

Preparação e caracterização de nanocápsulas contendo 2-nitrato-1,3-diisobutoxipropano (NDIBP) e complexos de inclusão NDIBP/ciclodextrina

 <https://doi.org/10.56238/sevned2024.007-054>

Ray Ravilly Alves Arruda

Me. Biologia Celular e Molecular, UFPB
E-mail: rayravilly@ltf.ufpb.br

Ulrich Vasconcelos

Dr. Engenharia de Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, UFRJ
E-mail: u.vasconcelos@cbiotec.ufpb.br

Rafael de Almeida Travassos

Dr. Produtos Naturais, Sintéticos Bioativos, UFPB
E-mail: rafaeltravassos@cbiotec.ufpb.br

Tarcísio Tarcio Corrêa Bonifácio

Me. Biologia Celular e Molecular, UFPB
E-mail: tarcisio.bonifacio@gmail.com

Valdir de Andrade Braga

Dr. Fisiologia, USP
E-mail: valdir@cbiotec.ufpb.br

Elisângela Afonso de Moura Kretzschmar

Dr^a Ciências Biológicas, UFPE
E-mail: elisdoc@cbiotec.ufpb.br

RESUMO

O 2-nitrato-1,3-di-isobutoxipropano (NDIBP), é um nitrato orgânico sintético derivado da glicerina, com baixa solubilidade em água. O objetivo deste trabalho foi preparar e caracterizar complexos de inclusão e nanocápsulas com NDIBP. Os complexos de inclusão foram preparados por liofilização e as nanocápsulas pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado. As isotermas de solubilidade determinadas para o NDIBP mostraram perfis do tipo A1 ($K_1:1 = 33,0 M^{-1}$). A formação do complexo de inclusão proporcionou um aumento de 12,5 vezes a solubilidade do NDIBP. Os complexos de inclusão apresentaram alterações na estrutura cristalina e estabilidade em até 150 dias à 4°C. As nanocápsulas mediram diâmetros entre 100 e 300 nm, e exibiram índice de polidispersão abaixo de 0,2, e potencial zeta < -30 mV. Além disso, os nanossistemas estudados apresentaram atividade fungicida e vasorrelaxante da artéria mesentérica, mostrando assim que as estratégias nanotecnológicas empregadas se mostram promissoras no incremento de características desejáveis ao NDIBP.

Palavras-chave: Nanossistemas, Nitratos orgânicos, Atividade fungicida, Atividade vasorrelaxante em artéria mesentérica.

1 INTRODUÇÃO

As ciências farmacêuticas encorajam pesquisas que promovem o controle da liberação de fármacos em um sítio específico onde deseja-se a ação da molécula, para isso podem ser empregados vetores como micropartículas e sistemas coloidais como lipossomas e nanopartículas. Atualmente, os nanocarreadores tornaram-se especialmente atrativos em sistemas de liberação controlada de fármacos convencionais, além do carregamento de moléculas terapêuticas como proteínas, peptídeos e ácidos nucleicos (Ramsden, 2018; Sousa *et al.*, 2019).

As nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos com diâmetro inferior a 1 μm e este termo se aplica aos nanossistemas constituídos por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco, estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica (Gnach *et al.*, 2015; Rao; Geckeler, 2011). A utilização dessas nanoestruturas apresenta algumas vantagens, como a proteção da molécula encapsulada contra degradação no organismo, melhor absorção tecidual da droga, bem como alterações em sua farmacocinética (Güven, 2021; Vieira; Gamarra, 2016;).

Alguns compostos terapêuticos possuem limitações em sua utilização por conta da insolubilidade em água e baixa biodisponibilidade, estimulando o desenvolvimento de novos sistemas carreadores de drogas, aos quais ciclodextrinas ganham destaque (Matioli, 2000). As ciclodextrinas formam complexos de inclusão com fármacos, podendo influenciar em sua estabilidade, resultando em na redução, aumento ou inalteração da degradação de fármacos (Popielec; Loftsson, 2017).

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos formados por moléculas de D-glicose unidas por meio de ligações glicosídicas, obtidas a partir da degradação enzimática do amido de várias espécies vegetais (Loftsson; Masson, 2001; Marques, 2010). As CDs apresentam-se na forma de cones, com o lado mais largo formado pelas hidroxilas secundárias em C2 e C3 e a face mais estreita constituída pelas hidroxilas primárias ligadas em C6. Os átomos de oxigênio envolvidos nas ligações glicosídicas (em C1 e C4) e os átomos de hidrogênio ligados em C3 e C5 determinam o caráter hidrofóbico do interior da cavidade, enquanto a presença de hidroxilas livres na parte externa confere um caráter hidrofílico às ciclodextrinas (Britto *et al.*, 2004).

Contudo, o aumento da solubilidade, bem como a redução da toxicidade das CDs podem ser melhoradas a partir de modificações químicas, como por exemplo, 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) (Gould; Scott, 2005; Veiga *et al.*, 2006). A HP- β -CD formam complexos relativamente não específicos com uma grande variedade de substratos e por isso, vem sendo utilizada como protótipo para investigação de interações não covalentes envolvendo diferentes compostos (Saenger *et al.*, 1998; Van de Manacker *et al.*, 2009; Yergey *et al.*, 2017).

O NDIBP (2-nitrato-1,3-di-isobutoxiopropano; $\text{C}_{11}\text{H}_{23}\text{NO}_5$, massa molar = 249,3) é um nitrato orgânico sintético, de baixa solubilidade em água, cujo mecanismo consiste na liberação de óxido

nítrico (NO) promovendo assim, o relaxamento do endotélio (MAEDA et al, 2004). Em complemento, é observada ação antifúngica nos nitratos orgânicos, por inibição da síntese do colesterol encontrado na membrana (Phillips, 2005). O trinitrato de glicerina (TNG) é precursor do NDIBP, assim como de outros nitratos orgânicos, como por exemplo, o 2-nitrato-1,3-dimetoxipropano (NDMP), 2-nitrato-1,3-dietoxipropano (NDEP) e o 2-nitrato-1,3-dipropoxipropano (NDPP), todos esses nitratos possuem atividade vasorrelaxante em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato, induzidos pela liberação de NO (França-Silva *et al.*, 2012).

Baseado nisso, este trabalho teve por objetivo, preparar e caracterizar nanocápsulas (NC) contendo NDIBP e complexos de inclusão NDIBP-2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina (NDIBP/HP- β -CD), visando o incremento de características ao composto complexado, como uma forma de liberação controlada e o aumento de sua solubilidade em água.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO NDIBP/HP-B-CD

Os complexos de inclusão foram preparados pelo método de liofilização *Freeze-Drying*, que consiste na completa solubilização da HP- β -CD em água destilada e posterior adição da molécula NDIBP. A amostra permaneceu sob agitação magnética à temperatura ambiente por 48h. Em seguida foi armazenada à -80 °C e liofilizada por aproximadamente 72h. Os complexos foram obtidos utilizando concentrações equimolares (1:1) da molécula e da HP- β -CD.

2.2 ESTUDO DE SOLUBILIDADE

O estudo de solubilidade de fases foi realizado de acordo com o método de Higuchi e Connors (1965). Um excesso de NDIBP foi adicionado a uma série de microtubos contendo água destilada e concentrações crescentes de HP- β -CD. As suspensões foram mantidas sob agitação por 72h à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram diluídas e a quantidade de NDIBP foi determinada por leitura espectrofotométrica em comprimento de onda de 240 nm.

2.3 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO

Foram realizados os seguintes ensaios: microscopia eletrônica de varredura – SEM (JEOL J-210), das amostras metalizadas com ouro coloidal por 30 segundos; difração de raios-X (Bruker, D8 Advance), com detector LYNXEYE e ótica TWIN-TWIN. Os dados foram coletados no intervalo angular entre 10 e 70° 2 θ , com velocidade angular de 0,2 segundos, tamanho do passo de 0,02° 2 θ , condições de voltagem equivalentes à 40 kW e corrente do tubo de 40 μ A; espectroscopia de infravermelho (BOMEM), na faixa espectral de 4000-400cm⁻¹ com 32 scans/min e resolução de 4 cm⁻¹.

