



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ANA ROSA RICHTER

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCARREADORES DE
ANFOTERICINA B À BASE DE GOMA DO CAJUEIRO HIDROFOBIZADA COM
ANIDRIDOS PROPIONICO E BUTÍRICO**

FORTALEZA

2019

ANA ROSA RICHTER

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCARREADORES DE
ANFOTERICINA B A BASE DE GOMA DO CAJUEIRO HIDROFOBIZADA COM
ANIDRIDOS PROPIÔNICO E BUTÍRICO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Química.
Área de concentração: Química.

Orientadora: Profa. Dra. Regina Célia Monteiro de Paula

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R395p Richter, Ana Rosa.
Preparação e caracterização de nanocarreadores de anfotericina B à base de goma do cajueiro hidrofobizada com anidridos propiônico e butírico / Ana Rosa Richter. – 2019.
154 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2019.

Orientação: Prof. Dr. Regina Célia Monteiro de Paula.

1. Goma do Cajueiro. 2. Nanopartículas. 3. Anfotericina B. I. Título.

CDD 540

ANA ROSA RICHTER

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCARREADORES DE
ANFOTERICINA B A BASE DE GOMA DO CAJUEIRO HIDROFOBIZADA COM
ANIDRIDOS PROPIÔNICO E BUTÍRICO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Química.
Área de concentração: Química.

Aprovada em: 25 / 02 / 2019.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Regina Célia Monteiro de Paula (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Judith Pessoa de Andrade Feitosa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Jeanny da Silva Maciel
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Francisco Audísio Dias Filho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Durcilene Alves da Silva
Universidade Federal do Piauí (UFPI)

Aos meus queridos pais, João Moacir e
Aparecida.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser imensamente bondoso e misericordioso com minha vida.

À minha mãe e companheira, Aparecida Richter, por estar comigo em todos os momentos de minha vida e principalmente nesta caminhada até aqui. Obrigada por nunca me deixar de acreditar que os sonhos existem e que toda realização começa a partir deles. Também por me ensinar todos os dias a ser uma mulher melhor.

Ao meu querido pai, João Moacir, por ser minha fortaleza. O homem mais importante da minha vida e meu grande apoiador. Obrigada por ser meu refúgio e a pessoa em que eu posso confiar.

À professora Regina Célia por ser mais do que uma orientadora durante estes dez anos de vida acadêmica. Por todos os puxões de orelha, conselhos e auxílio.

À professora Judith, por todas as dúvidas tiradas e sugestões para enriquecimento do trabalho.

Ao professor Francisco Goycoolea por toda contribuição no desenvolvimento da tese e dos trabalhos científicos, sempre muito gentil e prestativo.

À minha querida amiga Fernanda, por toda paciência, risadas e festas. E principalmente por conhecer a minha essência e acreditar no meu potencial.

À minha amiga do coração Débora por ser minha companheira de universidade, de desabafos, de sonhos e planos. Obrigada por me amar do jeito que eu sou.

À minha amiga Mayrla por ter dividido a bancada e a vida comigo.

Ao meu amigo Vítor Ribeiro, por ser essa surpresa linda em minha vida. Obrigada pelo cuidado e carinho tantas vezes demonstrado e por ser sempre tão presente, apesar da distância.

Às minhas amigas Bruna e Marília, pela amizade sincera e verdadeira. Vocês são um presente de Deus em minha vida. Obrigada por terem braços enormes sempre prontos pra me acolher em qualquer situação.

Aos amigos Diego e Nayane por serem amor. Obrigada por não desistirem de mim e me ensinar em inúmeras situações o verdadeiro significado de viver igreja.

Ao colega Rodrigo, pelo carinho e cuidado com minha vida, além da valiosa ajuda no trabalho científico.

À minha querida Leônia, companheira de bancada por alguns meses, mas que marcou e abençoou tanto minha vida em todas as prazerosas conversas e momentos de sabedoria e benção.

Ao meu amigo Luis Paulo, por todos os cafés, momentos de incentivo e ajuda.

Aos colegas do Laboratório de Polímeros por todos os momentos de descontração.

Ao laboratório de Biotecnologia e Síntese Orgânica – LABS por toda ajuda e disponibilidade.

À Central Analítica da UFC por todos as imagens de microscopia eletrônica de varredura.

Ao professor Emílio Miguel, por ser sempre tão prestativo com todas as minhas dúvidas relacionadas a microscopia.

À professora Durcilene, Alyne e Fábio pelas análises de microscopia de força atômica e hemólise e por toda a receptividade no pouco tempo em que estive no Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia da UFPI.

Ao professor Carlúcio e Ana pelas análises de toxicidade com o peixe zebra.

Aos professores membros da banca de avaliação que gentilmente se dispuseram a ler e contribuir com as sugestões para melhoria deste trabalho.

À Nádia Aline por todos os espectros de infravermelho tão cuidadosamente feitos.

Ao CENAUREN pelos espectros de ressonância magnética nuclear.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

“Um dia, quando olhares para trás, verás que os dias mais belos foram aqueles em que lutaste” (Sigmund Freud)

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi preparar nanocarreadores via auto-organização e emulsões de Pickering a partir da goma do cajueiro (GC) acilada com os anidridos acético, propiônico e butírico, sendo nomeados GCAC, GCProp e GCBut para o encapsulamento da Anfotericina B (AmB). Foram realizadas três condições reacionais para cada anidrido, 1:9, 1:12 e 1:24, variando a razão molar GC/anidrido. A confirmação da reação foi possível através dos espectros de infravermelho e ressonância magnética nuclear. O grau de substituição (GS) foi determinado por titulação potenciométrica, que aumentou com o aumento da proporção molar de anidrido para os derivados GCAC e GCBut. A análise termogravimétrica evidenciou que os produtos da reação de acilação têm maior estabilidade térmica do que a GC sem modificação. A toxicidade realizada com o peixe-zebra mostrou biocompatibilidade para GCProp e GCBut. As nanopartículas (NP's) foram preparadas via auto-organização e todos os sistemas apresentaram distribuição de tamanho unimodal, sem sinais de agregação e os valores de IPD indicam homogeneidade e estabilidade. O MEV evidenciou superfície lisa e esférica para as nanopartículas. As emulsões de Pickering foram formadas por emulsificação espontânea, vertendo-se a fase orgânica sob a fase aquosa. O tamanho de partículas para as emulsões apresentou distribuição unimodal e diminuiu após o isolamento. A microscopia de força atômica confirmou a hipótese da disposição das nanopartículas ao redor da gota de óleo. Após o encapsulamento da AmB houve o aumento tamanho de partícula, aumento do IPD e diminuição do potencial zeta, tanto para as NP's quanto para as emulsões. A eficiência de encapsulamento (EE) mostrou que as NP's encapsularam melhor a AmB (EE máxima = $96,3 \pm 4,6$ %) do que as emulsões (EE máxima = $55,2 \pm 0,1$ %), entretanto a AmB está menos agregada no sistema de emulsão. Foram realizados dois ensaios de estabilidade para NP's e emulsão de Pickering e, em ambos os ensaios, os dois sistemas sem fármaco mostraram excelente estabilidade. Após o encapsulamento da AmB as NP's GCProp foram mais estáveis no período de seis meses para o ensaio de estabilidade estoque. O perfil de liberação *in vitro* da AmB para as NP's teve liberação máxima de $61,06 \pm 1,4$ % após 72 h de ensaio. O ensaio de hemólise mostrou que a emulsão GCProp 9 exibe uma extensão de dano pequeno aos eritrócitos, indicando um sistema com boa compatibilidade.

Palavras-chave: Goma do cajueiro. Nanopartículas. Anfotericina B.

ABSTRACT

The aim of this work was to prepare nanocarriers by self-assembly and Pickering emulsions from acylated cashew gum (CG), using propionic and butyric anhydrides, named GCAC, GCProp and GCBUT, for Amphotericin B (AmB) encapsulation. The reaction was performed in three CG/anhydrides molar ratio conditions (1:9, 1:12 and 1:24) and the acylation reaction was confirmed by FTIR and NMR spectra. The degree of substitution was measured by potentiometric titration and it increases with increasing of anhydride amount for GCAC and GCBUT derivatives. TGA analysis showed the acylation provides a better thermal stability in comparison with GC. Zebrafish toxicity showed biocompatibility for GCProp and GCBUT. Nanoparticles (NP's) with monomodal size distribution, very negative zeta potential and low PDI were produced. SEM showed a smooth and spherical surface for nanoparticles. Pickering emulsions were prepared by adding the organic phase in the aqueous phase, resulting the immediate emulsion formation. The particle size of emulsion presented unimodal distribution and a size decrease is observed after the isolation by centrifugation. The atomic force microscopy confirmed the hypothesis that nanoparticles are around the oil drop. After AmB encapsulation there is an increase in particle size, decrease PDI and zeta potential for NP's and emulsions. The efficiency of encapsulation (EE) was higher for NP's (maximum EE = $96.3 \pm 4.6\%$) than for nano emulsions (maximum EE = $55.2 \pm 0.1\%$), however AmB is less aggregated in the emulsion system. Two stability assays were performed for NP's and Pickering emulsions and, in both assays, the two systems had excellent stability. The GCProp loaded AmB exhibited best size stability over 180 days. The *in vitro* release profile of AmB for the NPs had its maximum release of $61.06 \pm 1.4\%$ after 72 h of assay. The hemolysis assay showed that the GCProp 9 emulsion shows a small extent of damage to the erythrocytes, indicating a system with good compatibility.

Keywords: Cashew gum. Nanoparticles. Amphotericin B.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Nanopartícula via auto-organização.....	24
Figura 2	– Emulsão clássica e emulsão de Pickering.....	26
Figura 3	– Exsudato bruto e goma do cajueiro isolada.....	35
Figura 4	– Fragmento estrutural para a goma do cajueiro não modificada, onde R representa ramnose, arabinose ou ácido glucurônico.....	36
Figura 5	– Mecanismo da reação de acetilação para a galactose.....	39
Figura 6	– Estrutura da Anfotericina B.....	42
Figura 7	– Espectros de absorção na região do infravermelho para as amostras de (a) goma do cajueiro (b) derivados acilados com anidrido acético, (c) derivados acilados com anidrido propiônico e (d) derivados acilados com anidrido butírico.....	62
Figura 8	– Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio para a goma do cajueiro sem modificação.....	64
Figura 9	– Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio para o derivado GCAC 9.....	64
Figura 10	– Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (H^1) para o derivado GCProp.....	64
Figura 11	– Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio para o derivado GCBUT.....	65
Figura 12	– Curvas termogravimétricas e DTG para a goma do cajueiro.....	67
Figura 13	– Curvas termogravimétricas e DTG para os derivados GCAC.....	68
Figura 14	– Curvas termogravimétricas e DTG para os derivados CGProp.....	68
Figura 15	– Representação da estrutura de nanopartícula de goma do cajueiro acetilada.....	71
Figura 16	– Distribuição de tamanho para as nanopartículas (a) GCAC, (b) GCProp e (c) GCBUT	72

Figura 17	– Tamanho de partícula, IPD e potencial zeta para as nanopartículas formadas via auto-organização.....	75
Figura 18	– Tamanho de partícula em função do tempo para as nanopartículas GCProp acondicionadas sob refrigeração (4 ± 2 °C).....	76
Figura 19	– Índice de polidispersão em função do tempo para as nanopartículas GCProp acondicionadas sob refrigeração (4 ± 2 °C)	76
Figura 20	– Tamanho de partícula em função do tempo para as nanopartículas GCBut acondicionadas sob refrigeração (4 ± 2 °C).....	77
Figura 21	– Índice de polidispersão em função do tempo para as nanopartículas GCBut acondicionadas sob refrigeração (4 ± 2 °C)	77
Figura 22	– Tamanho de partícula e IPD para as nanopartículas GCprop em função do tempo em tampão HEPES 10 mmol/L (pH 7,4) a 37 ° C.....	79
Figura 23	– Tamanho de partícula e IPD para as nanopartículas GCBut em função do tempo em tampão HEPES 10 mmol/L (pH 7,4) a 37 ° C.....	80
Figura 24	– Tamanho de partícula em água e após 20 min de contato com tampão HEPES para as nanopartículas modificadas com os anidridos propiônico e butírico.....	81
Figura 25	– Comparação do (a) tamanho de partícula, (b) potencial zeta e (c) IPD entre as nanopartículas com e sem AmB.....	85
Figura 26	– Micrografias para as nanopartículas (a) GCProp 9, (b) GCProp 9 + AmB, (c) GCProp 12, (d) GCProp 12 + AmB, (e) GCProp 24 e (f) GCProp 24 + AmB.....	87
Figura 27	– Micrografias para as nanopartículas (a) GCBut 9, (b) GCBut 9 + AmB, (c) GCBut 12, (d) GCBut 12 + AmB, (e) GCBut 24 e (f) GCBut 24 + AmE	88
Figura 28	– Tamanho de partícula em função do tempo para as nanopartículas GCProp + AmB acondicionadas sob refrigeração (4 ± 2 °C).....	90
Figura 29	– Índice de polidispersão em função do tempo para as nanopartículas GCProp + AmB acondicionadas sob refrigeração (4 ± 2 °C).....	91
Figura 30	– Tamanho de partícula e IPD em função do tempo para as nanopartículas	91

	GCBuT 9 + AmB acondicionadas sob refrigeração (4 ± 2 °C).....	
Figura 31	– Espectro de UV-Vis para solução comercial de AmB em água e em DMSC	93
Figura 32	– Espectros de UV-vis para as nanopartículas (a) GCProp e (b) GCBuT encapsuladas com AmB em água.....	94
Figura 33	– Perfil de liberação <i>in vitro</i> da AmB para as nanopartículas GCProp e GCBuT em tampão fosfato pH 7,4 + LSS 0,25 % (m/v).....	96
Figura 34	– Tamanho de partícula, IPD e potencial zeta para as nanopartículas formadas por nanoprecipitação e auto-organização.....	102
Figura 35	– Distribuição de tamanho para as emulsões GCProp na maior concentração de polissacarídeo (2mg/mL), antes e após o isolamento por centrifugação	104
Figura 36	– Distribuição de tamanho para as emulsões GCBuT na maior concentração de polissacarídeo (2mg/mL), antes e após o isolamento por centrifugação	104
Figura 37	– Tamanho de partícula, IPD e potencial zeta para as emulsões formadas a partir dos derivados de GCProp antes e depois do isolamento.....	106
Figura 38	– Tamanho de partícula, IPD e potencial zeta para as emulsões formadas a partir dos derivados de GCBuT antes e depois do isolamento.....	109
Figura 39	– Tamanho de partícula em função do tempo para as emulsões GCProp 9 acondicionadas sob refrigeração (4 ± 2 °C) e produzidas com diferentes concentrações do derivado hidrofóbico.....	111
Figura 40	– Índice de polidispersão em função do tempo para as emulsões GCProp 9 acondicionadas sob refrigeração (4 ± 2 °C) e produzidas com diferentes concentrações do derivado hidrofóbico.....	112
Figura 41	– Tamanho de partícula em função do tempo para as emulsões GCProp 12 acondicionadas sob refrigeração (4 ± 2 °C) e produzidas com diferentes concentrações do derivado hidrofóbico.....	112
Figura 42	– Índice de polidispersão em função do tempo para as emulsões GCProp 12 acondicionadas sob refrigeração (4 ± 2 °C) e produzidas com diferentes concentrações do derivado hidrofóbico.....	113
Figura 43	– Tamanho de partícula em função do tempo para as emulsões GCProp 24	113

