

Universidade de Brasília

Instituto de Física

**Estudo das interações entre moléculas bioativas e sistemas
nanoestruturados por meio da espectroscopia vibracional**

Ísis Oliveira Szlachetka

Orientador: Prof. Dr. Sebastião William da Silva

Brasília – DF
Dezembro de 2020

Universidade de Brasília

Instituto de Física

**Estudo das interações entre moléculas bioativas e sistemas
nanoestruturados por meio da espectroscopia vibracional**

Ísis Oliveira Szlachetka

Orientador: Prof. Dr. Sebastião William da Silva

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade de Brasília como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Física.

Brasília – DF

Dezembro de 2020

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sebastião William da Silva – Orientador
(Instituto de Física/Universidade de Brasília)

Prof. Dr. Ricardo Gargano
(Universidade de Brasília)

Prof. Dr. Juliano Alexandre Chaker
(Universidade de Brasília – Faculdade de Ceilândia)

Prof^a. Dr^a. Luciana Rebelo Guilherme
(Universidade Estadual de Goiás)

Sumário

Agradecimentos	viii
Resumo	ix
Abstract	x
Lista de Símbolos e Abreviaturas	xi
Lista de Figuras	xiii
Capítulo 1	1
1. Introdução geral	1
Capítulo 2	5
2. Investigação do arranjo estrutural das moléculas formadoras de nanoemulsões à base de lecitina e óleo de pequi	5
2.1. Introdução	5
2.2. Suporte teórico e revisão da literatura	7
2.2.1. Nanoemulsões como carreadores de fármacos.....	7
2.2.2. Lipídios	11
2.2.3. Nanoemulsões à base de lecitina	16
2.2.4. Fases polimórficas de lipídios em água.....	18
2.2.5 Fases polimórficas: parâmetros de empacotamento crítico.....	19
2.2.5. Espectroscopias de FTIR e Raman na caracterização estrutural de lipídios ...	22
2.3. Nanoemulsões à base de lecitina e óleo de pequi: câncer de mama	25
2.4. Metodologia	28
2.4.1. Preparação das amostras	28
2.4.2. Técnicas experimentais	29
2.4.2.1. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier - FTIR	29
2.4.2.2. Raman.....	29
2.5. Resultados e discussões.....	29
2.6. Conclusões	52
Capítulo 3	53
3. Estudo dos mecanismos de adsorção de fluoxetina em nanotubos de carbono funcionalizados em carvão ativado	53
3.1. Introdução	53
3.2. Suporte teórico e revisão da literatura	56
3.2.1. Descontaminação por adsorção	56
3.2.2. Nanotubos de carbono	58

3.2.3. Fluoxetina como agente poluente.....	60
3.2.4. Estudos espectroscópicos	61
3.2.4.1. Fluoxetina.....	61
3.2.4.2. Materiais carbonáceos	62
3.3. Metodologia	64
3.3.1. Preparação das amostras	64
3.3.2. Técnica experimental	65
3.4. Resultados e discussões.....	66
3.5. Conclusão	76
Capítulo 4	77
Conclusão geral.....	77
Perspectivas de trabalhos futuros	78
Capítulo 5	79
Referências bibliográficas	79

“Viva como se fosse morrer
amanhã. Aprenda como se
fosse viver para sempre.”

Mahatma Gandhi

Dedico este trabalho à
minha família, em particular, ao
meu marido Pedro.

Agradecimentos

Agradeço ao meu marido Pedro, por sempre estar ao meu lado, por sempre me apoiar e acreditar em mim e por sua compreensão. Te amo.

A toda(s) minha(s) família(s), em especial ao meu pai, Joce, e à minha mãe, Roze, que são meus exemplos. Aos meus irmãos, Ícaro, Felipe, Giordano, Larissa e Taís, que me amam do jeito que sou. Ao meu padrasto Ourides pela ajuda com seu vasto conhecimento em Química.

Ao meu orientador Sebastião, por seus ensinamentos, paciência e conselhos. Afinal, são mais de 10 anos de orientação e convívio no laboratório. Aprendi muito não apenas na área de pesquisa, como também em estar sempre à disposição para ajudar os outros. Muito obrigada por tirar minhas dúvidas sempre que precisei.

Aos meus amigos do laboratório que tornam o ambiente mais agradável, Alexandre pela incrível parceria nos experimentos, Hermano, pelos chás, pelas conversas e pelos ensinamentos, John, Emanuel, Gil, Jerry e Alan, que foi adotado pelo nosso laboratório.

Aos meus amigos de curso, Samy, Rafael, Juliana, Jessé, Fernanda e Ayessa.

Aos professores Garg e Aderbal pelas conversas e pelo carinho.

Ao Marcelão e Marcelinho, pelos ensinamentos de laboratório de química e pela amizade.

Ao Diego e Alicia pela colaboração entre nossas teses.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Resumo

Nesta tese as técnicas de espectroscopia Raman e espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foram utilizadas no estudo da interação entre moléculas bioativas e sistemas nanoestruturados. As moléculas bioativas estudadas foram as de triglicerídeo (TAG) natural óleo de pequi e de fluoxetina (FLX). Por sua vez, os sistemas nanoestruturados empregados foram, respectivamente: nanoemulsão à base de lecitina e nanotubos de carbono funcionalizados sobre a superfície de carvão ativado (CA@NTC). Para comparação, a interação da FLX com micropartículas de carvão ativado (CA) também foi investigada. Os dados espectroscópicos evidenciaram que as moléculas de óleo de pequi exercem papel importante no arranjo espacial das cadeias de hidrocarbonetos que compõem as nanoemulsões à base de lecitina. Os resultados mostraram que a incorporação de teores crescentes de óleo de pequi promove um ordenamento das cadeias de hidrocarbonetos, inicialmente desordenada (L_d), fazendo com que as fases L_d e L_o coexistam em menor ou maior proporção relativa, dependendo do teor crescente de óleo de pequi empregado nas amostras. Adicionalmente, foi verificado que as moléculas de FLX são adsorvidas nas superfícies do CA e do CA@NTC por meio de interações $n - \pi$ e/ou $\pi - \pi$, as quais ocorrem entre os anéis aromáticos das moléculas de FLX e os oxigênios e/ou os anéis aromáticos das estruturas carbonáceas, respectivamente. Foi também constatado a existência de uma competição entre a adsorção de moléculas de FLX e de água do meio pelas superfícies das estruturas carbonáceas, sendo a amostra CA@NTC 10 vezes mais eficiente na adsorção de FLX do que a amostra CA. Por último, foi observado que adsorção da FLX nas superfícies dos materiais carbonáceos é reversível em ambos os sistemas, permitido assim a reutilização de ambos os sistemas.

Abstract

In this thesis, Raman spectroscopy and Fourier transform infrared (FTIR) techniques were used to study the interaction between bioactive molecules and nanostructured systems. The studied bioactive molecules were the natural triglyceride (TAG) pequi oil and fluoxetine (FLX). In turn, it was employed the following nanostructured systems: lecithin-based nano-emulsion and carbon nanotubes functionalized on the surface of activated carbon (CA@NTC). For comparison, FLX's interaction with activated carbon (CA) microparticles was also investigated. The spectroscopic data showed that small oil molecules play an important role in the spatial arrangement of the hydrocarbon chains that make up the lecithin-based nano-emulsions. The results showed that the incorporation of increasing levels of pequi oil promotes an ordering of the hydrocarbon chains, initially disordered (L_d), making the phases L_d and L_o to coexist in a smaller or larger relative proportion, depending on the increasing content of pequi oil used in the samples. Additionally, it was verified that the FLX molecules are adsorbed on the surfaces of the CA and CA@NTC through $n - \pi$ and / or $\pi - \pi$ interactions, which occur between the aromatic rings of the FLX molecules and the oxygen and/or aromatic rings of carbonaceous structures, respectively. There was also a competition between the adsorption of FLX molecules and water from the medium on the surfaces of carbonaceous structures, the CA@NTC sample being 10 times more efficient in FLX adsorption than the CA sample. Finally, it was found that FLX adsorption on the surfaces of carbonaceous materials is reversible in both systems, allowing the reuse of both systems.

Lista de Símbolos e Abreviaturas

ν - modo de vibração estiramento

ν_s - modo de vibração estiramento simétrico

ν_{as} - modo de vibração estiramento assimétrico

γ - modo de vibração fora do plano

β - modo de vibração no plano

τ - modo de vibração tesoura

δ - modo de vibração deformação

L_α - fase líquida desordenada

L_o - fase líquida ordenada

L_β - fase gel ordenada

$L_{\beta'}$ - fase gel inclinada

L_c - fase sub-gel

L_d - fase gel desordenada

S_o - fase sólida ordenada

ξ - valor potencial zeta

I - intensidade

A - área

AG - ácido graxo

ATR-FTIR - espectroscopia de reflexão total atenuada no infravermelho por transformada de Fourier

FTIR-HATR - espectroscopia de reflexão total atenuada horizontal no infravermelho por transformada de Fourier

β CD - β -ciclodextrina

BSA - albumina sérica bovina

CA - carvão ativado

CA_FLX - fluoxetina adsorvida em carvão ativado

CA@NTC - compósito à base de carvão ativado funcionalizado com nanotubos de carbono

CA@NTC_FLX - fluoxetina adsorvida em carvão ativado funcionalizado com nanotubos de carbono

cpp - parâmetro de empacotamento crítico

DFT - Teoria do Funcional da Densidade

DPPC - dipalmitoilfosfatidilcolina

FLX - fluoxetina

FTIR - espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

LC₅₀ - dose letal mediana

NTC - nanotubo de carbono

PC - fosfatidilcolina

PE - fosfatidiletanolamina

PI - fosfatidilinositol

POPC - 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina

PS - fosfatidilserina

SEM - microscópio eletrônico de varredura

SOPC - 1-estearoil-2-oleoil-*sn*-glicerol-3-fosfocolina

TAG - triacilglicerol

TG - triglicerídeo

Lista de Figuras

Figura 1. Representação da orientação das moléculas de tensoativos em uma interface água-óleo.	8
Figura 2. Representação esquemática 2D da estrutura micelar O/A.	9
Figura 3. Fórmulas estruturais dos ácidos (a) palmítico (16:0), (b) esteárico (18:0), (c) oleico (18:1) e (d) linoleico (18:2).....	12
Figura 4. Fórmula estrutural (a) do glicerol e (b) da esfingosina.	13
Figura 5. Fórmula estrutural de triglicerídeo.....	13
Figura 6. Fórmula estrutural do esfingolipídio típico ceramida. Fonte: adaptada de (MECKFESSEL; BRANDT, 2014).	14
Figura 7. Fórmula estrutural do colesterol.	15
Figura 8. Fórmula estrutural da fosfatidilcolina. Os carbonos 1 e 2 do glicerol são funcionalizados com ácidos graxos, e o carbono 3 é funcionalizado com um grupo aminofosfato.....	15
Figura 9. Representação estrutural da lecitina. Fonte: adaptada de < https://lcfamadas.wixsite.com/conhecimentos/hemostasia-2 >. Acesso em 20 de abril de 2020...	16
Figura 10. Tipos de agregados lipídicos formados em meio aquoso. Fonte: adaptada de < https://www.quimica.com.br/abc-cosmetologia-nanotecnologia-aplicada-aos-cosmeticos/3/ >. Acesso em 17 de julho de 2020.	21
Figura 11. A árvore e o fruto do pequi (Caryocar brasiliense). Fonte: < https://www.todafruta.com.br/pequi/ >. Acesso em 20 de abril de 2020.....	27
Figura 12. Espectro FTIR do óleo de pequi puro (i) e das nanoemulsões NE2:1 (67 mol% de óleo de pequi) (ii), NE1:1 (50 mol%) (iii), NE1:2 (33 mol%) (iv) e NE0:1(0 mol% de óleo de pequi) (v).	32
Figura 13. (a) Espectro FTIR na região do $C = O$ para o óleo de pequi (i) e para as nanoemulsões: NE2:1 (67 mol%) (ii), NE1:1 (50 mol%) (iii), NE1:2 (33 mol%) (iv) e NE0:1(0 mol% de óleo de pequi. (b) Número de onda do pico em torno de 1740 cm^{-1} e (c) razão entre as áreas das bandas $\nu(C = O)$ ligada e livre (<i>Aligado/Alivre</i>) ambas em função do teor de óleo de pequi presentes nas nanoemulsões.	36
Figura 14. (a) Espectros FTIR na região em torno de 2900 cm^{-1} para o óleo de pequi puro (i) e para as nanoemulsões NE2:1 (67 mol% de óleo de pequi) (ii), NE1:1 (50 mol%) (iii), NE1:2 (33 mol%) (iv) e NE0:1(0 mol% de óleo de pequi) (v). (b) Número de onda dos modos vibracionais $\nu(=CH)$ e $\nu_{as}CH_3$ e (c) $\nu_{s}CH_2$ e $\nu_{as}CH_2$ ambas em função do teor do óleo de pequi presente nas nanoemulsões. Na inserção no painel (a) são mostrados uma ampliação dos espectros em torno da região da vibração $\nu_{s}CH_2$	38

Figura 15. Espectros Raman do óleo de pequi puro (i) e das nanoemulsões NE2:1 (67 mol% de óleo de pequi) (ii), NE1:1 (50 mol%) (iii), NE1:2 (33 mol%) (iv) e NE0:1 (0 mol% de óleo de pequi) (v).40

Figura 16. (a) Espectros Raman na região 2800 – 3050 cm^{-1} do óleo de pequi puro (i) e das nanoemulsões NE2:1 (67 mol% de óleo de pequi) (ii), NE1:1 (50 mol%) (iii), NE1:2 (33 mol%) (iv) e NE0:1(0 mol% de óleo de pequi) (v). (b) dependência do número de onda dos modos vibracionais ν_{sCH2} e ν_{asCH2} e (c) dependência da razão entre as intensidades I_{2880}/I_{2850} e I_{2880}/I_{2930} ambas em função do teor de óleo de pequi presentes. É importante mencionar que as I_{2880}/I_{2850} e I_{2880}/I_{2930} estão relacionadas a razão $I_{ordem}/I_{desordem}$ (ORENDORFF; DUCEY; PEMBERTON, 2002).....43

Figura 17. (a) Espectros Raman na região 1000 – 1150 cm^{-1} , associadas aos modos vibrações das configurações trans e gauche das ligações (C-C) do óleo de pequi puro (i) e das nanoemulsões NE2:1 (67 mol%) (ii), NE1:1 (50 mol%) (iii), NE1:2 (33 mol%) (iv) e NE0:1(0 mol% de óleo de pequi) (v), (b) dependência da razões entre as intensidades das bandas associadas aos confórmeros trans (b)1065 e (c)1130 cm^{-1} com relação a bandas gauche, 1087 cm^{-1} , ambos em função do teor de óleo de pequi.45

Figura 18. (a) Espectros Raman na região 1270 – 1500 cm^{-1} , associadas aos modos deformações das ligações CH_2 do óleo de pequi puro (i) e das nanoemulsões NE2:1 (67 mol%) (ii), NE1:1 (50 mol%) (iii), NE1:2 (33 mol%) (iv) e NE0:1(0 mol% de óleo de pequi) (v). Dependências dos números de onda dos modos vibracionais $\tau(CH_2)$ (b) e $\delta(CH_2)$ (c) e dependência da razão entre as áreas entre os modos vibracionais $\tau(CH_2)$ e $\delta(CH_2)$ (d), ambos em função do teor de óleo de pequi.....46

Figura 19. Dependência entre os números de ondas dos modos vibracionais $\nu_{as}(CH_2)$ (a), $\nu_s(CH_2)$ (b), $\delta(CH_2)$ (c), $\tau(CH_2)$ (d) e das razões I_{trans}/I_{gauche} (e), $A\delta(CH_3)/A\delta(CH_2)$ (f), $I(C-C)/I(C-C)t$ (g) e (h) como função da razão $I_{ordem}/I_{desordem}$50

Figura 20. Processo de adsorção em partícula de carvão ativado. Fonte: adaptada de (ÇEÇEN; AKTAŞ, 2011).58

Figura 21. Nanotubos de carbono a) parede simples b) paredes múltiplas. Fonte: adaptada de (ZARBIN; OLIVEIRA, 2013).59

Figura 22. Fórmula estrutural da fluoxetina.....60

Figura 23. Imagem SEM do nanocompósito carvão ativado funcionalizado com nanotubos de carbono. Fonte: adaptada de (SOUSA-MOURA et al., 2019).65

Figura 24. Espectros FTIR da fluoxetina pura (i), CA_FLX (ii), CA puro (iii), CA@NTC_FLX (iv) e CA@NTC (v).69

Figura 25. Ampliações dos espectros FTIR das amostras FLX (linhas magentas), CA_FLX (linhas azul), CA@NTC_FLX (linhas verdes) relativos aos modos (a) $\gamma(CH)$, (b) $\nu_s(CF_3)$ e $\nu_{as}(CF_3)$, (c) $\nu(C-O)$, (d) $\beta(CH)$, (e) $\nu C-OH$ e (f) $\nu(C=C)_{anel}$70

Figura 26: Ampliação dos espectros FTIR em torno de 2800 a 3800 cm^{-1} das amostras (a) CA e CA_FLX e (b) CA@NTC e CA@NTC_FLX. Nas inserções são mostrados os espectros FTIR das mesmas amostras. Para comparação o espectro FTIR da água pura também é mostrado em ambas as inserções. É importante ressaltar que os espectros foram normalizados quanto às suas intensidades máximas.....72

Figura 27. Espectros FTIR da FLX pura (i), CA@NTC_FLX: (ii) antes e (iii) após enxague com solução de metanol e CA_FLX: (iv) antes e (v) após enxague com solução de metanol. Os espectros FTIR das amostras CA@NTC e CA (antes da adsorção da FLX) são apresentados com linhas tracejadas em (iii) e (v), respectivamente.....75

Capítulo 1

1. Introdução geral

A nanociência e a nanotecnologia trabalham no desenvolvimento de materiais, dispositivos e sistemas por meio do controle da matéria em escala nanométrica e exploram os novos fenômenos e propriedades físicas, químicas e biológicas decorrentes desta pequena escala. Sendo, portanto, uma ciência multidisciplinar, transdisciplinar e interdisciplinar presente nas tecnologias da informação, medicina, engenharia, química, física e biologia. Os resultados da nanotecnologia estão cada vez mais presentes no cotidiano das pessoas. Eles podem ser encontrados, por exemplo, em roupas, brinquedos, cosméticos, medicamentos, materiais esportivos, alimentos, produtos autolimpantes, vidros, baterias etc (BAYDA *et al.*, 2020; ZARBIN; OLIVEIRA, 2013).

Os nanomateriais possuem pelo menos uma dimensão em escala nanométrica, fazendo com que os efeitos quânticos se tornem importantes, possibilitando alterações expressivas nas suas propriedades ópticas, elétricas, magnéticas, mecânicas, térmicas, etc (BAYDA *et al.*, 2020). Os nanomateriais se caracterizam como sistemas de dimensões tão reduzidas que sua ação é fortemente dependente de sua elevada relação superfície/volume, o que implica em propriedades físico-químicas às vezes bastante diferentes daquelas dos materiais de dimensões maiores. Essas novas propriedades fazem com que estes materiais tenham aplicações, que até alguns anos atrás, eram inimagináveis, tais como dispositivos optoeletrônicos diversos, catalisadores e baterias mais eficientes, agentes adsorventes utilizados na remoção de poluentes, sistemas nanoestruturados que podem ser utilizados no diagnóstico, tratamento e cura dos mais variados tipos de cânceres e infecções, entre outras (BAYDA *et al.*, 2020; ZARBIN; OLIVEIRA, 2013).

Exemplos típicos de aplicações de sistemas nanoestruturados, e dos quais esta tese tratará, são os sistemas denominados “*drug delivery*”, ou seja, sistema para entrega de drogas em locais específicos e sistemas nanoestruturados destinados a despoluição ambiental (AZUMA *et al.*, 2015; MA *et al.*, 2018). Mais especificamente, sistemas à base de nanotubos de carbono empregados na remediação de água contaminada.

Os “*drug delivery*” são capazes de armazenar em seu interior, ou superfície, moléculas de uma droga ou o princípio ativo de um medicamento, de modo a funcionar como vetores capazes de transportar e controlar a taxa de liberação destes agentes químicos. Desta forma, estes sistemas nanométricos podem ser preparados para solubilizar, transportar, proteger, biocompatibilizar e liberar moléculas biologicamente ativas diretamente nos tecidos-alvos específicos, minimizando os efeitos colaterais da droga utilizada (TAYEB; SAINSBURY, 2018).

Por outro lado, compostos com propriedades adsorventes utilizados para a remoção de poluentes de efluentes têm sido bastante estudados (MARICHELVAM; AZHAGURAJAN, 2018). Entre esses poluentes, os resíduos farmacêuticos têm se destacado por apresentarem elevado consumo e, conseqüentemente, elevado descarte no meio ambiente. Dentre os compostos utilizados para a remoção de poluentes, os materiais carbonáceos (carvão ativado, nanotubos de carbono, grafeno, etc.) destacam-se por apresentarem elevada porosidade, grande área superficial, estabilidade química e térmica, dentre outras características, que permitem ampla versatilidade e eficiência. Estes materiais se utilizam das diferentes propriedades físico-químicas de suas superfícies que promovem uma interação entre os grupos funcionais e os contaminantes presentes na água. Esta interação se dá por meio da força de van der Waals entre a superfície dos materiais carbonáceos e os contaminantes não-polares ou por meio das interações eletrostáticas entre a superfície eletricamente carregada destes materiais e os contaminantes polares (CHEN; DUAN; ZHU, 2007; ZHAO *et al.*, 2003).

Note que em ambos exemplos descritos acima, a interação entre material nanoestruturado e o agente químico por ele transportado tem papel essencial na eficácia

do sistema em questão. Portanto, para tornar estas aplicações tão eficientes quanto possível, é fundamental conhecer as propriedades físico-químicas destas interações, pois por meio deste conhecimento é possível projetar, modificar e otimizar a construção destes sistemas.

As técnicas de espectroscopias vibracionais, como as espectroscopias Raman e FTIR, são particularmente sensíveis às mudanças decorrentes das interações inter- e intramoleculares, pois estas interações levam a mudanças nas propriedades físicas e químicas do sistema nanoparticulado. As informações adquiridas nos espectros vibracionais permitem correlacionar as alterações químicas, conformacionais e estruturais sofridas pelas moléculas decorrentes do seu processo de interação. Estas mudanças são traduzidas com o surgimento, deslocamento, alargamento e intensificação dos modos vibracionais das moléculas em interação quando comparados à molécula livre. Portanto, as alterações espectrais podem ser usadas para estudar os efeitos diretos ou indiretos da interação molecular em virtudes de ligações inter- ou intramolecular de grupos químicos tais como hidroxila ou amino, bem como alterações mediadas por cátions ou ânions presentes na superfície das nanopartículas (CHEN *et al.*, 2008; TRAN *et al.*, 2017).

Assim o principal objetivo deste trabalho é estudar as interações entre moléculas bioativas (óleo de pequi e fluoxetina) e sistemas nanoestruturados baseados em nanoemulsões de lecitina e compostos carbonáceos (carvão ativado e nanotubos de carbono funcionalizados na superfície de carvão ativado). Para isso, as técnicas de espectroscopias Raman e espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) são empregadas.

Diante do exposto acima, esta tese está organizada em duas frentes. No Capítulo 2 é estudado o efeito da presença do óleo de pequi no arranjo estrutural de nanoemulsões à base do fosfolípido lecitina (fosfatidilcolina). Para isso são apresentados alguns conceitos básicos a respeito de lipídios e seus polimorfismos, emulsões e uma breve revisão da literatura envolvendo aspectos relevantes sobre o tema estudado. Parte dos resultados deste capítulo foram publicados na referência (OMBREDANE *et al.*, 2020). O Capítulo 3

trata do estudo da interação entre o fármaco fluoxetina (FLX) e materiais carbonáceos à base de carvão ativado (CA) e de carvão ativado funcionalizado com nanotubos de carbono (CA@NTC). Os conceitos básicos e revisão bibliográfica pertinente também são apresentados neste capítulo. Parte dos resultados deste capítulo foram publicados na referência (SOUSA-MOURA *et al.*, 2019). Por fim, no capítulo 4 é feita uma conclusão geral sobre os resultados mais relevantes dos dois temas tratados.

Capítulo 2

2. Investigação do arranjo estrutural das moléculas formadoras de nanoemulsões à base de lecitina e óleo de pequi

2.1. Introdução

Dentre as causas de morte mais comuns, o câncer é a segunda principal, sendo responsável por cerca de 9,6 milhões de mortes no mundo no ano de 2018. Particularmente nas mulheres, o tipo de câncer mais comum, depois do câncer de pele não melanoma, é o câncer de mama, que afeta 24% das mulheres diagnosticadas com câncer (2,1 milhões de casos no ano de 2018) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

A mortalidade por câncer pode ser reduzida se os casos forem detectados e tratados precocemente. Um tratamento adequado e eficaz requer um diagnóstico correto, pois cada tipo da doença precisa de tratamentos específicos, dentre eles: cirurgia, quimioterapia, radioterapia, imunoterapia, hormonoterapia ou mesmo combinações dessas modalidades (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

Neste contexto a comunidade científica vem desenvolvendo novas abordagens e metodologias de modo a aperfeiçoar ou mesmo substituir os atuais métodos de tratamento do câncer de mama. Entre estas novas abordagens, o desenvolvimento de sistemas nanoestruturados tem se destacado objetivando a distribuição controlada de fármacos diretamente no tecido cancerígeno (do inglês “*drug delivery*”).

Um dos primeiros sistemas do tipo “*drug delivery*” usado no tratamento do câncer de mama foi o lipossoma, que demonstrou se acumular em tumores devido ao efeito de permeação aprimorado (Efeito EPR) (BYRNE; BETANCOURT; BRANNON-PEPPAS, 2008; MATSUMURA; MAEDA, 1986). Variantes mais recentes de sistemas deste tipo são

as emulsões ou, no presente caso, nanoemulsões. As nanoemulsões podem ser usadas para projetar sistemas de entrega de modo a aumentar a dosagem, a solubilidade e a biodisponibilidade de drogas, além de controlar sua liberação e aumentar a proteção contra a degradação química ou enzimática. Outra vantagem das nanoemulsões é que, devido à sua estrutura anfipática, são capazes de transportar tanto moléculas hidrofílicas quanto hidrofóbicas (CALLENDER *et al.*, 2017). Neste contexto, muita atenção tem sido dada no desenvolvimento e aperfeiçoamento de sistema de entrega de drogas baseados em nanocarreadores lipídicos.

É bem conhecido da literatura que a incorporação de agentes externos ativos (drogas, tensoativos, macromoléculas, etc) pode influenciar nas propriedades físico-químicas de bicamadas lipídicas ou fosfolipídicas. Contudo, embora existam muitos estudos relacionados aos diferentes arranjos espaciais de ácidos graxos, TAGs e fosfolipídios, bem como do efeito do colesterol no rearranjo estrutural de camadas fosfolipídicas (BRESSION; EL MARSSI; KHELIFA, 2006; DA SILVA; BRESSION; ROUSSEAU, 2009; GHOTRA; DYAL; NARINE, 2002), existem, no entanto, pouquíssimos trabalhos sistemáticos que analisam o efeito da interação entre AGs/TAGs e fosfolipídios, principalmente quando estes estão na escala nanométrica, como é o caso das nanoemulsões aqui estudadas (BUSH; ADAMS; LEVIN, 1980; GENOVA *et al.*, 2018; MENDELSON, 1972).

Portanto, esta parte do trabalho tem como objetivo analisar o efeito da presença do TAG natural “óleo de pequi” nas propriedades estruturais das nanopartículas que compõem uma nanoemulsão à base de lecitina de ovo e óleo de pequi, dispersas em água. Para isso serão investigados os padrões dos espectros vibracionais obtidos por espectroscopias Raman e FTIR em amostras com diferentes teores relativos entre seus componentes, procurando relacioná-las às mudanças conformacionais das estruturas lipídicas formadores das nanoemulsões.

2.2. Suporte teórico e revisão da literatura

2.2.1. Nanoemulsões como carreadores de fármacos

No mundo dos nanomateriais, as nanoemulsões são uma grande promessa como dispersões úteis de gotículas deformáveis (em nanoescala) que podem ter propriedades de fluxo que variam do líquido ao sólido e apresentam propriedades ópticas que variam de opaco a quase translúcido. Além disso, as nanoemulsões vêm desempenhando papel cada vez mais importante comercialmente, uma vez que podem ser formuladas usando significativamente menos tensoativo do que o necessário para as fases de microemulsão liotrópica nanoestruturadas.

As emulsões são utilizadas em uma ampla variedade de indústrias, incluindo as indústrias cosmética, agrícola, alimentícia e farmacêutica (ROSEN; KUNJAPPU, 2012). As emulsões permitem a solubilização de compostos hidrofóbicos em sistemas à base de água e de substâncias hidrofílicas em sistemas à base de óleo. Essas propriedades não apenas permitem a preparação e estabilização de aglomerados de diferentes substâncias, mas também podem ser exploradas em uma variedade de aplicações, especialmente na indústria farmacêutica, que melhoram o índice terapêutico das drogas, aumentando a eficácia e reduzindo a toxicidade (CALLENDER *et al.*, 2017). Como consequência destes avanços, o desenvolvimento de sistemas de entrega de drogas por meio de emulsões vem sendo fortemente impulsionado.

As emulsões são sistemas coloidais metaestáveis constituídos por gotículas de um líquido disperso dentro de outro líquido imiscível, estabilizados por um tensoativo apropriado (ou combinação de tensoativo/cotensoativo) (LOMBARDO *et al.*, 2020). Dependendo de sua composição, três tipologias de emulsões podem ser obtidas, a saber: emulsões água em óleo (A/O) (em que as gotículas de água são dispersas pelos tensoativos em uma fase oleosa contínua), emulsão óleo em água (O/A) (em que gotículas

de água são dispersas no óleo na fase pelas micelas reversas) e as emulsões bicontínuas em que nanodomínios de óleo e água são interdispersos dentro do sistema (LOMBARDO *et al.*, 2020).

Devido às diferenças nas interações atrativas entre as moléculas das duas fases líquidas, existe uma tensão interfacial entre os dois líquidos. Esta tensão interfacial pode ser reduzida significativamente pela adição de moléculas anfifílicas de superfícies ativas, ou "tensoativos", que são altamente solúveis em pelo menos uma das fases líquidas. Os tensoativos adsorvem preferencialmente em interfaces, uma vez que suas estruturas moleculares têm caudas de hidrocarbonetos não polares que preferem estar em líquidos não polares, como óleos, e grupos de cabeças polares ou carregados que preferem residir em líquidos polares, como água. A Figura 1 representa a orientação das moléculas de tensoativos em uma interface orgânica e aquosa. A Figura 2 mostra uma representação esquemática 2D da estrutura micelar O/A.

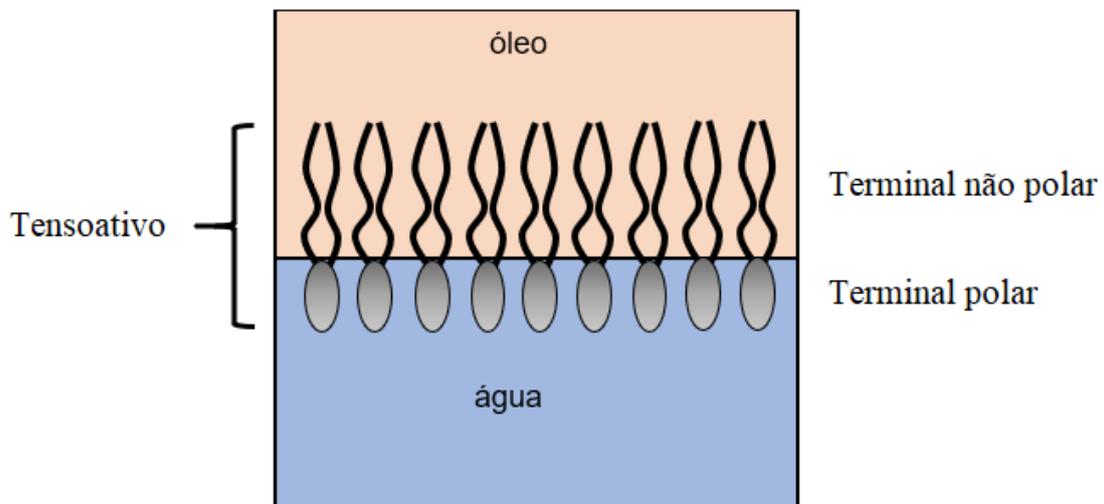


Figura 1. Representação da orientação das moléculas de tensoativos em uma interface água-óleo.

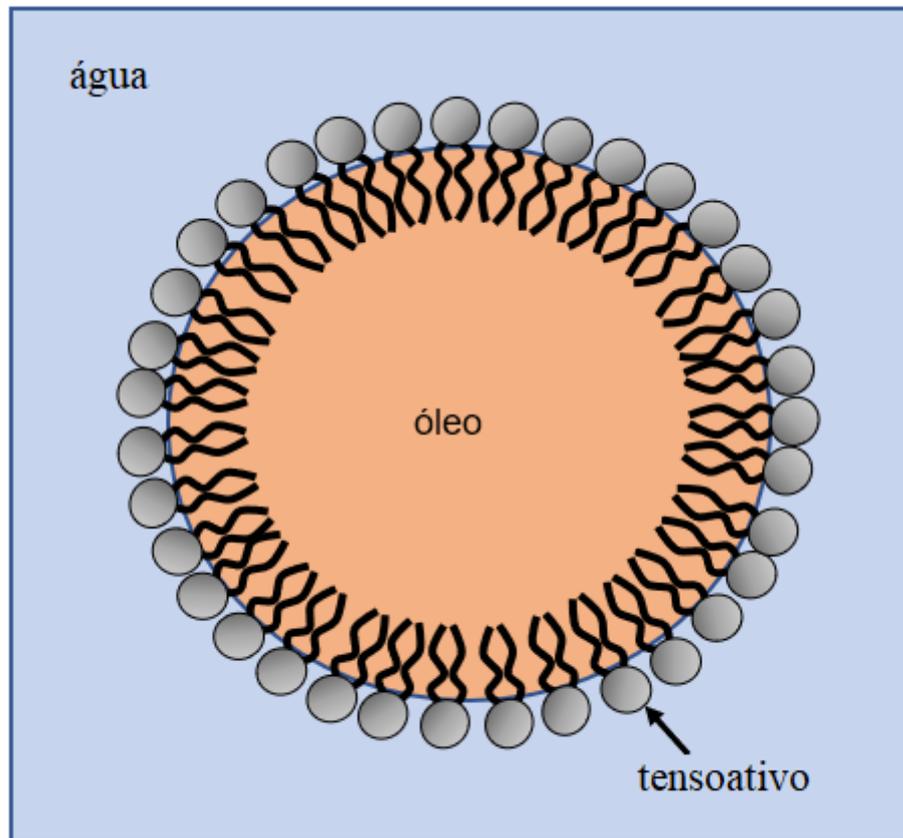


Figura 2. Representação esquemática 2D da estrutura micelar O/A.

Uma combinação de vários tipos diferentes de componentes anfífilicos iônicos e não iônicos pode ser empregada para estabilizar e aumentar a região de estabilidade coloidal das emulsões, incluindo o bis-2-etilhexilsulfosuccinato de sódio aniônico, o brometo de cetil trimetilamônio catiônico. Os anfífilicos zwitteriônicos, como a lecitina de soja ou de ovo, também são amplamente empregados devido às suas excelentes propriedades de biocompatibilidade (VAN NIEUWENHUYZEN; TOMÁS, 2008a).

As emulsões podem ser classificadas em: macroemulsões, nanoemulsões e microemulsões. Embora estas definições possam parecer semelhantes, diferindo apenas por uma questão de escala, essas fases são, na verdade, bastante diferentes. Ao contrário das microemulsões, que se formam espontaneamente por meio de automontagem e são termodinamicamente estáveis, as nanoemulsões não se formam espontaneamente; um cisalhamento externo deve ser aplicado para romper gotas maiores em menores. As

macroemulsões e nanoemulsões são termodinamicamente instáveis, ou seja, com tempo suficiente, ocorre a separação de fases. Contudo, devido às pequenas dimensões das nanoemulsões, a cinética de desestabilização das nanoemulsões é tão lenta (~ meses) que são consideradas cineticamente estáveis. Portanto, as nanoemulsões são atraentes do ponto de vista das aplicações do tipo “drug delivery” (GUPTA *et al.*, 2016).

Apesar da nomenclatura empregada, microemulsões apresentam geralmente tamanho de gotícula inferior às nanoemulsões, além de um aspecto translúcido. Em geral, o diâmetro das gotículas das macroemulsões está no intervalo de aproximadamente 1 – 100 µm. Portanto, consideradas, em muitos casos, grandes para serem utilizadas no direcionamento para alguns tumores. No outro extremo, estão as microemulsões, cuja as dimensões variam de aproximadamente 10 – 100 nm, sendo dimensionalmente apropriadas para algumas aplicações do tipo “drug delivery”. No entanto, partículas com estas dimensões são pequenas o suficiente para atravessar o endotélio em todas (ou quase todas) as regiões do corpo, chegando tanto nas regiões-alvo quanto em outras regiões que não estão relacionadas à doença (o espaço entre as células saudáveis varia de 15 a 30 nm). Como resultado, muitos dos efeitos adversos dos medicamentos tornam-se presentes, o que reduz o potencial terapêutico destes sistemas. Além do mais, as microemulsões são fortemente afetadas e até mesmo quebradas por mudanças de temperatura e/ou diluições, prejudicando assim suas aplicações como vetores de drogas. Por outro lado, as nanoemulsões, as quais apresentam dimensões de aproximadamente 100 a 500 nm, são estáveis sob condições de estresse (GUPTA *et al.*, 2016) e incapazes de atravessar a parede dos vasos de regiões saudáveis do organismo. Além disso, são pequenas o suficiente para atravessar o endotélio descontínuo dos tumores, que facilita a passagem preferencial para o tecido tumoral, e permanecer no local por mais tempo devido à atividade linfática ineficiente, evento conhecido como efeito de permeabilidade e retenção aumentada (DUNCAN, 1999; MATSUMURA; MAEDA, 1986).

2.2.2. Lipídios

Os lipídios são um dos grupos mais abundantes de biomoléculas no organismo. Eles constituem um grupo heterogêneo de moléculas orgânicas, com uma característica marcante em comum de serem insolúveis em água (hidrofóbicos). Em meio aquoso, essa classe de moléculas tende a apresentar agregação com estruturas diversas, formando tipicamente micelas, lamelas ou vesículas, de dimensões microscópicas ou nanoscópicas. O tipo de estruturação final vai depender da geometria do composto molecular (WARDHAN; MUDGAL, 2017).

As membranas biológicas são exemplos de estruturas que possuem lipídios na sua composição. As membranas delimitam o meio celular, confinando seus componentes e mediando sua comunicação com o meio exterior. Elas são flexíveis e constituem uma barreira altamente seletiva, regulando o trânsito molecular e iônico. Existem diferentes tipos de membranas biológicas, de composição bastante variada, o que reflete na sua especialização funcional, inclusive em função das diferentes proteínas de membrana que nelas contiverem (WARDHAN; MUDGAL, 2017).

Os lipídios exercem diversas funções biológicas, como isolamento térmico e reserva de energia, podem exercer funções regulatórias e controle da homeostase, além de serem componentes de membranas celulares. Alguns exemplos de classes comuns de lipídios são os ácidos graxos, os triacilgliceróis, os esfingolipídios, os compostos esteroidais e os glicerofosfolipídios (FERRIER, 2017).

Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos com cadeia de hidrocarbonetos variando de 4 a 36 átomos de carbono. Nos ácidos graxos típicos, uma das extremidades da cadeia apresenta um grupo hidrofílico, em geral um grupo carboxila. A cadeia de hidrocarbonetos pode ou não conter ligações duplas (insaturações), e/ou ramificações. A nomenclatura dos ácidos graxos representa o número de carbonos da cadeia e o número de ligações duplas, separados por dois pontos. Por exemplo, a nomenclatura do ácido palmítico (Figura 3(a))

é 16:0, pois ele tem 16 átomos de carbono e é saturado, não apresenta ligações duplas. Já o ácido oleico (Figura 3(c)) é representado por 18:1, ele apresenta 18 carbonos e uma ligação dupla. A ligação dupla nos ácidos graxos ocorre, em sua grande maioria, nos carbonos 9 (ácidos graxos monoinsaturados), 12 ou 15, e é representada pelo símbolo Δ com um número sobrescrito (NELSON; COX, 2013).

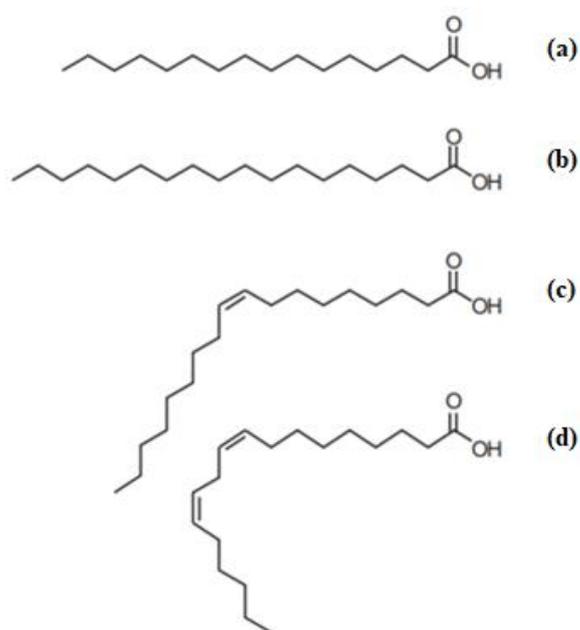


Figura 3. Fórmulas estruturais dos ácidos (a) palmítico (16:0), (b) esteárico (18:0), (c) oleico (18:1) e (d) linoleico (18:2).

Os ácidos graxos insaturados podem se apresentar tanto na isomerização *cis* quanto na isomerização *trans*. De forma simplificada, o isômero *cis* possui em cada átomo de carbono da ligação dupla um ligante igual que está no mesmo lado do plano espacial. No isômero *trans*, os ligantes iguais estão em lados opostos do plano espacial. No caso dos ácidos graxos, esse ligante é o hidrogênio.

Na maioria dos ácidos graxos de ocorrência natural, as ligações duplas estão na isomerização *cis*. A isomerização *trans* ocorre em processos de hidrogenação, processos enzimáticos ou oxidativos (NELSON; COX, 2013).

Ácidos graxos livres são difíceis de serem encontrados nos organismos; eles costumam estar ligados ao glicerol (Figura 4(a)), constituindo os triacilgliceróis ou a esfingosina (Figura 4(b)), constituindo os esfingolípídios (FERRIER, 2017).



Figura 4. Fórmula estrutural (a) do glicerol e (b) da esfingosina.

Os triacilgliceróis (TAG), anteriormente denominados triglicerídeos (TG), são constituídos por três moléculas de ácidos graxos (AG) esterificados a uma molécula de glicerol. Essa ligação ocorre entre os terminais polares das moléculas, hidroxila do glicerol e carboxila dos ácidos graxos, tornando assim a molécula de TAG essencialmente apolar, hidrofóbica e insolúvel em água. A maioria dos triacilgliceróis encontrados na natureza contém as cadeias de ácidos graxos diferentes entre si (NELSON; COX, 2013).

A forma de uma molécula TAG em fase sólida é frequentemente comparada a um "diapasão", com duas cadeias retas ligadas nas posições *sn*-1 e 2 (sentido oposto) e uma cadeia dobrada ligada na posição *sn*-3 (// a direção *sn*-1), que possui uma ligação *gauche* nas proximidades do grupo éster ligado ao glicerol (AKITA; KAWAGUCHI; KANEKO, 2006) (Figura 5).

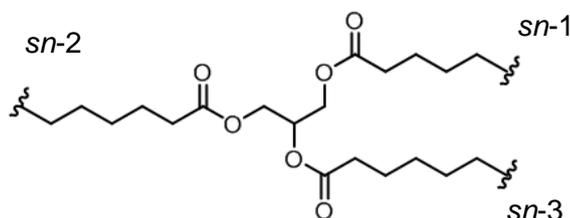


Figura 5. Fórmula estrutural de triglicerídeo.

As gorduras animais e aquelas presentes nos óleos vegetais e produtos lácteos são misturas complexas de triacilgliceróis que diferem nas cadeias de ácidos graxos e no grau de saturação, e, conseqüentemente, no seu ponto de fusão. Os TAGs saturados, caso das gorduras animais, possuem consistência sólida à temperatura ambiente. Já os TAGs cujas

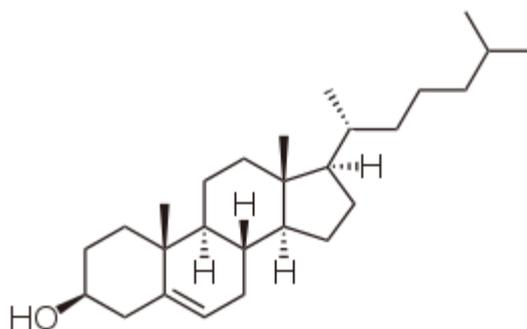


Figura 7. Fórmula estrutural do colesterol.

Os glicerofosfolípidios, também denominados fosfoglicerídios, possuem um glicerol em sua estrutura ligado a duas cadeias de ácidos graxos (carbonos 1 e 2) e uma terceira ligação com o grupo fosfato (carbono 3) que pode se ligar a outros grupos, como, por exemplo, a colina. Este é o caso da fosfatidilcolina, onde as cadeias *sn-1* e *sn-2* apontam para mesmas direções e o grupo principal polar aponta na direção oposta, ver Figura 8 (MOTOYAMA, 2012). Devido a estas características, a molécula dos glicerofosfolípidios contém uma região polar (grupo fosfato e seus ligantes) e outra apolar (devido aos ácidos graxos ligados por meio do glicerol). Assim, por conterem fosfato, os glicerofosfolípidio são denominados fosfolípidios.

Os glicerofosfolípidios são os lipídios predominantes nas membranas (NELSON; COX, 2013).