2.4 PREPARO DAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO NDIBP

A preparação das Nanocápsulas (NC) foi realizada segundo o método de deposição interfacial do polímero pré-formado, descrito inicialmente por Fessi et al. (1989). Este método envolve a mistura de uma fase orgânica em uma fase aquosa. A fase orgânica constituiu-se do polímero, solvente orgânico (acetona), monoestearato de sorbitano, óleo e NDIBP. A fase aquosa foi composta de polissorbato 80 e de água deionizada. A suspensão resultante foi mantida sob agitação por 10 minutos e em seguida o solvente orgânico foi eliminado e a suspensão foi concentrada até o volume final de 10 mL, com o auxílio de um evaporador rotativo.

2.4.1 Teste de Estabilidade a Longo Prazo

O teste teve como objetivo estabelecer a durabilidade das NC preparadas. Nestes testes foram avaliadas as condições das NC logo após a fabricação e a intervalos de tempos regulares (0, 7, 15 e 30 dias) ou até a manutenção da estabilidade sempre a temperatura de 4°C.

2.4.2 Aspectos Macroscópicos

Foi observado se ocorreu o surgimento de alterações no aspecto geral das preparações: homogeneidade, cor, viscosidade, deposição de materiais, formação de grumos, cremagem, floculação, coalescência e separação de fases.

2.4.3 Aspectos Microscópicos

Foi observado se ocorreu o surgimento de alterações no aspecto microscópico das NC como formação de grumos decorrente da degradação do polímero.

2.5 VARIAÇÕES DE PH

As formulações foram analisadas por um potenciômetro digital contendo eletrodo de vidro e um sensor de temperatura, os testes foram feitos a 20°C. Uma alíquota da formulação será colocada em um béquer, o eletrodo e a sonda foram colocados em contato com a amostra do béquer e foi realizada a leitura do pH.

2.6 POTENCIAL ZETA

O valor de potencial zeta, dado em mV foi determinado através de um analisador de potencial zeta, Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern). As análises foram realizadas diluindo-se as suspensões de NC em água (Milli-Q) 100 vezes e os resultados foram expressos como médias de três determinações.

2.7 EFICIÊNCIA DE ASSOCIAÇÃO DE NDIBP NAS NC POLIMÉRICAS

A quantidade de NDIBP encapsulada foi determinada diluindo-se a suspensão em metanol. O resultado da suspensão diluída foi analisado em espectrofotômetro, a um comprimento de onda de 240 nm e o controle negativo utilizado pra zerar o equipamento é metanol.

2.7.1 Bioensaios

2.7.1.1 Atividade antifúngica

A atividade antimicrobiana da NC foi testada com *Candida albicans* ATCC 60193 pelo método da microdiluição. Em placas de 24 poços, dispostos em 4 colunas (1 a 4) e 6 linhas (A a F). Na linha A foi inserido a NC contendo NDIBP, em concentrações que variaram de 3,5 mg/mL (coluna 1) a 0,43 mg/mL (coluna 4). As linhas B, C e D (24, 48 e 72 horas, respectivamente) foram destinadas para avaliação do crescimento da levedura, onde a cada 24 horas foi inoculado 10 µL dos poços da linha A nos poços da linha B e posteriormente C e D. Na linha E, estavam os controles positivos, localizado nas colunas 1 e 2 e o controles negativos localizados nas colunas 3 e 4. Na linha F, colunas 1 e 2 estavam os controles de cor e nas colunas 3 e 4 os controles de veiculação do candidato a fármaco.

Em todos os poços foram inseridos 500 µL de caldo Sabouraud e 500 µL de uma solução contendo as leveduras, diluídas em solução isotônica, na concentração de $4,5 \times 10^7$ de células/mL. Na linha A coluna 1, foi inserido 1 ml de NC contendo NDIBP e diluições seriadas foram feitas da coluna 1 a 4, para obter-se a concentração desejada. No controle positivo foi inserido caldo Sabouraud e a solução contendo leveduras. No controle negativo foi inserido caldo Sabouraud, e uma solução contendo as leveduras e a nistatina 7,4 UI/mL, antibiótico de referência utilizado no tratamento da *Candida albicans* (Nenoff *et al.*, 2016). O controle de cor possuía caldo Sabouraud e 10 µL de nanocápsula, já no controle de veículo foi inserido caldo Sabouraud e nanocápsula sem o fármaco. A leitura do crescimento da levedura foi realizada de forma visual.

2.8 VASORELAXAMENTO EM ARTÉRIA MESENTÉRICA INDUZIDO PELO COMPLEXO DE INCLUSÃO NDIBP/HP-B-CD E NC CONTENDO NDIBP

Foram utilizados ratos Wistar Kyoto com peso entre 250 e 300g provenientes do Biotério Prof. George Thomas (CEUA-UFPB processo n. 305/2009). Os animais foram mantidos sob temperatura controlada ($21 \pm 1^\circ$ C) e ciclo claro-escuro de 12:12 h (6-18 h), tendo livre acesso à água e ração (Labina®, Purina).

O NDIBP foi obtido através da síntese orgânica e gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Petrônio Athayde Filho. A molécula foi solubilizada em Cremophor® e água destilada (1:1). O complexo de inclusão NDIBP/HP-β-CD foi solubilizado da mesma forma. O experimento também avaliou a ação

das NC contendo NDIBP e NC sem fármaco, seguindo essa mesma metodologia, sem diluição em Cremophor®.

Foram utilizadas as seguintes drogas: cloridrato de acetilcolina (ACh); cloridrato de L (-) fenilefrina (FEN); Cremophor®, obtidas da Sigma-Aldrich® (EUA). A solução nutritiva utilizada foi Tyrode, aerada com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂), com temperatura mantida em 37°C, e pH ≈ 7,4. Na preparação desta solução foram utilizados os seguintes sais: KCl, NaCl, MgCl₂.6H₂O, glicose, bicarbonato de sódio, NaH₂PO₄.H₂O e CaCl₂.2H₂O.

Após eutanásia dos animais, fez-se uma incisão no abdome para a identificação e remoção da artéria mesentérica cranial, imediatamente transferida para a solução de Tyrode. Em seguida a artéria foi dissecada e seccionada em anéis de 2-5 mm de comprimento. Alguns dos anéis já dissecados, livres de tecido conectivo e adiposo, tiveram o endotélio removido por atrito mecânico entre as paredes internas do vaso e uma haste de metal. Cada anel foi imerso em cubas contendo 10 mL de solução de Tyrode, a 37°C e gaseificada com uma mistura carbogênica (95 % de O₂ e 5 % de CO₂) para manter o pH constante em 7,4. Os anéis foram suspensos por linhas de algodão fixadas a um transdutor de força (DATAQ®, 2008, Insight, Brasil) acoplado a um sistema de aquisição de dados PowerLab™ (software versão 4.2, ADInstruments, MA, EUA), para que os registros das tensões isométricas fossem obtidos. Cada um dos anéis foi submetido à tensão basal de 0,75 g por um período de estabilização de 60 minutos. Durante este tempo, a solução de Tyrode foi trocada a cada 15 minutos prevenindo a interferência de metabólitos e a linha de base foi ajustada quando necessário. Mudanças na tensão isométrica foram captadas pelo sistema de aquisição LabChart Pro® (ADInstruments, Austrália).

2.9 VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE ENDOTÉLIO FUNCIONAL

Foi verificada a presença de endotélio funcional através do relaxamento dos anéis pré-contraídos com 10 mM fenilefrina (FEN, 10 M) com posterior adição de 10 mM de acetilcolina (ACh 10 M). Os anéis que obtiveram relaxamento superior a 80% sobre a pré-contração com FEN foram considerados com endotélio funcional (E+). Já os anéis com relaxamento inferior a 10% foram considerados sem endotélio funcional (E-). Para esse estudo foram utilizados anéis sem endotélio funcional.

