



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

**SARAH BRENDA FERREIRA DOS SANTOS**

**SÍNTESE DE NANOCÁPSULAS DE AMIDO E HIDROXIETILAMIDO *VIA***  
**MINIEMULSÃO INVERSA PARA O CARREAMENTO DE FÁRMACOS**

**FORTALEZA**  
**2019**

SARAH BRENDA FERREIRA DOS SANTOS

SÍNTESE DE NANOCÁPSULAS DE AMIDO E HIDROXIETILAMIDO *VIA*  
MINIEMULSÃO INVERSA PARA O CARREAMENTO DE FÁRMACOS

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

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

Coorientadora: Dra. Lillian Maria Uchôa Dutra Fechine

FORTALEZA

2019

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

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

---

- S238s Santos, Sarah Brenda Ferreira dos Santos.  
Síntese de nanocápsulas de amido e hidroxietilamido via miniemulsão inversa para o carreamento de fármacos / Sarah Brenda Ferreira dos Santos Santos. – 2019.  
71 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2019.  
Orientação: Profa. Dra. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo.  
Coorientação: Profa. Dra. Lillian Maria Uchôa Dutra Fechine.
1. Nanocápsulas poliméricas. 2. Amido. 3. síntese via miniemulsão. 4. Staphylococcus aureus. 5. atividade antimicrobiana. I. Título.

CDD 540

---

SARAH BRENDA FERREIRA DOS SANTOS

SÍNTESE DE NANOCÁPSULAS DE AMIDO E HIDROXIETILAMIDO *VIA*  
MINIEMULSÃO INVERSA PARA O CARREAMENTO DE FÁRMACOS

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

Aprovada em: 26/07/2019.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Maria Elenir Nobre Pinho Ribeiro  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Raimundo Rafael de Almeida  
Instituto Federal do Ceará (IFCE)

## AGRADECIMENTOS

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

Agradeço primeiramente a Deus em suas várias denominações, por sempre me acompanhar e me guiar nas minhas escolhas e jornadas de vida.

A minha musa inspiradora e o meu maior exemplo de vida: Maria Pereira dos Santos, vulgo “mainha”, por me inspirar diariamente a conquistar meus objetivos e por sempre acreditar em mim em todas as situações.

Ao Stéfano Arrais, que também é minha melhor companhia, por todo Amor que temos um pelo outro, pelo companheirismo, carinho, cuidado, por ser atualmente meu maior incentivador de sonhos e por partilhar a vida ao meu lado.

A minha irmã Elizabeth, que utilizou a convivência como principal catalisador do meu bem estar, educação e cuidado.

Ao meu amado clã, em especial a David de Paula, pela amizade e companheirismo durante minha trajetória.

Ao Vladimir Gomes, pelo companheirismo dedicado há tantos anos de irmandade.

Ao Alessandro Marinho por nossa amizade tão especial, por dividir momentos importantes.

A Karen Pâmela a quem devo minha eterna gratidão e amizade por todo companheirismo e apoio dado em momentos difíceis, por ser essa pessoa aleatória, mas que está sempre disposta a ajudar a todos.

A Prof<sup>ª</sup> Dra. Nágila Ricardo, pela orientação e acolhimento, além da estrutura fornecida, que foram basilares para a realização da pesquisa.

A Dra. Lillian Fechine pela coorientação, pelo apoio em tantos momentos importantes, pelo cuidado e carinho durante o desenvolvimento da pesquisa, por sempre estar disposta a ajudar e por acreditar no meu potencial.

Aos meus amados companheiros de pesquisa e minha família científica o LabPIM, em especial a Aiêrta e Rafael, pelo companheirismo e amizade, tão especiais. Ao Elano, Neto, Débora, Ari, Pedro, Ellen, Matheus, Alexandre e Camila pelos momentos vividos.

Ao PADETEC e LABIMAN e CEDENNA pela parceria dada durante a realização da pesquisa.

À Universidade Federal do Ceará por me proporcionar durante tantos anos de experiência a realização de me tornar uma pessoa melhor.

## RESUMO

A resistência dos microrganismos tornou-se um desafio no que tange o tratamento das patologias convencionais e o uso excessivo de antibióticos, proporcionando vários efeitos colaterais adversos e falha na dosagem clínica. Assim, o desenvolvimento de sistemas “inteligentes” de liberação de fármacos surge como uma estratégia, que visa, principalmente, minimizar os efeitos colaterais, além de potencializar a ação terapêutica dos medicamentos. A síntese de nanocápsulas à base de amido *via* miniemulsão inversa é uma alternativa potencial para formulações convencionais de fármacos, uma vez que sua morfologia *core-shell* possibilita um encapsulamento eficiente de substâncias ativas biológicas, como cloridrato de fluoxetina e troxerrutina. Estes fármacos foram caracterizados quanto à análise estrutural, térmica e de composição por FT-IR, DSC e CLAE, respectivamente. Os polissacarídeos foram caracterizados por FT-IR e GPC. Os sistemas de nanocarreadores sintetizados neste trabalho foram caracterizados por DLS para verificar o diâmetro hidrodinâmico médio, que apresentou valores entre 251 e 360 nm, além disso, os valores de potencial zeta foram superiores a -30 mV, mostrando grande estabilidade coloidal para todos sistemas. A partir da análise de FT-IR, foi possível observar bandas características da formação de ligações de poliuretano, devido à reação de poliadição. A morfologia das nanocápsulas foi avaliada por MEV e MET, onde foi possível observar a formação da estrutura *core-shell* dos sistemas. Além disso, análises de conteúdo sólido (CS%) foram realizadas, as quais apresentaram concentração em g de nanocápsulas por g de solução em porcentagem em torno de 0,13% - 0,34%. A eficiência de encapsulamento (EE) e a capacidade de carregamento (CC) apresentaram valores > 90% para EE e > 2,0% para CC, demonstrando uma estratégia de síntese ideal para aplicação em formulações farmacêuticas. Finalmente, as nanocápsulas tiveram seu potencial antibacteriano testado contra microrganismos *Staphylococcus aureus* (ATCC® 6538P™) e duas cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina, nas quais a troxerrutina livre não apresentou atividade. No entanto, as nanocápsulas com fluxetina assim como as nanocápsulas controle apresentaram atividade antibacteriana com valores de CIM na faixa de 190-95 µg / mL contra todos os microrganismos isolados.

**Palavras-chave:** nanocápsulas poliméricas; Amido; síntese *via* miniemulsão; *Staphylococcus aureus*; atividade antimicrobiana.

## ABSTRACT

The resistance of microorganisms has become a challenge considering the conventional pathologies treatment and the overusage of antibiotics, providing several adverse side effects and clinical dosage failure. Thus, the development of “smart” drug delivery systems emerges as a great strategy, principally aiming to minimize the side effects, and also to improve the therapeutic action of medications. The synthesis of starch-based nanocapsules *via* inverse miniemulsion is a potential alternative for conventional drug formulations, since their core-shell morphology enables an efficient encapsulation of biologic active substances, such as fluoxetine hydrochloride and troxerrutin. were characterized regarding structural, thermal and composition analysis by FT-IR, DSC and HPLC, respectively. The polysaccharides were characterized by FT-IR and GPC. The nanocarriers systems synthesized in this work were characterized by DLS in order to verify the average hydrodynamic diameter, which showed values between 251 and 360 nm, in addition, the values of zeta potential were higher than -30 mV, showing great colloidal stability for all systems . From FT-IR analysis, it was possible to observe bands characteristic of the formation of polyurethane linkages, due to polyaddition reaction. The morphology of the nanocapsules was evaluated by SEM and TEM, where it was possible to observe the formation of the core-shell structure of the systems. In addition, analyzes of solid content (SC%) were carried out, which presented concentration of g of nanocapsules per g of solution in percentage around 0.13% - 0.34%. The Efficiency of Encapsulation (EE) as well as the Carrying Capacity (CC) presented values >90% for EE and >2.0% for CC, demonstrating an ideal synthesis strategy for application in pharmaceutical formulations. Finally, the nanocapsules had their antibacterial potential tested against *Staphylococcus aureus* microorganisms (ATCC<sup>®</sup> 6538P<sup>™</sup>), and two clinical strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, in which free troxerrutin showed no activity. However, the control nanocapsules and nanocapsules with fluxetine presented antibacterial activity with MIC values in the range of 190-95 µg/mL against all isolated microorganisms.

**Keywords:** polymeric nanocapsules; starch; synthesis *via* miniemulsion; *Staphylococcus aureus*; antimicrobial activity.

## LISTA DE FIGURAS

|             |   |    |
|-------------|---|----|
| Figura 1 –  | Representação da estrutura molecular da Fluoxetina.....   | 14 |
| Figura 2 –  | Representação da estrutura molecular da Troxerrutina.....   | 16 |
| Figura 3 –  | Representação esquemática dos principais sistemas nanocarreadores de fármacos.....  | 18 |
| Figura 4 –  | Estrutura molecular do amido: (a) cadeia de amilose e (b) fração ramificada da amilopectina.....  | 19 |
| Figura 5 –  | Representação estrutural do hidroxietilamido.....   | 21 |
| Figura 6 –  | Representação do sistema bifásico das emulsões: (a) direta e (b) inversa..  | 22 |
| Figura 7 –  | Esquema de síntese das nanocápsulas.....  | 26 |
| Figura 8 –  | Espectro de Absorção na Região do Infravermelho para FLX e TRX.....   | 33 |
| Figura 9 –  | Termograma de Calorimetria Exploratória Diferencial das amostras: FLX e TRX.....  | 36 |
| Figura 10 – | Cromatograma dos fármacos FLX e TRX realizado pela técnica CLAE...  | 38 |
| Figura 11 – | Espectro vibracional de Infravermelho das amostras AMD e HEA.....   | 39 |
| Figura 12 – | Cromatograma de permeação em gel das amostras AMD e HEA.....  | 41 |
| Figura 13 – | Gráfico de distribuição dos diâmetros hidrodinâmicos médios de partícula das nanocápsulas.....  | 45 |
| Figura 14 – | Espectro comparativo na Região do Infravermelho, entre os polissacarídeos (HEA e AMD) e as nanocápsulas sintetizadas (NC-HEA B e NC-AMD B)..... | 48 |
| Figura 15 – | Representação esquemática da reação de polimerização entre os grupos NCO do TDI e OH dos amidos <i>via</i> miniemulsão inversa.....             | 49 |
| Figura 16 – | Imagens de MEV da nanocápsula sintetizadas: (a) escala 5 $\mu\text{m}$ e (b) escala 500 $\mu\text{m}$ .....                                     | 51 |
| Figura 17 – | Imagens de MET da nanocápsula sintetizada: (a) escala 1 $\mu\text{m}$ e (b) escala 100 nm.....  | 53 |
| Figura 18 – | Gráfico de varredura (a) e curva de calibração de FLX (b) .....   | 55 |
| Figura 19 – | Gráfico de varredura (a) e curva de calibração de TRX (b) .....   | 57 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1 – Descrição dos sistemas sintetizados.....  | 27 |
| Tabela 2 – Atribuições das bandas do espectro na região do infravermelho para FLX...   | 36 |
| Tabela 3 – Atribuições das bandas do espectro na região do infravermelho para TRX...   | 35 |
| Tabela 4 – Atribuições das bandas do espectro na região do infravermelho para AMD e HEA.....   | 40 |
| Tabela 5 – Valores de polidispersividade obtidas pela análise de GPC de AMD e HEA.   | 42 |
| Tabela 6 – Tamanho de partícula e PDI das nanocápsulas sintetizadas a partir da variação da taxa de PGPR nas formulações.....                    | 44 |
| Tabela 7 – Diâmetro hidrodinâmico e PDI das nanocápsulas sintetizadas.....   | 46 |
| Tabela 8 – Potencial zeta das nanocápsulas sintetizadas.....   | 47 |
| Tabela 9 – Atribuições das bandas espectrais na região infravermelho para as nanocápsulas sintetizadas.....                                      | 50 |
| Tabela 10 – Resultados obtidos para o teor de sólidos das nanocápsulas.....  | 54 |
| Tabela 11 – Avaliação do efeito antibacteriano das formulações de fluoxetina NC-AMD F e NC-HEA F frente a isolados de bactérias patogênicas..... | 59 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                 |  |
|-----------------|--|
| A/O             | Emulsão do tipo água em óleo   |
| AMD             | Amido  |
| AMD_US          | Solução de amido submetida ao processo de Ultrassonicação              |
| ATCC®<br>6538P™ | Cepas Clínicas de <i>Staphylococcus aureus</i>                         |
| %CC             | Capacidade de Carreamento  |
| CIM             | Concentração Inibitória Mínima   |
| CLAE            | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência                               |
| CMC             | Concentração Micelar Crítica   |
| DSC             | Calorimetria Exploratória Diferencial                                  |
| %EE             | Eficiência de Encapsulamento   |
| ELD             | Espalhamento de Luz Dinâmica   |
| FA              | Fase aquosa  |
| FLX             | Cloridrato de Fluoxetina   |
| FO              | Fase Orgânica  |
| FO1             | Fase Orgânica 1  |
| FO2             | Fase Orgânica 2  |
| FO3             | Fase Orgânica 3  |
| FTIR            | Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho                  |
| GPC             | Cromatografia de Permeação em Gel                                      |
| HEA             | Hidroxietilamido   |
| HEA_US          | Solução de hidroxietilamido submetida ao processo de Ultrassonicação   |
| IRRS            | Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina                       |
| IVC             | Insuficiência Venosa Crônica   |
| LABIMAN         | Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas              |
| LABPIM          | Laboratório de Polímeros e Inovação de Materiais                       |
| MEV             | Microscopia Eletrônica de Varredura                                    |
| MRSA®           | Cepas Clínicas de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina |
| NC AMD B        | Nanocápsula de amido   |
| NC AMD F        | Nanocápsula de amido contendo Cloridrato de Fluoxetina                 |

|           |   |
|-----------|---|
| NC AMD T  | Nanocápsula de amido contendo Troxerrutina                        |
| NC B10    | Nanocápsula com 10 % de surfactante em relação a fase aquosa      |
| NC B15    | Nanocápsula com 15 % de surfactenta em relação a fase aquosa      |
| NC B20    | Nanocápsula com 20 % de surfactenta em relação a fase aquosa      |
| NC HEA B  | Nanocápsula de hidroxietilamido                                   |
| NC HEA F  | Nanocápsula de hidroxietilamido contendo Cloridrato de Fluoxetina |
| NC HEA T  | Nanocápsula de hidroxietilamido contendo Troxerrutina             |
| NLSs      | Nanopartículas Lipídicas Sólidas                                  |
| O/A       | Emulsão do tipo óleo em água                                      |
| PADETEC   | Parque de Desenvolvimento Tecnológico UFC                         |
| PDI       | Índice de Polidispersividade                                      |
| PGPR      | Polirricinoleato de Poliglicerol                                  |
| P $\zeta$ | Potencial Zeta  |
| SDS       | Dodecil Sulfato de Sódio  |
| TDI       | 2,4-tolueno Diisocianato  |
| TRX       | Troxerrutina  |
| TS%       | Teor de Sólidos   |
| UV VIS    | Espectroscopia de Absorção na região do Ultravioleta              |

## SUMÁRIO

|              |  |           |
|--------------|--|-----------|
| <b>1</b>     | <b>INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>13</b> |
| <b>1.1</b>   | <b>Fármacos.....</b>   | <b>14</b> |
| <b>1.1.1</b> | <b><i>Cloridrato de Fluoxetina.....</i></b>  | <b>14</b> |
| <b>1.1.2</b> | <b><i>Troxerrutina.....</i></b>  | <b>15</b> |
| <b>1.2</b>   | <b>Sistemas nanocarreadores de fármacos.....</b>   | <b>17</b> |
| <b>1.3</b>   | <b>Amido.....</b>  | <b>18</b> |
| <b>1.4</b>   | <b>Síntese em miniemulsão.....</b>   | <b>21</b> |
| <b>2</b>     | <b>OBJETIVOS.....</b>  | <b>24</b> |
| <b>2.1</b>   | <b>Objetivo geral.....</b>   | <b>24</b> |
| <b>2.2</b>   | <b>Objetivos específicos.....</b>  | <b>24</b> |
| <b>3</b>     | <b>METODOLOGIA.....</b>  | <b>25</b> |
| <b>3.1</b>   | <b>Materiais.....</b>  | <b>25</b> |
| <b>3.2</b>   | <b>Métodos.....</b>  | <b>25</b> |
| <b>3.2.1</b> | <b><i>Síntese das nanocápsulas via miniemulsão inversa.....</i></b>  | <b>25</b> |
| <b>3.3</b>   | <b>Caracterizações.....</b>  | <b>27</b> |
| <b>3.3.1</b> | <b><i>Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR).....</i></b>                              | <b>27</b> |
| <b>3.3.2</b> | <b><i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....</i></b>   | <b>28</b> |
| <b>3.3.3</b> | <b><i>Cromatografia de Permeação em Gel (GPC).....</i></b>   | <b>28</b> |
| <b>3.3.4</b> | <b><i>Tamanho de partícula, índice de polidispersividade e potencial zeta.....</i></b>                       | <b>29</b> |
| <b>3.3.5</b> | <b><i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....</i></b>   | <b>29</b> |
| <b>3.3.6</b> | <b><i>Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....</i></b>   | <b>30</b> |
| <b>3.4</b>   | <b>Teor de sólidos.....</b>  | <b>30</b> |
| <b>3.5</b>   | <b>Eficiência de encapsulamento e capacidade de carregamento dos ativos..</b>                                | <b>30</b> |
| <b>3.6</b>   | <b>Teste de atividade antimicrobiana.....</b>  | <b>31</b> |
| <b>4</b>     | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>   | <b>33</b> |
| <b>4.1</b>   | <b>Caracterizações dos Fármacos.....</b>   | <b>33</b> |
| <b>4.1.1</b> | <b><i>Espectroscopia de Absorção na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR).....</i></b> | <b>33</b> |
| <b>4.1.2</b> | <b><i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....</i></b>   | <b>37</b> |
| <b>4.2</b>   | <b>Caracterizações dos polissacarídeos.....</b>  | <b>39</b> |
| <b>4.2.1</b> | <b><i>Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com</i></b>                                      |           |

|         |  |    |
|---------|--|----|
|         | <i>Transformada de Fourier (FT-IR)</i> .....   | 39 |
| 4.2.2   | <i>Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)</i> .....   | 40 |
| 4.3     | <b>Caracterizações das Nanocápsulas</b> .....  | 43 |
| 4.3.1   | <i>Tamanho de partícula, índice de polidispersividade e potencial zeta</i> .....                       | 43 |
| 4.3.1.1 | <i>Tamanho de partícula e índice de polidispersividade</i> .....                                       | 43 |
| 4.3.1.2 | <i>Potencial Zeta</i> .....  | 46 |
| 4.3.2   | <i>Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)</i> ..... | 48 |
| 4.3.3   | <i>Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)</i> .....   | 51 |
| 4.3.4   | <i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i> .....   | 53 |
| 4.3.5   | <i>Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)</i> .....   | 54 |
| 4.4     | <b>Teor de sólidos</b> .....   | 55 |
| 4.5     | <b>Eficiência de encapsulamento e capacidade de carreamento</b> .....                                  | 56 |
| 4.5.1   | <i>Eficiência de encapsulamento do Cloridrato de fluoxetina</i> .....                                  | 56 |
| 4.5.2   | <i>Eficiência de encapsulamento da Troxerrutina</i> .....  | 58 |
| 4.6     | <b>Teste de atividade antimicrobiana</b> .....   | 59 |
| 5       | <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....  | 62 |
|         | <b>REFERÊNCIAS</b> .....   | 63 |

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a automedicação tem se tornado um dos grandes desafios enfrentados pela medicina clínica, pois o consumo indiscriminado de fármacos remete a várias reações adversas, tais como os efeitos colaterais no organismo evidenciados pela falha na dosagem terapêutica dos medicamentos, que ocorrem devido ao padrão imprevisível de liberação do fármaco, podendo ocasionar reações de toxicidade e resistência à drogas (SAHA; DAS, 2017; STEFANO et al., 2017).

Um dos principais efeitos colaterais impulsionados pelo consumo excessivo de medicamentos é evidenciado pela incidência de microrganismos patogênicos multirresistentes frente a tratamentos com os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, tais como penicilina e cefalosporina. Ob pressão seletiva destes medicamentos, os micróbios desenvolvem resistência através de mutações dentro do genoma, resultando em adaptações que proporcionam um ambiente favorável a multiplicação mesmo com altas concentrações de fármacos (NOBRE JÚNIOR et al., 2019).

Uma das bactérias multirresistentes mais difundidas é o *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA). De acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos, as infecções causadas por MRSA apresentam os maiores índices de morbimortalidade no ambiente hospitalar sendo responsáveis por aproximadamente 80.000 doenças invasivas com 11.285 mortes associadas a bactéria em 2017. Deste modo, torna-se necessário o desenvolvimento de novas estratégias que atuem para o tratamento eficaz frente a problemática supracitada.

Nessa perspectiva, o redirecionamento de medicamentos surge como uma alternativa viável para o tratamento de doenças infecciosas, uma vez que a utilização de drogas que apresentem seu perfil farmacológico e toxicológico caracterizado, pode reduzir o tempo e também os custos financeiros para o desenvolvimento de um novo medicamento (NOBRE JÚNIOR et al., 2019). Em estudos realizados por Macedo et al., (2017) verifica-se o efeito antimicrobiano de fármacos pertencentes à classe de inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS). Estes medicamentos são descritos como potenciais agentes antimicrobianos, que podem atuar sozinhos ou associados a outros fármacos.

Outro grupo de compostos que ganhou destaque nesse tipo de abordagem, é aquele oriundo de produtos naturais, ganhando-se como destaque os flavonoides, devido as suas potenciais atividades biológicas, tais como: propriedade antioxidante, anti-inflamatória, além disso, representam uma importante fonte de agentes anti-infecciosos (HUANG et al., 2019).

No entanto, a administração destes fármacos pode ser comprometida, devido a rápida degradação enzimática que os mesmos sofrem no organismo, requerendo assim, a utilização de sistemas carreadores que minimizem tais problemáticas. Dentre estes, as nanopartículas poliméricas têm sido amplamente utilizadas, pois são sistemas capazes de fornecer liberação sustentada devido à sua versatilidade e características únicas, tais como: diferentes composições, morfologias, tamanhos reduzidos de partículas e alta área superficial, modificação da superfície, atuando inclusive no direcionamento da droga, potencializando o efeito terapêutico do fármaco em estudo (STEINMACHER et al., 2017).

