

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Materiais

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA
DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO DE AMIOSE COM DIFERENTES
MOLÉCULAS HÓSPEDES**

Msc. ANDRESA DA COSTA RIBEIRO

Tese de doutorado

Porto Alegre, outubro de 2016.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Materiais

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA
DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO DE AMIOSE COM DIFERENTES
MOLÉCULAS HÓSPEDES**

Msc. ANDRESA DA COSTA RIBEIRO

Tese de doutorado realizada sobre a orientação da prof^a Dr^a Nádyá Pesce da Silveira e co-orientação da Prof^a Dr^a Rosane Michele Duarte Soares, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Materiais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em preenchimento parcial dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciência dos Materiais.

Porto Alegre, setembro de 2016.

A presente tese foi realizada inteiramente pelo autor, exceto as colaborações as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre julho de 2012 e julho de 2016, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob Orientação da Professora Doutora Nádyá Pesce da Silveira. No período de setembro de 2014 a setembro de 2015, parte do trabalho foi desenvolvido no Instituto Superior Técnico da Universidade de Lisboa, em Lisboa, em Portugal sob a supervisão do professor Dr. Luís Joaquim Pina da Fonseca.

Andresa da Costa Ribeiro

Orientadora: Dr^a Nádyá Pesce da Silveira

Supervisor de doutorado sanduíche: Dr. Luís Joaquim Pina da Fonseca

Comissão Examinadora:

Prof^o. Dr. Marcos Antônio Villetti

Prof^a. Dra. Maria Ismenia Zulian Lionzo

Profa. Dra. Naira Maria Balzaretto

Profa. Dra. Sílvia Staniscuaski Guterres

À minha família.

Ao meu esposo, pelo amor, dedicação, companheirismo e compreensão sempre!

AGRADECIMENTOS

À Deus pela proteção em todos os momentos.

À professora Nadya, minha orientadora, por ter me recebido no grupo em 2010, pela amizade, apoio e confiança dada durante o desenvolvimento desta tese.

À professora Rosane, pela co-orientação e amizade.

Ao professor Luís Fonseca, meu orientador no período do doutorado sanduíche, pela recepção em Lisboa, confiança depositada, carinho, amizade, ensinamentos e paciência.

A Prof. Dra. Fernanda Poletto, Prof. Dra. Naira Maria Balzaretto e Prof. Dra. Tania Maria Haas Costa pelas sugestões e contribuições no meu exame de qualificação.

À professora Dra. Fernanda Poletto, por ceder um espaço no seu laboratório para a realização de algumas análises.

Ao professor Augustus Fernandes, docente do Instituto Superior Técnico, pela ajuda nas análises de FTIR.

À Ângelo, aluno do Instituto Superior Técnico por toda a ajuda na discussão, colaboração no artigo, ajuda no desenvolvimento da parte experimental, pelo empréstimo do material de laboratório, análises de RMN e amizade.

Ao Zé e Mariana, pela dedicação e ajuda na realização dos experimentos como alunos de iniciação científica na etapa inicial deste trabalho.

Aos queridos colegas e amigos que passaram pelo laboratório LINDIM e aqueles que passaram para nos visitar: Joice, Joelson, Noor, Miriam, Angeloni, Felipe, Simone, Inês, Ticiane, Gabriela, Angeloni, Quélen e Mauro.

Ao Centro de Nanociências e Nanotecnologia (CNANO) da UFRGS pela ajuda nas análises de MEV.

Ao Laboratório Multiusuário de Análise Térmica (LAMAT) da UFRGS pela ajuda nas análises térmicas.

Aos amigos queridos que fiz quando estive em Lisboa: Dragana, Andréia, Clara, Elsa, Sara Matias, Sara Souza Rosa, Sara Rosa, Ana, Aldo, Ângelo, Alexandra, Samuel, Flávio, Pedro, Fátima, Marisa, Ricardo, Joana, Lucca, Naiana, Narjara, Patrícia, Antônio, Abiliane e Levi.

À minha querida amiga Carol Brito, companheira de viagem e nossa família em Portugal.

Ao casal D. Clair e Seu João por terem me recebido em sua casa sem ao menos me conhecer e me tratarem como filha na volta ao Brasil. Obrigada pelo apoio, incentivo e carinho!

Ao Instituto Federal Farroupilha, por terem me recebido nesta instituição como professora substituta. Obrigada pela confiança, carinho e receptividade. Aos amigos que fiz nesta instituição e cidade. A todos os servidores desta instituição. Em especial à Marta e João, por serem a minha família em São Borja.

Aos meus alunos do Instituto Farroupilha, por me darem a certeza de que escolhi a profissão certa, em especial aos alunos Luís Felipe, Daniele, Suelem e Guilherme por terem facilitado meu período de adaptação e apoiado a etapa final de escrita desta tese.

À Bibi, por mesmo estando distante, estar presente na minha vida. Por ter me ajudado em muitos momentos nas quais incluo o período que estivemos juntas no Brasil, no período que estive em Lisboa e ela na França e no meu recomeço, que foi a volta ao Brasil. Obrigada por tudo! Te amo muito!

À Daiani, pela amizade, companheirismo, parceria neste projeto e apoio em todos os momentos. Obrigada por muitas vezes pensar comigo, corrigir meus textos e acreditar quando eu não acreditei. Muito da parte experimental foi feita graças ao teu incentivo. Obrigada também à você e ao Júlio por estarem presentes nesta nova fase da minha vida e por ajudarem na construção dela. Amo-te amiga!!

À Yasmine, pela amizade e por todo o incentivo pessoal e profissional. Aprendi muito contigo, com o teu profissionalismo e seriedade! Aprendi contigo a ser uma pesquisadora! Muito obrigada por tudo!! Amo-te!

À Gisele, pela amizade, pelos conselhos, companheirismo e ensinamentos. Obrigada pelas leituras e contribuições que fizeste neste trabalho e por todo o incentivo que me deste ao longo deste 6 anos! Obrigada pelo carinho, parceria e AMOR! Eu aprendi muito contigo, como aluna de mestrado e depois como doutoranda! Muito obrigada por tudo!!!

Aos meus amigos fiéis e inseparáveis Leci, Diego, Fábio, Felipe, Tobias, Joseane, Júnior, Mariana, Sérgio, Érica, Cláudio, Paula Poli, pela presença constante e amizade sincera. Amo vocês!

Obrigada aos membros da minha família, tios, primos e padrinhos! Obrigada por me apoiarem e estarem presentes em todos os momentos!

Obrigada ao meu sogro, Maneca, à minha sogra, *in memoriam*, Maria e minha cunhada, Mirna, por tudo. Obrigada pelo incentivo, apoio, carinho e por me tratarem como filha. Eu os amo!!

Aos meus pais, pelo amor incondicional, pelo carinho, apoio e incentivo e por aceitarem as escolhas que tomei na vida. Obrigada por serem meus pais. Obrigada por suportarem a distância de hoje e a que passamos no período de um ano, devido ao doutorado sanduíche. Esta tese dedico a vocês e eu os amo muito!!

Às minhas irmãs Laisa e Leisa por todo apoio, carinho, amizade e pelo suporte quando estive fora do país! Eu amo vocês! Este título de doutora é nosso!

Aos meus sobrinhos, Gabriela e Bruno, por existirem e mesmo longe mostrar o amor a nós. Amo vocês demais!

Ao meu amado marido, por todo o incentivo, amor, carinho, apoio. Obrigada por ter abdicado de um ano da tua vida no Brasil para me seguir! Eu não teria conseguido sozinha. Obrigada por aceitar minha ausência (ou se resignar a ela). Obrigada por aceitar minha vinda à São Borja e ter ficado em São Leopoldo, sozinho, finalizando a graduação. Obrigada por me amar e novamente ter largado tudo para ter vindo morar comigo em São Borja. Obrigada por acreditar em mim até mesmo quando eu não acredito. Obrigada por ter estado na etapa final deste trabalho e ouvir o meu choro. Obrigada por estar presente hoje e sempre! Te amo daqui até o infinito!!

À UFRGS por ser a Instituição responsável pela minha formação intelectual e a todos os professores que tive, principalmente os do Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Materiais.

À CAPES pelo apoio financeiro e por promover o desenvolvimento intelectual e científico do Brasil.

Ao CNPq pelo apoio financeiro durante o período de doutorado sanduíche e por também promover o desenvolvimento intelectual e científico do Brasil.

A todos aqueles que por esquecimento não tem o nome citado nesta tese, mas que contribuíram para o desenvolvimento da mesma.

Esta tese não foi feita sozinha. Muitas pessoas contribuíram para que a mesma fosse finalizada. Eu não teria conseguido sem ajuda. Sou muito grata a todos! Muito obrigada!

LISTA DE TRABALHOS GERADOS A PARTIR DOS RESULTADOS DESCRITOS NA TESE

Trabalhos apresentados em eventos:

- ✓ Validação do método para miniaturização do amido, estudo da viscosidade e determinação da massa molecular por DLS.

12º Congresso Brasileiro de Polímeros – Setembro de 2013 – Florianópolis – Brasil.

- ✓ Preparation and characterization of amylose-pyrazinamide inclusion complexes.

4 th Portuguese BioEngineering Meeting – Fevereiro de 2015 – Porto, Portugal.

- ✓ Preparação e caracterização de complexos de inclusão amilose-rifampicina.

13º Congresso Brasileiro de Polímeros – Outubro de 2015 – Rio Grande do Norte – Brasil.

Artigos aceitos e submetidos:

- ✓ **Artigo 1:** Synthesis and characterization of acetylated amylose and development of inclusion complexes with rifampicin (Trabalho aceito para publicação na revista *Carbohydrate Polymer*)
- ✓ **Artigo 2:** Theoretical and experimental study of the conformation and behavior of amylopectin in solution (em fase de submissão)

Capítulo de livro submetido:

- ✓ Gliadin-based drug delivery systems: a review of the (nano)technology developed and advances (Capítulo submetido na editora *Nova Science Publishers, Inc.* como parte do livro “*Gliadins: Chemistry, Sources and Health Implications*”)

Sumário

LISTA DE FIGURAS	1
LISTA DE TABELAS	4
LISTA DE ABREVIATURAS.....	5
RESUMO	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS.....	14
2.1. OBJETIVO GERAL.....	14
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1. AMILOPECTINA	18
3.2. AMILOSE	18
3.2.1. Estrutura química da Amilose	19
3.2.2. Complexos de inclusão de amilose e suas principais características.....	20
3.2.3. Funcionalidade dos complexos de inclusão de amilose	22
3.2.4. Modificação da amilose via acetilação.....	23
3.2.4.1. Viabilidade da modificação.....	23
3.2.4.2. Acetilação.....	25
3.3. MOLÉCULAS HÓSPEDES	27
3.3.1. Rifampicina (RIF)	27
3.3.1.1. Histórico e estrutura química de RIF	27
3.3.1.2. Aplicabilidade de RIF no tratamento de doenças infecciosas.....	29
3.3.2. Rodamina B (RB)	31
3.3.2.1. Estrutura química de RB	31
3.3.2.2. Aplicabilidade de RB	33
3.3.3. Azul de Bromotimol (AB).....	34

3.3.3.1.	Estrutura química de AB	34
3.3.3.2.	Aplicabilidade de AB	35
6.	PARTE EXPERIMENTAL.....	38
6.1.	MATERIAIS	38
6.2.	MÉTODOS.....	38
6.2.1.	Preparação da amilose acetilada.....	38
6.2.2.	Caracterização da amilose acetilada (AMA).....	38
6.2.2.1.	Ganho em massa (GM) da AMA.....	38
6.2.2.2.	Determinação do percentual de grupos acetila (% Ac) e do Grau de Substituição (GS)	39
6.2.2.3.	Confirmação da modificação de AM via Espectroscopia No Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	40
6.2.2.4.	Morfologia dos grânulos da AM e AMA via Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	40
6.2.2.5.	Análise termogravimétrica (TGA) de AM e AMA.....	41
6.2.2.6.	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) de AM e AMA.....	41
6.2.3.	Validação do método analítico para quantificação das moléculas hóspedes no complexo	41
6.2.3.1.	Especificidade	42
6.2.3.2.	Linearidade.....	42
6.2.4.	Preparação dos complexos de inclusão	42
6.2.4.1.	Preparo do complexo AM-RIF.....	42
6.2.4.2.	Preparo dos complexos AM-RB e AM-AB	43
6.2.4.3.	Preparo dos complexos de inclusão com AMA	44
6.2.5.	Caracterização dos complexos de inclusão	45
6.2.5.1.	Medidas de espectroscopia de UV	45

6.2.5.2. Quantificação espectrofotométrica das moléculas hóspedes e determinação da eficiência de encapsulamento e da capacidade de carga dos complexos de inclusão desenvolvidos	45
6.2.5.3. Medidas de Espalhamento de Luz Dinâmico dos complexos de inclusão em solução	46
6.2.5.4. Potencial Zeta (PZ) dos complexos de inclusão em solução	47
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
7.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMA	50
7.1.1. Determinação do GM, do percentual de acetila (% Ac) e do grau de substituição (GS)	50
7.1.2. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR)	51
7.1.3. Análise da morfologia da AM e AMA via Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	53
7.1.1. Análise termogravimétrica (TGA, DTG) da AM e AMA	54
7.1.2. Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (<i>Differential Scanning Calorimetry – DSC</i>).....	57
7.2. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DOS FÁRMACOS-MODELO A PARTIR DA TÉCNICA DE ESPECTROFOTOMETRIA DE UV-VISÍVEL	58
7.2.1. Otimização do método.....	58
7.2.2. Validação do método analítico a partir da análise dos parâmetros especificidade, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação	60
7.2.2.1. Especificidade	61
7.2.2.2. Linearidade e análise de variância (ANOVA) na regressão	62
7.2.2.3. Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ).....	63
7.3. ANÁLISE DA FORMAÇÃO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO.....	63
7.3.1. Avaliação das transições eletrônicas ocorridas durante a formação dos complexos de inclusão.....	66
7.4. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO DESENVOLVIDOS	68

7.4.1. Eficiência de inclusão (% EI) e capacidade de carga (% CC) das moléculas-modelo em função da temperatura.....	68
7.4.2. Efeito da acetilação sobre a eficiência de inclusão (% EI) e capacidade de carga (% CC) dos complexos de inclusão.....	70
7.4.3. Efeito da estrutura das moléculas-hóspedes sob a eficiência de inclusão (% EI) e capacidade de carga (% CC).....	72
7.4.3.1. Efeito da estrutura da molécula RIF sob a formação dos complexos de inclusão desenvolvidos com AM e AMA.....	73
7.4.3.2. Efeito da estrutura da molécula RB sob a formação dos complexos de inclusão desenvolvidos com AM e AMA.....	74
7.4.3.3. Efeito da estrutura da molécula AB sob a formação dos complexos de inclusão desenvolvidos com AM e AMA.....	75
7.4.4. Análise de espalhamento de luz dinâmico (DLS) das amostras estudadas	76
7.4.4.1. Análises de tamanho da AM e AMA	76
7.4.4.2. Análise do tamanho dos complexos de inclusão.....	80
7.4.4.2.1. Comparação entre os d_h obtidos para os complexos de inclusão preparados com AM e AMA	80
7.4.4.2.2. Análise dos d_h obtidos para os complexos de inclusão	81
7.4.4.3. Análises de potencial zeta (PZ) das amostras estudadas.....	83
7.4.4.3.1. Comparação entre os resultados de PZ das amostras AM e AMA.....	83
7.4.4.3.2. Avaliação dos resultados de PZ obtidos para os complexos desenvolvidos com AM e AMA	85
7.4.5. Morfologia dos complexos de inclusão no estado sólido por Microscopia eletrônica de varredura	87
8. CONCLUSÕES	91
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
ANEXOS	111

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplos de sistemas coloidais de entrega que podem ser utilizados para proteger e distribuir componentes bioativos ¹⁰	11
Figura 2. Representação esquemática dos diferentes níveis de grânulos de amido e o envolvimento da amilose e da amilopectina ⁴⁸	17
Figura 3. Estrutura da amilopectina ⁵²	18
Figura 4. Número de publicações no período entre 1995 e 2015 usando a palavra-chave "amylose-inclusion complexes" em Web of Science.	19
Figura 5. Estrutura química da amilose ⁵²	19
Figura 6. Uma hélice de amilose complexada com uma molécula hóspede onde a cabeça polar está no exterior da hélice, ao passo que sua cadeia alifática está situada na cavidade da hélice ¹³	20
Figura 7. Ilustração esquemática da formação de complexos de inclusão entre amilose parcialmente modificada e uma molécula hóspede ¹⁹	24
Figura 8. Representação esquemática da reação da acetilação ¹⁰⁰	26
Figura 9. Estrutura da RIF ¹⁰⁶	28
Figura 10. Fragmentos estruturais da molécula e RIF: a) fragmento contendo a estrutura bicíclica; b) fragmento contendo a estrutura bicíclica e o grupo piperazina e c) fragmento contendo a estrutura bicíclica e o grupo carbonil ¹⁰⁷	29
Figura 11. Estrutura química da RIF quinona (RQ) ¹¹⁸	31
Figura 12. Estrutura química da RB ¹²⁵	32
Figura 13. Fórmulas moleculares adquiridas em solução para RB: a) como um cátion HR ⁺ (forma catiônica) e b) na forma neutra R ^o (anfótera - Zwitterionic) ^{128, 129}	32
Figura 14. Estrutura química do AB ¹⁴⁶	35
Figura 15. Representação esquemática: a) Sistema digestivo ⁷⁸ ; b) Metabolismo de primeira passagem de um fármaco: quando um fármaco é levado para o trato gastrointestinal grande parte dele entra no fígado através da veia porta e uma pequena porção vai para a circulação sistêmica. A parte que entra no fígado sofre um metabolismo hepático e os metabólitos do fármaco são excretados de volta para o intestino através do duto biliar ¹⁵¹	36
Figura 16. Fluxograma para determinação do percentual de grupos acetila (% Ac) e do grau de substituição (GS).	39
Figura 17. Fluxograma indicando a preparação do complexo AM-RIF.....	43

Figura 18. Fluxograma indicando a preparação do complexo AM-RIF.....	44
Figura 19. Fluxograma indicando a preparação dos complexos de inclusão AMA-RIF, AMA-RB e AMA-AB.	44
Figura 20. Representação dos grupos hidroxilas 2-OH, 3-OH e 6-OH disponíveis para as reações químicas.....	51
Figura 21. Espectro de FT-IR de AM (- -) e AMA (-).	52
Figura 22. Fotomicrografias obtidas a partir de microscopia eletrônica de varredura para: a) e b) AM, c) e d) AMA.	53
Figura 23. Curva de TGA da AM (—) e primeira derivada da TGA (DTG) da AM (—).....	54
Figura 24. Curva de TG da AM (—) e AMA.	55
Figura 25. Curva de TGA da AMA (—) e primeira derivada da TGA (DTG) da AMA (—).	56
Figura 26. Representação gráfica da absorbância versus comprimento de onda (λ) realizada no espectrofotômetro em função da determinação da varredura no espectro de absorção UV-vis da: a) RIF ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em KOH 0,1 M neutralizado, b) RB ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e c) AB ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em KOH 0,1 M, respectivamente.....	59
Figura 27. Representação gráfica da absorbância versus comprimento de onda (λ), realizada no espectrofotômetro em função da determinação da varredura no espectro de absorção UV-visível da: a) RIF($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$), b) RB ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e c) AB ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em H ₂ O MiliQ. ...	60
Figura 28. Espectro de varredura de: a) AM e RIF em KOH 0,1 M neutralizado; b) AM e RB em KOH 0,1 M e c) AM e AB em KOH 0,1 M.	61
Figura 29. Espectro de varredura de: AMA e RIF; b) AMA e RB e c) AMA e AB em H ₂ O MiliQ.	61
Figura 30. a) Comparação entre os espectros de absorção UV-vis dos complexos de inclusão desenvolvidos com AM: 1) AM-RIF em KOH 0,1 M neutralizado, 2) AM-RB em KOH 0,1 M e 3) AM-AB em KOH 0,1 M na temperatura de 65 °C e b) Alterações das cores nos complexos: 1) AM-RIF, 2) AM-RB, 3) AM-AB no tempo zero de complexação (i), preparado à 40 °C (ii) e preparado à 65 °C (iii).	64
Figura 31. a) Comparação entre os espectros de absorção dos complexos de inclusão desenvolvidos com AMA: 1) AMA-RIF, 2) AMA-RB, 3) AMA-AB em H ₂ O MiliQ na temperatura de 65 °C e; b) Alteração das cores nos complexos: 1) AMA-RIF, 2) AMA-RB, 3) AMA-AB no tempo zero de complexação (i), preparado à 40 °C (ii) e preparado à 65°C (iii).	65

Figura 32. Alteração das cores nos complexos desenvolvidos: a) no tempo zero de complexação; b) na temperatura de 40 °C; c) na temperatura de 65 °C para 1) AM-RIF, 2) AM-RB, 3) AM-AB, 4) AMA-RIF, 5) AMA-RB e 6) AMA-AB.	70
Figura 33. Representação de: a) amilose e de como a molécula hospedeira pode ser incluída durante a formação do complexo de inclusão; b) molécula incluída no interior da hélice; c) molécula parcialmente incluída; d) molécula não incluída na hélice, mas sim na região amorfa.	72
Figura 34. Estrutura química de RIF ²⁰⁶ , anel piperazina e grupo hidroxila C4. O pK _{a1} (em água) têm sido atribuído à porção hidroxila do C8, enquanto que o pK _{a2} (em água) têm sido atribuído a N4 da piperazina. Anel piperazina (---) e grupo hidroxila em C4 (-).	73
Figura 35. Estrutura química totalmente protonada do AB e seus grupos hidrofóbicos: anéis aromáticos (em vermelho) e radicaiais metila (em azul) ²¹¹	76
Figura 36. Curvas da distribuição de tamanho da AM e AMA nos solventes KOH 0,1 M e H ₂ O MiliQ, respectivamente.	78
Figura 37. Ilustração esquemática do fluxo sanguíneo em um pequeno vaso sanguíneo mostrando a presença da glicocálice. Nos vasos sanguíneos humanos as células endoteliais são cobertas por uma camada gelatinosa de glicoproteínas ligadas à membrana e proteínas do plasma conhecidas por glicocálice. Fisicamente, a camada de glicocálice é altamente carregada negativamente. Hemácias normalmente não invadem esta região por causa da repulsão eletrostática ²²²	84
Figura 38. Imagens de MEV das amostras obtidas dos materiais isolados: a) AM; b) AMA; c) RIF, d) RB e e) AB.	88
Figura 39. Imagens de MEV das amostras obtidas após precipitação e secagem da solução aquosa dos complexos de inclusão desenvolvidos: a) AM-RIF; b) AMA-RIF; c) AM-RB, d) AM-AB.	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de pKa e solubilidade das moléculas utilizadas.	27
Tabela 2. GM, % Ac e GS da AMA da amilose nativa e acetilada*	50
Tabela 3. Propriedades térmicas e termodinâmicas de AM e AMA.	57
Tabela 4. Concentrações das moléculas-modelo RIF, RB e AB (em $\mu\text{g.mL}^{-1}$) nos solventes KOH 0,1 M e H ₂ O MiliQ.	58
Tabela 5. Comprimentos de onda utilizados para doseamento do teor das moléculas-modelo RIF, RB e AB na solução KOH 0,1 M e em água MiliQ.	62
Tabela 6. Valores de LD e LQ das moléculas-modelo estudadas.	63
Tabela 7. Comprimentos de onda (λ) utilizados para quantificação do teor das moléculas-modelo RIF, RB e AB na solução de KOH 0,1 M e no solvente H ₂ O MiliQ.	66
Tabela 8. Valores de eficiência de inclusão (% EI) e capacidade de carga (% CC) dos complexos de inclusão preparados na temperatura de 40 °C e 65 °C.	68
Tabela 9. Valores do diâmetro hidrodinâmico (d_h) e polidispersão (P.d.I) da AM e da AMA.	77
Tabela 10. Valores do diâmetro hidrodinâmico (d_h) e polidispersão (P.d.I) dos complexos de inclusão desenvolvidos com AM e AMA.	80
Tabela 11. Valores de PZ (mV) encontrados para AM no solvente KOH 0,1 M, para AM em KOH 0,1 M neutralizado e para AMA em H ₂ O MiliQ. Para AMA os valores de PZ encontrados são baixos. Valores baixos de PZ (muito próximos a zero) indicam fraca estabilidade para estes sistemas, no entanto, parecem ser viáveis do ponto de visto de absorção.	83
Tabela 12. Valores de PZ (mV) encontrados para os complexos de inclusão desenvolvidos.	85

LISTA DE ABREVIATURAS

AB	Azul de bromotimol
AMA	Amilose acetilada
AMA-AB	Amilose acetilada-azul de bromotimol
AMA-RB	Amilose acetilada-rodamina B
AMA-RIF	Amilose acetilada-rifampicina
AM	Amilose nativa
AM-AB	Amilose nativa – azul de bromotimol
AM-RB	Amilose nativa – rodamina B
AM-RIF	Amilose nativa – rifampicina
ANOVA	Análise de variância
ATR	<i>Attenuated Total Reflection</i>
- Br	Íon brometo
-CH ₃	Radical metil
CH ₃ COO ⁻	Íon acetato
- COOH	Grupo ácido carboxílico
C _{Livre}	Concentração de fármaco-modelo livre na solução
C _{Total}	Concentração total de fármaco-modelo
d _h	Diâmetro hidrodinâmico
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
DP	Grau de polimerização
DP _n	Grau de polimerização por número
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura
DSPE	<i>1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphorylethanolamine</i>
DTG	<i>Derivative thermogravimetry</i>
ΔH	Entalpia
ε	Constante dielétrica do meio
E	Campo elétrico
EFSA	<i>European Food Safety authority</i>
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
f(ka)	Função de Henry

$g_1(\tau)$	Função de correlação do campo elétrico
$g_2(\tau)$	Função de correlação da intensidade
GM	Ganho em massa
GS	Grau de acetilação
HCl	Ácido clorídrico
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
H ₂ O	Água
He-Ne	Hélio-Neônio
I(t)	Intensidade de espalhamento de luz
IARC	<i>International Agency for research on cancer</i>
INH	Isoniazida
k_B	Constante de Boltzmann
KOH	Hidróxido de potássio
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
μ_e	Mobilidade eletroforética
μ_2	Variância de distribuição
m_a	Quantidade de amostra seca
m_{AMA}	Massa de amilose acetilada
m_{AM}	Massa de amilose nativa
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
M_w	Massa molecular ponderal média
η	Viscosidade
NaOH	Hidróxido de sódio
N ₂	Nitrogênio
- OH	Grupo hidroxila
OMS	Organização Mundial de Saúde
% Ac	Porcentagem de grupos acetila
% CC	Capacidade de carga
% EI	Eficiência de inclusão
ζ	Potencial zeta
PEG	Polietilenoglicól

<i>P.d.I</i>	Polidispersão
pH	Potencial hidrogeniônico
pKa	Logaritmo negativo (base 10) da constante ácida
PZ	Potencial Zeta
RB	Rodamina B
r^2	Coefficiente de correlação
R_h	Raio hidrodinâmico
RIF	Rifampicina
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
Rpm	Rotações por minuto
RQ	Rifampicina Quinona
-SO ₃	Radical sulfito
V	Velocidade da partícula
v_b	Volume de branco titulado
v_a	Volume de amilose modificada titulada
W	Quantidade de molécula hospedeira
A	Coefficiente angular da curva analítica
Σ	Desvio padrão do intercepto com o eixo y das três curvas de calibração
Λ	Comprimento de onda
SAXS	<i>Small-angle X-ray scattering</i>
Γ	Taxa de relaxação media
t	Tempo
τ	Tempo de atraso (<i>delay time</i>)
T	Temperatura absoluta
TB	Tuberculose
T_f	Temperatura final
TGA	<i>Thermogravimetric analysis</i> (Análise termogravimétrica)
T_o	Temperatura inicial
T_p	Temperatura do pico
UV-vis	Ultravioleta-visível
W	Quantidade de molécula hospedeira

RESUMO

A amilose, na presença de agentes complexantes adequados, tende a formar complexos de inclusão. Os mesmos são carregadores promissores, já que os ligantes aprisionados podem ser libertados posteriormente, o que conduz a muitas aplicações. Porém, a utilização da amilose nativa (AM) na formação dos complexos é limitada devido a sua baixa solubilidade em água. Sendo assim, estudos envolvendo a modificação desta molécula tornam-se promissores. O objetivo da presente tese foi preparar complexos de inclusão a partir da amilose nativa (AM) e modificada (AMA) usando como ligantes Rifampicina (RIF), Rodamina B (RB) e o Azul de Bromotimol (AB). Primeiramente, dentre os métodos existentes para modificação, escolheu-se a acetilação. O grau de acetilação foi investigado e a estrutura da amilose foi caracterizada por meio de FTIR, MEV, TGA e DSC. Quando comparada à AM, AMA apresentou maior solubilidade em água. A presença das bandas de absorção no FTIR à 1727, 1240 e 1122 cm^{-1} , confirmaram a acetilação. Os resultados de MEV sugeriram que a superfície lisa da AM foi transformada em uma superfície mais áspera em AMA e as análises de TGA e DSC mostraram uma estrutura instável para a mesma. Após esta etapa os complexos foram produzidos e a influência da temperatura e dos ligantes foi avaliada através da caracterização físico-química. UV-vis, DLS, PZ e MEV foram as técnicas usadas neste processo. As análises de UV confirmaram a formação dos complexos e aqueles desenvolvidos na temperatura de 65°C foram mais eficientes. Dentre estes destacam-se aqueles complexos preparados com RIF. O diâmetro hidrodinâmico médio (d_h) dos complexos medidos por DLS variou entre 70 e 100 nm, indicando que os mesmos podem ser utilizados em sistema de liberação controlada. Comparando o d_h da AM e AMA, observou-se que os tamanhos são maiores após a complexação, o que pode indicar que para AMA ou a interação forma complexos mais compactos, ou os ligantes não interagiram com a AMA. Análise de PZ mostrou que os complexos AM-RB e AM-AB apresentam alta estabilidade (PZ < -30 mV) e que os demais complexos apresentam valores de PZ próximos da neutralidade, o que pode melhorar a adsorção dos mesmos em sistemas biológicos. Os complexos AMA-RB e AMA-AB não formaram complexos no estado sólido e os demais formaram uma estrutura amorfa após precipitação. Em conclusão, este estudo levou ao desenvolvimento de um método eficaz para a preparação de complexos de inclusão de amilose.

Palavras-chaves: amilose, acetilação, complexos de inclusão, rifampicina, rodamina B, azul de bromotimol, liberação controlada

ABSTRACT

In the presence of suitable complexing agents, amylose tends to form inclusion complexes. This polymer is considered a promisor carrier since the ligands confined in its chains can be released later, leading to various applications. However, the use of native amylose (AM) in complexes formation is restricted due to its low water solubility. Therefore, studies regarding amylose modification become promising. The aim of this thesis was preparing inclusion complexes made of native (AM) and modified (AMA) amylose using rifampicin (RIF), rhodamine B (RB), and bromothymol blue (AB) as ligands. At first, acetylation was the chosen modification among the modified methods described in the literature. The acetylation degree was investigated and the modified macromolecule was characterized using FTIR, SEM, TGA, and DSC analysis. Compared with AM, AMA presented increased water solubility. The presence of absorption bands at 1727, 1240, and 1121 cm^{-1} confirmed the acetylation. SEM images suggested that the smooth surface of AM was turned into a rougher surface in AMA, while TGA and DSC results showed a less stable structure for AMA. After this step, the complexes were prepared and the influence of the temperature and ligand type was evaluated through physicochemical characterization. UV-Vis, DLS, PZ, and SEM were the techniques used in this process. UV-Vis analysis confirmed complexes formation, revealing that the ones prepared at 65°C were more efficient. Among those, complexes prepared with RIF stand out. The average hydrodynamic diameter (d_h) of the complexes measured by DLS ranged from 70 to 100 nm, indicating that these complexes can be used in controlled release systems. Comparing the d_h of AM and AMA, it was observed that the sizes were larger after complexation, which may indicate more compact complexes or no interaction between AMA and ligands. ZP results showed that AM-RB and AM-AB complexes presented high stability ($\text{PZ} < -30 \text{ mV}$), while the others presented PZ values near neutrality, which can increase their adsorption in biological systems. AMA-RB and AMA-AB did not form complexes in solid state, while the others formed an amorphous structure after precipitation. In conclusion, this study led to an effective method development for the amylose inclusion complexes preparation.

Keywords: amylose, acetylation, inclusion complexes, rifampicin, rodhamine B, bromothymol blue, controlled release

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, muitos estudos têm se dedicado ao desenvolvimento de sistemas de liberação controlada produzidos em macromoléculas naturais¹⁻³. O objetivo do encapsulamento é proteger ou liberar compostos hidrofóbicos, de modo a melhorar a sua eficácia biológica,⁴ ou até mesmo diminuir os efeitos adversos, caso seja usado em sistemas de liberação controlada de fármacos¹.

Dentre as macromoléculas usadas na criação destes sistemas pode-se citar as proteínas⁵, os polissacarídeos^{6, 7}, tais como a quitosana^{8, 9}. A principal vantagem do uso de macromoléculas de origem biológicas em sistemas de liberação controlada está relacionada a sua biodisponibilidade, baixo custo e não toxicidade⁴.

Estas macromoléculas podem ser utilizadas individualmente ou combinadas entre si, dependendo da natureza e funcionalidade desejada⁴. Isso ocorre, pois apresentam conformações e estrutura química variadas. Por conseguinte, os mecanismos para formar sistemas de liberação controlada são diferentes⁴. Devido a este fato, nos últimos anos uma variedade de sistemas foi desenvolvida para fins de encapsulamento a partir de diferentes metodologias (Figura 1)¹⁰.

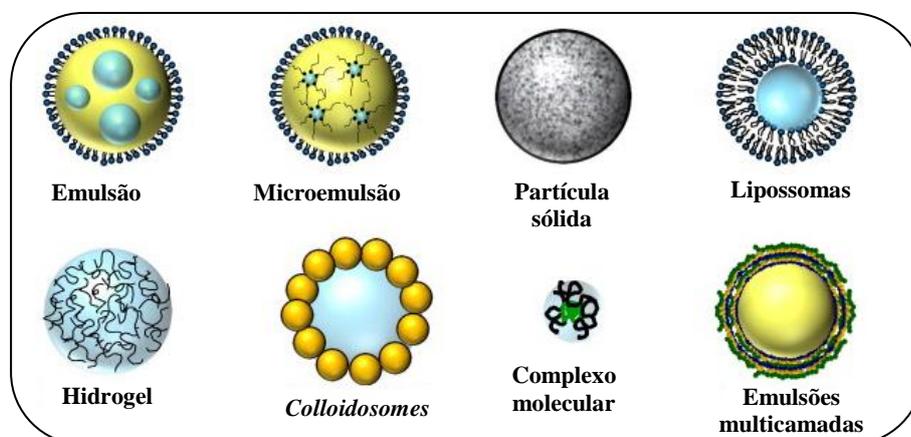


Figura 1. Exemplos de sistemas coloidais de entrega que podem ser utilizados para proteger e distribuir componentes bioativos¹⁰.

Dentre as metodologias utilizadas para o desenvolvimentos de sistemas de liberação controlada, destaca-se a formação de complexos de inclusão molecular. Este tipo de mecanismo ocorre pois alguns sistemas específicos apresentam estrutura molecular peculiar que favorecem sua formação¹¹. Esta técnica é interessante e atualmente muito usada pois o

preparo é simples, sendo necessário apenas o uso da macromolécula e seus agentes de complexação, o que, em alguns casos, pode baratear o desenvolvimento do sistema.

Dentre os complexos desenvolvidos até o momento, é bem conhecido na literatura o uso de amilose como molécula hospedeira¹²⁻¹⁴. A partir dela, vários sistemas de liberação controlada foram criados^{2, 15, 16}. Nestes complexos, a cavidade helicoidal formada pela amilose é considerada hidrofóbica e pode acomodar diferentes moléculas hóspedes¹⁷. Essa característica é complementada pelo fato desta molécula ser um dos polissacarídeos mais abundantes encontrados na natureza, apresentando várias qualidades, tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade e não-toxicidade. Além disso apresenta baixo custo, tornado-se assim uma boa escolha para encapsulamento^{1, 18}.

No entanto a amilose tem uma peculiaridade. No estado nativo, a sua aplicação é limitada devido a suas propriedades físicas específicas. Esta macromolécula apresenta baixa solubilidade em água, devido as suas múltiplas ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxilas¹⁹, e tem tendência a retrogradação a baixas temperaturas ou a tempos de armazenamento muito longos, o que pode dificultar ou até mesmo restringir sua aplicabilidade com certos ligantes²⁰. Sendo assim, adaptar e melhorar as propriedades físico-químicas da amilose torna-se um desafio para os cientistas.

Até o momento, alguns métodos foram testados para modificar a estrutura desta molécula, dentre eles citam-se a modificação química (a partir de várias metodologias)²⁰ e enzimática²¹. No entanto, estes estudos ainda são limitados, sendo necessário um conhecimento mais aprofundado sobre esta macromolécula e suas peculiaridades com diferentes ligantes.

