



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ALINE DE SOUZA

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS
MICROENCAPSULADOS MULTICAMADAS PARA
VEICULAÇÃO DA HESPERIDINA METIL CHALCONA
UTILIZANDO BIOPOLÍMEROS**

Londrina
2018

ALINE DE SOUZA

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS
MICROENCAPSULADOS MULTICAMADAS PARA
VEICULAÇÃO DA HESPERIDINA METIL CHALCONA
UTILIZANDO BIOPOLÍMEROS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção de grau de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Londrina – UEL.

Orientadora: Profa. Dra. Marcela Maria Baracat.

Londrina
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Souza, Aline .

Desenvolvimento de sistemas microencapsulados multicamadas para veiculação da hesperidina metil chalcona utilizando biopolímeros / Aline Souza. - Londrina, 2018.
74 f. : il.

Orientador: Marcela Maria Baracat.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2018.
Inclui bibliografia.

1. Microcápsula - Tese. 2. Multicamadas - Tese. 3. Coacervação - Tese. 4. Sistema de liberação - Tese. I. Baracat, Marcela Maria. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

ALINE DE SOUZA

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS MICROENCAPSULADOS
MULTICAMADAS PARA VEICULAÇÃO DA HESPERIDINA METIL
CHALCONA UTILIZANDO BIOPOLÍMEROS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção de grau de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Londrina – UEL.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Marcela Maria Baracat
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dra. Renata Micheli Martinez
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Nilton Syogo Arakawa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 27 de abril de 2018.

Dedico este trabalho aos meus pais José Roberto e Claudia, e a minha família pelo apoio incondicional em minhas escolhas.

AGRADECIMENTOS

A Prof. Dra. Marcela Maria Baracat, pela orientação, compreensão, amizade e por estar presente em todas as etapas deste trabalho.

A minha família, pela motivação em todas as horas, principalmente aos meus pais Claudia E. Castelani e José Roberto R. Souza pelo apoio incondicional.

Aos amigos Leticia Zuchelli, Dayt Corsino, Mariana Iastrenski, Bruce Alan, Felipe Benatti, Renan Marin, Mayara Galvão, Jessica B. Carra, Ricardo e colegas, pelo companheirismo, conversas, idéias, força que me ajudaram nessa jornada.

A Profa. Dra. Rubia Casagrande pelo auxílio e colaboração neste projeto.

Aos alunos de iniciação científica Maria R. O.Cambui, Igor Rebech, Pamela Miranda, Ana Paula Novelli, Pietra Pattini e principalmente a Laisa Giordani pelo auxílio no entendimento de alguns processos, obrigada pela ajuda e dedicação a esse projeto.

Aos professores pelos ensinamentos e ajuda nessa etapa importante.

Aos colaboradores do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise (LMEM), e Laboratório de Espectroscopia (ESPEC) pelas análises contidas neste trabalho.

Agradeço a disponibilidade e dedicação da banca examinadora.

Às agências de fomento Capes, CNPq e Fundação Araucária pelo incentivo à pesquisa.

*O período de maior ganho em conhecimento e
experiência é o período mais difícil da vida de
alguém.*

Dalai Lama

SOUZA, Aline de. **Desenvolvimento de sistemas microencapsulados multicamadas para veiculação da Hesperidina metil chalcona utilizando biopolímeros**. 2018. 74 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná.

RESUMO

Nas últimas décadas tem aumentado o desenvolvimento de pesquisa associada à modificação da liberação de fármacos, possibilitando melhor aproveitamento do fármaco pelo organismo, menor custo e efeitos adversos. Os sistemas de liberação sítio específico, proporcionam que o fármaco encapsulado alcance o local de ação, podendo ocorrer pela lenta liberação do fármaco, por alteração de pH ou por ataque enzimático. São utilizados métodos físicos, químicos e físico-químicos no desenvolvimento de sistemas de liberação microparticulados. No presente trabalho foram desenvolvidas microcápsulas multicamadas (MCM) pelo método de coacervação complexa, utilizando o conjugado polimérico de caseína e pectina, uma proteína e um polissacarídeo, respectivamente, para o revestimento da hesperidina metil chalcona (HMC), flavonóide com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. As MCM foram preparadas pela deposição alternada dos biopolímeros sobre o conjugado polimérico alcançando 5 (cinco) camadas sobrepostas, e foram secas em *spray dryer*. Avaliou-se a quantificação de HMC encapsulada e a eficiência de encapsulação (EE), e os resultados mostram a presença de 93,87% de HMC na formulação, sendo 84,63% microencapsulada. Os resultados do teste de liberação *in vitro*, mostraram liberação de 33,79% de HMC microencapsulada; a análise de tamanho de partícula demonstrou pequena alteração do tamanho das partículas com aumento do número de camadas; os resultados do potencial zeta indicaram maior estabilidade das partículas em solução com aumento do número de camadas; por microscopia eletrônica de varredura (MEV) observou-se MCM contendo HMC com formato esférico, superfície lisa e coalescidas; a espectroscopia do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) demonstrou os espectros das MCM inerte, da HMC e HMC microencapsulada e pode-se observar que o espectro da MCM inerte se assemelha ao da MCM contendo HMC; a calorimetria exploratória diferencial (DSC) demonstrou que na MCM contendo HMC não foram observados os picos característicos da HMC. Os resultados obtidos pelos métodos de FTIR e DSC mostraram que o fármaco foi revestido pelos polímeros e não se encontra presente em suas camadas mais externas, favorecendo a liberação lenta do fármaco, podendo ser um produto promissor para liberação sítio específico na região colônica.

Palavras-chave: Microcápsula. Multicamadas. Pectina. Caseína. Coacervação.

SOUZA, Aline. **Development of multilayer microencapsulated systems for the delivery of Hesperidin methyl chalcone using biopolymers.** 2018. 74 p. Dissertation (Master's Degree in Chemistry) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná.

ABSTRACT

In the last decades the development of research associated with the modification of drug release, making better use of the drug by the body, lower cost and adverse effects has increased. Release specific site release systems, provide that the drug encapsulated reaches the site of action, and may occur by slow release of the drug, by changing pH or by enzymatic attack. Physical, chemical and physical-chemical methods are used on the systems of microparticulate release development. On the present work were developed multilayer microcapsules (MCM) by the complex coacervation method, using the polymer conjugate of casein and pectin, a protein and a polysaccharide to hesperidin methyl chalcone (HMC), flavonoid with antioxidant and anti-inflammatory properties. The MCM were prepared by alternative deposition of biopolymers on conjugate polymer reaching 5 (five) overlapping layers, and were dried on spray dryer. The quantification of encapsulated HMC and the efficiency of encapsulation (EE), were evaluated and the results show the presence of 93.87 percent of HCM in formulation, being 84.63 percent of microencapsulate. The results of the in vitro release test, show release of 35.81 percent of HMC microencapsulate; the particle size analysis showed a little change in size of particles with increase of layers number; the results of zeta potential indicated greater stability of particles in solution with increase in the numbers of layers; by the scanning electron microscopy (SEM) was observed MCM with spherical, smooth surface and coalesces; spectroscopy by Fourier transform infrared (FTIR), demonstrated the spectra of MCM inert, the HMC and HMC microencapsulate can be observed that the specter of MCM inert resembles that of MCM containing HMC; the differential scanning calorimetric (DSC) showed that in the MCM containing HMC peaks were not observed characteristic of HMC. The results obtained by FTIR and DSC methods showed that the drug was covered by polymers and is not present on its outer layers, favoring the slow release of the drug, and may be a promising product for specific site release in colonic region.

Keywords: Microcapsule. Multi-layered. Pectin. Casein. Coacervation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Comparação ilustrativa das variações de concentração de fármacos administrados por métodos convencionais de multidosagem.....	20
Figura 2. Esquema representativo de sistema reservatório e sistema matricial	22
Figura 3. Etapas de liberação dos fármacos em sistemas matriciais inertes ou hidrofóbicos	22
Figura 4. Ilustração do funcionamento da liberação de um fármaco encapsulado em uma microesfera	22
Figura 5. Esquema do processo de secagem por <i>spray drying</i>	23
Figura 6. Ilustração das fases do processo de coaservação simples.....	25
Figura 7. Ilustração das proteínas filamentosas sob diferentes níveis de pH	26
Figura 8. Coacervação complexa	27
Figura 9. Preparação de microcápsulas LbL de polieletrólitos revestindo fármacos.....	28
Figura 10. Submicela e micela de caseína	30
Figura 11. Alternativa para representar a estrutura da Pectina	31
Figura 12. Estrutura da cadeia de homogalacturonana	32
Figura 13. Estrutura básica dos flavonoides.....	33
Figura 14. Produção da Hesperidina metil chalcona	35
Figura 15. Estrutura química da HMC	36
Figura 16. Curva analítica porcentagem de ação antioxidante por μg de HMC.....	44
Figura 17. Perfil de liberação das MC unicamada e MCM.....	46
Figura 18. Frequência (%) e Frequência acumulada (%) versus tamanho de partículas (μm) de MC unicamada.....	47
Figura 19. Frequência (%) e Frequência acumulada (%) versus tamanho de partículas (μm) de MCM (segunda camada adicionada de pectina).....	48
Figura 20. Frequência (%) e Frequência acumulada (%) versus tamanho de partículas (μm) de MCM (terceira camada adicionada de caseína).	48
Figura 21. Frequência (%) e Frequência acumulada (%) versus tamanho de partículas (μm) de MCM (quarta camada adicionada de pectina)	49
Figura 22. Frequência (%) e Frequência acumulada (%) versus tamanho de partículas (μm) de MCM (quinta camada adicionada de caseína).....	49
Figura 23. Frequência (%) e Frequência acumulada (%) versus tamanho de	

partículas (μm) de HMC revestida com MCM.....	50
Figura 24. Freqüência (%) e FreqüênciaA (acumulada %) versus tamanho de partículas (μm) de:MC unicamada, MCM 2, 3, 4 e 5	50
Figura 25. Distribuição do tamanho de partícula	51
Figura 26. Fotomicrografia por MEV de MC unicamada com HMC	54
Figura 27. Fotomicrografia por MEV de MCM inerte	54
Figura 28. Fotomicrografia por MEV de MCM contendo HMC	55
Figura 29. Espectro de FTIR da HMC	56
Figura 30. Espectro de FTIR da MCM com HMC seca em <i>spray drying</i>	56
Figura 31. Espectros de FTIR da HMC, e MCM com fármaco, seca em <i>spray drying</i>	57
Figura 32. Espectro de FTIR de MCM inerte	58
Figura 33. Espectros de FTIR das microcápsulas multicamadas inerte e contendo HMC, seca em <i>spray drying</i>	59
Figura 34. Espectros FTIR de microcápsulas, revestimento PUF e óleo de tung.....	60
Figura 35. Espectros FTIR de matérias-primas e materiais de encapsulação.....	61
Figura 36. Curva DSC da HMC	62
Figura 37. Curva DSC da MCM inerte	63
Figura 38. Curva DSC da MCM contendo HMC	63
Figura 39. Curvas da (---) HMC, (---) MCM inerte e (---) MCM contendo HMC	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição das proteínas do leite	29
Tabela 2. Análise da quantificação e eficiência de encapsulação.....	45
Tabela 3. Tamanho médio de partícula.....	51
Tabela 4. Potencial Zeta das MC unicamada e MCM	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato, sal de diamônio)
BC	<i>Bacillus coagulans</i>
CHI/ALG	Quitosana/Alginato
CMLP	Central Multiusuária de Laboratórios de Pesquisa da UEL
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
EE	Eficiência de encapsulação
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ESPEC	Laboratório de Espectroscopia
FF	Forma farmacêutica
FFLC	Formas farmacêuticas de liberação controlada
FFLM	Formas farmacêuticas de liberação modificada
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
HG	Homogalacturonana
HMC	Hesperidina metil chalcona
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LbL	<i>Layer by Layer</i>
LMEM	Laboratório de Microscopia Eletrônica e de Microanálise
MC	Microcápsulas
MCM	Microcápsulas multicamadas
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MH	Microencapsuladas contendo HMC
PUF	Poly (uréia-folmaldeído)
RG – I	Ramnogalacturonana tipo I
RG – II	Ramnogalacturonana tipo II
TGI	Trato gastro intestinal

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	Sistemas de liberação	19
2.2	Microcápsula	20
2.3	Coacervação	24
2.3.1	Coacervação Simples	25
2.3.2	Coacervação Complexa	25
2.4	Microcápsula Multicamadas	28
2.5	Caseína	29
2.6	Pectina	30
2.7	Flavonóides	32
2.7.1	Hesperidina metil chalcona (HMC)	34
3	OBJETIVOS	37
3.1	Objetivo Geral	37
3.2	Objetivo Específico	37
4	MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1	Material	38
4.2	Métodos	38
4.2.1	Preparação das Microcápsulas	38
4.2.2	Curva analítica: porcentagem de ação antioxidante por µg de HMC	39
4.2.3	Quantificação da HMC nas microcápsulas e determinação da Eficiência de Encapsulação	39
4.2.4	Liberação <i>In Vitro</i>/Teste de dissolução	40
4.2.5	Análise de Tamanho de Partícula e potencial Zeta	41
4.2.6	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	41
4.2.7	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	41
4.2.8	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	42

4.2.9	Análise Estatística	42
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1	Quantificação da HMC nas microcápsulas e determinação da Eficiência de Encapsulação.....	43
5.2	Liberação <i>In Vitro</i> /Teste de dissolução	45
5.3	Análise de Tamanho de Partícula e potencial Zeta.....	47
5.4	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	53
5.5	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	55
5.6	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	61
6	CONCLUSÃO.....	65
	REFERÊNCIAS.....	66

1 INTRODUÇÃO

As formas farmacêuticas líquida, sólida ou semissólida, administradas por via oral são as mais utilizadas e melhor aceitas pelos pacientes (BARACAT, 2004; PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007). Nas últimas décadas tem aumentado o desenvolvimento de pesquisa associada à modificação da liberação de fármacos, para possibilitar melhor aproveitamento do fármaco pelo organismo (LOPES; LOBO; COSTA, 2005).

As modificações são realizadas alterando propriedades físico e/ou químicas do fármaco e/ou da forma farmacêutica, como comprimidos revestidos com filmes, lipossomas, micelas, emulsões, sistemas poliméricos e micro/nanoencapsulação (CAMILO, 2007; LYRA, *et al*, 2007).

São utilizados métodos físicos, químicos e físico-químico no desenvolvimento de sistemas microparticulados, como *spray drying*, leite jorro, *spray cooling*; inclusão molecular, polimerização interfacial e coacervação (BIZERRA; SILVA, 2016; MATTÊ; ROSA, 2013).

A coacervação é a separação de duas fases líquidas em sistemas coloidais (LEIMANN, 2008; GOUIN, 2004). Pode ocorrer de forma simples; apenas uma substância como agente encapsulante; ou complexa onde são utilizados dois polímeros de cargas opostas (CALEFFI, 2014; CAMILO, 2017; PRATA, 2006; REYNA, *et al*. 2015).

A encapsulação baseia-se na preparação de uma dispersão entre o composto a ser encapsulado, o núcleo, e o material encapsulante, seguido por uma secagem do solvente (CALEFFI, 2014). É utilizada para alterar propriedades de colóides e de superfície; proteger os agentes quimicamente ativos mais instáveis ou irritantes, impedir sua degradação e perda de atividade por agentes ambientais externos, melhorar estabilidade de fármacos; modular as características e taxas de liberação e/ou proporcionar liberação sítio específica (DONBROW, 1992; JURAN, *et al*, 2018; PRATA, 2006).

Os sistemas de liberação sítio específicas, podem fazer com que haja uma liberação lenta do fármaco encapsulado, possibilitando que alcance o local específico de atuação e a liberação podendo ser ocasionada pela alteração de pH ou por ataque enzimático.

Para que ocorra a liberação das substâncias ativas, estão envolvidos processos físicos e químicos, como a difusão, erosão, degradação do polímero ou por uma combinação dos dois (LYRA, *et al.*, 2007; OLIVEIRA, *et al.*, 1992; LOPES; LOBO; COSTA, 2005).

As microcápsulas obtidas por coacervação complexa são formadas por interações eletroestáticas, ligações de hidrogênio, ligações covalentes, associação dipolo-dipolo e interações hidrofóbicas entre os polímeros e por serem insolúveis em água precipitam (BARACAT, *et al.*, 2012; BOBBIO, 2003; LUO e WANG, 2014; MÜLLER, 2011; SILVA, *et al.*, 2015).

A formação de microcápsulas multicamadas (MCM), pode ser obtida por múltiplas etapas de coacervação complexa, e deposição consecutiva de polímeros carregados positivamente e negativamente (GOUGIN, 2004; JOHNSTON, 2006).

É obtido um maior controle sobre as propriedades das MCM por meio da composição e concentração dos polímeros utilizados, pelo número de camadas e pH do meio reacional (SATO, *et al.* 2011; ZHANG, *et al.* 2013).

As MCM de biopolímeros, como a caseína e a pectina, possuem boa biocompatibilidade e biodegradabilidade (SATO, *et al.* 2011; ZHANG, *et al.* 2013). A caseína é uma classe de proteína proveniente do leite, formada por grupos de micelas, possui caráter anfipático, apresentando carga negativa acima do ponto isoelétrico, e carga positiva abaixo (BADUI, 1989; BARACAT, 2004; CAMILO, 2007; MITTAL, 2018). A pectina é um conjunto de polissacarídeos e oligossacarídeos que apresentam uma estrutura complexa macromolecular, pode-se encontrar até 17 tipos distintos de monossacarídeos (CANTERI, *et al.* 2012; WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006; RALET; LEROUGE; QUÉMÉNER, 2009).

A Hesperidina metil chalcona (HMC), classificada como flavonóide, extraída em maior escala de frutas cítricas, está presente no mesocarpo, e epicarpo em menor escala, tem demonstrado ação antioxidante, anti-inflamatória e antibiótica (CYPRIANO, 2015; MARTINEZ, 2015; PINHO-RIBEIRO, *et al.* 2015).

O desenvolvimento de um sistema microencapsulado multicamadas a partir do conjugado polimérico pectina/caseína para a veiculação da HMC poderá permitir modular a liberação e/ou absorção, otimizando seu uso na terapêutica (LUO; PAN; ZHONG, 2015).

Nosso grupo de pesquisa tem estudado novos produtos microencapsulados, a partir do conjugado polimérico de pectina/caseína, que é biodegradável e possui

característica de formação de sistemas organizados, tendo como vantagens a realização de todos os procedimentos em meio aquoso, em condições brandas e isentas de resíduos poluentes, possibilitando sua utilização na área farmacêutica e alimentícia (BARACAT; NAKAGAWA, 2012; GUAZELLI; FATTORI, 2013).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Sistemas de liberação

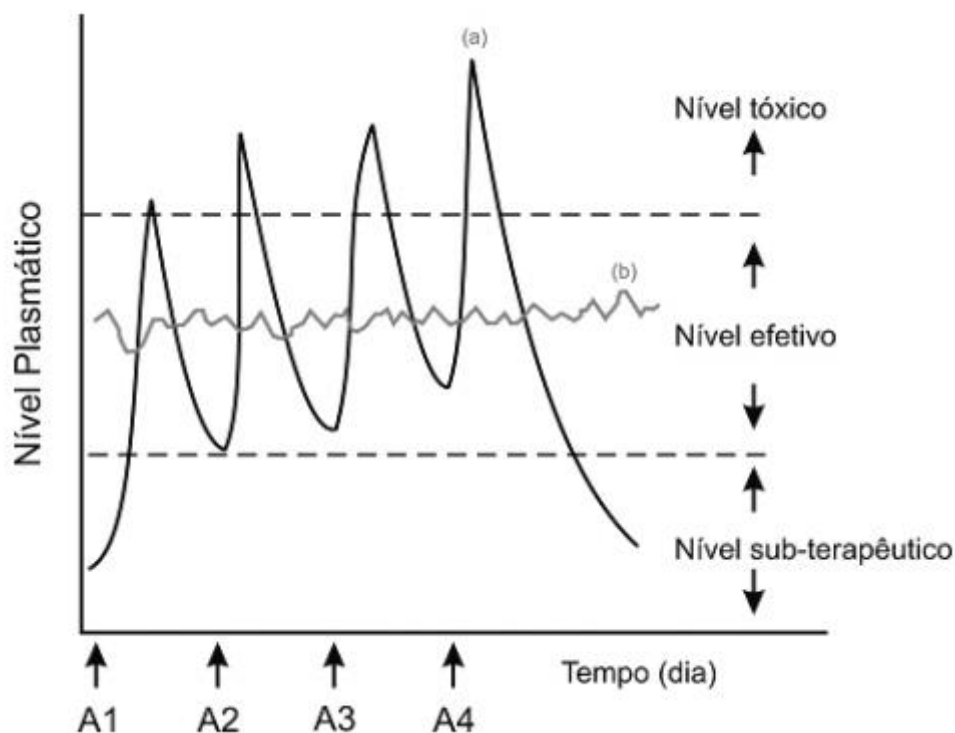
Os medicamentos contêm uma, ou mais substâncias ativas que são administradas aos pacientes por meio de uma das vias possíveis e mais apropriadas e são utilizados com finalidade profilática, terapêutica ou diagnóstica. São veiculados a uma forma farmacêutica (FF) líquida, sólida ou semissólida. As formas farmacêuticas de administração por via oral são as mais utilizadas, por serem indolores, possuírem maior facilidade de autoadministração, serem versáteis e terem uma boa aceitação por parte dos pacientes (BARACAT, 2004; PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007).

