UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

KETLLIN BRAGNHOLO

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCÁPSULAS DE POLI(ε-CAPROLACTONA) CONTENDO AMIGDALINA: EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO E ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA

PONTA GROSSA
2026

KETLLIN BRAGNHOLO

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCÁPSULAS DE POLI(ε-CAPROLACTONA) CONTENDO AMIGDALINA: EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO E ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago
Coorientadora: Prof.ª Dra. Andressa Novatski

PONTA GROSSA
2026

Bragnholo, Ketllin

B813 Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas de poli (e-caprolactona) contendo amigdalina: eficiência de encapsulação e estabilidade físico-química / Ketllin Bragnholo. Ponta Grossa, 2026.

71 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde - Área de Concentração: Atenção Interdisciplinar em Saúde), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Farago.
Coorientadora: Profa. Dra. Andressa Novatski.

1. Sistemas -liberação - medicamentos. 2. Controle - qualidade. 3. Preparações farmacêuticas. 4. Polímeros biocompatíveis. 5. Tecnologia farmacêutica. I. Farago, Paulo. II. Novatski, Andressa. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Atenção Interdisciplinar em Saúde. IV.T.

CDD: 615

Ficha catalográfica elaborada por Maria Luzia Fernandes Bertholino dos Santos- CRB9/986

KETLLIN BRAGNHOLO

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCÁPSULAS DE POLI(E-CAPROLACTONA) CONTENDO AMIGDALINA: EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO E ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde na Universidade Estadual de Ponta Grossa, Área de Atenção Interdisciplinar em Saúde.

Ponta Grossa, 27 de outubro de 2026.



Prof. Dr. PAULO VITOR FARAGO
Dr. Farmácia
UEPG/PR

gov.br Documento assinado digitalmente
LORENE ARMSTRONG
Data: 28/10/2026 23:23:51-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dra. LORENE ARMSTRONG (UEPG/PR)
Dra. em química
UEPG/PR

gov.br Documento assinado digitalmente
EMERSON CARRARO
Data: 29/10/2026 19:15:37-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. EMERSON CARRARO
Dr. em Farmácia
UNICENTRO/PR

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e pelo incentivo à pesquisa, fundamentais para a realização deste trabalho. Agradeço também ao Laboratório Multiusuário, à Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação (PROPESP) e ao Setor de Ciências Biológicas e da Saúde (SEBISA) pelo suporte institucional e técnico.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Vitor Farago, pela orientação competente, pela disponibilidade e pelas contribuições essenciais ao desenvolvimento desta pesquisa. À minha coorientadora, Prof.ª Dra. Andressa Novatski, pela dedicação, pelas valiosas sugestões e pela colaboração durante todo o processo.

Às profissionais Josemira e Ely, que me acolheram desde o início, agradeço pelo suporte técnico, pelo comprometimento e pela prontidão em auxiliar sempre que necessário.

À minha família, Nerci Martins de Oliveira Bragnholo, Orlei Bragnholo e Thaís Bragnholo, e, em especial, ao meu companheiro de vida, Everton Matioski de Lima Junior, pelo amor, pela paciência e pelo apoio incondicional, que tornaram possível a concretização desta etapa.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho, registro meus sinceros agradecimentos.

“Se enxerguei mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes.”

(Isaac Newton)

RESUMO

A amigdalina é um glicosídeo cianogênico hidrofílico e suscetível à hidrólise, características que podem limitar sua retenção e estabilidade em sistemas nanoestruturados. Este trabalho teve como objetivo desenvolver e caracterizar nanocápsulas de poli(ε-caprolactona) (PCL) contendo diferentes concentrações de amigdalina, avaliar a estabilidade físico-química das formulações durante 120 dias de armazenamento e determinar a eficiência de encapsulação (EE). As nanocápsulas foram obtidas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado, 0,01%, 1% e 10% de amigdalina. A caracterização incluiu pH, diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersidade (IPD), potencial zeta, microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG), difração de raios X (DRX), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e espectroscopia Raman. A amigdalina livre foi quantificada no sobrenadante por cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos, e a EE foi calculada pelo método indireto. Ao longo do armazenamento, todas as formulações permaneceram na escala nanométrica, com diâmetros entre 224,7 e 315,4 nm, IPD entre 0,037 e 0,280 e potencial zeta negativo entre – 34,10 e – 22,03 mV. O pH apresentou alterações significativas em períodos intermediários, porém com aproximação dos valores iniciais aos 120 dias. As micrografias evidenciaram estruturas particuladas, aproximadamente arredondadas, com superfície irregular e aglomeração atribuível, ao menos em parte, ao preparo das amostras. No DRX, as formulações de 0,01% e 1% apresentaram perfis predominantemente associados à PCL, enquanto a formulação de 10% manteve reflexões compatíveis com uma fração cristalina detectável da amigdalina. Os espectros de FTIR e Raman indicaram manutenção global das regiões características da matriz polimérica, sem evidência de alterações químicas acentuadas durante o período avaliado, embora a sobreposição de bandas tenha limitado a identificação direta da amigdalina nas menores concentrações. A faixa quantitativa do método cromatográfico foi de 6 a 90 µg/mL, com limite de detecção de 2,66 µg/mL e limite de quantificação de 8,06 µg/mL. A EE foi determinada de forma confiável apenas para a formulação contendo 1%, com resultado de 80,06 ± 0,78%. Conclui-se que as formulações mantiveram características físico-coloidais e estruturais compatíveis com sistemas nanoestruturados durante 120 dias.

Palavras-chave: Sistemas de Liberação de Medicamentos. Polímeros Biocompatíveis. Tecnologia Farmacêutica. Controle de Qualidade. Preparações Farmacêuticas.

ABSTRACT

Amygdalin is a hydrophilic cyanogenic glycoside susceptible to hydrolysis, characteristics that may limit its retention and stability in nanostructured systems. This study aimed to develop and characterize poly(ε-caprolactone) (PCL) nanocapsules containing different concentrations of amygdalin, evaluate the physicochemical stability of the formulations during 120 days of storage, and determine encapsulation efficiency (EE). The nanocapsules were prepared by interfacial deposition of a preformed polymer at 0,01%, 1%, and 10% amygdalin formulations. Characterization included pH, hydrodynamic diameter, polydispersity index (PDI), zeta potential, field-emission scanning electron microscopy (FE-SEM), X-ray diffraction (XRD), Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), and Raman spectroscopy. Free amygdalin in the supernatant was quantified by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to a diode-array detector, and EE was calculated using the indirect method. Throughout storage, all formulations remained within the nanometric range, with diameters from 224.7 to 315.4 nm, PDI values from 0.037 to 0.280, and negative zeta potentials from – 34.10 to – 22.03 mV. Significant pH changes occurred at intermediate time points; however, the values approached the initial measurements after 120 days. The micrographs showed particulate structures with approximately rounded contours, irregular surfaces, and agglomeration attributable, at least in part, to sample preparation. XRD profiles of the 0,01% and 1% formulations were predominantly associated with PCL, whereas the 10% formulation retained reflections compatible with a detectable crystalline fraction of amygdalin. FTIR and Raman spectra indicated overall preservation of the characteristic regions of the polymeric matrix, with no evidence of marked chemical changes during the evaluated period, although band overlap limited direct identification of amygdalin at the lower concentrations. The quantitative range of the chromatographic method was 6-90 μg/mL, with a detection limit of 2.66 μg/mL and a quantification limit of 8.06 μg/mL. EE was reliably determined only for the 1% formulation, yielding 80.06 ± 0.78%. The formulations therefore maintained physicochemical, colloidal, and structural characteristics consistent with nanostructured systems during 120 days.

Keywords: Drug Delivery Systems. Biocompatible Materials. Technology, Pharmaceutical. Quality Control. Pharmaceutical Preparations.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 · Estrutura química da amigdalina.....16
Figura 2 · Representação esquemática de uma nanocápsula polimérica.....18
Figura 3 · Estrutura química da poli(ε-caprolactona).....19
Figura 4 · Delineamento experimental...….....30
Figura 5 · Deposição interfacial do polímero pré-formado.....36
Figura 6 · Remoção do solvente orgânico em evaporador rotatório……..…….....37
Figura 7 · Variação do pH das formulações durante 120 dias de armazenamento...……40
Figura 8 · Distribuições de tamanho por intensidade das formulações: (A) branco; (B) 0,01%; (C)1%; e (D) 10%.....43
Figura 9 · Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG) das nanocápsulas de PCL.....44
Figura 10 · Gráficos de dispersão representando a curva analítica para resultado da linearidade da média das amostras nas concentrações de 6, 7, 9, 40, 50, 70 e 90 μg/mL, no comprimento de onda definido (214 nm).....46
Figura 11 · Difratogramas de raios X da mistura física, da amigdalina, da PCL e das nanocápsulas…….....50
Figura 12 · Espectros de FTIR da PCL, da MF e da AMG, com indicação das principais bandas de absorção.....53
Figura 13 · Espectros de FTIR das formulações nos dias 0 (A), 60 (B) e 120 (C).....54
Figura 14 · Espectros Raman da amigdalina (AMG), da mistura física (MF) e da PCL (A), e das formulações nos dias 0 (B), 30 (C), 60 (D), 90 (E) e 120 (F).....57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Volumes da solução estoque de amigdalina a 100 μg mL^{-1} utilizados no preparo das soluções padrão, com volume final de 10 mL……...……...32
Tabela 2 – Composição das nanocápsulas poliméricas contendo amigdalina obtidas por deposição interfacial do polímero pré-formado…….....……37
Tabela 3 – Valores de pH das formulações durante 120 dias de armazenamento……..……..41
Tabela 4 – Efeito do tempo de armazenamento sobre o pH das formulações…...…….…...41
Tabela 5 – Diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersidade e potencial zeta das formulações durante 120 dias de armazenamento.....…….42
Tabela 6 – Massa de amigdalina adicionada, volume final e concentração teórica das formulações…….....…….46
Tabela 7 – Valores de inclinação e intercepto obtidos para as três curvas analíticas de calibração da amigdalina…….....…….47
Tabela 8 – Relação entre as concentrações de amigdalina nas soluções injetadas, a faixa analítica do método e a interpretação da eficiência de encapsulação das formulações…...….49
Tabela A1 – Valores individuais de pH, estatísticas descritivas e comparação com o dia 0…68
Tabela A2 – Resultados detalhados da ANOVA de uma via para o efeito do tempo sobre o pH.....68
Tabela A3 – Comparações múltiplas entre todos os tempos pelo teste de Tukey HSD....…...69

LISTA DE SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
AMG	Amigdalina
DAD	Detector de arranjo de diodos
DLS	Espalhamento dinâmico de luz
DRX	Difração de raios X
EE	Eficiência de encapsulação
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IPD	Índice de polidispersidade
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MEV-FEG	Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo
PCL	Poli(ε-caprolactona)
PPGCS	Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
UHPLC	Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência
UEPG	Universidade Estadual de Ponta Grossa
MF	Mistura física
SERS	Espectroscopia Raman intensificada por superfície

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....12
2 OBJETIVOS.....14
2.1 OBJETIVO GERAL.....14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....14
3 REVISÃO DE LITERATURA.....15
3.1 GLICOSÍDEOS CIANOGÊNICOS E AMIGDALINA.....15
3.1.1 Glicosídeos cianogênicos: definição, ocorrência e relevância toxicológica.....15
3.1.2 Amigdalina: estrutura química, fontes botânicas e propriedades físico-químicas.....15
3.1.3 Hidrólise, metabolismo e aspectos de segurança.....16
3.1.4 Limitações tecnológicas da amigdalina.....17
3.2 NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS COMO SISTEMAS DE PROTEÇÃO.....18
3.2.1 Conceito de nanocápsulas e diferença em relação às nanoesferas.....18
3.2.2 Poli(ε-caprolactona) (PCL) como polímero de interesse.....19
3.2.3 Método de deposição interfacial do polímero pré-formado.....19
3.2.4 Atributos críticos de qualidade em nanocápsulas.....20
3.3 CARACTERIZAÇÃO DE NANOCÁPSULAS CONTENDO AMIGDALINA.....21
3.3.1 Caracterização morfológica por MEV-FEG.....21
3.3.2 Espectroscopia FTIR na avaliação estrutural.....21
3.3.3 Espectroscopia Raman como técnica complementar.....22
3.3.4 Possíveis interações intermoleculares entre amigdalina e PCL.....22
3.4 ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOCÁPSULAS.....23
3.4.1 Estabilidade coloidal e potencial zeta.....23
3.4.2 pH como indicador de estabilidade da formulação.....24
3.4.3 Influência do armazenamento na estabilidade.....24
3.4.4 Influência da concentração de amigdalina nas características das nanocápsulas.....25
3.4.5 Integração entre eficiência de encapsulação, MEV-FEG, FTIR, Raman, pH e parâmetros coloidais.....26
3.5 LACUNAS DA LITERATURA E JUSTIFICATIVA DO ESTUDO.....26
3.5.1 Lacunas relacionadas à amigdalina nanoencapsulada.....26
3.5.2 Justificativa.....27
4 MATERIAL E MÉTODOS.....28
4.1 EQUIPAMENTOS.....28
4.2 REAGENTES E SOLVENTES.....28
4.2.1 Fármaco.....28
4.2.2 Polímero.....28
4.2.3 Água purificada.....29
4.2.4 Solventes e demais reagentes.....29
4.2.5 Materiais.....29
4.3 DESENHO EXPERIMENTAL.....29
4.4 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO AMIGDALINA.....30
4.4.1 Condições cromatográficas.....30
4.4.2 Preparo da fase móvel.....31

4.4.3 Preparo da solução estoque de amigdalina....31
4.4.4 Preparo das soluções padrão e curva analítica....32
4.4.5 Preparo das amostras de nanocápsulas....33
4.4.6 Quantificação da amigdalina livre....33
4.4.7 Eficiência de encapsulação....34
4.4.8 Seletividade....34
4.4.9 Linearidade e faixa de trabalho....35
4.4.10 Limite de detecção e limite de quantificação....35
4.5 OBTENÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS CONTENDO AMIGDALINA..35
4.6 CARACTERIZAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO AMIGDALINA....38
4.6.1 Caracterização Físico-Química....38
4.6.2 Caracterização Morfológica....38
4.6.2.1 Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo....38
4.6.3 Análise Estrutural....38
4.6.3.1 Análise por Difração de Raios X (DRX)....38
4.6.3.2 Avaliação por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)..38
4.6.3.3 Avaliação por Espectroscopia Raman....39
4.7 AVALIAÇÃO DO ESTUDO DE ESTABILIDADE....39
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS....39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO....40
5.1 AVALIAÇÃO DO PH....40
5.2 DIÂMETRO HIDRODINÂMICO, ÍNDICE DE POLIDISPERSIDADE E POTENCIAL ZETA.42
5.3 MORFOLOGIA POR MEV-FEG....44
5.4 Síntese da caracterização físico-coloidal....45
5.5 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO....45
5.5.1 Aplicabilidade do método às diferentes formulações....48
5.5.2 Síntese da aplicabilidade....49
5.6 ANÁLISE POR DIFRAÇÃO DE RAIOS X....50
5.7 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)....52
5.8 ESPECTROSCOPIA RAMAN....56
6 CONCLUSÃO....62
REFERÊNCIAS....64
APÊNDICE A – DADOS INDIVIDUAIS E ANÁLISE ESTATÍSTICA DO pH DURANTE 120 DIAS DE ARMAZENAMENTO....68

1 INTRODUÇÃO

A amigdalina é um diglicosídeo cianogênico natural amplamente distribuído em sementes de espécies da família Rosaceae. Sua estrutura contém grupos aromáticos, glicosídicos, hidroxila e nitrila, relevantes tanto para sua identificação analítica quanto para a compreensão de seu comportamento em sistemas farmacêuticos (Jaszczak-Wilke *et al.*, 2021). Os efeitos biológicos e o perfil de segurança da amigdalina dependem da formulação, da via de administração, das condições de hidrólise e da possibilidade de liberação de cianeto. Embora atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e outros efeitos tenham sido descritos em estudos pré-clínicos, sua aplicação exige cautela e estratégias capazes de controlar seu ambiente físico-químico e sua estabilidade (Barakat *et al*., 2022; Spanoudaki *et al*., 2023).

Nesse contexto, a nanoencapsulação constitui uma alternativa para favorecer a proteção da amigdalina, reduzir sua exposição direta ao meio e investigar sua compatibilidade com matrizes poliméricas (Deng *et al.*, 2020). Além da obtenção do sistema, é necessário determinar quanto do composto permanece associado às partículas. A eficiência de encapsulação, portanto, representa um atributo relevante, especialmente para uma molécula hidrofílica, cuja partição para a fase aquosa pode limitar sua retenção no sistema. A avaliação da estabilidade durante o armazenamento também é essencial para verificar se as características da formulação são preservadas ao longo do tempo (Barakat *et al*., 2022; Spanoudaki *et al*., 2023).

Entre os polímeros empregados em sistemas nanoestruturados, a poli(ε-caprolactona) (PCL) destaca-se por ser um poliéster alifático semicristalino, biodegradável e biocompatível, amplamente utilizado em plataformas de liberação de compostos bioativos. Sua processabilidade, degradação relativamente lenta e compatibilidade com sistemas coloidais justificam seu uso na obtenção de nanocápsulas por deposição interfacial do polímero pré-formado. Entretanto, a obtenção de nanocápsulas de PCL contendo amigdalina não garante, por si só, eficiência de encapsulação ou estabilidade adequadas, sendo necessário investigar a associação do ativo e a manutenção das características estruturais e físico-químicas após o processamento (Pawar *et al.*, 2023; Woodruff; Hutmacher, 2010).

Para essa finalidade, a combinação de técnicas morfológicas, espectroscópicas, cromatográficas e físico-químicas permite uma avaliação mais abrangente. A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e a espectroscopia Raman fornecem informações complementares sobre os grupos funcionais da amigdalina e da PCL, possibilitando investigar preservação estrutural e possíveis interações intermoleculares decorrentes da nanoencapsulação (Pasieczna-Patkowska; Cichy; Flieger, 2025; Kotula;

Snyder; Migler, 2017). A microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG) contribui para a avaliação morfológica, enquanto a cromatografia permite quantificar a fração livre de amigdalina e estimar a eficiência de encapsulação.

Parâmetros como diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersidade, potencial zeta e pH são fundamentais para acompanhar o comportamento físico-coloidal das nanocápsulas. O tamanho e o índice de polidispersidade descrevem a distribuição das partículas; o potencial zeta fornece informações sobre a carga superficial e a tendência à agregação; e o pH permite monitorar alterações no meio dispersante que podem estar associadas a hidrólise, degradação ou reorganização dos componentes (Clogston; Vermilya, 2020; Németh *et al.*, 2022; Rasmussen; Pedersen; Marie, 2020). A interpretação integrada desses parâmetros reduz o risco de conclusões baseadas em uma única técnica.

Apesar do interesse crescente pela amigdalina e pelo uso da PCL como matriz polimérica, ainda são limitados os estudos que integram eficiência de encapsulação, caracterização morfológica e avaliação temporal da estabilidade físico-química. Assim, este trabalho teve como objetivo desenvolver nanocápsulas de PCL contendo diferentes concentrações de amigdalina, caracterizá-las por técnicas físico-químicas, morfológicas e espectroscópicas, determinar a eficiência de encapsulação por método cromatográfico e avaliar seu comportamento durante 120 dias de armazenamento.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar nanocápsulas de PCL contendo diferentes concentrações de amigdalina, determinar a eficiência de encapsulação do composto químico e avaliar a estabilidade físico-química das formulações durante 120 dias de armazenamento.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter nanocápsulas poliméricas de PCL contendo amigdalina pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado;
- Caracterizar as formulações quanto ao diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersidade, potencial zeta, pH e morfologia por MEV-FEG;
- Avaliar os perfis estruturais dos componentes e das formulações por DRX, FTIR e espectroscopia Raman, e investigar possíveis interações intermoleculares entre a amigdalina e a PCL;
- Determinar a eficiência de encapsulação da amigdalina pelo método indireto, mediante quantificação cromatográfica da fração livre no sobrenadante;
- Avaliar a estabilidade físico-química das formulações ao longo de 120 dias de armazenamento, por meio das determinações de pH, diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersidade e potencial zeta;
- Comparar o comportamento das nanocápsulas contendo diferentes concentrações de amigdalina e da formulação branca.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 GLICOSÍDEOS CIANOGÊNICOS E AMIGDALINA

3.1.1 Glicosídeos cianogênicos: definição, ocorrência e relevância toxicológica

Os glicosídeos cianogênicos constituem uma classe de metabólitos secundários de origem vegetal caracterizados pela presença de uma porção cianogênica ligada a resíduos glicídicos. Após hidrólise, especialmente em presença de β-glicosidases, esses compostos podem liberar cianeto de hidrogênio (HCN), molécula associada a efeitos tóxicos por interferir na respiração celular mitocondrial. Essa característica confere aos glicosídeos cianogênicos relevância simultânea nas áreas de botânica, toxicologia, alimentos e ciências farmacêuticas (Gleadow; Møller, 2014; Zagrobelny; Bak; Møller, 2008).