Entre as diferentes técnicas para síntese de nanopartículas poliméricas, o processo de miniemulsão mostrou-se ser altamente eficaz para aplicações biomédicas. Os sistemas oriundos desta técnica apresentam propriedades que incumbem aos mesmos, o direcionamento, bem como a liberação controlada de medicamentos, potencializando assim o efeito terapêutico destes fármacos (LANDFESTER; MAILA, 2013). O presente trabalho fundamenta-se no desenvolvimento de nanocápsulas obtidas por miniemulsão com intuito de propiciar os efeitos de liberação controlada de ativos, bem como avaliar a possível atividade biológica das formulações sintetizadas.

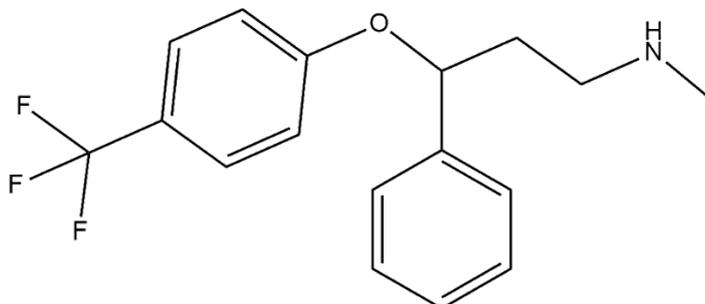
## 1.1 Fármacos

### 1.1.1 Cloridrato de Fluoxetina

O cloridrato de fluoxetina (FLX), comercialmente conhecido como Prozac<sup>®</sup> é um fármaco pertencente a classe de Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina (ISRS) clinicamente prescrito para o tratamento de uma variedade de condições patológicas relacionadas a distúrbios psicológicos tais como: depressão e ansiedade (PHAM et al., 2018), bipolaridade (BONENFANT et al., 2012), transtorno obsessivo compulsivo e doenças relativas a disfunções alimentares, como bulimia (PINTO; FERREIRA; CAVALHEIRO, 2017).

A fluoxetina cuja denominação química é ( $\pm$ )-*N*-metil-3-fenil-3-[4-(trifluorometil)fenoxi]propano-1-amina), representada pela sua estrutura na Figura 1, possui fórmula molecular  $C_{17}H_{18}F_3NO$ , com massa molecular  $309,13 \text{ g.mol}^{-1}$ . De acordo com trabalhos publicados por Carvalho Jr et al., (2018), verifica-se que a presença de um grupamento amina (secundária) no seu esqueleto molecular, confere ao fármaco a tendência de formar sais, sendo a interação iônica confirmada pela formação do cloridrato de fluoxetina. Trata-se de um composto de coloração branca, que apresenta aspecto cristalino, ponto de fusão entre  $158,4 - 158,9 \text{ }^\circ\text{C}$  e solubilidade em água de  $14 \text{ mg.mL}^{-1}$  (SWEETMAN, 2014). Comercialmente é utilizado sob a forma de uma mistura enantiomérica exibindo em sua composição os enantiômeros *R*- e *S*-, sendo último relatado em estudos de GARRIDO et al., (2009) por possuir maior proporção.

Figura 1 – Representação da estrutura molecular da Fluoxetina.



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

Compostos classificados como ISRS utilizados para o gerenciamento de patologias não infecciosas são descritos pela literatura por apresentarem atividade antimicrobiana em um grupo variado de micro-organismos (AYAZ et al., 2015). O efeito antimicrobiano do cloridrato de fluoxetina ocorre particularmente em bactérias gram-positivas, tais como *Staphylococcus*,

*Enterococcus Clostridium perfringens* e *Clostridium difficile*. São inativos contra enterobactérias com excessão de *Citrobacter spp.*, *Klebsiella pneumoniae* e *Morganella morganii* que são anaeróbias facultativas potencialmente toxigênicas e em espécies aeróbias como *Pseudomonas aeruginosa* (MACEDO et al., 2017).

Os mecanismos de ação de FLX não são completamente compreendidos, no entanto, é proposto pela literatura que a atuação do ativo ocorre pela inibição de bombas de efluxo, uma vez que agem em células humanas. Este é um mecanismo que pode evidenciar a atividade do fármaco que pode atuar sozinho ou em combinação com agentes antibióticos contra espécies bacterianas, principalmente no processo de multiplicação de cepas resistentes, onde o efeito antimicrobiano é demonstrado pela diminuição da concentração inibitória mínima (CIM), em que é observado a variação de cepas inicialmente resistentes convergindo para sensíveis, bem como, a modificação de aspectos fisiológicos relacionados com a patogenicidade dos microrganismos acima relatados (MUNOZ-BELLIDO; MUNOZ-CRIADO; GARCÌA-RODRÌGUEZ, 2000).

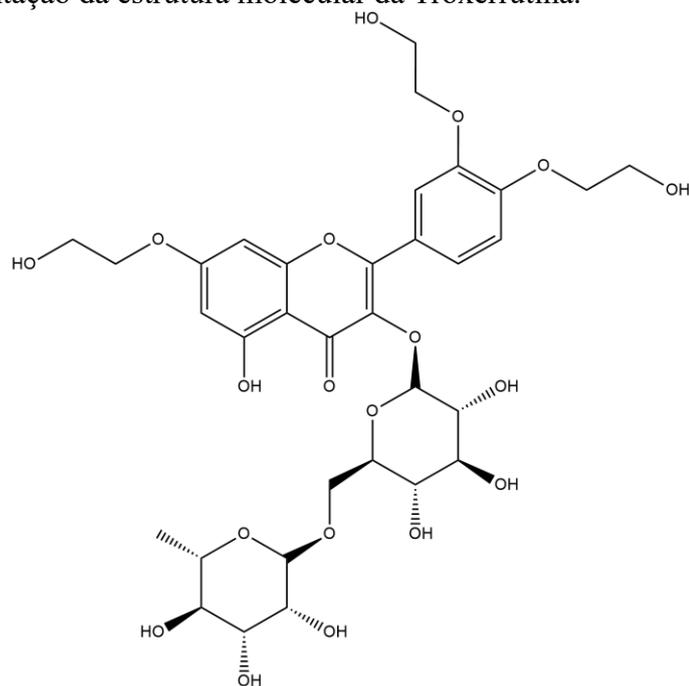
### **1.1.2 Troxerrutina**

Os flavonoides constituem uma das principais classes de metabólitos secundários das plantas, encontrados em diversos produtos alimentares, principalmente em frutas e vegetais, que apresentam estrutura polifenólica e são obtidos através da síntese de fenilpropanoides especialmente a partir do aminoácido fenilalanina (PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016). São compostos naturais amplamente distribuídos em aplicações farmacêuticas devido às suas propriedades antioxidantes, atuando no combate à formação de radicais livres, as quais causam envelhecimento (LI et al., 2019), bem como seu papel na prevenção de várias patologias, tais como câncer (RENGASAMY et al., 2019), doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, diabetes ou osteoporose (OLATUNDE et al., 2019).

A troxerrutina (TRX), conhecida trivialmente como vitamina P4, apresenta nomenclatura química 2-[3,4-bis(2-hidroxietoxi)fenil]-5-hidroxi-7-(2-hidroxietoxi)-3-[(2S, 3R, 4S, 5S, 6R)-3,4,5-trihidroxi-6-[[[(2R, 3R, 4R, 5R, 6S)-3,4,5-trihidroxi-6-metiltetrahydro-2H-piran-2-il]oximetil]tetrahydro-2H-piran-2-il]oxy-4H-cromen-4-ona, cuja representação estrutural está evidenciada na Figura 2. Este composto possui fórmula molecular  $C_{33}H_{42}O_{19}$  com massa molecular  $742,68 \text{ g.mol}^{-1}$ . Além disso, o mesmo, quando isolado, apresenta aspecto cristalino de coloração amarela e solubilidade em água a  $100 \text{ mg.mL}^{-1}$  (EUROPEAN

PHARMACOPOEIA COMMISSION, 2013). Trata-se de uma mistura semissintética de *O*-hidroxietilrutosídeos derivada do processo de trihidroxietilação da rutina (BIANCHI et al., 2018), um flavonoide de ocorrência natural extraído principalmente de duas fontes, sendo estas: *Dimorphandra gardneriana* Tul (ALVES et al., 2014) e *Sophora japonica* (TANG et al., 2019) sendo encontrado também como um dos constituintes presentes em diversos tipos de chás, é também encontrado no café, em grãos de diferentes cereais e em uma ampla variedade de frutas e vegetais (PANAT et al., 2016).

Figura 2 – Representação da estrutura molecular da Troxerrutina.



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

O fármaco TRX é tradicionalmente utilizado em aplicações terapêuticas no tratamento e prevenção de insuficiência venosa crônica (IVC) bem como, em outros distúrbios vasculares, tais como hemorróidas, microangiopatia e retinopatia diabética, sendo a administração do composto evidenciada pela eficácia e segurança, inclusive em pacientes idosos e mulheres grávidas, a qual não se apresentam efeitos colaterais (SUSAN et al., 2019). O mecanismo de atuação do bioativo ocorre principalmente no endotélio microvascular por intermédio de suas propriedades antioxidante e anti-inflamatória, reduzindo a hipermeabilidade, e conseqüentemente o edema, deste modo, favorecendo o processo de perfusão microvascular e a microcirculação (BIANCHI et al., 2018).

Tendo em vista as propriedades terapêuticas supracitadas, o bioativo tem despertado um considerável interesse em estudos biológicos, os quais, sugere-se que a troxerrutina pode atuar como agente promissor no mecanismo de neuroproteção em doenças evidenciadas no déficit cognitivo (ZHANG et al., 2017), como disfunções relacionadas a Alzheimer (BABRI et al., 2014) e doença de Parkinson (BALUCHNEJADMOJARAD; JAMALI-RAEUFY; ZABIHNEJAD, 2017). Além disso, apresenta efeitos farmacológicos significativos na prevenção quimioterápica de carcinomas, atuando sobretudo no câncer colorretal (VINOTHKUMAR et al., 2014), carcinoma hepatocelular (THOMAS et al., 2017) e associado a 5-fluorouracil no tratamento de câncer gástrico (XU; TANG, 2017).

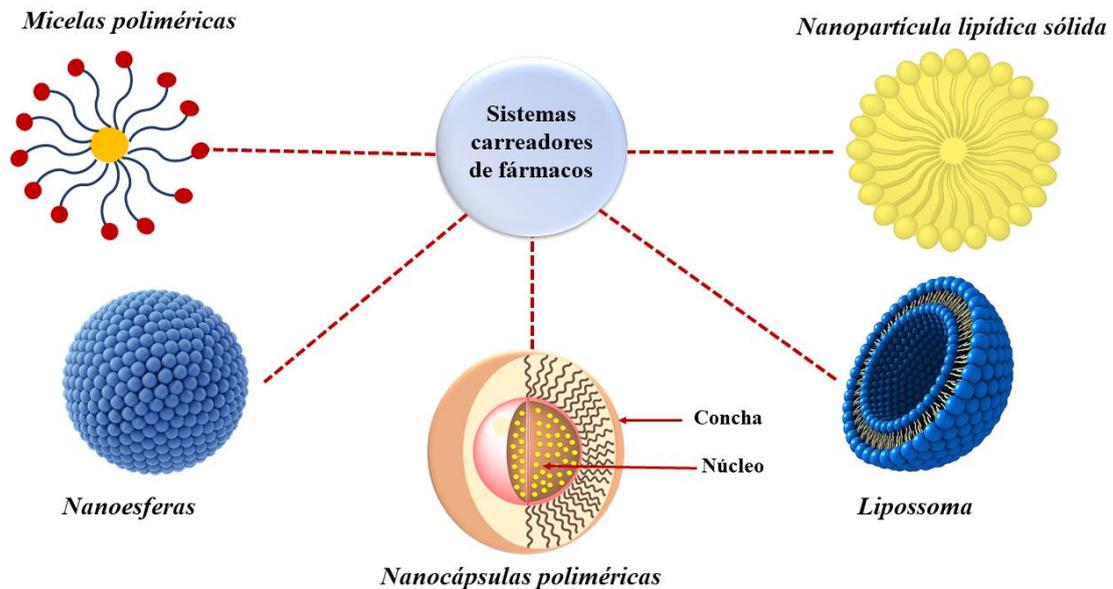
## **1.2 Sistemas nanocarreadores de fármacos**

Durante anos, os medicamentos têm sido desenvolvidos com o intuito de atender a demanda populacional, além disso, há um crescente interesse pela segurança e qualidade dos medicamentos e produtos farmacológicos, juntamente com a diminuição dos custos de produção, 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 (OKSANEN; GARCÍA MUÑOZ, 2010). Portanto, torna-se necessário a utilização de veículos que potencializem biodisponibilidade desses medicamentos e propiciem o transporte de agentes farmacêuticos para a circulação sistêmica no controle da farmacocinética, farmacodinâmica, não imunogenicidade, toxicidade não específica e bio-reconhecimento seletivo para produção de um efeito farmacológico desejado (DEBELE; MEKURIA; TSAI, 2016).

O nanocarreamento de fármacos surge no intuito de viabilizar a produção de sistemas multifuncionais que atuem no fornecimento de medicamentos, aprimorando, assim, a adequada administração e entrega eficiente de fármacos (HARWANSH; DESHMUKH; RAHMAN, 2019). Esses sistemas, conhecidos como nanocarreadores, são utilizados para reduzir a degradação prematura de fármacos e os efeitos colaterais indesejáveis de ativos citotóxicos em células normais, além disso, possuem propriedades de direcionamento específico e liberação controlada, para que assim a concentração de droga desejada seja obtida durante o período de tratamento efetivo sob índice terapêutico. Dentre estes sistemas, verifica-se que os principais nanocarreadores farmacêuticos incluem os lipossomas, micelas

poliméricas, nanopartículas lipídicas sólidas (NLSs), nanoemulsões e nanocápsulas, representados na Figura 3 (JAIN; THAREJA, 2019).

Figura 3 – Representação esquemática dos principais sistemas nanocarreadores de fármacos.



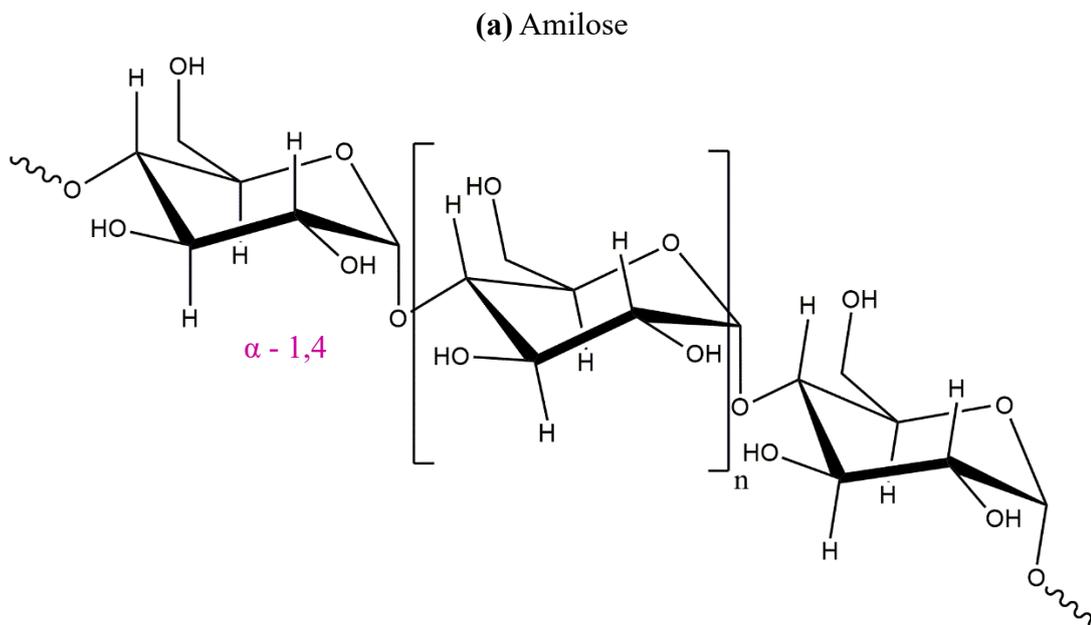
Fonte: Elaborado pela autora (2019).

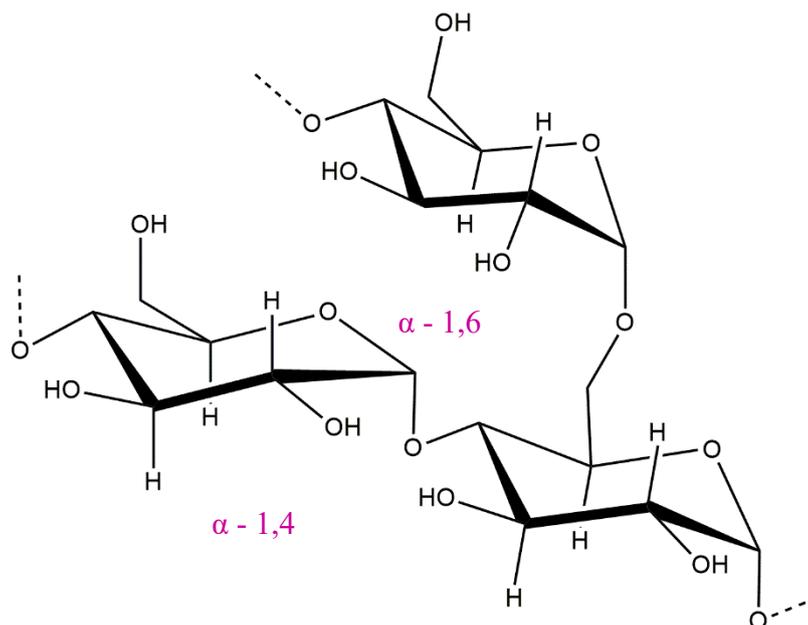
Com a finalidade de se obter uma melhor distribuição e direcionamento dos fármacos, as nanopartículas podem ter sua superfície funcionalizada ou modificada com a utilização de materiais poliméricos. Em estudos relatados por Gaikwad et al., (2019), nanocarreadores poliméricos foram considerados sistemas promissores no tratamento de neoplasias. As nanopartículas funcionalizadas promovem um aperfeiçoamento no processo de inclusão do fármaco, que é decorrente pela interação entre as cadeias poliméricas e as moléculas do medicamento, conferindo um aprimoramento na eficácia no sistema, além disso, os nanocarreadores oferecem inúmeras vantagens, dentre as quais, pode-se destacar a proteção do fármaco frente ao meio fisiológico, como a degradação enzimática além da facilidade na preparação com o uso de polímeros biodegradáveis (GEORGE; SHAH; SHRIVASTAV, 2019).

### 1.3 Amido

O amido é um polissacarídeo utilizado na dieta humana e representa uma das fontes mais abundantes de carboidratos presentes nas plantas, que pode ser obtido a partir de cereais, raízes, tubérculos, vegetais e frutas imaturas (MINAKAWA; FARIA-TISCHER; MALI, 2019). O biopolímero, representado na Figura 4, é definido pela mistura de dois diferentes tipos de frações polissacarídicas, amilose e amilopectina, ambos formados por unidades de  $\alpha$ -D-glicose unidas por ligações glicosídicas  $\alpha$  (1,4) que representa a porção linear, ou seja a amilose, e  $\alpha$  (1,6) nos pontos de ramificações inerentes a presença de amilopectina na composição do polissacarídeo, que pode representar entre 5-6 % das ligações desse tipo nas cadeias ramificadas (TAO et al., 2019). Em estudos relatados por Zhu et al. (2017), o amido apresenta-se na forma de grânulos semicristalinos, com diâmetros que variam de 2 a 100  $\mu\text{m}$ , cuja composição, tamanho, bem como suas funcionalidades são fatores fortemente influenciados pela razão entre amilose e amilopectina, que varia conforme a fonte botânica a qual este composto é obtido.

Figura 4 – Estrutura molecular do amido: (a) cadeia de amilose e (b) fração ramificada da amilopectina.



**(b) Amilopectina**

Fonte: Adaptado de (KHAN; AHMAD, 2013).

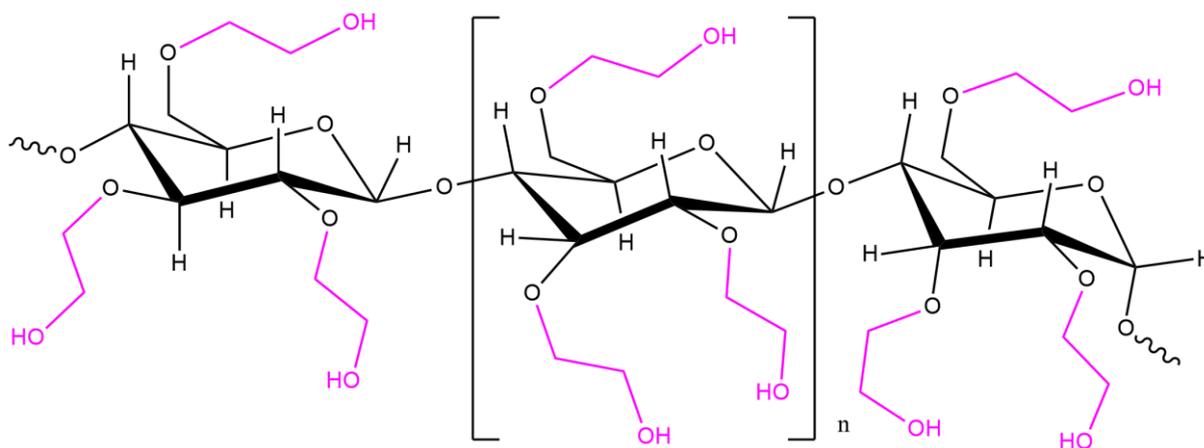
O biopolímero tem recebido bastante interesse em estudos biomédicos por apresentar uma grande diversidade de aplicações na indústria farmacêutica (MARTO et al., 2018). As nanopartículas constituídas de amido são consideradas veículos adequados para administração de medicamentos sendo utilizadas para o encapsulamento de fármacos, atuando sobretudo como sistemas de liberação controlada (HAPONIUK et al., 2018). A aplicabilidade de tais sistemas ocorre devido a singularidade de características funcionais presentes no amido, como biodegradabilidade, biocompatibilidade, baixa imunogenicidade, atividade antibacteriana, além de apresentarem solubilidade em água, capacidade de digestão enzimática e intumescimento (GOPINATH et al., 2018).