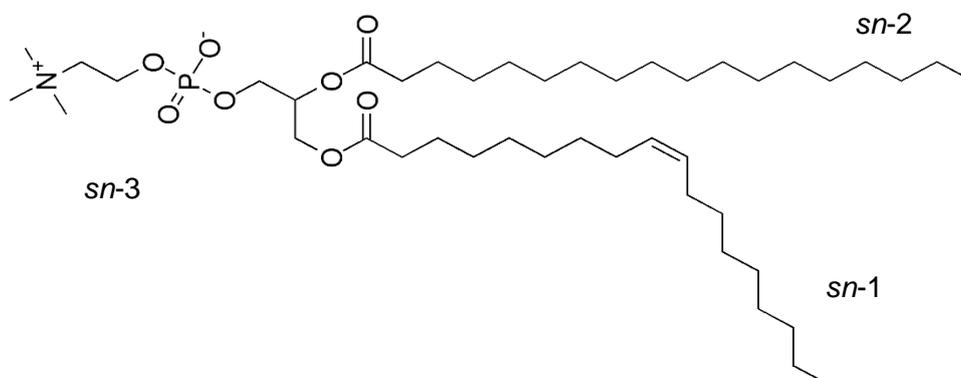


Figura 8. Fórmula estrutural da fosfatidilcolina. Os carbonos 1 e 2 do glicerol são funcionalizados com ácidos graxos, e o carbono 3 é funcionalizado com um grupo aminofosfato.

2.2.3. Nanoemulsões à base de lecitina

A lecitina, o primeiro fosfolípido identificado (por volta de 1847), é talvez o agente emulsificante natural mais amplamente usado na indústria de alimentos. Hoje em dia é igualmente usado em farmácia, cosméticos e biotecnologia como um agente dispersivo e emulsificante eficaz (KLANG; VALENTA, 2011).

As lecitinas são anfifílicas de ocorrência natural e são os principais componentes das membranas celulares de plantas e animais. Elas são misturas de fosfolípidios e têm funções importantes no crescimento e funcionamento das células. Os fosfolípidios mais comuns em misturas de lecitina são fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilserina (PS), esfingomiéline, lisofosfolípidios e outros fosfolípidios de glicerol de composição complexa de ácidos graxos (KLANG; VALENTA, 2011). Entretanto, de longe, a fosfatidilcolina é o fosfolípido mais abundante e, portanto, o nome lecitina foi comumente adotado para a própria substância (98 p/p) (SZNITOWSKA; DABROWSKA; JANICKI, 2002). Contudo, do ponto de vista químico, o nome lecitina refere-se exclusivamente a *sn*-3-fosfatidilcolina (VAN NIEUWENHUYZEN; TOMÁS, 2008b). Uma representação esquemática da lecitina é mostrada na Figura 9.

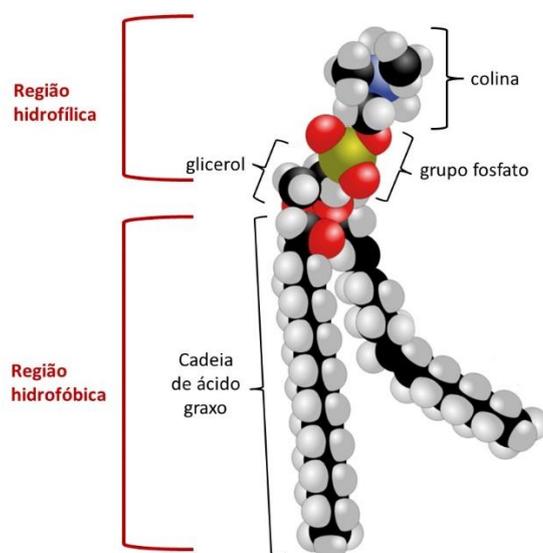


Figura 9. Representação estrutural da lecitina. Fonte: adaptada de <<https://lcfamadas.wixsite.com/conhecimentos/hemostasia-2>>. Acesso em 20 de abril de 2020.

A literatura tem indicado que nanoemulsões à base de lecitina podem conter estruturas lipossomais, especialmente quando são produzidas com excesso de lecitina como emulsificante. Pequenas vesículas unilamelares, bem como estruturas multilamelares, também são relatadas (NORDÉN *et al.*, 2001). Essa diversidade pode ser causada por diferenças na hidratação, temperatura e composição das misturas. Assim, a fosfatidilcolina forma estruturas lamelares com mono e bicamadas bem ordenadas e, portanto, é altamente adequada para estabilização de emulsão. Além do mais, formulações coloidais estabilizadas com fosfolípidios são usadas para solubilizar e incorporar drogas de maneira eficiente. As substâncias ativas podem ser incorporadas no núcleo desses agregados ou dentro das camadas de fosfolípidios. Assim, além de sua função como um agente emulsificante, as lecitinas servem também para melhorar a estabilidade química e a solubilização do fármaco bem como para reduzir a toxicidade e para aumentar a absorção. Finalmente, descobriu-se que a incorporação de drogas na camada fosfolípida interfacial aumenta a estabilidade química da camada (BASPINAR; KECK; BORCHERT, 2010).

Portanto, estudos sobre nanoemulsões revelaram a importância de seu uso nos mais diversos ramos e pesquisas continuam sendo feitas com o intuito de novas aplicações. Dentre esses ramos pode-se citar: cosméticos, alimentos, remoção de poluentes ambientais do solo e efluentes, processos de limpeza e tingimento, semicondutores, liberação controlada e direcionada de fármacos incorporados nesses sistemas, redução de toxicidade, dentre muitas outras aplicações (GUPTA *et al.*, 2016).

Assim, o desenvolvimento de novas formulações de medicamentos é uma área que vem se beneficiando extensivamente do uso das nanoemulsões. Como vimos, os efeitos clínicos desejados na administração de qualquer medicamento são fortemente dependentes da farmacocinética do medicamento. Nesse sentido, as nanoemulsões contendo fármacos incorporados têm se mostrado aliados poderosos na melhora da eficácia de diversos tratamentos há mais de duas décadas e seu uso tem permitido redução

de dosagens e conseqüente redução de efeitos colaterais adversos, com maximização de seus efeitos farmacológicos (BRUXEL *et al.*, 2012).

2.2.4. Fases polimórficas de lipídios em água

A maioria dos fosfolipídios sob hidratação forma a fase lamelar, na qual bicamadas lipídicas empilham-se uma sobre a outra, separadas por uma camada de solução aquosa. Na fase cristalina lamelar (L_c ou fase sub-gel), a qual é formada em temperaturas mais baixas, as cadeias acila são empacotadas de maneira ordenada. A ordem tridimensional é comparável a um estado cristalino. Em temperaturas levemente mais altas, as moléculas de lipídios formam uma fase semelhante a um sólido conhecido como fase de gel lamelar (L_β). Nesta fase, as moléculas estão mais compactadas e as cadeias de acila estão presentes em uma conformação altamente ordenada. Existem fortes interações de van der Waals entre as cadeias de acila. Na fase L_β as cadeias de hidrocarbonetos são dispostas perpendicularmente à bicamada da membrana. A fase $L_{\beta'}$ é do tipo gel semelhante à fase L_β , mas as moléculas estão em um arranjo inclinado. A inclinação é devido à necessidade de empacotamento maior da área do grupo de cabeça (duas vezes) do que das cadeias de diacil. A inclinação acomoda essas incompatibilidades de empacotamento. Em temperaturas mais altas, a fase gel se transforma em uma fase tipo líquida, também conhecida como de fase líquida desordenada (ou líquido-cristalino L_α , ou ainda fase fluida), que representa a maior parte da fase lipídica nas membranas biológicas. Esta fase é caracterizada por considerável desordem nas cadeias acila devido à presença de torções resultantes de ligações duplas insaturadas na conformação *cis* (FOX; UIBEL; HARRIS, 2007; KRANENBURG; SMIT, 2005).

As temperaturas nas quais as transições de fase ocorrem são diferentes para cada lipídio e dependem do grupo principal, comprimento da cadeia, saturação da cadeia, hidratação e histórico térmico. A presença de aditivos na membrana frequentemente altera

a temperatura e o perfil de transição (BUSH; ADAMS; LEVIN, 1980; GENOVA *et al.*, 2018; POPOVA; HINCHA, 2007).

Os lipídios também podem se organizar em fases bi- e tridimensionais. As fases fluidas não lamelar bidimensional são formadas quando os agregados de lipídios formam cilindros indefinidamente longos em vez de bicamadas. Os cilindros na água são dispostos para formar um padrão hexagonal. As fases fluidas 2D mais estudadas são as fases hexagonais normais H_I e as fases hexagonais inversas H_{II} . Na fase H_I , os lipídios agregam-se para formar micelas cilíndricas circulares que se organizam para formar a rede hexagonal, com uma região aquosa polar contínua preenchendo o espaço entre os cilindros. Na fase H_{II} , os lipídios estão dispostos ao contrário, com os grupos de cabeça polares voltados para dentro do cilindro e as cadeias de hidrocarbonetos voltadas para fora. Os grupos de cabeça polar envolvem água, que forma o núcleo central do cilindro.

Entre as fases 3D, a fase cúbica é a fase de fluido tridimensional mais bem caracterizada até agora. Existem dois tipos principais de fases cúbicas. Um tipo consiste em bicamada lipídica bicontínua curva em três dimensões que engloba redes de canais de água ($Ia3d$, $Pn3m$ e $Im3m$). O outro tipo é baseado em empacotamentos complexos de agregados micelares discretos ($Pm3n$). As outras estruturas tridimensionais, como romboédrica e tetragonal, também foram relatadas em alguns sistemas lipídicos em baixas hidratações (WARDHAN; MUDGAL, 2017).

2.2.5 Fases polimórficas: parâmetros de empacotamento crítico

Os lipídios e os ácidos graxos (gorduras e óleos) são insolúveis em água. Contudo, se um dos grupos oxigenados do glicerol estiver substituído por um grupo polar ou carregado eletricamente, o composto vai se dissolver em água de tal modo que suas regiões hidrofóbicas se agrupam e a região hidrofílica interage com a água das vizinhanças. Como resultado, haverá formação de diferentes agregados moleculares

devido à minimização da função de Gibbs em cada caso. Em meio aquoso, os lipídios se auto-organizam para formar uma variedade de sistemas/fases polimórficas de lipídio-água com diferentes geometrias, como micelas, cristais líquidos liotrópicos, micelas inchadas ou microemulsões, emulsões, organogéis ou lipossomas (KLANG; VALENTA, 2011). O tipo da fase polimórfica formada é determinado por uma série de fatores, incluindo a composição (hidrocarbonetos com cadeias curtas e longas, saturadas e insaturadas), concentração lipídica, força iônica, pH da solução aquosa, temperatura, pressão e grau de hidratação (LEWIS; MCELHANEY, 2013). A organização estrutural apresenta alta diversidade morfológica, tais como: pilhas planas de lamelas, tubos hexagonais e gotas esféricas (GREF *et al.*, 2006; VAN NIEUWENHUYZEN; TOMÁS, 2008).

A geometria dos agregados lipídicos é determinada pelo parâmetro de empacotamento crítico ($c_{pp} = V/lS$), que é definido como sendo a razão entre a área da região da cauda hidrofóbica (dada por V/l , onde V é o volume ocupado e l é o comprimento das cadeias de hidrocarbonetos) e a área da superfície do grupo de cabeça polar, dada por S . Com base no valor do parâmetro c_{pp} os lipídios podem ser estruturalmente classificados como cilindros, cones ou cones invertidos com base nos requisitos de empacotamento relativos das duas regiões do lipídio: cadeia acila hidrofóbica e grupo de cabeça polar hidrofílica. O parâmetro de empacotamento crítico determina a arquitetura de agregados formados por lipídios de diferentes formatos (WARDHAN; MUDGAL, 2017). Ou seja, a forma anfifílica do lipídio são classificadas em cones ($c_{pp} < 1/3$), cone truncado ($1/3 < c_{pp} < 1/2$; $1/2 < c_{pp} < 1$), cilindro ($c_{pp} \sim 1$) e cone truncado invertido ($c_{pp} > 1$) resultando em estruturas auto-organizadas como esferas, cilindros, vesículas, lamelas e esferas reversas, respectivamente. Exemplos típicos de agregados do tipo micelas, vesículas (fase líquido-cristalina não lamelar) e Bicamadas (fase lamelar) são mostrados na Figura 10.

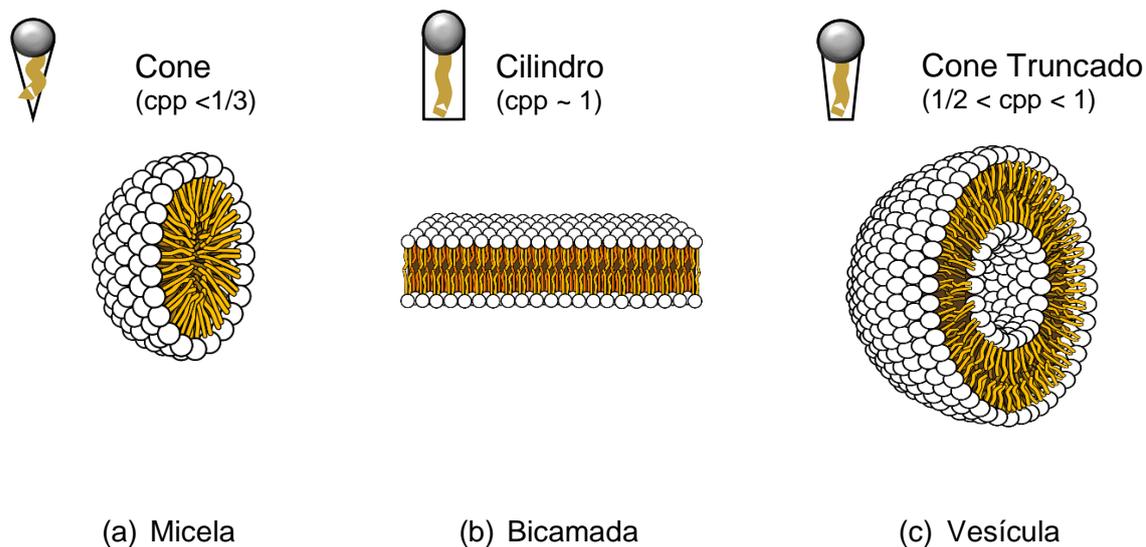


Figura 10. Tipos de agregados lipídicos formados em meio aquoso. Fonte: adaptada de <https://www.quimica.com.br/abc-cosmetologia-nanotecnologia-aplicada-aos-cosmeticos/3/>. Acesso em 17 de julho de 2020.

As micelas são estruturas em que a região hidrofóbica fica localizada no interior, onde praticamente não há presença de água, enquanto que a região hidrofílica fica na superfície em contato com o meio aquoso. Cada unidade do lipídio tem a geometria de um cone e, em meio aquoso, as cadeias de hidrocarboneto evitam o contato com a água, tendendo a se agrupar, e formam uma estrutura essencialmente esférica (Figura 10(a)). Quando o formato da unidade lipídica é cilíndrico, ou seja, a seção transversal da parte polar é semelhante à da cadeia apolar (como por exemplo, nos fosfolipídios e esfingolipídios), forma-se uma camada dupla de moléculas (ver Figura 10(b)). Nessas bicamadas lipídicas, as cadeias de hidrocarbonetos se agregam de modo que a cabeça hidrofílica permanece em contato com a água nas duas faces da bicamada. Contudo, nas laterais, o arranjo geométrico não é tão regular como no seu meio, com dispersão de parte das cabeças polares nessa região. Assim, em baixa concentração de fosfolipídios, essas bicamadas são pequenas. Em alta concentração, porém, as estruturas formadas podem ser muito maiores, de tal modo que a membrana se fecha espontaneamente sobre si mesma, formando uma vesícula esférica com meio aquoso em seu interior (ver Figura 10(c)) (NELSON; COX, 2013).

2.2.5. Espectroscopias de FTIR e Raman na caracterização estrutural de lipídios

Os lipídios possuem propriedades físico-químicas específicas tais como, ponto de fusão (*melt*), tamanho da cadeia do ácido graxo, quantidade e distribuição das duplas ligações, comportamento de cristalização, isomerismo geométrico (*cis/trans*), entre outras. Essas características são essenciais para obter funcionalidades específicas para determinadas aplicações (GUEDES *et al.*, 2017).

As espectroscopias vibracionais Raman e FTIR são técnicas utilizadas para caracterização dessas moléculas e estudo da interação entre elas. Uma das vantagens dessas técnicas é a facilidade de preparação das amostras e velocidade de obtenção dos resultados. Outra vantagem é permitir que sejam feitas análises quantitativas e qualitativas dos óleos e gorduras (BAETEN *et al.*, 1998; VOORT; ISMAIL; SEDMAN, 1994) .

As técnicas de Raman e FTIR têm sido sistematicamente utilizadas na caracterização dos diferentes sistemas lipídicos e composições. De modo geral, tanto os ácidos graxos e fosfolipídios quanto os triacilgliceróis (TAGs) existem na forma de múltiplos polimorfos e politipos, especialmente quando hidratados. Diferentes polimorfos e politipos, ou seja, estruturas que diferem na orientação das camadas do cristal, dão origem a espectros vibracionais muito semelhantes, diferentes apenas na região de números de onda mais baixos. Por outro lado, para polimorfos, as características espectrais dependem fortemente de como os lipídios se cristalizam. A atribuição depende da estrutura e do empacotamento lateral de suas cadeias alquílicas: hexagonal, ortorrômbica e triclínica, respectivamente (DA SILVA; BRESSON; ROUSSEAU, 2009; SATO, 2001). Além disso, a disposição e a orientação das moléculas na fase policristalina diferem de acordo com o estado polimórfico. As fases α e β' são caracterizadas por um 'diapasão', enquanto na forma β , as moléculas de TAGs formam a chamada conformação da 'cadeira empilhada' (BRESSON; EL MARSSI; KHELIFA, 2006). Portanto, diferentes polimorfos mostram propriedades físicas distintas, mas, após a fusão, produzem líquidos idênticos (GHOTRA;

DYAL; NARINE, 2002). Assim, a via de transição de fase dos lipídios é realizada da forma L_{α} para L_{β} , por meio da fase $L_{\beta'}$ (BRESSION; EL MARSSI; KHELIFA, 2006). No geral, dependendo das condições, os lipídios podem produzir diferentes espectros vibracionais que variam particularmente na transição de fase líquida para sólida.

Genova *et al.* (2018) realizaram uma pesquisa baseada na caracterização de membranas de bicamada do fosfolípido SOPC (1-estearoil-2-oleoil-*sn*-glicerol-3-fosfocolina) com misturas de colesterol usando Raman e FTIR. Foi demonstrado que a incorporação de colesterol nas membranas induz diversas alterações nas propriedades da bicamada, incluindo variação na sua espessura. O objetivo do trabalho era o de estudar as características físicas específicas da membrana lipídica e a análise dos espectros obtidos indicou a existência de ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxila do colesterol e a carbonila dos grupos éster da interface polar-apolar da membrana, especificamente nas cadeias hidrofóbicas, *sn*-2, que possuem ligação dupla de carbono na metade da cadeia. Como resultado, a adição de colesterol ao fosfolípido SOPC alterou as propriedades das unidades estruturais na cabeça polar, na interface e na região hidrofóbica. (GENOVA *et al.*, 2018)

Outro estudo envolvendo diferentes concentrações de colesterol em lecitina usando espectroscopia Raman foi realizado por Tantipolphan *et al.* (2006). Neste trabalho, misturas binárias (1:1) entre lecitina e colesterol foram preparadas de diferentes maneiras. Algumas mudanças espectrais foram observadas no espectro Raman da mistura em relação ao da lecitina pura. Uma dessas mudanças é o deslocamento do modo vibracional relacionado ao estiramento assimétrico do grupo metil da região colina. Como esses deslocamentos variam de acordo com o modo de preparação da mistura, os autores concluíram que diferentes níveis de ligação de hidrogênio podem ter ocorrido nos diferentes modos de preparo (TANTIPOLPHAN *et al.*, 2006). Em um trabalho recente, Zhu *et al.* (2019) também fizeram análise espectroscópica Raman para estudar o mecanismo da estabilidade de nanoemulsões de proteínas de soja-fosfatidilcolina (ZHU *et al.*, 2019). Neste trabalho, os resultados de espectroscopia Raman mostraram que as diferentes metodologias de

preparo das nanoemulsões aumentaram tanto o conteúdo α -hélice quanto as estruturas desordenadas da camada fosfolipídica, mas diminuíram as β -estruturas. Akita, Kawaguchi e Kaneko (2006) usaram as técnicas de Difração de Raios X (DRX), Raman e FTIR para realizar um estudo sobre a influência da insaturação *cis* nas três fases cristalinas (α , β' e β) do triacilglicerol trioleína (três moléculas de ácidos oleicos ligados ao grupo glicerol). Os resultados demonstraram que a insaturação *cis* exerce forte influência na estrutura metaestável da fase α . No que diz respeito às fases β e β' , foi verificado que a estrutura da subcélula e a ordem conformacional das cadeias de hidrocarbonetos nestas fases se assemelham aos TAGs saturados. Ou seja, as cadeias de acila formam estruturas de subcélulas T \parallel e O \perp com cadeias de acila conformacionalmente ordenadas em ambas as fases.

Tai *et al.* (2018) estudaram o efeito de derivados de esterol (colesterol, β -sitosterol e ergosterol) nas propriedades dos lipossomos de lecitina de soja e de gema de ovo. Para isso foi empregada a espectroscopia FTIR. De acordo com as alterações do número de onda dos espectros, foi possível investigar a possível interação ocorrida entre os grupos funcionais nas bicamadas, especialmente entre o grupo acil e a região do grupo principal da molécula fosfolipídica. Os autores concluíram que estas interações são de fundamental importância na preparação de lipossomos baseados em esteróis e lecitina. De acordo com eles, o conhecimento destas interações pode ser utilizado para melhorar a eficiência e o tempo de liberação do fármaco encapsulado. Pawlikowska-Pawlega *et al.* (2014) usaram ^1H NMR e FTIR para estudar a interação de quercetina com membrana lipossômica (formada por DPPC). A análise por FTIR permitiu constatar que a interação entre estas substâncias ocorre via ligação de hidrogênio entre o grupo hidroxila e a cabeça polar do lipídio. Como a quercetina exerce efeitos benéficos à saúde, o estudo sobre sua incorporação é muito importante para a eficácia de compostos fenólicos, tanto como fator antioxidante como fator anticâncer. Em completo, Tantipolphan *et al.* (2007), usando a técnica ATR-FTIR (Espectroscopia de reflexão total atenuada no infravermelho por

transformada de Fourier), estudaram como ocorre a adsorção de albumina sérica bovina (BSA) na lecitina.

Como pode ser constatado acima, as espectroscopias de FTIR e Raman têm sido usadas com sucesso na caracterização estrutural de lipídio e seus derivados, comprovando assim que estas técnicas podem ser utilizadas no estudo de nanoemulsões.

2.3. Nanoemulsões à base de lecitina e óleo de pequi: câncer de mama

O câncer de mama é uma das doenças mais desafiadoras desse século. Devido aos graves efeitos colaterais e à resistência a múltiplas drogas, os tratamentos convencionais do câncer de mama estão se mostrando cada vez menos eficazes. Diante deste problema, muitas pesquisas visam buscar novas abordagens terapêuticas que possam auxiliar ou substituir os tratamentos convencionais (MITRA; DASH, 2018).

A eficácia de um tratamento de câncer envolve aspectos muito mais complexos do que somente a bioatividade do fármaco utilizado. Uma questão fundamental, por exemplo, é a forma de administração do medicamento. Além disso, outros fatores levados em consideração na eficácia de um tratamento são os aspectos farmacocinéticos: i) a garantia da integridade molecular ou de seus metabólitos no organismo, visando maximizar sua eficiência; ii) a biodisponibilidade do princípio ativo na concentração correta ao longo do tempo; iii) a garantia de que o fármaco seja entregue (*drug delivery*) com alta eficiência principalmente no local de sua ação, com redução de efeitos colaterais; iv) que tenha sua liberação controlada, visando manter seus níveis de concentração com máxima eficácia. A fim de se alcançar esses parâmetros, desde a última década, tem-se buscado o desenvolvimento dos processos de encapsulamentos dos princípios bioativos, dentre os quais, nos interessa particularmente aqui o uso das nanoemulsões.

O uso de nanoemulsões como sistemas de carreamento e liberação de compostos hidrofóbicos cresceu, principalmente, com a finalidade de aumentar a solubilização de fármacos de reduzida hidrossolubilidade, sendo extensamente utilizados nas áreas farmacêutica, alimentícia e cosmética. Uma das aplicações farmacêuticas consiste no seu uso para o tratamento de câncer com o intuito de direcionar o fármaco ao tecido cancerígeno.

Dentre os principais candidatos de agente anticâncer, estão os compostos bioativos derivados de fontes naturais (AMARAL et al., 2019; NEWMAN; CRAGG, 2016). Acredita-se que alguns compostos naturais podem combater a agressividade do câncer de mama, inibir a proliferação de células cancerígenas e modular as vias relacionadas ao câncer (MITRA; DASH, 2018).

A utilização de produtos naturais vem crescendo com o avanço das pesquisas nos tratamentos de doenças devido aos adventos de novas tecnologias. Pelo fato de o câncer ser uma das doenças que mais causam morte no mundo, o potencial uso de produtos naturais como agentes anticâncer foi reconhecido na década de 1950 pelo *National Cancer Institute* (AMARAL et al., 2019).

O Brasil possui a maior diversidade de espécies de plantas no mundo. Infelizmente menos de 10% dessas espécies têm suas características biológicas avaliadas (AMARAL et al., 2019). Nessa riqueza biológica, o pequi (árvores do gênero *Caryocar*, nativa do cerrado brasileiro – Figura 11) tem se destacado. O pequi é uma fruta muito utilizada na culinária regional do centro-oeste brasileiro e na medicina popular. Ele tem sido utilizado no tratamento de várias enfermidades, como cicatrização de feridas, doenças respiratórias, queimaduras, entre outras (SENA et al., 2010, ROLL et al., 2018), seu óleo é rico em moléculas antioxidantes como carotenoides, vitamina C, compostos fenólicos e diversos óleos essenciais (GUEDES et al., 2017; MIRANDA-VILELA, 2009)(MIRANDA-VILELA, 2009). Além do mais, o óleo tem se mostrado um forte aliado no desenvolvimento do tratamento e prevenção de alguns tipos de câncer, como carcinogênese pulmonar (COLOMBO et al., 2015), fígado (PALMEIRA et al., 2016) e câncer de mama (MIRANDA-

VILELA *et al.*, 2013). Palmeira *et al.* (2016) mostraram que o óleo de pequi é capaz de reduzir lesões pré-neoplásicas no fígado. Em complemento, Colombo *et al.* (2015) estudaram a modificação do câncer de pulmão em camundongos devido às propriedades antioxidantes do óleo de pequi. Adicionalmente, Miranda-Vilela *et al.* (2013) usaram modelos animais de câncer de mama em que o óleo de pequi potencializou os efeitos anticâncer da terapia com hipertermia magnética. Por fim, Ombredane *et al.* (2020) constataram que o óleo de pequi, além de ser um componente estrutural da nanoemulsão, também atua como agente citotóxico contra as células do câncer de mama, o que torna esse sistema promissor para aumentar a atividade antitumoral do óleo de pequi em células do câncer de mama.



Figura 11. A árvore e o fruto do pequi (*Caryocar brasiliense*). Fonte: <<https://www.todafruta.com.br/pequi/>>. Acesso em 20 de abril de 2020.

O óleo de pequi possui uma variabilidade de ácidos graxos que depende de sua localização geográfica e condições climáticas. Estudos sobre a caracterização físico-química do óleo de pequi são realizados com o intuito de obter a porcentagem dos ácidos graxos encontrados na amostra (SENA *et al.*, 2010). De modo geral, sua composição é formada majoritariamente pelo ácido oleico (C18:1), seguido de ácido palmítico (C16:0).

Contudo, vale ressaltar que em gorduras naturais esses componentes estão principalmente na forma de triacilgliceróis (TAG).

A obtenção das funcionalidades específicas dos óleos naturais e gorduras, com relação ao seu uso no encapsulamento de fármacos, está, evidentemente, relacionada com as propriedades físico-químicas (p. ex. ponto de fusão, tamanho da cadeia hidrocarbônica, quantidade e distribuição das duplas ligações, comportamento de cristalização, isomerismo geométrico (*cis/trans*), dentre outras), bem como com as propriedades da molécula de fármaco (GUEDES *et al.*, 2017).

2.4. Metodologia

2.4.1. Preparação das amostras

O óleo de pequi foi doado pela Farmacotécnica (Brasília, Brasil). O perfil lipídico, por cromatografia, indicou a presença de ácidos graxos saturados e insaturados, principalmente ácido oleico (C18:1 Δ 9) (50,75% \pm 0,38) e ácido palmítico (C16:0) (40,65% \pm 0,05). Também foram encontrados menores teores de ácido esteárico (4,57% \pm 0,60), linoléico (3,22% \pm 0,40) e palmitoléico (2,80% \pm 0,40). A lecitina de ovo, adquirida da Lipoid (Ludwigshafen, Alemanha), possui aproximadamente 80% de sua composição formada por fosfatidilcolina e 20% de complementares informados no site do fabricante.

A preparação das nanoemulsões foi realizada conforme descrito no artigo de Ombredane *et al.* (2020). Em resumo, foram preparadas diferentes concentrações de lecitina de ovo e óleo de pequi em PBS para determinar qual a melhor proporção para a formação das nanopartículas: 1:2 (p/p), 1:1 (p/p), 2:1 (p/p), além da solução sem óleo de pequi, denominada branco, 1:0 (p/p). Essas diferentes concentrações foram diluídas em (1:7,5 (v/v)) e sonicadas a 20 kHz sob banho de gelo por 6 min. As nanoemulsões preparadas foram armazenadas a 4°C e protegido da luz.

2.4.2. Técnicas experimentais

2.4.2.1. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier - FTIR

As medidas de FTIR foram realizadas usando um espectrômetro de infravermelho por transformada de Fourier da marca *Bruker*, modelo Vertex 70, no Laboratório de Espectroscopia Óptica do Instituto de Física da Universidade de Brasília.

A análise foi realizada usando o módulo de reflexão total atenuada (ATR-FTIR). Foram executadas em média 96 varreduras, com uma resolução de 4 cm^{-1} , no intervalo de 400 a 4000 cm^{-1} , com mesma amostragem para o sinal de fundo, antes de cada medição. É importante mencionar que a precisão do número de onda do instrumento é melhor do que $0,01\text{ cm}^{-1}$ em 2000 cm^{-1} na medição ATR-FTIR (*Bruker Vertex 70*). Portanto, os deslocamentos do número da ordem de 1 cm^{-1} são considerados significativos.

2.4.2.2. Raman

As medidas RAMAN foram realizadas no espectrômetro *LabRAM HR Evolution*, da marca *Horiba*, do Laboratório de Espectroscopia Óptica do Instituto de Física da Universidade de Brasília.

O Espectrômetro Raman é equipado com microscópio confocal, detector CCD (*Charge Coupled Device*) e rede de 1800 linhas/mm. As medidas foram realizadas com um laser de He-Ne sintonizado na linha 633 nm (1 mW) e focalizado na amostra com uma objetiva de 50x.

2.5. Resultados e discussões

É bem conhecido na literatura que algumas moléculas podem exercer efeitos no ordenamento conformacional de camadas fosfolipídicas (BENESCH et al., 2014; POPOVA;

HINCHA, 2007). Por exemplo, os esteróis têm efeitos pronunciados no comportamento da transição da fase gel para a fase líquido cristalino de membranas lipídicas. Quando adicionados a lipídios na fase de gel (L_{β}), os esteróis tendem a liquefazer a estrutura da membrana rompendo a estrutura inclinada altamente ordenada das cadeias de hidrocarbonetos. Por outro lado, o colesterol tende a solidificar os lipídios na fase líquida desordenada (L_d), devido à interação hidrofóbica entre o esteroide heterocíclico e as cadeias acil lipídicas. Em ambos os casos, concentrações mais elevadas destes agentes resultam na formação de uma fase intermediária, conhecida como fase líquida ordenada (L_o). Na fase L_o , as caudas de fosfolipídios têm ordem superior à fase de gel, mas mantêm fluidez lateral semelhante à fase L_{α} (BUSH; ADAMS; LEVIN, 1980; GENOVA *et al.*, 2018; MENDELSON, 1972). Estes efeitos são mais fortes com lipídios contendo cadeias acila completamente saturadas e tornam-se progressivamente mais fracos com um grau crescente de insaturação, estando completamente ausentes com lipídios contendo ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (KARIEL; DAVIDSON; KEOUGH, 1991). Segundo estudos anteriores, estes comportamentos se devem principalmente às diferentes complexidades das moléculas (BUSH; ADAMS; LEVIN, 1980; GENOVA *et al.*, 2018; MENDELSON, 1972; TAI *et al.*, 2018). Por exemplo, a existência de cadeias laterais extras ou ligações duplas podem aumentar o efeito do impedimento estérico e enfraquecer a interação molecular entre as duas camadas (TAI *et al.*, 2018). Assim, pequenas alterações na estrutura química dos fosfolipídios ou das moléculas presentes no meio, podem levar a alterações conformacionais no esqueleto do fosfolipídico e alterar o espaçamento entre as cadeias lipídicas.

Como resultado do rearranjo conformacional das camadas lipídicas, são verificadas alterações em diferentes regiões dos espectros FTIR e Raman, as quais dependem dos domínios hidrofóbicos, interfacial e do grupo de cabeça da camada fosfolipídica envolvida na nova conformação espacial. Portanto, analisar as alterações espectrais correspondentes a cada um desses domínios podem fornecer informações a respeito do novo arranjo espacial. Assim, nesta seção são descritas e analisadas as mudanças nas

assinaturas espectrais específicas de cada grupo molecular decorrente das interações entre a membrana de lecitina e o óleo de pequi.

A fim de investigar a interação entre o óleo de pequi e a membrana fosfolipídica que compõe as nanoemulsões à base de lecitina de ovo e óleo de pequi, medidas de espectroscopias Raman e FTIR foram realizadas em nanoemulsões com diferentes proporções de óleo de pequi e lecitina. Para comparação, uma nanoemulsão sem o óleo de pequi e o óleo de pequi puro foram também estudadas.

A Figura 12 mostra espectros FTIR do óleo de pequi puro (i) e das nanoemulsões com formulações óleo:lecitina (p/p): NE2:1 (67 mol% de óleo de pequi) (ii), NE1:1 (50 mol%) (iii), NE1:2 (33 mol%) (iv) e NE0:1 (0 mol% de óleo) (v). Ao observar a Figura 12, nota-se que o espectro de absorção do óleo de pequi puro difere substancialmente dos espectros das amostras de nanoemulsões. As principais diferenças são as ausências de bandas de absorvância na região de $950 - 1300 \text{ cm}^{-1}$. As características mais importantes em todos os espectros estão relacionadas à presença das cadeias de hidrocarbonetos, que para todos os lipídios são observadas nas regiões de 1050-1200, 1250-1300, 1400-1500 e 2800-3100 cm^{-1} , associadas às vibrações de estiramento simétrico e antissimétrico do metileno (~ 2852 e $\sim 2920 \text{ cm}^{-1}$, respectivamente) e ao grupo metil em aproximadamente 2955 cm^{-1} ($\nu_{as}(CH_3)$) (WONG, 1984). Outras bandas associadas com as diferentes vibrações dos grupos metil e metileno, tais como a deformação e vibração em tesoura da ligação CH_2 e a deformação simétrica do grupo (CH_3) são encontradas em aproximadamente 721, 1465 e 1380 cm^{-1} , respectivamente (TANTIPOLPHAN *et al.*, 2007). Por fim, as vibrações de estiramento das ligações $C = C$ e $C = O$ (grupo éster carbonila) são encontradas em torno de 1650 e 1740 cm^{-1} , respectivamente (PAWLIKOWSKA-PAWŁĘGA *et al.*, 2013). As vibrações da cabeça polar, presentes nas moléculas de lecitina, são representadas pelas bandas associadas aos estiramentos simétricos ($\sim 1090 \text{ cm}^{-1}$) e antissimétrico ($\sim 1235 \text{ cm}^{-1}$) do grupo PO_2^- , parcialmente sobrepostos com a banda dos modos de estiramento simétrico ($\sim 1065 \text{ cm}^{-1}$) da ligação ($C - O - P - O - C$) e a banda associada com a vibração de estiramento antissimétrico do grupo $N^+(CH)_3$, que pode ser encontrada em

aproximadamente 970 cm^{-1} . As bandas em torno de 820 , 765 , e 465 cm^{-1} são atribuídas às vibrações assimétricas e simétricas do PO^- e deformação da ligação ($O-P-O$), respectivamente (KOYAMA; TODA; KYOGOKU, 1977).

Como relatado nos dois últimos parágrafos, a composição molecular dos dois principais componentes (óleo de pequi e lecitina) das nanoemulsões aqui estudadas são muito similares. Como resultado, com exceção das vibrações provenientes do grupo de cabeça polar das fosfatidilcolinas que compõem a lecitina, não é possível separar nos espectros de FTIR e Raman as contribuições individuais de cada componente. Como resultado, todos os dados discutidos neste trabalho são referentes aos modos vibracionais das cadeias de hidrocarbonetos provenientes de ambas componentes moleculares que compõem as nanoemulsões.

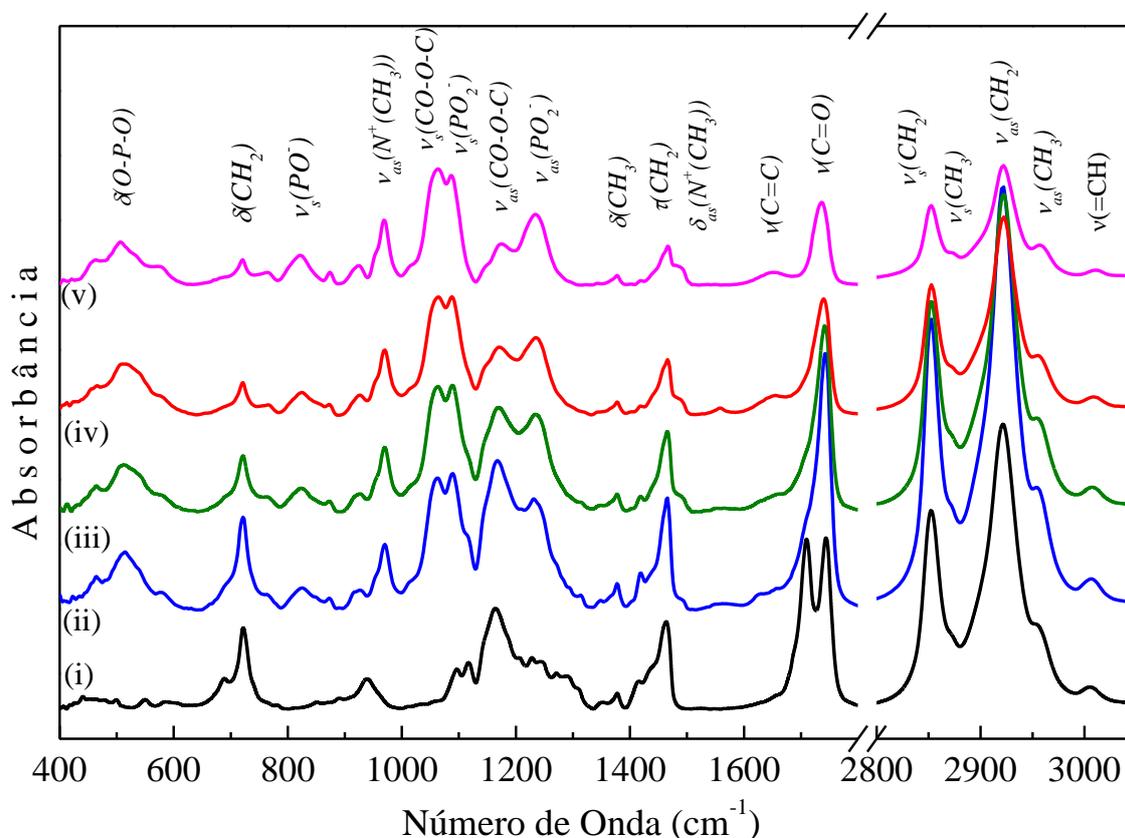


Figura 12. Espectro FTIR do óleo de pequi puro (i) e das nanoemulsões NE2:1 (67 mol% de óleo de pequi) (ii), NE1:1 (50 mol%) (iii), NE1:2 (33 mol%) (iv) e NE0:1(0 mol% de óleo de pequi) (v).

Como pode ser observado na Figura 12, a incorporação de diferentes teores de óleo de pequi nas nanoemulsões à base de lecitina resulta em sutis mudanças nos espectros FTIR. Vale mencionar que as energias vibracionais dos modos $\nu_{as}(N^+(CH_3)_3)$ e $\nu_{as}(PO_2^-)$, posicionadas respectivamente em 970 e 1234 cm^{-1} não mudam com a adição de diferentes teores de óleo de pequi. O número de onda mais baixo da vibração $\nu_{as}(PO_2^-)$, quando comparada com o fosfolípido anidro (1264 cm^{-1}), como relatado na literatura (WONG; MANTSCH, 1988), indica que é bastante provável que as nanoemulsões contenham uma certa quantidade de água molecular ligada a esse grupo via ponte de hidrogênio. Contudo, a constância da energia vibracional desta banda indica que o teor de moléculas de água ligadas a esse terminal não depende do teor do óleo de pequi presente na nanoemulsão. A constância da energia vibracional da ligação $(N^+(CH_3)_3)$ pode ser explicada levando-se em conta que as ligações de hidrogênios entre a molécula de água e este sítio no fosfolípido não ocorrem porque a carga positiva impede uma interação entre o átomo de nitrogênio do grupo $N^+(CH_3)_3$ e os átomos de hidrogênio da molécula de água.

Portanto, a ausência de qualquer mudança nas frequências vibracionais das bandas associadas à cabeça polar do fosfolípido sugere que os grupos PO_2^- e $N^+(CH_3)_3$ não estão diretamente envolvidos nas interações entre o fosfolípido e as moléculas que compõem o óleo de pequi. Por outro lado, pequenas alterações espectrais devido à presença de óleo de pequi nas amostras de nanoemulsões podem ser observadas nas regiões das vibrações do tipo tesoura ($\tau(CH_2) \sim 1450 \text{ cm}^{-1}$), de estiramento simétrico ($\nu_s(CH_2) \sim 2852 \text{ cm}^{-1}$) e antissimétrico ($\nu_{as}(CH_2) \sim 2922 \text{ cm}^{-1}$) do grupo CH_2 e vibrações de estiramento do grupo éster carbonila $\nu(C=O)$ em torno de 1740 cm^{-1} para as nanoemulsões e, em torno de 1710 e 1743 cm^{-1} para o óleo de pequi puro (ver Figura 12(i)).

É bem conhecido da literatura que a banda de absorção $\nu(C=O)$ é conformacionalmente sensível, responde a mudanças na polaridade de seu ambiente local e são influenciadas por ligações de hidrogênio e outras interações com ligantes do meio vizinho. Essas propriedades provaram ser muito úteis, pois elas podem ser interpretadas

em termos de mudanças na estrutura ou hidratação da interface polar/apolar da camada lipídica (LEWIS; MCELHANEY, 2013). É observado que a banda $\nu(C=O)$ dos lipídios em geral exibe uma assimetria (ou mesmo a presença de duas bandas distintas) que muda com o arranjo espacial do lipídio, com o grau de hidratação ou com a introdução de aditivos (BUSH; ADAMS; LEVIN, 1980; DOHI; KANEKO; KAWAGUCHI, 2002; LEWIS; MCELHANEY, 2013; UMEMURA; CAMERON; MANTSCH, 1980). Por exemplo, foi verificado que o espectro de FTIR do fosfolipídio dimiristoilfosfatidilserina (DMPS) desidratado (LEWIS; MCELHANEY, 2013) ou do TAG trioleína (AKITA; KAWAGUCHI; KANEKO, 2006), quando na fase L_{β} , apresenta dois picos bem resolvidos em aproximadamente ~ 1725 e 1740 cm^{-1} . Contudo, ao transitar para a fase L_{α} , estes picos colapsam formando uma banda larga e assimétrica.

Foi originalmente sugerido que as componentes de alta e baixa frequência da banda $\nu(C=O)$ surgem em função da desigualdade conformacional dos dois grupos éster presentes das cadeias reta $sn-1$ e dobrada $sn-2$ do fosfolipídio ($sn-3$ no caso do TAG), respectivamente. No entanto, tal atribuição foi seriamente questionada em estudos de espectroscopia de infravermelho de bicamadas fosfolipídicas totalmente hidratadas e marcadas com $^{13}\text{C} = O$ na cadeia $sn-2$ (LEWIS; MCELHANEY, 1992). Foi mostrado que, em multicamadas hidratadas de fosfolipídios com cadeias acil $sn-2$ marcadas com ^{13}C , ambas as componentes de estiramento da ligação $C=O$ ($sn-1$ não marcada e $sn-2$ marcada) são largas e cada uma delas formadas por duas componentes adjacentes e de intensidades diferentes. Quando a cadeia $sn-2$ do grupo éster é marcado ($^{13}\text{C} = O$), as bandas de estiramento da carbonila marcada aparecem em frequências $\sim 44\text{ cm}^{-1}$ menor, e, desta forma, verifica-se a presença de quatro bandas separadas (MANTSCH; MCELHANEY, 1991). Portanto, em bicamadas lipídicas hidratadas e não marcadas, a banda $\nu(C=O)$ é descrita com contornos assimétricos com um componente agudo próximo a 1740 cm^{-1} e um ombro largo centrado próximo a 1728 cm^{-1} .

Mais recentemente, foi verificado que, em bicamadas lipídicas tanto anidro quanto hidratadas, esses componentes são geralmente atribuídos a subpopulações de grupos éster carbonil 'livres' ($I_{livre} \sim 1743 \text{ cm}^{-1}$ - cadeias $sn-1$) e 'ligados' a hidrogênios ($I_{ligado} \sim 1725 \text{ cm}^{-1}$ - cadeias $sn-2$). Nos lipídios hidratados, a banda 'ligada' estaria associada à interação do terminal $C = O$ éster com moléculas de água, via ligações de hidrogênio. No caso do lipídio anidro, a interação se daria entre o terminal $C = O$ éster e o grupo colina do próprio fosfolípido (PASENKIEWICZ-GIERULA *et al.*, 1999; PAWLIKOWSKA-PAWLEGA *et al.*, 2014; POPOVA; HINCHA, 2007).