Sendo assim, neste trabalho tem-se como objetivo obter e caracterizar complexos de inclusão utilizando amilose nativa e modificada com três moléculas hóspedes diferentes, bem como avaliar as propriedades físico-químicas dos sistemas formados. A partir daí deseja-se nesta tese explorar a possibilidade de aplicação da amilose como molécula hospedeira no desenvolvimento de biomaterial com propriedade específica.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo é investigar o desempenho e eficiência de complexos de inclusão utilizando amilose nativa (AM) e amilose acetilada (AMA) como molécula hospedeira e rifampicina (RIF), rodamina B (RB) e azul de bromotimol (AB) como moléculas hóspedes.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Modificar quimicamente a amilose via reação de acetilação.
- ✓ Caracterizar a amilose acetilada a partir das técnicas de:
 - titulometria para determinação do % Ac e GS;
 - para observar as mudanças estruturais causadas pela introdução do grupo acetil utilizou-se a técnica de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR);
 - para análise da morfologia fez-se o uso da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV);
 - para examinar alterações na estabilidade térmica realizou-se análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC).
- ✓ Obter complexos de inclusão de amilose a partir da amilose nativa e acetilada.
- ✓ Investigar a formação, eficiência e capacidade de carga dos complexos a partir da técnica de espectrofotometria de UV.
- ✓ Analisar as características físico-químicas (tamanho e estabilidade) dos complexos desenvolvidos em solução a partir da técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial zeta (PZ).
- ✓ Obter os complexos de inclusão no estado sólido e investigá-los a partir da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Durante as últimas décadas, tem havido um interesse crescente no desenvolvimento de complexos de inclusão a partir de materiais biodegradáveis, para diversas aplicações, tais como em sistemas de liberação controlada de medicamentos^{15, 22-24}, na indústria alimentícia^{17, 25, 26}, na indústria cosmética²⁷, etc. Dentre os materiais biodegradáveis utilizados destacam-se a ciclodextrina^{28, 29}, a quitosana^{30, 31}, o amido^{17, 32} e seus polímeros: amilose^{2, 25, 33} e amilopectina³⁴⁻³⁷.

Os polissacarídeos, classe dos quais o amido e seus derivados fazem parte, tornam-se materiais interessantes no desenvolvimento de produtos renováveis e ambientalmente sustentáveis, pois são biopolímeros com características únicas: são abundantes, baratos, renováveis, estáveis e modificáveis quimicamente. Além disso, apresentam propriedades químicas e biológicas, tais como não-toxicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade, reatividade química elevada, capacidade de adsorção, etc³⁸⁻⁴².

Estes biopolímeros apresentam também capacidade gelificante e são capazes de encapsular ou aprisionar não somente moléculas com diferentes propriedades físico-químicas, mas também estruturas biológicas complexas³⁵. Além disso, as principais propriedades biofísicas necessárias para que o mesmo seja adequado para encapsular ou aprisionar outras moléculas, são determinadas por sua estrutura química, grupos funcionais, tipos de ligações e massa molecular^{35, 43}.

Esta versatilidade baseia-se na presença de grupos hidrofóbicos e hidrofílicos com extensão variável na molécula, que proporcionam o desenvolvimento de matrizes sensíveis às condições ambientais. Além disso, as propriedades destes materiais podem ser facilmente modificadas a partir de diferentes técnicas, usando uma grande variedade de biocatalisadores (usados para acelerar o processo de modificação) o que o tornam úteis do ponto de vista tecnológico³⁵.

Um dos polissacarídeos naturais mais abundante e disponível encontrado na natureza é o amido. O amido é um dos biopolímeros mais importantes do mundo. O mesmo é a principal fonte de energia, sob a forma de fornecimento de glicose exógena, na dieta humana⁴⁴. Este biopolímero é um carboidrato de armazenamento encontrado em plantas que contêm clorofila, como o milho, a batata, arroz, tapioca, trigo e cevada. A quantidade e o tipo de material associado variam dependendo de qual parte da planta o amido é proveniente

e de sua fonte. Ou seja, se é proveniente de sementes de cereais (trigo, milho, etc.), a partir de tubérculos (batata) ou a partir de raízes (mandioca)⁴⁵.

Este biopolímero existe na forma de grânulos discretos semicristalinos com diferentes tamanhos (1 – 100 μm) e várias formas (esférica, lenticular, poliédricas e irregulares)⁴⁶. O amido apresenta cor branca e é insolúvel em água fria devido à sua estrutura polimerizada com ligações de hidrogênio entre as cadeias adjacentes⁴⁵.

Este polissacarídeo é composto por dois componentes principais, amilopectina, altamente ramificada e amilose, essencialmente linear^{46,47}. Juntos, estes dois polímeros estão dispostos em um arranjo semicristalino granular complexo, baseado em agregados de hélices duplas (moléculas de amilose) e ramos adjacentes pertencentes às moléculas de amilopectina⁴⁴ (Figura. 2).

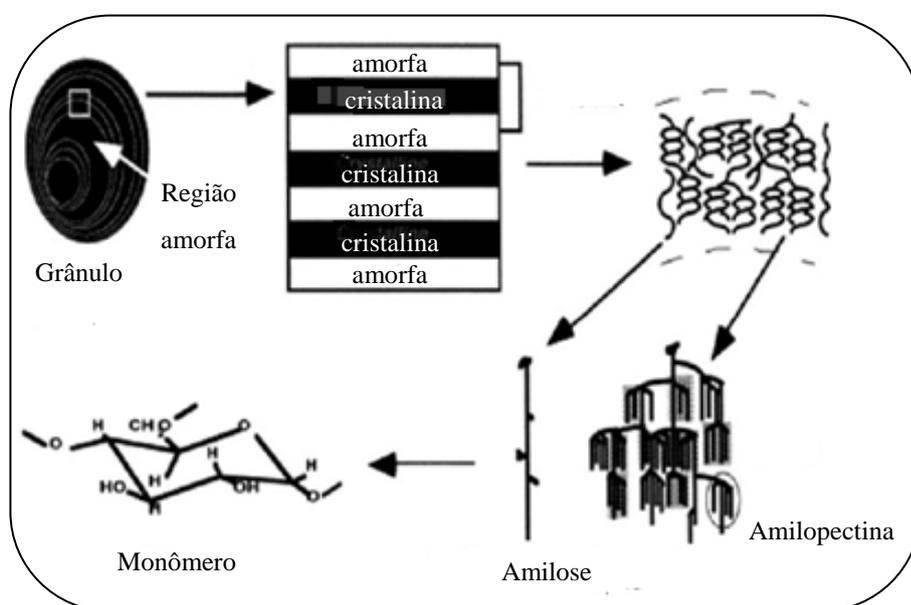


Figura 2. Representação esquemática dos diferentes níveis de grânulos de amido e o envolvimento da amilose e da amilopectina⁴⁸.

A proporção de material amorfo e cristalino no grânulo de amido nativo varia muito, de 10% a 50% de cristalinidade, dependendo da origem botânica do amido. Outras alterações na estrutura podem ocorrer como um resultado do processamento subsequente do amido. Por exemplo, o passo de processamento mais comum é a gelatinização, em que o amido é aquecido em excesso de água, a uma temperatura entre 50 e 70 °C. Neste caso, o amido sofre uma transição cooperativa pela afluência da água que entra nas regiões amorfas dos grânulos, fazendo-a inchar, e desestabilizam as regiões cristalinas. Isto resulta na rápida expansão do grânulo, no ponto de fusão dos cristalitos e em uma perda completa da estrutura ordenada⁴⁹.

3.1. AMILOPECTINA

A amilopectina é um polímero altamente ramificado com peso molecular entre (10^7 - 10^9) $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, formada por ligações glicosídicas α - (1 \rightarrow 4) com uma porção de 5% de ligações α - (1 \rightarrow 6)^{37, 50, 51} (Figura 3).

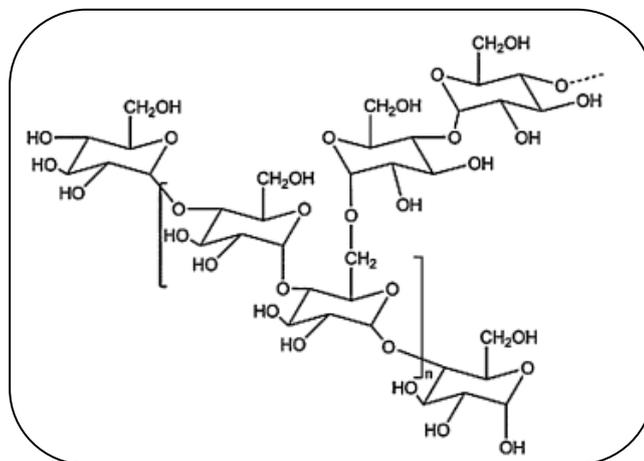


Figura 3. Estrutura da amilopectina⁵².

O grau de polimerização por número (DPn) desta biomolécula tem valor na faixa de 13400 – 15900. As cadeias de amilopectina são relativamente curtas em comparação às moléculas de amilose e apresentam um perfil de distribuição amplo^{53, 54}. Suas cadeias individuais podem apresentar de 10 a 100 unidades de glicose⁵⁵.

3.2. AMILOSE

A amilose é o componente linear do amido e é um dos polissacarídeos mais abundantes encontrados na natureza^{15, 56}. Este biopolímero é biocompatível, biodegradável e não tóxico⁵⁶ e apresenta uma característica única entre os polímeros: sob condições adequadas, apresenta a capacidade de interagir com um grande número de compostos polares e apolares formando complexos de inclusão. Devido a este fato, nos últimos anos, uma quantidade considerável de pesquisas têm sido dedicada ao estudo de complexos de inclusão a partir desta molécula^{2, 57, 58, 59, 60} e várias moléculas hóspedes têm sido investigadas para se ligarem a ela, entre elas citam-se ácidos graxos^{61, 62}, lipídios^{63, 64}, aromatizantes^{16, 60} e fármacos, tais como ibuprofeno^{15, 33}, genisteína², nimesulida, praziquantel⁶⁵ e indometacina⁵⁶.

No período entre 1995 e 2015 a incidência de artigos sobre o tema “*amylose and inclusion complexes*” indexados na base de dados da *Web of Science* mostra um aumento

progressivo de trabalhos envolvendo complexos de inclusão com esta biomolécula (Figura 4).

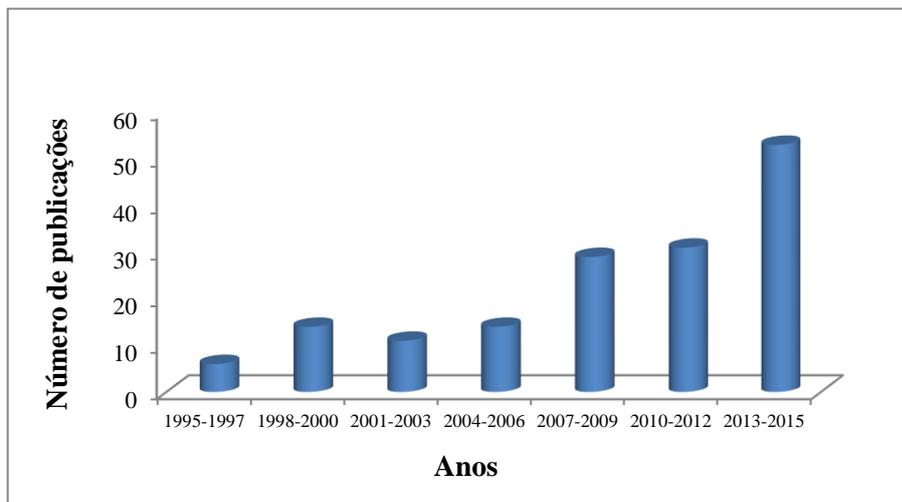


Figura 4. Número de publicações no período entre 1995 e 2015 usando a palavra-chave "amylose-inclusion complexes" em Web of Science.

Ou seja, a relevância deste estudo, em termos de avanço tecnológico, é importante e viável para o desenvolvimento de uma sociedade mais sustentável e com melhor qualidade de vida visto que sistemas de liberação controlada elaborados com materiais de fonte renovável possuem características de biodegradabilidade e não toxicidade.

3.2.1. Estrutura química da Amilose

Quanto à cadeia, a amilose é um polissacarídeo linear, formada por ligações glicosídicas α - (1 \rightarrow 4) e um teor de aproximadamente 0,1 a 0,5 % de ligações glicosídicas α - (1 \rightarrow 6)⁶⁶ (Figura 5).

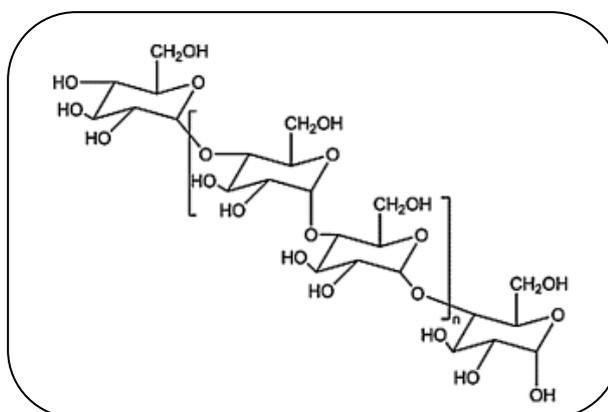


Figura 5. Estrutura química da amilose⁵².

Sua massa molecular varia entre (10^5-10^6) g.mol⁻¹ e apresenta um grau de polimerização por número (DP_n) de 324 – 4920, com cerca de 9 – 20 pontos de ramificações equivalentes a 3 – 11 cadeias por molécula^{47, 53, 67, 68}. Cada cadeia contém cerca de 200 - 700 resíduos de glicose equivalentes a um peso molecular de 32400-113400⁵³.

Suas cadeias laterais variam em comprimento de cadeia de 4 a mais de 100 e a extensão da ramificação (configuração α - (1→6)) tem sido demonstrada que aumenta com o aumento do tamanho molecular da amilose⁶⁹.

3.2.2. Complexos de inclusão de amilose e suas principais características

Como visto acima, a amilose, na presença de agentes orgânicos ou inorgânicos, cristaliza-se em uma forma helicoidal (Figura 6), apresentando uma cavidade interior hidrofóbica e uma superfície exterior hidrofílica⁵⁵.

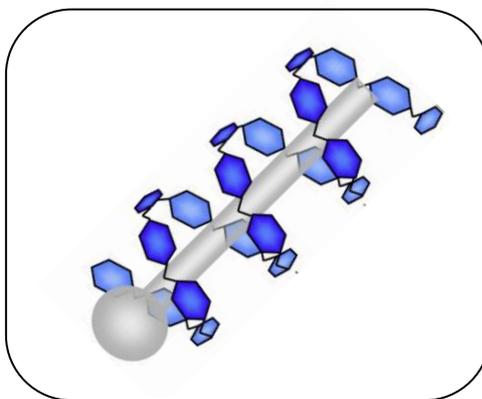


Figura 6. Uma hélice de amilose complexada com uma molécula hóspede onde a cabeça polar está no exterior da hélice, ao passo que sua cadeia alifática está situada na cavidade da hélice¹³.

Esta configuração α - (1→4) das cadeias de amilose permite a formação desta estrutura helicoidal. Estas estruturas são organizadas de modo que os grupos hidroxila estão dispostos na superfície exterior da hélice, o que aumenta a dispersabilidade das moléculas hóspedes em meio aquoso e deixa a superfície mais hidrofílica. Por outro lado, os oxigênios glicosídicos e os grupos metileno são confrontados com o núcleo interno, resultando em uma cavidade mais hidrofóbica, o que fornece sítios de ligação com elevada afinidade com ligantes hidrofóbicos^{65, 70, 71}.

De acordo com a literatura⁷² as forças necessárias para a formação destes complexos helicoidais têm sido identificadas por ligações intramoleculares (forças de van der Waals e

ligações de hidrogênio), as quais ocorrem entre as voltas da hélice da amilose e as forças intermoleculares que estabilizam o complexo entre as cadeias da amilose e seus ligantes.

A natureza helicoidal da amilose foi demonstrada pela primeira vez em 1943 por Rundle e Baldwin⁷³. A estrutura helicoidal da amilose também recebeu o nome de “amilose-V”. Este nome foi escolhido por Katz⁷⁴, pois ele considerava o padrão obtido após a formação dos complexos de inclusão com a do amido gelatinizado ou “Verkleisterter Stärke” em alemão, abreviado como “amido-V”¹³. Este tipo de estrutura apresenta características semelhantes a da Fig. 6, no entanto suas dimensões variam dependendo do tipo de solvente, do agente de complexação e molécula hóspede utilizada¹³.

Em solução aquosa neutra, amilose tem características de uma conformação aleatória com algumas regiões helicoidais. Isto ocorre, pois a água é um solvente bastante pobre para a amilose que promove associação espontânea dos seguimentos lineares para formar hélices duplas. Em contraste, na presença de moléculas hóspedes adequadas a amilose adotará a conformação de hélice simples que é estabilizada por ligações de hidrogênio³².

Existem outros tipos de estruturas que podem ser formadas com a amilose. Na sua forma desordenada ou amorfa os complexos de inclusão são conhecidos como complexos do “tipo I”. Os complexos também podem ser nomeados em dois tipos de formas helicoidais: a dupla hélice (formas A e B) ou hélice simples (forma V). Esta última ocorre quando estes complexos amorfos são organizados em lamelas e dão origem à formação de cristalitos, que são chamados de complexos de inclusão do “tipo II” (estrutura semicristalina), que fornece maior resistência enzimática caso estes complexos sejam usados em sistemas de liberação controlada^{13, 65, 71, 75}.

Cabe ressaltar que o tipo de molécula hóspede utilizada vai definir o tipo de complexo que será obtido. Ligantes de ácidos graxos, álcoois de cadeia longa e monoglicerídeos formam complexos helicoidais do tipo V₆, o qual apresenta uma volta de hélice composta por seis unidades de glucose. Já moléculas hóspedes mais volumosas podem ser compostas por sete ou oito unidades de glicose formando complexos do tipo V₇ e V₈ respectivamente. No entanto, nem sempre a hélice da amilose consegue “alargar” para receber a molécula hóspede, neste caso, hélices duplas são necessárias. Por outro lado, existem moléculas hóspedes que não conseguem formar complexos de inclusão com a amilose^{76, 77} e assim não poderão ser usadas neste tipo de sistemas.

3.2.3. Funcionalidade dos complexos de inclusão de amilose

Vários motivos destacam a importância do estudo de complexos de inclusão no desenvolvimento tecnológico de biomateriais^{2, 57, 58, 59, 60}.

Primeiramente, a dieta atual do ser humano, o estilo de vida sedentário e o aumento da consciência do consumidor geraram numerosas tentativas para introduzir nutracêuticos (importantes compostos bioativos naturais que conferem benefícios à saúde dos seres humanos⁷⁸), como ômega-3 e ácidos graxos insaturados (ômega-6) em alimentos. No entanto, muitos destes compostos têm baixa estabilidade nas condições de processamento, armazenamento e consumo.

Desta forma, a suplementação torna-se um grande desafio tecnológico. O encapsulamento de tais compostos sensíveis utilizando biopolímeros torna-se um método viável e interessante, visto que, por exemplo, podem reter a molécula hóspede preservando-a e liberando-a em um momento mais adequado ao organismo^{16, 32, 79}. Além disso, a formação dos complexos de amilose com aromas pode controlar a retenção e liberação dos compostos e conduzir a uma estabilização dos componentes de sabor, uma vez que os mesmos ficam protegidos contra a influência do oxigênio ou luz¹⁶.

Outra funcionalidade para complexos de inclusão se dá no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de medicamentos. O encapsulamento do fármaco em um biopolímero pode oferecer várias vantagens, tais como^{80, 1, 56, 81, 82, 22}:

- a) proteção do fármaco, o que pode aumentar sua biodisponibilidade e manter uma concentração constante e/ou prolongada do mesmo;
- b) proteger os compostos bioativos com meia-vida muito curta;
- c) permitir o direcionamento específico para a parte afetada, reduzindo, assim, o risco de toxicidade sistêmica;
- d) a liberação do fármaco no organismo, enquanto que o transportador é eliminado do corpo sem deixar vestígios;
- e) transportar fármacos hidrofóbicos (cavidade hidrofóbica).

Ou seja, o uso destes sistemas podem otimizar o efeito do fármaco, melhorando o conforto do paciente^{83, 84, 85}.

Finalmente, outro problema que tem chamado a atenção dos pesquisadores é a contaminação do ambiente por corantes pelas indústrias de papel, tecidos e etc. O estudo sobre este problema é interessante, pois o uso de corantes pode gerar água residual contaminada que aumenta a degradação dos ecossistemas naturais. Este tipo de molécula

pode ser altamente tóxica, potencialmente cancerígena, mutagênica e alergênica em organismos expostos. Elas ainda contaminam não somente o ambiente, mas também atravessam toda a cadeia alimentar^{39, 86, 87}.

Com base no que foi dito acima, estudos mostram que as propriedades físicas dos corantes quando associados em complexos de inclusão sofrem variação em seus parâmetros ópticos. Em alguns casos, por exemplo, a fluorescência é extinta enquanto que em outros a fluorescência aparece apenas na forma associada⁸⁸.

Por outro lado, corantes também são adicionados nos alimentos durante o processamento o que pode afetar as propriedades dos compostos alimentares.

Sendo assim, com base nas propriedades de proteção e direcionamento dos complexos de inclusão, e tendo em conta a elevada afinidade entre a amilose e diferentes tipos de moléculas, encapsular corantes em biomateriais é uma maneira de preservar o meio ambiente^{87, 89}. Além disso, tais aplicações são importantes para a indústria farmacêutica e alimentar⁸⁸.

3.2.4. Modificação da amilose via acetilação

3.2.4.1. Viabilidade da modificação

Embora complexos de inclusão de amilose com moléculas hóspedes tenham sido extensivamente estudados, muitos sistemas ainda não são conhecidos completamente ou não foram testados ou publicados na literatura. O conhecimento dos complexos de inclusão formados entre fármacos e corantes, por exemplo, e a amilose ainda é limitado e sua viabilidade ainda deve ser testada.

Um dos motivos desta limitação pode estar relacionado às propriedades físicas e químicas específicas da amilose^{19, 20, 45, 90}. Primeiramente, este polissacarídeo é uma macromolécula biológica com grau de polimerização (DP) superior a 400, apresentando assim, baixa solubilidade em água à temperatura ambiente. Este alto grau de polimerização também reduz a hidrólise do complexo, o que pode, eventualmente, limitar a biodisponibilidade da molécula incluída^{85, 91}. Por outro lado, a baixa solubilidade em água também pode ser devida às múltiplas ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxilas da amilose¹⁹. Outra desvantagem é o fato da amilose ter forte tendência a retrogradar¹⁹, ou seja, a amilose tende a formar novamente uma estrutura parcialmente cristalina, insolúvel e resistente à digestão enzimática, porém diferente da conformação inicial⁹². Esta propriedade

pode limitar o movimento das hélices das moléculas, o que traz dificuldade para a preparação de complexos de inclusão com esta molécula hospedeira em solução aquosa⁹⁰.

Além de todos os problemas que envolvem a formação de complexos de inclusão com amilose, grande parte dos complexos desenvolvidos até o momento são insolúveis em água e a maioria dos estudos feitos dedicou-se a compreensão destes complexos⁸⁵.

Nos últimos anos, com o objetivo de aumentar a disponibilidade da amilose para receber moléculas hóspedes, bem como melhorar suas propriedades físicas ou químicas e superar as desvantagens mostradas acima, pesquisas vêm sendo realizadas visando à modificação de sua estrutura. Para isso, vários métodos têm sido testados, tais como físicos, químicos e enzimáticos^{20, 45, 93-95}.

A modificação é realizada nos grupos hidroxilas de modo que enfraqueça as ligações de hidrogênio existentes sem que ocorra uma perda significativa da estrutura helicoidal. Após a modificação, a amilose resultante apresentar uma menor tendência a retrogradar, bem como uma maior solubilidade em meio aquoso, em comparação a amilose nativa (Figura 7). A modificação então torna esta macromolécula mais eficaz para interagir com ligantes em meio aquoso¹⁹.

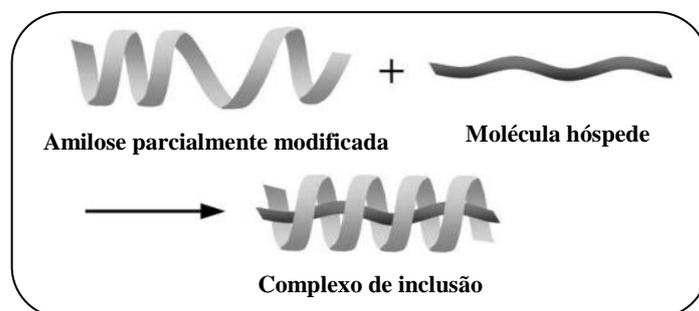


Figura 7. Ilustração esquemática da formação de complexos de inclusão entre amilose parcialmente modificada e uma molécula hóspede¹⁹.

Tais modificações desempenham um papel vital na melhoria do desempenho global e aumentam a utilização desta molécula em várias aplicações, tanto na indústria alimentar, farmacêutica e em outros processos industriais⁹⁶.

Tal como relatado em estudos anteriores^{20, 85, 90, 94} dentre as modificações existentes, a modificação química é um modo comum utilizado para alterar as propriedades do amido e da amilose. Este tipo de modificação é geralmente alcançada por esterificação, reticulação, oxidação, cationização ou enxerto⁹⁷.

Em um estudo sobre o desenvolvimento de complexos solúveis²⁰, por exemplo, realizou-se a modificação da amilose por três processos diferentes: via grupos hidroxipropil, acetilação e carboximetilação.

Primeiramente foi observado que, comparando a esterificação via grupos hidroxipropil e a modificação via acetilação, verifica-se que no segundo tipo de modificação, o grupo acetila tem uma procura estérica mais baixa que os grupos hidroxilas e, portanto, devem perturbar a conformação helicoidal e a capacidade de complexação da amilose em menor grau²⁰. Como resultado, a amilose acetilada mostrou maior capacidade de complexação das moléculas hóspedes do que os demais tipos de modificação. Outro estudo⁹⁴ mostrou que o grau de acetilação pode ainda aumentar a formação de complexos insolúveis, dependendo do grau de acetilação alcançado. Adicionalmente, Wulff *et. al.*²⁰ e Arijaje *et. al.*⁸⁵ descobriram que a modificação via acetilação aumentou significativamente a quantidade de complexos solúveis de amilose recuperados a partir da solução aquosa, bem como melhorou a inclusão de ácido oleico.

Finalmente, amidos acetilados são amplamente utilizados nas indústrias alimentícias, têxteis, papel e também em aplicações biomédicas devido à formação de película, estabilização e propriedades espessantes, que são aparentemente superiores às do amido natural⁴⁵.

Em vista destes fatos, a acetilação é considerada como uma alternativa promissora para o desenvolvimento de produtos com um valor superior adicional, conseguindo assim uma utilização mais racional e eficiente do amido e seus derivados em múltiplas aplicações⁴⁵.

3.2.4.2. Acetilação

Para acetilar o amido, e conseqüentemente a amilose, o método normalmente utilizado é a esterificação do amido nativo (ou amilose nativa) com anidrido acético^{45, 98}.

Neste processo, sabe-se que, durante a modificação, parte dos grupos hidroxilas dos monômeros de glicose são convertidos nos grupos CH_3COO^- do anidrido acético (Figura 8). Por conseguinte, a acetilação é uma esterificação dos grupos hidroxilas na unidade de anidroglicose da molécula de amido⁹⁹.

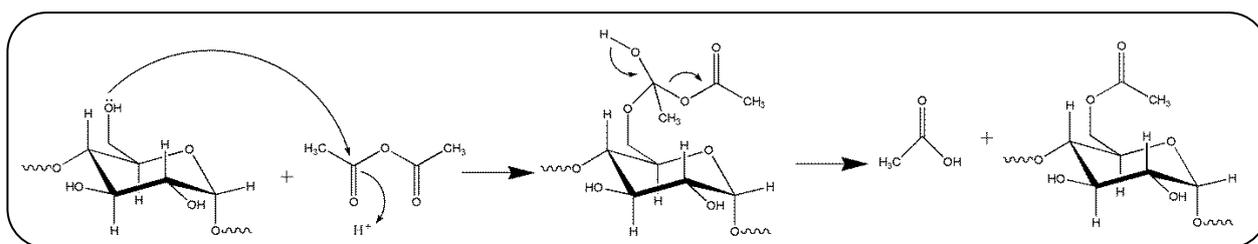


Figura 8. Representação esquemática da reação da acetilação¹⁰⁰.

Uma vez modificado, acetatos de amido têm aplicações reguladas por suas características, tais como a porcentagem de grupos acetila (% Ac) e o grau de acetilação (ou grau de substituição (GS))⁹⁹. De acordo com a literatura¹⁰¹, GS são classificados como baixo (< 0,1), intermediário (0,1 -1,0) e alto (> 1,0). GS baixo funcionam como agentes de texturização, ligante formador de filme, espessante, estabilizante, bem como são amplamente utilizados em uma grande variedade de alimentos, incluindo produtos de panificação, recheios de tortas enlatadas, molhos, sopas, alimentos congelados, alimentos para bebês, saladas, e etc. Já amidos com GS intermediários e elevados podem ser empregados como adesivos de fusão a quente, revestimentos, filtros de cigarro, embalagens biodegradáveis, aglutinantes para comprimidos e outras aplicações farmacêuticas¹⁰¹.

Estudos anteriores indicam¹⁰² que materiais acetilados com GS baixos (<0,2) podem não ser adequados em alguns sistemas de liberação controlada de fármacos devido ao seu alto inchaço e baixa solubilidade em água. Já materiais acetilados com GS altos são mais hidrofóbicos, ou seja, pouco solúveis em água, o que limita a aplicação dos mesmos no encapsulamento de fármacos¹⁰². Sendo assim, como se deseja obter complexos de inclusão solúveis em água para serem usados em aplicações farmacêuticas e na indústria em geral, um valor de GS intermediário foi escolhido neste estudo.

Amilose acetilada com GS intermediário normalmente é obtida por esterificação da amilose nativa com anidrido acético em um meio aquoso na presença de um catalisador alcalino (geralmente NaOH)⁴⁵. No entanto, apesar de todas estas aplicações oriundas da modificação da amilose, poucos trabalhos relatam o efeito da modificação da amilose sobre a encapsulação²⁰.

Desta forma, para uma melhor compreensão da amilose como molécula hospedeira, deseja-se preparar e caracterizar complexos de inclusão avaliando o efeito da amilose nativa e acetilada sobre o processo. A partir da modificação química realizada na amilose deseja-se ampliar o emprego deste polissacarídeo como um receptor de moléculas complexantes e

investigar os parâmetros determinantes para seu emprego, tanto em sistemas de liberação controlada de medicamentos, como matriz para o encapsulamento de corantes.

3.3. MOLÉCULAS HÓSPEDES

Três moléculas hóspedes foram escolhidas para interagir com a amilose formando complexos de inclusão: rifampicina (RIF), rodamina B (RB) e azul de bromotimol (AB). Estas foram escolhidas por apresentarem características estruturais diferentes que podem influenciar a formação dos complexos de inclusão desenvolvidos.

Os valores de pKa das moléculas hóspedes e das moléculas hospedeiras bem como suas solubilidades em água são mostrados na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1. Valores de pKa e solubilidade das moléculas utilizadas.

Amostra	pKa1	pKa2	Solubilidade em água []
AM	12,5	-	Pouco solúvel (0,5 g.L ⁻¹)
AMA	-	-	Solúvel (0,5 g.L ⁻¹)
RIF	1,7 (OH)	7,9 (Neutro)	Solúvel (1,3 g.L ⁻¹) (0,05 g.L ⁻¹)
RB	3,22	-	Fracamente Solúvel (0,01 g.L ⁻¹)
AB	7,10	-	Pouco Solúvel (0,5 g.L ⁻¹)

3.3.1. Rifampicina (RIF)

3.3.1.1. Histórico e estrutura química de RIF

Rifampicina (RIF) é um fármaco antibiótico pertencente à família da rifamicina¹⁰³ derivado da rifamicina B, produzida por cepas de *Nocardia Mediterranei* (*Streptomyces*)¹⁰⁴. Agentes antibióticos, tais como RIF, são capazes de ajudar na inibição e prevenção do crescimento de microrganismos¹⁰³.

A rifamicina foi isolada inicialmente em 1959 e em 1962 foi lançada como fármaco no tratamento de várias doenças tais como tuberculose (TB), lepra e outras infecções. Após vários estudos e modificações, RIF foi finalmente desenvolvida, bem como vários outros derivados de rifamicina¹⁰³. A introdução de RIF em 1968 encurtou consideravelmente a duração do tratamento da TB. RIF difunde-se livremente nos tecidos, células vivas e bactérias tornando-se extremamente eficaz contra os agentes patogênicos intracelulares¹⁰⁵.

A fórmula estrutural da RIF é mostrada na figura 9. Esta molécula tem muitos grupos hidroxilas livres, sendo que os capazes de reagir são aqueles ligados aos anéis benzênicos, porque não têm nenhum impedimento estérico¹⁰⁶. Sua solubilidade em água é $\sim 1,3 \text{ g.L}^{-1}$, sua massa molecular é $822,94 \text{ g.mol}^{-1}$ e sua fórmula molecular é $\text{C}_{43}\text{H}_{58}\text{N}_4\text{O}_{12}$ ¹⁰⁶.

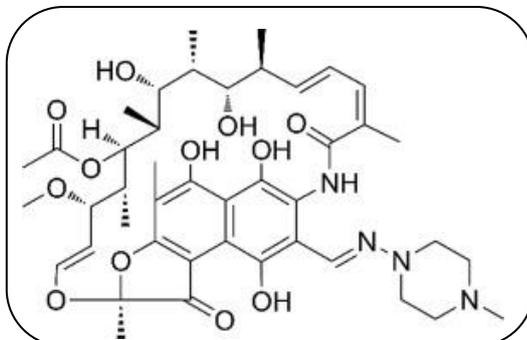


Figura 9. Estrutura da RIF¹⁰⁶.

A substância RIF é um pó cristalino marrom avermelhado¹⁰⁷. Ela tem características anfóteras (“*zwitterion*”) com pKa de 1,7 relacionado ao grupamento 4-hidroxila e pKa de 7,9, relacionado ao nitrogênio do grupo piperazina.

Em solução aquosa, o seu ponto isoelétrico é igual a 4,8. Este fármaco é levemente solúvel em água e devido a sua natureza anfótera, a sua solubilidade e estabilidade variam de acordo com o pH e a máxima estabilidade é conseguida mais próxima da neutralidade¹⁰⁴. Por outro lado, RIF é muito solúvel em etanol, acetato de etila, clorofórmio e outros solventes orgânicos¹⁰⁷.

O espectro de absorção no UV-vis em meio neutro (água destilada) na gama de comprimentos de onda de 200 a 700 nm, apresenta dois picos máximos bem definidos: um em 333 nm (correspondente ao grupo carbonil¹⁰⁷) e outro em 472 nm¹⁰⁸. Contudo, de acordo com a literatura, RIF apresenta um anel benzeno, sendo assim, sua estrutura bicíclica, apresenta três bandas de absorção. No entanto, esta absorção ocorre no comprimento de onda 184 nm, a qual é inferior às bandas deste estudo, não sendo assim registrada.

Além disso, sua estrutura é complexa e apresenta numerosas ligações duplas (Figura 9) e suas características estruturais eletrônicas podem ser divididas em três partes: a estrutura bicíclica (Figura 10a), estrutura bicíclica e o grupo piperazina (Figura 10b) e a estrutura bicíclica contendo o grupo carbonil (Figura 10c)¹⁰⁷.

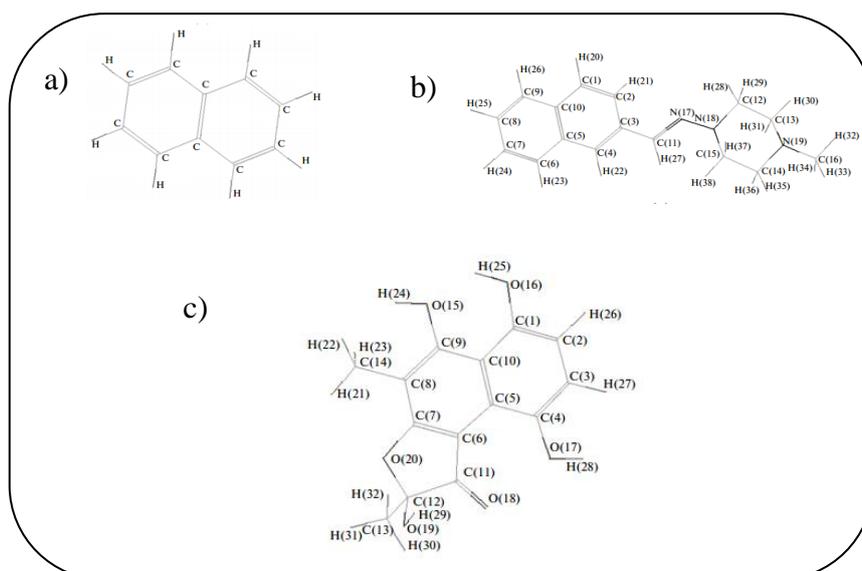


Figura 10. Fragmentos estruturais da molécula e RIF: a) fragmento contendo a estrutura bicíclica; b) fragmento contendo a estrutura bicíclica e o grupo piperazina e c) fragmento contendo a estrutura bicíclica e o grupo carbonil¹⁰⁷.

A banda de absorção em 333 nm corresponde ao elétron localizado no átomo de oxigênio do grupo carbonil que faz a transição do orbital π ligante para o orbital π antiligante (transição π - π^*). Já a banda em 472 nm é causada pelo elétron de valência no cromóforo C = N em transição do orbital π ligante para o orbital π antiligante (transição π - π^*)¹⁰⁷.

3.3.1.2. Aplicabilidade de RIF no tratamento de doenças infecciosas

A rifampicina (RIF), como dito acima, é um antibiótico semissintético que tem sido amplamente usado para tratar ou prevenir a doença tuberculose e outras infecções bacterianas, tais como a lepra, profilaxia da meningite meningocócica e infecções da *Haemophilus influenzae*¹⁰⁹. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) este antibiótico hidrofóbico¹⁰⁹ é uma dos fármacos de primeira linha recomendado para o tratamento da tuberculose^{110, 111}.

No entanto, apesar dos fármacos usados no tratamento desta doença estarem disponíveis há mais de 50 anos, a TB continua a ser a principal causa de mortes evitáveis¹¹². De acordo com o Relatório Global da Tuberculose (*Global Tuberculosis Report*) de 2015, estima-se que 9,6 milhões de pessoas desenvolveram a doença em 2014, 1,5 milhões morreram sendo que 0,4 milhão dos quais eram HIV positivo¹¹³.