	acondicionadas sob refrigeração (4 ± 2 °C) e produzidas com diferentes concentrações do derivado hidrofóbico.....	
Figura 44	– Índice de polidispersão em função do tempo para as emulsões GCProp 24 acondicionadas sob refrigeração (4 ± 2 °C) e produzidas com diferentes concentrações do derivado hidrofóbico.....	114
Figura 45	– Tamanho de partícula em função do tempo para as emulsões GCBut 9 acondicionadas sob refrigeração (4 ± 2 °C) e produzidas com diferentes concentrações do derivado hidrofóbico.....	114
Figura 46	– Índice de polidispersão em função do tempo para as emulsões GCBut 9 acondicionadas sob refrigeração (4 ± 2 °C) e produzidas com diferentes concentrações do derivado hidrofóbico.....	115
Figura 47	– Tamanho de partícula em função do tempo para as emulsões GCBut 12 acondicionadas sob refrigeração (4 ± 2 °C) e produzidas com diferentes concentrações do derivado hidrofóbico.....	115
Figura 48	– Índice de polidispersão em função do tempo para as emulsões GCBut 12 acondicionadas sob refrigeração (4 ± 2 °C) e produzidas com diferentes concentrações do derivado hidrofóbico.....	116
Figura 49	– Tamanho de partícula em função do tempo para as emulsões GCBut 24 acondicionadas sob refrigeração (4 ± 2 °C) e produzidas com diferentes concentrações do derivado hidrofóbico.....	116
Figura 50	– Índice de polidispersão em função do tempo para as emulsões GCBut 24 acondicionadas sob refrigeração (4 ± 2 °C) e produzidas com diferentes concentrações do derivado hidrofóbico.....	117
Figura 51	– Tamanho de partícula e IPD para as emulsões GCProp em função do tempo em tampão HEPES 10 mmol (pH 7,4) a 37 °C.....	118
Figura 52	– Tamanho de partícula e IPD para as emulsões GCBut em função do tempo em tampão HEPES 10 mmol/L (pH 7,4) a 37 °C.....	118
Figura 53	– Distribuição de tamanho para as emulsões GCProp em tampão HEPES 10 mmol/L (pH 7,4) a 37°C.....	119
Figura 54	– Distribuição de tamanho para as emulsões GCBut em tampão HEPES 10	120

	mmol/L (pH 7,4) a 37°C.....	
Figura 55	– Tamanho de partícula em água e após 20 min em contato com tampão HEPES para as emulsões GCProp e GCBut.....	121
Figura 56	– Estrutura sugerida para emulsão de Pickering.....	125
Figura 57	– Imagens de microscopia de força atômica tridimensionais (esquerda) e de amplitude (direita) para as emulsões GCProp 9 (a) sem AmB e (b) com AmB encapsulada.....	126
Figura 58	– Imagens de microscopia de força atômica tridimensionais (esquerda) e de amplitude (direita) para as emulsões GCBut 9 (a) sem AmB e (b) com AmB encapsulada.....	127
Figura 59	– Tamanho de partícula em função do tempo para as emulsões GCProp com AmB encapsulada acondicionadas sob refrigeração (4 ± 2 °C).....	128
Figura 60	– Índice de polidispersão em função do tempo para as emulsões GCProp encapsuladas com AmB acondicionadas sob refrigeração (4 ± 2 °C).....	129
Figura 61	– Espectro de UV-vis para as emulsões GCProp e GCBut com AmB encapsulada.....	130
Figura 62	– Extensão de hemólise para as emulsões GCProp 9 e GCBut 9 sem AmB	132
Figura 63	– Extensão de hemólise para as emulsões (a) GCProp 9 e (b) GCBut 9 com AmB encapsulada.....	133
Figura 64	– Tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta para as nanopartículas via auto-organização e emulsões antes e após o encapsulamento da AmB.....	135

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Aplicações da goma do cajueiro.....	37
Tabela 2 – Nanotecnologia aplicada à formulação de carreadores da AmB.....	45
Tabela 3 – Dados experimentais para a reação de acilação da goma do cajueiro.....	50
Tabela 4 – Porcentagem de grupos acila, GS e rendimento para os derivados acilados	59
Tabela 5 – Teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio para a goma do cajueiro e os derivados acilados.....	66
Tabela 6 – Tamanho de partícula, IPD e potencial zeta para as nanopartículas formadas via auto-organização.....	71
Tabela 7 – Eficiência de encapsulamento, tamanho de partícula, IPD e potencial zeta para as nanopartículas com AmB encapsulada.....	83
Tabela 8 – Tamanhos de partícula obtidos por MEV e espalhamento dinâmico de luz	89
Tabela 9 – Razão A_I/A_{IV} para as nanopartículas com AmB encapsulada.....	95
Tabela 10 – Modelos cinéticos para as nanopartículas GCProp e GCBut.....	98
Tabela 11 – Tamanho de partícula, IPD e potencial zeta para as nanopartículas formadas por nanoprecipitação.....	100
Tabela 12 – Eficiência de encapsulamento para as emulsões GCProp e GCBut.....	122
Tabela 13 – Tamanho de partícula, IPD e potencial zeta para as emulsões encapsuladas com AmB antes e após o isolamento em centrífuga.....	123
Tabela 14 – Razão A_I/A_{IV} para as emulsões encapsuladas com AmB.....	131

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AmB	Anfotericina B
ANVISA	Agência de Vigilância Sanitária
CITEC	Comissão de Incorporação de Tecnologias do Ministério da Saúde
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNT	Doenças Tropicais Negligenciadas
EE	Eficiência de Encapsulamento
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GC	Goma do Cajueiro
IPD	Índice de Polidispersão
LCC	Líquido da Casca da Castanha-de-cajú
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MFA	Microscopia de Força Atômica
NP's	Nanopartículas
NSL	Nanopartículas Sólidas Lipídicas
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCS	<i>Photon Correlation Spectroscopy</i>
PZ	Potencial Zeta
QELS	<i>Quasi-elastic light scattering</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
1.1	Sistemas de Liberação de Fármacos	22
1.2	Formação de Nanopartículas por Auto-Organização e Nanoprecipitação ..	23
1.3	Emulsões de Pickering	25
<i>1.3.1</i>	<i>Estabilidade das emulsões de Pickering</i>	27
<i>1.3.2</i>	<i>Aplicações das emulsões de Pickering</i>	27
1.4	Caracterização de Nanopartículas	29
<i>1.4.1</i>	<i>Tamanho de partícula</i>	29
<i>1.4.2</i>	<i>Potencial zeta</i>	31
<i>1.4.3</i>	<i>Morfologia</i>	32
1.5	Goma do Cajueiro	33
<i>1.5.1</i>	<i>Modificações química na Goma do Cajueiro</i>	38
1.6	Leishmaniose	40
<i>1.6.1</i>	<i>Anfotericina B</i>	41
<i>1.6.2</i>	<i>Outros Fármacos para o Tratamento da Leishmaniose</i>	46
2	OBJETIVOS	48
2.1	Objetivo Geral	48
2.2	Objetivos Específicos	48
3	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	49
3.1	Materiais	49
3.2	Isolamento da Goma do Cajueiro	49
3.3	Reação de Acilação	49
3.4	Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho	50
3.5	Ressonância Magnética Nuclear	50
3.6	Determinação do Grau de Substituição	50
<i>3.6.1</i>	<i>Rendimento</i>	51
3.7	Análise Elementar	51
3.8	Análise Termogravimétrica	52
3.9	Ensaio de Toxicidade	52
3.10	Preparação e Caracterização das Nanopartículas via Auto-organização	52
<i>3.10.1</i>	<i>Tamanho de Partícula e Potencial Zeta</i>	53

3.10.2	<i>Incorporação da Anfotericina B</i>	53
3.10.3	<i>Eficiência de Encapsulamento</i>	53
3.10.4	<i>Estudo da Agregação da Anfotericina B</i>	54
3.10.5	<i>Ensaio de Estabilidade</i>	54
3.10.6	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i>	54
3.10.7	<i>Ensaio de Liberação in Vitro</i>	55
3.11	Preparação das Emulsões de Pickering	55
3.11.1	<i>Tamanho de Partícula e Potencial Zeta</i>	56
3.11.2	<i>Incorporação da Anfotericina B</i>	56
3.11.3	<i>Eficiência de Encapsulamento</i>	56
3.11.4	<i>Estudo da Agregação da Anfotericina B</i>	57
3.11.5	<i>Ensaio de Estabilidade</i>	57
3.11.6	<i>Microscopia de Força Atômica</i>	57
3.11.7	<i>Ensaio de Hemólise</i>	57
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.1	Determinação do Grau de Substituição	59
4.2	Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho	61
4.3	Ressonância Magnética Nuclear	63
4.4	Análise Elementar	65
4.5	Análise Termogravimétrica	67
4.6	Ensaio de Toxicidade	69
4.7	Nanopartículas via Auto-Organização	70
4.7.1	<i>Tamanho de Partícula e Potencial Zeta</i>	70
4.7.2	<i>Estabilidade Estoque</i>	75
4.7.3	<i>Estabilidade em Tampão HEPES</i>	78
4.7.4	<i>Incorporação da Anfotericina B</i>	81
4.7.5	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	86
4.7.6	<i>Estabilidade Estoque Nanopartículas com Anfotericina B</i>	90
4.7.7	<i>Estudo da Agregação da Anfotericina B</i>	92
4.7.8	<i>Ensaio de Liberação in Vitro</i>	96
4.8	Preparação das Emulsões de Pickering	99
4.8.1	<i>Nanopartículas via Nanoprecipitação</i>	99
4.8.2	<i>Tamanho de Partícula e Potencial Zeta das Emulsões de Pickering</i>	103

4.8.3	<i>Estabilidade Estoque</i>	111
4.8.4	<i>Estabilidade de Tampão HEPES</i>	118
4.8.5	<i>Incorporação da Anfotericina B</i>	121
4.8.6	<i>Microscopia de Força Atômica</i>	125
4.8.7	<i>Estabilidade Estoque Emulsões com Anfotericina B</i>	128
4.8.8	<i>Estudo da Agregação da Anfotericina B</i>	130
4.8.9	<i>Ensaio de Hemólise</i>	132
4.8.10	<i>Análise Comparativa entre Nanopartículas e Emulsões</i>	134
5	CONCLUSÕES	137
	REFERÊNCIAS	139

1 INTRODUÇÃO

1.1 Sistemas de Liberação de Fármacos

Com o rápido desenvolvimento dos compostos farmacêuticos, novos sistemas de liberação de fármacos que possam contornar os desafios associados à baixa disponibilidade e solubilidade em água, pequena janela terapêutica, toxicidade e facilidade de degradação em meios fisiológicos estão sendo desenvolvidos (HUNTER; MOGHIMI, 2017).

Novos sistemas de liberação de fármacos na forma de nanocarreadores como lipossomas (AKBARZADEH *et al.*, 2013), nanopartículas poliméricas e lipídicas (KHOSA; REDDI; SAHA, 2018), hidrogéis (KIM *et al.*, 2019) e nanocristais (HUANG *et al.*, 2018) vêm sendo testados de modo a contornar as limitações descritas no parágrafo anterior.

Lipossomas são vesículas esféricas constituídas de uma ou mais camadas fosfolipídica e fabricadas a partir do colesterol ou outro fosfolípido natural, envoltas em um núcleo aquoso (AKBARZADEH *et al.*, 2013). Atualmente, um grande número de formulações lipídicas receberam aprovação para encapsulamento e comercialização de vários fármacos, como a doxorrubicina para o tratamento de câncer (Doxil®, Myocet® e Lipodox®), anfotericina B para combate das infecções fúngicas severas (Ambisome®), citarabina para meningite linfomatosa (Depocyt®) e sulfato de morfina para o tratamento da dor (DepoDur®), entre outros (CHANG, 2012). Entretanto, as aplicações dos lipossomas são limitadas devido à sua baixa estabilidade, curto prazo de validade, baixa eficiência de encapsulamento, especialmente para fármacos hidrofílicos, e rápida absorção seguida de sua eliminação pelo sistema mononuclear fagocitário (NASERI; VALIZADEH; MILANI, 2015).

Nanopartículas lipídicas sólidas (NSL) são sistemas compostos de lipídeos sólidos em uma dispersão aquosa, estabilizados com a ajuda de agentes emulsificantes. NSL podem efetivamente carrear uma série de moléculas, incluindo fármacos hidrofílicos e lipofílicos, oligonucleotídeos, genes, peptídeos e vacinas. Possuem como vantagens a biocompatibilidade, produção rápida e eficaz e, em muitos casos, a não utilização de solventes orgânicos. Porém, suas limitações incluem a baixa capacidade de carga de fármaco devido à natureza cristalina dos lipídeos, liberação da droga encapsulada devido à formação de rede cristalina do lipídeo e geleificação da fase dispersa durante o processo de estocagem (WEBER; ZIMMER; PARDEIKE, 2014).

Nanopartículas (NP's), na área farmacêutica, são descritas como sólidos coloidais cujo diâmetro varia entre 1 e 1000 nm, consistindo em macromoléculas com capacidade de

incorporar fármacos, seja por adsorção ou por ligações químicas (RAO; GECKELER, 2011). Uma das vantagens da utilização de nanopartículas como carreador de fármaco é que elas podem ser projetadas e modificadas para melhorar sua liberação no sítio de interesse, o que contribui para melhoria dos efeitos colaterais e segurança da terapia (BYRNE; BETANCOURT; BRANNON-PEPPAS, 2008). Outra vantagem é a capacidade do aumento da solubilidade e, por consequência, da biodisponibilidade do fármaco encapsulado (SALVATI *et al.*, 2013).

Nanopartículas poliméricas têm atraído bastante atenção nas áreas química, farmacêutica e biomédica, por meio da utilização de polímeros de diferentes características químicas, tais como: cadeias com diferentes hidrofobicidades, diferentes cargas superficiais e propriedades físico-químicas (NAJAFI; BAGHAIE; ASHORI, 2016; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

Como resultado desta versatilidade, nanopartículas poliméricas podem ser formuladas para liberação de uma gama de diferentes fármacos. Além disso, a capacidade de controlar a degradação ou a quebra da cadeia polimérica confere a possibilidade de controle da liberação do fármaco de maneira mais lenta e gradual do que por outros tipos de nanopartículas. Esta diversidade de potenciais aplicações rendeu às nanopartículas poliméricas atrativo como sistemas de liberação terapêutica (CHENG *et al.*, 2015).

1.2 Formação de Nanopartículas por Auto-organização e Nanoprecipitação

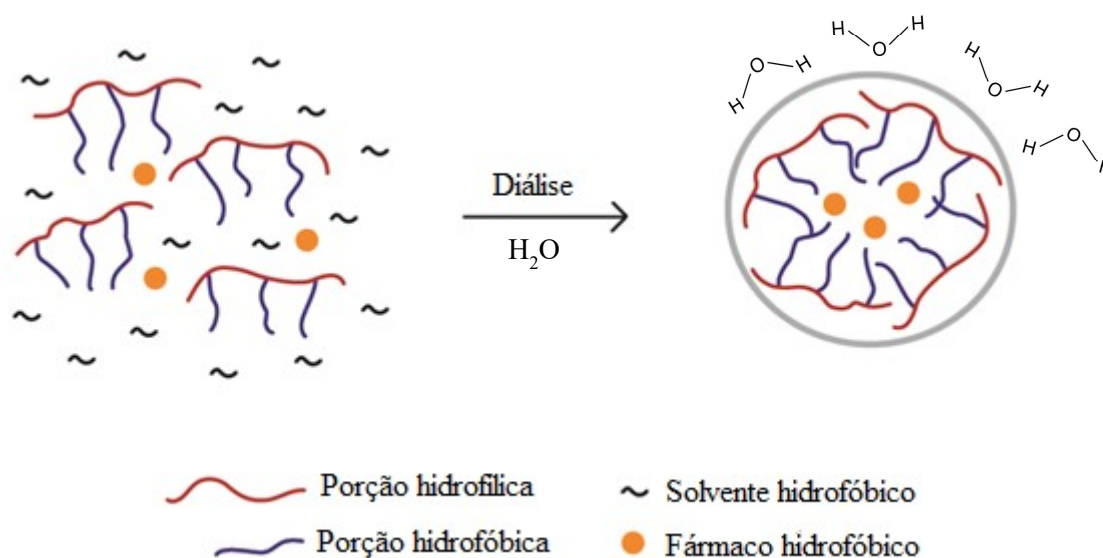
Diferentes métodos podem ser utilizados para a formação de sistemas de nanopartículas poliméricas à base de polissacarídeos. A seleção do método depende de vários fatores como o tamanho de partícula, a estabilidade térmica e química dos princípios ativos, a reprodutibilidade dos perfis cinéticos, a estabilidade do produto final e não toxicidade dos resíduos do produto final (AGNIHOTRI; MALLIKARJUNA; AMINABHAVI, 2004).

Para este trabalho, foram utilizados dois métodos distintos de formação de nanopartículas (NP's): a formação via auto-organização, por meio de diálise e a nanoprecipitação, como primeira etapa para a formação das emulsões de Pickering.