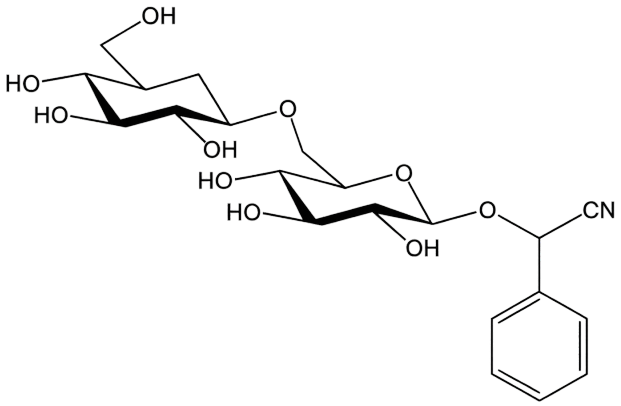
Esses compostos estão amplamente distribuídos no reino vegetal, com ocorrência descrita em diferentes famílias botânicas, incluindo *Rosaceae, Fabaceae e Poaceae.* Entre os exemplos mais conhecidos estão a amigdalina, encontrada em sementes de espécies do gênero *Prunus,* a *linamarina*, presente na mandioca, e a *dhurrina,* observada no sorgo. A presença desses metabólitos está relacionada principalmente à defesa química vegetal, uma vez que a liberação de HCN após dano tecidual atua como mecanismo de proteção contra herbívoros e microrganismos (Gleadow; Møller, 2014).

Embora a discussão ecológica desses compostos seja relevante, no contexto farmacêutico e nanotecnológico, o interesse principal recai sobre a estabilidade, a hidrólise e o risco toxicológico associado à liberação de cianeto. Dessa forma, a compreensão das características gerais dos glicosídeos cianogênicos fornece a base para a discussão específica da amigdalina, composto bioativo selecionado para o desenvolvimento das nanocápsulas avaliadas nesta dissertação (Abraham; buhrke; lampen, 2016; jaszczak-wilke *et al*., 2021).

3.1.2 Amigdalina: estrutura química, fontes botânicas e propriedades físico-químicas

A amigdalina é um glicosídeo cianogênico do tipo diglicosídeo, derivado da mandelonitrila, cuja estrutura é composta por uma porção aromática, um grupo nitrila e duas unidades de glicose. Sua fórmula molecular é $C_{20}H_{27}NO_{11}$ (Figura 1), com massa molar aproximada de 457,43 g/mol. A presença do grupo nitrila é particularmente importante, pois está relacionada à possibilidade de liberação de cianeto após processos de hidrólise (Bolarinwa; Orfila; Morgan, 2014).

Figura 1 – Estrutura química da amigdalina.



Fonte: Jaszczak-Wilke, et al. (2021).

Esse complexo é encontrado principalmente em sementes de espécies da família Rosaceae, como amêndoas amargas, damascos, pêssegos, cerejas e ameixas. A concentração de amigdalina nessas matrizes pode variar conforme espécie, cultivar, maturação, condições ambientais e processamento. Essa variabilidade torna relevante o controle das condições experimentais e reforça a importância da caracterização adequada de sistemas contendo esse composto (Bolarinwa; Orfila; Morgan, 2014).

Do ponto de vista físico-químico, a amigdalina apresenta caráter hidrofílico e elevada afinidade por meios aquosos, característica que pode dificultar sua retenção em sistemas com núcleo lipofílico e reduzir a eficiência de encapsulação. Além disso, a molécula é suscetível à hidrólise em determinadas condições, o que representa um desafio para formulações destinadas à preservação de sua estrutura química (Barakat *et al*., 2022; jaszczak-wilke *et al*., 2021).

3.1.3 Hidrólise, metabolismo e aspectos de segurança

A hidrólise da amigdalina pode ocorrer por ação de β-glicosidases, levando inicialmente à formação de prunasina e, posteriormente, de mandelonitrila. Esta última pode se decompor, espontaneamente ou por ação enzimática, originando benzaldeído e cianeto. Esse processo é influenciado por fatores como pH, temperatura, disponibilidade enzimática e composição do meio, o que torna a estabilidade da amigdalina dependente tanto da matriz quanto das condições de armazenamento (Abraham; Buhrke; Lampen, 2016).

A via oral é particularmente relevante do ponto de vista toxicológico, pois a microbiota intestinal pode contribuir para a hidrólise de glicosídeos cianogênicos e aumentar

a liberação de cianeto. Após absorção, o cianeto é metabolizado principalmente a tiocianato por vias de detoxificação, porém essa capacidade é limitada em exposições elevadas. Assim, a utilização de compostos cianogênicos requer cautela, especialmente quando se considera qualquer proposta de aplicação farmacêutica ou nutracêutica (ATSDR, 2006; EFSA, 2016).

Apesar de estudos experimentais associarem a amigdalina a possíveis atividades biológicas, como efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e citotóxicos em modelos *in vitro*, as evidências clínicas permanecem limitadas e controversas (Jaszczak-wilke *et al*., 2021; barakat *et al.*, 2022; milazzo; horneber, 2015). Portanto, nesta dissertação, a amigdalina é abordada principalmente como composto bioativo de interesse tecnológico, cujo desafio central envolve sua associação a um sistema nanoestruturado e a manutenção de sua estabilidade físico-química.

3.1.4 Limitações tecnológicas da amigdalina

A formulação da amigdalina em sistemas farmacêuticos ou tecnológicos apresenta desafios importantes. Sua elevada afinidade por água pode favorecer contato direto com o meio aquoso, enquanto sua susceptibilidade à hidrólise pode comprometer a preservação estrutural durante o processamento e o armazenamento. Além disso, a possibilidade de liberação de cianeto reforça a necessidade de estratégias capazes de reduzir a exposição direta da molécula a condições que favoreçam sua degradação (Abraham; Buhrke; Lampen, 2016; Barakat *et al.*, 2022; Jaszczak-Wilke *et al.*, 2021).

Nesse cenário, sistemas nanoestruturados podem representar uma alternativa relevante para favorecer a proteção físico-química da amigdalina. Dentre esses sistemas, encontram-se as nanocápsulas poliméricas que apresentam arquitetura do tipo reservatório, na qual um núcleo interno é revestido por uma parede polimérica. Essa organização pode contribuir para reduzir a exposição do ativo ao meio externo e favorecer a manutenção de parâmetros de estabilidade, desde que a formulação apresente características coloidais adequadas (Deng *et al.,* 2020; mora-huertas; fessi; elaissari, 2010).

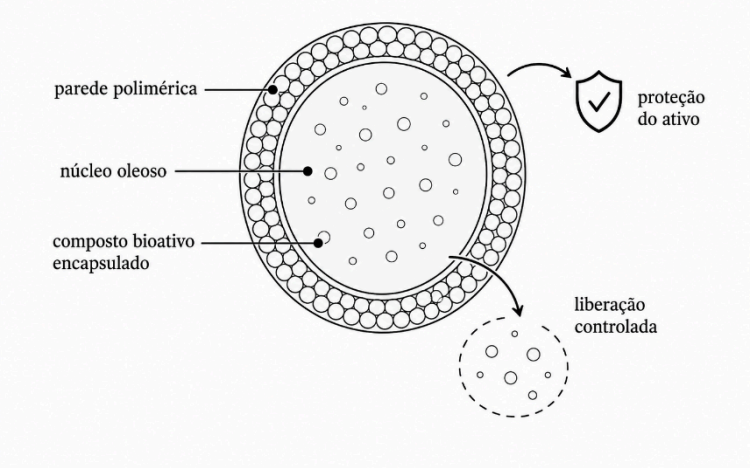
Dessa forma, a discussão sobre amigdalina conduz diretamente à necessidade de compreender as nanocápsulas poliméricas, os materiais empregados em sua obtenção e os métodos de caracterização capazes de demonstrar preservação estrutural, possíveis interações intermoleculares e estabilidade físico-química ao longo do tempo.

3.2 NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS COMO SISTEMAS DE PROTEÇÃO

3.2.1 Conceito de nanocápsulas e diferença em relação às nanoesferas

Nanopartículas poliméricas são sistemas coloidais com dimensões nanométricas amplamente investigados para proteção de compostos, modulação de propriedades físico-químicas e desenvolvimento de sistemas de veiculação. Dentro dessa classe, distinguem-se principalmente nanoesferas e nanocápsulas. As nanoesferas apresentam organização matricial, na qual o ativo pode estar disperso ou adsorvido em uma matriz polimérica contínua. As nanocápsulas, por sua vez, apresentam estrutura do tipo reservatório, como ilustrado na Figura 2, composta por um núcleo interno, frequentemente oleoso, envolto por uma parede polimérica (Soppimath *et al*., 2001; Mora-huertas; Fessi; Elaissari, 2010).

Figura 2 – Representação esquemática de uma nanocápsula polimérica.



Fonte: elaborada pela autora com auxílio do ChatGPT (OpenAI, 2026).

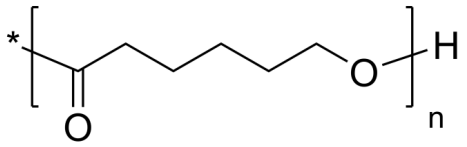
A arquitetura núcleo-casca das nanocápsulas busca proteger moléculas sensíveis a condições externas, pois a parede polimérica pode atuar como barreira física parcial entre o composto e o meio dispersante. Embora essa estrutura não elimine a necessidade de estudos complementares de liberação, segurança e eficácia, ela oferece base tecnológica adequada para investigações de estabilidade físico-química (Deng *et al.*, 2020; Mora-Huertas; Fessi; Elaissari, 2010).

No caso da amigdalina, a escolha por nanocápsulas poliméricas se justifica pela possibilidade de organizar o sistema em compartimentos e avaliar se a presença da poli(ε-caprolactona) e dos demais componentes da formulação contribui para a manutenção das características estruturais e coloidais ao longo do armazenamento. Assim, a nanocápsula é avaliada neste estudo como uma plataforma de estabilização físico-química.

3.2.2 Poli(ε-caprolactona) (PCL) como polímero de interesse

A PCL é um poliéster alifático biodegradável (Figura 3) amplamente utilizado em sistemas biomédicos e farmacêuticos devido à sua biocompatibilidade, hidrofobicidade, baixa temperatura de transição vítrea e degradação relativamente lenta. Essas características favorecem sua aplicação em sistemas poliméricos destinados à formação de filmes, matrizes e paredes de nanocápsulas (Woodruff; Hutmacher, 2010).

Figura 3 – Estrutura química da poli(ε-caprolactona), $(C_6H_{10}O_2)$□.



Fonte: Polymer Source (acesso em: 19 de julho de 2026).

Em nanocápsulas, a PCL constitui a parede polimérica ao redor do núcleo interno e pode atuar como barreira física parcial. Entretanto, devido ao caráter hidrofílico da amigdalina, sua localização e retenção no sistema dependem de sua partição entre as fases, da composição da formulação e da eficiência de associação, não sendo possível presumir sua permanência no núcleo da nanocápsula apenas com base na presença da PCL. Contudo, a PCL é um material adequado para investigar a estabilização físico-química de compostos sensíveis, como a amigdalina (Pawar *et al.,* 2023; Woodruff; Hutmacher, 2010).

Do ponto de vista espectroscópico, a PCL apresenta bandas características relacionadas principalmente a grupos éster, ligações C–O–C e grupos metilênicos. A identificação dessas bandas por FTIR e Raman permite verificar a presença do polímero nas formulações e avaliar possíveis alterações decorrentes do processo de nanoencapsulação (Elzein *et al.*, 2004; Kotula; Snyder; Migler, 2017).

3.2.3 Método de deposição interfacial do polímero pré-formado

A deposição interfacial do polímero pré-formado, também descrita como método de deslocamento de solvente, é uma técnica clássica para obtenção de nanocápsulas poliméricas. O método envolve a dissolução do polímero e de componentes lipofílicos em uma fase orgânica total ou parcialmente solúvel em água, seguida da adição dessa fase a uma fase aquosa contendo surfactante. A difusão do solvente orgânico para o meio aquoso promove a

precipitação do polímero na interface, formando estruturas nanométricas (Fessi *et al.,* 1989; Mora-H; Fessi; Elaissari, 2010).

Entre as vantagens deste método destacam-se simplicidade operacional, reprodutibilidade e possibilidade de obtenção de partículas em escala nanométrica sem necessidade de condições energéticas extremas. Esses aspectos são importantes para compostos sensíveis, pois reduzem a exposição a etapas potencialmente degradativas. No entanto, variáveis como concentração de polímero, composição da fase orgânica, proporção entre fases, tipo de surfactante e velocidade de adição podem influenciar diretamente as características finais da formulação (Fessi *et al*., 1989; Mora-H; Fessi; Elaissari, 2010).

Para formulações contendo amigdalina, o método de deposição interfacial permite a organização de um sistema polimérico capaz de ser posteriormente avaliado quanto à morfologia, perfil espectroscópico e estabilidade físico-química. Assim, o processo de preparo deve ser compreendido como etapa determinante para os atributos de qualidade das nanocápsulas.

3.2.4 Atributos críticos de qualidade em nanocápsulas

A qualidade de nanocápsulas poliméricas depende de um conjunto de atributos físico-químicos, incluindo tamanho de partícula, índice de polidispersidade, potencial zeta, morfologia, pH e estabilidade ao longo do armazenamento. Esses parâmetros permitem inferir a homogeneidade da dispersão, a tendência à agregação e possíveis alterações decorrentes do tempo ou das condições ambientais (Danaei *et al.*, 2018).

O tamanho de partícula e o índice de polidispersidade fornecem informações sobre a distribuição da população de partículas. Valores reduzidos de PDI costumam indicar maior homogeneidade, enquanto aumentos ao longo do tempo podem sugerir agregação, crescimento de partículas ou instabilidade da suspensão. Embora esses parâmetros sejam importantes, a estabilidade de um sistema nanoestruturado deve ser interpretada de forma integrada, considerando também carga superficial, pH e observações morfológicas (Danaei *et al.*, 2018).

O potencial zeta é frequentemente utilizado como indicador da carga superficial das partículas e da estabilidade coloidal. Valores elevados em módulo podem favorecer repulsão eletrostática entre partículas; entretanto, formulações estabilizadas por surfactantes também podem apresentar contribuição de estabilização estérica. Portanto, a interpretação do potencial

zeta deve considerar a composição da formulação e não apenas um valor numérico isolado (Honary; Zahir, 2013).

3.3 CARACTERIZAÇÃO DE NANOCÁPSULAS CONTENDO AMIGDALINA

3.3.1 Caracterização morfológica por MEV-FEG

A caracterização morfológica é essencial para avaliar a organização estrutural das nanocápsulas e verificar aspectos como formato, superfície e tendência à agregação. A microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo permite observar as partículas com maior resolução, contribuindo para a análise visual da morfologia e para a confirmação de que o processo de preparo resultou em estruturas compatíveis com sistemas nanoestruturados (Deng *et al.,* 2020; Mora-Huertas; Fessi; Elaissari, 2010).

Embora a MEV-FEG forneça informações relevantes sobre morfologia, essa técnica deve ser interpretada em conjunto com os dados físico-químicos, pois etapas de secagem e preparo da amostra podem alterar a organização das partículas em relação à suspensão original. Assim, a morfologia observada complementa, mas não substitui, parâmetros como potencial zeta, pH e distribuição de tamanho (Michen *et al*., 2015).

Dessa forma, a análise com MEV-FEG contribui para relacionar o aspecto morfológico das formulações com as demais evidências de estabilidade. A presença de partículas com morfologia compatível, associada à manutenção de parâmetros físico-químicos e espectroscópicos, fortalece a interpretação de que o sistema nanoencapsulado foi obtido de forma adequada.

3.3.2 Espectroscopia FTIR na avaliação estrutural

A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica amplamente empregada para identificação de grupos funcionais e avaliação de alterações estruturais em materiais e formulações. Em sistemas nanoestruturados, o FTIR permite comparar os espectros dos componentes isolados, da mistura física e das formulações, possibilitando observar manutenção, deslocamento, intensificação, redução ou desaparecimento de bandas características (Coates, 2000).

Para a amigdalina, são relevantes bandas associadas a grupos hidroxila, ligações C–O, anel aromático e grupo nitrila. Para a PCL, destacam-se bandas relacionadas ao estiramento da carbonila de éster, ligações C–O–C e vibrações de grupos CH_2. A observação

dessas regiões espectrais permite investigar se o processo de nanoencapsulação preserva sinais característicos dos componentes ou se há alterações sugestivas de interações intermoleculares (Elzein et al., 2004; Jaszczak-Wilke *et al*., 2021).

É válido ressaltar que o FTIR, isoladamente, não comprova compatibilidade farmacêutica completa nem estabilidade química definitiva. Entretanto, quando associado a Raman, MEV-FEG, pH e potencial zeta, fornece evidências importantes sobre a preservação estrutural dos componentes e possíveis interações entre a amigdalina, a PCL e os demais excipientes da formulação (Coates, 2000; Elzein *et al*., 2004; Kotula; Snyder; Migler, 2017).

3.3.3 Espectroscopia Raman como técnica complementar

A espectroscopia Raman é uma técnica vibracional complementar ao FTIR e fornece informações sobre modos vibracionais moleculares associados à polarizabilidade das ligações químicas. Em sistemas contendo polímeros e compostos bioativos, o Raman é útil para investigar a manutenção de bandas características, alterações na intensidade relativa dos sinais e possíveis deslocamentos espectrais decorrentes de interações intermoleculares (Kotula; Snyder; Migler, 2017; Krafft *et al*., 2012).

No caso da PCL, bandas Raman características podem ser atribuídas a vibrações de ligações C–O–C, deformações de grupos CH_2 e estiramento de carbonila. Para a amigdalina, são relevantes sinais associados ao anel aromático, ligações C–O e demais vibrações estruturais do glicosídeo. A comparação entre os espectros dos compostos puros, mistura física e nanocápsulas permite avaliar se a nanoencapsulação promove alterações importantes no perfil vibracional (Kotula; Snyder; Migler, 2017; Krafft *et al.*, 2012).

A manutenção das principais bandas de PCL e amigdalina nas formulações, sem deslocamentos expressivos ou desaparecimento de sinais críticos, pode sugerir preservação estrutural dos componentes. Por outro lado, mudanças discretas de posição ou intensidade podem indicar interação física, sobreposição de bandas ou reorganização molecular no sistema nanoencapsulado. Portanto, a interpretação deve ser cuidadosa e integrada aos demais resultados (Elzein *et al.,* 2004; Kotula; Snyder; Migler, 2017; Krafft *et al*., 2012).

3.3.4 Possíveis interações intermoleculares entre amigdalina e PCL

A investigação de possíveis interações intermoleculares é um ponto central na caracterização de nanocápsulas contendo amigdalina. Essas interações podem envolver

ligações de hidrogênio, forças dipolo-dipolo, interações hidrofóbicas ou simples proximidade física entre componentes da formulação. Em técnicas vibracionais, tais fenômenos podem se manifestar como deslocamentos de bandas, alterações de intensidade ou mudanças no perfil espectral (Coates, 2000; Elzein *et al*., 2004; Kotula; Snyder; Migler, 2017).

Entretanto, deve-se evitar interpretar a ausência de grandes alterações espectrais como prova absoluta de ausência de interação. Em sistemas complexos, sobreposição de bandas e baixa concentração relativa do ativo podem dificultar a visualização de alterações. Por isso, os dados de FTIR e Raman devem ser apresentados como evidências de preservação estrutural e possíveis interações intermoleculares, e não como demonstração isolada de compatibilidade completa (Coates, 2000; Kotula; Snyder; Migler, 2017).

Essa abordagem alinha a interpretação espectroscópica aos objetivos propostos. O foco não está em afirmar compatibilidade farmacêutica definitiva, mas em verificar se a nanoencapsulação preserva as características estruturais principais da amigdalina e da PCL e se há indícios de alterações moleculares relevantes após o preparo das formulações.

3.4 ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOCÁPSULAS

3.4.1 Estabilidade coloidal e potencial zeta

A estabilidade coloidal é um dos principais requisitos para sistemas nanoestruturados em suspensão. Nanocápsulas instáveis podem sofrer agregação, sedimentação, coalescência ou alterações na superfície das partículas, comprometendo a reprodutibilidade da formulação e a interpretação dos resultados. Entre os parâmetros utilizados para monitorar essa estabilidade, o potencial zeta ocupa posição de destaque por refletir a carga superficial das partículas e sua tendência de repulsão ou aproximação (Clogston; Vermilya, 2020; Honary; Zahir, 2013; Rasmussen; Pedersen; Marie, 2020).

Valores de potencial zeta com maior magnitude geralmente indicam maior repulsão eletrostática entre partículas, reduzindo a tendência à agregação. No entanto, esse critério deve ser interpretado com cautela, uma vez que formulações contendo surfactantes podem apresentar estabilização adicional por impedimento estérico. Assim, mais importante do que um valor pontual é a manutenção do potencial zeta ao longo do armazenamento e sua associação com outros parâmetros, como pH e morfologia (Clogston; Vermilya, 2020; Honary; Zahir, 2013; Németh *et al.*, 2022).