Nas últimas décadas o desenvolvimento de pesquisa associada à modificação da liberação de fármacos, ou outras substâncias bioativas, que proporcione cinética de liberação do fármaco de acordo as necessidades clínicas tem aumentado, a partir do preparo de formas farmacêuticas de liberação modificada (FFLM) ou formas farmacêuticas de liberação controlada (FFLC) (LOPES; LOBO; COSTA, 2005).

As FFLC são sistemas desenvolvidos para possibilitar melhor aproveitamento do fármaco pelo organismo, por ser liberação prolongada, requerem administrações do medicamento com menor frequência quando comparado às formas convencionais, onde a concentração do fármaco apresenta um aumento na corrente sanguínea, atinge um pico máximo e declina (Figura 1).

As FFLM promovem a otimização da distribuição do fármaco pelo organismo, evitam flutuações na sua concentração, e levam a uma melhoria na biodisponibilidade. Para o desenvolvimento destes sistemas estão incluídas as modificações das propriedades físico e/ou químicas do fármaco, e mudanças na forma farmacêutica, como comprimidos revestidos com filmes, lipossomas, micelas, emulsões, sistemas poliméricos e microencapsulação. Tais sistemas são capazes de influenciar o perfil farmacocinético, a velocidade de liberação, o local e a duração da ação do fármaco, tendo menores efeitos adversos, por manter a concentração plasmática do fármaco prolongada ou direcionada (CAMILO, 2007; LYRA, *et al*, 2007).

Figura 1. Comparação ilustrativa das variações de concentração de fármacos administrados por métodos convencionais de multidosagem. (a) e sistema de liberação controlada (b), sendo A à dose administrada do fármaco.



Fonte: LYRA, *et al*, 2007.

Os sistemas de liberação são subdivididos em: sistemas de liberação repetida; retardada; prolongada; controlada e sítio específica. O sistema de liberação repetida é aquele que utiliza fármacos com dosagens repetidas e intermitentes de uma ou mais unidades de liberação imediata. Sistema de liberação retardada ocorre em um tempo pré-determinado como, por exemplo, uma dose única de comprimido com revestimento entérico, onde o revestimento de barreira alcança uma liberação temporizada; liberação prolongada, tida como liberação lenta do fármaco, durante um longo período de tempo. Esta diferencia da liberação controlada por não alcançar a cinética de ordem zero (ARSH (ARSHADY, 1990). Os sistemas de liberação sítio específica, ou liberação direcionada, fazem com que haja uma liberação do fármaco lenta com o passar do tempo, ou com a ocorrência de um evento, como exemplos: a alteração de pH ou um ataque enzimático (CALEFFI, 2014).

2.2 Microcápsula

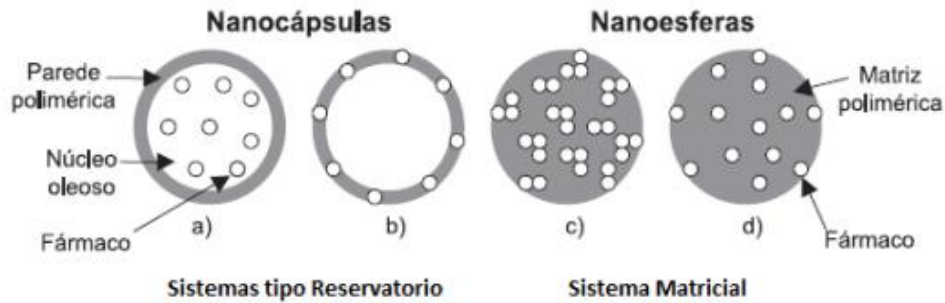
A microencapsulação é uma tecnologia de revestimento de partículas muito pequenas, sólidas, líquidas ou gasosas, através deste processo é possível converter líquidos em sólidos; mascarar odor e sabor; alterar propriedades de colóides e de superfície; proteger os agentes quimicamente ativos mais instáveis ou irritantes, impedir sua degradação e perda de atividade por agentes ambientais externos como umidade, ar ou luz ultravioleta e do trato gastrointestinal; melhorar estabilidade de fármacos; modular as características e taxas de liberação e proporcionar liberação sítio específica (DONBROW, 1992; JURAN, *et al*, 2018; PRATA, 2006). Este sistema tem sido amplamente utilizado em muitas áreas, como: gráfica, alimentícia, agrícola e muitos produtos técnicos e domésticos, e principalmente na área farmacêutica e médica (BAKAN, 2001; LEOPOLD, 1999; REYNA, *et al*. 2015).

O conceito das microcápsulas tem seu fundamento e foi inspirado no modelo celular, onde as células apresentam uma membrana que envolve o citoplasma, o protegendo, assim como outros componentes. Isto ainda permite o controle de entrada e saída de substâncias das células, com estímulos específicos (PRATA, 2006). Com base nessa estrutura, as microcápsulas são compostas de uma camada de polímero, que promove o isolamento das substâncias ativas evitando sua exposição (DONBROW, 1992), e a presença do polímero influencia o tempo de ação do fármaco no organismo. A liberação da substância ativa ocorre quando o polímero se dissolve ou quando esta se dissolve junto ao polímero (BAKAN, 2001).

As substâncias ativas podem estar na formulação de microesferas ou microcápsulas (Figura 2). No sistema aplicado às microcápsulas o fármaco encontra-se revestido por camada polimérica (Figura 2a, b) enquanto nas microesferas o fármaco está disperso em matrizes sólidas (Figura 2c, d), num sistema formado por cadeias de uma ou mais substâncias químicas polimerizadas, que compõem uma camada tridimensional, podendo haver ligação covalente, absorção ou adsorção das substâncias ativas, em sua superfície. Em matrizes hidrofóbicas ou lipídicas formam-se sistemas porosos, dissolúveis ou de dispersão, e para liberação das substâncias ativas estão envolvidos processos físicos e químicos, incluindo penetração de água na matriz, levando a difusão do fármaco pelos poros da matriz, erosão, degradação do polímero ou por uma combinação dos dois processos, dependendo das

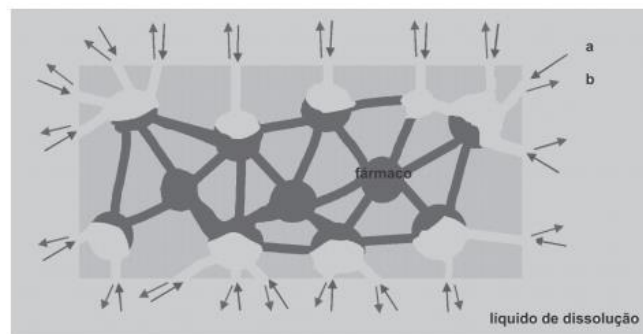
propriedades do fármaco e do excipiente utilizado (Figura 3 e 4) (LYRA, *et al*, 2007; OLIVEIRA, *et al*, 1992; LOPES; LOBO; COSTA, 2005).

Figura 2. Esquema representativo de sistema reservatório e sistema matricial.



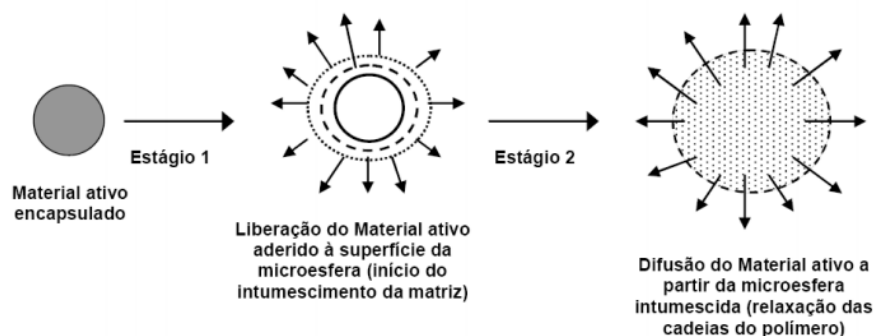
Fonte: Adaptado de Schaffazick, 2003.

Figura 3. Etapas de liberação dos fármacos em sistemas matriciais inertes ou hidrofóbicos. a) penetração do líquido de dissolução nos poros do sistema matricial; b) difusão lenta pelos canalículos do fármaco dissolvido até o exterior.



Fonte: LOPES; LOBO; COSTA, 2005.

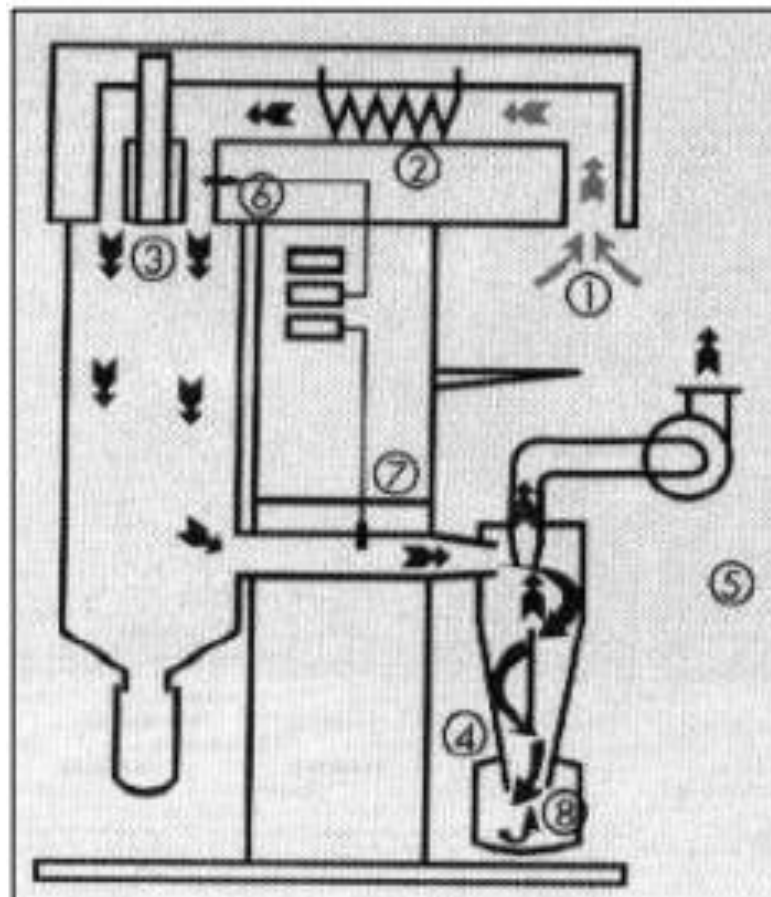
Figura 4. Ilustração do funcionamento da liberação de um fármaco encapsulado em uma microesfera.



Fonte: MATTÉ e ROSA, 2013.

São utilizados métodos físicos, químicos e físico-químico no desenvolvimento de sistemas microparticulados, métodos físicos são: secagem realizada por atomização (*spray drying*) em uma câmara de secagem automatizada com a formação do sistema multiparticulado (Figura 5) (MATTE; ROSA, 2013); leito jorro ou leito fluidizado, utilizam-se de um fluxo de ar para manter as partículas suspensas, tornando possível a automatização do revestimento; “*spray cooling*” que é a solidificação de gotículas por resfriamento; e extrusão, se trata do modelamento de microesferas por meios mecânicos (BAKAN, 2001; CLARKE; O’CONNOR; RANTOOLA, 1998; BIZERRA; SILVA, 2016; REYNA, *et al.* 2015).

Figura 5. Esquema do processo de secagem por *spray drying*. (1) entrada de ar; (2) aquecedor; (3) bico de atomização e entrada de ar de atomização; (4) ciclone; (5) saída de ar; (6) sensor de temperatura, entrada de ar; (7) sensor de temperatura, saída de ar; (8) frasco coletor.



Fonte: Baracat, 2004.

Entre os métodos químicos, destacam-se a inclusão molecular que, trata da encapsulação de algumas moléculas por outras, e a polimerização interfacial, uma

reação de polimerização entre duas soluções, em que o material ativo se encontra em suspensão (BIZERRA; SILVA, 2016).

Nos métodos físico-químicos utiliza-se uma solução contendo o fármaco disperso juntamente com o polímero, podendo ocorrer a separação de fases ou precipitação do polímero, o polímero se dispersa e reorganiza em contato com o fármaco, esse fenômeno é denominado de coacervação, podendo ocorrer de forma simples ou complexa (BAKAN, 2001; CLARKE; O'CONNOR; RANTOOLA, 1998; OLIVEIRA, *et al*, 1992; REYNA, *et al*. 2015).

Alguns aspectos básicos devem ser considerados no desenvolvimento de sistemas microencapsulados tais como: natureza, estabilidade e propriedades de liberação desejadas do material a ser encapsulado; características do polímero encapsulador e os processos de microencapsulação a serem utilizados (CALEFFI, 2014).

A escolha dos solventes é determinada não apenas pela solubilidade e estabilidade do polímero e fármaco, mas também pela segurança do processo, aspectos econômicos e ambientais, e toxicidade (BAKAN, 2001).

2.3 Coacervação

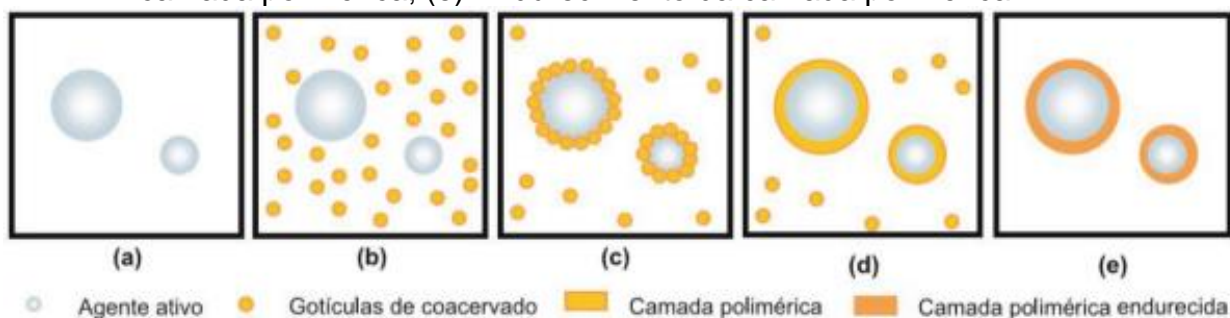
Segundo a IUPAC ("IUPAC Compendium of Chemical Terminology, eletronic version") a coacervação é a separação de duas fases líquidas em sistemas coloidais (LEIMANN,2008; GOUIN, 2004). O processo de coacervação é baseado em mecanismos físico-químicos complexos que envolvem muitas variáveis, como: características do polímero e do núcleo, relação núcleo/parede, taxas de agitação, taxas de adição e resfriamento (PRATA, 2006). É utilizada tipicamente para encapsular óleos, óleos essenciais e flavorizantes, pois os agregados poliméricos formados depositam-se ao redor das gotas de óleo dispersas, formando um filme protetor, apresentam interior hidrofóbico (LEIMANN, 2008; PRATA, 2006). Consiste num fenômeno de agregação macromolecular formando um sistema coloidal, possui duas fases líquidas, o coacervado, rico em colóides, e o sobrenadante, pobre em colóides (LEIMANN, 2008). Trata-se da deposição de um polímero ao redor de um agente ativo, que será recoberto, podendo ser induzida após a alteração das características do meio, como alteração de temperatura, pH, força iônica, ou ainda sua polaridade. A coacervação pode ser simples ou complexa, na simples há

apenas uma substância como agente encapsulante, na complexa são dois polímeros de cargas opostas (CALEFFI, 2014; CAMILO, 2007; PRATA, 2006; REYNA, *et al.* 2015).

2.3.1 Coacervação simples

A coacervação simples ocorre por meio da mistura entre duas substâncias, sendo uma redutora de hidratação e outra coloidal hidrófila. O processo ocorre devido a fatores relacionados à temperatura, força iônica ou variação do pH (CLARKE; O'CONNOR; RANTOOLA, 1998). Esse processo apresenta duas fases, uma rica em coacervado e outra pobre (LEIMANN, 2008). A formação de microcápsulas pelo método de coacervação simples se dá em etapas (Figura 6). Na primeira etapa se encontram dispersas a fase hidrofóbica na solução polimérica, na segunda se tem a separação de fases do polímero que depende da concentração de eletrólito e/ou da temperatura. No estágio seguinte há deposição do material polimérico ao redor das gotas, na superfície do material hidrofóbico, havendo a formação da parede e seu enrijecimento utilizando compostos capazes de formar ligações cruzadas com o polímero (LEIMANN, 2008; BEZERRA, 2014).

Figura 6. Ilustração das fases do processo de coacervação simples. (a) Dispersão do agente ativo a ser encapsulado em uma solução do polímero; (b) Indução da coacervação, formando gotículas de coacervado; (c) Deposição das gotículas de coacervado em torno dos núcleos contendo o princípio ativo; (d) Coalescência das gotículas de coacervado para formar uma camada polimérica; (e) Endurecimento da camada polimérica.

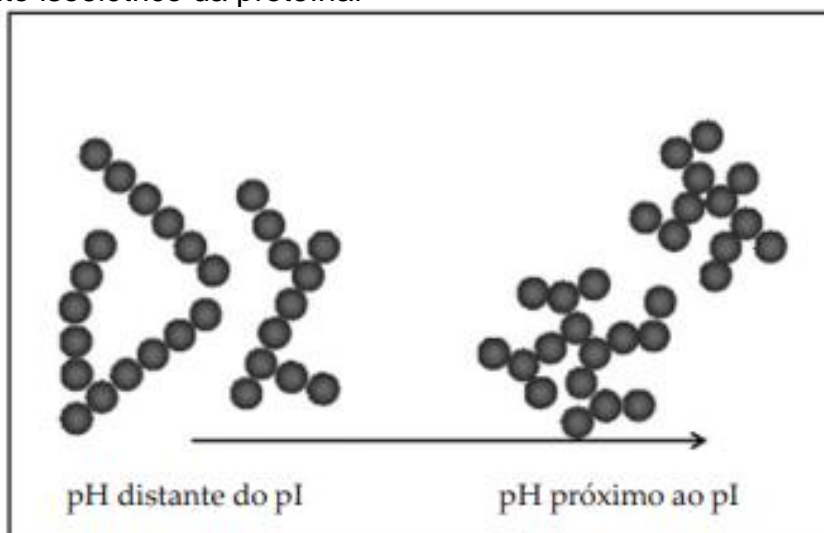


Fonte: LEIMANN, 2008.

2.3.2 Coacervação complexa

Entende-se por coacervação complexa um processo que ocorre entre dois polímeros de cargas opostas, em que ocorre a separação de fases pela diferença de potencial, atração ou repulsão eletrostática, entre os polímeros, formando um complexo polieletrólítico, insolúvel em água (BAKAN, 2001; BARACAT; *et al*, 2012; CLARKE; O'CONNOR; RANTOOLA, 1998). A formação dos coacervados se dá por meio da mistura de uma proteína com carga positiva, que deve estar dispersa num pH a baixo de seu ponto isoelétrico (Figura 7), misturada com um poliânion, como um polissacarídeo que deve apresentar carga negativa (BOBBIO; BOBBIO,2003; SILVA, *et al*, 2015).

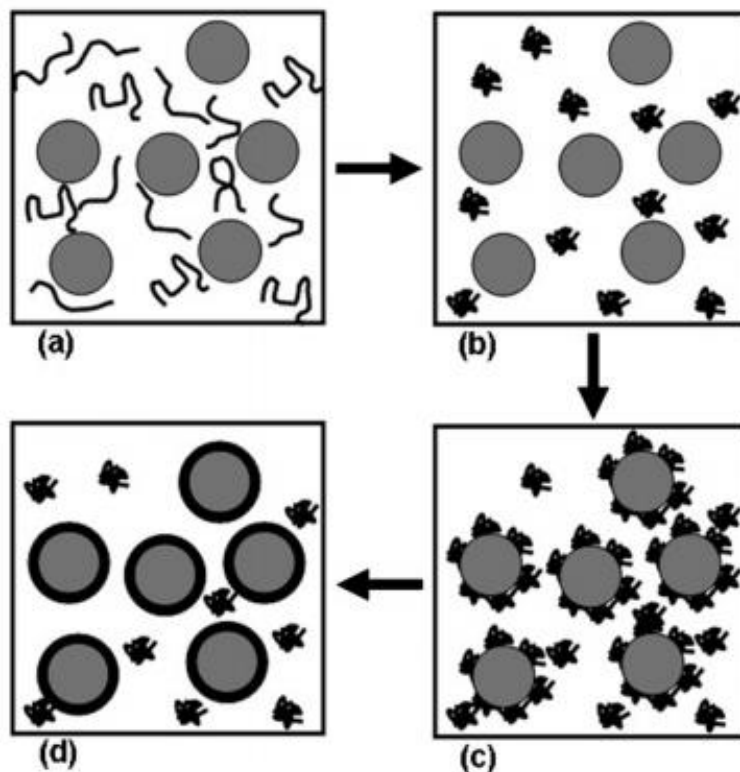
Figura 7. Ilustração das proteínas filamentosas sob diferentes níveis de pH. O pI é o ponto isoelétrico da proteína.



Fonte: AUGUSTIN e HEMAR, 2009.

O material a ser encapsulado deve estar presente em uma das fases poliméricas, na mistura de polímeros a ser coacervada, suspenso ou emulsionado, ou ainda pode ser adicionado durante a separação de fases, com agitação constante. É necessário que os dois colóides se misturem para o ajuste do pH, havendo a separação das fases dos polímeros que apresentam cargas opostas, forma-se gotículas de líquido fechado ou partículas sólidas, as microcápsulas são formadas pela interação interiônica entre os polímeros e levando a precipitação (Figura 8) (BOBBIO; BOBBIO, 2003; BARACAT; *et al*, 2012; MÜLLER, 2011; SILVA; *et al*, 2015).