O primeiro processo utilizado para a formação de nanopartículas é via auto-organização (FIGURA 1), conhecido como uma das estratégias mais promissoras para se produzir micelas usando polímeros anfífilicos, sendo uma rota atrativa para a síntese de materiais com nanoestrutura controlada (SONG *et al.*, 2011). O processo de formação ocorre em meio aquoso e não requer nenhuma condição drástica. O polímero é dissolvido em

solvente orgânico e transferido para um tubo de diálise com massa molar de corte adequado. A troca é realizada contra um solvente não miscível, geralmente água destilada. A difusão do solvente dentro da membrana é seguida pela organização progressiva do polímero, formando suspensões homogêneas de nanopartículas (NAGAVARMA *et al.*, 2012). É uma transição espontânea da “desordem para a ordem” de moléculas através de interações não covalentes, como as forças de van der Waals. A técnica de auto-organização tem sido utilizada com êxito na produção de sistemas de liberação de fármacos capazes de liberar compostos bioativos em concentrações terapêuticas efetivas (SIEPMANN; PEPPAS, 2012).

Figura 1 - Nanopartículas via auto-organização.



Fonte: Quiñones, Peniche e Peniche (2018, com adaptações).

Durante décadas, nanopartículas poliméricas formadas por blocos de copolímeros anfífilos têm sido extensamente investigadas como sistema para liberação de fármacos, particularmente para liberação de drogas hidrofóbicas em alvos específicos (WANG *et al.*, 2011). Análogo aos surfactantes de baixa massa molar, copolímeros anfífilos são materiais compostos por uma cadeia com grupos hidrofóbicos e hidrofílicos, e podem formar micelas espontaneamente ou outros agregados auto organizados em meio aquoso, servindo como micro reservatório para várias substâncias (LETCHFORD; BURT, 2007).

Nanopartículas via auto-organização são propostas como carreadores de fármacos anticancerígenos como o fluoracil (GU *et al.*, 2014 e YUAN *et al.*, 2015), epirrubicina (YU *et al.*, 2014) e paclitaxel (MERLIN *et al.*, 2013), antimaláricos (PITOMBEIRA *et al.*, 2015), leishmanicida (TIYABOONCHAI; LIMPEANCHOB, 2007) e anti-inflamatórios (DIAS *et*

al., 2016; NAJAFI; BAGHAIE; ASHORI, 2016).

O segundo processo de formação de nanopartículas poliméricas é a nanoprecipitação, também conhecido como método de deslocamento de solvente. Este fornece uma série de vantagens em relação aos outros métodos. É um procedimento rápido e de fácil reprodução, no qual as nanopartículas são formadas instantaneamente e ocorre em um único passo. O método consiste na rápida solvatação do polímero, devido a difusão do solvente na fase aquosa, resultando na precipitação do polímero juntamente com o fármaco aprisionado na matriz polimérica, formando assim as nanopartículas (SINGH *et al.*, 2016).

A nanoprecipitação é muito utilizada para encapsular fármacos hidrofóbicos em nanopartículas poliméricas. Nanopartículas sintetizadas a partir do processo de nanoprecipitação foram descritas para o encapsulamento de fármacos como o diclofenaco (DIAS *et al.*, 2016), ciprofloxacino (NAJAFI; BAGHAIE; ASHORI, 2016), 5-fluorouracil (YUAN *et al.*, 2015), citral (LUQUE-ALCARAZ *et al.*, 2016) e anfotericina B (KANEO *et al.*, 2014; SINGH *et al.*, 2016; MARCANO *et al.*, 2018; VAN DE VEN *et al.*, 2012).

1.3 Emulsões de Pickering

A emulsão clássica é um sistema que consiste em dois líquidos imiscíveis, nos quais gotículas de um líquido estão disperso em outro. Este sistema é tipicamente formado por gotículas na escala nano ou micro em todo o sistema. Por isso oferecem a possibilidade de aplicação nas áreas farmacêutica, cosmética e de alimento (FUJISAWA; TOGAWA; KORUDA, 2017).

As emulsões podem ser classificadas em três TIPOS; água-em-óleo, óleo-em-água e múltipla. As emulsões água-em-óleo são formadas quando as gotas de água estão dispersas ao longo da fase contínua de óleo, já para as emulsões óleo-em-água, o óleo está disperso ao longo da fase contínua da água. As emulsões múltiplas são sistemas complexos nos quais as emulsões água-em-óleo ou óleo-em-água estão dispersas em outra fase imiscível (KHAN *et al.*, 2011).

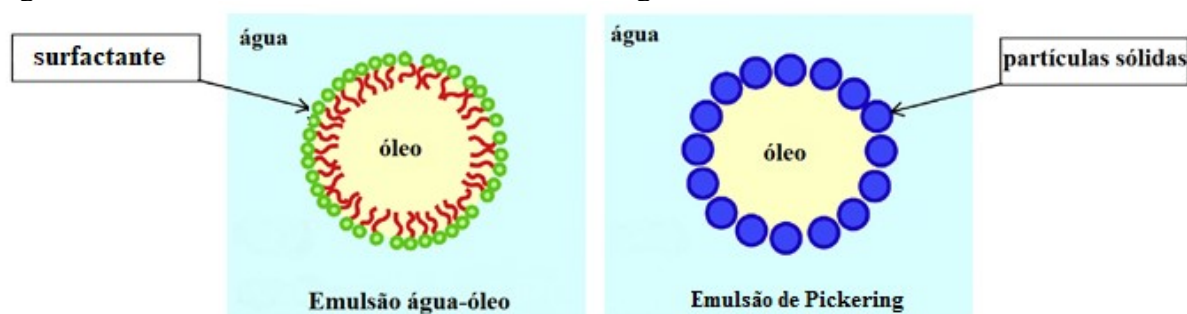
Nano e microemulsões clássicas apresentam pouca estabilidade na maioria dos meios, devido à sua grande área interfacial, de modo que há a necessidade da adição de surfactantes ou polímeros anfífilicos para estabilizar cineticamente o sistema. A seleção adequada do surfactante leva a uma redução eficiente da energia interfacial e criação de impedimento estérico ou repulsões eletrostáticas entre as gotas dispersas durante a produção da emulsão (DESTRIBATS *et al.*, 2014; SILVERSTEIN, 2014). Entretanto, a utilização de

surfactantes sintéticos têm sido cada vez mais limitada devido ao aumento dos requisitos legais e do consumidor (LAM; VEILOKOV; VELEV, 2014). Além disso, a maioria dos surfactantes promove reações adversas como irritação na pele e pode causar sintomas tóxicos em humanos e animais. Por exemplo, a possibilidade da ligação de surfactantes aniônicos com proteínas, enzimas e membranas fosfolipídicas resulta em mudanças bioquímicas como a modificação da estrutura das proteínas e a inativação de enzimas e membranas fosfolipídicas (CSERHATI; FORGACS; OROS, 2002).

Biopolímeros, como proteínas e polissacarídeos, são bons exemplos de emulsificantes/estabilizantes naturais encontrados frequentemente na indústria alimentícia, podendo também ser utilizados para estabilizar emulsões farmacêuticas. Na área farmacêutica, esses polímeros naturais já têm sido utilizados em outras aplicações como na formação de cápsulas (gelatina), tabletes (quitosana e goma arábica), agente de suspensão (goma arábica), formulações mucoadesivas (quitosana) e matriz para liberação prolongada de fármaco (quitosana e celulose) (ROWE; SHESKEY; OWEN, 2006).

Estudos de partículas sólidas estabilizando gotas de óleo foram reportados no início do século XX. Ramsden, em 1903, e Pickering, em 1907, observaram, independentemente, que partículas coloidais sólidas, como argilas e precipitados de sulfato de cobre e cal poderiam estabilizar a interface entre duas fases imiscíveis. Apesar do fato de Pickering ter reconhecido o trabalho de Ramsden em seu próprio artigo publicado quatro anos após o trabalho de Ramsden, esse tipo de emulsão foi nomeado de emulsão de Pickering (FIGURA 2) (BINKS, 2007). As emulsões livres de surfactantes tornam-se mais adequadas para várias aplicações, em particular para formulações alimentícias, farmacêuticas e cosméticas (SCHRADE; LANDFESTER; ZIENER, 2013).

Figura 2 - Emulsão clássica e emulsão de Pickering.



Fonte: Chevalier e Bolzinger (2013, com adaptações).

1.3.1 Estabilidade das Emulsões de Pickering

Um parâmetro muito importante para as emulsões é sua estabilidade, entretanto esta avaliação não é fácil (MYUNG, 2000). A estabilidade de uma emulsão farmacêutica pode ser caracterizada pela ausência de coalescência da fase dispersa e constância de seus aspectos físicos, como cor, odor e aparência (KHAN *et al.*, 2011).

A desestabilização das emulsões está associada a flocculação e coalescência. A flocculação pode ser descrita como a associação de pequenas partículas de emulsão formando um agregado com tamanho de partícula maior e que pode ser re-disperso após agitação. Este processo é reversível e as gotas de emulsão permanecem intactas. A flocculação pode ser considerada o fenômeno precursor da coalescência. O segundo fenômeno, coalescência, ocorre quando as barreiras mecânicas ou eletrostáticas são insuficientes para prevenir a formação progressiva de partículas maiores (GILBERT; CHRISTOPHER, 2002).

Em uma emulsão de Pickering, as gotas das emulsões são estáveis à coalescência porque a energia cinética da colisão entre as gotas é insuficiente para remover as partículas adsorvidas na interface óleo-água (ABEND *et al.*, 1998; BINKS, 2007).

Todos os tipos de interação entre as partículas adsorvidas influenciam na estabilidade das emulsões de Pickering. As interações de dispersão e eletrostática, mesmo as interações que não são especificamente interfaciais, na presença da interface óleo-água, têm influência nas interações globais. Por exemplo, interações eletrostáticas entre partículas carregadas operam uma descontinuidade dielétrica entre o óleo e a água, o que leva a um comportamento único para cada tipo de emulsão, diferente do comportamento de um meio dielétrico homogêneo (WANG; SINGH; BEHRENS, 2012). Partículas sólidas também podem controlar a coagulação. Como exemplo, partículas carregadas adsorvidas geram repulsões eletrostáticas entre as gotas de óleo de uma emulsão óleo-água, da mesma maneira que os emulsificantes fazem.

1.3.2. Aplicações das Emulsões de Pickering

As emulsões de Pickering não atraíram muita atenção até uma década atrás. Com o rápido desenvolvimento da ciência dos materiais, os pesquisadores reconheceram que as emulsões de Pickering possuem características únicas, quando comparadas às emulsões clássicas, estabilizadas por surfactantes. As emulsões de Pickering permitem a funcionalização da camada sólida que possibilita seu uso em várias de aplicações.

Na indústria de alimentos, a introdução de polímeros naturais, como proteínas e polissacarídeos como agentes emulsificantes e/ou estabilizantes, têm tido sucesso na formulação de emulsões altamente estáveis (CHEVALIER; BOLZINGER, 2013). A grande maioria dos trabalhos publicados na área alimentícia reporta a utilização de amido para formação das emulsões de Pickering (GE *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2019; SAARI; RAYNER; WAHLGREN, 2019; SONG *et al.*, 2015; YE *et al.*, 2017). Também são encontradas emulsões para encapsulamento de óleo essencial (WANG *et al.*, 2018; WEN *et al.*, 2014), curcumina (ARAIZA-CALAHORRA; AKHTAR; SARKAR, 2018; MAREFATI *et al.*, 2017; SHAH *et al.*, 2016), *whey protein* (ESTRADA-FERNÁNDEZ *et al.*, 2018) e óleos comestíveis (ATARIAN *et al.*, 2019).

Entretanto, trabalhos reportando as aplicações diretas das emulsões de Pickering na área farmacêutica ainda são muito limitados. Isto se deve ao fato de que a maioria das partículas estudadas não são biodegradáveis e biocompatíveis. Embora alguns materiais naturais como proteínas e polissacarídeos tenham sido utilizados na preparação de tais emulsões, as partículas formadas são geralmente polidispersas, instáveis ou muito hidrofílicas para estabilizar as emulsões (NAN *et al.*, 2014).

Emulsões de Pickering compostas de triglicerídeos de cadeia média e nanopartículas hidrofílicas de sílica foram reportadas no trabalho de Simovic *et al.* (2001). A estabilidade, as características estruturais e de liberação tópica do retinol (vitamina A1) foram estudadas e os autores descobriram que as emulsões de Pickering poderiam fornecer a vitamina de maneira mais eficiente, com taxas de permeação três vezes mais elevadas do que as emulsões clássicas estabilizadas por surfactantes. A principal razão para este efeito é uma maior força adesiva entre a pele e as emulsões de Pickering (SIMOVIC *et al.*, 2011).

Cossu *et al.* (2015) produziram emulsões de Pickering à base de amido modificado e óleo de oliva em filmes de alginato para a liberação oral de timol e anfotericina B. As emulsões foram estáveis em temperatura ambiente por três semanas. Após a adição de amilose ao sistema, as emulsões apresentaram aumento da liberação das drogas e da atividade antifúngica, indicando potencial para aplicação na cavidade oral (COSSU *et al.*, 2015).

Em estudo recente, nanocompósitos de PLGA, poli (ácido lático-co-ácido glicólico), e quitosana foram produzidos via emulsão de Pickering. Os ensaios de liberação utilizando o ibuprofeno como fármaco modelo foram realizados em duas condições de pH (WANG *et al.*, 2017).

Apesar do crescente interesse da aplicação de emulsão de Pickering como sistema de liberação de fármacos, os trabalhos reportam em grande maioria a sua utilização em

aplicações tópicas e para liberação de fármacos via administração oral (Wu e Ma, 2016). A utilização de emulsão de Pickering para sistema de liberação de fármaco intravenoso ainda é pouco investigada.

1.4 Caracterização de Nanopartículas

A caracterização de nanopartículas, bem como de qualquer outro carreador, é um requisito crítico para assegurar a qualidade, estabilidade e a cinética de liberação do fármaco estudado. Os métodos de caracterização incluem medidas de tamanho de partícula e sua distribuição, propriedades estruturais, carga superficial e morfologia das partículas.

O tamanho de partícula e a carga superficial são os dois fatores mais mencionados como responsáveis por uma série de efeitos biológicos nas nanopartículas, incluindo a captação celular, toxicidade e dissolução. É de suma importância investigar estes dois fatores durante o desenvolvimento de nanopartículas para liberação controlada de fármacos, especialmente pela possibilidade de alteração do tamanho de partícula e potencial zeta nos meios fisiológicos, como por exemplo a adsorção de proteínas pelo efeito chamado proteína corona (BHATTACHARJEE, 2016).

1.4.1. Tamanho de Partícula

O diâmetro de partículas formadas por biopolímeros pode ser controlado a partir das condições utilizadas para sua produção. Dependendo do modo como essas nanopartículas são produzidas, seu tamanho pode variar de alguns nanômetros até vários micrômetros (MCCLEMENTS, 2005).

O tamanho de partícula pode ser considerado a propriedade física mais importante de amostras particuladas e é um parâmetro crítico na produção de inúmeros produtos, além de influenciar diretamente nas propriedades do material. Reatividade, estabilidade em suspensão, eficiência de liberação, textura e sabor, aparência, viscosidade, porosidade e densidade são algumas dessas propriedades (MALVERN, 2014).

Espalhamento dinâmico de Luz (DLS, do inglês, *Dynamic Light Scattering*), também conhecido como espectroscopia de correlação de fótons (PCS, do inglês, *Photon Correlation Spectroscopy*) ou espalhamento quase elástico de luz (QELS, do inglês, *quasi-elastic light scattering*), é uma técnica não evasiva que requer mínima preparação de amostra e não há necessidade de calibração do experimento. É bem estabelecida para a determinação

do tamanho de partículas e moléculas em solução e é capaz de medir diâmetros variando de alguns nanômetros até cerca de 5 micrômetros em poucos minutos (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

Quando um feixe de luz incide em uma solução contendo macromoléculas, a luz se espalha em todas as direções como função do tamanho e da forma. No espalhamento de luz estático, a luz dispersa é analisada em função do tempo e da intensidade, o que fornece informações úteis sobre a massa molar e o raio de giro de macromoléculas. Por outro lado, se é medido a intensidade de flutuação da luz espalhada, causada pelo movimento Browniano das moléculas em solução, pode ser obtido o coeficiente de difusão (D_T) que está relacionado ao volume hidrodinâmico das macromoléculas (STETEFELD; MCKENNA; PATEL, 2016). Para uma partícula esférica, a relação de Stokes-Einstein (Equação 1) é utilizada para calcular o diâmetro hidrodinâmico da partícula;

$$d_h = \frac{kT}{3\pi\eta D_T} \quad (1)$$

onde d_h é o diâmetro hidrodinâmico, D_T é o coeficiente de difusão translacional, k é a constante de Boltzmann, T é a temperatura e η é a viscosidade.