Para nanocápsulas contendo amigdalina, alterações expressivas no potencial zeta podem sugerir mudanças na composição superficial, adsorção ou dessorção de componentes,

degradação parcial da matriz ou reorganização da interface partícula-meio. Dessa forma, o acompanhamento temporal desse parâmetro é fundamental para avaliar a estabilidade físico-química das formulações propostas (Honary; Zahir, 2013; Németh *et al*., 2022).

3.4.2 pH como indicador de estabilidade da formulação

O pH é um parâmetro simples, porém relevante, na avaliação de estabilidade de formulações nanoencapsuladas. Variações de pH ao longo do armazenamento podem indicar alterações químicas no meio, degradação de componentes, hidrólise do polímero ou mudanças relacionadas ao ativo. No caso da amigdalina, esse acompanhamento é especialmente importante devido à sua susceptibilidade à hidrólise em determinadas condições (Ich, 2003; Jaszczak-Wilke *et al.,* 2021; Woodruff; Hutmacher, 2010).

A PCL, por ser um poliéster, pode sofrer processos de hidrólise ao longo do tempo, embora sua degradação seja relativamente lenta quando comparada a outros polímeros biodegradáveis. Ainda assim, alterações no ambiente da suspensão podem refletir mudanças na estabilidade do sistema. Desse modo, o pH deve ser interpretado como um indicador complementar, especialmente quando associado ao potencial zeta e às análises espectroscópicas (Pawar *et al.*, 2023; Woodruff; Hutmacher, 2010).

Em estudos de estabilidade, a manutenção de valores de pH sem variações acentuadas sugere maior conservação das condições físico-químicas da suspensão. Por outro lado, mudanças progressivas podem indicar necessidade de ajuste de formulação, avaliação de condições de armazenamento ou investigação de processos degradativos. Assim, o pH integra o conjunto de parâmetros necessários para compreender o comportamento das nanocápsulas durante o período avaliado (ICH, 2003).

3.4.3 Influência do armazenamento na estabilidade

O armazenamento pode influenciar diretamente a estabilidade de sistemas nanoestruturados, especialmente quando há variações de temperatura, exposição à luz, alterações no meio dispersante ou reorganização de componentes da formulação. Em nanocápsulas, o tempo pode favorecer processos como agregação, alteração da carga superficial, mudanças no pH e modificação das interações entre ativo e matriz polimérica (ICH, 2003; Mora-Huertas; Fessi; Elaissari, 2010).

As diretrizes internacionais para estudos de estabilidade destacam a importância de avaliar o comportamento de produtos farmacêuticos ao longo do tempo e sob condições controladas. Embora formulações experimentais em estágio de desenvolvimento possam não seguir integralmente protocolos regulatórios aplicados a produtos finais, o monitoramento temporal de parâmetros físico-químicos é essencial para demonstrar robustez e identificar sinais de instabilidade (ICH, 2003).

No contexto desta dissertação, a avaliação ao longo do armazenamento permite verificar se as nanocápsulas de PCL contendo diferentes concentrações de amigdalina mantêm características compatíveis com estabilidade físico-química. Essa abordagem é relevante porque integra parâmetros estruturais, morfológicos e coloidais, evitando conclusões baseadas em um único resultado isolado.

3.4.4 Influência da concentração de amigdalina nas características das nanocápsulas

A concentração do composto bioativo pode influenciar diretamente as propriedades de sistemas nanoencapsulados. Alterações na quantidade de amigdalina adicionada podem modificar sua partição entre as fases, a composição da interface e a organização das partículas. Como consequência, parâmetros como diâmetro, índice de polidispersidade, potencial zeta, pH, morfologia, perfil espectroscópico e eficiência de encapsulação podem variar entre formulações (Deng *et al.,* 2020; Mora-Huertas; Fessi; Elaissari, 2010).

A eficiência de encapsulação expressa a proporção do composto associada ao sistema em relação à quantidade inicialmente adicionada. No método indireto, a fração livre é separada das partículas e quantificada no sobrenadante; a diferença entre a quantidade total teórica e a quantidade livre é utilizada para estimar a fração encapsulada. A validade desse cálculo depende de separação adequada, recuperação conhecida do sobrenadante e utilização de um método analítico cuja faixa quantitativa abranja as concentrações das amostras.

A comparação entre nanocápsulas contendo diferentes quantidades de amigdalina permite identificar se a concentração do ativo interfere na eficiência de encapsulação e nos atributos críticos de qualidade. Essa análise é importante para reconhecer os limites tecnológicos do sistema, selecionar condições analíticas adequadas e evitar que respostas abaixo do limite de quantificação ou acima da faixa linear sejam interpretadas como resultados quantitativos válidos.

3.4.5 Integração entre eficiência de encapsulação, MEV-FEG, FTIR, Raman, pH e parâmetros coloidais

A avaliação de nanocápsulas contendo amigdalina torna-se mais consistente quando diferentes técnicas são interpretadas de forma integrada. A eficiência de encapsulação informa a fração do composto associada ao sistema; a MEV-FEG fornece informações morfológicas (Crecente-Campo; Alonso, 2019); o FTIR e o Raman permitem avaliar características estruturais e possíveis interações intermoleculares; o diâmetro hidrodinâmico e o índice de polidispersidade descrevem a distribuição das partículas; o potencial zeta indica aspectos relacionados à estabilidade coloidal; e o pH contribui para identificar mudanças no meio dispersante ao longo do armazenamento (Clogston; Vermilya, 2020; Kotula; Snyder; Migler, 2017; Mora-Huertas; Fessi; Elaissari, 2010).

Essa integração é necessária porque cada técnica apresenta limitações próprias. Alterações espectroscópicas podem ser discretas ou mascaradas por sobreposição de bandas; imagens de microscopia podem ser influenciadas pelo preparo da amostra; valores de potencial zeta e pH, isoladamente, não explicam todos os mecanismos de estabilidade; e a eficiência de encapsulação somente é confiável quando a resposta cromatográfica se encontra dentro da faixa quantitativa do método. A análise conjunta reduz essas limitações e oferece uma visão mais robusta do comportamento da formulação.

Portanto, a abordagem adotada nesta dissertação busca relacionar a quantidade de amigdalina associada às nanocápsulas com a morfologia, a preservação estrutural e a manutenção dos parâmetros físico-coloidais durante o armazenamento. Essa estratégia é coerente com a avaliação tecnológica do sistema nanoencapsulado.

3.5 LACUNAS DA LITERATURA E JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

3.5.1 Lacunas relacionadas à amigdalina nanoencapsulada

Nas revisões e estudos consultados, observa-se predominância de trabalhos direcionados às propriedades biológicas da amigdalina ou às estratégias de veiculação, enquanto são menos frequentes investigações que integrem eficiência de encapsulação, caracterização estrutural, morfologia e estabilidade físico-química durante o armazenamento (Barakat *et al.,* 2022; Spanoudaki *et al.,* 2023).

Além disso, a amigdalina apresenta desafios particulares por se tratar de um glicosídeo cianogênico suscetível à hidrólise. Essa característica exige que estudos com esse

composto considerem não apenas a obtenção do sistema nanoestruturado, mas também a preservação estrutural do ativo, a estabilidade do meio e possíveis interações com os componentes da formulação (Abraham; Buhrke; Lampen, 2016; Barakat *et al.*, 2022; Jaszczak-Wilke *et al.*, 2021).

Outra lacuna relevante envolve a aplicação conjunta de técnicas vibracionais e métodos quantitativos em formulações poliméricas contendo amigdalina. Embora FTIR, Raman e cromatografia sejam amplamente utilizados na caracterização de materiais e compostos bioativos, sua integração com parâmetros coloidais e morfológicos em nanocápsulas de PCL contendo amigdalina ainda é pouco explorada (Barakat *et al.*, 2022; spanoudaki *et al.*, 2023).

3.5.2 Justificativa

Diante das limitações associadas à estabilidade química e ao potencial toxicológico da amigdalina, o desenvolvimento de sistemas nanoestruturados representa uma estratégia relevante para sua proteção e estabilização físico-química. As nanocápsulas poliméricas de PCL destacam-se por sua arquitetura do tipo reservatório, composta por parede polimérica e núcleo interno, com potencial para reduzir a exposição direta do composto ao meio externo (Barakat *et al.,* 2022; Mora-Huertas; Fessi; Elaissari, 2010; Spanoudaki *et al.*, 2023).

Entretanto, ainda são necessários estudos que avaliem de forma integrada a eficiência de encapsulação e a estabilidade físico-química de nanocápsulas contendo amigdalina, especialmente considerando diferentes concentrações do ativo e o monitoramento ao longo do armazenamento. A associação entre cromatografia, MEV-FEG, FTIR, Raman, pH, tamanho, índice de polidispersidade e potencial zeta permite uma análise mais abrangente do sistema, contemplando aspectos quantitativos, morfológicos, estruturais e coloidais (Barakat *et al.,* 2022; Spanoudaki *et al.*, 2023).

Assim, a presente dissertação busca contribuir para essa lacuna por meio da preparação, caracterização, determinação da eficiência de encapsulação e avaliação da estabilidade de nanocápsulas de PCL contendo amigdalina. A integração de técnicas cromatográficas, espectroscópicas, morfológicas e físico-químicas fornece subsídios para compreender o desempenho da formulação e os limites analíticos envolvidos em sua avaliação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 EQUIPAMENTOS

- Balança analítica (CELTAC, modelo FA2104N, São Paulo, Brasil);
- Centrífuga (Hermle Z326K, Wehingen, Alemanha);
- Cromatógrafo líquido de ultra-alta eficiência acoplado a detector de arranjo de diodos (SHIMADZU, modelo Nexera X2 System®, Quioto, Japão);
- Cromatógrafo líquido de ultra-alta eficiência acoplado a espectrômetro de massas (WATERS, modelo Acquity H-Class, Massachusetts, Estados Unidos);
- Destilador de água (FANEM LTDA, modelo 724/2-A, São Paulo, Brasil);
- Difratômetro de raios X (SHIMADZU, modelo XRD-6000, Quioto, Japão);
- Espectrômetro infravermelho com transformada de Fourier (SHIMADZU, modelo IR Prestige-21, Quioto, Japão);
- Espectrômetro Raman com laser de excitação de 532 nm;
- Evaporador rotatório (FISATOM, modelo 801, Diadema, Brasil);
- Liofilizador (LIOTOP, modelo L202, São Paulo, Brasil);
- Metalizador (SHIMADZU, modelo IC-50 Ion Coater, Quioto, Japão);
- Microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo (TESCAN, modelo Mira 3, Brno, República Tcheca);
- pHmetro digital (HANNA Instruments, modelo HI 2221, São Paulo, Brasil);
- Placa de agitação e aquecimento (FISATOM, modelo Q261-22, Diadema, Brasil);
- Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, modelo Nano ZS90, Malvern, Reino Unido).

4.2 REAGENTES E SOLVENTES

4.2.1 Fármaco

- Amigdalina (massa molar de 457,43 g/mol; pureza de 98%; TRG Biotech, Hanzhong, China).

4.2.2 Polímero

- Poli(ε-caprolactona) (PCL; massa molar média de 14.000 g/mol; Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brasil).

4.2.3 Água purificada

- Água purificada pelo processo de destilação (H_2O destilada), em equipamento tipo Pilsen (Fanem LTDA, modelo 724/2-A, São Paulo, Brasil);
- Água ultra purificada pelo sistema de ultrapurificação em equipamento Milli-Q (Merck, Integral 5, Darmstadt, Alemanha).

4.2.4 Solventes e demais reagentes

- Acetona ($(CH_3)2$ CO) (Synth, Diadema, Brasil);
- Metanol (CH_3OH) grau HPLC (Hexis Científica, Phillispsburg, Estados Unidos);
- Monooleato de sorbitano etoxilado 20 (polissorbato 80, Tween® 80, Delaware, Porto Alegre, Brasil);
- Monooleato de sorbitano (Span 80®, Oxiteno, Mauá, São Paulo);
- Triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico (Focus Química, São Paulo, Brasil).

4.2.5 Materiais

- Amicon® Ultra 0,5 mL, dispositivo de ultrafiltração com membrana de celulose regenerada e corte de massa molar de 10.000 Da (Tullagreen, Carrigtwohill, Irlanda);
- Chromafil® Xtra PTFE-20/13, filtro de PTFE com poros de 0,22 µm (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha).

4.3 DESENHO EXPERIMENTAL

O estudo foi organizado em três etapas principais: obtenção das nanocápsulas de PCL contendo diferentes concentrações de amigdalina; caracterização e avaliação da estabilidade físico-química das formulações; e quantificação da amigdalina livre para o cálculo da eficiência de encapsulação. A caracterização compreendeu análises de pH, diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersidade, potencial zeta, MEV-FEG, DRX, FTIR e espectroscopia Raman. A quantificação foi realizada por HPLC-DAD, conforme o delineamento apresentado na Figura 4.

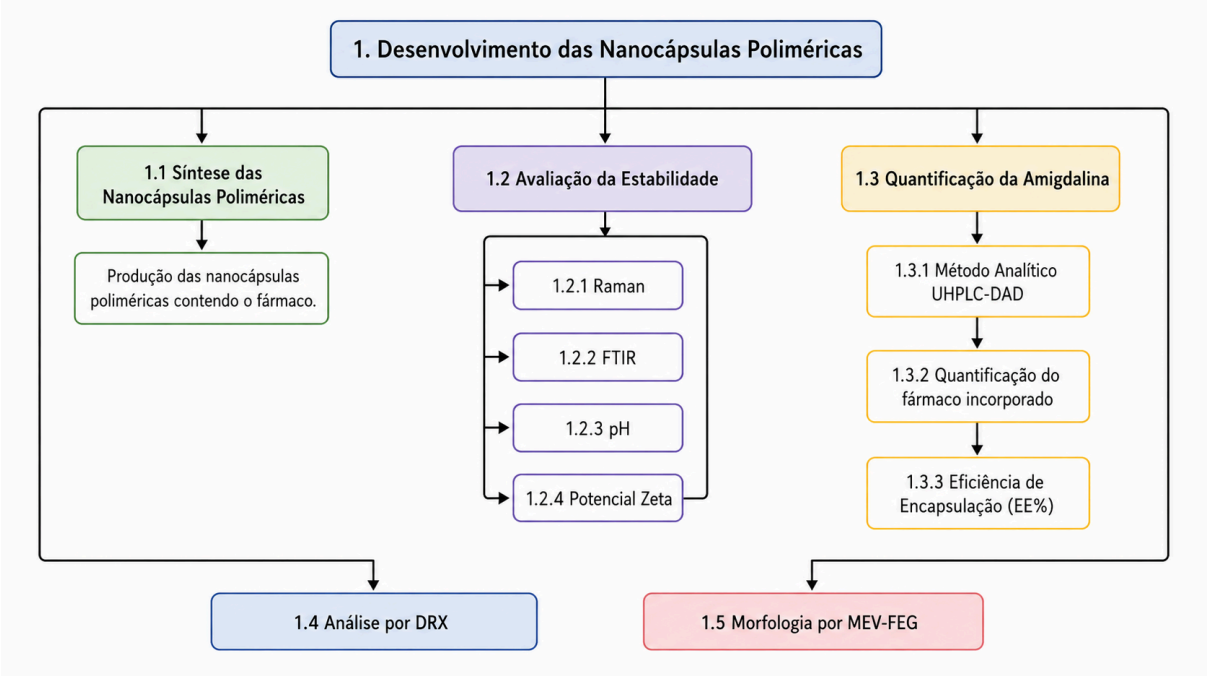


Figura 4 – Delineamento experimental do desenvolvimento, da caracterização, da avaliação de estabilidade e da determinação da eficiência de encapsulação das nanocápsulas de PCL contendo amigdalina.

4.4 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO AMIGDALINA

4.4.1 Condições cromatográficas

A separação cromatográfica da amigdalina foi realizada em coluna de fase reversa C18, com dimensões de 250 × 4,6 mm e tamanho de partícula de 5 µm. A eluição foi conduzida em modo isocrático, utilizando água ultrapura e acetonitrila na proporção de 25:75 (v/v). O fluxo da fase móvel foi mantido em 1,4 mL min^{-1}, a temperatura da coluna em 25 °C e o volume de injeção em 20 µL.

A detecção da amigdalina foi realizada em 214 nm, com tempo total de corrida de 20 minutos. A identificação do analito nas amostras foi efetuada pela comparação do tempo de retenção e do espectro de absorção obtido pelo detector DAD com os do padrão analítico de amigdalina.

Quadro 1 – Condições cromatográficas empregadas na quantificação da amigdalina.

Parâmetro	**Condição**
Coluna	C18, 250 × 4,6 mm, 5 µm
Fase móvel	Água ultrapura:acetonitrila, 25:75 (v/v)

Eluição	Isocrática
Fluxo	1,4 mL min^{-1}
Temperatura	25 °C
Detecção	214 nm
Volume de injeção	20 µL
Tempo de corrida	20 min
Diluente	Fase móvel
Filtração	Membrana de PTFE, 0,22 µm

Fonte: elaborada pela autora (2026).

Essas condições correspondem ao protocolo experimental empregado para a análise da amigdalina nas nanocápsulas.

4.4.2 Preparo da fase móvel

A fase móvel foi preparada diariamente pela mistura de água ultrapura e acetonitrila grau HPLC na proporção de 25:75 (v/v). Para o preparo de 100 mL, foram misturados 25 mL de água ultrapura e 75 mL de acetonitrila. Para volumes maiores, as proporções foram mantidas; por exemplo, para 1.000 mL foram utilizados 250 mL de água ultrapura e 750 mL de acetonitrila.

Após o preparo, a fase móvel foi homogeneizada, filtrada em membrana compatível com solventes orgânicos e desgaseificada em banho de ultrassom por aproximadamente 10 minutos. Antes das análises, o sistema cromatográfico e a coluna foram condicionados com a fase móvel até a obtenção de pressão e linha de base estáveis.

4.4.3 Preparo da solução estoque de amigdalina

A solução estoque de amigdalina foi preparada na concentração nominal de 100 µg/mL. Para isso, 10,0 mg do padrão foram transferidos quantitativamente para balão volumétrico de 100 mL e dissolvidos em aproximadamente 70 mL de fase móvel. A solução

foi homogeneizada e, quando necessário, submetida a banho de ultrassom até completa dissolução; em seguida, o volume foi completado com a fase móvel.

Quando aplicável, a massa do padrão foi corrigida de acordo com a pureza declarada no certificado de análise, conforme a relação apresentada a seguir:

$$m_{corrigida} = \frac{10{,}0\ mg}{pureza\ em\ forma\ decimal}$$

A solução estoque foi acondicionada em frasco âmbar e mantida protegida da luz até o momento da análise.

4.4.4 Preparo das soluções padrão e curva analítica

A faixa inicialmente investigada para a análise da amigdalina foi de 6 a 90 µg/mL, com sete níveis de concentração: 6, 7, 9, 40, 50, 70 e 90 µg/mL.

Cada padrão foi preparado independentemente, em balão volumétrico de 10 mL, a partir da solução estoque de 100 µg mL^{-1}, conforme a equação de diluição: $C_1V_1 = C_2V_2$

Tabela 1 – Volumes da solução estoque de amigdalina a 100 µg mL^{-1} utilizados no preparo das soluções padrão, com volume final de 10 mL.

Concentração final	**Volume da solução estoque de 100 µg mL^{-1}**	**Volume final**
6 µg mL^{-1}	0,60 mL	10 mL
7 µg mL^{-1}	0,70 mL	10 mL
9 µg mL^{-1}	0,90 mL	10 mL
40 µg mL^{-1}	4,00 mL	10 mL
50 µg mL^{-1}	5,00 mL	10 mL
70 µg mL^{-1}	7,00 mL	10 mL
90 µg mL^{-1}	9,00 mL	10 mL

Fonte: elaborada pela autora (2026).

Após a transferência da solução estoque, os balões foram completados com a fase móvel. Foram preparadas três soluções independentes para cada nível de concentração, totalizando 21 determinações.

Antes da injeção, as soluções foram homogeneizadas e filtradas em membrana de PTFE de 0,22 µm.

4.4.5 Preparo das amostras de nanocápsulas

As suspensões de nanocápsulas foram homogeneizadas, e uma alíquota de 1,0 mL de cada formulação foi transferida para tubo de centrifugação. As amostras foram centrifugadas a 15.000 rpm por 50 minutos, a 10 °C, para separar a fração particulada da fase aquosa contendo a amigdalina livre.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi cuidadosamente coletado, evitando-se o contato com o material sedimentado. A fração sobrenadante foi utilizada para determinação indireta da eficiência de encapsulação.

As diluições foram realizadas com a fase móvel, de acordo com a concentração nominal de cada formulação:
0,01 %: sem diluição; 1 %: diluição 1:10; 10 %: diluição 1:100.