A disponibilidade de três grupos hidroxilas, presentes por unidade de glucose proporciona ao amido suscetibilidade a modificações químicas, que consistem pela inserção de grupos funcionais na rede de ligações glicosídicas do polissacarídeo, conferindo uma importante ferramenta utilizada para elevar as interações dos sítios ativos do polissacarídeo com as moléculas de fármacos no processo de encapsulamento (SAKEER et al., 2018).

Existem numerosos métodos de modificações químicas no amido, todavia alguns métodos são mais usuais sendo estes: derivatização como eterificação e esterificação (KHLESTKIN; PELTEK; KOLCHANOV, 2018), reticulação (HAQ et al., 2019) e grafitação (CHEN; KAUR; SINGH, 2018). Dentre os quais, pode-se destacar o processo de

hidroxietilação que ocorre pela interação do amido com óxido de etileno em meio alcalino, com o qual obtém-se como produto o hidroxietilamido representado por sua estrutura molecular na Figura 5. Esta reação confere ao biopolímero uma maior solubilidade em água e também exibe uma maior estabilidade à hidrólise (PALEOS; SIDERATOU; TSIOURVAS, 2017).

Figura 5 – Representação estrutural do hidroxietilamido.



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

A reticulação do amido é um dos métodos mais comuns de modificação, consiste basicamente em uma reação que ocorre quando os grupamentos reativos presentes nas cadeias poliméricas do polissacarídeo são interligados através da utilização de grupos multifuncionais de agentes reticulantes, como o éter e éster, resultando na substituição de ligações de hidrogênio intra e intermolecular do amido por ligações covalentes mais fortes (SINGH; KAUR; MCCARTHY, 2009). O processo em questão resulta na formação de uma estrutura mais rígida e é principalmente aplicado com intuito de aprimorar as propriedades funcionais do biopolímero, tais como resistência a quebra de viscosidade por exposição a alta temperatura, cisalhamento e condições ácidas (KOU; GAO, 2018).

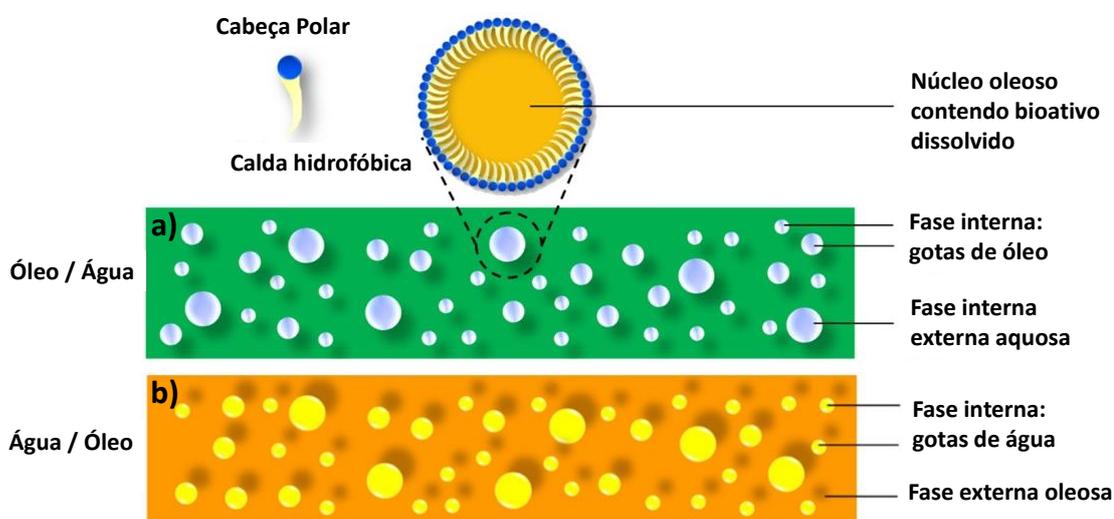
#### 1.4 Síntese *via* miniemulsão

Nos últimos anos o desenvolvimento de sistemas nanoestruturados cresceu extensivamente e a aplicação de tais materiais têm sido um campo de novas oportunidades para

inúmeras aplicações na área de biomedicina. Neste contexto, o processo de miniemulsão tem se apresentado como uma ferramenta versátil para a formação de nanopartículas e nanocápsulas poliméricas. Em contraste com outras abordagens utilizadas para a formação de nanopartículas, como por exemplo, a polimerização em emulsão, microemulsão e formação de camada por camada, existe uma variedade de tipos de reações interfaciais que podem ser utilizadas no processo de miniemulsão, tais como polimerização enzimática radicalar, aniônica, catiônica, poliadição e policondensação. A utilização da técnica viabiliza perfeitamente o encapsulamento de compostos hidrofílicos ou lipofílicos, sejam eles líquidos ou sólidos, sendo estes retidos em invólucros poliméricos (LANDFESTER; MAILA, 2013).

Miniemulsões são dispersões coloidais constituídas por dois líquidos imiscíveis estabilizados por agentes tensoativos, que apresentam gotas com diâmetros médios na faixa de 20 a 500 nm e podem ser de dois tipos que estão representadas na Figura 6. Estes sistemas são constituídos por fases distintas, fase dispersa, onde é localizado o núcleo que contém o ativo solubilizado e fase contínua composta pela presença de surfactantes utilizados para estabilizar a emulsão formada. Deste modo, as emulsões podem ser classificadas como: direta onde o núcleo é constituído pela presença de um fármaco de hidrofóbica solubilizado em em um meio de mesma polaridade (fase orgânica), sendo esta fase vertida em uma fase aquosa, que contém surfactantes com intuito de estabilizar a emulsão formada (O/A); ou inversa em que o núcleo é composto pela fase aquosa, em que o fármaco de natureza hidrofílica é solubilizado em água disperso em uma fase orgânica, formada pela adição de surfactantes em meio lipofílico (A/O) 6 (SINGH et al., 2017).

Figura 6 – Representação do sistema bifásico das emulsões: (a) direta e (b) inversa.



Fonte: Adaptado de (SINGH et al., 2017).

Por apresentarem tamanhos em escala nanométrica, são considerados sistemas cineticamente estáveis, devido ao efeito dos movimentos brownianos, serem dominantes em relação as forças gravitacionais, gerando uma maior resistência a fenômenos de agregação de gotículas. Além disso, tensoativos iônicos e não iônicos são frequentemente utilizados no processo de preparação para evitar a agregações na estrutura via estabilização eletrostática e estérica. Verifica-se que um dos principais processos de desestabilizações em miniemulsões é o amadurecimento de Ostwald, descrito pelo crescimento do raio das gotículas e na diminuição do total de gotículas dispersas, este fenômeno é decorrente pelas diferenças pressão de Laplace, que é maior nas gotículas menores em comparação com as maiores (KARAMI et al., 2019).

Durante o processo de formação das miniemulsões a energia livre de Gibbs é positiva, o que denota o sistema em ser termodinamicamente instável, por conseguinte, a preparação desses sistemas é configurada como processo não espontâneo, assim, além da utilização de surfactantes, as miniemulsões precisam ser estabilizadas por energia. Existem dois tipos de metodologias utilizadas para suprir tal necessidade, classificadas como emulsificação de baixa e alta energia, sendo destacada esta última, por atuar também na redução do tamanho das partículas com a obtenção de nanogotas, trata-se de uma técnica que envolve a aplicação de um dispositivo mecânico para criar forças disruptivas que quebram a fase interna, em seguida dispersando na fase contínua (HARWANSH; DESHMUKH; RAHMAN, 2019). Dentre os principais homogeneizadores utilizados, verifica-se que a irradiação ultrassônica pode afetar positivamente a eficiência na formação das emulsões, visto que a cavitação acústica gerada durante a radiação favorece para a formação de nanopartículas com alta taxa de cisalhamento (LUO, 2016).

O processo de formação das nanocápsulas é realizado pela utilização de reticulantes na miniemulsão, tais como o tolueno diisocianato ou diisotiocianato na fase contínua, juntamente com os monômeros adequados, a adição de tais compostos durante a síntese permite 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, sendo a natureza dos monômeros e a fase contínua, fatores substanciais para a formação das cápsulas. O nanocarreador resultante desta síntese tem capacidade de potencializar a biodistribuição dos fármacos, que é otimizada em termos de composição química, morfologia da superfície, tamanho, forma e perfil de liberação controlada, sendo que este possui dependência da distribuição inicial do tamanho das nanocápsulas (STEINMACHER et al., 2017).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Sintetizar e caracterizar nanocápsulas de amido e hidroxietilamido *via* miniemulsão inversa para encapsular os fármacos cloridrato de fluoxetina e troxerrutina.

### 2.2 Objetivos específicos

- ❖ Sintetizar nanocápsulas de amido e hidroxietilamido utilizando como estratégia a metodologia de miniemulsão inversa por irradiação ultrassônica;
- ❖ Avaliar a estabilidade coloidal das formulações preparadas;
- ❖ Caracterizar as nanocápsulas sintetizadas;
- ❖ Determinar a eficiência de encapsulamento (EE%), além da taxa de carreamento (CC%) dos ativos nas cápsulas;
- ❖ Avaliar o potencial antibacteriano das formulações frente aos micro-organismos *Staphylococcus aureus* (ATCC<sup>®</sup> 6538P<sup>™</sup>), e duas cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina.

## 3 METODOLOGIA

### 3.1 Materiais

O amido (AMD) foi extraído de *Spondia purpúrea*, popularmente conhecido como Seriguela, sendo este isolado e purificado pelo Laboratório de Polímeros e Inovação de Materiais (LabPIM) ( $1.228.292 \text{ g mol}^{-1}$ ), o Hidroxietilamido (HEA) obtido da Sigma-Aldrich CAS 9005-27-0 ( $732.917 \text{ g mol}^{-1}$ ), no qual suas respectivas massas moleculares foram determinadas por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC), como apresentado na Figura 12. Polirricinoleato de poliglicerol (PGPR) foi adquirido da empresa Danisco®, 2,4-diisocianato-1-metil-benzeno (TDI,  $174.2 \text{ g.mol}^{-1}$ ) da Sigma-Aldrich, ciclohexano (>99.9%) da Synth, Dodecil sulfato de sódio (SDS) da Fluka. O fármaco fluoxetina foi cedido pelo Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas (LABIMAN), e o bioativo troxerrutina foi cedido pela empresa PADETEC-UFC.

### 3.2. Métodos

#### 3.2.1. Síntese das nanocápsulas via miniemulsão inversa

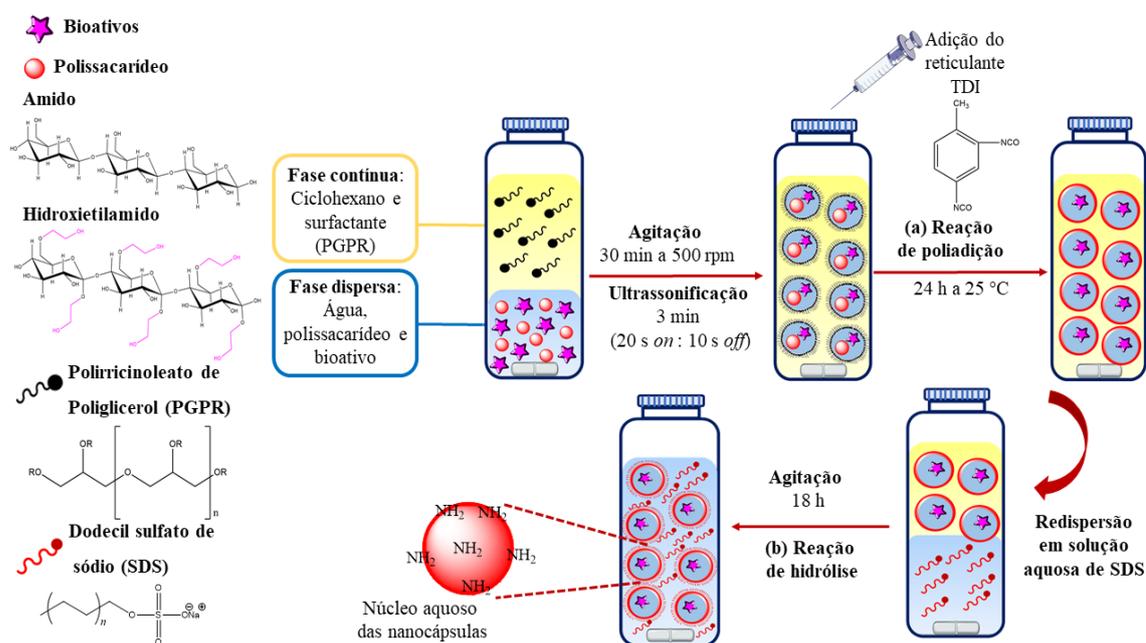
As nanocápsulas de amido (AMD) e hidroxietilamido (HEA) foram sintetizadas por reação de poliadicação interfacial, utilizando o processo de miniemulsão inversa como estratégia metodológica, procedimento este já estabelecido na literatura e adaptado de Steinmacher et al., (2017), como mostrado na Figura 7. Primeiramente, a fase orgânica (FO) foi preparada pela solubilização do surfactante PGPR em 14,5 g de ciclohexano, e posteriormente foi dividida em três diferentes recipientes, sendo estes: FO1: 8 g; FO2: 4.0 g e FO3: 2.5 g. A fase aquosa (FA) foi preparada com 50 mg de polissacarídeo dissolvido em 1,3 g de água, seguida da adição de 20 mg de ativo hidrofílico, cloridrato de fluoxetina ou troxerrutina, no qual seguiu processo de agitação pelo período de 1 hora a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Após o preparo das duas fases imiscíveis, a FO1 foi adicionada a FA, no qual o sistema foi sujeito a pré-homogeneização sob agitação magnética de 500 rpm durante 30 minutos. Após tal procedimento a emulsão foi submetida ao processo de ultrassonicação de sonda com regime de pulso de 20 segundos *on* e 10 segundos *off* e amplitude de 70 % pelo período de 3 min. Posterior à irradiação ultrassônica, a FO2 foi vertida na emulsão, e foi seguida a mesma metodologia aplicada na FO1. Por fim, para a reação de poliadicação interfacial,

utilizou-se 100 mg do agente reticulante tolueno diisocianato (TDI), que foram dissolvidos na FO3, e adicionado lentamente na nanoemulsão, em que a reação de reticulação, e consequentemente a formação das nanocápsulas, sucedeu pelo processo de interligação entre as cadeias poliméricas do polissacarídeo que ocorre através das ligações covalentes entre estas cadeias com grupos isocianatos do reticulante. Para que se completasse a reação interfacial o sistema foi mantido sob agitação por 24 horas a 25 °C.

Após o processo de síntese, as nanocápsulas foram purificadas no intuito de remover o excesso de surfactante utilizado durante a síntese, onde foi retirada uma alíquota de 1 mL da miniemulsão e centrifugada a 4000 rpm durante 20 min, o precipitado foi lavado com ciclohexano (2X) e redisperso em 400 µL do mesmo solvente. Em seguida, em um banho de sonicação (Bandelin Sonorex, tipo RK 52H), as nanocápsulas purificadas foram redispersas lentamente em uma solução aquosa de 5 mL de SDS 0,1% (m/m). Então, a redispersão foi deixada sob agitação a 500 rpm durante 18 h até a completa evaporação do solvente.

Figura – 7 Esquema de síntese das nanocápsulas.



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

As formulações sintetizadas foram submetidas a um estudo de otimização, onde variou-se concentração do surfactante PGPR nas nanocápsulas, na composição da nanoemulsão, em que o mesmo foi variado na faixa de 10 a 20% em massa em relação a fase aquosa. Para tal, a técnica de espalhamento de luz dinâmica foi utilizada para avaliação quanto a estabilidade dos sistemas em estudo. Deste modo, a formulação que apresentou aos

parâmetros avaliados foi escolhida para a síntese das nanocápsulas contendo os ativos. A Tabela 1 apresenta todos os sistemas preparados, nos quais foram ainda caracterizados 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); Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC); Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV); Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET); além disso foi determinado: teor de sólidos (%TS), eficiência de encapsulamento (EE%), assim como capacidade de carreamento e atividade antibacteriana.

Tabela 1 – Descrição dos sistemas sintetizados.

| SISTEMAS<br>PREPARADOS | CONCENTRAÇÃO DE<br>SURFACTANTE | ATIVO (mg) |
|------------------------|--------------------------------|------------|
|                        | PGPR <sup>a</sup> (%)          |            |
| NC-B10                 | 10                             | --         |
| NC-B15                 | 15                             | --         |
| NC-B20                 | 20                             | --         |
| NC-HEA B <sup>b</sup>  |                                | --         |
| NC-AMD B <sup>b</sup>  | 10                             | --         |
| NC- HEA F <sup>c</sup> |                                |            |
| NC-AMD F <sup>c</sup>  |                                |            |
| NC-HEA T <sup>d</sup>  | 10                             | 20         |
| NC-AMD T <sup>d</sup>  |                                |            |

<sup>a</sup> Os valores 10, 15 e 20 expressam a porcentagem de surfactante em massa em relação a fase dispersa;

<sup>b</sup> Sistemas sem ativo encapsulado (Branco);

<sup>c</sup> Sistemas com o ativo fluoxetina;

<sup>d</sup> Sistemas com o ativo troxerrutina.

Fonte: Elaborado pela autora (2019).

### 3.3. Caracterizações

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

Para obter os espectros das amostras 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 cm<sup>-1</sup>

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.

### ***3.3.2. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)***

Os eventos térmicos das amostras foram obtidos em equipamento modelo Q20 V24.9 Build 121, pertencente ao Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC. As condições utilizadas para a realização das análises foram: faixa de temperatura de 25 a 300 °C, sob atmosfera de nitrogênio e fluxo de  $50 \text{ mL min}^{-1}$ , com rampa de aquecimento de  $10 \text{ °C min}^{-1}$ . As amostras foram pesadas previamente com massa de aproximadamente 4 mg.

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

A técnica em questão foi utilizada para determinar a pureza dos ativos utilizados no projeto, com equipamento da marca Shimadzu, pertencente ao LabPIM, que é constituído de fracionador FRC-10A, bomba LC-10AD, detector UV-VIS modelo SPD-10AVP gerenciado pelo controlador SCL-10AVP, no qual foi utilizada uma coluna RP C18A Merck com 15 cm de comprimento por 4,6 mm de diâmetro interno e tamanho de partícula  $5 \mu\text{m}$  associada a uma pré-coluna de 20 mm de comprimento por 2 mm de diâmetro interno as quais foram mantidas a 30 °C.

A análise do perfil cromatográfico da fluoxetina se deu pela adaptação de Prado et al. (2006), em que a fase móvel foi preparada pela mistura binária de solventes constituídos por acetonitrila e solução aquosa de fosfato de potássio dibásico (25 mM) na proporção de 40:60 (v/v) e pH 7,0; o material foi filtrado em uma membrana  $0,45 \mu\text{m}$ . O procedimento se deu pela observação do cromatograma quanto ao perfil cromatográfico e resolução entre o pico da fluoxetina fixando-se o fluxo em  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ , e volume de amostra injetado foi de  $20 \mu\text{L}$ . A detecção foi realizada em comprimento de onda de 214 nm, como citado na literatura (MUKHOPADHYAY; PRADHAN; SAMANTA, 2015).

Para troxerrutina, o procedimento foi adaptado de Šatínský et al. (2013) em que a fase móvel é constituída pela proporção de 50:50 (v/v) de acetonitrila e solução de ácido acético 5% e pH 3,0, a metodologia seguiu-se de maneira análoga ao procedimento adotado para a análise da fluoxetina, com distinção no perfil de detecção que foi feito em comprimento de onda de 255 nm, relatado na literatura supracitada.

### **3.3.4 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)**

A técnica de GPC foi utilizada para determinar massa molar média, bem como, a polidispersividade dos polissacarídeos utilizados no trabalho (AMD e HEA). Foram utilizadas quatro amostras denominadas: AMD, AMD\_US, HEA e HEA\_US, as quais foram preparadas na concentração de 1 mg mL<sup>-1</sup> (0,1 % m/v), solubilizadas sob agitação constante e aquecimento a 50 °C, As amostras AMD US e HEA US são os polissacarídeos após a irradiação ultrassônica, nos quais foram analisadas a fim de verificar o efeito do ultrasson de sonda utilizado no método. Para o preparo das amostras sonicadas, as mesmas foram submetidas ao processo ultrassonicação, com a mesmo regime de pulso adotado para a síntese das nanocápsulas.

Após a preparação, as amostras foram filtradas em membrana Millipore® 0,45 µm. As análises foram realizadas em um cromatógrafo SHIMADZU LC-10AD com detector de índice de refração RID-10A a 40 °C. A coluna utilizada possui como características: PolySep-GFC linear 7,8 x 300 mm, fase móvel de NaNO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> a temperatura ambiente, fluxo de 0,8 mL min<sup>-1</sup>, tempo de fluxo de 40 min e o volume de amostra injetada foi de 20 µL. Para a determinação das massas molares da amostra analisada utilizou-se padrões de pululan (Shodex Denko®) (MM de 5.9 x 10<sup>3</sup> a 7,88 x 10<sup>5</sup> g mol<sup>-1</sup>).

### **3.3.5 Tamanho de partícula, Índice de polidispersividade e Potencial zeta**

Os parâmetros de estabilidade das nanocápsulas foram avaliados quanto ao tamanho de partícula, índice de polidispersividade (PDI) e potencial zeta. Para tal, utilizou-se o equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern®), pertencente ao LABPIM. No qual, para a realização do experimento as amostras foram diluídas em água deionizada na proporção (1:1000) (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, bem como a carga de superficial das amostras foram expressos como média de cinco determinações.

