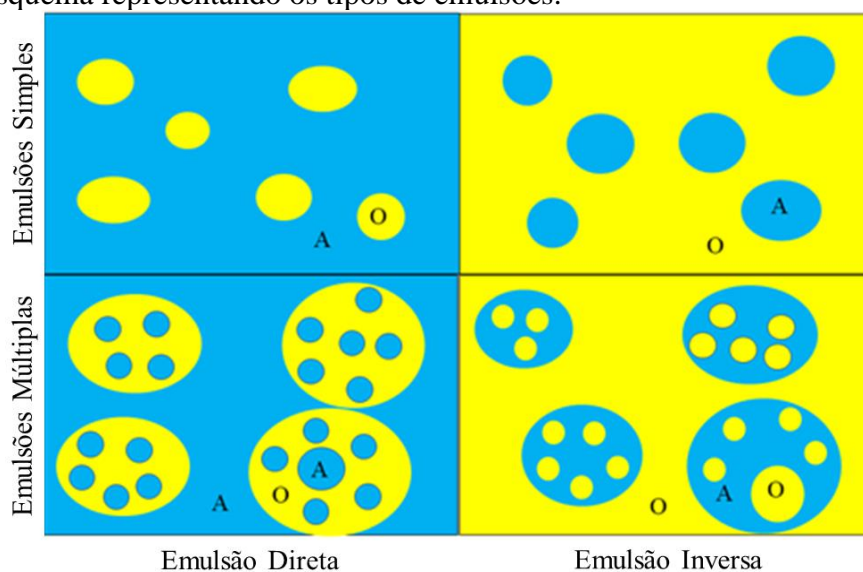
### **1.5 Nanoemulsões múltiplas**

Sistemas nanoemulsionados consistem em misturas de líquidos imiscíveis com o uso de surfactante apropriado, isto é uma espécie de caráter anfifílico que seja capaz de reduzir a tensão superficial das nanogotas formadas, prevenindo que o sistema apresente fenômenos de aglomeração (EL KHAYAT et al., 2018). (O surfactante apropriado é aquele que atinge o equilíbrio hidrofílico-lipofílico requerido pela fase dispersa (em menor volume) da nanoemulsão, assim esse equilíbrio é uma expressão do tamanho e da força das porções hidrofílica e lipofílica do emulsionante. Todos emulsionantes consistem em uma molécula que combina ambos os grupos (SINGH et al., 2017).

Durante a formação das nanoemulsões, a energia livre de Gibbs  $\Delta G$  é positiva, o que confere ao sistema instabilidade termodinamicamente. Por conseguinte, a preparação desses sistemas é classificada como processo não espontâneo, assim, além da utilização de surfactantes, as miniemulsões precisam ser estabilizadas por energia (MCCLEMENTS, 2012).

Nanoemulsões podem ser aplicadas, como líquidos (TAN et al., 2010), cremes (LAXMINARAYAN et al., 2013), sprays, géis (LALA; AWARI, 2014), aerossóis (AMANI et al., 2010), espumas pode ser administrada por vias igualmente variadas como tópica (MOU et al., 2008), oral, intravenosa, intranasal, parental (TAN et al., 2010) e ocular. As nanoemulsões múltiplas são sistemas complexos constituídos de várias fases, onde uma emulsão primária é vertida em outro solvente, hidrofílico ou lipofílico, podendo ser do tipo nanoemulsão múltipla direta (A/O/A) ou inversa (O/A/O), como exemplificadas na Figura 5. (BOUYER,2012).

Figura 5 – Esquema representando os tipos de emulsões.

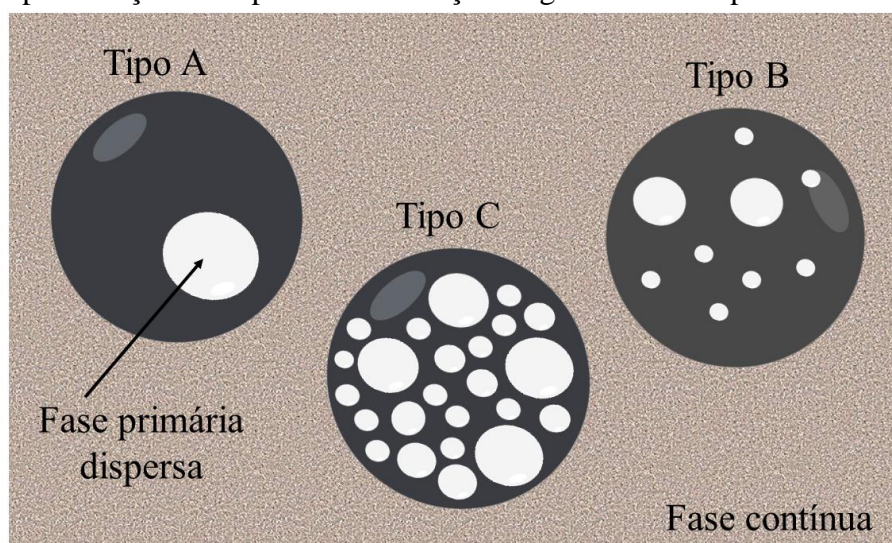


Fonte: Adaptado de BOUYER., (2012).

O método de duas etapas consiste na re-emulsificação de uma emulsão primária em outra fase DEVANI, ASHFORD E CRAIG, (2005), (Figura 5). Nanomulsões múltiplas de óleo-em-água-em-óleo (O1/A/O2) são novos sistemas de entrega onde a fase de óleo interna (O1), está dispersa em uma fase aquosa (A), que é distribuída dentro de uma fase contínua de óleo externa (O2) em um único sistema, tornando-se assim bastante eficaz para transporte, proteção e aumento da biodisponibilidade de ativos de caráter lipofílico (HWANG et al 2017).

Emulsões múltiplas podem apresentar glóbulos com uma ou mais gotículas com tamanhos inferiores em seu núcleo, conforme apresentado na Figura 6. Deste modo, o tamanho de um glóbulo de emulsão múltipla é significativamente maior do que o tamanho das gotículas internas, especialmente quando há um número de gotículas internas superiores a um. As emulsões múltiplas são frequentemente classificadas em três grupos, dependendo do número de gotículas internas presentes nos glóbulos (GARTI e BENICHOU, 2001). A emulsão múltipla do tipo A é observada quando o glóbulo de emulsão múltipla consiste apenas em uma grande gota interna, que é o glóbulo de emulsão múltipla do tipo "core-shell". Verifica-se a ocorrência da emulsão múltipla do tipo b, na qual apresenta o glóbulo com várias pequenas gotículas internas; e para a emulsão múltipla de tipo C, o glóbulo de emulsão múltipla consiste em uma maior quantidade de gotículas internas e polidispersas.

Figura 6 - Representação dos tipos de distribuição de gotas em múltiplas emulsões.



Fonte: Adaptado de GARTI e BENICHOU, (2001).

### 1.6 Síntese *via* miniemulsão

O processo de miniemulsão é uma ferramenta versátil para a formação de nanopartículas e nanocápsulas poliméricas. Em contraste a outras abordagens utilizadas para a formação de nanopartículas (por exemplo, como polimerização em emulsão, polimerização em microemulsão e formação de camada por camada), uma variedade de tipos de polimerização: polimerização enzimática radicalar, aniônica, catiônica, poliadição e policondensação podem ser utilizados no processo de miniemulsão. O processo permite perfeitamente o encapsulamento de compostos hidrofílicos ou hidrofóbicos, sejam eles líquidos ou sólidos em cascas poliméricas (MUSYANOVYCH et al., 2008).

A adição de reticulantes como o tolueno diisocianato ou diisotiocianato na fase contínua, juntamente com os monômeros adequados, permitem que as reações de poliadição, possam ocorrer na interface das gotículas. A espessura da parede da cápsula pode ser ajustada diretamente pela quantidade dos reagentes. A natureza dos monômeros e a fase contínua são os fatores críticos para a formação das cápsulas (LANDFESTER; MAILA, 2013).

O nanocarreador resultante desta síntese é capaz de potencializar a biodisponibilidade dos fármacos otimizada em termos de composição química, morfologia da superfície, tamanho, forma e perfil de liberação sustentada, sendo que este possui dependência da distribuição inicial do tamanho das nanocápsulas (STEINMACHER et al., 2017). Sistemas nanocarreadores de ativos a partir de hidroxietilamido, foram utilizados em diversas aplicações como em trabalho publicado por Kang et al., (2015), no qual as

nanocápsulas foram utilizadas como uma plataforma modular para o direcionamento específico de fármaco em células. Entretanto, essa estratégia foi apenas utilizada com fármacos de caráter hidrofílico, sendo um desafio a sua aplicação para o encapsulamento de fármacos de natureza lipofílica, denotando o caráter inovador do trabalho, bem como a necessidade de ampliar pesquisas com encapsulamento de ativos hidrofóbicos, utilizando nanocarreadores biocompatíveis.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Sintetizar nanocápsulas de hidroximetilamido através do processo de múltipla nanoemulsão, para encapsular o óleo essencial do cravo e lapachol

### 2.2 Objetivos específicos

- Extrair o óleo essencial a partir dos botões florais do cravo;
- Caracterizar o óleo essencial;
- Caracterizar o lapachol;
- Preparar nanoemulsões primárias estáveis;
- Sintetizar nanocápsulas de hidroxietilamido a partir das nanoemulsões primárias;
- Caracterizar as nanocápsulas sintetizadas;
- Determinar a eficiência de encapsulação (%EE) do óleo essencial do cravo e do lapachol, além da taxa de carregamento dos ativos nas cápsulas;
- Realizar ensaios de liberação *in vitro*;
- Determinar a concentração mínima inibitória do sistema frente aos microorganismos *C. parapsilosis* ATCC® 22019, *C. krusei* ATCC® 6258.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Materiais

Ácido oleico e hidroxietilamido e o agente reticulante 2,4-diisocianato-1-metilbenzeno (TDI,  $174,2 \text{ g.mol}^{-1}$ ) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (CAS 112-80-1, 65-88% GC, e CAS 9005-27-0, respectivamente), Dodecil sulfato de sódio (SDS) foi obtido da Fluka, ciclohexano (>99,9%, Vetec). O bioativo OEC foi extraído de cravos obtidos em mercado público na cidade de Fortaleza-CE. O lapachol foi cedido pelo PADETEC-UFC. O polirricinoleato de poliglicerol (PGPR) foi adquirido da empresa Danisco®. O Brij 78 e o Brij 700, foram cedidos pela Universidade de Manchester. Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico. As análises de atividade antifúngica frente aos micro-organismos ATCC® *C. parapsilosis* 22019 e ATCC® *C. krusei* 6258, foram realizadas em parceria com o Laboratório de Bioprospeção de Moléculas Antimicrobianas (LABIMAN).

#### 3.2. Métodos

##### 3.2.1. Extração de óleo essencial do cravo (OEC)

470 gramas dos botões de cravo foram triturados, colocados em um balão de fundo redondo de 5 L com 2,5 L de água destilada, e extraídos por hidrodestilação, utilizando um doseador do tipo Clevenger, durante um período de 2 horas e 30 minutos.

Figura 7 – Sistema de Hidrodestilação.



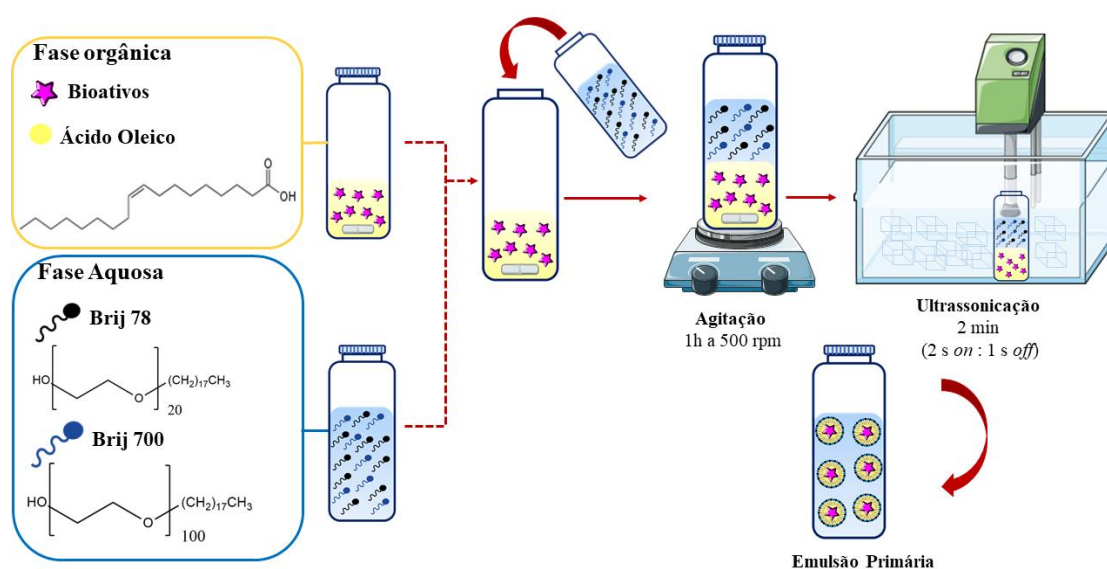
Fonte: Elaborado pelo autor, (2018).

Em seguida, o hidrolato foi recolhido e posteriormente extraído com clorofórmio PA na proporção de 100 mL de hidrolato para 50 mL de clorofórmio, em um funil de separação. A fração clorofórmica, foi tratada com sulfato de sódio anidro, concentrado em evaporador rotatório.

### 3.2.2. Obtenção das nanoemulsões primárias

A preparação das nanoemulsões primárias segue metodologia adaptada de Hosseini et al., (2013), como apresentado na Figura 8. A fase aquosa (FA) foi composta de 9 g de água destilada e a massa de surfactante variando de 25 a 100 mg de uma mistura de Brij 78 e Brij 700. As massas de cada surfactante foram calculadas com o intuito de se obter um valor de equilíbrio hidrofílico lipofílico (EHL) resultante igual a 17, valor requerido pelo ácido oleico. Os valores de EHL dos Brij 78 e Brij 700 são respectivamente 15 e 18. A partir destes valores, foram encontradas as seguintes proporções de Brij 78 e Brij 700: 51,4% e 48,6% em massa dos dois surfactantes respectivamente em fase aquosa. A fase oleosa (FO) é composta de 1 g de ácido oleico e 30 mg do óleo essencial do cravo ou 10 mg do lapachol, em seguida verte-se a fase aquosa sobre a fase orgânica, onde a emulsão é levada para uma pré-homogeneização por 1 h, posteriormente as emulsões são levadas para o ultrassom de sonda utilizando-se de banho de gelo e com regime de pulso de 2 segundos *on* e 1 segundo *off* durante 2 min e amplitude 70%. As nanoemulsões sintetizadas estão representadas na Tabela 1

Figura 8 – Preparação da nanoemulsão primária



Fonte: Elaborado pelo autor, (2019)

Tabela 1 – Denotação dos sistemas nanoemulsionados primários de acordo com sua

composição em percentagem e/ou massa.

<b>Emulsão primária</b>	<b>Fase Orgânica<sup>a</sup> (%)</b>	<b>Surfactante<sup>b</sup> (mg)</b>	<b>Bioativo (mg)</b>
B <sup>b</sup> -5 <sup>a</sup> I <sup>c</sup>	10	50	--
B <sup>b</sup> -7,5 <sup>a</sup> I <sup>c</sup>	10	75	--
B <sup>b</sup> -10 <sup>a</sup> I <sup>c</sup>	10	100	--
O <sup>b</sup> -5 <sup>a</sup> I <sup>c</sup>	10	50	
O <sup>b</sup> -7,5 <sup>a</sup> I <sup>c</sup>	10	75	30
O <sup>b</sup> -10 <sup>a</sup> I <sup>c</sup>	10	100	
B <sup>b</sup> -5 <sup>a</sup> II <sup>c</sup>	5	25	
O <sup>b</sup> -5 <sup>a</sup> II <sup>c</sup>	5	25	10
O <sup>b</sup> -10 <sup>a</sup> II <sup>c</sup>	5	50	

<sup>a</sup> Os valores 5, 7,5 e 10 expressam percentagem de surfactante em relação a massa da Fase orgânica.

<sup>b</sup> B e O, são siglas que significam amostra branco, não contém bioativo, e amostra com Óleo essencial do cravo respectivamente.

<sup>c</sup> I e II, significam amostras com 10% de fase orgânica e 5% de fase orgânica respectivamente.

Fonte: Elaborado pelo autor, (2018).

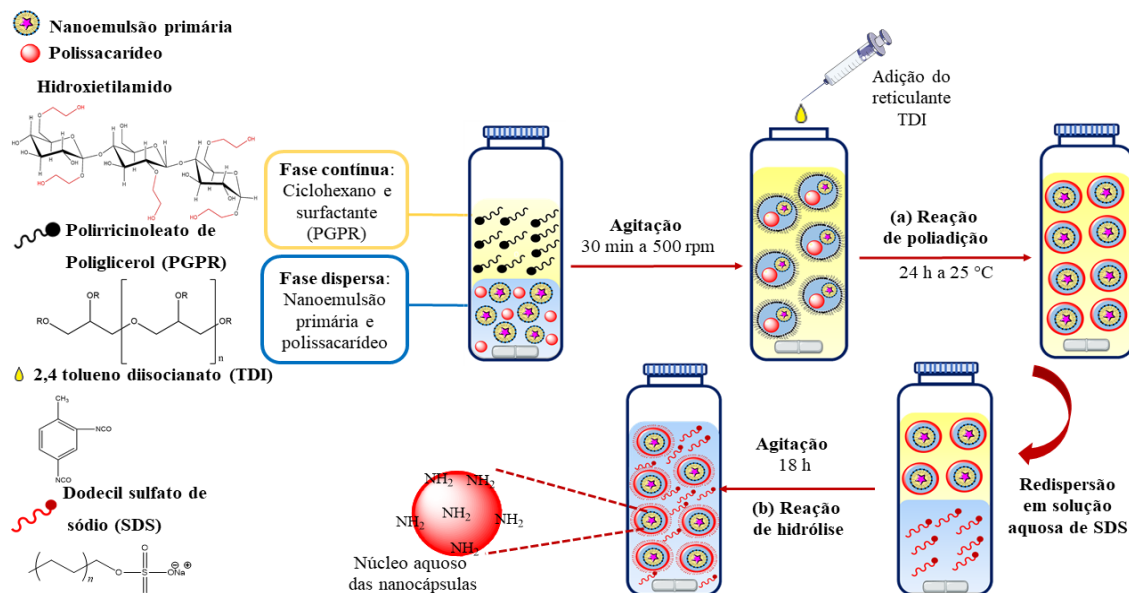
Após a preparação das nanoemulsões primárias, as mesmas foram submetidas as análises de tamanho de partícula e potencial zeta, como forma de avaliar qual das formulações da Tabela 6, apresenta as melhores condições para ser utilizada na síntese das nanocápsulas.

### **3.2.3. Preparação das nanocápsulas via nanoemulsão inversa múltipla**

Com base na síntese das cápsulas de hidroxietilamido (HEA), procedimento já estabelecido na literatura Kang et al., (2015), a síntese de nanocápsulas de hidroxietilamido, foi realizada seguindo o método de dupla nanoemulsão inversa, representada na Figura 9. Inicialmente retira-se uma alíquota de 1,3 g da nanoemulsão primária, nos quais foram adicionadas 65 mg de hidroxietilamido, com posterior adição de 63,2 mg de surfactante Brij, nas proporções citadas na preparação de nanoemulsão primária. A fase orgânica contém 14,5 g de ciclohexano e 94,8 mg de PGPR (poliricinoleato de poliglicerol), formando nanogotas sob irradiação de ultrassom, estabilizadas pelo o tensoativo PGPR. O reticulante foi utilizado na reação de poliadição na interface da gota, no caso o tolueno diisocianato (TDI). O TDI foi adicionado lentamente na miniemulsão, a reação de reticulação que se deu pela adição do reticulante às cadeias de hidroxietilamido, formando uma cápsula de polissacarídeo.