Um dos motivos que explica este fato é a farmacoterapia prolongada e a carga de comprimidos utilizada no tratamento¹¹²: a posologia padrão recomendada consiste no uso de

quatro fármacos conhecidos como isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol¹¹⁴ durante 2 meses, seguido de 4 meses com rifampicina e isoniazida¹¹³.

O uso de RIF (quando administrada em conjunto com os demais fármacos) reduz o tempo de tratamento da TB de 12 para 6 meses e para infecções latentes, de 9 para 3 meses. No entanto, o uso deste fármaco causa diversos efeitos adversos, os quais incluem náuseas, vômitos, perda de peso, hepatotoxicidade, reações gastrointestinais, reações cutâneas e imunológicas graves. Além disso, sua coloração alaranjada causa efeitos na urina, suor e lágrimas, podendo até danificar lentes de contato^{112, 115, 116}. Além destes efeitos secundários, o período de tratamento prolongado dificulta a administração do fármaco, o que facilita o desenvolvimento da tuberculose multiresistente¹¹⁶.

Como é visto acima, há medicamentos disponíveis no mercado para o tratamento de doenças infecciosas. Porém, seu uso pode acarretar efeitos colaterais ao organismo, visto que a maioria desses fármacos exibe fracas propriedades biofarmacêuticas que comprometem a sua biodisponibilidade direta ao sítio de ação¹¹¹.

Desta forma, os fatos acima expostos confirmam a necessidade do desenvolvimento de agentes antimicrobianos novos e mais eficazes e produtos farmacêuticos destinados a tratar cepas resistentes.

O desenvolvimento de sistemas de entrega de medicamentos inovadores para a administração de agentes anti-infecciosos pode representar um avanço neste campo, e a criação dos mesmos reduziria o tempo de tratamento, bem como melhoraria o efeito terapêutico do uso do mesmo^{109, 111}.

Com este intuito, nos últimos anos, várias abordagens foram usadas para aumentar a solubilidade e biodisponibilidade da RIF, tais como o desenvolvimento de lipoesferas fosfolipídicas de RIF para liberação oral^{117, 118}, nanopartículas desenvolvidas com polímeros PEG e DSPE para liberação pulmonar¹¹⁰, complexos formados entre RIF e enzimas bacterianas (RNA polimerase)¹⁰⁵, formação de complexos de inclusão com RIF e hidroxipropil- β -ciclodextrina^{109, 119}, associação de RIF com dendrímeros (polímeros globulares altamente ramificados)¹¹⁶, entre outros.

Nestes sistemas, observou-se que a solubilidade e eficácia foram melhoradas após a formação do complexo.

Por outro lado, a RIF é instável se usada sozinha, bem como na presença de isoniazida (INH). Na presença deste outro fármaco RIF pode interagir levando a formação de uma hidrazona insolúvel¹¹⁶. Além deste fato, a degradação é dependente do pH. Na forma

ácida (condições gástricas), RIF sofre hidrólise que conduz a compostos ainda menos solúveis, tais como 3-formil-rifampicina¹¹⁶. Já em meio alcalino, devido à oxidação do ar, se converte em rifampicina quinona (RQ) (Figura 11), um derivado inativo¹¹⁸.

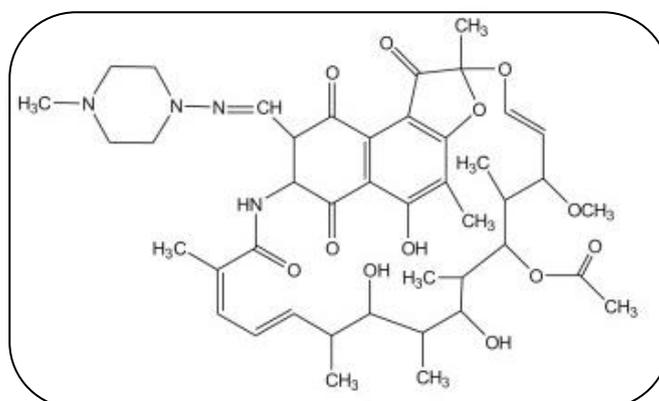


Figura 11. Estrutura química da RIF quinona (RQ)¹¹⁸.

Como vê-se acima, nos últimos anos, muitos estudos têm sido desenvolvidos utilizando RIF como molécula hospede. No entanto, ainda não se chegou a um sistema de liberação satisfatório que reduza os efeitos colaterais e diminua de forma significativa a frequência de utilização deste fármaco. Sendo assim, os dados acima expostos mostram a importância e validade deste estudo com amilose como molécula hospedeira para este tipo medicamento.

3.3.2. Rodamina B (RB)

3.3.2.1. Estrutura química de RB

As rodaminas são um grupo de corantes fluorescentes, que incluem a rodamina B, rodamina 6G, rodamina 123, entre outras¹²⁰. RB é um dos importantes corantes fluorescentes da família dos xantenos^{121, 122}. Sua fórmula molecular é $C_{28}H_{31}N_2O_3$, sua massa molecular é de $479,01 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ e é encontrada na forma de cristais esverdeados ou pó vermelho-violeta^{123, 124} (Figura 12).

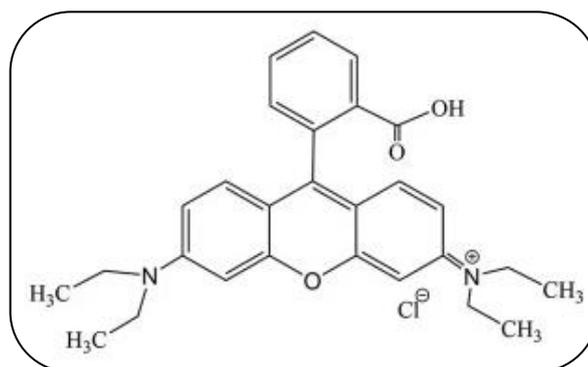


Figura 12. Estrutura química da RB¹²⁵.

RB é uma molécula interessante que suporta dois grupos aromáticos perpendiculares: um zwitteriônico (bipolar) em pH superior a 3,2 e em concentrações inferiores a 10^{-5} M, por isso pode-se esperar que as interações eletrostáticas de longo alcance sejam minimizadas nestas condições, permitindo a exploração das interações de curto alcance¹²⁶, ou seja, interações que atuam a pequenas distâncias de separação intermolecular¹²⁷.

Este corante existe em soluções como cátion HR^+ (forma catiônica) e uma forma neutra R (forma anfótera - *zwitterionic*)^{128, 129}. Esta última é representada por uma mistura de equilíbrio da zwitteriônica R fluorescente e colorida e uma lactona R^o incolor, a qual existe em alguns solventes, exceto em água onde a fração R^o é pequena demais para ser registrada experimentalmente¹²⁸ (Figura 13).

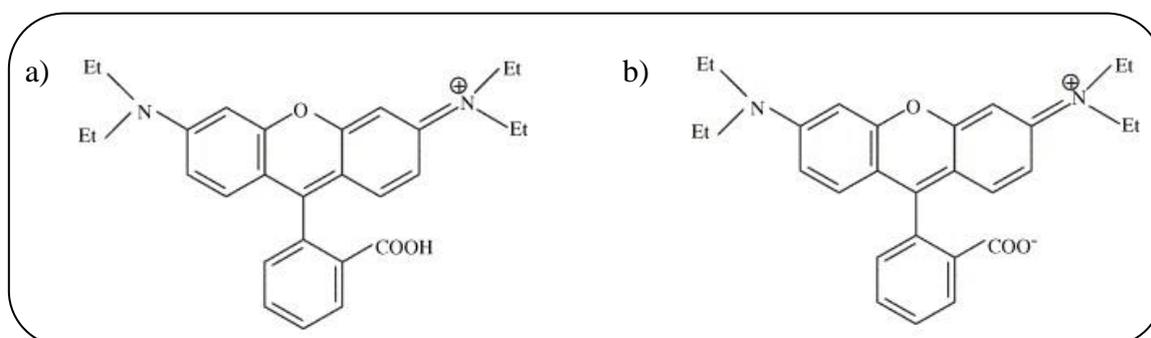


Figura 13. Fórmulas moleculares adquiridas em solução para RB: a) como um cátion HR^+ (forma catiônica) e b) na forma neutra R^o (anfótera - *Zwitterionic*)^{128, 129}.

Em água pura e em sistemas ricos em água, os espectros de absorção e excitação das espécies neutra e catiônica são bastante semelhantes com absorções máximas em 553 nm e 557 nm, respectivamente^{121, 128}, sendo solúveis em água¹²¹.

3.3.2.2. Aplicabilidade de RB

Suas propriedades ópticas dependem de vários fatores, tais como concentração e pH. O grupo carboxílico participa do equilíbrio ácido-básico típico, em que a formas ácida e básica são fortemente luminescentes e coloridas¹³⁰. Esta propriedade de luminescência a torna muito útil como marcador. Ou seja, a mesma pode ser usada como uma sonda em estudos de vários materiais, incluindo sistemas biológicos, sensores e etc¹³¹. Este corante ainda pode ser usado como reagente analítico, corantes nas indústrias, incluindo as fábricas de vidros, fogos de artifício, papel, têxtil, plástico, tintas e pesticidas. Além disso, estudos referem-se também a aplicação destes corantes em alimentos e cosméticos¹²¹.

Ou seja, a aplicabilidade dos corantes da família dos xantenos é extensa. As indústrias têxteis, por exemplo, utilizam uma grande variedade de corantes em sua produção (há aproximadamente 20 – 30 grupos diferentes de corantes disponíveis no mercado)¹³². Destes grupos, existem mais de 100 000 disponíveis comercialmente e mais de 7.10⁵ toneladas são produzidos anualmente.

No entanto, apesar de sua extensa aplicabilidade, o uso de RB tem uma desvantagem ambiental. Devido a sua solubilidade, estes corantes são poluentes comuns e podem ser encontrados em efluentes industriais²⁸. A água residual produzida a partir do seu uso é descartada no meio aquático e este fato representa um grande problema para as indústrias, primeiramente devido aos regulamentos ambientais rigorosos para o seu descarte¹³². Outro fator preocupante relacionado a esta água residual no meio aquático, refere-se ao fato de que o descarte pode obstruir o processo de fotossíntese em cursos d'água^{28, 132}.

Adicionalmente, a Agência Internacional de Investigação do Câncer (*International Agency for Research on Cancer – IARC*) e a Autoridade para Segurança de Alimentos Europeia (*European Food Safety Authority – EFSA*) avaliaram RB como potencialmente genotóxica e cancerígena, e sua ingestão, inalação e contato com a pele pode causar intoxicação ou lesão aguda e crônica. Devido a estes fatos, o uso de RB como aditivo alimentar é proibido em muitos países. No entanto, para melhorar o aspecto de certos alimentos, algumas indústrias o adicionam em suas formulações. Este fato é perigoso, visto que o consumo de tais alimentos pode ameaçar a saúde humana¹²¹.

A partir dos fatos expostos acima, é possível perceber a necessidade de se remover os corantes das águas residuais dos efluentes gerados pelas indústrias. Devido a isto, vários

métodos físicos, químicos e biológicos para o tratamento das águas residuais contendo corantes, têm sido estudados nos últimos anos¹³³. Entre os métodos conhecidos citam-se floculação, membrana de filtração, técnicas eletroquímicas, ozonização, coagulação, precipitação, adsorção e etc²⁸. Além disso, vários biomateriais têm sido testados como carregadores, tais como amido¹³⁴, quitosana¹³⁵, sílica¹³³, ciclodextrina³⁹, entre outros.

Dentre estes processos estabelecidos para o tratamento de efluentes o processo de adsorção tem vantagens quanto aos demais processos físicos, tais como floculação, flotação e etc, principalmente devido à sua eficácia e economia. Além disso, este método não perturba a qualidade da água e não deixa nenhum produto tóxico, diferente do que ocorre em processos de degradação eletroquímica, bioquímica ou fotoquímica¹³⁶.

Atualmente, dentre os biomateriais testados para complexação com corantes, dá-se grande ênfase atualmente às ciclodextrinas, em especial a β -ciclodextrina e o amido^{28, 40, 134}. Primeiramente descobriu-se que materiais à base de β -ciclodextrina exibiram capacidades de adsorção elevada para moléculas fenólicas e corantes¹³⁷. Ciclodextrinas e polímeros do amido também foram sintetizados e avaliados para extração dos corantes na água¹³⁶. Os resultados mostraram que estes materiais são eficazmente usados como absorventes para a remoção de corantes.

A amilose, além de ser um dos polímeros do amido, semelhante à ciclodextrina, apresenta a cavidade central hidrofóbica ao passo que a superfície exterior é hidrofílica, e como já foi dito, esta importante propriedade permite que moléculas hóspedes possam dispersar em meio aquoso¹³⁸. Outro fato importante é que a ciclodextrina utilizada para encapsulamento é um dos polímeros mais caros entre os agentes encapsulantes, e complexos de inclusão de ciclodextrina tendem a formar grandes agregados em meio aquoso¹³⁸. Sendo assim, testar a viabilidade desta biomolécula para a inclusão de RB torna-se importante, visto que a partir das conclusões obtidas aqui pode-se desenvolver um método para extração deste corante em efluentes industriais, campo este ainda carente de meios alternativos baratos e ecológicos.

3.3.3. Azul de Bromotimol (AB)

3.3.3.1. Estrutura química de AB

O 3,3-dibromotimolsulfonftaleína, mais conhecido como azul de bromotimol (AB)¹³⁹ é um indicador químico para bases e ácidos fracos¹⁴⁰. AB exhibe alterações drásticas

no seu espectro de absorção no visível nos comprimentos de onda de 300 nm a 600 nm¹⁴¹. Em meio ácido e alcalino, AB apresenta cor amarelada na forma cíclica apolar¹⁴² e azulada na forma aniônica¹⁴² respectivamente, enquanto que em meio neutro, apresenta cor verde azulada¹⁴³.

É um ácido orgânico fraco, com composição química $C_{27}H_{28}Br_2O_5S$, com massa molecular¹⁴⁴ com valor de 624 g.mol^{-1} e estrutura formada por dois monoterpenos fenólicos, sendo um deles contendo um átomo de bromo e um grupo benzênico ligado a um éster sulfônico¹⁴⁵. Este corante é vendido na forma de um sólido como um sal de sódio e apresenta um cátion de sódio e pares de íons foram formados por substituição dos cátions de sódio com vários tipos de cátions de amônio quaternário hidrofóbicos¹⁴⁶ (Figura 14).

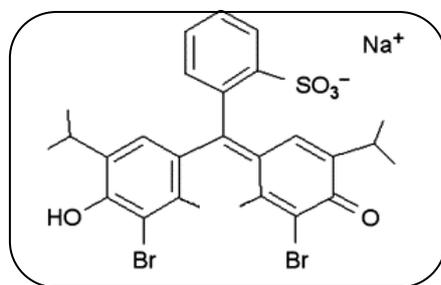


Figura 14. Estrutura química do AB¹⁴⁶.

3.3.3.2. Aplicabilidade de AB

Este composto é um corante hidrofóbico¹⁴² e devido a este fato tem uma grande aplicabilidade. O mesmo é um composto orgânico sintético muito usado como indicador em titulações do tipo ácido-base, na determinação do pH de soluções e de tecidos fisiológicos, em investigação de interações entre lipídios e proteínas, fármaco modelo em sistemas de liberação controlada de fármacos e etc^{139, 145, 147, 148}.

Esta última aplicação, é bastante utilizada. Conforme literatura^{149, 150}, quando um fármaco é absorvido a partir do trato gastrointestinal, uma porção principal entra na veia porta e outra vai para a circulação sistêmica. Depois de entrar na veia porta muitos fármacos são captados pelo fígado e metabolizados lá. Subsequentemente, os fármacos intactos bem como seus metabólicos são transportados para a circulação sistêmica ou são excretados na biliar (Figura 15).

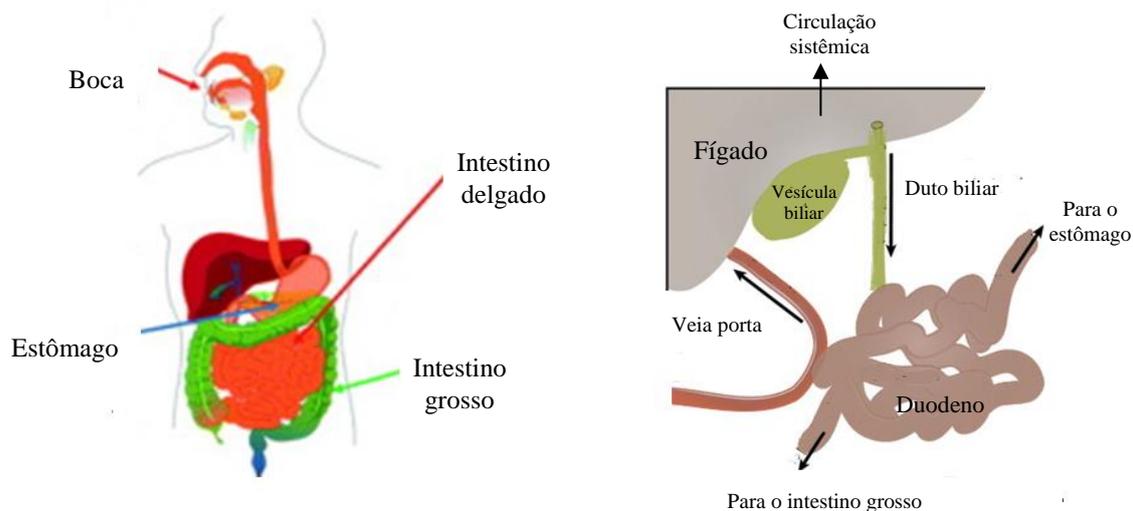


Figura 15. Representação esquemática: a) Sistema digestivo⁷⁸; b) Metabolismo de primeira passagem de um fármaco: quando um fármaco é levado para o trato gastrointestinal grande parte dele entra no fígado através da veia porta e uma pequena porção vai para a circulação sistêmica. A parte que entra no fígado sofre um metabolismo hepático e os metabólitos do fármaco são excretados de volta para o intestino através do duto biliar¹⁵¹.

Este fato chamado de “primeira passagem” pelo fígado tornou-se muito importante no campo biofarmacêutico. Para os fármacos aspirina, lidocaína e propranolol, por exemplo, foi observado ser necessário avaliar a “primeira passagem” antes de se estudar a biodisponibilidade do fármaco. Para esta avaliação três fatores estão envolvidos: a) captação hepática a partir da corrente sanguínea, (b) transporte intracelular e metabolismo nas células do fígado, e (c) de retorno a partir das células do fígado para o sangue ou a secreção em biliar¹⁵⁰.

Fármacos aniônicos e não metabolizantes são aqueles que entram na veia porta e rapidamente aparecem no fígado¹⁵⁰. AB é um composto aniônico e apresenta propriedades não-metabolizantes, sendo assim, ele encaixa-se perfeitamente como um fármaco modelo para drogas com características semelhantes. O motivo acima explica o uso desta molécula neste estudo.

6. PARTE EXPERIMENTAL

6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1. MATERIAIS

Amostras de amilose de batata de grau analítico ($M_w > 150\ 000$), rifampicina, Rodamina B e Azul de Bromotimol foram obtidos de Sigma Aldrich® e foram utilizadas sem purificação prévia. Utilizou-se ainda H₂O purificada (Milipore MilliQ), KOH, etanol 96 %, anidrido acético e NaOH, todos de grau analítico. Todos os demais reagentes químicos, de grau analítico, foram utilizados como recebidos.

6.2. MÉTODOS

6.2.1. Preparação da amilose acetilada

Amilose acetilada (AMA) foi produzida utilizando-se o método proposto por Mark e Mehlretter¹⁵², com modificações. Primeiramente, a AM foi seca em estufa a 50 °C por 12 h. Então, 1 g de AM foi dispersa em 3 mL de anidrido acético em um balão de fundo redondo. A suspensão foi agitada a 500 rpm com um agitador mecânico por 5 min. Como catalisador foram adicionados 30 % (0,9 mL) de NaOH 50%. A reação foi conduzida a 90°C e agitada por 90 min. Ao final da reação o balão foi resfriado até atingir a temperatura de 50 °C. Em seguida, AMA foi precipitada com a adição de 10 mL de álcool etílico (96 %) e centrifugada (Labofuge 200, Heraeus Instruments) a 3000 rpm por 10 min. A operação de lavagem e centrifugação foi realizada 5 vezes. Após, a AMA produzida foi seca em uma bomba de vácuo a $2 \cdot 10^{-2}$ mbar (bomba de vácuo RZ 2,5; Vacuubrand) por 12 h a 25 °C.

6.2.2. Caracterização da amilose acetilada (AMA)

6.2.2.1. Ganho em massa (GM) da AMA

Para determinar o ganho de massa (GM) de AMA a massa da amostra antes e após acetilação foi medida. Após fez-se o cálculo conforme equação 1.

$$GM = \left(\frac{m_{AMA} - m_{AM}}{m_{AM}} \right) \times 100 \quad 1$$

Onde:

m_{AM} : massa de AM (g);

m_{AMA} : massa de AMA (g).

6.2.2.2. Determinação do percentual de grupos acetila (% Ac) e do grau de Substituição (GS)

O percentual de acetilação (% Ac) e o grau de substituição (GS) foram determinados por titulação utilizando o método sugerido por Wurzburg¹⁵³ com modificações. AMA (0,1 g de amostra) foi colocada em um frasco de vidro e 5 mL de etanol 75% foi adicionado. A suspensão foi agitada e aquecida a 50 °C durante 30 min. Após, 4 mL de solução aquosa de KOH 0,2 M foram adicionados e a solução formada foi agitada durante 1 h. O excesso de álcali foi titulado com HCl 0,2 M utilizando fenolftaleína como indicador (Figura 16). Uma amostra de AM (branco) também foi analisada como controle. O experimento foi realizado em duplicata.

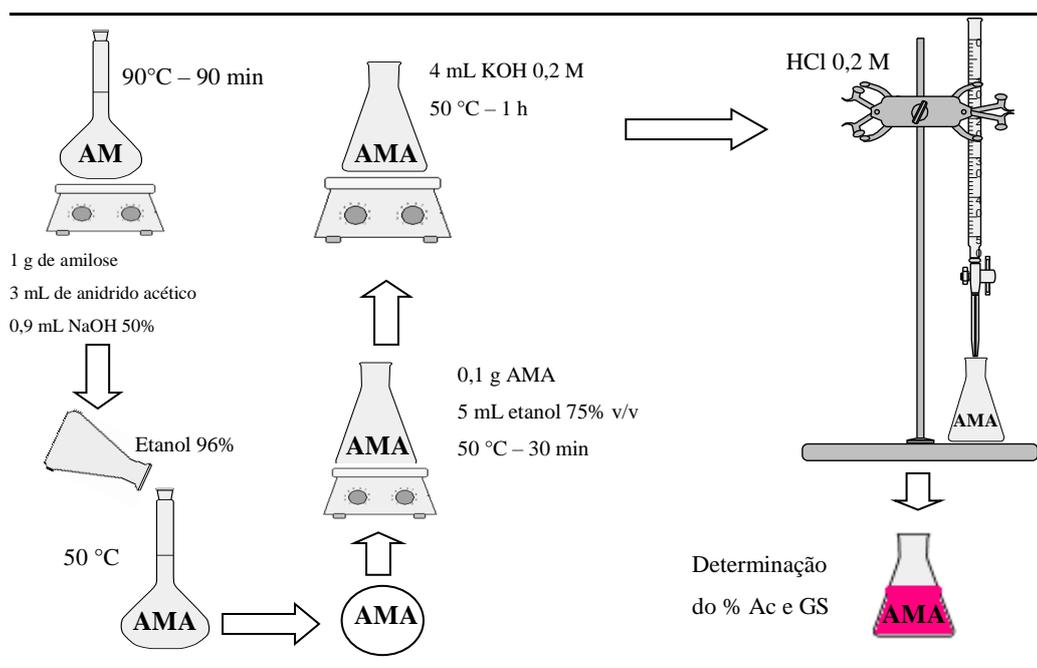


Figura 16. Fluxograma para determinação do percentual de grupos acetila (% Ac) e do grau de substituição (GS).

Para determinação do percentual de acetilação (% Ac) e do grau de substituição (GS) utilizaram-se as equações 2 e 3 abaixo.

$$\%Ac = \frac{[(v_2 - v_1/1000 \text{ mL}) \times \text{molaridade HCl} \times 43 \times 100]}{m_{\text{amostra}} \text{ (g)}} \quad 2$$

$$GS = \frac{(162 \times \% Ac)}{[43 \times 100 - (42 \times \% Ac)]} \quad 3$$

Onde:

v_1 e v_2 : volume (mL) de HCl usado na titulação do branco e da amostra, respectivamente;

$m_{amostra}$: quantidade de amostra seca (g);

43: massa molecular dos grupos acetil ($g \cdot mol^{-1}$);

162: massa molecular das unidades de anidroglicose ($g \cdot mol^{-1}$);

42: massa molecular dos grupos acetil menos a massa molecular de átomos de hidrogênio ($g \cdot mol^{-1}$).

6.2.2.3. Confirmação da modificação de AM via Espectroscopia No Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia FTIR é uma medida do comprimento de onda e intensidade de radiação infravermelha de uma amostra¹⁵⁴. Esta técnica investiga as vibrações moleculares. Ou seja, os grupos funcionais podem ser associados com as bandas de absorção na região do infravermelho os quais correspondem às vibrações fundamentais dos grupos funcionais¹⁵⁵.

As amostras de AM e AMA foram caracterizadas usando um espectrofotômetro com transformada de Fourier (Perkin-Elmer Spectrum 400 FT-IR/FT-NIR spectrometer) equipada com um acessório de reflexão atenuada total (*Attenuated Total Reflection – ATR*). A região espectral foi medida a uma resolução de 4 cm^{-1} e 32 corridas foram realizadas na região entre 600 e 4000 cm^{-1} . Durante a análise as amostras de AM e AMA foram colocadas sobre o cristal de ATR na temperatura ambiente ($25 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

6.2.2.4. Morfologia dos grânulos da AM e AMA via Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura é um dos mais versáteis instrumentos disponíveis para a observação das características microestruturais de materiais sólidos¹⁵⁶.

As amostras de AM e AMA foram observadas utilizando um instrumento FE-SEM (EVO MA10, Zeiss, Alemanha). As amostras sólidas foram colocadas em fita de carbono e metalizadas uma fina camada de Au antes da aquisição da amostra. As imagens foram obtidas com uma tensão de excitação de 7,0 kV.

6.2.2.5. Análise termogravimétrica (TGA) de AM e AMA

A técnica TGA é uma técnica destrutiva, que determina a estabilidade térmica do material a partir da quantificação da perda de massa com o aumento da temperatura. A variação da massa é registrada em função da temperatura e do tempo, em um ambiente com atmosfera controlada. Esta perda de massa pode ser analisada a partir de dois métodos: análise termogravimétrica (TGA) e a partir das derivadas das curvas termogravimétricas (DTG). Enquanto TGA é uma técnica analítica que grava a perda/ganho de massa da amostra em função do tempo e temperatura, o DTG expressa a primeira derivada (dm/dt). DTG mostra assim picos cujas áreas são proporcionais à diferença de massa entre a amostra¹⁵⁷.

A estabilidade térmica das amostras foi avaliada por termogravimetria no equipamento SDT Q600 (TA Instruments). As análises foram realizadas sob atmosfera de nitrogênio (ultra puro) a uma taxa de vazão de 50 mL.min⁻¹ em cadinhos de Alumina. A taxa de aquecimento variou de 25 °C a 500 °C com razão de aquecimento de 10 °C.min⁻¹.

6.2.2.6. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) de AM e AMA

Análises de DSC foram realizadas em um calorímetro modelo DSC Q2000 (TA Instruments). As análises foram realizadas sob atmosfera de nitrogênio (ultra puro) a uma taxa de vazão de 50 mL.min⁻¹. A massa de amostra medida foi de aproximadamente 50 mg e uma capsula de alumínio (Tzero Aluminum) foi utilizada como referência. As rampas de aquecimento e resfriamento foram fixadas a uma taxa 10 °C.min⁻¹ e variaram em um intervalo de 25 °C e 390 °C.

6.2.3. Validação do método analítico para quantificação das moléculas hóspedes no complexo

Para garantir a desempenho do método, assegurando a confiabilidade dos resultados, os dados foram estatisticamente avaliados a partir dos parâmetros especificidade, linearidade, limites de detecção e limite de quantificação.

6.2.3.1. Especificidade

A especificidade do método foi avaliada através da comparação dos espectros de UV de AM e AMA, e das amostras contendo os fármacos-modelo. As varreduras foram realizadas entre os comprimentos de onda 200 a 700 nm e foram observados quanto à presença de bandas de interferência entre a amilose e as moléculas hóspedes.

6.2.3.2. Linearidade

A determinação da linearidade foi realizada a partir de três curvas padrão com sete concentrações diferentes para cada fármaco-modelo. A linearidade foi avaliada a partir da regressão linear, utilizando ajuste dos dados pelo método dos mínimos quadrados e analisada estatisticamente para definir o desvio padrão relativo e o coeficiente de correlação (r^2)¹⁵⁸. Além disso, realizou-se a análise de variância (ANOVA) das curvas obtidas.

6.2.3.3. Limite de detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

LD e LQ foram estimados matematicamente a partir da obtenção das curvas padrões resultantes da média das três curvas de calibração feitas anteriormente (para todas as moléculas-modelo). A determinação destes valores baseou-se no desvio padrão do residual da linha de regressão e sua relação com o coeficiente angular nas curvas padrão (Equação 4 e 5)¹⁵⁸.

$$LD = 3,3.\sigma/\alpha \quad 4$$

$$LQ = 10.\sigma/\alpha \quad 5$$

Onde:

σ : é o desvio padrão do intercepto com o eixo y das três curvas de calibração;

α : e é média do coeficiente angular da curva analítica.

6.2.4. Preparação dos complexos de inclusão

6.2.4.1. Complexo AM-RIF

Solução de AM na concentração 0,5 mg.mL⁻¹ foi preparada por dissolução em solução de KOH 0,1 M previamente submetida à atmosfera de nitrogênio. A solução foi

mantida em agitação magnética durante 6 h à 90°C até a sua dissolução total. Após, a solução de AM foi neutralizada com a adição de HCl 0,2 M².

Soluções de RIF (na concentração 0,05 mg.ml⁻¹), em água, foi preparada separadamente. A mesma foi agitada durante 30 min à 25°C protegida da luz e sob atmosfera de nitrogênio para evitar sua degradação.

Após a obtenção das soluções de AM e RIF iniciou-se o processo de preparação dos complexos de inclusão. Para isso as duas soluções foram misturadas na proporção 30:1, respectivamente, e posteriormente submetidas à agitação por 24 h à 40°C e 65°C (Figura 17).

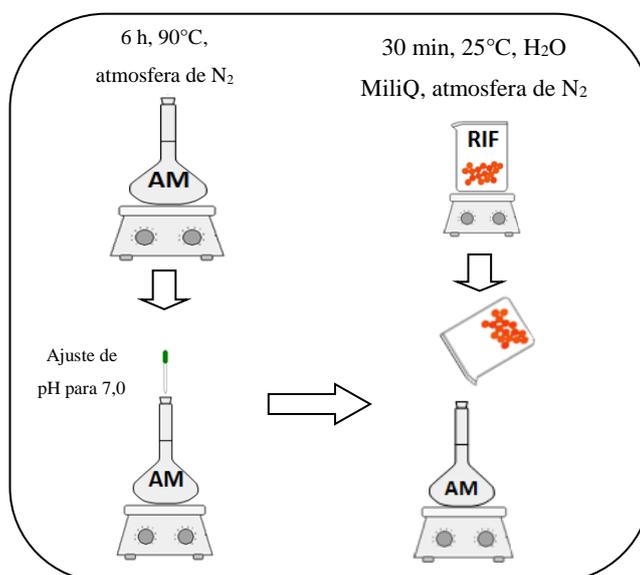


Figura 17. Fluxograma indicando a preparação do complexo AM-RIF.

6.2.4.2. Complexos AM-RB e AM-AB

Soluções de AM (na concentração 0,5 mg.mL⁻¹) foi preparada por dissolução em solução de KOH 0,1 M previamente submetida à atmosfera de nitrogênio. A solução foi mantida em agitação magnética durante 6 h à 90 °C até a sua dissolução total. Já as moléculas hóspedes RB e AB foram preparadas separadamente na concentração 0,01 mg.mL⁻¹ no solvente KOH 0,1 M durante 30 min à 25 °C².

Após esta etapa de dissolução dos dois componentes, os mesmos foram misturados (AM-RB e AM-AB) na proporção 30:1 e posteriormente submetidas à agitação por 24 h à 40 °C (Figura 18).

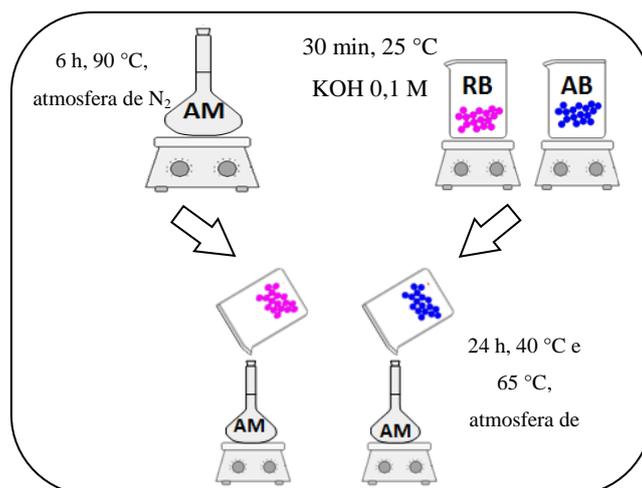


Figura 18. Fluxograma indicando a preparação do complexo AM-RIF.

6.2.4.3. Complexos de inclusão com AMA

Solução de AMA na concentração $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ foi preparada por dissolução em H_2O MiliQ previamente submetida à atmosfera de nitrogênio. A solução foi mantida em agitação magnética durante 6 h à $90 \text{ }^\circ\text{C}$ até a sua dissolução total.

A solução de RIF, RB e AB foram preparadas na concentração $0,05 \text{ mg.ml}^{-1}$, $0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$, respectivamente em H_2O MiliQ durante 30 min à $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Para a molécula RIF a solução foi preparada em atmosfera de nitrogênio e ao abrigo da luz. Após a obtenção das soluções iniciou-se o processo de preparação dos complexos de inclusão. No processo os dois componentes (AMA-RIF, AMA-RB e AMA-AB) foram misturados na proporção 30:1 e posteriormente submetidos à agitação por 24 h à $40 \text{ }^\circ\text{C}$ e $65 \text{ }^\circ\text{C}$ (Figura 19).

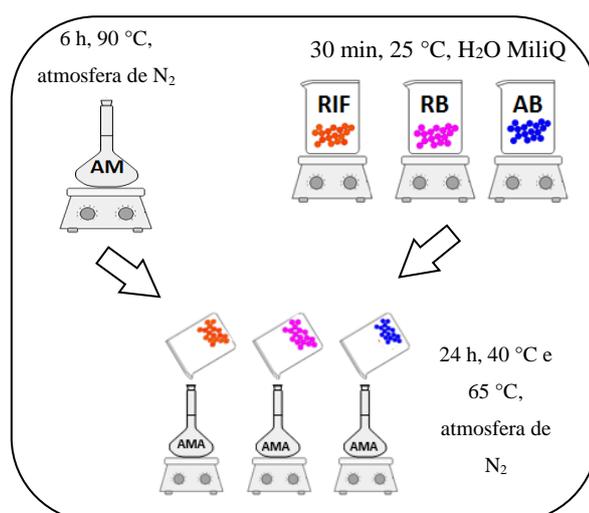


Figura 19. Fluxograma indicando a preparação dos complexos de inclusão AMA-RIF, AMA-RB e AMA-AB.

6.2.5. Caracterização dos complexos de inclusão

6.2.5.1. Medidas de espectroscopia de UV

Os espectros na região ultravioleta e visível (UV-Vis) foram obtidos no espectrômetro Perkin-Elmer 554 usando uma célula de 1 cm. Um branco com cada solvente foi feito antes das análises.

6.2.5.2. Quantificação espectrofotométrica das moléculas hóspedes e determinação da eficiência de encapsulamento e da capacidade de carga dos complexos de inclusão desenvolvidos

A análise quantitativa das moléculas-modelo nos complexos desenvolvidos em solução, após a escolha do melhor comprimento de onda, foi feita por espectrofotometria no UV. Para isto, obteve-se inicialmente a curva de calibração absorvância *versus* concentração a partir de sete concentrações de moléculas-hóspedes RIF, RB e AB. Os solventes utilizados para a dissolução das moléculas-hóspede foram KOH 0,1 M neutralizado (para RIF), KOH 0,1 M (para RB e AB) e H₂O miliQ (para RIF, RB e AB).

O doseamento foi efetuado por absorção espectroscópica nos comprimentos de onda (λ) determinados a partir de testes preliminares. Estes comprimentos de onda foram escolhidos pois são os que melhor identificam a formação do complexo.

A quantidade de moléculas hóspedes associadas aos complexos de inclusão foi determinada pelo parâmetro eficiência de encapsulamento (% EI) e capacidade de carga (% CC) (Eq. 6 e 7)¹⁵⁹.

A eficiência de inclusão avalia qual a porcentagem total de fármaco presente na partícula em relação à quantidade de fármaco total adicionado na formulação, ou seja, parte da quantidade de fármaco adicionado estará encapsulada e parte estará livre na dispersão. Já a capacidade de carga avalia a quantidade de fármaco encapsulado em função da quantidade de molécula hospedeira presente¹⁵⁹.

$$EI \% = \frac{C_{Total} - C_{Livre}}{C_{Total}} \times 100 \quad 6$$

$$CC \% = \frac{C_0 - C_{Livre}}{W} \times 100 \quad 7$$

Onde:

C_{Total} : concentração total de molécula-modelo (mg.mL^{-1});

C_{Livre} : concentração de molécula-modelo livre na solução (mg.mL^{-1});

C_0 : concentração inicial de molécula-modelo na solução (mg.mL^{-1});

W : quantidade de molécula hospedeira (mg.mL^{-1}).