Quadro 2 – Diluições aplicadas às formulações de nanocápsulas de PCL para a análise cromatográfica da amigdalina.

Formulação	**Diluição para análise**
Nanocápsulas sem amigdalina	Sem diluição; branco da matriz
Formulação com 0,01%	Sem diluição
Formulação com 1%	1:10
Formulação com 10%	1:100

Fonte: elaborada pela autora (2026).

Para a diluição 1:10, 1,0 mL do sobrenadante foi transferido para balão volumétrico de 10 mL, e o volume foi completado com fase móvel. Para a diluição 1:100, 100 µL do sobrenadante foram transferidos para balão volumétrico de 10 mL, e o volume foi completado com fase móvel.

Após a diluição, as soluções foram filtradas em membrana de PTFE de 0,22 µm e transferidas para frascos de HPLC. Todas as formulações foram analisadas em triplicata.

4.4.6 Quantificação da amigdalina livre

A concentração cromatográfica de amigdalina foi calculada a partir da equação da curva analítica:

$$C_{HPLC} = \frac{A - b}{a}$$

em que:

- C_{HPLC} é a concentração determinada na solução injetada, em µg mL^{-1};
- (A) é a área integrada do pico;
- (a) é o coeficiente angular;
- (b) é o intercepto da curva.

A concentração de amigdalina livre presente na amostra original foi calculada considerando-se o fator de diluição:

$$C_{livre} = C_{HPLC} \times FD$$

4.4.7 Eficiência de encapsulação

A concentração teórica total de amigdalina em cada formulação foi calculada de acordo com a massa adicionada e o volume final recuperado:

$C_{teórica} = m_{adicionada} \times 10^6 / V_{formulação}$

Em que a massa foi expressa em gramas, o volume em mililitros e a concentração em µg mL^{-1}.

A eficiência de encapsulação foi calculada pelo método indireto, utilizando-se a concentração de amigdalina livre no sobrenadante:

$$EE(\%) = \left(\frac{C_{teórica} - C_{livre}}{C_{teórica}}\right) \times 100$$

4.4.8 Seletividade

A seletividade foi avaliada pela comparação dos cromatogramas obtidos para:

1. fase móvel;
2. padrão de amigdalina;
3. sobrenadante da formulação sem amigdalina;
4. sobrenadante das formulações contendo amigdalina;
5. branco da matriz fortificado com amigdalina.

O método foi considerado seletivo quando não foram observados picos interferentes no tempo de retenção da amigdalina. A pureza espectral do pico também foi avaliada por meio do detector DAD.

4.4.9 Linearidade e faixa de trabalho

A linearidade foi investigada por meio de três curvas analíticas independentes, preparadas a partir da solução estoque de amigdalina de 100 µg/mL. Inicialmente, foram avaliados sete níveis de concentração: 6, 7, 9, 40, 50, 70 e 90 µg/mL. Cada solução foi preparada independentemente em balão volumétrico, utilizando-se a fase móvel como diluente, e submetida às condições cromatográficas descritas anteriormente.

As áreas dos picos cromatográficos foram utilizadas como variável dependente, enquanto as concentrações nominais de amigdalina foram empregadas como variável independente. A regressão linear foi realizada pelo método dos mínimos quadrados, sendo determinados, para cada curva, a equação da reta, o coeficiente angular, o intercepto, o coeficiente de correlação de Pearson e o coeficiente de determinação.

Foram adotados como critérios de aceitação:

- coeficiente de correlação de Pearson igual ou superior a 0,990;
- coeficiente angular significativamente diferente de zero;
- ausência de tendência sistemática na distribuição dos resíduos;
- adequação da resposta analítica ao longo da faixa de 6 a 90 µg/mL.

4.4.10 Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram estimados a partir dos dados obtidos nas três curvas analíticas independentes, considerando-se a relação entre o desvio-padrão dos interceptos e a média dos coeficientes angulares.

Os cálculos foram realizados conforme as seguintes equações:

$$LD = \frac{3{,}3 \times \sigma}{S}$$

$$LQ = \frac{10 \times \sigma}{S}$$

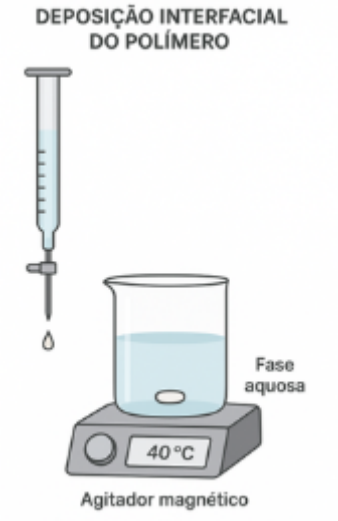
Em que σ corresponde ao desvio-padrão dos interceptos das três curvas analíticas e S representa a média dos respectivos coeficientes angulares.

4.5 OBTENÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS CONTENDO AMIGDALINA

As suspensões de nanocápsulas de PCL contendo amigdalina foram preparadas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado, também denominado nanoprecipitação (Mora-Huertas; Fessi; Elaissari, 2010). A composição das formulações é apresentada na Tabela 4.

Na fase orgânica, a PCL foi solubilizada em acetona na presença de Span® 80, triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico e amigdalina. A fase aquosa foi preparada pela dispersão de Tween® 80 em água destilada sob agitação magnética. A fase orgânica foi mantida sob agitação por 5 minutos a 40 °C e adicionada lentamente à fase aquosa, à velocidade aproximada de uma gota por segundo (Figura 5). Ao final da adição, a suspensão permaneceu sob agitação vigorosa por 40 minutos. O solvente orgânico foi removido em evaporador rotatório (Figura 6), e o volume final recuperado de cada formulação foi registrado. Foram obtidas formulações contendo 0,01% , 1% e 10% de amigdalina, além de uma formulação branca, todas preparadas em triplicata (Tabela 2).

Figura 5 – Deposição interfacial do polímero pré-formado.



Fonte: A autora (2025).

Figura 6 – Remoção do solvente orgânico em evaporador rotativo.



Fonte: A autora (2025).

Tabela 2 – Composição das nanocápsulas poliméricas contendo amigdalina obtidas por deposição interfacial do polímero pré-formado.

	Formulação			
Composição	**0,01%**	**1%**	**10%**	**Branco**
	Fase Aquosa			
Tween® 80	0,77 g	0,77 g	0,77 g	0,77 g
Água destilada	57 mL	57 mL	57 mL	57 mL
	Fase orgânica			
PCL	0,1 g	0,1 g	0,1 g	0,1 g
Acetona	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL
Amigdalina	0,001g	0,1g	1g	–
Triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico	0,3 g	0,3 g	0,3 g	0,3 g
Span® 80	0,07 g	0,07 g	0,07 g	0,07 g

Fonte: A autora (2026).

4.6 CARACTERIZAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO AMIGDALINA

4.6.1 Caracterização Físico-Química

O diâmetro hidrodinâmico e o índice de polidispersidade (IPD) foram determinados por espalhamento dinâmico de luz (DLS), e o potencial zeta foi obtido por mobilidade eletroforética em equipamento Zetasizer® Nano ZS90 (Malvern Instruments, Reino Unido), com ângulo de detecção de 90° e temperatura de 25 °C. Para essas análises, as suspensões foram diluídas em água na proporção de 1:500 (v/v). O pH foi determinado diretamente nas formulações utilizando pHmetro previamente calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0.

4.6.2 Caracterização Morfológica

4.6.2.1 Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo

A avaliação morfológica e superficial foi realizada em microscópio eletrônico de varredura com emissão de campo (TESCAN, modelo Mira 3, Brno, República Tcheca). As amostras foram depositadas sobre suporte sólido, secas e metalizadas com ouro em metalizador IC-50 Ion Coater (SHIMADZU, Quioto, Japão). As micrografias foram obtidas com voltagem de aceleração entre 7 e 10 kV, utilizando-se o software TESCAN Essence™.

4.6.3 Análise Estrutural

4.6.3.1 Análise por Difração de Raios X (DRX)

As amostras foram analisadas em difratômetro de raios X Shimadzu XRD-6000, com velocidade de varredura de 2°/min, intervalo de 2θ entre 4° e 80°, radiação Cu Kα (λ = 1,5418 Å), corrente de 40 mA e tensão de 40 kV. Para a análise, as nanossuspensões foram depositadas sobre lamínulas e secas à temperatura ambiente até a formação de uma camada contínua.

4.6.3.2 Avaliação por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

As formulações foram analisadas por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), utilizando-se amostras liofilizadas dispersas em brometo de potássio (KBr) grau espectroscópico na proporção de 2% (m/m). Os espectros foram obtidos em equipamento IR Prestige-21 (SHIMADZU, Quioto, Japão), na faixa de 4.000 a 400 cm^{-1},

com resolução de 4 cm^{-1} e 128 varreduras. Os perfis foram comparados aos espectros da amigdalina, da PCL, da mistura física e da formulação branca. A intensidade relativa das bandas foi calculada pela equação apresentada a seguir:

$$I = \frac{A_o}{A}$$

Em que I corresponde à intensidade relativa, A_0 à área da banda analisada e A à área da banda de referência.

4.6.3.3 Avaliação por Espectroscopia Raman

As análises por espectroscopia Raman foram realizadas com laser de excitação de 532 nm, na faixa espectral de 50 a 2200 cm^{-1}. Foram avaliadas a PCL, a amigdalina, a mistura física e as formulações branca e contendo 0,01%, 1% e 10% de amigdalina. Para o estudo temporal, as formulações foram analisadas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120 de armazenamento. As nanossuspensões foram depositadas sobre lâminas e secas à temperatura ambiente antes da aquisição dos espectros. Os dados foram submetidos à correção de linha de base, suavização e normalização, e a interpretação foi conduzida qualitativamente, considerando a presença, o deslocamento e a sobreposição das bandas. Em razão das etapas de processamento e das diferenças de escala de intensidade, as alturas dos picos não foram utilizadas para comparação quantitativa entre os tempos.

4.7 AVALIAÇÃO DO ESTUDO DE ESTABILIDADE

As formulações branca e contendo 0,01%, 1% e 10% de amigdalina foram armazenadas sob refrigeração, protegidas da luz, durante 120 dias. As avaliações foram realizadas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120 e incluíram pH, diâmetro hidrodinâmico, IPD e potencial zeta. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Os resultados foram expressos como média ± desvio-padrão (n = 3). Para o pH, o efeito do tempo foi avaliado separadamente em cada formulação por análise de variância de uma via (ANOVA), seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey, adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Os resultados de diâmetro hidrodinâmico, IPD e potencial zeta

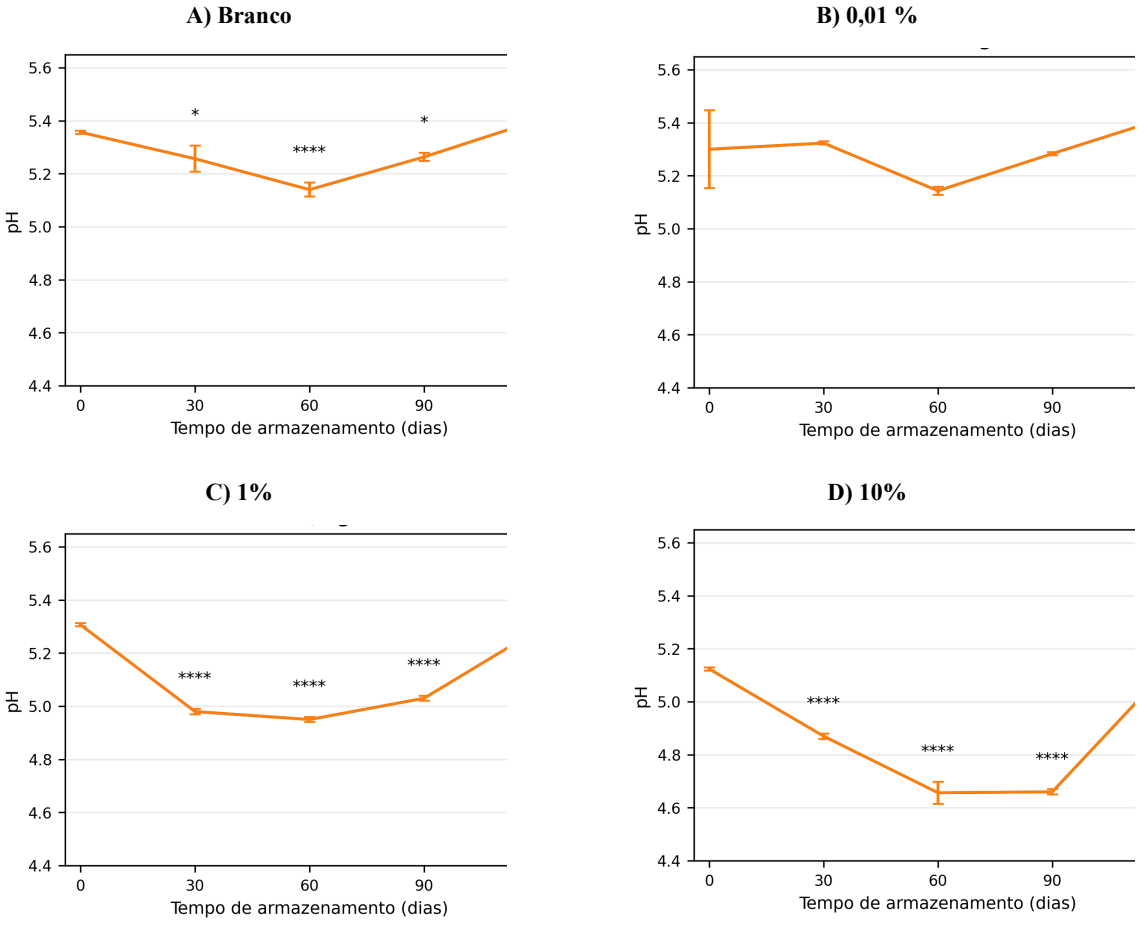
foram apresentados de forma descritiva. As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism® versão 5.04 (GraphPad Software, San Diego, Estados Unidos).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO DO PH

A evolução do pH das formulações durante os 120 dias de armazenamento é apresentada na Figura 7 e nas Tabelas 3 e 4. Os resultados correspondem à média de três determinações para cada amostra e foram analisados separadamente para cada formulação por análise de variância de uma via (ANOVA), seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey, com nível de significância de 5%.

Figura 7 – Variação do pH das formulações durante 120 dias de armazenamento. Os resultados são apresentados como média ± desvio-padrão (n = 3). As diferenças entre os tempos foram avaliadas por ANOVA de uma via, seguida do teste de Tukey. Os asteriscos indicam diferença significativa em relação ao dia 0: *p < 0,05 e ****p < 0,0001.



Fonte: A autora (2026).

Tabela 3 – Valores de pH das formulações durante 120 dias de armazenamento.

Tempo (dias)	Branco	0,01%	1%	10%
0	5,36 ± 0,01	5,30 ± 0,15	5,31 ± 0,01	5,12 ± 0,01
30	5,26 ± 0,05*	5,32 ± 0,01	4,98 ± 0,01****	4,87 ± 0,01****
60	5,14 ± 0,03****	5,14 ± 0,02	4,95 ± 0,01****	4,66 ± 0,04****
90	5,26 ± 0,02*	5,28 ± 0,01	5,03 ± 0,01****	4,66 ± 0,01****
120	5,40 ± 0,04	5,42 ± 0,05	5,29 ± 0,01	5,12 ± 0,05

Nota: resultados expressos como média ± desvio-padrão (n = 3). *p < 0,05 e ****p < 0,0001 em comparação ao respectivo dia 0, pela ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey.

Tabela 4 – Efeito do tempo de armazenamento sobre o pH das formulações.

Formulação	F(4,10)	p	Resultado
Branco	33,53	< 0,0001	Significativo
0,01%	6,01	0,0099	Significativo
1%	1038,19	< 0,0001	Significativo
10%	169,15	< 0,0001	Significativo

Nota: ANOVA de uma via realizada separadamente para cada formulação, considerando o tempo como fator independente. Nível de significância de 5%.

A ANOVA indicou efeito significativo do tempo sobre o pH de todas as formulações. Nas comparações com o dia 0, o branco apresentou redução significativa nos dias 30, 60 e 90; as formulações contendo 1% e 10% também apresentaram valores significativamente menores nesses três períodos. Para a formulação com 0,01%, embora a ANOVA global tenha sido significativa, não foram identificadas diferenças em relação ao dia 0 nas comparações apresentadas na Tabela 5, indicando que o efeito global pode estar relacionado a diferenças entre outros tempos de armazenamento.

O padrão observado foi não monotônico: as reduções ocorreram principalmente entre os dias 30 e 90, enquanto, aos 120 dias, os valores se aproximaram dos resultados iniciais e não diferiram significativamente do dia 0. Esse comportamento não sustenta uma acidificação progressiva detectável por pH. Entretanto, a recuperação dos valores ao final do estudo não permite, isoladamente, excluir processos de degradação ou outras alterações químicas, devendo o pH ser interpretado em conjunto com os demais parâmetros de estabilidade.

5.2 DIÂMETRO HIDRODINÂMICO, ÍNDICE DE POLIDISPERSIDADE E POTENCIAL ZETA

Os resultados de diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersidade (IPD) e potencial zeta são apresentados na Tabela 5. Todas as formulações mantiveram diâmetro médio na escala nanométrica ao longo do período avaliado. Entre os dias 0 e 120, observou-se aumento do diâmetro médio em todas as formulações, variando aproximadamente de 13% a 17%. Embora esse aumento não tenha ocorrido de maneira estritamente linear, os maiores valores foram registrados ao final do estudo.

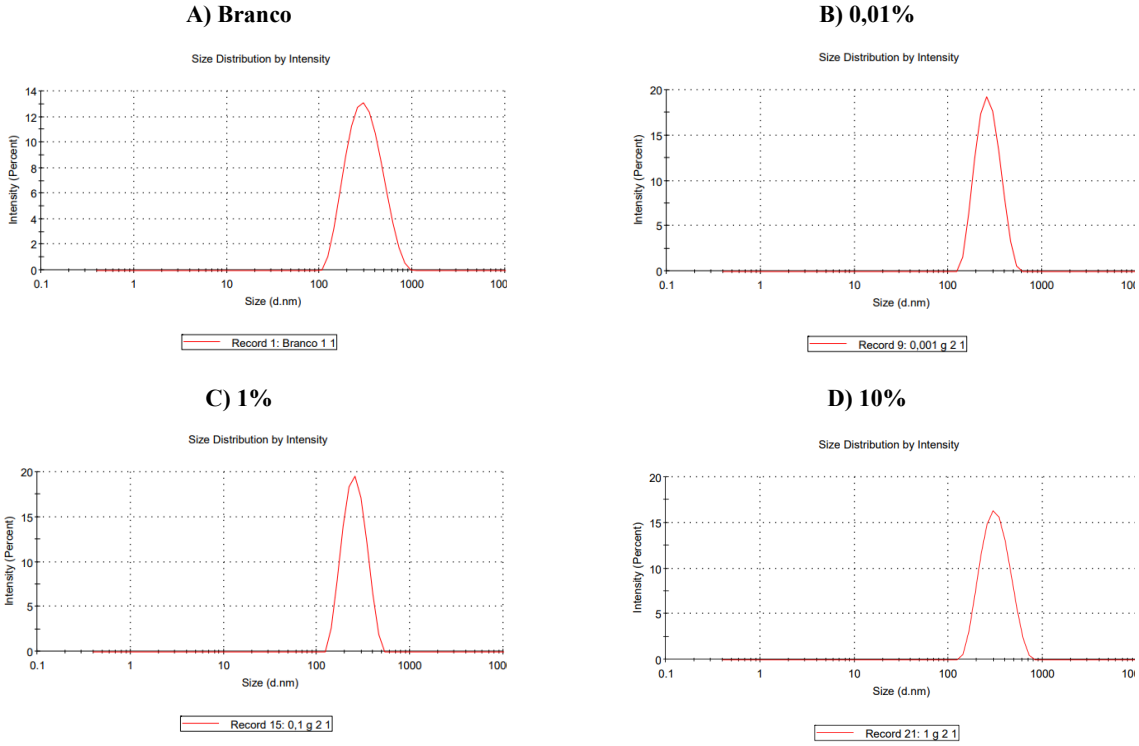
Tabela 5 – Diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersidade e potencial zeta das formulações durante 120 dias de armazenamento.