O diâmetro medido a partir do DLS é um valor que se refere a como a partícula se difunde em um fluido, por isso é utilizada a nomenclatura de diâmetro hidrodinâmico. O coeficiente de difusão não dependerá apenas do tamanho da partícula, mas também de qualquer estrutura de superfície, bem como concentração e os tipos de íons presentes no meio (MALVERN, 2013).

O tamanho de partícula e sua distribuição de tamanho dentro do conceito de sistema de liberação de fármaco são características importantes e influenciam na estabilidade, solubilidade, razão de liberação do fármaco e seu comportamento dentro do sistema biológico. O tamanho usual das NP's pode variar entre 10 a 1000 nm, entretanto, para liberação de fármacos em sítios específicos, são preferíveis tamanhos na faixa entre 50 – 300 nm, especialmente para agentes quimioterápicos e do sistema nervoso central. NP's com estes tamanhos possuem a capacidade de cruzar barreiras biológicas mais facilmente e de aumentar a absorção celular, além de terem rápida ação. Os tamanhos acima de 300 nm são indicados para sistemas intestinais, por proporcionarem uma liberação mais controlada do fármaco (KHOSA *et al.*, 2018). Para sistemas injetados por via intravenosa, são indicados tamanhos inferiores a 200 nm, sem que haja embolização (HICKEY *et al.*, 2015).

Além disso, o tamanho de partícula pode ser considerado um indicador da estabilidade, onde o ideal é que seja mantida uma estreita distribuição quando estocadas. Aumento do tamanho de partícula no período de estocagem pode indicar aglomeração, o que reflete em instabilidade física das nanopartículas (KHOSA *et al.*, 2018).

O índice de polidispersão (IPD) é a medida utilizada para descrever o grau de uniformidade de uma dada amostra em relação ao tamanho de partícula (MALVERN, 2011). É um índice adimensional e seu valor numérico varia de zero, para uma amostra de tamanho perfeitamente uniforme, a 1,0, para uma amostra altamente polidispersa, com múltiplos tamanhos de partícula (DANAIE *et al.*, 2018).

1.4.2. Potencial Zeta

O potencial zeta (PZ), também denominado de potencial eletrocinético, é o potencial no plano de deslizamento/cisalhamento de uma partícula coloidal movimentando-se sob um potencial elétrico. O potencial elétrico de uma superfície é definido como a quantidade de trabalho que precisa ser realizada para trazer uma carga positiva unitária do infinito para a superfície sem qualquer aceleração (BHATTACHARJEE, 2016).

A medida do potencial zeta é feita indiretamente, utilizando-se a mobilidade eletroforética das partículas. Uma suspensão coloidal diluída é colocada em uma cubeta contendo dois eletrodos e é aplicado um potencial elétrico à suspensão. As espécies carregadas eletricamente irão se mover em direção ao eletrodo de carga contrária, tão mais rapidamente quanto maiores forem sua carga elétrica e o campo elétrico aplicado (MALVERN, 2013).

O PZ fornece informações importantes sobre a estabilidade ao longo do tempo e sua tendência à agregação. Em geral, valores de potencial zeta de ± 60 mV indicam uma excelente estabilidade, entretanto, para uma boa estabilidade de nanodispersões estabilizadas eletrostaticamente, um valor mínimo de ± 30 mV é suficiente. Para sistemas em que a estabilidade é resultante de efeitos eletrostáticos e estérico, é desejado um valor mínimo de ± 20 mV. Altos valores de potencial, sejam negativos ou positivos, resultam na repulsão entre as partículas, diminuindo a tendência para agregação. O potencial zeta pode ser medido utilizando-se instrumentos baseados no princípio da mobilidade eletroforética. Em equipamentos comerciais, geralmente é acoplado com um DLS havendo a possibilidade de medir a carga da partícula e seu tamanho com o mesmo equipamento (TAMJIDI; SHAHEDI; VARSHOSAZ, 2013).

1.4.3. Morfologia

A morfologia se refere as características externas, como a forma e a estrutura da superfície de nanopartículas, e tem influência significativa na eficiência de encapsulamento de fármacos, no perfil de liberação, características farmacocinéticas, biodistribuição e sítio alvo de liberação (MOGHIMI; HUNTER, 2012; TRUONG; WHITTAKER; MAK, 2015).

As técnicas de microscopia eletrônica de transmissão (MET), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de força atômica (MFA) são extremamente úteis para determinar o tamanho de partícula, estado de agregação, morfologia e estrutura superficial de nanopartículas.

O MEV fornece informações sobre as características de superfície e morfologia tridimensional da partícula. Normalmente, as amostras são liofilizadas e convertidas em pó e as partículas secas são recobertas com um condutor, como o ouro, antes da análise em alto vácuo. Outra possibilidade para preparo de amostras em solução é o gotejamento das nanopartículas sob o porta amostra com subsequente secagem em estufa, a temperaturas brandas, ou em temperatura ambiente, e posterior recobrimento metálico para análise.

Diferentemente do MEV, o MET fornece uma imagem bidimensional da estrutura interna das nanopartículas com um poder de resolução em torno de 0,4 nm. A fração dos elétrons transmitidos depende da densidade dos elétrons da amostra, de modo que componentes com densidades eletrônicas diferentes aparecem na imagem com diferentes intensidades. O preparo de amostra do MET é um pouco mais complexo quando comparado ao MEV, pois as amostras precisam ter uma espessura ideal, que é em torno de algumas centenas de nanômetros. Para a análise, a amostra é corada com metal pesado para aumentar o contraste, seca e fixada no porta amostra (CORTESI; VALACCHI; MURESAN, 2017).

Atualmente, com a utilização de *softwares* é possível obter informações sobre tamanho médio de partícula através de imagens de MET. Entretanto, tais informações muitas vezes não corroboram com os dados obtidos por DLS (ZHAO *et al.*, 2015). O motivo é o fato de as duas técnicas utilizarem fundamentos diferentes. Enquanto as amostras para análise no DLS estão solvatadas, o MET trabalha com amostras secas em alto vácuo. De modo que o DLS mede o volume hidrodinâmico de partículas dispersas enquanto o MET fornece a área de superfície projetada com base na quantidade de elétrons incidentes que foram transmitidos através da amostra. Assim, o tamanho obtido pelo DLS é geralmente maior que o do MET (BHATTACHARJEE, 2016).

A maior limitação para estas duas técnicas é o preparo da amostra e a exposição

ao vácuo, que pode resultar em mudanças estruturais da partícula e a presença de artefatos podem dificultar a interpretação das imagens. A criofixação utilizada na técnica de criotransmissão pode ajudar a contornar estes problemas, a partir da preservação da estrutura dos nanocarreadores, onde a amostra é analisada em um estado congelado hidratado (BARBOSA; NEVES; SILVA, 2016; CORTESI; VALACCHI; MURESAN, 2017).

A microscopia de força atômica (MFA) tem sido bastante utilizada para caracterização principalmente de nanoestruturas como nanocápsulas e emulsões de Pickering (EL-GOGARY *et al.*, 2014; GESTRANIUS *et al.*, 2017; SOSA *et al.*, 2017; ZOPPE; VENDITTI; ROJAS 2012), especialmente devido à possibilidade de se trabalhar com amostras biológicas contendo água.

O preparo das amostras é bastante simples, não há a necessidade da utilização de vácuo para análise e as amostras podem ser medidas em sua forma hidratada, o que previne qualquer distorção em sua morfologia ou a formação de artefatos (BELOQUI; SOLINIS, 2016). As amostras são escaneadas por uma sonda, resultando em imagens com alta resolução da superfície da amostra. De maneira geral, a resolução vertical e lateral de uma imagem obtida por MFA pode variar de 30 a 0,1 nm, respectivamente (BHATTACHARJEE, 2016).

1.5 Goma do Cajueiro

Polissacarídeos são produtos naturais formados a partir do processo de captura de átomos de carbono, a fotossíntese, seguido por modificações biossintéticas. São definidos como estruturas poliméricas de carboidratos compostos por repetições de unidades monossacarídicas ligadas por ligações glicosídicas. Como biopolímeros naturais, polissacarídeos são atóxicos, biodegradáveis e biocompatíveis, além de serem extraídos de fontes renováveis e possuírem baixo custo de processamento (LIU *et al.*, 2008; RAEMDONCK *et al.*, 2013).

Os polissacarídeos diferem entre si devido a sua estrutura, mais precisamente na configuração química, tipo de monossacarídeos presentes (unidades monoméricas) e em como estes estão unidos (PRAJAPATI *et al.*, 2013).

A goma do cajueiro (GC), polímero de partida utilizado para a produção das nanopartículas e das emulsões de Pickering deste trabalho, é extraída a partir do exsudato da árvore do *Anacardium occidentale* L. Ela é popularmente chamada de cajueiro e pertencente à família *Anacardiaceae*, havendo mais de 12 espécies relacionadas ao gênero *Anacardium*. O nome popular caju é derivado da palavra “yu”, que significa amarelo, a cor predominante de

seus frutos. A palavra que designa o gênero *Anacardium* significa coração invertido, em alusão à forma do pedúnculo (MEDINA *et al.*, 1978). É uma árvore rústica que pode crescer até mais do que doze metros, sendo encontrada facilmente em países tropicais como o Brasil, majoritariamente na região nordeste, nos estados como Piauí, Ceará e Rio Grande do Norte (RIBEIRO *et al.*, 2003).

Presente em uma ampla área do litoral brasileiro na época do descobrimento, a espécie foi observada com interesse pelos colonizadores devido ao seu notável valor e com isso foi disseminada por quase todo o país. Também foi levada para o exterior pelos portugueses, inicialmente até a Índia no século XVI e atualmente se constitui uma exploração de grande valor econômico para muitas nações (LIMA, 1998).

Do cajueiro, aproveita-se praticamente tudo. O principal produto é a amêndoa da castanha-de-caju, localizada no interior da castanha, da qual se extrai o líquido da casca de castanha-de-caju (LCC), usado na indústria química e de lubrificantes, curtidores e aditivos. O pedúnculo do caju, o pseudofruto, é processado por indústrias ou minifábricas para a obtenção do suco ou da polpa congelada, a ser utilizada na fabricação de sucos, cajuínas e outras bebidas. O pedúnculo também pode ser aproveitado para a fabricação de diversos produtos, principalmente doces, e na alimentação animal. Além do pseudofruto inteiro também ser comercializado *in natura* em feiras e supermercados. (SERRANO; PESSOA, 2016).

Nos últimos 25 anos o Ceará vem representando quase 50% do total de castanha-de-caju produzida no Brasil, seguido pelos estados do Rio Grande do Norte (~ 22%) e Piauí (~ 18%), os quais juntos representam cerca de 90% do total produzido. Os estados da Bahia, Maranhão e Pernambuco complementam com a totalidade do restante (EMBRAPA, 2016).

Segundo dados da análise mensal de setembro de 2017, feita pelo CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento, estimou-se para a safra nacional de castanha-de-caju *in natura* um total de 99.073 toneladas. A safra representa um aumento na produtividade de 31,15 % em relação à safra de 2016 (CONAB, 2017).

Diante da enorme produção, o aproveitamento total de todos os coprodutos fornecidos pela cajucultura têm chamado muita atenção, principalmente pela possibilidade de utilização da goma do cajueiro (FIGURA 3) como substituinte da goma arábica, um polissacarídeo frequentemente utilizado como espessante e estabilizante nas indústrias farmacêuticas e alimentícias, devido às suas semelhanças em vários aspectos.

Figura 3 - Exsudato bruto e goma do cajueiro isolada



Fonte: Elaborada pela autora.

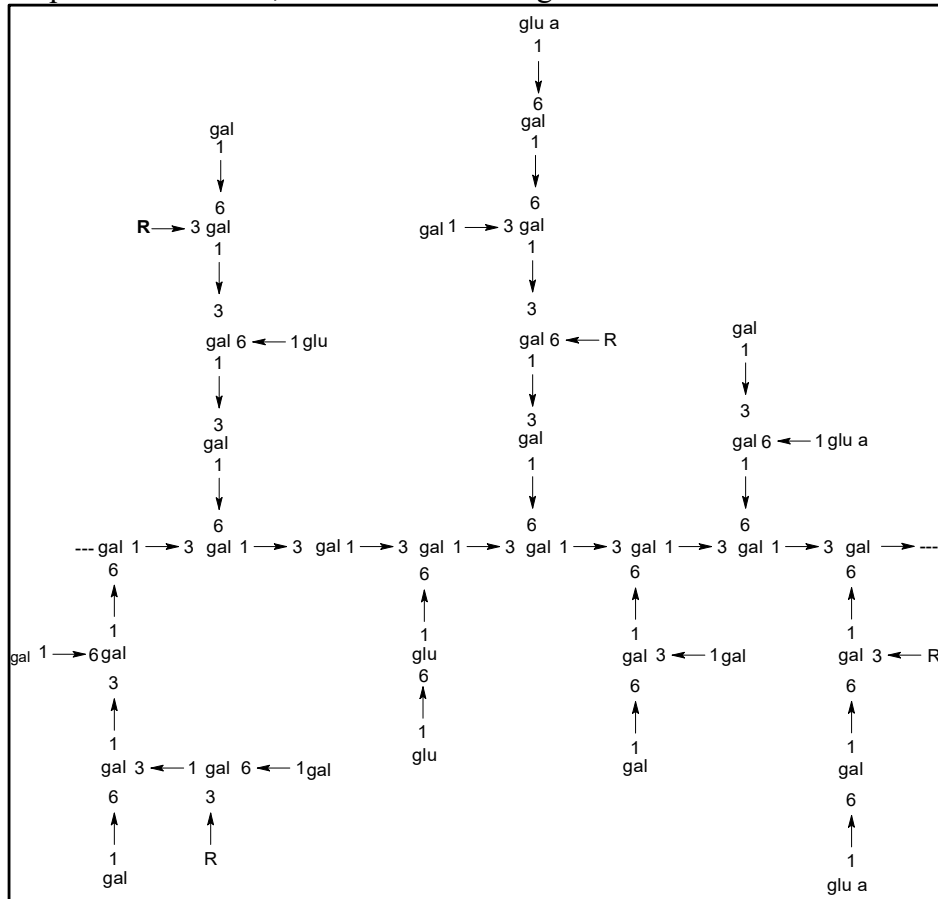
A GC é um heteropolissacarídeo extraído a partir do exsudato das árvores. O processo de exsudação é simples, podendo ser espontâneo ou por meios físicos e químicos. O processo espontâneo é observado como defesa natural contra doenças e pragas. A extração física é feita a partir de incisões e ferimentos provocados por ferramentas, semelhante à extração de látex na fabricação da borracha. A extração química é feita a partir da introdução de substâncias como o óxido de etileno, derivados do ácido benzoico e ácido 2-cloroetilfosfônico na casca (ARAÚJO, 1991). O exsudato surge nos troncos e nos ramos das árvores e é uma resina de coloração que varia do amarelo ao castanho, de consistência dura e solúvel em água.

Os polissacarídeos naturais são frequentemente contaminados com sais inorgânicos, proteínas, ligninas e ácidos nucleicos que precisam ser separados. Por isso a necessidade de purificação, que inclui separação cromatográfica, complexação de íons metálicos ou sais de amônio quaternário, precipitação com etanol ou acetona. Para tanto, a comparação entre dois métodos distintos de isolamento de gomas naturais foi feita por Rodrigues, de Paula e Costa (1993), sendo adaptada uma nova metodologia para o isolamento e purificação da goma do cajueiro.