2.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE VASORRELAXANTE DO NDIBP E DO COMPLEXO DE INCLUSÃO NDIBP/HP-B-CD E NC CONTENDO NDIBP SOBRE TECIDO VASCULAR

O protocolo de avaliação da atividade vasorrelaxante induzida pelo complexo de inclusão NDIBP/HP-β-CD e NC contendo NDIBP foi realizado de acordo com Daiber *et al.* (2004). Após o período de estabilização, foi induzida uma contração com FEN (10 M) e concentrações crescentes do complexo (10⁻⁸, 3 x 10⁻⁸, 10⁻⁷, 3 x 10⁻⁷, 10⁻⁶, 3 x 10⁻⁶, 10⁻⁵, 3 x 10⁻⁵ e 10⁻⁴ M) foram aplicadas de maneira

cumulativa para a obtenção de uma curva concentração-resposta. A atividade vasorrelaxante do NDIBP foi avaliada de acordo com o mesmo protocolo. O relaxamento foi expresso como percentagem reversa da contração induzida pela FEN. Após a obtenção das curvas concentração-resposta, foram calculados os valores de pD_2 ($-\log$ da CE_{50}) e $E_{m\acute{a}x}$ (efeito máximo) das curvas individuais. O relaxamento induzido pelo NDIBP em anéis de artéria mesentérica foi comparado com o relaxamento dos anéis induzido pelo complexo de inclusão NDIBP/HP- β -CD e pela NC contendo o NDIBP.

2.10.1 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm EPM (erro padrão da média). Foram aplicados o ANOVA Two-way e o Teste t student para a análise estatística e as diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$. O relaxamento foi expresso como percentagem reversa da contração induzida pela FEN e as curvas foram obtidas por regressão não-linear, por meio da qual obteve-se o pD_2 . O programa estatístico utilizado foi o GraphPad Prism versão 6.00[®].

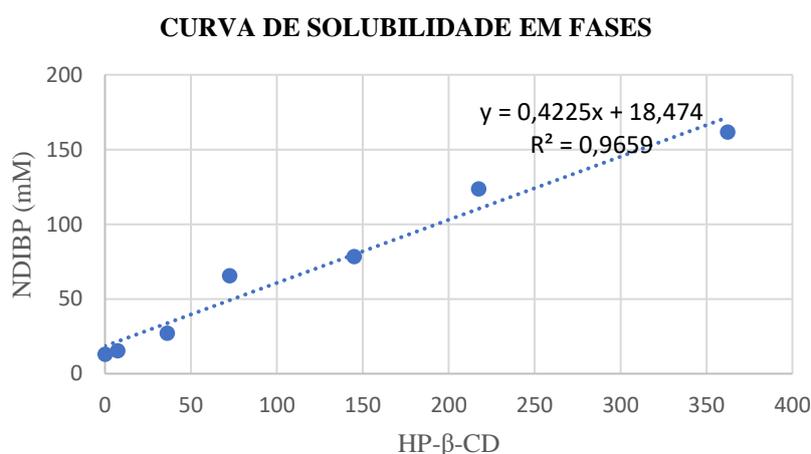
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO

3.1.1 Diagrama de Solubilidade em Fases

O diagrama de solubilidade em fases do NDIBP em HP- β -CD em solução aquosa se comportou como uma curva do tipo AL (Figura 1), por ter apresentado um crescimento linear na solubilidade do NDIBP em função das concentrações crescentes de HP- β -CD. Baseado no diagrama obtido, foi calculada a constante de estabilidade (KC) do complexo NDIBP/ HP- β -CD.

Figura 1 - Estudo do diagrama de solubilidade em fases.



Fonte: Autor

O interesse da KC é caracterizar a interação molecular existente entre os constituintes do complexo e sua viabilidade prática (Aguiar *et al.*, 2014; VEIGA, 2006). A KC do sistema NDIBP/HP-

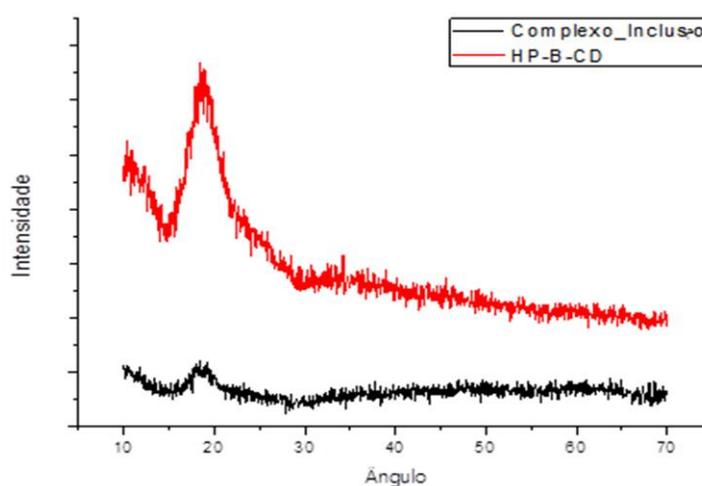
β -CD foi de 33,0 M⁻¹, esse resultado está de acordo com outros complexos de inclusão obtidos. Melo *et al.* (2007), preparando um complexo de inclusão nitrofurazona/HP- β -CD, determinaram a constante de estabilidade de 14,9 M⁻¹, por outro lado, Messner *et al.* (2011) determinaram a constante de estabilidade do complexo hidrocortisona/ HP- β -CD como sendo 1450,0 M⁻¹, indicando assim que a força de interação que irá ocorrer entra a molécula hóspede e a HP- β -CD é específica, gerando complexos de maior ou menor estabilidade. Complexos com baixos valores Kc (inferiores a 200 M⁻¹) conduzem a uma liberação mais rápida do princípio ativo, isso se dá pela menor afinidade existente entre a molécula hóspede e a HP- β -CD, já complexos de inclusão que apresentam uma elevada Kc (acima de 5000 M⁻¹) apresentam um retardo na liberação do princípio ativo, dado pela alta afinidade que ocorre entre a molécula hóspede e a HP- β -CD.

Os resultados referentes ao diagrama de solubilidade em fases demonstraram que existe interação entre o NDIBP e a HP- β -CD, através da utilização da técnica de complexação foi possível aumentar a solubilidade em água do candidato a fármaco (NDIBP) 12,5 vezes.

3.1.2 Difração de Raios-X

A partir da análise dos padrões de difração, pode-se observar que a HP- β -CD possui estrutura amorfa, ou não cristalina, como já descrito anteriormente na literatura (SPAMER *et al.*, 2002). A análise de Raios-X da amostra do complexo, nos revelam que o complexo NDIBP/HP- β -CD apresenta uma curva diferente da apresentada pela HP- β -CD livre (Figura 2). Essas diferenças nos padrões de difração podem ser decorrentes da formação do complexo de inclusão, que geram alterações na estrutura do HP- β -CD e isso leva a mudança do padrão da difração de raios-X. Esses resultados estão de acordo com outros relatados na literatura, nos quais se utiliza a HP- β -CD como hospedeira no complexo de inclusão, o mesmo padrão da matriz pura é observado no complexo (Liu *et al.*, 2006; Zingone; Rubessa, 2005). Além disso, a HP- β -CD apresentou um padrão de difração amorfo, sem a presença de picos cristalinos, onde pode-se observar dois halos de difração amplos em torno de 10 e 20°, que são característicos dessas ciclodextrinas (Huang *et al.*, 2016; Qiu *et al.*, 2014).

Figura 2 - Difração de Raios-X, Intensidade do complexo de inclusão e intensidade da molécula de HP- β -CD.