As concentrações foram obtidas a partir das retas de calibração obtidas e validadas a partir da técnica espectrofotométrica de UV.

6.2.5.3. Medidas de Espalhamento de Luz Dinâmico dos complexos de inclusão em solução

A técnica de espalhamento de luz dinâmica é normalmente utilizada para investigar o comportamento de polímeros em solução na escala nanométrica¹⁶⁰. Ela utiliza a intensidade e a polarização da luz dispersa (Equação 8) a partir de uma amostra em solução para caracterizar o tamanho, a forma e as interações das partículas em solução^{154, 160}.

$$g_2(\tau) = \lim_{T \rightarrow \infty} \left[\frac{1}{T} \int_0^T I(t)I(t + \tau) dt \right] \quad 8$$

Onde $I(t)$ representa a intensidade de espalhamento de luz nos tempos t e $t + \tau$ e τ é o tempo de atraso (ou “*delay time*”). O fator 2 indica uma função de correlação de segunda ordem¹⁵⁴.

Para amostras polidispersas, a função é de primeira ordem sendo representada por uma soma ou uma integral sobre a distribuição das taxas de decaimento (Equação 9)¹⁶¹

$$g_1(\tau) = \int_0^\infty G(\Gamma) \exp(-\Gamma\tau) d\Gamma \quad 9$$

Onde $\Gamma(\tau^{-1})$ é a frequência de relaxação do movimento dinâmico da partícula em observação e $G(\Gamma)$ é normalizada de forma que (Equação 10),

$$\int_0^\infty G(\Gamma) d\Gamma = 1 \quad 10$$

A partir da técnica de DLS pode-se determinar o raio hidrodinâmico (R_h) obtido pela equação de Stokes-Einstein (Equação 11), onde k_B , T , η e D correspondem à constante de Boltzmann, a temperatura absoluta e a viscosidade do solvente, respectivamente^{154, 160}.

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta}$$

O tamanho hidrodinâmico, na técnica de espalhamento de luz, é chamado de raio hidrodinâmico (R_h). O R_h é o raio da esfera hipotética que se difunde com a mesma velocidade que as partículas analisadas por DLS. Assim, o valor do R_h é hipotético pois raramente existem esferas rígidas em dispersões coloidais. Na realidade, as partículas dispersas são hidratada/solvatada formando regiões não esféricas. As mesmas têm um movimento dinâmico e flutuam ao longo do tempo, dependendo da força iônica, tipos de moléculas, natureza do solvente, seu tamanho e da temperatura. Ou seja, o R_h , calculado na técnica de DLS, fornece apenas um tamanho indicativo do sistema coloidal¹⁶².

O índice de polidispersão (*P.d.I*) descreve a distribuição de tamanhos da partícula. Este parâmetro é usado no método dos cumulantes usado nas medidas de DLS. Sua determinação é feita relacionando a taxa de relaxação média (Γ) com a variação de distribuição (μ_2) (Equação 12)¹⁶³.

$$P.d.I = \frac{\mu_2}{\Gamma} \quad 12$$

As suspensões produzidas durante o processo de complexação foram analisadas em um espectrômetro de espalhamento de luz Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, USA), com laser de He-Ne ($\lambda_0 = 632,8$ nm com um ângulo de espalhamento de 173°) como fonte de radiação à temperatura de $25 \pm 0,1$ °C. A distribuição de tamanhos das partículas foi analisada por espalhamento de luz dinâmico (DLS). Todas as soluções foram filtradas através de um filtro de $0,45 \mu\text{m}$ (PTFE – Millipore Millex) antes das análises. Os resultados foram obtidos em triplicata.

6.2.5.4. Potencial Zeta (PZ) dos complexos de inclusão em solução

O potencial zeta (PZ) é definido como o potencial eletrostático na camada da mobilidade eletroforética das partículas e seus valores afetam grandemente a estabilidade dos sistemas coloidais por forças eletrostáticas¹⁶⁴. Sendo assim, esta técnica pode ser usada para prever estabilidade e agregação entre as partículas¹⁶⁵.

A camada interna é composta predominantemente por íons/moléculas com carga oposta à das partículas (camada de Stern). Embora matematicamente esse efeito eletrostático estende-se até o infinito, experimentalmente, ele só está presente poucos nm da superfície da partícula. Cabe ressaltar que a composição desta camada difusa é dinâmica e oscila de acordo com uma variedade de fatores, tais como pH, força iônica, concentração. Quando um

campo elétrico é aplicado a tal dispersão, as partículas carregadas avançam para o eletrodo oposto (eletroforese). Dentro desta camada difusa existe um plano hipotético que atua como interface entre as partículas que se deslocam e a camada dispersante em torno dela. Este plano é característico de um plano de cisalhamento e PZ é o potencial nesta interface¹⁶².

Os valores de PZ não podem ser medidos diretamente, sendo deduzido a partir da mobilidade eletroforética (μ_e) das partículas carregadas sob um campo elétrico aplicado (Equação 13)¹⁶².

$$\mu_e = \frac{V}{E} \quad 13$$

Onde V e E correspondem a velocidade da partícula ($\mu\text{m/s}$) e campo elétrico (V/cm), respectivamente. O PZ é então calculado a partir da mobilidade eletroforética com a equação de Henry (Equação 14):

$$\mu_e = \zeta \frac{\varepsilon}{1,5\eta} f(ka) \quad 14$$

Onde ζ é o potencial zeta (PZ), ε é a constante dielétrica do meio, η a viscosidade e $f(ka)$ é a função de Henry (onde, para soluções aquosas, têm valor igual a 1,5)¹⁵⁴.

As medidas de PZ foram realizadas em equipamento Zetasizer Nano (Malvern Instruments, EUA) em $\lambda = 632,8 \text{ nm}$ à $25 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$ usando um laser He-Ne. Os valores de ZP foram calculados através da mobilidade eletroforética de acordo com a equação de Henry e a aproximação de Smoluchowski¹⁶⁶. As soluções contendo os complexos de inclusão foram medidas à 25°C . A mobilidade eletroforética de cada amostra foi medida 3 vezes e no mínimo 10 corridas foram realizadas em cada medida.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMA

7.1.1. Determinação do Ganho de Massa (GM), do percentual de acetila (% Ac) e do grau de substituição (GS)

De acordo com a literatura¹⁶⁷, sabe-se que nas reações de acetilação os grupos hidroxilas das cadeias são substituídos por grupos acetila. Como o grupo acetila apresenta massa maior que os grupos hidroxila observa-se um aumento na massa do material modificado. Este ganho em massa está relacionado a uma maior taxa de acetilação.

No estudo observamos GM de 16,6 % (Tabela 2). Este resultado é um indicativo de que ocorreu a modificação química, ou seja, a amilose nativa (AM) passa a ser uma amilose acetilada cujo nome agora será “amilose acetilada” (AMA).

Tabela 2. GM, % Ac e GS da AMA da amilose nativa e acetilada*

Amilose	GM (%)	% Ac	GS	Solubilidade em H₂O no pH neutro (g.L⁻¹)
Nativa	0	0	0	Traços
	16,5	18,9	0,87	Solúvel (0,5 g.L ⁻¹)
	16,7	18,5	0,85	Solúvel (0,5 g.L ⁻¹)
Acetilada	-	16,8	0,76	Solúvel (0,5 g.L ⁻¹)
	16,6± 0,1	18,7 ± 0,3	0,86 ± 0,01	

*Para GM tem-se resultados de duas determinações (p < 0,05) e para % Ac GS os resultados obtidos são de três determinações (p < 0,05).

Por outro lado, sabe-se que as propriedades físicas dos materiais acetilados são determinadas pelo GS^{168, 169}. O GS indica o número médio de grupos hidroxila substituídos por unidades de anidroglicose^{20, 170}. Como cada unidade de anidroglicose possui três grupos hidroxilas disponíveis para substituição^{170, 171} (OH-2, OH-3 e OH-6), o grau de substituição máximo é 3 (Figura 20).

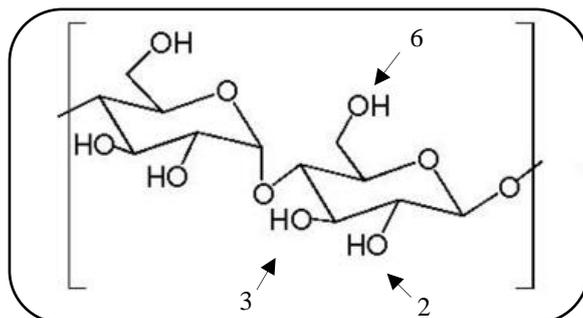


Figura 20. Representação dos grupos hidroxilas 2-OH, 3-OH e 6-OH disponíveis para as reações químicas.

Conforme literatura¹⁷², a acetilação do amido ocorre por um mecanismo de adição-eliminação. Cada um dos três grupos hidroxilas livres do amido mostram reatividade diferente. O carbono primário OH-6 é mais reativo e é acetilado mais rapidamente do que os carbonos secundários em OH-2 e OH-3 devido ao impedimento estérico. Este fato pode justificar o mais alto grau de substituição do amido com baixo teor de amilose. Dos dois grupos OH secundários, o carbono em OH-2 é mais reativo do que o carbono em OH-3, principalmente porque o primeiro é mais próximo do hemiacetal e mais ácido do que o segundo. Como o carbono em OH-6 é o mais reativo, o mesmo têm sido o principal sítio reativo para a substituição dos grupos hidroxilas por grupos acetilas.

No entanto, acetatos com GS elevados são praticamente insolúveis em H₂O, sendo inadequados para o estudo em questão. Em oposição tem-se acetatos com baixos GS, caracterizados por uma maior solubilidade em H₂O¹⁶⁸. Neste estudo, os resultados revelaram que o percentual de acetila foi de $(18,7 \pm 0,3)$ % com um GS de $0,86 \pm 0,01$ (Tabela 2), o que corrobora com a maior solubilidade em água de AMA em relação à AM.

7.1.2. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR)

As mudanças estruturais causadas pela introdução do grupo acetil na amilose foram verificadas e confirmadas a partir de análises de FT-IR (Figura 21).

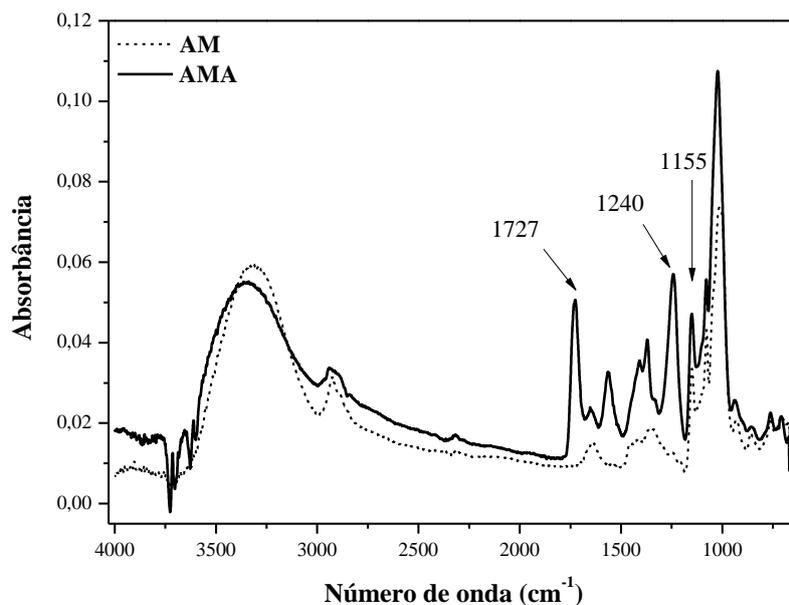


Figura 21. Espectro de FT-IR de AM (- -) e AMA (-).

Comparando o espectro da AMA ao espectro de AM, é possível observar o aparecimento de duas novas bandas em 1240 cm^{-1} (devido à vibração de estiramento C – O do grupo acetil) e em 1727 cm^{-1} (devido ao estiramento da ligação C=O)^{99, 173} (Fig 21). Estas bandas são atribuídas à absorvência do grupo carbonílico do éster proveniente do radical acetil¹⁶⁹ e é um indicativo de que os grupos acetila foram ligados covalentemente à molécula de amilose. Além disso, uma banda em 1155 cm^{-1} também indica a formação de um acetato de amilose¹⁷⁴.

Por outro lado, sabe-se que bandas na região $1850\text{-}1760\text{ cm}^{-1}$ e 1700 cm^{-1} são atribuídos ao anidrido acético^{169, 174} e ao ácido acético¹⁶⁹, respectivamente. Como neste estudo, no espectro de FT-IR (Figura 21) não se observa a presença destas bandas, pode-se concluir que o produto está livre destes compostos.

Finalmente, mudanças nas absorções correspondentes às vibrações de estiramento dos grupos hidroxilas (-OH), em $3000\text{ - }3600\text{ cm}^{-1}$, e em 1020 cm^{-1} , devido à vibração da ligação C-O¹⁷⁵, acompanhadas de uma diminuição nas absorções de vibrações de dobragem (1650 cm^{-1}) também foram observados no espectro (Figura 21) e são devidos à introdução dos grupos acetila na amilose, fato este que está de acordo com o encontrado nas análises de MEV vistas posteriormente (Figura 22)¹⁷⁶. Cabe salientar que a única banda em que houve um aumento e deslocamento na absorção foi a dos grupos hidroxilas. Esta banda é de grande interesse sendo caracterizada pelas ligações de hidrogênio que possuem um papel importante nos mecanismos biológicos.

7.1.3. Análise da morfologia da AM e AMA via Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Neste estudo, a partir da técnica de MEV, foi possível observar a integridade do material acetilado.

É observado que as partículas de AM (Fig. 22 a e b) são esféricas, com uma superfície lisa, com formação de alguns agregados, semelhante ao encontrado em outros estudos¹⁷⁷. Já para AMA (Fig. 22 c e d) é observado partículas esféricas, porém com uma superfície rugosa.

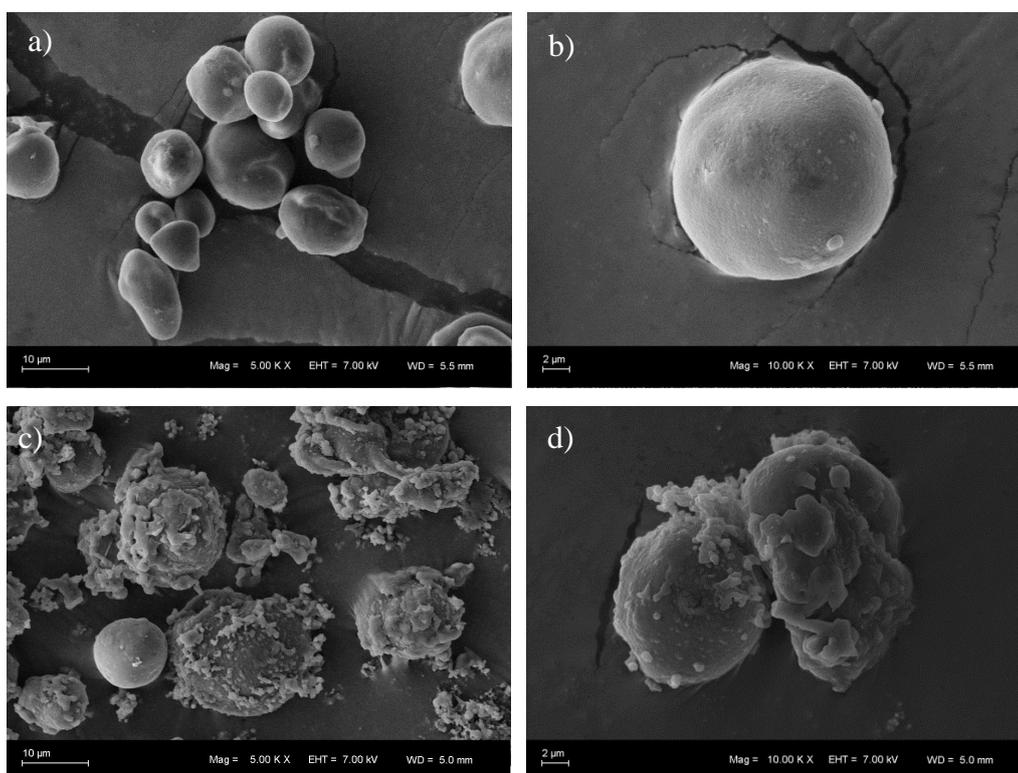


Figura 22. Fotomicrografias obtidas a partir de microscopia eletrônica de varredura para: a) e b) AM, c) e d) AMA.

De acordo com a literatura, a acetilação é um tratamento químico suave, que não afeta a integridade do material¹⁷⁷. No entanto, a superfície das partículas em AMA é rugosa. Esta rugosidade pode indicar o início da fusão do material, como observado em outros estudos^{178, 101}. Além disso, a fusão após a acetilação pode estar relacionada à introdução de grupos hidrofílicos à molécula de amilose, o que diminui as ligações de hidrogênio intermoleculares, como observado no UV-vis (Figura. 21)⁹⁸. Ou seja, a presença dos grupos acetila favorece a desorganização da estrutura, o que resulta na redução das forças

associativas entre as cadeias de AMA, as quais interferem nas ligações de hidrogênio intra e intermoleculares que estabilizam a estrutura¹⁷⁹. Este fato favorece a agregação das moléculas, promovendo a fusão das mesmas.

7.1.1. Análise termogravimétrica (TGA, DTG) da AM e AMA

A partir das curvas termogravimétricas da AM e AMA foi possível examinar as alterações na estabilidade térmica causada pela acetilação e também foi possível determinar a perda de massa do material em aquecimento¹⁸⁰.

Para AM (Fig. 23) observam-se duas perdas de massa no intervalo de 25°C à 500°C, a primeira em torno de 60-100 °C e a outra em torno de 300 °C. A primeira perda de massa é atribuída à perda de água da amilose. A absorção de água ou umidade do ambiente pela amilose é muito alta devido às ligações de hidrogênio formadas pelos grupos hidroxila das unidades de anidroglicose ao longo de sua cadeia¹⁸¹. A segunda corresponde à sua decomposição. Segundo a literatura^{181, 182}, nesta etapa ocorre a eliminação dos grupos polihidroxílicos, decomposição e despolicimerização das cadeias.

Para analisar a temperatura em que estas perdas ocorrem medidas da derivada da variação da massa em relação a temperatura (dm/dT) também foram realizadas (Figura 23).

A partir da DTG da AM (Fig. 23), observa-se que a decomposição ocorre a um pico em 321,65 °C. Além disso, na temperatura de 480 °C, 83 % da AM foi decomposta.

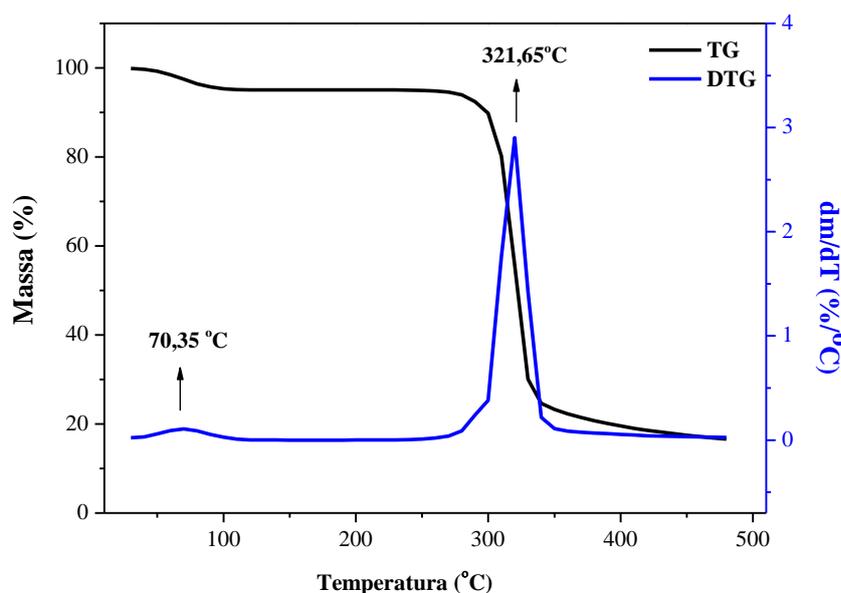


Figura 23. Curva de TGA da AM (—) e primeira derivada da TGA (DTG) da AM (—).

Comparando a curva de TGA da AM e AMA observa-se que para AMA também há uma perda de massa com o aumento da temperatura (Figura 24). No entanto, a primeira fase de perda de massa devido à desidratação da amilose foi menor em comparação à AM.

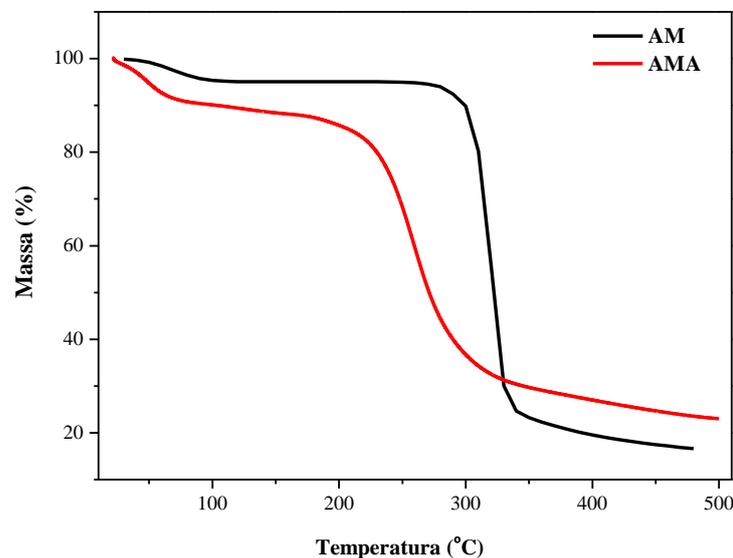


Figura 24. Curva de TG da AM (—) e AMA.

Além disso, ao se analisar a curva de TG (Figura 25) da AMA também se vê uma perda de massa em duas fases. No entanto, as temperaturas em que essas perdas ocorreram foram diferentes. Conforme DTG, a primeira perda, correspondente à perda de água, ocorreu em um pico de 46,54 °C e a segunda perda, correspondente à decomposição, ocorreu em 257,89 °C.

Como o ocorrido para a AM, o primeiro pico é atribuído à perda de massa de água e a uma temperatura de 480,45 °C, cerca de 76,46% da massa foi perdida. Sendo assim, os fatos acima mostram que a acetilação diminuiu a estabilidade térmica da amilose.

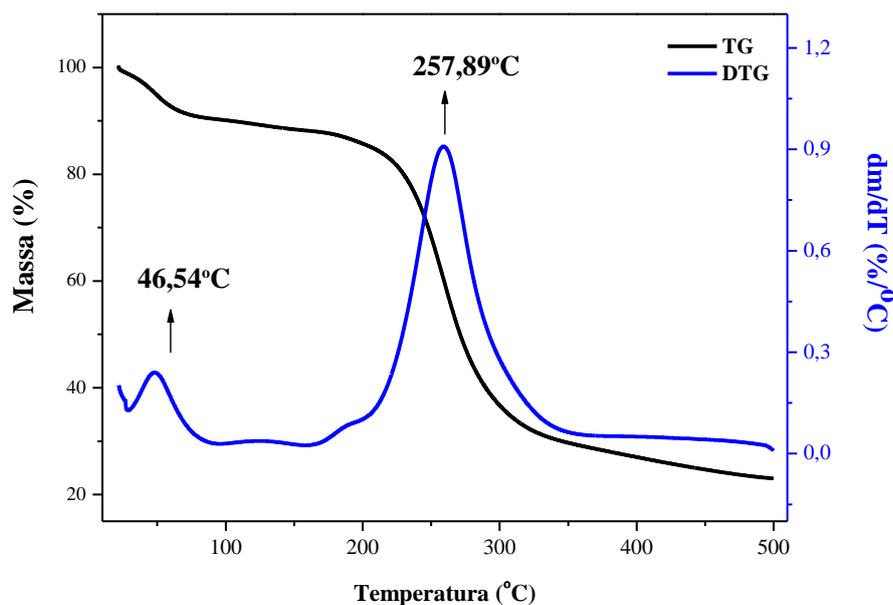


Figura 25. Curva de TGA da AMA (—) e primeira derivada da TGA (DTG) da AMA (—).

Sabe-se, de acordo com a literatura¹⁸⁰, que a estabilidade térmica de produtos acetilados aumenta com o aumento do grau de substituição. Este aumento na estabilidade deve-se à baixa quantidade de grupos hidroxilas remanescentes nas moléculas de amido (ou amilose) após a acetilação. Além disso, as ligações covalentes devido à acetilação dos grupos hidroxila bem como o aumento na massa molecular após a modificação são também responsáveis pelo aumento da estabilidade térmica¹⁷². Ou seja, um elevado grau de substituição produz um efeito benéfico sobre a estabilidade de materiais acetilados¹⁸⁰.

No entanto, para a amilose acetilada deste estudo (amilose parcialmente substituída, com valor de GS igual a 0,86), têm-se uma menor estabilidade, visto que a primeira região de perda de massa ocorreu à temperatura mais baixa, em comparação com a AM.

Este fato pode ser explicado, pois como o GS é baixo, o composto AMA, além de apresentar grupos acetila substituindo os grupos hidroxilas, o mesmo ainda apresenta grupos hidroxilas remanescentes. Desta forma, AMA apresentará uma fraca estabilidade térmica. Outro fator determinante para esta fraca estabilidade foi mostrado nas análises de MEV (Fig. 22), onde a amilose, após a acetilação, apresentou rugosidade. Esta rugosidade foi relacionada à introdução dos grupos hidrofílicos, que diminuíram as ligações de hidrogênio inter e intramoleculares, o que causa instabilidade do sistema e agregação. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores sobre ésteres de amido^{180, 181}.

7.1.2. Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (*Differential Scanning Calorimetry – DSC*)

Os parâmetros térmicos encontrados a partir das análises térmicas DSC de AM e AMA são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Propriedades térmicas e termodinâmicas de AM e AMA.

Amostra	Temperaturas de transição de fase (°C)*			$T_c - T_o$ (°C)	ΔH_g (J/g)
	T_o (°C)	T_p (°C)	T_f (°C)		
AM	45,6	110,2	163,2	117,6	228,8
AMA	55,1	114,5	165,8	110,8	176,7

* T_o = temperatura inicial; T_p = temperatura de pico endotérmico; T_f = temperatura fusão; $T_f - T_o$ = diferença entre temperatura final e inicial.

É possível observar que AMA apresenta diferenças no comportamento térmico em relação a AM. Amostras de AM apresentam um evento endotérmico entre 60 °C e 150 °C sendo que a temperatura de pico endotérmico é de 110,2 °C (Tabela 3). Este evento endotérmico de fusão é característico de polímeros semicristalinos ocorrendo devido a ampla distribuição de tamanho dos cristalitos. Evento semelhante já foi observado em outros estudos para amidos com alto teor de amilose⁷¹. Além disso a entalpia de AM é alta, com um valor de 228,8 J/g (Tabela 3). Para AMA, o evento endotérmico é deslocado para uma temperatura mais alta (entre 90 °C e 200 °C) e sua temperatura de fusão é de 140 °C. Para AMA, a entalpia diminuiu para 176,7 J/g.

A partir dos dados obtidos, comparando AM com AMA, observa-se que a acetilação diminuiu a entalpia (Tabela 3). A entalpia reflete principalmente a perda de hélices duplas e cristalinidade de AM⁹⁹. Neste estudo então, a diminuição da entalpia após a acetilação é um resultado das hélices duplas, presente em regiões cristalinas e não cristalinas do grânulo terem sido quebradas durante a reação de acetilação. Ou seja, ao acetilar determinado material, ocorre o enfraquecimento das forças de ligação inter e intramoleculares das moléculas de amilose, que reduzem a energia necessária para a hidratação e a interrupção da estrutura da amilose⁹⁹. Além disso, esta diminuição pode ser atribuída à introdução dos grupos acetila na espinha dorsal, fato este que aumenta a flexibilidade estrutural da molécula. A menor entalpia para AMA sugere uma menor porcentagem de estruturas cristalinas ou menos estáveis. Fato semelhante a este já foi observado em outros estudos^{183, 184}.

7.2. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DOS FÁRMACOS-MODELO A PARTIR DA TÉCNICA DE ESPECTROFOTOMETRIA DE UV-VISÍVEL

7.2.1. Otimização do método

A técnica de espectrofotometria de UV é um método eficiente para explorar a formação de complexos de inclusão¹⁸⁵. Além disso, esta técnica é útil para determinar o teor de moléculas hóspedes em complexos de inclusão⁹⁰.

Para otimização do método espectrofotométrico na região do ultravioleta, primeiramente investigou-se os espectros das moléculas-modelo. O objetivo foi definir as bandas de absorção máxima e suas intensidades. Por outro lado, buscou-se escolher os comprimentos de onda de trabalho, onde não devem ser observadas interferências de excipientes, impurezas ou de solventes.

Para isso, traçou-se o espectro de cada solução (em KOH 0,1 M e H₂O MiliQ), na faixa de comprimentos de onda de 200 nm a 700 nm (Fig. 26 e 27), observando-se a presença de sinais na faixa do analito. Para o fármaco-modelo RIF foi necessário alterar o pH da solução de dissolução KOH 0,1 M. Para isso neutralizou-se com HCl 0,1 M o meio antes de solubilizar o fármaco. Esta ação foi necessária visto que este fármaco é facilmente oxidado em solução alcalina. Desta forma, para RIF, a solução de KOH 0,1 M foi neutralizada obtendo-se assim, uma amostra solubilizada neste solvente e outra em H₂O MiliQ.

Cabe ressaltar que para a obtenção dos espectros de varredura das moléculas-modelo foi necessário também escolher a melhor concentração para os ligantes. Nesta etapa foi observado que as concentrações variaram dependendo da molécula hóspede usada (Tabela 4).

Tabela 4. Concentrações das moléculas-modelo RIF, RB e AB (em $\mu\text{g.mL}^{-1}$) nos solventes KOH 0,1 M e H₂O MiliQ.

Amostras	KOH 0,1 M	H ₂ O MiliQ
RIF*	50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
RB	1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
AB	5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

*Para RIF, devido à oxidação em meio alcalino deste fármaco, o solvente foi KOH 0,1 M neutralizado.

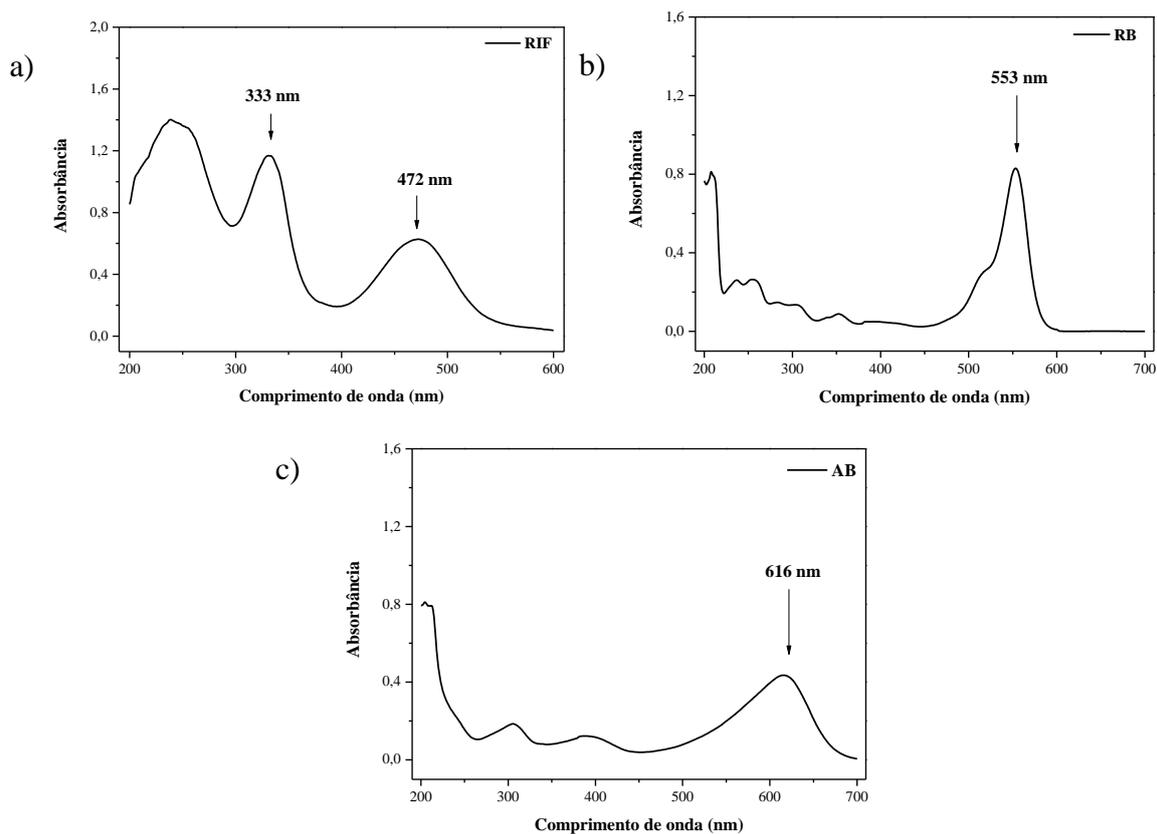
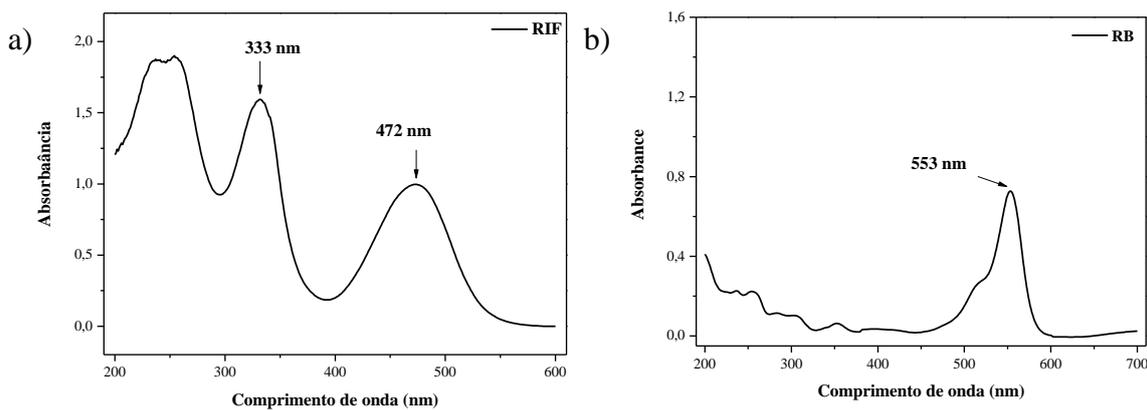


Figura 26. Representação gráfica da absorvância *versus* comprimento de onda (λ) realizada no espectrofotômetro em função da determinação da varredura no espectro de absorção UV-vis da: a) RIF ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em KOH 0,1 M neutralizado, b) RB ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e c) AB ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em KOH 0,1 M, respectivamente.



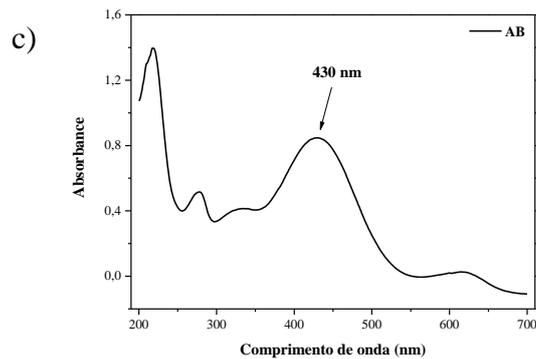


Figura 27. Representação gráfica da absorvância *versus* comprimento de onda (λ), realizada no espectrofotômetro em função da determinação da varredura no espectro de absorção UV-visível da: a) RIF($50 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$), b) RB ($1 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) e c) AB ($1 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) em H_2O MiliQ.

Para RIF em KOH 0,1 M neutralizado e em H_2O MiliQ, (Fig. 26a e 27a), vê-se dois máximos de absorção livres de interferência nos comprimentos de onda centrados em 333 nm e 472 nm. A banda em 333 nm é atribuída à transição eletrônica $\pi-\pi^*$ do cromóforo naftohidroquinona, enquanto que a banda em 472 nm é atribuída a uma transição eletrônica $n \rightarrow \pi^*$ com transferência de carga do elétron a partir do grupo doador de elétrons (CO) para o (OH) do cromóforo naftohidroquinona¹⁸⁶.

Para RB (Fig. 26b e 27b) os máximos de absorção livre de interferência encontram-se centrados em 553 nm em ambas soluções, banda esta que se refere às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ do ligante¹⁸⁷.

Para AB (Fig. 26c e 27c) veem-se bandas em 616 nm, para a amostra na solução de KOH 0,1 M e 430 nm para amostra no solvente H_2O MiliQ. Conforme a literatura^{188, 189} estas bandas são devido às transições $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$, respectivamente.

Os valores aqui determinados, para todos as moléculas-modelo, são similares aos encontrados na literatura^{108, 120, 141, 188, 190}.

7.2.2. Validação do método analítico a partir da análise dos parâmetros especificidade, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação

Após esta etapa, realizou-se o processo de validação do método analítico. A validação objetiva demonstrar a viabilidade do método desenvolvido e garante o sucesso de sua utilização e dos resultados obtidos¹⁹¹.

Definidas as condições analíticas que apresentaram os melhores resultados em relação aos parâmetros de adequação do sistema, o método foi submetido a alguns

parâmetros de avaliação. Os parâmetros avaliados foram especificidade, linearidade, limites de detecção e quantificação. Os parâmetros escolhidos para avaliação são baseados no Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, da Anvisa¹⁹² e Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos, do Inmetro¹⁹³.