Tempo (dias)	Formulação	n	Diâmetro (nm)	IPD	Potencial zeta (mV)
0	Branco	3	257,1 ± 3,3	0,143 ± 0,045	−32,83 ± 1,91
0	0,01%	3	254,3 ± 3,1	0,160 ± 0,049	−31,90 ± 3,14
0	1%	3	224,7 ± 1,4	0,117 ± 0,046	−28,50 ± 5,28
0	10%	3	278,2 ± 2,5	0,148 ± 0,032	−34,10 ± 0,66
30	Branco	3	279,2 ± 13,6	0,167 ± 0,014	−29,73 ± 1,78
30	0,01%	3	270,5 ± 6,95	0,153 ± 0,050	−30,93 ± 2,40
30	1%	3	238,9 ± 2,98	0,044 ± 0,009	−29,47 ± 1,65
30	10%	3	296,0 ± 10,48	0,094 ± 0,077	−30,03 ± 0,74
60	Branco	3	267,2 ± 3,9	0,147 ± 0,036	−27,33 ± 2,15
60	0,01%	3	268,5 ± 16,8	0,180 ± 0,046	−26,27 ± 0,50
60	1%	3	245,3 ± 4,9	0,127 ± 0,046	−25,17 ± 2,24
60	10%	3	299,1 ± 4,0	0,198 ± 0,050	−28,30 ± 7,37
90	Branco	3	266,9 ± 6,6	0,280 ± 0,329	−22,03 ± 3,01
90	0,01%	3	262,4 ± 14,4	0,067 ± 0,068	−27,43 ± 1,92
90	1%	3	251,2 ± 1,8	0,037 ± 0,033	−25,07 ± 1,57
90	10%	3	300,3 ± 9,8	0,179 ± 0,042	−25,67 ± 0,64
120	Branco	3	301,7 ± 17,1	0,120 ± 0,095	−24,07 ± 2,68
120	0,01%	3	290,7 ± 13,6	0,142 ± 0,098	−27,23 ± 3,45
120	1%	3	260,0 ± 9,0	0,063 ± 0,056	−27,20 ± 2,95
120	10%	3	315,4 ± 2,9	0,080 ± 0,029	−28,57 ± 0,60

Nota: resultados expressos como média ± desvio-padrão (n = 3). IPD: índice de polidispersidade. As comparações entre tempos para diâmetro, IPD e potencial zeta são descritivas, pois não são apresentados testes inferenciais para esses parâmetros.

Os valores médios de IPD permaneceram entre 0,037 e 0,280. Na maior parte das análises, os valores foram baixos, sugerindo distribuição de tamanho relativamente estreita. Deve-se destacar, contudo, a elevada variabilidade do branco no dia 90 (0,280 ± 0,329), que indica heterogeneidade entre as réplicas nesse ponto e recomenda cautela na interpretação isolada dessa medida. Os perfis de distribuição por intensidade apresentados na Figura 8 exibem uma população predominante para cada formulação, sem evidência visual de múltiplos picos bem definidos nas curvas selecionadas.

Figura 8 – Distribuições de tamanho por intensidade das formulações: (A) branco; (B) 0,01%; (C) 1%; e (D) 10%. Os gráficos correspondem aos registros selecionados para cada formulação (dia 0).



Fonte: Complexo de Laboratórios Multiusuários – UEPG, 2026.

O potencial zeta permaneceu negativo em todas as formulações e tempos, com valores entre −22,03 e −34,10 mV. Em alguns períodos, houve redução do módulo da carga superficial, ou seja, os valores se tornaram menos negativos. Aos 120 dias, ocorreu aumento parcial do módulo em algumas formulações em relação aos períodos intermediários; ainda assim, os valores finais foram, em geral, menos negativos que os observados no dia 0. Esse resultado sugere alteração temporal da interface das partículas, mas não permite, isoladamente, concluir pela ocorrência de desestabilização. A interpretação deve considerar conjuntamente o diâmetro, o IPD e a ausência ou presença de alterações macroscópicas da dispersão.

A formulação contendo 10% apresentou os maiores diâmetros, enquanto a formulação com 1% apresentou os menores valores em todos os tempos. Como essa diferença já estava presente no dia 0 e não foi avaliada por testes inferenciais, deve ser interpretada como uma tendência descritiva, e não como efeito comprovado da concentração de amigdalina.

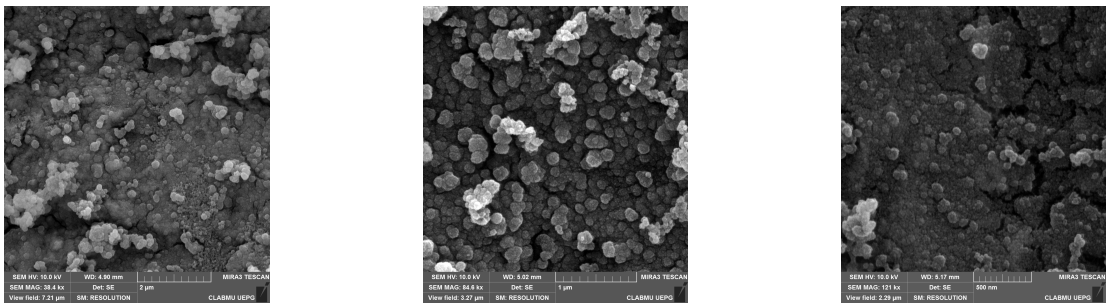
De acordo com Agrawal et al. (2014), esses dados contribuem para que as nanocápsulas poliméricas apresentem, em geral, diâmetros na faixa nanométrica. Para sistemas destinados à administração oral, o tamanho das partículas constitui um parâmetro significativo, uma vez que influencia sua interação com o muco e o epitélio gastrointestinal, sendo frequentemente investigadas formulações com dimensões inferiores a 500 nm.

5.3 MORFOLOGIA POR MEV-FEG

As micrografias obtidas por MEV-FEG mostraram estruturas particuladas com superfície irregular, contornos aproximadamente arredondados em parte dos campos e formação de aglomerados. Não foram observadas diferenças morfológicas marcantes entre as formulações nos campos analisados. A comparação, entretanto, é qualitativa, pois as imagens representam regiões específicas das amostras e, para a formulação contendo 10%, foram utilizadas ampliações diferentes.

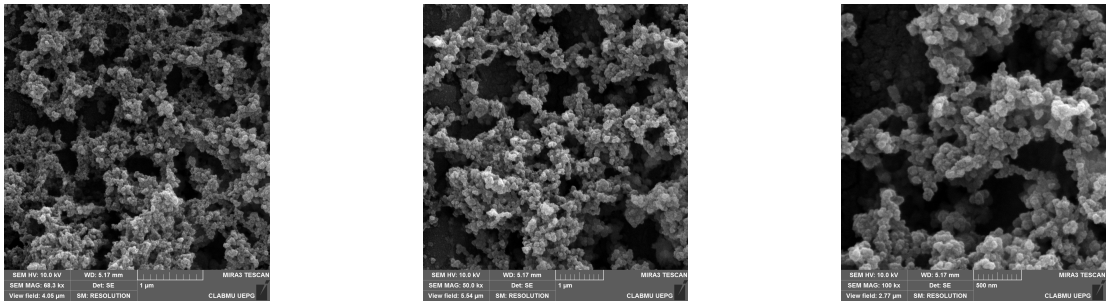
Figura 9 – Micrografias obtidas por MEV-FEG das nanocápsulas de PCL. (A) Branco; (B) 0,01%; (C–D) formulação 1% em duas regiões distintas; (E) 10%, aumento de 50.000×; e (F) 10%, aumento de 100.000×. As barras de escala correspondem às indicadas em cada micrografia.

A **B** **C**



Branco (30.000x) 0,01% (84.000x) 1% (120.000x)

D **E** **F**



1% (2ª região/68.000 x) 10% (50.000×) 10% (100.000×)

Fonte: Complexo de Laboratórios Multiusuários – UEPG, 2026.

A aglomeração visualizada nas micrografias deve ser interpretada com cautela, pois o preparo para MEV-FEG envolve deposição, secagem e alto vácuo, etapas que removem o meio dispersante e favorecem a aproximação das partículas. Assim, os agrupamentos podem decorrer parcialmente do preparo da amostra e não reproduzir a organização na dispersão líquida. A morfologia deve, portanto, ser interpretada em conjunto com o diâmetro hidrodinâmico, o IPD e o potencial zeta.

5.4 Síntese da caracterização físico-coloidal

Em conjunto, as formulações mantiveram dimensões nanométricas e não apresentaram alterações morfológicas significantes durante os 120 dias. Entretanto, foram observadas variações de pH, aumento do diâmetro médio e redução temporária do módulo do potencial zeta. Portanto, os resultados indicam manutenção global das características físico-coloidais avaliadas, mas não ausência de alterações ao longo do tempo. A presença de amigdalina, inclusive na formulação de 10%, não foi associada a perda do caráter nanométrico ou a desestabilização macroscópica nas condições estudadas.

5.5 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

Para análise da eficiência de encapsulação, o dado inicial da curva analítica utilizada na mesma sequência cromatográfica das amostras apresentou a equação:

$y = 42.728{,}36x + 498.935{,}82$, com $R^2 = 0{,}9986$.

A resposta analítica foi utilizada para a determinação da concentração de amigdalina nas amostras, considerando-se os respectivos fatores de diluição.

Com base nos volumes finais obtidos experimentalmente, as concentrações teóricas foram:

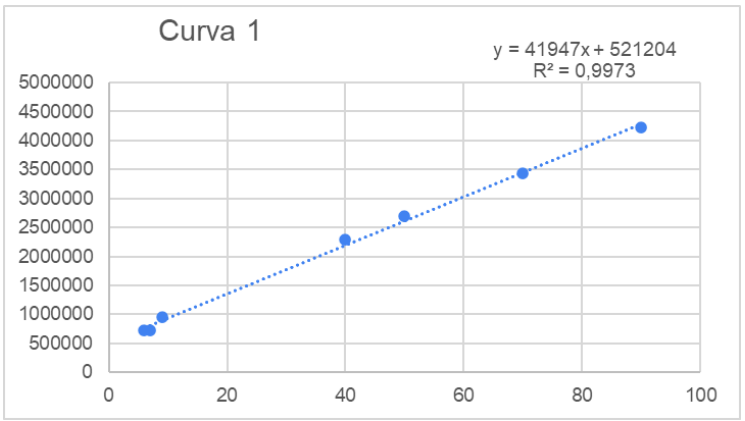
Tabela 6 – Massa de amigdalina adicionada, volume final e concentração teórica das formulações.

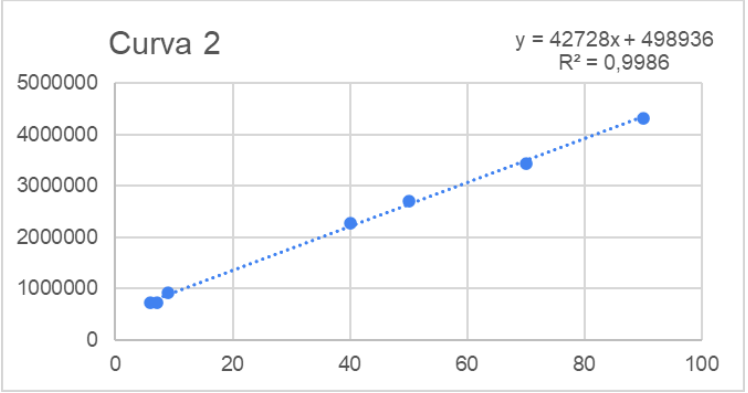
Formulação	Massa adicionada	Volume final	Concentração teórica
0,01%	1 mg	50,90 mL	19,65 µg mL^{-1}
1%	100 mg	47,12 mL	2.122,24 µg mL^{-1}
10%	1.000 mg	49,60 mL	20.161,29 µg mL^{-1}

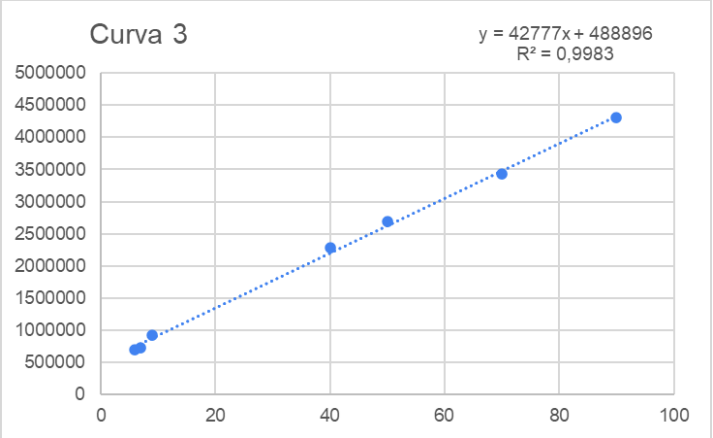
Fonte: elaborada pela autora (2026).

Após a estimativa do limite de quantificação, a faixa quantitativa foi estabelecida entre 6 e 90 µg/mL, considerando o LQ calculado. Assim, a avaliação final da linearidade necessária para análise considerou sete níveis de concentração — 6, 7, 9, 40, 50, 70 e 90 µg/mL — em três curvas analíticas independentes (figura 10).

Figura 10: Gráficos de dispersão representando a curva analítica para resultado da linearidade da média das amostras nas concentrações de 6, 7, 9, 40, 50, 70 e 90 µg/mL de amigdalina, no comprimento de onda definido (214 nm).







Fonte: A autora (2026).

Os limites de detecção e quantificação foram estimados, considerando-se a relação entre o desvio-padrão dos interceptos e a média dos coeficientes angulares. Dessa forma, foram considerados os seguintes coeficientes:

Tabela 7 – Valores de inclinação e intercepto obtidos para as três curvas analíticas de calibração da amigdalina.

Curva	Inclinação	Intercepto
1	40.276,0837	635.653,8632
2	41.527,1052	581.199,5514
3	41.507,6379	575.766,3591

Fonte: elaborada pela autora (2026).

A média dos coeficientes angulares foi de 41.103,6089, enquanto o desvio-padrão dos interceptos foi de 33.119,2411. A aplicação desses valores nas equações resultou em:

$$LD = 2,66\ \mu g/mL$$
$$LQ = 8,06\ \mu g/mL$$

A eficiência de encapsulação da amigdalina foi estimada pelo método indireto, a partir da quantificação da fração livre presente no sobrenadante após a centrifugação das nanossuspensões. Para cada formulação, foi centrifugada uma alíquota de 1,0 mL. A massa de amigdalina livre foi calculada considerando-se a concentração determinada por HPLC-DAD, o fator de diluição e o volume de sobrenadante recuperado.

A massa teórica de amigdalina presente na alíquota foi obtida pela multiplicação da concentração teórica da formulação pelo volume centrifugado:

$$m_{teórica,\,alíquota} = C_{teórica} \times V_{alíquota}$$

A massa livre presente no sobrenadante foi calculada por:

$$m_{livre} = C_{HPLC} \times FD \times V_{sobrenadante}$$

A eficiência de encapsulação foi então determinada pela relação:

$$EE(\%) = \left(\frac{m_{teórica,\,alíquota} - m_{livre}}{m_{teórica,\,alíquota}}\right) \times 100$$

Como a alíquota centrifugada e o sobrenadante recuperado apresentaram volume de 1,0 mL, os valores numéricos das massas, em µg, foram equivalentes às respectivas concentrações, em µg/mL. O volume final total de cada formulação foi utilizado apenas para calcular a concentração teórica de amigdalina na nanossuspensão; para o cálculo da EE%, foram consideradas as massas teórica e livre correspondentes à alíquota efetivamente centrifugada.

5.5.1 Aplicabilidade do método às diferentes formulações

A faixa quantitativa estabelecida, de 6 a 90 µg/mL, não abrangeu adequadamente todas as formulações. O método apresentou limite de detecção de 2,66 µg/mL e limite de quantificação de 8,06 µg/mL.

Na formulação contendo 0,01% de amigdalina, as concentrações calculadas na solução injetada foram de −3,08, 0,19 e −1,11 µg/mL. Esses valores ficaram abaixo do LD e do LQ, indicando que a resposta cromatográfica não pôde ser diferenciada ou quantificada de maneira confiável em relação ao sinal de fundo e ao intercepto da curva analítica. As concentrações negativas não representam ausência física de amigdalina, mas resultam da aplicação da equação da regressão a áreas inferiores ou muito próximas ao intercepto.

Para a formulação contendo 0,01% de amigdalina, as respostas cromatográficas ficaram abaixo do LD e do LQ. Consequentemente, os valores de EE calculados, que variaram de 99,06% a 115,70%, não devem ser considerados quantitativamente válidos. Valores superiores a 100% refletem a elevada incerteza decorrente de respostas abaixo da capacidade quantitativa do método. Assim, o resultado deve ser apresentado como concentração de amigdalina livre inferior aos limites analíticos e eficiência de encapsulação não determinada quantitativamente.

Na formulação contendo 1% de amigdalina, as concentrações obtidas nas soluções injetadas variaram de 40,81 a 44,04 µg/mL, permanecendo dentro da faixa quantitativa de 6 a 90 µg/mL. Após a aplicação do fator de diluição 1:10, a concentração média de amigdalina

livre foi de 423,09 ± 16,60 µg/mL. A eficiência de encapsulação foi de 80,06 ± 0,78%, com coeficiente de variação de 0,98%.

Esses resultados indicam boa concordância entre as três determinações e demonstram que, entre as formulações avaliadas, a de 1% foi a única quantificada de maneira adequada dentro da faixa analítica estabelecida.

Para a formulação contendo 10% de amigdalina, mesmo após a diluição 1:100, as concentrações obtidas nas soluções injetadas variaram de 166,98 a 179,42 µg/mL. Esses valores ficaram acima do limite superior da curva analítica, estabelecido em 90 µg/mL.

A EE média inicialmente calculada para essa formulação, de 13,59%, com coeficiente de variação de 24,08%, não deve ser considerada quantitativamente confiável. A elevada variabilidade entre as réplicas reforça a inadequação do fator de diluição empregado. Para uma nova análise, a amostra deve ser submetida a maior diluição, de modo que a concentração injetada permaneça entre 6 e 90 µg/mL, preferencialmente na região intermediária da curva.

5.5.2 Síntese da aplicabilidade

Tabela 8 – Relação entre as concentrações de amigdalina nas soluções injetadas, a faixa analítica do método e a interpretação da eficiência de encapsulação das formulações.

Formulação	**Concentração na solução injetada**	**Relação com a faixa analítica**	**Interpretação da EE**
0,01%	−3,08 a 0,19 µg/mL	Abaixo do LD e do LQ	EE não quantificável
1%	40,81 a 44,04 µg/mL	Dentro da faixa de 9–90 µg/mL	80,06 ± 0,78%
10%	166,98 a 179,42 µg/mL	Acima do limite superior	EE não confiável

Fonte: elaborada pela autora (2026).

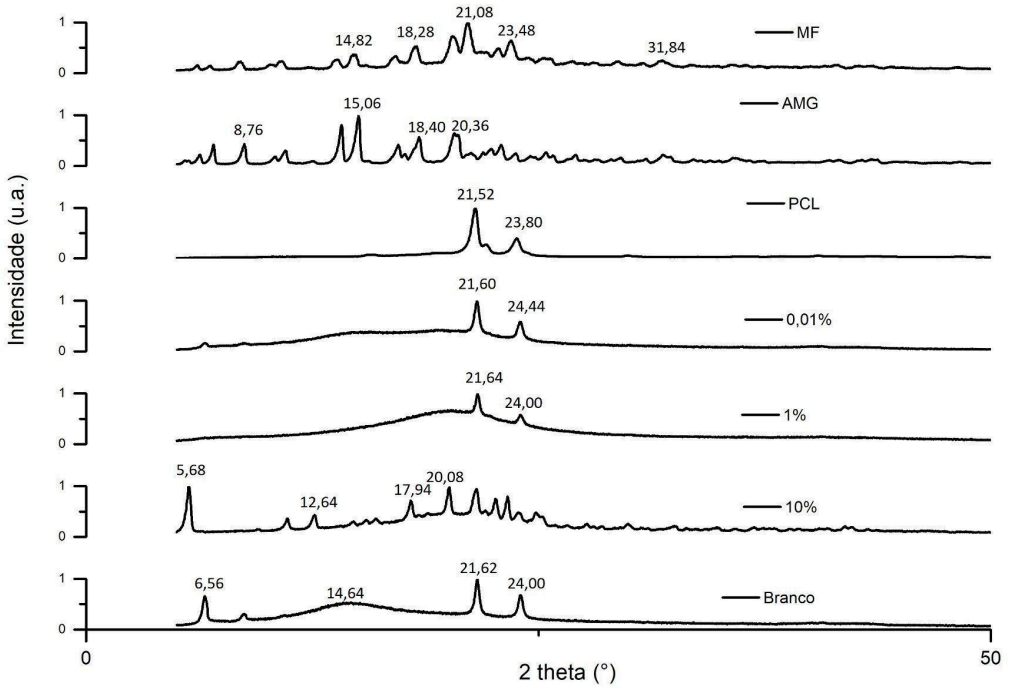
Dessa forma, o método apresentou aplicabilidade quantitativa apenas para a formulação intermediária, contendo 1% de amigdalina, para a qual foi obtida eficiência de encapsulação de 80,06 ± 0,78%. A formulação de menor concentração apresentou resposta

abaixo dos limites de detecção e quantificação, impossibilitando a determinação confiável da fração livre. A formulação de maior concentração, por sua vez, apresentou respostas acima da faixa linear e requer maior diluição. Esses achados não indicam necessariamente falha de encapsulação nas formulações extremas, mas demonstram uma limitação da faixa de aplicação do método nas condições e diluições empregadas.