### **3.3.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

A análise foi realizada com intuito de avaliar a morfologia das nanocápsulas sintetizadas. Inicialmente foi retirado uma alíquota de 1 mL das nanocápsulas, purificadas e posteriormente redispersadas em 400 µL de ciclohexano. Em seguida este material foi diluído no mesmo solvente na proporção 1:1000 (v/v) e depositado sobre um substrato de silício onde

o solvente foi evaporado. Posteriormente as amostras foram aderidas a um disco metálico e este levado a um metalizador Quorum, modelo Q150T ES, para aplicação de uma camada de prata com 20 nm de espessura e posterior observação. As imagens foram analisadas por meio do microscópio eletrônico de varredura modelo Quanta 650 FEG ESEM (FEI Company) a 10 kV pertencente a Central Analítica da Universidade Federal do Ceará.

### **3.3.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

A micrografia das nanocápsulas foi avaliada através de Microscopia Eletrônica de Transmissão. Para tal, a preparação das amostras se deu pela diluição das formulações dispersas em ciclohexano até cerca de 0,01% de conteúdo sólido, posteriormente, foi retirado uma alíquota de 50 mL e esta foi inserida em uma rede de cobre revestida com carbono de 300 *mesh*. Subsequentemente, as amostras depositadas foram deixadas para secar a temperatura ambiente para completa evaporação do solvente. A obtenção das imagens se deu pela utilização de um microscópio eletrônico de modelo HT7700 (Hitachi *Company*, Tóquio, Japão) pertencente ao Centro para el Desarrollo de la Nanociencia y la Nanotecnologia (CEDENNA) da Universidad de Santiago de Chile (USACH).

### **3.4 Teor de sólidos**

A análise, foi realizada por método gravimétrico, com intuito de se verificar concentração das cápsulas presentes em g por g de solução, calculada a partir da Equação 1. Inicialmente, pesou-se um Eppendorf® vazio, com o qual atribui-se com terminologia ( $m_1$ ). Em seguida, adicionou-se 300  $\mu$ L da solução do material redispersado em solução de SDS 0,1 % (m/m) e pesou-se novamente ( $m_2$ ). A amostra foi congelada e liofilizada, posteriormente, foi realizada uma terceira pesagem, ( $m_3$ ), para a determinação do cálculo.

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

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

A eficiência de encapsulamento é uma técnica que avalia quantitativamente a eficácia da síntese, pois através desta técnica é possível obter, em termos de concentração, os valores de ativo encapsulado. Deste modo, inicialmente foi realizada uma varredura no

equipamento UV/Vis para se encontrar os comprimentos de onda onde os ativos apresentam máximo valor de absorvância ( $\lambda_{\text{máx}}$ ), o equipamento utilizado pertence marca Thermo Scientific modelo Genesys 6.

Para a determinação da curva de calibração, primeiramente foi feita uma solução aquosa de 100 ppm, que é denominada “solução mãe”, a partir da qual foram retiradas diferentes alíquotas desta solução e diluídas para diferentes concentrações, em seguida, foram feitas as leituras de absorvância da faixa de concentração anteriormente preparada, obtendo a equação da reta como resultado da curva de calibração.

Para quantificação dos valores de eficiência de encapsulamento das nanocápsulas, as amostras redispersadas em solução de SDS (0,1 %) foram centrifugadas a 9000 rpm durante 10 min utilizando filtro de ultracentrifugação com tamanho de poro de 3000 KDa, em seguida foram feitas as leituras de absorvância do sobrenadante em triplicata. O cálculo da eficiência de encapsulamento (EE%) foi realizado, pelo método indireto, descrito na Equação 2.

$$\text{Equação 2} \rightarrow 1 - EE\% = \frac{[\text{ativo}_{\text{sob}}]}{[\text{ativo}_{\text{total}}]} * 100$$

Onde  $\text{ativo}_{\text{sob}}$  é a concentração de fármaco no sobrenadante e  $\text{ativo}_{\text{total}}$  é a quantidade de fármaco inicial.

Para realização do cálculo de capacidade de carregamento, foi levado em consideração a massa de bioativo encapsulado e massa de polissacarídeo utilizada para formulação da síntese, em que foi utilizada a expressão representada na equação 3.

$$\text{Equação 3} \rightarrow \frac{\text{Massa de ativo encapsulado (mg)}}{\text{Massa de polissacarídeo (mg)}} * 100$$

### 3.6 Teste de atividade antimicrobiana

O teste foi utilizado para verificar a possível atividade antibacteriana das formulações sintetizadas que continham FLX em sua composição, bem como, os seus respectivos controles e materiais de partida, sendo estes HEA, AMD e FLX.

Foram utilizadas três cepas: *Staphylococcus aureus* (ATCC® 6538P™), e duas cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina todas pertencentes a bacterioteca do LABIMAN. Estas foram semeadas em ágar Mueller Hinton incubadas a 35 °C

por 24 h. 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 ± 0,1) tamponado com 0,165 M do ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS) (Sigma, EUA).

A CIM foi determinada pela técnica de diluição em microplacas (96 orifícios) de acordo com a metodologia descrita segundo o protocolo M7-A10 (CLSI, 2015). Os compostos AMD e HEA foram testados no intervalo de concentração de 2000-3.90 µg/mL. Para as formulações sintetizadas NC-HEA B, NC-AMD B, NC-HEA F e NC-AMD F, os compostos foram testados no intervalo de concentração de 190-0,37 µg/ml. A partir de um cultivo de 24 h das bactérias a serem testadas em ágar Mueller - Hinton, foi preparada uma suspensão de inóculo inicial de acordo com a escala 0,5 McFarland. Em seguida, foi realizada uma diluição em meio caldo Mueller – Hinton Cátions ajustado para obtenção do inóculo contendo 10<sup>7</sup> UFC/mL.

As microplacas foram incubadas a 36 °C por 20 h. As leituras foram realizadas visualmente. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada como a menor concentração da droga capaz de inibir completamente o crescimento do microrganismo, em comparação com o verificado no poço controle contendo somente o meio de cultura e o inóculo padronizado (CLSI, 2015). Os testes foram realizados em triplicata.

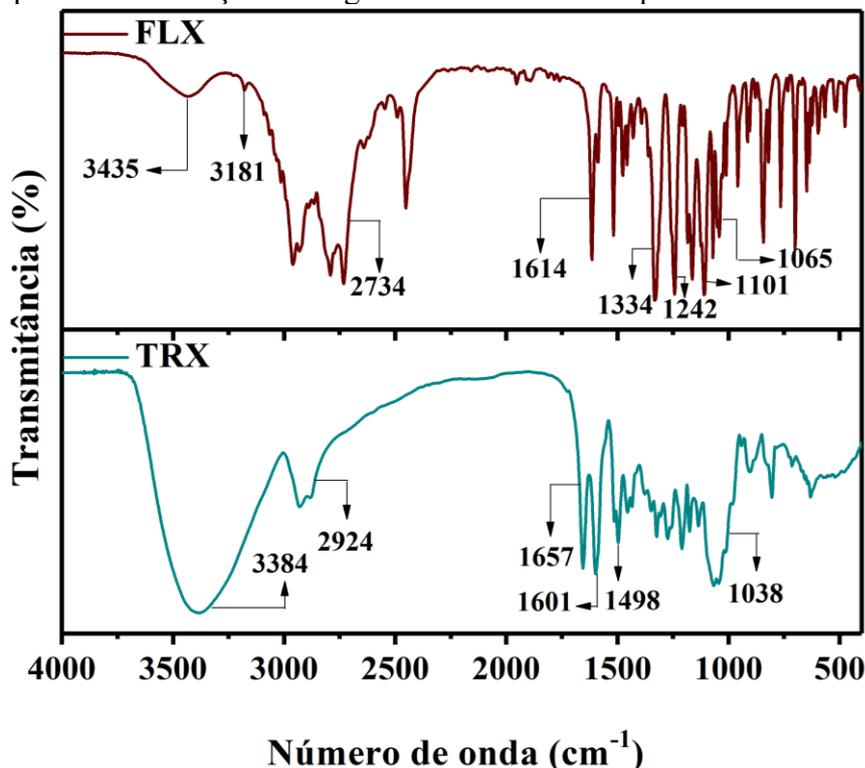
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterizações dos Fármacos

#### 4.1.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

A Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho, é uma técnica vibracional amplamente utilizada na caracterização de compostos químicos, através da qual é possível analisar as vibrações decorrentes das ligações químicas presentes na estrutura, o que possibilita, a identificação de compostos orgânicos existentes na molécula, contribuindo assim para a sua respectiva elucidação estrutural (BUREAU; COZZOLINO; CLARK, 2019). Deste modo, com intuito de avaliar as principais bandas de transmissão existentes nos fármacos FLX e TRX, os espectros de infravermelho estão representados na Figura 8.

Figura 8 – Espectro de Absorção na Região do Infravermelho para FLX e TRX.



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

O espectro do cloridrato de fluoxetina (FLX) apresentou bandas de baixa intensidade na região de  $3433\text{ cm}^{-1}$ , característica de estiramento N-H de aminas secundárias, que está em concordância com trabalhos publicados por (MOHITE; DESHMUKH, 2017). O

espectro ainda apresenta bandas de baixa intensidade na região de  $3181\text{ cm}^{-1}$ , relativas a estiramento C-H de carbono  $\text{sp}^2$ , bandas de forte intensidade na região entre  $2799$  e  $2715\text{ cm}^{-1}$ , característicos de estiramento C-H de carbono  $\text{sp}^3$ , na região de  $1614\text{ cm}^{-1}$  representam os estiramento C=C de aromáticos, na região localizadas em  $1334\text{ cm}^{-1}$  pode-se verificar bandas relativas aos grupamentos fluoretos, referentes a ligação C-F, na região de  $1242\text{ cm}^{-1}$  representa bandas que caracterizam estiramentos C-N de aminas e na região entre  $1065$  e  $1101\text{ cm}^{-1}$  representam estiramentos simétrico e assimétrico, respectivamente relativos a ligação C-O-C de éteres. As principais bandas vibracionais do cloridrato de fluoxetina estão elucidadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Atribuições das bandas do espectro na região do infravermelho para FLX.

| Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) | Atribuições                        | Referências                          |
|-------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| 961                                 | $\delta$ C-H do anel fora do plano | (PAVIA et al., 2010)                 |
| 1065                                | $\nu_{\text{sim}}$ C-O-C           | (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005) |
| 1101                                | $\nu_{\text{ass}}$ C-O-C           | (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005) |
| 1242                                | $\nu$ C-N de aminas                | (PAVIA et al., 2010)                 |
| 1334                                | $\nu$ C-F de haletos               | (PINTO; FERREIRA; CAVALHEIRO, 2017)  |
| 1512                                | $\nu$ C=C de aromáticos            | (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005) |
| 1614                                | $\nu$ C=C de aromáticos            | (PAVIA et al., 2010)                 |
| 2734                                | $\nu$ C-H de carbono $\text{sp}^3$ | (PAVIA et al., 2010)                 |
| 2951                                | $\nu$ C-H de carbono $\text{sp}^2$ | (PAVIA et al., 2010)                 |
| 3433                                | $\nu$ N-H de aminas secundárias    | (MOHITE; DESHMUKH, 2017)             |

Fonte: Elaborado pela autora (2019).

Através da análise do espectro de absorção de TRX (Figura 8), pode-se verificar a presença de bandas de absorção de alta intensidade na região de  $3383\text{ cm}^{-1}$ , características de estiramento assimétrico OH; a presença de duas bandas na região entre  $2924$ - $2848\text{ cm}^{-1}$ , que representam o estiramento de C-H característicos de alcanos, em  $1657\text{ cm}^{-1}$  pode-se observar o

estiramento de C=O, que indica a presença de grupamentos cetonas, sob efeito de conjugação com anéis aromáticos, que são confirmados pelo surgimento das bandas em 1601 e 1498  $\text{cm}^{-1}$ , característicos de estiramento assimétrico e simétrico, respectivamente de C=C de aromáticos, além disso verificam-se bandas de absorção na região de 1038  $\text{cm}^{-1}$  relativos a estiramento da ligação C-O-C. A análise destes dados encontra-se em concordância com estudos relatados por XU et al. (2018). As atribuições das principais bandas representativas de TRX, bem como as suas respectivas regiões foram dispostas na Tabela 3.

Tabela 3 – Atribuições das bandas do espectro na região do infravermelho para TRX.

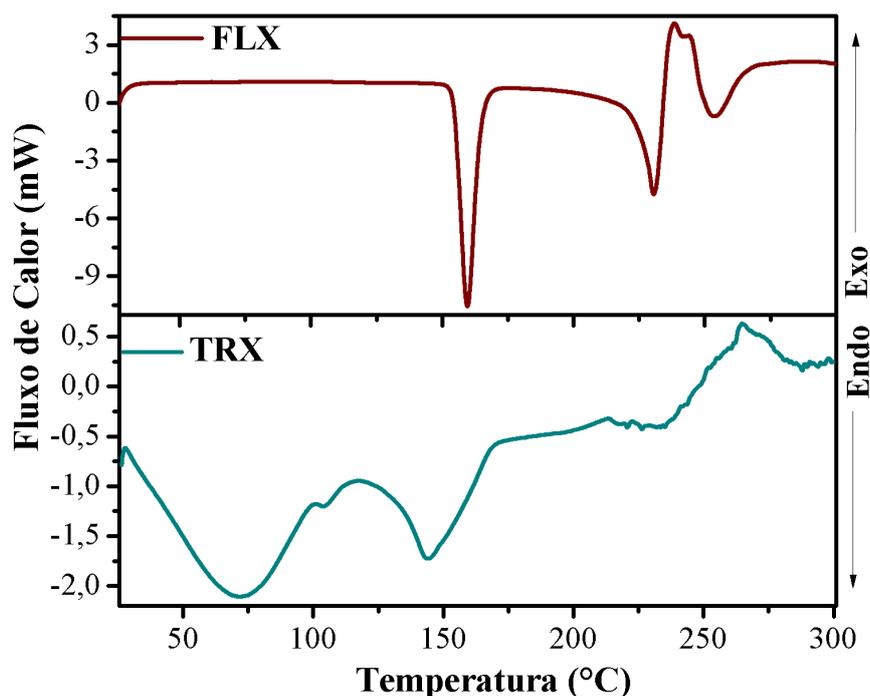
| Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) | Atribuições  | Referências                             |
|-------------------------------------|--|---|
| 625                                 | $\delta$ C-H do anel fora do plano                   | (PAVIA et al., 2010)                    |
| 804                                 | $\delta$ fora do plano de anel aromático substituído | (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005)    |
| 925                                 | $\nu$ C=C de vinil                                   | (CONSTANTIN; FUNDUEANU; NICHLFOR, 2008) |
| 1038                                | $\nu_{\text{sim}}$ C-O-C                             | (PAVIA et al., 2010)                    |
| 1358                                | $\delta_{\text{sim}}$ CH <sub>3</sub>                | (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005)    |
| 1462                                | $\delta_{\text{ass}}$ CH <sub>2</sub>                | (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005)    |
| 1498                                | $\nu_{\text{sim}}$ C=C de aromáticos                 | (PAVIA et al., 2010)                    |
| 1601                                | $\nu_{\text{ass}}$ C=C de aromáticos                 | (PAVIA et al., 2010)                    |
| 1657                                | $\nu$ C=O de cetonas                                 | (XU et al., 2018a)                      |
| 2867                                | $\nu$ C-H de carbono $\text{sp}^3$                   | (XU et al., 2018a)                      |
| 2924                                | $\nu$ C-H de carbono $\text{sp}^2$                   | (XU et al., 2018a)                      |
| 3383                                | $\nu_{\text{ass}}$ O-H                               | (XU et al., 2018a)                      |

Fonte: Elaborado pela autora (2019).

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

A técnica de DSC é um método termoanalítico, fundamentado na variação da capacidade de calor envolvida entre as transições, denominadas como eventos térmicos, classificados como endotérmicos e exotérmicos. Deste modo, a relevância da técnica está diretamente relacionada com a análise relativa as caracterizações físicas e químicas dos compostos estudados pela mesma (CORDENONSI et al., 2017). Para a avaliação de fármacos a aplicabilidade do método é feita pelo fornecimento de dados concernentes as propriedades físicas dos compostos, bem como a realização de estudos relacionados aos parâmetros de polimorfismo existentes entre os mesmos. Para tal, a análise dos perfis dos termogramas das amostras cloridrato de fluoxetina (FLX) e troxerrutina (TRX) estão elucidadas nas Figura 9.

Figura 9 – Termograma de Calorimetria Exploratória Diferencial das amostras FLX e TRX.



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

Através da análise, pode-se verificar que o perfil do termograma de FLX apresentou um primeiro pico endotérmico na faixa de 151,99 -171,79 °C, com máximo de intensidade em 159,59 °C, comportamento este característicos do processo de fusão do fármaco, que está em consonância com os resultados observados por Pinto; Ferreira; Cavaleiro (2017), com qual, o evento endotérmico ocorreu na temperatura de 159,6 °C. Pode-se observar que a partir da temperatura de 217 °C ocorre o início de processo de decomposição térmica do fármaco, que

ocorre em duas diferentes etapas, inicialmente ocorre o evento com caráter endotérmico ocorrente nas faixas de 219,75 - 234,78 °C, com pico máximo em 230,51 °C. O evento exotérmico ocorreu na faixa de 233-254 °C, com pico de maior intensidade em 238,27 °C.

No trabalho relatado por Kelmann et al. (2007) é proposto que as etapas de decomposição do fármaco (FLX) são referentes a saída do composto 3-fenil-3-[( $\alpha$ ,  $\alpha$ ,  $\alpha$ -trifluoro-*p*-toluil)-oxi]-propileno, por clivagem do grupamento amina. A segunda etapa residual de decomposição é proveniente pela perda do grupo metilamina na estrutura. A presença de dois picos endotérmicos é sugerido por Craig (2007), como a indicação de polimorfismo presente no fármaco, de modo que a variação no arranjo conformacional atua diretamente na eficácia terapêutica do mesmo (PANDEY; DALVI (2019).

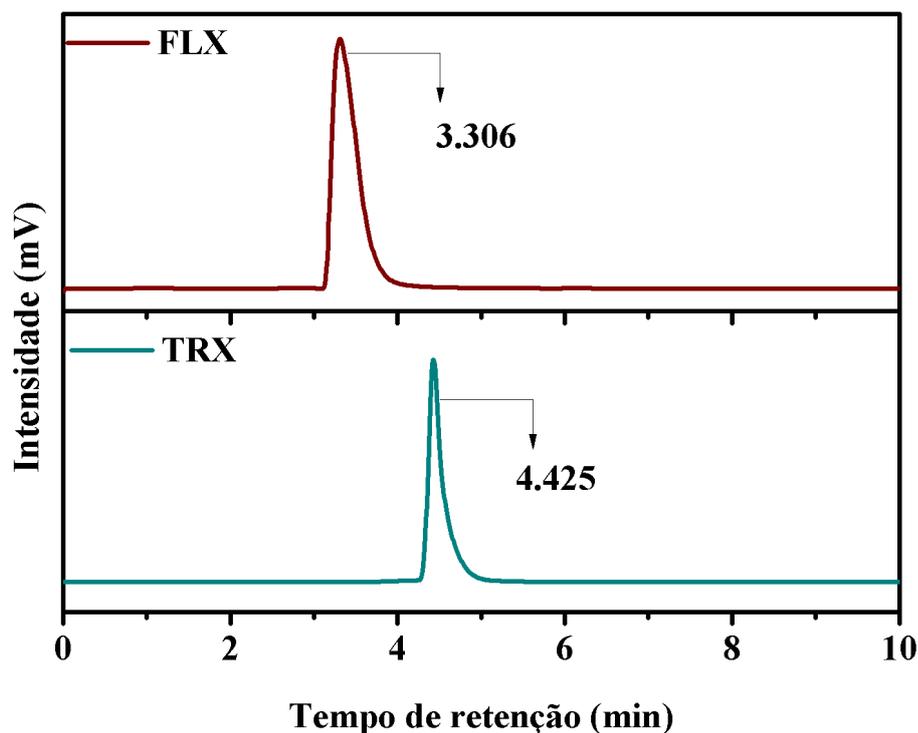
O comportamento calorimétrico evidenciado pelo termograma de TRX, não apresenta ponto de fusão definido, com o qual, verifica-se a presença de diferentes transições de fase, que sugere a ocorrência de rearranjo molecular devido a presença de polimorfismo no ativo. A análise em questão está de acordo com trabalhos relatados por Filho et al. (2002), no qual sugerem que tal comportamento está relacionado com a característica amorfa do fármaco estudado, uma vez que não há rede cristalina no mesmo.

Através do termograma pode-se verificar a ocorrência de dois eventos endotérmicos, sendo o primeiro relativo entre a faixa de 28,06 - 71,29 °C, com máximo de intensidade na temperatura de 71,29 °C, e um segundo evento ocorre na faixa de 129,69 - 168,13 °C, com máximo de intensidade em 144,08 °C. O comportamento observado é relativo a perdas sucessivas de moléculas de água. Pode-se observar que o processo de decomposição do bioativo ocorre a temperatura de 265,16 °C, estes resultados estão em consonância com a literatura (HOORES FAND; GHANBARZADEH; HAMISHEHKAR, 2015).

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

A técnica CLAE é um método analítico que apresenta diversas aplicações, dentre as quais podem se destacar aspectos como de análises de: purificação, isolamento, identificação e estabilidade, entre outros (WORSFOLD et al., 2019). Para o presente trabalho, o método foi analisado com intuito de se verificar o grau de pureza dos fármacos utilizados, no qual, foi levado em consideração o tempo de retenção obtido, e posteriormente foi calculado a área dos perfis analisados. O cromatograma do cloridrato de fluoxetina (FLX), bem como da troxerrutina (TRX), estão representados na Figura 10 e demonstram o perfil de composição do fármaco estudado.

Figura 10 – Cromatograma dos fármacos FLX e TRX realizado pela técnica CLAE.



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

Os perfis cromatográficos das amostras analisadas (Figura 10) apresentam semelhanças, visto que há a presença de um único pico de maior intensidade, com variação nos tempos de retenção, indicando, deste modo que os fármacos utilizados no referido trabalho apresentam altos índices de pureza. Para o fármaco FLX, o pico de maior intensidade ocorre com tempo de retenção de 3,306 min, este resultado encontra-se em consonância com que fora relatado por (PRADO et al., 2006). A partir da obtenção da área total do cromatograma, pela integração da área do pico referente ao fármaco, verificou-se o percentual de 98,97% do total, com base nesse resultado é possível correlacionar a área do pico com a composição do ativo na amostra, que apresentou o mesmo percentual de pureza em massa.