Posteriormente as nanocápsulas sintetizadas foram redispersas em uma solução 0,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS).

Figura 9 – Representação esquemática da síntese das nanocápsulas.



Fonte: Elaborado pelo autor, (2019)

Após o processo de otimização das condições para obtenção das formulações, as nanocápsulas com óleo essencial do cravo encapsulado e lapachol encapsulados foram sintetizadas e caracterizadas por tamanho de partícula, índice de polidispersividade e potencial zeta pelas técnicas de Espalhamento de Luz Dinâmica (DLS); Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR); Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV); além disso foi determinado: teor de sólidos (%TS), eficiência de encapsulamento (% EE), estudo da cinética de liberação do fármaco e atividade antifúngica.

### 3.3. Caracterização

#### 3.3.1 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectro de Massa (CG-EM)

As análises dos compostos voláteis extraídos por MEFS foram realizadas em um equipamento CG Shimadzu QP2010 equipado com detector seletivo de massas, utilizando coluna DB-5 de 0,40  $\mu\text{m}$  de espessura, 0,18 mm de diâmetro e 20 m de comprimento (J&W Scientific®). A temperatura do injetor foi de 250 °C e a temperatura da interface de fonte de íons de 300 °C. O modo de injeção foi *split* (1:10), o gás de arraste foi hélio com vazão na coluna de 0,59 mL/min. As análises foram realizadas no modo *SCAN* em uma faixa de 18 a

400 m/z (em intervalos de 0,5 s e com energia de ionização de 70 eV) e com a temperatura do injetor de 250 °C. A mistura de hidrocarbonetos lineares padrão Sigma-Aldrich® (C7-C30) também foi analisada nas mesmas condições. (CAMELO, 2014).

### **3.3.2. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR)**

Para obter os espectros das amostras, as mesmas foram maceradas em um almofariz de ágata e prensadas em pastilhas de brometo de potássio (KBr) sob pressão de 8 t para composição da pastilha. Após a prensagem os espectros foram registrados no intervalo de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  em uma resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ . A análise foi realizada em um equipamento Perkin Elmer, modelo 16 PC, no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC.

### **3.3.3. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , foram obtidos num equipamento Bruker Avance-DRX 500, equipado com uma sonda de detecção inversa, operando em 500,6 MHz ( $^1\text{H}$ ) e 175,5 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), numa janela espectral de 20 ppm. As amostras foram solubilizadas em  $\text{CDCl}_3$ . Os resultados obtidos das análises foram expressos em função do deslocamento químico das amostras ( $\delta$ ) em ppm.

### **3.3.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

Com o intuito de verificar a pureza do lapachol utilizado, realizou-se a análise do mesmo pela técnica CLAE. A escolha da fase móvel foi realizada através da mistura binária de solventes constituídos por metanol e solução aquosa de ácido acético a 5%, partindo-se da proporção 95:5 até 70:30, observando o cromatograma quanto ao perfil cromatográfico e resolução entre o pico do lapachol fixando-se o fluxo em 1mL/min. Foi selecionado, em termos de sensibilidade e repetibilidade, o melhor comprimento de onda a ser utilizado na detecção do lapachol, dentre os comprimentos de 251, 278 e 331 nm citados na literatura (FONSECA et al., 2004) .

### **3.3.5 Tamanho de partícula e índice de polidispersividade**

A análise foi realizada utilizando um Zetasizer Nano ZS90 (Malvern®). As amostras foram diluídas em água deionizada na proporção (1:1000) (NCSDS:H<sub>2</sub>O) (v/v) e analisadas a um ângulo fixo de 90° e a 25 °C. O tamanho médio e a distribuição de tamanho, o índice de polidispersividade das nanocápsulas foram expressos como média de cinco determinações.

### 3.3.6 Potencial zeta

A carga de superfície das amostras foi avaliada através da determinação de potencial zeta utilizando um Zetasizer HSA 3000 (Malvern®). As análises foram realizadas diluindo as dispersões das nanocápsulas em água deionizada na proporção (1:1000) (NCSDS:H<sub>2</sub>O)(v/v) e os resultados foram expressos como médias de cinco determinações.

### 3.3.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As imagens microscópicas, bem como dados sobre a composição química das amostras, foram analisadas por meio de um Quanta 650 FEG ESEM (FEI *Company*) equipado com energia dispersiva de raios-X (EDX). As amostras foram diluídas em ciclohexano na proporção (1:1000) (NC:Ciclohexano) (v/v), depositada sobre um substrato de silício e secas.

### 3.3.8 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A morfologia das nanocápsulas foi observada utilizando um microscópio eletrônico modelo Hitachi HT7700 (Hitachi *Company*, Tóquio, Japão) pertencente ao *Centro para el Desarrollo de la Nanociencia y la Nanotecnología* (CEDENNA) da *Universidad de Santiago de Chile* (USACH). As amostras foram preparadas, diluindo-se as nanocápsulas dispersas em ciclohexano até cerca de 0,01% de conteúdo sólido, então 50µl da amostra foi colocada em uma rede de cobre revestida de carbono de 300 *mesh* e deixou-se secar o solvente à temperatura ambiente (BARBOSA et al., 2018).

## 3.4 Teor de sólidos

Essa análise foi feita para mostrar a concentração das cápsulas presentes em g/g de solução, calculada a partir da Equação 1. Pesou-se um Eppendorf® vazio (m<sub>1</sub>), em seguida, adicionou-se 300 µL da solução, e pesou-se novamente (m<sub>2</sub>), em seguida a amostra foi congelada e liofilizada, e pesada novamente (m<sub>3</sub>).

$$\text{Equação 1} \rightarrow \% TS = \frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1} * 100\%$$

## 3.5. Eficiência de encapsulamento e capacidade de carregamento dos ativos

Primeiramente foi realizada uma varredura no UV/Vis para se encontrar os comprimentos de onda onde os ativos apresentam máximo valor de absorbância.

Posteriormente, uma curva de calibração foi determinada para cada ativo, para a realização do cálculo da eficiência de encapsulamento (EE%) utilizando a Equação 1.

$$\text{Equação 2} \rightarrow \text{EE\%} = \frac{[\text{Lapachol inc}] - [\text{Lapachol sob}]}{[\text{Lapachol inc}]} \times 100\%$$

Onde *lapachol inc* é a quantidade de fármaco inicial e *lapachol sob* é a quantidade de fármaco no sobrenadante.

Para a capacidade de carregamento do ativo o cálculo foi realizado utilizando a seguinte expressão:

$$\text{Equação 3} \rightarrow \text{CC\%} = \frac{\text{Massa de Lapachol encapsulado (g)}}{\text{Massa de Hidroxietilamido (g)}} \times 100\%$$

As mesmas equações foram utilizadas para o cálculo de EE% e capacidade de carregamento do ativo OEC.

### 3.6. Ensaio de difusão

Para esse teste, com base em metodologia adaptada da Farmacopéia Brasileira (2010), foi preparado tampão fosfato pH 7,3 através da dissolução de 20,8 g de fosfato de sódio dibásico hepta-hidratado e 3,08 g de fosfato de sódio monobásico monoidratado em 900 mL de água, e pH ajustado em  $7,3 \pm 0,1$  com ácido fosfórico ou hidróxido de sódio, depois acrescentou-se 100 mL de etanol. Em seguida, 2 mL da amostra foram adicionados ao compartimento doador e 50 mL da solução tampão foram adicionados ao compartimento receptor. A uma temperatura de 37 °C, o ensaio de difusão ocorreu utilizando uma membrana de celulose com porosidade de 12 kDa, que foi utilizada como divisória entre os dois compartimentos, a mesma foi previamente ativada durante período de 30 min com mesmas condições de solução receptora e temperatura. Os sistemas foram devidamente fechados com o intuito de evitar a volatilização do etanol. Os intervalos a serem utilizados na análise foram: 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 7 h, 8 h, 24 h, 25 h, 48 h, 49 h.

Os resultados provenientes da análise foram expostos em função da massa percentual de bioativo liberado e do tempo decorrido da difusão do mesmo. Os modelos cinéticos foram usados para descrever o mecanismo de difusão, utilizando-se dos valores de coeficiente de correlação, com o intuito de mostrar qual modelo cinético descreve mais adequadamente o processo de difusão. Para realização dos cálculos foram utilizados os



seguintes modelos:

- (1) Zero Ordem  $C_t = C_o + K_{dt}$
- (2) Primeira Ordem  $\ln C_t/C_o = - K_{dt}$
- (3) Higuchi  $C_t = K_{dt} + t^{0.5}$
- (4) Peppas  $C_t/C_o = K \times t^n$

Todos os cálculos foram realizados de acordo com as equações cinéticas anteriormente descritas. Utilizou-se o software (*Origin pro 8*) para a submissão dos resultados obtidos da liberação aos modelos cinéticos e posterior obtenção dos respectivos coeficientes de correlação  $R^2$ .

### 3.7. Teste de atividade antifúngica

Foi utilizado a técnica de microdiluição em caldo de acordo com o documento M27-A3 (CLSI, 2008), utilizando o meio de cultura RPMI 1640 (pH  $7,0 \pm 0,1$ ) tamponado com 0,165 M do ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS) (Sigma, EUA).

Os compostos foram testados no intervalo de concentração de 0,78 -201 ppm para NC- OEC e 0,39 – 100% para NC – Controle.

A partir de um cultivo de 24 h das leveduras a serem testadas, realizado em ágar Sabouraud dextrose, foi preparada uma suspensão de inóculo inicial de acordo com a escala 0,5 McFarland. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas em meio RPMI 1640 para obtenção de inóculo final contendo 0,5 a  $2,5 \times 10^3$  UFC/mL. As microplacas foram incubadas por 24 h a uma temperatura de 35 °C ( $\pm 2$  °C). As leituras foram realizadas visualmente.

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada como a menor concentração da droga capaz de inibir 50% do crescimento do microrganismo, em comparação com o verificado no poço controle contendo somente o meio de cultura e o inóculo padronizado (CLSI, 2008). Os testes foram realizados em triplicata.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização do óleo essencial do cravo

#### 4.1.1 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG-EM)

Com base no óleo essencial de cravo extraído, calculou-se o seu rendimento. Pela massa de óleo verificou-se que o rendimento da extração, foi de 3.57%. Posteriormente realizou-se a análise cromatográfica do óleo, onde foi possível constatar que o mesmo apresenta em sua constituição uma quantidade total de 23 compostos. Todavia ao expressar os resultados coloca-se uma tabela com os constituintes em maior quantidade encontrados na amostra. Os mesmos representam 92,4% da composição do óleo, como podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2 - Composição química do óleo essencial da espécie *Syzygium aromaticum*.

Tempo de Retenção	Nome	Fórmula Molecular	Area%
3.311	Isobutirato de Metila	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	1,05
22.898	Eugenol	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	53,08
24.715	β-Cariofileno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	33,80
25.661	α- Cariofileno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	3,12
27.973	Acetato de Eugenila	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	1,35
Total			92,4%

Fonte: Elaborado pelo autor, (2018).

Ao analisar-se a Tabela 2 é possível inferir que o eugenol é o composto majoritário do óleo, com 53% de presença no mesmo, posteriormente o β-cariofileno com 33% presentes no óleo do cravo. Deve-se destacar ainda a incidência do α- cariofileno com 3%, sendo que os outros dezoito compostos somados apresentaram 7,6% da composição total do óleo. Os percentuais gerados pelo cromatograma dos compostos estão em consonância com dados reportados por Plata-Rueda et al., (2018), que analisou óleo de cravo com origem em Minas Gerais, cujo perfil cromatográfico mostrou o eugenol com 27,1%, β-cariofileno 24,5% e o α- cariofileno 10,8%, demonstrando deste modo similaridade com o perfil supracitado, no que tange o fato de eugenol e β-cariofileno serem reportados como compostos majoritários.

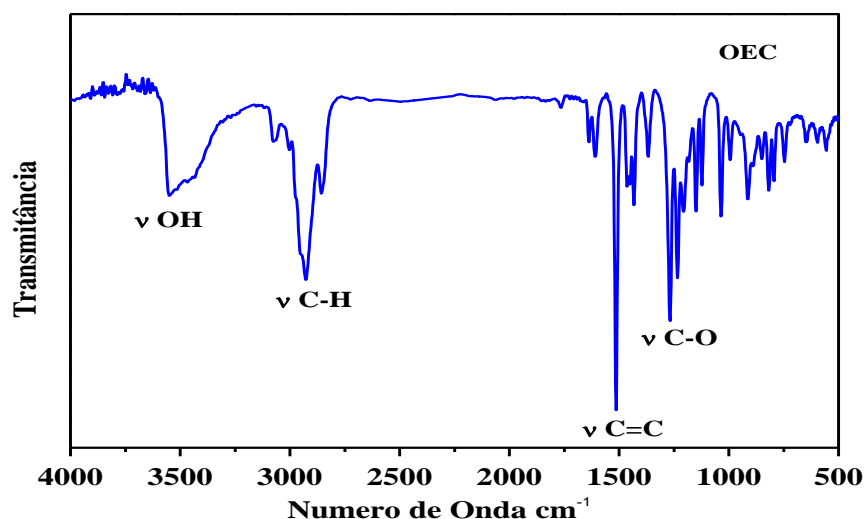
Todavia as diferenças nos percentuais de composição do óleo podem ser

atribuídas as diferentes origens dos cravos obtidos, sendo este comportamento amplamente relatado em trabalhos como de Wan et al., (2019), que relatou a presença de 34,42% de eugenol, no óleo de cravo utilizado no estudo supracitado.

#### 4.1.2 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR)

O espectro na região de infravermelho para o óleo essencial, mostrou bandas de absorção intensas na região de  $1267\text{ cm}^{-1}$   $1514\text{ cm}^{-1}$  e  $3550\text{ cm}^{-1}$  relacionadas ao estiramento assimétrico C-O de éter aromático, ao estiramento C=C de aromáticos e ao estiramento assimétrico da ligação O-H respectivamente. estas bandas também foram encontradas em estudos realizados por Pereira; Maia., (2007), que analisou propriedades químicas e biológicas do óleo de cravo.

Figura 10 – Espectro obtido do óleo essencial do cravo através de FT-IR.



Fonte: Elaborado pelo autor, (2018).

As atribuições das demais bandas na região do infravermelho, bem como as suas respectivas regiões foram dispostas na Tabela 3.

Tabela 3 - Atribuições das bandas do espectro na região do Infravermelho para o óleo de cravo.

Número de Onda $\text{cm}^{-1}$	Atribuições
1063	$\nu_{\text{ass}}$ C-O de éter aromático
1234	$\nu$ C-O de Fenol
1267	$\nu_{\text{ass}}$ C-O de éter aromático

1431	v C-C do grupo fenila
1514	v C=C de aromáticos
1609	v <sub>ass</sub> C=C de aromáticos
2926	v C-H de carbonos alifáticos
3550	v <sub>ass</sub> O-H

Fonte: (LAMPMAN et al., 1973).

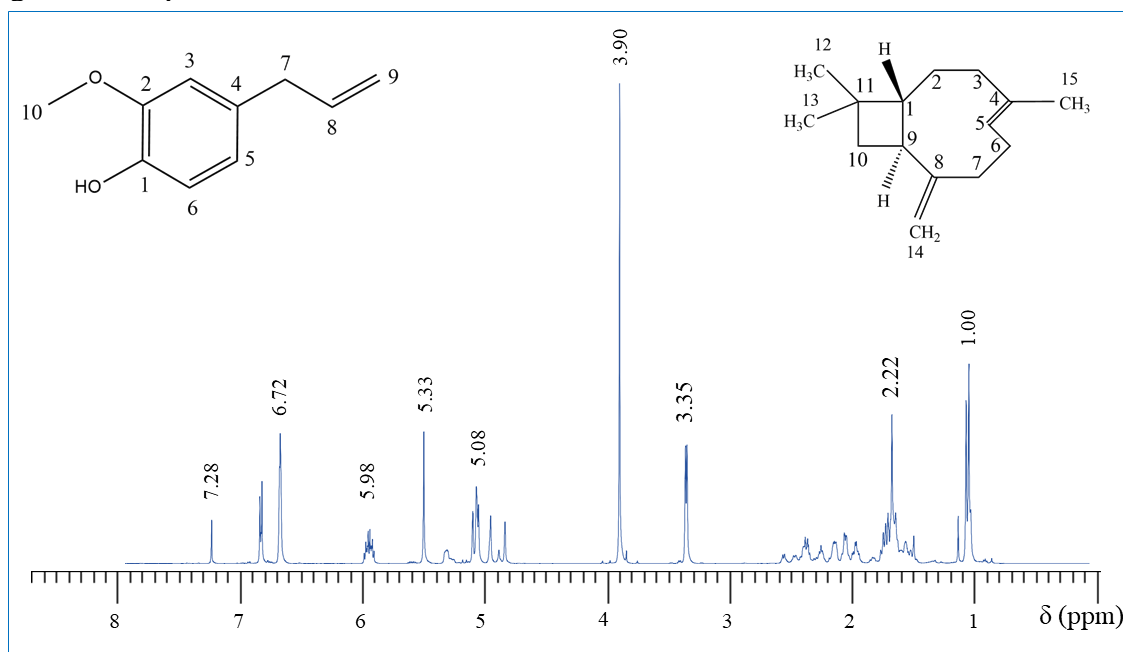
As regiões mencionadas na Tabela 3 e as respectivas atribuições encontradas estão corroborando com bandas encontradas em trabalho descrito por González-Rivera et al., (2016), que realizou estudos de extração de óleos essenciais, dentre eles o óleo de cravo. As bandas relacionadas foram indicadas como sendo oriundas do eugenol, composto majoritário.

#### **4.1.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**

##### *4.1.3.1 RMN <sup>1</sup>H do óleo essencial do cravo*

A técnica de RMN de <sup>1</sup>H, objetiva através da análise de spins de <sup>1</sup>H, visualizar a partir do espectro obtido, sinais característicos que possam subsidiar uma investigação mais consistente sobre os constituintes majoritários presentes no óleo de cravo. A elucidação realizada para este bioativo, foi idealizada levando-se em conta as estruturas químicas dos compostos majoritários, sobretudo o Eugenol e o β-cariofileno, como mostrados na técnica de CG-EM. A partir destes compostos químicos obteve-se um espectro de RMN como o observado na Figura 11.

Figura 11 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do óleo essencial do cravo.