Fonte: Autor

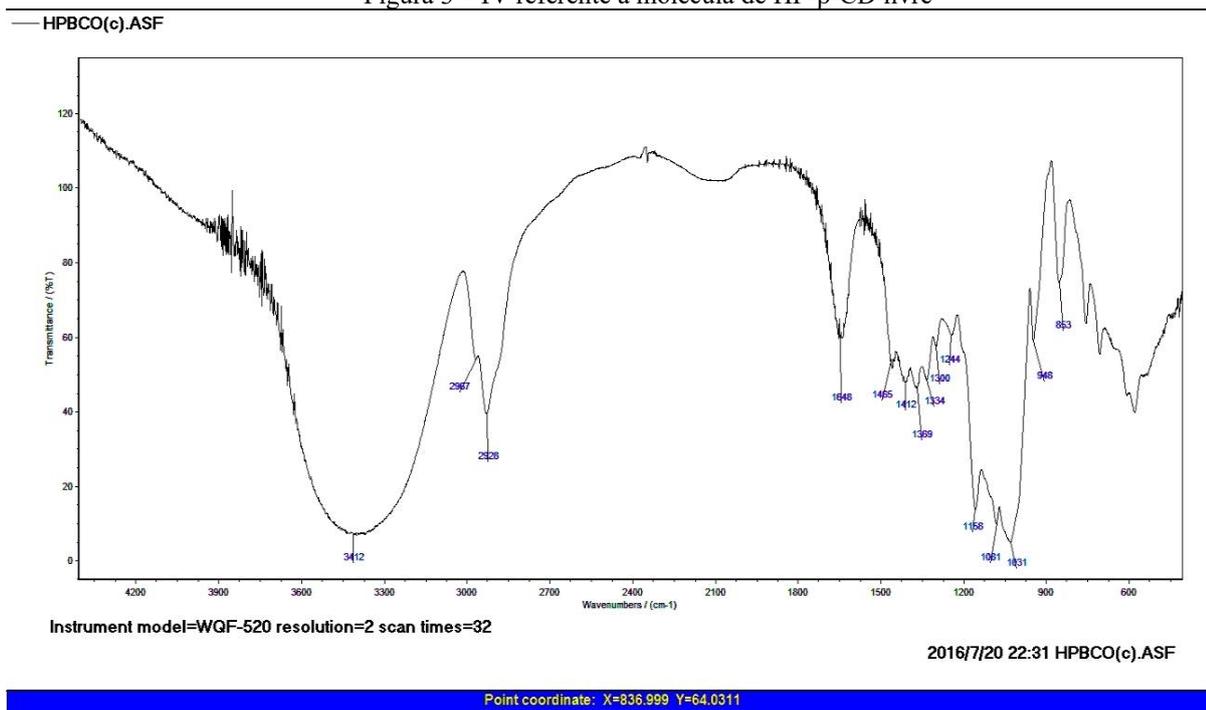
3.1.3 Espectroscopia de Infravermelho

A HP- β -CD na sua forma livre e o complexo de inclusão NDIBP: HP- β -CD (na proporção de 1:1) foram submetidos a espectroscopia na região do infravermelho afim de se observar mudanças em virtude da interação NDIBP/HP- β -CD. A Figura contendo os resultados da espectroscopia apresenta as principais frequências de vibração do HP- β -CD e do complexo de inclusão.

Nas Figuras 3 e 4 é possível observar que o espectro da HP- β -CD revela absorções típicas da β -ciclodextrina (EGYED, 1990), a banda em 1155 cm^{-1} é atribuída à vibração do anel da piranose e ao estiramento assimétrico das ligações glicosídicas, este assinalamento também é observado para a maioria dos sacarídeos, em 3410 cm^{-1} ainda pode-se observar o estiramento referente ao grupo OH (Egyed, 1990).

Nota-se uma diminuição na intensidade da banda na região de 3000 a 3500 cm^{-1} da HP- β -CD livre em comparação ao complexo de inclusão, esse fato pode ser explicado pela quebra de ligações de hidrogênio após a interação da molécula em questão com o NDIBP, em consequência da liberação da água de inclusão. Estas moléculas de água ocupam normalmente a cavidade e são deslocadas quando algum composto menos polar se aproxima da cavidade. Além disso, os picos da HP- β -CD livre, assemelham-se aos do complexo NDIBP/HP- β -CD, o que denota um provável encapsulamento (Chaves et al, 2010). Além disso, os espectros referentes a HP- β -CD livre e o CI apresentaram ausência, deslocamento ou mudanças na intensidade de determinadas bandas de absorção, sugerindo a complexação do NDIBP pela CD (Garrido *et al.*, 2018; Pan *et al.*, 2017).

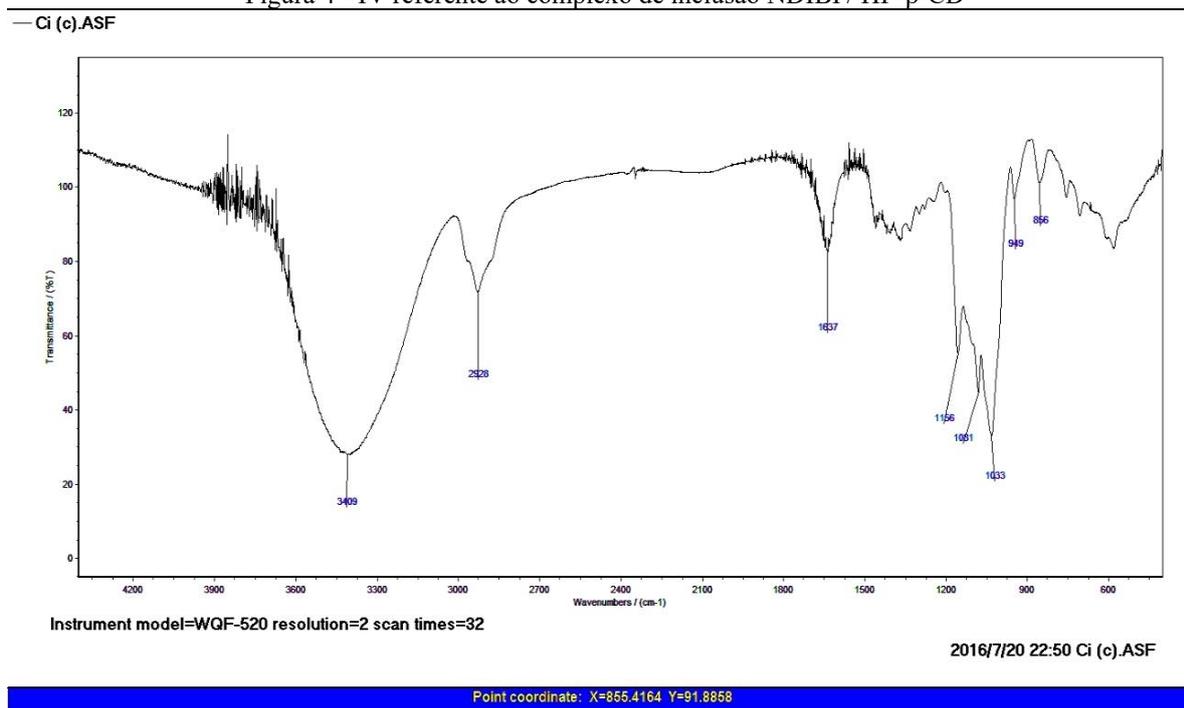
Figura 3 – IV referente a molécula de HP- β -CD livre



Fonte:

fonte: Autor

Figura 4 - IV referente ao complexo de inclusão NDIBP/ HP- β -CD



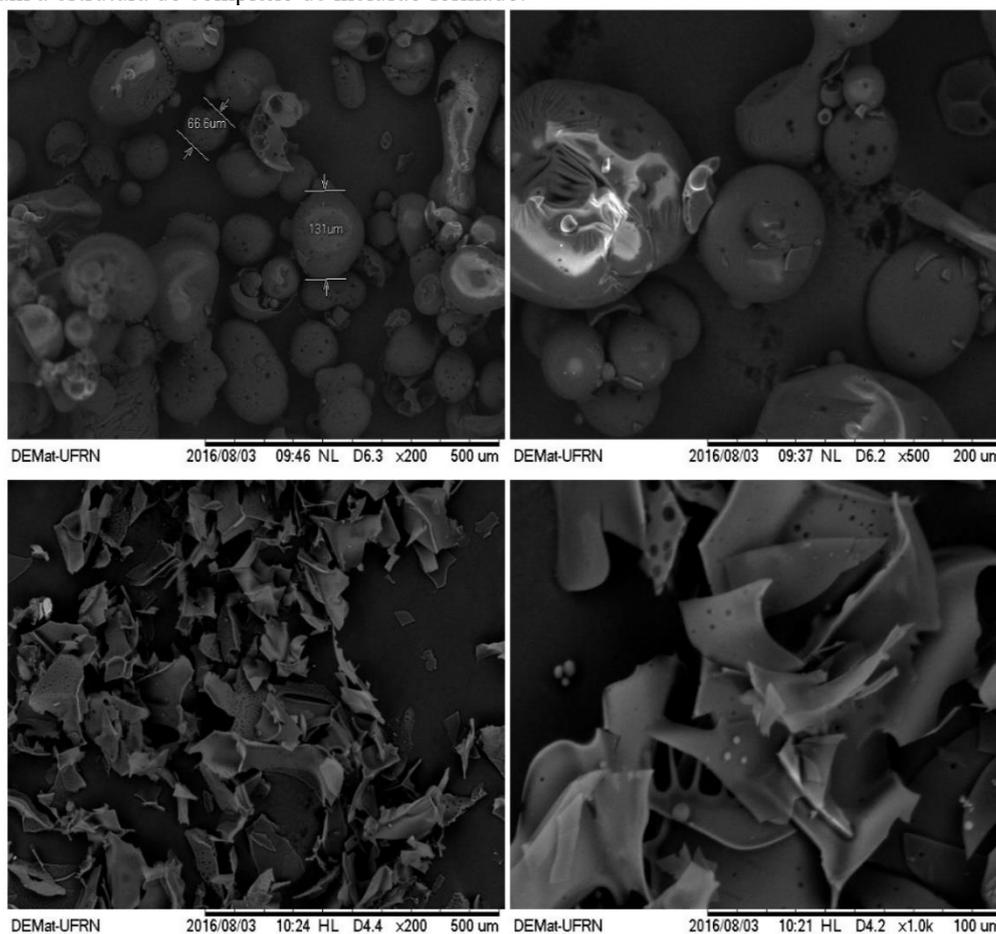
Fonte: Autor

3.1.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

O MEV é uma ferramenta que pode ser usado para observar interação entre moléculas, desde que a mudança na sua estrutura possa ser observada, alterações drásticas no formato, aspecto e tamanho das partículas, são fortes indicadores da complexação de substâncias em CDs (Lyra *et al.*, 2010; Qiu *et al.*, 2014). As análises por MEV facilitaram a observação dos cristais da amostra de HP- β -CD e do

complexo de inclusão entre o NDIBP: HP- β -CD. Na Figura 5, podemos observar alterações na estrutura da HP- β -CD quando comparada ao complexo de inclusão. Esta alteração indica que a interação que ocorre entre o NDIBP e a HP- β -CD gera a mudança da estrutura cristalina da HP- β -CD, possivelmente devido a formação do complexo de inclusão (Moraes *et al.*, 2007). Diversos autores relataram que essas mudanças morfológicas que ocorrem são indicativos da formação dos complexos de inclusão, principalmente devido a interação entre o composto em estudo e a HP- β -CD (Wei *et al.*, 2017; Yao *et al.*, 2014).

Figura 5 – Microscopia eletrônica de varredura. Imagens A e B representam a estrutura da HP- β -CD livre, já as imagens C e D representam a estrutura do complexo de inclusão formado.



Fonte: Autor

3.1.5 Caracterização das Nanocápsulas

3.1.5.1 Tamanho de Partícula, Índice de Polidispersão, Potencial Zeta e pH

Inicialmente foram preparadas NC contendo o candidato a fármaco NDIBP e NC que foram preparadas sem o incremento do NDIBP. Parâmetros como o tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e o pH das partículas, podem indicar a estabilidade da NC formulada em suspensão. A Tabela 1 lista os valores medidos desses parâmetros para as NC preparadas contendo ou não o NDIBP.

Tabela 1 - Valores de tamanho médio (nm), potencial zeta (mV) e polidispersão (PDI) das suspensões de nanocápsulas poliméricas

| Amostras | Estabilidade (tempo) | Tamanho de Partícula | Potencial Zeta | PDI |
|-------------|----------------------|----------------------|----------------|-------|
| NDIBP – 7mg | T 0 dias | 191,93 nm | - 29,1 mV | 0,116 |
| NDIBP – 7mg | T 30 dias | 197,03 nm | - 30,96 mV | 0,125 |
| NDIBP – 7mg | T 90 dias | 202,16 nm | - 21,63 mV | 0,125 |

Fonte: autor

Os resultados apresentados na Tabela 2 indicam que as suspensões de NC poliméricas contendo NDIBP e as sem o fármaco apresentaram diâmetro e índice de polidispersão compatíveis com suspensões coloidais (Guterres *et al.*, 1995).

A partir da Tabela 1, é possível observar que o diâmetro médio de partícula para as formulações analisadas manteve-se praticamente constantes no período de zero a 150 dias, indicando que estas formulações são estáveis quanto ao tamanho por pelo menos 150 dias, não havendo formação de agregados que seriam evidenciados pelo aumento do tamanho de partícula.

De acordo com Mohanraj e Chen (2006) valores de polidispersão, que indicam a distribuição de tamanho das NC, menores que 0,2 para suspensões coloidais são ideais. Em relação a polidispersão, na Tabela 1 pôde-se observar que as formulações, apresentam valores inferiores a 0,2 isso indica que as formulações possuem uma distribuição de tamanho aceitável. Grandes variações do valor de polidispersão em função do tempo podem indicar formação de agregados (Mohanraj; Chen, 2006). Na Tabela 1, foram observadas pequenas variações de polidispersão para todas as formulações em função do tempo, mostrando assim que as formulações possuem uma estabilidade adequada. Dessa forma, de acordo com a literatura, os resultados indicam a formação de sistemas monodispersos e com sucesso de produção (Balest, 2013).

Os valores de potencial zeta das formulações indicam uma boa estabilidade em suspensão, uma vez que os valores foram próximos a -30 mV, valores estes que indicam uma boa estabilidade coloidal devido a uma repulsão eletrostática entre as nanopartículas, sendo assim as nanopartículas tendem a não se agregar. Nanopartículas com valores de potencial zeta de aproximadamente (\pm) 30 mV são mais estáveis em suspensão (Camargo *et al.*, 2023; Mohanraj; Chen, 2006).

Tabela 2 - *pH* das nanocápsulas contendo NDIBP e sem o composto

| Tempo | NC – NDIBP (7 mg) | NC – Sem NDIBP |
|------------------|------------------------------|-----------------------|
| T 0 dias | 5,55 | 3,23 |
| T 7 dias | 5,51 | 3,22 |
| T 15 dias | 5,46 | 3,40 |
| T 30 dias | 5,44 | 3,30 |

Fonte: Autor

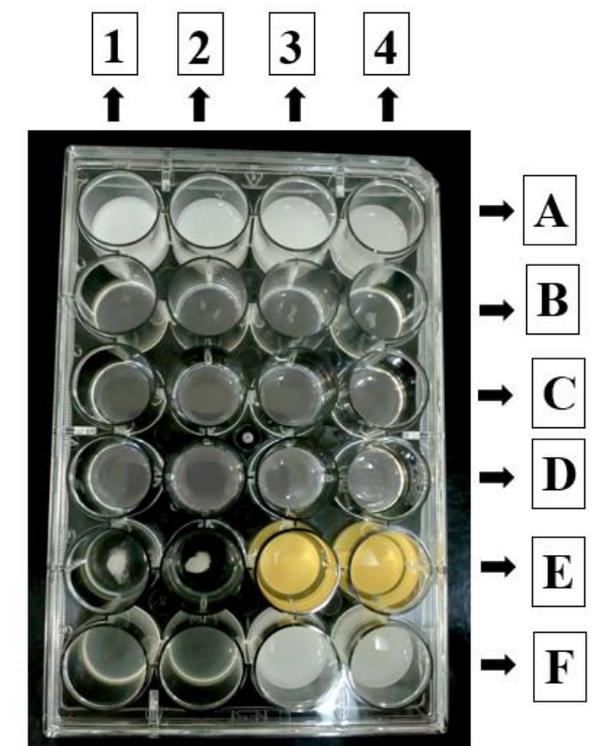
O último parâmetro de estabilidade investigado das NC foi o pH. A Tabela 2 apresenta o comportamento do pH das formulações de NC e contendo NDIBP em função do tempo. A análise do pH em função do tempo é importante para assegurar a estabilidade das suspensões de NC, pois a alteração de pH pode indicar degradação do polímero. Este fato se deve à hidrólise do polímero, liberando alguns de seus componentes (Schaffazick *et al.*, 2003). Em todas as formulações observou-se variações nos valores de pH em função do tempo, essas variações podem estar associadas à degradação do polímero produzindo ácido lático livre causando diminuição de pH (Guterres *et al.*, 1995).