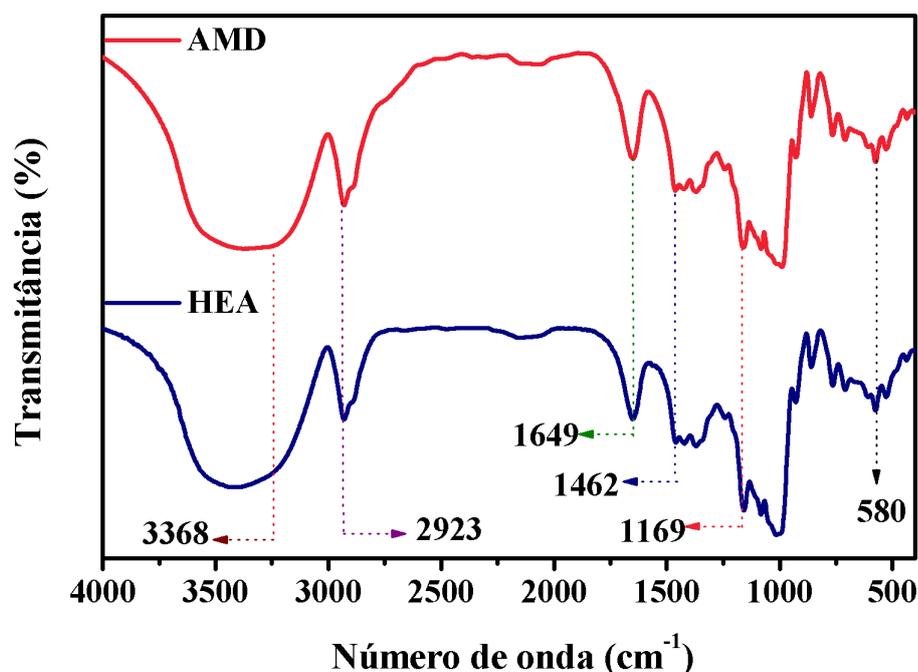
Para TRX, foi observado a presença do pico com maior intensidade no tempo de retenção de 4,425 minutos, que está de acordo com Šatínský et al. (2013), através da integração deste pico, verificou-se o percentual de 98,57% do total, que relaciona-se composição do fármaco na amostra, que apresentou o mesmo percentual de pureza em massa.

## 4.2 Caracterizações dos polissacarídeos

### 4.2.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

A utilização da técnica espectroscópica se deu com intuito de se avaliar a constituição química dos grupos funcionais presentes nas moléculas de amido de *Spondia purpurea* (AMD) e hidroxietilamido (HEA), possibilitando, deste modo, a elucidação estrutural dos compostos analisados, a Figura 11 representa os perfis vibracionais das amostras AMD e HEA.

Figura 11 – Espectro vibracional de Infravermelho das amostras AMD e HEA.



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

Pela análise dos espectros, pode-se observar que as bandas de absorção de AMD e HEA apresentam semelhança nos perfis vibracionais. A região de 3368  $\text{cm}^{-1}$  apresenta bandas largas características de estiramentos assimétricos de hidroxila (OH). Em 2923  $\text{cm}^{-1}$  apresenta bandas de menor intensidade relativas aos estiramentos de C-H, relacionado a ligações do tipo  $\text{CH}_2$  devido a presença de metilenos na estrutura (WANG et al., 2019). A região de 1649  $\text{cm}^{-1}$  é atinente a deformações de O-H, associados à presença de água adsorvida nas regiões amorfas do amido. Em 1169  $\text{cm}^{-1}$  pode-se observar estiramentos característicos de ligações do tipo C-C e C-O, relativos a vibrações típicas de anel de anidroglicose. Os valores observados nas regiões

de 1000 – 500  $\text{cm}^{-1}$  são relacionados em polissacarídeos como região de “impressão digital” que se caracterizam por vibrações esqueléticas do anel piranosídico referente a presença de ligações glicosídicas dos componentes estruturais do amido (ZHAO et al., 2018). As principais regiões observadas, bem como suas atribuições dos polissacarídeos utilizados estão evidenciadas na Tabela 4.

Tabela 4 – Atribuições das bandas do espectro na região do infravermelho para AMD e HEA.

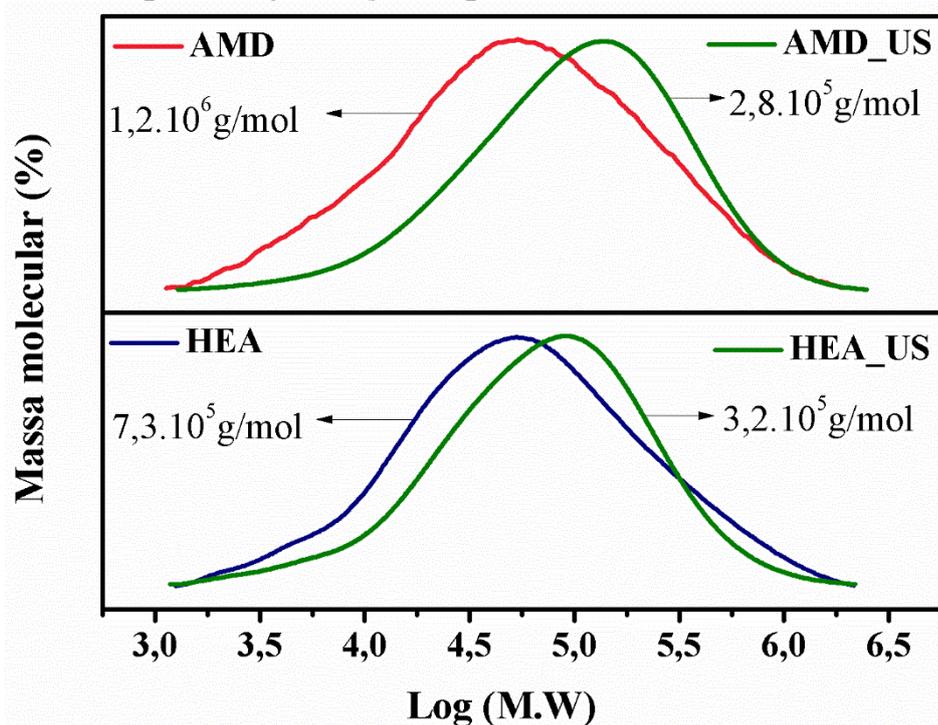
| Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) | Atribuições                                    | Referências          |
|-------------------------------------|--|----------------------|
| 580                                 | $\delta$ (C-C) e (C-O) do anel piranosídico    | (ZHAO et al., 2018)  |
| 1080                                | $\nu_{\text{sim}}$ C-O-C do anel glicosídico   | (TAN et al., 2017)   |
| 1169                                | $\nu_{\text{ass}}$ C-O e C-C                   | (ZHAO et al., 2018)  |
| 1394                                | $\delta$ ( $\text{CH}_2$ )                     | (PACIA et al., 2017) |
| 1462                                | $\delta$ OH                                    | (ZHAO et al., 2018)  |
| 1649                                | $\delta$ H-O-H DE água reticulada              | (ZHAO et al., 2018)  |
| 2923                                | $\nu$ C-H de carbono $\text{sp}^2$ de metileno | (WANG et al., 2019)  |
| 3368                                | $\nu_{\text{ass}}$ O-H                         | (WANG et al., 2019)  |

Fonte: Elaborado pela autora (2019)

#### 4.2.2 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

A cromatografia de permeação em gel é uma técnica analítica que tem vasta aplicação na caracterização de materiais poliméricos, que através da qual torna-se possível avaliar os valores de massa molecular média, bem como a polidispersividade do material estudado, além destes parâmetros, neste trabalho, sua utilização se deu com intuito de se verificar a influência da irradiação ultrassônica nos perfis das cadeia dos polissacarídeos empregados. Os cromatogramas do amido nativo de *S. purpurea* (AMD) e hidroxietilamido (HEA) estão elucidados na Figura 12.

Figura 12 – Cromatograma de permeação em gel das amostras AMD e HEA.



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

Para avaliar os valores de massa molar obtidos nos cromatogramas de AMD e HEA, faz-se necessário a compreensão da composição dos materiais estudados, para tal, verifica-se que os grânulos de amido são formados basicamente por dois tipos de moléculas amilose e amilopectina, que apresentam diferentes estruturas, com tamanhos, estrutura química e massas molares distintas. A amilose é uma fração essencialmente linear, que apresenta massa molecular na ordem entre  $10^5$ - $10^6$  g.mol<sup>-1</sup>, ao passo que a amilopectina é uma molécula que apresenta em sua composição um maior grau de ramificações que dispõe de massa molecular na ordem entre  $10^7$ - $10^9$  g.mol<sup>-1</sup> (SHRESTHA; HALLEY, 2014). De acordo com o resultado, verificou-se que os valores de massa de pico de  $1,2 \cdot 10^6$  g.mol<sup>-1</sup> para AMD e  $7,3 \cdot 10^5$  g.mol<sup>-1</sup> para HEA, de modo que os valores de ordem encontrados, podem ser atribuídos possivelmente a uma maior proporção de amilose presente na composição dos materiais.

Pela observação dos valores de massa molar numérica média ( $M_n$ ) e massa molar ponderal média ( $M_w$ ), apresentados na Tabela 5, é possível calcular o índice de polidispersividade, que representa a razão entre a massa molecular ponderal média e a massa molecular numérica média, ou seja,  $M_w/M_n$ . Na área de polímeros a literatura reporta que tal índice reflete a uniformidade dos tamanhos das cadeias poliméricas, assim como o grau de dispersão de suas massas molares no sistema. Em um estudo realizado por Hoyos-Leyva et al.

(2017) polímeros uniformes possuem,  $M_w/M_n$  igual a 1, sendo chamados de monodispersos, que indicam sistemas com massas molares menos dispersos e como maior uniformidade dos seus valores de massa molar, com cadeias distribuídas com baixa variação no comprimento. Para polímeros com valores de polidispersão mais acentuados, ou seja, maiores que 1 apresentam uma maior heterogeneidade nos tamanhos das cadeias poliméricas e consequentemente maiores variações nos valores das massas molares, sendo chamados de polidispersos.

Tabela 5 – Valores de polidispersividade obtidas pela análise de GPC de AMD e HEA.

| Amostra | $M_n^a$ ( $10^4$ ) g.mol <sup>-1</sup> | $M_w^b$ ( $10^5$ ) g.mol <sup>-1</sup> | Polidispersividade ( $M_w/M_n$ ) |
|---------|--|--|----------------------------------|
| AMD     | 7,2                                    | 3,8                                    | 5,382                            |
| AMD_US  | 5,3                                    | 1,4                                    | 2,715                            |
| HEA     | 3,0                                    | 1,9                                    | 6,322                            |
| HEA_US  | 3,3                                    | 1,2                                    | 3,741                            |

a – Massa molecular numérica média

b – Massa molecular ponderal média

Fonte: Elaborado pela autora (2019).

Os valores de polidispersividade dos polissacarídeos, elucidados na Tabela 5 demonstram que as amostras são classificadas como polidispersas, a literatura sugere que a formação de suas cadeias ocorre de maneira mais desordenada, resultando no alargamento da faixa de distribuição de massas. Tal resultado está em conformidade com a literatura, visto que as diferenças entre os valores de massa molecular, bem como a dispersão dos materiais é relativo à fonte botânica que o material é extraído, caso seja este de origem vegetal, sendo comum em polissacarídeos o comportamento polidisperso (ZHANG et al., 2018).

Outro fator a ser analisado pela técnica está na influência da utilização da irradiação ultrassônica nos parâmetros de massa molecular média e polidispersividade. Para isto as amostras AMD e HEA foram submetidas ao processo de ultrassonificação de sonda com regime de pulsos de 20 segundos *on* e 10 segundos *off* e amplitude de 70% pelo período de 3 minutos, sendo atribuídas a nomenclatura AMD\_US e HEA\_US. De acordo com os resultados verificam-se diferenças significativas nos parâmetros analisados com tratamento ultrassônico e não ultrassônico, as amostras, quando sujeitas a irradiação apresentam redução nos valores de massa molecular em que para AMD a variação ocorre de  $1,2 \cdot 10^6$  g.mol<sup>-1</sup> para  $2,8 \cdot 10^5$  g.mol<sup>-1</sup> após o processo de irradiação e para HEA a variação nos valores de massa sucede de  $7,3 \cdot 10^5$  g.mol<sup>-1</sup> para  $3,2 \cdot 10^5$  g.mol<sup>-1</sup>, o mesmo se observa para os índices de polidispersividade, que para AMD

passam de 5,382 a 2,715, e para HEA de 6,322 a 3,741.

O comportamento observado é relatado pela literatura como processo de degradação na cadeia dos polissacarídeos, que ocorre por meio da cavitação acústica, onde a irradiação ultrassônica induz a uma rápida formação e colapso de bolhas de cavitação no interior do líquido irradiado, em que o intenso estresse ocasionado pela técnica resulta em uma cisão irreversível na cadeia, que diferentemente de alguns procedimentos adotados, tais como a utilização de agentes químicos, a degradação ultrassônica é um processo seletivo e a clivagem ocorre frequentemente no centro da molécula, gerando como consequência modificações nas propriedades físico-químicas, tais como o tamanho e polidispersividade destes materiais (XU et al., 2018).

### **4.3 Caracterizações das Nanocápsulas**

#### ***4.3.1 Tamanho de partícula, índice de polidispersividade e potencial zeta***

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

O espalhamento de luz dinâmico (DLS) é uma técnica amplamente utilizada para caracterização do dimensionamento de partículas em dispersão, através da qual é possível determinar o diâmetro hidrodinâmico, bem como, avaliar a polidispersividade dos sistemas de estudo (GEORGE; SHAH; SHRIVASTAV, 2019). Destaca-se por ser um método não invasivo, de modo que a amostra analisada pode ser reutilizada para outros fins, ademais, não se faz necessário modificações nos sistemas, exceto diluição, sendo necessário um pequeno volume de amostra para a realização da análise (SHARMA et al., 2018). A literatura reporta que um dos parâmetros utilizados para avaliar a estabilidade cinética de nanopartículas poliméricas é a averiguação da escala de tamanho, dentro deste meio, as nanocápsulas obtidas pelo processo de miniemulsão devem possuir tamanhos que variam na escala de 50 a 500 nm (ARTUSIO et al., 2018).

Em sistemas nanoestruturados a polidispersividade representa, fisicamente, o grau de heterogeneidade obtido pelo tamanho do diâmetro hidrodinâmico das partículas analisadas, de modo que maiores valores de PDI indicam a não uniformidade no perfil hidrodinâmico das partículas, ocasionando na formação de sistemas menos estáveis fisicamente e mais suscetíveis a mecanismos de instabilidade de amadurecimento de Ostwald (MORADI; ANARJAN, 2018). Nestes sistemas, verifica-se que os valores de PDI variam na faixa de 0-0,4. Para as partículas

com valores de PDI entre 0-0,1 indicam que o sistema apresenta-se como monodisperso, sugerindo assim, uniformidade no mesmo. Entre os valores de 0,1-0,4 refere-se a partículas consideradas como moderadamente dispersas e acima dos valores de 0,4 indicam sistemas polidispersos (SHARMA et al., 2018).

Deste modo foi realizado um estudo inicial de otimização para as formulações dos sistemas, no qual, investigou-se o efeito da concentração do surfactante na estabilidade das nanocápsulas sintetizadas em que foi feita a variação da taxa de PGPR nas formulações dos sistemas, que sucedeu na faixa de 10 a 20% em massa em relação a fase dispersa, de modo que os resultados obtidos dos tamanhos de partícula e índice de polidispersividade estão evidenciados na Tabela 6.

Tabela 6 – Tamanho de partícula e PDI das nanocápsulas sintetizadas a partir da variação da taxa de PGPR nas formulações.

| <b>Sistemas</b> | <b>Diâmetro<br/>médio (nm)</b> | <b>PDI*</b>   |
|-----------------|--------------------------------|---------------|
| NC-B10          | 251,93 ± 2,14                  | 0,222 ± 0,018 |
| NC-B15          | 264,73 ± 7,05                  | 0,243 ± 0,022 |
| NC-B20          | 242,03 ± 3,733                 | 0,260 ± 0,050 |

PDI: Índice de polidispersividade.

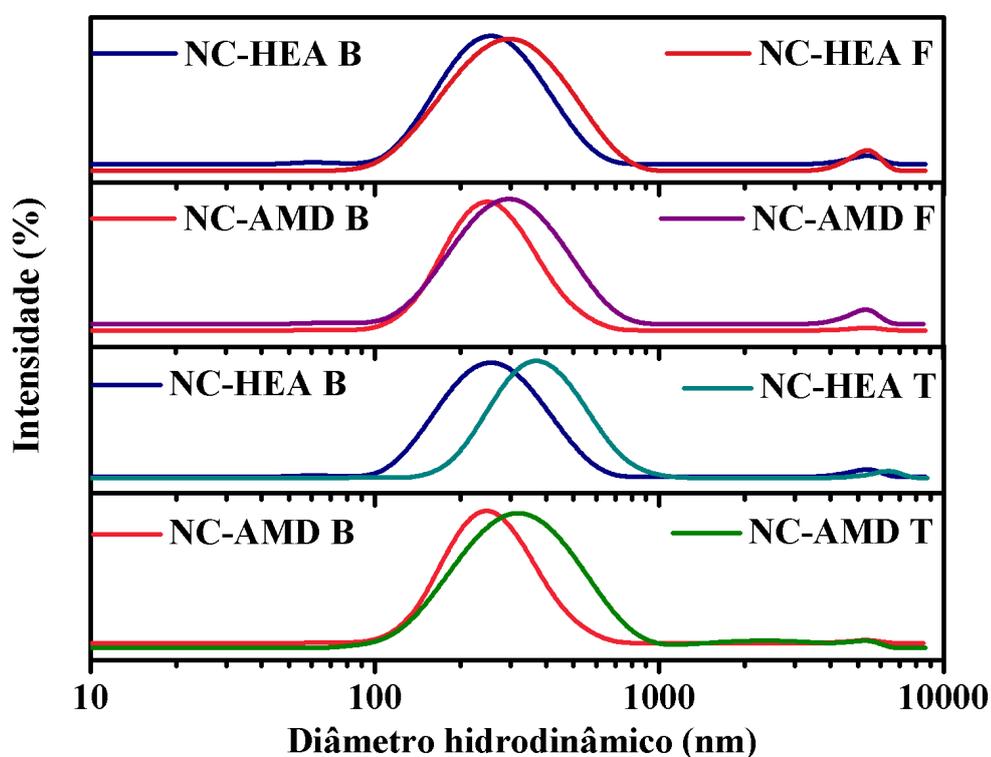
Fonte: Elaborado pela autora (2019).

De acordo com os valores obtidos na Tabela 6, observa-se que houve redução no tamanho médio das partículas com o aumento da concentração do surfactante PGPR, a literatura sugere que o comportamento evidenciado pela análise é esperado, haja vista que a maior quantidade de surfactante é capaz de fornecer estabilidade coloidal na área superficial e por consequência facilita o processo de homogeneização produzindo assim as nanocápsulas com menor tamanho de partícula (STEINMACHER et al., 2017).

No entanto verifica-se que não houve variação significativa nos tamanhos das amostras, somente um aumento nos valores de PDI. É sugerido que esse comportamento ocorre devido ao processo de agregação entre as partículas, decorrente da utilização de maiores taxas de surfactante, de modo que o mesmo pode ter atingido a concentração micelar crítica (CMC), que pode apresentar como consequência em uma maior instabilidade coloidal no sistema (ROSENBAUER; LANDFESTER; MUSYANOVYCH, 2009).

Neste contexto, a formulação NC-B10, com 10% em massa de PGPR em relação a fase aquosa foi escolhida para a utilização na síntese dos demais sistemas, pois apresentou menor valor de PDI. As formulações sintetizadas foram: NC-HEA B, NC-AMD B, NC-HEA F, NC-AMD F, NC-HEA T e NC-AMD T, sendo estas avaliadas quando sua estabilidade coloidal, deste modo o gráfico de distribuição dos tamanhos médios das partículas das formulações sintetizadas está representado na Figura 13.

Figura 13 – Gráfico de distribuição dos diâmetros hidrodinâmicos médios de partícula das nanocápsulas.



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

De acordo com o gráfico apresentado (Figura 13), é possível avaliar o efeito de estabilização dos sistemas estudados, no qual, leva-se em consideração a distribuição populacional observada na análise. Para os sistemas sintetizados, pode-se verificar que a distribuição dimensional dos tamanhos das partículas apresentam caráter bimodal, caracterizado pela presença de dois picos, este comportamento é relatado por Sharma et al. (2018) como característico de sistemas que apresentam polidispersividade em sua conformação, no entanto, faz-se necessário o conhecimento dos valores de PDI para a confirmação do que fora observado pelo gráfico, deste modo, a Tabela 7 apresenta os valores dos tamanhos médios de partícula, bem como os índices de polidispersividade dos sistemas preparados.

Tabela 7 – Diâmetro hidrodinâmico e PDI das nanocápsulas sintetizadas.

| Sistemas | Diâmetro médio (nm) | PDI              |
|----------|---------------------|------------------|
| NC-HEA B | 251,933 ± 2,145     | 0,2216 ± 0,01796 |
| NC-AMD B | 260,83 ± 4,349      | 0,2163 ± 0,0247  |
| NC-HEA F | 303,43 ± 2,623      | 0,3306 ± 0,02720 |
| NC-AMD F | 300,10 ± 2,046      | 0,307 ± 0,00828  |
| NC-HEA T | 320,03 ± 5,68       | 0,267 ± 0,017    |
| NC-AMD T | 360,46 ± 13,55      | 0,337 ± 0,0235   |

PDI: Índice de polidispersividade.

Fonte: Elaborado pela autora (2019).