Comportamento semelhante também foi observado na introdução de aditivos em bicamadas fosfolipídicas (POPOVA; HINCHA, 2007; SALGADO; VILLALAÍN; GÓMEZ-FERNÁNDEZ, 1995). Por exemplo, foi observado que a adição de colesterol em bicamadas de diferentes fosfolípidos, tais como o DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina) hidratado (BENESCH *et al.*, 2014; UMEMURA; CAMERON; MANTSCH, 1980) e o POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine) anidro (POPOVA; HINCHA, 2007) leva a um aumento da intensidade da banda $\nu(C = O)_{ligado}$ com relação da banda $\nu(C = O)_{livre}$. Este comportamento tem sido explicado em termos da ligação do terminal do grupo OH do colesterol com o grupo carbonil da cadeia $sn-2$ (ou $sn-1$) do fosfolípido.

Com base na discussão acima, a presença das duas bandas de absorção na região entre $1700 - 1750 \text{ cm}^{-1}$ no espectro de FTIR do óleo de pequi (Figura 13(v)) evidencia que os TAGs que compõem o óleo de pequi estão parcialmente ordenados a temperatura ambiente (mais próximo da fase L_{β} do que da fase L_{α}). Contudo, não se pode afirmar o mesmo para as cadeias de hidrocarbonetos que compõem a lecitina (Figura 13(i - iv)), as quais estão aparentemente mais desordenadas.

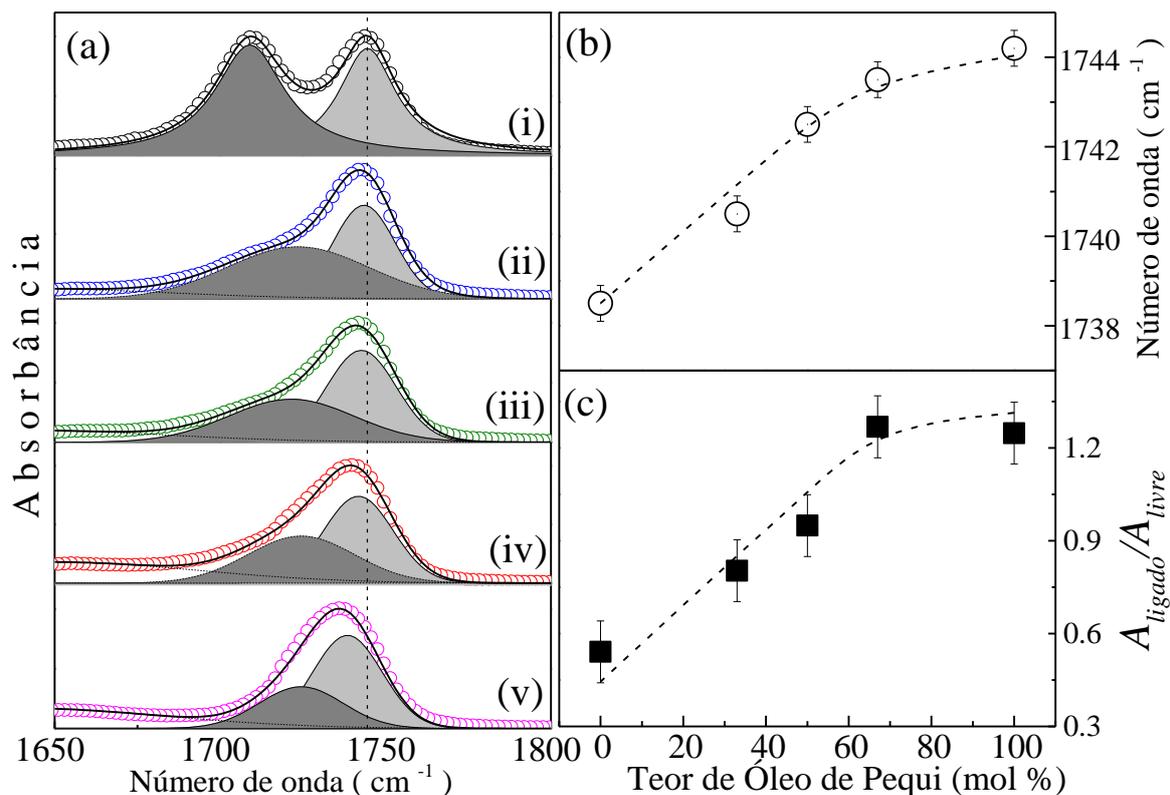


Figura 13. (a) Espectro FTIR na região do $C = O$ para o óleo de pequi (i) e para as nanoemulsões: NE2:1 (67 mol%) (ii), NE1:1 (50 mol%) (iii), NE1:2 (33 mol%) (iv) e NE0:1 (0 mol% de óleo de pequi). (b) Número de onda do pico em torno de 1740 cm^{-1} e (c) razão entre as áreas das bandas $\nu(C = O)$ ligada e livre ($A_{\text{ligado}}/A_{\text{livre}}$) ambas em função do teor de óleo de pequi presentes nas nanoemulsões.

Um estudo detalhado do perfil das bandas de absorção do grupo $C = O$ (ver Figura 13(a)) mostra que a banda $\nu(C = O)$ pode ser deconvoluída em duas componentes usando funções Gaussianas. Como relatado anteriormente, estas bandas podem ser atribuídas a populações de grupos éster carbonil 'livres' ($I_{\text{livre}} \sim 1743\text{ cm}^{-1}$) e 'ligados' ($I_{\text{ligado}} \sim 1725\text{ cm}^{-1}$) via ligações de hidrogênios. Note que a energia vibracional da componente $\nu(C = O)_{\text{livre}}$ bem como a razão entre as intensidades integradas dos picos em 1725 e 1743 cm^{-1} ($A_{\text{ligado}}/A_{\text{livre}}$) crescem com o teor de óleo de pequi introduzido (Figura 13(b) e (c)). Estes comportamentos indicam que a introdução do óleo de pequi leva a um aumento da polaridade no ambiente próximo ao grupo acila dos hidrocarbonetos que compõem as nanoemulsões, possivelmente devido a uma interação via ponte de hidrogênio. Como resultado, as cadeias de hidrocarbonetos das moléculas que compõem a lecitina e o óleo

de pequi estariam mais compactadas, favorecendo ao aumento da conformação *all-trans*, típica de uma camada relativamente mais ordenada, em detrimento da conformação *gauche*, onde as moléculas lipídicas exibem um aumento na taxa e na amplitude de movimento inter- e intramolecular. Portanto, o comportamento mostrado na Figura 13 sugere que, embora a membrana fosfolipídica formadora das nanoemulsões não estejam bem ordenadas, a introdução do óleo de pequi aparentemente promove um ordenamento.

Se a hipótese de que a introdução do óleo de pequi promove um ordenamento da camada fosfolipídica (lecitina) está correta, outras mudanças espectrais são esperadas. Por exemplo, as vibrações internas das cadeias de hidrocarboneto têm se mostrado sensíveis na caracterização de transições da fase gel para a fase líquido-cristalino. As bandas espectrais mais utilizadas para determinar a ordenamento espacial das cadeias de hidrocarbonetos lipídicos são os modos de estiramento simétrico e antissimétrico do grupo CH_2 , encontrados em torno de 2850 e 2920 cm^{-1} , respectivamente. As energias vibracionais destas bandas são sensíveis à conformação da cadeia acila e respondem pelas mudanças na proporção de rotâmeros *trans/gauche* das cadeias acila dos ácidos graxos e dos sistemas de membrana natural (GENOVA *et al.*, 2018; MANTSCH; MCELHANEY, 1991). Como resultado, na transição de fase $L_\beta \rightarrow L_\alpha$, observa-se um aumento nas energias vibracionais dos modos $\nu_s(CH_2)$ e $\nu_{as}(CH_2)$ de 1,5 a 2,5 cm^{-1} (LEWIS; POHLE; MCELHANEY, 1996; MANTSCH; MCELHANEY, 1991). Este também é o caso para o modo vibracional do grupo metil ($\nu_{as}(CH_3) \sim 2955 cm^{-1}$) bem como para o modo de estiramento da ligação $\nu(=CH)$ ($\sim 3010 cm^{-1}$) das cadeias insaturadas. O comportamento acima descrito pode ser observado na Figura 14(a - c). Portanto, a hipótese de que a introdução do óleo de pequi promove um ordenamento na camada fosfolipídica é aparentemente verdadeira.

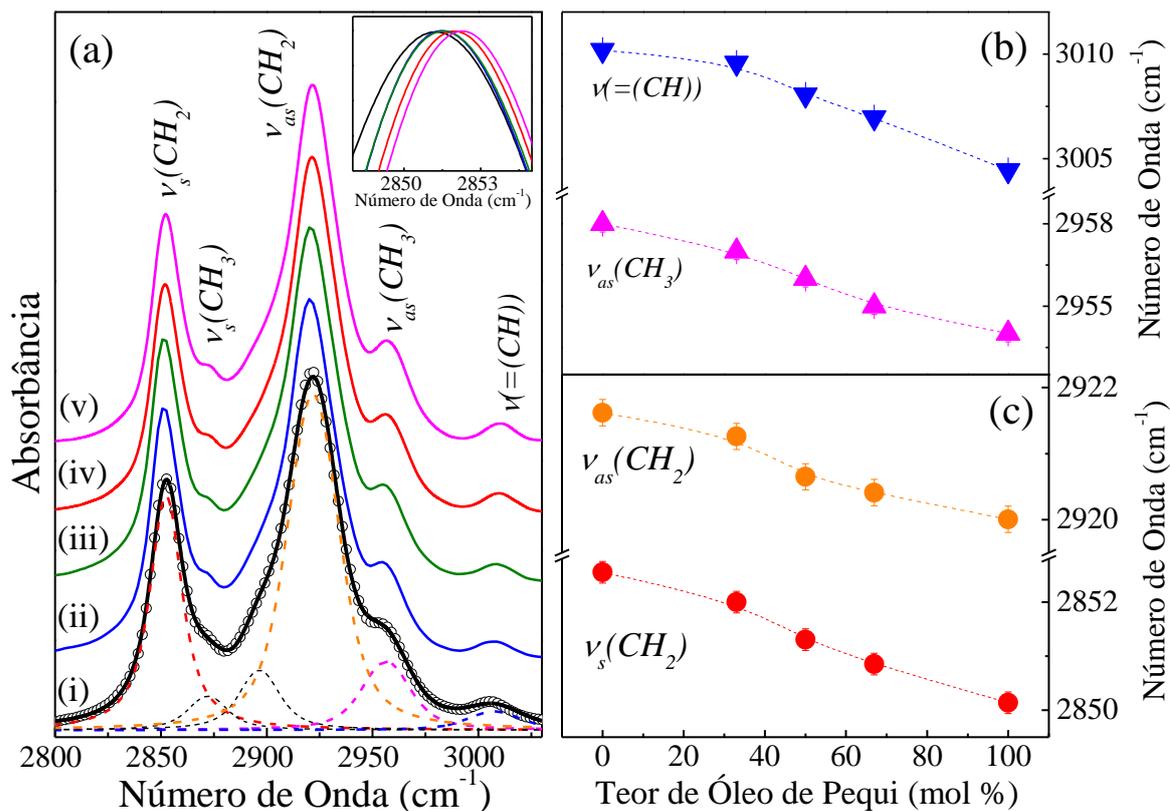


Figura 14. (a) Espectros FTIR na região em torno de 2900 cm^{-1} para o óleo de pequi puro (i) e para as nanoemulsões NE2:1 (67 mol% de óleo de pequi) (ii), NE1:1 (50 mol%) (iii), NE1:2 (33 mol%) (iv) e NE0:1 (0 mol% de óleo de pequi) (v). (b) Número de onda dos modos vibracionais $\nu(=CH)$ e $\nu_{as}(CH_3)$ e (c) $\nu_s(CH_2)$ e $\nu_{as}(CH_2)$ ambas em função do teor do óleo de pequi presente nas nanoemulsões. Na inserção no painel (a) são mostrados uma ampliação dos espectros em torno da região da vibração $\nu_s(CH_2)$.

Embora a espectroscopia de FTIR ofereça informações da ordem conformacional de sistemas baseados em hidrocarbonetos, esta técnica, no entanto, sofre de grandes limitações, como por exemplo: inatividade e debilidade dos principais modos vibracionais dos alcanos, intensa absorção da água, baixa resolução e baixa sensibilidade experimental da absorção no infravermelho quando comparada aos resultados obtidos por espectroscopia Raman (ORENDORFF; DUCEY; PEMBERTON, 2002).

Assim, experimentos de espectroscopia Raman foram realizados nas mesmas amostras com o objetivo de reforçar que a introdução do óleo de pequi promove um certo ordenamento das cadeias de hidrocarbonetos que compõem as nanoemulsões.

São várias as evidências espectrais Raman que revelam o estado de ordenamento das cadeias de hidrocarboneto, entre elas pode-se citar: as razões entre as intensidades

(altura dos picos) $I_{\nu_{as}(CH_2)}/I_{\nu_s(CH_2)}$, $I_{\nu_{as}(CH_2)}/I_{\nu_s(CH_3)}$, $I_{(C-C)_t}/I_{(C-C)_g}$ e razão entre as intensidade integradas (áreas dos picos) ($A_{\delta_{as}(CH_3)}/A_{\delta(CH_2)}$). Os números de onda dos picos $\nu_s(CH_2)$, $\nu_{as}(CH_2)$ e $\delta(CH_2)$ também serão analisados (ORENDORFF; DUCEY; PEMBERTON, 2002); COLLARD; GENOVA *et al.*, 2018; SINJAB; NOTINGHER, 2019). Assim, com o objetivo de elucidar as sutilezas do ordenamento conformacional das cadeias de hidrocarbonetos que compõem as nanoemulsões aqui estudadas, os comportamentos de todos estes parâmetros, como função do teor de óleo de pequi, serão investigados a seguir.

A Figura 15 mostra os espectros Raman, obtidos a temperatura ambiente, do óleo de pequi puro (i) e das nanoemulsões com formulações óleo:lecitina (p/p): NE2:1 (67 mol% de óleo de pequi) (ii), NE1:1 (50 mol%) (iii), NE1:2 (33 mol%) (iv) e NE0:1(0 mol% de óleo de pequi) (v). Uma comparação entre os espectros Raman (Figura 15) e os espectros FTIR (Figura 12) evidencia que, embora compartilhem quase todos os modos vibracionais, os perfis espectrais Raman e de FTIR são muito diferentes. As principais diferenças são as ausências dos modos vibracionais associados ao fosfato ($(O - P - O)$ em $\sim 465 \text{ cm}^{-1}$; PO^- em ~ 765 e $\sim 820 \text{ cm}^{-1}$ e PO_2^- em ~ 1090 e $\sim 1235 \text{ cm}^{-1}$) e a inversão das intensidades dos modos de estiramentos $\nu(C = C) \sim 1660 \text{ cm}^{-1}$ e $\nu(C = O) \sim 1740 \text{ cm}^{-1}$. Os modos vibracionais $\nu(C = C)$ dependem muito de sua conformação e são geralmente encontrados em torno de 1655 e 1670 cm^{-1} para as conformações *cis* e *trans*, respectivamente. Portanto, como esperado, pode-se concluir que as ligações insaturadas dos precursores (óleo de pequi e lecitina), bem como das nanoemulsões, estão na conformação *cis*.

Note que as ausências, no espectro Raman, dos modos vibracionais envolvendo o íon de fosfato permitem um estudo mais detalhado dos modos de vibração do esqueleto da cadeia carbônica do hidrocarboneto. Por exemplo, é possível analisar os modos vibracionais das ligações $(C - C)$ na região de $1000 - 1200 \text{ cm}^{-1}$ e das vibrações de deformação do CH_2 ($1200 - 1500 \text{ cm}^{-1}$). As bandas de estiramento das ligações carbono-carbono randomicamente orientadas na conformação *gauche* ($(C - C)_g$) podem ser

encontradas em torno de 1087 e 1120 cm^{-1} . Por sua vez, as bandas em torno de 1065 e 1130 cm^{-1} representam os modos de estiramento simétrico (1065 cm^{-1}) e antissimétrico (1130 cm^{-1}) da ligação $C - C$ na conformação *all-trans* ($(C - C)_t$) (SAILER; VIAGGI; NÜSSE, 1997; YELLIN; LEVIN, 1977). Enquanto os modos de abano simétrico do CH , provenientes das ligações *cis*-duplas não conjugadas ($=CH$), são encontradas em $\sim 1268 \text{ cm}^{-1}$. Por último, as vibrações de torção e de tesoura da ligação CH_2 são encontradas em torno de 1300 e 1440 cm^{-1} , respectivamente (JAMIESON *et al.*, 2018; SAILER; VIAGGI; NÜSSE, 1997; SENA *et al.*, 2010).

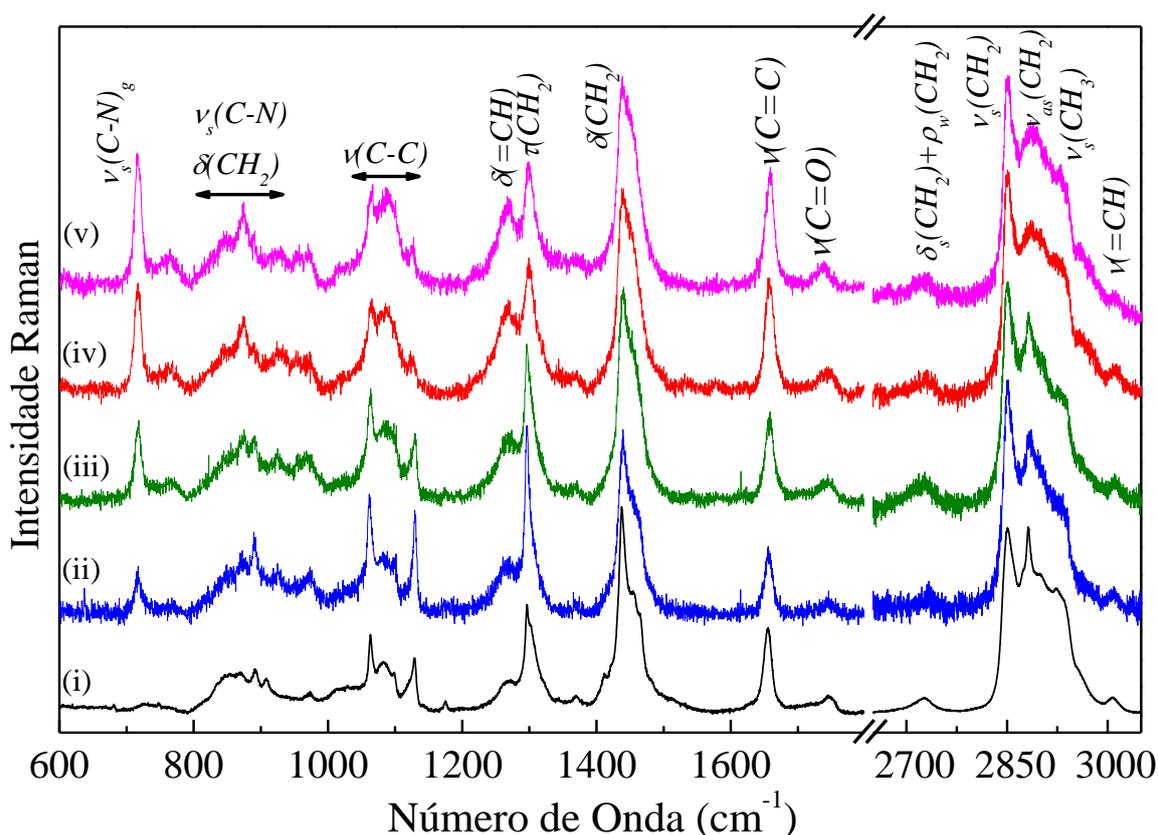


Figura 15. Espectros Raman do óleo de pequi puro (i) e das nanoemulsões NE2:1 (67 mol% de óleo de pequi) (ii), NE1:1 (50 mol%) (iii), NE1:2 (33 mol%) (iv) e NE0:1 (0 mol% de óleo de pequi) (v).

Os modos vibracionais de estiramento das ligações $C - H$ (2800 – 3100 cm^{-1}) são provavelmente as regiões espectrais mais bem estudadas nos espectros dos lipídios. Há três picos principais que são intensivamente utilizados na análise do grau de conformação das cadeias dos hidrocarbonetos dos lipídios. Os picos em torno de 2850 e 2880 cm^{-1} são

atribuídos aos modos de estiramento simétrico ($\nu_s(CH_2)$) e antissimétrico ($\nu_{as}(CH_2)$) das ligações CH_2 , respectivamente, e a banda em 2930 cm^{-1} é atribuída em parte ao modo de estiramento simétrico $C - H$ do grupo metil da cadeia de hidrocarboneto e ao modo de estiramento simétrico $C - H$ do grupo metil da porção colina (ABBATE; WUNDER; ZERBI, 1984; BUNOW; LEVIN, 1977; FOX; UIBEL; HARRIS, 2007; ORENDORFF; DUCEY; PEMBERTON, 2002). Contudo, o perfil dessa região espectral é um pouco mais complexo do que o descrito anteriormente. Esta complexidade é em grande parte resultado de interações de ressonância de Fermi entre o modo $\nu_s(CH_2)$ e combinações binárias dos modos de deformação do CH_2 situados na região de $1250 - 1500\text{ cm}^{-1}$. Esta interação gera duas outras intensas bandas em aproximadamente 2900 e 2940 cm^{-1} , sendo que, sobreposta a esta última banda, encontra-se o modo de estiramento simétrico da ligação CH_3 ($\nu_s(CH_3)$) (ABBATE; ZERBI; WUNDER, 1982; SNYDER; HSU; KRIMM, 1978; WONG, 1984).

Como relatado anteriormente, é bem documentado na literatura que a intensidade das bandas vibracionais Raman encontradas na região de $2800 - 3100\text{ cm}^{-1}$ são sensíveis tanto ao comprimento da cadeia carbônica quanto ao empacotamento inter-cadeia dos lipídios em geral (BUNOW; LEVIN, 1977; COLLARD; SINJAB; NOTINGHER, 2019; GENOVA *et al.*, 2018; HUANG; LAPIDES; LEVIN, 1982; LEVIN; KEIHN; HARRIS, 1985; LEWIS; POHLE; MCELHANEY, 1996; MANTSCH; MCELHANEY, 1991). De forma simplificada, quando na fase líquida (amorfo), os espectros Raman na região $2800 - 3000\text{ cm}^{-1}$ se caracterizam por um pico intenso em $\sim 2850\text{ cm}^{-1}$ e um grande platô que se estende de $2880 - 2950\text{ cm}^{-1}$. Por sua vez, na fase líquido-cristalino (L_α) os espectros Raman, na mesma região, são dominados por dois picos intensos e moderadamente estreitos em aproximadamente 2850 e 2880 cm^{-1} e duas bandas largas e pouco intensas em 2930 e 2970 cm^{-1} . Por fim, ao transitar para a fase gel (L_β), além de se deslocarem para menores energias, a banda em $\sim 2850\text{ cm}^{-1}$ se divide em duas e perde intensidade, enquanto a banda em 2880 cm^{-1} torna-se mais estreita e intensa que a primeira (BUNOW;

LEVIN, 1977; DA SILVA; ROUSSEAU, 2008; HUANG; LAPIDES; LEVIN, 1982; LEVIN; KEIHN; HARRIS, 1985). Este comportamento é explicado em termos das mudanças na proporção entre estruturas com conformeros *trans/gauche*. Na estrutura *all-trans* (ordenada), a banda de Fermi em 2940 cm^{-1} é fraca porque compartilha sua intensidade (proveniente da ressonância de Fermi com o modo ($\nu_s(\text{CH}_2)$) com a outra banda de Fermi localizada em $\sim 2900\text{ cm}^{-1}$. Quando os conformeros *gauches* são gerados, a desordem altera a condição de ressonância de Fermi e reduz a intensidade da banda 2900 cm^{-1} , devolvendo intensidade à banda em $\sim 2930\text{ cm}^{-1}$. Assim, a razão entre as intensidades (I_{2880}/I_{2930}) é proporcional ao teor de conformadores *all-trans*. Portanto, são construídas duas razões (marcadores Raman) a partir das intensidades (altura) das bandas $\nu(\text{CH}_2)$. A primeira (I_{2880}/I_{2850}) é uma medida da densidade do empacotamento lateral das cadeias de hidrocarbonetos e é ela própria uma indicação da razão ordem/desordem destas cadeias (ADISHCHEV *et al.*, 2018; LEVIN; KEIHN; HARRIS, 1985; ORENDORFF; DUCEY; PEMBERTON, 2002). Por outro lado, a razão I_{2880}/I_{2930} reflete a proporção de conformeros *trans/gauche* das cadeias de hidrocarbonetos que compõem as camadas lipídicas (BUSH; ADAMS; LEVIN, 1980). Maiores valores de ambos os marcadores indicam uma maior proporção de conformeros *trans/gauche*, o que leva a uma maior interação entre as cadeias de hidrocarbonetos e conseqüentemente a um maior ordenamento das cadeias lipídicas. Adicionalmente, as frequências das bandas em ~ 2850 e 2883 cm^{-1} representam o nível de ordem conformacional e acoplamento entre cadeias lipídicas. Frequências decrescentes significam aumento da interação inter-cadeias (CSISZÁR *et al.*, 2006; DA SILVA; BRESSON; ROUSSEAU, 2009; LEVIN; KEIHN; HARRIS, 1985).

Como pode ser observado na Figura 16, enquanto as energias vibracionais dos modos $\nu_s(\text{CH}_2)$ e $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ (Figura 16(b)) decrescem, as razões I_{2880}/I_{2850} e I_{2880}/I_{2930} (Figura 16(c)) crescem com o aumento do teor de óleo de pequi. O decréscimo do primeiro marcador indica que a introdução do óleo de pequi aumenta as interações laterais entre as cadeias de hidrocarbonetos, diminuindo a liberdade rotacional e vibracional das ligações CH_2 e CH_3 . Por outro lado, o crescimento das razões I_{2880}/I_{2850} e I_{2880}/I_{2930} são

consistentes com o progressivo ordenamento das cadeias devido à progressiva eliminação dos conformadores *gauche* no arranjo espacial das moléculas lipídicas que compõem as nanoemulsões.

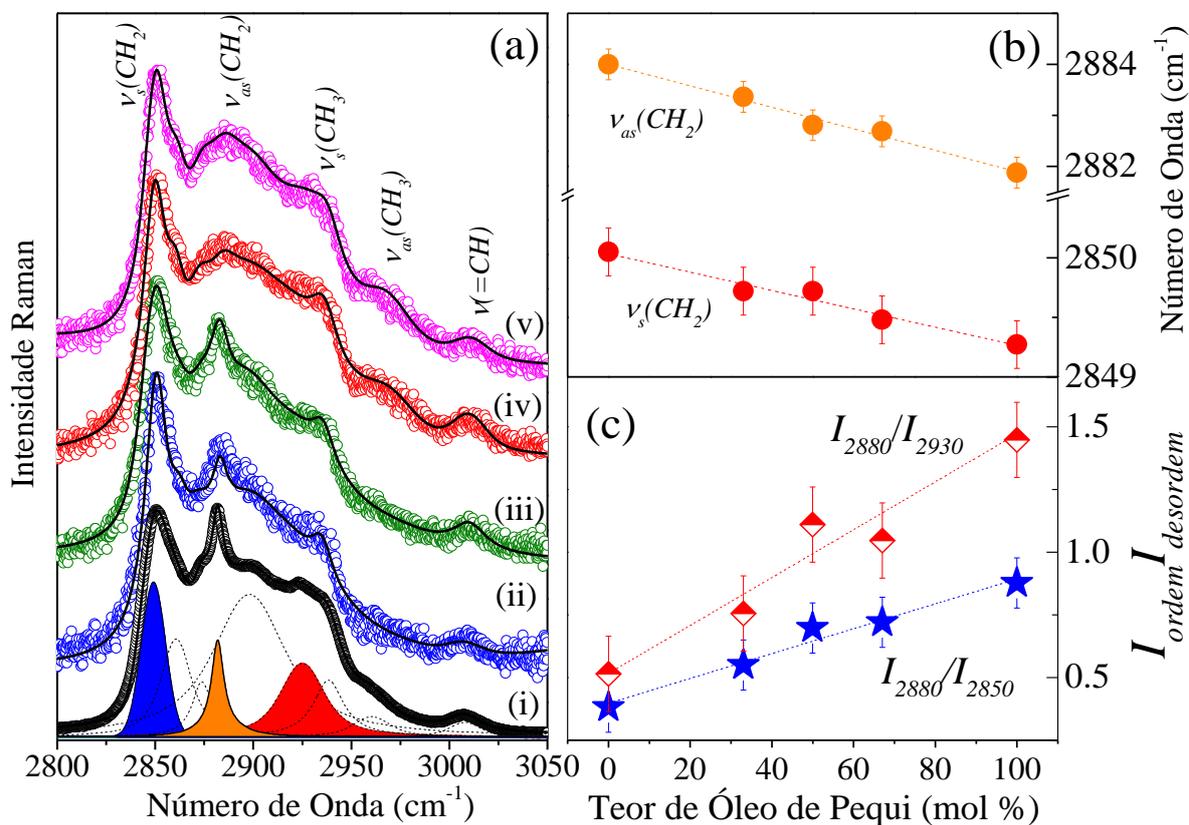


Figura 16. (a) Espectros Raman na região 2800 – 3050 cm^{-1} do óleo de pequi puro (i) e das nanoemulsões NE2:1 (67 mol% de óleo de pequi) (ii), NE1:1 (50 mol%) (iii), NE1:2 (33 mol%) (iv) e NE0:1(0 mol% de óleo de pequi) (v). (b) dependência do número de onda dos modos vibracionais $\nu_s(\text{CH}_2)$ e $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ e (c) dependência da razão entre as intensidades I_{2880}/I_{2850} e I_{2880}/I_{2930} ambas em função do teor de óleo de pequi presentes. É importante mencionar que as I_{2880}/I_{2850} e I_{2880}/I_{2930} estão relacionadas a razão $I_{ordem}/I_{desordem}$ (ORENDORFF; DUCEY; PEMBERTON, 2002).

O teor relativo entre os conformeros *trans/gauche* e a consequente razão ordem/desordem das cadeias de hidrocarboneto que compõem as nanoemulsões também podem ser avaliadas por meio do perfil espectral da região compreendida entre 1000 – 1200 cm^{-1} (ABBATE; ZERBI; WUNDER, 1982; GENOVA *et al.*, 2018; LEVIN; KEIHN; HARRIS, 1985; ORENDORFF; DUCEY; PEMBERTON, 2002). Na fase ordenada dessa região espectral, o espectro Raman dos lipídios em geral é dominado por bandas em torno de 1065 e 1130 cm^{-1} , associadas às vibrações de estiramento das cadeias *all-trans*

completamente estendidas. Com o aumento do grau de desordem, a intensidade dessas bandas diminui e uma banda larga em torno de 1087 cm^{-1} tem sua intensidade aumentada em virtude do aumento do número de confórmeros *gauche*. Portanto, ao examinar a relação entre as intensidades das bandas associadas aos confórmeros *trans* com relação às intensidades das bandas associadas aos confórmeros *gauche* ($(I_{(C-C)_t}/I_{(C-C)_g})$), pode-se obter uma medida da densidade do empacotamento lateral da cadeia de hidrocarboneto, que é uma indicação de ordem.

A Figura 17 mostra o efeito do óleo de pequi nas intensidades relativas dos modos vibracionais associados as configurações *trans* e *gauche* na região de $1000 - 1150\text{ cm}^{-1}$. Nota-se que o espectro Raman, à temperatura ambiente, do óleo de pequi puro (Figura 17(a - i)) mostra picos estreitos e relativamente intensos em torno de 1065 e 1130 cm^{-1} e uma banda larga e relativamente mais fraca em $\sim 1087\text{ cm}^{-1}$. A presença desta banda evidencia que, embora exista uma pequena fração de confórmeros *gauche* nas cadeias de hidrocarboneto que compõem o óleo de pequi puro, estas cadeias encontram-se relativamente ordenadas. Por outro lado, um comportamento oposto é observado no espectro Raman da nanoemulsão sem o óleo de pequi (Figura 17(a - v)). O perfil espectral demonstra que um importante movimento molecular está presente na estrutura das cadeias de hidrocarbonetos, o que significa que as interação intra-cadeias são relativamente mais fracas. Os espectros das nanoemulsões com 33, 50 e 67 mol % de óleo de pequi evidenciam um crescente aumento na razão entre os confórmeros *trans/gauche*. Este comportamento é melhor evidenciado nas Figura 17(b) e (c), onde é mostrado que as razões entre as intensidades das bandas associadas aos confórmeros *trans* (1065 e 1130 cm^{-1}) com relação a bandas *gauche* (1087 cm^{-1}) crescem com o aumento do teor de óleo de pequi. Este resultado é consistente com o resultado encontrado na região de estiramento da região do CH_2 ($2800 - 3100\text{ cm}^{-1}$).

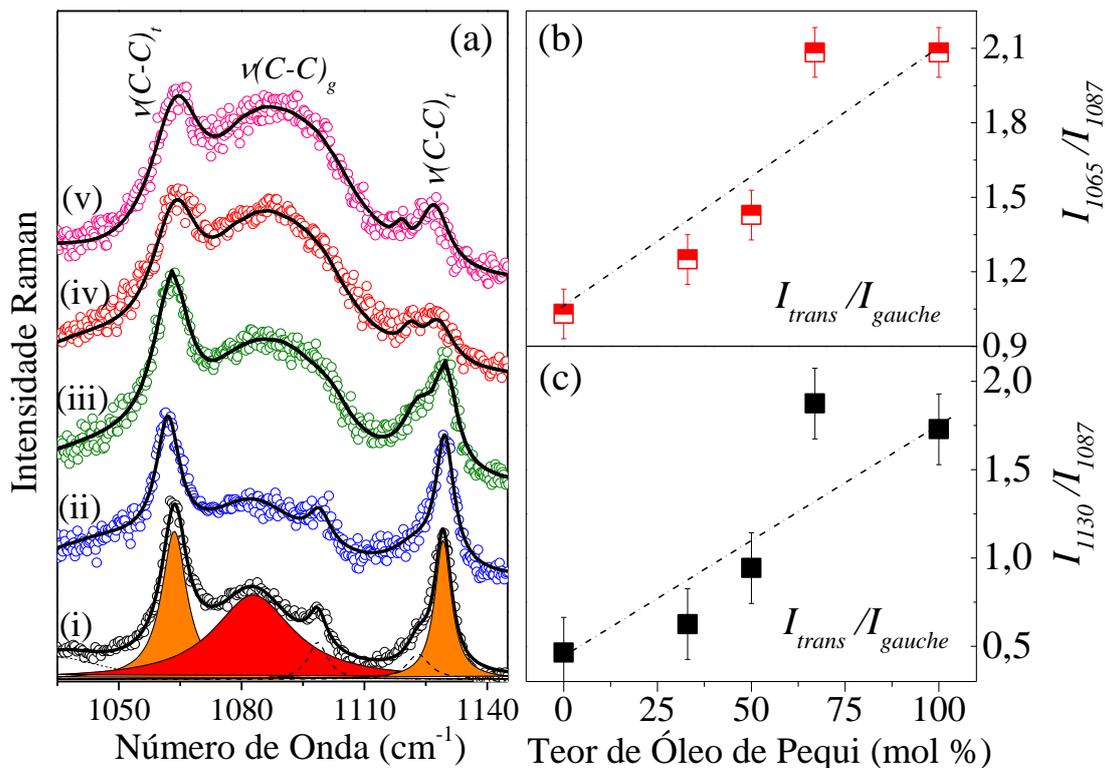


Figura 17. (a) Espectros Raman na região 1000 – 1150 cm^{-1} , associadas aos modos vibrações das configurações *trans* e *gauche* das ligações (C-C) do óleo de pequi puro (i) e das nanoemulsões NE2:1 (67 mol%) (ii), NE1:1 (50 mol%) (iii), NE1:2 (33 mol%) (iv) e NE0:1(0 mol% de óleo de pequi) (v), (b) dependência da razões entre as intensidades das bandas associadas aos conforméros *trans* (b)1065 e (c)1130 cm^{-1} com relação a bandas *gauche*, 1087 cm^{-1} , ambos em função do teor de óleo de pequi.

Enquanto as frequências e as intensidades (altura dos picos) dos modos de estiramento das ligações (C – C) e CH_2 fornecem uma descrição qualitativa da ordem conformacional das cadeias de hidrocarbonetos, as frequências e as áreas das bandas associados aos modos de deformação encontrados na região de 1300-1500 cm^{-1} fornecem um meio para avaliar a microagregação na fase de gel dos fosfolípidios (YELLIN; LEVIN, 1977). Mudanças nesta região do espectro podem diagnosticar os arranjos de empacotamento da cadeia alquila, pois refletem aumentos concomitantes da mobilidade da cadeia de hidrocarbonetos e a proporção do conforméros *trans/gauche* (BUSH; ADAMS; LEVIN, 1980; KAMIŃSKI *et al.*, 2014; MENDELSON; MOORE, 1998; YELLIN; LEVIN, 1977). A banda em torno de 1300 cm^{-1} é formada pela sobreposição de vários modos vibracionais, incluído as deformações no plano e fora do plano das ligações CH_2 e

outros modos de deformação da cadeia de hidrocarboneto. Tanto as intensidades quanto as frequências destes modos mudam quando as cadeias de hidrocarbonetos transitam da fase líquida para a fase cristalina e são principalmente sensíveis a alterações de conformidade *trans/gauche* (FOX; UIBEL; HARRIS, 2007; ORENDORFF; DUCEY; PEMBERTON, 2002). A variação da frequência deste modo está relacionada ao grau de interação entre as cadeias, com o maior acoplamento correlacionado com a redução de sua frequência vibracional. Assim, o comportamento mostrado nas Figura 18(a) e (b) evidencia que o óleo de pequi induz um aumento da interação entre as cadeias de hidrocarbonetos, reduzindo a proporção de conformeros *gauche*, o que aumenta o ordenamento das cadeias.

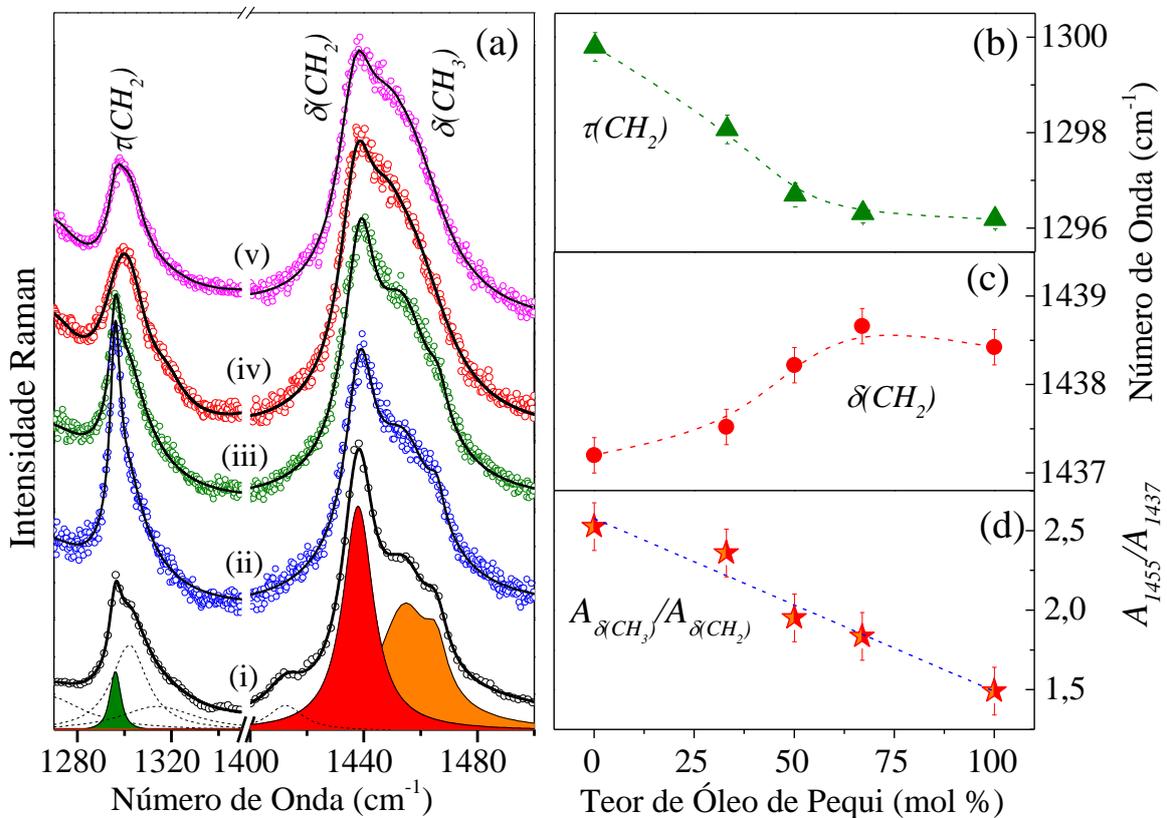


Figura 18. (a) Espectros Raman na região 1270 – 1500 cm^{-1} , associadas aos modos deformações das ligações CH_2 do óleo de pequi puro (i) e das nanoemulsões NE2:1 (67 mol%) (ii), NE1:1 (50 mol%) (iii), NE1:2 (33 mol%) (iv) e NE0:1 (0 mol% de óleo de pequi) (v). Dependências dos números de onda dos modos vibracionais $\tau(\text{CH}_2)$ (b) e $\delta(\text{CH}_2)$ (c) e dependência da razão entre as áreas entre os modos vibracionais $\tau(\text{CH}_2)$ e $\delta(\text{CH}_2)$ (d), ambos em função do teor de óleo de pequi.

A interpretação do comportamento observado para a banda em torno de 1450 cm^{-1} não é simples (ver Figura 18). Isto porque as interações entre os modos vibracionais cujas simetrias são as mesmas levam a ressonâncias de Fermi entre o modo fundamental Raman ativo, $\nu_2(\delta = 0; \delta(CH_2))$ e o harmônico de $2\nu_8(\delta = \pi)$ ($\nu_8 = \rho(CH_2) \sim 790\text{ cm}^{-1}$: ativo no infravermelho) (BUSH; ADAMS; LEVIN, 1980; MOTOYAMA, 2012). Como resultado desta ressonância, o modo vibracional em 1450 cm^{-1} se divide em dois: um modo com simetria A_g em $\sim 1440\text{ cm}^{-1}$ e outro com simetria B_{3g} em 1455 cm^{-1} .

Para os casos onde são envolvidas fortes interações inter-cadeias dentro do cristal, como por exemplo nas estruturas ortorrômbricas, o modo Raman ativo $\nu_2^a(\delta = 0)$ está localizado em $\sim 1418\text{ cm}^{-1}$ (A_g) enquanto a ressonância de Fermi entre o modo $\nu_2^b(\delta = 0)$ e o harmônico de $2\nu_8(\delta = \pi)$ leva formação de outras duas bandas em 1440 e 1465 cm^{-1} (ambos com simetria B_{3g}). Portanto, a banda em $\sim 1418\text{ cm}^{-1}$ está associada com a presença de estruturas cristalinas ortorrômbricas (L_β) (ABBATE; ZERBI; WUNDER, 1982; SNYDER; HSU; KRIMM, 1978; WUNDER, 1981). No estudo do polimorfismos do TAG triestearina ($C_{57}H_{110}O_6$), por exemplo, foi verificado que, quando no estado líquido, o espectro Raman apresenta uma banda larga na região de $1425 - 1475\text{ cm}^{-1}$, evidenciando a sobreposição de vários modos vibracionais associados com o fato de que, no estado líquido, o TAG não está organizado em uma estrutura específica. Por outro lado, quando na fase L_α , dois picos largos em ~ 1435 e $\sim 1455\text{ cm}^{-1}$ são observados. Este resultado demonstra que um certo grau de ordenamento da estrutura cristalina está presente. Por fim, quando cristalizado na fase L_β , três máximos bem definidos foram observados em aproximadamente 1418 , 1440 e 1450 cm^{-1} (DA SILVA; BRESSON; ROUSSEAU, 2009). Além do mais, para sistemas envolvendo as fosfatidilcolinas 1,2-dimiristoil, 1,2-dipalmitoil e 1,2- distearoil submetidos a diferentes temperaturas, foi demonstrado que, na fase gel, o perfil da banda Raman centrada em torno de 1440 cm^{-1} é formado por um pico intenso em $\sim 1436\text{ cm}^{-1}$ e um fraco ombro em torno de 1455 cm^{-1} . Com o aumento da temperatura, quando a fase líquido cristalino é alcançada, foi observado que, além de se deslocarem

para menores energia, a intensidade da banda em torno de 1455 cm^{-1} aumenta fortemente (YELLIN; LEVIN, 1977). Resultado semelhante foi também encontrado para do DPPC (1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina) contendo Anfotericina B, também em diferentes temperaturas (KAMIŃSKI *et al.*, 2014). Em ambos os casos, os resultados foram explicados em termos do enfraquecimento da interação inter-cadeias devido ao aumento da temperatura, o que leva a um aumento do movimento intramolecular e do número de confórmeros *gauche*. Para as nanoemulsões aqui estudadas, os comportamentos espectrais observados são opostos aos verificados nos casos anteriormente descritos.

Os dados Raman apresentados nas Figura 18 mostram que a adição do óleo de pequi leva a um aumento da energia vibracional da banda em $\sim 1437\text{ cm}^{-1}$ e a uma redução da razão A_{1455}/A_{1437} , sugerindo que a adição do óleo de pequi inibe a formação de certos confórmeros *gauche* e, portanto, causa um aumento acentuado na rigidez das cadeias de hidrocarbonetos que compõem as nanoemulsões. Além do mais, a presença do pico em 1418 cm^{-1} no espectro Raman do óleo de pequi puro confirma que a estrutura cristalina ortorrômbica está presente na amostra.