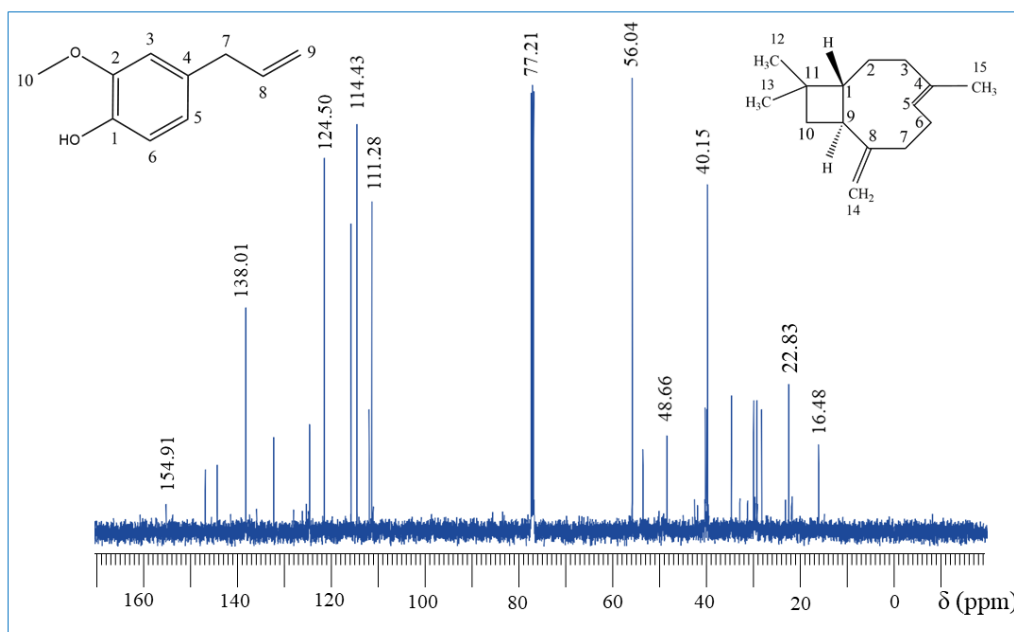
Fonte: Elaborado pelo autor, (2018)

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  do OEC mostrou dois singletos em  $\delta$  1,00 referente aos hidrogênios dos carbonos metílicos ligados a (C11) do  $\beta$ -cariofileno, outro sinal encontrado em  $\delta$  2,22 foi atribuído aos hidrogênios do grupo metila ligado ao (C4) do mesmo composto. Para a molécula de eugenol foram encontrados sinais em  $\delta$  3,90 referentes a metoxila. O multipletto em  $\delta$  5,09, foi atribuído aos hidrogênios olefílicos ligados ao C9 (ddt), e o sinal em  $\delta$  6,72 refere-se aos hidrogênios ligados a (C3) e (C5) do eugenol. O singletto em  $\delta$  5,33 refere-se ao hidrogênio da hidroxila. O dupletto em  $\delta$  3,35 pode ser inferido aos hidrogênios metilênicos ligados ao (C7). Os sinais encontrados para o  $\beta$ -cariofileno estão em consonância com os encontrados por Dahham et al., (2016), em estudos de avaliação da atividade antiinflamatória do composto em questão. Os valores obtidos para o eugenol e o  $\beta$ -cariofileno a partir do espectro concordam com os encontrados por Freitas e colaboradores., (2018) em análises realizadas de diferentes óleos essenciais das espécies do tipo *Ocimum gratissimum*.

#### 4.1.3.2 RMN $^{13}\text{C}$ do óleo essencial do cravo

A Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 visa identificar através de valores específicos de deslocamento químico sinais característicos, que possibilitem esclarecer os compostos que podem estar presentes no OEC, sendo, portanto, utilizada adicionalmente ao RMN  $^1\text{H}$ . A análise realizada foi feita com intervalo de deslocamento entre 20 e 160 ppm, como mostrado na Figura 12.

Figura 12- Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do óleo essencial do cravo.



Fonte: Elaborado pelo autor, (2018).

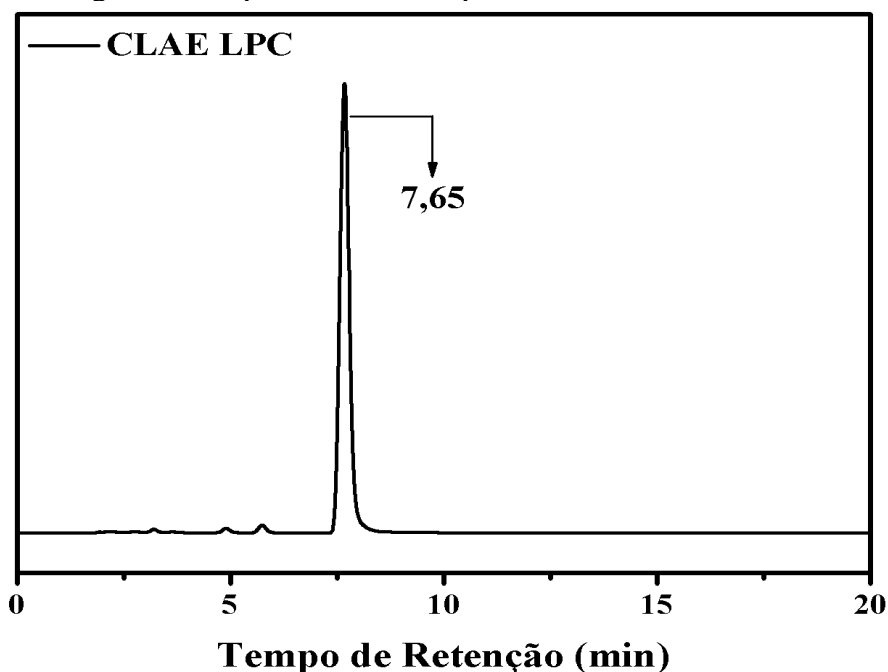
A análise do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de OEC (Figura 12), apresentou sinais característicos do composto. O  $\beta$ -cariofileno foi identificado no óleo a partir dos sinais em  $\delta$  16,48 refere-se ao carbono metílico ligado ao C4 do, e em  $\delta$  154,91 esse sinal refere-se ao C8 da dupla ligação do mesmo composto. Os sinais referentes ao  $\beta$ -cariofileno encontrados neste trabalho, coadunam com os que foram encontrados por Al-Burtamani e colaboradores (2005), através de estudos realizados sobre a composição química do óleo essencial da espécie *Haplophyllum tuberculatum*. O Eugenol, foi identificado através dos sinais em  $\delta$  56,04 (C10), em  $\delta$  40,15 (C7), na região de  $\delta$  138,01 (C8),  $\delta$  114,43 (C6), na região de  $\delta$  111,28 (C3) e em  $\delta$  124,50 ao (C5). Os resultados encontrados para os sinais referentes ao eugenol, estão condizentes com os encontrados por Farag e colaboradores., (2018), em análises de metabólitos feitas com dez espécies de canela.

## 4.2. Caracterizações do Lapachol

### 4.2.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Esta técnica foi utilizada com intuito de analisar o grau de pureza do lapachol, onde os picos foram identificados de acordo com trabalho de Fonseca et al., (2004) levando-se em consideração o tempo de retenção obtido. Posteriormente foi calculado a área dos perfis analisados. O cromatograma da Figura 13, demonstra o perfil da composição do bioativo.

Figura 13- Cromatograma do lapachol realizado pela técnica CLAE.



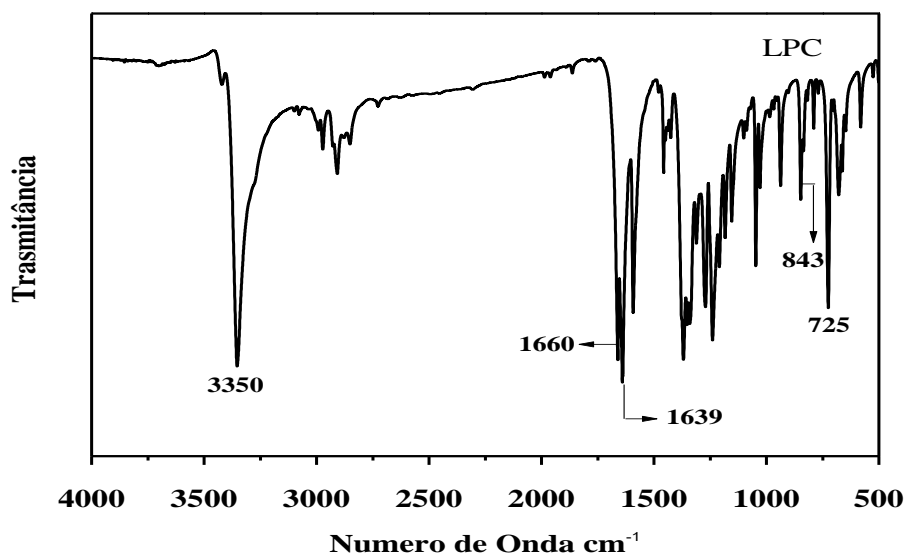
Fonte: Elaborado pelo autor, (2018).

O perfil cromatográfico obtido mostrou picos com intensidade pequena e um pico principal de maior intensidade referente ao lapachol com tempo de retenção de 7,650 minutos. A partir da obtenção da área total do cromatograma, e integrando a área do pico referente ao lapachol, chegou-se ao valor de 95,69% do total. Com base nesse resultado é possível correlacionar a área do pico com a composição do bioativo na amostra. O lapachol apresentou percentual de pureza 95,69%, em massa.

#### ***4.2.2 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR)***

A técnica de espectroscopia na região do infravermelho foi aplicada, com objetivo de analisar as vibrações decorrentes de ligações químicas presentes na estrutura, o que possibilita, a identificação de grupos funcionais existentes na molécula, contribuindo assim para a sua respectiva elucidação estrutural. Para isso as bandas de transmissão encontradas no espectro da Figura 14 foram utilizadas, atreladas aos grupos responsáveis pelas respectivas bandas.

Figura 14 – Espectro no Infravermelho do lapachol.



Fonte: Elaborado pelo autor, (2018).

O espectro vibracional da molécula do lapachol apresenta bandas de absorção na região de 1639  $\text{cm}^{-1}$  e 1660  $\text{cm}^{-1}$  referentes a C=O do carbono 4 e do carbono 1 respectivamente, além de uma banda na região de 3350  $\text{cm}^{-1}$  de um estiramento assimétrico na ligação O-H, além de bandas nas regiões de 725 e 843  $\text{cm}^{-1}$ , todas atribuídas ao anel aromático presente no lapachol. Essas e as demais atribuições mostradas na Tabela 4, foram realizadas tomando como base bibliografia relatada por (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

Tabela 4 - atribuições das bandas do espectro na região do infravermelho para o lapachol.

Número de onda $\text{cm}^{-1}$	Atribuições
725	$\delta$ C-H fora do plano
937	$\delta$ CCH de alifáticos
1046	$\nu$ CC aromáticos
1238	$\delta$ C-OH
1369	$\delta$ C-H de $\text{CH}_3$
1591	$\delta$ CC de aromáticos
1639	$\nu$ C=O do carbono 4
1660	$\nu$ C=O do carbono 1
3353	$\nu_{\text{ass}}$ O-H

Fonte: (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).



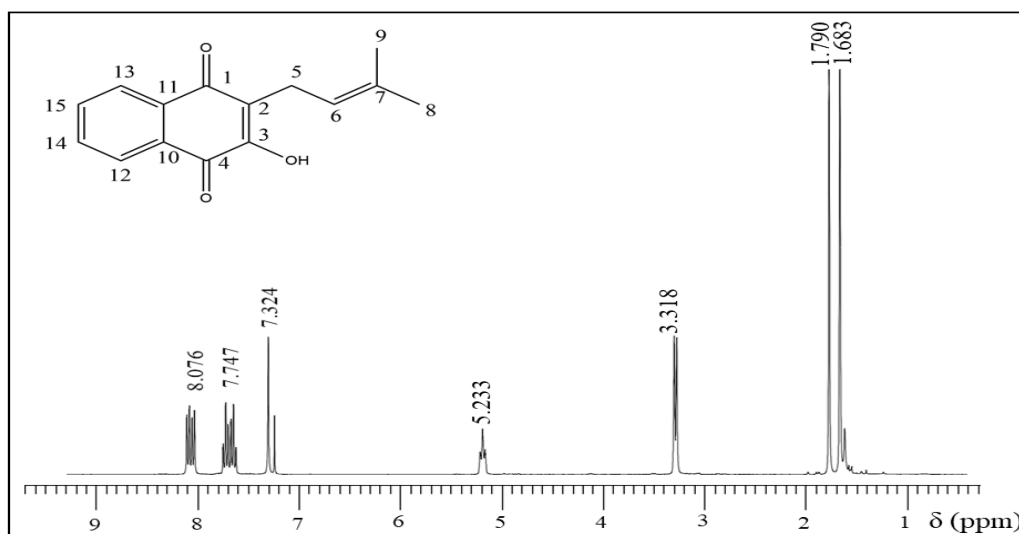
As bandas encontradas em  $1046\text{ cm}^{-1}$ ,  $1238\text{ cm}^{-1}$  e  $1369\text{ cm}^{-1}$ , referentes ao estiramento CC em aromáticos, a deformação C-OH e a torção HC-CH<sub>3</sub>, também foram relatadas em trabalho de Delarmelina et al., (2016), assim como as demais bandas atribuídas na Tabela 4.

### 4.2.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

#### 4.2.3.1 RMN <sup>1</sup>H

A referida análise apresenta relevância no que tange a elucidação estrutural dos bioativos, que foram cedidos ou sintetizados, processo esse que deve propiciar subsídios necessários para confirmar-se que estrutura química está sendo estudada, como mostra o espectro de RMN <sup>1</sup>H do lapachol na Figura 15.

Figura 15 - RMN <sup>1</sup>H do Lapachol.



Fonte: Elaborado pelo autor, (2018).

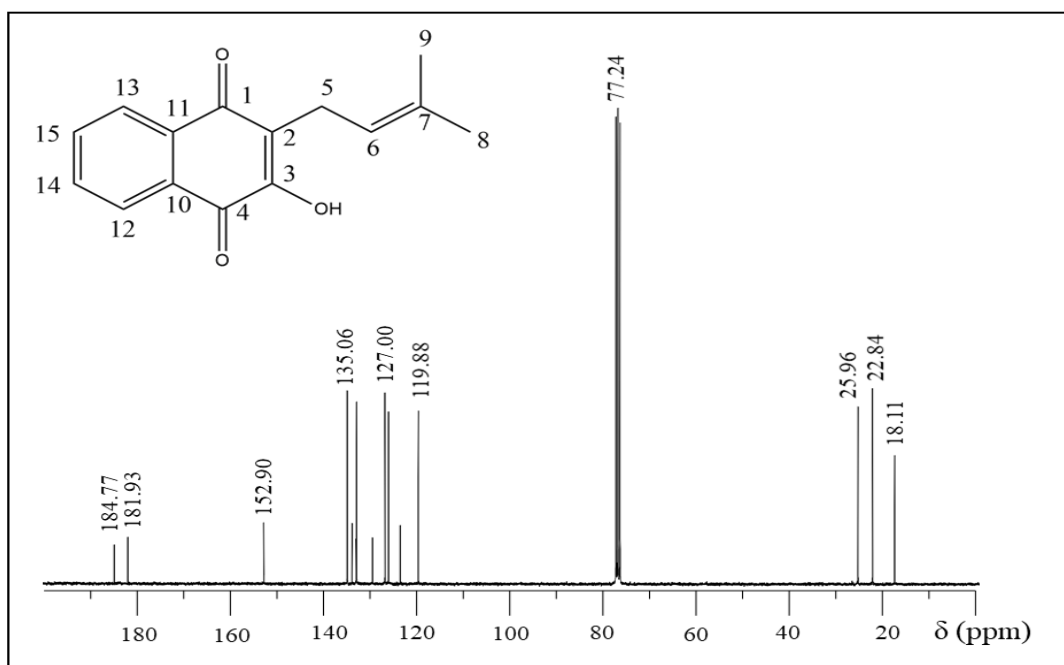
No espectro de RMN <sup>1</sup>H do lapachol foram encontrados em  $\delta$  8,08 dupletto de dupletto (dd), em  $\delta$  7,75 há um dupletto de dupletto de dupletto (ddd), referente aos hidrogênios ligados ao (C13), (C14) respectivamente e na região de  $\delta$  7,32, hidrogênio da hidroxila. Um tripleto foi encontrado em  $\delta$  5,23 do hidrogênio ligado ao (C6), em  $\delta$  3,32 um dupletto referente ao hidrogênio localizado no (C5), em  $\delta$  1,79 ppm um singletto do hidrogênio presente no (C9) e em  $\delta$  1,68 há um singletto do hidrogênio presente no carbono 8. Esse valores de deslocamento químico bem como as suas respectivas atribuições estão em concordância com resultados obtidos por Singh et al., (2008), que realizou estudos de análise estrutural dos

compostos pertencentes a classe das naftoquinonas.

#### 4.2.3.2 RMN $^{13}\text{C}$

A Ressonância Magnética Nuclear de  $^{13}\text{C}$  constitui uma importante técnica de elucidação das estruturas moleculares, pelo fato de fornecer informações acerca dos carbonos presentes na estrutura em análise como o ambiente químico em que o mesmo se encontra, permitindo que se conclua como estão dispostos os átomos em um molécula que possua carbono, como o observado no espectro ilustrado na Figura 16.

Figura 16 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do lapachol.



Fonte: Elaborado pelo autor, (2018).

Os dados de RMN  $^{13}\text{C}$  do lapachol, mostraram sinais em  $\delta$  184,77 (C-4), em  $\delta$  181,93 (C-1), em  $\delta$  135,06 (C-14),  $\delta$  127,00 (C-12),  $\delta$  119,88 (C-6),  $\delta$  25,96 (C-8), em  $\delta$  22,84 (C-5),  $\delta$  18,11 (C-8). Estes resultados obtidos corroboram com os que foram encontrados em trabalho realizado por Sab et al., (2015), que estudou plantas do gênero *Bignoniaceae*, com intuito de verificar a presença de lapachol.

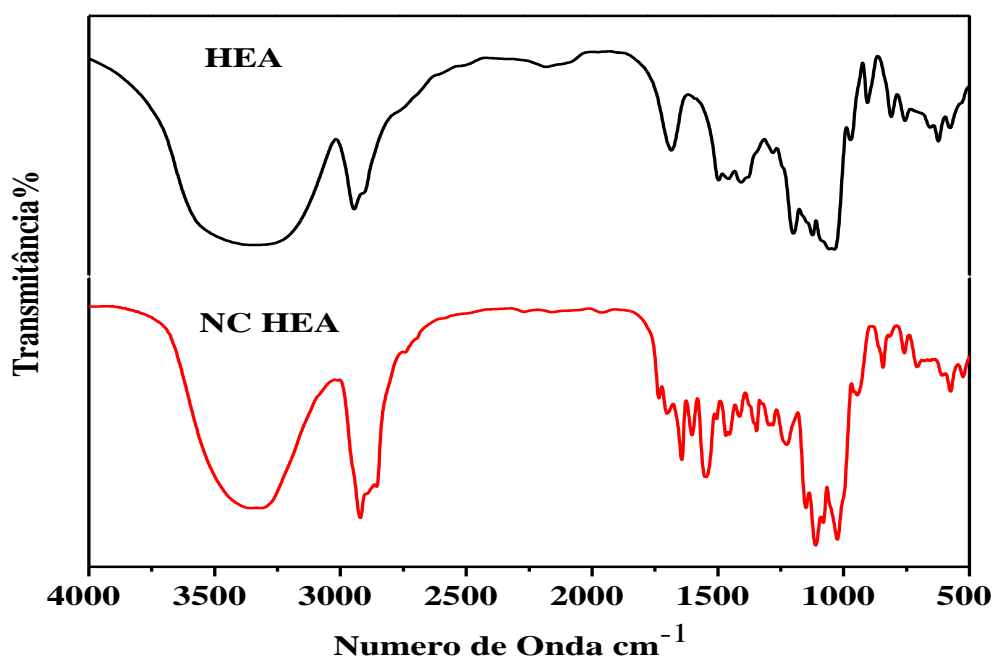
### 4.3. Caracterizações das nanocápsulas sintetizadas

#### 4.3.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR)

A técnica espectroscópica foi utilizada para realizar-se um estudo sobre a

formação das nanocápsulas, sobretudo a respeito da mudança de perfil do espectro do amido antes e depois da reação de reticulação, sendo que essa diferença no espectro do polissacarídeo, pode ser observada através do surgimento de novas bandas, o desaparecimento de bandas existentes, e o aumento ou diminuição da intensidade de bandas já existentes, ilustrados na Figura 17.

Figura 17 – Espectro comparativo na região do Infravermelho, entre o hidroxietilamido (HEA) e a nanocápsula sintetizada (NC HEA).



Fonte: Elaborado pelo autor, (2018).

O espectro do HEA apresentou bandas de transmitância com maiores intensidades na região de  $1654\text{ cm}^{-1}$ , referente ao estiramento H-OH de água reticulada no polissacarídeo, em  $3324\text{ cm}^{-1}$  estiramento assimétrico de O-H, em  $1165\text{ cm}^{-1}$  estiramentos C-C e C-O, regiões estas encontradas por Zhao et al., (2018) em estudos realizados sobre propriedades físico-químicas do amido da castanha com origem na China. A Tabela 5 apresenta ainda regiões de transmissão do infravermelho para as nanocápsulas.