Os valores de diâmetro médios das partículas, demonstram, que as cápsulas produzidas pertencem a escala nanométrica, com valores de 251,93 e 260,83 nm, para as amostras que não continham ativo em suas formulações, sendo estas: NC-HEA B, NC-AMD B. Para os sistemas preparados com a incorporação dos fármacos, observou-se valores de tamanhos de 303,43; 300,10; 320,03 e 360,46 nm, referidos para as amostras: NC-HEA F, NC-AMD F, NC-HEA T e NC-AMD T, respectivamente. Deste modo, o resultado apresentado, corrobora com que menciona a literatura e estão consoantes com o que fora obtido por trabalhos de (PRAMANIK et al., 2018).

Pela avaliação dos valores de índice de polidispersividade obtidos (Tabela 7) verifica-se que as formulações NC-HEA B e NC-AMD B apresentam valores que variam entre 0,2216 e 0,2163. Para as nanocápsulas com fármaco, verifica-se que os valores obtidos foram de: 0,330 e 0,337. Deste modo, as formulações sintetizadas mostraram comportamento moderadamente polidisperso quanto a distribuição das partículas, concordando com que fora observado no gráfico de distribuição dimensional (Figura 13) estes resultados estão em consonância com trabalhos publicados por Baier et al. (2012) que realizou estudos no desenvolvimento de nanocápsulas de hidroxietilamido.

#### 4.3.1.2 Potencial Zeta

O potencial zeta ( $P\zeta$ ) é um dos métodos mais utilizados para avaliar as interações elétricas existentes em sistemas coloidais, dentre estes, encontram-se as emulsões, para tal, verifica-se que tais interações são decorrentes da presença de partículas carregadas eletricamente, que interagem entre si por mecanismos de interface. Ao aplicar um campo elétrico no líquido, pela observação da migração das partículas para qualquer um dos eletrodos, torna-se possível estudar a carga das partículas, de modo que, a 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 8 fornece dados de potencial zeta das nanocapsulas sintetizadas.

Tabela 8 - Potencial zeta das nanocápsulas sintetizadas.

| <b>Sistemas</b> | <b>Potencial Zeta (mV)</b> |
|-----------------|----------------------------|
| NC-HEA B        | -38,03                     |
| NC-AMD B        | -35,33                     |
| NC-HEA F        | -35,72                     |
| NC-AMD F        | -33,20                     |
| NC-HEA T        | -35,90                     |
| NC-AMD T        | -37,26                     |

Fonte: Elaborado pela autora (2019).

De acordo com os resultados obtidos pode-se verificar que os valores de potencial zeta das nanocápsulas sintetizadas apresentam valores em sinais negativos, que são evidenciados devido a utilização do surfactante de caráter aniônico (SDS) no processo de redispersão, dentre os quais, verifica-se que as nanocápsulas sintetizadas apresentam valores de  $P\zeta$  que variam entre -33 a -38 mV.

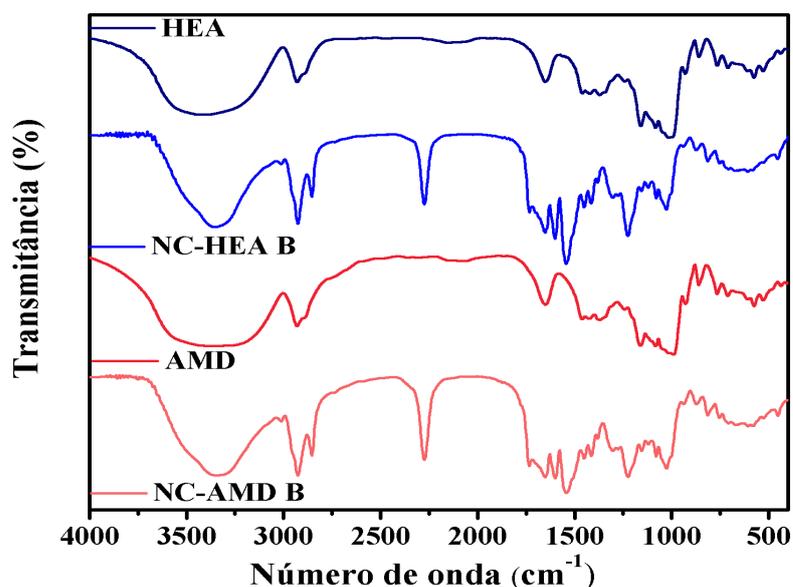
A literatura reporta, que para sistemas coloidais os estudos de estabilidade relacionando potencial zeta estão dispostos em quatro categorias, sendo estas divididas em

valores de  $P\zeta$ , de modo que sistemas com valores na faixa de  $\pm 0-10$  mV, são considerados muito instáveis; de  $\pm 10-20$  mV relativamente estáveis;  $\pm 20-30$  mV moderadamente estáveis e para valores superiores a  $\pm 30$  mV são altamente estáveis (CANO-SARMIENTO et al., 2018). Deste modo, os sistemas preparados apresentam alta estabilidade quanto a degradações físicas. Vale salientar que a estabilidade referente ao potencial zeta é resultante das forças de repulsão existentes entre partículas de mesma carga elétrica, deste modo impede o processo de agregação entre as partículas (MORADI; ANARJAN, 2018).

#### 4.3.2 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

O FT-IR foi utilizado com intuito de investigar quimicamente a composição das nanocápsulas especialmente pela análise da modificação no perfil espectral do polissacarídeo em estudo, antes e depois da reação de reticulação que ocorre entre os grupos OH presentes nas moléculas de amido e surfactante, com grupamentos NCO advindos das moléculas de tolueno diisocianato (TDI), em que a referida diferença entre os espectros pode ser observada pelo surgimento e desaparecimento de bandas já existentes, bem como, o aumento ou diminuição da intensidade de bandas pertencentes ao espectro avaliado, de modo que os perfis espectroscópicos das amostras estão evidenciados na Figura 14.

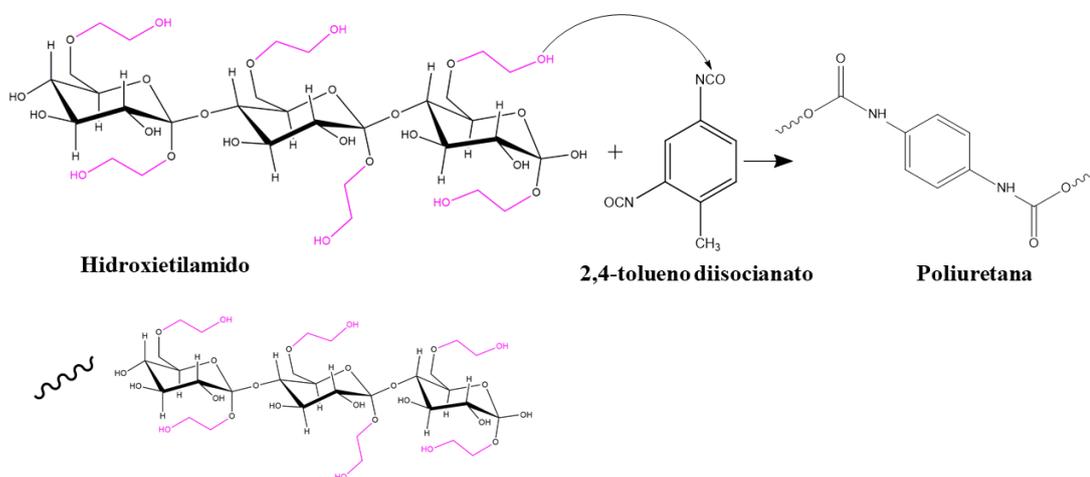
Figura 14 – Espectro comparativo na região do Infravermelho, entre os polissacarídeos (HEA e AMD) e as nanocápsulas sintetizadas (NC-HEA B e NC-AMD B).



Os valores de número de onda, bem como, as respectivas atribuições vibracionais dos polissacarídeos (HEA e AMD) já foram discutidos na sessão 4.2.1, de acordo com o que fora acima relatado, os seus respectivos espectros foram expostos para efeito de comparação com os perfis observados nas nanocápsulas.

Pela análise dos perfis espectrais, pode-se observar semelhança entre as nanocápsulas e os materiais de partida na região de  $3368\text{ cm}^{-1}$ , que são característicos de estiramento de O-H, referente as interações das hidroxilas existentes na estrutura dos compostos analisados, no entanto, verifica-se que nas nanocápsulas há uma diminuição na intensidade de tais estiramentos, o comportamento observado ocorre devido a reação de poliadição, que está representada esquematicamente na Figura 15, entre os grupamentos isocianatos (NCO) presentes nas cadeias reativas do reticulante TDI com as hidroxilas reativas do polissacarídeo, para NC-AMD B ocorre no carbono 6 do amido, menos impedido estericamente e para NC-HEA B a reação é localizada na região das hidroxilas presentes nos grupamentos hidroxietil.

Figura 15 – Representação esquemática da reação de polimerização entre os grupos NCO do TDI e OH dos amidos *via* miniemulsão inversa.



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

A reação de reticulação é confirmada pela presença de bandas nas regiões de  $1733\text{ cm}^{-1}$ , referente ao estiramento de C=O de característico de carbonila e em  $1544\text{ cm}^{-1}$  relativo a deformação N-H, ambas são provenientes da formação de poliuretana na estrutura (PRAMANIK et al., 2018). Os resultados obtidos a partir da análise dos perfis espectrais das amostras estão em concordância com trabalhos de Steinmacher et al. (2017) com o qual foram realizados estudos com nanocápsulas utilizando o hidroxietilamido como material de partida. As principais regiões presentes nas nanocápsulas estão evidenciadas na Tabela 9.

Tabela 9 – Atribuições das bandas espectrais na região infravermelho para as nanocápsulas sintetizadas.

| Número de onda (cm <sup>-1</sup> ) | Atribuições  | Referências                |
|------------------------------------|--|----------------------------|
| 989                                | $\nu$ esqueléticos do invólucro polimérico.                  | (VASILEV et al., 2014)     |
| 1082                               | $\delta$ fora do plano CHCH <sub>2</sub>                     | (VASILEV et al., 2014)     |
| 1224                               | $\nu$ C-O de éter aromático                                  | (VASILEV et al., 2014)     |
| 1548                               | $\delta$ N-H de grupos uretanos                              | (STEINMACHER et al., 2017) |
| 1609                               | $\nu_{ass}$ C=C de aromáticos                                | (VASILEV et al., 2014)     |
| 1648                               | $\nu$ C=O de poliureia                                       | (STEINMACHER et al., 2017) |
| 1734                               | $\nu$ C=O de poliuretana                                     | (STEINMACHER et al., 2017) |
| 2278                               | Grupos NCO relativos ao TDI                                  | (BAIER et al., 2010)       |
| 2851                               | $\nu$ C-H de carbono sp <sup>3</sup> de compostos aromáticos | (VASILEV et al., 2014)     |
| 2925                               | $\nu$ C-H de carbono sp <sup>2</sup> relativos ao PGPR       | (VASILEV et al., 2014)     |
| 3368                               | $\nu_{ass}$ O-H  | (PRAMANIK et al., 2018)    |

Fonte: Elaborado pela autora (2019).

De acordo com os resultados obtidos na Tabela 9 verifica-se a presença de regiões em 1648 cm<sup>-1</sup> referente a estiramento de carbonila, característicos de formação de poliureia no composto, este fato indica que pode ocorrer reação colateral do isocianato com a água levando a unidades de ureia, na região de 2278 cm<sup>-1</sup> de estiramentos de isocianatos residuais, que podem ser explicados devido a escolha da rota sintética, haja vista que o processo de solubilização do amido ocorre a 50 °C, e posteriormente a síntese segue sem aquecimento, somente com agitação, a literatura reporta que a solubilização do amido sucede por gelatinização, que ao passar por aquecimento, seguido de resfriamento, ou seja, quando o sistema é mantido apenas na agitação, o polissacarídeo em questão é gelatinizado e incorporado em uma rede

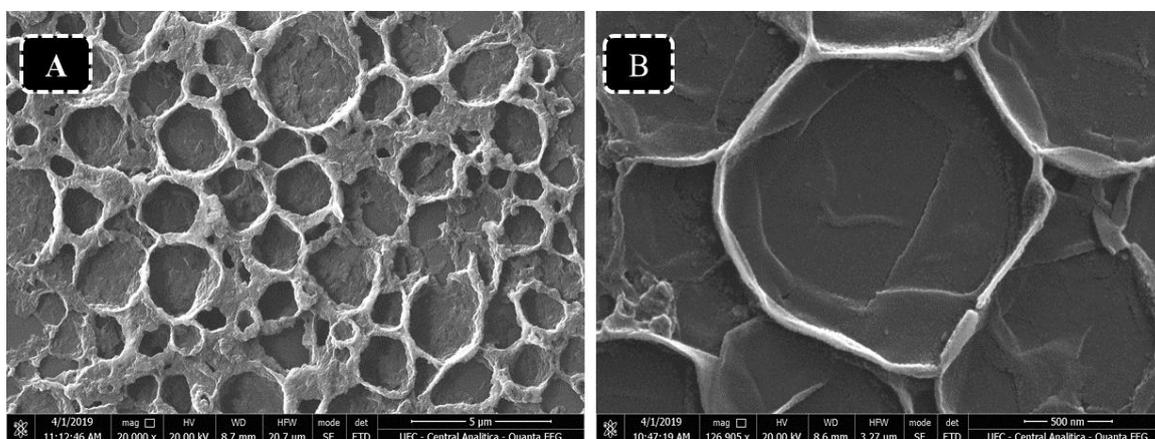
interconectada de agregados poliméricos (STEINMACHER et al., 2017).

Como a reação de reticulação ocorre na interface entre a gota e a fase contínua, o processo de gelatinização pode reduzir a mobilidade do amido no interior da gotícula presente na fase aquosa, resultando em uma menor concentração de hidroxilas presentes na região interfacial da gota, é justificado então, a utilização do reticulante em excesso, com intuito de garantir a reação com as hidroxilas reativas nas cápsulas, sendo os grupos de isocianatos (NCO) residuais hidrolisados no processo de redispersão das nanocápsulas que ocorre em meio aquoso.

#### 4.3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura é uma técnica amplamente utilizada para analisar fenômenos de superfície de materiais, destaca-se por ser um método versátil aplicado na caracterização de sistemas nanoestruturados que fornece informações qualitativas, tais como: topografia, morfologia, composição a informações cristalográficas (SHARMA et al., 2018). Morfologia sugere a forma e o tamanho, enquanto que topografia fornece informações sobre as características da superfície e textura, ao passo que a composição e cristalografia demonstram os principais compostos dispostos na superfície do material, bem como seu arranjo espacial (BRABAZON; RAFFER, 2014). Para o referido estudo a técnica foi utilizada para verificar a possível formação da estrutura *core shell* das nanocápsulas sintetizadas, que está demonstrada na Figura 16.

Figura 16 – Imagens de MEV da nanocápsula sintetizada: (a) escala 5  $\mu\text{m}$  e (b) escala 500 nm.



Fonte: Central analítica – UFC (2019).

Em trabalhos relatados por Steinmacher et al. (2017), as características da

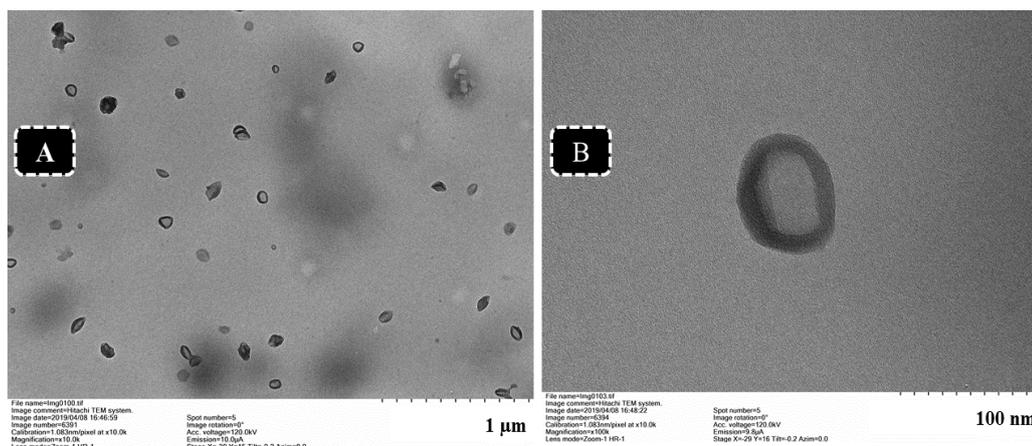
polimerização e/ou reticulação interfacial são responsáveis pela morfologia final da cápsula que é composta por um invólucro do amido reticulado, com núcleo mais volumoso e aquoso, que ao ser submetido a análise de microscopia realizada com o uso de sistema a vácuo, essa porção composta por água é removida, por evaporação, conferindo as cápsulas os espaços oriundos da região do núcleo, e a morfologia assemelha-se a bolas esvaziadas.

Pela análise observada na Figura 16, pode-se verificar que as cápsulas apresentam estruturas com morfologias com estruturas núcleo/concha, que já era esperado de acordo com o método de síntese em miniemulsão adotado, e está em concordância com a literatura (HAN et al., 2019). Outro fator que pode ser avaliado pela imagem está na organização espacial dos sistemas, com o qual verifica-se que as nanocápsulas apresentam aglomerações, denotando através desta figura a moderada polidispersividade do sistema, o que corrobora com os valores de PDI pela técnica de ELD.

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

A microscopia eletrônica de transmissão é um método substancial no que tange a avaliação da micromorfologia, bem como, a estrutura interna de materiais nanoestruturados. Dentre os principais objetivos verificados por MET, podem se destacar o estudo relacionado a formação da estrutura, o tamanho e distribuição destes sistemas, por sua vez são de fundamental importância na nanotecnologia, de modo que o conhecimento detalhado da microestrutura destes materiais torna possível o entendimento e, em muitos casos, até a previsão das propriedades e do comportamento dos mesmos (SHIRIN-ABADI, A. R.; KHOEE, S.; RAHIM-ABADI, M., 2014). Nessa perspectiva, no referido estudo a técnica foi utilizada com intuito de verificar a estrutura interna das nanocápsulas sintetizadas. Os resultados obtidos estão dispostos na Figura 17.

Figura 17 – Imagens de MET da nanocápsula sintetizada: (a) escala 1  $\mu\text{m}$  e (b) escala 100 nm.



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

De acordo com os resultados elucidados na Figura 18, as nanocápsulas apresentam distribuição de tamanhos que variam em uma faixa entre 200 - 300 nm, estando em consonância com os resultados obtidos pelos valores de diâmetro hidrodinâmico obtidos pela análise de tamanho de partícula. Além disso, as micrografias possibilitam verificar a presença de estruturas de caráter esférico regular, e superfície densa, confirmando assim, a formação da estrutura *core-shell* (BAIER et al., 2010). Deste modo, pode-se verificar que a rota sintética adotada para a obtenção das nanocápsulas obteve sucesso, no que tange os aspectos morfológicos esperados pelos sistemas preparados. No entanto, pode-se avaliar que a espessura presente na parede polimérica das nanocápsulas não apresenta tamanhos uniformes, que pode estar relacionado ao caráter moderadamente polidisperso dos sistemas evidenciado pelos valores de PDI obtidos pela técnica de DLS (DEBELE; MEKURIA; TSAI, 2016).

A micromorfologia estrutural presente na superfície das nanocápsulas é um fator relevante, pois afeta diretamente no comportamento de liberação do fármaco encapsulado, pois se relaciona com os mecanismos, assim como, a cinética de formação da parede constituída pelo invólucro polimérico, conseqüentemente apresentando relação dependente da estrutura química e reatividade dos monômeros, da viscosidade e das propriedades da fase contínua (CUI et al., 2018).

#### 4.4 Teor de sólidos

O teor de sólidos (%TS) é um parâmetro utilizado para se avaliar quantitativamente a massa de materiais sólidos presentes em solução do material redispersado. Trata-se de uma

técnica gravimétrica na qual a 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 10 apresenta os percentuais obtidos para os sistemas analisados nesse trabalho.

Tabela 10 – Resultados obtidos para o teor de sólidos das nanocápsulas.

| <b>Sistema</b> | <b>Teor de sólidos (%)</b> |
|----------------|----------------------------|
| NC-HEA B       | 0,13                       |
| NC-AMD B       | 0,23                       |
| NC-FLX H       | 0,27                       |
| NC-FLX A       | 0,33                       |
| NC-TRX H       | 0,33                       |
| NC-TRX A       | 0,34                       |

Fonte: Elaborado pela autora (2019).

De acordo com os valores obtidos, pode-se verificar que o teor de sólidos para as amostras sintetizadas foram de 0,13 e 0,23% para as nanocápsulas de hidroxietilamido e amido (NC-HEA B e NC-AMD B) sem a presença de ativo; 0,27 e 0,33% para os sistemas com fluoxetina (NC-HEA F e NC-AMD F); e 0,33 e 0,34% para as amostras com troxerrutina em sua composição (NC-HEA T e NC-AMD T). 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 microorganismos estudados.

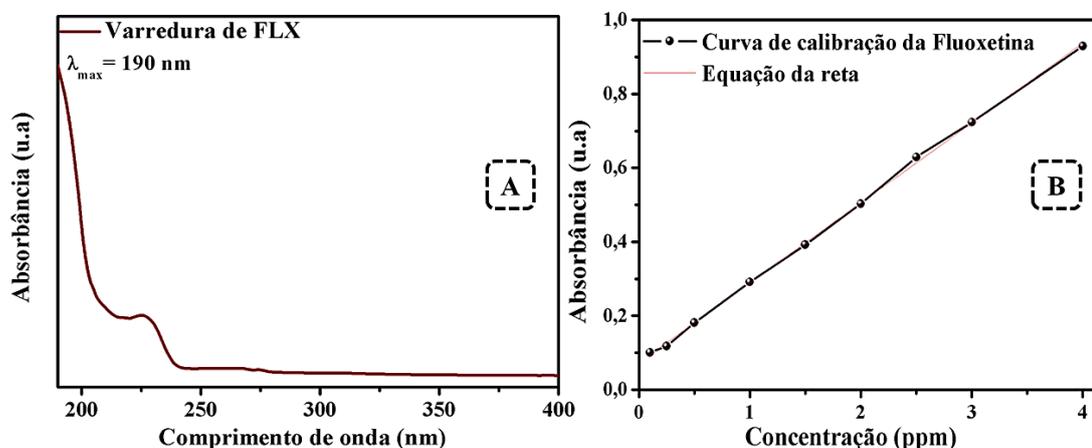
## **4.5 Eficiência de encapsulamento e capacidade de carregamento**

### ***4.5.1 Eficiência de encapsulamento do Cloridrato de fluoxetina***

Para realização do cálculo de eficiência de encapsulamento do cloridrato de fluoxetina, inicialmente foi realizada uma varredura, com intuito de se verificar o comprimento de onda com máximo de absorção do fármaco, a partir de então, adotou-se o procedimento para a preparação de uma curva de calibração para efetuar a quantificação presente do fármaco fora da cápsula. A Figura 18 apresenta o espectro de varredura de FLX (a) e sua respectiva curva de

calibração (b).