A composição química da GC do Ceará foi elucidada por de Paula, Heatley e Budd (1998), por meio de técnicas de ressonância magnética nuclear, cromatografia de permeação de gel, espalhamento de luz e viscosimetria, indicando que a goma consiste em 72 % de β -D-galactopiranosose, 14 % de α -D-glucopiranosose, 4,6 % de α -L-arabinofuranose, 3,2 % de α -L-ramnopiranosose e 4,5 % de ácido glucurônico. A estrutura da goma apresentou, principalmente, uma cadeia principal de galactose ligada por C-1 e C-3, com ramificações de galactose ligada por C-1 e C-6 (FIGURA 4). Cadeias laterais que podem ser formadas por até

seis unidades de glucose, e a arabinose, ramnose e ácido glucurônico estão presentes como grupos terminais (DE PAULA; RODRIGUES, 1995). O teor de ácidos urônicos após hidrólise ácida foi determinado por Cunha *et al.*, (2007), sendo de 7,2% em massa.

Figura 4 - Fragmento estrutural para a goma do cajueiro não modificada, onde R representa ramnose, arabinose ou ácido glucurônico.



Fonte: Cunha *et al.* (2007, com adaptações)

Vários trabalhos têm sido propostos utilizando goma do cajueiro como material de partida em diversas áreas, projetando o seu potencial de aplicação como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 – Potenciais aplicações da goma do cajueiro.

Aplicação	Referência
Ação gastroprotetora	FIGUEIREDO <i>et al.</i> (2018)
Agente floculante	KLEIN <i>et al.</i> (2018)
Agente nucleante	DARTORA; LOUREIRO; FORTE (2018)
Alimentícia	DA SILVA <i>et al.</i> (2018); DE SOUZA <i>et al.</i> (2018); PORTO; CRISTIANINI (2018); COMUNIAN <i>et al.</i> (2018); SILVA <i>et al.</i> (2018)
Atividade antidiarreica	ARAÚJO <i>et al.</i> (2015)
Atividade antimicrobiana	LUSTOSA <i>et al.</i> (2017); QUELEMES <i>et al.</i> (2013); CAMPOS <i>et al.</i> (2012)
Atividade anti-inflamatória	DA SILVA <i>et al.</i> (2018)
Blendas	RAMESAN <i>et al.</i> (2018a); RAMESAN <i>et al.</i> (2018b)
Emulsão	RICHTER <i>et al.</i> (2018)
Encapsulamento de carotenoides	GOMEZ-ESTACA <i>et al.</i> (2016)
Encapsulamento de óleo essencial	FERNANDES <i>et al.</i> (2016); DE OLIVEIRA <i>et al.</i> (2014); ABREU <i>et al.</i> (2012)
Encapsulamento de larvicida	PAULA <i>et al.</i> (2012a); PAULA <i>et al.</i> (2012b)
Estabilização de óleo de peixe	BOTREL <i>et al.</i> (2017)
Formulação de comprimidos	PAULA <i>et al.</i> (2018); KUMAR <i>et al.</i> (2014); GOWTHAMARAJAN <i>et al.</i> (2011); OFORI-KWAKYE <i>et al.</i> (2010)
Fluido para perfuração de poços	SILVA; LUCAS (2018)
Hidrogéis superabsorventes	GUILHERME <i>et al.</i> (2005)
Imobilização de enzimas	SILVA <i>et al.</i> (2010)
Materiais eletrônicos	AMORIM <i>et al.</i> (2018); CASTRO <i>et al.</i> (2017)
Microesferas	MAGALHÃES JR <i>et al.</i> (2009)
Nanocompósitos	RAMESAN <i>et al.</i> (2018d)
Nanopartículas magnéticas	RAMESAN <i>et al.</i> (2018c)
Nanopartículas para carreamento de fármacos	SILVA <i>et al.</i> (2019); LIMA <i>et al.</i> (2018); DIAS <i>et al.</i> (2016); ABREU <i>et al.</i> (2016); PITOMBEIRA <i>et al.</i> (2015);

	MAGALHÃES <i>et al.</i> (2016)
Odontológica	SOUZA FILHO <i>et al.</i> (2018); HASNAIN <i>et al.</i> (2018)
Produção de filmes	MACIEL <i>et al.</i> (2007)
Produção de géis contendo lidocaína	DAS; NAYAK; NANDA (2013)
Revestimento comestível protetor	OLIVEIRA <i>et al.</i> (2018); FORATO <i>et al.</i> (2015)
Sistemas layer-by-layer	LEITE <i>et al.</i> (2017); BITTENCOURT <i>et al.</i> (2016); ARAÚJO <i>et al.</i> (2012)
Sistemas mucoadesivos	CORDEIRO <i>et al.</i> (2017); GOWTHAMARAJAN <i>et al.</i> (2012)

Fonte: Elaborada pela autora.

1.5.1 Modificações Químicas da Goma do Cajueiro

Vários polissacarídeos têm sido modificados quimicamente a fim de melhorar suas propriedades físico-químicas, mecânicas ou biológicas, de maneira a expandir suas possibilidades de uso como novos materiais (LEMARCHAND *et al.*, 2004).

Apesar das inúmeras vantagens relacionadas à goma do cajueiro, o seu uso pode se tornar limitado devido à sua baixa viscosidade e pouca energia de ativação de fluxo, característico de um sistema com poucas interações intra e intermoleculares (DE PAULA; RODRIGUES, 1995). Por isso foram propostas várias modificações químicas a fim de se melhorar suas propriedades e possibilitar a inserção de novos grupos reacionais. Modificações químicas como oxidação (CUNHA *et al.*, 2007), sulfatação (MOURA NETO *et al.*, 2011), carboximetilação (SILVA *et al.*, 2004), acetilação (PITOMBEIRA *et al.*, 2015; LIMA *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2019), quaternização com sais de amônio (QUELEMES *et al.*, 2017), bem como reações de copolimerização com acrilamida (SILVA *et al.*, 2007), N-propilacrilamida (ABREU *et al.*, 2016), L-lactídeo (RICHTER, *et al.*, 2018) e a reticulação com epícloridrina (SILVA *et al.*, 2006) foram investigadas.

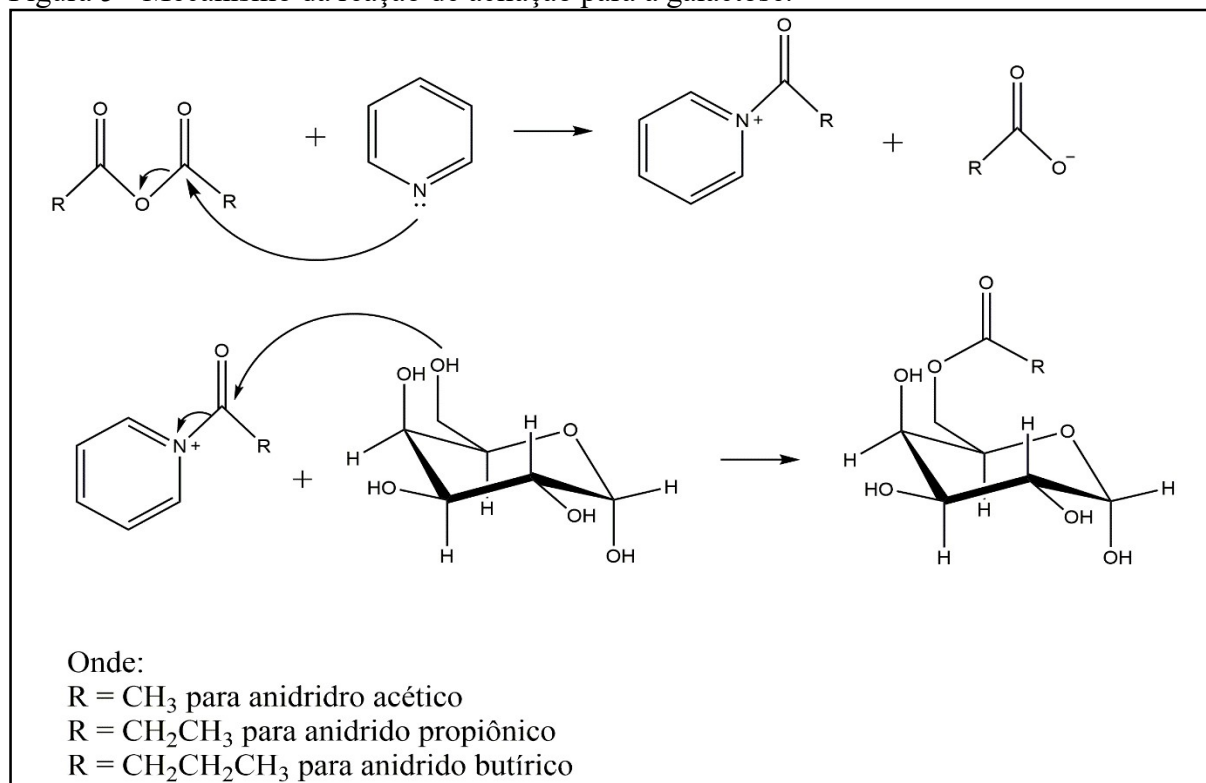
A reação de acilação tem sido bastante utilizada para formar derivados anfífilos de carboidratos tanto em meio homogêneo quanto em meio heterogêneo. Dentre os agentes acilantes utilizados destaca-se o anidrido acético, cloreto de acila e cetonas com catalisadores ácidos ou básicos (GRÖNDAHL; TELEMANN; GATENHOLM, 2003; XU *et al.*, 2010). Entre os catalisadores podendo-se encontrar: hidróxido de sódio (ACEVEDO-GUEVARA *et al.*,

2018; HONG *et al.*, 2015; PAULOS *et al.*, 2016; RIBEIRO *et al.*, 2017; XIE *et al.*, 2015), ácido sulfúrico (LIMA *et al.*, 2018; NAJAFI; BAGHAIE; ASHORI, 2016), ácido acético (WU *et al.*, 2018), iodo molecular (SANCHEZ-RIVERA *et al.*, 2010) e piridina (DIAS *et al.*, 2016; PITOMBEIRA *et al.*, 2015; SONG *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2009).

Neste trabalho a goma do cajueiro foi modificada por meio da substituição de grupos hidroxila por grupos acila, com diferentes tamanhos de cadeia lateral (anidridos acético, propiônico e butírico) e catalisada por piridina. A piridina foi escolhida devido à sua alta solubilidade em água e à facilidade de remoção por meio de lavagem com água após a esterificação.

O mecanismo proposto para a acilação da goma do cajueiro consiste em uma adição-eliminação (FIGURA 5), no qual cada hidroxila presente na cadeia da GC possui reatividade diferente. A hidroxila ligada ao átomo de carbono primário C6 é mais reativa do que as hidroxilas ligadas aos átomos de carbono secundário C2 e C4, devido ao impedimento estérico e, em relação a estes átomos de carbono secundário. A hidroxila ligada a C2 é mais reativa que a hidroxila de C4, pois aquela está mais próxima ao hemiacetal e é mais ácida (FEDOROVA; ROGOVIN, 1963).

Figura 5 - Mecanismo da reação de acilação para a galactose.



Fonte: Elaborada pela autora.

1.6 Leishmaniose

As doenças tropicais negligenciadas (DTN) compreendem um grupo de enfermidades que afetam principalmente populações que vivem na pobreza. Por atingirem pessoas em contextos desfavorecidos, as DTN apresentam pouca visibilidade e não despertam o interesse das indústrias farmacêuticas para o investimento e desenvolvimento de tratamentos melhores e mais novos. Além disso, a pobreza dos acometidos por essas doenças limita o seu acesso aos tratamentos e aos serviços de saúde (BRASIL, 2016).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que cerca de 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco da leishmaniose em mais de 100 países, com registro aproximado de dois milhões de novos casos das diferentes formas clínicas ao ano (BRASIL, 2017). É uma doença com extensiva morbidade e mortalidade e tem notável impacto sobre a saúde pública global, além de ser considerada uma das seis principais doenças tropicais pela OMS. Após a toxoplasmose e da criptosporidíase, a leishmaniose é considerada a terceira doença parasitária mais comum (SHAFIEI *et al.*, 2014).

Leishmaniose é uma doença infecciosa e não contagiosa, que acomete pele e mucosas e geralmente apresenta evolução crônica. A infecção é causada por diferentes espécies de protozoário do gênero *Leishmania* e compreende várias formas clínicas, incluindo a leishmaniose cutânea (LC), a leishmaniose mucocutânea, a leishmaniose difusa cutânea, a leishmaniose visceral (LV), o calazar e a leishmaniose recidiva. O vetor, organismo que serve de veículo para a transmissão da leishmaniose, são os insetos denominados flebotomíneos, pertencentes ao gênero *Lutzomyia* (BRASIL, 2014).

No Brasil, em 2015, a região Nordeste registrou o maior número de ocorrências de leishmaniose visceral, com 1.806 casos, seguida pelas regiões Sudeste (538); Norte (469); Centro-Oeste (157); e Sul (5). Em relação à leishmaniose tegumentar a região Norte registrou o maior número de casos (8.939) dessa doença; seguida do Nordeste (5.152); Centro-Oeste (2.937); Sudeste (1.762); e Sul (493) (BRASIL, 2017).

Inicialmente, a leishmaniose era uma zoonose caracterizada como doença de caráter eminentemente rural. Com o progresso das cidades e o desmatamento, vem se expandindo para áreas urbanas de médio e grande porte e se tornou crescente como problema de saúde pública no país e em outras áreas do continente americano, sendo uma endemia em franca expansão geográfica (BRASIL, 2017).

Leishmaniose é uma doença crônica, sistêmica e caracterizada por febre de longa duração, perda de peso, diminuição ou perda da força muscular e anemia. Quando não tratada,

pode evoluir a óbito em mais de 90% dos casos. Muitos infectados apresentam a forma assintomática da doença. Suas manifestações clínicas refletem o desequilíbrio entre a multiplicação dos parasitos nas células do sistema fagocítico mononuclear, a resposta imunitária do indivíduo e o processo inflamatório subjacente (BRASIL, 2017). O diagnóstico clínico é complexo, pois a doença no homem pode apresentar sinais e sintomas que são comuns a outras patologias, como doença de Chagas, malária, esquistossomose, febre tifoide e tuberculose (GONTIJO; MELO, 2004).

1.6.1 Anfotericina B

Além da leishmaniose, pacientes transplantados, com câncer e soropositivos que geralmente recebem cuidados que incluem terapias com antibióticos e/ou imunossupressores de amplo espectro, têm o risco aumentado de doenças como a candidíase, histoplasmose e aspergilose (DIRO *et al.*, 2015).

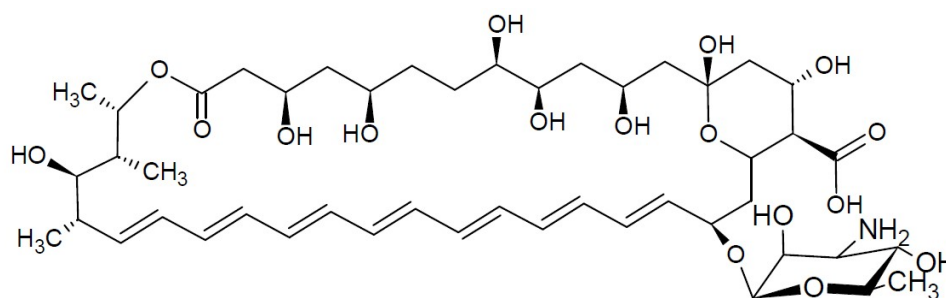
Para estes pacientes, as infecções fúngicas podem acarretar alta mortalidade, com taxas superiores à 30%. Em especial, cerca de 90% dos pacientes portadores do vírus HIV morrem como resultado destas infecções fúngicas (BARAU; BRAUN; VINCENT, 2014). O tratamento clínico das doenças fúngicas sistêmicas representa, portanto, também um grande desafio de saúde pública no Brasil.

A anfotericina B (AmB) é um antifúngico de segunda linha usado contra a maioria das infecções sistêmicas fúngicas. Desde os anos 50, tem sido utilizada para o tratamento clínico de doenças fúngicas iniciais e, vários anos depois, também para a leishmaniose (OURA; STERNBERG; WRIGHT, 1955). O fármaco é altamente ativo, mas seu uso clínico é limitado devido à frequente toxicidade relatada na administração parenteral das formulações convencionais, compostas por micelas de AmB e desoxicolato de sódio (CALDEIRA *et al.*, 2015).