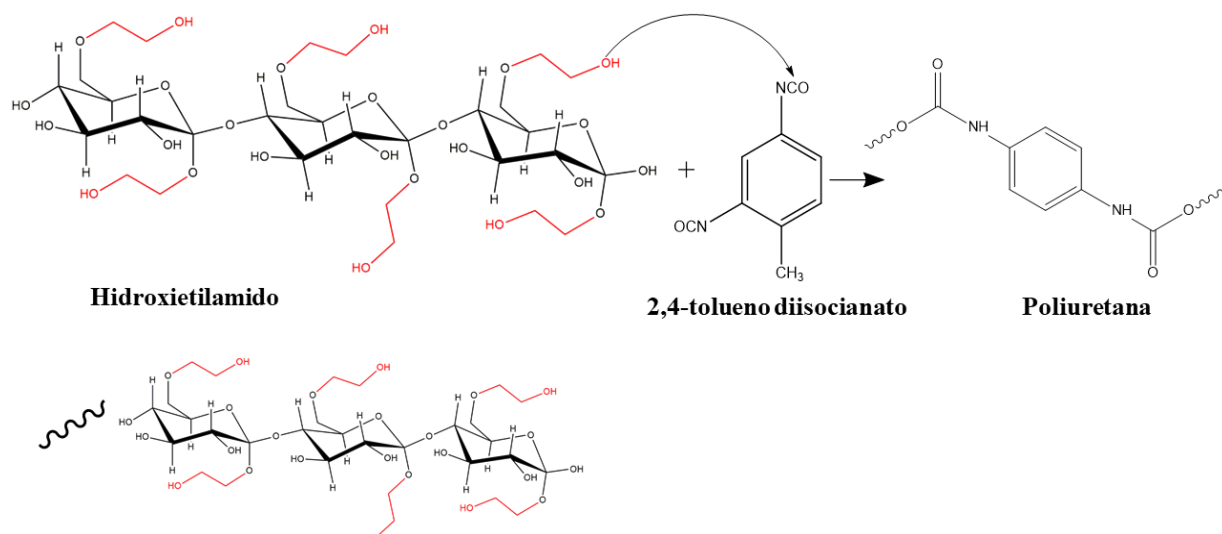
Tabela 5 – Atribuições das bandas do espectro na região do Infravermelho para o HEA e para as nanocápsulas sintetizadas.

Número de Onda $\text{cm}^{-1}$	Atribuições (HEA)	Número de Onda $\text{cm}^{-1}$	Atribuições (NC-HEA)
990	$\delta$ fora do plano RCHCH <sub>2</sub>	1024	$\delta$ fora do plano RCHCH <sub>2</sub>
1165	$\nu$ C-O e C-C do anel da anidroglicose	1111	$\nu$ C-O de éter alifático
1372	$\delta$ CH <sub>3</sub>	1227	C-O de éter aromático
1467	$\delta$ CH <sub>2</sub> (N)	1346	$\delta$ CH <sub>3</sub>
1654	$\nu$ H-OH de água reticulada	1464	$\delta$ CH <sub>2</sub> (N)
2931	$\nu$ C-H de carbonos alifáticos	1644	$\nu$ H-OH de água reticulada
3324	$\nu_{\text{ass}}$ O-H	1702	$\nu$ C=O livre
		1734	$\nu$ C=O de poliuretana
		2921	$\nu$ C-H de carbonos alifáticos
		3340	$\nu_{\text{ass}}$ O-H

(LAMPMAN et al., 1973).

A Tabela 5 reporta regiões do infravermelho, bem como as suas respectivas atribuições, em  $1702\text{ cm}^{-1}$ , referente ao surgimento de uma banda proveniente de estiramento C=O livre, que não havia sido verificada no espectro do HEA, bem como a região em  $1734\text{ cm}^{-1}$ , referente ao estiramento C=O da poliuretana formada. Ambas são provenientes da reação de poliadição (Figura 18) que ocorre entre os grupamentos isocianatos do reticulante TDI, com as hidroxilas reativas do polissacarídeo localizadas nos grupamentos hidroxietil, pois são menos impedidas estericamente, formando as ligações poliuretana. Outra alteração observada, ocorreu no perfil da banda referente ao estiramento assimétrico de O-H, verificou-se que a mesma apresentou diminuição na largura da banda, fato este atribuído, a diminuição do número de hidroxilas presentes no composto, haja vista sua reação de reticulação. Os resultados obtidos a partir destes espectros estão em consonância com levantamentos realizados por Baier et al., (2012), que realizou estudos envolvendo nanocápsulas de hidroxietilamido.

Figura 18– Reação de reticulação do hidroxietilamido.



Fonte: Elaborado pelo autor, (2019).

#### 4.3.2. Tamanho de partícula e índice de polidispersidade.

O tamanho de partícula das nanoemulsões primárias e das nanocápsulas foi mensurado, bem como o índice de polidispersividade. Conforme Antonello e colaboradores (2017), uma nanoemulsão ocorre quando são formadas nanogotículas que podem variar de 50 até 500 nm, nos quais os sistemas que apresentam gotículas com essa característica têm sido

classificados como miniemulsões.

Às emulsões primárias com os subscritos “O” contém o ativo OEC e as emulsões controle com os subscritos “B” não contém bioativo. Posteriormente foram obtidos diferentes valores de tamanho de partícula e de índice de polidispersividade. Somente após o processo de otimização dos sistemas é que foram feitas nanocápsulas com lapachol, portanto o mesmo não foi submetido as formulações para otimização. Todos os valores estão listados na Tabela 6.

Tabela 6 - Tamanho de partícula e índice de polidispersividade das nanoemulsões primárias e das nanocápsulas.

Emulsão	Tamanho de Partícula (nm)		Índice de Polidispersividade	
	DIA 1	DIA 37	DIA 1	DIA 37
B <sup>b</sup> -5 <sup>a</sup> I <sup>c</sup>	205,63 ± 3,58	241,00±19,25	0,123±0,0189	0,28± 0,0080
B <sup>b</sup> -7,5 <sup>a</sup> I <sup>c</sup>	232,83±1,75	261,43±1,92	0,213± 0,0087	0,253± 0,0140
B <sup>b</sup> -10 <sup>a</sup> I <sup>c</sup>	226,70± 1,21	268,86 ± 1,04	0,243±0,0095	0,233± 0,0190
O <sup>b</sup> -5 <sup>a</sup> I <sup>c</sup>	309,70± 3,20	367,93± 20,09	0,212±0,0060	0,223±0,0920
O <sup>b</sup> -7,5 <sup>a</sup> I <sup>c</sup>	254,05± 18,60	414,20± 44,41	0,283±0,0714	0,829±0,0050
O <sup>b</sup> -10 <sup>a</sup> I <sup>c</sup>	220,70± 6,23	486,30±56,43	0,271±0,0367	0,497±0,0075
B <sup>b</sup> -5 <sup>a</sup> II <sup>c</sup>	253,03 ± 4,46	_____	0,243±0,0153	_____
O <sup>b</sup> -5 <sup>a</sup> II <sup>c</sup>	241,56± 2,31	_____	0,33±0,0473	_____
O <sup>b</sup> -10 <sup>a</sup> II <sup>c</sup>	245,93 ±6,23	_____	0,296±0,0547	_____
NC-OEC	343,00±13,00	_____	0,473±0,0307	_____
NC-LPC	273,70±3,52	_____	0,491±0,0163	_____
NC-HEA	268,70±1,61	_____	0,404±0,0643	_____

Fonte: Elaborado pelo autor, (2018).

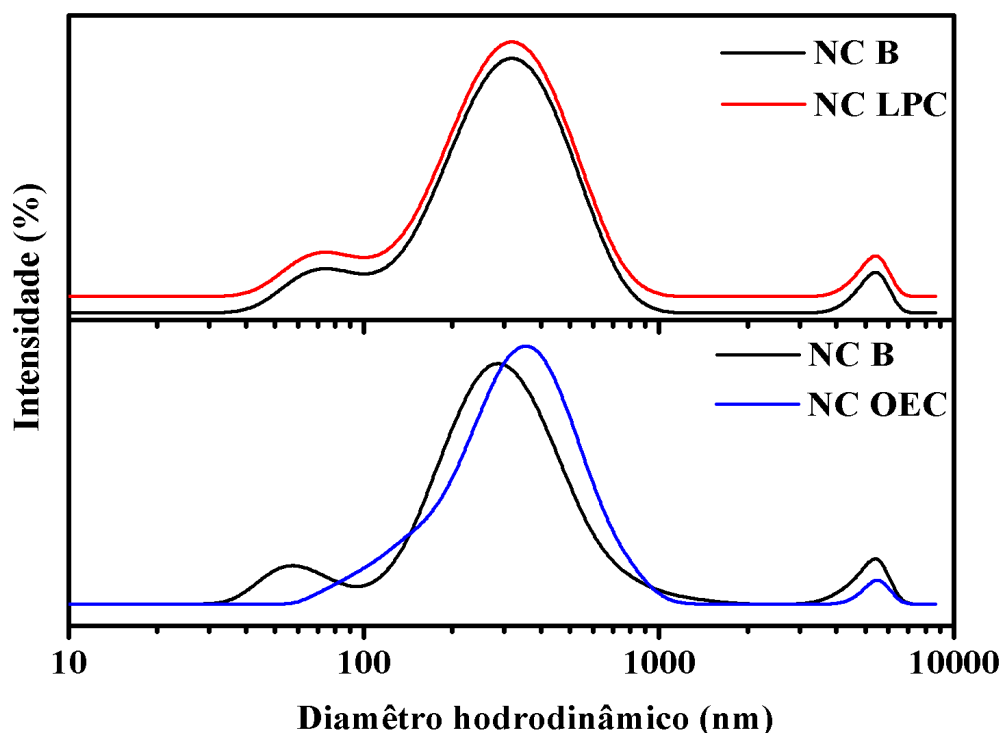
Verificou-se no geral que as emulsões com 10% de fase orgânica apresentaram menores tamanhos, principalmente as formulações com maior taxa de surfactante, como observado na amostra 0-10, que tem 10% de surfactante em massa com relação a fase orgânica, mostrando que os tamanhos de partícula sofrem influência da quantidade de surfactante empregada na formulação. Todos os valores de tamanho de partícula obtidos para os sistemas estão dentro do intervalo de 50-500 nm, portanto sendo classificados como nanoemulsões. Quanto ao índice de polidispersividade, todas emulsões estudadas obtiveram valores entre 0,1 e 0,3, no qual podem ser classificadas como sendo moderadamente

polidispersa, concordando com resultados obtidos por Jiménez et al., (2018), que em estudos realizados com nanoencapsulamento de óleos essenciais verificou que as emulsões obtiveram resultados de acordos com supracitados.

Os nanossistemas foram ainda avaliados quanto ao tamanho em função do tempo de estocagem, onde começaram apresentar aumentos consideráveis de tamanho de partícula e índice de polidispersividade, o que remete a necessidade da elaboração de sistemas de encapsulamento mais rígidos, capazes de minimizar esses aumentos. Assim torna-se necessário a utilização de partículas ou cápsulas poliméricas de hidroxietilamido para o encapsulamento de bioativos, devido a sua tolerância biológica e biodegradabilidade, tempo de prateleira, rigidez, alta capacidade de carreamento, dentre outras coisas (BAIER et al., 2012).

As nanocápsulas foram sintetizadas através da técnica de múltipla nanoemulsão inversa nas quais apresentaram os seguintes valores médios de diâmetro hidrodinâmico: 268,7, 273,7 e 343 nm para as nanocápsulas NC-B, NC-OEC e NC-LPC, respectivamente como ilustrado na Figura 19.

Figura 19 – Gráficos de distribuições dos tamanhos de partícula e PDI das nanocápsulas sintetizadas.



Fonte: Elaborado pelo autor, (2018).

Além disso, todos os sistemas mostraram comportamento moderadamente

polidisperso quanto a distribuição das partículas, resultados estes que estão em consonância com os obtidos por Zhang et al., (2017), que produziu nanogéis como carreadores de óleo essencial com diâmetros médios de 200 a 300 nm utilizando a técnica de múltipla emulsão.

#### 4.3.3 Potencial zeta

Segundo Hunter, (2013), essa medida tem como intuito definir de que forma o potencial entre a camada de líquido imediatamente ao lado da superfície (fortemente ligado à partícula) e a fase contínua interagem. O potencial zeta também fornece uma medida da carga líquida na superfície da partícula e da distribuição de potencial elétrico na interface, funcionando como uma medida de estabilidade. A Tabela 7 contém dados de potencial zeta das emulsões primárias e das nanocápsulas.

Tabela 7 - Resultados de potencial zeta para naoemulsões primárias e nanocápsulas.

Emulsão	Potencial zeta (mV)	
	DIA 1	DIA 37
B <sup>b</sup> -5 <sup>a</sup> I <sup>c</sup>	-38,933	-35,03
B <sup>b</sup> -7,5 <sup>a</sup> I <sup>c</sup>	-36,433	-33,86
B <sup>b</sup> -10 <sup>a</sup> I <sup>c</sup>	-36,767	-35,83
O <sup>b</sup> -5 <sup>a</sup> I <sup>c</sup>	-39,267	-36,46
O <sup>b</sup> -7,5 <sup>a</sup> I <sup>c</sup>	-42,366	-31,46
O <sup>b</sup> -10 <sup>a</sup> I <sup>c</sup>	-41,533	-40,6
B <sup>b</sup> -5 <sup>a</sup> II <sup>c</sup>	-37,83	_____
O <sup>b</sup> -5 <sup>a</sup> II <sup>c</sup>	-33,46	_____
O <sup>b</sup> -10 <sup>a</sup> II <sup>c</sup>	-34,2	_____
NC-OEC	-25,7	_____
NC-LPC	-19,4	_____
NC-HEA	-20,4	_____

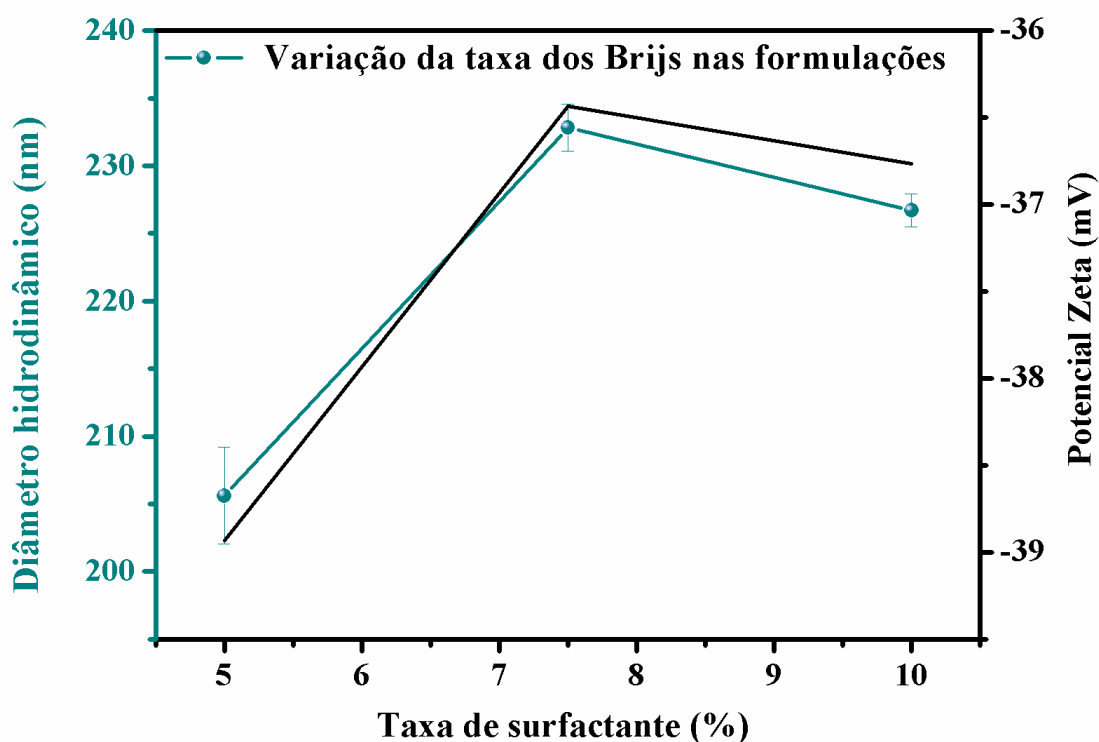
Fonte: Elaborado pelo autor, (2018).

Os resultados obtidos para as emulsões primárias apontam que as mesmas atingiram estabilidade, que está de acordo com o reportado na literatura, que sistemas onde o valor de potencial zeta seja igual ou superior a  $\pm 30$  mV podem ser classificados como estáveis, em função da carga (RAVIADARAN et al., 2018).



Todavia quando a concentração de surfactante foi aumentada, o potencial zeta diminui de -38,93 para -36,76 mV. Esse fenômeno é observado por causa da ação do surfactante que cobre as superfícies das partículas lipídicas da nanoemulsão primária, devido à sua propriedade anfifílica. Presumivelmente, quando a concentração de surfactante não iônico, como os Brijos 78 e 700<sup>®</sup>, foi aumentada, ele poderia ter coberto as superfícies mais largas das partículas, diminuindo assim a carga elétrica negativa disposta na interface, como mostra a Figura 18 (HAN et al., 2014).

Figura 20 – Tamanho de partícula e potencial zeta em função da variação da taxa de surfactantes da emulsão primária.



Fonte: Elaborado pelo autor, (2019).

Com relação as nanocápsulas, os valores encontrados de potencial encontram-se fora do intervalo de  $\pm 30$  mV, sendo encontrados no intervalo entre -20 e -30 mV. Segundo Cano-Sarmiento et al., (2018), sistemas com esse intervalo de potencial, são considerados como sendo moderadamente estáveis.

Embora o potencial zeta propicie informações sobre a estabilidade intereletrônica das partículas, existem outros parâmetros que podem contribuir para que o sistema apresente comportamento estável, tais como a relação da soma das forças atrativas de Van der Waals e as forças de repulsão eletrostática causadas pela camada elétrica dupla, enquanto o zeta

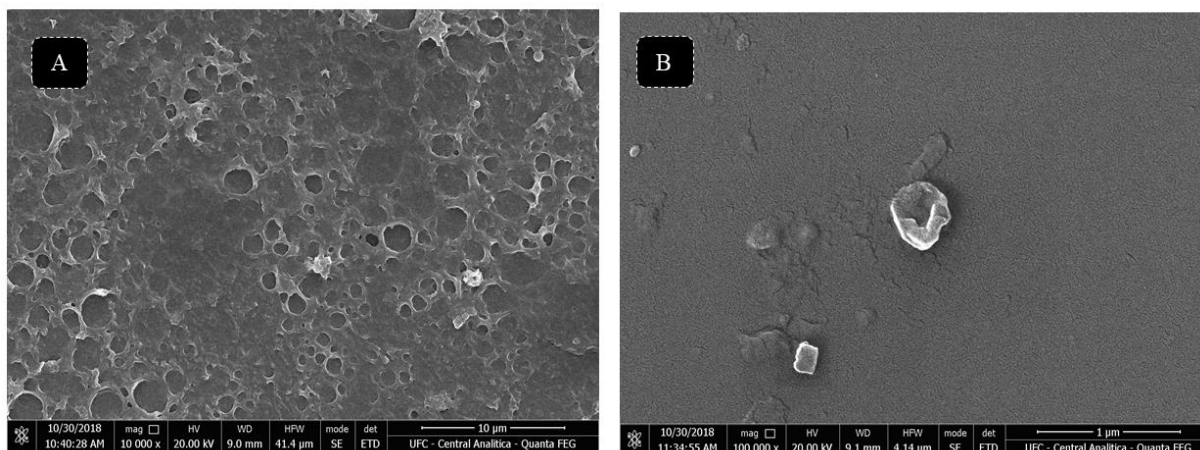
fornece informações sobre as forças eletrostáticas repulsivas, não considerando as forças atrativas de Van der Waals, portanto, é possível encontrar sistemas estáveis com menores valores absolutos de potencial zeta (DERJAGUIN; LANDAU, 1993).