Figura 18 – Gráfico de varredura (a) e curva de calibração de FLX (b).



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

O comprimento de onda com máximo de absorção obtido pelo espectro de varredura do cloridrato de fluoxetina foi de 190 nm, verifica-se que o valor observado pela análise encontra-se divergente em comparação com dados obtidos pela literatura, em que trabalhos publicados por Mukhopadhyay; Pradhan; Samanta, (2015) demonstram valores de absorvância mais deslocados com  $\lambda$  máximo em 216 nm. O comportamento evidenciado pode ser justificado pela escolha do solvente, visto que para utilização da análise o fármaco foi solubilizado em água, já para o trabalho supracitado utilizou-se uma mistura binária de água e metanol com proporção (90:10).

A literatura reporta que solventes com maior polaridade deslocam as transições do tipo  $n \rightarrow \pi^*$  para comprimentos de onda com menores valores de  $\lambda$  máximo (PAVIA et al., 2010). O comprimento de onda obtido foi utilizado para se construir a curva de calibração apresentada na Figura 18 (b). A expressão gerada pela curva de FLX:  $A_{FLX} = 0,21598x + 0,07333$  com  $R^2 = 0,99915$ , de modo que a quantificação do fármaco se deu de acordo com os parâmetros elucidados na expressão, onde  $A_{FLX}$  representa a absorvância obtida durante a leitura realizada e  $x$  a concentração do fármaco fora da cápsula.

A partir da expressão, verifica-se que as nanocápsulas sintetizadas apresentam valores elevados de eficiência de encapsulamento, evidenciando fortes interações intermoleculares entre o fármaco e o núcleo aquoso da cápsula. A formulação com hidroxietilamido (NC-HEA F) apresentou eficiência de encapsulamento com valores >99,99% dentro dos limites de detecção do aparelho, a formulação com amido (NC-AMD A) apresentou

95,56% de EE%.

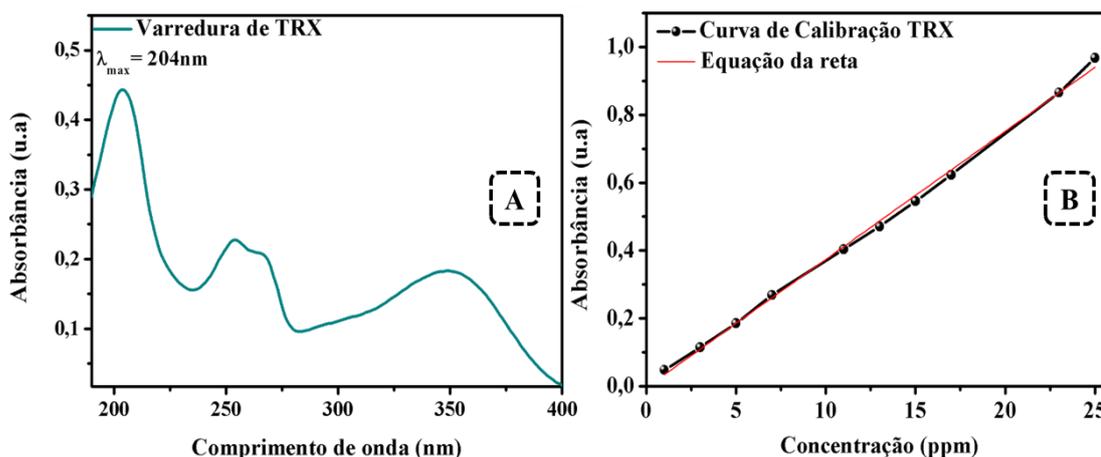
As diferenças elucidadas entre os valores de eficiência de encapsulamento demonstram que as cápsulas com HEA apresentam maiores interações com o bioativo, onde o comportamento observado pode ser justificado pelo processo de modificação química do polissacarídeo, o que confere ao polissacarídeo maior solubilidade em meio aquoso haja visto que a presença de grupamentos hidroxietila na estrutura menos impedidos estericamente favorece a interações de hidrogênio com a água (PALEOS; SIDERATOU; TSIOURVAS, 2017). Resultados semelhantes de EE% foram relatados na literatura em estudos publicados por Baier et al. (2012) que desenvolveram nanocápsulas de hidroxietilamido com valores de 98% de EE% sugerindo que o invólucro polimérico da cápsula possui estabilidade química.

Através dos valores obtidos pela curva de calibração, também foi possível avaliar o sistema quanto a mensuração da quantidade em massa de bioativo encapsulado, o que viabiliza analisar quantitativamente a capacidade de carregamento (CC%) do sistema, para a formulação NC-HEA F, obteve 2,08% de CC enquanto que o sistema NC-AMD F apresentou 1,98% de CC, estes resultados estão em concordância 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, de eficiência de encapsulamento e 1,9% de capacidade de carregamento, verifica-se que a capacidade de carrear uma maior quantidade de ativo por massa de carreador, confere ao sistema uma maior probabilidade de apresentar potenciais aplicações farmacológicas.

#### ***4.5.2 Eficiência de encapsulamento da Troxerrutina***

Para a obtenção da eficiência de encapsulamento das nanocápsulas com troxerrutina realizou-se o procedimento equivalente ao que fora adotado para as cápsulas com cloridrato de fluoxetina, para tal a verificação do valor de  $\lambda$  máximo através de uma varredura no UV-VIS é primordial para preparação da curva de calibração, que foi utilizada para efetuar a quantificação presente do fármaco fora da cápsula O espectro de varredura de TRX (a), bem como sua respectiva curva de calibração (b) estão apresentados na Figura 20.

Figura 19 – Gráfico de varredura (a) e Curva de calibração de TRX (b).



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

De acordo com os valores obtidos pelo espectro de varredura da troxerrutina, verifica-se que o comprimento de onda com máximo de absorção foi de 204 nm, pode-se observar que o comportamento observado foi semelhante ao que fora analisado para FLX, de modo que o espectro apresenta deslocamento para menores valores de  $\lambda$  máximo em comparação com estudos desenvolvidos por Khattab et al. (2015) que encontrou comprimento de onda máximo próximo a 248 nm, essa diferença foi anteriormente discutida e pode estar atribuída a utilização do solvente, com o qual verifica-se que solventes com maior polaridade deslocam para comprimentos de onda com menores valores de  $\lambda$  máximo (PAVIA et al., 2010). O espectro de varredura obtido foi utilizado para se construir a curva de calibração apresentada na Figura 19 (b). A expressão gerada pela curva de TRX:  $A_{TRX} = 0,03775x - 0,00367$  com  $R^2 = 0,99755$ .

Pela análise da expressão gerada, verificou-se que as cápsulas sintetizadas NC-HEA T e NC-AMD T apresentaram os seguintes valores de eficiência de encapsulamento 93,97% e 97,19%, respectivamente. Além disso, foi possível avaliar quantidade de fármaco encapsulado em massa obtida a partir dos valores de eficiência de encapsulamento, com objetivo de quantificar a capacidade de carregamento (CC%) dos sistemas preparados, que apresentaram: 1,95 % e 2,02 % de CC%, para as formulações NC-TRX H e NC-TRX A, respectivamente.

Os resultados obtidos demonstram que a metodologia de miniemulsão inversa para obtenção das cápsulas foi eficiente quanto a interação entre os bioativos com núcleo aquoso e estão em concordância com estudos publicados por Kang et al. (2015), com o qual é sugerido que sistemas com valores de EE% superiores a 90% demonstram estabilidade coloidal quanto a matriz polimérica. Os valores de capacidade de carregamento estão em consonância com o que

fora discutido na sessão 4.3.5.1 denotando ao sistema potencialidade para aplicações no campo farmacêutico.

#### 4.6 Teste de atividade antimicrobiana

As infecções causadas por microrganismos resistentes são consideradas um dos grandes desafios existentes na medicina clínica, pois envolvem altas taxas de morbidade e mortalidade, bem como aumento dos custos de tratamento devido à limitação da eficácia dos medicamentos existentes e à falha na dosagem clínica. Uma das bactérias multirresistentes (MR) mais difundidas é o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), tratam-se de bactérias gram-positivas, e são uma das principais causas relacionadas a infecções hospitalares, além disso, têm sido relatadas por apresentar um aumento significativo em sua incidência em diferentes países, sendo consideradas um problema de saúde pública (VAZIRIAN et al., 2019).

Neste contexto, o controle de infecções por MRSA pode ser útil na redução dos custos de morbidade, mortalidade e cuidados de saúde. Deste modo, com intuito de verificar o efeito antimicrobiano nos sistemas encapsulados, as formulações foram testadas frente aos micro-organismos *Staphylococcus aureus* (ATCC<sup>®</sup> 6538P<sup>TM</sup>), e duas cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA). Entretanto o fármaco TRX não demonstrou resposta frente as bactérias testadas, sendo assim não se realizou ensaios com TRX encapsulado. Desta forma, os resultados expostos na Tabela 11 expressam as respostas obtidas das nanocápsulas com o fármaco FLX, assim como, seus respectivos controles.

Tabela 11 – Avaliação do efeito antibacteriano das formulações de fluoxetina NC-AMD F e NC-HEA F frente a isolados de bactérias patogênicas.

| Subst.   | CIM <sup>b</sup> (µg mL <sup>-1</sup> )                              |                   |                                  |                                  |
|----------|--|-------------------|----------------------------------|----------------------------------|
|          | Cepas <sup>a</sup><br>ATCC <sup>®</sup><br><i>S. aureus</i><br>6538P | MRSA <sup>®</sup> | Cepa Clínica<br>MRSA 1<br>(1831) | Cepa Clínica<br>MRSA 2<br>(2046) |
| NC-AMD F | 95   | 95                | 190                              | 95                               |
| NC-AMD B | 50%  | 50%               | 50%                              | 50%                              |
| NC-HEA F | 95   | 95                | 95                               | 190                              |
| NC-HEA B | 50%  | 50%               | 50%                              | 100%                             |
| FLX      | 255  | 255               | 255                              | 255                              |
| HEA      | >2000  | >2000             | --                               | --                               |
| AMD      | >2000  | >2000             | --                               | --                               |

<sup>a</sup> Cepas de bactérias isoladas de coleção.

<sup>b</sup> CIM foi definido como a mais baixa concentração que produziu 100% de redução do crescimento das células bacterianas após 20 h de incubação.

De acordo com os resultados dispostos, verifica-se que AMD não apresentou atividade antibacteriana dentro da faixa testada. HEA apresentou atividade na concentração de 2000 µg/ml. O cloridrato de fluoxetina apresentou atividade antibacteriana na faixa de 255 µg/ml. As formulações sintetizadas: NC-HEA B, NC-AMD B, NC-HEA F e NC-AMD F apresentaram atividade antibacteriana na faixa de 190-95 µg/ml frente a todos os microrganismos isolados. Estes resultados demonstram que o processo de obtenção das nanocápsulas atuou de modo significativo para efeitos de ação antimicrobiana, visto que AMD e HEA não apresentam atividade, já as nanocápsulas produzidas com os respectivos polissacarídeos possuem a ação antimicrobiana.

Além disso, pode-se verificar que as nanocápsulas com FLX apresentaram menores valores de CIM em comparação com os resultados obtidos do fármaco livre, estes resultados estão em consonância com estudos publicados por Nobre Júnior et al., (2019) que trabalhou com os mesmos microrganismos testados pela análise. O autor sugere que a inibição do crescimento bacteriano ocorre entre as moléculas do fármaco com as células bacterianas, caracterizando o mesmo como agente bactericida. O menor valor de (CIM) obtido nas nanocápsulas pode ser evidenciado por um possível efeito sinérgico oriundo do processo de interação intermolecular entre o fármaco e o núcleo, bem como a ação involucro polimérico presente na própria cápsula

frente ao efeito antibacteriano verificado. Nesse contexto, pode-se propor que a formação das cadeias de poliuretano, formadas pela reação de reticulação, promove uma maior interação com o meio celular existente nos micro-organismos, confirmada pela inibição do crescimento bacteriano das cepas inicialmente resistentes (LAM et al., 2018). Deste modo, o desenvolvimento de sistemas com potencial efeito antimicrobiano surge como uma alternativa terapêutica viável para aplicação em doenças infecciosas.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os fármacos FLX e TRX foram caracterizados por FT-IR, que possibilitou a confirmação das suas estruturas químicas através de bandas específicas para cada ativo. De acordo com a análise térmica por DSC, verificou-se a presença de picos endotérmicos com máximo de intensidade em 159,59 °C para FLX, referente ao ponto de fusão do material, para TRX, verifica-se dois picos endotérmicos sendo o primeiro em 71,29 °C e o segundo 144,08 °C, relativo a perdas sucessivas de água. A pureza destes materiais foi determinada por CLAE, sendo 98,97% para FLX e 98,57% para TRX.

As nanocápsulas sintetizadas foram otimizadas, quanto a variação da taxa de concentração do surfactante PGPR em relação a fase aquosa, onde o sistema NC-B10 apresentou maior estabilidade, sendo este utilizado para a preparação das demais formulações. Estes sistemas apresentaram boa estabilidade coloidal, avaliada pela técnica de ELD, com valores de diâmetro médio de partícula variando entre 251 e 260 nm para as cápsulas sem ativo e entre 300 a 360 nm para àquelas que continham o fármaco incorporado à sua formulação, os valores de PDI entre 0,21 e 0,33 sugerem moderada polidispersividade nos sistemas nanoestruturados. além disso, os valores de potencial zeta foram superiores a  $\pm 30$  mV o que caracteriza alta estabilidade quanto a degradações físicas.

Para confirmação da formação das nanocápsulas, as mesmas foram caracterizadas quimicamente e análise de sua morfologia. Pela técnica de FT-IR foi possível confirmar a reação de reticulação, entre as cadeias reativas do polissacarídeo com os grupamentos isocianatos do reticulante TDI, pelo surgimento de bandas nas regiões de 1733 e 1544  $\text{cm}^{-1}$  relativo a formação de poliuretanas na estrutura. Pelas análises de MEV e MET foi possível confirmar a formação da estrutura *core shell* nos sistemas encapsulados.

A eficiência de encapsulamento das nanocápsulas apresentou valores superiores a 90%, evidenciando fortes interações intermoleculares entre o fármaco e o núcleo aquoso da cápsula, sendo a formulação NC-HEA F com maior valor de EE% (>99,99%). Além disso, formulações sintetizadas foram avaliadas quanto ao seu efeito antimicrobiano, frente às bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC<sup>®</sup> 6538P<sup>™</sup>), e duas cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA 1 e MRSA 2), de modo que os sistemas com FLX apresentaram atividade antibacteriana na faixa de 190-95  $\mu\text{g/ml}$  frente a todos os micro-organismos isolados. Deste modo, o método de miniemulsão foi satisfatório para a formulação de sistemas com potencial aplicação farmacológica.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, D.; GERALDO, L.; OLIVEIRA, S. De; GONÇALVES, D.; MACÊDO, D.; ROSE, I.; MENEZES, A. De; GALBERTO, J.; ARLENE, M.; RODRIGUES, S.; MARIA, M.; SOUZA, D. A. Promising medicinal plants for bioprospection in a Cerrado area of Chapada do Araripe , Northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, Crato, v. 155, p. 1522–1533, 2014. DOI 10.1016/j.jep.2014.07.042.
- ARTUSIO, F.; BAZZANO, M.; PISANO, R.; RIZZA, G.; SCHILLER, T.; SANGERMANO, M. Polymeric nanocapsules via interfacial cationic photopolymerization in miniemulsion. **Polymer**, Torino, v. 139, p. 155–162, 2018. DOI 10.1016/j.polymer.2018.02.019.
- AYAZ, M.; SUBHAN, F.; AHMED, J.; KHAN, A. U.; ULLAH, F.; SADIQ, A.; SYED, N. I. H.; ULLAH, I.; HUSSAIN, S. Citalopram and venlafaxine differentially augments antimicrobial properties of antibiotics. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, Pakistan, v. 72, n. 6, p. 1269–1278, 2015. ISSN 0001-6837.
- BABRI, S.; MOHADDES, G.; FEIZI, I.; MOHAMMADNIA, A.; NIAPOUR, A.; ALIHEMMATI, A.; AMANI, M. Effect of troxerutin on synaptic plasticity of hippocampal dentate gyrus neurons in a  $\beta$ -amyloid model of Alzheimer ' s disease : An electrophysiological study. **European Journal of Pharmacology**, Tabriz, v. 732, p. 19–25, 2014. DOI 10.1016/j.ejphar.2014.03.018.
- BAIER, G.; BAUMANN, D.; SIEBERT, J. M.; MUSYANOVYCH, A.; MAILÄNDER, 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.
- BALUCHNEJADMOJARAD, T.; JAMALI-RAEUFY, N.; ZABIHNEJAD, S. Troxerutin exerts neuroprotection in 6-hydroxydopamine lesion rat model of Parkinson ' s disease : Possible involvement of PI3K / ER  $\beta$  signaling. **European Journal of Pharmacology**, Tehran, v. 801, n. August 2016, p. 72–78, 2017. DOI 10.1016/j.ejphar.2017.03.002
- BIANCHI, M.; CANAVESI, R.; APRILE, S.; GROSA, G.; GROSSO, E. Del. Troxerutin , a mixture of O -hydroxyethyl derivatives of the natural flavonoid rutin : Chemical stability and analytical aspects. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Novara, v. 150, p. 248–257, 2018. DOI 10.1016/j.jpba.2017.12.018.
- BONENFANT, D.; MIMÉAULT, M.; NIQUETTE, P.; HAUSLER, R. Adsorption study of a commonly used antidepressant drug, fluoxetine hydrochloride, onto a crosslinked  $\beta$ -cyclodextrin-carboxymethylcellulose polymer. **Water Science and Technology**, Quebec, v. 66, n. 1, p. 224–230, 2012. DOI: 10.2166/wst.2012.112.
- BRABAZON, D.; RAFFER, A. Advanced characterization techniques for nanostructures.

**Emerging Nanotechnologies for Manufacturing**, Dublin, p. 53–85, 2014. DOI: 10.1016/B978-0-323-28990-0.00003-8.

BUREAU, S.; COZZOLINO, D.; CLARK, C. J. Contributions of Fourier-transform mid infrared (FT-MIR) spectroscopy to the study of fruit and vegetables: A review. **Postharvest Biology and Technology**, Avignon, v. 148, n. May 2018, p. 1–14, 2019. DOI 10.1016/j.postharvbio.2018.10.003.

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**, Vera Cruz, p. 1–26, 2018. DOI 10.1007/s12393-018-9176-z.

CARVALHO-JR, P. S.; DA SILVA, C. C. P.; DINIZ, L. F.; SOUZA, M. S.; TENORIO, J. C.; ELLENA, J. Paroxetine and Fluoxetine Hexafluorosilicate salts: Synthesis, crystal structure, Hirshfeld surface, and supramolecular analysis. **Journal of Fluorine Chemistry**, São Carlos, v. 209, n. October 2017, p. 23–32, 2018. DOI 10.1016/j.jfluchem.2018.02.004.

CHEN, Y. F.; KAUR, L.; SINGH, J. **Chemical Modification of Starch**. [s.l.] Elsevier Ltd, Palmerston North, 2018. DOI 10.1016/B978-0-08-100868-3.00007-X.

CORDENONSI, L. M.; SPONCHIADO, R. M.; CAMPANHARO, S. C.; GARCIA, C. V.; RAFFIN, R. P. Study of Flavonoids presente in Pomelo ( Citrus máxima ) by DSC , UV-VIS , IR , 1 H AND 13 C NMR AND MS. **Drug Analytical Research**, Porto Alegre, p. 31–37, 2017. DOI: 10.22456/2527-2616.74097.

CRAIG, D. Q. M. *Pharmaceutical Applications of DSC*. 1st Edition, Boca Raton: CRC Press 2007. *E-book*.

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

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

EUROPEAN PHARMACOPOEIA COMISSION. **European Pharmacopoeia**, Sainte-Ruffine, v.1. 8th 2013. DOI 10.1002/jps.2600591048.

EVANGELISTA, S. de S.; OLIVEIRA, A. C. de. Staphylococcus aureus metilino resistente adquirido na comunidade: um problema mundial. **Revista Brasileira de Enfermagem**, Belo Horizonte v. 68, n. 1, p. 136–143, 2016. DOI 10.1590/0034-7167.2015680119p.

FILHO, M. B.; MOREIRA, E.; GOMES, T.; MACE, R. O. Thermal characterization of the quercetin and rutin flavonoids. **Thermochimica Acta**, João Pessoa, v. 393, p. 79–84, 2002. DOI 10.1016/S0040-6031(02)00087-4.

GAIKWAD, V. L.; CHOUDHARI, P. B.; BHATIA, N. M.; BHATIA, M. S. Characterization of pharmaceutical nanocarriers: in vitro and in vivo studies. *In: GRUMEZESCU, Alexandru Mihai. Nanomaterials for Drug Delivery and Therapy*, Pune: Elsevier Inc., 2019.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-816505-8.00016-3>. Acesso em: 18 maio 2019.

GARRIDO, M.; GARRIDO, J.; CALHEIROS, R.; MARQUES, P. M.; BORGES, F. Fluoxetine and norfluoxetine revisited: New insights into the electrochemical and spectroscopic properties. **Journal of Physical Chemistry A**, Porto, v. 113, n. 36, p. 9934–9944, 2009. DOI 10.1021/jp904306b.