7.2.2.1. Especificidade

O processo de validação iniciou-se com o estudo da Especificidade. Neste teste mede-se a capacidade do método usado em determinar o analito com exatidão e precisão na presença de interferentes¹⁹⁴. Para isso, espectros de varredura de AM e AMA com as moléculas-modelo foram feitos (Fig. 28 e 29). O objetivo foi verificar a qualidade das bandas máximas em cada caso, observando se haveria interferência na presença de AM e AMA.

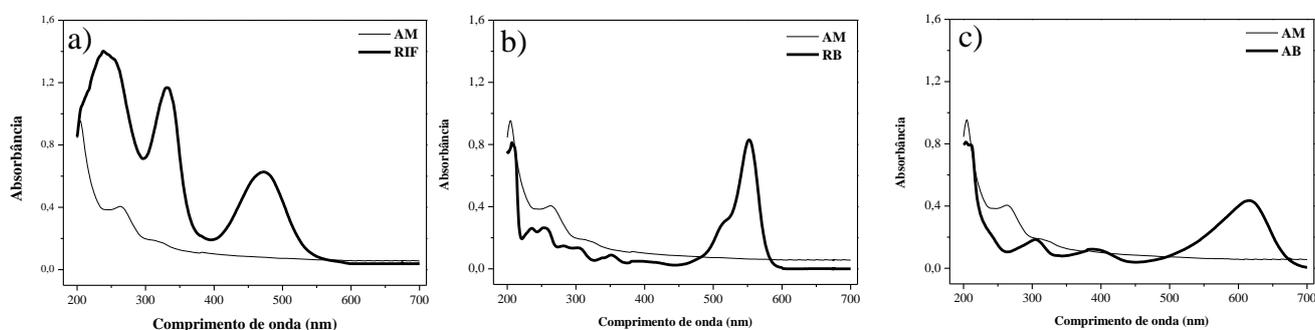


Figura 28. Espectro de varredura de: a) AM e RIF em KOH 0,1 M neutralizado; b) AM e RB em KOH 0,1 M e c) AM e AB em KOH 0,1 M.

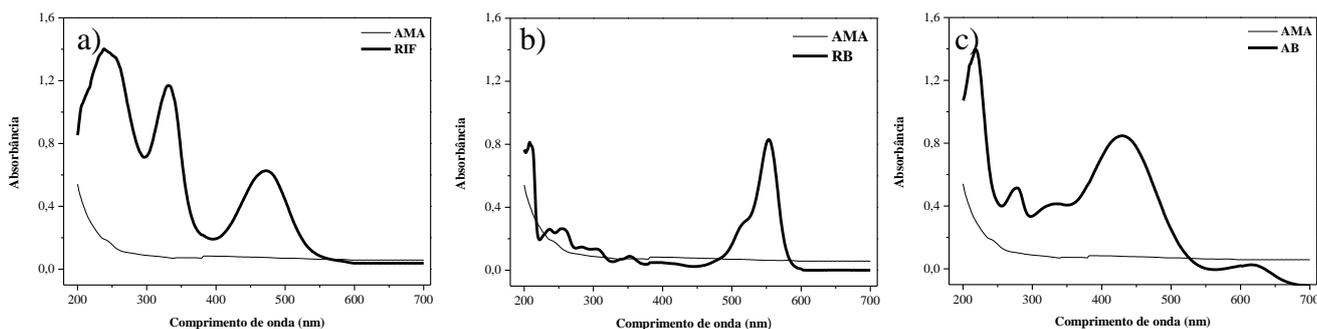


Figura 29. Espectro de varredura de: a) AMA e RIF; b) AMA e RB e c) AMA e AB em H₂O MiliQ.

Nas figuras 28 e 29 observam-se os espectros de AM e AMA com suas moléculas-modelo na faixa de comprimento de onda compreendida entre 200 – 700 nm. Em todos os casos veem-se bandas de absorção máximas bem definidas (Tabela 5).

Tabela 5. Comprimentos de onda utilizados para doseamento do teor das moléculas-modelo RIF, RB e AB na solução KOH 0,1 M e em água MiliQ.

Amostras	λ em KOH 0,1 M (nm)	λ em água MiliQ (nm)
RIF*	333 e 472	333 e 472
RB	553	553
AB	616	430

*Para RIF, devido à oxidação em meio alcalino deste fármaco, o solvente foi KOH 0,1 M neutralizado.

Com base nas figuras acima, verifica-se que os excipientes contidos no complexo de AM e AMA não interferem na quantificação do produto final e o método apresenta especificidade.

7.2.2.2. Linearidade e análise de variância (ANOVA) na regressão

Após o teste de especificidade, o processo de validação prosseguiu com o estudo da linearidade. A avaliação deste parâmetro iniciou-se com a construção das curvas de calibração e determinação de sua linearidade. As concentrações utilizadas, bem como as absorções obtidas para a avaliação da linearidade das curvas de calibração para todas as moléculas-modelo nas condições específicas de cada uma são mostrados no anexo.

Conforme os resultados encontrados para as regressões lineares conclui-se que para as faixas de concentrações estudadas, a resposta analítica do equipamento tem uma relação linear com a concentração do analito, visto que o coeficiente de regressão linear das curvas obtidas através do ajuste dos dados apresenta valores acima de 0,98, o que satisfaz o critério de linearidade¹⁹².

Para avaliar a linearidade¹⁹³ realizou-se a análise de variância (ANOVA) das regressões (Tabelas no anexo).

Primeiramente, a partir da análise de variância (ANOVA) conclui-se que as curvas padrões obtidas apresentam regressão linear significativa ($p < 0,05$) e não apresentam desvios de linearidade. Além disso, a validade das regressões foi feita a partir dos valores de F (medido e crítico) de modo que para o coeficiente angular da curva ser diferente de zero se deve ter valores de F_{medido} maiores do que os valores de $F_{\text{crítico}}$. Conforme as tabelas em anexo, os valores de F_{medido} são muito maiores do que $F_{\text{crítico}}$. Sendo assim, conclui-se que,

com 95 % de confiança, o modelo é linear e está bem ajustado na faixa de concentração estudada.

7.2.2.3. Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ)

Como resultado das avaliações da linearidade, calcularam-se os limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ) das moléculas-modelo (Tabela 6).

Tabela 6. Valores de LD e LQ das moléculas-modelo estudadas.

Moléculas-modelo	LD ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
RIF em KOH 0,1 M neutralizado	2,1	6,4
RB em KOH 0,1 M	0,4	1,2
AB em KOH 0,1 M	0,1	0,3
RIF em H₂O MiliQ	2,0	6,1
RB em H₂O MiliQ	0,5	1,5
AB em H₂O MiliQ	1,2	3,5

Conforme teoria^{88, 193}, LD é a menor concentração detectável de analito pelo método e o LQ é a menor concentração quantificável do mesmo. Os valores encontrados demonstram a sensibilidade do método comprovando que o mesmo é adequado para o estudo, desde que a faixa de concentração de fármaco esteja acima destes limites mínimos.

7.3. ANÁLISE DA FORMAÇÃO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO

Acredita-se que após a complexação, o composto formado sofre mudanças em suas características físico-químicas, fornecendo meios para se detectar o fenômeno. Em solução, há um equilíbrio entre as moléculas complexadas e livres, se ocorrer complexação, há uma alteração no espectro de absorção na técnica de espectrofotometria de UV-visível¹⁹⁵.

De modo geral, as alterações observadas nos espectros (identificadas pelos deslocamentos batocrômicos e/ou aumento/diminuição e/ou alargamento das bandas¹⁹⁶) das moléculas sob a forma complexada, em comparação ao composto puro, oferecem um indicativo de que houve a formação de complexo^{29, 3}. Essas alterações no microambiente das soluções, podem ser explicadas como resultado da transferência da molécula hóspede para a cavidade da amilose.

Sendo assim, para analisar a formação dos complexos de inclusão a partir das moléculas-modelo usadas, realizou-se análises de espectrofotometria de UV-visível (Figuras 30 e 31). As análises espectrofotométricas mostradas foram feitas para os complexos

preparados na temperatura de 65 °C. Para comparação têm-se ao lado as figuras dos complexos obtidos: i) no tempo zero de complexação; ii) complexo preparado à 40 °C após 24 h e iii) complexo preparado à 65 °C após 24 h.

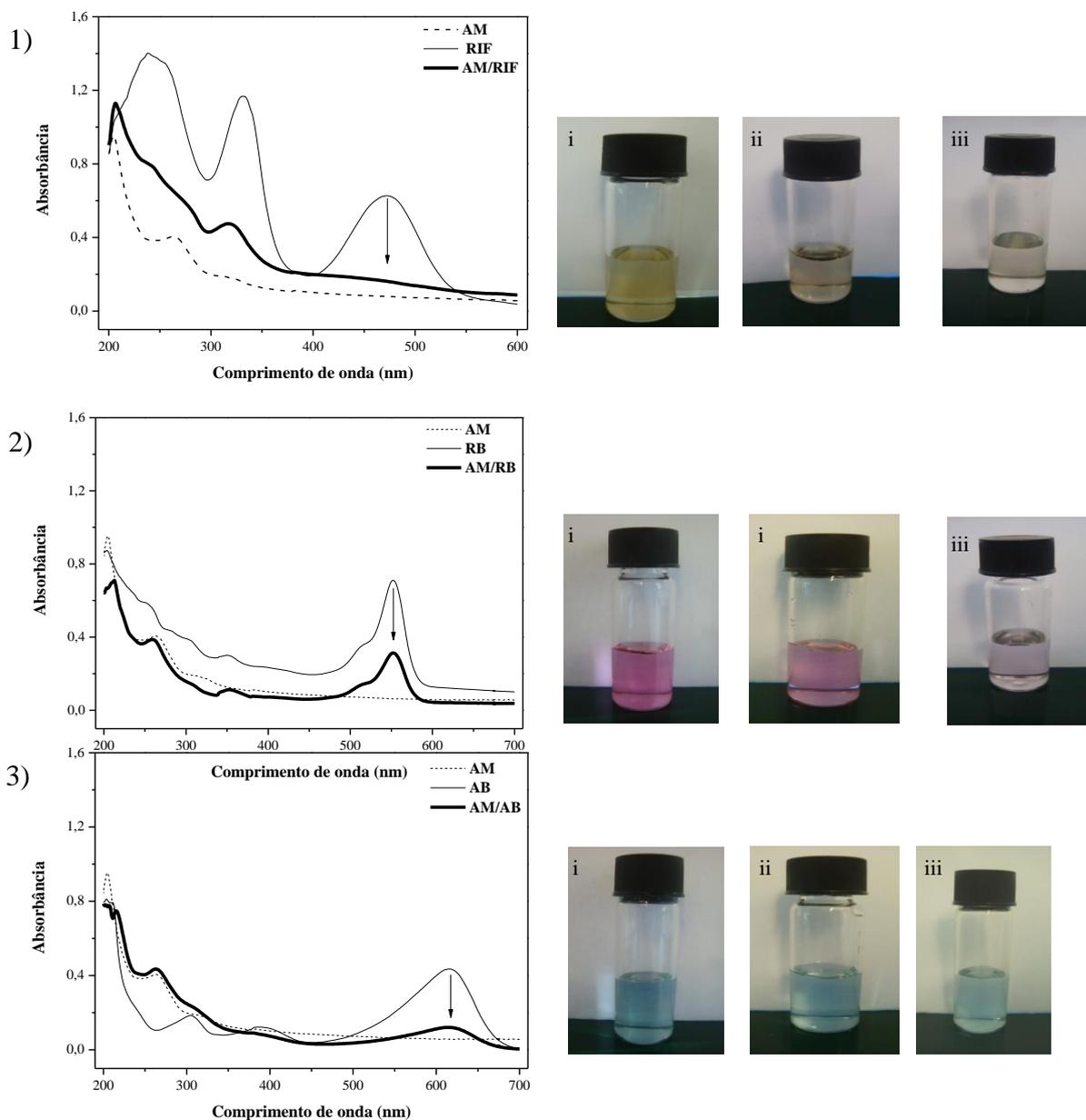


Figura 30. a) Comparação entre os espectros de absorção UV-vis dos complexos de inclusão desenvolvidos com AM: 1) AM-RIF em KOH 0,1 M neutralizado, 2) AM-RB em KOH 0,1 M e 3) AM-AB em KOH 0,1 M na temperatura de 65 °C e b) Alterações das cores nos complexos: 1) AM-RIF, 2) AM-RB, 3) AM-AB no tempo zero de complexação (i), preparado à 40 °C (ii) e preparado à 65 °C (iii).

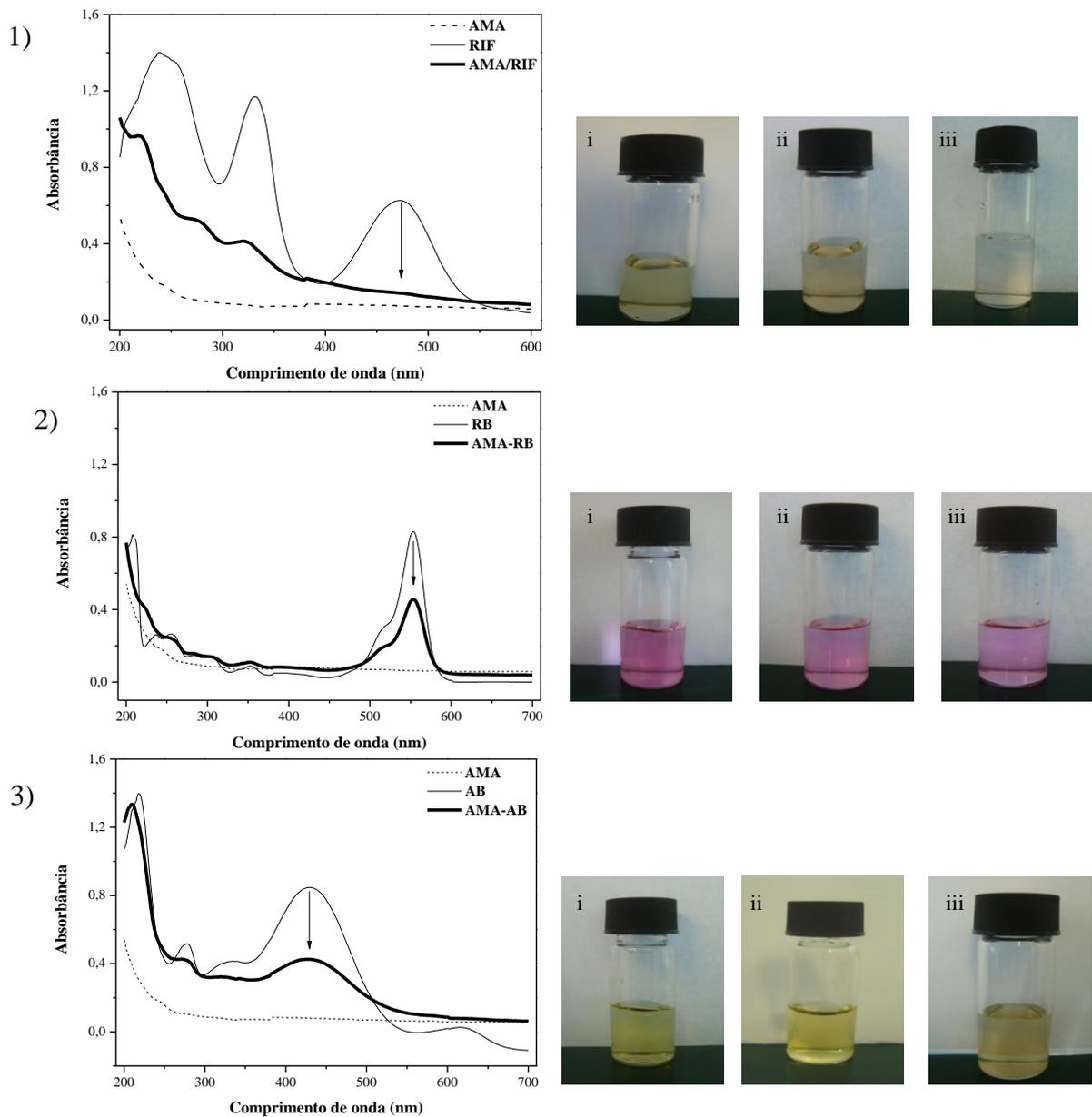


Figura 31. a) Comparação entre os espectros de absorção dos complexos de inclusão desenvolvidos com AMA: 1) AMA-RIF, 2) AMA-RB, 3) AMA-AB em H₂O MiliQ na temperatura de 65 °C e; b) Alteração das cores nos complexos: 1) AMA-RIF, 2) AMA-RB, 3) AMA-AB no tempo zero de complexação (i), preparado à 40 °C (ii) e preparado à 65°C (iii).

Primeiramente, com o objetivo de quantificar as moléculas-modelo no complexo, foi feita a escolha dos comprimentos de onda que mais sofreram variações após a complexação. Estas bandas que apresentaram maior interferência foram escolhidas para o estudo espectrofotométrico dos complexos e os valores de seus comprimentos de onda máximos estão sendo mostrados na Tabela 7.

Tabela 7. Comprimentos de onda (λ) utilizados para quantificação do teor das moléculas-modelo RIF, RB e AB na solução de KOH 0,1 M e no solvente H₂O MiliQ.

Amostras	λ em KOH 0,1 M (nm)	λ em H₂O MiliQ (nm)
RIF*	472	472
RB	553	553
AB	616	430

*Para RIF, devido à oxidação em meio alcalino deste fármaco, o solvente foi KOH 0,1 M neutralizado.

Em segundo lugar, sabe-se que os níveis energéticos das moléculas são quantizados e a absorção de energia pode ser considerada como um processo específico relacionado com a estrutura de cada molécula, a qual determina a energia envolvida na transição, e com a probabilidade de que esta ocorra. A intensidade da radiação que incide na amostra pode ser medida e relacionada com a concentração da espécie hóspede¹⁹⁶.

Sendo assim, ao comparar os espectros dos complexos de inclusão desenvolvidos com os fármacos-modelo livres (Figura 30 e 31), em todos os casos, vê-se que as bandas utilizadas para análise apresentam deslocamentos batocrômicos possivelmente devido à coordenação dos ligantes à molécula de amilose. Como é possível observar, os deslocamentos ocorreram para maiores comprimentos de onda, as quais apresentam transições eletrônicas menos energéticas, uma vez que o orbital para onde o elétron é promovido tem menor energia que o orbital presente na molécula livre.

Além disso, fotografias tiradas antes e após o processo de inclusão (Figura 30 e 31) comprovam que os sistemas com maior eficiência apresentam uma clara alteração na cor (percebe-se uma diminuição na mesma após a complexação, mais evidenciada nos complexos preparados à 65 °C).

Nos complexos AM-AB, e AMA-RB a mudança na cor não é significativa, o que pode ser um indicativo de que as moléculas hóspedes, nas condições em estudo, são menos suscetíveis a permanecer na cavidade hidrofóbica das hélices da amilose.

7.3.1. Avaliação das transições eletrônicas ocorridas durante a formação dos complexos de inclusão

A molécula RIF (Fig. 30 (1) e 31 (1)), antes da complexação, apresentava duas bandas de absorção, uma em 333 nm, atribuída à transição eletrônica π - π^* do cromóforo

naftohidroquinona e em 472 nm, atribuída a uma transição eletrônica $\pi \rightarrow \pi^*$. Após a complexação, nos dois solventes em estudo, várias alterações no espectro foram observadas.

Primeiramente vê-se um deslocamento e diminuição na banda de absorção 333 nm. Já a intensidade da banda 472 nm de transição $\pi \rightarrow \pi^*$ teve sua intensidade reduzida drasticamente. Essas alterações podem ter sido causadas pela interação de RIF com a amilose, visto que este polissacarídeo não tem absorção nesta faixa de comprimento de onda. Pode também ser especulado que o cromóforo naftohidroquinona, que contém grupos OH esteja “encoberto” pelas cadeias da amilose ou esteja formando novas ligações de hidrogênio, o que liderou a mudança de densidade das nuvens eletrônicas.

Para RB, antes da complexação, os máximos de absorção encontram-se centrados em 553 nm (transições eletrônicas $\pi \rightarrow \pi^*$) em ambos os solventes.

Após a interação o complexo desenvolvido ainda apresenta a banda de absorção máxima em 553 nm, referente à RB nos dois tipos de amilose (Fig.30 (2) e 31 (2)). No entanto, é observada uma diminuição na intensidade desta banda, sendo que para o complexo desenvolvido com AM a intensidade dessa redução é mais significativa (fato observado também ao se analisar a cor das soluções complexadas (Fig. 30 (2 – II) e 31 (2 – II)). De acordo com a literatura¹⁹⁷, as forças responsáveis pela interação entre a molécula hospedeira e RB são complexas. Neste processo podem ocorrer interações hidrofóbicas (incluindo as transições eletrônicas $\pi \rightarrow \pi^*$), eletrostáticas e ligações de hidrogênio¹⁹⁷. Porém, a forma como estas interações irão ocorrer dependerá principalmente do pH do meio em que as moléculas estarão inseridas. Uma redução pouco significativa na banda de absorção máxima pode ser um indicativo de que nas condições do estudo há pouca interação eletrostática entre AM, AMA e RB.

Finalmente, AB antes da complexação, apresenta uma banda máxima em 616 nm no solvente KOH 0,1 M (transição eletrônica $n \rightarrow \pi^*$) e uma banda em 430 nm (transição eletrônica $\pi \rightarrow \pi^*$) no solvente H₂O miliQ. Após a formação dos complexos vê-se uma diminuição nas bandas máximas nos dois solventes (Fig.30 (a3) e 31 (a3)). No entanto, esta redução na intensidade é baixa, comparado ao ligante livre. Um dos motivos desta baixa intensidade pode estar relacionado à fraca interação entre a molécula hóspede e AM e AMA.

Em outras palavras pode-se dizer que o deslocamento no máximo de absorbância é devido à proteção parcial dos elétrons excitáveis e cromóforos presentes na cavidade da amilose. Este fato é um indicativo da formação dos complexos de inclusão.

7.4. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO DESENVOLVIDOS

7.4.1. Eficiência de inclusão (% EI) e capacidade de carga (% CC) das moléculas-modelo em função da temperatura

Eficiência de inclusão (% EI) e capacidade de carga (% CC) são parâmetros quantitativos que ilustram a quantidade de molécula-hóspede incluídas no complexo de AM e AMA.

Estes parâmetros foram determinados a partir da variação dos valores de absorvância em relação aos comprimentos de onda característicos de cada molécula hóspede por meio de regressão linear da curva de calibração. Sendo assim, neste estudo, os valores encontrados para a eficiência de inclusão (% EI) e capacidade de carga (% CC) irão fornecer uma ideia da interação entre as moléculas hóspedes com as moléculas hospedeiras AM e AMA.

Ao analisar estes dois parâmetros inicialmente verificou-se a influência do aumento da temperatura durante a preparação dos complexos de inclusão para todos os sistemas desenvolvidos (Tab. 8).

Tabela 8. Valores de eficiência de inclusão (% EI) e capacidade de carga (% CC) dos complexos de inclusão preparados na temperatura de 40 °C e 65 °C.

Amostra	% EI à 40 °C	% EI à 65 °C	% CC à 40 °C	% CC à 65 °C
AM-RIF	70,9 ± 0,9	78,3 ± 2,2	7,04 ± 0,1	7,85 ± 0,1
AM-RB	84,5 ± 1,5	96,1 ± 0,3	1,69 ± 0,3	2,05 ± 0,3
AM-AB	94,1 ± 2,7	90,1 ± 2,1	9,88 ± 0,3	9,8 ± 0,2
AMA-RIF	79,5 ± 4,5	89,1 ± 1,6	7,97 ± 0,3	8,93 ± 0,3
AMA-RB	69,7 ± 1,4	69,8 ± 1,0	1,39 ± 0,2	1,33 ± 0,9
AMA-AB	93,7 ± 0,4	92,9 ± 0,2	1,37 ± 0,2	1,29 ± 0,1

Como pode ser visto, ao se comparar os valores encontrados para % EI e % CC, verifica-se que os resultados variaram de forma considerável. Ao analisar a tabela observa-se que os mesmos dependeram do tipo de amilose (AM ou AMA), da molécula hóspede (RIF, RB e AB), do solvente e da temperatura utilizada na preparação dos complexos.

Observa-se claramente também que o aumento da temperatura de reação de 40 °C para 65 °C usado durante a formação dos complexos aumentou em cerca de 10% e 1% os

valores de % EI e % CC, respectivamente, para as amostras AM-RIF, AM-RB e AMA-RIF (Tabela 8).

Na literatura¹³ têm sido descritos três métodos diferentes para a formação de complexos de inclusão com amilose:

1. A partir do amido e seus ligantes;
2. A partir da amilose nativa e seus ligantes;
3. A partir da síntese da amilose na presença dos seus ligantes.

Dependendo do método usado, as características dos complexos de inclusão com amilose obtidos serão diferentes. Para a obtenção de complexos mais puros e monodispersos os métodos 1 e 2 são mais adequados. Ao adicionar o ligante ao amido (ou a amilose) e aquecer o sistema, a complexação pode ocorrer. O uso de aquecimento é necessário visto que assim as cadeias de amilose adquirem mobilidade suficiente para interagir com os ligantes.

Os complexos de amilose podem ser classificados em dois tipos¹³: o tipo I, menos ordenado e o tipo II, semicristalino. Os complexos do tipo I são formados em temperaturas iguais ou abaixo de 60 °C e resultam na formação de segmentos helicoidais individuais os quais são orientados aleatoriamente. Baixas temperaturas resultam assim em uma taxa de nucleação elevada, levando a formação de hélices muito rapidamente o que resulta em um baixo nível de cristalinidade (ou até mesmo leva à formação de complexos sem cristalinidade). Os complexos do tipo II, por outro lado, são obtidos por aquecimento da mistura a temperaturas elevadas (acima de 90 °C). Nestas temperaturas, a velocidade de nucleação é baixa. Deste modo ocorrerá a formação de estruturas com regiões cristalinas bem definidas.

A partir da informação acima e dos resultados encontrados (Tabela 8) conclui-se que o aumento da temperatura provoca uma maior mobilidade das cadeias de amilose o que facilita o movimento das moléculas hóspedes para o interior da estrutura dos complexos. Na temperatura de 65 °C os complexos formados deverão ser mais estruturados do que os desenvolvidos na temperatura de 40 °C. Nesta temperatura baixa (40 °C) ocorrerá a formação de complexos mais desordenados. Esta hipótese está de acordo com estudos anteriores sobre complexos de inclusão de amilose com ácidos graxos^{59, 198}.

Outro fator que pode novamente ser analisado é a cor das amostras antes e após a complexação, nas temperaturas de 40 °C e 65 °C (Figura 32). De modo geral vê-se claramente que nos complexos desenvolvidos à 65 °C, a mudança na cor foi mais evidente.

Este fato comprova que os sistemas desenvolvidos nesta temperatura apresentam maior eficiência. As alterações de cor podem ser devido à alta perturbação dos elétrons cromóforos das moléculas hóspedes após sua inserção na cavidade hidrofóbica da estrutura da amilose. Ou seja, para os sistemas AM-RIF, AM-RB e AMA-RIF na temperatura de 65 °C, maior é a interação e, conseqüentemente, maior será a alteração na intensidade da cor.

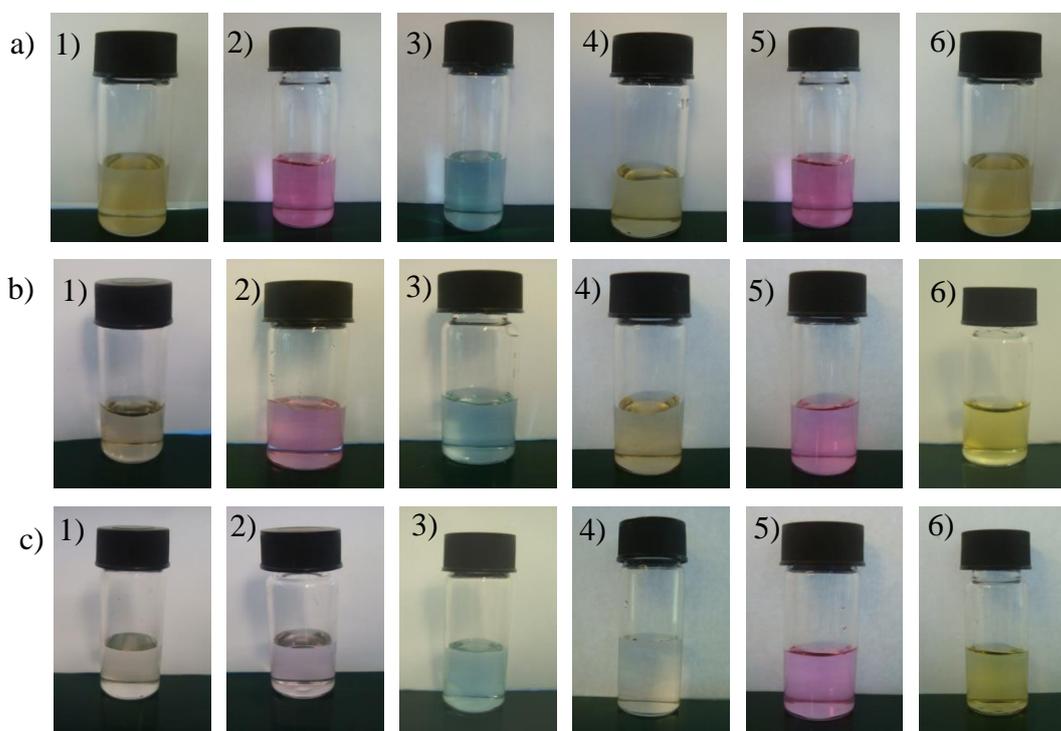


Figura 32. Alteração das cores nos complexos desenvolvidos: a) no tempo zero de complexação; b) na temperatura de 40 °C; c) na temperatura de 65 °C para 1) AM-RIF, 2) AM-RB, 3) AM-AB, 4) AMA-RIF, 5) AMA-RB e 6) AMA-AB.

Por outro lado, para AM-AB o sistema com menor temperatura foi o mais eficiente e para AMA-RB e AMA-AB a temperatura não afetou a eficiência. Para que se possa explicar com mais propriedade os fatos acima, deve-se entender o efeito da modificação da amilose sobre a complexação, bem como compreender a influência da estrutura das moléculas hóspedes sobre a mesma. Esta análise será realizada posteriormente.

7.4.2. Efeito da acetilação sobre a eficiência de inclusão (% EI) e capacidade de carga (% CC) dos complexos de inclusão

Os valores de % EI e % CC também variaram dependendo do tipo de amilose usada (AM e AMA). Para AMA-RIF os valores de % EI são 10 % maiores do que para a AM-RIF.

No entanto, a % CC é bem menor (em torno de 70 % mais baixa). A variação nestas grandezas pode estar relacionada com a substituição dos grupos hidroxila pelos grupos acetila o que pode alterar os estados de ionização das moléculas hóspedes nos complexos de inclusão.

Este evento pode desestabilizar as moléculas de AMA. Ao desestabilizar as moléculas de AMA, a formação dos complexos de inclusão pode ser diminuída ou até mesmo pode ocorrer um impedimento de que as moléculas hóspedes entrem na cavidade hidrofóbica.

Como neste estudo AMA-RIF apresenta uma eficiência maior supõem-se que neste caso, os grupos acetila presentes em AMA podem ter promovido a preferência das moléculas hóspedes em interagir com a cavidade hidrofóbica. Este fato pode ser atribuído ao alinhamento dos grupos acetila em direção a cavidade, aumentando a interação das moléculas-hóspedes e, conseqüentemente, explicam os maiores valores de complexação obtidos para AMA neste trabalho. Esta hipótese está em concordância com o proposto em outro estudo sobre complexos de inclusão entre o amido acetilado e o ácido esteárico⁹⁴.

Para AMA-RIF outra hipótese pode explicar este aumento na eficiência. Para o preparo do complexo AM-RIF (desenvolvido com amilose não modificada), a amilose foi dissolvida previamente em meio alcalino (KOH 0,1 M). Após dissolução, o pH foi ajustado para 7,0 o que aumentou significativamente a força iônica em relação à AMA que foi preparada em água. Os íons presentes na solução neutralizada (em AM) que promovem maior força iônica, podem competir diretamente com os grupos ionizáveis de RIF, os quais interagem com os grupos iônicos da amilose envolvidos na formação dos complexos e, conseqüentemente são responsáveis pela menor eficiência de inclusão e capacidade de carregamento dos complexos preparados a partir de AM.

Para os complexos AMA-RB e AMA-AB verifica-se uma baixa capacidade de carga (menor do que as obtidas para os complexos preparados com AM). Esta baixa capacidade de carga pode explicar a presença de cor após a complexação para estas amostras (Fig. 32).

A baixa capacidade de carga pode ser devido a uma baixa solubilidade aquosa de RB e AB que limitam sua dissolução. Assim, o rendimento dos hóspedes disponíveis em solução para o encapsulamento é mais baixo do que para os compostos com uma maior solubilidade aquosa. Vale ressaltar que a dissolução dos compostos RB e AB para o desenvolvimento dos complexos AM-RB e AM-AB foi feita no solvente KOH 0,1 M, solvente alcalino utilizado para a dissolução da AM. Ou seja, a solubilidade destes compostos pode ter variado devido

ao pH de dissolução e este fato pode ter alterado a capacidade de carga dos complexos desenvolvidos.

7.4.3. Efeito da estrutura das moléculas-hóspedes sob a eficiência de inclusão (% EI) e capacidade de carga (% CC)

Sabe-se que agentes complexantes adequados induzem uma conformação helicoidal na amilose, onde a hélice é hidrofílica no exterior (os grupos hidroxila das suas unidades de glicose são dirigidas para a parte externa) e apresenta uma cavidade hidrofóbica, a qual favorece as interações hidrofóbicas¹⁹⁹. As ligações intramoleculares, tais como forças de van der Waals e ligações de hidrogênio, ocorrem entre as voltas ao longo da hélice, estabilizando-a. Já as forças intermoleculares, estabilizam a interação entre a amilose e o seu ligante¹³. Estudos indicam que as moléculas hóspedes podem ser incluídas de várias maneiras na cavidade hidrofóbica da amilose dependendo de seu tamanho e suas propriedades. Dentre estas maneiras citam-se: no interior das hélices, presa entre as hélices ou mesmo nas regiões amorfas^{61, 200} (Figura 33).

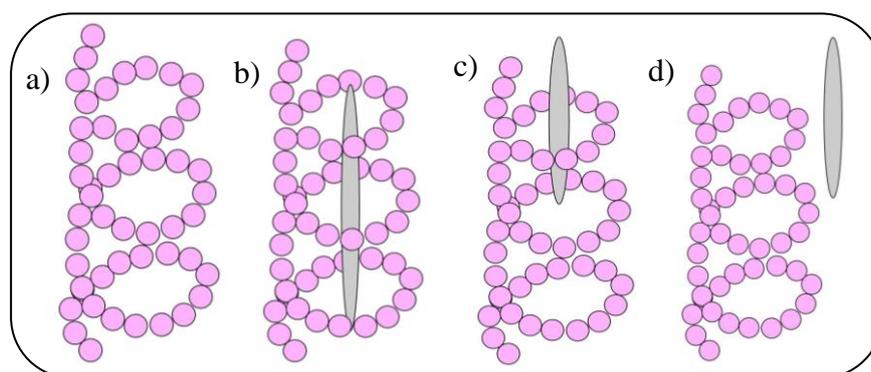


Figura 33. Representação de: a) amilose e de como a molécula hospedeira pode ser incluída durante a formação do complexo de inclusão; b) molécula incluída no interior da hélice; c) molécula parcialmente incluída; d) molécula não incluída na hélice, mas sim na região amorfa.

Para que se possa compreender o que pode estar acontecendo nos sistemas desenvolvidos, e entender os valores encontrados para eficiência de inclusão e capacidade de carga, é necessário verificar as características e propriedades das moléculas hóspedes envolvidas. Com base neste fato, sabe-se que a quantidade de anéis aromáticos presentes na molécula hóspede estão relacionados a uma maior eficiência de encapsulamento^{71, 201}. Ao analisar as moléculas-hóspedes deste estudo, observa-se que as moléculas RIF e RB

apresentam dois anéis aromáticos e AB apresenta 3 anéis aromáticos. A partir desta informação pode-se concluir que os sistemas desenvolvidos com o ligante AB teria uma eficiência de inclusão maior. No entanto, somente este fato não permite que sejam compreendidas a eficiência e capacidade de carga destes sistemas.

Sendo assim, deve-se inicialmente analisar a estrutura química das moléculas-hóspedes individualmente para se entender e explicar a interação entre os ligantes e a amilose bem como entender a % EI e a % CC dos complexos de inclusão formados.

7.4.3.1. Efeito da estrutura da molécula RIF sobre a formação dos complexos de inclusão desenvolvidos com AM e AMA

Como não existem na literatura, até o momento, estudos envolvendo a complexação entre amilose e RIF, para que se compreenda o que pode estar acontecendo nos complexos desenvolvidos, os resultados destes foram comparados a de estudos de complexação de RIF com ciclodextrinas^{109, 202, 203}.

Sabe-se que a molécula RIF contém vários grupos ionizados com pKa nas faixas de pH 1 e 11. Entre estes grupos, existem dois principalmente importantes, o grupo hidroxila em C4 e o nitrogênio (anel piperazina), com pKa de 1,7 e 7,9, respectivamente²⁰⁴ (Figura 34). Entre os pH 1,7 e 7,9 as espécies iônicas estão em uma forma *zwitteriônica* (anfótera) globalmente neutra^{204, 205}.