Orendorff, Ducey e Pemberton (2002) ao estudarem a transição de fase sólida/líquida (induzida termicamente) do polietileno mostrou que existe uma forte correlação entre os indicadores espectrais Raman. Eles mostraram que os indicadores espectrais são quantitativamente correlacionados à razão $I_{\nu_{as}(CH_2)}/I_{\nu_s(CH_2)}$ (ou $(I_{ordem}/I_{desordem})$), pois este é o principal indicador de ordem rotacional e conformacional obtido empiricamente a partir de espectros Raman. Esses indicadores são interpretados em termos de movimento intramolecular do hidrocarboneto, interações intermoleculares entre cadeias alquilas, estrutura cristalina desses materiais sólidos e a presença de confórmeros *trans/gauche*. Os autores mostram que o polietileno está na fase líquida ou cristalina quando a razão $(I_{ordem}/I_{desordem})$ é menor que 0,8 ou maior que 1,9, respectivamente. No intervalo entre estes extremos, foi verificada a presença de uma mistura bifásica, composta pela coexistência de fases gel desordenadas (L_d) e líquida ordenada (L_o). Por sua vez, Fox, Uibel e Harris (2007) ao estudarem a transição de fase de vesículas de fosfatidilcolina

DPPC (também induzida termicamente), mostraram que quando a razão ($I_{ordem}/I_{desordem}$) $\leq 0,95$ as vesículas de DPPC estão na fase desordenada e quando a razão ($I_{ordem}/I_{desordem}$) $\geq 1,1$ a fase cristalina é predominante.

Assim, com base na referência (ORENDORFF; DUCEY; PEMBERTON, 2002), foram construídas curvas de correlação entre os principais indicadores apresentados anteriormente como função da razão ($I_{ordem}/I_{desordem}$), a qual foi obtida a partir das intensidades dos modos vibracionais $\nu_s(CH_2)$ e $\nu_{as}(CH_2)$ das diferentes amostras de nanoemulsões. Estas correlações são mostradas na Figura 19. Nota-se da Figura 19 que, embora todas as amostras estejam em conformação estrutural desordenada, um progressivo ordenamento é induzido pela adição crescente do óleo de pequi.

É de conhecimento da literatura que a mistura de lipídios e aditivos (e/ou hidratação) resulta em diagramas de fase ricos e complexos (BINDER; KLOSE, 2002; DE ALMEIDA; FEDOROV; PRIETO, 2003; INOUE *et al.*, 2001; KRANENBURG; SMIT, 2005; KRIVANEK; OKORO; WINTER, 2008; MARSH, 2010). Por exemplo, o lipídio POPC puro somente apresenta as fases gel e líquido cristalino, as quais dependem da temperatura e do grau de hidratação. Quando completamente desidratado, a temperatura de transição das fases $L_\beta \rightarrow L_\alpha$ está em torno de 35 °C e decresce para - 5 °C quando completamente hidratado (BINDER; KLOSE, 2002; MARSH, 2010). É importante ressaltar que estes valores dependem de muitos outros parâmetros, como por exemplo o histórico térmico e o modo de preparação das amostras. Como resultado, alguns autores relatam temperaturas de transição da fase $L_\beta \rightarrow L_\alpha$ maiores que 65 °C para o POPC puro desidratado (PFEIFFER *et al.*, 2003; POPOVA; HINCHA, 2007).

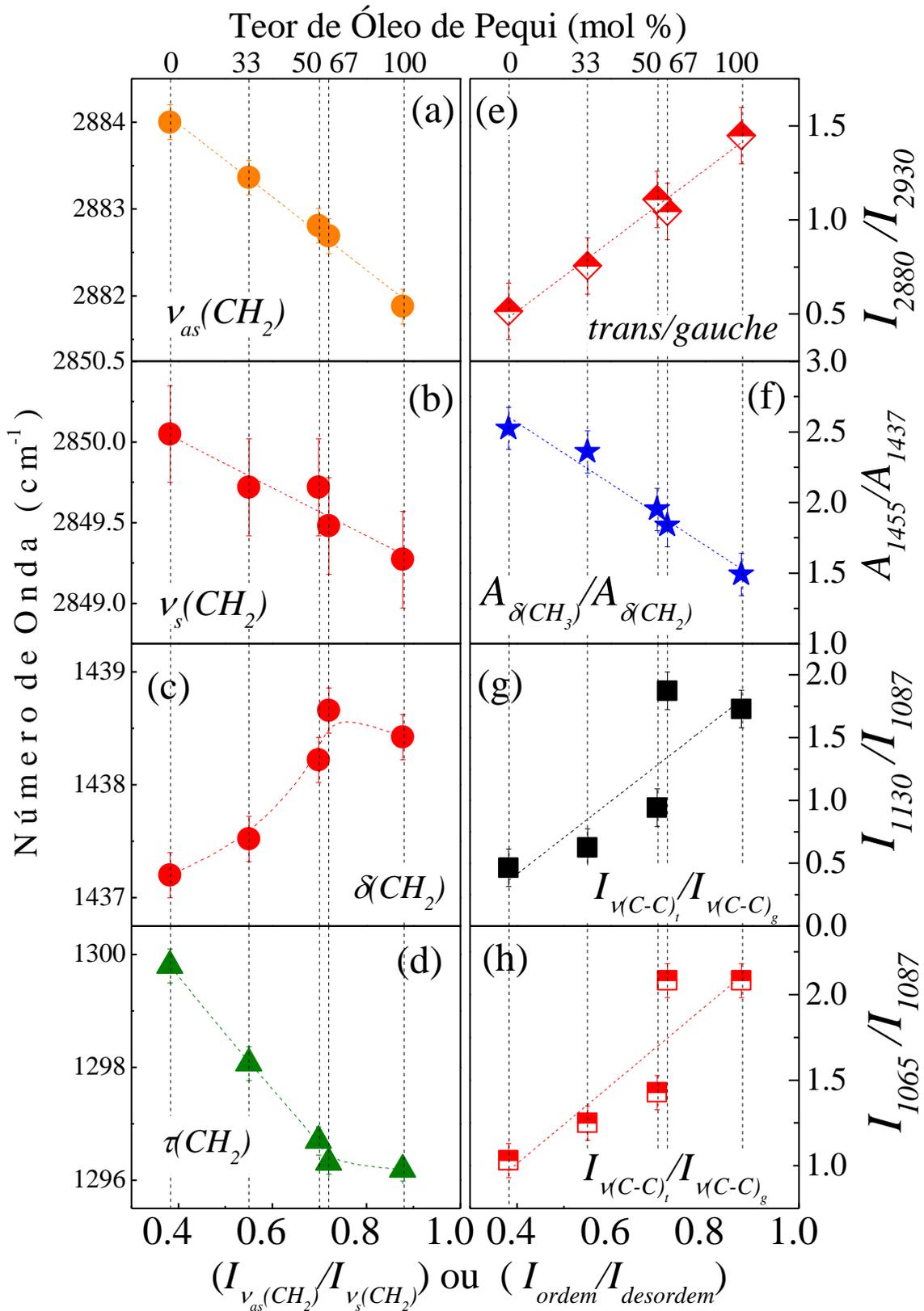


Figura 19. Dependência entre os números de ondas dos modos vibracionais $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ (a), $\nu_s(\text{CH}_2)$ (b), $\delta(\text{CH}_2)$ (c), $\tau(\text{CH}_2)$ (d) e das razões I_{trans}/I_{gauche} (e), $A_{\delta(\text{CH}_3)}/A_{\delta(\text{CH}_2)}$ (f), $I_{(\text{C-C})_g}/I_{(\text{C-C})_t}$ (g) e (h) como função da razão $I_{ordem}/I_{desordem}$.

Para os casos envolvendo fosfolipídios e aditivos, o caso mais estudado é a mistura de fosfolipídios e colesterol (DE ALMEIDA; FEDOROV; PRIETO, 2003; KRIVANEK; OKORO; WINTER, 2008; MARSH, 2010). Têm sido demonstrados que esta mistura é capaz de formar a fase denominada líquido ordenado (L_o) caracterizada por uma ordem orientacional de curto alcance e distúrbio translacional de longo alcance. A fase L_o é distinta das fases líquido cristalino desordenado (L_α) e gel ordenado (L_β ou L_β), as quais são admitidas apenas pelos fosfolipídios puros. Na mistura fosfolipídio/colesterol, é geralmente encontrado que, acima (ou abaixo) da temperatura de fusão da cadeia (T_m), a fase L_d (S_o : fase sólida ordenada) está presente para teores inferiores a ~ 15 mol % enquanto a fase L_o (L_o) é encontrada para teores superiores a ~ 35 mol % de colesterol. Para teores intermediários de colesterol ($\sim 15 < x < \sim 35$ mol %) a coexistência das fases ($L_d + L_o$) e ($S_o + L_o$) são encontradas para temperaturas maiores e menores que T_m , respectivamente (DE ALMEIDA; FEDOROV; PRIETO, 2003; KRIVANEK; OKORO; WINTER, 2008; MARSH, 2010).

Com base na discussão do parágrafo anterior e dos dados resumidos na Figura 19, é possível concluir que, assim como o colesterol, a incorporação de teores crescentes de óleo de pequi inibe a formação de confórmeros com isomerização *gauche*. Em outras palavras, é possível afirmar que o óleo de pequi promove um ordenamento das cadeias de hidrocarbonetos da lecitina, inicialmente desordenada (L_d), fazendo com que as fases L_d e L_o coexistam em menor ou maior proporção relativa, dependendo do teor crescente de óleo de pequi empregado nas amostras. Esta hipótese é reforçada pelo comportamento dos modos de estiramento do metileno, onde foi verificado que a adição crescente de óleo de pequi leva a decréscimos das energias vibracionais dos modos $\nu_s(CH_2)$ e $\nu_{as}(CH_2)$ e aumento das razões I_{2880}/I_{2850} e I_{2880}/I_{2930} . Este comportamento indica um aumento nas interações laterais entre as cadeias de hidrocarboneto, o que leva a um progressivo ordenamento das cadeias em virtude da eliminação dos conformadores *gauche* no arranjo espacial das moléculas lipídicas.

2.6. Conclusões

Nesta parte do trabalho foi investigado o efeito da presença de diferentes teores do TAG óleo de pequi no rearranjo conformacional das cadeias de hidrocarboneto que compõem as nanopartículas lipídicas de uma nanoemulsão à base de lecitina de ovo e óleo de pequi. A análise detalhada das alterações nos espectros FTIR e Raman permitiu avaliar a interação das moléculas de óleo de pequi na membrana de lecitina. Mais especificamente, os dados permitiram determinar que a cabeça polar da lecitina não está diretamente envolvida nas interações entre o fosfolípido (lecitina) e as moléculas que compõem o óleo de pequi. Além do mais, foi verificado que as mudanças graduais dos modos vibracionais do grupo CH_2 e das vibrações de estiramento das ligações $C - C$ e do grupo éster carbonila $\nu(C = O)$ fornecem uma descrição qualitativa da ordem conformacional das cadeias de hidrocarbonetos. Os resultados mostraram que a incorporação de teores crescentes de óleo de pequi inibe a formação de confórmeros com isomerização *gauche*, causando assim um aumento da rigidez das cadeias de hidrocarboneto. Como resultado, é possível afirmar que o óleo de pequi promove um ordenamento das cadeias de hidrocarbonetos, inicialmente desordenada (L_d), fazendo com que as fases L_d e L_o coexistam em menor ou maior proporção relativa, dependendo do teor crescente de óleo de pequi empregado nas amostras.

Capítulo 3

3. Estudo dos mecanismos de adsorção de fluoxetina em nanotubos de carbono funcionalizados em carvão ativado

3.1. Introdução

O crescimento populacional das últimas décadas provocou um significativo aumento da poluição ambiental, principalmente devido à urbanização mal planejada e ao desenvolvimento inadequado da atividade industrial.

Uma das mais preocupantes formas de poluição é a contaminação dos recursos hídricos, uma vez que a água é imprescindível para a manutenção da vida. Dentro desse contexto, o tratamento de efluentes é uma medida importante para diminuir a poluição no meio hídrico.

O tratamento de efluentes tem por finalidade reduzir os índices de contaminação da água descartada pelo uso doméstico e industrial de tal modo que ela retorne ao meio ambiente sem oferecer risco a esse meio e à saúde humana. Esse tratamento consiste na remoção das impurezas físicas, químicas, biológicas e de organismos patogênicos oriundos das mais diversas atividades antrópicas, como indústria e esgoto doméstico.

Os processos utilizados em tratamentos de efluentes são bastante diversificados e baseados em processos tanto físicos quanto químicos. Em uma lista incompleta, pode-se elencar: decantação, filtração (membranas de filtração), osmose reversa, separação centrífuga, flotação, coagulação química, precipitação química, reações de óxido-redução, troca iônica, evaporação, eletrodíálise e adsorção, dentre outros (ALMADA, 2008).

O primeiro desafio que surge diante da necessidade de se tratar um efluente é definir qual tratamento adotar. Essa escolha deve levar em conta diversos fatores que vão muito

além da identificação e caracterização dos contaminantes, sendo fundamental considerar a localização da fonte dos efluentes, sua carga, as propriedades finais da água tratada e, além disso, as questões econômicas, tais como a logística da implantação do processo, sua viabilidade econômica e ambiental, sem esquecer que o próprio processo de tratamento é, por si só, um gerador de resíduos.

Dentre as técnicas de tratamento previamente citadas, a adsorção é um dos métodos mais eficientes para tratamento de águas e águas residuais (SWEETMAN *et al.*, 2017). A técnica de adsorção se baseia na passagem do efluente por um material sólido altamente poroso e adsorvente, no qual a impureza (adsorbato) se adere à superfície do adsorvente por meio de interações físicas e/ou químicas entre um e outro. A partir dessas características, o processo de adsorção é caracterizado como físico ou químico. A adsorção é uma técnica que apresenta grande versatilidade e se destaca por ser eficiente quando a concentração de contaminante é baixa por apresentar pouca geração de resíduos e pela possibilidade de reutilização do adsorvente com a recuperação de metais pesados (ALVES, 2007).

Devido às suas propriedades físico-químicas, o carvão ativado (CA) é um adsorvente poderoso amplamente utilizado na purificação de água, de modo a remover contaminantes e componentes indesejáveis. A estabilidade química e térmica em conjunto com a estrutura interna porosa, a qual promove uma grande área superficial com grupos funcionais específicos ativos, permite que as moléculas contaminantes se adsorvam na superfície do CA via interações de van der Waals. Contudo, o uso do CA na despoluição de águas contaminadas apresenta desvantagens, como a difícil reativação e necessidade de um contato mais longo com o contaminante para que a adsorção ocorra satisfatoriamente (EL GAMAL *et al.*, 2018), baixa capacidade de adsorção de metais pesados, suscetibilidade a incrustação biológica e entupimento e dificuldade na modificação da superfície para aplicações especializadas (BHATNAGAR; SILLANPÄÄ, 2011; CRINI, 2005). Portanto, há uma necessidade premente de desenvolver uma nova geração de materiais adsorventes

que possam estender os limites dos sistemas tradicionais de tratamento químico e adsorventes.

Dentre as impurezas encontradas em efluentes, os resíduos de produtos farmacêuticos descartados merecem atenção especial. Com a crescente urbanização e aumento populacional, a produção de medicamentos cresceu exponencialmente, com o conseqüente aumento no consumo (excessivo, até) de produtos farmacêuticos, inclusive sem prescrição médica (ABRAHAM, 2010).

Esses produtos costumam ser descartados pela própria indústria e pelos consumidores de forma direta ou indireta (por exemplo, na forma de resíduos metabólicos, após sua administração) e são de difícil remoção pelo sistema convencional de tratamento (CHOWDHURY *et al.*, 2020). Afsa *et al.* (2020) estudaram a ocorrência de 40 compostos farmacêuticos ativos em águas residuais hospitalares e urbanas e sua ocorrência nas águas costeiras de Mahdia, Tunísia. De modo a fornecer uma avaliação do risco ambiental, os autores fizeram uma estimativa dos Quocientes de Riscos dos contaminantes estudados e concluíram que as elevadas concentrações dos fármacos sulfadiazina, sulfametoxazol e fluoxetina encontradas nos efluentes poderiam apresentar riscos médio/alto para os organismos aquáticos testados.

A extensão na qual acontece a adsorção química pode ser acompanhada a partir do monitoramento da extensão na qual ocorre a interação química adsorvente-adsorbato. Para tanto, pode-se utilizar diversas técnicas espectroscópicas já consagradas na literatura. Particularmente, nesta tese, esta investigação é realizada pela técnica de FTIR. Operando na faixa do infravermelho, ela monitora as modificações espectrais dos modos vibracionais das moléculas e, desse modo, acompanha o comportamento das ligações de adsorvente e adsorbato antes e após as eventuais ligações/interações, podendo, assim, inferir como e em que extensão ocorre a adsorção do fármaco com o adsorvente.

Assim, a partir das considerações acima, esta parte do trabalho tem como objetivo estudar a interação entre moléculas de fluoxetina (adsorbato) e compósito à base de carvão ativado funcionalizado com nanotubos de carbono. Ou seja, ambos atuando como

adsorventes. Esta interação será verificada por meio da análise espectral dos componentes livres e adsorvidos.

Este trabalho, somado aos estudos prévios conduzidos por nosso grupo de pesquisa (SOUSA-MOURA, 2019), permitiu propor um novo método de adsorção (adsorvente carbonáceo híbrido) para o tratamento de efluentes como uma eventual alternativa aos métodos convencionais para tratamento de água.

3.2. Suporte teórico e revisão da literatura

3.2.1. Descontaminação por adsorção

A remoção de contaminantes baseada na adsorção tem sido usada com sucesso por muitos anos no tratamento de água (HIJNEN *et al.*, 2010). Neste processo a despoluição ocorre por meio da transferência de massa, na qual determinadas substâncias presentes em fluidos líquidos ou gasosos (contaminantes) aderem à superfície de certos sólidos, possibilitando a separação dessas substâncias do meio. Logo, quanto maior for a superfície específica desse sólido (geralmente poroso), mais favorável será a adsorção. A espécie que se acumula na superfície do sólido é denominada adsorvato ou adsorbato e o meio sólido denomina-se adsorvente ou adsorvente (MELO *et al.*, 2014). Diversos fatores influenciam o processo de adsorção, como a temperatura do sistema, pH da solução, estrutura do poro, área superficial do adsorvente e propriedades químicas do adsorvente e do adsorvato (MELO *et al.*, 2014).

A adsorção pode ser classificada em dois tipos, de acordo com a intensidade das forças envolvidas: adsorção física, denominada fisissorção, e adsorção química, quimissorção. Na adsorção física, a ligação do adsorvato à superfície do adsorvente é relativamente fraca e ocorre, de uma forma geral, por meio das forças de van der Waals. Esse tipo de fenômeno permite a dessorção por técnicas relativamente simples (aquecimento, tratamento com solventes e outros), que consiste na recuperação do adsorvato e regeneração do

adsorvente para uso posterior. Na adsorção química, altamente específica, ocorre a formação de ligações químicas entre as moléculas do adsorvato e a superfície do adsorvente (MELO *et al.*, 2014) e sua recuperação está sujeita a tratamentos mais rigorosos ou pode até ser inviável.

Na adsorção, o sólido adsorvente deve possuir uma grande área superficial e compatibilidade física e/ou química com o soluto. Entre os tipos de materiais adsorventes utilizados, o CA é o mais comum. Por apresentar alta porosidade e, portanto, grande área superficial, o CA tem um papel importante na remediação de água contendo contaminantes emergentes (Figura 20). Ele vem sendo amplamente utilizado para purificação de ingredientes e produtos alimentícios, como produto farmacêutico, na indústria automobilística, armazenamento de gás e energia elétrica e tratamento de água, em que é utilizado como adsorvente para remoção de contaminantes orgânicos e inorgânicos (ALVES, 2007; TRAN *et al.*, 2017).

Para a obtenção do CA, primeiramente materiais carbonáceos são carbonizados em altas temperaturas; em seguida o carvão pode ser ativado por dois métodos distintos: ativação física ou química. O primeiro método consiste na reação de gaseificação do carvão com gases contendo oxigênio combinado em altas temperaturas (até 1000 °C) para oxidação da matéria carbonosa, enquanto que o segundo método é caracterizado pela desidratação do carvão utilizando soluções ácidas ou básicas seguida de aquecimento a temperaturas moderadas (400°C a 600°C) em atmosfera inerte para ativação do carvão (RUTHVEN, 1984).

Contudo, apesar de fácil de implementar e manter o uso do CA nem sempre é eficiente o suficiente para remover todos os contaminantes biológicos e químicos, principalmente poluentes aniônicos (AFKHAMI; MADRAKIAN; KARIMI, 2007; CARTER; WEBER; OLMSTEAD, 1992). De modo que, mais recentemente, várias abordagens estão sendo estudadas para o desenvolvimento de adsorventes mais eficientes e baratos. Entre estas novas abordagens, o uso de nanotubos de carbono (NTCs) têm merecido atenção especial.

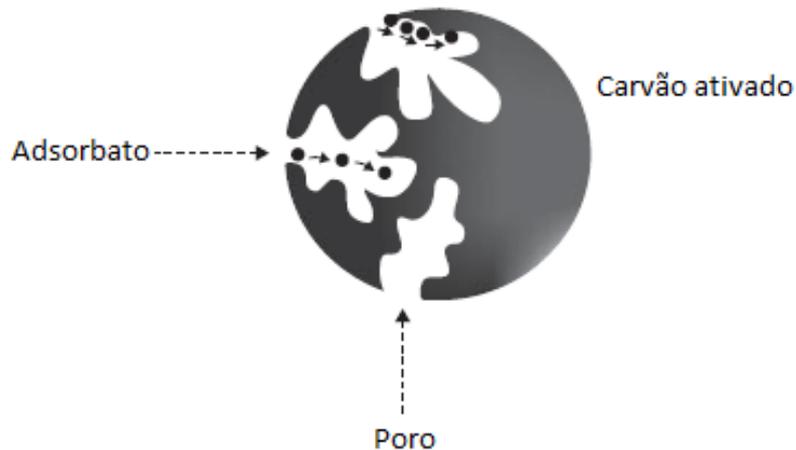


Figura 20. Processo de adsorção em partícula de carvão ativado. Fonte: adaptada de (ÇEÇEN; AKTAŞ, 2011).

3.2.2. Nanotubos de carbono

O crescente interesse pela nanotecnologia possibilitou o desenvolvimento de novos nanomateriais à base de carbono. Inicialmente, devido às suas excepcionais propriedades térmicas e elétricas, esses nanomateriais foram desenvolvidos para aplicação na indústria eletrônica. Contudo, devido a sua grande área superficial, facilidade de modificação química ou física, excelente capacidade para desinfecção microbiana, remoção de contaminantes orgânicos e inorgânicos, os nanomateriais à base de carbono e seus respectivos nanocompósitos têm oferecido muitas possibilidades para novas aplicações no tratamento de água. Assim, nanomateriais carbonáceos têm sido estudados como alternativa para melhorar a remoção de micropoluentes na água (SMITH; RODRIGUES, 2015).

Os NTCs são estruturas formadas pelo enrolamento cilíndrico de uma folha de grafeno, material bidimensional com carbonos de hibridização sp^2 dispostos em estrutura hexagonal. Os NTCs podem ser classificados em nanotubos de carbono de paredes simples (uma única folha de grafeno em sua estrutura) e nanotubos de carbono de paredes múltiplas (mais de uma folha de grafeno enrolada de forma concêntrica e com distância entre os tubos da ordem da intercamada de grafite) (Figura 21). As propriedades dos NTCs

dependem de alguns fatores como diâmetro, comprimento, quiralidade (orientação da folha de grafeno em relação ao eixo do tubo), número de camadas concêntricas, tipos de impurezas presentes, dentre outras (SAITO; DRESSELHAUS; DRESSELHAUS, 1998; ZARBIN; ORTH, 2019).

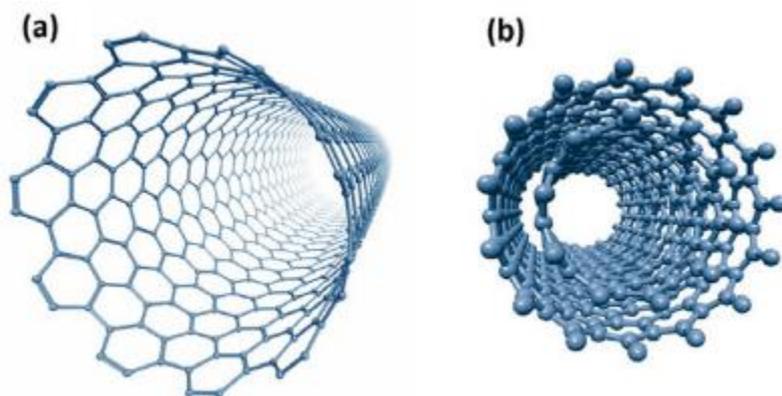


Figura 21. Nanotubos de carbono a) parede simples b) paredes múltiplas. Fonte: adaptada de (ZARBIN; OLIVEIRA, 2013).

Existem várias técnicas para a produção de nanotubos de carbono, sendo as principais a ablação a laser, a descarga por arco elétrico e a deposição química a vapor. Cada técnica possui vantagens e desvantagens, resultando em materiais de naturezas diferentes. O método mais utilizado é o de deposição química a vapor, por possuir menores custos operacionais, facilitando produção em larga escala (GONÇALVES, 2018).

O emprego dos nanomateriais carbonáceos, como os NTCs, o grafeno e materiais compostos de cada um, tem mostrado resultados promissores (SUI *et al.*, 2012). No entanto, o alto custo de fabricação desses nanomateriais ainda tem limitado o seu uso na purificação de água. Outro importante fator a ser considerado é o fato de que os NTCs são extremamente hidrofóbicos e sujeitos à agregação, pois estão submetidos a altas forças de interação de van der Waals ao longo do eixo do comprimento (GIRIFALCO; HODAK; LEE, 2000) e, como resultado da agregação, a área superficial disponível para a adsorção é reduzida. Para minimizar este problema, os NTCs raramente são aplicados em suas formas puras; eles são mais comumente usados em composição, seja disperso em

polímeros ou decorando nanopartículas, tais como Fe₃O₄ ou Ag nanopartículas (SMITH; RODRIGUES, 2015).

3.2.3. Fluoxetina como agente poluente

O descarte de produtos farmacêuticos em efluentes de estações de águas residuais e águas receptoras acarreta vários riscos toxicológicos para o meio ambiente e seres humanos, podendo causar efeitos tóxicos a longo prazo mesmo em concentrações baixas (LI *et al.*, 2020a). Em função deste problema, muitas pesquisas estão sendo realizadas com o intuito de avaliar e monitorar os efeitos toxicológicos destas contaminações. Dentre elas, pode-se citar a morte de espécies aquáticas pela toxicidade do efluente, modificação no comportamento de peixes, bem como na sua alimentação, reprodução e fuga de predadores, além do surgimento de bactérias resistentes (MIRANDA *et al.*, 2018).

A fluoxetina (FLX), C₁₇H₁₈F₃NO, é um fármaco psicotrópico comercializado inicialmente com o nome de Prozac® usado no tratamento de distúrbios depressivos moderados a graves, transtorno obsessivo-compulsivo, distúrbios de pânico, transtorno alimentar e de ansiedade (ANDERSEN *et al.*, 2014). O nome oficial da FLX, de acordo com a IUPAC é (RS/+-)-N-metil-3-fenil-[4(trifluorometil)fenoxi]propano-1-amina e sua fórmula estrutural é mostrada na Figura 22:

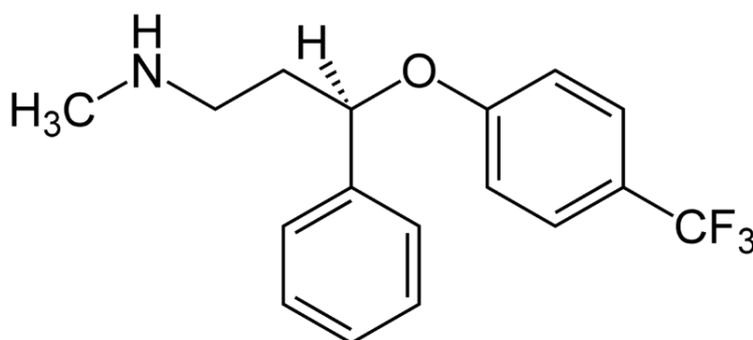


Figura 22. Fórmula estrutural da fluoxetina.

A FLX é um fármaco extensivamente usado na medicina humana e sua presença em efluentes pelo mundo vem sendo reportada em vários estudos nos últimos anos (AFSA *et al.*, 2020; HAZELTON *et al.*, 2014; PERINI *et al.*, 2017). Fluoxetina foi reportada em efluentes em Portugal (SANTOS *et al.*, 2013), Estados Unidos (BROOKS *et al.*, 2003), China (YUAN *et al.*, 2013), Canadá (METCALFE *et al.*, 2010), Noruega (VASSKOG *et al.*, 2008), entre outros lugares.

Foran *et al.* (2004) observaram que a fertilização de ovos do peixe medaka é dependente da concentração de FLX na água e Henry e Black (2008) relataram aumento da letargia do peixe-mosquito em função da presença do fármaco no meio aquático. Mennigen *et al.* (2010) observaram que a fluoxetina interfere no metabolismo do peixe dourado. Pelli e Connaughton (2015) relataram que exposição crônica a concentrações relevantes de FLX diminui a sobrevivência, aumenta comportamentos anormais e atrasa as respostas de escape de predadores em peixe lebiste. Bi *et al.* (2018), por outro lado, estudaram a resposta de sete espécies de algas à FLX e verificaram que a FLX inibe o crescimento de todas as espécies de algas.

Assim, devido a seu alto potencial contaminante, a fluoxetina vem sendo extensamente estudada, principalmente sobre temas associados à sua resistência à degradação e/ou bioacumulação.

3.2.4. Estudos espectroscópicos

3.2.4.1. Fluoxetina

Garrido *et al.* (2009) estudaram as propriedades físico-químicas da fluoxetina e da norfluoxetina, principal metabólito da FLX. Por meio das técnicas de espectroscopias Raman e FTIR, os autores analisaram o comportamento eletroquímico, processos oxidativos e propriedades espectroscópicas destes compostos. El-Habeeb e Refat (2014) investigaram, via análises térmicas e espectroscopias de FTIR e Raman, a transferência

de carga do cloridrato de fluoxetina com fármacos π receptores. De Sousa *et al.* (2008) realizaram um estudo teórico e experimental sobre o complexo supramolecular de fluoxetina com β -ciclodextrina (β CD). Por meio da técnica de espectroscopia de reflexão total atenuada horizontal no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR-HATR), foi possível verificar mudanças entre os modos vibracionais da FLX e β CD indicando interação entre os compostos por meio dos anéis aromáticos da FLX. Bonenfant *et al.* (2012) também estudaram a adsorção do cloridrato de fluoxetina em um polímero reticulado de β -ciclodextrina-carboximetilcelulose. Para tal estudo foram empregadas as técnicas de espectroscopia no ultravioleta visível e FTIR para comprovar a eficiência de adsorção do composto. Os resultados indicam que ocorre ligação de hidrogênio entre o grupo $-CF_3$ da FLX com o grupo $6' - OH$ da β CD e interações de van der Waals entre o anel aromático da FLX com a cavidade da β CD. Esses resultados sugerem que o polímero possui alta afinidade com a FLX e pode ser uma técnica viável para a remoção desse medicamento frequentemente encontrado em águas residuais.

3.2.4.2. Materiais carbonáceos

A avaliação da eficácia do uso de materiais carbonáceos em processos de adsorção implica em analisar suas propriedades físicas e/ou químicas depois do eventual processo de adsorção. Após o ensaio, deve-se investigar de que forma o adsorbato interage com o material adsorvente. Uma técnica espectroscópica muito utilizada para esse fim é a FTIR. A partir de sua análise, é possível desvendar os mecanismos de adsorção, bem como identificar grupos funcionais orgânicos que podem atuar como sítios de adsorção.

Allegrini *et al.* (1994) usaram a espectroscopia FTIR para estudar a adsorção de gases poluentes no carvão ativado, pois os compostos gasosos possuem espectros característicos, bandas de alta intensidade e boa sensibilidade. Terzyk (2001) estudou a influência da composição química da superfície do carvão ativado na adsorção de paracetamol em soluções aquosas. FTIR foi utilizada para elucidar quais grupos funcionais

estavam presentes na superfície do carvão ativado. Tran *et al.* (2017) estudaram o mecanismo e a eficiência de adsorção (TRAN; YOU; CHAO, 2017) de corantes catiônicos em CA e os grupos funcionais da superfície do carvão foram caracterizados por FTIR. O espectro obtido mostrou uma redução da intensidade das ligações $C = C$ do anel aromático e o deslocamento da banda após a adsorção do corante, o que confirma a contribuição significativa das interações $\pi - \pi$, principal mecanismo de contribuição da adsorção, comparado com as interações $n - \pi$ e ligações de hidrogênio. Baudot, Tan e Kong (2010) usaram a espectroscopia FTIR como ferramenta de caracterização entre nanotubos de carbono e um material epóxi, utilizando uma combinação de análise experimental e modelo teórico de FTIR para examinar a presença de ligações covalentes no composto. Brownlow *et al.* (2010) estudaram a deformação do compósito nanotubo de carbono de parede dupla em uma matriz epóxi usando as técnicas FTIR e Raman. A técnica FTIR foi usada para analisar o comportamento da transferência de carga na interface nanotubos-epóxi por meio do deslocamento espectral por unidade de tensão aplicada. A partir desta análise, foi possível estimar o estresse médio da matriz no compósito (ligações $C - O - C$ são as mais sensíveis) e, conseqüentemente, o estresse médio dos nanotubos. Além disso, Lefrant, Baibarac e Baltog (2009) caracterizaram compósitos à base de polímeros e nanotubos de carbono demonstrando que espectroscopia Raman e FTIR são técnicas fundamentais para estabelecer os tipos de ligações.

O mecanismo de adsorção de poluentes em nanotubos de carbono funcionalizados continua sendo extensamente estudada. Como exemplo podemos citar a remoção de vários poluentes como, dióxido de enxofre, azul de metileno, zinco, ibuprofeno, rodamina B, corantes (JIA *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2020b), dentre outros.

3.3. Metodologia

3.3.1. Preparação das amostras

A fluoxetina, de fórmula empírica $C_{17}H_{18}F_3NO$ com número CAS 54910-89-3, foi adquirida da indústria farmacêutica C&C. O CA, derivado da carbonização de eucalipto peneirado em malha de 325 mesh (tamanho $\sim 42 \mu\text{m}$), foi fornecido pela indústria AlphaCarbo.

O compósito à base de carvão ativado funcionalizado com nanotubos de carbono (CA@NTC) foi preparado pelo grupo de pesquisa do professor Dr. José Maurício Rosolen do Departamento de Química da Universidade de São Paulo, segundo descrito nas referências de Matsubara *et al.* (2016) e Rosolen *et al.* (2006). Resumidamente o compósito CA@NTC foi preparado pela deposição dos nanotubos de carbono sobre carvão ativado pelo método de deposição química a vapor. Neste processo, foi utilizado vapor de álcool e partículas de cobalto e manganês (1:1) como fonte de carbono e catalisador, respectivamente. Um fluxo constante de N_2 foi usado como gás carreador do vapor de álcool (SOUSA-MOURA *et al.*, 2019).

Uma imagem SEM (*scanning electron microscope* – microscópio eletrônico de varredura) do compósito utilizado neste estudo é mostrado na Figura 23.

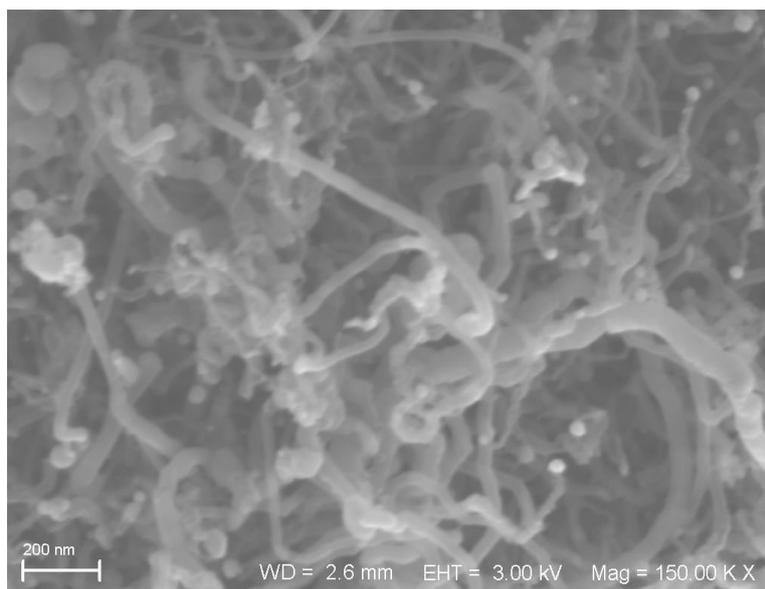


Figura 23. Imagem SEM do nanocompósito carvão ativado funcionalizado com nanotubos de carbono. Fonte: adaptada de (SOUSA-MOURA *et al.*, 2019).

Para investigar a interação entre a FLX e o nanocompósito CA@NTC, uma solução de FLX contendo 100 mg.L^{-1} foi encubada, sob agitação por 20 min na proporção 1:1, em uma solução de CA@NTC contendo 2000 mg.L^{-1} (amostra denominada CA@NTC_FLX).

Para comparação, 100 mg.L^{-1} de FLX foi encubada em 2000 mg.L^{-1} de CA (CA_FLX), seguindo o mesmo procedimento utilizado na preparação da amostra anterior.

Para investigar o processo de dessorção das moléculas de FLX e a viabilidade da regeneração adsorvente das amostras AC e CA@NTC, as amostras AC_FLX e CA@NTC_FLX foram centrifugadas, enxaguadas em solução de metanol e posteriormente lavadas em água.

Estas amostras foram preparadas e cedidas pelo Dr. Diego Sousa-Moura, então aluno de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília.

3.3.2. Técnica experimental

Os espectros FTIR foram coletados usando um espectrômetro no infravermelho da marca *Bruker*, modelo Vertex 70, no Laboratório de Espectroscopia Óptica do Instituto de

Física da Universidade de Brasília. A faixa de varredura foi de 400-4000 cm^{-1} , 4.0 de resolução, 96 varreduras e com correção do sinal da atmosfera e de sinal de fundo. É importante mencionar que a precisão do número de onda do instrumento é melhor do que 0,01 cm^{-1} em 2000 cm^{-1} na medição FTIR (*Bruker Vertex 70*). Portanto, os deslocamentos do número da ordem de 1 cm^{-1} são considerados significativos.

Para a aquisição dos espectros FTIR as amostras CA, CA@NTC, CA_FLX e CA@NTC_FLX foram previamente centrifugadas e secas em vácuo e posteriormente pastilhadas em brometo de potássio (KBr) na proporção 1:100.

3.4. Resultados e discussões

Sousa-Moura *et al.* (2019) ao estudarem a efetividade das estruturas CA e CA@NTCs na remoção de FLX em água, sondada por embriões de peixe-zebra, demonstraram que a segunda é melhor adsorvente de FLX que a primeira.

Esta avaliação foi realizada por meio da determinação da dose letal mediana (LC_{50}) em embriões de peixe-zebra expostos a água contaminada com diferentes teores de FLX, na ausência e presença de CA e CA@NTCs. Inicialmente, foi encontrado que na ausência dos compostos carbonáceos o valor de LC_{50} é de 5,2 mgL^{-1} . Em complemento, após o tratamento com 100 mgL^{-1} de CA e 10 mgL^{-1} de CA@NTCs foi encontrado que os valores LC_{50} de ambos os ensaios são aproximadamente iguais a 10,1 mgL^{-1} . Ou seja, um mesmo valor de LC_{50} foi alcançado com concentrações 10 vezes menores de CA@NTCs, quando comparado com ao CA.

Outra evidência da adsorção da FLX pelas amostras de CA e CA@NTC são os valores de potencial zeta (ξ) destes sistemas antes e após a adsorção da FLX. Os valores do potencial zeta para as amostras CA e CA@NTC foram de $\xi = -30.4 \pm 0.2 \text{ mV}$ e $\xi = -14.3 \pm 0.2 \text{ mV}$, respectivamente. Após a adsorção da FLX, esses valores aumentaram para $\xi = 9.99 \pm 0.2 \text{ mV}$ e $\xi = 16.8 \pm 0.2 \text{ mV}$, respectivamente. Os

resultados positivos dos valores de ξ indicam que a superfície das estruturas carbonáceas foram carregadas com sucesso (SOUSA-MOURA, 2019).

Os diferentes valores registrados acima podem ser explicados em termos da densidade de sítios ativos na superfície dos materiais carbonáceos disponíveis para a adsorção da FLX.

Assim, por ser uma técnica útil na identificação de grupos funcionais presentes na superfície dos materiais carbonáceos (KIM *et al.*, 2005), a espectroscopia FTIR será empregada no estudo da adsorção de FLX na superfície das amostras de CA e CA@NTCs.

A Figura 24 exibe os espectros FTIR da FLX pura (i), CA_FLX (ii), CA puro (iii), CA@NTC_FLX (iv) e CA@NTC (v). Foi verificado que o espectro FTIR da FLX pura (Fig. 1 (i)) está de acordo com o reportado na literatura (EL-HABEEB; REFAT, 2014; JOSINO *et al.*, 2021; PINTO; FERREIRA; CAVALHEIRO, 2017). Além do mais, cálculos da Teoria do Funcional da Densidade (DFT - *Density Functional Theory*), mostram que os modos vibracionais da FLX são altamente acoplados e, portanto, fazer sua atribuição completa não é uma tarefa fácil (KOVÁCS, 2003). Em razão deste fato, existem na literatura diferentes atribuições para os modos vibracionais. Alguns autores sugerem que os modos associados ao grupo fenil podem estar localizados em torno de 837 cm^{-1} , 1320 cm^{-1} e na região de $1400 - 1620\text{ cm}^{-1}$, correspondendo aos modos fora e no plano da ligação CH ($\gamma(CH)$ e $\beta(CH)$) e o modo estiramento $C = C$ dos anéis aromáticos, respectivamente. Com ênfase para as bandas em aproximadamente 1590 cm^{-1} e 1615 cm^{-1} , atribuídas aos modos $\nu(C = C)$ do anel aromático 1 e 2, respectivamente (PINTO; FERREIRA; CAVALHEIRO, 2017). As bandas em 1070 cm^{-1} e 1110 cm^{-1} são atribuídas aos modos estiramento do grupo CF_3 (ARSHAD *et al.*, 2017; EL-HABEEB; REFAT, 2014; PINTO; FERREIRA; CAVALHEIRO, 2017). O modo vibracional do esqueleto $C - O - C$ da molécula de FLX surgem em 700 cm^{-1} , 1245 cm^{-1} . Finalmente, os modos vibracionais NH e CH_2/CH_3 são encontrados em torno 2770 cm^{-1} e 2900 cm^{-1} , respectivamente.

Os espectros FTIR da amostra CA e do compósito CA@NTC (Figura 24 (iii) e (v)), possuem características similares, diferindo principalmente nas regiões de 500 – 850 cm^{-1} (deformações $C - H$ fora do plano nos anéis aromáticos), 1000 – 1300 cm^{-1} , associadas com as vibrações de estiramento $\nu(C - O)$ dos grupos éteres/fenóis presentes na superfície das estruturas carbonáceas e aos modos de estiramento $\nu(C - C)$ (CHEN *et al.*, 2009; TRAN *et al.*, 2017).

As similaridades são observadas nas bandas associadas aos grupos carboxil/fenóis ($\nu(C - HO)$) na região de 1380 – 1400 cm^{-1} e nas bandas em 1560 cm^{-1} e em 1630 cm^{-1} , correspondentes aos modos de estiramento do anel aromático acoplados ao grupo carbonil e modos de deformação das moléculas de água adsorvidas na superfície, respectivamente. A banda observada em $\sim 1742 \text{ cm}^{-1}$, observada principalmente para as amostras CA_FLX e CA@NTC_FLX, estão provavelmente associadas a ligações $C = O$, causadas por vibrações de grupos carboxílicos nas superfícies das amostras. Na região de mais alta energia (2800 – 3100 cm^{-1}) são encontrados os modos de estiramento simétrico e assimétrico das ligações CH_2/CH_3 , provavelmente introduzidos no processo de ativação das superfícies dos compostos (Chen *et al.*, 2010). Finalmente, a banda larga em torno de 3450 cm^{-1} é atribuída a contribuições de uma variedade de modos de estiramento $O - H$. Grupos carboxila bem como grupos de hidroxila presentes na superfície das amostras certamente contribuem para esta banda. Contudo, elas não podem ser distinguidas de forma confiável de moléculas de água fracamente ligadas (TRAN *et al.*, 2017). Além do mais, a largura e a posição destas bandas indicam que vários grupos contendo $-OH$ estão provavelmente presentes em diferentes ambientes químicos de carbono presentes na superfície dos materiais carbonáceas.