5.6 ANÁLISE POR DIFRAÇÃO DE RAIOS X

A caracterização do estado sólido constitui uma etapa relevante para a compreensão das propriedades físico-químicas de materiais empregados em sistemas de liberação. Conforme o grau de ordenamento estrutural, esses materiais podem apresentar natureza cristalina, amorfa ou semicristalina. Nas fases cristalinas, átomos ou moléculas estão organizados de maneira periódica e com ordenamento de longo alcance; nas fases amorfas, não há essa periodicidade, embora possa existir organização em curtas distâncias. Assim, o grau de cristalinidade da PCL e a organização do composto encapsulado podem influenciar o comportamento do sistema nanocarreador (Christie, 2023).

Figura 11 – Difratogramas de raios X da mistura física, da amigdalina, da PCL e das nanocápsulas.



Fonte: elaborada pela autora (2026).

A PCL pura apresentou reflexões em 21,52° e 23,80° em 2θ, confirmando sua natureza semicristalina. Esses valores estão de acordo com os descritos para o polímero, que apresenta reflexões próximas de 21,4° e 23,8°, atribuídas, respectivamente, aos planos cristalográficos

(110) e (200). Perfil semelhante foi descrito em estudos com PCL pura e sistemas contendo compostos incorporados, nos quais a manutenção desses picos demonstrou a preservação de domínios cristalinos do polímero (Lyu; Lee; Han, 2019; Camargo *et al.*, 2021).

A amigdalina pura apresentou múltiplas reflexões, com picos destacados em 8,76°, 15,06°, 18,40° e 20,36° em 2θ, evidenciando uma fração cristalina detectável. A amigdalina pode formar diferentes hidratos e solvatomorfos, que apresentam padrões de difração distintos, especialmente na região de baixos ângulos. Desse modo, os picos confirmam a organização cristalina da amostra, mas não permitem identificar uma forma cristalina específica sem comparação com padrões completos e análises térmicas complementares (Zhang *et al.*, 2022).

A mistura física apresentou reflexões em 14,82°, 18,28°, 21,08°, 23,48° e 31,84° em 2θ. Os sinais em 14,82° e 18,28° ficaram próximos dos picos da amigdalina pura em 15,06° e 18,40°, enquanto as reflexões em 21,08° e 23,48° se aproximaram dos picos da PCL em 21,52° e 23,80°. O resultado demonstra que a simples mistura preservou contribuições cristalinas reconhecíveis dos dois componentes, apesar de pequenas diferenças nas posições dos máximos e da sobreposição de reflexões. O pico em 31,84° não apresentou correspondência direta com os picos selecionados da PCL ou da amigdalina e, portanto, não foi atribuído a uma fase específica (Gomes *et al.,* 2019).

A nanocápsula branca apresentou reflexões em 6,56°, 14,64°, 21,62° e 24,00° em 2θ. Os sinais em 21,62° e 24,00° ficaram próximos daqueles observados para a PCL pura, demonstrando que a organização semicristalina do polímero foi parcialmente preservada após a formação das nanocápsulas. As reflexões em 6,56° e 14,64° mostram, ainda, que sinais de baixo ângulo podem estar associados aos componentes ou à organização estrutural do próprio nanocarreador; com os dados disponíveis, sua origem não pode ser definida com segurança.

A formulação contendo 0,01% de amigdalina apresentou reflexões em 21,60° e 24,44° em 2θ. O primeiro pico praticamente coincidiu com o da nanocápsula branca e com o da PCL pura, e o segundo ocorreu na mesma região da reflexão da PCL e do branco. Como esses sinais não correspondem aos principais picos selecionados da amigdalina pura, o perfil da formulação foi determinado predominantemente pelo nanocarreador. A ausência das reflexões da amigdalina pode decorrer da quantidade reduzida do composto, da sobreposição com a matriz ou da diminuição de sua organização cristalina após o encapsulamento; entretanto, os dados não permitem afirmar amorfização completa.

A formulação contendo 1% apresentou reflexões em 21,64° e 24,00° em 2θ, praticamente coincidentes com as da nanocápsula branca. Não foram individualizadas

reflexões correspondentes aos principais picos da amigdalina. A ausência desses sinais pode indicar dispersão molecular ou organização insuficiente para produzir reflexões detectáveis, bem como concentração abaixo da capacidade de detecção da técnica. Resultados semelhantes foram descritos em sistemas de PCL contendo outros compostos, nos quais o perfil do fármaco deixou de ser individualizado, sem que isso comprovasse, isoladamente, amorfização completa (Camargo *et al.*, 2021; Gomes *et al*., 2019).

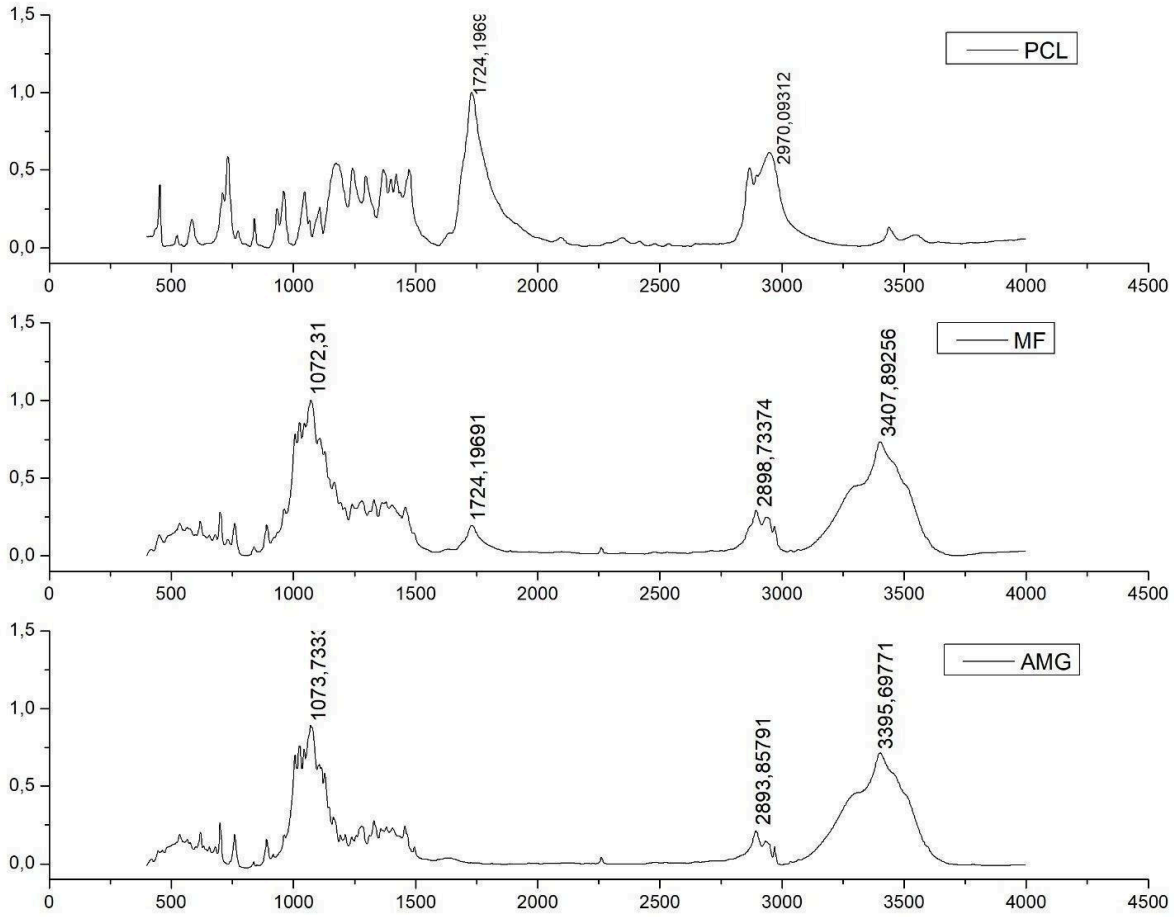
A formulação contendo 10% apresentou comportamento distinto, com reflexões em 5,68°, 12,64°, 17,94° e 20,08° em 2θ. Os picos em 17,94° e 20,08° ficaram próximos daqueles observados para a amigdalina pura em 18,40° e 20,36°, respectivamente, e não foram destacados no difratograma da formulação branca. Esses resultados são compatíveis com a manutenção de uma fração cristalina detectável da amigdalina encapsulada na formulação de maior concentração. O difratograma, contudo, não permite determinar a proporção entre as frações mais e menos ordenadas no interior do sistema. Os picos em 5,68° e 12,64° não foram atribuídos de maneira definitiva, pois a formulação branca também apresentou reflexões de baixo ângulo (Zhang *et al*., 2022).

Em conjunto, os resultados demonstraram comportamento dependente da concentração de amigdalina (figura 11). As formulações contendo 0,01% e 1% apresentaram perfis essencialmente semelhantes ao da nanocápsula branca, com predominância das reflexões semicristalinas da PCL e ausência de picos individualizados da amigdalina. Em contraste, a formulação contendo 10% apresentou reflexões próximas às da amigdalina pura, indicando que parte do composto encapsulado permaneceu em estado cristalino detectável.

5.7 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A comparação dos espectros de FTIR obtidos no início do estudo e após 120 dias de armazenamento demonstrou que as formulações mantiveram, de modo geral, o perfil vibracional característico da matriz de poli(ε-caprolactona). No dia 0, as principais bandas das nanocápsulas foram registradas nas regiões de aproximadamente 1099-1111 cm^{-1}, 1738-1742 cm^{-1} e 2920-2932 cm^{-1}. No dia 120, essas bandas permaneceram nas regiões de 1099-1111 cm^{-1}, 1741-1745 cm^{-1} e 2927-2928 cm^{-1}, respectivamente (figura 12 e 13).

Figura 12 – Espectros de FTIR da poli(ε-caprolactona) (PCL), da mistura física (MF) e da amigdalina (AMG), com indicação das principais bandas de absorção.

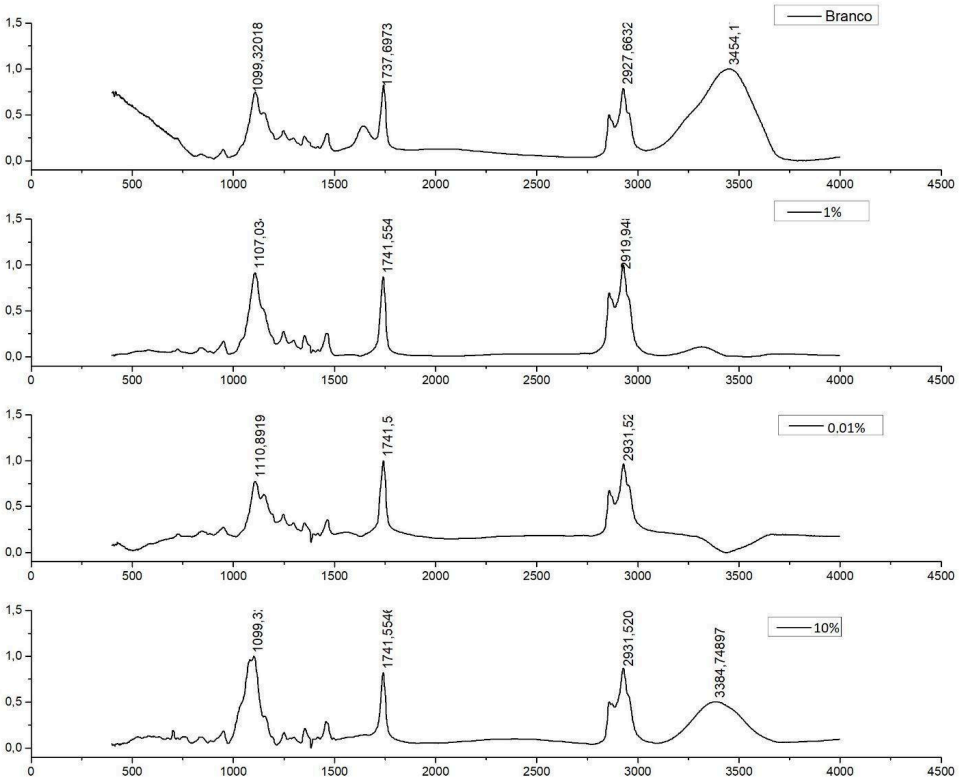


Fonte: elaborada pela autora (2026).

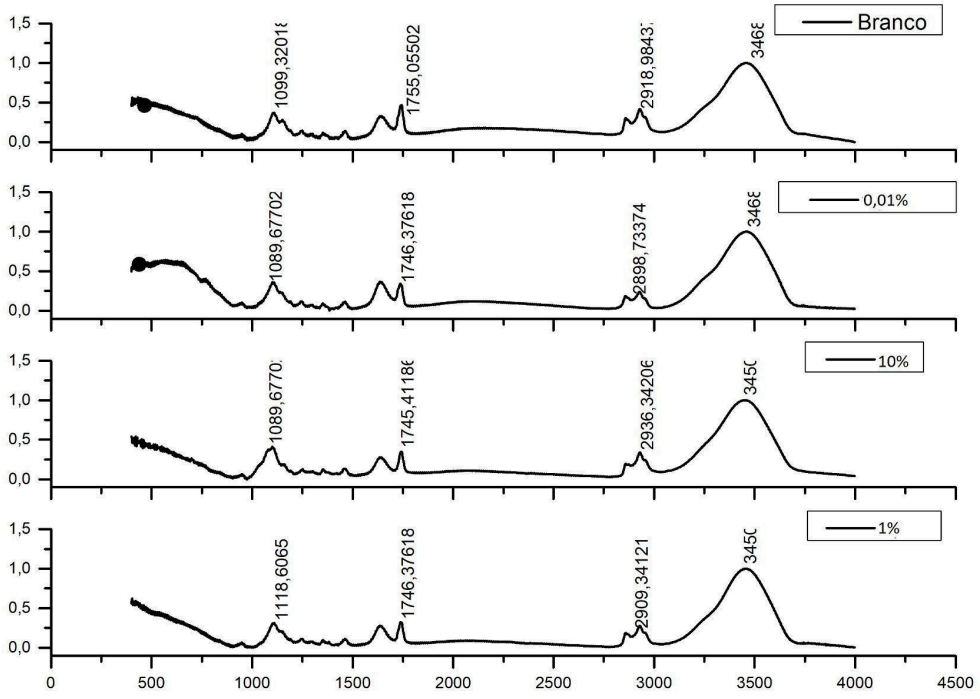
As absorções identificadas são compatíveis com os grupos funcionais característicos da PCL. A banda situada na região de aproximadamente 1720-1745 cm^{-1} é atribuída ao estiramento da carbonila C=O dos grupos éster; as bandas próximas de 2900 cm^{-1} estão relacionadas ao estiramento dos grupos metileno da cadeia alifática; e as vibrações das ligações C-O e C-O-C são normalmente identificadas entre aproximadamente 1100 e 1300 cm^{-1} (Ebrahimi *et al.,* 2022; Yaseri *et al.,* 2023; Thangavel *et al.*, 2025).

Figura 13 – Espectros de FTIR das formulações nos dias 0 (A), 60 (B) e 120 (C).

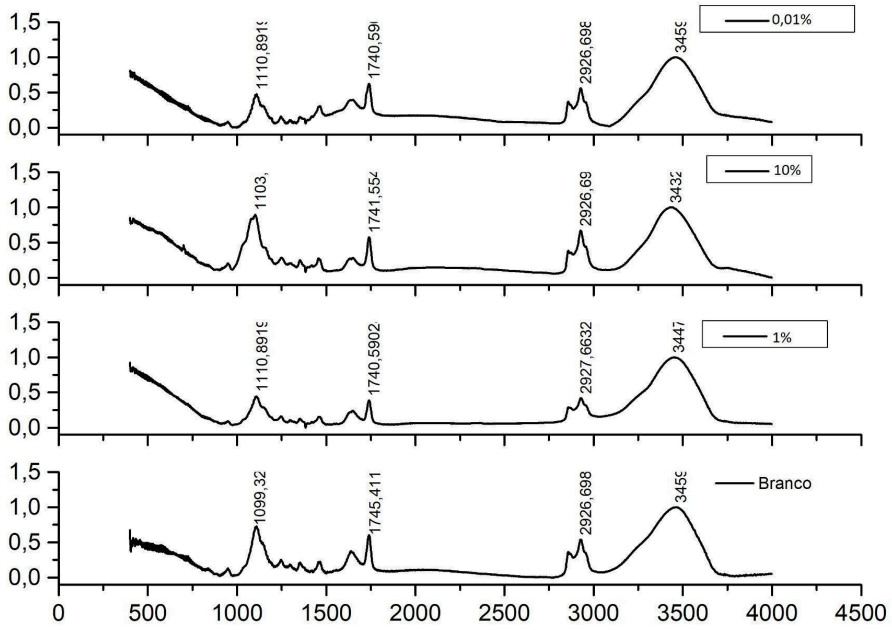
A) Dia 0



B) Dia 60



C) Dia 120



Fonte: elaborada pela autora (2026).

A conservação dessas bandas em todas as formulações indica que os principais grupos funcionais da PCL permaneceram detectáveis após 120 dias. Resultados semelhantes foram apresentados por Thangavel et al. (2025), que observaram a preservação das bandas de C=O, CH_2, C-O e C-O-C em sistemas baseados em PCL, interpretando esse comportamento como indicativo de manutenção da integridade estrutural da cadeia polimérica.

Na região de aproximadamente 1099-1111 cm^{-1}, associada às vibrações de C-O e C-O-C, o branco permaneceu praticamente inalterado, passando de 1099,32 cm^{-1} no dia 0 para 1099,3 cm^{-1} no dia 120. A formulação contendo 0,01% também permaneceu em aproximadamente 1110,9 cm^{-1}. As formulações de 1% e 10% apresentaram deslocamentos discretos, inferiores a 5 cm^{-1}.

Na região da carbonila dos grupos éster da PCL, foram observadas pequenas variações de posição entre os tempos, porém as absorções permaneceram na faixa característica do polímero. Modificações estruturais ou superficiais de baixa magnitude nem sempre produzem alterações claramente detectáveis por FTIR, especialmente quando a proporção dos grupos envolvidos é pequena em relação à matriz polimérica (Yaseri *et al.,* 2023).

Na região de estiramento dos grupos CH_2, as bandas permaneceram entre aproximadamente 2919 e 2932 cm^{-1} no dia 0 e entre 2926 e 2928 cm^{-1} no dia 120. A

manutenção dessas absorções demonstra que a porção alifática da cadeia da PCL permaneceu presente durante o armazenamento.

A maior variabilidade entre os dias 0 e 120 foi identificada na região de 3380-3460 cm^{-1}, atribuída principalmente ao estiramento O-H. No dia 0, essa banda foi destacada em 3454,1 cm^{-1} no branco e em 3384,7 cm^{-1} na formulação de 10%. No dia 120, foram registradas bandas em 3459 cm^{-1} no branco e na formulação de 0,01%, 3447 cm^{-1} na formulação de 1% e 3432 cm^{-1} na formulação de 10%. Essas diferenças podem refletir alterações na hidratação, nas ligações de hidrogênio e no preparo das amostras, não sendo suficientes, isoladamente, para demonstrar degradação química.

A amigdalina pura utilizada como referência apresentou bandas em aproximadamente 1073,73, 2893,9 e 3395,7 cm^{-1}, enquanto a mistura física apresentou bandas em 1072,31, 1724,2, 2898,73 e 3407,9 cm^{-1}. Essas regiões se sobrepõem às absorções da PCL e dos demais componentes da formulação, dificultando a identificação direta da amigdalina, principalmente nas formulações de menor concentração.