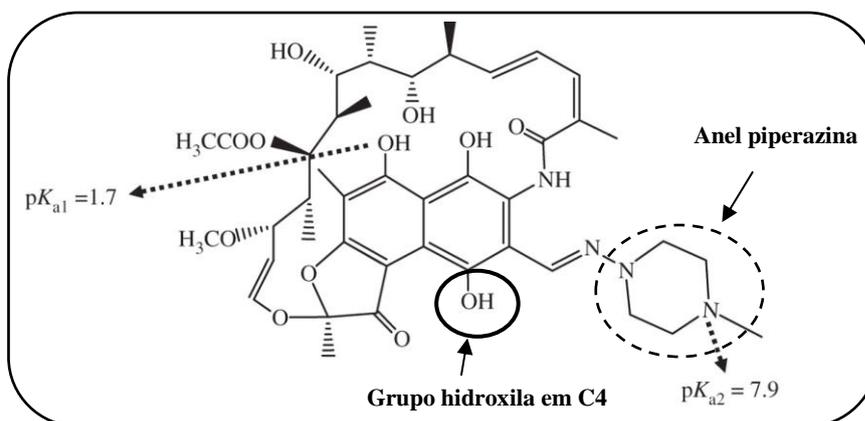


Figura 34. Estrutura química de RIF²⁰⁶, anel piperazina e grupo hidroxila C4. O pKa₁ (em água) têm sido atribuído à porção hidroxila do C8, enquanto que o pKa₂ (em água) têm sido atribuído a N4 da piperazina. Anel piperazina (---) e grupo hidroxila em C4 (—).

Em um estudo anterior sobre adsorção de RIF em nanopartículas²⁰⁵, foi observado o favorecimento da adsorção em meio neutro pela condição *zwitteriônica* (anfótera) e não

pela forma aniônica da molécula. Os autores então sugerem que este favorecimento é devido à estrutura das moléculas de RIF, ou seja, os grupos mais favoráveis para ligação seriam o nitrogênio do grupo imina ou o nitrogênio adjacente do grupo piperazina.

Em outro estudo envolvendo RIF e ciclodextrinas²⁰² análises de RMN foram realizadas. Os resultados mostraram que apenas os picos da cadeia lateral relacionada ao anel piperazina (Figura 34) sofreram modificações significativas após a complexação. De acordo com esta informação, os autores concluíram que somente esta região sofreu interação com o núcleo hidrofóbico e a região mais “volumosa” ficou na superfície da cavidade da ciclodextrina. Conclusões semelhantes à deste estudo também foram observadas por outros autores^{109, 203}

Neste estudo, supõe-se que o comportamento seja semelhante. Como foi visto na seção 7.3.1., RIF apresenta duas transições eletrônicas características: uma em 333 nm (transição $\pi - \pi^*$) e uma em 472 nm (transição $n - \pi^*$). Como houve diminuição nas duas bandas (mais evidente na banda de absorção 472 nm) acredita-se que os grupos característicos podem estar encobertos pelas cadeias de amilose ou podem ter formado outras ligações com elas, o que pode ter alterado a densidade das nuvens eletrônicas. Desta forma, a interação entre RIF, AM e AMA independe dos grupos funcionais presentes na parte externa da hélice, sendo completamente dependente dos cromóforos das bandas características que se encontram supostamente no núcleo hidrofóbico da molécula (para os dois tipos de amostra).

7.4.3.2. Efeito da estrutura da molécula RB sob a formação dos complexos de inclusão desenvolvidos com AM e AMA

Para os complexos de inclusão desenvolvidos com RB a % EI apresenta valores altos para amostras preparadas com AM: $84,5\% \pm 1,5\%$ à 40 °C e $96,1\% \pm 0,3\%$ à 65 °C. Observa-se também que para este complexo (AM-RB), as análises de UV mostraram uma diminuição acentuada na intensidade da banda de absorção (Figura 31b) bem como na cor.

A diminuição na cor de rosa para incolor indica um deslocamento no equilíbrio de RB a partir do íon anfótero para a forma lactona. Este percentual diminui para os complexos desenvolvidos com AMA, de $69,7\% \pm 1,4\%$ à 40 °C para $69,8\% \pm 1,0\%$ à 65 °C. Apesar destes altos valores para % EI, observa-se também que os valores de %CC são baixos para as duas amostras de amilose, o que pode indicar uma baixa interação entre o ligante RB e as moléculas hospedeiras (para AM e AMA).

Para que se possa compreender quais os grupos são mais favoráveis para participar da complexação, primeiramente deve-se conhecer as propriedades de RB.

RB apresenta pKa igual a 3,22²⁰⁷ sendo composta por dois grupos aromáticos perpendiculares²⁰⁸ e um grupo – COOH. Estes grupos funcionais podem favorecer as ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas, uma vez que existem átomos de nitrogênio que podem ser carregados positivamente¹⁹⁷.

O complexo AM-RB foi preparado em pH básico. Neste meio, os grupos – COOH estão desprotonados. De acordo com a literatura¹⁹⁷, em pH com valores elevados, o grupo – COOH é menos ativo. Neste meio básico supõem-se que tanto AM como RB estejam carregados negativamente. Já o complexo AMA-RB foi preparado em água. Neste solvente polar, sabe-se que RB geralmente apresenta uma carga negativa no grupo – COOH e um átomo de nitrogênio carregado positivamente¹⁹⁷. Devido a este fato RB tem um caráter negativo tanto em pH neutro (complexos preparados com AMA) como no meio básico (complexos preparados com AM). Este caráter negativo pode ser responsável pela fraca interação entre estas duas moléculas, fato este observado pelos baixos valores de capacidade de carga encontrados nos dois sistemas.

7.4.3.3. Efeito da estrutura da molécula AB sob a formação dos complexos de inclusão desenvolvidos com AM e AMA

O ligante AB apresenta pKa com valor de 6,82 em água à 25 °C²⁰⁹. Esta molécula muda de cor de acordo com o pH, indo de amarelo (pH < 6) para verde (pH entre 6 e 7) e para azul (pH > 8)²⁰⁹. A molécula de AB apresenta grupos hidrofóbicos: três anéis aromáticos em sua estrutura e radicais – CH₃ (Figura 35)²¹⁰.

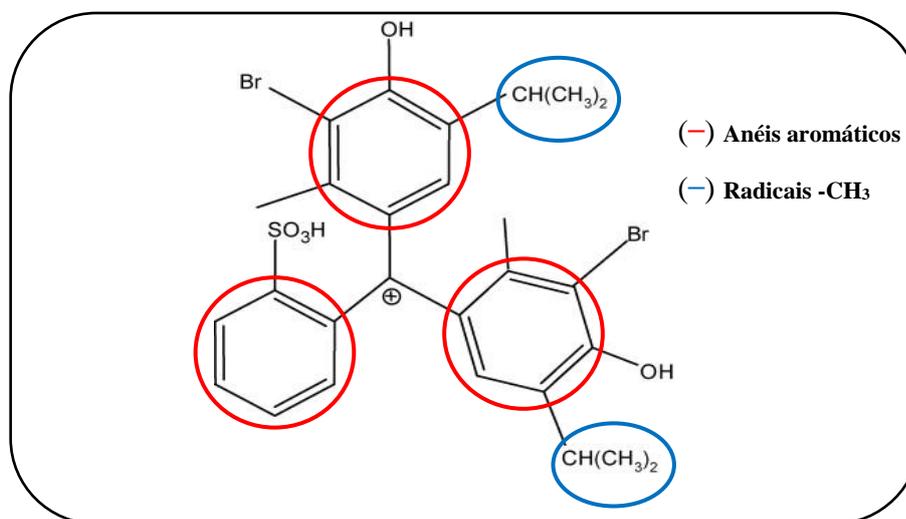


Figura 35. Estrutura química totalmente protonada do AB e seus grupos hidrofóbicos: anéis aromáticos (em vermelho) e radicais metila (em azul)²¹¹.

Cabe ressaltar que neste trabalho, o complexo AM-AB foi preparado em KOH 0,1 M e o complexo AMA-AB em H₂O MiliQ. O exame da estrutura molecular do corante mostra que há uma variedade de grupos funcionais que podem proporcionar interação favorável com solventes polares, tais como a água. No entanto, como dito na seção 3.3.3.1., AB tem um cátion de sódio por molécula. Este par iônico hidrofóbico foi formado por substituição do cátion de sódio hidrófilo com um cátion tetraalquilamônio¹⁴⁶. Como resultado, a solubilidade do par iônico é mais baixa em água.

Com base nas informações abaixo verifica-se que os resultados baixos encontrados para capacidade de carga (1,3% ± 0,1%) do complexo AMA-AB podem ser atribuídos à baixa solubilidade deste ligante em meio neutro. Este fato altera o número de ligantes disponíveis para inclusão na molécula hospedeira.

Por outro lado, o complexo AM-AB apresenta uma capacidade de carga maior (9,8 ± 0,2 %). Este valor mais elevado pode ser devido a presença dos íons O⁻ na molécula de amilose. Estes grupos presentes na AM promovem um “ataque nucleofílico” no AB, o que resulta na viragem do indicador para a forma incolor. Este desvanecimento do AB na presença de íons O⁻ já foi descrito na literatura²¹² (Equação 15) e pode ser um indicativo de que este ligante está reagindo à AM de forma mais forte do que AMA, a qual apresenta um número menor de grupos hidroxilas.



Cabe ressaltar que análises de AB sem a presença da amilose (AM e AMA) e nas mesmas condições de preparo dos complexos também foram realizadas. O que foi observado é que não houve descoloração de AB. A descoloração só ocorreu na presença de AM (Figura 30.3). No entanto, como a capacidade de carga é baixa, a perda na cor também é baixa.

7.4.4. Análise de espalhamento de luz dinâmico (DLS) das amostras estudadas

7.4.4.1. Análises de tamanho da AM e AMA

A eficiência de sistemas de entrega controlada de substâncias é influenciada pelo tamanho da partícula, carga de superfície, modificação da superfície e hidrofobicidade²¹³. Desta forma, o conhecimento destas propriedades é importante para uma melhor

compreensão da aplicação destes complexos em sistemas *in vivo*. Neste sentido, a técnica de espalhamento de luz dinâmico é relativamente rápida para determinação das distribuições de tamanho das partículas desenvolvidas tais como proteínas, polímeros, micelas e nanopartículas. Além disso, DLS é uma técnica importante, pois é capaz de distinguir entre uma solução molecular homogênea e uma dispersão de agregados²¹⁴.

Sendo assim, para um melhor entendimento sobre as variações de tamanhos que podem ocorrer após a complexação, primeiramente fez-se a caracterização da AM e AMA a partir da técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS).

O objetivo nesta etapa do trabalho foi verificar os tamanhos das moléculas sem a presença da molécula hóspede. Esta caracterização inicial permite uma melhor análise sobre o perfil dos complexos desenvolvidos.

De maneira geral, os resultados das análises de DLS revelaram diferenças entre os experimentos realizados com AM e AMA (Tabela 9).

Tabela 9. Valores do diâmetro hidrodinâmico (d_h) e polidispersão (*P.d.I*) da AM e da AMA.

Amostra	d_h (nm)	<i>P.d.I</i>
AM	74,0 ± 2,0	0,42 ± 0,03
AMA	79,0 ± 4,0	0,56 ± 0,01

Cabe ressaltar que o objetivo da modificação da amilose foi produzir complexos solúveis em água. Este procedimento foi necessário visto que a AM é pouco solúvel nesse solvente, o que dificulta o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada com esta molécula. Sendo assim, é necessário informar que os resultados mostrados na Tab. 9 referem-se a solventes diferentes (AM: KOH 0,1 M e AMA: H₂O MiliQ).

Tipicamente, a partir das análises de DLS obtêm-se dois tipos de dados: um é valor do tamanho médio das partículas presentes na solução e o outro é a curva de distribuição de tamanho das partículas. O primeiro tipo de dado é obtido pelo método dos cumulantes e a curva de distribuição é obtida através do método de ajuste dos mínimos quadrados não negativos (NNLS - *Non-Negative Least Squares*)²¹⁵.

Ao analisar os resultados obtidos a partir do método dos cumulantes para a AM e AMA, observa-se que os diâmetros hidrodinâmicos médios (d_h) não variaram de forma significativa (Tab. 9). No entanto, ao se comparar este método de análise às curvas de distribuição, verifica-se que os valores diferem entre si (Figura 36).

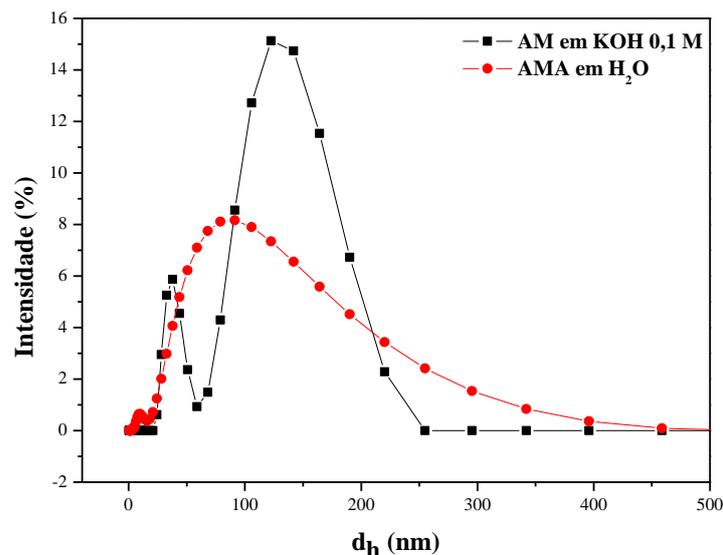


Figura 36. Curvas da distribuição de tamanho da AM e AMA nos solventes KOH 0,1 M e H₂O MiliQ, respectivamente

Esta diferença nos resultados, como visto cima, refere-se ao fato de que os valores obtidos pelo método dos cumulantes correspondem ao tamanho médio de partículas presentes em função das flutuações da intensidade de luz²¹⁵, ou seja, os valores encontrados correspondem a uma média de tamanho hidrodinâmico de todas as populações presentes. Já as curvas de distribuição revelam informações mais detalhadas sobre a distribuição da intensidade de cada grupo de partículas e informam se grupos de partículas com tamanhos substancialmente diferentes estão presentes na amostra. Tais amostras são chamadas de polidispersas²¹⁵.

Para AM o d_h tem valor de $(74,0 \pm 2,0)$ nm pelo método dos cumulantes. Por outro lado, de acordo com as curvas de distribuição, vê-se que a mesma é bimodal (Figura 36), composta por duas populações: uma com tamanho de 122,4 nm e outra menor, com tamanho de 37,8 nm. Para AMA, o d_h tem valor de $(79,0 \pm 4,0)$ nm pelo método dos cumulantes e a mesma apresenta uma distribuição de tamanho mais homogênea com valores em torno de 91,3 nm.

Entende-se que estas diferenças no perfil de distribuição ocorrem, pois, as partículas, devido ao movimento browniano, estão em constante agitação na solução. Como o sistema é polidisperso, em cada medição, uma população diferente de partículas aparece na janela de detecção do DLS (no volume de espalhamento), o que resulta em valores diferentes para as curvas de distribuição. Como visto em outros estudos²¹⁵, uma grande

variação nas medidas, neste caso, não corresponde a um erro experimental, mas sim, reflete o tamanho da partícula e a polidispersividade das mesmas nos solventes.

Além dos dados acima, as duas amostras de amilose apresentam polidispersão (*P.d.I*) alta: AM com valor de $0,42 \pm 0,03$ nm e em AMA com valor de $0,56 \pm 0,01$ nm. A *P.d.I* é uma medida da uniformidade das dimensões das partículas presentes na suspensão. Assim, o seu valor pode refletir a tendência das partículas em agregar^{215, 216}.

Neste estudo, os valores de *P.d.I* encontrados são altos ($> 0,1$). A partir desta informação verifica-se que existe correlação entre os valores de *P.d.I* e a curva de distribuição de tamanho das partículas. A agregação pode ser a razão pela qual haja esta diferença nos tamanhos hidrodinâmicos das amostras de AM e AMA a partir das curvas de distribuição. Além disso, os valores encontrados confirmam que as moléculas de AM e AMA, nos solventes descritos, formam sistemas polidispersos.

Acredita-se também que estas diferenças nos valores e perfil do d_h e curvas de distribuição podem ser devidas às diferentes interações moleculares que podem ocorrer às moléculas nos diferentes solventes. Após a acetilação, como visto anteriormente, sabe-se que alguns dos grupos hidroxilas presentes na AM, foram substituídos pelos grupos acetila na AMA. O grupo acetila é mais “volumoso” do que o grupo hidroxila. Sendo assim, este aumento no volume pode provocar mudanças nas interações entre as moléculas e cadeias, ocasionando mudanças não só em AMA, mas também nos complexos desenvolvidos.

Cabe ressaltar também que os valores do d_h e curvas de distribuição medidos por DLS são muito menores do que os valores observados a partir da análise de MEV (Figura 22 a e d). Esta discrepância com os resultados de MEV é evidentemente causada pelo estado físico das amostras em cada análise. Para as análises de MEV utilizou-se amostras no estado sólido e as de DLS encontram-se em solução. No entanto, nas duas análises realizadas, observa-se que a morfologia das partículas encontradas varia muito e que o sistema apresenta uma distribuição polidispersa.

7.4.4.2. Análise do tamanho dos complexos de inclusão

7.4.4.2.1. Comparação entre os d_h obtidos para os complexos de inclusão preparados com AM e AMA

Primeiramente, ao se analisar os d_h dos complexos de inclusão desenvolvidos com AM, nas duas temperaturas escolhidas, verifica-se que os valores encontrados são maiores do que os d_h obtidos para os complexos com AMA (Tab. 10).

Tabela 10. Valores do diâmetro hidrodinâmico (d_h) e polidispersão (*P.d.I*) dos complexos de inclusão desenvolvidos com AM e AMA.

Amostra	40 °C		65 °C	
	d_h (nm)	<i>P.d.I</i>	d_h (nm)	<i>P.d.I</i>
AM-RIF	155 ± 3	0,26 ± 0,03	117 ± 2	0,33 ± 0,04
AM-RB	98 ± 8	0,37 ± 0,05	117 ± 6	0,48 ± 0,03
AM-AB	89 ± 2	0,35 ± 0,03	113 ± 6	0,42 ± 0,03
AMA-RIF	79 ± 4	0,43 ± 0,02	76 ± 2	0,42 ± 0,05
AMA-RB	72 ± 6	0,43 ± 0,02	79 ± 7	0,44 ± 0,03
AMA-AB	76 ± 4	0,41 ± 0,03	76 ± 2	0,41 ± 0,01

Duas hipóteses podem ser dadas para explicar a diminuição do d_h para os complexos preparados com AMA em relação a AM. Primeiramente, AMA apresenta grupos acetila em sua estrutura e alguns grupos hidroxilas. Como informado na seção 7.4.3., os grupos hidroxilas estão localizados na parte externa da amilose. Além disso, as interações intramoleculares estabilizam a estrutura helicoidal deste composto e as interações intermoleculares são responsáveis pelas interações entre amilose e os ligantes^{13, 199}.

Nas amostras desenvolvidas com AMA, a presença dos grupos acetila podem desestabilizar a amilose e conseqüentemente aumentar, diminuir, ou até mesmo evitar a formação dos complexos de inclusão. Na primeira hipótese, os grupos acetila podem acabar induzindo a formação de fortes interações hidrofóbicas com as moléculas hóspedes fazendo com que os complexos tendam a se “fechar” ligeiramente sobre si mesmos, o que explicaria os valores de d_h muito próximo dos valores encontrados para AMA não encapsulada. Este resultado é similar ao ocorrido em outro estudo, onde foi possível se obter complexos de inclusão desenvolvidos com amido acetilado com d_h menores do que os obtidos com amido nativo²¹⁷.

Na segunda hipótese, como praticamente não houve alteração no d_h dos complexos preparados com AMA, pode-se supor de que não houve interação e que os dois compostos formadores do complexo encontram-se livres na solução. No entanto, para o composto preparado com RIF (AMA-RIF), esta hipótese pode ser descartada, visto que, como comentado na seção 7.3., na análise de espectroscopia de UV-vis, houve uma diminuição drástica da banda de absorção do ligante, causada por modificações nos cromóforos característicos do fármaco. Além disso, a diminuição da banda de absorção levou a uma diminuição na cor do complexo formado (Figuras 30 e 31).

Esta mudança na cor não foi observada para os demais complexos de inclusão formados com AMA (AMA-RB e AMA-AB). O fato pode indicar que para estes sistemas não houve interação entre as moléculas e as mesmas encontram-se livres na solução. No entanto, para confirmar esta hipótese, outras análises são necessárias.

7.4.4.2.2. Análise dos d_h obtidos para os complexos de inclusão

Conforme estudos anteriores²¹³, o diâmetro hidrodinâmico é um parâmetro importante para caracterização de sistemas de liberação controlada. Para sistemas de liberação controlada de fármacos, por exemplo, os tamanhos podem determinar a interação dos complexos com a membrana celular e influenciar na sua penetração através das barreiras fisiológicas²¹³.

Para aplicações *in vivo*, foi mostrado que nanopartículas poliméricas devem ter tamanhos intermediários em torno de 20 a 100 nm^{162, 218}. Nesta faixa de tamanho, quando as nanopartículas são projetadas de forma adequada, as mesmas podem circular no sangue por longos períodos de tempo²¹⁸.

Neste estudo, os tamanhos hidrodinâmicos médios dos complexos de inclusão formulados variaram entre 72 e 155 nm (Tabela 10), indicando que os mesmos podem ser utilizados em sistemas de liberação controlada.

Como foi visto no capítulo anterior, para AM, sem a molécula hóspede incluída, o d_h tem valor de $74,0 \pm 2,0$ nm e sua polidispersão tem valor de $0,42 \pm 0,1$. Este tamanho aumentou para $117,1 \pm 2,0$ nm, com *P.d.I* de $0,33 \pm 0,1$ quando RIF foi incorporado ao complexo. Este aumento no tamanho em comparação a AM pode ser devido à incorporação do ligante ao complexo.

Já para o complexo preparado com AMA e RIF, o tamanho sem a molécula hóspede incluída foi $78,9 \pm 4,0$ nm com *P.d.I* médio de $0,56 \pm 0,0$. Nesta amostra, o d_h não variou e

seu valor permaneceu semelhante ao encontrado para as amostras sem a molécula hóspede (76 ± 2 nm com *P.d.I* médio de $0,42 \pm 0,1$).

Estes resultados sugerem que, nos complexos AMA-RIF, a presença do ligante RIF induz fortes interações hidrofóbicas²¹⁷ com os grupos acetila presentes nos complexos. Estas interações tendem a “fechar o complexo sobre si mesmo” o que reduz o seu tamanho, diferente do que ocorre com os complexos preparados com AM, que contém uma quantidade maior de grupos hidroxilas, fato este que causa um aumento de 40% em seu tamanho hidrodinâmico.

Para os complexos desenvolvidos com RB, semelhante ao observado com RIF, os d_h das amostras preparadas com AM são maiores do que as preparadas com AMA (Tabela 10).

Para AM-RB o valor para o d_h é 117 ± 6 nm com *P.d.I* $0,48 \pm 0,03$ e para AMA-RB, os valores do d_h e *P.d.I* são respectivamente 79 ± 7 nm e $0,44 \pm 0,03$. No meio básico, meio em que as amostras de AM-RB foram preparadas, supõem-se que tanto AM como RB estão carregadas negativamente. As cargas negativas presentes aumentam a repulsão entre as moléculas o que pode acarretar em um aumento no tamanho das partículas. Como o sistema está em solução, tamanhos variados podem ser observados. Tamanhos estes que podem indicar a presença de moléculas complexadas (AM-RB) e moléculas livres (AM e RB).

Já os complexos AMA-RB foram preparados em água. Como vimos na seção 7.4.3.2. neste meio neutro, RB também tem um caráter negativo. Porém, a força de repulsão é menor do que no complexo AM-RB, meio extremamente básico. Este fato pode indicar que em AMA, RB interagiu mais facilmente com a molécula hospedeira, formando um complexo mais “enovelado”.

No entanto, como mostrado na seção 7.4.1., os valores de capacidade de carga encontrados para este complexo foram baixos (em torno de 1,3 %). Este valor sugere que a maior parte do ligante não encapsulou e encontra-se livre na solução. Desta forma, os tamanhos observados referem-se às moléculas livres na solução. Uma explicação para este fato é que no pH neutro RB encontra-se na forma anfótera. Nesta forma ocorre maior interação atrativa dos grupos carboxila e xanteno da molécula de RB¹²⁹, os quais passam a agregar e não tem condições de penetrar na cavidade de AMA, devido ao maior tamanho, ficando livre na solução ou se ligando com os grupos externos dela.

Finalmente, os d_h dos complexos desenvolvidos com AB também foram analisados. No complexo AM-AB, o valor do d_h foi $112,7 \pm 2,1$ nm com *P.d.I* de $0,42 \pm 0,03$. Para o

complexo AMA-AB o valor do d_h permaneceu em torno de $76,34 \pm 2,3$ nm e *P.d.I* de $0,41 \pm 0,01$.

Novamente, para os complexos preparados com AMA, os valores do d_h encontrados são semelhantes aos valores encontrados para a molécula hospedeira sozinha. Como na seção 7.4.1, para o complexo AMA-AB os valores de capacidade de carga são baixos (em torno de 1%) sugere-se que o ligante teve uma má incorporação no complexo. A má incorporação pode ser devida ao fato de que os grupos hidrofóbicos são mais volumosos difundindo mais lentamente no biopolímero, diminuindo assim sua capacidade de inclusão. O complexo desenvolvido com AM também tem uma incorporação baixa (em torno de 9%). No entanto, este valor é mais alto dos que os encontrados para AMA. Estes dados sugerem que o encapsulamento é mais eficiente para as amostras desenvolvidas com AM devido à presença de um maior número de hidroxilas. A presença de hidroxilas aumenta a estabilidade das hélices da AM. Este aumento na estabilidade pode aumentar o número de moléculas incluídas na hélice.

7.4.4.3. Análises de potencial zeta (PZ) das amostras estudadas

7.4.4.3.1. Comparação entre os resultados de PZ das amostras AM e AMA

Inicialmente foram analisados os valores de PZ encontrados para amilose no estado nativo (AM) e acetilado (AMA) (Tabela 11).

Tabela 11. Valores de PZ (mV) encontrados para AM no solvente KOH 0,1 M, para AM em KOH 0,1 M neutralizado e para AMA em H₂O MiliQ. Para AMA os valores de PZ encontrados são baixos. Valores baixos de PZ (muito próximos a zero) indicam fraca estabilidade para estes sistemas, no entanto, parecem ser viáveis do ponto de vista de absorção.

Amostra	PZ (mV)
AM em KOH 0,1 M	-33 ± 2
AM em KOH 0,1 M neutralizado	$-9,3 \pm 0,2$
AMA em H ₂ O miliQ	$-3 \pm 0,7$

As amostras de AM apresentaram uma carga negativa líquida com valores de PZ de $-33,0 \pm 1,8$ mV no solvente KOH 0,1 M, um valor altamente negativo. Após neutralização

do meio, o PZ aumentou para $-9,3 \pm 0,2$ mV. Para a amostra AMA o valor do PZ aumentou mais ainda, adquirindo um valor de $-3 \pm 0,7$ mV. Como observado, o PZ permaneceu negativo para todas as amostras.

Conforme a literatura, o PZ é um parâmetro diretamente relacionado à estabilidade dos complexos de inclusão²¹⁹. Estudos indicam que PZ com valores próximos de ± 30 mV estão relacionados a sistemas com boa estabilidade em suspensão²²⁰. Já valores de PZ abaixo de ± 30 mV podem indicar amostras instáveis, o que pode levar à agregação⁴⁵.

Além deste fato, sabe-se que os valores de PZ também tem efeitos biológicos importantes²²⁰. Os mesmos desempenham um papel na captação de partículas, pois a superfície da mucosa intestinal está carregada negativamente devido à presença da glicocálice.

Glicocálice é a região externa de uma membrana celular (Figura 37). A mesma é dominada por moléculas glicosiladas que dirigem suas interações específicas tais como o reconhecimento célula-célula e contribuem para a repulsão estérica, o que evita a indesejável adesão não específica de outras moléculas ou células²²¹.

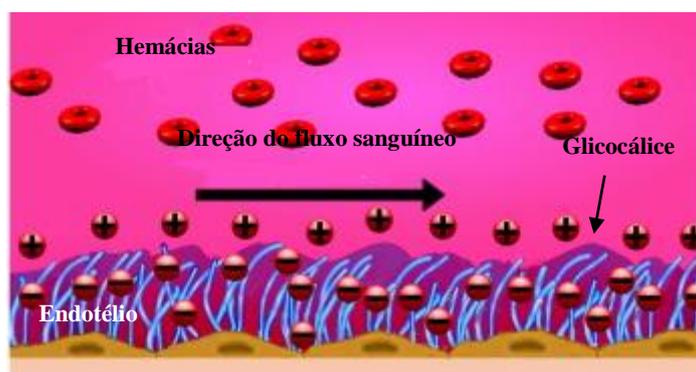


Figura 37. Ilustração esquemática do fluxo sanguíneo em um pequeno vaso sanguíneo mostrando a presença da glicocálice. Nos vasos sanguíneos humanos as células endoteliais são cobertas por uma camada gelatinosa de glicoproteínas ligadas à membrana e proteínas do plasma conhecidas por glicocálice. Fisicamente, a camada de glicocálice é altamente carregada negativamente. Hemácias normalmente não invadem esta região por causa da repulsão eletrostática²²².

Partículas com valores baixos de PZ (menores do que -30 mV), têm tempos de circulação sanguínea mais longos do que partículas carregadas²²³. Além disso, estudos também sugerem, que materiais com valores de PZ negativos são mais acessíveis para fixar em superfícies do que materiais sem carga ou com carga elétrica positiva^{219, 220, 223, 224}.

Para partículas carregadas positivamente, tais como a quitosana, estudos verificaram que as mesmas apresentam forte interação eletrostática com a mucosa intestinal (carregada negativamente). Este fato contribui para o aumento da absorção intestinal dos fármacos encapsulados²²². No entanto, esta forte interação eletrostática pode abrandar a progressão e penetração dessas partículas na superfície das células epiteliais, reduzindo assim, a sua absorção^{222, 223}. Por outro lado, estudos demonstraram que partículas não ionizadas tem uma maior afinidade para interagir com as células do que as partículas ionizadas ou carregadas positivamente²²².

Por conseguinte, um potencial negativo baixo para as amostras (principalmente os encontrados para as amostras solubilizadas em meio neutro (Tabela 11) parecem ser desejáveis de um ponto de visto de absorção de partículas e absorção do fármaco.

Além disso, os valores negativos obtidos para o PZ indicam que a superfície das amostras é carregada negativamente. A maior estabilidade de AM possivelmente deve-se a maior quantidade de grupos hidroxilas na superfície externa desta molécula. Para AMA, a carga negativa e baixa estabilidade podem ser devidos à disponibilidade dos grupos acetila livres no polímero. Resultados semelhantes foram encontrados em outros estudos^{45, 225}.

7.4.4.3.2. Avaliação dos resultados de PZ obtidos para os complexos desenvolvidos com AM e AMA

Análises de PZ dos complexos de inclusão também foram realizadas (Tabela 12). Os valores encontrados, como já era esperado, variaram dependendo do tipo de complexo e do tipo de ligante usado.

Tabela 12. Valores de PZ (mV) encontrados para os complexos de inclusão desenvolvidos.

Amostra	PZ (mv)
AM-RIF	-18 ± 0,7
AM-RB	-38 ± 3
AM-AB	-47 ± 1
AMA-RIF	-9 ± 1
AMA-RB	-4 ± 1
AMA-AB	-6 ± 2

Como pode ser visto, os valores de PZ permanecem negativos para todos os complexos. No entanto, para os complexos AM-RB e AM-AB, diferente do que acontece

com os demais, verifica-se uma alta estabilidade (valores menores que -30 mV). Como é sabido, a amilose é composta por unidades de anidroglicose e os resíduos de glicose dos grupos hidroxilas tem um pKa elevado (em torno de 12,34)²²⁶. Este fato explica os valores de PZ mais negativos para estas amostras, visto que estes complexos foram desenvolvidos em solução alcalina de KOH 0,1 M.

Para os demais sistemas, vê-se uma fraca estabilidade. Possivelmente isto ocorre, pois nos sistemas desenvolvidos com AMA há uma diminuição nos grupos hidroxilas (estes foram substituídos pelos grupos acetila).

Para os complexos desenvolvidos usando a molécula hóspede RIF observou-se que a inclusão da mesma à estrutura melhorou a estabilidade coloidal para ambos os complexos (os valores de PZ diminuíram de $-9 \pm 0,2$ mV para $-18 \pm 0,7$ mV para AM-RIF e $-3 \pm 0,7$ mV para $-9 \pm 0,8$ mV para AMA). O aumento da estabilidade coloidal pode ser devido à carga negativa adicionada pelas moléculas de RIF quando inseridas ao sistema.

Ao analisar o PZ dos complexos desenvolvidos com RB também observa-se um aumento na estabilidade coloidal após a complexação (para AM e AMA).

Para o complexo AMA-RB, observa-se que a diferença de valor é muito baixa (a molécula AMA sozinha apresenta PZ de $-3 \pm 0,7$ mV e na presença de RB, seu valor passa a ser $-4 \pm 1,1$ mV. Estudos sugerem que PZ próximos da neutralidade, também implicam, indiretamente em uma dispersão estável. Isto ocorre pois nestas partículas as interações atrativas e repulsivas não estão presentes²²⁷. Sendo assim, este resultado de PZ pode indicar uma estabilidade deste sistema. No entanto, esta diferença não é significativa e este resultado é mais um indicativo da fraca interação entre AMA e RB.

Além disso, como vimos na seção 6 há uma diferença de pH no preparo dos dois complexos (para o complexo AM-RB utilizou-se KOH 0,1 M como solvente e para o complexo AMA-RB, utilizou-se H₂O miliQ). De acordo com a literatura uma alteração no pH resulta na formação de diferentes espécies iônicas e superfícies. À pH baixo (menor do que 4) os íons de RB são catiônicos e a forma molecular é monomérica. Este fato facilitaria sua entrada na cavidade da molécula hospedeira. Em pH superior a 4, a forma anfótera de RB pode aumentar a agregação devido às interações eletrostáticas atrativas entre os grupos carboxílicos e xanteno dos monômeros, formando uma forma molecular maior incapaz de encapsular¹²⁹.

Finalmente, para os complexos desenvolvidos com AB, também verifica-se um aumento na estabilidade coloidal. Para o complexo AM-AB houve um aumento em torno de

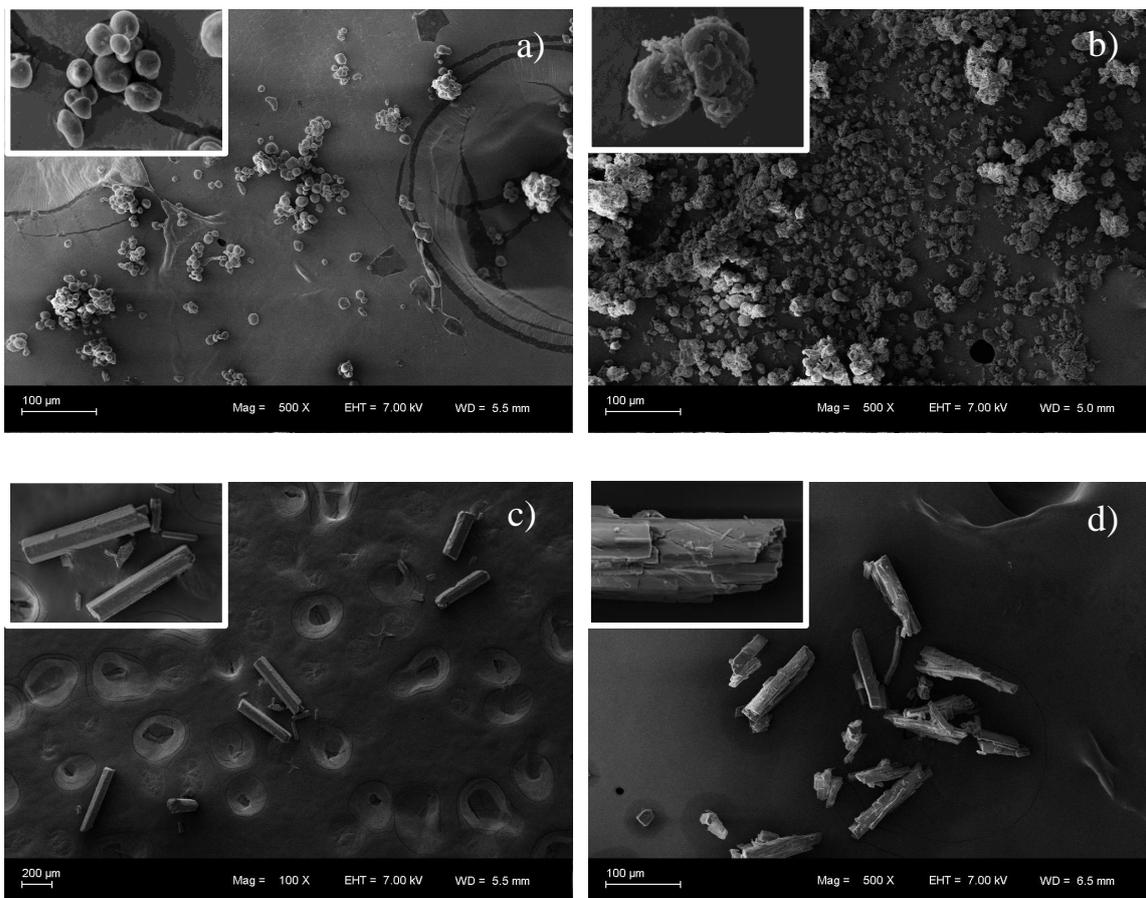
43% e para o complexo AMA-AB o aumento foi significativo (o valor do PZ mudou de $-2,8 \pm 0,7$ mV para $-6,0 \pm 1,8$ mV). No entanto o valor é baixo, o que também indica uma fraca interação entre estas duas moléculas.

7.4.5. Morfologia dos complexos de inclusão no estado sólido por Microscopia eletrônica de varredura

Após o desenvolvimento dos complexos de inclusão no estado líquido, realizou-se a precipitação e secagem dos mesmos. O objetivo era obter complexos de inclusão no estado sólido.

Para a obtenção destas imagens dos complexos de inclusão no estado sólido realizou-se a precipitação e secagem dos mesmos, conforme explicado na seção 6.2.. Neste processo foi observado que, para os complexos AMA-RB e AMA-AB, não houve formação de precipitado para obtenção de complexos no estado sólido.