GEORGE, A.; SHAH, P. A.; SHRIVASTAV, P. S. Natural biodegradable polymers based nano-formulations for drug delivery: A review. **International Journal of Pharmaceutics**, Ahmedabad, v. 561, n. December 2018, p. 244–264, 2019. DOI 10.1016/j.ijpharm.2019.03.011.

GOPINATH, V.; SARAVANAN, S.; AL-MALEKI, A. R.; RAMESH, M.; VADIVELU, J. Biomedicine & Pharmacotherapy A review of natural polysaccharides for drug delivery applications : Special focus on cellulose , starch and glycogen. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Kuala Lumpur, v. 107, p. 96–108, 2018. DOI 10.1016/j.biopha.2018.07.136.

HAN, S.; LYU, S.; WANG, S.; FU, F. High-intensity ultrasound assisted manufacturing of melamine-urea-formaldehyde/paraffin nanocapsules. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Beijing, v. 568, p. 75–83, 2019. DOI 10.1016/j.colsurfa.2019.01.054.

HAPONIUK, T.; THOMAS, S.; GOPI, S.; JACOB, J. Biopolymer based nanomaterials in drug delivery systems : A review. **Materials Today Chemistry**, Kottayam, v. 9, n. 13, p. 43–55, 2018. DOI 10.1016/j.mtchem.2018.05.002.

HAQ, F.; YU, H.; WANG, L.; TENG, L.; HAROON, M.; KHAN, R. U.; MEHMOOD, S.; BILAL-UL-AMIN; ULLAH, R. S.; KHAN, A.; NAZIR, A. Advances in chemical modifications of starches and their applications. **Carbohydrate Research**, Hangzhou, v. 476, n. February, p. 12–35, 2019. DOI 10.1016/j.carres.2019.02.007.

HARWANSH, R. K.; DESHMUKH, R.; RAHMAN, M. A. Nanoemulsion: Promising nanocarrier system for delivery of herbal bioactives. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, Mathura, v. 51, n. January, p. 224–233, 2019. DOI 10.1016/j.jddst.2019.03.006.

HOORES FAND, Z.; GHANBARZADEH, S.; HAMISHEHKAR, H. Preparation and Characterization of Rutin-loaded Nanophytosomes. **Pharmaceutical Sciences**, Tabriz, v. 21, n. 3, p. 145–151, 2015. DOI 10.15171/PS.2015.29.

HOYOS-LEYVA, J. D.; BELLO-PÉREZ, L. A.; ALVAREZ-RAMIREZ, J.; AGAMA-ACEVEDO, E. Structural characterization of aroid starches by means of chromatographic techniques. **Food Hydrocolloids**, Morelos, v. 69, p. 97–102, 2017. DOI 10.1016/j.foodhyd.2017.01.034.

HUANG, Z.; ZHANG, L.; WANG, Y.; GAO, H.; LI, X.; HUANG, X. Effects of rutin and its

derivatives on citrinin production by *Monascus aurantiacus* Li AS3 . 4384 in liquid fermentation using different types of media. **Food Chemistry**, Nanchang, v. 284, n. 235, p. 205–212, 2019. DOI 10.1016/j.foodchem.2019.01.109.

JAIN, A. K.; THAREJA, S. *In vitro* and *in vivo* characterization of pharmaceutical nanocarriers used for drug delivery. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, Chhattisgarh, v. 47, n. 1, p. 524–539, 2019. DOI 10.1080/21691401.2018.1561457.

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.

KARAMI, Z.; REZA, M.; ZANJANI, S.; HAMIDI, M. Nanoemulsions in CNS drug delivery : recent developments, impacts and challenges. **Drug Discovery Today**, Zanzan, v. 24, n. 05, p. 1104-1115, 2019. DOI 10.1016/j.drudis.2019.03.021.

KELMANN, R. G.; CARMIGNAN, F.; BERTOL, C. D.; CRUZ, A. P.; SILVA, M. A. S.; FOPPA, T.; MURAKAMI, F. S.; SARTORI, T.; GRANADA, A. Thermoanalytical study of fluoxetine hydrochloride. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, Florianópolis, v. 87, n. 2, p. 463–467, 2007. DOI 10.1007/s10973-005-7471-4.

KHAN, F.; AHMAD, S. R. Polysaccharides and Their Derivatives for Versatile Tissue Engineering Application. **Macromolecular Bioscience**, Edinburgh, v. 13, p. 395–421, 2013. DOI 10.1002/mabi.201200409.

KHATTAB, F. I.; RAMADAN, N. K.; HEGAZY, M. A.; AL-GHOBASHY, M. A.; GHONIEM, N. S. Validated spectrophotometric methods for simultaneous determination of troxerutin and carbazochrome in dosage form. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Cairo, v. 139, p. 206–213, 2015. DOI 10.1016/j.saa.2014.12.047.

KHLESTKIN, V. K.; PELTEK, S. E.; KOLCHANOV, N. A. Review of direct chemical and biochemical transformations of starch. **Carbohydrate Polymers**, Novosibirsk, v. 181, p. 460–476, 2018. DOI 10.1016/j.carbpol.2017.10.035.

KOU, T.; GAO, Q. New insight in crosslinking degree determination for crosslinked starch. **Carbohydrate Research**, Guangzhou, v. 458–459, p. 13–18, 2018. DOI 10.1016/j.carres.2018.01.009.

LAM, S. J.; WONG, E. H. H.; BOYER, C.; QIAO, G. G. Progress in Polymer Science Antimicrobial polymeric nanoparticles. **Progress in Polymer Science**, Parkville, [s. l.], v. 76, p. 40–64, 2018. DOI 10.1016/j.progpolymsci.2017.07.007.

LANDFESTER, K.; MAILA, V. Nanocapsules With Specific Targeting and Release Properties Using Miniemulsion Polymerization. **Expert Opinion on Drug Delivery**, Mainz, v. 10, n 05 p. 593–609, 2013. DOI 10.1517/17425247.2013.772976.

LI, D.; SUN-WATERHOUSE, D.; WANG, Y.; QIAO, X.; CHEN, Y.; LI, F. Interactions of

Some Common Flavonoid Antioxidants. **Encyclopedia of Food Chemistry**, Taian, v. 02, p. 644-649, 2019. DOI 10.1016/B978-0-08-100596-5.21509-6.

LIM, C.; TAKAHASHI, E.; HONGSUWAN, M.; WUTHIEKANUN, V. Epidemiology and burden of multidrug-resistant bacterial infection in a developing country. **eLife**, Bangkok, v. 5, p. 1–18, 2016. DOI 10.7554/eLife.18082.

LUO, M. R. **Handbook of Ultrasonics and Sonochemistry**. 1th. ed. Singapore: Springer Nature, 2016. *E-book*.

MACEDO, D.; JOSÉ, A.; CHAVES, M.; NÁDIA, C.; SOUSA, S. De; QUEVEDO, J.; BARICHELLO, T.; VITORIANO, H.; JÚNIOR, N.; LUCENA, D. F. De. Antidepressants, antimicrobials or both? Gut microbiota dysbiosis in depression and possible implications of the antimicrobial effects of antidepressant drugs for antidepressant effectiveness. **Journal of Affective Disorders**, Fortaleza, v. 208, n. 15. p. 22-32, 2017. DOI 10.1016/j.jad.2016.09.012.

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. 02, p. 1–11, 2018. DOI 10.1016/j.ejpb.2018.01.011.

MINAKAWA, A. F. K.; FARIA-TISCHER, P. C. S.; MALI, S. Simple ultrasound method to obtain starch micro- and nanoparticles from cassava, corn and yam starches. **Food Chemistry**, Londrina, v. 283, n. 15, p. 11–18, 2019. DOI 10.1016/j.foodchem.2019.01.015.

MOHITE, S. K.; DESHMUKH, M. T. PREPARATION AND EVALUATION OF MUCOADHESIVE MICROSPHERE OF FLUOXETINE HCl. **Internacional Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 8, n. 9, p. 3776–3785, 2017. DOI 10.5958/0974-360X.2019.00119.7

MORADI, S.; ANARJAN, N. Preparation and characterization of  $\alpha$ -tocopherol nanocapsules based on gum Arabic-stabilized nanoemulsions. **Food Science and Biotechnology**, Tabriz, v. 28, p. 413–421, 2018. DOI 10.1007/s10068-018-0478-y.

MUKHOPADHYAY, A.; PRADHAN, K. K.; SAMANTA, R. Development and Validation of an UV- Spectrometric Method for the Estimation of Fluoxetine in Pure and Tablet Dosage Forms. **Internacional Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, Jharkhand, v. 5, n. April 2014. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.5(8).3418-24.

MUNOZ-BELLIDO, J. L.; MUNOZ-CRIADO, S.; GARCÍA-RODRÍGUEZ, J. A. Antimicrobial activity of psychotropic drugs. Selective serotonin reuptake inhibitors. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Salamanca, v. 14, n. 3, p. 177–180, 2000. DOI 10.1016/S0924-8579(99)00154-5.

NOBRE JÚNIOR, H. V.; SAMPAIO, L. S.; DIAS BARROSO, F. D.; ALEXANDRE JOSINO, M. A.; ROCHA DA SILVA, C.; AIRES DO NASCIMENTO, F. B. S.; BATISTA DE ANDRADE NETO, J.; DE SÁ CARNEIRO, I.; CAVALCANTI, B. C.; LIMA DE MESQUITA, J. R.; JUVÊNCIO DA SILVA, L.; GURGEL DO AMARAL VALENTE SÁ, L.; ODORICO DE MORAES, M.; DE SOUSA CAMPOS, R. A mechanistic approach to the in-

vitro resistance modulating effects of fluoxetine against meticillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Microbial Pathogenesis**, Fortaleza, v. 127, n. August 2017, p. 335–340, 2019. DOI 10.1016/j.micpath.2018.11.056.

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

FAROMBI, E. O.; AKINMOLADUN, A. C.; OWUMI, S. E. Anti-cancer Foods: Flavonoids. *In*: MELTON, L.; SHAHIDI, F.; VARELIS, P. (Eds.). **Encyclopedia of Food Chemistry**. Ibadan: Oxford: Academic Press, 2019. p. 224–236.

PACIA, M. Z.; KOCHAN, K.; WIERCIGROCH, E.; MALEK, K.; KACZOR, A.; SZAFRANIEC, E.; CZAMARA, K.; MAJZNER, K.; BARANSKA, M. Raman and infrared spectroscopy of carbohydrates: A review. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Krakow, v. 185, p. 317–335, 2017. DOI 10.1016/j.saa.2017.05.045.

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

PANAT, N. A.; MAURYA, D. K.; GHASKADBI, S. S.; SANDUR, S. K. Troxerutin, a plant flavonoid, protects cells against oxidative stress-induced cell death through radical scavenging mechanism. **Food Chemistry**, Pune 411007, v. 194, p. 32–45, 2016. DOI 10.1016/j.foodchem.2015.07.078.

PANCHE, A. .; DIWAN, A. .; CHANDRA, S. . Flavonoids: an overview. **Journal of Nutritional Science**, Jharkhand, v. 5, n. 1–15, p. 15, 2016. DOI 10.1017/jns.2016.41.

PANDEY, K. U.; DALVI, S. V. Understanding stability relationships among three curcumin polymorphs. **Advanced Powder Technology**, Gujarat, v. 30, n. 2, p. 266–276, 2019. DOI 10.1016/j.apt.2018.11.002.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução a Espectroscopia**. 4a ed. Bellingham: Cengage learning, 2010. *E-book*.

PHAM, V. T.; NGUYEN, T. Q.; DAO, U. P. N.; NGUYEN, T. T. On the interaction between fluoxetine and lipid membranes: Effect of the lipid composition. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Ho Chi Minh City, v. 191, p. 50–61, 2018. DOI 10.1016/j.saa.2017.09.050.

PINTO, B. V.; FERREIRA, A. P. G.; CAVALHEIRO, E. T. G. A mechanism proposal for fluoxetine thermal decomposition. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, Budapest, v. 130, n. 3, p. 1553–1559, 2017. DOI 10.1007/s10973-017-6305-5.

PRADO, J. N.; PISSATTO, S.; MORAIS, E. C.; FOPPA, T.; MURAKAMI, F. S.; SILVA, M. A.; LABORAT, M. A. S. S. Validação de Metodologia Analítica por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para Doseamento de Cápsulas de Fluoxetina. **Acta Farm. Bonaerense**, Florianópolis, v. 25, n. 3, p. 436–440, 2006. ISSN 0326-2383.

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.

RENGASAMY, K. R. R.; KHAN, H.; GOWRISHANKAR, S.; LAGOA, R. J. L.; MAHOMOODALLY, F. M.; KHAN, Z.; SUROOWAN, S.; TEWARI, D.; ZENGIN, G.; HASSAN, S. T. S.; KARUTHA, S. The role of flavonoids in autoimmune diseases : Therapeutic updates. **Pharmacology and Therapeutics**, Karaikudi, v. 194, p. 107–131, 2019. DOI 10.1016/j.pharmthera.2018.09.009.

ROSENBAUER, E.; LANDFESTER, K.; MUSYANOVYCH, A. Surface-Active Monomer as a Stabilizer for Polyurea Nanocapsules Synthesized via Interfacial Polyaddition in Inverse Miniemulsion. **Langmuir**, Ulm, v. 18, n. 24, p. 12084–12091, 2009. DOI 10.1021/la9017097.

SAHA, P.; DAS, P. S. ADVANCES IN CONTROLLED RELEASE TECHNOLOGY IN PHARMACEUTICALS: A REVIEW. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 9, p. 2070–2084, 2017. DOI 10.20959/wjpps20179-10194.

SAKEER, K.; ISPAS-SZABO, P.; BENYERBAH, N.; MATEESCU, M. A. Ampholytic starch excipients for high loaded drug formulations : Mechanistic insights. **International Journal of Pharmaceutics**, Québec, v. 535, n. 1–2, p. 201–216, 2018. DOI 10.1016/j.ijpharm.2017.11.005

ŠATÍNSKÝ, D.; JÄGEROVÁ, K.; HAVLÍKOVÁ, L.; SOLICH, P. A New and Fast HPLC Method for Determination of Rutin, Troxerutin, Diosmin and Hesperidin in Food Supplements Using Fused-Core Column Technology. **Food Analytical Methods**, Hradec Králové, v. 6, n. 5, p. 1353–1360, 2013. DOI 10.1007/s12161-012-9551-y.

SCHAFFAZICK, R. S.; GUTERRES, S.S.; FREITAS, L.L.; POHLMANN, A.R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Quim. Nova**, Porto Alegre, v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003. DOI 10.1590/S0100-40422003000500017

SHARMA, S. K.; VERMA, D. S.; KHAN, L. U.; KUMAR, S.; KHAN, S. B. **Handbook of Materials Characterization**. Cham, Switzerland: © Springer International Publishing AG, 2018.

SHIRIN-ABADI, A. R.; KHOEE, S.; RAHIM-ABADI, M. M. Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects Kinetic and thermodynamic correlation for prediction of morphology of nanocapsules with hydrophobic core via miniemulsion polymerization. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Tehran, v. 462, p. 18–26, 2014. DOI 10.1016/j.colsurfa.2014.08.009.

SHRESTHA, A. K.; HALLEY, P. J. Starch Modification to Develop Novel Starch-Biopolymer Blends. In: **Starch Polymers**, South Wales, p. 105–143, 2014. DOI 10.1016/B978-0-444-53730-0.00022-1.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric Identification of**

**Organic Compounds.** 7th. New York: College of environmental Science & forestry, 2005. *E-book.*

SINGH, J.; KAUR, L.; MCCARTHY, O. J. Potato Starch and its Modification. In: KAUR, J. S. AND L. (Ed.). **Advances in Potato Chemistry and Technology.** 1st. ed. [s.l.]. Palmerston North: Elsevier Ltd., 2009. p. 273–318.

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**, Lucknow, v. 252, p. 28–49, 2017. DOI 10.1016/j.jconrel.2017.03.008.

STEFANO, I. C. A.; CONTERNO, L. O.; FILHO, C. R. da S.; MARIN, M. J. S. Medication use by the elderly: analysis of prescribing, dispensing, and use in a medium-sized city in the state of São Paulo. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, São Paulo, v. 20, p. 679–690, 2017. DOI 10.1590/1981-22562017020.170062.

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**, Mainz, v. 5, n. 2, p. 25, 2017. DOI 10.3390/pr5020025.

SUSAN, N.; GEORGE, K.; ALIAS, A.; SELVAM, A. Anticancer mechanism of troxerutin via targeting Nrf2 and NF- $\kappa$ B signalling pathways in hepatocarcinoma cell line. **Toxicology in Vitro**, Nadu, v. 54, n.10, p. 317–329, 2019. DOI 10.1016/j.tiv.2018.10.018.

SWAIN, R. P.; SUBUDHI, B. Effect of semicrystalline copolymers in solid dispersions of pioglitazone hydrochloride: in vitro - in vivo correlation . **Drug Development and Industrial Pharmacy**, Bhubaneswar, v. 0, n. 0, p. 1–12, 2019. DOI 10.1080/03639045.2019.1572183.

SWEETMAN, S. C. **Martindale:** The complete Drug Reference 38th ed. London: Pharmaceutical Press. v. 1–4, n. 1–5109, p. 5109, 2014.

TAN, W.; ZHANG, J.; LUAN, F.; WEI, L.; LI, Q.; DONG, F.; GUO, Z. Synthesis , characterization , and antifungal evaluation of novel 1,2,3-triazolium-functionalized starch derivative. **International Journal of Biological Macromolecules**, Beijing, v. 101, p. 845–851, 2017. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2017.03.171.

TANG, R.; LUO, J.; WANG, W.; LIU, D.; WANG, G.; GUO, X. Rutin's natural source Flos Sophorae as potential antioxidant and improver of fungal community in Chinese sausages. **LWT - Food Science and Technology**, Sichuan, v. 101, p. 435–443, 2019. DOI 10.1016/j.lwt.2018.11.064.

TAO, K.; LI, C.; YU, W.; GILBERT, R. G.; LI, E. How amylose molecular fine structure of rice starch affects functional properties. **Carbohydrate Polymers**, Jiangsu, v. 204, p. 24–31, 2019. DOI 10.1016/j.carbpol.2018.09.078.

THOMAS, N. S.; GEORGE, K.; ARIVALAGAN, S.; MANI, V.; SIDDIQUE, A. I.; NAMASIVAYAM, N. The in vivo antineoplastic and therapeutic efficacy of troxerutin on rat preneoplastic liver: biochemical, histological and cellular aspects. **European Journal of Nutrition**, Nadu, v. 56, n. 7, p. 2353–2366, 2017. DOI 10.1007/s00394-016-1275-0.

VASILEV, K.; TAHERI, S.; FÖRCH, R.; LANDFESTER, K.; BAIER, G.; BARTON, M.; MAJEWSKI, P. Synthesis and antibacterial properties of a hybrid of silver–potato starch nanocapsules by miniemulsion/polyaddition polymerization. **Journal of Materials Chemistry B**, Mawson Lakes, v. 2, n. 13, p. 1838, 2014. DOI 10.1039/c3tb21690j.

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**, Tehran, v. 6, n. 1, p. 1–10, 2019. DOI 10.22127/rjp.2018.80365.

VINOTHKUMAR, R.; VINOTH KUMAR, R.; KARTHICKUMAR, V.; VISWANATHAN, P.; KABALIMOORTHY, J.; NALINI, N. Oral supplementation with troxerutin (trihydroxyethylrutin), modulates lipid peroxidation and antioxidant status in 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Nadu, v. 37, n. 1, p. 174–184, 2014. DOI 10.1016/j.etap.2013.11.022.

WANG, M.; BAI, X.; JIANG, Y.; LANG, S.; YU, L. Preparation and characterization of low oil absorption starch via freeze-thawing. **Carbohydrate Polymers**, Changchun, v. 211, p. 266–271, 2019. DOI 10.1016/j.carbpol.2019.02.020.

WORSFOLD, P.; POOLE, C.; TOWNSHEND, A.; MIRÓ, M.; DIEHL, D. M.; BELL, D. S.; BOJKO, B. **Encyclopedia of Analytical Science**, 3th. Detroit: Elsevier Ltd, 2019. *E-book*.

XU, G. yun; TANG, X. jun. Troxerutin (TXN) potentiated 5-Fluorouracil (5-Fu) treatment of human gastric cancer through suppressing STAT3/NF- $\kappa$ B and Bcl-2 signaling pathways. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, Huai'an, v. 92, p. 95–107, 2017. DOI 10.1016/j.biopha.2017.04.059.

XU, Q. J.; ZUO, C. S.; LIU, D. Y.; SHI, W. Z. Studies on the Structure and Catalytic Properties for Heck Reaction of Troxerutin Supported Palladium Catalyst. **Theoretical Foundations of Chemical Engineering**, Zhumadian, v. 52, n. 6, p. 1039–1044, 2018. DOI 10.1134/S0040579518060155.

XU, Y.; GUO, Y.; DUAN, S.; WEI, H.; LIU, Y.; WANG, L.; HUO, X.; YANG, Y. Effects of ultrasound irradiation on the characterization and bioactivities of the polysaccharide from blackcurrant fruits. **Ultrasonics Sonochemistry**, Harbin, v. 49, n. August, p. 206–214, 2018. DOI 10.1016/j.ultsonch.2018.08.005.

ZHANG, S.; LI, H.; ZHANG, L.; LI, J.; WANG, R.; WANG, M. Effects of troxerutin on cognitive deficits and glutamate cysteine ligase subunits in the hippocampus of streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus rats. **Brain Research**, Shijiazhuang, v. 1657, p. 355–360, 2017. DOI 10.1016/j.brainres.2016.12.009.

ZHANG, Y.; ZHANG, Y.; XU, F.; LI, S.; TAN, L. Structural characterization of starches from Chinese jackfruit seeds (*Artocarpus heterophyllus* Lam). **Food Hydrocolloids**, Hainanv. 80, p. 141–148, 2018. DOI 10.1016/j.foodhyd.2018.02.015.

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**, Beijing, v. 117, p. 1074–1080, 2018. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2018.06.034.

ZHU, J.; ZHANG, S.; ZHANG, B.; QIAO, D.; PU, H.; LIU, S.; LI, L. Structural features and thermal property of propionylated starches with different amylose/amylopectin ratio.

**International Journal of Biological Macromolecules**, Guangzhou, v. 97, p. 123–130, 2017. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2017.01.033.