AmB é um antifúngico polieno macrolídeo, isolado a partir da espécie de bactéria do gênero *Streptomyces nodosus* em 1955 (DONOVICKET *et al.*, 1955). Possui baixa solubilidade em quase todos os solventes; pouquíssima solubilidade em água e moderada solubilidade em álcoois, porém possui alta solubilidade em dimetilsulfóxido (DMSO) e dimetilformamida (DMF). Sua estrutura molecular é compreendida por uma lactona macrocíclica (FIGURA 7) e contém 47 átomos de carbono, consistindo em um anel macrocíclico fechado por lactonização. Possui cadeia de duplas ligações conjugadas não substituídas (heptano) e, na porção oposta, uma cadeia poli-hidroxilada grupos hidroxila

livres, o que lhe confere característica anfifílica. Em uma das extremidades da molécula, encontra-se um resíduo micosamina (lactona) com um grupo amino livre, formando uma cadeia lateral. A molécula tem aproximadamente 24 Å de comprimento, equivalente a meia camada de fosfolipídio (FILIPPIN; SOUZA, 2006). Sua fórmula molecular é $C_{47}H_{73}NO_{17}$ e sua massa molar é de 924 g/mol (LIU *et al.*, 2017).

Figura 7 - Estrutura da Anfotericina B.



Fonte: Ganis *et al.* (1971)

O mecanismo de ação da AmB provém da interação com o ergosterol, um esteroide constituinte exclusivo da parede celular fúngica, levando à formação de poros através das membranas lipídicas. Esta alteração da permeabilidade celular possibilita o escape de íons pequenos, como o potássio e metabólitos, levando à morte celular (LEGRAND *et al.* 1992). Além disso, a AmB inibe enzimas da membrana, como a ATPase, o que reduz a capacidade de proliferação e esgota a reserva de energia celular nas células fúngicas (WILCOCK *et al.*, 2013).

A toxicidade da AmB surge a partir de sua afinidade pelo colesterol, o principal componente da membrana celular dos mamíferos. A AmB interage com o colesterol e penetra na membrana celular, criando um canal transmembrana, levando ao vazamento de metabólitos e íons monovalentes, desencadeando a morte celular. Como as moléculas de AmB se acumulam em órgãos vitais do corpo humano, particularmente no rim, sua afinidade com o colesterol se torna um efeito deletério para as células hospedeiras, por meio da perturbação da integridade da membrana, causando graves danos celulares (NEUMANN; BAGINSKI; CZUB, 2010).

O Fungizone® foi a primeira formulação comercial de AmB utilizando desoxicolato de sódio como surfactante. Porém, este fármaco é extremamente agregado em sua formulação e pode apresentar reações agudas relacionadas com a perfusão e a nefrotoxicidade relacionada a dose de anfotericina B. Sua toxicidade limita à dose máxima

tolerada de 0,7 a 1 mg/kg/dia (HAMILL, 2013).

Outras formulações comerciais de AmB incluem um carreador lipossomal nanoscópico, o Ambisome®, um complexo lipídico, o Abelcet® e dispersões coloidais, o Anfotec® e o Anfocil® (ESPADA *et al.*, 2008).

O carreador lipossomal de anfotericina B (Ambisome®), recebeu inicialmente aprovação em 1989 para ser utilizada apenas na Irlanda e a aprovação pela FDA para utilização nos Estados Unidos se deu em agosto de 1997. É uma pequena formulação de vesícula unilamelar, sendo a única preparação lisossômica verdadeira (MOEN; LYSENG-WILLIAMSON; SCOTT, 2009).

A formulação lipídica Abelcet® recebeu aprovação do FDA em 20 de novembro de 1995 para comercialização. Sua indicação inicial era limitada apenas ao tratamento de aspergilose em pacientes com intolerância a AmB convencional, sendo posteriormente expandida para todas as infecções fúngicas sistêmicas. É um complexo formado por AmB e os lipídeos dimiristil fosfatidilcolina e dimiristil fosfatidilglicerol na proporção molar de 1:1 (MERHAV; MIELES, 1997). Devido à sua alta massa molar, o Abelcet® é rapidamente eliminado da circulação pelo sistema mononuclear fagocitário (WINGARD, 1997).

As dispersões coloidais disponíveis no mercado (Anfotec® e Anfocil®) consistem em uma razão molar de 1:1 de anfotericina B e sulfato de colesterol, de modo que duas moléculas de AmB se ligam a duas moléculas de colesterol, formando uma estrutura com porção hidrofílica e hidrofóbica (HILLERY, 1997).

Apesar de estar em uso clínico por mais de 50 anos, a AmB continua exibindo boa atividade *in vitro* contra um largo espectro de fungos isolados e clinicamente relevantes, incluindo a maioria das cepas de *Candida* spp., *Aspergillus* spp., e de outros filamentos de fungos, como o *Mucorales*. Apesar da resistência fúngica ter sido verificada muito raramente, algumas espécies bem reconhecidas apresentam resistência intrínseca à AmB, incluindo *Aspergillus terreus*, *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp., e *Trichoporon asahii* (HAMILL, 2013).

A leishmaniose se espalha rapidamente e é, atualmente, a maior preocupação de saúde pública em países em desenvolvimento. O seu tratamento ainda é um desafio porque existem vários problemas, como o alto custo dos fármacos, a necessidade de alta dosagem, a incidência e a prevalência de resistência aos medicamentos, os efeitos colaterais e a falta de novos medicamentos acessíveis. A necessidade de um agente ideal para tratar doenças fúngicas é inevitável. Um medicamento ideal deve ser eficaz em doses mínimas, não induzir resistência, ter baixo custo, ser isento de efeitos colaterais adversos, não ser teratogênico e não

requerer hospitalização (ORYAN, 2015).

As formulações convencionais para o tratamento das doenças fúngicas possuem uma série de limitações. Por isso o desenvolvimento de outros tipos de terapia é de suma importância para este tipo de infecção. Diante das grandes dificuldades de se trabalhar com a AmB, tem-se utilizado a nanotecnologia como ferramenta na criação de carreadores com intuito de contornar os problemas envolvendo sua utilização. A Tabela 2 apresenta vários tipos de partícula, na escala nanométrica, utilizados para incorporação da AmB.

Tabela 2 - Nanotecnologia aplicada à formulação de carreadores da AmB.

Tipo de partícula	Material	Referência
Nanopartícula	Quitosana	CHHONKER <i>et al.</i> (2015); SANDHYA <i>et al.</i> (2018); SINGH <i>et al.</i> (2016); TIYABOONCHAI; LIMPEANCHOB (2007); MARCANO <i>et al.</i> (2018)
	Goma do Cajueiro	LIMA <i>et al.</i> (2018)
	Lecitina/Goma tragacanto	JABRI <i>et al.</i> (2018)
	Dextrina	KANEO <i>et al.</i> (2014)
	Vitamina E-TGPS	AL-QUADEIB <i>et al.</i> (2015); ITALIA <i>et al.</i> (2009)
	PLGA	SOUZA <i>et al.</i> (2015); VAN DE VEN <i>et al.</i> (2012)
	Nanomicelas	Quitosana
Policarbonato		WANG <i>et al.</i> (2016)
Dextrana/PLGA		CHOI <i>et al.</i> (2008)
PEG		JEE <i>et al.</i> (2012)
Conjugados	Goma Arábica	NISHI <i>et al.</i> (2007)
	Carragenana	APARNA <i>et al.</i> (2018)
Membranas	Nanodiscos de fosfolipídeos	HARGREAVES; NGUYEN; RYAN (2006)
Nanocápsulas	Quitosana	ASTHANA <i>et al.</i> (2013)
Emulsão	Celulose	ISHAQ <i>et al.</i> (2018)
	Goma do cajueiro	RICHTER <i>et al.</i> (2018)
	Amido	COSSU <i>et al.</i> (2015)
	Tween® e Span®	SILVA <i>et al.</i> (2013)
	Óleos surfactantes comerciais	SOSA <i>et al.</i> (2017)
	Colesterol	CALDEIRA <i>et al.</i> (2015); DOS SANTOS <i>et al.</i> (2017)

Fonte: Elaborada pela autora.

1.6.2 Outros Fármacos para o Tratamento da Leishmaniose

O antimônio pentavalente (Sb^{5+}) é um medicamento destinado ao tratamento da leishmaniose tegumentar americana ou cutâneo-mucosa e no tratamento da leishmaniose visceral ou calazar. É também considerado o fármaco de primeira linha para o tratamento da leishmaniose. Entretanto, é preciso longos períodos de administração (superior a 30 dias) e é extremamente tóxico em humanos (HERWALDT; BERMAN, 1992).

Atualmente, existem duas formulações à base de antimônio pentavalente disponíveis no mercado internacional; o antimoniato de meglumina (Glucantime[®]) e o estibogluconato de sódio (Pentostam[®]), sendo este último não comercializado no Brasil. Com o objetivo de padronizar o esquema terapêutico, a OMS recomenda que a dose seja calculada em miligramas de antimônio pentavalente por quilograma de peso corporal por dia ($mg Sb^{+5}/kg/dia$) (BRASIL, 2017).

Os efeitos colaterais da terapia com o antimonial pentavalente são a toxicidade para o coração, fígado e pâncreas, doença renal aguda, anemia, redução do número de leucócitos e plaquetas, dor abdominal, náuseas, desordens sanguíneas e dores no local na injeção quando administradas intramuscular (IGBINEWEKA *et al.*, 2012). Além de não ser indicado como primeira escolha em pacientes grávidas, em pessoas acima de 50 anos, em portadores de doenças no coração, rim e fígado, possui altíssimo custo. Atualmente, vários relatos têm mostrado que a eficácia desta droga tem sido reduzida significativamente (SAZGARNIA *et al.*, 2013).

Outro medicamento para o tratamento da leishmaniose é a miltefosina (hexadecilfosfocolina, Impavido[®]). Ela foi originalmente desenvolvida para tratamento de metástases cutâneas em carcinomas mamários e, posteriormente, em estudos realizados na Índia, descobriu-se a eficácia terapêutica no tratamento das leishmanioses (EISSA *et al.*, 2015). A inclusão da miltefosina como fármaco para o tratamento da leishmaniose foi considerada um avanço, pois é o primeiro fármaco a ser administrado oralmente, de modo que o tratamento pode ser feito em casa, eliminando os custos com a hospitalização (DAS *et al.*, 2010).

Estudos clínicos com a miltefosina reportaram eficiência para pacientes que apresentaram resistência ao antimonial pentavalente, além de seu custo ser menor, quando comparado ao Sb^{+5} . Em geral, os resultados são positivos para a terapia oral, entretanto, este fármaco apresenta resistência em resposta ao seu uso extensivo (ORYAN, 2015).

A miltefosina é formulada em cápsulas e comercializada em duas apresentações: uma contendo 10 mg e outra 50 mg do fármaco. Atualmente no Brasil, o medicamento não possui registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Em em 2010, a antiga CITEC (Comissão de Incorporação de Tecnologias do Ministério da Saúde) deliberou a incorporação da miltefosina no SUS, mas a decisão não foi implementada. Os critérios de exclusão para a sua utilização no tratamento da leishmaniose são gestação e lactação, hipersensibilidade ao componente e comorbidades hepáticas e renais. Estudos pela FDA (*Food and Drug Administration*) mostraram potencial efeito teratogênico para o feto humano (BRASIL, 2016; SANTANA et al., 2017).

Enquanto as formulações à base de antimônio pentavalente são tóxicas e apresentam eficiência limitada e o fluconazol tem eficiência questionável, a anfotericina B lipossomal e a miltefosina são as opções de fármacos mais viáveis e promissoras para o tratamento da leishmaniose até o presente momento (MOSIMANN et al., 2018).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Desenvolver nanocarreadores de Anfotericina B via auto-organização e por emulsões de Pickering, tendo como material de base a goma do cajueiro hidrofobizada com os anidridos propiônico e butírico.

2.2 Objetivos Específicos

- Utilizar a goma do cajueiro para obtenção de derivados hidrofóbicos através de reação de acilação;
- Estudar o efeito da razão goma/anidrido e o tipo de anidrido utilizado na reação de acilação;
- Caracterizar os derivados obtidos;
- Preparar e caracterizar nanopartículas via auto-organização;
- Investigar a estabilidade das nanopartículas;
- Incorporar Anfotericina B nas nanopartículas e determinar a eficiência de encapsulamento;
- Realizar ensaios de liberação *in vitro* das nanopartículas com AmB encapsulada;
- Preparar e caracterizar emulsões de Pickering;
- Investigar a estabilidade das emulsões;
- Incorporar Anfotericina B nas emulsões e determinar a eficiência de encapsulamento;

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Materiais

O exsudato do cajueiro (*Anacardium occidentale*) foi fornecido pela EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). Os anidridos acético, propiônico e butírico, todos da VETEC foram utilizados sem prévia purificação. A piridina da Sigma-Aldrich[®] e o dimetilsulfóxido (DMSO) 99 %, como solvente foram oriundos da VETEC[®]. Miglyol é de origem da Cremer Oleo[®], etanol e acetona da Synth[®] e Anfotericina B da Ethycal[®].

3.2 Isolamento da Goma do Cajueiro

A goma do cajueiro foi isolada a partir da metodologia descrita por Rodrigues, de Paula e Costa (1993). Foram pesados 10 g de exsudato triturado, adicionados 100 mL de água destilada e deixado sob agitação por 12 horas. A solução foi filtrada em funil de placa sinterizada número 1, a fim de remover resíduos sólidos. O pH foi ajustado para 7,0 com NaOH 0,1 mol/L, com posterior adição de 1 g de NaCl, para o ajuste da força iônica e melhor precipitação. A solução foi precipitada em etanol e o precipitado filtrado em funil de placa sinterizada, lavado com etanol e acetona, e seco com jato de ar quente.

3.3 Reação de Acilação

Para a hidrofobização da goma do cajueiro, seguiu-se a metodologia proposta por Motozato *et al.* (1986), com modificações. A goma do cajueiro isolada (1 g) foi pesada e dispersa em 40 mL de formamida e a solução mantida em banho de glicerina à 50 °C durante o período de 1 h. Em seguida foram adicionados o anidrido e a piridina. As condições reacionais usadas neste estudo podem ser vistas na Tabela 3. A reação foi processada sob agitação moderada por 24 h, à temperatura de ~ 50 – 55 °C. O produto de reação foi precipitado utilizando 800 mL de água destilada e filtrado em funil de placa sinterizada número 4. O controle da remoção de piridina foi realizado por medidas de condutância.

Os derivados hidrofóbicos obtidos a partir da reação da goma do cajueiro com o anidrido acético foram nomeados de GCAc, os derivados obtidos com o anidrido propiônico de GCProp e com o anidrido butírico de GCBut.

Tabela 3 - Dados experimentais para a reação de acilação da goma do cajueiro.

Amostra	Anidrido	Volume anidrido (mL)	Razão molar goma:piridina:anidrido
GCAc 9		5,29	1:6:9
GCAc 12	Acético	7,00	1:6:12
GCAc 24		14,10	1:6:24
GCPop 9		7,15	1:6:9
GCPop 12	Propiônico	9,54	1:6:12
GCPop 24		19,07	1:6:24
GCBut 9		9,08	1:6:9
GCBut 12	Butírico	12,10	1:6:12
GCBut 24		24,22	1:6:24

Fonte: Elaborada pela autora.

3.4 Espectroscopia Vibracional de Absorção na Região do Infravermelho

Os espectros de infravermelho para os derivados hidrofóbicos foram obtidos utilizando um espectrofotômetro Shimadzu® modelo IR Trace – 100 em modo de absorbância na região entre 4000 e 400 cm^{-1} . As amostras foram prensadas e analisadas em pastilhas de KBr.

3.5 Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) foram obtidos num equipamento Bruker® modelo Avance DRX500 e a temperatura das amostras foi mantida em 70°C. As amostras foram previamente dissolvidas em DMSO- d_6 .

3.6 Determinação do Grau de Substituição

O grau de substituição (GS) foi determinado utilizando o método volumétrico de titulação descrito por Sánchez-Rivera *et al.* (2010). Uma massa de cerca de 300 mg de goma do cajueiro hidrofobizada foi pesada e seca em estufa a 105 °C durante 2 h. O material foi transferido para um erlenmeyer, onde foi adicionado 12 mL de etanol (75 % V/V) e o sistema aquecido a 55 °C durante 30 min. Após este período, 12 mL de NaOH 0,5 mol/L foi

adicionado e aquecido por mais 15 min, tornando-se solúvel e o erlenmeyer foi hermeticamente fechado e deixado em repouso durante 72 h em temperatura ambiente.