Figura 8. Exemplo de coacervação complexa. (a) dispersão do núcleo em gelatina (p. ex.), (b) coacervação inicial da gelatina após a adição de um agente de coacervação, (c) coacervação da gelatina na superfície do núcleo e (d) formação do invólucro reticulado.



Fonte: AUGUSTIN e HEMAR, 2009.

Existe uma relação de interação entre os biopolímeros e o complexo formado, sendo que esta pode ser afetada de acordo aspectos utilizados, tais como força iônica, flexibilidade, cargas e massa do biopolímero e pH, entre outros (PRATA, 2006). A coacervação complexa tem por finalidade melhorar as características dos polímeros de origem, melhorando sua funcionalidade (CAMILO, 2007). Os pontos importantes para que ocorra a interação/ligação polimérica, são as interações eletroestáticas, ligações feitas por hidrogênio e ligações covalentes (BOBBIO; BOBBIO, 2003; SILVA; *et al*, 2015).

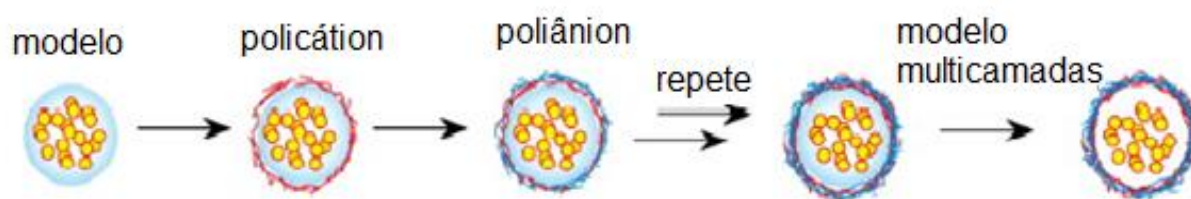
O uso dos coacervados pode ser limitado devido a dois fatores: força iônica e sensibilidade ao pH (SILVA, *et al*, 2015). Para que sua resistência seja aumentada, deve-se reticular o invólucro por meio da utilização de reticulação química ou enzimática que atenda a necessidade de forma adequada. As principais vantagens da coacervação complexa são: maior capacidade no controle do tamanho das partículas, maior versatilidade e a possibilidade de trabalhar em condições brandas de temperatura, e sem a necessidade de utilizar solventes orgânicos

(AUGUSTIN; HEMAR, 2009; GOUGIN, 2004; JURAN, *et al*, 2018; MENDANHA, 2009; SILVA, *et al*, 2015).

2.4 Microcápsula Multicamadas

A formação de microcápsula multicamadas (MCM) (Figura 9), *Layer by Layer* (LbL) é tipicamente obtida por múltiplas etapas de coacervação complexa, pela deposição consecutiva de polímeros carregados positivamente e negativamente, onde as forças eletrostáticas, ligação de hidrogênio e ligações covalentes, fazem com que ocorra o acúmulo de camadas na microcápsula (GOUGIN, 2004; JOHNSTON, 2006). Esta complexação polimérica não ocorre de forma simplificada, é influenciada pelas propriedades dos polieletrólitos que as formam como: força iônica, massa molecular, grau de acetilação, grau de esterificação, distribuição e densidade de cargas, além do pH do meio, tempo e temperatura de agitação, atração por força eletrostática, ligação de hidrogênio, ligação covalente e afinidade biológica (KUMAR; AHUJA, 2013; COIMBRA, *et al.* 2011; SATO; *et al.* 2011; ZHANG; *et al.* 2013).

Figura 9. Preparação de microcápsulas LbL de polieletrólitos revestindo fármacos.



Fonte: SATO, *et al.* 2011.

Um maior controle sobre as propriedades das MCM é obtido pelo número de camadas, pela composição e concentração dos polímeros que compõe as camadas e pH do meio reacional. Existem dois sítios distintos onde os fármacos podem ser acomodados em MCM; o invólucro de polieletrólitos e a cavidade interna (SATO, *et al.* 2011; ZHANG, *et al.* 2013).

A química superficial das microcápsulas determina como elas se comportam dentro de um ambiente biológico. A modificação da superfície das MCM tem como objetivos: impedir o corpo de reconhecer as MCM como material estranho e expeli-

la; entregar as MCM em locais específicos, como o intestino e com a ação enzimática ou pH e liberar a substância ativa *in loco*. As MCM de biopolímeros como a caseína e a pectina, uma proteína e um polissacarídeo respectivamente, possuem boa biocompatibilidade e biodegradabilidade (SATO; *et al.* 2011; ZHANG, *et al.* 2013).

2.5 Caseína

O termo caseína é proveniente do latim “*caseus*”, cujo seu significado é “queijo”. É uma classe de proteína proveniente do leite, representando 80% da composição proteica de mamíferos como os bovinos e cerca de 40% no leite do ser humano (BADUI, 1989).

É por definição uma fosfoglicoproteína, complexos de fosfato e cálcio estáveis que formam um grupo heterogêneo de proteínas e fosfoproteínas. Estas substâncias fazem com que a caseína precipite em pH abaixo de 4,6 á 20 °C (BADUI, 1989; BARACAT, 2004; MITTAL, 2018).

O peso molecular da caseína fica em torno de 84.240, sendo que seu ponto isoelétrico é de 4.55 mV. Existem quatro frações principais, α_{S1} , α_{S2} , β e K que se diferem pela mobilidade eletroforética, peso molecular e número de aminoácidos presentes em sua constituição, demonstradas na tabela 1 (BADUI, 1989).

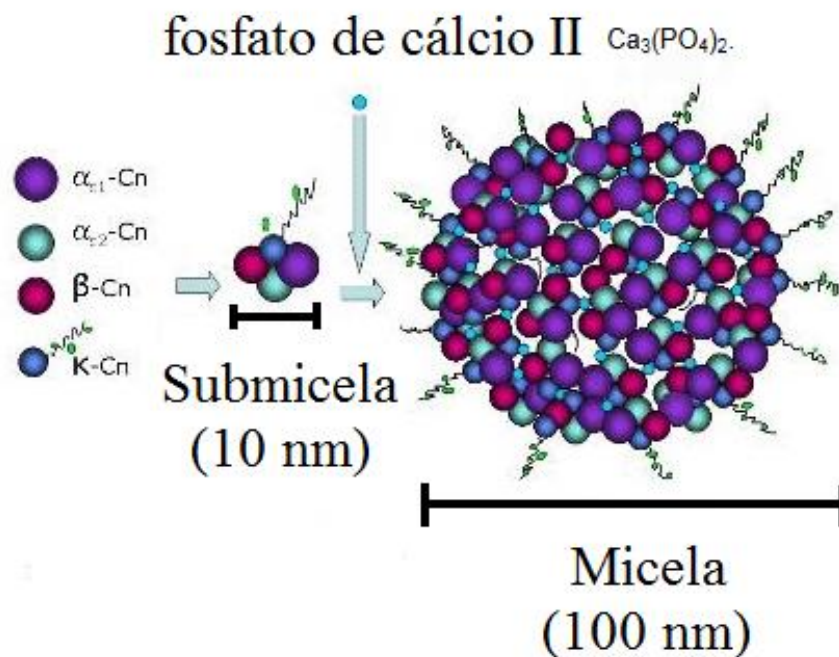
Tabela 1. Distribuição das proteínas do Leite.

Proteína	% de Proteína	Ponto Isoelétrico	Peso molecular (kDa)	Número de Aminoácidos
Caseína	80			
α_{S1}	34	4,1	23.612	199
α_{S2}	8		25.228	207
B	25	4,5	23.980	209
K	19	4,1	19.005	169

FONTE: BADUI, 1989

A estrutura da caseína é formada por grupos de micelas que, por sua vez, são compostas por submicelas formando subunidades de caseína que apresentam diâmetro que varia de 10 a 20 nm, sendo que estes valores podem variar conforme fatores como a temperatura, pH e o tipo de concentração de caseína (figura 10) (BADUI, 1989; BARACAT, 2004; CAMILO, 2007).

Figura 10. Submicela e micela de caseína.



FONTE: FARIA, 2011.

Por ser uma proteína que apresenta caráter anfipático (anfótero), a caseína apresenta cargas negativas acima do ponto isoelétrico, e carga positiva abaixo do mesmo. Isso contribui para seu uso em sistemas formadores de filme, sistemas matriciais e microcápsulas (BARACAT, 2004; CAMILO, 2007).

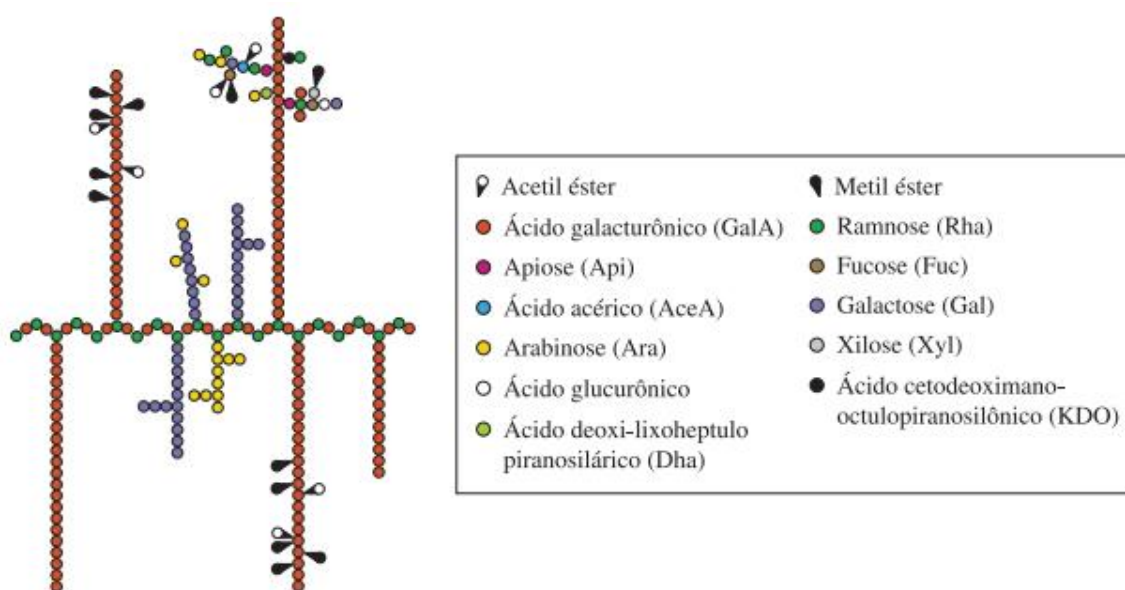
A caseína e a pectina são utilizadas para formulação de microcápsulas, pela sua capacidade formadora de gel e emulsões. Por ser uma proteína e um polissacarídeo de origem natural, não possuem efeitos tóxicos no organismo e são biodegradáveis (BARACAT, *et al*, 2012; CAMILO, 2007).

2.6 Pectina

Composta por uma estrutura macromolecular, a pectina é um conjunto de polissacarídeos e oligossacarídeos que apresenta uma estrutura complexa, constituída por um conjunto de biomacromoléculas que apresentam uma composição diversa, onde se podem encontrar monossacarídeos de até 17 tipos distintos. São provenientes de diversas fontes, tais como frutas, vegetais, algas entre outros (CANTERI; *et al.* 2012; WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006; RALET; LEROUGE; QUÉMÉNER, 2009).

A estrutura contém polissacarídeos diferentes, sendo os três principais: a ramnogalacturonana tipo II (RG-II); homogalacturonana (HG) e a ramnogalacturonana tipo I (RG-I). Desta forma, as pectinas caracterizam-se como biopolímeros multiblocos (Figura 11) (CANTERI; *et al.* 2012; FRAEYE; *et al.* 2010; JOLIE; *et al.* 2012).

Figura 11. Alternativa para representar a estrutura da Pectina.



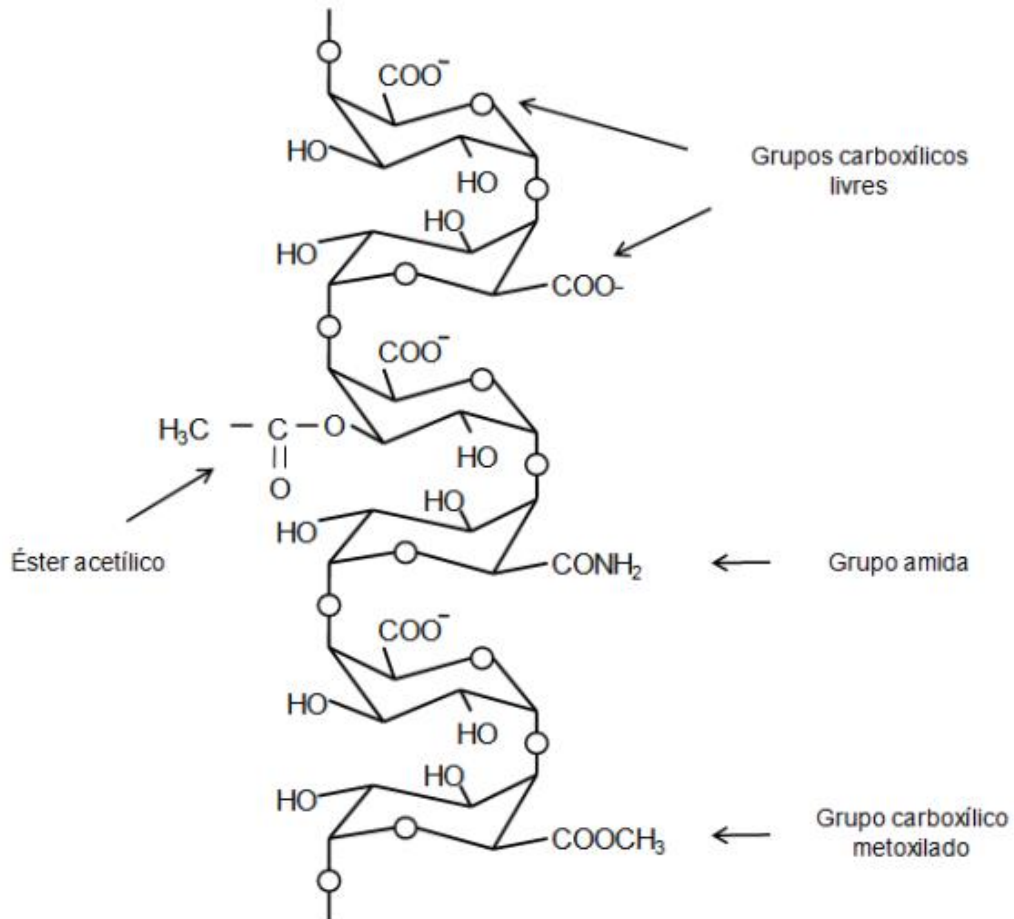
Fonte: CANTERI; *et al.* 2012.

Dos três principais polissacarídeos presentes na estrutura da pectina, a homogalacturonana é uma cadeia composta por resíduos ácidos, sendo estes α -D-galacturônico (GaA) que podem apresentar um número em torno de 200 unidades (CANTERI; *et al.* 2012; YAPO, 2009, 2011).

Além desta, pode-se encontrar nas pectinas estruturas de grupos amida ((R-C)ONH₂), sendo estes ligados por meio C-6. Este caso acontece quando a desmetoxilação ocorre em meio alcoólico com utilização de amônia, onde a pectina

passa a ser denominada como amidada, tendo sua propriedade funcional influenciada pelos níveis e proporções dos grupos amídicos, acetílicos e metílicos (Figura 12) (FRAEYE; *et al*, 2010).

Figura 12. Estrutura da cadeia de homogalacturonana.

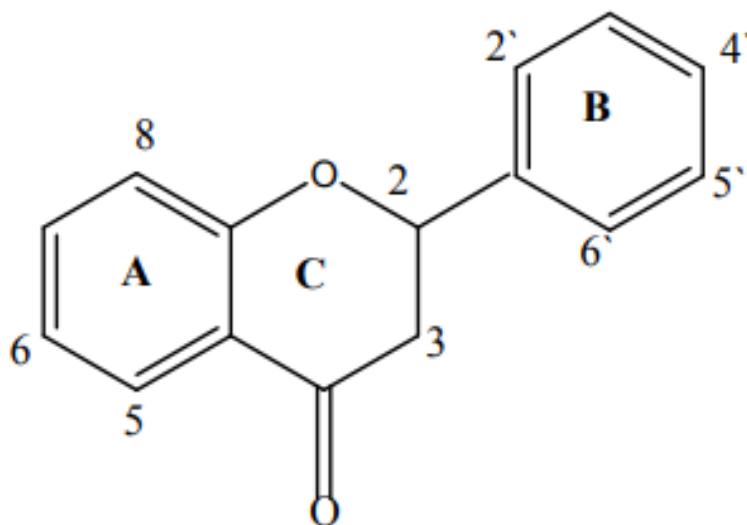


Fonte: FRAEYE; *et al*, 2010. Adaptado.

2.7. Flavonoides

Entende-se por flavonoides compostos bioativos que pertencem ao grupo dos polifenóis, são provenientes do metabolismo secundário de plantas (DORNAS; *et al*. 2007), possuem uma estrutura básica composta por 15 átomos de carbono, possuem duas unidades distintas: um fragmento $\text{C}_6\text{-C}_3$ que contém o anel BC e o fragmento C_6 que contém o anel A (Figura 13) (BOHM; *et al*. 1998; SILVA, 2008).

Figura 13. Estrutura básica dos flavonóides.



Fonte: DORNAS; *et al.* 2007.

Possuem uma porção oleofínica e uma carbonila conjugada, ligada a grupamentos aromáticos e diferem-se pelo grau de oxidação e padrão de substituição do anel (PADARATZ, 2009).

Os flavonoides dividem-se em classes, sendo que as principais são as flavanonas, isoflavonas, chalconas, flavanóis, flavonas, flavan-3-óis, auronas e antocianidinas (DORNAS; *et al.* 2007). Essas classes apresentam diferenças na substituição do anel central (C) e em seus graus de oxidação.

Os principais aspectos dos flavonóides estão relacionados às suas ações anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, anticancerígena e analgésica. Dois fatores importantes tornam estas substâncias indicadas ao uso terapêutico, sendo a sua alta capacidade em transferir elétrons em reações e um potencial redox considerado baixo. Os compostos fenólicos atuam como antioxidantes, pois combatem os radicais livres por meio da doação de átomos de hidrogênio, presentes em grupos hidroxila (OH), localizados na estrutura aromática, possui a capacidade de acomodar o elétron desemparelhado, pois há deslocalização eletrônica, por ressonância no anel aromático e o grupo carbonila, fazendo com que estes sejam neutralizados mantendo-se uma estrutura estável (CALEFFI, 2014; PADARATZ, 2009).

Sua ação anti-inflamatória ocorre porque os flavonóides são capazes de inibir mediadores inflamatórios como citocinas e algumas enzimas. Realizam a neutralização das espécies reativas de oxigênio (EROs) (BOHM; *et al.* 2008).

Compostos fenólicos presentes na dieta têm demonstrado efeitos benéficos à saúde, com ação antialérgica, antiviral, anti-inflamatória, vasodilatadora e apresentam baixa toxicidade e raros efeitos adversos (PINHO-RIBEIRO; *et al.* 2015; RUIZ-MIYAZAWA; *et al.* 2015; MARTINEZ; *et al.* 2016).

2.7.1. Hesperidina Metil Chalcona (HMC)

Classificada como um flavonoide a hesperidina pertence ao grupo das flavononas, sua extração é realizada em maior escala em frutas cítricas (PINHO-RIBEIRO; *et al.* 2015), está presente no mesocarpo e em menor escala no epicarpo (TSIRIGOTIS-MANIECKA; *et al.* 2017). Estudos determinam que 50% da fruta são convertidos em suco enquanto o restante é transformado em bagaço, o farelo de polpa cítrica é um resíduo sólido produzido por meio da prensagem e da secagem de frutas de onde são extraídos cerca de 1,5% de hesperidina (CYPRIANO, 2015).

É utilizada como medicamento tanto de forma isolada quanto em combinação com outras substâncias como o DIOSMIN (GIANNINI; *et al.* 2015). Atua sobre as veias do sistema circulatório, tais como má circulação, varizes, hemorroidas e, ainda, linfedemas. Outra ação da hesperidina é o combate a inflamação (PINHO-RIBEIRO; *et al.* 2015).