As micrografias obtidas para todos os sistemas, antes e após a inclusão, são mostradas abaixo (Figuras 38 e 39).



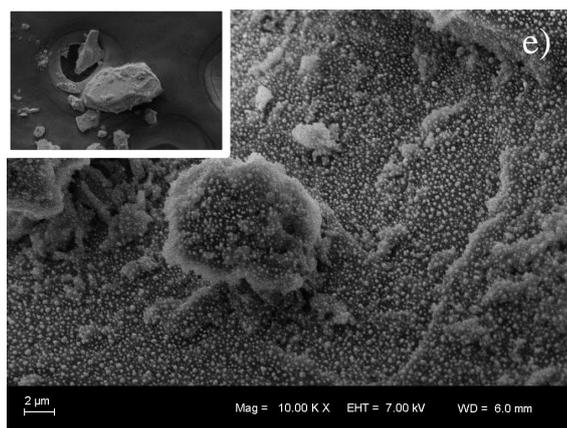


Figura 38. Imagens de MEV das amostras obtidas dos materiais isolados: a) AM; b) AMA; c) RIF, d) RB e e) AB.

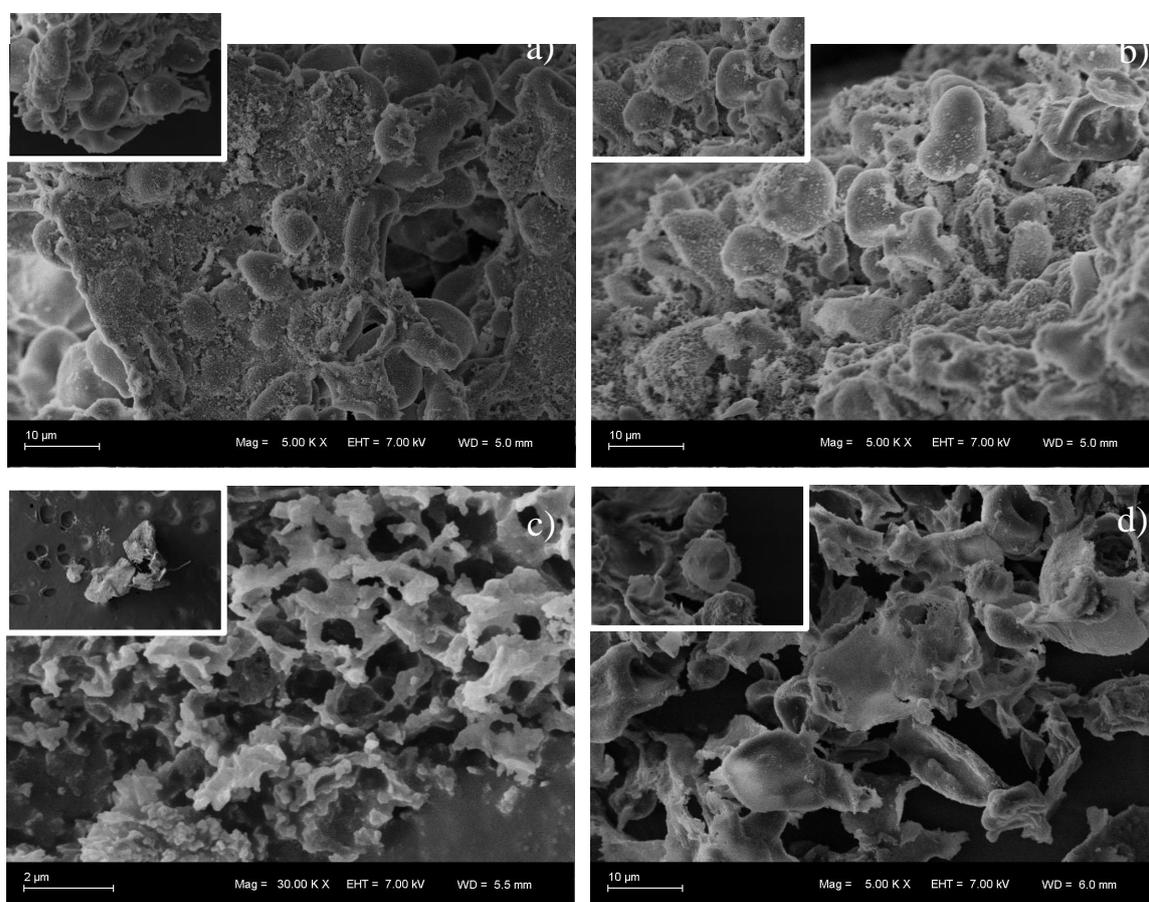


Figura 39. Imagens de MEV das amostras obtidas após precipitação e secagem da solução aquosa dos complexos de inclusão desenvolvidos: a) AM-RIF; b) AMA-RIF; c) AM-RB, d) AM-AB.

Primeiramente, as imagens de MEV obtidas (Figura 38 a) como mostrado no capítulo 7.1.3., mostram, que as moléculas de amilose formam grânulos lisos. Após a acetilação a

superfície torna-se mais áspera do que AM (Figura 38 b). Este fato foi devido à ruptura das ligações de hidrogênio causado pela introdução dos grupos acetila na molécula.

Ao comparar a morfologia dos materiais isolados e complexados (Figura 38 e 39) observam-se alterações possivelmente induzidas pela interação entre as moléculas hospedeira e os ligantes em tamanho e forma.

O ligante RIF, antes da inclusão no complexo (Figura 38 c), é observada como sendo formada por cristais na forma de agulha que indicam que o fármaco encontram-se na forma cristalina. Esta morfologia já foi identificada em outros estudos^{228, 229}. Após a formação dos complexos, em ambos os casos, observou-se uma mudança proeminente na morfologia das superfícies (Figura 39 a e b). Vê-se que as mesmas passaram a apresentar uma superfície mais agregada nas quais as arestas de RIF encontram-se dispostas entre AM e AMA, não sendo possível mais identificar os compostos isoladamente. Ou seja, a RIF cristalina é convertida em uma estrutura amorfa juntamente com AM e AMA.

Para o ligante RB, na análise de MEV (Figura 38 d), observa-se que a morfologia é composta por cristais com formato irregular e grande variedade de tamanhos, semelhante ao observado em outro estudo¹²⁰. Após a complexação (Figura 39 c), semelhante ao que ocorre com RIF, há uma modificação na superfície: observa-se claramente uma estrutura desordenada, onde a AM perde seus grânulos, não sendo mais possível observar a presença dos cristais de RB. Além disso, claramente observa-se a perda na morfologia da molécula hospedeira e do ligante. Este fato pode indicar que a presença do ligante alterou de forma decisiva a estrutura de AM, causando uma modificação na estrutura de forma tão evidente que não foi possível identificar cristais de RB na superfície.

Finalmente, semelhante ao ocorrido com RB, a morfologia de AB e AM foram alteradas drasticamente após a complexação (Figura 39 d). Acredita-se que os mesmos, quando incluídos na molécula hospedeira, sofrem interações entre si que desestabilizam a formação dos complexos em AM no estado sólido. Desta forma, deixa-se de se formar uma estrutura cristalina dando origem a uma estrutura amorfa.

8. CONCLUSÕES

8. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos para o GM, % Ac e GS para a AM após a esterificação fornecerem os valores de 16,6 %, $18,7 \pm 0,3$ e $0,86 \pm 0,01$, respectivamente. O valor de GM é um indicativo de que houve modificação química na estrutura da molécula. Já os valores de % Ac e GS sugerem que AMA é mais solúvel em água do que AM.

O aparecimento das bandas em 1155 cm^{-1} , 1240 cm^{-1} e em 1727 cm^{-1} no espectro de FTIR confirmaram a acetilação. Por outro lado, não foi detectada a presença de bandas na região entre $1850\text{-}1760 \text{ cm}^{-1}$ e 1700 cm^{-1} (bandas características do anidrido acético e ácido acético). Sendo assim, esta amostra está livre destes compostos.

A partir da técnica de MEV analisou-se a morfologia do material acetilado, o qual apresentou uma superfície rugosa, causada pela introdução de grupos hidrofílicos à molécula. As amostras AM e AMA também apresentaram duas perdas de massa, no entanto, para AMA essas perdas ocorreram a temperaturas mais baixas, o que pode indicar uma fraca estabilidade para esta amostra. As análises de DSC mostraram que a acetilação diminuiu a entalpia o que sugere uma menor porcentagem de estruturas cristalinas na amostra.

A partir da técnica de UV-vis foi possível confirmar a formação dos complexos de inclusão. Para RIF houve diminuição nas bandas características. Possivelmente, neste ligante, o cromóforo naftohidroquinona, que contém grupos hidroxilas, esteja ou encoberto ou formando novas ligações com a amilose (AM e AMA). Para RB e AB a redução na banda de absorção é menor do que em RIF. Foi suposto, neste caso, que aqui há pouca interação entre as moléculas.

Os valores de % EI e % CC variaram de acordo com o ligante e amilose utilizada. Os complexos desenvolvidos à 65°C apresentaram % EI maiores. O complexo AMA-RIF apresentou % EI maior do que o complexo AM-RIF, fato que pode estar relacionado à adição dos grupos acetila à estrutura da amilose. Já para os complexos AMA-RB e AMA-AB, verificou-se valores baixos para % CC, possivelmente devido à baixa solubilidade aquosa destes ligantes.

A partir da técnica de DLS concluiu-se que as amostras AM e AMA são polidispersas. Os d_h estão na faixa ideal de tamanho para sistemas de liberação controlada. No entanto, os d_h dos complexos preparados com AM são maiores do que os preparados com AMA, possivelmente devido a presença dos grupos acetila que podem desestabilizar a amilose, provocando uma redução em seu poder de complexação.

Para o complexo AM-RIF houve um aumento no d_h (causado pela incorporação do ligante à AM). Já para AMA-RIF o d_h reduziu em torno de 40% e este fato pode ser devido a presença dos grupos acetila que aumentaram as interações intermoleculares. Para o complexo AM-RB também observou-se um aumento no d_h após a complexação causado pela repulsão entre as moléculas devido ao caráter negativo do ligante. Para AMA-RB os tamanhos são similares à molécula de AMA livre, possivelmente devido ao caráter anfótero de RB, o qual aumenta a agregação e dificulta a inclusão. Finalmente, para os complexos preparados com AB, os valores do d_h são semelhantes aos valores encontrados para os outros complexos. Em AMA-AB também observou-se um d_h semelhante à AMA livre, o que indica uma má incorporação do ligante ao complexo.

Os valores de PZ permaneceram na gama de valores negativos, em todos os casos. Para AM-RB e AM-AB, verificou-se uma alta estabilidade. Já para os complexos produzidos com AMA observou-se uma fraca estabilidade causada pela diminuição dos grupos hidroxilas. Para os complexos preparados com RIF observou-se que a inclusão melhorou a estabilidade coloidal. Para RB e AB também houve um aumento na estabilidade após a complexação, no entanto, para AMA-RB a diferença é pouco significativa, o que é um indicativo da fraca interação entre estes ligantes.

Após precipitação e secagem dos complexos verificou-se que AMA-RB e AMA-AB não precipitaram, concluindo-se assim, que para estas amostras, não há formação de complexos no estado sólido. Comparando a morfologia dos materiais isolados e complexados verificou-se alterações: RIF é formada por hastes longas e cristalinas e, após a complexação, sua morfologia alterou-se, passando a apresentar uma superfície mais agregada nas quais as arestas de RIF encontram-se dispostas em AM e AMA. RB apresenta uma morfologia composta por cristais de formatos irregulares, com tamanhos variados e, semelhante à RIF, após a complexação, não há possibilidade de identificar as moléculas separadamente. Para o ligante AB, a morfologia também foi alterada drasticamente, ou seja, quando incluídos em AM, os mesmos sofreram interações que desestabilizaram a molécula.

Por fim, considerando os resultados obtidos, concluiu-se que a partir de uma técnica simples é possível se obter complexos de inclusão de amilose. O estudo foi válido, visto que permitiu compreender a eficiência, morfologia e propriedades de complexação da AM e AMA com diferentes moléculas hóspedes. O processo de acetilação não foi eficiente para todos os ligantes, porém, os complexos preparados com RIF apresentaram características interessantes e promissoras para testes *in vitro*.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Yang, L.; Zhang, B.; Yi, J.; Liang, J.; Liu, Y.; Zhang, L.-M., Preparation, characterization, and properties of amylose-ibuprofen inclusion complexes. *Starch/Staerke*, Ahead of Print.
2. Cohen, R.; Orlova, Y.; Kovalev, M.; Ungar, Y.; Shimoni, E., Structural and Functional Properties of Amylose Complexes with Genistein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, *56* (11), 4212-4218.
3. Crupi, V.; Ficarra, R.; Guardo, M.; Majolino, D.; Stancanelli, R.; Venuti, V., UV-vis and FTIR-ATR spectroscopic techniques to study the inclusion complexes of genistein with β -cyclodextrins. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **2007**, *44* (1), 110-117.
4. Chen, J.; Miao, M.; Campanella, O.; Jiang, B.; Jin, Z., Biological macromolecule delivery system for improving functional performance of hydrophobic nutraceuticals. *Current Opinion in Food Science* **2016**, *9*, 56-61.
5. Kumar Malik, D.; Baboota, S.; Ahuja, A.; Hasan, S.; Ali, J., Recent advances in protein and peptide drug delivery systems. *Current drug delivery* **2007**, *4* (2), 141-151.
6. Liu, Z.; Jiao, Y.; Wang, Y.; Zhou, C.; Zhang, Z., Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Advanced drug delivery reviews* **2008**, *60* (15), 1650-1662.
7. Pushpamalar, J.; Veeramachineni, A. K.; Owh, C.; Loh, X. J., Biodegradable Polysaccharides for Controlled Drug Delivery. *ChemPlusChem* **2016**.
8. Agnihotri, S. A.; Mallikarjuna, N. N.; Aminabhavi, T. M., Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release* **2004**, *100* (1), 5-28.
9. Zhang, Z.-f.; Zhou, J.-p.; Huo, M.-r., Chitosan microspheres drug delivery systems. *Progress in Pharmaceutical Sciences* **2006**, *30* (6), 261-266.
10. McClements, D. J., Encapsulation, protection, and release of hydrophilic active components: Potential and limitations of colloidal delivery systems. *Advances in Colloid and Interface Science* **2015**, *219*, 27-53.
11. Zhu, X.; Sun, J.; Wu, J., Study on the inclusion interactions of β -cyclodextrin and its derivative with dyes by spectrofluorimetry and its analytical application. *Talanta* **2007**, *72* (1), 237-242.
12. Fenyvesi, E.; Zemlényi, C.; Orgoványi, J.; Oláh, E.; Sente, L., Can conversion mixture substitute beta-cyclodextrin in encapsulation of essential oils and their components? *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **2016**, *86* (1-2), 55-66.
13. Putseys, J. A.; Lamberts, L.; Delcour, J. A., Amylose-inclusion complexes: Formation, identity and physico-chemical properties. *J. Cereal Sci.* **2010**, *51* (3), 238-247.

14. Heinemann, C.; Escher, F.; Conde-Petit, B., Structural features of starch–lactone inclusion complexes in aqueous potato starch dispersions: the role of amylose and amylopectin. *Carbohydrate Polymers* **2003**, *51* (2), 159-168.
15. Yang, L.; Zhang, B.; Yi, J.; Liang, J.; Liu, Y.; Zhang, L. M., Preparation, characterization, and properties of amylose-ibuprofen inclusion complexes. *Starch-Stärke* **2013**, *65* (7-8), 593-602.
16. Wulff, G.; Avgenaki, G.; Guzmán, M. S. P., Molecular encapsulation of flavours as helical inclusion complexes of amylose. *Journal of cereal science* **2005**, *41* (3), 239-249.
17. Yeo, L.; Thompson, D. B.; Peterson, D. G., Inclusion complexation of flavour compounds by dispersed high-amylose maize starch (HAMS) in an aqueous model system. *Food Chemistry* **2016**, *199*, 393-400.
18. Madene, A.; Jacquot, M.; Scher, J.; Desobry, S., Flavour encapsulation and controlled release—a review. *International journal of food science & technology* **2006**, *41* (1), 1-21.
19. Kida, T.; Minabe, T.; Okabe, S.; Akashi, M., Partially-methylated amyloses as effective hosts for inclusion complex formation with polymeric guests. *Chemical Communications* **2007**, (15), 1559-1561.
20. Wulff, G.; Steinert, A.; Höller, O., Modification of amylose and investigation of its inclusion behavior. *Carbohydrate Research* **1998**, *307* (1–2), 19-31.
21. Bruno, F. F.; Akkara, J. A.; Ayyagari, M.; Kaplan, D. L.; Gross, R.; Swift, G.; Dordick, J. S., Enzymic modification of insoluble amylose in organic solvents. *Macromolecules* **1995**, *28* (26), 8881-8883.
22. Carbinatto, F. M.; Ribeiro, T. S.; Colnago, L. A.; Evangelista, R. C.; Cury, B. S. F., Preparation and Characterization of Amylose Inclusion Complexes for Drug Delivery Applications. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2015**.
23. Loftsson, T.; Duchêne, D., Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *International journal of pharmaceutics* **2007**, *329* (1), 1-11.
24. Vyas, A.; Saraf, S.; Saraf, S., Cyclodextrin based novel drug delivery systems. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **2008**, *62* (1-2), 23-42.
25. Singh, M.; Byars, J. A.; Kenar, J. A., Amylose–Potassium Oleate Inclusion Complex in Plain Set-Style Yogurt. *Journal of food science* **2014**, *79* (5), E822-E827.
26. Szente, L.; Szejtli, J., Cyclodextrins as food ingredients. *Trends in Food Science & Technology* **2004**, *15* (3), 137-142.
27. Buschmann, H.-J.; Schollmeyer, E., Applications of cyclodextrins in cosmetic products: a review. *Journal of cosmetic science* **2002**, *53* (3), 185-192.
28. Ozmen, E. Y.; Sezgin, M.; Yilmaz, A.; Yilmaz, M., Synthesis of β -cyclodextrin and starch based polymers for sorption of azo dyes from aqueous solutions. *Bioresource Technology* **2008**, *99* (3), 526-531.

29. Rawat, S.; Jain, S. K., Solubility enhancement of celecoxib using β -cyclodextrin inclusion complexes. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* **2004**, 57 (2), 263-267.
30. Calvo, P.; Remunan-Lopez, C.; Vila-Jato, J. L.; Alonso, M. J., Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *Journal of Applied Polymer Science* **1997**, 63 (1), 125-132.
31. Bosquez-Molina, E.; Zavaleta-Mejía, L., New Bioactive Biomaterials Based on Chitosan. *Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities* **2016**, 33.
32. Conde-Petit, B.; Escher, F.; Nuessli, J., Structural features of starch-flavor complexation in food model systems. *Trends in Food Science & Technology* **2006**, 17 (5), 227-235.
33. Zhang, L.; Cheng, H.; Zheng, C.; Dong, F.; Man, S.; Dai, Y.; Yu, P., Structural and release properties of amylose inclusion complexes with ibuprofen. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **2016**, 31, 101-107.
34. Zhu, J.; Heng, Y.; Zhang, D.; Wen, Y.; Li, H.; Zhao, G., Synthesis and characterization of enzymatically cross-linked feruloyl amylopectin for curcumin encapsulation. *International Journal of Biological Macromolecules* **2016**, 85, 126-132.
35. Santiago, L. G.; Castro, G. R., Novel technologies for the encapsulation of bioactive food compounds. *Current Opinion in Food Science* **2016**, 7, 78-85.
36. Lu, H.-W.; Zhang, L.-M.; Wang, C.; Chen, R.-F., Preparation and properties of new micellar drug carriers based on hydrophobically modified amylopectin. *Carbohydrate polymers* **2011**, 83 (4), 1499-1506.
37. Peres, G. L.; Leite, D. C.; da Silveira, N. P., Study of complexes formation between transition metal ions and amylopectin in DMSO/H₂O solution. *Starch-Stärke* **2016**.
38. Adetunji, C. O.; Fawole, O. B.; Arowora, K. A.; Adetunji, J. B.; Agbaje, A. B.; Ogundare, M. O., Effects of hydrophilic plasticizers added to chitosan coating for extending the storage life of Citrus sinensis. *South Asian J. Exp. Biol.* **2013**, 3 (3), 131-136.
39. Crini, G., Studies on adsorption of dyes on beta-cyclodextrin polymer. *Bioresource technology* **2003**, 90 (2), 193-198.
40. Crini, G.; Peindy, H. N., Adsorption of CI Basic Blue 9 on cyclodextrin-based material containing carboxylic groups. *Dyes and Pigments* **2006**, 70 (3), 204-211.
41. Crini, G., Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in wastewater treatment. *Progress in Polymer Science* **2005**, 30 (1), 38-70.
42. Kim, J.-Y.; Huber, K. C., Preparation and characterization of corn starch- β -carotene composites. *Carbohydrate Polymers* **2016**, 136, 394-401.
43. Shi, A.; Li, D.; Liu, H.; Adhikari, B.; Wang, Q., Effect of drying and loading methods on the release behavior of ciprofloxacin from starch nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules* **2016**, 87, 55-61.

44. Warren, F. J.; Gidley, M. J.; Flanagan, B. M., Infrared spectroscopy as a tool to characterise starch ordered structure—a joint FTIR–ATR, NMR, XRD and DSC study. *Carbohydrate Polymers* **2016**, *139*, 35-42.
45. Mahmoudi Najafi, S. H.; Baghaie, M.; Ashori, A., Preparation and characterization of acetylated starch nanoparticles as drug carrier: Ciprofloxacin as a model. *International Journal of Biological Macromolecules* **2016**, *87*, 48-54.
46. Lin, L.; Cai, C.; Gilbert, R. G.; Li, E.; Wang, J.; Wei, C., Relationships between amylopectin molecular structures and functional properties of different-sized fractions of normal and high-amylose maize starches. *Food Hydrocolloids* **2016**, *52*, 359-368.
47. Ahmed, Z.; Tetlow, I. J.; Ahmed, R.; Morell, M. K.; Emes, M. J., Protein–protein interactions among enzymes of starch biosynthesis in high-amylose barley genotypes reveal differential roles of heteromeric enzyme complexes in the synthesis of A and B granules. *Plant Science* **2015**, *233*, 95-106.
48. Koma, S.; Kamal-Alahmad; Niazi, S.; Ammar, A.-F.; Zaaboul, F.; Zhang, T. Chemically modified starch and utilization in food stuffs 2016, p. 264-272.
49. Delcour, J. A.; Joye, I. J.; Pareyt, B.; Wilderjans, E.; Brijs, K.; Lagrain, B., Wheat Gluten Functionality as a Quality Determinant in Cereal-Based Food Products. In *Annual Review of Food Science and Technology, Vol 3*, Doyle, M. P.; Klaenhammer, T. R., Eds. Annual Reviews: Palo Alto, 2012; Vol. 3, pp 469-492.
50. Peres, G. L.; Leite, D. C.; Silveira, N. P. d., Ultrasound effect on molecular weight reduction of amylopectin. *Starch-Stärke* **2015**, *67* (5-6), 407-414.
51. Fuentes, C.; Zielke, C.; Prakash, M.; Kumar, P.; Peñarrieta, J. M.; Eliasson, A.-C.; Nilsson, L., The effect of baking and enzymatic treatment on the structural properties of wheat starch. *Food Chemistry* **2016**, *213*, 768-774.
52. Gandini, A.; Lacerda, T. M., From monomers to polymers from renewable resources: Recent advances. *Progress in Polymer Science* **2015**.
53. Tester, R. F.; Karkalas, J.; Qi, X., Starch—composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science* **2004**, *39* (2), 151-165.
54. Jayakody, L.; Hoover, R., Effect of annealing on the molecular structure and physicochemical properties of starches from different botanical origins – A review. *Carbohydrate Polymers* **2008**, *74* (3), 691-703.
55. Wani, A. A.; Singh, P.; Shah, M. A.; Schweiggert-Weisz, U.; Gul, K.; Wani, I. A., Rice starch diversity: effects on structural, morphological, thermal, and physicochemical properties—a review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2012**, *11* (5), 417-436.
56. Cai, X.; Yang, L.; Zhang, L.-M.; Wu, Q., Evaluation of amylose used as a drug delivery carrier. *Carbohydr. Res.* **2010**, *345* (7), 922-928.

57. Marinopoulou, A.; Papastergiadis, E.; Raphaelides, S. N.; Kontominas, M. G., Structural characterization and thermal properties of amylose-fatty acid complexes prepared at different temperatures. *Food Hydrocolloids* **2016**, *58*, 224-234.
58. Rachmawati, R.; Woortman, A. J. J.; Loos, K., Tunable Properties of Inclusion Complexes Between Amylose and Polytetrahydrofuran. *Macromol. Biosci.* **2013**, *13* (6), 767-776.
59. Seo, T.-R.; Kim, J.-Y.; Lim, S.-T., Preparation and characterization of crystalline complexes between amylose and C18 fatty acids. *LWT - Food Science and Technology* **2015**, *64* (2), 889-897.
60. Le-Bail, P.; Houinsou-Houssou, B.; Kosta, M.; Pontoire, B.; Gore, E.; Le-Bail, A., Molecular encapsulation of linoleic and linolenic acids by amylose using hydrothermal and high-pressure treatments. *Food Research International* **2015**, *67*, 223-229.
61. Zabar, S.; Lesmes, U.; Katz, I.; Shimoni, E.; Bianco-Peled, H., Structural characterization of amylose-long chain fatty acid complexes produced via the acidification method. *Food Hydrocolloids* **2010**, *24* (4), 347-357.
62. Seo, T.-R.; Kim, J.-Y.; Lim, S.-T., Preparation and characterization of crystalline complexes between amylose and C18 fatty acids. *LWT-Food Science and Technology* **2015**, *64* (2), 889-897.
63. Snape, C. E.; Morrison, W. R.; Maroto-Valer, M. M.; Karkalas, J.; Pethrick, R. A., Solid state ¹³C NMR investigation of lipid ligands in V-amylose inclusion complexes. *Carbohydrate Polymers* **1998**, *36* (2), 225-237.
64. Liu, H.; Arntfield, S. D.; Holley, R. A.; Aime, D. B., Amylose-lipid complex formation in acetylated pea starch-lipid systems. *Cereal Chemistry* **1997**, *74* (2), 159-162.
65. Carbinatto, F. M.; Ribeiro, T. S.; Colnago, L. A.; Evangelista, R. C.; Cury, B. S. F., Preparation and Characterization of Amylose Inclusion Complexes for Drug Delivery Applications. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2016**, *105* (1), 231-241.
66. Rodrigues, A.; Emeje, M., Recent applications of starch derivatives in nanodrug delivery. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *87* (2), 987-994.
67. Li, H.; Prakash, S.; Nicholson, T. M.; Fitzgerald, M. A.; Gilbert, R. G., The importance of amylose and amylopectin fine structure for textural properties of cooked rice grains. *Food Chemistry* **2016**, *196*, 702-711.
68. Lima, M. d. G. d. S.; Lopes, N. F.; Zimmer, P. D.; Meneghello, G. E.; Mendes, C. R.; do, A. L., Enzyme expression in indica and japonica rice cultivars under saline stress. *Acta Sci., Biol. Sci.* **2012**, *34* (4), 473-481.
69. Hoover, R., Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review. *Carbohydrate Polymers* **2001**, *45* (3), 253-267.

70. Kim, J.-Y.; Lee, J. H.; Jeong, D.-Y.; Jang, D.-K.; Seo, T.-R.; Lim, S.-T., Preparation and characterization of aqueous dispersions of dextrin and policosanol composites. *Carbohydrate polymers* **2015**, *121*, 140-146.
71. Carbinatto, F. M., Complexos de inclusão com amilose: obtenção, caracterização e avaliação como sistemas de liberação controlada de fármacos. **2014**.
72. Manca, M.; Woortman, A. J. J.; Loos, K.; Loi, M. A., Imaging inclusion complex formation in starch granules using confocal laser scanning microscopy. *Starch/Staerke* **2015**, *67* (1-2), 132-138.
73. Rundle, R. E.; Baldwin, R. R., The Configuration of Starch and the Starch—Iodine Complex. I. The Dichroism of Flow of Starch—Iodine Solutions¹. *Journal of the American Chemical Society* **1943**, *65* (4), 554-558.
74. Katz, J. R., On the change in x-ray pattern when starch preparations are dried (as a way of characterizing these substances with x-rays). *Recueil des travaux chimiques des Pays-Bas* **1937**, *56* (8), 766-772.
75. Rodríguez, S. D.; Bernik, D. L.; Méreau, R.; Castet, F.; Champagne, B.; Botek, E., Amylose–vanillin complexation assessed by a joint experimental and theoretical analysis. *The Journal of Physical Chemistry C* **2011**, *115* (47), 23315-23322.
76. Kenar, J. A.; Compton, D. L.; Little, J. A.; Peterson, S. C., Formation of inclusion complexes between high amylose starch and octadecyl ferulate via steam jet cooking. *Carbohydrate Polymers* **2016**, *140*, 246-252.
77. Zhu, F., Interactions between starch and phenolic compound. *Trends in Food Science & Technology* **2015**, *43* (2), 129-143.
78. Wang, J.; Guleria, S.; Koffas, M. A. G.; Yan, Y., Microbial production of value-added nutraceuticals. *Current Opinion in Biotechnology* **2016**, *37*, 97-104.
79. Lesmes, U.; Cohen, S. H.; Shener, Y.; Shimoni, E., Effects of long chain fatty acid unsaturation on the structure and controlled release properties of amylose complexes. *Food Hydrocolloids* **2009**, *23* (3), 667-675.
80. Ribeiro, A. C.; Fonseca, L. P.; Soares, R.; da Silveira, N. P.; Peres, G. L. In *Preparation and characterization of amylose-pyrazinamide inclusion complexes*, 2015; IEEE: pp 1-1.
81. Basit, A. W.; Ibekwe, V. C., Colonic drug delivery formulation. Google Patents: 2015.
82. McConnell, E. L.; Tutas, J.; Mohamed, M. A. M.; Banning, D.; Basit, A. W., Colonic drug delivery using amylose films: the role of aqueous ethylcellulose dispersions in controlling drug release. *Cellulose (Dordrecht, Neth.)* **2007**, *14* (1), 25-34.
83. Schmitt, H.; Creton, N.; Prashantha, K.; Soulestin, J.; Lacrampe, M. F.; Krawczak, P., Melt-blended halloysite nanotubes/wheat starch nanocomposites as drug delivery system. *Polymer Engineering & Science* **2015**, *55* (3), 573-580.

84. Kang, B.; Opatz, T.; Landfester, K.; Wurm, F. R., Carbohydrate nanocarriers in biomedical applications: functionalization and construction. *Chemical Society Reviews* **2015**.
85. Arijaje, E. O.; Wang, Y.-J., Effects of Chemical and Enzymatic Modifications on Starch–Oleic Acid Complex Formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2015**, *63* (16), 4202-4210.
86. Li, S., Removal of crystal violet from aqueous solution by sorption into semi-interpenetrated networks hydrogels constituted of poly (acrylic acid-acrylamide-methacrylate) and amylose. *Bioresource technology* **2010**, *101* (7), 2197-2202.
87. Zhang, H.; Chen, G.; Wang, L.; Ding, L.; Tian, Y.; Jin, W.; Zhang, H., Study on the inclusion complexes of cyclodextrin and sulphonated azo dyes by electrospray ionization mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry* **2006**, *252* (1), 1-10.
88. Polewski, K.; Maciejewska, W., UV-visible absorption, fluorescence, and optical rotatory study of the amylose-Rose Bengal complex. *Carbohydrate research* **1993**, *246* (1), 243-251.
89. Polewski, K.; Napierała, D., Amylose–dye complexes in cationic micelles: an optical spectroscopy study. *Carbohydrate research* **1999**, *315* (1), 35-47.
90. Zhou, Y.; Li, X.; Lv, Y.; Shi, Y.; Zeng, Y.; Li, D.; Mu, C., Effect of oxidation level on the inclusion capacity and solution stability of oxidized amylose in aqueous solution. *Carbohydrate Polymers* **2016**, *138*, 41-48.
91. Chang, Q.; Zhou, X.; Wu, C.; Xu, X.; Jin, Z., Preparation, characterization, water solubility, and targeted delivery of linear dextrin-conjugated linoleic acid inclusion complex. *Starch - Stärke* **2015**, *67* (5-6), 521-527.
92. da Silva, M. W. L. P.; Emanuelli, T., Amido resistente: características físico-químicas, propriedades fisiológicas e metodologias de quantificação. *Ciência rural* **2005**, *35* (4).
93. Bruno, F. F.; Akkara, J. A.; Ayyagari, M.; Kaplan, D. L.; Gross, R.; Swift, G.; Dordick, J. S., Enzymatic modification of insoluble amylose in organic solvents. *Macromolecules* **1995**, *28* (26), 8881-8883.
94. Arijaje, E. O.; Wang, Y.-J.; Shinn, S.; Shah, U.; Proctor, A., Effects of Chemical and Enzymatic Modifications on Starch–Stearic Acid Complex Formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2014**, *62* (13), 2963-2972.
95. Kong, X.; Zhou, X.; Sui, Z.; Bao, J., Effects of gamma irradiation on physicochemical properties of native and acetylated wheat starches. *International Journal of Biological Macromolecules* **2016**, *91*, 1141-1150.
96. Paulos, G.; Mrestani, Y.; Heyroth, F.; Gebre-Mariam, T.; Neubert, R. H. H., Fabrication of acetylated dioscorea starch nanoparticles: Optimization of formulation and process variables. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **2016**, *31*, 83-92.
97. Okunlola, A.; Owojori, T., Impact of degree of substitution of acetylated Ofada rice starch polymer on the release properties of nimesulide microspheres. *Journal of Excipients and Food Chemicals* **2016**, *7* (1), 4-16.

98. Singh, N.; Chawla, D.; Singh, J., Influence of acetic anhydride on physicochemical, morphological and thermal properties of corn and potato starch. *Food Chemistry* **2004**, *86* (4), 601-608.
99. Colussi, R.; El Halal, S. L. M.; Pinto, V. Z.; Bartz, J.; Gutkoski, L. C.; da Rosa Zavareze, E.; Dias, A. R. G., Acetylation of rice starch in an aqueous medium for use in food. *LWT - Food Science and Technology* **2015**, *62* (2), 1076-1082.
100. Teodoro, A. P.; Mali, S.; Romero, N.; de Carvalho, G. M., Cassava starch films containing acetylated starch nanoparticles as reinforcement: Physical and mechanical characterization. *Carbohydrate polymers* **2015**, *126*, 9-16.
101. Luo, Z.-G.; Shi, Y.-C., Preparation of acetylated waxy, normal, and high-amylose maize starches with intermediate degrees of substitution in aqueous solution and their properties. *Journal of agricultural and food chemistry* **2012**, *60* (37), 9468-9475.
102. Xiao, H.; Yang, T.; Lin, Q.; Liu, G.-Q.; Zhang, L.; Yu, F.; Chen, Y., Acetylated starch nanocrystals: Preparation and antitumor drug delivery study. *International Journal of Biological Macromolecules* **2016**, *89*, 456-464.
103. Manning, T.; Mikula, R.; Wylie, G.; Phillips, D.; Jarvis, J.; Zhang, F., Structural measurements and cell line studies of the copper-PEG-Rifampicin complex against Mycobacterium tuberculosis. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2015**, *25* (3), 451-458.
104. Alves, R., Estudo termoanalítico e de compatibilidade fármaco-excipientes de rifampicina e alguns medicamentos utilizados na terapêutica da tuberculose. **2007**.
105. Campbell, E. A.; Korzheva, N.; Mustaev, A.; Murakami, K.; Nair, S.; Goldfarb, A.; Darst, S. A., Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell* **2001**, *104* (6), 901-912.
106. Cassano, R.; Trombino, S.; Ferrarelli, T.; Mauro, M. V.; Giraldo, C.; Manconi, M.; Fadda, A. M.; Picci, N., Respirable rifampicin-based microspheres containing isoniazid for tuberculosis treatment. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2012**, *100* (2), 536-542.
107. Illarionova, E. A.; Illarionov, A. I.; Nikonovich, O. L., Definition of electronic transitions in the UV and visible spectral regions in rifampicin molecules. *Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics* **2016**, *80* (1), 40-43.
108. Liu, Z.; Yin, P.; Gong, H.; Li, P.; Wang, X.; He, Y., Determination of rifampicin based on fluorescence quenching of GSH capped CdTe/ZnS QDs. *Journal of Luminescence* **2012**, *132* (9), 2484-2488.
109. He, D.; Deng, P.; Yang, L.; Tan, Q.; Liu, J.; Yang, M.; Zhang, J., Molecular encapsulation of rifampicin as an inclusion complex of hydroxypropyl- β -cyclodextrin: Design; characterization and in vitro dissolution. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2013**, *103* (0), 580-585.
110. Abdulla, J.; Tan, Y.-F.; Darwis, Y., Rehydrated Lyophilized Rifampicin-Loaded mPEG-DSPE Formulations for Nebulization. *AAPS PharmSciTech* **2010**, *11* (2), 663-671.