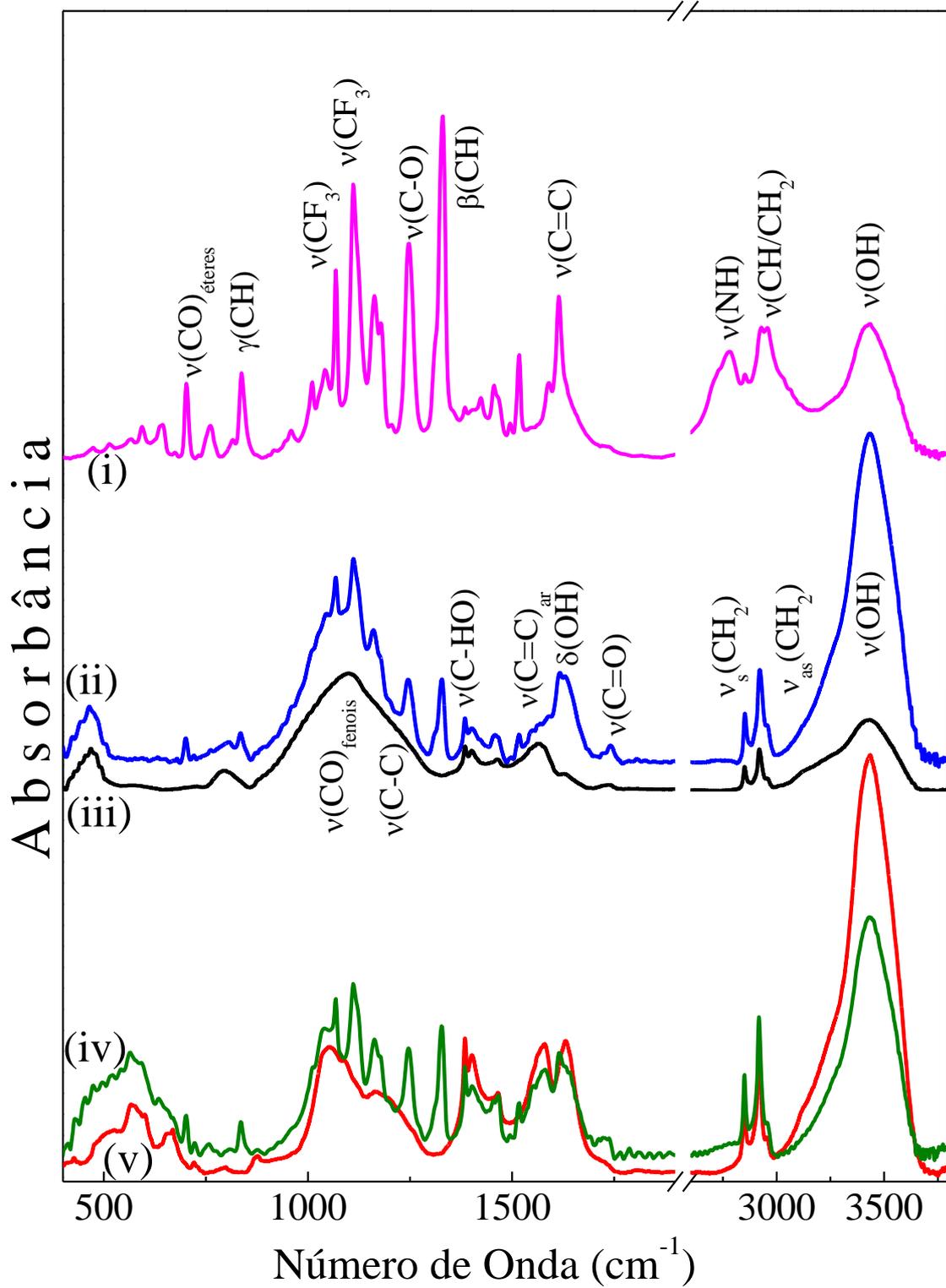


Figura 24. Espectros FTIR da fluoxetina pura (i), CA_FLX (ii), CA puro (iii), CA@NTC_FLX (iv) e CA@NTC (v).

Uma comparação entre os espectros FTIR das amostras FLX, CA_FLX, CA@NTC_FLX (Fig. 3.5 (i), (ii) e (iv)) sugere inicialmente que o espectro da FLX está simplesmente sobreposto aos espectros FTIR das amostras do CA e CA@NTC. Contudo, uma análise mais detalhada revela algumas mudanças significativas nas energias dos modos vibracionais da FLX (ver Figura 25).

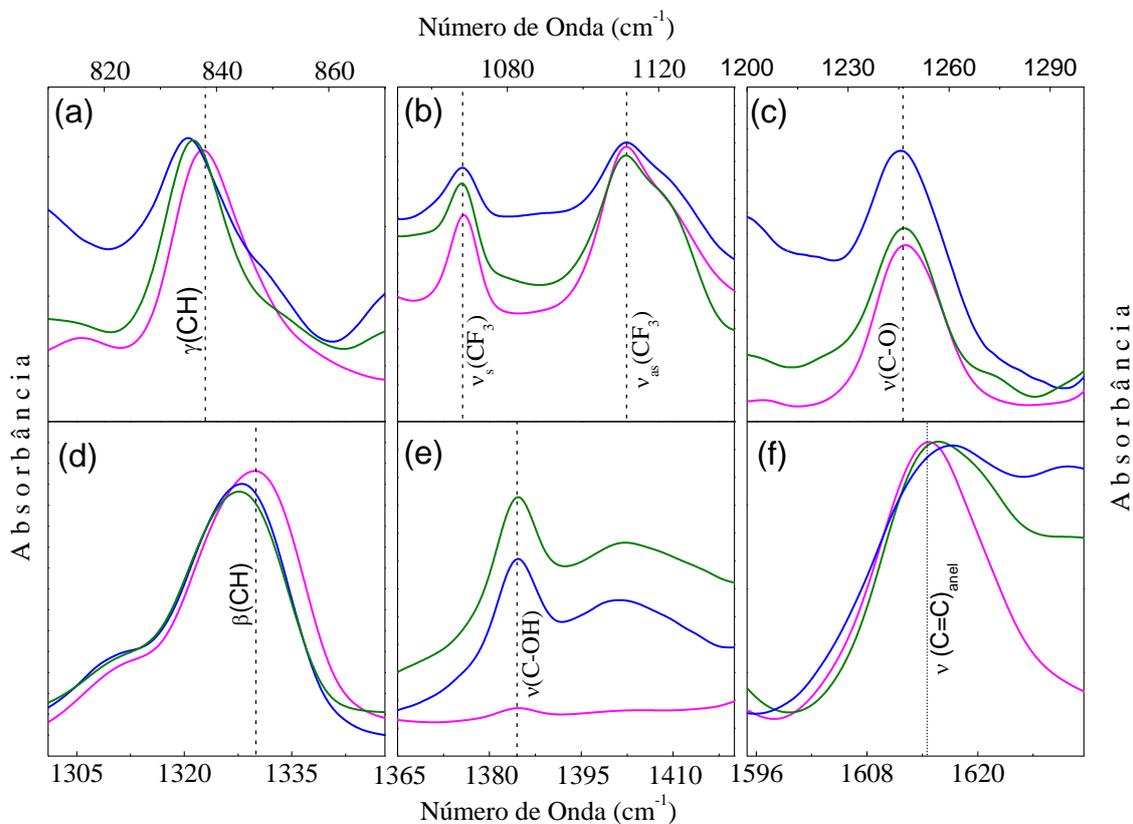


Figura 25. Ampliações dos espectros FTIR das amostras FLX (linhas magentas), CA_FLX (linhas azul), CA@NTC_FLX (linhas verdes) relativos aos modos (a) $\gamma(CH)$, (b) $\nu_s(CF_3)$ e $\nu_{as}(CF_3)$, (c) $\nu(C-O)$, (d) $\beta(CH)$, (e) $\nu(C-OH)$ e (f) $\nu(C=C)_{anel}$.

A Figura 25 mostra que, enquanto as bandas de absorção associadas às vibrações CH da fluoxetina adsorvida no CA (CA_FLX: linha azul) e no composto CA@NTC (CA@NTC_FLX: linha verde) (Figura 25(a) e (d)) deslocam-se para menores energias, a banda associada à ligação $C=C$ (Figura 25(f)) desloca-se para maiores energias, ambas quando comparadas com a FLX livre (linha magenta). Note ainda que as energias vibracionais dos modos estiramento dos grupos CF_3 (Figura 25(b)) e vibrações do grupo

$C = O$ da FLX (Figura 25(c)) e vibrações do grupo $C - OH$ das estruturas carbonáceas (Figura 25(e)) permanecem praticamente constantes nos espectros de absorção de todas as amostras. Estes resultados evidenciam que a adsorção da FLX nas superfícies das estruturas apresenta impacto tanto nas vibrações dos grupos CH e $C = C$ dos anéis aromáticos da molécula de FLX.

Outra importante mudança espectral observada após a adsorção da FLX diz respeito aos apreciáveis aumento (redução) de intensidades relativas das bandas em torno de 1630 cm^{-1} e 3450 cm^{-1} , observados para a amostra CA (CA@NTC). Nota-se da Figura 26 que, após adsorção da FLX, a intensidade relativa da banda de estiramento $-OH$ da amostra CA (Figura 26(a) - linha preta) é aproximadamente 6 vezes menor que a da amostra CA_FLX (Figura 26(a) - linha azul), enquanto que para a amostra CA@NTC (Figura 26(b) - linha vermelha) a intensidade relativa da mesma banda é aproximadamente 2 vezes maior que para a amostra CA@NTC_FLX (Figura 26(b) - linha verde). É também possível observar que antes da adsorção da FLX, a intensidade relativa do ombro em 3250 cm^{-1} é maior na amostra CA do que na CA@NTC (ver inserção nas Figura 26(a) e (b): espectros normalizados).

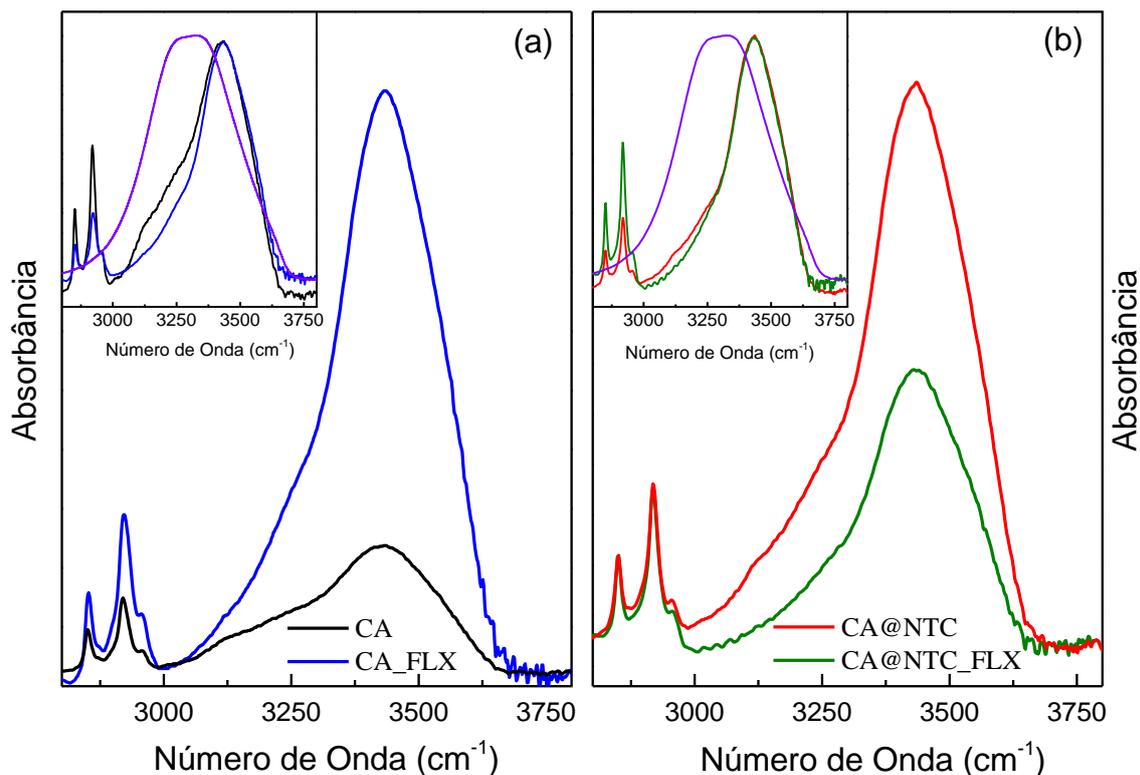


Figura 26: Ampliação dos espectros FTIR em torno de 2800 a 3800 cm^{-1} das amostras (a) CA e CA_FLX e (b) CA@NTC e CA@NTC_FLX. Nas inserções são mostrados os espectros FTIR das mesmas amostras. Para comparação o espectro FTIR da água pura também é mostrado em ambas as inserções. É importante ressaltar que os espectros foram normalizados quanto às suas intensidades máximas.

As intensidades relativas das bandas de estiramento OH são frequentemente usadas para estimar as mudanças gerais na organização das moléculas de água. As bandas em 3250 cm^{-1} e 3450 cm^{-1} são usualmente relacionadas a moléculas de água em organização semelhante ao gelo (com ligação tetraédrica - fortemente ligado) e a ambiente líquido com ligações de hidrogênio distorcidas (portanto, mais fracamente ligadas), respectivamente.

Assim, a redução da intensidade da banda em 3250 cm^{-1} indica que a adsorção da FLX leva a uma redução do teor de $-OH$ fortemente ligados à superfície das amostras CA e CA@NTC. Em complemento, o aumento de ~ 6 (redução de ~ 2) vezes na intensidade da banda em 3450 cm^{-1} observado para amostra CA_FLX (CA@NTC_FLX) sugere a existência de uma competição entre a adsorção da FLX e de OH na superfície dos materiais carbonáceos, sendo a amostra CA@NTC é da ordem de 10 vezes mais eficiente na

adsorção de FLX do que a amostra CA. Explicando assim os resultados encontrados na referência (SOUSA-MOURA).

A literatura é rica em relatos de que a adsorção de moléculas orgânicas na superfície de materiais carbonáceos pode ocorrer principalmente por ligações de hidrogênio e interações $n-\pi$ e $\pi-\pi$ (KONICKI; ALEKSANDRZAK; MIJOWSKA, 2017; TRAN *et al.*, 2017; TRAN; YOU; CHAO, 2017). As interações por ligações de hidrogênio podem ocorrer entre os grupos $-OH$ e $-COOH$ (doador H) presentes na superfície dos materiais carbonáceos e átomos aceitadores de H (ou seja, nitrogênio e oxigênio) e entre os anéis aromáticos, ambos provenientes da molécula orgânica adsorvida. O primeiro é conhecido como ligação H dipolo-dipolo e o último é conhecido como ligação H de Yoshida (TRAN; YOU; CHAO, 2017). Contudo, na presença de umidade, os grupos funcionais do material carbonáceo também podem formar ligações de hidrogênio com moléculas de água do meio. Esta interação é mais forte do que aquela entre grupos funcionais do material carbonáceo e o soluto orgânico, o que resulta na sorção competitiva entre moléculas de água e o soluto orgânico (MÜLLER *et al.*, 1996).

Nas interações $n-\pi$, os grupos de oxigênio na superfície do material carbonáceo atuam como doadores de elétrons, enquanto os anéis aromáticos da moléculas orgânica atuam como aceitadores de elétrons. Por fim, as interações $\pi-\pi$ ocorrem entre os elétrons π de um material carbonáceo e os elétrons π dos anéis aromáticos da molécula orgânica.

Com base nos resultados observados é possível inferir que, em menor ou maior grau, todas as interações descritas acima estão presentes nos sistemas aqui estudados. Os deslocamentos para menores e maiores energias das bandas CH e $C=C$ associadas aos anéis aromáticos da molécula de FLX evidenciam que a FLX interage com a superfície das amostras CA e CA@NTC por meio das interações $n-\pi$ e/ou $\pi-\pi$. Por outro lado, aparentemente, a superfície da amostra de CA exerce forte interação com as moléculas de água presentes na solução de FLX/água por meio das ligações de H (ligação de H de

Yoshida e/ou ligação H dipolo-dipolo). Como resultado desta interação, as moléculas de água são preferencialmente adsorvidas pela superfície do CA em detrimento das moléculas de FLX. Por motivo ainda desconhecido, o teor de interação das moléculas de água do meio com a superfície do compósito CA@NTC, por meio das ligações de H , é muito menor que as interações $n - \pi$ e/ou $\pi - \pi$ com as moléculas de FLX, justificando, assim, a maior eficiência para a remoção da FLX pelo compósito CA@NTC quando comparado com a amostra de CA.

Em tempo, afim de investigar a viabilidade da regeneração dos adsorventes (AC e CA@NTC), as amostras previamente preparadas foram centrifugadas, lavadas em solução de metanol e enxaguadas em água. Os resultados deste experimento são mostrados na Figura 27.

Como pode ser observado na Figura 27, não há evidências da presença de FLX nos espectros FTIR das amostras CA_FLX e CA@NTC_FLX após enxague com solução de metanol. Portanto, pode se concluir que o enxague das amostras mostra-se eficiente na dessorção da FLX adsorvida na superfície de ambos os materiais carbonáceos.

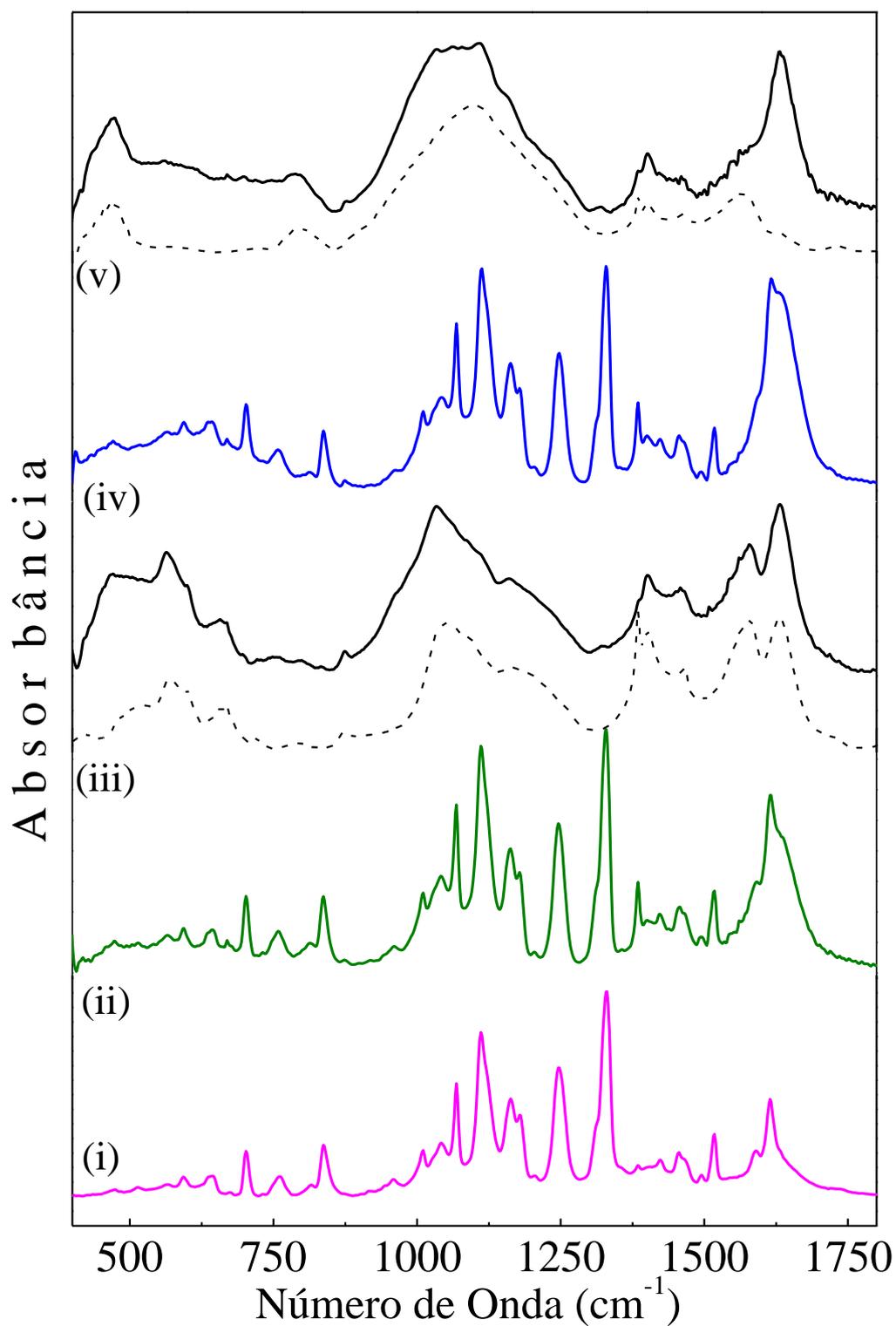


Figura 27. Espectros FTIR da FLX pura (i), CA@NTC_FLX: (ii) antes e (iii) após enxague com solução de metanol e CA_FLX: (iv) antes e (v) após enxague com solução de metanol. Os espectros FTIR das amostras CA@NTC e CA (antes da adsorção da FLX) são apresentados com linhas tracejadas em (iii) e (v), respectivamente.

3.5. Conclusão

Nesta parte do trabalho, os mecanismos de adsorção da fluoxetina na superfície de carvão ativado e nanotubos de carbono funcionalizados em carvão ativado foram investigados por espectroscopia FTIR. As mudanças nas intensidades relativas dos modos vibracionais de deformação e estiramento dos grupos hidroxila sugeriram a existência de interações de H entre as moléculas de água do meio e as superfícies das amostras CA e CA@NTC. Além do mais, as variações das energias vibracionais das ligações CH (redução) e $C = C$ (aumento) provenientes dos anéis aromáticos da FLX indicaram que estas moléculas são adsorvidas nas superfícies dos materiais carbonáceos por meio das interações $n - \pi$ e/ou $\pi - \pi$. Estes resultados combinados permitiram sugerir a existência de uma competição entre a adsorção de moléculas de FLX e de água do meio pelas superfícies das estruturas carbonáceas, sendo a amostra CA@NTC mais eficiente na adsorção de FLX do que a amostra CA. Por último, o estudo de dessorção demonstrou que a adsorção da FLX nas superfícies dos materiais carbonáceos é reversível em ambos os sistemas.

Capítulo 4

Conclusão geral

Em resumo, este trabalho reporta a aplicação bem sucedida das técnicas de espectroscopias Raman e FTIR na investigação das interações entre moléculas bioativas (óleo de pequi e fluoxetina) e sistemas nanoestruturados baseados em nanoemulsões de lecitina e compostos carbonáceos (carvão ativado e nanotubos de carbono funcionalizados na superfície de carvão ativado).

A partir do estudo sobre o efeito da presença do óleo de pequi nas propriedades estruturais das nanopartículas que compõem uma nanoemulsão à base de lecitina de ovo e óleo de pequi, foi constatado que a cabeça polar do fosfolípido (grupos PO_2^- e $N^+(CH_3)_3$) não estão diretamente envolvidos nas interações entre o fosfolípido e as moléculas que compõem o óleo de pequi. Por outro lado, as alterações espectrais na região do grupo éster carbonil indicaram que a introdução do óleo de pequi leva a um aumento da polaridade no ambiente próximo ao grupo acila dos hidrocarbonetos que compõem as nanoemulsões, possivelmente devido a uma interação via ponte de hidrogênio. Como consequência, as cadeias de hidrocarbonetos das moléculas que compõem a lecitina e o óleo de pequi estariam mais compactadas, favorecendo ao aumento da conformação *all-trans* em detrimento da conformação *gauche*. Este resultado foi comprovado por meio de marcadores Raman, tais como a razão entre as intensidades $I_{\nu_{as}(CH_2)}/I_{\nu_s(CH_2)}$, $I_{\nu_{as}(CH_2)}/I_{\nu_s(CH_3)}$ e $(I_{(C-C)_t}/I_{(C-C)_g})$. Estes marcadores estão correlacionados com os teores relativos entre conformémeros *trans/gauche* e a consequente razão ordem/desordem das cadeias de hidrocarboneto que compõem as nanoemulsões. Com base nestes resultados, foi possível concluir que a introdução do óleo de pequi leva a coexistir em menor

ou maior proporção relativa das fases L_d e L_o dependendo do teor crescente de óleo de pequi empregado nas amostras

No segundo trabalho, onde foi estudado os mecanismos de interação entre a fluoxetina e a superfície de carvão ativado e nanotubos de carbono funcionalizados na superfície de carvão ativado, foi constatada a existência de uma competição entre a adsorção de moléculas de água e moléculas de fluoxetina presentes no meio. Foi constatado que o compósito contendo nanotubos de carbono funcionalizados na superfície de carvão ativado é da ordem de 10 vezes mais eficiente na adsorção da fluoxetina que o carvão ativado puro, como indicado pelos resultados. Os dados espectroscópicos permitiram propor que as interações entre as moléculas de água do meio e da fluoxetina, ambas com as superfícies dos materiais carbonáceos, são do tipo interações de hidrogênio e interações $n - \pi$ e/ou $\pi - \pi$, respectivamente. Por último, o estudo de dessorção demonstrou que é possível reverter a adsorção da FLX nas superfícies dos materiais carbonáceos em ambos os sistemas.

Perspectivas de trabalhos futuros

- Desenvolver uma metodologia para a obtenção de espectros SERS de nanoemulsões lipídicas.
- Estudar o efeito da introdução de diferentes moléculas bioativas no arranjo estrutural de moléculas formadoras de nanoemulsões.
- Utilizar a espectroscopia Raman convencional e SERS no estudo da adsorção de diferentes moléculas nas superfícies de materiais carbonáceos.

Capítulo 5

Referências bibliográficas

ABBATE, S.; WUNDER, S. L.; ZERBI, G. Conformational dependence of Fermi resonances in n-alkanes. Raman spectra of 1,1,1,4,4,4-hexadeuteriobutane. **Journal of Physical Chemistry**, v. 88, n. 3, p. 593–600, 1984.

ABBATE, S.; ZERBI, G.; WUNDER, S. L. Fermi resonances and vibrational spectra of crystalline and amorphous polymethylene chains. **Journal of Physical Chemistry**, v. 86, n. 16, p. 3140–3149, 1982.

ABRAHAM, J. Pharmaceuticalization of society in context: Theoretical, empirical and health dimensions. **Sociology**, v. 44, n. 4, p. 603–622, 2010.

ADISHCHEV, S. V. et al. Stretch Vibrations of CH₂ as a Measure of Conformational and Lateral Orders in Fatty Acid and Phospholipid Layers. **Optoelectronics, Instrumentation and Data Processing**, v. 54, n. 6, p. 538–545, 2018.

AFKHAMI, A.; MADRAKIAN, T.; KARIMI, Z. The effect of acid treatment of carbon cloth on the adsorption of nitrite and nitrate ions. **Journal of Hazardous Materials**, v. 144, n. 1–2, p. 427–431, 2007.

AFSA, S. et al. Occurrence of 40 pharmaceutically active compounds in hospital and urban wastewaters and their contribution to Mahdia coastal seawater contamination. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 2, p. 1941–1955, 2020.

AKITA, C.; KAWAGUCHI, T.; KANEKO, F. Structural study on polymorphism of cis-unsaturated triacylglycerol: Triolein. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 9, p. 4346–4353, 2006.

ALLEGRI, C. et al. Study of pollutant gas adsorption on activated charcoal using ftir spectroscopy. **Spectroscopy Letters**, v. 27, n. 3, p. 367–377, 1994.

ALMADA, R. B. **Processos físico-químicos acoplados para tratamento de**

efluente industrial para fins de reuso. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, p. 141. 2008.

ALVES, A. C. M. **Avaliação do Tratamento de Efluentes Líquidos contendo Cobre e Chumbo por Adsorção em Carvão Ativado.** Dissertação (Mestrado em Engenharia: Recursos Hídricos e Saneamento) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Tecnologia. Maceió, 2007.

AMARAL, R. G. et al. Natural Products as Treatment against Cancer : A Historical and Current Vision. **Remedy Publications LLC**, v. 4, p. 1–5, 2019.

ANDERSEN, J. et al. Molecular basis for selective serotonin reuptake inhibition by the antidepressant agent fluoxetine (Prozac). **Molecular Pharmacology**, v. 85, n. 5, p. 703–714, 2014.

ARSHAD, S. et al. Synthesis, XRD crystal structure, spectroscopic characterization, local reactive properties using DFT and molecular dynamics simulations and molecular docking study of (E)-1-(4-bromophenyl)-3-(4-(trifluoromethoxy)phenyl)prop-2-en-1-one. **Journal of Molecular Structure**, v. 1137, p. 419–430, 2017.

AZUMA, T. et al. Detection of peramivir and laninamivir, new anti-influenza drugs, in sewage effluent and river waters in Japan. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–12, 2015.

BAETEN, V. et al. Oil and Fat Classification by FT-Raman Spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 7, p. 2638–2646, 1998.

BASPINAR, Y.; KECK, C. M.; BORCHERT, H. H. Development of a positively charged prednicarbate nanoemulsion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 383, n. 1–2, p. 201–208, 2010.

BAUDOT, C.; TAN, C. M.; KONG, J. C. FTIR spectroscopy as a tool for nano-material characterization. **Infrared Physics and Technology**, v. 53, n. 6, p. 434–438, 2010.

BAYDA, S. et al. The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical-physical applications to nanomedicine. **Molecules**, v. 25, n. 1, 2020.

BENESCH, M. G. K. et al. A DSC and FTIR spectroscopic study of the effects of the

epimeric 4-cholesten-3-ols and 4-cholesten-3-one on the thermotropic phase behaviour and organization of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes: Comparison with their 5-cholesten analogues. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 177, p. 71–90, 2014.

BHATNAGAR, A.; SILLANPÄÄ, M. A review of emerging adsorbents for nitrate removal from water. **Chemical Engineering Journal**, v. 168, n. 2, p. 493–504, 2011.

BI, R. et al. Sensitivities of seven algal species to triclosan, fluoxetine and their mixtures. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2018.

BINDER, H.; KLOSE, G. Lyotropic phase behavior and structure of mixed lipid (POPC)-detergent (C12En, n = 2, 4, 6) assemblies: Insights from hydration-tuning infrared spectroscopy. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 106, n. 42, p. 10991–11001, 2002.

BONENFANT, D. et al. Adsorption study of a commonly used antidepressant drug, fluoxetine hydrochloride, onto a crosslinked β -cyclodextrin-carboxymethylcellulose polymer. **Water Science and Technology**, v. 66, n. 1, p. 224–230, 2012.

BRESSON, S.; EL MARSSI, M.; KHELIFA, B. Conformational influences of the polymorphic forms on the CO and C-H stretching modes of five saturated monoacid triglycerides studied by Raman spectroscopy at various temperatures. **Vibrational Spectroscopy**, v. 40, n. 2, p. 263–269, 2006.

BROOKS, B. W. et al. Aquatic ecotoxicology of fluoxetine. **Toxicology Letters**, v. 142, n. 3, p. 169–183, 2003.

BROWNLOW, S. R. et al. Probing deformation of double-walled carbon nanotube (DWNT)/epoxy composites using FTIR and Raman techniques. **Composites Science and Technology**, v. 70, n. 10, p. 1460–1468, 2010.

BRUXEL, F. et al. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1827–1840, 2012.

BUNOW, M. R.; LEVIN, I. W. Comment on the carbon-hydrogen stretching region of vibrational raman spectra of phospholipids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 487, n. 2, p. 388–394, 1977.

BUSH, F.; ADAMS, R.; LEVIN, I. W. Structural Reorganizations in Lipid Bilayer

Systems: Effect of Hydration and Sterol Addition on Raman Spectra of Dipalmitoylphosphatidylcholine Multilayers". **Biochemistry**, n. 19, p. 4429–4436, 1980.

BYRNE, J. D.; BETANCOURT, T.; BRANNON-PEPPAS, L. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 15, p. 1615–1626, 2008.

CALLENDER, S. P. et al. Microemulsion utility in pharmaceuticals: Implications for multi-drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 526, n. 1–2, p. 425–442, 2017.

CARTER, M. C.; WEBER, W. J.; OLMSTEAD, K. P. Effects of background dissolved organic matter on TCE adsorption by GAC. **Journal / American Water Works Association**, v. 84, n. 8, p. 81–91, 1992.

ÇEÇEN, F.; AKTAŞ, Ö. **Fundamentals of Adsorption onto Activated Carbon in Water and Wastewater Treatment**. [s.l.] Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, 2011.

CHEN, J. et al. Effects of pre-treatment in air microwave plasma on the structure of CNTs and the activity of Ru/CNTs catalysts for ammonia decomposition. **Catalysis Today**, v. 148, n. 1–2, p. 97–102, 2009.

CHEN, W. et al. Adsorption of hydroxyl- and amino-substituted aromatics to carbon nanotubes. **Environmental Science and Technology**, v. 42, n. 9, p. 6862–6868, 2008.

CHEN, W.; DUAN, L.; ZHU, D. Adsorption of polar and nonpolar organic chemicals to carbon nanotubes. **Environmental Science and Technology**, v. 41, n. 24, p. 8295–8300, 2007.

CHOWDHURY, P. et al. Direct UV photolysis of pharmaceutical compounds: Determination of pH-dependent quantum yield and full-scale performance. **Chemical Engineering Journal**, v. 380, n. May 2019, p. 122460, 2020.

COLLARD, L.; SINJAB, F.; NOTINGHER, I. Raman Spectroscopy Study of Curvature-Mediated Lipid Packing and Sorting in Single Lipid Vesicles. **Biophysical Journal**, v. 117, n. 9, p. 1589–1598, 2019.

COLOMBO, N. B. R. et al. Caryocar brasiliense camb protects against genomic and

oxidative damage in urethane-induced lung carcinogenesis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 9, p. 852–862, 2015.

CRINI, G. Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in wastewater treatment. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 30, n. 1, p. 38–70, 2005.

CSISZÁR, A. et al. The phase transition behavior of 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC) model membrane influenced by 2,4-dichlorophenol - An FT-Raman Spectroscopy Study. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 139, n. 2, p. 115–124, 2006.

DA SILVA, E.; BRESSON, S.; ROUSSEAU, D. Characterization of the three major polymorphic forms and liquid state of tristearin by Raman spectroscopy. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 157, n. 2, p. 113–119, 2009.

DA SILVA, E.; ROUSSEAU, D. Molecular order and thermodynamics of the solid-liquid transition in triglycerides via Raman spectroscopy. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 10, n. 31, p. 4606–4613, 2008.

DE ALMEIDA, R. F. M.; FEDOROV, A.; PRIETO, M. Sphingomyelin/phosphatidylcholine/cholesterol phase diagram: Boundaries and composition of lipid rafts. **Biophysical Journal**, v. 85, n. 4, p. 2406–2416, 2003.

DE SOUSA, F. B. et al. Supramolecular complex of fluoxetine with β -cyclodextrin: An experimental and theoretical study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 353, n. 1–2, p. 160–169, 2008.

DOHI, K.; KANEKO, F.; KAWAGUCHI, T. X-ray and vibrational spectroscopic study on polymorphism of trielaidin. **Journal of Crystal Growth**, v. 237–239, n. 1- 4 III, p. 2227–2232, 2002.

DUNCAN, R. Polymer conjugates for tumour targeting and intracytoplasmic delivery. The EPR effect as a common gateway? **Pharmaceutical Science and Technology Today**, v. 2, n. 11, p. 441–449, 1999.

EL-HABEEB, A. A.; REFAT, M. S. Charge transfer complexes beneficial method for

determination of fluoxetine HCl pure drug: Spectroscopic and thermal analyses discussions. **Russian Journal of General Chemistry**, v. 84, n. 9, p. 1810–1818, 2014.

EL GAMAL, M. et al. Bio-regeneration of activated carbon: A comprehensive review. **Separation and Purification Technology**, v. 197, p. 345–359, 2018.

FERRIER, D. R. **Lippincott Illustrated Reviews: Biochemistry**. Seventh ed. Philadelphia, United States: Lippincott Williams & Wilkins, 2017.

FORAN, C. M. et al. Reproductive Assessment of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Following a Four-Week Fluoxetine (SSRI) Exposure. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 46, n. 4, p. 511–517, 2004.

FOX, C. B.; UIBEL, R. H.; HARRIS, J. M. Detecting phase transitions in phosphatidylcholine vesicles by raman microscopy and self-modeling curve resolution. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 111, n. 39, p. 11428–11436, 2007.

GARRIDO, E. M. et al. Fluoxetine and Norfluoxetine Revisited: New Insights into the Electrochemical and Spectroscopic Properties. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 113, n. 36, p. 9934–9944, 2009.

GENOVA, J. et al. Fourier-transform infrared and Raman characterization of bilayer membranes of the phospholipid SOPC and its mixtures with cholesterol. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 557, n. April, p. 85–93, 2018.

GHOTRA, B. S.; DYAL, S. D.; NARINE, S. S. Lipid shortenings: A review. **Food Research International**, v. 35, n. 10, p. 1015–1048, 2002.

GIRIFALCO, L. A.; HODAK, M.; LEE, R. S. Carbon nanotubes, buckyballs, ropes, and a universal graphitic potential. **Physical Review B - Condensed Matter and Materials Physics**, v. 62, n. 19, p. 13104–13110, 2000.

GONÇALVES, J. O. **DESENVOLVIMENTO DE HIDROGÉIS À BASE DE QUITOSANA MODIFICADA PARA A ADSORÇÃO DE CORANTES ALIMENTÍCIOS EM SISTEMA BINÁRIO**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande, 2018.

GRAF, R. et al. New self-assembled nanogels based on host-guest interactions: Characterization and drug loading. **Journal of Controlled Release**, v. 111, n. 3, p. 316–

324, 2006.

GUEDES, A. M. M. et al. Length-scale Specific Crystalline Structural Changes Induced by Molecular Randomization of Pequi Oil. **Journal of Oleo Science**, v. 66, n. 5, p. 469–478, 2017.

GUPTA, A. et al. Nanoemulsions: Formation, properties and applications. **Soft Matter**, v. 12, n. 11, p. 2826–2841, 2016.

HAZELTON, P. D. et al. Chronic fluoxetine exposure alters movement and burrowing in adult freshwater mussels. **Aquatic Toxicology**, v. 151, p. 27–35, 2014.

HENRY, T. B.; BLACK, M. C. Acute and chronic toxicity of fluoxetine (selective serotonin reuptake inhibitor) in western Mosquitofish. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 54, n. 2, p. 325–330, 2008.

HIJNEN, W. A. M. et al. GAC adsorption filters as barriers for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water treatment. **Water Research**, v. 44, n. 4, p. 1224–1234, 2010.

HUANG, C. HSIEN; LAPIDES, J. R.; LEVIN, I. W. Phase-Transition Behavior of Saturated, Symmetric Chain Phospholipid Bilayer Dispersions Determined by Raman Spectroscopy: Correlation between Spectral and Thermodynamic Parameters. **Journal of the American Chemical Society**, v. 104, n. 22, p. 5926–5930, 1982.

INOUE, T. et al. Effect of fatty acids on phase behavior of hydrated dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer: Saturated versus unsaturated fatty acids. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 109, n. 2, p. 117–133, 2001.

JAMIESON, L. E. et al. Ratiometric analysis using Raman spectroscopy as a powerful predictor of structural properties of fatty acids. **Royal Society Open Science**, v. 5, n. 12, 2018.

JIA, L. et al. Modified multi-walled carbon nanotubes assisted foam fractionation for effective removal of acid orange 7 from the dyestuff wastewater. **Journal of Environmental Management**, v. 262, n. February, p. 110260, 2020.

JOSINO, M. A. A. et al. Development and in vitro evaluation of microparticles of fluoxetine in galactomannan against biofilms of *S. aureus* methicilin resistant.

Carbohydrate Polymers, v. 252, n. June 2020, 2021.

KAMIŃSKI, D. M. et al. Antibiotic amphotericin B-DPPC lipid complex: X-ray diffraction and FTIR studies. **Journal of Molecular Structure**, v. 1080, p. 57–62, 2014.

KARIEL, N.; DAVIDSON, E.; KEOUGH, K. M. W. Cholesterol does not remove the gel-liquid crystalline phase transition of phosphatidylcholines containing two polyenoic acyl chains. **BBA - Biomembranes**, v. 1062, n. 1, p. 70–76, 1991.

KIM, U. J. et al. Raman and IR spectroscopy of chemically processed single-walled carbon nanotubes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 44, p. 15437–15445, 2005.

KLANG, V.; VALENTA, C. Lecithin-based nanoemulsions. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 21, n. 1, p. 55–76, 2011.

KONICKI, W.; ALEKSANDRZAK, M.; MIJOWSKA, E. Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies on adsorption of cationic dyes from aqueous solutions using graphene oxide. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 123, p. 35–49, 2017.

KOVÁCS, A. Vibrational analysis of 4-trifluoromethylphenol. **Journal of Molecular Structure**, v. 645, p. 193–198, 2003.

KOYAMA, Y.; TODA, S.; KYOGOKU, Y. Raman spectra and conformation of the glycerophosphorycholine headgroup. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 19, p. 74–92, 1977.

KRANENBURG, M.; SMIT, B. Phase behavior of model lipid bilayers. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 14, p. 6553–6563, 2005.

KRIVANEK, R.; OKORO, L.; WINTER, R. Effect of cholesterol and ergosterol on the compressibility and volume fluctuations of phospholipid-sterol bilayers in the critical point region: A molecular acoustic and calorimetric study. **Biophysical Journal**, v. 94, n. 9, p. 3538–3548, 2008.

LEFRANT, S.; BAIBARAC, M.; BALTOG, I. Raman and FTIR spectroscopy as valuable tools for the characterization of polymer and carbon nanotube based composites. **Journal of Materials Chemistry**, v. 19, n. 32, p. 5690–5704, 2009.

LEVIN, I. W.; KEIHN, E.; HARRIS, W. C. A Raman spectroscopic study on the effect of cholesterol on lipid packing in diether phosphatidylcholine bilayer dispersions. **BBA - Biomembranes**, v. 820, n. 1, p. 40–47, 1985.

LEWIS, R. N. A. H.; MCELHANEY, R. N. Structures of the subgel phases of n-saturated diacyl phosphatidylcholine bilayers : FTIR spectroscopic studies of $^{13}\text{C} = \text{O}$ and ^2H labeled lipids. **Biophysical Journal**, v. 61, n. 1, p. 63–77, 1992.

LEWIS, R. N. A. H.; MCELHANEY, R. N. Membrane lipid phase transitions and phase organization studied by Fourier transform infrared spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1828, n. 10, p. 2347–2358, 2013.

LEWIS, R. N. A. H.; POHLE, W.; MCELHANEY, R. N. The interfacial structure of phospholipid bilayers: Differential scanning calorimetry and Fourier transform infrared spectroscopic studies of 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine and its dialkyl and acyl-alkyl analogs. **Biophysical Journal**, v. 70, n. 6, p. 2736–2746, 1996.

LI, Y. et al. Prioritization of pharmaceuticals in water environment in China based on environmental criteria and risk analysis of top-priority pharmaceuticals. **Journal of Environmental Management**, v. 253, n. November 2019, p. 109732, 2020a.

LI, Z. et al. Adsorption of hazardous dyes on functionalized multiwalled carbon nanotubes in single and binary systems: Experimental study and physicochemical interpretation of the adsorption mechanism. **Chemical Engineering Journal**, v. 389, p. 124467, 2020b.

LOMBARDO, D. et al. Self-assembly of organic nanomaterials and biomaterials: The bottom-up approach for functional nanostructures formation and advanced applications. **Materials**, v. 13, n. 5, 2020.

MA, W. et al. Biototoxicity assessment and toxicity mechanism on coal gasification wastewater (CGW): A comparative analysis of effluent from different treatment processes. **Science of the Total Environment**, v. 637–638, p. 1–8, 2018.

MANTSCH, H. H.; MCELHANEY, R. N. Phospholipid phase transitions in model and biological membranes as studied by infrared spectroscopy. **Chemistry and Physics of**

Lipids, v. 57, n. 2–3, p. 213–226, 1991.

MARICHELVAM, M. K.; AZHAGURAJAN, A. Removal of mercury from effluent solution by using banana corm and neem leaves activated charcoal. **Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management**, v. 10, p. 360–365, 2018.

MARSH, D. Liquid-ordered phases induced by cholesterol: A compendium of binary phase diagrams. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1798, n. 3, p. 688–699, 2010.

MATSUBARA, E. Y. et al. Electronic enhancement of hybrid specific capacity of carbon nanotube/bone charcoal composite with Ag nanoparticle decoration. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 765, p. 58–64, 2016.

MATSUMURA, Y.; MAEDA, H. A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumoritropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. **Cancer Research**, v. 46, n. 8, p. 6387–6392, 1986.

MECKFESSEL, M. H.; BRANDT, S. The structure, function, and importance of ceramides in skin and their use as therapeutic agents in skin-care products. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 71, n. 1, p. 177–184, 2014.

MELO, D. Q. et al. **Adsorção: aspectos teóricos e aplicações ambientais**. [s.l.: s.n.].

MENDELSON, R. Laser-Raman Spectroscopic Study of Egg Lecithin and Egg Lecithin-Cholesterol Mixtures. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 290, p. 15–21, 1972.

MENDELSON, R.; MOORE, D. J. Vibrational spectroscopic studies of lipid domains in biomembranes and model systems. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 96, n. 1–2, p. 141–157, 1998.

MENNIGEN, J. A.; SASSINE, J.; TRUDEAU, V. L.; MOON, THOMAS W. Waterborne fluoxetine disrupts feeding and energy metabolism in the goldfish *Carassius auratus*. **Aquatic Toxicology**, v. 100, n. 1, p. 128–137, 2010.

METCALFE, C. D. et al. Antidepressants and their metabolites in municipal

wastewater, and downstream exposure in an urban watershed. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, n. 1, p. 79–89, 2010.

MIRANDA-VILELA, A. L. **AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIGENOTÓXICOS , ANTIOXIDANTES E FARMACOLÓGICOS DE EXTRATOS DA POLPA DO FRUTO DO PEQUI (*Caryocar brasiliense* CAMB)**. Tese (Doutorado em Biologia Animal) – Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Genética e Morfologia, Universidade de Brasília. Brasília, 2009.

MIRANDA-VILELA, A. L. et al. Dextran-functionalized magnetic fluid mediating magnetohyperthermia combined with preventive antioxidant pequi-oil supplementation: Potential use against cancer. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 9, n. 7, p. 1261–1271, 2013.

MIRANDA, A. C. et al. Avaliação Do Conhecimento Dos Consumidores De Duas Cidades Da Grande Sp, Brasil, Sobre Os Impactos Causados Pelo Descarte Incorreto De Medicamentos Tt - Evaluación Del Conocimiento De Los Consumidores De Dos Ciudades Del Gran Sao Paulo, Brasil, Sobre Los. **Interciencia**, v. 43, n. 8, p. 580–584, 2018.

MITRA, S.; DASH, R. Natural Products for the Management and Prevention of Breast Cancer. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, p. 1–23, 2018.

MOTOYAMA, M. <Structure and Phase Characterization of Triacylglycerols.pdf>. v. 12, p. 19–68, 2012.