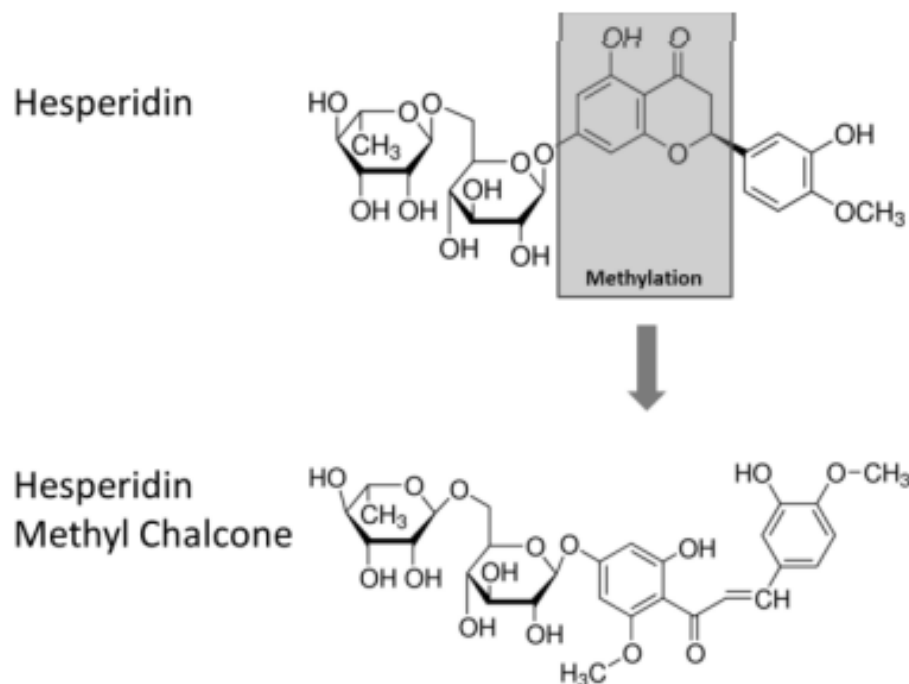
Os flavonoides são considerados moléculas promissoras no tratamento de Doenças Inflamatórias Intestinais por apresentarem baixa incidência de efeitos colaterais (GUAZELLI; *et al.* 2013).

Quando flavonoides são metilados sua estabilidade metabólica é aumentada, aumentando também a solubilidade, assim como a distribuição tecidual, com maior biodisponibilidade oral, além de inibir o aumento de células cancerígenas (MARTINEZ; *et al.* 2015).

A hesperidina metil chalcona é produzida por meio da metilação do flavonóide em condições alcalinas (Figura 14). A vantagem é a obtenção de uma chalcona que torna a HMC melhor distribuída, com maior resistência e maior absorção intestinal, se comparada com à hesperidina (YUN; *et al.* 2016). Ressalta-

se que os flavonóides em geral apresentam baixa absorção intestinal (MARTINEZ; *et al.* 2015; PINHO-RIBEIRO; *et al.* 2015).

Figura 14. Produção da Hesperidina metil chalcona.



Fonte: PINHO-RIBEIRO; *et al.* 2015.

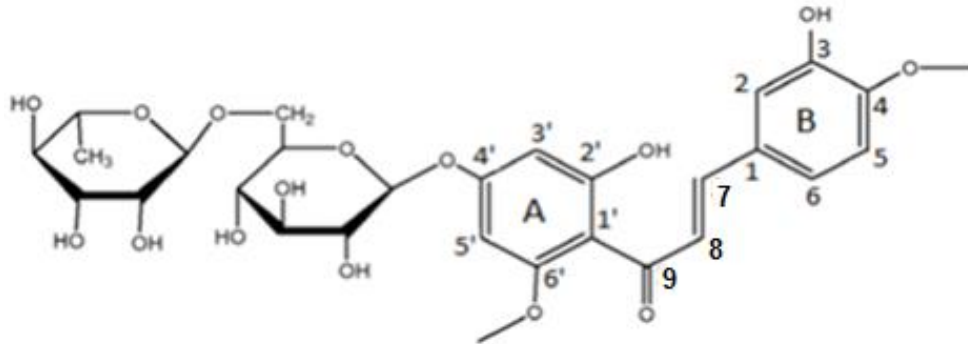
A HMC é uma chalcona glicosídica, utilizada em formulações farmacêuticas associada ao extrato de *Ruscus aculeatus* e ácido ascórbico como Cyclo 3[®], na redução dos sintomas e melhora da qualidade de vida de pacientes com doença venosa crônica (ALLAERT; *et al.* 2011). Além disso, a administração de HMC inibe o estresse oxidativo e inflamação induzidos pela radiação UVB na pele (MARTINEZ, 2015, 2016). Dessa forma, existe grande perspectiva nos efeitos anti-inflamatórios da HMC.

A HMC já demonstrou atividade antioxidante e anti-inflamatória, a atividade antioxidante é atribuída a relação estrutura atividade da 7,8 ligação dupla conjugada com a função 9-oxo, e a presença de OH nos carbonos 3 e 2' (Figura 15) são importantes para a atividade farmacológica vasoprotetora (LUO; PAN; ZHONG, 2015; MARTINEZ, 2015).

As substituições nos anéis A e B das chalconas resultam em mudanças nas propriedades químicas e na eficácia de sua ação terapêutica e também supõe-se

que a presença do grupo ceto α , β insaturado possa ser responsável por suas atividades biológicas (COSTA; SILVA, 2014; PADARATZ, 2009).

Figura 15. Estrutura química da HMC.



Fonte: GUAZELLI, 2017.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver e avaliar microcápsulas multicamadas (*Layer by Layer*) preparadas com conjugado de pectina/caseína como polímero de revestimento, contendo hesperidina metil chalcona (HMC) e avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do sistema de liberação obtido.

3.2. Objetivos específicos

- Definir as condições de preparação do conjugado pectina/caseína em que ocorra máxima interação e a formação das multicamadas;
- Padronizar os parâmetros de obtenção do sistema microencapsulado multicamada pelo método de coacervação complexa;
- Avaliar a influência dos processos de secagem nas características do sistema;
- Avaliar as características morfológicas das microcápsulas multicamadas;
- Determinar a distribuição de tamanho das microcápsulas multicamadas;
- Quantificar a HMC nos sistemas microencapsulados multicamadas pelo método ABTS;
- Avaliar o perfil de liberação dos sistemas obtidos, simulando o TGI superior e colônico;
- Avaliar os espectros obtidos por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR);
- Avaliar as curvas obtidas por calorimetria exploratória diferencial (DSC).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Materiais Pectina GENU[®] 8003 (ref. 13595) foi obtida da CP Kelco (Limeira, Brasil). Caseína da Kauffman&Co (Kehl, Germany). Ácido cítrico, hidróxido de sódio, ácido clorídrico e fosfato de sódio foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Germany). HMC da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA); 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato, sal de diamônio, ABTS); e persulfato de potássio foram adquiridos da Sigma ChemicalCo. (St. Louis, USA). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.2 Métodos

4.2.1 Preparação das Microcápsulas

Foram preparadas microcápsulas multicamadas (MCM) utilizando os biopolímeros, caseína e pectina, para a veiculação da Hesperidina metil chalcona (HMC), por meio da técnica de coacervação complexa, na proporção 1:5 fármaco/polímero, de acordo com BARACAT *et al.*(2012) com adaptações.

Utilizou-se 2,50 g de pectina e 2,50 g caseína, dispersas em água deionizada 50 mL e 25 mL respectivamente, sob agitação mecânica constante, o pH foi elevado a $8,0 \pm 0,1$, usando hidróxido de sódio (NaOH) 4M. A dispersão de caseína foi adicionada a solução de 5,00 g de HMC, sob agitação mecânica em Turrax (Fisaton 713D) por 3 minutos, após esse tempo sob agitação mecânica (Fisaton 713), adicionou-se a dispersão de pectina, reduzindo o pH para $3,0 \pm 0,1$ com o uso de ácido cítrico 1M, lentamente para a formação das microcápsulas (MC).

Incorporou-se à dispersão de MC 5,00 g de pectina (pH $\pm 4,2$), o pH foi elevado a $8,0 \pm 0,1$ com NaOH 4M, adicionou-se a dispersão contendo 5,00 g de caseína em pH $8,0 \pm 0,1$, reduzindo-se o pH novamente a $3,0 \pm 0,1$. Repete-se o procedimento adicionando-se a dispersão de pectina e posteriormente a de caseína, reduzindo o pH a $3,0 \pm 0,1$.

As MC foram secas por *spray dryer* (LabPlant, modelo SD-05) usando bico atomizador do tipo duplo fluido com mistura externa e orifício de saída de 1 mm. Os

parâmetros do processo foram: temperatura do ar de entrada mantida constante a 180 °C e temperatura de saída de 104-110 °C; o fluxo de ar de 66 m³ / h e a taxa de alimentação de 377,8 mL / h.

4.2.2 Curva analítica: porcentagem de ação antioxidante por µg de HMC.

Esta análise baseia-se na habilidade dos antioxidantes em sequestrar o radical cátion 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato, sal de diamônio) - ABTS⁺. Primeiramente, o ABTS foi dissolvido em água para concentração final de 7 mM. Para gerar o radical cátion, foi adicionado persulfato de potássio 2,45 mM à solução de ABTS, e esta mistura foi mantida no escuro, a temperatura ambiente, por 16 horas. Esta solução do radical cátion ABTS⁺ foi diluída em tampão fosfato de potássio (pH 7,4 ± 0,1) até atingir uma absorvância de 0,700 a 750 nm. Alíquotas de 10 µL de soluções de HMC com concentrações de: 50; 40; 25; 20; 12,5; 10; 6,25; 5; 3,175; 2,5; 1,25; 0,625; 0,312; 0,156 µg reagiram com 1 mL da solução do radical cátion ABTS⁺ durante 6 minutos, e as absorvâncias foram determinadas, gerando uma curva analítica de porcentagem (%) de ação antioxidante por µg de HMC.

4.2.3 Quantificação da HMC nas microcápsulas e determinação da Eficiência de Encapsulação (EE)

A quantificação de HMC encapsulada pela MCM, foi realizada por extração exaustiva do fármaco, utilizando-se 13,2 mg da formulação dispersa em 5 mL de etanol absoluto, levado ao ultrassom por 3 horas e centrifugadas a 0,8 g por 15 min. A HMC presente no sobrenadante foi quantificada pela técnica da capacidade sequestradora do radical ABTS ao reagir com a solução do radical cátion ABTS⁺ por 6 minutos, seguida da leitura da absorvância utilizando o comprimento de onda de 730 nm. Utilizou-se a equação da reta da curva analítica de HMC para determinar a quantidade do fármaco presente no sobrenadante. O procedimento de extração da HMC foi realizado várias vezes, até o esgotamento do fármaco nas MCM.

A eficiência de encapsulação da HMC foi realizada por meio da dispersão de 15 mg da MCM em 1 mL de etanol absoluto, agitado manualmente e centrifugada a 0,8 g por 15 min. A HMC presente no sobrenadante foi quantificada pela técnica da capacidade sequestradora do radical ABTS, seguida da leitura da absorvância, λ

730 nm. Utilizou-se a equação da reta da curva analítica de HMC para determinar a quantidade do fármaco presente no sobrenadante, foram realizadas 3 (três) extrações. A eficiência de encapsulação (EE) foi calculada de acordo com a equação 1:

$$EE(\%) = \frac{(\text{HMC na formulação } (\mu\text{g}) - \text{HMC no sobrenadante } (\mu\text{g}))}{\text{HMC na formulação } (\mu\text{g})} \times 100 \text{ (Equação 1)}$$

4.2.4 Liberação *In Vitro*/Teste de dissolução

O ensaio de dissolução das formulações microencapsuladas foi realizado durante 12 horas, utilizando dissolutor Erweka DT800, aparato USP tipo 1 e velocidade de 50 rpm. Durante as 2 primeiras horas, o meio de dissolução utilizado foi 500 mL de HCl 0,1 M, pH $1,2 \pm 0,1$, a 37°C , simulando as condições do suco gástrico. Nas próximas 10 horas, o meio de dissolução foi 500 mL de KOH-KH₂PO₄ 0,1 M, pH $7,1 \pm 0,1$, simulando as condições da região intestinal. Em intervalos de tempos de 15, 30 e 60 minutos, as amostras foram coletadas e as respostas aos meios de dissolução, filtradas em papel de filtro Millipore de 0,45 microns. As amostras foram quantificadas pela técnica da capacidade sequestradora do radical ABTS, seguida da leitura da absorvância em λ 730 nm. Utilizou-se a equação da reta da curva analítica de HMC para determinar a quantidade do fármaco presente no sobrenadante. Os resultados foram expressos em porcentagem (%) de fármaco liberado em função do tempo.

4.2.5 Análise de Tamanho de Partícula, potencial Zeta e influência do pH na estabilidade das MC.

A distribuição do tamanho de partícula das MC e o potencial Zeta foram analisados com o equipamento Zeta - APS (Matec Applied Sciences, Northborough, MA, USA). Após a adição de cada camada de pectina e caseína pelo processo *Layer by Layer*, foram feitas medidas da mobilidade eletroforética das microcápsulas em água, imediatamente após a adição de cada dispersão, variando o pH de 11 á 3, a temperatura de 25°C . O tamanho de partícula foi obtido por análise cumulativa

usando o software Zeta-APS, para confirmar a adsorção das multicamadas sobre as microcápsulas.

4.2.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia das amostras de MC unicamada, MCM inerte e contendo HMC, foram realizadas utilizando-se o Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 200 (FEI, EUA) do Laboratório de Microscopia Eletrônica e de Microanálise - LMEM da Central Multiusuária de Laboratórios de Pesquisa da UEL (CMLP), as amostras foram cobertas com ouro sob atmosfera de argônio e as imagens obtidas com um aumento de 1000, 6000 e 12000 vezes.

4.2.7 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Compostos orgânicos e inorgânicos, que contenham ligações covalentes, absorvem várias frequências de radiação eletromagnética na região do infravermelho do espectro eletromagnético.

As moléculas absorvem radiação e são excitadas para atingir um estado de maior energia, um processo de absorção quantizado. Ocorre uma variação do comprimento das ligações entre os átomos nas vibrações de estiramento, e nas vibrações de dobramento a posição dos átomos muda em relação ao plano de ligação original. Neste processo, são absorvidas as frequências de radiação que equivalem às frequências vibracionais naturais da molécula. Cada tipo de ligação tem sua própria frequência natural de vibração, sendo assim o espectro de infravermelho pode ser um método de identificação para as moléculas como as impressões digitais são para os seres humanos (PAVIA, 2010; SILVERSTEIN, 1994).

Foram realizadas análises de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) da HMC, das MCM inerte e contendo fármaco, utilizando espectrômetro IR PRESTIGE-21 (Shimadzu, Japão) do Laboratório de Espectroscopia - ESPEC da Central Multiusuária de Laboratórios de Pesquisa da UEL (CMLP), no modo de transmissão na faixa de 400 a 4000 cm^{-1} . Com objetivo de confirmar a encapsulação do fármaco nas MCM, foi realizada a comparação dos espectros e identificação das bandas de absorção na região do infravermelho para cada tipo de MC e também para a HMC. Para realizar as análises, as amostras

sólidas foram preparadas em pastilhas de brometo de potássio (KBr). Para cada amostra, adicionou-se MC e KBr, a mistura foi homogeneizada utilizando pistilo e almofariz de ágata, até obter um pó fino, em seguida, o pó foi prensado no formato de pastilha usando uma prensa hidráulica manual (Specac) até a pressão de 5 toneladas.

4.2.8 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas de DSC da HMC e das MCM inerte e contendo fármaco foram realizadas em equipamento Shimadzu DSC-60. As amostras foram aquecidas de 25 a 300 °C com razão de aquecimento de 10 °C/min sob atmosfera de nitrogênio.

4.2.9 Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média. As diferenças estatisticamente significativas entre os grupos foram determinadas através do teste paramétrico ANOVA de uma via seguida. As análises estatísticas foram realizadas usando-se o software GraphPadPrism6 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para valores correspondentes a $p < 0,05$, ou seja, nível de significância de pelo menos 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

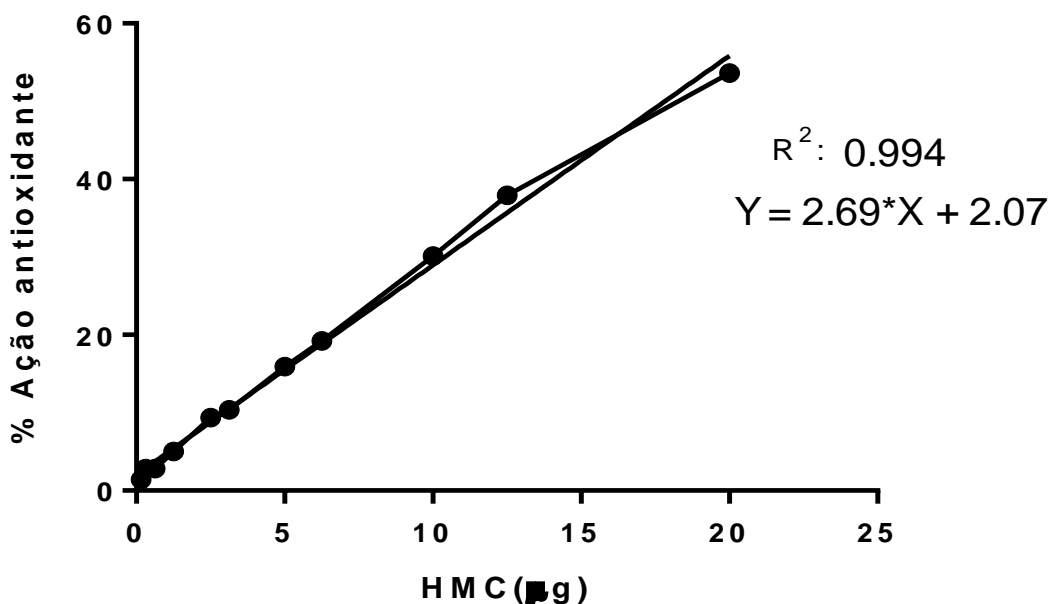
As MCM foram obtidas pela técnica de coacervação complexa em múltiplas etapas, *Layer by Layer*, pela deposição consecutiva de polímeros (GOUGIN, 2004; JOHNSTON, 2006). Utilizando-se a pectina, um polissacarídeo que apresenta carga positiva acima de seu ponto isoelétrico (*pI*) de 4,1; e a caseína, uma proteína que apresenta carga negativa acima de seu *pI* de 4,55 (BARACAT, 2004; CAMILO, 2007). Entre os biopolímeros ocorrem ligações/interações poliméricas, por interações eletrostáticas, ligações feitas por hidrogênio e ligações covalentes (BOBBIO; BOBBIO, 2003; SILVA; *et al.* 2015). Os polímeros conjugados foram utilizados para revestir a HMC, um flavonóide do grupo das flavononas, que tem demonstrado atividade antioxidante e anti-inflamatória, e atividade farmacológica vasoprotetora (MARTINEZ; *et al.* 2016). Flavonoides são moléculas promissoras no tratamento de Doenças Inflamatórias Intestinais (GUAZELLI; *et al.* 2017) .

5.1 Quantificação da HMC nas microcápsulas e Determinação da Eficiência de Encapsulação (EE)

A eficiência de encapsulação foi realizada por análise indireta, por meio da quantificação da atividade antioxidante dos flavonóides, ou seja sua capacidade de doar elétrons, pela técnica da capacidade sequestradora do radical cátion ABTS^{•+}. Utilizou-se a equação da reta da curva analítica de porcentagem de ação antioxidante por µg de HMC (Figura 16), para determinar a quantidade do fármaco nos sobrenadantes, utilizando-se a equação 2.

$$Y = 2,69 * X + 2,07 \text{ (Equação 2)}$$

Figura 16. Curva analítica porcentagem de ação antioxidante por μg de HMC.



A eficiência de encapsulação foi obtida a partir da diferença entre a porcentagem da quantidade total de HMC presente na amostra após extração exaustiva (quantificação) e a porcentagem da quantidade de HMC presente no sobrenadante, utilizando a equação 1.

O resultado da porcentagem de ação antioxidante na quantificação foi de 13,21%.

Utilizando-se a equação 2, obtida pela curva analítica, os resultados mostraram que a quantidade de HMC extraída da MCM foi de 4,14 μg , onde 4,4088 μg de HMC corresponde a 100% de fármaco teórico incorporado na formulação da MCM utilizada para a realização da análise, ou seja 93,87% de fármaco está presente na amostra (Tabela 2).

Os resultados da eficiência de encapsulação mostraram que 15,37% de HMC está presente no sobrenadante, sendo assim 84,63% da HMC encontra-se encapsulada. Os sobrenadantes mostraram atividade antioxidante de 11,75; 2,53 e 2,29%, de capacidade de doar elétrons, utilizando a equação 2, assim, observou-se que foram extraídos 3,60; 0,17 e 0,08 μg de HMC, respectivamente, com somatória de 3,85 μg de HMC presente no sobrenadante. Para realização da eficiência de encapsulação foi utilizado 25,05 μg de HMC corresponde a 100% de fármaco teórico incorporado na formulação da MCM (Tabela 2).

Tabela 2. Análise da quantificação e eficiência de encapsulação.

Análise	100% teórico de HMC na MCM (μg)	HMC presente no sobrenadante (μg)	% de HMC na MCM	% de HMC no sobrenadante
Quantificação	4,41	4,14	6,13	93,87
Eficiência	25,05	3,85	84,63	15,37

Os resultados demonstrados por GUAZELLI, 2017, no desenvolvimento de duas formulações microencapsuladas contendo HMC (MH) com proporções de fármaco:polímeros MH1:5 e MH1:3, obteve-se eficiência de encapsulação de 46% e 39%, respectivamente. Considerando o baixo resultado de eficiência de encapsulação nas microcápsulas com apenas uma camada, sugeriu-se que novas técnicas de revestimento seriam necessárias para melhorar a eficiência de encapsulação de fármacos que facilmente se difundem para o meio externo. Desta maneira, o método de revestimento multicamadas, *LbL*, utilizando a técnica de coacervação complexa mostrou-se mais eficiente para encapsulação da HMC.