3.2 EFICIÊNCIA DE ASSOCIAÇÃO DE NDIBP EM NC POLIMÉRICAS

3.2.1 Bioensaios das Nanocápsula contendo NDIBP como Agente Antifúngico

O teste de suscetibilidade com *Candida albicans* 60193 pelo método de microdiluição em caldo, revelou que a nanocápsula contendo o NDIBP apresenta atividade biocida quando incubada no meio contendo as leveduras, essa ação foi pode ser obtida após um período de 48 horas. Os resultados da análise podem ser observados na Figura 6. Para determinação do teste de suscetibilidade foi utilizado o teste de microdiluição que está de acordo com o protocolo empregado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (Barry *et al.*, 2000).

Figura 6 - Método de microdiluição em caldo Sabouraud, avaliação da atividade da nanocápsula contendo NDIBP sobre a *Candida albicans* ATCC 60193.



Fonte: Autor

No período de 24 horas após a incubação da nanocápsula ao meio, linha B, a levedura cresceu em todos os poços com diferentes concentrações de nanocápsula, indicando que a linhagem leveduriforme continuava viável. Passado um período de 48 horas da incubação da nanocápsula contendo NDIBP, não foi visualizado crescimento do microrganismo nos poços, esse resultado pode ser visto na linha C, das colunas 1 a 4, mostrando assim, que todas as concentrações de nanocápsula adicionadas aos poços foram capazes de inibir o crescimento da *Candida albicans*. O resultado da linha D, referente ao período de 72 horas da incubação da nanocápsula contendo o candidato a fármaco, foi similar aos apresentados na linha C. Revelando assim, que não houve o crescimento após a passagem desse período.

A partir dos resultados, não foi possível definir se o NDIBP nanoencapsulado possuía uma atividade biocida ou bioestática em relação a levedura *Candida albicans* ATCC 60193, já que foi observado o crescimento do microrganismo no período de 24 horas, não se repetindo nas análises posteriores. Visando avaliar qual efeito que a nanocápsula contendo o NDIBP causava a levedura, novos ensaios foram realizados, onde 10 μ L foi retirado dos poços contendo a maior concentração de NC nos períodos de 24, 48 e 72 horas, ou seja, uma alíquota foi retirada dos poços 1-B, 1-C e 1-D e transferidos para um meio de cultura novo, para assim avaliarmos o crescimento da levedura, o resultado pode ser observado na Figura 7.

Figura 7 - Avaliação da viabilidade de *Candida albicans* ATCC 60193 após 72 horas da incubação na nanocápsula contendo NDIBP



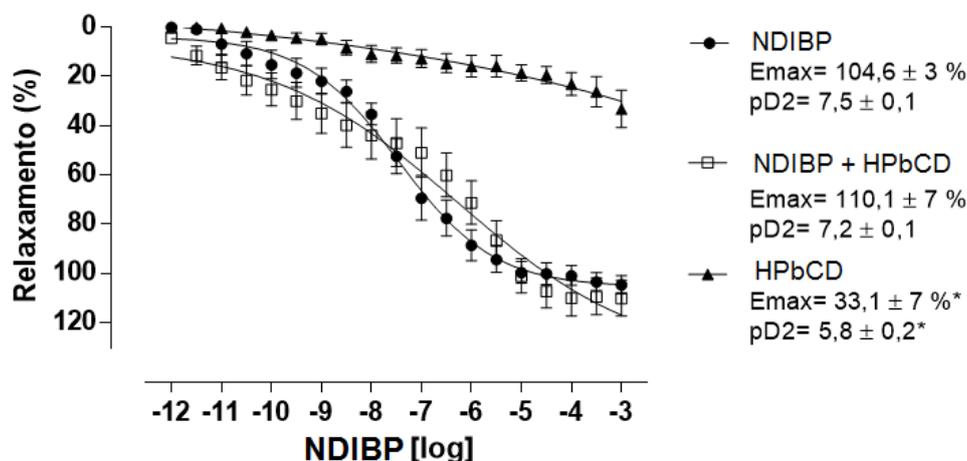
Fonte: Autor

Através do resultado obtido nesse teste, foi observado que a levedura não cresceu nos poços, sugerindo assim, que a nanocápsula contendo o NDIBP possui atividade biocida em relação a levedura *Candida albicans* ATCC 60193. Provavelmente, no período de 24 horas a matriz polimérica, que forma a nanocápsula, não degradou e dessa forma o NDIBP não estava disponível no meio, isso pode explicar o porquê do crescimento da levedura nos poços referentes ao período de 24 horas, linha A. Já com 48 horas, não foi observado o crescimento do microrganismo, sugerindo assim que passado esse tempo a matriz polimérica, que forma e da estrutura a nanocápsula, sofreu degradação e promoveu a liberação do NDIBP no meio.

3.2.2 Vasorrelaxamento em Artéria Mesentérica Induzido pelo Complexo de Inclusão NDIBP/HP- β -CD e por NC contendo NDIBP

Em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato Wistar Kyoto sem endotélio funcional e pré-contraídos com FEN ($10\mu\text{M}$), concentrações crescentes do 2-nitrato-1,3-diisobutoxiopropano ($10^{-8} - 10^{-4}\text{M}$) promoveram vasorrelaxamento concentração dependente ($E_{\text{máx}} = 104,6 \pm 3 / 7,5 \pm 0,1$) como demonstrado na Figura 8. Sugerindo dessa forma que o NDIBP é um composto com potencial efeito vasodilatador. Em anéis de artéria mesentérica sem endotélio funcional e pré-contraídos com FEN ($10\mu\text{M}$), concentrações crescentes do 2-nitrato-1,3-diisobutoxiopropano ($10^{-8} - 10^{-4}\text{M}$) + hidroxipropil- β -ciclodextrina (complexo de inclusão) também promoveram vasorrelaxamento concentração dependente ($E_{\text{máx}} = 110,1 \pm 7 / 7,2 \pm 0,1$). O resultado evidencia que a complexação do NDIBP pela molécula HP- β -CD não interfere no efeito vasorrelaxante provocado pelo composto.

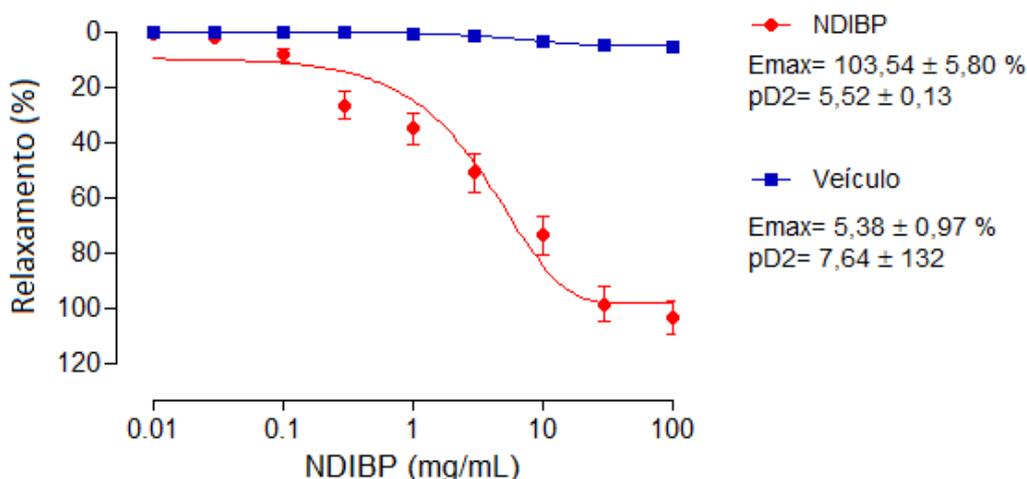
Figura 8 – Atividade vasorrelaxante do complexo de inclusão e do NDIBP (10^{-8} a 3×10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídos com FEN ($10 \mu\text{M}$) sem endotélio funcional. O efeito foi avaliado em tecido vascular ($n=6$). [média \pm e.p.m]



Fonte: Autor

Em anéis de artéria mesentérica sem endotélio funcional e pré-contraídos com FEN ($10 \mu\text{M}$), concentrações crescentes do 2-nitrato-1,3-diisobutoxipropano (10^{-8} – 10^{-4} M) nanoencapsuladas também promoveram vasorrelaxamento concentração dependente ($E_{\text{máx}} = 103,54 \pm 5,8 / 5,52 \pm 0,13$), o resultado pode ser observado na Figura 9. A partir da análise do gráfico podemos observar que a nanocápsula sem o composto (veículo) não interferiu no relaxamento da artéria mesentérica, isso comprova que os constituintes que formam as NC não têm potencial vasorrelaxante e o efeito que vemos relacionado ao NDIBP nanoencapsulado se deu pela ação do NDIBP liberado pela nanocápsula.