MÜLLER, E. A. et al. Adsorption of water on activated carbons: A molecular simulation study. **Journal of Physical Chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1189–1196, 1996.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. Sixth ed. [s.l.] W.H.Freeman & Co Ltd, 2013. v. 53

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, p. 629–661, 2016.

NORDÉN, T. P. et al. Physicochemical characterisation of a drug-containing phospholipid-stabilised o/w emulsion for intravenous administration. **European Journal of**

Pharmaceutical Sciences, v. 13, n. 4, p. 393–401, 2001.

OMBREDANE, A. S. et al. Nanoemulsion-based systems as a promising approach for enhancing the antitumoral activity of pequi oil (*Caryocar brasiliense* Cambess.) in breast cancer cells. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 58, n. May, p. 101819, 2020.

ORENDORFF, C. J.; DUCEY, M. W.; PEMBERTON, J. E. Quantitative correlation of Raman spectral indicators in determining conformational order in alkyl chains. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 106, n. 30, p. 6991–6998, 2002.

PALMEIRA, S. M. et al. Chemopreventive effects of pequi oil (*Caryocar brasiliense* Camb.) on preneoplastic lesions in a mouse model of hepatocarcinogenesis. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 25, n. 4, p. 299–305, 2016.

PASENKIEWICZ-GIERULA, M. et al. Charge pairing of headgroups in phosphatidylcholine membranes: A molecular dynamics simulation study. **Biophysical Journal**, v. 76, n. 3, p. 1228–1240, 1999.

PAWLIKOWSKA-PAWŁĘGA, B. et al. FTIR, ¹H NMR and EPR spectroscopy studies on the interaction of flavone apigenin with dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1828, n. 2, p. 518–527, 2013.

PAWLIKOWSKA-PAWŁĘGA, B. et al. Characteristics of quercetin interactions with liposomal and vacuolar membranes. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1838, n. 1 Part B, p. 254–265, 2014.

PELLI, M.; CONNAUGHTON, V. P. Chronic exposure to environmentally-relevant concentrations of fluoxetine (Prozac) decreases survival, increases abnormal behaviors, and delays predator escape responses in guppies. **Chemosphere**, v. 139, p. 202–209, 2015.

PERINI, J. A. D. L. et al. Photo-Fenton degradation of the pharmaceuticals ciprofloxacin and fluoxetine after anaerobic pre-treatment of hospital effluent. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 7, p. 6233–6240, 2017.

PFEIFFER, H. et al. Hydration pressure and phase transitions of phospholipids: II.

Thermotropic approach. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1609, n. 2, p. 148–152, 2003.

PINTO, B. V.; FERREIRA, A. P. G.; CAVALHEIRO, E. T. G. A mechanism proposal for fluoxetine thermal decomposition. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 130, n. 3, p. 1553–1559, 2017.

POPOVA, A. V.; HINCHA, D. K. Effects of cholesterol on dry bilayers: Interactions between phosphatidylcholine unsaturation and glycolipid or free sugar. **Biophysical Journal**, v. 93, n. 4, p. 1204–1214, 2007.

ROLL, M. M. et al. The pequi pulp oil (Caryocar Brasiliense Camb.) provides protection against aging-related anemia, inflammation and oxidative stress in Swiss mice, especially in females. **Genetics and Molecular Biology**, v. 41, n. 4, p. 858–869, 2018.

ROSEN, M. J.; KUNJAPPU, J. T. **SURFACTANTS AND INTERFACIAL PHENOMENA**. fourth ed. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2012.

ROSOLEN, J. M. et al. Carbon nanotube/felt composite electrodes without polymer binders. **Journal of Power Sources**, v. 162, n. 1, p. 620–628, 2006.

RUTHVEN, D. M. **Principles of adsorption and adsorption processes**. [s.l.: s.n.].

SAILER, K.; VIAGGI, S.; NÜSSE, M. Kinetics of radiation- and cytochrome c-induced modifications in liposomes analysed by FT-Raman spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1329, n. 2, p. 259–268, 1997.

SAITO, R.; DRESSELHAUS, G.; DRESSELHAUS, M. S. **Physical Properties of Carbon Nanotubes**. [s.l.] Imperial College Press, 1998.

SALGADO, J.; VILLALÁIN, J.; GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J. C. Metastability of dimiristoylphosphatidylethanolamine as studied by FT-IR and the effect of α -tocopherol. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1239, p. 213–225, 1995.

SANTOS, L. H. M. L. M. et al. Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: Identification of ecologically relevant pharmaceuticals. **Science of the Total Environment**, v. 461–462, p. 302–316, 2013.

SATO, K. Crystallization behaviour of fats and lipids - a review. **Chemical**

Engineering Science, v. 56, p. 2255–2265, 2001.

SENA, D. M. et al. Physicochemical and spectroscopical investigation of Pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm.) pulp oil. **Grasas y Aceites**, v. 61, n. 2, p. 191–196, 2010.

SMITH, S. C.; RODRIGUES, D. F. Carbon-based nanomaterials for removal of chemical and biological contaminants from water: A review of mechanisms and applications. **Carbon**, v. 91, p. 122–143, 2015.

SNYDER, R. G.; HSU, S. L.; KRIMM, S. Vibrational spectra in the C-H stretching region and the structure of the polymethylene chain. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy**, v. 34, n. 4, p. 395–406, 1978.

SOUSA-MOURA, D. et al. CNTs coated charcoal as a hybrid composite material: Adsorption of fluoxetine probed by zebrafish embryos and its potential for environmental remediation. **Chemosphere**, v. 230, p. 369–376, 2019.

SOUSA-MOURA, D. **O USO DE CARBONO MICRO/NANOESTRUTURADO HÍBRIDO NA REMEDIAÇÃO DE ECOSISTEMAS AQUÁTICOS CONTAMINADOS POR FÁRMACOS PSICOTRÓPICOS UTILIZANDO O PEIXE-ZEBRA COMO BIOSSENSOR.** [s.l.] University of Brasilia, 2019.

SUI, Z. et al. Green synthesis of carbon nanotube–graphene hybrid aerogels and their use as versatile agents for water purification. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, p. 8767–8771, 2012.

SWEETMAN, M. et al. Activated Carbon, Carbon Nanotubes and Graphene: Materials and Composites for Advanced Water Purification. **C**, v. 3, n. 4, p. 18, 2017.

SZNITOWSKA, M.; DABROWSKA, E. A.; JANICKI, S. Solubilizing potential of submicron emulsions and aqueous dispersions of lecithin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 246, n. 1–2, p. 203–206, 2002.

TAI, K. et al. The effect of sterol derivatives on properties of soybean and egg yolk lecithin liposomes: Stability, structure and membrane characteristics. **Food Research International**, v. 109, n. 17, p. 24–34, 2018.

TANTIPOLPHAN, R. et al. Analysis of lecithin-cholesterol mixtures using Raman

spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 2, p. 476–484, 2006.

TANTIPOLPHAN, R. et al. Adsorption of bovine serum albumin (BSA) onto lecithin studied by attenuated total reflectance Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 337, n. 1–2, p. 40–47, 2007.

TAYEB, H. H.; SAINSBURY, F. Nanoemulsions in drug delivery: Formulation to medical application. **Nanomedicine**, v. 13, n. 19, p. 2507–2525, 2018.

TERZYK, A. P. The influence of activated carbon surface chemical composition on the adsorption of acetaminophen (paracetamol) in vitro. Part II. TG, FTIR, and XPS analysis of carbons and the temperature dependence of adsorption kinetics at the neutral pH. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 177, n. 1, p. 23–45, 2001.

TRAN, H. N. et al. Insights into the mechanism of cationic dye adsorption on activated charcoal: The importance of π – π interactions. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 107, p. 168–180, 2017.

TRAN, H. N.; YOU, S. J.; CHAO, H. P. Fast and efficient adsorption of methylene green 5 on activated carbon prepared from new chemical activation method. **Journal of Environmental Management**, v. 188, n. 2017, p. 322–336, 2017.

UMEMURA, J.; CAMERON, D. G.; MANTSCH, H. H. A Fourier transform infrared spectroscopic study of the molecular interaction of cholesterol with 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 602, p. 32–44, 1980.

VAN NIEUWENHUYZEN, W.; TOMÁS, M. C. Update on vegetable lecithin and phospholipid technologies. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 110, n. 5, p. 472–486, 2008a.

VAN NIEUWENHUYZEN, W.; TOMÁS, M. C. Update on vegetable lecithin and phospholipid technologies. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 110, n. 5, p. 472–486, 2008b.

VASSKOG, T. et al. Occurrence of selective serotonin reuptake inhibitors in sewage

and receiving waters at Spitsbergen and in Norway. **Journal of Chromatography A**, v. 1185, n. 2, p. 194–205, 2008.

VOORT, F. R. VAN DE; ISMAIL, A. A.; SEDMAN, J.; Emo, G. Monitoring the Oxidation of Edible Oils by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. **JAOCs**, v. 71, n. 3, p. 243–253, 1994.

WARDHAN, R.; MUDGAL, P. **Textbook of Membrane Biology**. 1. ed. Singapore: Springer Singapore, 2017.

WONG, P. T. T. Raman Spectroscopy of Thermotropic and High-Pressure Phases of Aqueous Phospholipid Dispersions. **Annual Review of Biophysics and Bioengineering**, v. 13, p. 1–24, 1984.

WONG, P. T. T.; MANTSCH, H. H. High-pressure infrared spectroscopic evidence of water binding sites in 1, 2-diacyl phospholipids *. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 46, p. 213–224, 1988.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Who report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all**. Disponível em: <
<https://www.who.int/publications/i/item/who-report-on-cancer-setting-priorities-investing-wisely-and-providing-care-for-all>>. Acesso em: 26 de outubro de 2020.

WUNDER, S. L. Raman Spectroscopic Study of the High-Pressure Phase of Polyethylene. **Macromolecules**, v. 14, n. 4, p. 1024–1030, 1981.

YELLIN, N.; LEVIN, I. W. Hydrocarbon chain disorder in lipid bilayers: Temperature dependent raman spectra of 1,2-diacyl phosphatidylcholine-water gels. **Biochimica et Biophysics Acta**, v. 489, p. 177–190, 1977.

YUAN, S. et al. Detection, occurrence and fate of 22 psychiatric pharmaceuticals in psychiatric hospital and municipal wastewater treatment plants in Beijing, China. **Chemosphere**, v. 90, n. 10, p. 2520–2525, 2013.

ZARBIN, A. J. G.; OLIVEIRA, M. M. Nanoestruturas de Carbono (Nanotubos, Grafeno): Quo Vadis? **Quimica Nova**, v. 36, n. 10, p. 1533–1539, 2013.

ZARBIN, A. J. G.; ORTH, E. S. ALGUMAS ESTRUTURAS DO CARBONO

ELEMENTAR E SUA IMPORTÂNCIA PARA O DESENVOLVIMENTO E SOBERANIA DO BRASIL. **Química Nova**, v. XY, p. 1–7, 2019.

ZHAO, J. et al. Noncovalent functionalization of carbon nanotubes by aromatic organic molecules. **Applied Physics Letters**, v. 82, n. 21, p. 3746–3748, 2003.

ZHU, Y. et al. Stability Mechanism of Two Soybean Protein-Phosphatidylcholine Nanoemulsion Preparation Methods from a Structural Perspective: A Raman Spectroscopy Analysis. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2019.



Nanoemulsion-based systems as a promising approach for enhancing the antitumoral activity of pequi oil (*Caryocar brasiliense* Cambess.) in breast cancer cells



Alicia S. Ombredane^{a,b,1}, Victor H.S. Araujo^{b,1}, Clarissa O. Borges^a, Patrícia L. Costa^{a,c}, Marcela G. Landim^{a,b}, Andréia C. Pinheiro^{a,b}, Ísis O. Szlachetka^d, Luiz E.C. Benedito^e, Laila S. Espindola^e, Diego J.S. Dias^b, Daniela M. Oliveira^f, Juliano A. Chaker^{a,b,c}, Sebastião W. da Silva^{b,d}, Ricardo B. de Azevedo^{b,f}, Graziella A. Joanitti^{a,b,c,f,*}

^a Laboratory of Bioactive Compounds and Nanobiotechnology (LBCNano), University of Brasília, Campus Universitário – Centro Metropolitano, Ceilândia Sul, Brasília, DF, 72220-275, Brazil

^b Post-Graduation Program in Nanoscience and Nanobiotechnology, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília, 70910-900, Brazil

^c Post-Graduation Program in Sciences and Technologies in Health, Faculty of Ceilandia, University of Brasília, Campus Universitário – Centro Metropolitano, Ceilândia Sul, Brasília, DF, 72220-275, Brazil

^d Institute of Physics, University of Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília, 70910-900, Brazil

^e Laboratório de Farmacognosia, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília, 70910-900, Brazil

^f Laboratory of Nanobiotechnology, Department of Genetics and Morphology, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília, 70910-900, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Nanoemulsion
Pequi oil
Breast cancer
Stability
Cytotoxicity

ABSTRACT

Previous studies have reported the effects of pequi oil (*Caryocar brasiliense* Cambess.) in cancer prevention and treatment. However, its biomedical applications are limited due to the hydrophobic nature of the oil. In this study, we used nanotechnology strategies to design and characterize a pequi oil-based nanoemulsion and evaluate its anticancer effects. Our data show that monodisperse (PDI 0.23) pequi oil nanoemulsions (123 nm – hydrodynamic diameter; –15 mV – zeta potential) were prepared successfully using lecithin as surfactant and had physicochemical stability when exposed to stress conditions (pH and serial dilution) or long-term (200 days) storage at different temperatures. Significant dose- and time-dependent antitumoral effects against breast cancer cells (4T1) were also observed (IC₅₀ of 299.8 and 173.7 µg/mL after 24 and 48 h respectively, $p < 0.001$), along with lower cytotoxicity against non-tumoral cells (NIH/3T3) (IC₅₀ of 442.7 and 380.3 µg/mL after 24 and 48 h respectively). In addition, we show that in our formulation, pequi oil has a dual role, behaving both as a structural component of the nanoemulsion and as a cytotoxic agent against breast cancer cells. Taken together, our results reveal pequi oil-based nanoemulsion as a promising nanosized platform to be used as an adjuvant tool for breast cancer treatments.

1. Introduction

Breast cancer is by far the most common and frequent type of cancer

among women worldwide. In 2018, the World Health Organization (WHO) reported that breast cancer was the fifth cause of death by cancer, with a 15% mortality rate [1,2]. Due to the heterogeneity and

* Corresponding author. Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia, Campus Universitário – Centro Metropolitano, Ceilândia Sul, Brasília, DF, 72220-275, Brazil.

E-mail addresses: aliciaombredane@gmail.com (A.S. Ombredane), victorhunterhsa@hotmail.com (V.H.S. Araujo), clarissaborges2@gmail.com (C.O. Borges), patricia_lcosta@hotmail.com (P.L. Costa), marcela.landim@gmail.com (M.G. Landim), andreiacp@gmail.com (A.C. Pinheiro), isis_szlachetka@hotmail.com (Í.O. Szlachetka), lueduardoch@gmail.com (L.E.C. Benedito), darvenne@gmail.com (L.S. Espindola), djsdias@unb.br (D.J.S. Dias), dmoliveira@unb.br (D.M. Oliveira), julianochaker@gmail.com (J.A. Chaker), swsilvaunb@gmail.com (S.W. da Silva), razevedo@unb.br (R.B. de Azevedo), bygra1@gmail.com, gjoanitti@unb.br (G.A. Joanitti).

¹ Both authors contributed equally to this manuscript.

<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101819>

Received 28 January 2020; Received in revised form 7 May 2020; Accepted 17 May 2020

Available online 24 May 2020

1773-2247/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

high incidence of breast cancer, the investigation of novel therapeutic approaches is fundamental to complement conventional clinical procedures (surgery, chemotherapy, radiotherapy, and hormone therapy) and to improve therapeutic treatment [3–5]. Several studies have explored different natural sources of new molecules with potential effects against this type of cancer, in which plant-derived bioactive compounds and their derivatives have emerged among the main candidates for new anticancer agents [6–9].

Pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess.) is a native tree found in the Brazilian Cerrado whose fruit-extracted oil is mostly composed by fatty acids (e.g. oleic acid) with the presence of other antioxidant molecules (approximately 0.5–1% w/w) such as carotenoids, vitamin C, and phenolic compounds [10–17]. Despite its use in food preparations, pequi oil is also largely employed in folk medicine to treat various health disorders such as respiratory diseases, edema, ophthalmic problems related to low vitamin A intake, burns, wound healing, bruises, swelling, and menstrual disorders [10,14,18–20].

Previous studies have reported the effects of pequi oil on cancer prevention and treatment. Colombo and collaborators (2015) showed that oral supplementation with pequi oil decreased DNA damage and lipid peroxidation in a chemically induced lung carcinogenesis model *in vivo* [12]. In breast cancer animal models, oral supplementation of pequi oil inhibited tumor growth [21], reduced the side effects induced by chemotherapy [22], and potentiated anticancer effects of magnetic hyperthermia therapy [23].

Nanoemulsions are usually used as drug delivery systems to carry mainly hydrophobic compounds in pharmaceutical, food, and cosmetic industries [24–29]. They are nanosystems (< 500 nm) composed of an oil phase and an aqueous phase stabilized by surfactants. Interestingly, the hydrophobic compound can be protected from degradation while encapsulated in this nanosized platform [24,25,28]. It is also possible to tailor the surface of this nanosystem with specific cancer-targeted molecules able to direct the nanoparticles to the desired tissue [28,29].

In cancer therapy, parenteral administration of nanoemulsions is mainly used to deliver chemotherapy to the tumor microenvironment. The enhanced permeability and retention effect along with tumor defective vascularization and low lymphatic drainage improves the accumulation of nanoemulsions into targeted tumors and reduces side effects [25,27]. However, the use of administration routes that allow improved absorption and biodistribution of the pequi oil, such as parenteral routes (e.g. intravascular, intramuscular, subcutaneous), is not suitable due to the hydrophobic nature of the oil; therefore, restricting the options for delivery. In this context, nanotechnology has emerged as a promising approach for circumventing the challenge of delivering poorly soluble compounds [24–26,28].

In this study, we used nanotechnology strategies to design and characterize a pequi oil-based nanoemulsion (PeNE) and evaluate its anticancer effects. Our data reveal that pequi oil has a dual role in this formulation, behaving both as a structural component of the nanoemulsion and as a cytotoxic agent against breast cancer cells.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Pequi oil was donated by Farmacotécnica (a pharmacotechnical development company, Brasília, Brazil). Egg lecithin was purchased from Lipoid (Ludwigshafen, Germany). Hexane (P.A.) was purchased from Dinâmica Química Contemporânea LTDA (SP, Brazil). MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide), boron trifluoride (BF₃), methanol, fatty acid reference material (F.A.M.E Mix C8–C24), and dimethyl sulfoxide (DMSO) were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Murine fibroblast (NIH-3T3) cells were acquired from Cell Bank of Rio de Janeiro (Brazil) and murine breast adenocarcinoma cells (4T1) were donated by Dr Suzanne Ostrand-Rosenberg (University of Maryland, Baltimore County, USA)

and modified to express Firefly Luciferase (4T1-luciferase) as previously described [30]. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin, and trypsin were all purchased from Thermo (Gibco, USA).

2.2. Fatty acid profile of pequi oil

Lipidic profile determination was done in triplicate for pequi oil, based on the protocol described [31]. Approximately 15 mg (\pm 0.1 mg) of oil was weighed in glass tubes with caps and 1.5 mL of a 0.5 M KOH solution in methanol was added. Samples were submitted to vortex agitation (~1 min) and a 70 °C water bath for 5 min. After cooling, 2 mL of 14% BF₃ in methanol was added and samples were submitted again to vortex agitation and 70 °C water bath to promote full esterification of fatty acids in samples. Extraction of fatty acid methyl esters was performed by adding a 2.5 mL of saturated NaCl solution and 1 mL of hexane, followed by vortex agitation for 1 min and centrifugation at 241g for 5 min 100 μ L of hexanic phase was transferred to 1.5 mL vials and 900 μ L of hexane was added. Samples were then analyzed by gas chromatography (Shimadzu GCMS-QP2010 Plus with an AOC-5000 injection system and a J&W Scientific DB-23 column (60 m \times 0.25 mm ID \times 0.25 μ m). Injector and detector temperatures were 250 °C and the volume of injection was 1 μ L with a split ratio of 60. Helium was used as carrier gas for all samples and method consisted of a starting temperature of 140 °C for 5 min followed by a 2 °C/min ramp to 235 °C, providing a total run time of approximately 53 min. Quantification was achieved with a calibration curve of certified reference material (F.A.M.E Mix C8–C24).

2.3. Development of pequi oil-based nanoemulsion (PeNE)

The development of the nanoemulsions was an adaptation of a method previously described [32]. The method consisted of two steps: first, a concentrated solution was prepared by adding egg lecithin and pequi oil in PBS. Different proportions of egg lecithin and pequi oil were evaluated to determine the best proportion for nanodroplets formation: 1:2 w/w, 1:1 w/w, and 2:1 w/w. Then, the concentrated solution was diluted in a larger volume of PBS (1:7.5 (v/v)). Sonication at 20 kHz under an ice bath for 6 min was used in both steps. The developed formulations were stored at 4 °C and under dark conditions until further analysis. A blank formulation (without the oil) was prepared similarly as described above.

2.4. Physicochemical parameters of PeNE

2.4.1. Dynamic light scattering (DLS)

The nanodroplet size, polydispersity index (PDI), and zeta potential were measured using ZetaSizer® Nano ZS90 (Malvern, UK) at room temperature and with detection of light scattering in an angle of 90°. Three readings of each sample were obtained to calculate the Z-average. The pH of the samples was measured with a pH indicator stripe previous to each zeta potential analysis.

2.4.2. Stability of nanoemulsions under stress conditions

Exposure of nanoemulsions to stress conditions (serial dilution and pH variation) was performed in order to determine their stability. The samples were diluted in PBS 2-, 4-, 8-, 16-, 32-, 64-, and 128- fold. In parallel, the pH change was performed with the addition of 2 M NaOH and 2.5 M HCl to achieve pH 3, 5, 7, 9, and 11. The physicochemical parameters of each sample were analyzed as described in section 2.4.1.

2.4.3. Stability of nanoemulsions under different storage conditions

Nanoemulsion formulations were stored at 4 °C, 37 °C, and room temperature (RT) protected from light. Their physicochemical parameters were analyzed after 1, 7, 15, and 200 days as described in section 2.4.1. This approach is in accordance with Singh and

collaborators (2017) and Sánchez-López and collaborators (2019) [25,33].

2.4.4. Analysis of infrared spectrophotometry – FTIR

For the FTIR measurements, the nanoemulsions were previously lyophilized (Thermo Savant SPD121P – Thermo Scientific) and stored under nitrogen atmosphere until analysis. The FTIR experiments were performed using a Bruker spectrometer (model Vertex 70). The analysis was performed using the module attenuated total reflectance (ATR). The measurements were averaged over 96 scans, which were taken at a resolution of 4 cm^{-1} from 400 to 4000 cm^{-1} . The background signal was averaged over 96 scans before each measurement. Finally, the spectra were fitted using Gaussian functions. Data were treated with IR Solution software 1.50[®] and transferred to the graphics program GraphPad Prism 5.0[®] construction.

2.5. Cell culture

The cell lines murine breast carcinoma 4T1-luciferase and murine fibroblast (NIH-3T3) were grown in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) supplemented with 10% of fetal bovine serum (v/v) and 1% of antibiotic solution (100 IU/mL Penicillin – 100 µg/mL Streptomycin – v/v) at 37 °C and 5% CO₂.

2.6. Cell treatment

For viability assay, cells were seeded into 96-well culture plate at a density of 2.10^3 cells per well (4T1-luciferase) and 3.10^3 cells per well (NIH-3T3) in DMEM culture medium overnight at 37 °C, 5% CO₂ in a humid atmosphere. Then, the medium was changed and various concentrations of PeNE and blank formulations, and free pequi oil were added (90,180,360, and 540 µg/mL, considering pequi oil concentration). The free pequi oil was diluted in ethanol previous to the treatment. The final ethanol concentration was lower than 1% per well. The plates were incubated for 24 and 48 h at 37 °C, 5% CO₂ in a humid atmosphere.

2.7. Cell viability assay

Cell viability assay was performed using MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay. The MTT assay is based on the reduction of tetrazolium derivatives in living cells by mitochondrial dehydrogenases, allowing the estimation of the metabolic activity of cells. This assay enables the assessment of cell viability and proliferation as parameters of cell survival and growth [34]. After 24 and 48 h of incubation, the treatments were removed and 150 µL of the MTT solution (0.5 mg/mL in DMEM) was added in each well. The plates were incubated for 2 h at 37 °C and 5% CO₂ in humid atmosphere. The culture medium was discarded and 150 µL of dimethyl sulfoxide (DMSO) was added in each well. The absorbance was monitored using a spectrophotometer with a microplate reader at 595 nm (Molecular Devices, USA). The control group was considered as 100% cell viability.

2.8. Statistical analysis

Statistical differences between experimental groups were evaluated by the analysis of variance (ANOVA) and Tukey post-hoc test at a significance level of 0.05 using Graph Pad Prism 5.03 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). The half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) values were determined by linear regression (probit analysis) using the software Graph Pad Prism with confidence limits of 95%. All values were expressed as means ± standard error of the mean (SEM) and a value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. All assays were performed in triplicates in three independent experiments.

3. Results and discussion

The present study shows that pequi oil nanoemulsions were prepared successfully and had physicochemical stability when exposed to stress conditions (pH and serial dilution) or long-term storage at different temperatures. Significant antitumoral effects against breast cancer cells were also observed, along with lower cytotoxicity against non-tumoral cells. Detailed data and discussion can be found in the next sections.

3.1. Preparation and optimization of pequi oil-based nanoemulsions (PeNE)

First, to confirm the composition of the pequi oil used in the present study, its fatty acid profile was analyzed and the obtained data were compared with previous descriptions [13,14,35]. We observed the presence of saturated and unsaturated fatty acids, mainly oleic acid ($50.75\% \pm 0.38$) and palmitic acid ($40.65\% \pm 0.05$). Lower contents of steric acid ($4.57\% \pm 0.60$), linoleic ($3.22\% \pm 0.40$), and palmitoleic ($2.80\% \pm 0.40$) were also found. Although the lipid profile of pequi oil can vary according to environmental factors (e.g. region, climate, soil, temperature) [13,14,35], the fatty acid profile found in the present study was similar to the profiles reported in the literature [13,14,35]. Then, we next established the parameters used to prepare different formulations of PeNE (Table 1).

Surfactants play a key role in nanoemulsion systems by enabling the dispersion of immiscible liquids, such as oil in aqueous buffer, due to their amphiphilic structure [24]. Egg lecithin has been currently used in pharmaceutical, cosmetic, and dietetic formulations as an emulsifier. It is a mixture of phospholipids found in all living cells, and is mainly constituted of phosphatidylcholine (~80%) [36]. Moreover, it can be fully metabolized and has been considered as Generally Recognized as Safe (GRAS) excipients approved by the United States Food and Drug Administration (FDA) [37,38].

Due to its emulsifier properties and biocompatibility, egg lecithin was the surfactant selected for the preparation of PeNE. Since surfactant concentration significantly affects nanoemulsion colloidal parameters [39], the influence of three oil-to-surfactant ratios (OSR) on the physicochemical characteristics of PeNE was evaluated (Table 1).

All PeNE formulations (Table 1) showed hydrodynamic diameters (HDs) in the range expected for nanoemulsions produced with phosphatidylcholines – described to be approximately 150–300 nm [40]. Increasing amounts of lecithin resulted in nanodroplets with smaller hydrodynamic diameter and PdI, indicating that oil-to-surfactant ratios have a significant impact on the colloidal properties of PeNE (Table 1).

Such behavior has been widely reported in the literature and can be explained by different factors: if the interfacial region created is much larger than the amount of surfactants, this region will not be properly covered, which can trigger a coalescing process and consequently increase HD during the nanoemulsification process. On the other hand, having adequate amounts of surfactant leads to lower interfacial tensions during the homogenization process, facilitating the formation of smaller and more homogeneous nanodroplets [24,25,40,41].

Table 1
Physicochemical characteristics of the PeNE formulations.

Oil: Lecithin (w/w)	Hydrodynamic diameter ^a (nm)	PdI ^b	Zeta potential (mV) ^c
2:1	306.56 ± 12.12	0.478 ± 0.06	-68.30 ± 7.09
1:1	291.10 ± 03.57	0.262 ± 0.07	-26.30 ± 1.32
1:2	120.36 ± 02.05	0.238 ± 0.01	-15.03 ± 1.62

The results are reported as the average of three independent measurements (n = 3 ± SD).

^a Z-average.

^b Polydispersity index.

^c pH = 7.

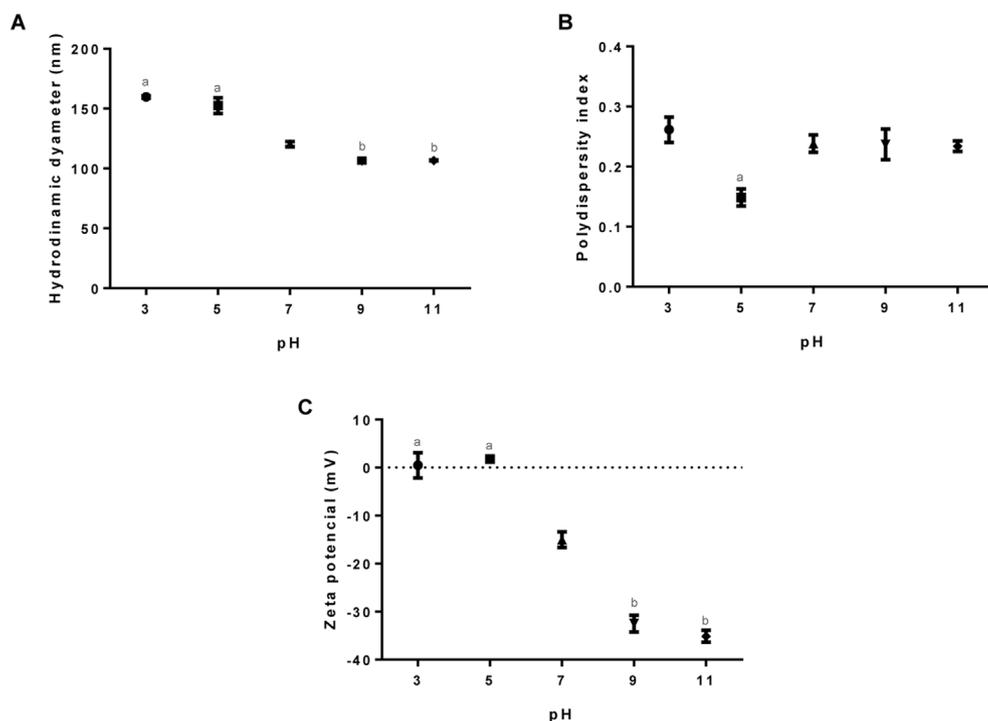


Fig. 1. Evaluation of stability of pequi oil-based nanoemulsion at different pH values. Hydrodynamic diameter (A), polydispersity index (B), and zeta potential (C). The values are expressed as mean ± SD. One-way ANOVA: significant difference pH 7 versus other groups $p < 0.05$ (Tukey post hoc test). Different letters indicate statistically significant differences between groups.

Among the formulations here evaluated (Table 1), we decided to work with OSR 1:2 formulation due to its reduced HD and PDI.

3.2. Stability evaluation of PeNE under pH and dilution stresses

Nanoemulsions designed for biomedical applications are subjected to stress conditions that may impact their structural integrity after administration [24–26]. Therefore, the colloidal parameters of PeNE exposed to stress conditions related to pH and dilution factors were monitored in order to investigate alterations in their physicochemical characteristics (Figs. 1 and 2).

Variations in pH values lead to changes in PeNE physicochemical characteristics related to DH and zeta potential parameters (Fig. 1). When compared to original nanoemulsion obtained at pH 7 (120 nm DH), we observed slight variations of approximately 40 nm ($p < 0.0001$) at acidic pH and of 14 nm ($p < 0.01$) at basic pH (Fig. 1A). PDI values remained stable in almost all pH ranges here evaluated, showing a drop from 0.238 to 0.150 at pH 5 (Fig. 1B).

As for zeta potential, values increased 15 mV at acidic pH and decreased approximately 15 mV at basic pH ($p < 0.0001$) (Fig. 1C). According to Bhattacharjee (2016), zeta potential values become more positive and more negative at acidic and basic pH, respectively. This

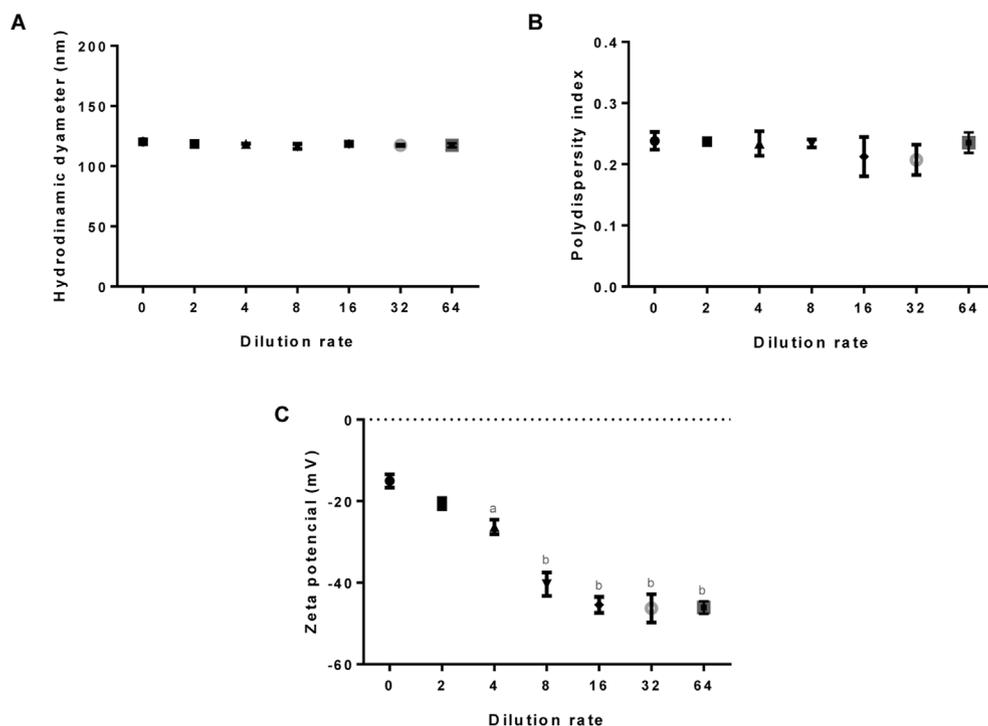


Fig. 2. Evaluation of stability of pequi oil-based nanoemulsion at different dilution rates. Hydrodynamic diameter (A), polydispersity index (B), and zeta potential (C). The values are expressed as mean ± SD. One-way ANOVA: significant difference between “0 dilution rate” versus other groups $p < 0.05$ (Tukey post hoc test). Different letters indicate statistically significant differences between groups.

observation agrees with the results of the present study and can be explained by the cationic or anionic charge adsorption from the acid or basis, present in the medium, on the interface between the nanodroplets and the aqueous medium [42].

One of the main characteristics of nanoemulsions is their kinetic stability, which confers resistance for nanodroplets submitted to stress conditions such as dilution [24,27]. Therefore, nanoemulsions are good candidates to be administered in parenteral routes [26,27,43]. Under dilution stress, PeNE nanodroplets did not suffer significant variations in their size and polydispersity index (Fig. 2A and B), supporting the idea that PeNE behaves like nanoemulsions and can be classified as such. In addition, higher dilution rates (4- to 64-fold) lead to a significant decrease of zeta potential values (Fig. 2C). This result corroborates with the knowledge that particle concentration influences ZP. Although a general guideline correlating particle concentration and ZP has not been established, it has been stated that overall in diluted samples the zeta potential tends to decrease [42].

3.3. Stability evaluation of PeNE over time

To investigate the storage conditions of PeNE, its stability was evaluated by measuring its physicochemical parameters and evaluating its macroscopic aspects after short-term (1–15 days) and long-term (200 days) storage times at 4 °C, 37 °C, and room temperature (RT) (Fig. 3). For this evaluation, all samples were protected from light exposure.

The macroscopic aspect of a nanoemulsion is an important parameter to be analyzed since it indicates the occurrence of instability mechanisms [24,25,28,43,44]. In the present study, PeNE presented a homogeneous dispersion with no signs of flocculation, creaming, sedimentation, or phase separation during all temperatures and storage periods evaluated (data not shown). Considering that oils are not miscible to aqueous buffers, the observation of homogeneous dispersion indicates the entrapment of the pequi oil in the nanodroplets. In addition, size measurements of PeNE indicated no remarkable changes in hydrodynamic diameter, PDI, and zeta potential of PeNE in all temperatures and times analyzed (Fig. 3). Similarly, the pH of PeNE remained stable at 7 in all temperatures and times analyzed (data not

shown).

Stability evaluation is of prime importance for nanoparticulate systems intended for biomedical applications since it affects storage, transport, and usage conditions. The present data emphasize the long-term size stability profile of PeNE, suggesting that its transportation and storage may be done under a variety of temperatures.

3.4. Infrared spectra of PeNE

The FTIR technique is particularly sensitive to changes in the vibrational properties of interacting molecules. The molecular information acquired from FTIR spectroscopy allows correlating the conformational and structural changes undergone by the molecule as a function of its interaction process. Therefore, to investigate the interactions between pequi oil and the surfactant egg lecithin, measurements of FTIR were carried out in PeNE. For comparison, the blank formulation (only egg lecithin) and free pequi oil were also measured (Fig. 4).

As stated previously, pequi oil used in the formulation of nanoemulsions contains mainly oleic (~51%) and palmitic (~40%) acids, among other fatty acids (< 9%). The other constituents of pequi oil make up less than 0.5% of the total volume. As a result, the FTIR spectrum of pequi oil is dominated by the fatty acid absorption signals [45,46] (Fig. 4 (iii)). However, in natural fats, these components are mostly in the form of triacylglycerols (TAGs), whose basic structure is a glycerol backbone with three acyl chains attached to it [47], whereas phosphatidylcholine (a major component of egg lecithin) has the oleic acid and palmitic acid chains pointed in the same direction and the polar head group pointed in the opposite direction [47] (Fig. 4).

Note from Fig. 4 that the FTIR spectrum of PeNE is dominated by the spectral features of the blank formulation. The most prominent features in common in all spectra are bands corresponding to CH_2 , CH_3 , $C=C$, and $C=O$ groups, due to the hydrophobic chain region, and the PO_2^- and $N^+(CH_3)_3$ moieties from the polar head group [48,49]. Small spectral changes due to the pequi oil presence in PeNE can be observed in the spectral region corresponding to the $\nu_{as}(C-O-P-O-C)$ (~1170 cm^{-1}) and mainly at the stretching vibrations of the ester

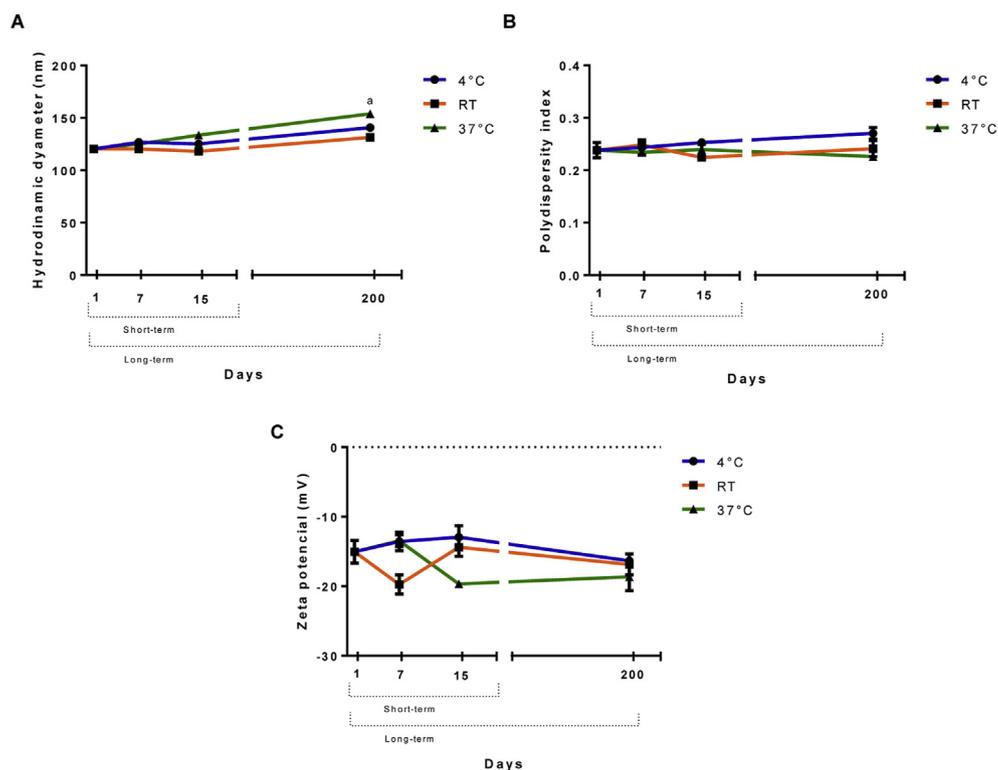


Fig. 3. Evaluation of stability of pequi oil-based nanoemulsion over time storage at 4 °C, room temperature (RT), and 37 °C according to hydrodynamic diameter (A), polydispersity index (B), and zeta potential (C). One-way ANOVA: significant difference between groups $p < 0.05$ (Tukey post hoc test). Different letters indicate statistically significant differences between groups.

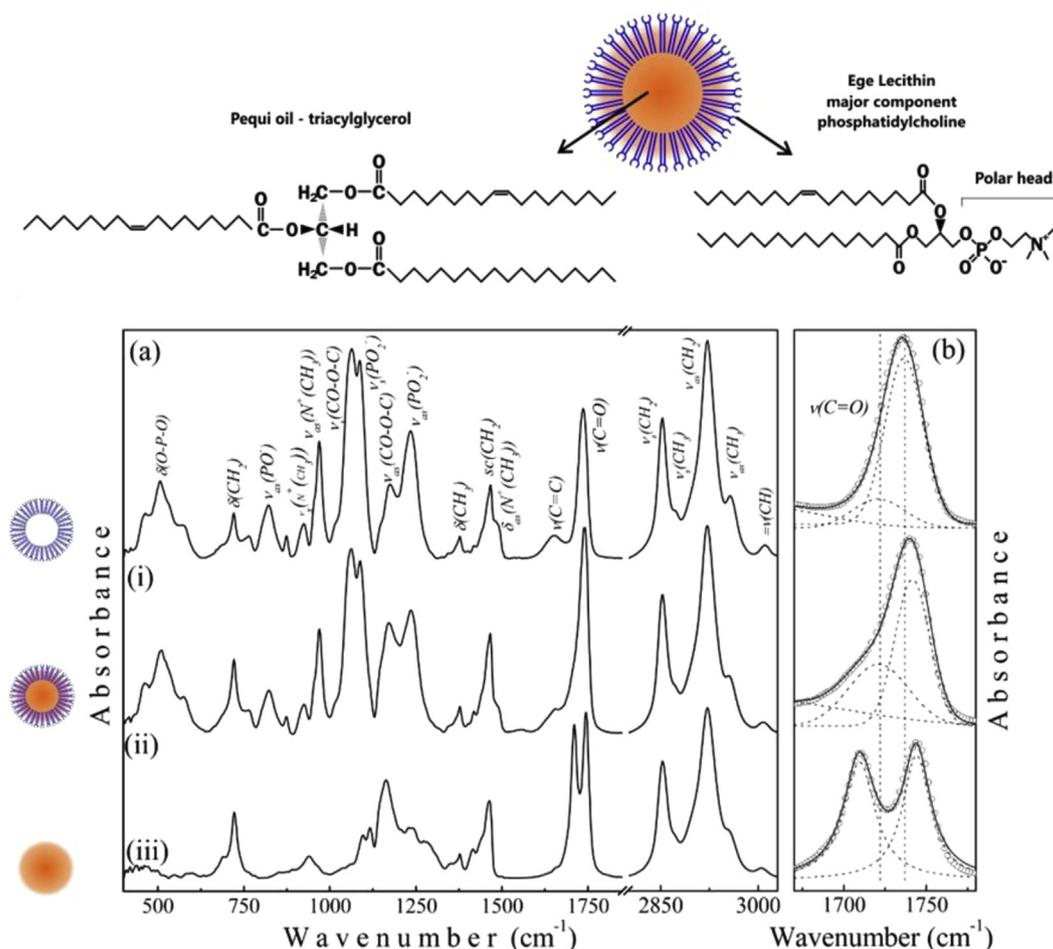


Fig. 4. FTIR spectra of pequi oil-based nanoemulsion (a) oil:lecithin ratio (w/w) 0:1 (i), 1:2 (ii), and free pequi oil (iii). (b) Zoom of the FTIR spectra in the range 1670–1780 cm^{-1} . The dashed lines show the Gaussian fit of the data.

carbonyl ($\nu(\text{C}=\text{O})$) and methylene groups (Fig. 4b). The $\nu(\text{C}=\text{O})$ band, in all FTIR spectra, can be deconvoluted in two components using Gaussian functions. These bands are usually assigned to populations of ‘free’ ($\sim 1743 \text{ cm}^{-1}$) and H-bonded ($\sim 1726 \text{ cm}^{-1}$) ester carbonyl groups, whose relative integrated intensities and vibrational energies usually change from gel (L_β) to liquid crystalline (L_α) phase transition temperature-induced [50]. At room temperature, a fully hydrated lecithin membrane is known to have liquid disordered (L_d) and ordered (L_o) phases coexisting, in the range of 15–40 mol% cholesterol [51,52].

Thus, based on the results shown in Fig. 4 (b) and the discussion above, it is reasonable to assume that, just like cholesterol, incorporation of pequi oil promotes an ordering of the L_d phase, causing L_d and L_o phases to coexist in PeNE. This hypothesis is reinforced by the behavior of the stretching modes of methylene. It was found that the wavenumber of the $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ and $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ bands of the PeNE sample are both downward shift by 1 cm^{-1} , when compared to the blank formulation.