Ao final dos três dias, o excesso de NaOH que não reagiu com a goma hidrofobizada foi titulado com HCl. Após a titulação foi adicionado um excesso de HCl (1 mL) e a solução foi deixada em repouso a temperatura ambiente por 24 h. A solução foi novamente titulada, com HCl e a porcentagem de acetato e o GS foram determinadas a partir das equações 2 e 3, respectivamente

$$\% \text{ grupo acila} = \frac{(V_{\text{branco}} - V_{\text{amostra}}) \cdot C_{\text{HCl}} \cdot M_{\text{acila}} \times 10^{-3}}{m_{\text{amostra}}} \times 100\% \quad (2)$$

onde V_{branco} é o volume gasto na titulação da GC sem modificação, V_{amostra} é o volume gasto na titulação da GC hidrofobizada e M_{acila} é o valor de massa molar (g/mol) referente ao grupo a ser adicionado, sendo 43 para grupo acetil, 57 para o grupo propionil e 71 para o grupo butil.

$$GS = \frac{162 \times (\% \text{ grupo acila})}{[100M_{\text{acila}} - (M_{\text{acila}} - 1) \cdot (\% \text{ grupo acila})]} \quad (3)$$

3.6.1 Rendimento

Com base nos valores do GS foi determinado o percentual de rendimento para as reações de acilação usando a equação 4.

$$R(\%) = \frac{m_f}{m_i \left(1 + \frac{GS \times M_{\text{acila}}}{162} \right)} \times 100\% \quad (4)$$

Onde m_i é a massa inicial de GC e m_f é a massa do produto. O valor 162 na equação representa a massa molar (g/mol) da unidade glicosídica.

3.7 Análise Elementar

A determinação dos teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio para a goma do cajueiro e os derivados acilados foi realizado no Analisador Elementar Perkin Elmer® modelo EA 2400 series II, no modo CHN.

3.8 Análise Termogravimétrica

As propriedades térmicas da goma do cajueiro e de seus derivados hidrofóbicos foram determinadas por análise termogravimétrica no equipamento Shimadzu® modelo TGA-50 em ar sintético com taxa de aquecimento de 10 °C/min até a temperatura de 600°C.

3.9 Análise de Toxicidade

Os ensaios de toxicidade foram realizados com peixe-zebra (*Danio rerio*) selvagem com idade entre 60 e 90 dias ($4,0 \pm 0,1$ g) de ambos os sexos, adquiridos através do fornecedor Agroquímica - Comércio de Produtos Veterinários LTDA®. Os animais foram aclimatados durante 168 h e acondicionados em aquários de vidro imersos em água de abastecimento fornecida pela Companhia de Água e Esgoto do Ceará (CAGECE), previamente tratada com anticloro (*ProtecPlus*®), em temperatura de 24 °C.

Para cada combinação amostra-concentração foram utilizados seis animais, que receberam 20 µL de amostra via intraperitoneal. Dois grupos de animais foram utilizados como controle negativo, um sendo administrado uma solução de DMSO e água e outro somente água deionizada. Após a administração das amostras, os animais foram observados por 24 h e contabilizado o número de animais mortos para realização da análise estatística, estimando-se a dose letal mediana (DL₅₀). A DL₅₀ foi determinada pelo método Trimmed Spearman-Kärber.

A realização dos procedimentos experimentais com este modelo animal foi aprovada pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Ceará (UECE) em Fortaleza – CE, sob o protocolo nº 7210149/2016.

3.10 Preparação das Nanopartículas via Auto-Organização

As nanopartículas foram preparadas via auto-organização utilizando soluções dos derivados hidrofóbicos na concentração de 1 mg/mL em DMSO. As soluções foram inseridas em membrana semipermeável de celulose com limite de massa molar de 14.000 g/mol e dialisadas contra água destilada durante 72 h, com duas trocas de água diária. Após a diálise, as concentrações das nanopartículas em solução foram recalculadas com base no volume final. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.10.1 Tamanho de Partícula e Potencial Zeta

O tamanho de partícula, o índice de polidispersão (IPD) e o potencial zeta das nanopartículas foram medidos utilizando espalhamento dinâmico de luz, operado com laser de comprimento de onda 633 nm com um ângulo de espalhamento de 173 °. O equipamento usado nesses ensaios foi o Nano Zeta Sizer Malvern® modelo ZS 3600.

3.10.2 Incorporação da Anfotericina B

Para a incorporação da anfotericina B nas nanopartículas, foram solubilizados 50 mg do derivado hidrofóbico e 5 mg de AmB em 5 mL de DMSO. A solução contendo a goma do cajueiro hidrofobizada e o fármaco foi dialisada durante 72 h contra água destilada, com troca de água a cada 12 h, em recipiente protegido da luz.

As nanopartículas encapsuladas com AmB foram caracterizadas por espalhamento dinâmico de luz, com medições de tamanho de partícula e potencial zeta imediatamente após a diálise e para o estudo da estabilidade estoque, elas foram refrigeradas à 4 °C durante seis meses.

3.10.3 Eficiência de Encapsulamento

A eficiência de encapsulamento (EE) foi quantificada a partir das nanopartículas secas por liofilização. O material pulverizado foi dissolvido em DMSO e centrifugado à 40000 G durante 30 min, de modo que a matriz da nanopartícula fosse rompida e o fármaco encapsulado liberado. Após a centrifugação, a concentração de AmB foi determinada por espectrofotometria no ultravioleta-visível (UV-vis) em 391 nm. Foi utilizado um espectrofotômetro Shimadzu® modelo UV-1800. A determinação da eficiência foi calculada utilizando uma curva de calibração, relacionando a absorbância com a concentração ($R^2 = 0,9988$).

$$ABS = 0,00238 + 78.5352c$$

onde c é a concentração de AmB em mg/mL. A EE foi calculada a partir da Equação 5.

$$EE(\%) = \frac{[Total_{AmB}] - [Livre_{AmB}]}{[Total_{AmB}]} \times 100\% \quad (5)$$

3.10.4 Estudo da Agregação da Anfotericina B

O estado de agregação da anfotericina B dentro das nanopartículas foi verificado através de medidas de UV-vis, utilizando a razão entre as intensidades das bandas de absorção em 348 e em 409 nm, de acordo com a metodologia proposta por Barwicz, Christian e Gruda (1992).

3.10.5 Ensaios de Estabilidade

A distribuição estatística do tamanho de partícula e o índice de polidispersão foram tomados como parâmetros de estabilidade das nanopartículas. Ambos foram investigados em duas condições: (i) nanopartículas em água e refrigerada a 4 °C; e (ii) tampão HEPES (*N*-(2-hidroxietil) piperazina-*N'*-(2-ácido etanosulfônico) 10 mmol (pH 7,4) mantido a 37 °C. O ensaio (i) foi realizado durante 1 ano, para as nanopartículas sem fármaco, e durante seis meses para as nanopartículas com AmB encapsulada, medidas semanalmente durante o primeiro mês e mensalmente no período subsequente. Esse ensaio teve como objetivo avaliar a estabilidade de estoque das nanopartículas. Foram realizados ensaios em triplicata usando soluções de nanopartículas sem prévia diluição ou filtração.

O ensaio (ii) foi realizado durante 6 h, apenas em nanopartículas sem fármaco. Para tanto, 50 µL de solução de nanopartículas sem prévia diluição ou filtração foram adicionados a 950 µL de tampão HEPES 10 mmol/L aquecido à 37 °C numa incubadora sob agitação de 50 rpm. Os dados foram adquiridos no intervalo de 20 min para as primeiras duas horas, a cada 30 min para a terceira e quarta horas de ensaio e então a cada uma hora nas duas últimas horas.

3.10.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia das nanopartículas preparadas via auto-organização foi observada por meio de imagens de microscopia eletrônica de varredura, utilizando o microscópio FEI® modelo Quanta 450 FEG. A voltagem de aceleração configurada em 20 kV e a magnitude de aumento das imagens variou entre 50.000 a 100.000 vezes. Para o preparo das amostras, as

soluções de nanopartículas foram gotejadas em suporte de aço contendo fita de carbono e permaneceram em temperatura ambiente durante 24 h para evaporação da água. As amostras secas foram metalizadas na metalizadora Quorum[®] modelo QT150 ES, com cobertura de ouro em atmosfera de argônio.

3.10.7 Ensaio de Liberação *in Vitro*

O ensaio de liberação da anfotericina B foi realizado por meio de sistema de diálise. As nanopartículas com Anfotericina B (10 mg) foram dispersas em 2 mL de tampão fosfato pH=7,4 contendo lauril sulfato de sódio (LSS) na concentração de 0,25 % m/v e colocadas em sistemas contendo membrana de acetato de celulose, com tamanho de poro de 14.000 g/mol. O sistema foi dialisado contra 20 mL de solução tampão contendo LSS a 37 °C durante 72 h. O acompanhamento da liberação da anfotericina B foi realizado em intervalos de tempos por espectrofotometria na região do ultravioleta-visível (UV-vis) em 368 nm. Os valores de absorbância foram convertidos em porcentagem de liberação por meio de curva de calibração ($R^2 = 0,9997$).

$$\text{ABS} = 0,00175 + 53,8163c$$

3.11 Preparação das Emulsões de Pickering

Para a preparação das emulsões foi utilizado a metodologia descrita por Calvo e Remunan-Lopez (1997) com algumas modificações. Para composição da fase aquosa foi preparada uma solução 10 mg/mL dos derivados hidrofóbicos em DMSO, com volumes variando de 0,5 a 2 mL, e adicionada água deionizada de modo a se obter um volume final de 20 mL. A fase orgânica foi preparada utilizando 0,5 mL de etanol, 125 µL de Miglyol[®] e 9,5 mL de acetona.

Imediatamente após o preparo da fase orgânica, esta foi vertida sobre a fase aquosa, formando uma dispersão turva. O etanol, a acetona e uma parte da água foram removidos por meio de rotaevaporação usando o equipamento Buchi[®] modelo B-480 a 45 °C até atingir um terço do volume inicial. As emulsões foram isoladas por centrifugação durante 1 h com rotação em 15000 rpm a 24 °C, utilizando uma centrífuga Sigma[®] modelo 3-30KS. Por serem menos densas que a fase aquosa, as emulsões permanecem no sobrenadante, na forma de creme esbranquiçado. Removeu-se este creme utilizando micropipetador

automático. As emulsões isoladas foram estocadas a 4 ± 2 °C. Para obter a concentração de derivados hidrofóbicos mais adequada para a formação das emulsões, foram preparadas soluções a 0,5, 1 e 2 mg/mL de goma hidrofobizada em relação ao volume final de fase aquosa.

O tipo de emulsão formada foi determinado pelo teste da gota, descrito por Zoppe, Venditti e Rojas (2012). Uma gota de emulsão recém preparada foi adicionada a água e ao Mygliol® e foi verificada visualmente a habilidade de dispersão nos dois meios.

3.11.1 Tamanho de Partícula e Potencial Zeta

O tamanho de partícula, o índice de polidispersão e o potencial zeta das emulsões foram obtidos por espalhamento dinâmico de luz utilizando um laser a 633 nm com um ângulo de espalhamento (configurado) em 173°. O equipamento usado nesses ensaios foi um Nano Zeta Sizer Malvern® modelo ZS 3600. Foi retirada uma alíquota de 50 µL das emulsões e suspensas em 1 mL de água deionizada, medindo-se antes e imediatamente após o isolamento das emulsões em centrífuga.

3.11.2 Incorporação da Anfotericina B

Para a incorporação da anfotericina B, foi utilizada a mesma metodologia descrita para a síntese das emulsões de Pickering (item 3.10.2), adicionando 5 mg do fármaco à solução do derivado hidrofóbico em DMSO. Utilizou-se apenas a concentração de 0,5 mg/mL. As emulsões encapsuladas foram caracterizadas por espalhamento dinâmico de luz antes e após o isolamento em centrífuga.

3.11.3 Eficiência de Encapsulamento

Para determinar a eficiência de encapsulamento da AmB, todo o volume de emulsão removido com a micropipeta foi dissolvido em DMSO até um volume final de 5 mL e centrifugado a 40.000 G por 30 min, de modo que o fármaco fosse completamente liberado da matriz polimérica. A concentração de AmB foi medida por UV-vis em um comprimento de onda de 391 nm e a determinação da eficiência foi calculada utilizando a curva de calibração, explícita no item 3.10.3.

3.11.4 Estudo da Agregação da Anfotericina B

De forma semelhante ao experimento realizado para as nanopartículas (item 3.10.4), foi verificado o estado de agregação da AmB dentro das emulsões, com medição da razão da intensidade das bandas em 380 e em 409 nm, no espectro de UV-vis.

3.11.5 Ensaio de Estabilidade

Da mesma maneira como feito para as nanopartículas (item 3.10.5), a distribuição de tamanho de partícula e o índice de polidispersão foram tomados como parâmetros de estabilidade para as emulsões. Também foram realizados ensaios de estabilidade em duas condições: (i) emulsões em água e refrigerada a 4 ± 2 °C e (ii) tampão HEPES 10 mmol/L (pH 7,4) mantido a 37 °C. O mesmo procedimento experimental de investigação da estabilidade das nanopartículas foi aplicado às emulsões. Para as emulsões com AmB, foi realizado ensaio de estabilidade em refrigerador, durante seis meses.

3.11.6 Microscopia de Força Atômica

A microscopia de força atômica foi utilizada para elucidar as características morfológicas das emulsões, em microscópio modelo TT-AFM da AFM Workshop[®]. As análises foram realizadas no modo contato intermitente, utilizando ponteira ACT20 de silício da APP NANO[®], com frequência aproximadamente de 365 kHz e $r < 10$ nm. As amostras foram diluídas na proporção de 1:1000 (v/v) e sonicadas por 30 min em banho ultrassônico antes da análise. Foram gotejados 10 µL de amostra no suporte de mica e secas em estufa a 40 °C durante 10 min. As imagens foram processadas utilizando o *software* Gwyddion[®] 2.45.

As imagens de microscopia de força atômica foram realizadas no Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia (Biotec) da Universidade Federal do Piauí, no Campus Ministro Reis Velloso, Parnaíba.

3.11.7 Ensaio de Hemólise

A atividade hemolítica das emulsões foi avaliada seguindo a metodologia descrita por Quelemes *et al.* (2017), utilizando sangue humano, coletado em EDTA (1,8 mg/mL). Inicialmente, hemácias foram centrifugadas e resuspensas três vezes em solução salina estéril

(0,9 % m/v) para completa separação do plasma. Em tubo (ependorf) foram adicionados 125 μ L de emulsão e 125 μ L de concentrado de hemácia e o sistema incubado por 30 min à 37 °C e centrifugado à 10.000 G por cinco minutos. O sobrenadante foi removido com micropipetador e a absorbância lida em leitor de placa ELISA (Robonik®) em 492 nm.

As emulsões foram testadas em diversas concentrações. O triton-X (0,1 % v/v) foi utilizado como controle positivo e a solução salina como controle negativo. A extensão de hemólise foi calculada a partir da Equação 6.

$$H (\%) = \frac{(Abs_{goma} - Abs_{salina})}{(Abs_{triton} - Abs_{salina})} \times 100\% \quad (6)$$

As análises de hemólise foram realizadas no Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia (Biotec) da Universidade Federal do Piauí, no Campus Ministro Reis Velloso, Parnaíba.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação do Grau de Substituição

Na Tabela 4, estão sumarizados os resultados para porcentagem de grupos acilas, grau de substituição (GS) e rendimento reacional para os derivados hidrofóbicos utilizando os anidridos acético, propiônico e butírico.

O grau de substituição é definido como o número médio de hidroxilas substituídas pelo grupo acil por unidade glicosídica. Uma concentração baixa de anidrido no meio reacional não é suficiente para converter todos os grupos hidroxila em acila. Como a reação não é homogênea, é provável que algumas unidades de grupos OH não estejam acessíveis ao anidrido, de modo que o grau de substituição é inferior a três (GARG; JANA, 2011).

Tabela 4 - Porcentagem de grupos acila, GS e rendimento para os derivados acilados.