#### 4.3.4 Microscopia eletrônica de varredura

O MEV é um instrumento avançado e versátil que é amplamente utilizado para analisar fenômenos de superfície dos materiais, dentre eles, topografia, morfologia, orientação e composição Sharma et al., (2018). A morfologia indica como está disposta as nanocápsulas no que tange ao seu tamanho e formato (BRABAZON; RAFFER, 2010).

Segundo Steinmacher et al., (2017), as características da polimerização e/ou reticulação interfacial são responsáveis pela morfologia final da cápsula, sendo esta composta por um núcleo mais volumoso e aquoso que ao ser submetido a análise de microscopia realizada com o uso de sistema a vácuo, essa porção composta por água é removida, conferindo as cápsulas os espaços oriundos da região do núcleo, como se as mesmas estivessem esvaziadas. Tal comportamento foi observado, quando as nanocápsulas foram submetidas a microscopia eletrônica de varredura, como demonstradas na Figura 21.

Figura 21 – MEV das nanocápsulas nas escalas: a) 10  $\mu\text{m}$  e b) 1  $\mu\text{m}$ .



Fonte: Central Analítica UFC, (2018).

De acordo com a Figura 21a, as nanocápsulas apresentam-se aglomeradas e polidispersas, denotando através desta imagem a moderada polidispersividade do sistema, o que corrobora com os valores de PDI por DLS. Na Figura 21b, é possível estimar um tamanho aproximado a 500 nm, porém esse valor de tamanho não é representativo a maior população

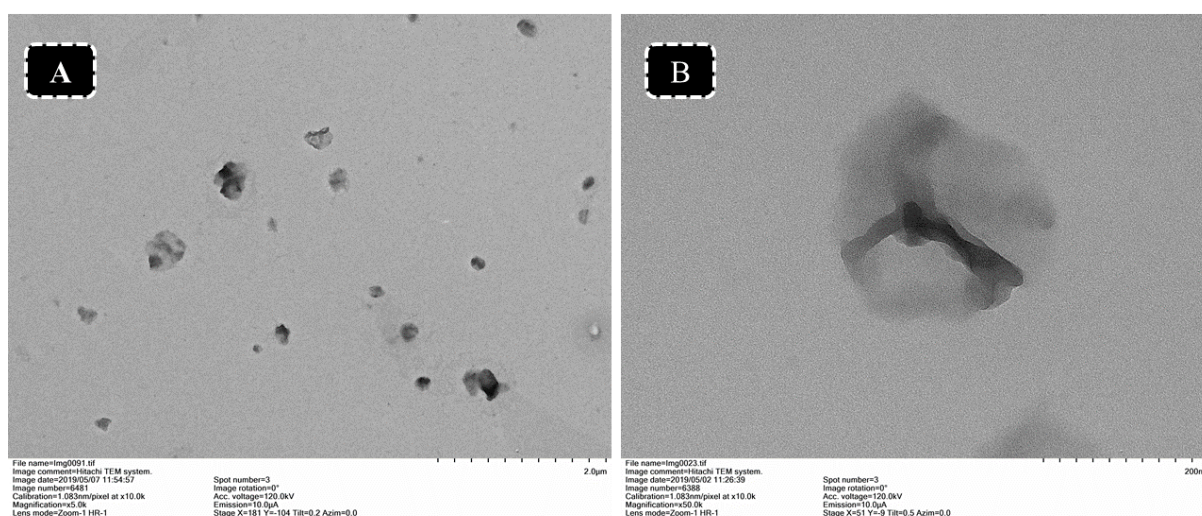
de cápsulas, onde na primeira imagem pode-se observar um maior número de cápsulas menores.

#### 4.3.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A microscopia eletrônica de transmissão é uma técnica que funciona através do processo de emissão dos feixes de elétrons, que atravessam a amostra, sofrendo diversos tipos de espalhamento que dependem das características do material (SHARMA et al., 2018). O objetivo principal do TEM é examinar a estrutura, morfologia, tamanho e sua distribuição, que por sua vez são de fundamental importância na nanotecnologia, pois, a forma como se processa uma síntese e outros aspectos envolvidos na mesma, acarretam em mudanças na eficácia de materiais nanoestruturados (WAITZ; KAZYKHANOV; KARNTHALER, 2004).

Para avaliar a estrutura interna das nanocápsulas, algumas amostras foram observadas pelo TEM. De acordo com os resultados elucidados na Figura 22, as nanocápsulas obtidas têm uma faixa de tamanho de 200-400 nm, corroborando com a técnica de espalhamento de luz dinâmica. Foi possível observar a formação de uma estrutura clara de núcleo-concha (BAIER et al., 2010). Isso significa que as nanocápsulas com a concha de poliuretana, foram sintetizadas com sucesso. No entanto, a espessura da parede das nanocápsulas não é uniforme, e pode haver alguma estrutura multinuclear na nanocápsula (DEBELE; MEKURIA; TSAI, 2016).

Figura 22 – Imagens de TEM das nanocápsulas NC B (a) e NC LPC (b).



Fonte: CEDENNA – Universidade do Chile, (2019).

A morfologia da superfície das nanocápsulas é um fator importante que afeta o comportamento de liberação do fármaco. As nanocápsulas sintetizadas têm forma esférica

regular, e superfície densa. A morfologia da superfície da nanocápsula está relacionada ao mecanismo de formação, apresentando relação dependente da estrutura química e reatividade dos polímeros, da viscosidade, das propriedades da fase contínua (CUI et al., 2018).

#### 4.4 Teor de sólidos

A verificação do teor de sólidos na solução redispersada consiste em uma análise de caráter gravimétrico, na qual essa mensuração é realizada em função da massa de sólidos da solução por massa da mesma em (g/g). Para o estudo em questão a massa de sólidos corresponderá a quantidade de nanocápsulas obtidas após o processo de liofilização. A Tabela 8 apresenta os percentuais obtidos para os sistemas analisados nesse estudo.

Tabela 8 - Resultados obtidos para o teor de sólidos das nanocápsulas.

Amostra	Percentual do teor de sólidos %
NC-HEA	0,40
NC-LPC	0,77
NC-OEC	0,59

Fonte: Elaborado pelo autor, (2018).

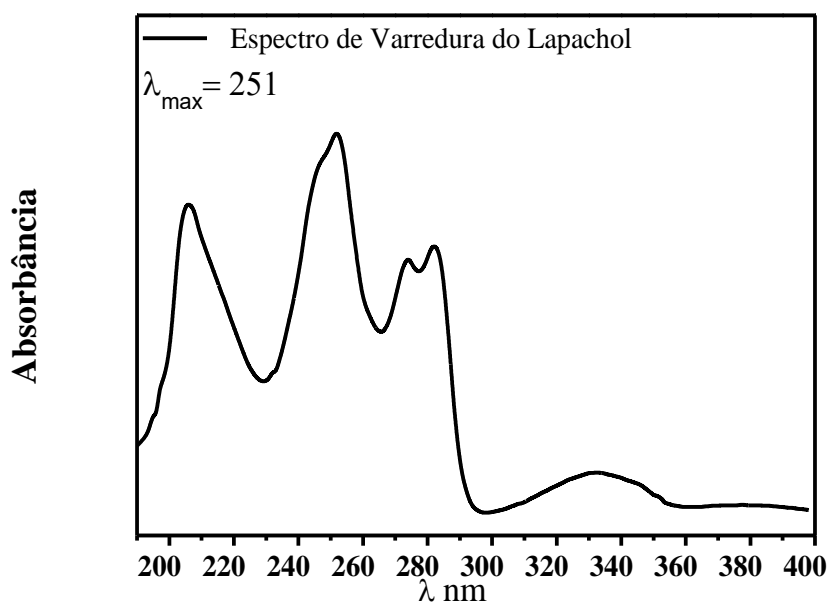
Os valores obtidos para o teor foram de: 0,40%, 0,76% e 0,59%, para as nanocápsulas de amido sem a presença de ativo, contendo o lapachol e o óleo do cravo, respectivamente. Os valores obtidos para os ativos são maiores devidos a presença dos mesmos. Além disso, os resultados de teor de sólidos, denotam a concentração de nanocápsulas sintetizadas em função da massa da solução redispersada, sendo importante uma vez que essa concentração de nanocarreadores está diretamente relacionada com a probabilidade de o sistema apresentar respostas frente aos micro-organismos estudados.

#### 4.5 Eficiência de encapsulamento e capacidade de carregamento

##### 4.5.1 Eficiência de encapsulamento do lapachol

Primeiramente foi realizada uma varredura do bioativo utilizando o solvente ciclohexano para solubilizar o mesmo, com o intuito de se verificar o valor de  $\lambda$  máximo do lapachol mostrado na Figura 23, para que posteriormente fosse realizada a quantificação do ativo presente na cápsula através da curva de calibração do ativo em questão.

Figura 23 – Espectro de varredura do lapachol.

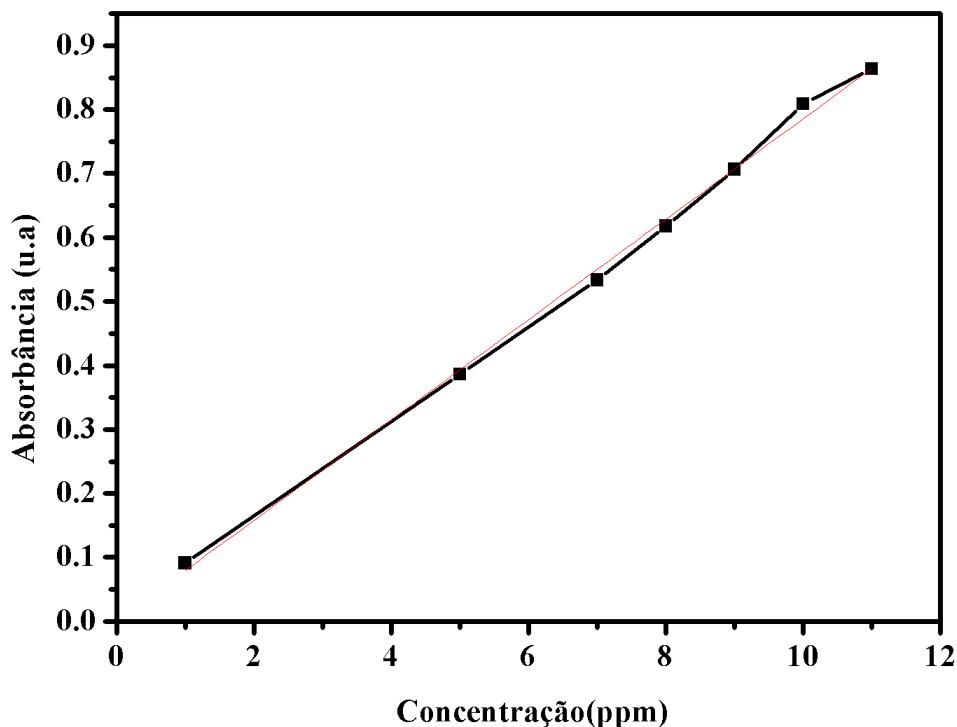


Fonte: Elaborado pelo autor, (2018).

O comprimento de onda em que o lapachol apresentou maior absorbância foi em 251 nm, o valor obtido está em concordância com resultado reportado em trabalho publicado por SEGOLONI; DI MARIA, (2018).

O comprimento de onda obtido foi utilizado para se construir a curva de calibração apresentada na (Figura 24), utilizando o mesmo solvente empregado na varredura. A expressão gerada pela curva de  $[A_{\text{LPC}}] = 0,07843[\text{LPC}] + 0,00114$  com  $R^2 = 0,9974$ .

Figura 24 - Curva de calibração do lapachol.



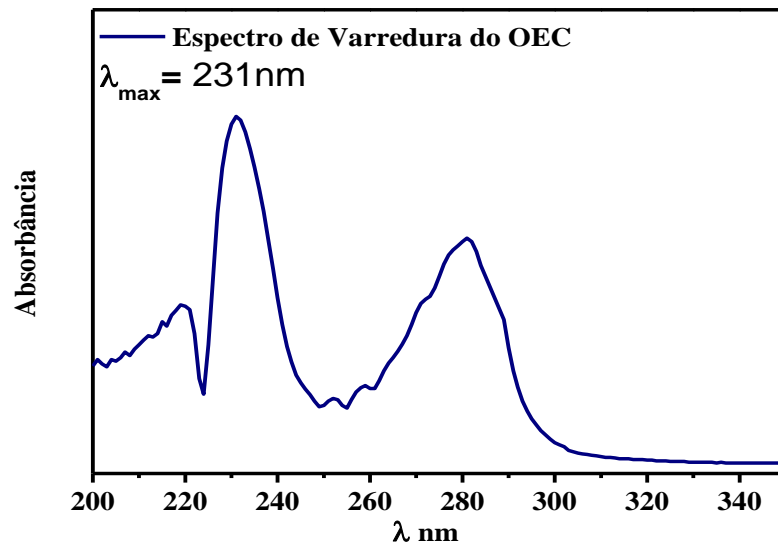
Fonte: Elaborado pelo autor, (2018).

A partir desta expressão encontrou-se o resultado de 73,47% de eficiência de encapsulamento (EE%) do ativo lapachol, que pode ser justificado pelas atrações intermoleculares entre o lapachol e o ciclohexano presente na fase contínua da múltipla nanoemulsão, que por sua vez transporta o ativo para a fase externa, diminuindo a eficiência do sistema. A curva também propicia a mensuração da quantidade em massa de ativo encapsulado, o que possibilita analisar quantitativamente a capacidade de carregamento do sistema. As nanocápsulas com lapachol apresentaram resultado igual a 1,61%, onde esse resultado e a EE% obtidas estão em consonância com o que foi estudado por Marto et al., (2018), que em trabalho realizado utilizando o amido como carreador obteve 79% de eficiência de encapsulamento e 1,9% de capacidade de carregamento.

#### ***4.5.2 Eficiência de encapsulamento do óleo essencial do cravo***

A realização de uma varredura no UV é primordial para descobrir-se o valor de  $\lambda$  máximo do óleo essencial, mostrada na Figura 25, pois a partir desse valor obtido foi possível construir uma curva de calibração.

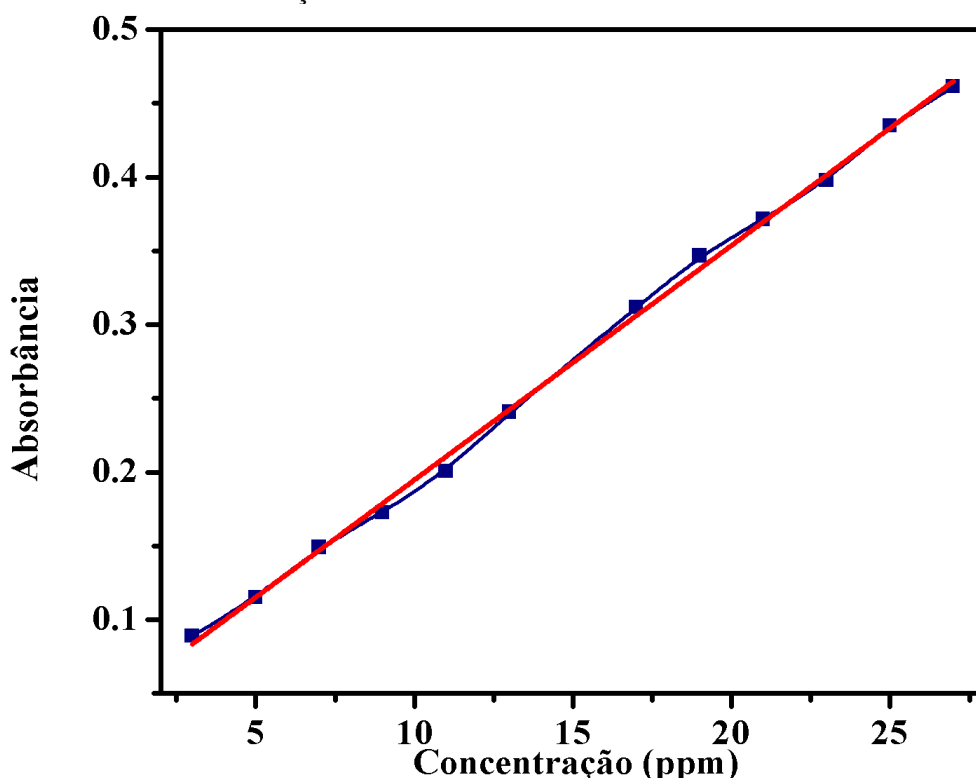
Figura 25 - Espectro de varredura do óleo essencial do cravo.



Fonte: Elaborado pelo autor, (2018).

O perfil da varredura do óleo do cravo mostrou que o comprimento de onda no qual o mesmo apresentou maior absorbância foi na região de 231 nm. Perfil similar de espectro foi reportado em trabalho publicado por Ma e colaboradores (2018), que encontrou comprimento de onda máximo próximo de 235 nm. Essa mudança por sua vez pode ser justificada pela diferença existente na composição do óleo. A partir deste valor encontrado foi feita uma curva de calibração apresentada na Figura 26, com o intuito de realizar a quantificação de óleo essencial do cravo, presente nas nanocápsulas sintetizadas.

Figura 26 - Curva de calibração do óleo essencial do cravo



Fonte: Elaborado pelo autor, (2018).

A curva de calibração do OEC gerou uma equação da reta com a seguinte expressão:  $[A_{OEC}] = 0,0159[OEC] + 0,003576$ , com  $R^2 = 0,9981$ , onde x é a absorbância obtida durante a leitura realizada para a quantificação do ativo na cápsula. Através da expressão obtida verificou-se que o sistema de nanocápsulas de hidroxietilamido em análise conseguiu encapsular 76,89% do ativo inicialmente colocado, Esse resultado apresenta concordância com resultados obtidos por Sebaaly et al., (2015), que apresentou variações da EE% entre  $56,8 \pm 0,33$  até  $75,7 \pm 1,76\%$  do referido bioativo, porém utilizando lipossomas. Posteriormente foi realizada mensuração para observa-se a capacidade de carregamento do sistema e obteve-se um resultado de 4,99%, valor bem acima do encontrado para o lapachol, levando-se em conta que as nanocápsulas de OEC apresentaram maior EE%, o resultado obtido se torna complacente com obtido da eficiência. Além disso a capacidade de transportar uma maior quantidade de ativo por massa de carreador, confere ao sistema uma maior probabilidade de apresentar potenciais aplicações farmacológicas.



## 4.6 Ensaios de difusão

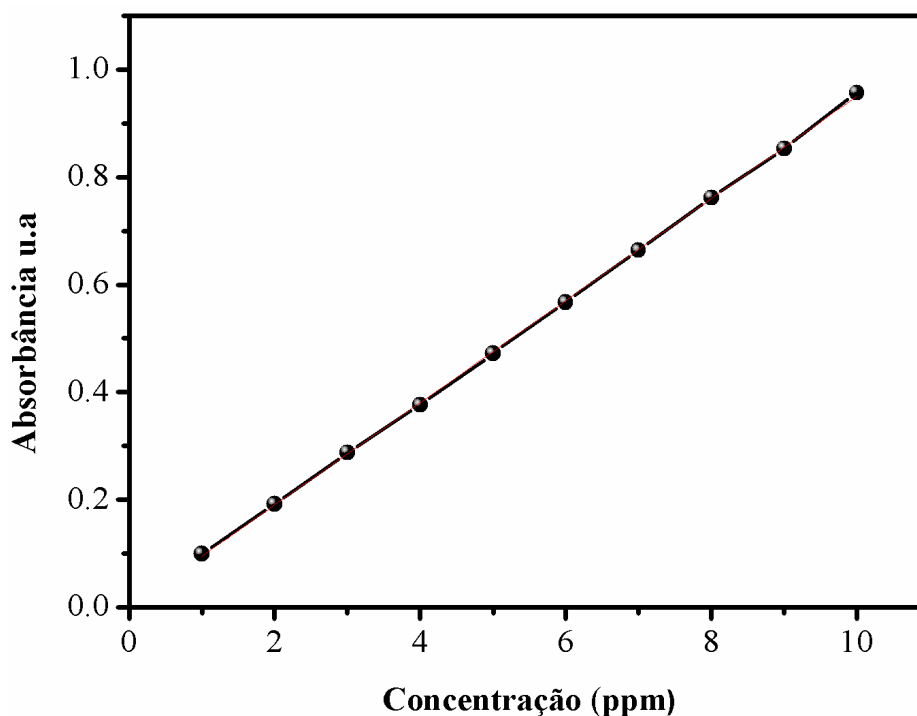
Os ensaios de liberação são realizados com intuito de atestar o perfil de liberação que sistemas de encapsulamento podem prover. Todavia não foi possível realizar tais ensaios com o óleo de cravo encapsulado, devido a dificuldades experimentais de execução, como a volatilização do mesmo. Contudo os ensaios com lapachol encapsulado ocorrem normalmente, como demonstrados na seção 4.6.1.