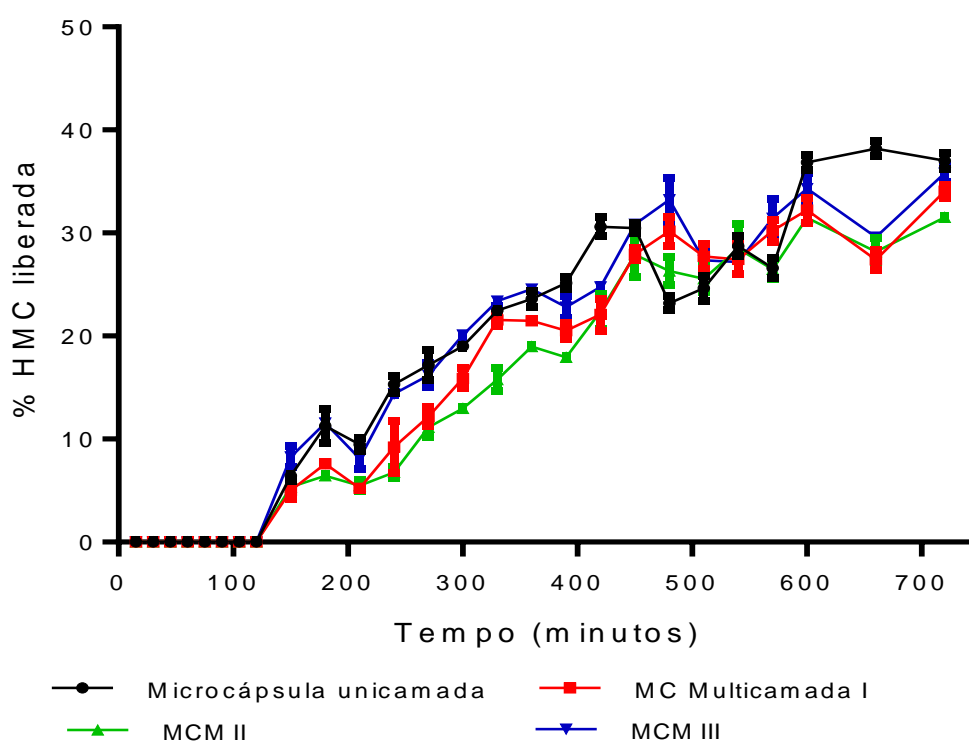
Como observado por LEE, *et al.*, 2018, no desenvolvimento de revestimento multicamadas, *LbL* de PSS [poly(sodium-4-styrenesulfonate)] com PDAMDAC [poly(diallyldimethylammonium chloride)] adicionada ao PCL [Poly(ϵ -caprolactone)], para a veiculação do retinóide dopamida e desenvolvimento de MCM PCL com PSS/PDAMDAC adicionado camadas de nanopartículas de sílica (NPs) como revestimento da dopamida, observou-se a presença de 67% de dopamida na MCM com adição de NPs, e a presença de 32% de dopamida nas MCM sem adição de sílica, demonstrando que a presença da sílica reforça a camada do invólucro. Assim como a presença de multicamada nas MC reforça o invólucro.

5.2 Liberação In Vitro/Teste de dissolução

Os resultados da análise do perfil de dissolução da HMC presente em MC unicamada e MCM contendo HMC (Figura 17), mostraram que não houve liberação significativa de HMC em meio ácido (HCL 0,1M pH 1,2 \pm 0,1) nos primeiros 120 minutos. A liberação inicial de fármaco se dá em 150 minutos, em meio básico (tampão KH_2PO_4 - KOH 0,2M pH 7,1 \pm 0,1), tendo sua porcentagem máxima de

extração de 36,87% no tempo de 600 minutos para MC unicamada, e para MCM (realizada em triplicata I, II e III), de 34,30; 32,21 e 31,49% de HMC liberada das MCM, respectivamente, no tempo de 600 minutos. Esse resultado demonstra que com uma melhor eficiência na incorporação da HMC pela MCM e a presença de várias camadas, favoreceu a liberação mais lenta da HMC, quando comparada a MC unicamada.

Figura 17. Perfil de liberação das MC unicamada e MCM contendo HMC. Meio ácido (HCl 0,1M pH $1,2 \pm 0,1$), no tempo de 0 a 120 minutos, tampão KH_2PO_4 - KOH 0,2M (pH $7,1 \pm 0,1$), no tempo de 120 a 720 minutos.



O perfil de dissolução obtido difere-se do obtido por GUAZELLI, 2017, onde foram desenvolvidas duas formulações microencapsuladas contendo HMC (MH) com diferentes proporções fármaco/polímeros (MH1:5 e MH1:3), ambas as formulações apresentaram uma liberação de 100% do fármaco, dentro de 240 minutos em meio que simula as condições do suco entérico.

Assim como os resultados observados por ANSELMO; *et al*, 2016, no desenvolvimento de sistemas microencapsulados utilizando quitosana e alginato (CHI/ALG) para veiculação de probiótico *Bacillus coagulans* (BC) via *LbL*, investigou

a liberação de BC na presença de fluido gástrico simulado (SGF, pH 2), sais biliares e fluido intestinal simulado (SIF, pH7). Os autores, demonstram maior eficiência na proteção do BC com o aumento das camadas de CHI/ALG, e a MC de camada única de quitosana, demonstrou proteção da BC ineficiente no SGF, sais biliares e SIF.

5.3 Tamanho de Partícula e potencial Zeta

As microcápsulas unicamadas e MCM contendo fármaco, preparadas por coacervação complexa e secas pelo método de *spray drying* foram analisadas de maneira a obter a distribuição do tamanho das partículas, obtendo, desta maneira, os histogramas de frequência (%) e de frequência acumulada (%) (Figuras 18 e 23).

Figura 18. Frequência (%) e Frequência acumulada (%) versus tamanho de partículas (μm) de MC unicamada.

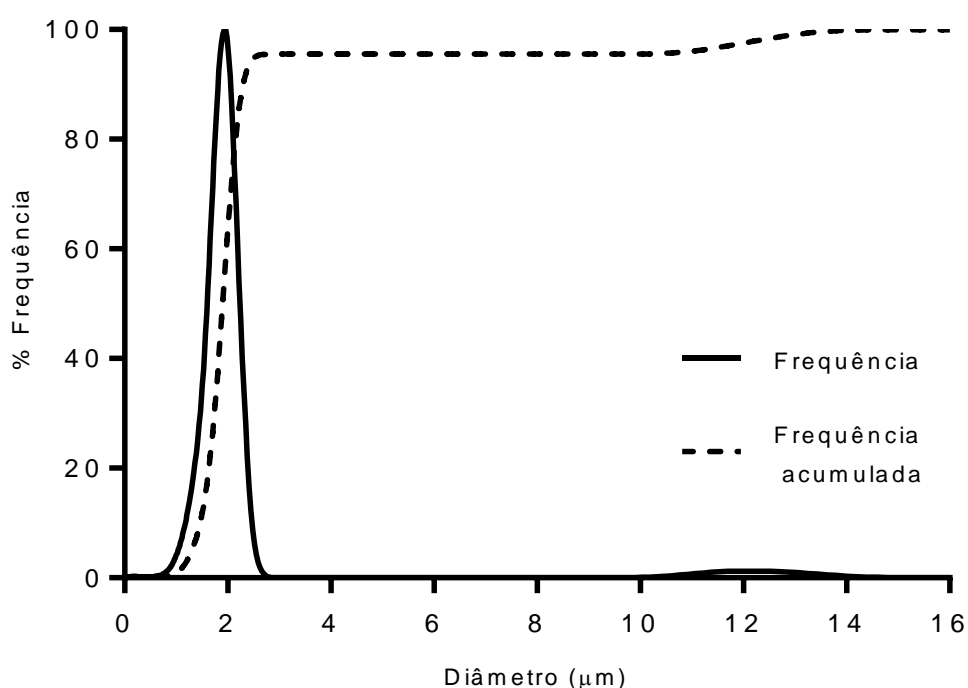


Figura 19. Frequência (%) e Frequência acumulada (%) versus tamanho de partículas (μm) de MCM (segunda camada adicionada de pectina).

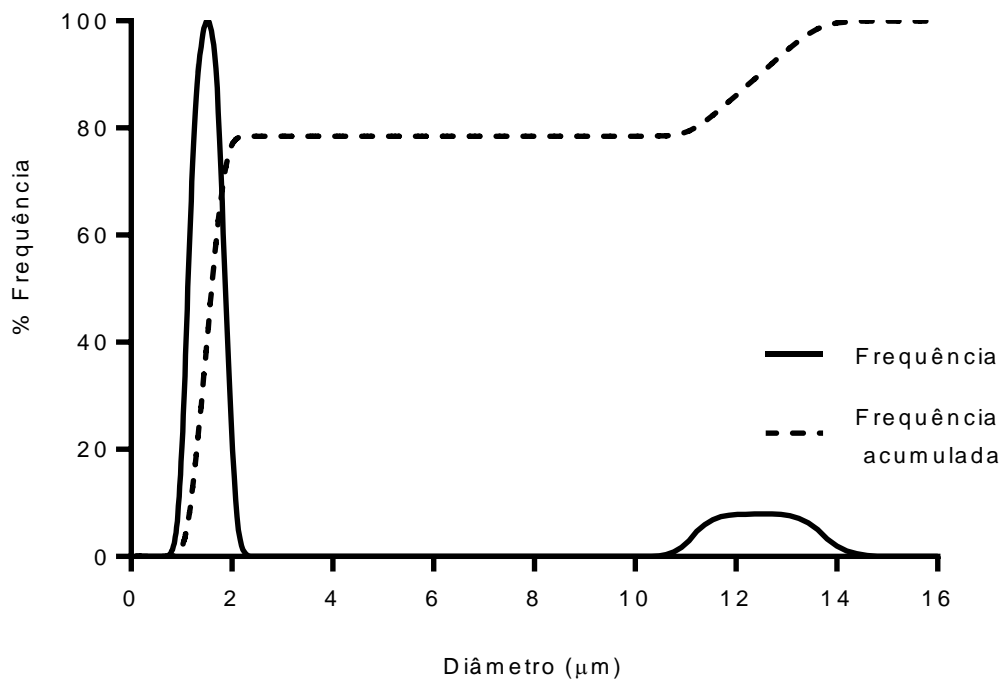


Figura 20. Frequência (%) e Frequência acumulada (%) versus tamanho de partículas (μm) de MCM (terceira camada adicionada de caseína).

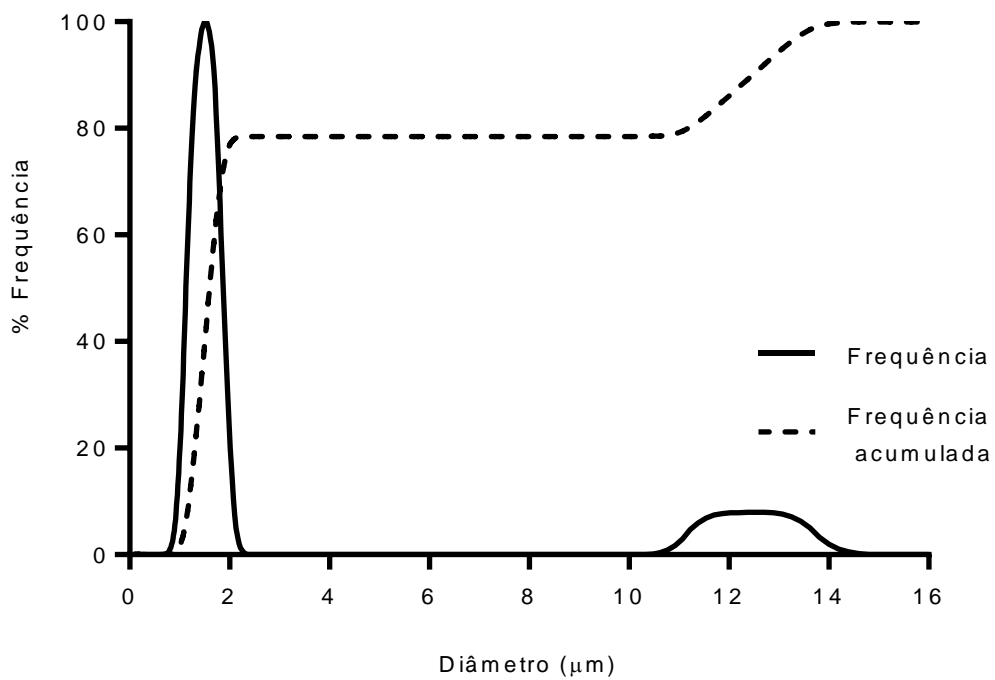


Figura 21. Frequência (%) e Frequência acumulada (%) versus tamanho de partículas (μm) de MCM (quarta camada adicionada de pectina).

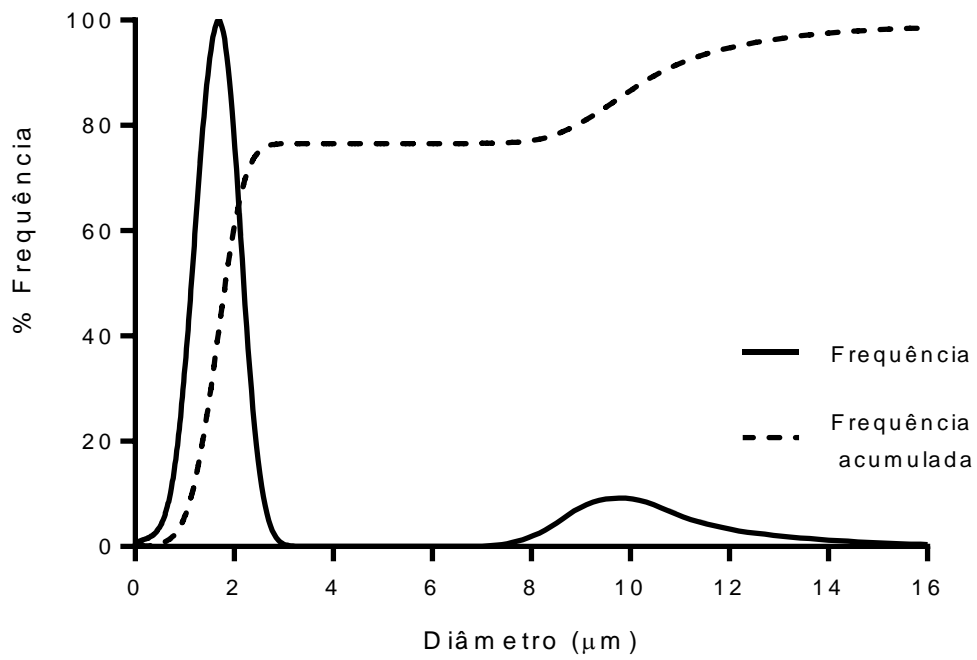


Figura 22. Frequência (%) e Frequência acumulada (%) versus tamanho de partículas (μm) de MCM (quinta camada adicionada de caseína).

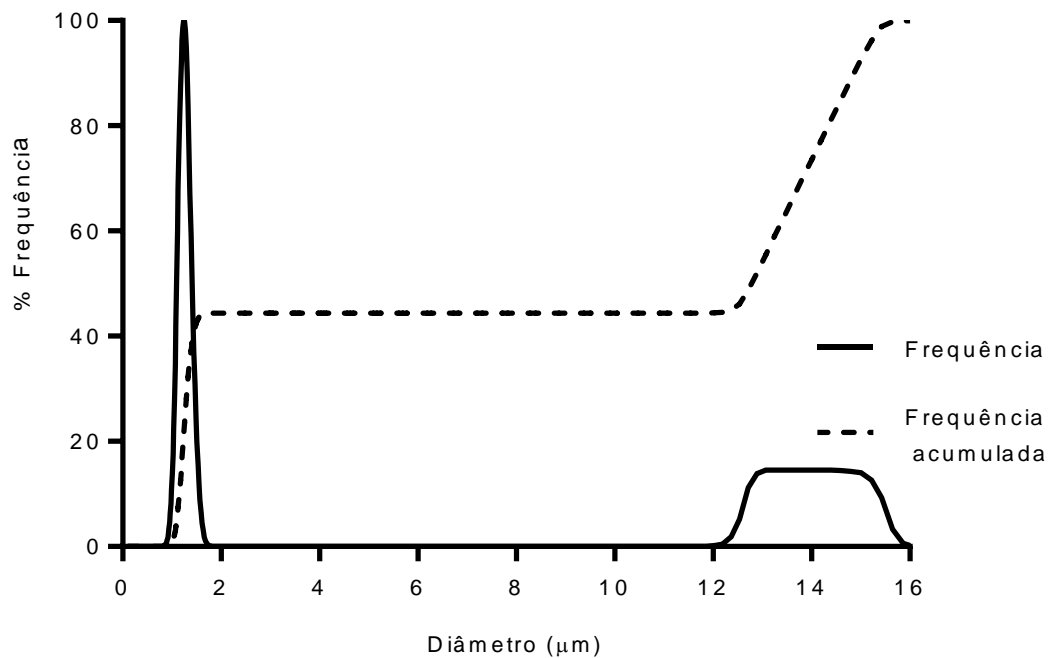


Figura 23. Frequência (%) e Frequência acumulada (%) versus tamanho de partículas (μm) de HMC revestida com MCM.

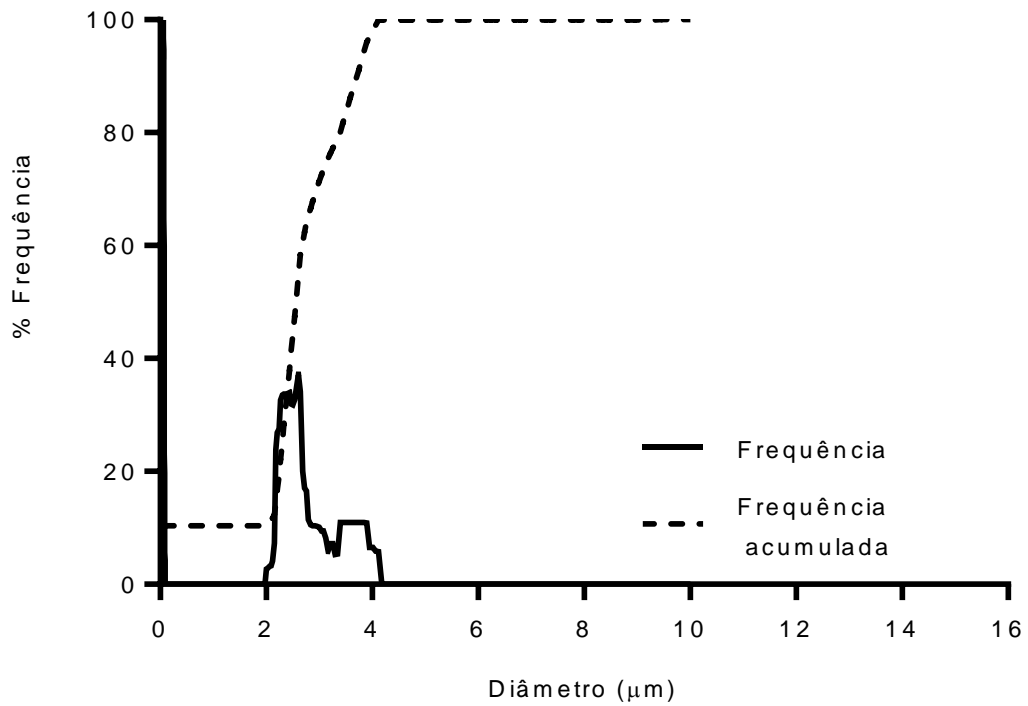
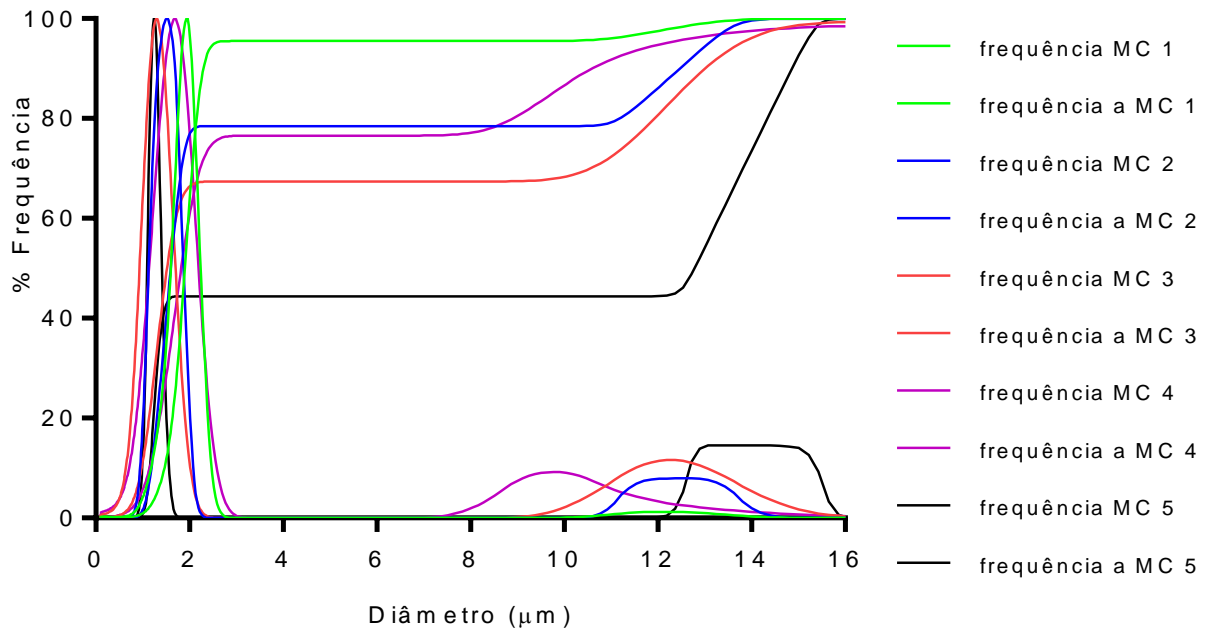


Figura 24. Frequência (%) e Frequência (acumulada %) versus tamanho de partículas (μm) de: MC unicamada, MCM 2, 3, 4 e 5.