3.5. Antitumoral activity of PeNE

Murine breast carcinoma (4T1) cell line was used to perform cytotoxic assay, *in vitro* (Fig. 5). This is a triple-negative breast cancer cell line whose proliferation pattern and metastasis closely resemble that of advanced human breast cancer [53].

Both free and nanostructured pequi oil induced similar dose-dependent effects on 4T1 cell viability after 24h ($p < 0.001$) (Fig. 5A). Nevertheless, after 48h, PeNE treatment showed a higher cytotoxic effect and a significant dose-dependent cell viability reduction, while free oil treatment showed a cytotoxic pattern similar to that observed at

24h. Particularly, at 180 and 360 $\mu\text{g/mL}$, PeNE reduced cell viability by 55% and 90%, respectively ($p < 0.001$). In comparison, free pequi oil did not induce toxicity at 180 $\mu\text{g/mL}$ and reduced only 30% of cell viability at 360 $\mu\text{g/mL}$ after 48h (Fig. 5B). According to IC_{50} values, PeNE was 1.4- and 2.5-fold more cytotoxic than free pequi oil after 24 and 48h, respectively. This data shows that the encapsulation of pequi oil improved its bioavailability and its cytotoxicity.

In addition, PeNE and free pequi oil showed to be more cytotoxic against cancer cells. Indeed, both samples were 20% less cytotoxic against non-tumoral fibroblasts (NIH/3T3) at the same conditions tested in 4T1 after 24h (Fig. 5C). After 48h, either sample resulted in 40% less cytotoxicity at 180, 360, or 540 $\mu\text{g/mL}$ than what we observed in 4T1 cells (Fig. 5D). Moreover, no time-dependent activity was noted in fibroblasts. IC_{50} values showed that PeNE was 1.5- and 2.2-fold more aggressive against breast cancer cells (4T1) than fibroblasts (NIH/3T3) after 24 and 48h exposure, respectively (Fig. 5).

In this study, the blank formulation (egg lecithin without oil) did not show cytotoxic activity in the tested conditions (Fig. 5), indicating that the cytotoxicity of PeNE is due to the presence of the encapsulated pequi oil. In addition, our data show that egg lecithin is a biocompatible surfactant for nanoemulsions. This data is supported by other studies showing that lecithin-based nanoemulsions are suitable nanocarriers frequently used in delivery systems that can be applied in parenteral administration for cancer treatments [26,27,40,43].

Previous studies have reported the development of pequi oil (*C. brasiliense* Cambess.) microemulsions showing stability aspects and an antioxidant profile [54]. Nevertheless, microemulsions and nanoemulsions are different nanometric platforms. Despite having similar

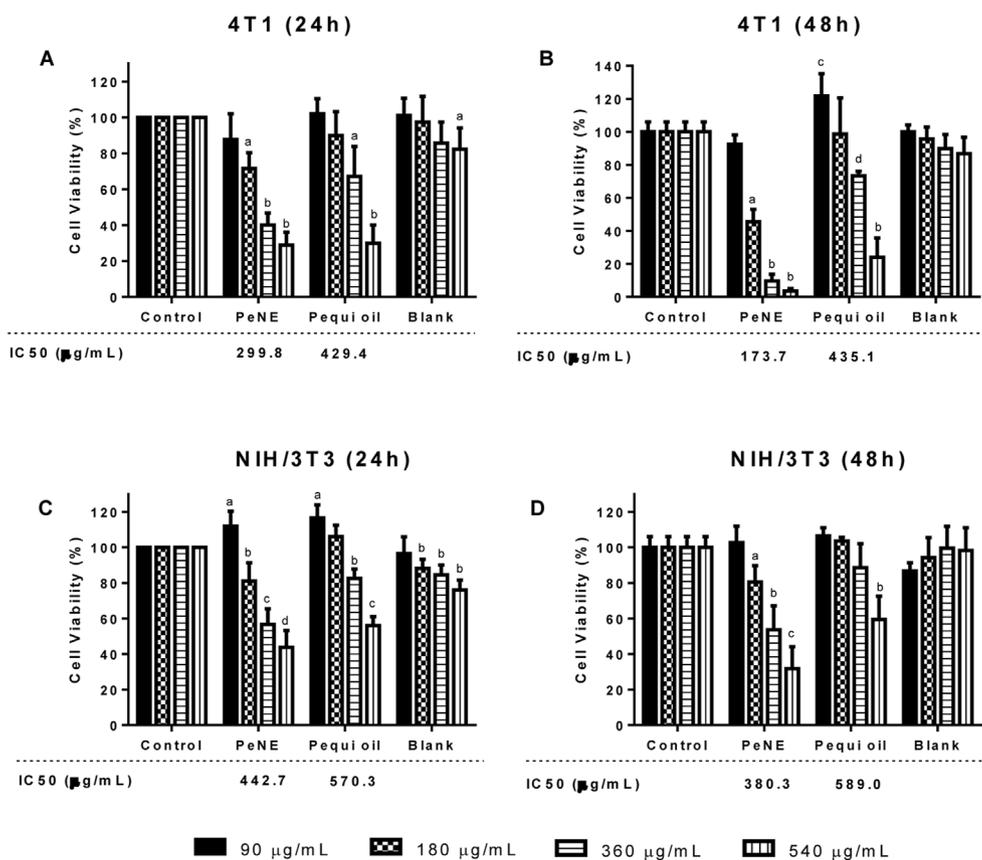


Fig. 5. Cytotoxicity of pequi oil-based nanoemulsion (PeNE), free pequi oil, and blank formulation (egg lecithin without oil) on the viability of breast cancer cells (4T1) (A–B) and fibroblast (NIH/3T3) (C–D) after exposure for 24 and 48 h. The assay was carried out using the MTT method. The values are expressed as mean \pm SEM. Significant difference $p < 0.05$ versus control group (Tukey post hoc test). Different letters indicate statistically significant differences between groups. IC₅₀ values are represented below each treatment.

nanodroplet size range, both systems show remarkable differences regarding their stability. While microemulsions have thermodynamic stability, which makes them sensitive to changes in composition and temperature, nanoemulsions are kinetically stable. In other words, nanoemulsions are more resistant to stress conditions (e.g. dilution factors, pH), resulting in better stability over long time periods, if compared to microemulsions [24,55].

To the best of our knowledge, this is the first study to report the physicochemical stability and the anticancer activity of pequi oil-based nanoemulsion in breast cancer cells. Although nanoemulsions have been employed in cancer treatments, their oil phase is usually used only as a platform for carrying hydrophobic drugs but not as the bioactive compound itself. In our study, we show that pequi oil has a dual role in this formulation, behaving both as a structural component of the nanoemulsion and as a cytotoxic agent against breast cancer cells.

Taken together, the present study reveals PeNE as a promising nanosized platform to be used as an adjuvant tool for breast cancer treatments. Oleic acid, one of the most abundant bioactive compounds in pequi oil (~51%), has been described to act as an anticancer agent against several types of cancer [56–59]. Associations of synergism between this fatty acid and other pequi oil bioactive compounds may favor combined effects [60,61] resulting in the cytotoxicity against breast cancer cells observed herein. Moreover, the PeNE developed represents a versatile nanometric platform suitable to have its surface further tailored with different moieties involved with improved cell internalization and active targeting delivery of conventional chemotherapeutic agents, enabling potential synergistic interactions between drug and plant derivatives [62] to achieve favorable outcomes in therapeutic procedures for cancer. Such PeNE modifications along with detailed investigations aiming to unravel its mechanism of action against breast cancer cells are underway.

The present study is one more evidence of the power of nanotechnology as a tool to potentiate the effects of promising bioactive

compounds found in natural resources. This modern approach aggregates value of biological resources, expands their market utility, and reinforces the need for a sustainable economy to protect biodiversity.

4. Conclusion

Several studies have explored different natural sources of new molecules with potential effects against breast cancer, in which plant-derived bioactive compounds and their derivatives have emerged among the main candidates for new anticancer agents. Herein, we employed nanotechnology strategies to design and characterize a pequi oil-based nanoemulsion (PeNE) and evaluate its anticancer effects. Taken together, the results of the present study reveal the use of PeNE as a promising nanosized platform to be used as an adjuvant tool for breast cancer treatments. To the best of our knowledge, this is the first study to report the physicochemical stability and the anticancer activity of pequi oil nanoemulsion in breast cancer cells.

CRediT authorship contribution statement

Alicia S. Ombredane: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing - original draft, Visualization. **Victor H.S. Araujo:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing - original draft. **Clarissa O. Borges:** Methodology, Investigation, Writing - original draft. **Patrícia L. Costa:** Methodology, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing - original draft. **Marcela G. Landim:** Methodology, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing - original draft. **Andréia C. Pinheiro:** Methodology, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing - original draft. **Ísis O. Szlachetka:** Methodology, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing - original draft. **Luiz E.C. Benedito:** Methodology, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing - original draft. **Laila S.**

Espindola: Methodology, Writing - review & editing, Resources. **Diego J.S. Dias:** Methodology, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing - original draft. **Daniela M. Oliveira:** Writing - review & editing, Resources. **Juliano A. Chaker:** Visualization, Writing - review & editing. **Sebastião W. da Silva:** Methodology, Visualization, Writing - review & editing, Resources. **Ricardo B. de Azevedo:** Writing - review & editing, Resources, Funding acquisition. **Graziella A. Joanitti:** Conceptualization, Methodology, Writing - review & editing, Visualization, Resources, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

Declaration of competing interest

G. A. Joanitti, V. H. S. Araujo, and R. B. Azevedo are named inventors of the following patent application (Provisional Patent: BR 10 2017 025294 9, November 24, 2017, Brazilian Patent Office [Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI]) regarding the development and use of pequi oil-based nanoemulsions. This patent does not represent a direct conflict of interest to the reported data in this manuscript. All other authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors thank Publicase® for the careful and excellent revision of our manuscript. We would like to thank particularly Marcia Triunfol at Publicase® for editing this manuscript. We also would like to thank Farmacotécnica for donating the pequi oil and Dr Suzanne Ostrand-Rosenberg for donating the 4T1 cells. This study is in accordance to the Brazilian New Law on Biodiversity (Law 13,123 of May, 2015) and registered in the *National System of Genetic Resource Management and Associated Traditional Knowledge (SisGen)* platform under the number AC22EF9. This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - Finance Code001), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Nanobiotecnologia (INCT-Nanobiotecnologia), Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF), and ArboControl Brasil Project – Process TED74/2016 and TED42/2017 (FNS/UnB). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101819>.

References

- [1] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, Global cancer statistics 2018 : GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA. Canc. J. Clin.* 68 (2018) 394–424, <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
- [2] O.W.H.I.A. for C. Research, Latest global cancer data : cancer burden rises to 18 . 1 million new cases and 9 . 6 million cancer deaths in 2018 Latest global cancer data : cancer burden rises to 18 . 1 million new cases and 9 . 6 million cancer deaths in 2018, Press RELEASE N° 263, <https://www.who.int/cancer/PRGloboCanFinal.pdf>, (2018) accessed November 7, 2019, 1–3.
- [3] M. Akram, M. Iqbal, M. Daniyal, A.U. Khan, Awareness and current knowledge of breast cancer, *Biol. Res.* (2017) 1–23, <https://doi.org/10.1186/s40659-017-0140-9>.
- [4] E.S. McDonald, A.S. Clark, J. Tchou, P. Zhang, G.M. Freedman, Clinical diagnosis and management of breast cancer, *J. Nucl. Med.* (2016) 9–17, <https://doi.org/10.2967/jnumed.115.157834>.
- [5] G. Jeswani, S. Das Paul, A.K. Jha, Advances in the delivery of cancer therapeutics: a comprehensive review, *Curr. Drug Deliv.* 15 (2018) 21–36, <https://doi.org/10.2174/1567201814666170726105219>.
- [6] R. Ali, Z. Mirza, G.M.D. Ashraf, M.A. Kamal, S.A. Ansari, G.A. Damanhour, A.M. Abuzenadah, A.G. Chaudhary, I.A. Sheikh, New anticancer agents: recent developments in tumor therapy, *Anticancer Res.* 32 (2012) 2999–3005.
- [7] L. Pan, H.B. Chai, A.D. Kinghorn, Discovery of new anticancer agents from higher plants, *Front. Biosci. - Sch.* 4 (2012) 142–156, <https://doi.org/10.2741/s257>.
- [8] S. Mitra, R. Dash, Natural products for the management and prevention of breast cancer, evidence-based complement, *Alternative Med.* (2018) 8324696, <https://doi.org/10.1155/2018/8324696>.
- [9] R.G. Amaral, S.A. dos Santos, L.N. Andrade, P. Severino, A.A. Carvalho, Natural products as treatment against cancer: a historical and current vision, *Clin. Oncol.* 4 (2019) p1562.
- [10] A.L. Miranda-Vilela, L.C.S. Pereira, C.A. Gonçalves, C.K. Grisolia, Pequi fruit (Caryocar brasiliense Camb.) pulp oil reduces exercise-induced inflammatory markers and blood pressure of male and female runners, *Nutr. Res.* 29 (2009) 850–858, <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2009.10.022>.
- [11] S.M. Palmeira, P.R.P. Silva, J.S.P. Ferrão, A.A.B.L. Ladd, M.L.Z. Dagli, C.K. Grisolia, F.J. Hernandez-Blazquez, Chemopreventive effects of pequi oil (Caryocar brasiliense Camb.) on preneoplastic lesions in a mouse model of hepatocarcinogenesis, *Eur. J. Canc. Prev.* 25 (2016) 299–305, <https://doi.org/10.1097/CEJ.000000000000187>.
- [12] N.B.R. Colombo, M.P. Rangel, V. Martins, M. Hage, D.P. Gelain, D.F. Barbeiro, C.K. Grisolia, E.R. Parra, V.L. Capelozzi, Caryocar brasiliense camb protects against genomic and oxidative damage in urethane-induced lung carcinogenesis, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 48 (2015) 852–862, <https://doi.org/10.1590/1414-431X20154467>.
- [13] A.M.M. Guedes, R. Antoniassi, A.F. De Faria-Machado, Pequi: A Brazilian fruit with potential uses for the fat industry, *OCL - oilseeds Fats, Crop. Lipids.* 24 (2017), <https://doi.org/10.1051/ocl/2017040>.
- [14] L.R.O. Torres, F.C. Santana, F.B. Shinagawa, J. Mancini-Filho, Bioactive compounds and functional potential of pequi (Caryocar spp.), a native Brazilian fruit: a review, *Grasas Aceites* 69 (2018), <https://doi.org/10.3989/gya.1222172>.
- [15] A.M.M. Guedes, R. Antoniassi, M.C. Galdeano, R. Grimaldi, M.G. de Carvalho, A.E. Wilhelm, A.G. Marangoni, Length-scale specific crystalline structural changes induced by molecular randomization of pequi oil, *J. Oleo Sci.* 66 (2017) 469–478, <https://doi.org/10.5650/jos.ess16192>.
- [16] M.C. Ribeiro, E.V. de B. Vilas Boas, T.R. Riul, L. Pantoja, H.A. Marinho, A.S. dos Santos, Influence of the extraction method and storage time on the physicochemical properties and carotenoid levels of pequi (Caryocar brasiliense Camb.) oil, *Food Sci. Technol.* 32 (2012) 386–392, <https://doi.org/10.1590/s0101-20612012005000053>.
- [17] L.R.O. Torres, F.B. Shinagawa, F.C. Santana, E.S. Araújo, M.V.C. Oropeza, L.F.L. Macedo, L.B. Almeida-Muradian, H.C. Lima, J. Mancini-Filho, Physicochemical and antioxidant properties of the pequi (Caryocar brasiliense Camb.) almond oil obtained by handmade and cold-pressed processes, *Int. Food Res. J.* 23 (2016) 1541–1551.
- [18] M.M. Roll, A.L. Miranda-Vilela, J.P.F. Longo, T. da S. Agostini-Costa, C.K. Grisolia, The pequi pulp oil (Caryocar Brasiliense Camb.) provides protection against aging-related anemia, inflammation and oxidative stress in Swiss mice, especially in females, *Genet. Mol. Biol.* 41 (2018) 858–869, <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2017-0218>.
- [19] C.L.B. Ambrósio, F.A.C.S. Campos, Z.P. De Faro, Carotenoids as an alternative against hypovitaminosis A, *Rev. Nutr.* 19 (2006) 233–243, <https://doi.org/10.1590/S1415-52732006000200010>.
- [20] F.D. De Araujo, A review of caryocar brasiliense (caryocaraceae)-an economically valuable species of the central Brazilian cerrados, *Econ. Bot.* 49 (1995) 40–48, <https://doi.org/10.1007/BF02862276>.
- [21] A.L. Miranda-Vilela, F.A. Portilho, V.G.B. De Araujo, L.L.C. Estevanato, B.P. Mezzomo, M. de F.M. De Almeida Santos, Z.G.M. Lacava, The protective effects of nutritional antioxidant therapy on Ehrlich solid tumor-bearing mice depend on the type of antioxidant therapy chosen: histology, genotoxicity and hematology evaluations, *J. Nutr. Biochem.* 22 (2011) 1091–1098, <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2010.09.009>.
- [22] A.L. Miranda-Vilela, C.K. Grisolia, J.P.F. Longo, R.C.A. Peixoto, M.C. de Almeida, L.C.P. Barbosa, M.M. Roll, F.A. Portilho, L.L.C. Estevanato, A.L. Bocca, SôN. Bão, Z.G.M. Lacava, Oil rich in carotenoids instead of vitamins C and E as a better option to reduce doxorubicin-induced damage to normal cells of Ehrlich tumor-bearing mice: hematological, toxicological and histopathological evaluations, *J. Nutr. Biochem.* 25 (2014) 1161–1176, <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.06.005>.
- [23] A.L. Miranda-Vilela, R.C.A. Peixoto, J.P.F. Longo, D.D.O.S.E. Cintra, F.A. Portilho, K.L.C. Miranda, P.P.C. Sartoratto, S.N. Bão, R.B. De Azevedo, Z.G.M. Lacava, Dextran-functionalized magnetic fluid mediating magnetohyperthermia combined with preventive antioxidant pequi-oil supplementation: potential use against cancer, *J. Biomed. Nanotechnol.* 9 (2013) 1261–1271, <https://doi.org/10.1166/jbn.2013.1616>.
- [24] A. Gupta, H.B. Eral, T.A. Hatton, P.S. Doyle, Nanoemulsions: formation, properties and applications, *Soft Matter* 12 (2016) 2826–2841, <https://doi.org/10.1039/c5sm02958a>.
- [25] Y. Singh, J.G. Meher, K. Raval, F.A. Khan, M. Chaurasia, N.K. Jain, M.K. Chourasia, Nanoemulsion: concepts, development and applications in drug delivery, *J. Contr. Release* 252 (2017) 28–49, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.03.008>.
- [26] S. Ganta, M. Talekar, A. Singh, T.P. Coleman, M.M. Amiji, Nanoemulsions in translational research - opportunities and challenges in targeted cancer therapy, *AAPS PharmSciTech* 15 (2014) 694–708, <https://doi.org/10.1208/s12249-014-0088-9>.
- [27] K. Pathak, S. Pattnaik, K. Swain, Application of nanoemulsions in drug delivery, *Nanoemulsions*, Elsevier, 2018, pp. 415–433, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811838-2.00013-8>.
- [28] H.H. Tayeb, F. Sainsbury, Nanoemulsions in drug delivery: formulation to medical application, *Nanomedicine* 13 (2018) 2507–2525, <https://doi.org/10.2217/nmm-2018-0088>.
- [29] P. Rajpoot, K. Pathak, V. Bali, Therapeutic applications of nanoemulsion based drug delivery systems: a review of patents in last two decades, *Recent Pat. Drug Deliv. Formulation.* 5 (2011) 163–172, <https://doi.org/10.2174/>

- 187221111795471427.
- [30] A.L. Dos Santos Câmara, G. Nagel, H.R. Tschiche, C.M. Cardador, L.A. Muehlmann, D.M. De Oliveira, P.Q. Alvim, R.B. Azevedo, M. Calderón, J.P.F. Longo, Acid-sensitive lipidated doxorubicin prodrug entrapped in nanoemulsion impairs lung tumor metastasis in a breast cancer model, *Nanomedicine* 12 (2017) 1751–1765, <https://doi.org/10.2217/nmm-2017-0091>.
- [31] W.W. Christie, *Gas Chromatography and Lipids: a Practical Guide*, Oily, Great Britain, 1989.
- [32] L. Wang, X. Li, G. Zhang, J. Dong, J. Eastoe, Oil-in-water nanoemulsions for pesticide formulations, *J. Colloid Interface Sci.* 314 (2007) 230–235, <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.04.079>.
- [33] E. Sánchez-López, M. Guerra, J. Dias-Ferreira, A. Lopez-Machado, M. Ettcheto, A. Cano, M. Espina, A. Camins, M.L. Garcia, E.B. Souto, Current applications of nanoemulsions in cancer therapeutics, *Nanomaterials* (2019), <https://doi.org/10.3390/nano9060821>.
- [34] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods* 65 (1983) 55–63, [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- [35] E.C. Aguilár, T.L. Jascólka, L.G. Teixeira, P.C. Lages, A.C.C. Ribeiro, E.L.M. Vieira, M.C.G. Peluzio, J.I. Alvarez-Leite, Paradoxical effect of a pequi oil-rich diet on the development of atherosclerosis: balance between antioxidant and hyperlipidemic properties, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 45 (2012) 601–609, <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2012007500074>.
- [36] L.E. Palacios, T. Wang, Egg-yolk lipid fractionation and lecithin characterization, *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.* 82 (2005) 571–578, <https://doi.org/10.1007/s11746-005-1111-4>.
- [37] L. Budai, N. Kaszás, P. Gróf, K. Lenti, K. Maghami, I. Antal, I. Klebovich, I. Petrikovics, M. Budai, Liposomes for topical use: a physico-chemical comparison of vesicles prepared from egg or soy lecithin, *Sci. Pharm.* 81 (2013) 1151–1166, <https://doi.org/10.3797/scipharm.1305-11>.
- [38] Food and Drug Administration, Title 21-FOOD and drugs. Chapter I-food and drug administration department OF health and human services. Subchapter B-food for human consumption. Section 184.1400 lecithin, <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=184.1400>, (2018).
- [39] J. Rao, D.J. McClements, Formation of flavor oil microemulsions, nanoemulsions and emulsions: influence of composition and preparation method, *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 5026–5035, <https://doi.org/10.1021/jf200094m>.
- [40] V. Klang, C. Valenta, Lecithin-based nanoemulsions, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 21 (2011) 55–76, [https://doi.org/10.1016/S1773-2247\(11\)50006-1](https://doi.org/10.1016/S1773-2247(11)50006-1).
- [41] B. Ozturk, S. Argin, M. Ozilgen, D.J. McClements, Formation and stabilization of nanoemulsion-based vitamin e delivery systems using natural surfactants: quillaja saponin and lecithin, *J. Food Eng.* 142 (2014) 57–63, <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.06.015>.
- [42] S. Bhattacharjee, DLS and zeta potential - what they are and what they are not? *J. Contr. Release* 235 (2016) 337–351, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>.
- [43] S.A. Chime, F.C. Kenchukwu, A.A. Attama, Nanoemulsions — Advances in Formulation, Characterization and Applications in Drug Delivery, Application of Nanotechnology in Drug Delivery, Ali Demir Sezer, IntechOpen, July 25th 2014, <https://doi.org/10.5772/58673>.
- [44] C. Chircov, A.M. Grumezescu, Nanoemulsion preparation, characterization, and application in the field of biomedicine, *Nanoarchitectonics Biomed.* (2019), <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816200-2.00019-0>.
- [45] D.M. Sena, F.F.G. Rodrigues, P.T.C. Freire, S.G. De Lima, H.D.M. Coutinho, J.C.L. Carvajal, J.G.M. Da Costa, Physicochemical and spectroscopical investigation of Pequi (Caryocar coriaceum Wittm.) pulp oil, *Grasas Aceites* 61 (2010) 191–196, <https://doi.org/10.3989/gya.105909>.
- [46] G.L. Teixeira, S. Ávila, J.L.M. Silveira, M. Ribani, R.H. Ribani, Chemical, thermal and rheological properties and stability of sapucaia (Lecythis pisonis) nut oils, *J. Therm. Anal. Calorim.* 131 (2018) 2105–2121, <https://doi.org/10.1007/s10973-017-6742-1>.
- [47] M. Motoyama, Structure and phase characterization of triacylglycerols by Raman spectroscopy, *Bull. NARO Inst. Livest Grassl. Sci.* 12 (2012) 19–68.
- [48] B. Pawlikowska-Pawłęga, L.E. Misiak, B. Zarzyka, R. Paduch, A. Gawron, W.I. Gruszecki, FTIR, ¹H NMR and EPR spectroscopy studies on the interaction of flavone apigenin with dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1828 (2013) 518–527, <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2012.10.013>.
- [49] R. Tantipolphan, T. Rades, A.J. McQuillan, N.J. Medicott, Adsorption of bovine serum albumin (BSA) onto lecithin studied by attenuated total reflectance Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy, *Int. J. Pharm.* 337 (2007) 40–47, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.12.021>.
- [50] R.N.A.H. Lewis, R.N. McElhaney, Membrane lipid phase transitions and phase organization studied by Fourier transform infrared spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1828 (2013) 2347–2358, <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2012.10.018>.
- [51] R.F.M. De Almeida, A. Fedorov, M. Prieto, Sphingomyelin/phosphatidylcholine/cholesterol phase diagram: boundaries and composition of lipid rafts, *Biophys. J.* 85 (2003) 2406–2416, [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)74664-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74664-5).
- [52] D. Marsh, Liquid-ordered phases induced by cholesterol: a compendium of binary phase diagrams, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1798 (2010) 688–699, <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2009.12.027>.
- [53] B.A. Pulaski, S. Ostrand-Rosenberg, Mouse 4T1 breast tumor model, *Curr. Protoc. Im.* 39 (2000) 20.2.1–20.2.16, <https://doi.org/10.1002/0471142735.im2002s39>.
- [54] M.D.P.R. Torres, A.L. Raiser, M.R. Marcílio, E.B. Ribeiro, C.R. Andrighetti, D.M.S. Valladao, Development, stability and antioxidant activity of microemulsion containing pequi (caryocar brasiliense camb.), *Oil, Rev. Virtual Quim.* 10 (2018) 346–361, <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20180027>.
- [55] D.J. McClements, Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities, *Soft Matter* 8 (2012) 1719–1729, <https://doi.org/10.1039/c2sm06903b>.
- [56] C. Carrillo, M. del M. Cavia, S.R. Alonso-Torre, Antitumor effect of oleic acid; mechanisms of action. A review, *Nutr. Hosp.* 27 (2012) 1860–1865, <https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.6.6010>.
- [57] G.A. Joanitti, *Oleic Acid and Cancer: from Therapeutic to Co-adjutant Agents in Anticancer Approaches. from: Oleic Acid: Dietary Sources, Functions and Health Benefits*, 2013 ISBN 9781626183322.
- [58] S. Jung, S. Lee, H. Lee, J. Yoon, E.K. Lee, Oleic acid-embedded nanoliposome as a selective tumoricidal agent, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 146 (2016) 585–589, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.06.058>.
- [59] L. Jiang, W. Wang, Q. He, Y. Wu, Z. Lu, J. Sun, Z. Liu, Y. Shao, A. Wang, Oleic acid induces apoptosis and autophagy in the treatment of Tongue Squamous cell carcinomas, *Sci. Rep.* 7 (2017) 11277, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11842-5>.
- [60] J. Boik, A. Kirakosyan, P.B. Kaufman, E.M. Seymour, K. Spelman, Interactions of bioactive plant metabolites: synergism, antagonism, and additivity, *Recent Adv. Plant Biotechnol.* 2009, https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0194-1_10.
- [61] L.K. Caesar, N.B. Cech, Synergy and antagonism in natural product extracts: when 1 + 1 does not equal 2, *Nat. Prod. Rep.* 36 (2019) 869–888, <https://doi.org/10.1039/c9np00011a>.
- [62] R. Pezzani, B. Salehi, S. Vitalini, M. Iriti, F.A. Zuñiga, J. Sharifi-Rad, M. Martorell, N. Martins, Synergistic effects of plant derivatives and conventional chemotherapeutic agents: an update on the cancer perspective, *Med* 55 (2019) 110, <https://doi.org/10.3390/medicina55040110>.



CNTs coated charcoal as a hybrid composite material: Adsorption of fluoxetine probed by zebrafish embryos and its potential for environmental remediation.

Diego Sousa-Moura ^{a, **}, Elaine Yoshiko Matsubara ^{c, *}, Irvin Bryan Machado Ferraz ^a, Rhaul de Oliveira ^a, Ísis Oliveira Szlachetka ^b, Sebastião William da Silva ^b, Níchollas Serafim Camargo ^a, José Maurício Rosolen ^c, Cesar Koppe Grisolia ^a, Marcia Cristina Oliveira da Rocha ^a

^a Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Genética & Morfologia, Brasília, DF, Brazil

^b Universidade de Brasília, Laboratório de Física Aplicada, Instituto de Física, Brasília, DF, Brazil

^c Universidade de São Paulo, FFCLRP - Departamento de Química, Ribeirão Preto, SP, 14040901, Brazil

H I G H L I G H T S

- HMNC and AC are practically non-toxic to zebrafish embryos: LC_{50} (96 h) ≥ 1000 mg.L⁻¹.
- HMNC adsorbs fluoxetine molecules more effectively than AC.
- Fluoxetine interacts with HMNC and is less available to early embryo development stages.
- Embryos exposed to HMNC and unexposed embryos behave similarly.

A R T I C L E I N F O

Article history:

Received 12 February 2019

Received in revised form

2 May 2019

Accepted 2 May 2019

Available online 10 May 2019

Handling Editor: David Volz

Keywords:

Danio rerio

Carbonaceous materials

Remediation agent

Hybrid micro/nanocomposite

A B S T R A C T

Although traditional water treatment systems can remove various substances from wastewater, these conventional systems fail to remove many chemical molecules that pose potential ecological and health risks. Carbon nanotubes (CNTs) appear attractive to adsorption of many substances, but CNTs adsorbed with toxic substances becomes a nanocomposite still more toxic. Here, we employ zebrafish embryos as biosensor to examine how a hybrid micro/nanostructured carbonaceous material (HMNC) derived from a combination of activated carbon (AC) with hydrophilic carbon nanotubes (CNTs) can remediate wastewater contaminated with the pharmaceutical fluoxetine hydrochloride (FLX). AC and HMNC are practically non-toxic to zebrafish embryos ($LC_{50} > 1000$ mg.L⁻¹). HMNC addition to culture medium containing FLX significantly reduces sublethal effects and lethality. Interaction between FLX and HMNC involves chemical adsorption such that embryo co-exposure to HMNC adsorbed with FLX in the range of concentrations evaluated herein does not elicit any behavioral changes in zebrafish.

© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Inefficient fluoxetine hydrochloride (FLX) removal by conventional water treatment and the consequent broad distribution of this drug in the environment (Aus der Beek et al., 2015) make the

development of more efficient water treatment methods and of materials that can be incorporated into water treatment plants an urgent matter.

Activated carbon (AC) can remove many pharmaceutically active compounds from water, so it plays an important role in remediating water containing emerging contaminants. Different kinds of AC exist depending on their physicochemical properties (e.g., particle size, pore size distribution, surface area, and bulk density). The functional groups distribution on the AC surface determines how AC interacts with contaminants. Adsorption is controlled by van der

* Corresponding author.

** Corresponding author.
E-mail addresses: diegosousa.12@gmail.com (D. Sousa-Moura), elainematsubara@yahoo.com (E.Y. Matsubara).

Waals interactions between AC and non-polar contaminants or electrostatic interactions between the charged AC surface and polar contaminants. However, AC has disadvantages, including difficult reactivation and need for longer contact with the contaminant for adsorption to occur (Yoon et al., 2008; McCreary and Snoeyink, 2014; El Gamal et al., 2018). Thus, carbon nanomaterials have been studied as alternative to improve micropollutant removal in water (Cho et al., 2011; Sotelo et al., 2012).

Several carbon nanomaterials have been studied for micropollutant removal (Cho et al., 2011; Sotelo et al., 2012; Ji et al., 2010). In this context, carbon nanotubes (CNTs) have been claimed as one of the most promising remediation materials for their large specific surface area, high porosity, high selectivity, numerous adsorption sites, short intraparticle diffusion distance, and tunable pore size, not to mention that they can engage in desirable interactions with countless contaminants and can be produced on a large scale. In spite of CNTs can be potentially applied in water remediation, their similarities with asbestos and their possible cyto- and genotoxic effects (Franchi et al., 2012) have raised concerns. Various studies have shown that CNTs impact terrestrial and aquatic organisms negatively (Lam et al., 2004; Wahrheit et al., 2004; Donaldson et al., 2006; Templeton et al., 2006; Roberts et al., 2007; Smith et al., 2007). In aquatic environment the CNTs when combined with toxic adsorbents become indeed a harmful element, and this has been recently observed as well as to case of fluoxetine combined with MWCNTs (Yan et al., 2018). Furthermore, there exist additional drawbacks concerning the practical usage of particulate CNTs in water treatment. First, it is hard to obtain hydrophilic CNTs at low costs. Second, using renewable resources to obtain hydrophilic CNTs is difficult because raw CNTs are predominantly hydrophobic. Finally, ensuring that all the nanomaterial will be well exposed to contaminants while avoiding the deleterious CNT-toxic adsorbent release into the aquatic environment is a challenging task.

To overcome the challenges associated with effective commercial use of CNTs in water treatment, here we propose the use of a hybrid micro/nanostructured material (HMNC) consisting of granular active charcoal or active carbon (AC) covered with hydrophilic CNTs grown directly on the AC surface. HMNCs are composites that allow the physicochemical properties of CNTs to be explored as a result of the amount and type of constituents and of the electronic interactions between them. In this kind of hybrid composite material, CNT coating binds to the surface of a dense and micrometric material and can be easily captured by masks, filter paper, etc., which is not possible with free CNTs (a low-density particulate material). HMNCs can be composed of many kinds of micrometric matrices such as carbon fiber non-woven, charcoal, and bone charcoal and have been little studied in the context of water treatment (Gonçalves et al., 2011; Zhang et al., 2009).

We then use zebrafish embryos as biosensor to evaluate how AC or HMNC interacts with FLX. Zebrafish is a small teleost (3–4 cm) belonging to the freshwater fish family Cyprinidae. This fish species is often employed as a model to assess the ecotoxicity of metals, pesticides, pharmaceuticals, and other substances (Kanungo et al., 2014) because the fish are small and undergo rapid external development. Several studies have suggested that acute toxicity measured by using zebrafish embryos (Fish Embryo Toxicity (FET) test — OECD n. 236) provides similar sensitivity as compared to the adult fish (Lammer et al., 2009). The FET test offers advantages: it requires small volumes of test solutions, consequently generating less waste; the species used in the test are easy to obtain within a short period; and mortality as well as alterations in embryo development can be easily measured (OECD, 2013). To date, zebrafish have not been used as biosensor to check HMNC toxicity to non-target species, and the use of HMNC as adsorbent of psychotropic drugs has not been evaluated to verify whether these

composites can be considered as a novel material for application in water treatment and environmental remediation.

2. Materials and methods

2.1. Fluoxetine and activated carbon

Fluoxetine was purchased from C&C pharmaceutical industry (CAS number: 54910-89-3, empirical formula $C_{17}H_{18}F_3NO$). Activated carbon (AC) derived from carbonization of eucalyptus was provided by AlphaCarbo Industrial (particle size = 325 mesh).

2.2. Hybrid micro/nanostructured carbonaceous material

The composite material studied in the present work was synthesized as described previously in detail in Matsubara et al. (2016) and Rosolen et al. (2006). AC was used as a micrometric carbonaceous material. Briefly, AC was submitted to a chemical vapor deposition (CVD) method; alcohol and Co/Mn particles (1:1) were employed as carbon source and catalyst, respectively, to obtain AC covered with CNTs, referred to as hybrid micro/nanostructured carbonaceous material (HMNC) hereafter.

2.3. Samples characterization

The surface charge (zeta potential) was determined by DLS experiments using the Zetasizer Nano ZS apparatus. Samples morphology was assessed by Scanning Electron Microscopy (SEM) using a Zeiss-EVO 50 scanning electron microscope. Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) was carried out with the IXXRF Systems 500 digital processing for compositional characterization. Specific surface area (SSA) was determined by using the Brunauer, Emmett, Teller (BET) method at 77K and the Quantachrome NOVA 1200 equipment (with N_2). Before the BET experiments, the samples were dried at 150 °C and under reduced pressure for 3 h. The FTIR experiments were performed using a Bruker spectrometer (model Vertex 70). The spectra were recorded using potassium bromide (KBr) pressed pellet containing ~1% w/w of the investigated sample. The measurements were averaged over 96 scans, which were taken at a resolution of 4 cm^{-1} from 400 to 4000 cm^{-1} . The background signal was averaged over 96 scans before each measurement.

2.4. Zebrafish (*Danio rerio*) embryo culture

This research project was approved by the Ethics Committee on Animal Research of the Institute of Biological Science of the University of Brasilia under protocol number n. 100226/2014.

Zebrafishes were raised in an aquatic facility (ZebTec - Tecnoplast, Italy) with a photoperiod cycle of 12:12 h (light:dark) in aquariums under reverse osmosis and activated carbon filtered water. The water parameters were strictly controlled: temperature was maintained at 27.0 ± 1 °C, conductivity at 650 ± 100 $\mu S/cm$, pH at 7.0 ± 0.5 and dissolved oxygen $\geq 95\%$ saturation. These conditions were maintained in all the performed tests. Zebrafish eggs were collected immediately after natural mating, rinsed in water, and checked under a stereomicroscope (Stereoscopic Zoom Microscope – Stemi 2000, Zeiss, Germany). The unfertilized eggs and those showing cleavage irregularities or injuries were discarded.

2.5. Fish embryo toxicity (FET) test

Fish embryo toxicity test was based on the OECD guideline Protocol 236 “Fish Embryo Toxicity” (FET) test (Braunbeck et al., 2014, OECD, 2013). Zebrafish embryos were exposed to different

treatments (single and mixture exposure) prepared by successive dilutions of a stock solution. The test was performed using 60 eggs per treatment, divided in 3 replicates, selected and distributed in 24-well microplates in the climate chamber (SL-24 Solab Científica, Brazil), 20 wells were filled up with 2 mL of the test solution and four wells with water (internal plate control, as required in the OECD guideline). The test was initiated immediately after fertilization, and it was continued for 96 h. Embryos and larvae were observed daily under a stereomicroscope. Developmental parameters were evaluated in embryos over the test period, using a magnification of $\times 70$ for eggs and $\times 40$ for hatched embryos. Before hatching, the following parameters were evaluated: egg coagulation, otolith formation, general delay in development, eye and body pigmentation, somite formation, heartbeat, oedemas, detachment of the tail-bud from the yolk sac, yolk sac absorption and hatching. After hatching, spine malformation and posture (embryos side-lying in the bottom of the microplate well after mechanical stimulus = behavioral changes) were also evaluated. All parameters were assessed and quantified as observed or not observed.

2.5.1. Single and mixture exposure

Zebrafish embryos were exposed to four different concentrations of AC or HMNC (0, 10, 100, and 1000 mg.L⁻¹, in the absence of FLX – pilot test). The FLX toxicity test was performed at the following five different concentrations: 0, 3.19, 4.33, 7.59 and 18.46 mg.L⁻¹ (pilot test). After the single toxicity tests (pilot test), the blend bioassays comprised three groups. Group 1 (or FLX Group) consisted of FLX-exposed embryos (0, 3.19, 4.33, 7.59 and 18.46 mg.L⁻¹). For groups 2 and 3 (FLX@AC and FLX@HMNC, respectively), stock solutions of folded and mixed concentrations were prepared in a ratio of 1:1, namely: 0; 6.38; 8.66; 15.18 and 36.92 mg.L⁻¹ of FLX and 20; 200; 2000 mg.L⁻¹ of AC (or HMNC). After mixed FLX and AC (or HMNC), the mixture concentration will be half of initial. Thus, the final concentrations of the mixtures are: 0, 3.19, 4.33, 7.59 and 18.46 mg.L⁻¹ of FLX, and 10, 100 and 1000 mg.L⁻¹ of AC (or HMNC). Fig. 1 illustrates the experimental

tests with negative control (0 mg.L⁻¹), control of carbonaceous materials (10, 100 and 1000 mg.L⁻¹), single toxicity of the FLX group and their respective mixtures (FLX@AC and FLX@HMNC). The test was performed using 60 eggs per treatment, divided in 3 replicates (20 eggs per replicate and four wells with water (internal plate control, as required in the OECD guideline). The same parameters described in the previous section were analyzed and quantified as observed or not observed.

2.6. High performance liquid chromatography analysis

FLX stock solutions at 2, 10, 20, 30, 40, 50, 80, and 100 mg.L⁻¹ concentrations were prepared in the same solvent proportion as the mobile phase and diluted to half of the initial concentration using AC or HMNC 2000 mg.L⁻¹ solution to evaluate AC or HMNC saturation. The final concentrations were 1; 5; 10; 15; 20; 25; 40 and 50 mg.L⁻¹ of FLX and 1000 mg.L⁻¹ of AC or HMNC. Analyses were performed in triplicate; 1 mL was used per replicate at 26 ± 1 °C. The final solutions were kept under stirring, light, and at room temperature for 20 min. Then, they were filtered through a syringe-driven Millex filter (0.22 μ m, 13-mm pore) and analyzed by HPLC.

To determine FLX remaining in the medium, the method adapted from Sabbioni et al., (2004) was used. The standard curve was obtained by using a Shimadzu-Prominence high performance liquid chromatograph comprising an online degasser (DGU 20A5 model), a solvent delivery unit (LC-20AT model), an auto sample injector (SIL-20 AHT model), a column oven (20A), an UV-VIS detector (SPD-20A model), and a controller (CBM-20A). The column consisted of C-18-ODS (M) reverse phase CLC (150 mm \times 4.6 mm and 5- μ m particle size). To construct the standard curve, FLX solutions at concentrations ranging between 1 and 50 mg.L⁻¹ were prepared in 35:65 (v/v) phosphate buffer pH 3.0 and acetonitrile. The isocratic method was used. The mobile phase consisted of 35:65 (v/v) phosphate buffer pH 3.0 and acetonitrile at a flow rate of 1 mL min⁻¹. The detection wavelength was set at 228 nm, and the injection volume was 20 μ L. The oven temperature was maintained

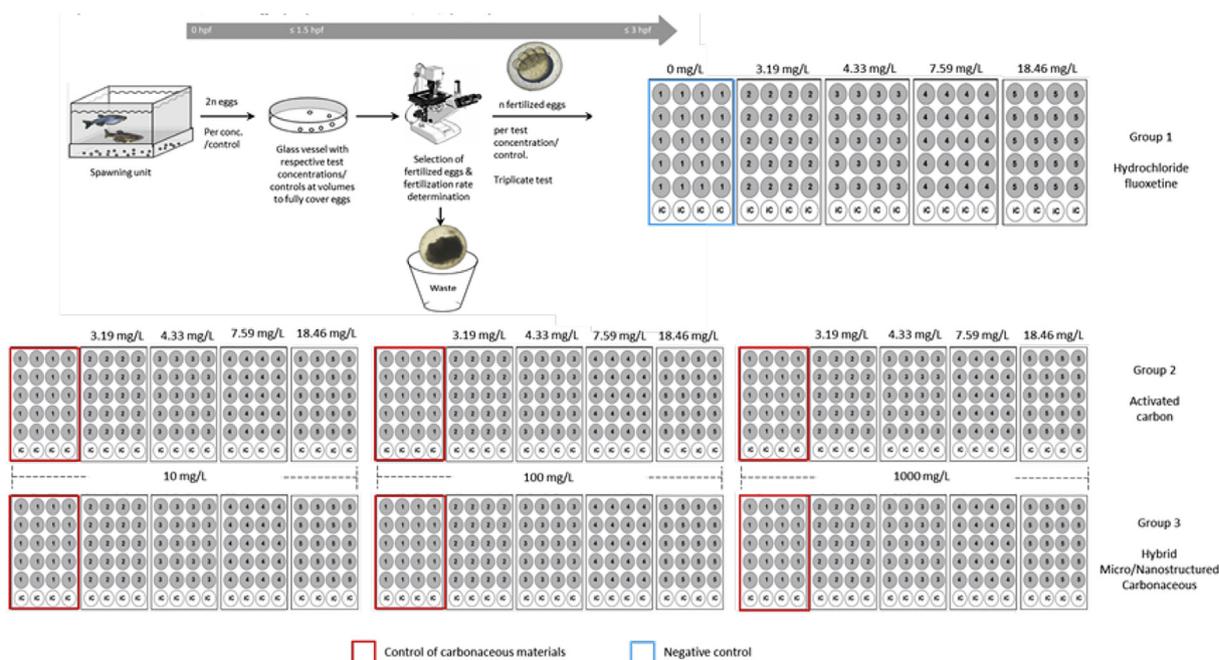


Fig. 1. Experimental embryo toxicity tests, adapted from OECD protocol no. 236.1–5: concentrations of the tested substances; IC: internal control. Group 1: Fluoxetine (FLX); Group 2: Activated Carbon + Fluoxetine (FLX@AC); and Group 3: Hybrid Micro/Nanostructured Carbonaceous Material + Fluoxetine (FLX@HMNC).

at 30 °C. Data were collected and processed with the LC solution software (Shimadzu, Tokyo, Japan).

2.7. Statistical analysis

The effective concentrations (LC_{50} and EC_{50}) to mortality and to behavior change (loss of equilibrium) were calculated using a two-parameter Logistic model. All analyses were performed using the Rstudio statistical package (R Core Team (2018)).