### 4.6.1 Ensaio de difusão do lapachol

Os ensaios de liberação foram realizados objetivando verificar o perfil de liberação das nanocápsulas contendo o fármaco em pH fisiológico, adicionado de etanol para solubilizar-se o bioativo difundido, possibilitando sua quantificação (GUL et al., 2018).

A curva de calibração do lapachol nas condições do ensaio de liberação, foi realizada com intuito de verificar a viabilidade de quantificar o bioativo nestas condições e com o objetivo de obter uma equação com o intuito de realizar as quantificações de fármaco liberadas no meio receptor. Sendo essa análise realizada em comprimento de onda de 275 nm (TABOSA et al., 2018).

Figura 27 – Curva de calibração do lapachol em tampão 7,4 e 10% de etanol

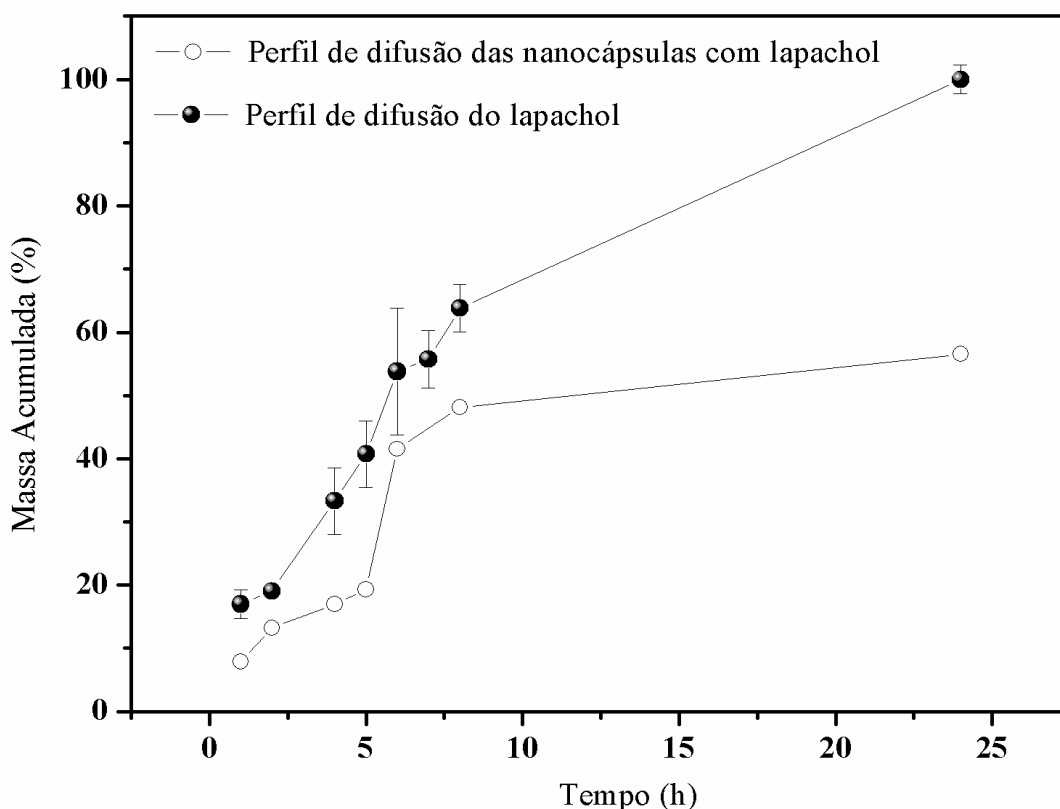


Fonte: Elaborado pelo autor, (2019).

A partir da metodologia utilizada para o ensaio e dos intervalos de concentração

utilizados, obteve-se a curva de calibração que submetida ao fit linear gerou a seguinte expressão:  $[A_{LPC}] = 0.09501[LPC] + 0.000493$ , na qual a mesma obteve coeficiente de correlação linear com  $R^2 = 0.99983$ . A equação da reta gerada, foi utilizada para a realização das quantificações de fármaco presentes no compartimento receptor. As quantidades de fármaco liberadas no meio receptor, para os ensaios do lapachol e das nanocápsulas contendo o mesmo, foram quantificadas e expostas em termos de percentagem, mostradas na Figura 28.

Figura 28- Perfil de difusão das nanocápsulas com lapachol e do lapachol livre.



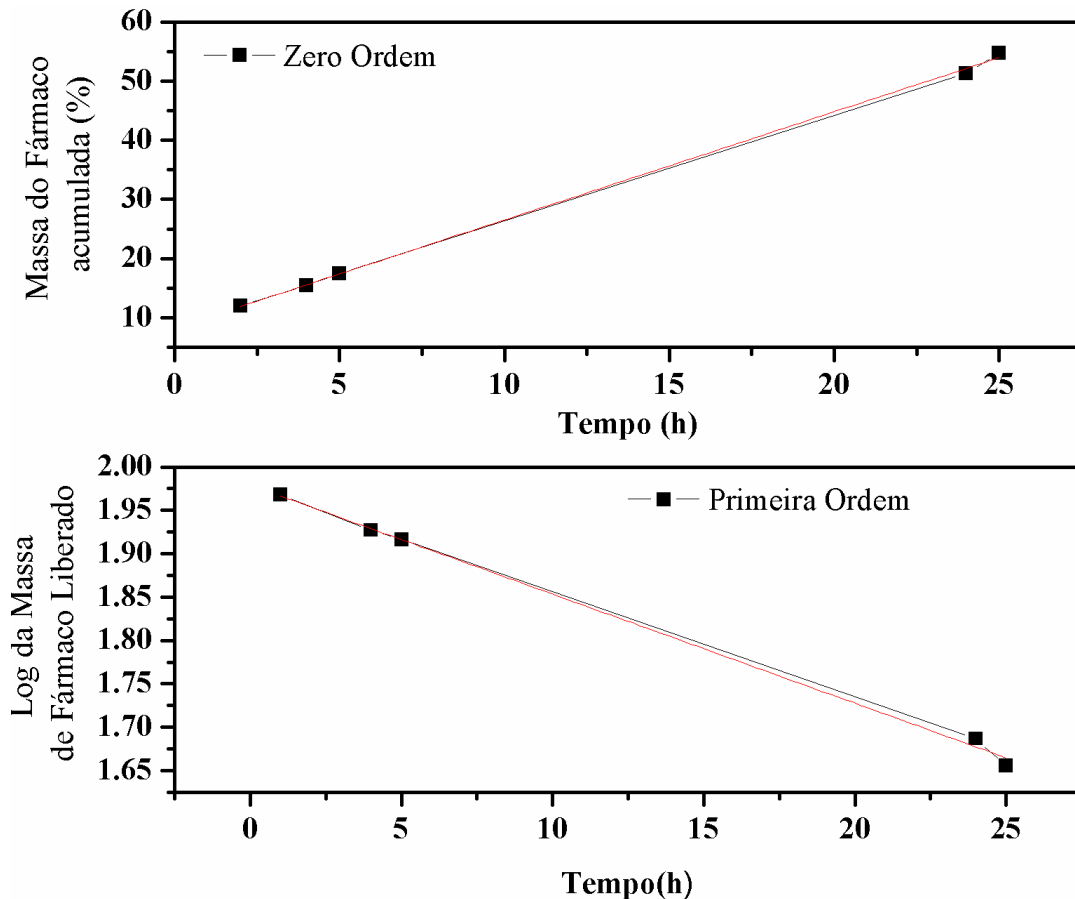
Fonte: Elaborado pelo autor, (2019).

O perfil de difusão do fármaco livre mostrou que em 24 h o mesmo difundiu na sua totalidade, contudo o sistema de nanoencapsulamento do bioativo no mesmo período de tempo, liberou 47,56%, o que denota o caráter de liberação controlada propiciado pela formulação proposta no presente trabalho. Além disso quando comparado a sistemas propostos em outros trabalhos Rodrigues et al., (2018) no qual as nanoemulsões liberaram 58,7% em um período de 54 h, as nanocápsulas mostram uma estabilização no perfil de liberação após 24 horas, além de maior efetividade na retenção do bioativo.

#### 4.6.2 Estudos de Modelos Cinéticos

Para analisar os dados de liberação *in vitro*, vários modelos cinéticos foram utilizados para descrever a cinética de liberação ao qual o fármaco encapsulado obedece e investigar o mecanismo envolvido no processo de difusão do fármaco (Fickiano ou não-Fickiano), isto é, se depende ou não exclusivamente do gradiente de concentração (PARRA et al., 2015). Os dados de liberação da porção inicial da curva de liberação foram ajustados às equações que descrevem os modelos cinéticos, e as mesmas foram comparadas utilizando os coeficientes de correlação  $r^2$ . Os modelos de Zero e Primeira ordem são importantes, na medida em que fornecessem informações acerca de como a concentração de bioativo influencia no perfil de liberação do mesmo, como demonstrado na Figura 29 e Tabela 9.

Figura 29 – Modelos cinéticos de Zero Ordem e Primeira Ordem.



Fonte: Elaborado pelo autor, (2019).

Tabela 9- Expressão e coeficiente de correlação obtidos a partir dos modelos cinéticos de Zero e Primeira ordem.

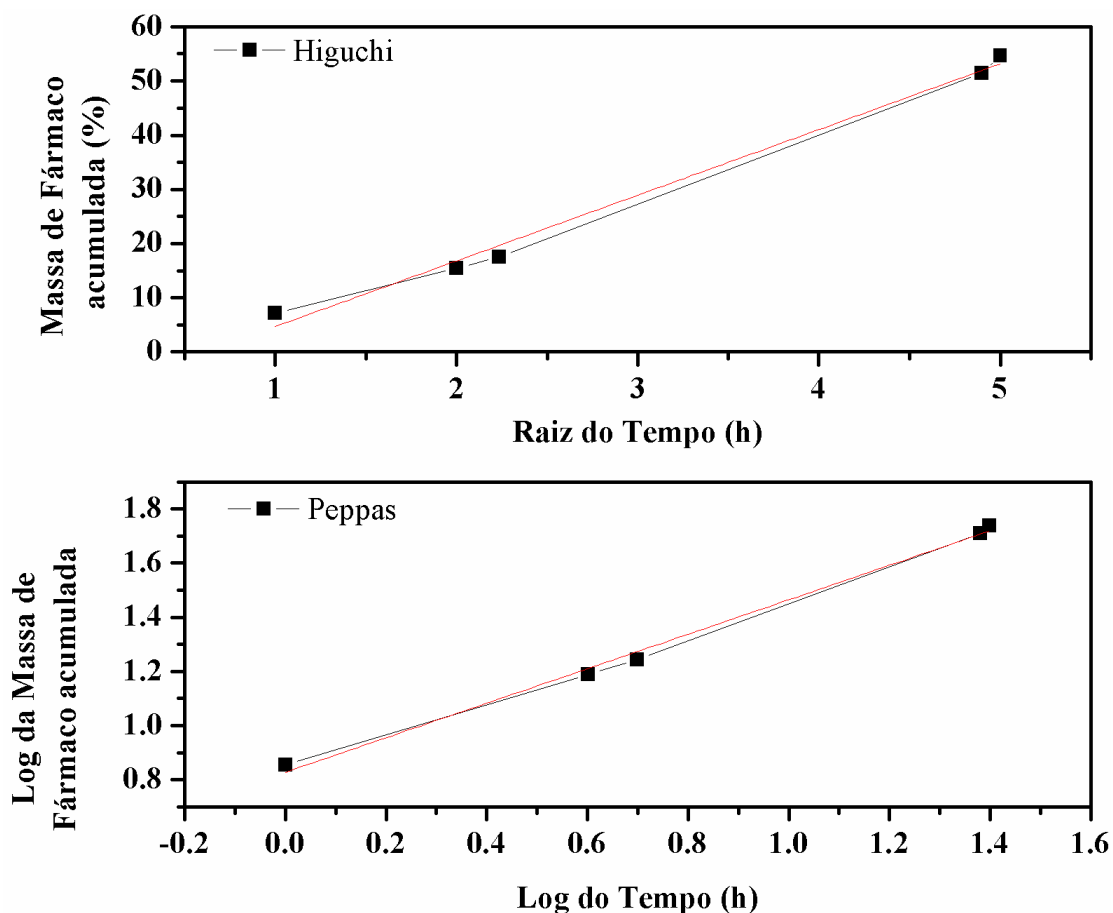
<b>Modelos Cinéticos</b>	<b>Expressão</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
Zero Ordem	$y = 8,26x + 1,83$	0.9991
Primeira Ordem	$y = 1,98x - 0,01$	0.9973

Fonte: Elaborado pelo autor, (2019).

Com base no gráfico demonstrado na Figura 30, bem como nos valores de R<sup>2</sup> dispostos na Tabela 9, o modelo de ordem zero apresentou melhor correlação com os dados de liberação, onde pode se inferir que o processo de difusão do fármaco ocorre conforme modelo cinético de Zero Ordem padronizar, em suma a variação de concentração do mesmo não exerce influência em seu perfil de liberação (SAADATMAND et al., 2019).

Adicionalmente, os dados de liberação também foram submetidos aos modelos de Higuchi e Peppas, com intuito de verificar-se de que forma o material encapsulante sintetizado exerce influência no perfil de liberação ou o mesmo segue o modelo de fick (LOPES; LOBO; COSTA, 2005). os dados da difusão foram ajustados aos modelos e mostrados na Figura 30 e na Tabela 10.

Figura 30 – Modelos cinéticos de Higuchi e Peppas.



Fonte: Elaborado pelo autor, (2019)

Tabela 10- Expressão e coeficiente de correlação obtidos a partir dos modelos cinéticos de Higuchi e Peppas.

Modelos Cinéticos	Expressão	R <sup>2</sup>
Higuchi	$y = 12,12x - 7,46$	0,98952
Peppas	$y = 0,83x + 0,64$	0,99397

Fonte: Elaborado pelo autor, (2019).

A partir dos resultados mostrados na Tabela 10 e na Figura 30, pode-se inferir que o modelo de Peppas se ajusta mais adequadamente ao ensaio de difusão realizado, haja vista que o mesmo apresentou maior valor de coeficiente de correlação, R<sup>2</sup>, sugerindo assim que a liberação do fármaco nas nanocápsulas pode ocorrer através dos mecanismos de absorção da água por parte das cadeias poliméricas que podem ser propensas à clivagem hidrolítica ou pela introdução de grupos ionizáveis (ácidos/básicos) que podem causar alterações conformacionais e de intumescimento (PRAMANIK et al., 2018), conseqüentemente um relaxamento das cadeias e a expansão do volume, logo o polímero expande e se torna poroso,

fazendo com que o sistema torne-se menos restritivo a difusão do fármaco (IVANOVA et al., 2018).

#### 4.7 Teste de atividade antifúngica

Com o intuito de verificar a susceptibilidade das cepas *Candida spp* frente aos bioativos, bem como aos sistemas nanoencapsulados, foram realizados testes de sensibilidade. Entretanto o lapachol não demonstrou resposta frente as leveduras testadas, portanto não se realizou ensaios com lapachol encapsulado. Os resultados das amostras OEC, NC B e NC OEC estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11- Avaliação do efeito antifúngico do lapachol e óleo de cravo isolados e encapsulados frente a isolados de *Candida spp*.

		CIM 50 <sup>b</sup>	
		ATCC® <i>C. parapsilosis</i> 22019	ATCC® <i>C. krusei</i> 6258
Subst.	Óleo de Cravo	0,625%	1,25%
	NC OEC	3,14 ppm	1,57 ppm
	NC HEA	0,78%	0,78%

<sup>a</sup>Cepas de leveduras isoladas de coleção. <sup>b</sup>CIM foi definido como a mais baixa concentração que produziu 50% de redução do crescimento das células fúngicas após 24 h de incubação.

Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

Os compostos NC B e NC OEC, apresentaram atividade antifúngica dentro da faixa de concentração testada frente a todos os isolados, com resultados de Concentração Inibitória Mínima (CIM), de 0,78% e 3,14 ppm respectivamente, enquanto que óleo de cravo na concentração de 0,625-1,25% apresentou atividade contra as cepas. Vale ressaltar que a amostra NC HEA, que não possui bioativo em sua composição, apresentou atividade na concentração de 0,78%, que presumivelmente pode ser atribuída a interações de natureza hidrofóbica entre os grupos poliuretano das nanocápsulas (LAM et al., 2018).

O resultado obtido para o óleo do cravo extraído, cujo concentração mínima inibitória foi de 1,25% para a cepa *C. krusei*, apresentou divergência com o obtido por (RAJKOWSKA; KUNICKA-STYCZYŃSKA; MAROSZYŃSKA., 2017), que em estudo

realizado com a mesma cepa, obteve resultados entre 0,06% e 0,120%, sendo essa divergência justificada pela diferença verificada na composição do óleo de cravo dos ensaios. Similar comportamento pode ser constatado quando se analisa o resultado do óleo frente a *c.parapsopolis* que em trabalho realizado por (RAJKOWSKA; NOWICKA-KRAWCZYK; KUNICKA-STYCZYŃSKA, 2019), verificou resultados de 0,25% de CIM, que apresentam-se diferentes dos resultados obtidos nesse trabalho, devido a diferença na composição do óleo de cravo.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos para os bioativos caracterizados, pode-se inferir que o OEC é constituído majoritariamente por eugenol e  $\beta$ -cariofileno, compostos responsáveis pelas propriedades antifúngica, no qual o primeiro composto citado é encontrado em maior percentual no óleo extraído, que foi caracterizado por FT-IR e RMN, onde verificou-se bandas e sinais oriundas dos compostos majoritários, corroborando com o CG-EM. Para o lapachol, o mesmo apresentou índice de pureza acima de 95%, conforme a técnica CLAE, tendo sua estrutura confirmada por FT-IR e RMN.

A partir dos resultados obtidos, pode-se inferir que as nanocápsulas sintetizadas *via* múltipla nanoemulsão foram formadas, haja vista a formação de bandas referentes a poliuretana no infravermelho e a visualização da morfologia “*core-shell*” através do MEV. Com base nos mesmos conclui-se que as nanocápsulas sintetizadas apresentaram raio hidrodinâmico em escala nanométrica, já que os valores ficaram entre 50 a 500 nm, enquanto que em termos de carga líquida na superfície da partícula, medida pelo potencial zeta, os sistemas se mostraram moderadamente estáveis.

Quanto a eficiência de encapsulamento, os sistemas reteram 76,89% da massa de óleo do cravo e 73,47% de lapachol. Com base na eficiência de encapsulamento dos sistemas foi realizado os ensaios de liberação, onde a nanocápsula contendo lapachol liberou 47,56% em 24 horas. Adicionalmente ao compararmos o perfil de liberação do fármaco e do sistema nota-se que as nanocápsulas fornecem perfil de liberação sustentada, uma vez que os percentuais de liberação são inferiores aos do ativo livre.