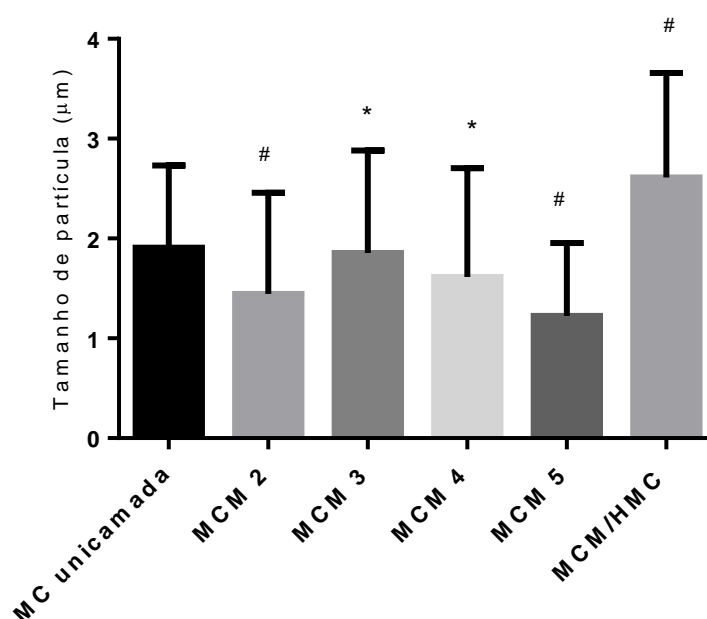
De acordo com a Tabela 3 pode-se observar que a média de tamanho de partícula foi de $1,9079 \pm 0,822 \mu\text{m}$ para MC unicamada e $1,2251 \pm 0,730 \mu\text{m}$ para MCM após a adição de 5 (cinco) camadas de biopolímeros.

Com a adição dos biopolímeros não houve um aumento no tamanho das partículas, como era esperado, houve uma pequena diminuição do diâmetro das mesmas. Esse resultado sugere que houve maior interação entre as partículas tornando-a mais compacta, para as MCM inerte, porém com a presença do fármaco observou-se um aumento no tamanho das partículas alcançando o tamanho médio de $2,6111 \pm 1,047$. A distribuição do tamanho de partícula foi demonstrada nas Figuras 24 e 25, e Tabela 3.

Tabela 3. Tamanho médio de partícula

Amostra	Tamanho de partícula médio (μm)
MC unicamada	$1,9008 \pm 0,822$
MC 2	$1,4465 \pm 1,013$
MC 3	$1,8558 \pm 1,025$
MC 4	$1,6159 \pm 1,090$
MC 5	$1,2251 \pm 0,730$
MCM/HMC	$2,6111 \pm 1,047$

Figura 25. Distribuição do tamanho de partícula. MC unicamada, MCM 2, 3, 4 e 5 e MCM com HMC. As diferenças estatisticamente significativas entre os grupos foram determinadas através do teste paramétrico ANOVA de uma via seguido de Tukey's, para comparar os grupos ($\#p > 0,05$ comparada com a MC unicamada).



O resultado do tamanho de partícula se assemelha ao observado por ANSARIFAR, *et al.*, 2017, em que a formulação de MCM obtida pelo método *LbL*, constituídas de fibrilas isoladas de proteína de soja (SPI) e pectina com auto grau de metoxilação (HMP), utilizadas para revestimento do limoleno, demonstraram que o tamanho das partículas variou de 4,64 a 8,32 μm , o tamanho de partícula variou pouco com o aumento do número de camadas (camadas 1,3 e 5 de SPI) e (camadas 2,4 e 6 de HMP). Este resultado pode estar associado ao comportamento de adsorção das camadas de SPI que formaram partículas localizadas na interface das cápsulas, formando uma camada porosa onde a HMP foi percolada nesta estrutura preenchendo os vazios.

O potencial Zeta é um fator importante na estabilidade das partículas encapsuladas. Quanto maior o potencial zeta das partículas, maior a força de repulsão, levando a maior estabilidade da dispersão (ANSARIFAR, *et al.* 2017).

Os resultados de potencial zeta, Tabela 4, demonstraram que com a sobreposição de duas camadas de biopolímeros à MC inerte, há um aumento de 79,40 mV no potencial, elevando sua estabilidade, e com a adição de pectina na quarta camada houve diminuição de 23,60 mV.

Estes resultados podem ser devido a carga negativa do polissacarídeo que se encontra no pH abaixo de seu ponto isoelétrico (BARACAT, 2004; CAMILO, 2017) e novamente o aumento do potencial com adição de caseína. Assim como observado por MANJU e SREENIVASAN, 2011, na preparação de microcápsulas multicamadas (*Layer by Layer*) camadas de poli (ácido 4-estireno sulfônico de sódio) e poli (etileno imina) sequenciais, revestindo a curcumina, os resultados mostram carga global da partícula em suspensão aquosa maior que 50 mV cada adsorção, demonstrando elevada estabilidade de micro partícula em suspensão.

Segundo LEE, *et al.*, 2018, na preparação de MC por adsorção interfacial de copolímeros anfílicos de PMPC-b-PCL-b-PMPC [Poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)-block-poly(ϵ -caprolactone)-block-poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)] e PAMA-b-PCL-b-PAMA [poly(2-aminoethyl methacrylate)-block-poly(ϵ -caprolactone)-block-poly(2-aminoethyl methacrylate)], utilizados para incorporar PCL [poly(ϵ -caprolactone)]. A adição de uma camada de PAMA-b-PCL-b-PAMA à MC elevou o potencial zeta de -14,5 mV à 62 mV, aumentando sua estabilidade, pois o potencial está acima de + 30 mV. O potencial zeta se manteve em 60 mV após a adição de PCL, mantendo a estabilidade da MCM.

O revestimento da HMC pela MCM demonstrou potencial menor que da MCM inerte, provavelmente devido a adição de fármacos parcialmente solúveis diminuiu a estabilidade das MC. Os agregados poliméricos formados, apresentam interior hidrofóbico (LEIMANN, 2008; PRATA, 2006), a presença de um fármaco parcialmente solúvel desestabiliza a agregação das partículas.

Tabela 4. Potencial Zeta das MC unicamada e MCM.

Amostra	Potencial Zeta (mV)
MC unicamada	16,40
MCM 2	19,40
MCM 3	98,80
MCM 4	75,20
MCM 5	93,10
MCM com HMC	44,30

5.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As fotomicrografias obtidas das MC unicamada com HMC, MCM inerte e com HMC, obtidas pela técnica de MEV, estão representadas nas Figuras 26, 27 e 28 respectivamente. As MC unicamada preparadas com conjugado de pectina/caseína contendo a HMC, secas em *spray drying*, apresentaram formatos esféricos e tamanhos não uniformes. As microcápsulas inertes, revestidas com camadas sequenciais dos biopolímeros, secas em estufa a 37 °C, apresentam formatos não esféricos e aglomeradas. Essa aglomeração observada nas MCM inerte é característica de secagem em estufa e não por atomização (BARACAT; *et al*, 2004).

As MCM contendo o fármaco, após a secagem em *spray drying*, apresentaram-se com formatos esféricos, aglomeradas e com superfície lisa, demonstrando maior coesão entre as moléculas da superfície e a provável presença de multicamadas.

As características observadas na MC unicamada com HMC assemelham-se aos resultados obtidos por BARACAT, 2004, em que as MC foram preparadas com conjugado de pectina / caseína contendo paracetamol, como fármaco modelo, demonstrando MC com formas esféricas e sem a formação de aglomerados.

Figura 26. Fotomicrografia por MEV de MC unicamada com HMC, aumento de 1000 e 6000 vezes.

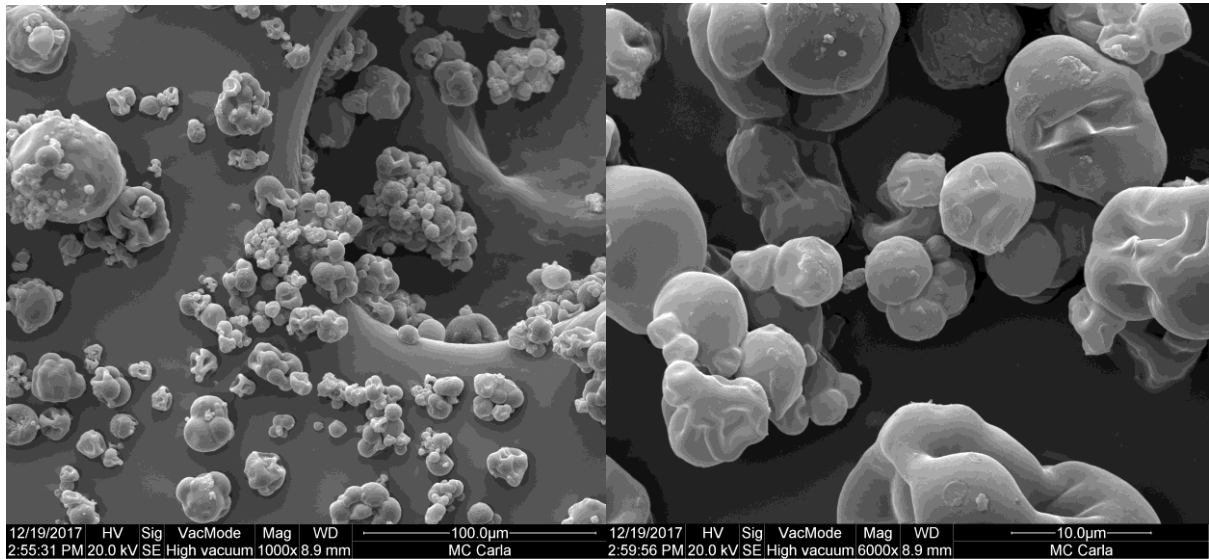


Figura 27. Fotomicrografia por MEV de MCM inerte, aumento de 1000 e 6000 e 12000 vezes.

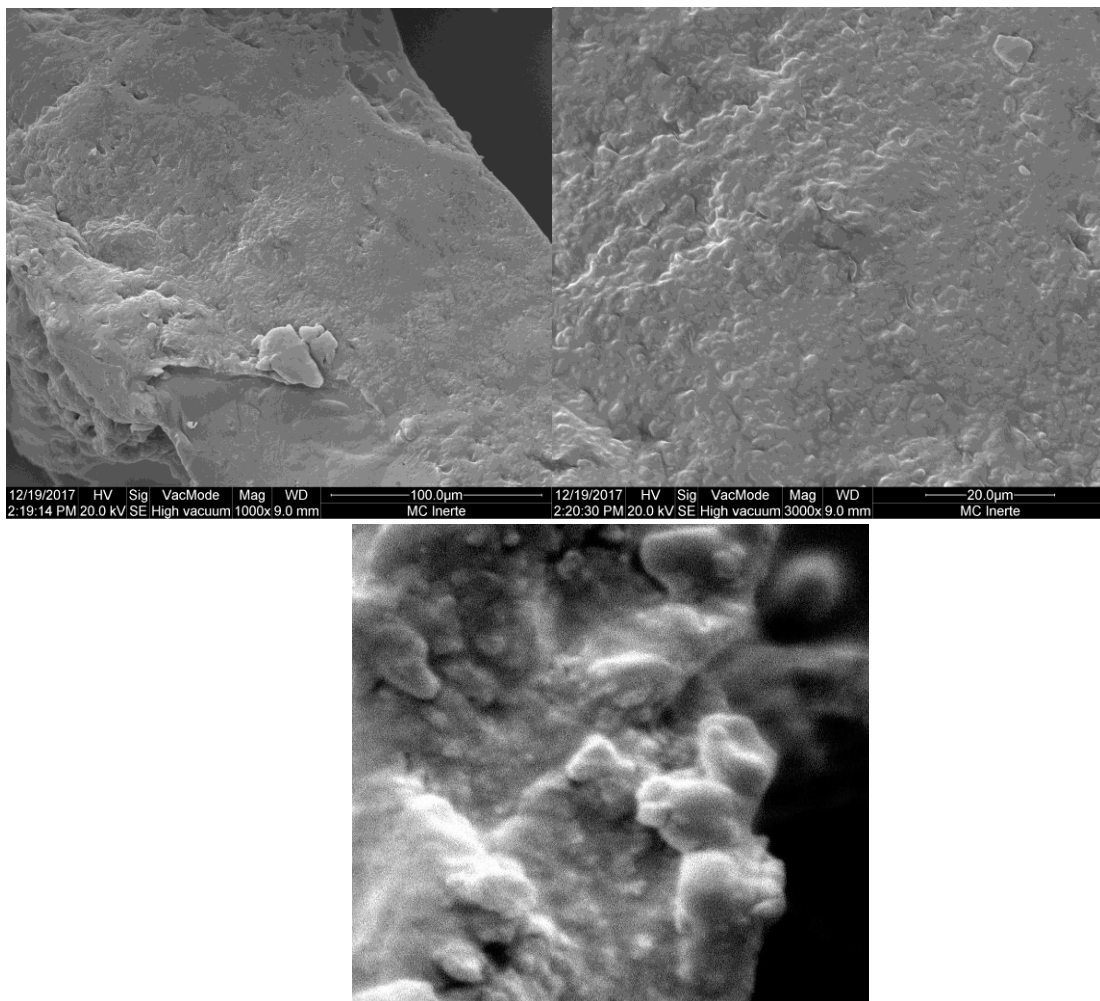
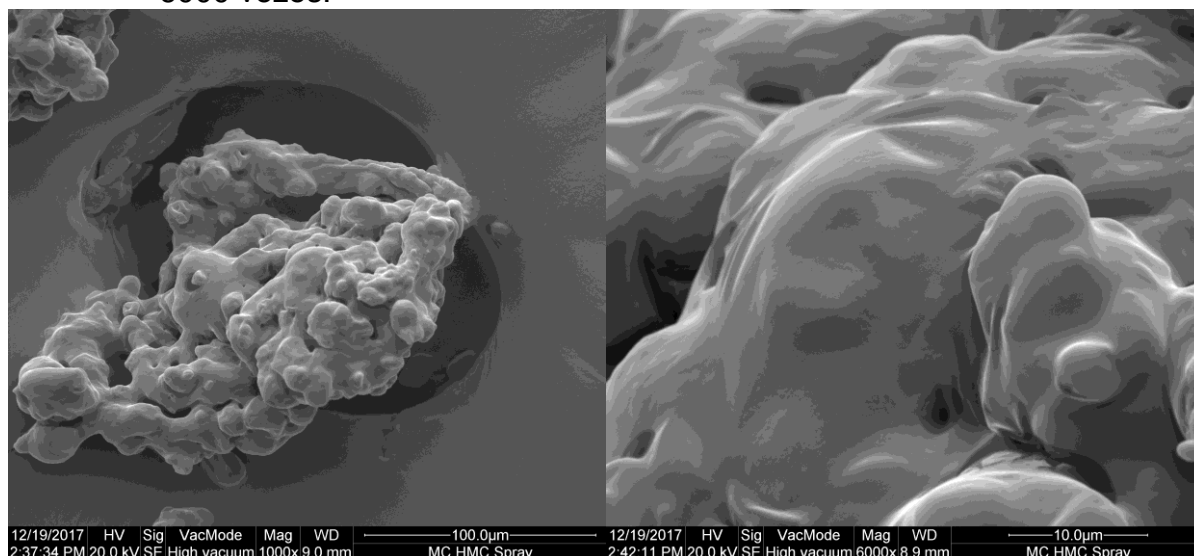


Figura 28. Fotomicrografia por MEV de MCM contendo HMC, aumento de 1000 e 6000 vezes.



5.5 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Foram realizadas análises de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) da HMC (Figura 29), da MCM inerte (Figura 30) e da MCM contendo fármaco (Figura 31).

Na Figura 29 está representado o espectro de infravermelho da HMC, com as bandas características em 3400 cm^{-1} (estiramento OH de alcoóis e fenóis), 2902 e 2831 cm^{-1} (estiramento C-H de CH_3 e CH_2), 1596 e 1595 cm^{-1} (estiramento C=C de aromáticos), 1416 e 1413 cm^{-1} (dobramento C-H de CH_3 e CH_2), 1256 , 1085 e 1047 cm^{-1} (dobramento C-O), 805 cm^{-1} (dobramento C=C fora do plano de aromático) (PAVIA, 2010; SILVERSTEIN, 1994).