111. Imperiale, J. C.; Sosnik, A. D., Cyclodextrin complexes for treatment improvement in infectious diseases. *Nanomedicine* **2015**, *10* (10), 1621-1641.
112. Saritha, A.; Rambhau, D.; Srinivasan, S.; Mahalingan, K., Preparation and evaluation of cationic niosomes encapsulated with micellar solubilized rifampicin. *J. Global Trends Pharm. Sci.* **2010**, *1* (1), 7-14.
113. Verbeeck, R. K.; Günther, G.; Kibuule, D.; Hunter, C.; Rennie, T. W., Optimizing treatment outcome of first-line anti-tuberculosis drugs: the role of therapeutic drug monitoring. *European Journal of Clinical Pharmacology* **2016**, 1-12.
114. Liu, C.; Kong, C.; Wu, G.; Zhu, J.; Javid, B.; Qian, F., Uniform and amorphous rifampicin microspheres obtained by freezing induced LLPS during lyophilization. *International Journal of Pharmaceutics* **2015**, *495* (1), 500-507.
115. He, D.; Deng, P.; Yang, L.; Tan, Q.; Liu, J.; Yang, M.; Zhang, J., Molecular encapsulation of rifampicin as an inclusion complex of hydroxypropyl- β -cyclodextrin: Design; characterization and in vitro dissolution. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2013**, *103*, 580-585.
116. Bellini, R. G.; Guimarães, A. P.; Pacheco, M. A. C.; Dias, D. M.; Furtado, V. R.; de Alencastro, R. B.; Horta, B. A. C., Association of the anti-tuberculosis drug rifampicin with a PAMAM dendrimer. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* **2015**, *60*, 34-42.
117. Singh, C.; Koduri, L. V. S. K.; Bhatt, T. D.; Jhamb, S. S.; Mishra, V.; Gill, M. S.; Suresh, S., In Vitro-In Vivo Evaluation of Novel Co-spray Dried Rifampicin Phospholipid Lipospheres for Oral Delivery. *AAPS PharmSciTech* **2016**, 1-9.
118. Singh, C.; Bhatt, T. D.; Gill, M. S.; Suresh, S., Novel rifampicin–phospholipid complex for tubercular therapy: Synthesis, physicochemical characterization and in-vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics* **2014**, *460* (1–2), 220-227.
119. Ferreira, D. A.; Ferreira, A. G.; Vizzotto, L.; Federman Neto, A.; Gomes de Oliveira, A., Analysis of the molecular association of rifampicin with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* **2004**, *40* (1), 43-51.
120. Andreani, L., Desenvolvimento e caracterização de microesferas de glúten de trigo para utilização em sistemas de liberação controlada. **2008**.
121. Fu, D.-S.; Wu, P.-P.; Zhong, X.-D.; Liu, Q.; Luo, H.-D.; Li, Y.-Q., A Simple Synchronous Fluorescence Approach for Rapid and Sensitive Determination of Rhodamine B in Chilli Products. *Food Analytical Methods* **2015**, *8* (1), 189-194.
122. Nigmatullin, R.; Thomas, P.; Lukasiewicz, B.; Puthussery, H.; Roy, I., Polyhydroxyalkanoates, a family of natural polymers, and their applications in drug delivery. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **2015**.
123. Li, F.; Chen, Y.; Huang, H.; Cao, W.; Li, T., Removal of rhodamine B and Cr(VI) from aqueous solutions by a polyoxometalate adsorbent. *Chemical Engineering Research and Design* **2015**, *100*, 192-202.

124. De Macedo, E. R.; Da Fluorescência, F. E. D. E. E., CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS.
125. Grzhegorzhevskii, K.; Ostroushko, A.; Koriakova, O.; Ovchinnikova, I.; Kim, G., Photoinduced charge transfer in the supramolecular structure based on toroid polyoxomolibdate Mo138 and xanthene dye – Rhodamine-B. *Inorganica Chimica Acta* **2015**, *436*, 205-213.
126. Moreno-Villoslada, I.; Jofré, M.; Miranda, V.; Chandía, P.; González, R.; Hess, S.; Rivas, B. L.; Elvira, C.; San Román, J.; Shibue, T., π -Stacking of rhodamine B onto water-soluble polymers containing aromatic groups. *Polymer* **2006**, *47* (19), 6496-6500.
127. Rocha, W. R., Interações intermoleculares. *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola* **2001**, *4*, 31-36.
128. McHedlov-Petrosyan, N. O.; Vodolazkaya, N. A.; Doroshenko, A. O., Ionic equilibria of fluorophores in organized solutions: the influence of micellar microenvironment on protolytic and photophysical properties of rhodamine B. *Journal of Fluorescence* **2003**, *13* (3), 235-248.
129. Guo, Y.; Zhao, J.; Zhang, H.; Yang, S.; Qi, J.; Wang, Z.; Xu, H., Use of rice husk-based porous carbon for adsorption of Rhodamine B from aqueous solutions. *Dyes and Pigments* **2005**, *66* (2), 123-128.
130. Jorge, J.; Castro, G. R.; Martines, M. A. U., Comparison among Different pH Values of Rhodamine B Solution Impregnated into Mesoporous Silica. *Orbital-The Electronic Journal of Chemistry* **2013**, *5* (1), 23-29.
131. Moreno-Villoslada, I.; Jofré, M.; Miranda, V.; González, R.; Sotelo, T.; Hess, S.; Rivas, B. L., pH Dependence of the Interaction between Rhodamine B and the Water-Soluble Poly(sodium 4-styrenesulfonate). *The Journal of Physical Chemistry B* **2006**, *110* (24), 11809-11812.
132. Kurukutla, A. B.; Kumar, P. S. S.; Anandan, S.; Sivasankar, T., Sonochemical degradation of rhodamine b using oxidants, hydrogen peroxide/peroxydisulfate/peroxymonosulfate, with Fe²⁺ ion: proposed pathway and kinetics. *Environmental Engineering Science* **2015**, *32* (2), 129-140.
133. McKay, G., Analytical solution using a pore diffusion model for a pseudoirreversible isotherm for the adsorption of basic dye on silica. *AIChE Journal* **1984**, *30* (4), 692-697.
134. Delval, F.; Crini, G.; Morin, N.; Vebrel, J.; Bertini, S.; Torri, G., The sorption of several types of dye on crosslinked polysaccharides derivatives. *Dyes and Pigments* **2002**, *53* (1), 79-92.
135. Juang, R.-S.; Tseng, R.-L.; Wu, F.-C.; Lee, S.-H., Adsorption behavior of reactive dyes from aqueous solutions on chitosan. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **1997**, *70* (4), 391-399.
136. Ozmen, E. Y.; Yilmaz, M., Use of β -cyclodextrin and starch based polymers for sorption of Congo red from aqueous solutions. *Journal of Hazardous Materials* **2007**, *148* (1-2), 303-310.

137. Yilmaz, E.; Memon, S.; Yilmaz, M., Removal of direct azo dyes and aromatic amines from aqueous solutions using two β -cyclodextrin-based polymers. *Journal of Hazardous Materials* **2010**, *174* (1–3), 592-597.
138. Seo, T.-R.; Kim, H.-Y.; Lim, S.-T., Preparation and characterization of aqueous dispersions of high amylose starch and conjugated linoleic acid complex. *Food Chemistry* **2016**, *211*, 530-537.
139. Silva Ribeiro, A.; de Araújo, S., Desenvolvimento de dosímetros plásticos para aplicações em dosimetria Gama. **2009**.
140. Chandrashekar, B. N.; Swamy, B. E. K.; Mahesh, K. R. V.; Chandra, U.; Sherigara, B. S., Electrochemical studies of bromothymol blue at surfactant modified carbon paste electrode by using cyclic voltammetry. *Int. J. Electrochem. Sci* **2009**, *4*, 471-480.
141. Jurcic, K.; Nesbitt, C. A.; Yeung, K. K. C., Characterization of discontinuous buffer junctions using pH indicators in capillary electrophoresis for protein preconcentration. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1134* (1–2), 317-325.
142. Tena-Solsona, M.; Alonso-de Castro, S.; Miravet, J. F.; Escuder, B., Co-assembly of tetrapeptides into complex pH-responsive molecular hydrogel networks. *Journal of Materials Chemistry B* **2014**, *2* (37), 6192-6197.
143. Ghaedi, M.; Taghavimoghadam, N.; Naderi, S.; Sahraei, R.; Daneshfar, A., Comparison of removal of bromothymol blue from aqueous solution by multiwalled carbon nanotube and Zn(OH)₂ nanoparticles loaded on activated carbon: A thermodynamic study. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* **2013**, *19* (5), 1493-1500.
144. Joseph, N.; Ahmadiannamini, P.; Jishna, P. S.; Volodin, A.; Vankelecom, I. F. J., ‘Up-scaling’ potential for polyelectrolyte multilayer membranes. *Journal of Membrane Science* **2015**, *492*, 271-280.
145. Cruz, N. A., Avaliação da Persistência do Corante Azul de Bromotimol por Fotólise em Meio Aquoso. **2014**.
146. Yin, W.; Dong, Z.; Chen, X.; Finn, N.; Yates, M. Z., Hydrophobic ion pairing to enhance encapsulation of water-soluble additives into CO₂-swollen polymer microparticles. *The Journal of Supercritical Fluids* **2007**, *41* (2), 293-298.
147. Ramaraj, B.; Radhakrishnan, G., Hydrogel capsules for sustained drug release. *Journal of applied polymer science* **1994**, *51* (6), 979-988.
148. Lo, H.; Kadiyala, S.; Guggino, S. E.; Leong, K. W., Poly (L-lactic acid) foams with cell seeding and controlled-release capacity. *Journal of biomedical materials research* **1996**, *30* (4), 475-484.
149. Takada, K.; Muranishi, S.; Sezaki, H., Pharmacokinetics of the hepatobiliary transport of bromphenol blue as a model of organic anionic compounds. *Journal of pharmacokinetics and biopharmaceutics* **1974**, *2* (6), 495-509.

150. 高田寛治; 上田正紀; 大野真理子; 村西昌三, Biopharmaceutical study of the hepatobiliary transport of drugs. II. Roles of the liver cytoplasmic Y and Z binding proteins and T binder on the hepato-biliary transport of organic anionic compounds. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1974**, 22 (7), 1477-1486.
151. Vu, L. T.; Less, R. R.; Rajagopalan, P., The promise of organotypic hepatic and gastrointestinal models. *Trends in Biotechnology* **2014**, 32 (8), 406-413.
152. Mark, A. M.; Mehlretter, C. L., Facile Preparation of Starch Triacetates. *Starch - Stärke* **1972**, 24 (3), 73-76.
153. Wurzburg, O. B., *Modified starches-properties and uses*. CRC Press Inc.: 1986.
154. Ribeiro, A. C. Estudo estrutural da Gliadina. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, 2012.
155. Berthomieu, C.; Hienerwadel, R., Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Photosynthesis research* **2009**, 101 (2-3), 157-170.
156. Dedavid, B. A.; Gomes, C. I.; Machado, G., *Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores*. EdIPUCRS: 2007.
157. de Oliveira, G. G. G.; Feitosa, A.; Loureiro, K.; Fernandes, A. R.; Souto, E. B.; Severino, P., Compatibility study of paracetamol, chlorpheniramine maleate and phenylephrine hydrochloride in physical mixtures. *Saudi Pharmaceutical Journal* **2016**.
158. Bueno, N. G.; Pereira, A. V., SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF METHYLDOPA IN A DISSOLUTION TEST OF TABLETS USING AN EXTRACT OF RADISH AS A SOURCE OF PEROXIDASE. *Química Nova* **2015**, 38 (8), 1107-1111.
159. Samprasit, W.; Akkaramongkolporn, P.; Ngawhirunpat, T.; Rojanarata, T.; Kaomongkolgit, R.; Opanasopit, P., Fast releasing oral electrospun PVP/CD nanofiber mats of taste-masked meloxicam. *International journal of pharmaceutics* **2015**, 487 (1), 213-222.
160. Lue, A.; Liu, Y.; Zhang, L.; Potthas, A., Light scattering study on the dynamic behaviour of cellulose inclusion complex in LiOH/urea aqueous solution. *Polymer* **2011**, 52 (17), 3857-3864.
161. Frisken, B. J., Revisiting the method of cumulants for the analysis of dynamic light-scattering data. *Appl Opt* **2001**, 40 (24), 4087-91.
162. Bhattacharjee, S., DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release* **2016**, 235, 337-351.
163. Pereira-Lachataignerais, J.; Pons, R.; Panizza, P.; Courbin, L.; Rouch, J.; Lopez, O., Study and formation of vesicle systems with low polydispersity index by ultrasound method. *Chem. Phys. Lipids* **2006**, 140 (1-2), 88-97.
164. Ortega-Toro, R.; Jiménez, A.; Talens, P.; Chiralt, A., Effect of the incorporation of surfactants on the physical properties of corn starch films. *Food Hydrocolloids* **2014**, 38, 66-75.

165. Joye, I. J.; McClements, D. J., Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: Fabrication, characterization, and application. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2014**, *19* (5), 417-427.
166. Hunter, R. J., Zeta Potential in Colloid Science Academic Press. *New York* **1981**.
167. Brum, S. S.; Oliveira, L. C. A.; Bianchi, M. L.; Guerreiro, M. C.; Oliveira, L. K. d.; Carvalho, K. T., G. "Síntese de acetato de celulose a partir da palha de feijão utilizando N-bromossuccinimida (NBS) como catalisador". *Polímeros* **2012**, *22* (5), 447-452.
168. Golachowski, A.; Zięba, T.; Kapelko-Żeberska, M.; Drożdż, W.; Gryszkin, A.; Grzechac, M., Current research addressing starch acetylation. *Food Chemistry* **2015**, *176*, 350-356.
169. Colussi, R.; El Halal, S. L. M.; Pinto, V. Z.; Bartz, J.; Gutkoski, L. C.; da Rosa Zavareze, E.; Dias, A. R. G., Acetylation of rice starch in an aqueous medium for use in food. *LWT-Food Science and Technology* **2015**, *62* (2), 1076-1082.
170. Sun, Y.; Hu, Q.; Qian, J.; Li, T.; Ma, P.; Shi, D.; Dong, W.; Chen, M., Preparation and properties of thermoplastic poly (caprolactone) composites containing high amount of esterified starch without plasticizer. *Carbohydrate Polymers* **2016**, *139*, 28-34.
171. Han, F.; Gao, C.; Liu, M.; Huang, F.; Zhang, B., Synthesis, optimization and characterization of acetylated corn starch with the high degree of substitution. *International Journal of Biological Macromolecules* **2013**, *59*, 372-376.
172. Colussi, R.; Pinto, V. Z.; El Halal, S. L. M.; Vanier, N. L.; Villanova, F. A.; Marques e Silva, R.; da Rosa Zavareze, E.; Dias, A. R. G., Structural, morphological, and physicochemical properties of acetylated high-, medium-, and low-amylose rice starches. *Carbohydrate Polymers* **2014**, *103*, 405-413.
173. Zhang, Y.; Gan, T.; Hu, H.; Huang, Z.; Huang, A.; Zhu, Y.; Feng, Z.; Yang, M., A Green Technology for the Preparation of High Fatty Acid Starch Esters: Solid-Phase Synthesis of Starch Laurate Assisted by Mechanical Activation with Stirring Ball Mill as Reactor. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2014**, *53* (6), 2114-2120.
174. Kulkarni, S. D.; Sinha, B. N.; Kumar, K. J., Physicochemical and drug release characteristics of acetylated starches of five *Lagenaria siceraria* cultivars. *International Journal of Biological Macromolecules* **2015**, *72*, 1005-1012.
175. Bartz, J.; Goebel, J. T.; Giovanaz, M. A.; Zavareze, E. d. R.; Schirmer, M. A.; Dias, A. R. G., Acetylation of barnyardgrass starch with acetic anhydride under iodine catalysis. *Food Chemistry* **2015**, *178*, 236-242.
176. Halal, S. L. M. E.; Colussi, R.; Pinto, V. Z.; Bartz, J.; Radunz, M.; Carreño, N. L. V.; Dias, A. R. G.; Zavareze, E. d. R., Structure, morphology and functionality of acetylated and oxidised barley starches. *Food Chemistry* **2015**, *168*, 247-256.
177. Boutboul, A.; Giampaoli, P.; Feigenbaum, A.; Ducruet, V., Influence of the nature and treatment of starch on aroma retention. *Carbohydrate polymers* **2002**, *47* (1), 73-82.

178. Bello-Pérez, L. A.; Agama-Acevedo, E.; Zamudio-Flores, P. B.; Mendez-Montealvo, G.; Rodriguez-Ambriz, S. L., Effect of low and high acetylation degree in the morphological, physicochemical and structural characteristics of barley starch. *LWT - Food Science and Technology* **2010**, *43* (9), 1434-1440.
179. Bartz, J.; Madruga, K. M.; Klein, B.; Pinto, V. Z.; Dias, A. R. D., Propriedades de pasta de amidos de arroz nativo e acetilados. *Brazilian Journal of Food Technology* **2012**, *15*, 78-83.
180. Zhang, L.; Xie, W.; Zhao, X.; Liu, Y.; Gao, W., Study on the morphology, crystalline structure and thermal properties of yellow ginger starch acetates with different degrees of substitution. *Thermochimica Acta* **2009**, *495* (1-2), 57-62.
181. Schlemmer, D.; Angélica, R. S.; Sales, M. J. A., Morphological and thermomechanical characterization of thermoplastic starch/montmorillonite nanocomposites. *Composite Structures* **2010**, *92* (9), 2066-2070.
182. Aggarwal, P.; Dollimore, D., A method of comparison between corn starch and its products using thermal analysis. *Instrumentation science & technology* **1999**, *27* (3), 191-197.
183. Han, F.; Liu, M.; Gong, H.; Lü, S.; Ni, B.; Zhang, B., Synthesis, characterization and functional properties of low substituted acetylated corn starch. *International Journal of Biological Macromolecules* **2012**, *50* (4), 1026-1034.
184. Aburto, J.; Alric, I.; Thiebaud, S.; Borredon, E.; Bikiaris, D.; Prinos, J.; Panayiotou, C., Synthesis, characterization, and biodegradability of fatty-acid esters of amylose and starch. *J. Appl. Polym. Sci.* **1999**, *74* (6), 1440-1451.
185. Kaur, K.; Uppal, S.; Kaur, R.; Agarwal, J.; Mehta, S. K., Energy efficient, facile and cost effective methodology for formation of an inclusion complex of resveratrol with hp- β -CD. *New Journal of Chemistry* **2015**.
186. Nadejde, C.; Ursu, L.; Creanga, D.; Dorohoi, D., Solvatochromic Behaviour of Rifampicin in Diluted Solutions. *REVISTA DE CHIMIE* **2015**, *66* (3), 360-363.
187. Stobiecka, M.; Hepel, M., Multimodal coupling of optical transitions and plasmonic oscillations in rhodamine B modified gold nanoparticles. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2011**, *13* (3), 1131-1139.
188. El-Nahhal, I. M.; Zourab, S. M.; Kodeh, F. S.; Abdelsalam, F. H., Sol-gel encapsulation of bromothymol blue pH indicator in presence of Gemini 12-2-12 surfactant. *Journal of sol-gel science and technology* **2014**, *71* (1), 16-23.
189. El-Nahhal, I. M.; Zourab, S. M.; Kodeh, F. S.; Abd el-salam, F. H.; Baker, S. A., Sol-gel entrapment of bromothymol blue (BTB) indicator in the presence of cationic 16E1Q and 16E1QS surfactants. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* **2016**, 1-9.
190. Thomas, O.; Burgess, C., *UV-visible spectrophotometry of water and wastewater*. Elsevier: 2007; Vol. 27.
191. Morais, G. G., Otimização da terapia da tuberculose: desenvolvimento de sistemas de liberação baseados em nanotecnologia.

192. Anvisa, B., Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. *Resolução RE nº 899*.
193. de Acreditação, C. G. *Orientação sobre Validação de métodos analíticos*; DOQ-CGCRE-008-Revisão 03–Fev: 2010.
194. Lopes, M. A. L.; Castro, C. S. P.; Dias, J., *Procedimento gerencial de validação de métodos*. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia: 2008.
195. Grillo, R.; de Melo, N. F. S.; Fraceto, L. F.; Brito, C. L.; Trossini, G. H. G.; Menezes, C.; Ferreira, E. I.; Moraes, C. M., Caracterização físico-química de complexo de inclusão entre hidroximetilnitrofurazona e hidroxipropil-beta-ciclodextrina. *Química Nova* **2008**, 290-295.
196. Lyra, M. A.; Marques, D. E.; Alves, L. D. S.; Fontes, D. A. F.; Soares-Sobrinho, J. L.; Rolim-Neto, P. J., Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* **2010**, 31 (2), 117-124.
197. Zhang, R.; Hummelgård, M.; Lv, G.; Olin, H., Real time monitoring of the drug release of rhodamine B on graphene oxide. *Carbon* **2011**, 49 (4), 1126-1132.
198. Luo, Z.; Zou, J.; Chen, H.; Cheng, W.; Fu, X.; Xiao, Z., Synthesis and characterization of amylose–zinc inclusion complexes. *Carbohydrate Polymers* **2016**, 137, 314-320.
199. Lii, C.-y.; Stobinski, L.; Tomasik, P.; Liao, C.-d., Single-walled carbon nanotube—potato amylose complex. *Carbohydrate polymers* **2003**, 51 (1), 93-98.
200. Lay Ma, U. V.; Floros, J. D.; Ziegler, G. R., Formation of inclusion complexes of starch with fatty acid esters of bioactive compounds. *Carbohydrate Polymers* **2011**, 83 (4), 1869-1878.
201. de Paiva, R. E. F.; Abbehausen, C.; Bergamini, F. R. G.; Thompson, A. L.; Alves, D. A.; Lancellotti, M.; Corbi, P. P., Investigating the inclusion of the Ag (I)-nimesulide complex into β -cyclodextrin: studies in solution and in the solid state. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **2014**, 79 (1-2), 225-235.
202. Ferreira, D. A.; Ferreira, A. G.; Vizzotto, L.; Federman Neto, A.; Oliveira, A. G. d., Analysis of the molecular association of rifampicin with hydroxypropyl-2-cyclodextrin. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* **2004**, 40 (1), 43-51.
203. Wang, N.; Tan, Q.; Liu, J.; Zhao, C.-J.; Zhang, J., Preparation and evaluation of rifampicin hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion compound. *Zhongguo Xiandai Yingyong Yaoxue* **2010**, 27 (2), 128-132.
204. Tewes, F.; Brillault, J.; Couet, W.; Olivier, J.-C., Formulation of rifampicin–cyclodextrin complexes for lung nebulization. *Journal of Controlled Release* **2008**, 129 (2), 93-99.
205. Ferreira, Q. S.; Silva, S. W.; Santos, C. M. B.; Ribeiro, G. C.; Guilherme, L. R.; Morais, P. C., Rifampicin adsorbed onto magnetite nanoparticle: SERS study and insight on the molecular arrangement and light effect. *Journal of Raman Spectroscopy* **2015**, 46 (9), 765-771.

206. Moretton, M. A.; Chiappetta, D. A.; Sosnik, A., Cryoprotection–lyophilization and physical stabilization of rifampicin-loaded flower-like polymeric micelles. *Journal of The Royal Society Interface* **2011**, rsif20110414.
207. Jimin, F.; Xiuyan, H.; Qian, Z.; Junhong, C.; Xun, W., Study on the Surface Speciation of Fe-pillared Montmorillonite and Mechanism of its Photocatalytic Effect on Degradation of Ionic Dye Rhodamine-B. *Applied Surface Science* **2015**.
208. Moreno-Villoslada, I.; Jofré, M.; Miranda, V.; Chandía, P.; González, R.; Hess, S.; Rivas, B. L.; Elvira, C.; San Román, J.; Shibue, T.; Nishide, H., π -Stacking of rhodamine B onto water-soluble polymers containing aromatic groups. *Polymer* **2006**, 47 (19), 6496-6500.
209. Sun, L.-N.; Peng, H.; Stich, M. I. J.; Achatz, D.; Wolfbeis, O. S., pH sensor based on upconverting luminescent lanthanide nanorods. *Chemical Communications* **2009**, (33), 5000-5002.
210. Qi, Z.-m.; Matsuda, N.; Santos, J.; Itoh, K.; Takatsu, A.; Kato, K., A study of molecular adsorption of bromothymol blue by optical waveguide spectroscopy. *Langmuir* **2003**, 19 (2), 214-217.
211. Balderas-Hernández, P.; Ramírez-Silva, M. T.; Romero-Romo, M.; Palomar-Pardavé, M.; Roa-Morales, G.; Barrera-Diaz, C.; Rojas-Hernández, A., Experimental correlation between the pKa value of sulfonphthaleins with the nature of the substituents groups. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2008**, 69 (4), 1235-1245.
212. Bryleva, E. Y.; Vodolazkaya, N. A.; McHedlov-Petrossyan, N. O.; Samokhina, L. V.; Matveevskaya, N. A.; Tolmachev, A. V., Interfacial properties of cetyltrimethylammonium-coated SiO₂ nanoparticles in aqueous media as studied by using different indicator dyes. *Journal of Colloid and Interface Science* **2007**, 316 (2), 712-722.
213. Kumari, A.; Yadav, S. K.; Yadav, S. C., Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2010**, 75 (1), 1-18.
214. Wang, H. M.; Wenz, G., Molecular solubilization of fullerene C₆₀ in water by γ -cyclodextrin thioethers. *Beilstein journal of organic chemistry* **2012**, 8 (1), 1644-1651.
215. Huo, Q., Protein complexes/aggregates as potential cancer biomarkers revealed by a nanoparticle aggregation immunoassay. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2010**, 78 (2), 259-265.
216. Tao, F.; Hill, L. E.; Peng, Y.; Gomes, C. L., Synthesis and characterization of β -cyclodextrin inclusion complexes of thymol and thyme oil for antimicrobial delivery applications. *LWT - Food Science and Technology* **2014**, 59 (1), 247-255.
217. Kaur, G.; Mehta, S. K.; Kumar, S.; Bhanjana, G.; Dilbaghi, N., Coencapsulation of Hydrophobic and Hydrophilic Antituberculosis Drugs in Synergistic Brij 96 Microemulsions: A Biophysical Characterization. *Journal of pharmaceutical sciences* **2015**, 104 (7), 2203-2212.
218. Elsabahy, M.; Wooley, K. L., Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications. *Chemical Society Reviews* **2012**, 41 (7), 2545-2561.

219. Doostmohammadi, A.; Monshi, A.; Salehi, R.; Fathi, M. H.; Golniya, Z.; Daniels, A. U., Bioactive glass nanoparticles with negative zeta potential. *Ceramics International* **2011**, *37* (7), 2311-2316.
220. Do, D. P.; Pai, S. B.; Rizvi, S. A. A.; D'Souza, M. J., Development of sulforaphane-encapsulated microspheres for cancer epigenetic therapy. *International Journal of Pharmaceutics* **2010**, *386* (1–2), 114-121.
221. Holland, N. B.; Qiu, Y.; Ruegsegger, M.; Marchant, R. E., Biomimetic engineering of non-adhesive glycocalyx-like surfaces using oligosaccharide surfactant polymers. *Nature* **1998**, *392* (6678), 799-801.
222. Liu, M.; Yang, J., Electrokinetic effect of the endothelial glycocalyx layer on two-phase blood flow in small blood vessels. *Microvascular Research* **2009**, *78* (1), 14-19.
223. Booyesen, L.; Kalombo, L.; Brooks, E.; Hansen, R.; Gilliland, J.; Gruppo, V.; Lungenhofer, P.; Semete-Makokotlela, B.; Swai, H. S.; Kotze, A. F., In vivo/in vitro pharmacokinetic and pharmacodynamic study of spray-dried poly-(dl-lactic-co-glycolic) acid nanoparticles encapsulating rifampicin and isoniazid. *International journal of pharmaceutics* **2013**, *444* (1), 10-17.
224. Silveira, N.; Longuinho, M. M.; Leitão, S. G.; Silva, R. S. F.; Lourenço, M. C.; Silva, P. E. A.; Pinto, M. d. C. F. R.; Abraçado, L. G.; Finotelli, P. V., Synthesis and characterization of the antitubercular phenazine lapazine and development of PLGA and PCL nanoparticles for its entrapment. *Materials Science and Engineering: C* **2016**, *58*, 458-466.
225. Raj, V.; Prabha, G., Synthesis, characterization and in vitro drug release of cisplatin loaded Cassava starch acetate–PEG/gelatin nanocomposites. *Journal of the Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences*.
226. Gonçalves, C.; Gama, F. M., Characterization of the self-assembly process of hydrophobically modified dextrin. *European Polymer Journal* **2008**, *44* (11), 3529-3534.
227. Singh, H.; Jindal, S.; Singh, M.; Sharma, G.; Kaur, I. P., Nano-formulation of rifampicin with enhanced bioavailability: Development, characterization and in-vivo safety. *International journal of pharmaceutics* **2015**, *485* (1), 138-151.
228. Jaiswar, D. R.; Pawar, J. N.; Amin, P. D., Hot Melt Extrusion: Continuous Process of Preparation of Sustained Released Matrix Tablet by Using Hydroxypropylcellulose.
229. Patil, J. S.; Devi, V. K.; Devi, K.; Sarasija, S., A novel approach for lung delivery of rifampicin-loaded liposomes in dry powder form for the treatment of tuberculosis. *Lung India: official organ of Indian Chest Society* **2015**, *32* (4), 331.

ANEXOS

1. CURVA DE CALIBRAÇÃO

A Tabela 1, 2, 3, 4, 5 e 6 apresentam os dados experimentais obtidos para a avaliação da linearidade das curvas de calibração medidas para todos os fármacos-modelo nas condições específicas de cada fármaco.

Tabela 1. Valores de absorvância para a curva padrão da RIF por UV em KOH 0,1 M neutralizado* em 472 nm.

Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	RIF 1	RIF 2	RIF 3	Média	Erro padrão	Desvio padrão
5	0,090	0,086	0,108	0,095	0,007	0,01173
10	0,183	0,169	0,216	0,159	0,026	0,04430
20	0,347	0,321	0,413	0,360	0,027	0,04743
30	0,527	0,476	0,595	0,533	0,035	0,05970
40	0,700	0,627	0,790	0,706	0,047	0,08165

*Resultado de três determinações em dias diferentes.

Tabela 2. Valores de absorvância obtidos para a curva padrão da RB por UV em KOH 0,1 M* em 472 nm.

Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	RB 1	RB 2	RB 3	Média	Erro padrão	Desvio padrão
1	0,178	0,235	0,267	0,227	0,026	0,045
2	0,373	0,353	0,397	0,374	0,013	0,013
3	0,511	0,707	0,786	0,668	0,082	0,082
4	0,666	0,704	0,771	0,714	0,031	0,031
5	0,830	0,908	0,968	0,902	0,040	0,040

*Resultado de três determinações em dias diferentes.

Tabela 3. Valores de absorvância obtidos para a curva padrão da AB por UV em KOH 0,1 M* em 472 nm.

Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	AB 1	AB 2	AB 3	Média	Erro padrão	Desvio padrão
1	0,179	0,217	0,267	0,221	0,025	0,044
2	0,353	0,441	0,576	0,440	0,050	0,087
3	0,435	0,563	0,660	0,553	0,065	0,113
4	0,513	0,722	0,795	0,677	0,085	0,146
5	0,627	0,775	0,919	0,774	0,084	0,146

*Resultado de três determinações em dias diferentes.

Tabela 4. Valores de absorvância obtidos para a curva padrão da RIF por UV em H₂O* em 472 nm.

Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	RIF 1	RIF 2	RIF 3	Média	Erro padrão	Desvio padrão
--	-------	-------	-------	-------	-------------	---------------

1	0,073	0,087	0,065	0,075	0,006	0,01114
2	0,159	0,147	0,130	0,145	0,008	0,01458
3	0,328	0,352	0,291	0,324	0,018	0,03073
4	0,493	0,474	0,427	0,465	0,019	0,03398
5	0,644	0,685	0,596	0,642	0,026	0,04455

*Resultado de três determinações em dias diferentes.

Tabela 5. Valores de absorbância obtidos para a curva padrão da RB em H₂O por UV* em 472 nm.

Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	RB 1	RB 2	RB 3	Média	Erro padrão	Desvio padrão
1	0,171	0,146	0,146	0,154	0,0085	0,01473
2	0,332	0,297	0,297	0,310	0,0117	0,02027
3	0,499	0,440	0,445	0,461	0,0189	0,03272
4	0,644	0,591	0,600	0,612	0,0164	0,02836
5	0,818	0,727	0,727	0,727	0,0303	0,05254

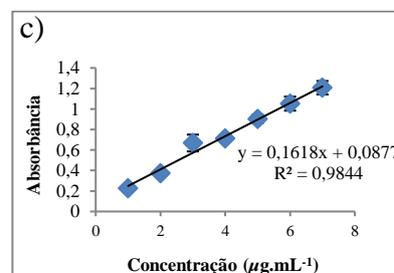
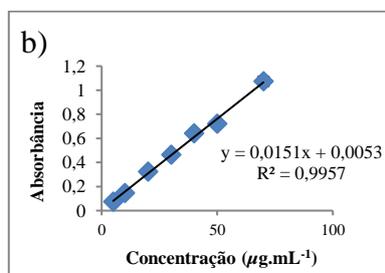
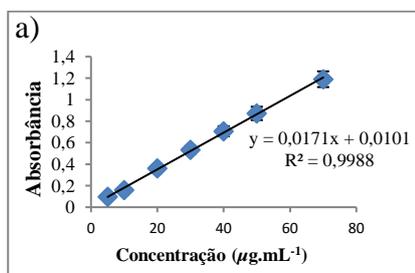
*Resultado de três determinações em dias diferentes.

Tabela 6. Valores de absorbância obtidos para a curva padrão da AB em H₂O por UV* em 472 nm.

Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	AB 1	AB 2	AB 3	Média	Erro padrão	Desvio padrão
1	0,188	0,205	0,229	0,207	0,035	0,060
2	0,362	0,403	0,452	0,406	0,026	0,045
3	0,539	0,591	0,667	0,599	0,037	0,064
4	0,713	0,817	0,865	0,798	0,045	0,078
5	0,774	0,847	0,969	0,863	0,057	0,099

*Resultado de três determinações em dias diferentes.

A concentração e a absorbância obtidas foram relacionadas em um gráfico para a obtenção da curva de calibração. Os dados foram ajustados ao modelo de regressão linear, obtendo-se assim as equações da reta e os respectivos coeficientes de regressão (r^2). Os resíduos da regressão foram calculados através da diferença entre os valores de absorbância medidos e os valores calculados pela reta ajustados (Figura 1).



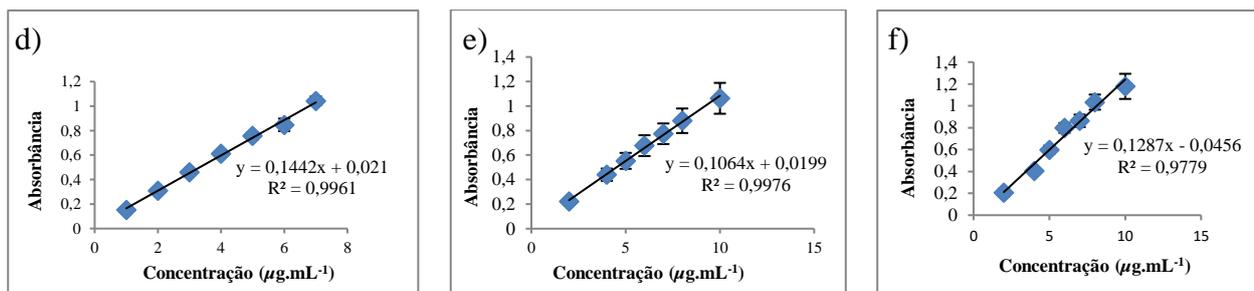


Figura 1. Representação gráfica das curvas padrão média da: a) RIF em KOH 0,1 M neutralizado; b) RIF em H₂O MiliQ; c) RB em KOH 0,1 M; d) RB em H₂O MiliQ; e) AB em KOH 0,1 M e f) AB em H₂O MiliQ.

2. Tabelas referentes à Análise de Variância (ANOVA)

A análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos por UV são mostradas abaixo (Tabela 7 - 12).

Tabela 7. Análise de variância ANOVA da curva padrão da RIF em KOH 0,1 M neutralizado.

Fontes de variação	gl	Soma dos quadrados	Variância	F _{medido} *	F _{crítico}
Regressão	1	0,9322	0,932	4129,08	1,73.10 ⁻⁸
Resíduo	5	1,13.10 ⁻³	2,26.10 ⁻⁴		
Total	6	0,933			

*Nível de significância para um valor de p < 0,05.

Tabela 8. Análise de variância ANOVA da curva padrão da RB em KOH 0,1 M.

Fontes de variação	gl	Soma dos quadrados	Variância	F _{medido} *	F _{crítico}
Regressão	1	0,7329	0,733	316,23	1,03.10 ⁻⁵
Resíduo	5	1,16.10 ⁻²	2,23.10 ⁻⁴		
Total	6	0,744			

*Nível de significância para um valor de p < 0,05.

Tabela 9. Análise de variância ANOVA da curva padrão do AB em KOH 0,1 M.

Fontes de variação	gl	Soma dos quadrados	Variância	F _{medido} *	F _{crítico}
Regressão	1	0,4755	0,4755	2121,83	9,11.10 ⁻⁸
Resíduo	5	1,11.10 ⁻³	2,24.10 ⁻⁴		
Total	6	0,4766			

*Nível de significância para um valor de p < 0,05.

Tabela 10. Análise de variância ANOVA da curva padrão da RIF em H₂O MiliQ.

Fontes de variação	gl	Soma dos quadrados	Variância	F _{medido} *	F _{crítico}
Regressão	1	0,7356	0,73256	1147,92	4,21.10 ⁻⁷

Resíduo	5	3,19.10 ⁻³	6,38.10 ⁻⁴
Total	6	0,7357	

*Nível de significância para um valor de $p < 0,05$.

Tabela 11. Análise de variância ANOVA da curva padrão da RB em H₂O MiliQ.

Fontes de variação	gl	Soma dos quadrados	Variância	F _{medido} *	F _{crítico}
Regressão	1	0,5820	0,582	1263,93	3,31.10 ⁻⁷
Resíduo	5	2,30.10 ⁻³	4,61.10 ⁻⁴		
Total	6	0,584			

*Nível de significância para um valor de $p < 0,05$.

Tabela 13. Análise de variância ANOVA da curva padrão do AB em H₂O MiliQ.

Fontes de variação	gl	Soma dos quadrados	Variância	F _{medido} *	F _{crítico}
Regressão	1	0,6953	0,6953	221,51	2,48.10 ⁻⁵
Resíduo	5	1,57.10 ⁻²	3,13.10 ⁻³		
Total	6	0,711			

*Nível de significância para um valor de $p < 0,05$.