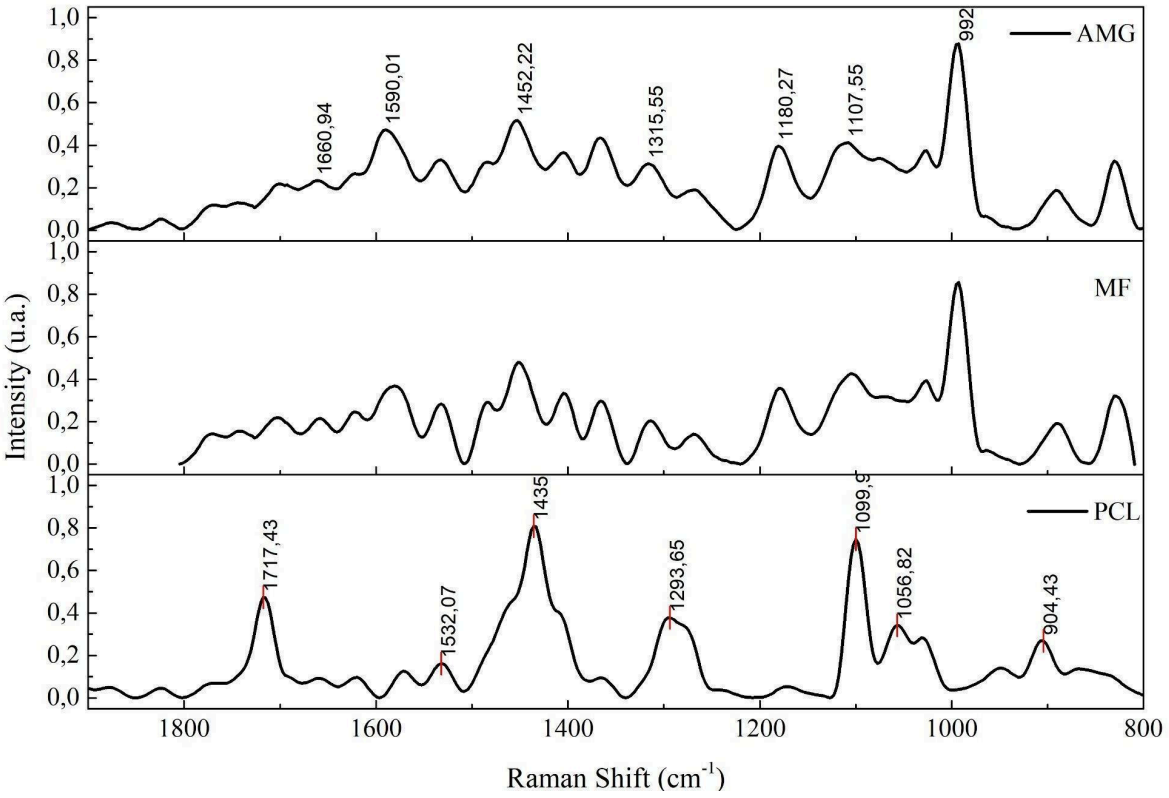
De modo geral, a conservação das principais bandas da PCL, associada à ausência de novas absorções bem definidas ou do desaparecimento dos sinais característicos, indica que não foram detectadas alterações químicas estruturais expressivas por FTIR entre os dias 0 e 120. O resultado é compatível com a manutenção do perfil químico global das nanocápsulas, mas não substitui uma análise quantitativa específica da amigdalina e de possíveis produtos de degradação.

5.8 ESPECTROSCOPIA RAMAN

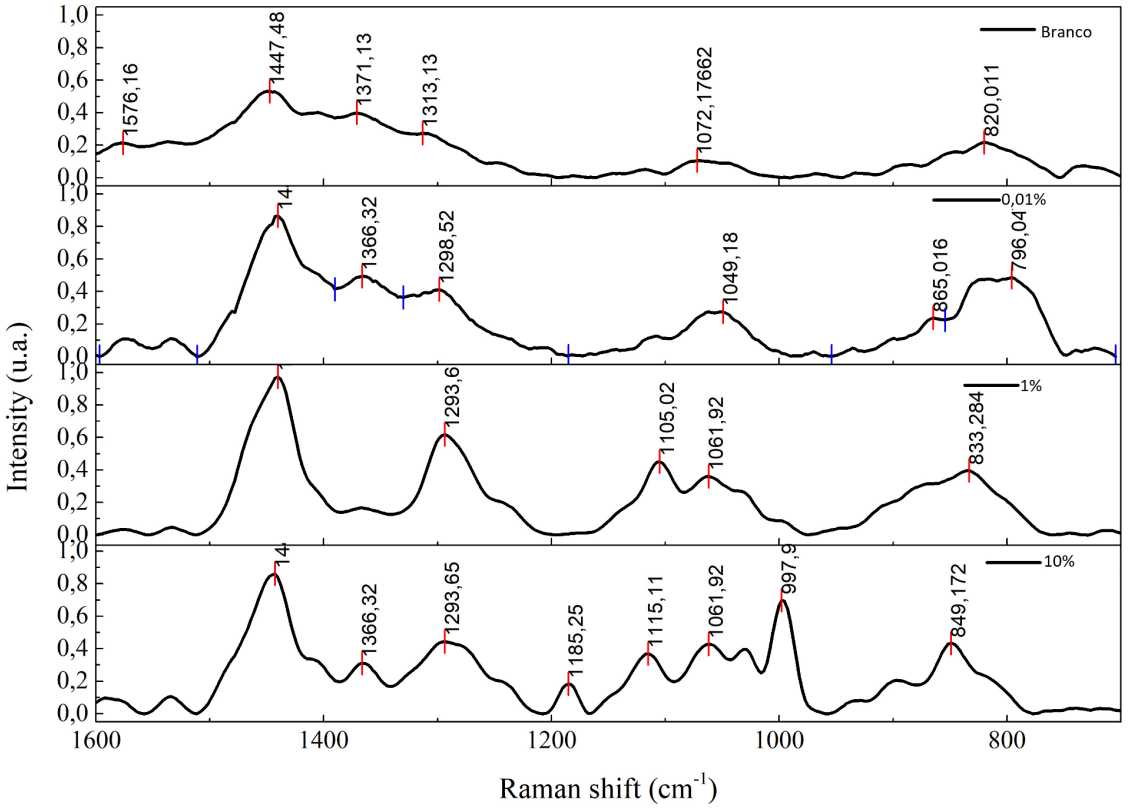
A análise dos espectros Raman permitiu acompanhar qualitativamente o perfil vibracional das nanocápsulas durante 120 dias. Foram comparadas as formulações branca e contendo 0,01%, 1% e 10% de amigdalina, além dos materiais de referência: amigdalina pura, PCL e mistura física (figura 14).

Figura 14 – Espectros Raman da amigdalina (AMG), da mistura física (MF) e da PCL (A), e das formulações nos dias 0 (B), 30 (C), 60 (D), 90 (E) e 120 (F).

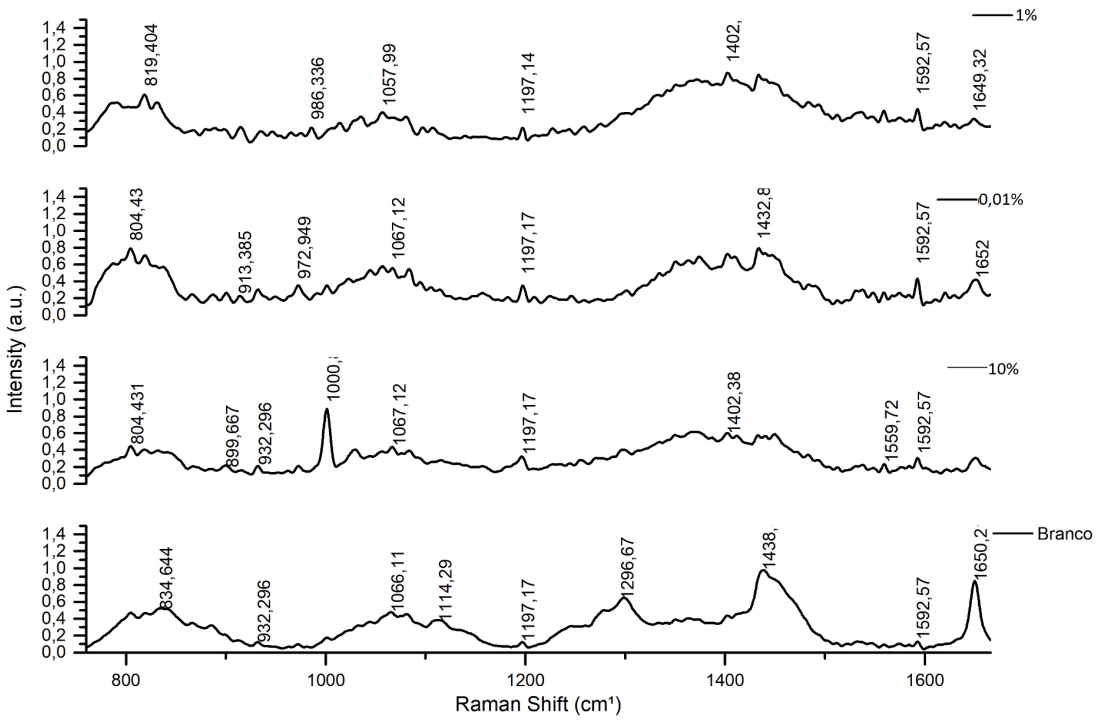
A) AMG, MF e PCL



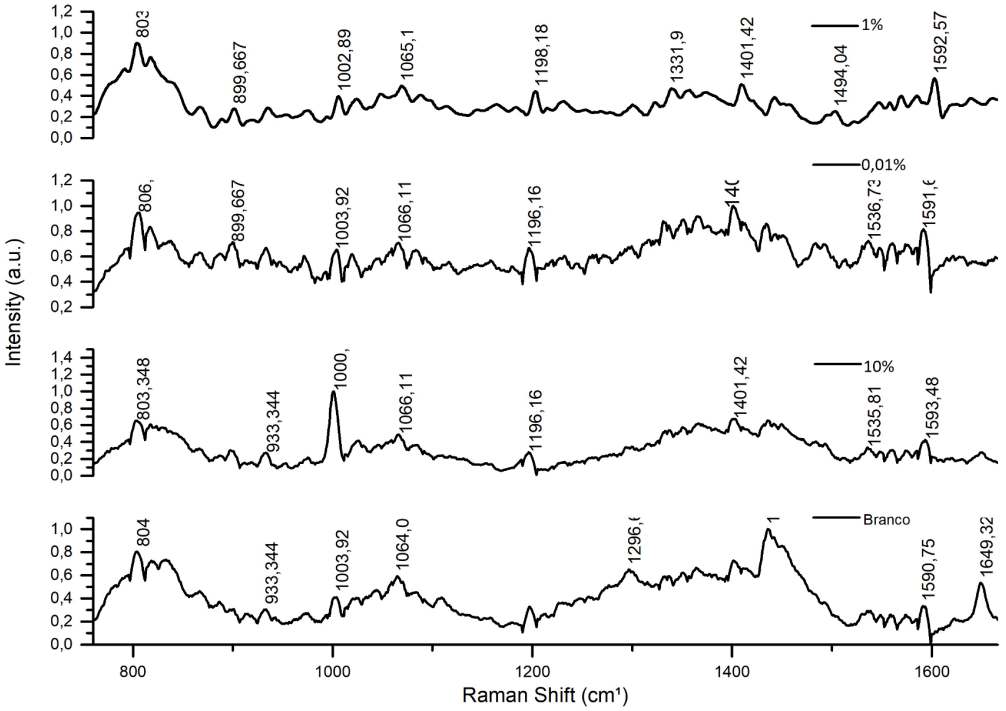
B) Dia 0



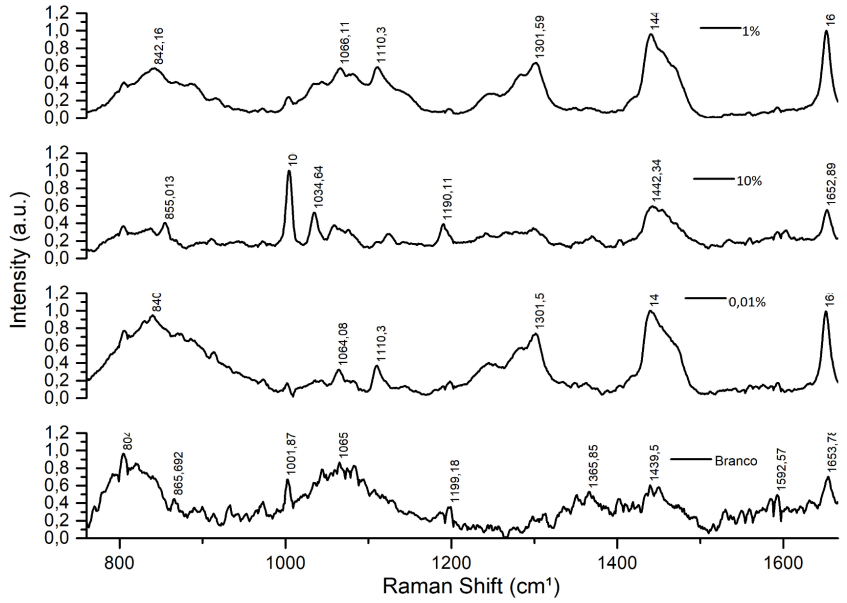
C) Dia 30



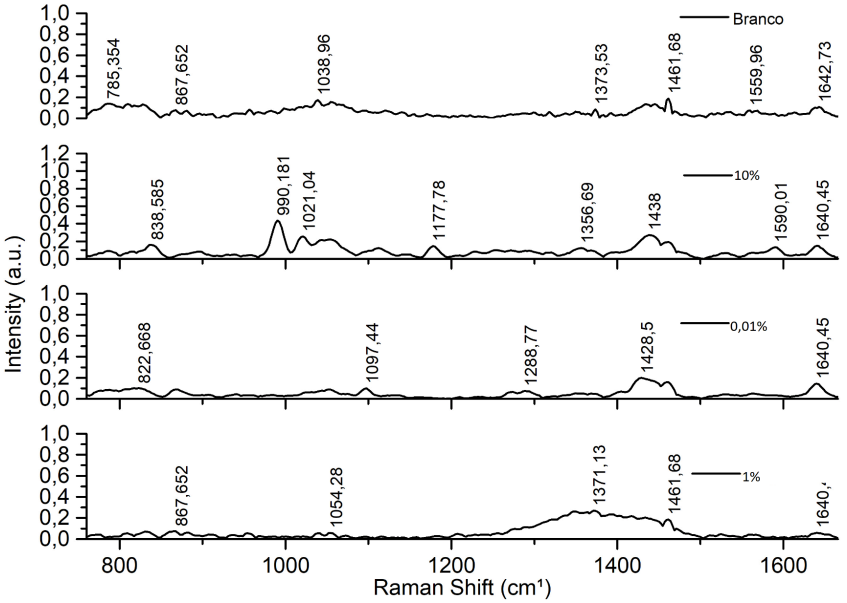
D) Dia 60



E) Dia 90



F) Dia 120



Fonte: elaborada pela autora (2026).

O espectro da PCL apresentou sinais em aproximadamente 904, 1057, 1100, 1294, 1435 e 1717 cm^{-1}. As regiões próximas de 1050-1110 cm^{-1} estão relacionadas aos modos vibracionais da cadeia envolvendo ligações C-C e C-O; as bandas em torno de 1290-1305 cm^{-1} apresentam contribuições dos movimentos de torção dos grupos metileno; a região entre aproximadamente 1415 e 1445 cm^{-1} também recebe contribuição das deformações dos grupos CH_2; e a banda próxima de 1717 cm^{-1} corresponde ao estiramento da carbonila do poliéster (Kotula; Snyder; Migler, 2017).

No espectro da amigdalina pura foram identificadas bandas em aproximadamente 992, 1108, 1180, 1316, 1452, 1590 e 1661 cm^{-1}. Algumas dessas regiões se encontram próximas às bandas da PCL e dos demais componentes, especialmente entre 1050 e 1450 cm^{-1}, o que limita sua utilização como marcadores exclusivos da amigdalina. Uma das bandas Raman mais específicas do composto está associada ao estiramento da ligação nitrila e ocorre próxima de 2245 cm^{-1} (Thygesen *et al.*, 2004; Krafft *et al.*, 2012).

Embora a aquisição tenha sido realizada até 2200 cm^{-1}, os gráficos comparativos utilizados na interpretação apresentaram predominantemente a faixa de aproximadamente 750 a 1660 cm^{-1}. Consequentemente, a região da nitrila da amigdalina não foi contemplada e a região da carbonila da PCL, próxima de 1717-1725 cm^{-1}, não foi incluída integralmente. Essa restrição diminui a capacidade de empregar esses grupos como marcadores específicos da estabilidade química.

A mistura física apresentou perfil semelhante à combinação dos sinais observados nos materiais individuais, compatível com a sobreposição dos espectros. Entretanto, a simples manutenção ou sobreposição das bandas não permite confirmar a ocorrência ou a ausência de interações moleculares entre a amigdalina e a PCL; essa interpretação requer avaliação conjunta das alterações de posição, largura e intensidade, além de técnicas complementares.

No tempo inicial, a formulação branca apresentou bandas em aproximadamente 820, 1072, 1313, 1371, 1447 e 1576 cm^{-1}. As formulações contendo 0,01% e 1% apresentaram perfis semelhantes ao branco, demonstrando que, nas menores concentrações, o espectro Raman foi predominantemente determinado pela matriz da nanocápsula. Na formulação contendo 10%, foram observadas bandas próximas de 849, 998, 1062, 1115, 1185, 1294, 1366, 1447 e 1590 cm^{-1}; os sinais próximos de 998, 1185 e 1590 cm^{-1} apresentaram correspondência com regiões observadas no padrão de amigdalina, tornando a contribuição do composto mais evidente nessa formulação.

Durante o acompanhamento da formulação contendo 0,01%, permaneceram regiões próximas de 1060-1110, 1290-1300 e 1400-1440 cm^{-1}, associadas principalmente à matriz polimérica. A baixa proporção de amigdalina e a sobreposição espectral provavelmente contribuíram para a pouca diferenciação em relação ao branco. Assim, a ausência de bandas claramente atribuíveis à amigdalina não indica necessariamente ausência ou degradação do composto, mas evidencia uma limitação de sensibilidade nas condições empregadas. A identificação de pequenas quantidades de glicosídeos cianogênicos por Raman pode exigir regiões mais específicas, como a banda da nitrila, ou técnicas de intensificação do sinal, como SERS (Thygesen *et al.*, 2004).

Na formulação contendo 1%, as regiões próximas de 1050-1110 e 1400-1440 cm^{-1} permaneceram ao longo do estudo, sendo compatíveis com a manutenção do perfil da matriz contendo PCL. Não foi identificado comportamento progressivo de desaparecimento contínuo de uma banda ou surgimento crescente de um novo sinal, e várias bandas também foram observadas no branco, impedindo sua atribuição exclusiva à amigdalina.

Na formulação contendo 10%, sinais próximos de 990-1004, 1178-1197 e 1590-1593 cm^{-1} permaneceram em diferentes períodos e apresentaram correspondência com o padrão de amigdalina. O perfil espectral associado ao composto permaneceu parcialmente reconhecível durante os 120 dias. Não foi observado o desaparecimento simultâneo dessas regiões nem o surgimento de um conjunto novo e persistente de bandas diretamente relacionado a produtos de degradação.

A permanência das bandas, entretanto, não comprova isoladamente que toda a quantidade inicial de amigdalina permaneceu inalterada. Como os gráficos foram submetidos à normalização, suavização e correção de linha de base, além de apresentarem diferentes limites de intensidade, as alturas dos picos não devem ser comparadas diretamente como medida de concentração.

A formulação branca confirmou que grande parte das regiões espectrais observadas nas formulações carregadas também estava presente na matriz sem amigdalina. Pequenas mudanças nas regiões associadas à PCL podem decorrer de reorganização física das cadeias durante o armazenamento ou da secagem sobre a lâmina, não representando obrigatoriamente degradação química. Por isso, os resultados Raman devem ser interpretados em conjunto com pH, diâmetro hidrodinâmico, IPD, potencial zeta, FTIR e quantificação cromatográfica (Camargo *et al*., 2020; Kotula; Snyder; Migler, 2017).

De modo geral, não foi observado padrão progressivo e consistente de surgimento de novas bandas ou desaparecimento das regiões características ao longo dos 120 dias. As principais regiões associadas à matriz polimérica permaneceram presentes, e a formulação contendo 10% manteve sinais compatíveis com o espectro da amigdalina pura. Para as formulações contendo 0,01% e 1%, a elevada contribuição da matriz e a sobreposição das bandas dificultaram a identificação direta do composto. Os resultados indicam estabilização geral do perfil espectral, sem evidência Raman clara de alterações químicas acentuadas; contudo, não permitem excluir toda possibilidade de degradação. Futuras análises devem incluir a região próxima de 2245 cm^{-1}, correspondente ao grupo nitrila, e empregar condições padronizadas que possibilitem comparações quantitativas ou semiquantitativas (Micklander; Brimer; Engelsen, 2002; Krafft *et al.*, 2012).

6 CONCLUSÃO

O método de deposição interfacial do polímero pré-formado permitiu obter nanocápsulas de PCL contendo diferentes concentrações de amigdalina. As formulações permaneceram na escala nanométrica durante os 120 dias de armazenamento, com baixos a moderados valores de IPD e potencial zeta negativo. Embora tenham ocorrido variações temporais de pH, diâmetro, IPD e potencial zeta, não foi identificado um padrão progressivo de perda das características físico-coloidais. O retorno do pH a valores próximos aos iniciais no dia 120 indica que as alterações intermediárias não caracterizaram acidificação contínua do sistema.

A avaliação morfológica confirmou a formação de estruturas particuladas, aproximadamente arredondadas e com superfície irregular. Os aglomerados observados nas micrografias devem ser interpretados com cautela, pois podem ter sido favorecidos pelas etapas de deposição, secagem e exposição ao alto vácuo. Assim, as imagens de MEV-FEG complementaram os dados obtidos em suspensão, mas não demonstraram, isoladamente, instabilidade coloidal.