A partir dos dados obtidos da liberação, inferiu-se que a concentração de fármaco não interfere no perfil de liberação do mesmo, pois sua difusão seguiu cinética de Zero Ordem. Além disso o fármaco encapsulado obedeceu ao modelo cinético de Peppas, que descreve a liberação do ativo como sendo resultante do intumescimento e posterior erosão do polissacarídeo, fazendo com que o lapachol encapsulado seja liberado.

O óleo de cravo extraído bem como as nanocápsulas branco e com OEC, apresentaram atividade contra as cepas ATCC<sup>®</sup> *C. parapsilosis* 22019 e ATCC<sup>®</sup> *C. krusei* 6258, dentro das concentrações testadas, mostrando a eficácia do ativo, bem como dos sistemas de encapsulamento de potencializar propriedade antifúngica do fármaco em questão. Esse resultado abre perspectiva para estudos mais aprofundados acerca dessa atividade antifúngica.

A partir dos resultados obtidos, conclui-se que os sistemas nanoencapsulados



sintetizados foram eficientes, no que tange a retenção e liberação controlada do mesmo. Desta forma, as nanocápsulas carreadoras de ativo em função de seu tamanho de partícula e das propriedades biológicas dos fármacos encapsulados, apresentam potencial aplicação das mesmas por *via* oral, utilizando assim os sistemas na forma de suspensão.

## REFERÊNCIAS

- AFFONSO, R. S.; RENNÓ, M. N.; SLANA, G. B. C. A.; FRANÇA, T. C. C. Aspectos químicos e biológicos do óleo essencial de cravo da Índia. **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro, v. 4, n. 2, p. 146-161, 2012. DOI 10.5935/1984-6835.20120012.
- AMANI, A.; YORK, P.; CHRYSTYN, H.; CLARK, B. J. Evaluation of a Nanoemulsion-Based Formulation for Respiratory Delivery of Budesonide by Nebulizers. **AAPS PharmSciTech**, Bradford, v. 11, n. 3, p. 1147–1151, 2010. DOI 10.1208/s12249-010-9486-9.
- AL-BURTAMANI, S. K. S.; FATOPE, M. O.; MARWAH, R. G.; ONIFADE, A. K.; AL-SAIDI, S. H. Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of the essential oil of *Haplophyllum tuberculatum* from Oman. **Journal of Ethnopharmacology**, Mascate, v. 96, n. 1–2, p. 107–112, 2005. DOI 10.1016/j.jep.2004.08.039.
- ANTONELLO, A.; JAKOB, G.; DOLCET, P.; MOMPER, R.; KOKKINOPOULOU, M.; LANDFESTER, K.; MUÑOZ-ESPÍ, R.; GROSS, S. Synergy of Miniemulsion and Solvothermal Conditions for the Low-Temperature Crystallization of Magnetic Nanostructured Transition-Metal Ferrites. **Chemistry of Materials**, Mainz, v. 29, n. 3, p. 985–997, 2017. DOI 10.1021/acs.chemmater.6b03467.
- ANTUNES, R. M. P.; LIMA, E. O.; PEREIRA, M. S. V.; CAMARA, C. A.; ARRUDA, T. A.; CATÃO, R. M. R.; BARBOSA, T. P.; NUNES, X. P.; CELIDARQUE S. DIAS, T. M. S. S. . Artigo concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Campina Grande, v. 16, n. 4, p. 517–524, 2006. DOI 10.1590/S0102-695X2006000400014.
- BAIER, G.; BAUMANN, D.; SIEBERT, M.; MUSYANOVYCH, A.; MAILA, V.; LANDFESTER, K. Suppressing Unspecific Cell Uptake for Targeted Delivery Using Hydroxyethyl Starch Nanocapsules. **Biomacromolecules**, Mainz, v. 13, n. 9, p. 2704-2715, 2012. DOI 10.1021/bm300653v.
- BAIER, G.; MUSYANOVYCH, A.; DASS, M.; THEISINGER, S.; LANDFESTER, K. Cross-linked starch capsules containing dsDNA prepared in inverse miniemulsion as “nanoreactors” for polymerase chain reaction. **Biomacromolecules**, Mainz, v. 11, n. 4, p. 960–968, 2010. DOI 10.1021/bm901414k.
- BARBOSA, J. S.; NETO, D. M. A.; FREIRE, R. M.; ROCHA, J. S.; FECHINE, L. M. U. D.; DENARDIN, J. C.; VALENTINI, A.; DE ARAÚJO, T. G.; MAZZETTO, S. E.; FECHINE, P. B. A. Ultrafast sonochemistry-based approach to coat TiO<sub>2</sub> commercial particles for sunscreen formulation. **Ultrasonics Sonochemistry**, Fortaleza, v. 48, n. April, p. 340–348, 2018. DOI 10.1016/j.ultsonch.2018.06.015.
- BRABAZON, D.; RAFFER, A. Advanced Characterization Techniques for Nanostructures. **Emerging Nanotechnologies for Manufacturing**, Dublin, p. 59–91, 1 jan. 2010. DOI 10.1016/B978-0-8155-1583-8.00003-X.
- BOUYER, E.; GHOZLENE, M.; VÉRONIQUE, R.; GROSSIORD, J. L.; FLORENCE, A. Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field? **International Journal of Pharmaceutics**,

Paris, v. 436, n. 1-2, p. 359-378, 2012. DOI 10.1016/J.IJPHARM.2012.06.052.

**Brasil. Farmacopeia Brasileira**, v. 1, p. 1–523, 2010. Disponível em: <http://antigo.anvisa.gov.br>. acesso em: 26 Mar. 2019.

CANO-SARMIENTO, C.; TÉLLEZ-MEDINA, D. I.; VIVEROS-CONTRERAS, R.; CORNEJO-MAZÓN, M.; FIGUEROA-HERNÁNDEZ, C. Y.; GARCÍA-ARMENTA, E.; ALAMILLA-BELTRÁN, L.; GARCÍA, H. S.; GUTIÉRREZ-LÓPEZ, G. F. Zeta Potential of Food Matrices. **Food Engineering Reviews**, Veracruz, p. 1–26, 2018. DOI 10.1007/s12393-018-9176-z.

CHAI, K.; LU, K.; XU, Z.; TONG, Z.; JI, H. Rapid and selective recovery of acetophenone from petrochemical effluents by crosslinked starch polymer. **Journal of Hazardous Materials**, Nanning, v. 348, p. 20–28, 15 abr. 2018. DOI 10.1016/J.JHAZMAT.2018.01.034.

CHAIEB, K.; HAJLAOUI, H.; ZMANTAR, T.; KAHLA-NAKBI, A.B.; ROUABHIA, M.; MAHDOUANI, K.; BAKHROUF, A. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzigium aromaticum* L. *Myrtaceae*): a short review. **Phytother. Res.** Monastir, v. 21, n. 6, p. 501-506, 2007. DOI 10.1002/ptr.2124.

Clinical and Laboratory Standards Institute; Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard M27-A3, 3rd ed., **Wayne**, Pensilvânia, PA. 2008.

CORZO-LEÓN, D. E.; SATLIN, M. J.; SOAVE, R.; SHORE, T. B.; SCHUETZ, A. N.; JACOBS, S. E.; WALSH, T. J. Epidemiology and outcomes of invasive fungal infections in allogeneic haematopoietic stem cell transplant recipients in the era of antifungal prophylaxis: a single-centre study with focus on emerging pathogens. **Mycoses**, Cidade do México, v. 58, n. 6, p. 325–336, 2015. DOI 10.1111/myc.12318.

COSTA SILVA, R. A.; DA SILVA, C. R.; DE ANDRADE NETO, J. B.; DA SILVA, A. R.; CAMPOS, R. S.; SAMPAIO, L. S.; DO NASCIMENTO, F. B. S. A.; DA SILVA GASPAS, B.; DA CRUZ FONSECA, S. G.; JOSINO, M. A. A.; GRANGEIRO, T. B.; GASPAS, D. M.; DE LUCENA, D. F.; DE MORAES, M. O.; CAVALCANTI, B. C.; NOBRE JÚNIOR, H. V. In vitro anti-Candida activity of selective serotonin reuptake inhibitors against fluconazole-resistant strains and their activity against biofilm-forming isolates. **Microbial Pathogenesis**, Fortaleza, v. 107, p. 341–348, 2017. DOI 10.1016/j.micpath.2017.04.008.

CUI, G.; WANG, J.; WANG, X.; LI, W.; ZHANG, X. Preparation and Properties of Narrowly Dispersed Polyurethane Nanocapsules Containing Essential Oil via Phase Inversion Emulsification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Tianjin, v. 66, n. 41, p. 10799–10807, 2018. DOI 10.1021/acs.jafc.8b02406.

DAHAM, S. S.; TABANA, Y. M.; AHAMED, M. B. K.; MAJID, A. M. S. A. In vivo anti-inflammatory activity of  $\beta$ -caryophyllene, evaluated by molecular imaging. **Molecules & Medicinal Chemistry**, Penang, v. 1, n. 1001, p. 6p, 2016. DOI 10.14800/mmc.1001.

DANIEL, A. N.; SARTORETTO, S. M.; SCHMIDT, G.; CAPARROZ-ASSEF, S. M.;

- BERSANI-AMADO, C. A.; CUMAN, R. K. N. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of eugenol essential oil in experimental animal models. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Maringá, v. 19, n. 1 B, p. 212–217, 2009. DOI 10.1590/S0102-695X2009000200006.
- DAVOODI, M.; KAVOOSI, G.; SHAKERI, R. Preparation and characterization of potato starch-thymol dispersion and film as potential antioxidant and antibacterial materials. **International Journal of Biological Macromolecules**, Xiraz, v. 104, p. 173-179, 2017. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2017.05.145.
- DE ALMEIDA, E. R.; DA SILVA FILHO, A. A.; DOS SANTOS, E. R.; CORREIA LOPES, C. A. Antiinflammatory action of lapachol. **Journal of Ethnopharmacology**, Recife, v. 29, n. 2, p. 239–241, 1990. DOI 10.1016/0378-8741(90)90061-W.
- DEBELE, T. A.; MEKURIA, S. L.; TSAI, H. Polysaccharide based nanogels in the drug delivery system : Application as the carrier of pharmaceutical agents. **Materials Science & Engineering C**, Taipei, v. 68, p. 964–981, 2016. DOI 10.1016/j.msec.2016.05.121.
- DELARMELINA, M.; FERREIRA, G. B.; FERREIRA, V. F.; DE M. CARNEIRO, J. W. Vibrational spectroscopy of lapachol,  $\alpha$ - and  $\beta$ -lapachone: Theoretical and experimental elucidation of the Raman and infrared spectra. **Vibrational Spectroscopy**, Rio de Janeiro, v. 86, p. 311–323, 1 set. 2016. DOI 10.1016/J.VIBSPEC.2016.08.009.
- DERJAGUIN, B.; LANDAU, L. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. **Progress in Surface Science**, Moscou, v. 43, n. 1–4, p. 30–59, 1993. DOI 10.1016/0079-6816(93)90013-L.
- DEVANI, M. J.; ASHFORD, M.; CRAIG, D.Q.M. The development and characterisation of triglyceride-based ‘spontaneous’ multiple emulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, Norwich, v. 300, n. 1-2, p. 76-88, 2005. DOI 10.1016/j.ijpharm.2005.05.011.
- EPIFANO, F.; GENOVESE, S.; FIORITO, S.; MATHIEU, V.; KISS, R. Lapachol and its congeners as anticancer agents: A review. **Phytochemistry Reviews**, Chieti e Pescara, v. 13, n. 1, p. 37–49, 2014. DOI 10.1007/s11101-013-9289-1.
- EL KHAYAT, N. W.; DONIA, A. A.; MADY, O. Y.; EL MAGHRABY, G. M. Optimization of eugenol microemulsion for transdermal delivery of indomethacin. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, Tanta, v. 48, p. 311–318, 2018. DOI 10.1016/j.jddst.2018.10.006.
- FARAG, M. A.; LABIB, R. M.; NOLETO, C.; PORZEL, A.; WESSJOHANN, L. A. NMR approach for the authentication of 10 cinnamon spice accessions analyzed via chemometric tools. **LWT - Food Science and Technology**, Cairo, v. 90, n. December 2017, p. 491–498, 2018. DOI 10.1016/j.lwt.2017.12.069.
- FREITAS, J. V. B.; ALVES FILHO, E. G.; SILVA, L. M. A.; ZOCOLO, G. J.; DE BRITO, E. S.; GRAMOSA, N. V. Chemometric analysis of NMR and GC datasets for chemotype characterization of essential oils from different species of *Ocimum*. **Talanta**, Fortaleza, v. 180, n. October 2017, p. 329–336, 2018. DOI 10.1016/j.talanta.2017.12.053.
- FONSECA, S. G. C.; SILVA, L. B. L. da; CASTRO, R. F.; SANTANA, D. P. de. Validação de metodologia analítica para doseamento de soluções de lapachol por CLAE. **Química Nova**,

Fortaleza, v. 27, n. 1, p. 157–159, fev. 2004. DOI 10.1590/S0100-40422004000100026.

GARTI, N.; BENICHO, A. Double emulsions for controlled-release applications progress and trends. **Sjoblom J, editor. Encyclopedia handbook of emulsion technology. New York: Marcel Dekker; Nova Iorque, p. 377- 407, 2001.**

GONZÁLEZ-RIVERA, J.; DUCE, C.; FALCONIERI, D.; FERRARI, C.; GHEZZI, L.; PIRAS, A.; TINE, M. R. Coaxial microwave assisted hydrodistillation of essential oils from five different herbs (lavender, rosemary, sage, fennel seeds and clove buds): Chemical composition and thermal analysis. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Pisa, v. 33, p. 308–318, 2016. DOI 10.1016/j.ifset.2015.12.

GRADISHAR, W. J. Albumin-bound paclitaxel: a next-generation taxane. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, Chicago, v. 7, n. 8, p. 1041–1053, 2006. DOI 10.1517/14656566.7.8.1041

GUL, R.; UMER, S.; AHMAD, M.; MUKHTIAR, M. Formulation of Hedera helix L. in Topical Dosage Forms: In Vitro and Ex Vivo Evaluation. **Dissolution Technologies**, Quetta May, p. 1–6, 2018. DOI 10.14227/DT250218P40.

HAN, S. B.; KWON, S. S.; JEONG, Y. M.; YU, E. R.; PARK, S. N. Physical characterization and in vitro skin permeation of solid lipid nanoparticles for transdermal delivery of quercetin. **International Journal of Cosmetic Science**, Seul, v. 36, n. 6, p. 588–597, 2014. Disponível em: 10.1111/ics.12160

HOSSEINI, S. M.; HOSSEINI, H.; MOHAMMADIFAR, M. A.; MORTAZAVIAN, A. M.; MOHAMMADI, A.; KHOSRAVI-DARANI, K.; SHOJAEE-ALIABADI, S.; DEHGHAN, S.; KHAKSAR, R. Incorporation of essential oil in alginate microparticles by multiple emulsion/ionic gelation process. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 62, p. 582–588, Teerã: 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.09.054>>.

HUNTER, R. Zeta potential in colloid science: principles and applications. **Academic press**, Sydney: 2013, DOI 10.1016/B978-0-12-361961-7.50004-3.

HUSSAIN, H.; KROHN, K.; AHMAD, U.; MIANA, A. Lapachol : an overview. **Arkivok**, Paderborn, v. 2, p. 145–171, 2007. DOI 10.3998/ark.5550190.0008.204.

HUSSEIN, G.; MIYASHIRO, H.; NAKAMURA, N.; HATTORI, M.; KAKIUCHIN, N.; SHIMOTOHNO, K. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 14, n. 7, p. 510-516, 2000.

HWANG, J.Y.; HA, H.K.; LEE, M.R.; KIM, J. W.; KIM, H.J.; LEE, W.J. Physicochemical Property and Oxidative Stability of Whey Protein Concentrate Multiple Nanoemulsion Containing Fish Oil. **Journal of Food Science**, Gyeongsang do Sul, v. 82, n. 2, p. 437-444, 1 2017. DOI 10.1111/1750-3841.13591.

IVANOVA, N.; STEFANOVA, T.; ILIEV, I.; STOYANOV, G. S.; BRATOEVA, K. Kinetic Modeling on Amide Hydrolysis, Drug Release and Mucosal Permeation of Indomethacin in the Composition of Selected Semisolid Vehicles. **Journal of IMAB - Annual Proceeding (Scientific Papers)**, Varna, v. 24, n. 4, p. 2303–2312, 2018. DOI 10.5272/jimab.2018244.2303.

- JIMÉNEZ, M.; DOMÍNGUEZ, J. A.; PASCUAL-PINEDA, L. A.; AZUARA, E.; BERISTAIN, C. I. Elaboration and characterization of O/W cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) and black pepper (*Piper nigrum*) emulsions. **Food Hydrocolloids**, Veracruz, v. 77, p. 902–910, 2018. DOI 10.1016/j.foodhyd.2017.11.037.
- KANG, B.; OKWIEKA, P.; SCHÖTTLER, S.; SEIFERT, O.; KONTERMANN, R. E.; PFIZENMAIER, K.; MUSYANOVYCH, A.; MEYER, R.; DIKEN, M.; SAHIN, U.; MAILÄNDER, V.; WURM, F. R.; LANDFESTER, K. Tailoring the stealth properties of biocompatible polysaccharide nanocontainers. **Biomaterials**, Mainz, v. 49, p. 125–134, 2015. DOI 10.1016/j.biomaterials.2015.01.042.
- KHLESTKIN, V. K.; PELTEK, S. E.; KOLCHANOV, N. A. Review of direct chemical and biochemical transformations of starch. **Carbohydrate Polymers**, Novosibirsk, v. 181, n. September 2017, p. 460–476, 2018. DOI 10.1016/j.carbpol.2017.10.035.
- LAM, S. J.; WONG, E. H. H.; BOYER, C.; QIAO, G. G. Progress in Polymer Science Antimicrobial polymeric nanoparticles. **Progress in Polymer Science**, Melbourne, [s. l.], v. 76, p. 40–64, 2018. DOI 10.1016/j.progpolymsci.
- LAMPMAN, P.; VYVYAN, K.; PAVIA, D. L.; KRIZ, G. S. Introduction to spectroscopy, **Cengage Learning**. Washington, v. 4, p. 700, 1973.
- LALA, R. R.; AWARI, N. G. Nanoemulsion-based gel formulations of COX-2 inhibitors for enhanced efficacy in inflammatory conditions. **Applied Nanoscience**, Mumbai, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 143–151, 2014. DOI 10.1007/s13204-012-0177-6.
- LANDFESTER, K.; MAILA, V. Nanocapsules With Specific Targeting and Release Properties Using Miniemulsion Polymerization. **Expert Opin. Drug Deliv**, Mainz, p. 1-17, 2013. DOI 10.1517/17425247.2013.772976.
- LAXMINARAYAN, R.; DUSE, A.; WATTAL, C.; ZAIDI, A. K. M.; WERTHEIM, H. F. L.; SUMPRADIT, N.; VLIEGHE, E.; HARA, G. L.; GOULD, I. M.; GOOSSENS, H.; GREKO, C.; SO, A. D.; BIGDELI, M.; TOMSON, G.; WOODHOUSE, W.; OMBAKA, E.; PERALTA, A. Q.; QAMAR, F. N.; MIR, F.; KARIUKI, S.; BHUTTA, Z. A.; COATES, A.; BERGSTROM, R.; WRIGHT, G. D.; BROWN, E. D.; CARS, O. Antibiotic resistance-the need for global solutions. **The Lancet Infectious Diseases**, Washington, [s. l.], v. 13, n. 12, p. 1057–1098, 2013. DOI 10.1016/S1473-3099(13)70318-9.
- LIMA, N. M.; CORREIA, C. S.; LEON, L. L.; MACHADO, G. M.; MADEIRA, M. de F.; SANTANA, A. E. G.; GOULART, M. O. Antileishmanial activity of lapachol analogues. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Maceió, v. 99, n. 7, p. 757–761, nov. 2004. DOI 10.1590/S0074-02762004000700017.
- LI, W.; CHEN, H.; HE, Z.; HAN, C.; LIU, S.; LI, Y. Influence of surfactant and oil composition on the stability and antibacterial activity of eugenol nanoemulsions. **LWT - Food Science and Technology**, Wuhan, v. 62, n. 1, p. 39–47, 2015. DOI 10.1016/j.lwt.2015.01.012.
- LIU, C.; LIANG, B.; WANG, Y. Core – shell nanocapsules containing essential oil for textile application. **Journal applied polymer science**, Guangzhou, v. 45695, n. Lc, p. 1–7, 2018. DOI 10.1002/app.45695.
- LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada:

polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Porto, v. 41, n. 2, p. 143–154, 2005. DOI 10.1590/S1516-93322005000200003.