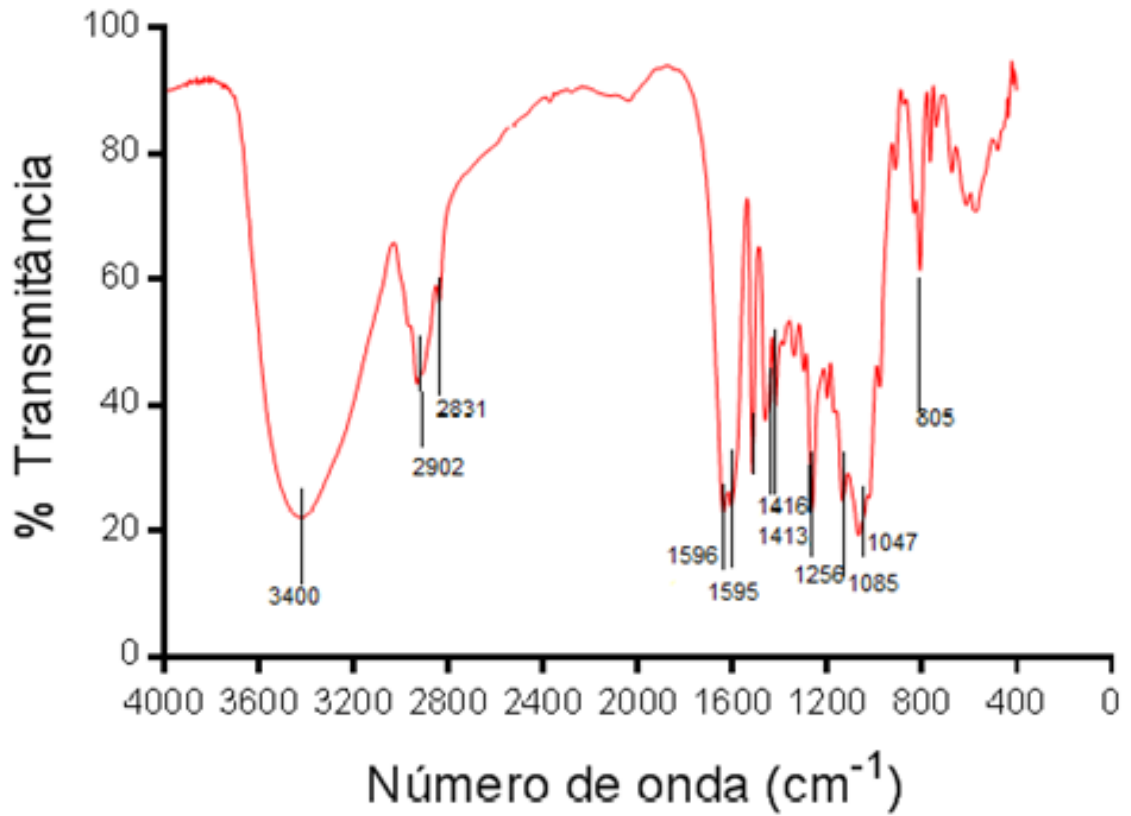
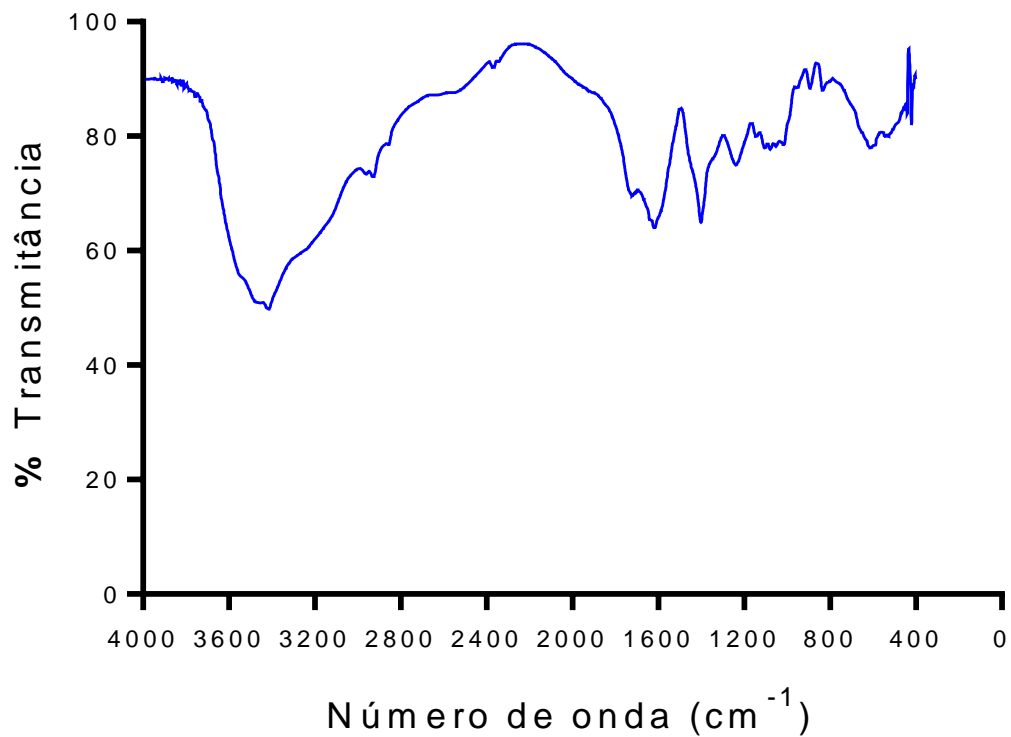
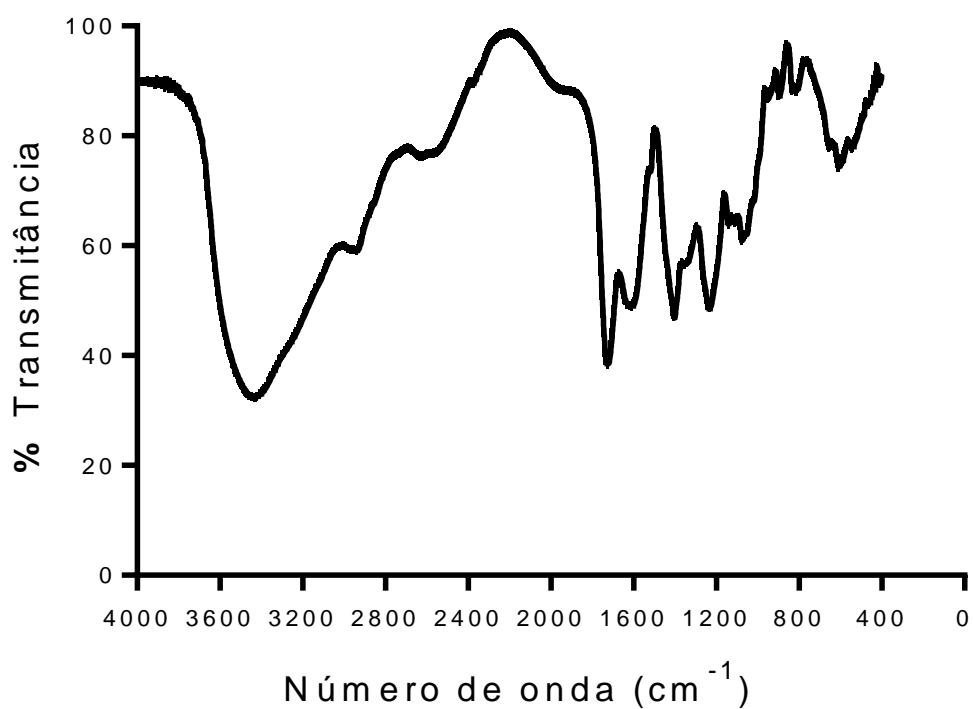
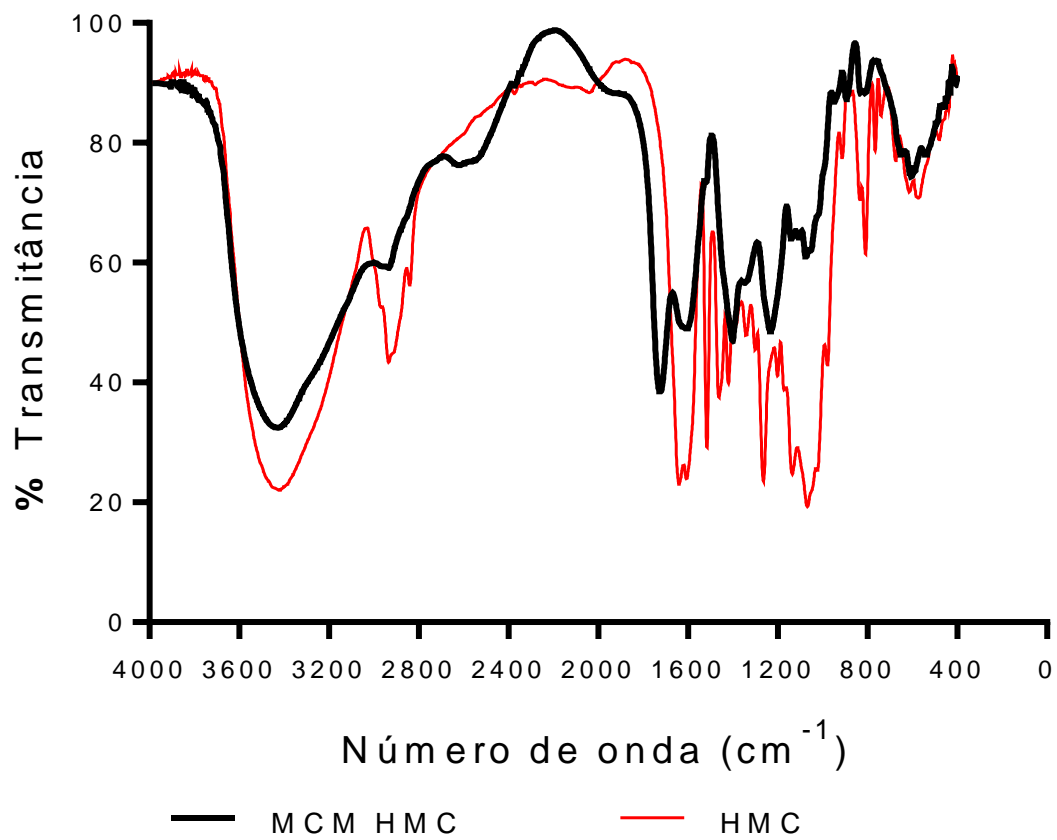
Figura 29. Espectro de FTIR da HMC.**Figura 30.** Espectro de FTIR de MCM inerte.

Figura 31. Espectro de FTIR da MCM com HMC seca em *spray drying*.



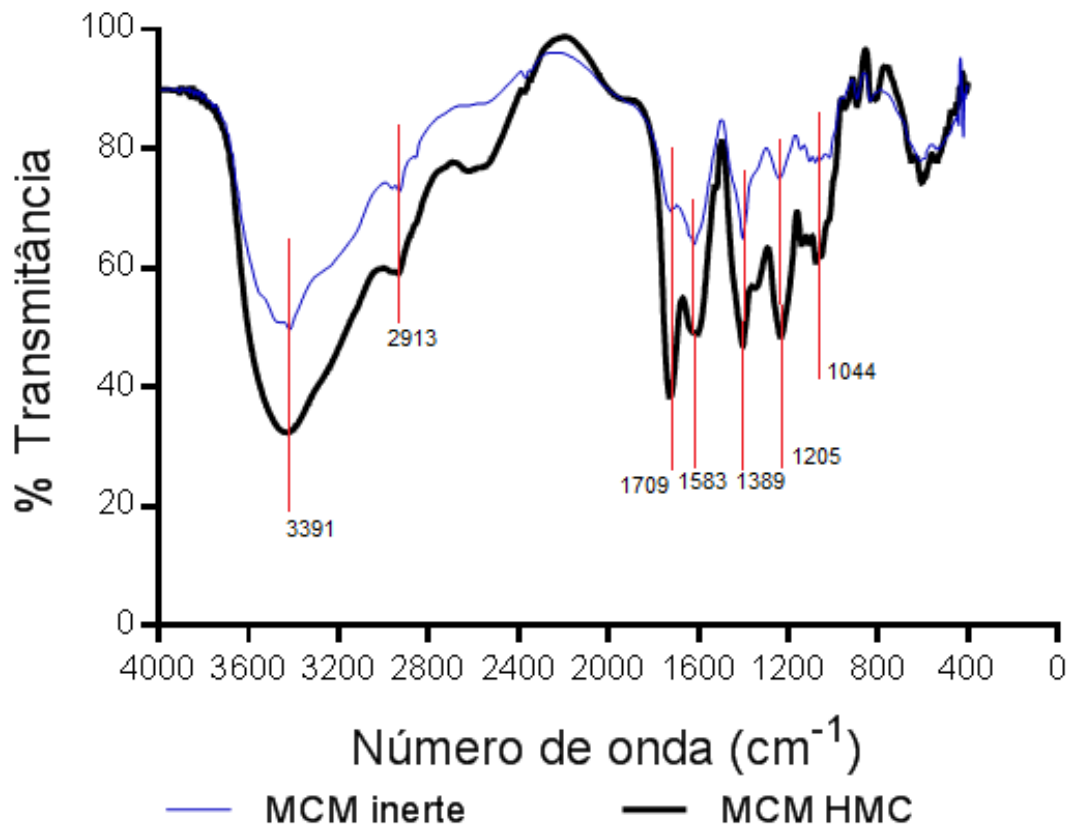
Com a sobreposição dos espectros da MCM contendo HMC, secas em *spray drying* e a HMC (Figura 32), podemos observar as diferenças e semelhanças entre os espectros, e pode-se observar que os espectros não se assemelham e não há sobreposição dos picos característicos das amostras.

Figura 32. Espectros de FTIR da HMC, e MCM com fármaco, seca em *spray drying*.



Da mesma forma foram sobrepostos os espectros das MCM inerte e contendo HMC seca em *spray drying* representado na Figura 33.

Figura 33. Espectros de FTIR das microcápsulas multicamadas inerte e contendo HMC, secas em *spray drying*.

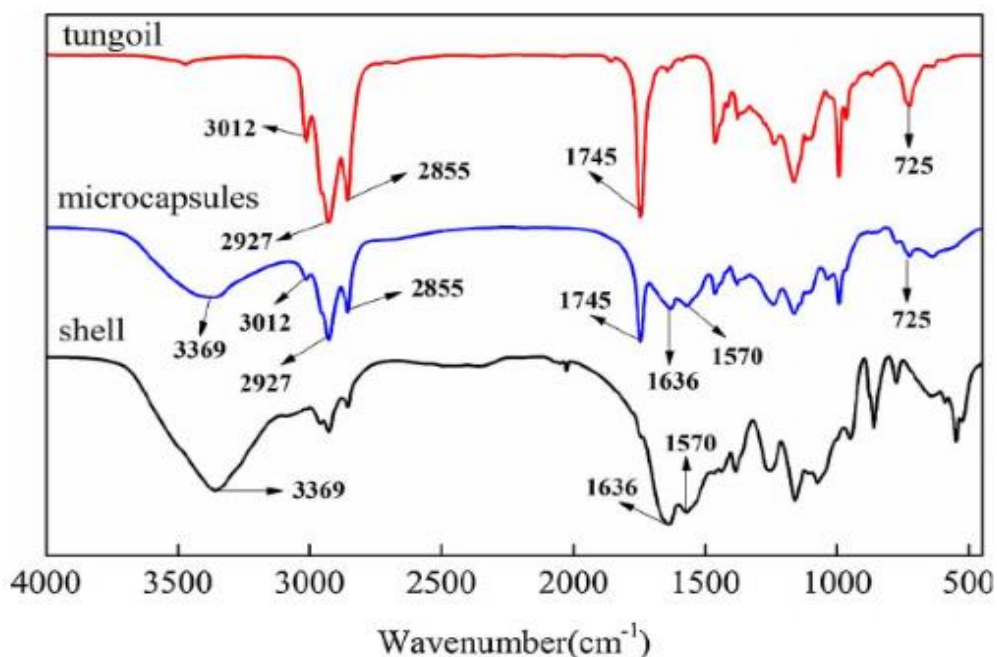


Os espectros obtidos da HMC, e MCM inerte e com fármaco secas em *spray drying* (Figuras 29 - 33), nos mostram que o espectro da MCM contendo o fármaco se assemelha ao da MCM inerte, aumentando a intensidade de absorção, mas mantendo os picos base da MCM inerte como a banda larga em 3391 cm^{-1} , bandas entre $3600\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ caracterizam o estiramento da ligação O-H, uma banda em 2913 cm^{-1} (estiramento simétrico do -CH₂- e -CH₃), em 1709 cm^{-1} , associada à vibração da carbonila de cetona e ácido carboxílico (-C=O estiramento), uma banda em 1583 cm^{-1} que pode ser associada a ligações duplas, C=C de aromáticos com faixa $1600\text{-}1475\text{ cm}^{-1}$, em 1389 cm^{-1} dobramento da ligação C-H de metila, em 1205 e 1044 cm^{-1} referente à ligação C-O de álcool e ácido carboxílico com faixa entre 1300 a 100 cm^{-1} .¹ Como cada tipo de ligação tem sua própria frequência natural de vibração, e o espectro de infravermelho pode ser utilizado como método de identificação para as moléculas, (PAVIA, 2010; SILVERSTEIN, 1994), esse resultado nos leva a crer que os espectros da MCM inerte e MCM contendo

fármaco são similares, portanto indica que a HMC está contida no núcleo da microcápsula, foi revestida pelos biopolímeros e não se encontra presente em sua camada mais externa.

Assim como foi descrito por HAIYAN, *et al*, 2018, em seu trabalho com microcápsulas carregadas com óleo de Tung, utilizando resorcinol, óleo de tung e Reax 88A atuando como tensoativo, para o preparo da MC, com a proteção de revestimento de Poly (uréia-folmaldeído)(PUF), que foram formadas pelo método de polimerização *in situ*. O espectro (Figura 34) mostra que os picos característicos das MC são refletidos de forma abrangente em *Shell* (MC com óleo de Tung protegidos com PUF), o que confirma firmemente que o óleo de tung, foi revestido de forma eficiente com PUF.

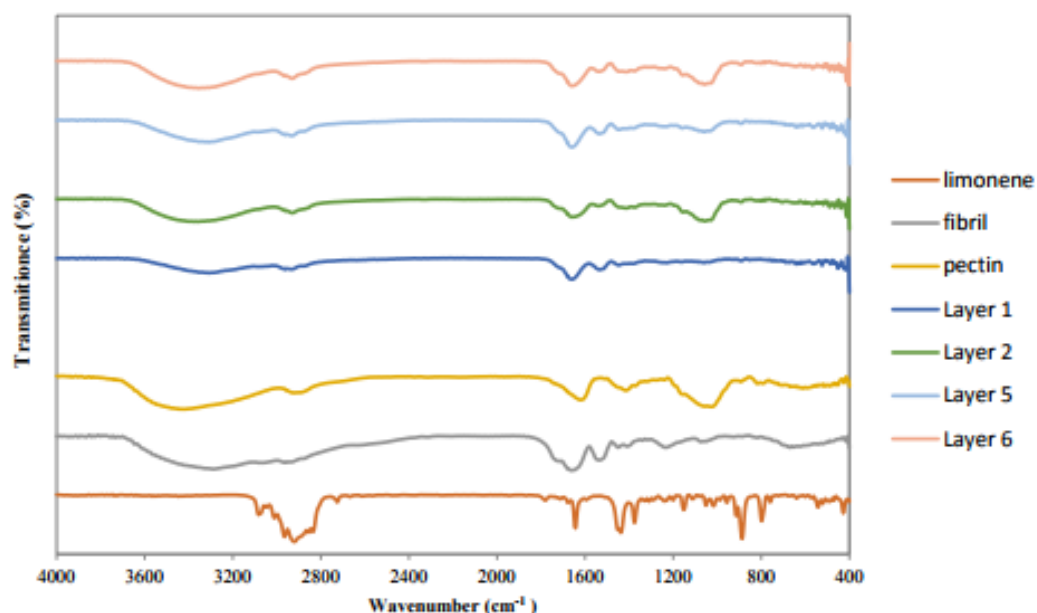
Figura 34. FTIR spectra of microcapsules, PUF shell and tung oil.



Fonte: HAIYAN, *et al*, 2018.

Os resultados de FTIR observados por ANSARIFAR, *et al*. 2017, na formulação de MCM pelo método *LbL*, constituídas de fibrilas isoladas de proteína de soja (SPI) e pectina com auto grau de metoxilação (HMP), utilizadas para revestimento do limoleno, demonstraram estabilidade do limoleno na matriz polimérica, e a não interação do mesmo com as camadas poliméricas, os picos característicos do limoleno não são observados nos espectros das camadas poliméricas de 1, 2, 5 e 6 (Figura 35).

Figura 35. Espectros FTIR de matérias-primas e materiais de encapsulação.



Fonte: ANSARIFAR, *et al.*, 2017.

5.6 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

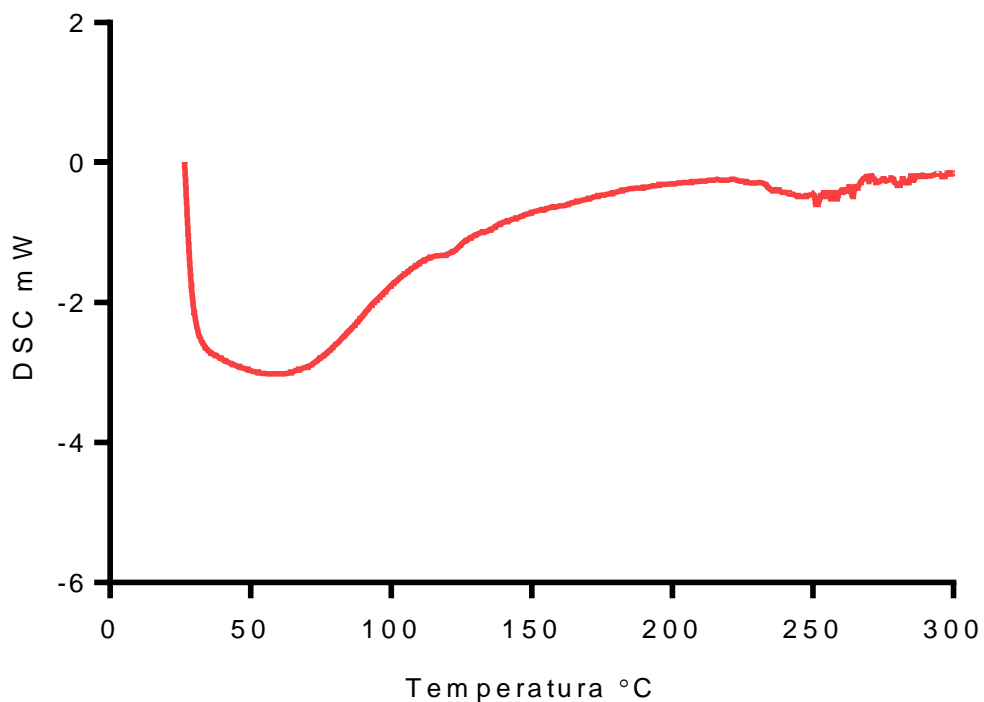
A técnica de DSC determina a quantidade de energia necessária para manter a amostra à mesma temperatura da referência, na qual se acompanha a variação de energia entre a amostra e da referência. Acompanhando a variação na temperatura de uma amostra, havendo liberação de calor o processo é exotérmico, com absorção de calor o processo é endotérmico. Os fenômenos detectados são: transição cristalina, fusão, vaporização, adsorção, transição vítrea, desidratação, decomposição, combustão, polimerização, pureza e estabilidade térmica, entre outros (BARACAT; *et al.* 2004; BERNAL; *et al.* 2002).

A Figura 36 mostra o perfil de decomposição térmica da HMC, a Figura 37 mostra o perfil de MCM, Figura 38 representa o perfil de MCM contendo HMC e a Figura 39 demonstra as curvas sobrepostas de DSC da HMC, MCM inerte e contendo HMC.