Figura 9 - Atividade vasorrelaxante das nanocápsulas contendo NDIBP (10^{-8} a 3×10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídos com FEN ($10 \mu\text{M}$) sem endotélio funcional. O efeito foi avaliado em tecido vascular ($n=4$). Valores expressos por média \pm e.p.m.



Fonte: Autor (2017).

Resultados semelhantes de $E_{m\acute{a}x}$ e pD_2 foram observados por Franca-Silva *et al.* (2012), quando avaliaram o efeito vasorrelaxante em anéis de artéria mesentérica na ausência de endotélio funcional de nitratos orgânicos derivados da glicerina. Os valores do NDIBP, assim como valores de outros nitratos orgânicos podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores (%) de $E_{m\acute{a}x}$ e pD_2 referentes ao efeito vasorrelaxador do NDIBP e de outros nitratos orgânicos derivados da glicerina em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídas com FEN, na ausência de endotélio funcional

| COMPOSTO | $E_{m\acute{a}x} \pm SEM$ | $pD_2 \pm SEM$ |
|----------|---------------------------|----------------|
| NDIBP | 104,6 \pm 3,0 | 7,5 \pm 0,1 |
| NDMP | 93,8 \pm 11,7 | 4,4 \pm 0,07 |
| NDEP | 108,8 \pm 5,4 | 4,8 \pm 0,06 |
| NDPP | 111,1 \pm 8,5 | 5,4 \pm 0,08 |
| NDBP | 105,4 \pm 2,7 | 5,9 \pm 0,06 |

Fonte: Adaptado de Franca-Silva *et al.* (2012)

As NC poliméricas contendo o NDIBP, foram utilizadas nos experimentos *in vitro*, referentes a avaliação do vasorrelaxamento em artéria mesentérica, sem a adição do agente diluente Cremophor(R), que é um surfactante não-iônico derivado do óleo de castor, que é um óleo obtido das sementes de *Ricinus communis*. O Cremophor® vem sendo utilizado na solubilização de uma série de drogas de caráter hidrofóbico, incluindo sedativos, anestésicos e drogas anticâncer (Zuylén *et al.*, 2001).

Alguns efeitos adversos do Cremophor® vem sendo observados na clínica médica, um exemplo é a reação de hipersensibilidade aguda, que é caracterizada por dispneia, taquicardia e hipotensão (Gelderblomm *et al.*, 2001), também apresenta ação no endotélio, causando vasodilatação (Singla *et al.*, 2002). Dessa forma esse composto pode interferir em resultados experimentais, se não for utilizado nas concentrações ideais para não apresentar efeitos.

Além de apresentar efeitos adversos indesejados, o Cremophor® também pode alterar resultados de experimentos *in vitro*, por esses motivos a busca por diluentes ou carreadores inertes de drogas que possuem características hidrofóbicas vem crescendo. Nos resultados mostrados acima podemos observar que as NC serviram de carreadores para o NDIBP e não interferiram em sua ação, visto que o relaxamento da artéria mesentérica teve um $E_{m\acute{a}x}$ de 103,5 \pm 5,8 %. Sugerindo assim que essa estratégia pode ser uma saída para encapsulação de drogas hidrofóbicas que atualmente vem sendo diluídas em Cremophor®.

4 CONCLUSÕES

O presente trabalho mostrou evidências da complexação do NDIBP pela molécula de HP- β -CD, as análises realizadas a partir dos dados obtidos por métodos como a difração de Raios-X,

espectroscopia de infravermelho e a microscopia eletrônica de varredura nos mostram as alterações sofridas pelo composto da HP- β -CD evidenciam que a complexação de fato aconteceu. A complexação promove uma melhoria na solubilidade do NDIBP na ordem de 12,5 vezes.

Considerando os resultados gerados pelas NC poliméricas contendo o NDIBP, as análises realizadas a partir dos dados obtidos por métodos como espectroscopia de autocorrelação de fótons nos mostram as alterações sofridas pelas amostras de NC ao longo do tempo e evidenciam que as nanopartículas possuem uma boa estabilidade. O mesmo foi confirmado pelas análises de potencial de superfície e polidispersibilidade.

A nanocápsula contendo o NDIBP se mostrou eficiente nos ensaios biológicos com *Candida albicans* ATCC 60193, o trabalho sugere com base nos resultados apresentados que composto apresentou um potencial biocida quando inoculados com a levedura em caldo Sabouraud.

O NDIBP apresentou efeito vasorrelaxante em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos Wistar Kyoto sem endotélio funcional. O efeito vasorrelaxante foi observado tanto no complexo de inclusão NDIBP/HP- β -CD quanto nas NC contendo o NDIBP.

O NDIBP encapsulado em NC apresentou efeitos altamente relevantes nos resultados de vasorrelaxamento, visto que, não foi necessária a diluição do NDIBP em Cremophor®. Fator esse que ressalta a importância da formulação, já que possibilitou a realização de experimentos in vitro sem a utilização do Cremophor®, diluente que possui características tóxicas.



REFERÊNCIAS

- AGUIAR, U.N.; LIMA, S.G.; ROCHA, M.S.; et al. Preparação e caracterização do complexo de inclusão do óleo essencial de croton zehntneri com b-ciclodextrina. *Quim. Nova*, v. 37, n. 1, p. 50-55, 2014.
- BALEST, A. P. Caracterização e estudo de estabilidade de suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb). Trabalho de conclusão de curso (TCC). Farmácia. Universidade de Brasília. 2013.
- BARRY A.L.; PFALLER, M.A.; BROWN, S.D. Quality control limits for broth microdilution susceptibility tests of ten antifungal agents. *J Clin Microbiol.* v. 38, p. 3457-3459, 2000.
- BRITTO, M. A. F. O.; NASCIMENTO JR, C. S.; SANTOS, H. F. Análise estrutural de ciclodextrinas: um estudo comparativo entre métodos teóricos clássicos e quânticos. *Quím. Nova*, v. 27, p. 882-888, 2004.
- BUDAL, R.M. Estudos de formação de complexos de inclusão em ciclodextrinas. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis/SC 2003.
- CAMARGO, G. dos A.; CARNEIRO, J. F.; MONTEIRO, L. M.; et al. Development and characterization of Ruta graveolens L. extract-loaded polymeric microparticles for vehicle in children's shampoo formulation. *Res Soc Develop.* v. 12, n. 1, p. e17812139094, 2023.
- CHAVES I.S.; RODRIGUES S.G.; MELO N.F.S.; et al. Alternativas para o Tratamento da Esquistossomose: Caracterização Físico-Química do Complexo de Inclusão entre Praziquantel e Hidroxipropil- β -Ciclodextrina. *Latin Am J Pharm.* v. 29, n. 7, p. 1067-74, 2010.
- DAIBER, A.; OELZE, M.; COLDEWEY, M.; et al. Oxidative Stress and Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase Activity: A Comparison of Pentaerythritol Tetranitrate with Other Organic Nitrates. *Molec Pharmacol.* v. 66, p. 1372 – 1382, 2004.
- EGYED, O. Spectroscopic studies on β -cyclodextrin. *Vibration. Spectroscopy.* v. 1, n. 2, p. 225-227, 1990.
- FESSI, H.; PUISEIUX, F.; DEVISSAGUET, J-P. Procédé de preparation de systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance sous forme de nanocapsules. *Eur Patent.* 0274961 A1, 1988.
- FRANCA-SILVA, M.S., LUCIANO, M. N., RIBEIRO, T.P.; et al. The 2-nitrate-1,3-dibutoxypropan, a new nitric oxide donor, induces vasorelaxation in mesenteric arteries of the rat. *Eur J Pharmacol.* v. 690, n.1-3, p. 170-175, 2012.
- FRÖMMING, K. H.; SZEJTLI, J. Cyclodextrins in pharmacy. *Topics in inclusion science.* Hungria: Kluwer Academic Publishers, 1994.
- GARRIDO, E.M.P.J. et al. Microencapsulation of caffeic acid phenethyl ester and caffeic acid phenethyl amide by inclusion in hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Food Chem.* v. 254, p. 260- 265, 2018.
- GELDERBLOM H, VERWEIJ J, NOOTER K, et al. Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. *Eur J Cancer.* v. 37, p. 1590–1598, 2001.
- GNACH, A.; LIPINSKI, T.; BEDNARKIEWICZ, A.; et al. Upconverting nanoparticles: Assessing the toxicity. *Chem. Soc. Rev.* v. 44, p. 1561–1584, 2015.