3. Results and discussion

3.1. Morphology of AC and HMNC

AC is a cheap adsorbent extensively studied in the literature and employed in water treatment, and for this reason it is the material chosen to be combined with CNTs. Nevertheless, it is also particularly interesting to preparation of HMNC because its surface is excellent to the incorporation of catalyst used to the CNT growth. Carbonaceous materials, as AC are also attractive to HMNC synthesis since they do not react with catalyst during the CVD methodology used to prepare them Fig. 2 shows SEM pictures of AC with average particle size of 500 μm , whereas Fig. 3 reveals that CNTs cover all the surface of the AC micrometric particles, producing the HMNC. EDS compositional analysis (not shown here) demonstrates that carbon and oxygen predominate in both AC and HMNC, in agreement with the literature (Bansal and Goyal, 2005). AC and HMNC SSA values are 329.4 and 266.0 m^2g^{-1} , respectively, as determined from BET N_2 isotherms. Although CNTs are well known for their large surface area, the lower HMNC SSA as compared to AC is due to blockade of AC pores by CNTs. It is worth to remember that the AC surface is composed by large cavities or holes and small particles of charcoal (inserted in Fig. 2). During the process of the Mn/Co catalyst incorporation on the AC's surface (to CNTs' growth synthesis) these small particles are probably removed. The Mn/Co catalyst precursor salt is expected to penetrate in all large cavities as well as in a fraction of AC's mesopores and micropores too. This could explain the decrease of specific surface area after the AC surface coating with CNTs. In the HMNC, CNTs are found in whole surface of HMNC and inside of the cavities.

DLS measurements allowed determining zeta potential for the carbonaceous nanostructures before and after adsorption with fluoxetine. The values of potential for CA and HMNC pure are $\xi = -30.4 \pm 0.2 \text{ mV}$ and $\xi = -14.3 \pm 0.2 \text{ mV}$, respectively. After adsorption, these values increased to $\xi = 9.99 \pm 0.2 \text{ mV}$ and $\xi = 16.8 \pm 0.2 \text{ mV}$, respectively. The positive results of the ξ values indicate the carbonaceous nanostructures were loaded successfully and suggest that fluoxetine adsorption on CNT is probably

chemical. Adsorption of FLX on single-walled carbon nanotubes has been studied by simulation and suggests that there exist a charge transfer between FLX and CNTs (Shahabi and Tavakol, 2017). For the case of MWCNTs is still not clear the presence of eventual charge transfer between the MWCNTs and FLX. In supplementary materials is shown the FTIR spectra of free FLX and of FLX adsorbed onto the nanostructure's AC and HMNC (Fig. S1a, ii and iv) do not reveal any significant changes in the FLX vibrational energies. On the other hand, the shifts in the aromatic ring vibration modes and the unchanged behavior of the CF_3 and C-O-C modes suggest that FLX adsorbs onto the carbonaceous nanostructures through π - π interaction. Similar results are found in the literature. The hypothesis that considers π - π interaction agrees with the changes in the AC and HMNC zeta potential values from negative (before FLX adsorption) to positive (after FLX adsorption).

3.2. Biological tests and HPLC analysis

Zebrafish have been widely used in ecotoxicological assessments. In the present study, the embryos present normal development in control medium as well as in carbonaceous adsorbent materials (AC or HMNC), which agrees with previous studies described by Kimmel et al. (1995). The maximum mortality is 3% for the entire test period. We were unable to determine LC_{50} or EC_{50} (sublethal parameters) for HMNC because they are above the highest concentration tested herein (1000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

Literature studies have focused on showing how carbonaceous nanostructures affect non-target species of different trophic levels. However, most of these studies, especially studies on vertebrates, report sublethal effects, generating a knowledge gap about lethality. Additionally, Lovern and Klaper, (2006) pointed out that nanomaterial toxicity depends on the methodology that was used to manufacture them. Therefore, establishing a toxicity pattern is difficult Yu et al. (2016). Zhu et al. (2007) evaluated the toxicity of a carbonaceous nanostructure, C_{60} (fullerene), to zebrafish embryos and observed that the nanomaterial is not toxic at concentrations of up to 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, but the authors were not able to calculate LC_{50} or EC_{50} . Nevertheless, when they evaluated C_n (other fullerene forms), they observed effects on hatching, embryo development, and mortality. Moreover, Cherukuri et al. (2006) assessed the toxicity of CNTs modified with Pluronic to rabbits (intravenous administration), but they did not identify sublethal effects. In contrast, Ye et al. (2009) verified cellular death, morphological changes, ROS, and expression of interleukin-8 (IL-8) genes when they investigated evaluating CNTs dispersed by Pluronic F_{68} . Here, the absence of lethal or sublethal effects on zebrafish embryos shows that AC and HMNC are not toxic to the fish. In our previous study, MWCNTs were tested in zebrafish for cyto- or genotoxicity. The lack of cyto-

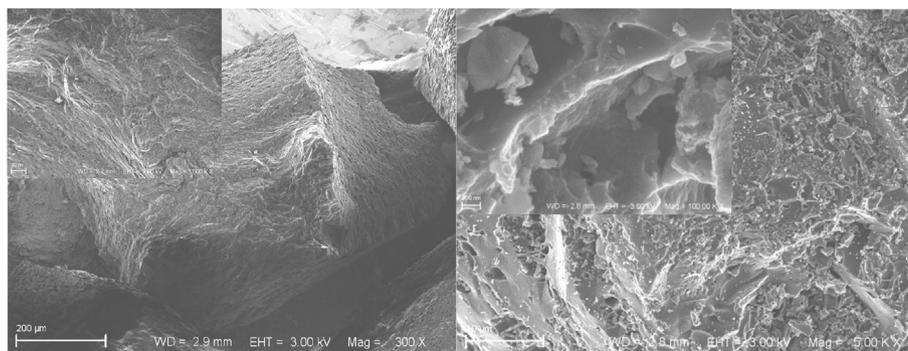


Fig. 2. SEM images of Activated Carbon (AC) at different magnifications.

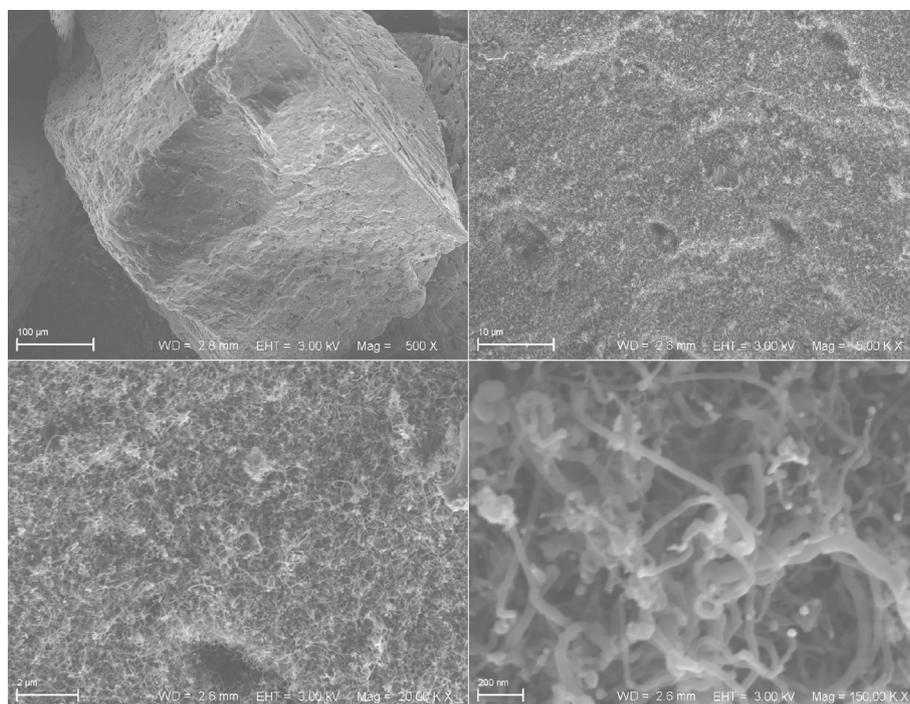


Fig. 3. SEM images of Hybrid Micro/Nanostructured Carbonaceous Material (HMNC) at different magnifications.

genotoxicity and reactivity encouraged more refined studies with purposes for using this nanomaterial in remediation processes Souza Filho et al. (2014).

The lethality results obtained with control FLX (LC_{50} 96 h = 6.32 mg.L^{-1}) can be compared to literature studies. For example, Nakamura et al. (2008) evaluated FLX effects on *Oryzias latipes* fish and determined LC_{50} 96 h = 5.5 mg.L^{-1} . Brooks et al. (2003) assessed the FLX environmental risk to selected benthic and pelagic toxicity test organisms, to obtain LC_{50} 168 h = 0.89 mg.L^{-1} for *Pimephales promelas* fish. Henry and Black (2008) achieved LC_{50} 168 h = 0.56 mg.L^{-1} for the adverse FLX effects on *Gambusia affinis* fish. Alsop and Wood (2013) conducted a study on zebrafish, to find lower acute FLX toxicity: LC_{50} 96 h = 0.25 mg.L^{-1} .

Table 1 lists the LC_{50} values for the positive control (FLX) and for FLX in the presence of different concentrations of carbonaceous adsorbents (AC or HMNC).

For AC or HMNC at 10 mg.L^{-1} , LC_{50} is around 34% higher for HMNC. In the case of AC or HMNC at 100 mg.L^{-1} , LC_{50} is approximately 6.5% higher for AC. A tenfold increase in AC concentration raises LC_{50} by 38.6%, whereas a tenfold increase in HMNC concentration raises LC_{50} by only 1.1%. Therefore, a lower HMNC concentration provides optimal results in terms of LC_{50} . In other words,

Table 1

Lethal concentrations in mg.L^{-1} (\pm standard error) of Fluoxetine (FLX) and mixtures of Fluoxetine + Hybrid Micro/Nanostructured Carbonaceous Material (FLX@HMNC) and Fluoxetine + Activated Carbon (FLX@AC) used in the zebrafish embryo toxicity tests.

Treatment	LC_{50} (96 h)	Model (R^2)
FLX	5.20 ± 0.19	Logistic - two parameters (0.98)
FLX@AC 10 mg.L^{-1}	7.54 ± 0.31	Logistic - two parameters (0.99)
FLX@AC 100 mg.L^{-1}	11.25 ± 0.71	Logistic - two parameters (0.98)
FLX@HMNC + 10 mg.L^{-1}	10.08 ± 0.60	Logistic - two parameters (0.98)
FLX@HMNC + 100 mg.L^{-1}	10.52 ± 0.65	Logistic - two parameters (0.99)

HMNC 10 mg.L^{-1} is equivalent to AC 100 mg.L^{-1} , which represents an advantage of HMNC over AC when it comes to minimizing zebrafish embryo mortality.

FLX@AC 1000 mg.L^{-1} and FLX@HMNC 1000 mg.L^{-1} had no mortality effect, so we were not able to calculate LC_{50} . Fig. 4 shows an overview of the embryo toxicological results.

Although LC_{50} is higher for AC 100 mg.L^{-1} as compared to HMNC 100 mg.L^{-1} , HMNC does not elicit any behavioral changes in the organism, whereas mortality in the presence of FLX at 4.33, 7.59, and 18.46 mg.L^{-1} is 5%, 10%, and 100%, respectively.

Serotonin (5-HT) is one of the most important and ubiquitous neurotransmitters in the animal kingdom (Azmitia, 1999). In aquatic organisms, the serotonergic system (the FLX action site) plays a fundamental role in their behavior: social, food demand, and motor responses (Lillesaar et al., 2007; Mennigen et al., 2010). Studies have shown that aquatic organisms exposed to FLX concentrations display altered behavior (Airhart et al., 2007; Prieto, 2012). We evaluated behavioral changes (equilibrium) in hatched embryos after 96 h of exposure to different samples at different concentrations. Fig. 5 shows that approximately 80% of the organisms exposed to 4.33 mg.L^{-1} of FLX are altered. Almost all the organisms exposed to FLX 7.59 mg.L^{-1} died (only $n = 2$ live organisms in 60 - these data was not showed in Fig. 5). In this case, the only two remaining hatching embryos present behavioral changes, which means 100% behavior change. We were not able to measure behavioral changes in the organisms exposed to FLX 18.46 mg.L^{-1} , because they were all dead at 96 h.

Less than 20% and 2% of the organisms exposed to FLX 4.33 mg.L^{-1} @AC 10 mg.L^{-1} and FLX 4.33 mg.L^{-1} @AC 100 mg.L^{-1} , respectively, have altered behavior. These data reveals a dose-dependent response, as it was detected less behavioral changes when AC concentration increases.

To FLX 7.59 mg.L^{-1} @AC 10 mg.L^{-1} , AC maintains approximately 50% of living organisms, but all of them had changes in the balance. Besides of, it was observed behavioral changes amount to 10% in

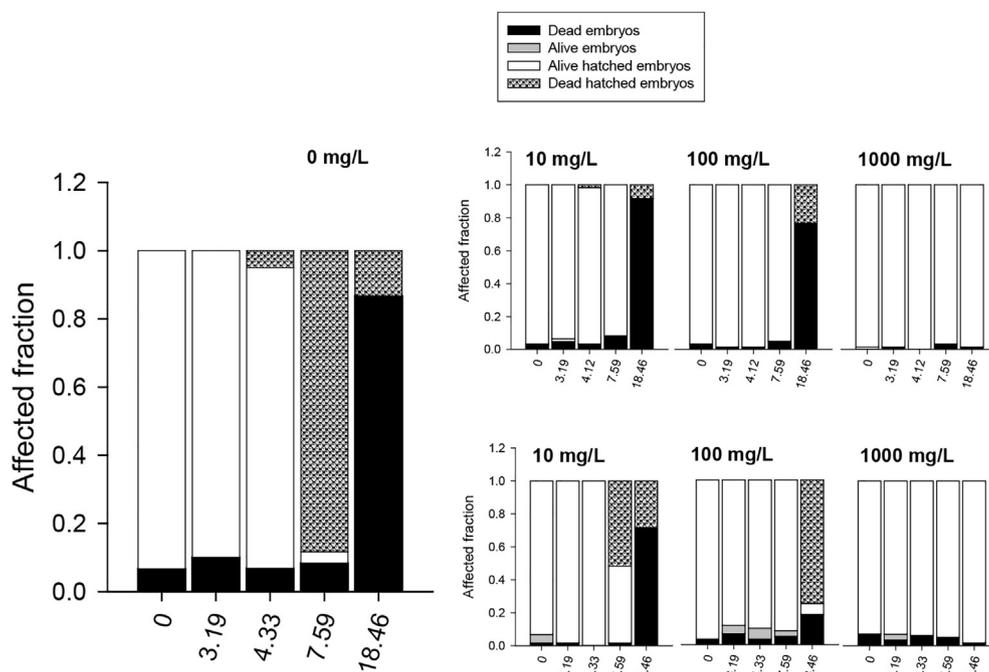


Fig. 4. Overview of the embryotoxicity studies after 96-h exposure to different treatments. Letter “a” represents the Fluoxetine (FLX) treatment. Letters “b”, “c”, and “d” corresponds to the different treatments with Fluoxetine + Hybrid Micro/Nanostructured Carbonaceous Material (FLX@HMNC), whereas letters “e”, “f”, and “g” refer to the different treatments with Fluoxetine + Activated Carbon (FLX@AC).

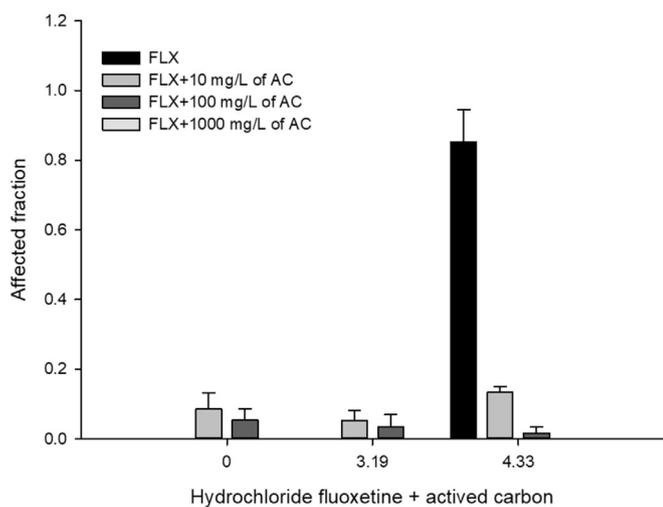


Fig. 5. Bar graph (\pm standard error) of the behavioral changes at 96 h of exposure to Fluoxetine (FLX) and FLX@Activated Carbon (FLX@AC).

FLX 7.59 mg.L⁻¹@AC 100 mg.L⁻¹. In addition, less than 7% of the organisms ($n = 4$) are alive in FLX 18.46 mg.L⁻¹@AC 100 mg.L⁻¹, and all of them had changes in equilibrium. Table 2 shows the effect

Table 2

Effect concentrations in mg.L⁻¹ (\pm standard error) of Fluoxetine (FLX) and mixtures of Fluoxetine + Activated Carbon (FLX@AC) used in the zebrafish embryo toxicity tests. It was not possible to determine an EC₅₀ value for organisms exposed to FLX@100 and 1000 mg.L⁻¹ of AC.

Treatment	EC ₅₀ (96 h)	Model (R ²)
FLX	4.22 \pm 0.39	Logistic - two parameters (0.98)
FLX@AC 10 mg.L ⁻¹	7.89 \pm 0.67	Logistic - two parameters (0.99)

concentrations (EC₅₀) for organisms exposed to FLX and FLX@10 mg.L⁻¹ of AC.

FLX@HMNC does not modify organism's behavior. The results described point out a higher interaction between FLX and HMNC; that is, HMNC is a better FLX adsorbent as compared to AC. This HMNC adsorptive property allows good zebrafish embryo development in medium containing lower FLX concentration because a greater amount of the drug is adsorbed onto the HMNC surface.

Zebrafish embryos are a good and efficient biosensor to prove the effects of FLX adsorption onto AC or HMNC. Despite its lower SSA, HMNC at low concentrations (10 mg.L⁻¹) adsorbs FLX more efficiently than AC. This is because AC and HMNC establish different electronic interactions with FLX. In the HMNC composite, the presence of CNTs covering the AC surface creates new properties or improves existing properties. The CNTs contain defects and functional groups originating from the synthesis process (Rosolen et al., 2006; Matsubara, 2010), which favor interaction with the FLX amine group and make the FLX molecules less bioavailable to the zebrafish embryos. At high concentrations (100 mg.L⁻¹), HMNC can adsorb more FLX molecules than AC, which explains the absence of behavioral changes in zebrafish embryos in the presence of FLX@HMNC. This result reinforces the data obtained for HMNC in water: despite bearing CNTs, the highest HMNC concentration in the absence of FLX is not toxic to the zebrafish. This is because CNTs are in the form of a micro/nanostructured hybrid and not in the form of free particulates. Fig. 6 represents how HMNC may have acted.

To confirm this assertion, we measured the amount of free FLX in the medium after contact with the carbonaceous adsorbent by the HPLC technique. We analyzed the different FLX, AC, HMNC, FLX@AC, and FLX@HMNC concentrations of used in embryo toxicity tests were analyzed to find the saturation point of the two carbonaceous adsorbent materials. We constructed a calibration curve on the basis of HPLC peak areas for several FLX concentrations, to obtain the standard curve with the following equation

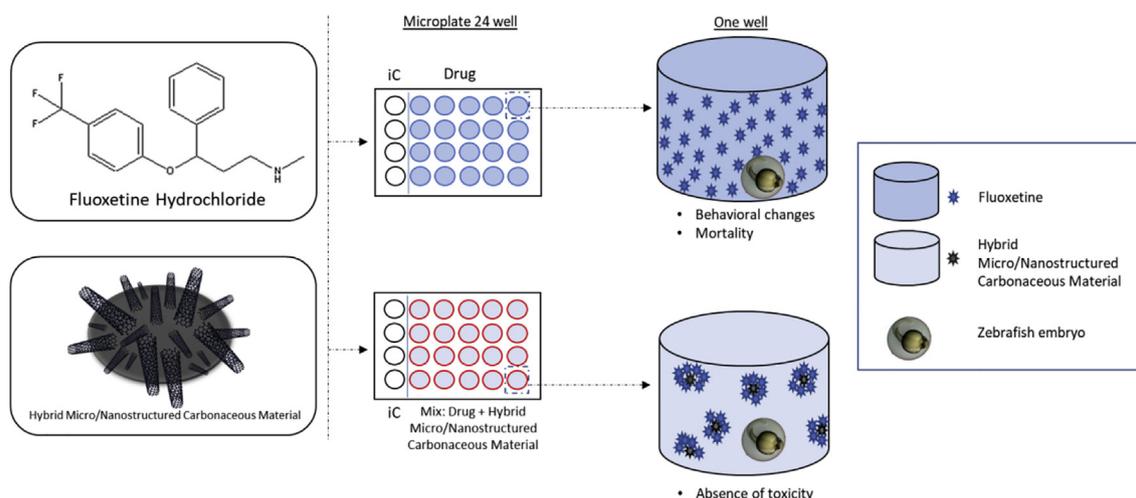


Fig. 6. Scheme of the interactions between Fluoxetine hydrochloride and Hybrid Micro/Nanostructured Carbonaceous Material. iC: internal control.

$Y = 454725 \cdot X + 7501$ and R^2 of 0.9998. We used this standard curve in subsequent studies.

Fig. 7 depicts the rate of FLX adsorption onto HMNC and AC during the tests. Fig. 7 - gray color, shows that AC 1000 mg.L^{-1} only removes lower FLX concentrations (between 1 and 10 mg.L^{-1}) from the medium. When the FLX concentration increases, AC becomes saturated. Consequently, some FLX molecules remain free in the medium and are detected by the equipment. Fig. 7 - black color, demonstrates that HMNC can adsorb higher FLX quantities. Saturation starts only at higher FLX concentrations ($>40 \text{ mg.L}^{-1}$), when HPLC detects approximately 2% of the FLX in the medium. Lastly, FTIR spectra were performed on the precipitates of FLX@AC and FLX@HMNC samples washed with methanol. The spectra obtained are typical of the carbonaceous nanostructures as prepared, and show no evidence of FLX onto micro/nanostructured surface, as can be seen in Fig. S2 (Supplementary material). Thus, confirming that FLX was successfully desorbed and the regeneration of the adsorbent is feasible.

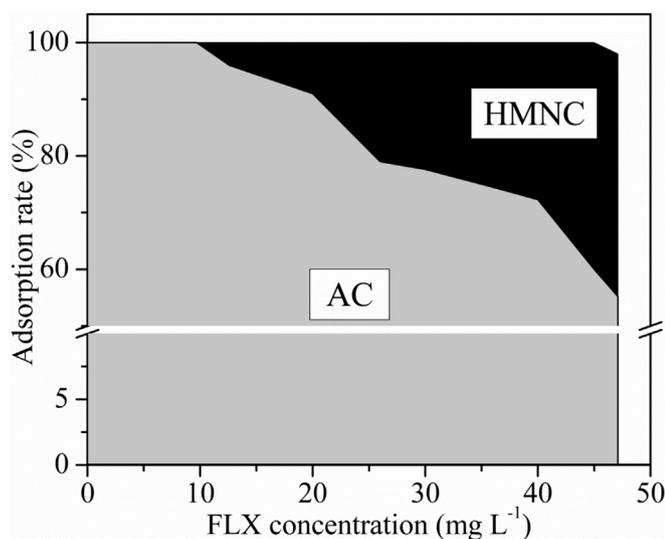


Fig. 7. (gray) Adsorption rate of various fluoxetine concentrations onto Activated Carbon 1000 mg.L^{-1} ; (black) Adsorption rate of various fluoxetine concentrations onto Hybrid Micro/Nanostructured Carbonaceous Material 1000 mg.L^{-1} .

4. Conclusion

Here, we show a decrease in FLX sublethal and lethal effects on zebrafish embryos in the presence of carbonaceous adsorbent materials (AC and HMNC). The results indicate that zebrafish embryos are a good biosensor to analyze how HMNC and AC affect FLX adsorption.

HMNC and AC present low toxicity to zebrafish embryos, with LC_{50} above 1000 mg.L^{-1} , but the use of HMNC for FLX adsorption is more advantageous. The presence of CNTs on the AC surface in HMNC elicits electronic interactions that modify the properties of both AC and CNTs, giving rise to a hybrid material. The use of a hybrid composite material (micro/nanostructured carbonaceous material) enables the application of CNTs in environmental remediation without the toxicological effects attributed to carbon nanomaterials. Moreover, this approach allows an easy CNTs recovery.

HMNC proved to be a better FLX adsorbent than AC: HMNC provides the same outcome as AC at tenfold lower concentration (10 mg.L^{-1} versus 100 mg.L^{-1} , respectively) without behavioral changes.

In conclusion, HMNC resulted from a combination of activated carbon and hydrophilic carbon nanotubes can be potentially employed in water treatment or environmental remediation.

Acknowledgments

The authors would like to thank FAPESP (Proc. 2017/04759-2, JMR - Research Grant), CAPES (PROEX -1869/2016, EYM) and CNPq (JMR - Research Grant, DSM - PhD fellowship and CKG - 305741/2015-2 Research Grant). Prof. C.K. Grisolia would like to thank Juliana B.M.F. Vieira (Technical assistance).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.019>.

References

- Airhart, M.J., et al., 2007. Movement disorders and neurochemical changes in zebrafish larvae after bath exposure to fluoxetine (PROZAC). *Neurotoxicol. Teratol.* 29 (6), 652–664. <https://doi.org/10.1016/j.nt.2007.07.005>.
- Alsop, D., Wood, C.M., 2013. Metal and pharmaceutical mixtures: Is ion loss the

- mechanism underlying acute toxicity and widespread additive toxicity in zebrafish? *Aquat. Toxicol.* 140–141, 257–267. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.05.021>.
- Aus der Beek, T., et al., 2015. Pharmaceuticals in the environment - global occurrences and perspectives. *Environ. Toxicol. Chem. n/a*. -n/a. doi: 10.1002/etc.3339.
- Azmitia, E.C., 1999. Serotonin neurons, neuroplasticity, and homeostasis of neural tissue. *Neuropsychopharmacology* 21, 335–45S. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(99\)00022-6](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(99)00022-6) (Woolley 1961).
- Bansal, R.C., Goyal, M., 2005. Activated Carbon Adsorption. Taylor & Francis Group LLC, Florida, USA.
- Braunbeck, T., et al., 2014. The fish embryo test (FET): Origin, applications, and future. *Environ. Sci. Pollut. Control Ser.* 22 (21), 16247–16261. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3814-7>.
- Brooks, B.W., et al., 2003. Waterborne and sediment toxicity of fluoxetine to select organisms. *Chemosphere* 52 (1), 135–142. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00103-6](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00103-6).
- Cherukuri, P., et al., 2006. Mammalian pharmacokinetics of carbon nanotubes using intrinsic near-infrared fluorescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (50), 18882–18886. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609265103>.
- Cho, Hyun-hee, Huang, Haiou, Schwab, Kellogg, 2011. Effects of Solution Chemistry on the Adsorption of Ibuprofen and Triclosan onto Carbon Nanotubes, pp. 12960–12967.
- Donaldson, K., et al., 2006. Carbon nanotubes: A review of their properties in relation to pulmonary toxicology and workplace safety. *Toxicol. Sci.* 92 (1), 5–22. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfj130>.
- El Gamal, M., et al., 2018. Bio-regeneration of activated carbon: A comprehensive review. *Separ. Purif. Technol.* 197 (January), 345–359. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2018.01.015>.
- Franchi, L.P., et al., 2012. Citotoxicidade e Genotoxicidade de Nanotubos de Carbono. *Quim. Nova* 35 (3), 571–580.
- Gonçalves, V.R., et al., 2011. Micro/nanostructured carbon composite modified with a hybrid redox mediator and enzymes as a glucose biosensor. *Carbon* 49 (9), 3039–3047.
- Henry, T.B., Black, M.C., 2008. Acute and chronic toxicity of fluoxetine (selective serotonin reuptake inhibitor) in western Mosquitofish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 54 (2), 325–330. <https://doi.org/10.1007/s00244-007-9018-0>.
- Ji, L., et al., 2010. Adsorption of monoaromatic compounds and pharmaceutical antibiotics on carbon nanotubes activated by KOH etching. *Environ. Sci. Technol.* 44 (16), 6429–6436. <https://doi.org/10.1021/es1014828>.
- Kanungo, J., et al., 2014. Zebrafish model in drug safety assessment. *Curr. Pharmaceut. Des.* 20 (34), 5416–5429. <https://doi.org/10.2174/1381612820666140205145658>.
- Kimmel, C.B., et al., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dynam.* 203 (3), 253–310. <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>.
- Lam, C.W., et al., 2004. Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicol. Sci.* 77 (1), 126–134. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfg243>.
- Lammer, E., et al., 2009. Is the Fish Embryo Toxicity Test (FET) with the Zebrafish (*Danio rerio*) a Potential Alternative for the Fish Acute Toxicity Test? *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, vol. 149. Elsevier, pp. 196–209.
- Lillesaar, C., et al., 2007. The Serotonergic Phenotype Is Acquired by Converging Genetic Mechanisms within the Zebrafish Central Nervous System. *Developmental Dynamics*, vol. 236. Wiley Online Library, pp. 1072–1084.
- Lovern, S.B., Klaper, R., 2006. *Daphnia magna* mortality when exposed to titanium dioxide and fullerene (C60) nanoparticles. *Environ. Toxicol. Chem./SETAC* 25 (4), 1132–1137. <https://doi.org/10.1897/05-278r.1>.
- Matsubara, E.Y., 2010. PhD Thesis. <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/59/59138/tde-24032010-112625/pt-br.php>.
- Matsubara, E.Y., et al., 2016. Electronic enhancement of hybrid specific capacity of carbon nanotube/bone charcoal composite with Ag nanoparticle decoration. *J. Electroanal. Chem.* 765, 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2015.11.020>. Elsevier B.V.
- Mccreary, J., Snoeyink, L., 2014. Granular activated carbon in water treatment author (s): John J . Mccreary and Vernon L . Snoeyink Source . J. Am. Water Works Assoc. 69 (8), 437–444. *Esthetics and Facilities Designs* (August 1977).
- Mennigen, J.A., et al., 2010. Waterborne Fluoxetine Disrupts Feeding and Energy Metabolism in the Goldfish *Carassius auratus*. *Aquatic Toxicology*, vol. 100. Elsevier B.V., pp. 128–137. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.07.022>.
- Nakamura, Y., et al., 2008. The effects of pH on fluoxetine in Japanese medaka (*Oryzias latipes*): Acute toxicity in fish larvae and bioaccumulation in juvenile fish. *Chemosphere* 70 (5), 865–873. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.06.089>.
- OECD, 2013. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, vol. 2. OECD Publishing, pp. 1–22. <https://doi.org/10.1787/9789264203709-en> (July).
- Prieto, M.J., 2012. Effect of risperidone and fluoxetine on the movement and neurochemical changes of zebrafish. *Open J. Med. Chem.* 2 (4), 129–138. <https://doi.org/10.4236/ojmc.2012.24016>.
- R Core Team, 2018. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. <https://www.R-project.org/>.
- Roberts, A.P., et al., 2007. In vivo biomodification of lipid-coated carbon nanotubes by *Daphnia magna*. *Environ. Sci. Technol.* 41 (8), 3028–3029. <https://doi.org/10.1021/es062572a>.
- Rosolen, J.M., et al., 2006. Carbon nanotube/felt composite electrodes without polymer binders. *J. Power Sources* 162 (1), 620–628. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2006.06.087>.
- Sabbioni, C., et al., 2004. A rapid HPLC-DAD method for the analysis of fluoxetine and norfluoxetine in plasma from overdose patients. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36, 351–356. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2004.06.008>.
- Shahabi, D., Tavakol, H., 2017. DFT, NBO and molecular docking studies of the adsorption of fluoxetine into and on the surface of simple and sulfur-doped carbon nanotubes. *Appl. Surf. Sci.* 420, 267–275. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.05.068>.
- Smith, C.J., Shaw, B.J., Handy, R.D., 2007. Toxicity of single walled carbon nanotubes to rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): Respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects. *Aquat. Toxicol.* 82 (2), 94–109. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.02.003>.
- Sotelo, José L., et al., 2012. Adsorption of pharmaceutical compounds and an endocrine disruptor from aqueous solutions by carbon materials adsorption of pharmaceutical compounds and an endocrine disruptor from aqueous solutions. *J. Environ. Sci. Health, Part B* (47), 640–652.
- Souza Filho, J., et al., 2014. Evaluation of carbon nanotubes network toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) model. *Environ. Res.* 134, 9–16.
- Templeton, R.C., et al., 2006. Life-cycle effects of single-walled carbon nanotubes (SWNTs) on an estuarine meiobenthic copepod. *Environ. Sci. Technol.* 40 (23), 7387–7393. <https://doi.org/10.1021/es060407p>.
- Warheit, D.B., et al., 2004. Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats. *Toxicol. Sci.* 77 (1), 117–125. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfg228>.
- Yan, Zhenhua, et al., December 2018. Accumulation, metabolite and active defence system responses of fluoxetine in zebrafish embryos: Influence of multiwalled carbon nanotubes with different functional groups. *Aquat. Toxicol.* 205, 204–212. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.10.018>.
- Ye, S.F., et al., 2009. ROS and NF- κ B Are Involved in Upregulation of IL-8 in A549 Cells Exposed to Multi-Walled Carbon Nanotubes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 379. Elsevier Inc., pp. 643–648. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.12.137>.
- Yoon, K.Y., et al., 2008. Antimicrobial effect of silver particles on bacterial contamination of activated carbon fibers. *Environ. Sci. Technol.* 42 (4), 1251–1255. <https://doi.org/10.1021/es0720199>.
- Yu, F., et al., 2016. Adsorptive Removal of Antibiotics from Aqueous Solution Using Carbon Materials. *Chemosphere* 153, 365–385. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.03.083>. Elsevier Ltd.
- Zhang, Jiangnan, et al., 2009. Effect of growing CNTs onto bamboo charcoals on adsorption of copper ions in aqueous solution effect of growing CNTs onto bamboo charcoals on adsorption of copper ions in aqueous solution. *Carbon* (14), 2850–2855.
- Zhu, X., et al., 2007. Developmental toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos after exposure to manufactured nanomaterials: Buckminsterfullerene aggregates (nC60) and fullerol. *Environ. Toxicol. Chem.* 26 (5), 976–979. <https://doi.org/10.1897/06-583.1>.

CNTs coated charcoal as a hybrid composite material: adsorption of Fluoxetine probed by zebrafish embryos and its potential for environmental remediation.

Diego Sousa-Moura^{1*}; Elaine Yoshiko Matsubara^{3*}; José Maurício Rosolen³; Cesar Koppe Grisolia¹; Irvin Bryan Machado Ferraz¹; Rhaul de Oliveira¹; Ísis Oliveira Szlachetka²; Sebastião William da Silva²; Níchollas Serafim Camargo¹; Marcia Cristina Oliveira da Rocha¹;

¹Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Genética & Morfologia, Brasília, DF – Brazil

²Universidade de Brasília, Laboratório de Física Aplicada, Instituto de Física, Brasília, DF – Brazil.

³Universidade de São Paulo, FFCLRP - Departamento de Química, 14040901 Ribeirão Preto, SP – Brazil

The interactions between FLX and the carbonaceous microstructure surface must play an important role in the vibrational properties of the AC and HMNC systems. The FTIR technique is particularly sensitive to changes in the vibrational properties of adsorbed molecules on different surfaces. The molecular information acquired from this technique allows correlating the conformational and structural changes undergone by the molecule as a function of its adsorption process. These changes are translated with the appearance, displacement and enlargement of vibrational modes of the adsorbed molecule when compared with the free molecule.

In order to investigate the interaction between the FLX and AC or HMNC systems, the samples were produced in the ratio of 1:1, namely: 100 mg.L⁻¹ of FLX @ 2000 mg.L⁻¹ of AC or HMNC, under stirring for 20 min. This procedure was carried out with the aim of adsorbing the FLX onto the carbonaceous micro/nanostructure surface. Then, to study desorption process of FLX molecules and the viability of adsorbent regeneration (AC and HMNC), the previously prepared samples were centrifuged and washed in a methanol solution.

Figure 1 displays the FTIR spectra of FLX, AC, HMNC, FLX@AC, and FLX@HMNC. The FTIR spectrum of FLX (Figure 4a (i)) agrees with literature reports (El-Habeeb and Refat, 2014). According to Density Functional Theory (DFT) calculations, the vibrational modes are highly coupled, so making their complete assignment is no easy task. Some authors have suggested that the modes associated with the phenyl group can be located around 837, 1170, 1330, and 1615 cm⁻¹, corresponding to the $\rho(CH_2) + \gamma(CH)$, $(\rho(CH_2) + \nu(C = C))$, $\delta(CH_2) + \gamma(CH)$, and $\nu(C = C)$ modes, respectively (Garrido *et al.*, 2009). The bands at 1070 and 1110 cm⁻¹ may correspond to the CF₃ elongation modes (El-Habeeb and Refat, 2014; Arshad *et al.*, 2017). The FLX molecule C-O-C skeletal and vibration modes arise at 700, 1245 cm⁻¹. Finally, the NH

($\sim 2770 \text{ cm}^{-1}$) and CH/CH_2 ($2800 - 3100 \text{ cm}^{-1}$) vibrational modes appear at higher wavelengths (not shown here).

AC and HMNC have quite different infrared spectra (Figure 4a (iii) and (v)) because HMNC have coated the surface of AC. Because HMNC contains CNTs on the AC surface, several differences are expected; e.g., at $550 - 715 \text{ cm}^{-1}$, due to ring C-H vibration, and at $870 - 1320 \text{ cm}^{-1}$, associated with ether and phenol $\nu(\text{C-O})$ (Tran *et al.*, 2017). Similarities between AC and HMNC are found only in wavelength range associated with bands due to oxygen bonds in ether, $\nu(\text{C-O})$ around 1100 cm^{-1} , and carboxyl/phenols, δ (H-O) around 1400 cm^{-1} . The bands at 1560 and 1630 cm^{-1} correspond to $\nu(\text{C} = \text{C})$ and $\delta(\text{H}_2\text{O})$, respectively, and are also different as expected because of CNT coating. Likewise, the bands referring to the $\nu(\text{CH}_2/\text{CH}_3)$ modes (not shown here) emerge in the region of 2850 and 2950 cm^{-1} (Chen *et al.*, 2010). However, it is worth to note the behavior of FTIR FLX spectra on surface of AC and HMNC. They are similar only at range of 1000 and 1300 cm^{-1} , which means that the vibrational modes of fluoxetine are identical both in the AC and surface of CNT deposited on HMNC. Outside these ranges the wavelength of vibrational modes of FLX are changed (see Fig 4b, d) to small values, while between 1600 and 1650 the FLX band at $\sim 1615 \text{ cm}^{-1}$ is shift to highest value. These results suggest that FLX when adsorbed on CA and CNT seems to assume the same structural feature.

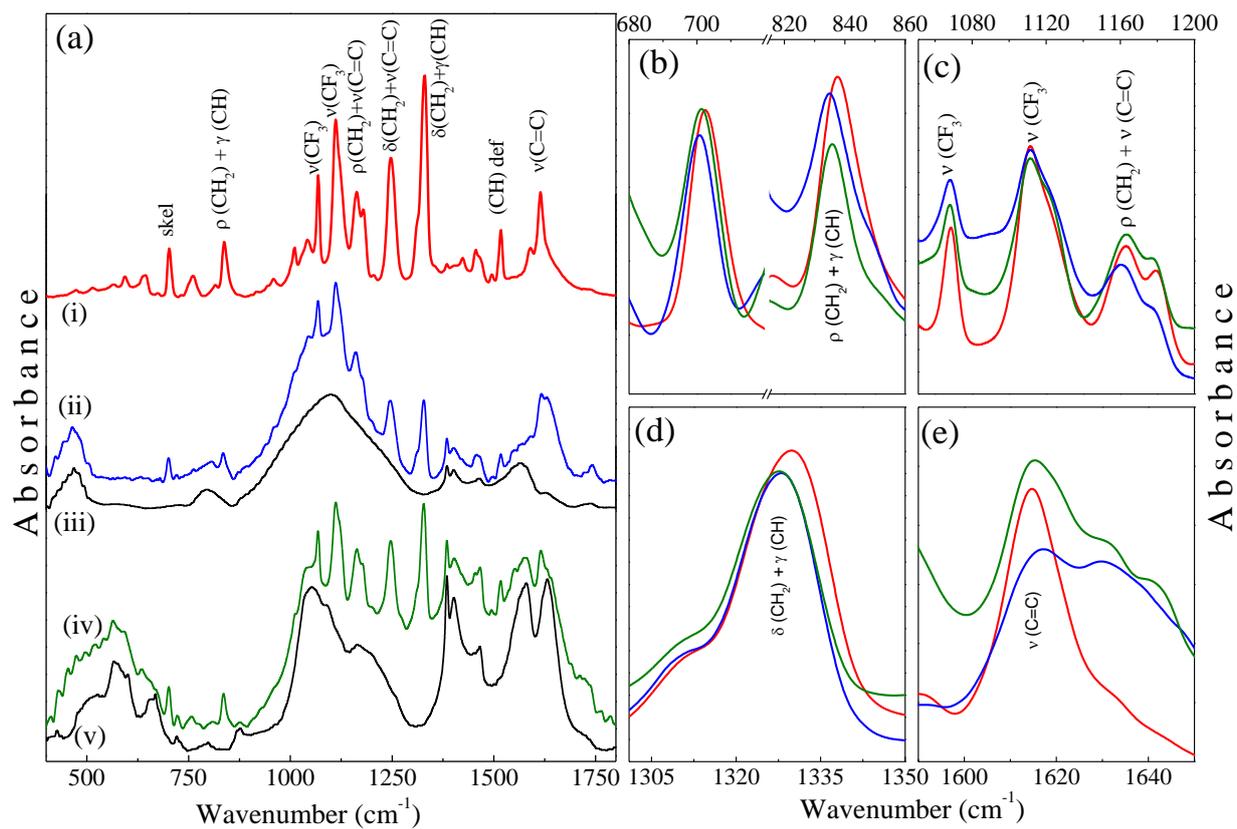


Figure S1. FTIR spectra of (a) (i) Fluoxetine (FLX), (ii) Fluoxetine + Activated Carbon (FLX@AC), (iii) Activated Carbon (AC), (iv) Fluoxetine + Hybrid Micro/Nanostructured Carbonaceous Material (FLX@HMNC), (v) HMNC. (b)-(e) Zoom, at different spectral ranges, of (i) FLX (red lines), (ii) FLX@AC (blue lines), and (iv) FLX@ HMNC (green lines).

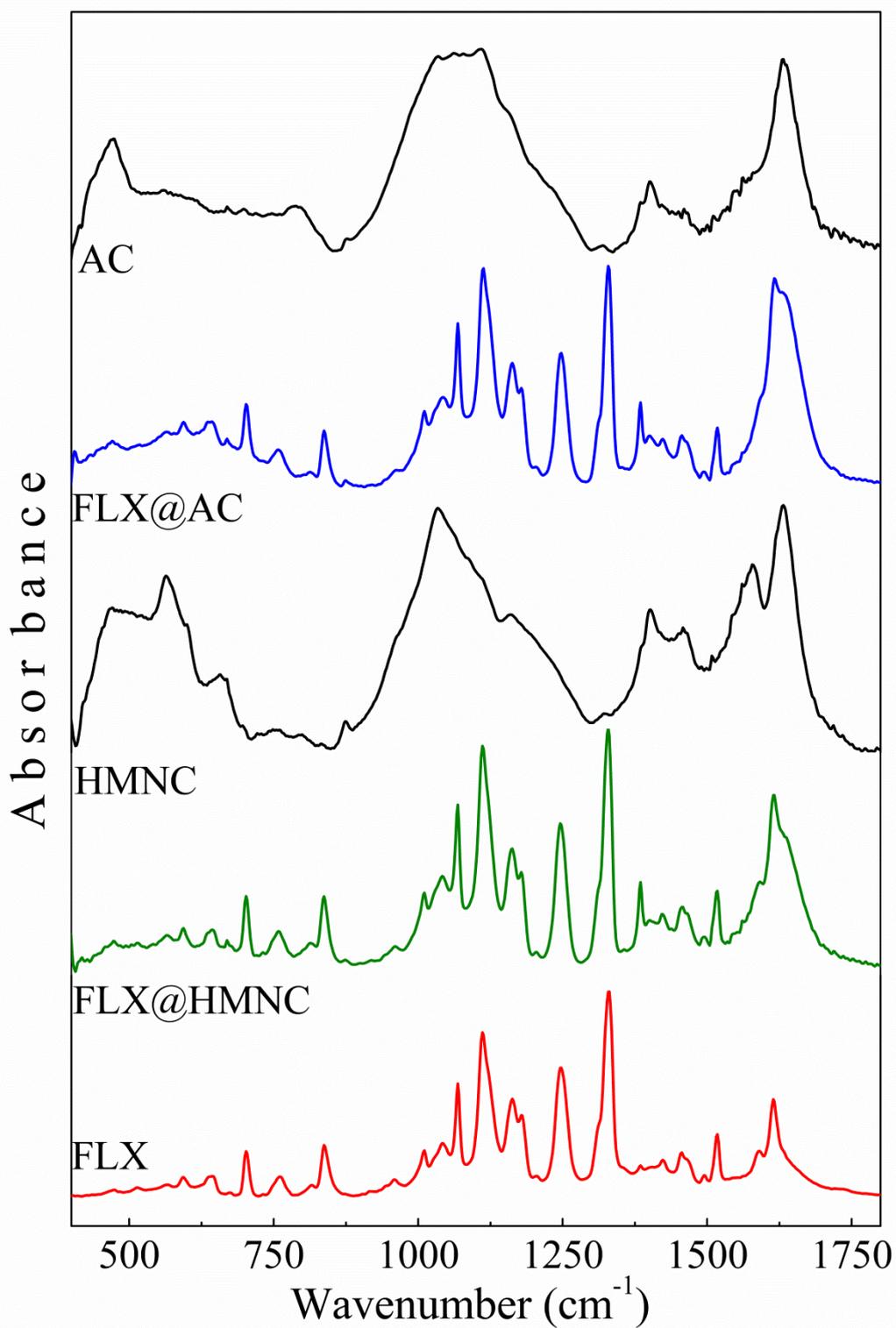


Figure S2. FTIR of carbonaceous materials after rinse in methanol to extract of fluoxetine.