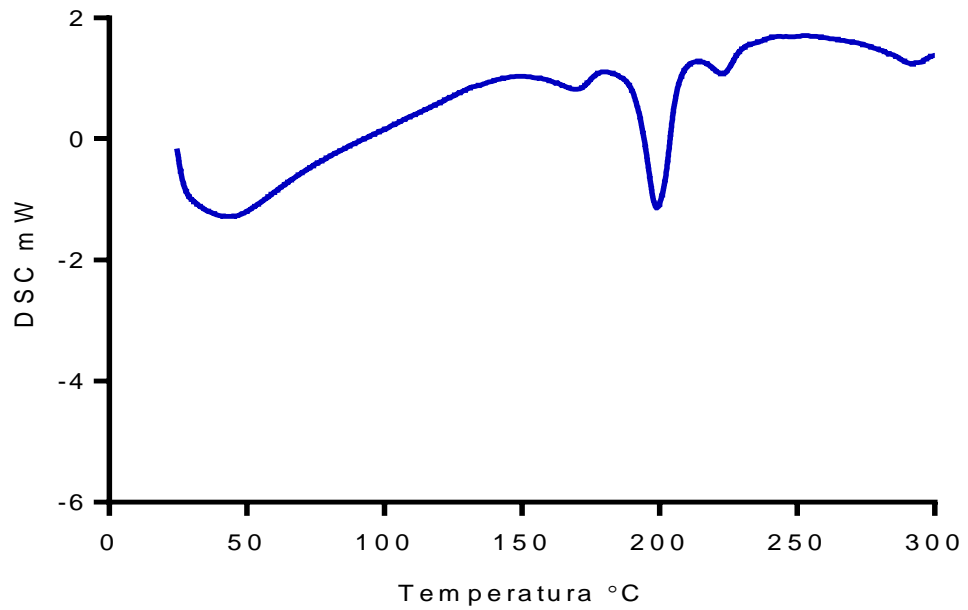
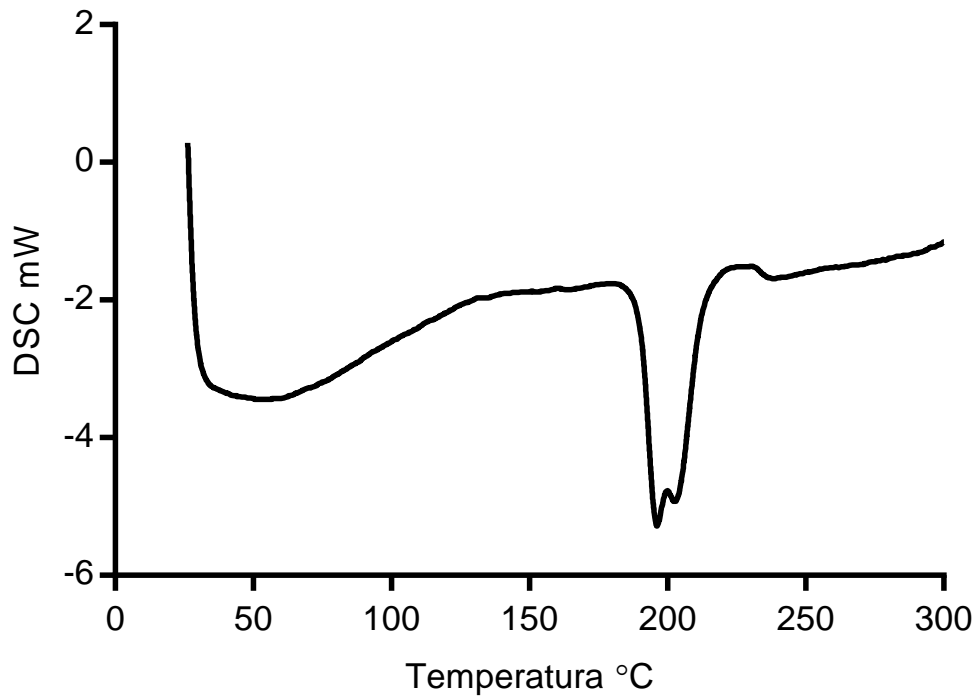
A curva de DSC da HMC (Figura 36) demonstra um pico em 117 °C, segundo WEI (2017) e TSIRIGOTIS-MANIECKA (2017) o pico visualizado próximo a 120 °C refere-se à evaporação de água e/ou presença de impurezas. Observa-se

um pico endotérmico em 247 °C e um pico exotérmico em 266 °C, segundo WEI (2017) se refere à fusão e recristalização da hesperidina respectivamente.

Figura 36. Curva DSC da HMC.



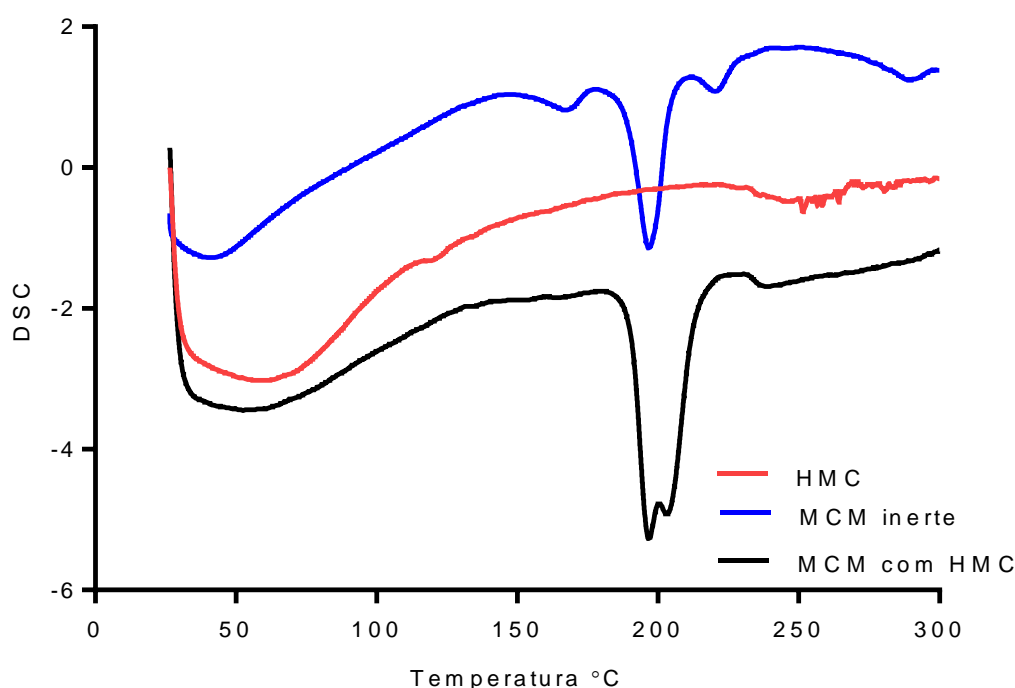
As Figuras 37 e 38 mostram as curvas de DSC da MCM inerte e MCM contendo fármaco respectivamente, a curva de MCM inerte apresenta três estágios de degradação em 165°C, um pico exotérmico mais proeminente em 195 °C, um pico em 216 °C. Na MCM contendo HMC a amostra demonstra dois estágios de degradação, o pico de maior intensidade ocorre em 197 °C, e em 233°C, demonstrando um pequeno deslocamento na temperatura de degradação quando comparada à MCM inerte.

Figura 37. Curva DSC da MCM inerte.**Figura 38.** Curva DSC da MCM contendo HMC.

A Figura 39 demonstra as curvas de DSC sobrepostas da HMC, MCM inerte e MCM contendo fármaco, e observa-se que os picos de degradação da MCM inerte e MCM contendo HMC ocorrem na mesma faixa de temperatura, enquanto os picos

de fusão e de recristalização da HMC não são observados na curva da MCM contendo HMC, esse resultado indica que a HMC está contida no núcleo da microcápsula, foi revestida pelos biopolímeros e não se encontra presente em sua camada mais externa, favorecendo a liberação lenta do fármaco, como observado nos resultados obtidos na liberação *in vitro* (Figura 17).

Figura 39. Curvas de DSC da (---) HMC, (---) MCM inerte e (---) MCM contendo HMC.



Assim como foi avaliado por YUN; *et al.* 2016, no estudo da formação de um complexo de inclusão de hesperidina metil chalcona com Hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD), foi avaliado termogramas DSC de HMC, de HP- β -CD e de seu complexo de inclusão. O termograma DSC do complexo de inclusão tem apenas um amplo pico endotérmico em cerca de 80 °C, característica da HP- β -CD, indicando a formação do complexo de inclusão.

Segundo TSIRIGOTIS-MANIECKA; *et al.* 2017, no estudo no revestimento de hesperidina com microesferas de alginato de sódio, alginato com quitosana e alginato com gelatina, a caracterização térmica foi realizada através da análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC). O termograma da hesperidina mostrou

dois picos endotérmicos a 145 °C e 262 °C, o primeiro pico provavelmente está relacionado à evaporação da água, o segundo pode ser atribuído a sua fusão, o pico exotérmico a 275 °C indica a decomposição de HESP. Os termogramas de AP e ACP revelaram amplos picos endotérmicos em torno de 135 °C e 115 °C respectivamente, devido a fusão de alginato, apresenta picos exotérmicos 305 °C e 280 °C, respectivamente, correlacionados com a degradação dos polímeros utilizados - alginato e quitosana. Os termogramas alginato com quitosana e alginato com gelatina, a 245 °C e 240 °C respectivamente, correspondem provavelmente ao derretimento da HESP. Pode-se observar que as microesferas estudadas, mostraram um tipo similar de padrão de perda de peso durante o experimento.

Diferentemente do que foi observado no DSC da MCM contendo HMC, na qual o pico de fusão da HMC não foi observado, indicando que a Hesperidina metil chalcona foi encapsulada pelo biopolímero (Figura 39).

6 CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que as microcápsulas multicamadas apresentaram melhor eficiência de encapsulação, quando comparada as microcápsulas unicamada.

Observou-se uma menor taxa de liberação de HMC revestida por MCM, no teste de liberação *in vitro*.

Os resultados obtidos de tamanho de partícula demonstraram maior coesão entre os polímeros com o aumento de número de camadas. Observou-se no potencial zeta aumento da estabilidade das MCM inerte com aumento do número de camadas poliméricas.

Por meio do FTIR, observou-se que o espectro da MCM inerte se assemelha ao espectro da MCM contendo HMC, indicando que a HMC está contida no interior da microcápsula, foi revestida pelos biopolímeros e não se encontra presente em suas camadas mais externas.

Com a sobreposição das curvas de DSC observa-se que os picos de fusão da MCM inerte e MCM contendo HMC ocorreram na mesma faixa de temperatura, enquanto os picos de fusão e de recristalização da HMC não são observados na

curva da MCM contendo HMC, esse resultado indica que a HMC está contida no núcleo da microcápsula e foi revestida pelos biopolímeros.

Os resultados obtidos até o momento indicaram a formação de microcápsulas multicamadas contendo HMC, com liberação lenta do fármaco, podendo ser um produto promissor para liberação sítio específico na região colônica, considerando as propriedades do flavonóide escolhido para realização do trabalho.

REFERÊNCIAS

ANSARIFAR, E.; *et al.* Novel Multilayer Microcapsules Based on Soy Protein Isolate Fibrils and High Methoxyl Pectin: Production, Characterization and Release Modeling. **Revista Internacional de Macromoléculas Biológicas**. V. 97, p.761-769, 2017.

ANSELMO, A. C.; *et al.* Layer-by-Layer Encapsulation of Probiotics for Delivery to the Microbiome. **Advanced Materials**. V.28, n. 43, p. 9486-9490, 2016.

ARSHADY, R. Microspheres and microcapsules, a survey of manufacturing techniques. Part II: coacervation. **Polymer Engineering and Science**, London. V. 30, p.905-914, 1990.

AUGUSTIN, M.; HEMAR, Y. Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. **Chemical Society Reviews**, V. 38, p. 902-912, 2009.

BADUI, S. D. **Química de los alimentos**; Ed. 4, cap 12, Editora PEARSON EDUCACIÓN, México, 2006.

BAKAN, J. A. Microencapsulação. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. 1.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, V. 2, p. 707-735, 2001.

BARACAT, M. M.; *et al.* Microcapsule Processing in a Spouted Bed. **Canadian Journal of Chemical Engineering**. V. 82, p. 134-141, 2004.

BARACAT, M. M.; *et al.* Preparation and characterization of microcapsules based on biodegradable polymers: pectin/casein complex for controlled drug release systems. **American Association of Pharmaceutical Scientists**. V. 13, p. 364-372, 2012.

BERNAL, C. *et al.* Influência de alguns parâmetros experimentais nos resultados de análise calorimétricas diferenciais – DSC. **Química Nova**. V. 25, p. 849-855, 2002.

BEZERRA, F. M.; *et al.* Comparação entre microcápsulas formadas por coacervação simples e coacervação complexa aplicada em têxteis. In: Congresso Científico Têxtil e de Moda, n. 2, 2014, São Paulo, **Anais**, CONTEXMOD, São Paulo, p. 77-91, 2014.

BIZERRA, A.; SILVA, V. Sistemas de liberação controlada: Mecanismos e aplicações. **Revista Saúde e Meio Ambiente – RESMA**, Três Lagoas, V. 3, n.2, p. 1-12, 2016.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Manual de laboratório de química de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, p. 63-64, 2003.

BOHM, H.; *et al.* Flavounols, flavones and anthocyanins as natural antioxidants of food and the possible role in prevention of chronic diseases. **Zeitschrift Ernahrungswiss**. V. 37, n 2, 147-163, 1998.

CALEFFI, T. S. L. **Microencapsulação de polpa de amora-preta por coacervação complexa e Spray Drying**, 2014. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba Pr. 2014.

CAMILO, K. F. B. **Complexo pectina/caseína: aspectos básicos e aplicados**. 2007. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

CANTERI, Maria H. G.; *et al.* Pectina: da matéria-prima ao produto final. **Polímeros**. V. 22, n. 2, p. 149-157, 2012.

CLARKE, N.; O'CONNOR, K.; RAMTOOLA, Z. Influence of formulation variables on the morphology of biodegradable microparticles prepared by spray drying. **Drug Development and Industrial Pharmacy**. V. 24, n. 2, 169-174, 1998.

COSTA e SILVA C.T. **“Preparo de formulações tópicas contendo Naningerina e análise da estabilidade físico-química e funcional”**. Universidade Estadual de Londrina, 2014.

DALGLEISH, D. G.; Milk proteins, chemistry and physics In: FOX P.F.; CONDON, J.J.; (Ed) **Food Proteins London, Applied science publisher**, 1982.

DONBROW, M. **Microcapsules and nanoparticles in medicine and pharmacy**. Boca Raton, CRC Press, cap. 1, p. 1-13, 1992.

DORNAS, W. C. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. V. 28, n.3, p. 241- 249, 2007.

FARIA, P. C. **Obtenção e caracterização de membranas assimétricas com pele densa á base de poliacrilonitrila**. 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP. 2011.

FRAEYE, I.; *et al.* Fine-tuning the properties of pectinecalcium gels by control of pectin fine structure, gel composition and environmental conditions. **Trends in Food Science & Technology**. V. 21, n. 5, p. 219-228, 2010.

GIANNINI, I.; *et al.* Flavonoids mixture (diosmin, troxerutin, hesperidin) in the treatment of acute hemorrhoidal disease: a prospective, randomized, triple-blind, controlled trial. **Techniques in Coloproctology**. V. 19, p. 339-345, 2015.

GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing Technologies and trends. **Trends in Food Science & Technology**. V. 15, p. 330-347, 2004.

GUAZELLI, C. F. S. **Efeito terapêutico e mecanismos de ação da Hesperidina metil chalcona, Tran-chalcona e suas formas microencapsuladas em modelo de colite ulcerativa em camundongos**. 2017. Tese (Doutorado em ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

GUAZELLI, C. F. S.; *et al.* Quercetin-loaded microcapsules ameliorate experimental colitis in mice by anti-inflammatory and antioxidant mechanisms. **Journal of Natural Products**. V. 76, n. 2, p. 200-208, 2013.

HAIYAN, L.; *et al.* Fabrication of microcapsules containing dual-functional tung oil and properties suitable for self-healing and self-lubricating coatings. **Organic Coatings**. V.115, p.164-171, 2018.

JOHNSTON, A. P. R. Cápsulas modificadas camada por camada e suas aplicações. **Opinião atual na Colloid & Interface Science**. V. 11, n. 4, p. 203-209, 2006.

JOLIE, R. P.; *et al.* Pectin conversions under high pressure: Implications for the structure-related quality characteristics of plant-based foods. **Trends in Food Science & Technology**, V. 24, n. 2, p. 103-118, 2012.

JURAN, N.; *et al*, Microencapsulation by pectin for multi-components carriers bearing both hydrophobic and hydrophilic active agents. **Carbohydrate Polymers**. V. 182, p.172-179, 2018.

LEE, J. Y.; *et al*. Tailored Layer-by-Layer Deposition of Silica Reinforced Polyelectrolyte Layers on Polymer Microcapsules for Enhanced Antioxidant Cargo Retention. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**. V. 58, p. 80-86, 2018.

LEIMANN, F. V. **Microencapsulação de óleo essencial de capim limão utilizando o processo de coacervação simples**. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

LEOPOLD, C. S. Coated dosage forms for colon-specific drug delivery. **Pharmaceutical Science & Technology Today**. V. 2, n. 5, p. 197-204, 1999.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. V. 41, p. 143-154, 2005.

LUO, Y.; PAN, K.; ZHONG, Q. Casein/pectin nanocomplexes as potential oral delivery vehicles. **International Journal of Pharmaceutics**. V. 486, p. 59-68, 2015.

LYRA, M. A. M.; *et al*. Sistemas Matriciais Hidrofílicos e Mucoadesivos para Liberação Controlada de Fármacos. **Latin American Journal of Pharmacy**. V. 26, p. 784-793, 2007.

MANJU, S.; SREENIVASAN, K. Hollow microcapsules built by layer by layer assembly for the encapsulation and sustained release of curcumin, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. V. 82, p. 588-593, 2011.

MARTINEZ, R. M.; *et al.* Hesperidin methyl chalcone inhibits oxidative stress and inflammation in a mouse model of ultraviolet B irradiation-induced skin damage. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. V. 148, p. 145-153, 2015.

MARTINEZ, R. M.; *et al.* Topical formulation containing hesperidin methyl chalcone inhibits skin oxidative stress and inflammation induced by ultraviolet B irradiation. **Journal Photochemical e Photobiological Sciences**, V.15, p. 554-563, 2016.

MATTÈ, G. M.; ROSA, S. Microencapsulación con microesferas de quitosano. **Revista Iberoamericana de Polímeros**. V. 14, n.5, p. 206-218, 2013.

MENDANHA, D. V.; *et al.* Microencapsulation of casein hydrolysate by complex coacervation with SPI/ pectin. **Food Research International**. V. 42, p. 1099-1104, 2009.

MÜLLER, P. S. **Microencapsulação do óleo de laranja**. 2011. Dissertação (Mestrado em tecnologia de Alimentos) - Tecnologia de Alimentos do Setor de Tecnologia - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Pr. 2011.

OLIVEIRA, A.G.; *et al.* Micro e nanocapsulas. Um eficiente sistema com dimensões reduzidas para liberação controlada e direcionamento de fármacos. **Revista de ciências farmaceuticas**. São Paulo. V. 14, p. 301-313, 1992.

PADARATZ, P. **Síntese e avaliação do potencial biológico de chalconas e substâncias relacionadas**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade do Vale do Itajaí, Santa Catarina, Vale do Itajaí, 2009.

PAVIA, D. L.; *et al.* **Introdução à espectroscopia**. Tradução da 4. ed. Norte-americana. São Paulo: Cengage Learning, p.15-83, 2010.

PEZZINI, B. R.; SILVA, M. A. S.; FERRAZ, H. G. Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. V. 43, p. 491-502, 2007.

PINHO-RIBEIRO, F. A.; *et al.* Protective effects of the flavonoid hesperidin methyl chalcone in inflammation and pain in mice: Role of TRPV1, oxidative stress, cytokines and NF-KappaB. **Chemico-Biological interactions**. V. 228, p. 88-99, 2015.

PRATA, A. S. **Estudo dos parâmetros físico-químicos envolvidos na formação de microcápsulas produzidas por coacervação complexa**. 2006. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas, Campinas SP. 2006.

RALET, M. C.; LEROUGE, P.; QUÉMÉNER, B. Mass spectrometry for pectin structure analysis. **Carbohydrate Research**. V. 344, p. 1798-1807, 2009.

REYNA, E. N.; *et al.* Microencapsulación de componentes bioactivos Microencapsulation of bioactive compounds. **Investigación y Ciencia DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE AGUASCALIENTES**. V. 66, p. 64-70, 2015.

ROUND, A. N.; *et al.* A new view of pectin structure revealed by acid hydrolysis and atomic force microscopy. **Carbohydrate Research**, V. 345, p. 487-497, 2010.

RUIZ-MIYAZAWA, K.; *et al.* Vinpocetine reduces lipopolysaccharide-induced inflammatory pain and neutrophil recruitment in mice by targeting oxidative stress, cytokines and NF-κB. **Chemico- Biological Interactions**. V. 237, p. 9-17, 2015.

SATO, K.; *et al.* pH- and sugar-sensitive layer-by-layer films and microcapsules for drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**. V. 63, n. 9, p. 809-821, 2011.

SCHAFFAZICK, S. R.; et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**. V. 5, p. 726-37, 2003.

SILVA, T. M. *et al.* Coacervação complexa: uma técnica para a encapsulação de probióticos. **Ciência e Natura**, Santa Maria, V.37, p. 49-55, 2015.

SILVERSTEIN, R. M. **Identificação Espectrométrica de compostos orgânicos**. Tradução 5 ed. Norte-americana. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, p. 85-119, 1994.

TSIRIGOTIS-MANIECKA, M.; *et al.* Microencapsulation of hesperidin in polyelectrolyte complex microbeads: Physico-chemical evaluation and release behavior. **Journal of Food Engineering**. V. 214, p. 104-116, 2017.

WEI, Q. Keck, C. M. Müller R. H. Oral hesperidin – amorphization & improved dissolution properties by controlled loading onto porous silica. **International Journal of Pharmaceutics**. V. 518, p. 253-263, 2017.

WILLATS, W. G. T.; KNOX, P.; MIKKELSEN, J. D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in Food Science & Technology**. V. 17, p. 97-104, 2006.

YAPO, B. M. Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins – A new hypothetical model. **Carbohydrate Polymers**. V. 86, p. 373-385, 2011.

YAPO, B. M. Pectin quantity, composition and physicochemical behaviour as influenced by the purification process. **Food Research International**. V. 42, n. 8, p. 1197-1202, 2009.

YUN, L.; et al. Structural Characterization of Inclusion Complex of Hesperidin Methyl Chalcone and Hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **Journal of The Chemical Society Of Pakistan**, V. 38, p. 1098-1103, 2016.

ZHANG, Y.; *et al.* Polysaccharide-based polyelectrolytes hollow microcapsules constructed by layer-by-layer technique. **Polímeros de carboidratos**. V. 96, n. 2, p. 528-535, 2013.

ALLAERT, F. A.; *et al.* Correlation between improvement in functional signs and plethysmographic parameters during venoactive treatment (Cyclo 3 Fort). **International Angiology**. V. 30, p. 272-277, 2011.

SILVA, L. M. **Determinação da estabilidade de óleos e de compostos com atividade anti-aterosclerótica do azeite durante o processamento de alimentos**, 2008. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade do Porto, Porto, 2008.