MA, S.; ZHAO, Z.; LIU, P.; RECEIVED: Optimization of preparation process of  $\beta$ -cyclodextrin inclusion. **Journal of Food Measurement and Characterization**, Hainan, p. 11, 2018. DOI 10.1002/app.45695.

MAEDA, J. A.; BOVI, M. L. A.; BOVI, O. A.; DO LAGO, A. A. Craveiro-da-índia: características físicas das sementes e seus efeitos na germinação e desenvolvimento vegetativo. **Bragantia**, Campinas, v. 49, n. 1, p. 23-36, 1990. DOI 10.1590/S0006-87051990000100003.

MAGAJI RA, OKASHA MAM, ABUBAKAR MS, F. M. Anti-ulcerogenic and anti-secretory activity of the n-butanol portion of *Syzygium aromaticum* in rat. **Nigerian Journal of Pharmaceutical Research**, Zaria, v. 6, n. 2, p. 119–126, 2007.

MARKOWITZ, K.; MOYNIHAN, M.; LIU, M.; KIM, S. Biologic properties of eugenol and zinc oxide-eugenol: a clinically oriented review. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology**, Nova Iorque, v. 73, n. 6, p. 729-737, 1992. DOI 10.1016/0030-4220(92)90020-q.

MARTÍNEZ, M.J.A.; BENITO, P.B. Biological activity of quinones. **Studies in Natural Products Chemistry**, Amsterdam, Vol. 30 ed. Atta-ur-Rahman, pp. 303–366. Elsevier. Madri: 2005. DOI 10.1016/S1572-5995(05)80036-5

MARTO, J.; RUIVO, E.; LUCAS, S. D.; GONÇALVES, L. M.; SIMÕES, S.; GOUVEIA, L. F.; FELIX, R.; MOREIRA, R.; RIBEIRO, H. M.; ALMEIDA, A. J. Starch nanocapsules containing a novel neutrophil elastase inhibitor with improved pharmaceutical performance. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Lisboa, v. 127, n. February, p. 1–11, 2018. DOI 10.1016/j.ejpb.2018.01.011.

MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions : terminology , differences , and similarities. **Soft Matter**, Boston, p. 1719–1729, 2012. DOI 10.1039/c2sm06903b.

MOELLERING JR, R. C. Novos desafios no campo das doenças infecciosas. **Patógenos Emergentes nas Doenças Infecciosas: Relatório Especial Hospital Practice. Euromédice. Ed. Médicas**, p. 5-7, 2000.

MOU, D.; CHEN, H.; DU, D.; MAO, C.; WAN, J.; XU, H.; YANG, X. Hydrogel-thickened nanoemulsion system for topical delivery of lipophilic drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, Wuhan, v. 353, p. 270–276, 2008. DOI 10.1016/j.ijpharm.2007.11.051.

MYTLE, N.; ANDERSON, G. L.; DOYLE, M. P.; SMITH, M. A. Antimicrobial activity of clove (*Syzygium aromaticum*) oil in inhibiting *Listeria monocytogenes* on chicken frankfurters. **Food control**, Athens, v. 17, n. 2, p. 102-107, 2006. DOI doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.09.008.

MUSYANOVYCH, A.; SCHMITZ-WIENKE, J.; MAILÄNDER, V.; WALTHER, P.; LANDFESTER, K. Preparation of biodegradable polymer nanoparticles by miniemulsion technique and their cell interactions. **Macromolecular Bioscience**, Mainz, v. 8, n. 2, p. 127-139, 2008. DOI 10.1002/mabi.200700241

OGATA, M.; HOSHI, M.; URANO, S.; ENDO, T. Antioxidant activity of eugenol and related

monomeric and dimeric compounds. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Tóquio, v. 48, n. 10, p. 1467-1469, 2000. DOI 10.1248/cpb.48.1467.

OKSANEN, C. A.; GARCÍA MUÑOZ, S. Process modeling and control in drug development and manufacturing. **Computers and Chemical Engineering**, Nova Iorque, v. 34, n. 7, p. 1007–1008, 2010. DOI 10.1016/j.compchemeng.2010.04.013.

OLIVEIRA, M. F.; LEMOS, T. L. G.; MATTOS, M. C. DE; SEGUNDO, T. A.; SANTIAGO, G. M. P.; BRAZ-FILHO, R. New enamine derivatives of lapachol and biological activity. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Fortaleza, v. 74, n. 2, p. 211–221, jun. 2002. DOI 10.1590/S0001-37652002000200004.

PALEOS, C. M.; SIDERATOU, Z.; TSIOURVAS, D. Drug Delivery Systems Based on Hydroxyethyl Starch. **Bioconjugate Chemistry**, Atenas, v. 28, n. 6, p. 1611–1624, 2017. DOI 10.1021/acs.bioconjchem.7b00186.

PARRA, A.; MALLANDRICH, M.; CLARES, B.; EGEEA, M. A.; ESPINA, M.; GARCÍA, M. L.; CALPENA, A. C. Design and elaboration of freeze-dried PLGA nanoparticles for the transcorneal permeation of carprofen: Ocular anti-inflammatory applications. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Barcelona, v. 136, p. 935–943, 1 dez. 2015. DOI 10.1016/j.colsurfb.2015.10.026.

PEREIRA, C.; MAIA, J. Study of the antioxidant activity and essential oil from wild basil (*Ocimum gratissimum* L.) leaf. **Food Science and Technology (Campinas)**, Viçosa, v. 27, n. 3, p. 624–632, 2007. DOI 10.1590/S0101-20612007000300030

PFALLER, M. A.; ANDES, D. R.; DIEKEMA, D. J.; HORN, D. L.; REBOLI, A. C.; ROTSTEIN, C.; FRANKS, B.; AZIE, N. E. Epidemiology and Outcomes of Invasive Candidiasis Due to Non-albicans Species of *Candida* in 2,496 Patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) Registry 2004–2008. **PLOS ONE**, Iowa, v. 9, n. 7, p. e101510, 2014. DOI 10.1371/journal.pone.0101510.

PINTO, E.; VALE-SILVA, L.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. **Journal of Medical Microbiology**, Porto, v. 58, n. 11, p. 1454–1462, 2009. DOI 10.1099/jmm.0.010538-0.

PLATA-RUEDA, A.; CAMPOS, J. M.; DA SILVA ROLIM, G.; MARTÍNEZ, L. C.; DOS SANTOS, M. H.; FERNANDES, F. L.; SERRÃO, J. E.; ZANUNCIO, J. C. Terpenoid constituents of cinnamon and clove essential oils cause toxic effects and behavior repellency response on granary weevil, *Sitophilus granarius*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Viçosa, v. 156, n. March, p. 263–270, 2018. DOI 10.1016/j.ecoenv.2018.03.033.

PORTILLO, A.; VILA, R.; FREIXA, B.; ADZET, T.; CAÑIGUERAL, S. Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, Barcelona, v. 76, n. 1, p. 93–98, 1 jun, 2001. DOI 10.1016/s0378-8741(01)00214-8.

PRAMANIK, S. K.; SENECA, S.; PETERS, M.; D'OLIESLAEGER, L.; REEKMANS, G.; VANDERZANDE, D.; ADRIAENSENS, P.; ETHIRAJAN, A. Morphology-dependent pH-responsive release of hydrophilic payloads using biodegradable nanocarriers. **RSC Advances**, Diepenbeek, v. 8, n. 64, p. 36869–36878, 2018. DOI 10.1039/C8RA07066K.



- RANTANEN, J.; KHINAST, J. The Future of Pharmaceutical Manufacturing Sciences. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Copenhagen, v. 104, n. 11, p. 3612–3638.2015. DOI 10.1002/jps.24594.
- RAVELO, Á. G.; ESTÉVEZ-BRAUN, A.; PÉREZ-SACAU, E. The chemistry and biology of lapachol and related natural products  $\alpha$  and  $\beta$ -lapachones. **Studies in Natural Products Chemistry**, Tenerife, v. 29, n. PART J, p. 719–760, 2003. DOI 10.1016/S1572-5995(03)80017-0.
- RAVIADARAN, R.; CHANDRAN, D.; SHIN, L. H.; MANICKAM, S. Optimization of palm oil in water nano-emulsion with curcumin using microfluidizer and response surface methodology. **Lwt**, Selangor, v. 96, n. May, p. 58–65, 2018. DOI 10.1016/j.lwt.2018.05.022.
- RAJKOWSKA, K.; KUNICKA-STYCZYŃSKA, A.; MAROSZYŃSKA, M. Selected Essential Oils as Antifungal Agents Against Antibiotic-Resistant *Candida* spp.: In Vitro Study on Clinical and Food-Borne Isolates. **Microbial Drug Resistance**, Łódź, v. 23, n. 1, p. 18–24, 2017. DOI 10.1089/mdr.2016.0001.
- RAJKOWSKA, K.; NOWICKA-KRAWCZYK, P.; KUNICKA-STYCZYŃSKA, A. Effect of Clove and Thyme Essential Oils on *Candida* Biofilm Formation and the Oil Distribution in Yeast Cells. **Molecules**, Łódź, v. 24, n. 10, p. 1954, 2019. DOI 10.3390/molecules24101954.
- RODRIGUES, F. V. S.; DINIZ, L. S.; SOUSA, R. M. G.; HONORATO, T. D.; SIMÃO, D. O.; ARAÚJO, C. R. M.; GONÇALVES, T. M.; ROLIM, L. A.; GOTO, P. L.; TEDESCO, A. C.; SIQUEIRA-MOURA, M. P. Preparation and characterization of nanoemulsion containing a natural naphthoquinone. **Quimica Nova**, Petrolina, v. 41, n. 7, p. 756–761, 2018. DOI 10.21577/0100-4042.20170247.
- SAADATMAND, M. M.; YAZDANSHENAS, E. M.; KHAJAVI, R.; MIGHANI, F.; TOLIYAT, T. Patterning the surface roughness of a nano fibrous scaffold for transdermal drug release. **International Journal of Nano Dimension**, Yazd, v. 10, n. 1, p. 78–88, 2019. DOI 20.1001.1.20088868.2019.10.1.7.8.
- SAB, B. A.; JACOB, J.; MANJUNATH, G. G.; SINGH, V. K. Cyclooolivil , a lignan from the roots of *Stereospermum suaveolens*. **Pharmacognosy research**, Karnataka, v. 7, n. 1, p. 45–49, 2015. DOI 10.4103/0974-8490.147198.
- SANTANA, C. F.; SILVA, A. A. F. Primeiras observações com o emprego de lapachol em pacientes humanos portadores de neoplasias malignas. **Revista do Instituto de Antibióticos**, Recife, v. 20, p. 61, 1980.
- SEBAALY, C.; JRAIJ, A.; FESSI, H.; CHARCOSSET, C.; GREIGE-GERGES, H. Preparation and characterization of clove essential oil-loaded liposomes. **Food Chemistry**, Beirute, v. 178, p. 52–62, 2015. DOI 10.1016/j.foodchem.2015.01.067.
- SEGOLONI, E.; DI MARIA, F. UV–VIS spectral and GC–MS characterization of *Handroanthus serratifolius* (Vahl.) Grose (a.k.a. *Tabebuia serratifolia* (Vahl.) Nichols/Lapacho) heartwood main extractives: a comparison of protocols aimed at a practical evaluation of Lapachol and Dehydro- $\alpha$ -Lapachone content. **European Journal of Wood and Wood Products**, Perugia, v. 76, n. 5, p. 1547–1561, 2018. DOI 10.1007/s00107-018-1331-y.
- SHAH, N.; MEWADA, R. K.; MEHTA, T. Crosslinking of starch and its effect on viscosity

behaviour. **Reviews in Chemical Engineering**, Chandlodiya, v. 32, n. 2, p. 265-270, 2016. DOI 10.1515/revce-2015-0047.

SHARMA, S. K.; VERMA, D. S.; KHAN, L. U.; KUMAR, S.; KHAN, S. B. Handbook of Materials Characterization. Cham, Switzerland: © **Springer International Publishing AG**, Cham, 2018. DOI 10.1007/978-3-319-92955-2.

SHUKRI, R.; MOHAMED, S.; MUSTAPHA, N. M. Cloves protect the heart, liver and lens of diabetic rats. **Food Chemistry**, Seri Kembangan, v. 122, n. 4, p. 1116–1121, 2010. DOI 10.1016/j.foodchem.2010.03.094.

SIGWARD, E.; MIGNET, N.; RAT, P.; DUTOT, M.; MUHAMED, S.; GUIGNER, J. M.; SCHERMAN, D.; BROSSARD, D.; CRAUSTE-MANCIET, S. Formulation and cytotoxicity evaluation of new self-emulsifying multiple W/O/W nanoemulsions. **International Journal of Nanomedicine**, Paris, v. 8, p. 611–625, 2013. DOI 10.2147/IJN.S35661.

SILVA, L. B. L.; SANTANA, D. P. de; CASTRO, R. F. VALIDATION OF THE ANALYTICAL METHODOLOGY FOR EVALUATION OF LAPACHOL IN SOLUTION BY HPLC. **Quimica nova**, Recife: v. 27, n. 1, p. 157–159, 2004. DOI 10.1590/S0100-40422004000100026.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Silverstein - Spectrometric Identification of Organic Compounds 7<sup>th</sup> ed. Califórnia: **College of environmental Science & Forestry**, 2005.

SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.; **Farmacognosia: da planta ao medicamento** 6<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: UFRGS, 2007.

SINGH, P.; KHANDELWAL, P.; HARA, N.; ASAI, T.; FUJIMOTO, Y. Radermachol and naphthoquinone derivatives from *Tecomella undulata*: Complete <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR assignments of radermachol with the aid of computational <sup>13</sup>C shift prediction. **Indian Journal of Chemistry - Section B Organic and Medicinal Chemistry**, Jaipur, v. 47, n. 12, p. 1865–1870, 2008.

SINGH, Y.; MEHER, J. G.; RAVAL, K.; KHAN, F. A.; CHAURASIA, M.; JAIN, N. K.; CHOURASIA, M. K. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, Lucnau, v. 252, 2017. DOI 10.1016/j.jconrel.2017.03.008.

STEINMACHER, F.; BAIER, G.; MUSYANOVYCH, A.; LANDFESTER, K.; ARAÚJO, P.; SAYER, C. Design of Cross-Linked Starch Nanocapsules for Enzyme-Triggered Release of Hydrophilic Compounds. **Processes**, Florianópolis, v. 5, n. 2, p. 25, 2017. DOI 10.3390/pr5020025.

STURESSON, C.; WIKINGSSON, L. D. Comparison of poly (acryl starch) and poly (lactide-co-glycolide) microspheres as drug delivery system for a rotavirus vaccine. **Journal of controlled release**, Reims, v. 68, n. 3, p. 441-450, 2000. DOI 10.1016/j.ijpharm.2005.09.035.

TABOSA, M. A. M.; ANDRADE, A. R. B. de; LIRA, A. A. M.; SARMENTO, V. H. V.; SANTANA, D. P. de; LEA, L. B. Microemulsion formulations for the transdermal delivery of lapachol. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Recife, v. 19, n. 4, p. 1837–1846,

2018. DOI 10.1208/s12249-018-0995-2.

TAN, S.; STANSLAS, J.; BASRI, M.; ABEDI KARJIBAN, R.; KIRBY, B.; SANI, D.; BIN BASRI, H. Nanoemulsion-based Parenteral Drug Delivery System of Carbamazepine: Preparation, Characterization, Stability Evaluation and Blood-Brain Pharmacokinetics. **Current Drug Delivery**, Seri Kembangan, v. 12. P 705-804, 2010. Disponível em: 10.2174/1567201812666150901112544.

TASCINI, C.; SOZIO, E.; CORTE, L.; SBRANA, F.; SCARPARO, C.; RIPOLI, A.; BERTOLINO, G.; MERELLI, M.; TAGLIAFERRI, E.; CORCIONE, A.; BASSETTI, M.; CARDINALI, G.; MENICHETTI, F. The role of biofilm forming on mortality in patients with candidemia: a study derived from real world data. **Infectious Diseases**, , v. 50, n. 3, p. 214–219, Pisa: 2018. DOI 10.1080/23744235.2017.1384956.

VAZIRIAN, M.; HAMIDIAN, K.; NOOROLLAH, M.; MANAYI, A.; SAMADI, N. Enhancement of Antibiotic Activity and Reversal of Resistance in Clinically Isolated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus by Trachyspermum ammi Essential Oil. **Research Journal of Pharmacognosy**, Teerã, v. 6, n. 1, p. 1–10, 2019. DOI 10.22127/rjp.2018.80365.

VIEIRA, D. B.; GAMARRA, L. F. Advances in the use of nanocarriers for cancer diagnosis and treatment Avanços na utilização de nanocarreadores no tratamento e no diagnóstico de câncer. **Einstein (São Paulo)**, São Paulo, v. 14, n. 55 11, p. 99–103, 2016. DOI 10.1590/S1679-45082016RB3475.

VITERI JUMBO, L. O.; HADDI, K.; FARONI, L. R. D.; HELENO, F. F.; PINTO, F. G.; OLIVEIRA, E. E. Toxicity to, oviposition and population growth impairments of Callosobruchus maculatus exposed to clove and cinnamon essential oils. **PloS one**, Viçosa, v. 13, n. 11, p. e0207618, 2018. DOI 10.1371/journal.pone.0207618.

WAITZ, T.; KAZYKHANOV, V.; KARNTHALER, H. P. Martensitic phase transformations in nanocrystalline NiTi studied by TEM. **Acta Materialia**, Viena, v. 52, p. 137–147, 5 jan. 2004. DOI 10.1016/j.actamat.2003.08.036.

WAN, J.; ZHONG, S.; SCHWARZ, P.; CHEN, B.; RAO, J. Physical properties, antifungal and mycotoxin inhibitory activities of five essential oil nanoemulsions: Impact of oil compositions and processing parameters. **Food Chemistry**, Fargo, v. 291, p. 199–206, 2019. DOI 10.1016/j.foodchem.2019.04.032.

ZHANG, M.; NOWAK, M.; MALO DE MOLINA, P.; ABRAMOVITCH, M.; SANTIZO, K.; MITRAGOTRI, S.; HELGESON, M. E. Synthesis of Oil-Laden Poly(ethylene glycol) Diacrylate Hydrogel Nanocapsules from Double Nanoemulsions. **Langmuir**, Santa Barbara, v. 33, n. 24, p. 6116–6126, 2017. DOI 10.1021/acs.langmuir.7b01162.

ZHAO, J.; ZHANG, Y.; WU, Y.; LIU, L.; OUYANG, J. Physicochemical properties and in vitro digestibility of starch from naturally air-dried chestnut. **International Journal of Biological Macromolecules**, Pequim, v. 117, p. 1074–1080, 2018. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2018.06.034.

ZHENG, G. Q.; KENNEY, P. M.; LAM, L. K. T. Sesquiterpenes from clove (Eugenia caryophyllata) as potential anticarcinogenic agents. **Journal of natural products**, Mineápolis, v. 55, n. 7, p. 999-1003, 1992. DOI 10.1021/np50085a029.