GOULD, S.; SCOTT, R.C. 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD): A toxicology review. *Food Chem Toxicol.* v.43, p.1451-1459, 2005.

GUTERRES, S. S.; FESSI, H.; BARRATT, G.; DEVISSAGUET, J-P.; PUISIEUX, F. Poly(DLlactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. *Int. J. Pharm.* v. 113, p. 57-63, 1995.

GÜVEN E. Nanotechnology-based drug delivery systems in orthopedics. *J Dis Relat Surg.* v. 32, n. 1, p. 267-273, 2021.

HIGUCHI T; CONNORS KA. Phase solubility techniques. *Adv Anal Chem Instrum,* v. 4, p. 117-212, 1965.

HUANG, Y. et al. Preparation of inclusion complex of apigenin-hydroxypropyl- β -cyclodextrin by using supercritical antisolvent process for dissolution and bioavailability enhancement. *Int J Pharm,* v. 511, n. 2, p. 921-930, 2016.

LIU, J; QIU, L; GAO, J; JIN, Y. Preparation, characterization and in vivo evaluation of formulation of baicalein with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Int. J. Pharm.* v. 2006, p. 312-137, 2006.

LOFTSSON, T. e DUCHÊNE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int J Pharm.* v. 329, p.1-11, 2007.

LOFTSSON, T.; MASSON, M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. *Int J Pharm.* v. 225, n. 1-2, p. 15-30, 2001.

LYRA, M.A.M. et al. Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina. *Rev Ciênc Farm Básica Apl,* v. 31, n. 2, p. 117-124, 2010.

MAEDA, S; TANABE, T; OTSUKI, T; et al. Moderate Regular Exercise Increases Basal Production of Nitric Oxide in Elderly Women. *Hypertension Res.* v. 27, n. 12, p. 947-953, 2004.

MARQUES, H. M. C. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. *Flavour Frag J.* v. 25, n. 5, p. 313-326, sep. 2010.

MATIOLI G. Ciclodextrinas e suas aplicações em alimentos, fármacos, agricultura, biotecnologia, química analítica e produtos gerais. Maringá: Eduem Editora; 2000. 124p.

MELO, N.F.S.; GRILLO, R.; MORAES, C.M.; et al. Preparação e caracterização inicial de complexo de inclusão entre nitrofurazona e 2-hidroxipropil- -ciclodextrina. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.,* v. 28, n.1, p.35-44, 2007.

MESSNER, M.; KURKOVA, S.V.; BREWSTER, M.E.; et al. Self-assembly of cyclodextrin complexes: Aggregation of hydrocortisone/cyclodextrin complexes. *Int J Pharm.* Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Iceland. 2011.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles – A review. *Trop J. Pharm. Res.* v. 5, p. 561-573, 2006.

MORAES, C.M.; ABRAMI, P.; GONÇALVES M.M.; et al. Preparação e caracterização físico-química de complexos de inclusão entre anestésicos locais e hidroxipropil- -ciclodextrina. *Quím Nova* v. 30, p. 777-784, 2007.

NENOFF, P.; KRUGER, C.; NEUMEISTER, C.; et al. *In vitro* susceptibility testing of yeasts to nystatin – low minimum inhibitory concentrations suggest no indication of *in vitro* resistance of *Candida albicans*, *Candida* species or non-*Candida* yeast species to nystatin. Clin Med Invest, v. 1, n. 3, p. 71-7, 2016.

PAN, H. et al. A superior preparation method for daidzein-hydroxypropyl- β -cyclodextrin complexes with improved solubility and dissolution: Supercritical fluid process. Acta Pharm, v. 67, p. 85-97, 2017.

PHILLIPS, A.J. Treatment of non-albicans *Candida* vaginitis with amphotericin B vaginal suppositories. Am J Obstet Gynecol; Saint Louis, v. 192, n. 6: p. 2009-2013, 2005.

POPIELEC, A.; LOFTSSON, T. Effects of cyclodextrins on the chemical stability of drugs. Int J Pharm. v. 531, n. 2, p. 532–542, 2017.

QIU, N. et al. Inclusion complex of barbigerone with hydroxypropyl- β -cyclodextrin: preparation and *in vitro* evaluation. Carbohydr Polym, v. 101, n. 623-630, 2014.

RAMSDEN, J J. Chapter 1 - What is nanotechnology? In: RAMSDEN, J. J. (Ed.). Applied Nanotechnology: The conversion of research results to products micro and nano technologies. 3. ed. William Andrew Publishing, 2018. p. 3-13.

RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. Prog. Polym. Sci., v. 36, p. 887-913, 2011.

SAENGER, W. R.; JACOB, J.; GESSLER, K.; et al. Structures of the Common Cyclodextrins and Their Larger Analogues-Beyond the Doughnut. Chem. Rev. v. 98, p. 1787-1802, 1998.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES S. S.; FREITAS, L. L.; et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. Quim. Nova, v. 26, p. 726-737, 2003.

SINGLA, A.K.; GARG, A.; AGGARWAL, D. Paclitaxel and its formulations. Int J Pharm. v. 235, n. 1-2, p. 179-192, 2002.

SOUSA, D.; FERREIRA, D.; RODRIGUES, J. L.; et al. Chapter 14 - Nanotechnology in targeted drug delivery and therapeutics. In: MOHAPATRA, S. S.; RANJAN, S.; DASGUPTA, N.; et al. (Ed.). Applications of Targeted Nano Drugs And Delivery Systems: Nanoscience and nanotechnology in drug delivery. Elsevier, 2019. p. 375-409.

SPAMER, E.; MULLER, D. G.; WESSELS, P. L.; et al. Characterization of the complexes of furosemide with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and sulfobutyl ether-7- β -cyclodextrin. Eur J Pharm Biopharm. v. 16, p. 247–253; 2002.

VAN DE MANAKKER, F. et al. Cyclodextrin-based polymeric materials: synthesis, properties, and pharmaceutical/biomedical applications. Biomacromolecules, v. 10, n. 12, p. 3157-3175, 2009.

VEIGA, F.; PECORELLI, C.; RIBEIRO, L.; As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica. Minerva Coimbra: Coimbra, 2006.

VIEIRA, D.B.; GAMARRA, L.F. Advances in the use of nanocarriers for cancer diagnosis and treatment. Einstein. v. 14, n. 1, p. 99-103, 2016.



WEI, Y. et al. Characterization of glabridin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex with robust solubility and enhanced bioactivity. *Carbohydr Polym*, v. 159, p. 152-160, 2017.

YAO, Y. et al. Development of a myricetin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex: Preparation, characterization, and evaluation. *Carbohydr Polym*, v. 110, p. 329-337, 2014.

YERGEY, A.L.; BLANK, P.S.; COLOGNA, S.M.; et al. Characterization of hydroxypropyl-beta-cyclodextrins used in the treatment of Niemann-Pick Disease type C1. *PLoS One*. v. 12, n. 4, p. e0175478, 2017.

ZIGONE, G. & RUBESSA, F. Preformulation study of the inclusion complex warfarin- β -cyclodextrin. *Int J Pharm*. v.291, p.3-10, 2005.

ZUYLEN L, KARLSSON MO, VERWEIJ J, et al. Pharmacokinetic modeling of paclitaxel encapsulation in Cremophor EL micelles. *Cancer Chemother Pharmacol*. v. 47, p. 309–318, 2001.