As análises estruturais evidenciaram a preservação da contribuição semicristalina da PCL nas nanocápsulas. No DRX, as formulações contendo 0,01% e 1% apresentaram perfis predominantemente associados à matriz polimérica, enquanto a formulação contendo 10% manteve reflexões próximas às da amigdalina pura, indicando a presença de uma fração cristalina detectável do composto encapsulado. Os resultados de FTIR e Raman mostraram manutenção global das principais regiões vibracionais da PCL, sem surgimento progressivo de novas bandas ou desaparecimento consistente dos sinais característicos durante o armazenamento. Entretanto, a sobreposição espectral e a baixa proporção do ativo limitaram a identificação direta da amigdalina nas formulações de menor concentração, de modo que essas técnicas não permitem afirmar, isoladamente, ausência completa de degradação química.

O método cromatográfico apresentou faixa quantitativa de 6 a 90 µg/mL, limite de detecção de 2,66 µg/mL e limite de quantificação de 8,06 µg/mL. A eficiência de encapsulação foi determinada de forma confiável apenas para a formulação contendo 1% de amigdalina, com resultado de 80,06 ± 0,78%. Na formulação de 0,01%, as respostas permaneceram abaixo dos limites analíticos; na formulação de 10%, permaneceram acima da faixa linear mesmo após diluição 1:100. Portanto, os valores de eficiência de encapsulação

das formulações extremas não devem ser interpretados quantitativamente nas condições empregadas.

De forma integrada, os achados indicam que as nanocápsulas mantiveram características físico-coloidais, morfológicas e estruturais compatíveis com sistemas nanoestruturados ao longo de 120 dias de armazenamento sob refrigeração e proteção da luz. A formulação contendo 1% apresentou o resultado quantitativo melhor sustentado pelo método analítico. Contudo, a demonstração definitiva da estabilidade química da amigdalina requer quantificação do ativo e, quando pertinente, de produtos de degradação em diferentes tempos de armazenamento. Estudos futuros devem ajustar a faixa cromatográfica e os fatores de diluição para todas as formulações, incluir a região da nitrila na análise Raman e avaliar liberação, segurança e desempenho biológico do sistema.

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, K.; BUHRKE, T.; LAMPEN, A. Bioavailability of cyanide after consumption of a single meal of foods containing high levels of cyanogenic glycosides: a crossover study in humans. **Archives of Toxicology**, v. 90, p. 559-574, 2016. doi: 10.1007/s00204-015-1479-8.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). **Toxicological profile for cyanide**. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, 2006.

AGRAWAL, Udita et al. Is nanotechnology a boon for oral drug delivery?. **Drug discovery today**, v. 19, n. 10, p. 1530-1546, 2014.

BARAKAT, H. et al. Amygdalin: a review on its characteristics, antioxidant potential, gastrointestinal microbiota intervention, anticancer therapeutic and mechanisms, toxicity, and encapsulation. **Biomolecules**, v. 12, n. 10, artigo 1514, 2022. doi: 10.3390/biom12101514.

BOLARINWA, I. F.; ORFILA, C.; MORGAN, M. R. A. Amygdalin content of seeds, kernels and food products commercially-available in the UK. **Food Chemistry**, v. 152, p. 133-139, 2014. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.11.002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada** - RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, n. 141, p. 87, 25 jul. 2017.

CAMARGO, G. A. et al. Stability testing of tacrolimus-loaded poly(ε-caprolactone) nanoparticles by physicochemical assays and Raman spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v. 110, artigo 103139, 2020. doi: 10.1016/j.vibspec.2020.103139.

CAMARGO, G. A. et al. Characterization and in vitro and in vivo evaluation of tacrolimus-loaded poly(ε-caprolactone) nanocapsules for the management of atopic dermatitis. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 12, artigo 2013, 2021. doi: 10.3390/pharmaceutics13122013.

CHRISTIE, J. K. Review: understanding the properties of amorphous materials with high-performance computing methods. Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, **Physical and Engineering Sciences**, v. 381, n. 2250, artigo 20220251, 2023. doi: 10.1098/rsta.2022.0251.

CLOGSTON, J. D.; VERMILYA, A. Measuring zeta potential of nanoparticles: version 1.2. In: NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Nanotechnology Characterization Laboratory Assay Cascade Protocols**. Bethesda, MD: National Cancer Institute, 2020. NCL Method PCC-2. doi: 10.17917/ZB8P-FB40.

COATES, J. Interpretation of infrared spectra, a practical approach. In: MEYERS, R. A. (ed.). **Encyclopedia of Analytical Chemistry**. Chichester: John Wiley & Sons, 2000. p. 10815-10837.

CRECENTE-CAMPO, J.; ALONSO, M. J. Engineering, on-demand manufacturing, and scaling-up of polymeric nanocapsules. **Bioengineering & Translational Medicine**, v. 4, n. 1, p. 38-50, 2019.

DANAEI, M. et al. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, artigo 57, 2018. doi: 10.3390/pharmaceutics10020057.

DENG, S. et al. Polymeric nanocapsules as nanotechnological alternative for drug delivery system: current status, challenges and opportunities. **Nanomaterials**, v. 10, n. 5, artigo 847, 2020. doi: 10.3390/nano10050847.

EBRAHIMI, Z.; IRANI, S.; ARDESHIRYLAJIMI, A.; SEYEDJAFARI, E. Enhanced osteogenic differentiation of stem cells by 3D printed PCL scaffolds coated with collagen and hydroxyapatite. **Scientific Reports**, v. 12, artigo 12359, 2022. doi: 10.1038/s41598-022-15602-y.

ELZEIN, T. et al. FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces. Journal of Colloid and Interface Science, v. 273, n. 2, p. 381-387, 2004. doi: 10.1016/j.jcis.2004.02.001.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Acute health risks related to the presence of cyanogenic glycosides in raw apricot kernels and products derived from raw apricot kernels. **EFSA Journal**, v. 14, n. 4, artigo 4424, 2016.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. P.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. International **Journal of Pharmaceutics**, v. 55, p. R1-R4, 1989. doi: 10.1016/0378-5173(89)90281-0.

GLEADOW, R. M.; MØLLER, B. L. Cyanogenic glycosides: synthesis, physiology, and phenotypic plasticity. **Annual Review of Plant Biology**, v. 65, p. 155-185, 2014. doi: 10.1146/annurev-arplant-050213-040027.

GOMES, M. L. S. et al. Long-lasting anti-platelet activity of cilostazol from poly(ε-caprolactone)-poly(ethylene glycol) blend nanocapsules. **Materials Science and Engineering**: C, v. 94, p. 694-702, 2019. doi: 10.1016/j.msec.2018.10.029.

HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems: a review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 2, p. 255-264, 2013.

INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION (ICH). Q1A(R2): **Stability testing of new drug substances and products**. Geneva: ICH, 2003.

JASZCZAK-WILKE, E. et al. Amygdalin: toxicity, anticancer activity and analytical procedures for its determination in plant seeds**. Molecules**, v. 26, n. 8, artigo 2253, 2021. doi: 10.3390/molecules26082253.

KOTULA, A. P.; SNYDER, C. R.; MIGLER, K. B. Determining conformational order and crystallinity in polycaprolactone via Raman spectroscopy. **Polymer**, v. 117, p. 1-10, 2017. doi: 10.1016/j.polymer.2017.04.006.

KRAFFT, C. et al. Distribution of amygdalin in apricot (Prunus armeniaca) seeds studied by Raman microscopic imaging. **Applied Spectroscopy**, v. 66, n. 6, p. 644-649, 2012. doi: 10.1366/11-06521.

LYU, J. S.; LEE, J.-S.; HAN, J. Development of a biodegradable polycaprolactone film incorporated with an antimicrobial agent via an extrusion process. **Scientific Reports**, v. 9, artigo 20236, 2019. doi: 10.1038/s41598-019-56757-5.

MICHEN, B. et al. Avoiding drying-artifacts in transmission electron microscopy: characterizing the size and colloidal state of nanoparticles. **Scientific Reports**, v. 5, artigo 9793, 2015. doi: 10.1038/srep09793.

MICKLANDER, E.; BRIMER, L.; ENGELSEN, S. B. Noninvasive assay for cyanogenic constituents in plants by Raman spectroscopy: content and distribution of amygdalin in bitter almond (Prunus amygdalus). **Applied Spectroscopy**, v. 56, n. 9, p. 1139-1146, 2002. doi: 10.1366/000370202760295368.

MILAZZO, S.; HORNEBER, M. Laetrile treatment for cancer. Cochrane Database of Systematic Reviews, n. 4, artigo CD005476, 2015. doi: 10.1002/14651858.CD005476.pub4.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, n. 1-2, p. 113-142, 2010. doi: 10.1016/j.ijpharm.2009.10.018.

NÉMETH, Z. et al. Quality by Design-driven zeta potential optimisation study of liposomes with charge imparting membrane additives. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 9, artigo 1798, 2022. doi: 10.3390/pharmaceutics14091798.

NIYOM, Y. et al. Synergy between polymer crystallinity and nanoparticles size for payloads release. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 550, p. 139-146, 2019. doi: 10.1016/j.jcis.2019.04.085.

PASIECZNA-PATKOWSKA, S.; CICHY, M.; FLIEGER, J. Application of Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy in characterization of green synthesized nanoparticles. **Molecules**, v. 30, n. 3, artigo 684, 2025. doi: 10.3390/molecules30030684.

PAWAR, R. et al. Polycaprolactone and its derivatives for drug delivery. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 34, n. 10, p. 3296-3316, 2023. doi: 10.1002/pat.6140.

POLYMER SOURCE. Polycaprolactone (PCL). Disponível em: **Polymer Source**. Acesso em: 19 jul. 2026.

RASMUSSEN, M. K.; PEDERSEN, J. N.; MARIE, R. Size and surface charge characterization of nanoparticles with a salt gradient. **Nature Communications**, v. 11, artigo 2337, 2020. doi: 10.1038/s41467-020-15889-3.

RIBEIRO, J. P. M. et al. Physicochemical characterization, quantitative drug analysis, and stability testing of hydroxytyrosol-loaded poly(ε-caprolactone) nanocapsules. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 66, 2023. doi: 10.1590/1678-4324-2023230081.

SAVIC, I. M. et al. Development and validation of HPLC method for the determination of amygdalin in the plant extract of plum kernel. **Research Journal of Chemistry and Environment**, v. 16, n. 4, p. 80-86, 2012.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, n. 1-2, p. 1-20, 2001. doi: 10.1016/S0168-3659(00)00339-4.

SPANOUDAKI, M. et al. Amygdalin as a promising anticancer agent: molecular mechanisms and future perspectives for the development of new nanoformulations for its delivery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 18, artigo 14270, 2023. doi: 10.3390/ijms241814270.

THANGAVEL, S.; KANDASAMY, K. T.; RATHANASAMY, R.; DHAIRIYASAMY, R. Optimizing graphene-enhanced polycaprolactone nanofibers for superior biomedical properties. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 35, n. 4, e20250042, 2025. doi: 10.1590/0104-1428.20240133.

THYGESEN, L. G.; JØRGENSEN, K.; MØLLER, B. L.; ENGELSEN, S. B. Raman spectroscopic analysis of cyanogenic glucosides in plants: development of a flow injection surface-enhanced Raman scatter method for determination of cyanide. **Applied Spectroscopy**, v. 58, n. 2, p. 212-217, 2004. doi: 10.1366/000370204322842959.

WOODRUFF, M. A.; HUTMACHER, D. W. The return of a forgotten polymer: polycaprolactone in the 21st century. **Progress in Polymer Science**, v. 35, n. 10, p. 1217-1256, 2010. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002.

YASERI, R. et al. Surface modification of polycaprolactone nanofibers through hydrolysis and aminolysis: a comparative study on structural characteristics, mechanical properties, and cellular performance. **Scientific Reports**, v. 13, artigo 9434, 2023. doi: 10.1038/s41598-023-36563-w.

ZAGROBELNY, M.; BAK, S.; MØLLER, B. L. Cyanogenesis in plants and arthropods. Phytochemistry, v. 69, n. 7, p. 1457-1468, 2008. doi: 10.1016/j.phytochem.2008.02.019.

ZHANG, T. et al. Insights into the properties of amygdalin solvatomorphs: X-ray structures, intermolecular interactions, and transformations. **ACS Omega**, v. 7, n. 10, p. 8906-8918, 2022. doi: 10.1021/acsomega.1c07314.

APÊNDICE A – DADOS INDIVIDUAIS E ANÁLISE ESTATÍSTICA DO pH DURANTE 120 DIAS DE ARMAZENAMENTO

Este apêndice apresenta os valores individuais das triplicatas, as estatísticas descritivas, os resultados detalhados da análise de variância de uma via e todas as comparações múltiplas realizadas pelo teste de Tukey para as formulações avaliadas.

Tabela A1 – Valores individuais de pH, estatísticas descritivas e comparação com o dia 0.

Formulação	Tempo (dias)	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Média	DP	ΔpH vs. dia 0	p ajustado (Tukey)	Difere do dia 0?
Branco	0	5,35	5,36	5,36	5,357	0,006	0,000	Referência	Referência
Branco	30	5,20	5,29	5,28	5,257	0,049	-0,100	0,0161	Sim
Branco	60	5,11	5,15	5,16	5,140	0,026	-0,217	< 0,0001	Sim
Branco	90	5,26	5,25	5,28	5,263	0,015	-0,093	0,0243	Sim
Branco	120	5,44	5,37	5,40	5,403	0,035	0,047	0,3864	Não
0,01%	0	5,14	5,33	5,43	5,300	0,147	0,000	Referência	Referência
0,01%	30	5,33	5,32	5,32	5,323	0,006	0,023	0,9933	Não
0,01%	60	5,13	5,14	5,16	5,143	0,015	-0,157	0,1183	Não
0,01%	90	5,28	5,28	5,29	5,283	0,006	-0,017	0,9982	Não
0,01%	120	5,39	5,39	5,48	5,420	0,052	0,120	0,2946	Não
1%	0	5,30	5,31	5,31	5,307	0,006	0,000	Referência	Referência
1%	30	4,99	4,97	4,98	4,980	0,010	-0,327	< 0,0001	Sim
1%	60	4,94	4,95	4,96	4,950	0,010	-0,357	< 0,0001	Sim
1%	90	5,03	5,02	5,04	5,030	0,010	-0,277	< 0,0001	Sim
1%	120	5,30	5,28	5,29	5,290	0,010	-0,017	0,2570	Não
10%	0	5,12	5,12	5,13	5,123	0,006	0,000	Referência	Referência
10%	30	4,88	4,87	4,86	4,870	0,010	-0,253	< 0,0001	Sim
10%	60	4,61	4,67	4,69	4,657	0,042	-0,467	< 0,0001	Sim
10%	90	4,66	4,65	4,67	4,660	0,010	-0,463	< 0,0001	Sim
10%	120	5,16	5,14	5,06	5,120	0,053	-0,003	0,9999	Não

Nota: Resultados obtidos em triplicata (n = 3). ΔpH corresponde à diferença entre a média de cada tempo e a média do respectivo dia 0. Os valores de p foram ajustados pelo teste de Tukey após ANOVA de uma via; $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Tabela A2 – Resultados detalhados da ANOVA de uma via para o efeito do tempo sobre o pH.

Formulação	Fonte de variação	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	p
Branco	Entre os tempos	0,124293	4	0,031073	33,53	< 0,0001
	Dentro dos grupos (erro)	0,009267	10	0,000927		
	Total	0,133560	14			

0,01%	Entre os tempos	0,118760	4	0,029690	6,01	0,0099
	Dentro dos grupos (erro)	0,049400	10	0,004940		
	Total	0,168160	14			
1%	Entre os tempos	0,359907	4	0,089977	1038,19	< 0,0001
	Dentro dos grupos (erro)	0,000867	10	0,000087		
	Total	0,360773	14			
10%	Entre os tempos	0,645027	4	0,161257	169,15	< 0,0001
	Dentro dos grupos (erro)	0,009533	10	0,000953		
	Total	0,654560	14			

Nota: ANOVA de uma via realizada separadamente para cada formulação, considerando os cinco tempos de armazenamento como níveis do fator tempo. Cada grupo foi composto por três determinações independentes. Nível de significância de 5%.

Tabela A3 – Comparações múltiplas entre todos os tempos pelo teste de Tukey HSD.

Formulação	Comparação (dias)	Diferença média	IC 95% da diferença	p ajustado	Significativo
Branco	**0 × 30**	**-0,100**	**[-0,182; -0,018]**	**0,0161**	**Sim**
Branco	**0 × 60**	**-0,217**	**[-0,298; -0,135]**	**< 0,0001**	**Sim**
Branco	**0 × 90**	**-0,093**	**[-0,175; -0,012]**	**0,0243**	**Sim**
Branco	**0 × 120**	**0,047**	**[-0,035; 0,128]**	**0,3864**	**Não**
Branco	**30 × 60**	**-0,117**	**[-0,198; -0,035]**	**0,0059**	**Sim**
Branco	**30 × 90**	**0,007**	**[-0,075; 0,088]**	**0,9987**	**Não**
Branco	**30 × 120**	**0,147**	**[0,065; 0,228]**	**0,0011**	**Sim**
Branco	**60 × 90**	**0,123**	**[0,042; 0,205]**	**0,0040**	**Sim**
Branco	**60 × 120**	**0,263**	**[0,182; 0,345]**	**< 0,0001**	**Sim**
Branco	**90 × 120**	**0,140**	**[0,058; 0,222]**	**0,0016**	**Sim**
0,01%	**0 × 30**	**0,023**	**[-0,166; 0,212]**	**0,9933**	**Não**
0,01%	**0 × 60**	**-0,157**	**[-0,346; 0,032]**	**0,1183**	**Não**
0,01%	**0 × 90**	**-0,017**	**[-0,206; 0,172]**	**0,9982**	**Não**
0,01%	**0 × 120**	**0,120**	**[-0,069; 0,309]**	**0,2946**	**Não**
0,01%	**30 × 60**	**-0,180**	**[-0,369; 0,009]**	**0,0635**	**Não**
0,01%	**30 × 90**	**-0,040**	**[-0,229; 0,149]**	**0,9526**	**Não**
0,01%	**30 × 120**	**0,097**	**[-0,092; 0,286]**	**0,4833**	**Não**
0,01%	**60 × 90**	**0,140**	**[-0,049; 0,329]**	**0,1817**	**Não**
0,01%	**60 × 120**	**0,277**	**[0,088; 0,466]**	**0,0049**	**Sim**
0,01%	**90 × 120**	**0,137**	**[-0,052; 0,326]**	**0,1975**	**Não**
1%	**0 × 30**	**-0,327**	**[-0,352; -0,302]**	**< 0,0001**	**Sim**
1%	**0 × 60**	**-0,357**	**[-0,382; -0,332]**	**< 0,0001**	**Sim**
1%	**0 × 90**	**-0,277**	**[-0,302; -0,252]**	**< 0,0001**	**Sim**
1%	**0 × 120**	**-0,017**	**[-0,042; 0,008]**	**0,2570**	**Não**
1%	**30 × 60**	**-0,030**	**[-0,055; -0,005]**	**0,0181**	**Sim**
1%	**30 × 90**	**0,050**	**[0,025; 0,075]**	**0,0005**	**Sim**
1%	**30 × 120**	**0,310**	**[0,285; 0,335]**	**< 0,0001**	**Sim**
1%	**60 × 90**	**0,080**	**[0,055; 0,105]**	**< 0,0001**	**Sim**
1%	**60 × 120**	**0,340**	**[0,315; 0,365]**	**< 0,0001**	**Sim**
1%	**90 × 120**	**0,260**	**[0,235; 0,285]**	**< 0,0001**	**Sim**
10%	**0 × 30**	**-0,253**	**[-0,336; -0,170]**	**< 0,0001**	**Sim**
10%	**0 × 60**	**-0,467**	**[-0,550; -0,384]**	**< 0,0001**	**Sim**
10%	**0 × 90**	**-0,463**	**[-0,546; -0,380]**	**< 0,0001**	**Sim**
10%	**0 × 120**	**-0,003**	**[-0,086; 0,080]**	**0,9999**	**Não**
10%	**30 × 60**	**-0,213**	**[-0,296; -0,130]**	**< 0,0001**	**Sim**
10%	**30 × 90**	**-0,210**	**[-0,293; -0,127]**	**< 0,0001**	**Sim**
10%	**30 × 120**	**0,250**	**[0,167; 0,333]**	**< 0,0001**	**Sim**
10%	**60 × 90**	**0,003**	**[-0,080; 0,086]**	**0,9999**	**Não**
10%	**60 × 120**	**0,463**	**[0,380; 0,546]**	**< 0,0001**	**Sim**

10%	**90 × 120**	**0,460**	**[0,377; 0,543]**	**< 0,0001**	**Sim**

Nota: A diferença média foi calculada como média do segundo tempo menos média do primeiro tempo. IC 95%: intervalo de confiança de 95%. Resultados com p ajustado < 0,05 foram considerados significativos. O procedimento de Tukey controla o erro familiar nas comparações múltiplas.