Amostra	Acila (%)	GS	Rendimento (%)
GCAc 9	30,69 ± 0,93	1,65 ± 0,07	49,09 ± 5,12
GCAc 12	30,15 ± 2,48	1,61 ± 0,18	56,76 ± 5,62
GCAc 24	37,42 ± 0,02	2,21 ± 0,002	73,11 ± 8,35
GCPop 9	33,64 ± 3,7	1,29 ± 0,19	53,1 ± 3,91
GCPop 12	27,54 ± 1,97	1,15 ± 0,09	68,7 ± 8,24
GCPop 24	29,41 ± 0,46	1,17 ± 0,02	94,1 ± 3,65
GCBut 9	41,19 ± 1,30	1,12 ± 0,10	65,91 ± 2,10
GCBut 12	42,21 ± 1,59	1,65 ± 0,10	67,17 ± 2,09
GCBut 24	43,25 ± 1,40	1,72 ± 0,09	69,23 ± 4,02

Fonte: Elaborada pela autora

A porcentagem de grupos acilas para os derivados variou entre $27,54 \pm 1,97$ e $43,25 \pm 1,40$ %. Para os derivados GCAc e GCBut observa-se que à medida em que se aumenta a proporção molar de anidrido adicionado à reação, um aumento da porcentagem de grupos acila é observado, o que indica que para estes derivados há um aumento do grau de substituição, pois há um maior número de grupos acila introduzidos na cadeia de goma do cajueiro. Esta tendência não é observada para os derivados GCPop, uma vez que o derivado GCPop 9 tem maior porcentagem de grupos acilas que os derivados GCPop 12 e GCPop 24.

No que diz respeito aos valores de grau de substituição, para os derivados GCAc nota-se que não há diferença expressiva do valor de GS entre os derivados GCAc 9 e GCAc 12, sendo os valores bastante próximos, de $1,65 \pm 0,07$ e $1,61 \pm 0,18$, sugerindo que o aumento de anidrido no meio reacional entre os derivados GCAc 9 e GCAc 12 não causa um aumento significativo no GS. Porém, ao se dobrar a proporção de anidrido (GCAc 12 e GCAc 24), há um aumento expressivo do valor de GS, de $1,61 \pm 0,18$ para $2,21 \pm 0,002$.

Para os derivados GCProp é possível observar que o grau de substituição do derivado GCProp 9 é maior que para os derivados GCProp 12 e GCPro 24, cujos valores de GS são próximos entre si. Provavelmente, a saturação do meio reacional e o impedimento estérico causam este efeito. O excesso de anidrido em GCProp 12 e GCProp 24 acarreta uma menor substituição e leva a valores semelhantes de GS.

Para os derivados CGBut, maior grau de substituição está correlacionado a uma maior proporção de anidrido, assim como para os derivados GCAc. Entre os derivados CGBut 9 e CGBut 12 há um expressivo aumento do GS, com valores de $1,12 \pm 0,01$ e $1,65 \pm 0,10$, respectivamente, enquanto que entre os derivados CGBut 12 e CGBut 24 este aumento não é tão pronunciado, tendo valores de $1,65 \pm 0,10$ e $1,72 \pm 0,09$, respectivamente. É razoável presumir que o aumento da concentração de anidrido no meio reacional e o impedimento estérico do grupo butila, dificulte a substituição nas cadeias laterais da goma do cajueiro, resultando em um aumento menor do GS.

A goma do cajueiro foi hidrofobizada com anidrido acético por Silva *et al.* (2019) na razão molar equivalente ao derivado GCAc 12, e o grau de substituição, obtido por ressonância magnética nuclear de hidrogênio, foi de 0,33, valor inferior ao obtido para este trabalho, indicando que a acilação catalisada por hidróxido de sódio leva a produtos com baixa substituição. No trabalho de Lima *et al.* (2018) a modificação da GC com anidrido acético foi realizada em meio ácido, e os valores para o GS variaram entre $0,19 \pm 0,02$ a $2,72 \pm 0,36$, dependendo das condições reacionais utilizadas.

Pitombeira *et al.* (2015) também modificou a goma do cajueiro com anidrido acético e piridina, em condição semelhante ao derivado GCAc 24, e o valor para o grau de substituição, obtido por ressonância magnética nuclear de hidrogênio, foi de 2,8, valor superior ao obtido para este trabalho.

No trabalho de Zhang *et al.* (2009), a modificação da pululana foi realizada com anidrido e piridina, nas condições reacionais equivalentes aos derivados GCAc 9 e GCAc 12 deste trabalho. Os autores obtiveram maior grau de substituição, com valores de 3,00 e 2,84, respectivamente. Embora utilizem o mesmo anidrido, a cadeia polimérica da pululana é linear,

e a cadeia da goma do cajueiro é ramificada. Logo há menor impedimento estérico na acilação da pululana e, conseqüentemente, maior eficiência da reação, refletindo em valores mais altos de GS.

A inulina foi hidrofobizada com os anidridos acético e propiônico por Walz, Hirth e Weber (2018) em condições reacionais semelhantes aos derivados GCAc 9 e GCProp 9 deste trabalho. O grau de substituição foi determinado por RMN e os valores para os derivados acilados com anidridos acético e propiônico foram, respectivamente, de 2,4 e 2,3, o que indica que não houve influência no GS com a variação da cadeia do grupo acila adicionado, diferente do obtido para a acilação da goma do cajueiro deste trabalho, onde GS para os derivados com anidrido acético foi superior ao do derivado com anidrido propiônico.

A acilação do amido foi realizada utilizando-se os anidridos acético, propiônico e butírico no trabalho de Garg e Jana (2011). O GS para os derivados do amido foi dependente do tamanho da cadeia do anidrido; os derivados acilados com anidrido butírico apresentaram menor GS que os derivados modificados com anidrido propiônico e anidrido acético, para a mesma concentração de anidrido, tendência diferente da observada para os derivados acilados da goma do cajueiro.

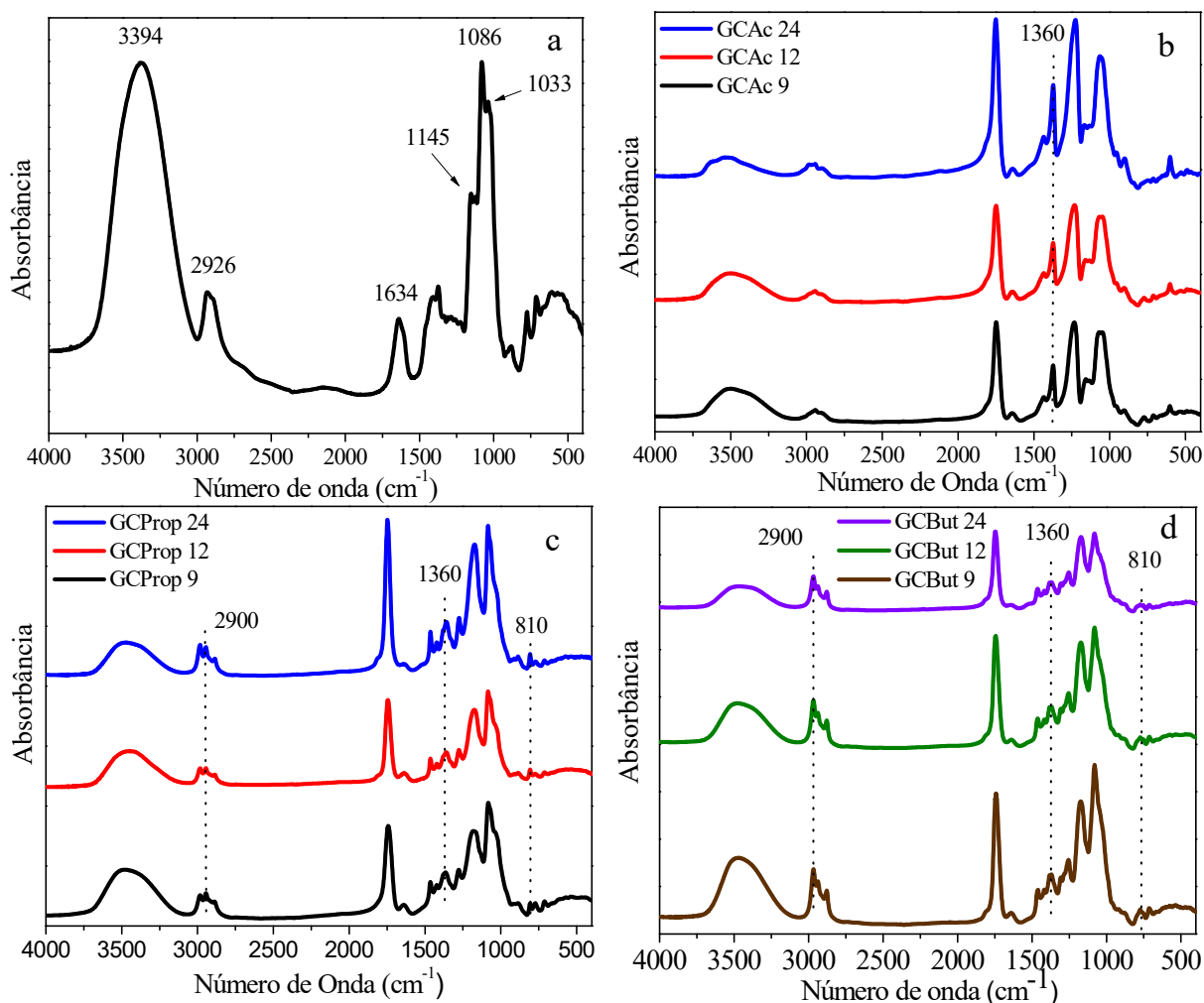
4.2 Espectroscopia Vibracional na região do Infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho para as amostras de (a) goma do cajueiro não modificada, (b) derivados modificados com anidrido acético, GCAc, (c) derivados modificados com anidrido propiônico, GCProp, e (d) derivados modificados com anidrido butírico, GCBut estão dispostos na Figura 7.

A GC sem modificação (FIGURA 7a) apresenta bandas de absorção em 3394 cm^{-1} (estiramento de hidroxila), em 2926 cm^{-1} (estiramento CH) em 1634 cm^{-1} (deformação OH da água) e em 1145 , 1086 e 1033 cm^{-1} (estiramento C-O-C da ligação glicosídica e OH de álcool).

Comparando o espectro da GC (FIGURA 7a) sem modificação com os espectros dos derivados acilados (FIGURA 7b, c, d), verifica-se o aparecimento de uma banda em 1750 cm^{-1} (estiramento C=O de carbonila), o que corrobora a ocorrência da reação de acilação.

Figura 7 - Espectros de absorção na região do infravermelho para as amostras de (a) goma do cajueiro (b) derivados modificados com anidrido acético, (c) derivados modificados com anidrido propiônico e (d) derivados modificados com anidrido butírico.



Fonte: Elaborada pela autora.

Em relação aos derivados modificados com anidrido acético, GAc, (FIGURA 7b), quanto maior a proporção molar de anidrido utilizado na síntese, maior é a intensidade da banda em 1360 cm^{-1} (deformação de CH_3), pois há a introdução de apenas um grupo CH_3 na cadeia da goma do cajueiro.

Os espectros dos derivados modificados com anidridos propiônico e butírico, GProp e GBut (FIGURA 5c e 5d) exibem bandas, respectivamente, em 1360 e 810 cm^{-1} (deformação CH_3 e CH_2), além de deformação do sinal em 2900 cm^{-1} (estiramento de grupo CH) (ZHANG et al., 2009).

A goma do cajueiro hidrofobizada com anidrido acético e o estudo relatado por

Lima *et al.* (2018), Dias *et al.* (2016) e Pitombeira *et al.* (2015), também apresentaram espectros de infravermelho com as mesmas características.

Outros polissacarídeos como pululana (ZHANG *et al.*, 2009) e dextrana (DUERAMAE *et al.*, 2017) foram modificados com anidrido acético, e o amido foi modificado com os anidridos acético (NAJAFI *et al.*, 2016 e RIBEIRO *et al.*, 2017), propiônico (HONG *et al.*, 2015) e butírico (GARG e JANA, 2011). A ocorrência da reação de acilação também foi indicada pelo aparecimento da absorção característica de carbonila de grupos éster na região do infravermelho.

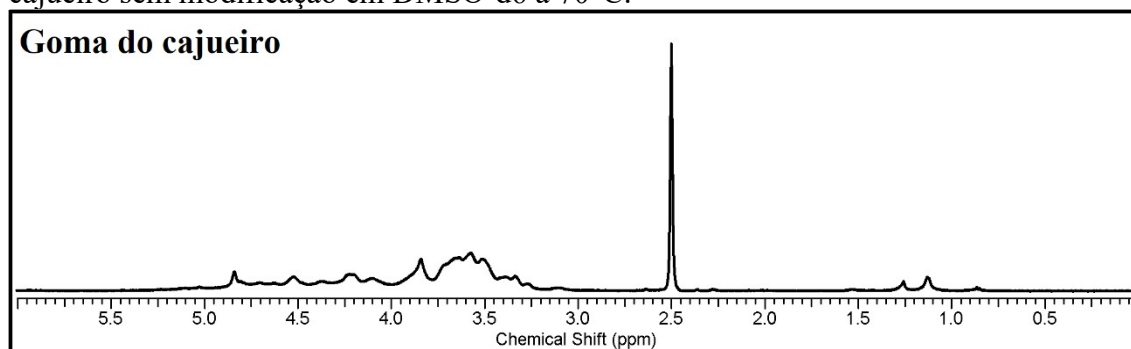
Nos derivados modificados da goma do cajueiro, à medida que se aumenta a proporção molar de anidrido utilizado na síntese do derivado, há uma diminuição da intensidade da absorção do grupo OH e um aumento da intensidade da absorção do estiramento C=O, o que sugere maior grau de substituição com o aumento da proporção de anidrido. Tendência semelhante é relatada por Zhang *et al.* (2009), Song *et al.* (2013) e Najafi *et al.* (2016).

4.3 Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear de próton (RMN-¹H) foram obtidos em DMSO-d₆. O espectro da goma do cajueiro sem modificação está disposto na Figura 8 enquanto os espectros para os derivados modificados com anidrido acético, propiônico e butírico estão, respectivamente, nas Figuras 9, 10 e 11.

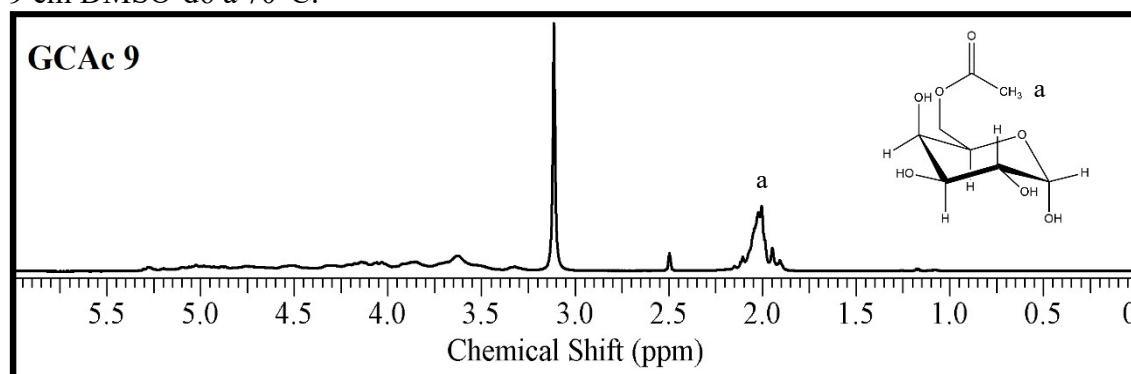
Na goma do cajueiro sem modificação (FIGURA 8), os prótons anoméricos podem ser vistos na região característica entre 4,4 e 5,0 ppm. Os sinais desta região são reportados característicos de α -D-glucose (4,95 ppm), α -L-ramnose (4,81 ppm), β -D-galactose (1 \rightarrow 3) (4,69 ppm e 4,43 ppm) e β -D-ácido glucurônico (4,51 ppm) (MOURA NETO *et al.*, 2011). O sinal em 1,2 ppm corresponde ao grupo metila (H-6) da ramnose e o sinal em 2,5 ppm é correspondente ao resíduo de solvente não deuterado (DMSO).

Figura 8 - Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio para a goma do cajueiro sem modificação em DMSO-d₆ a 70°C.



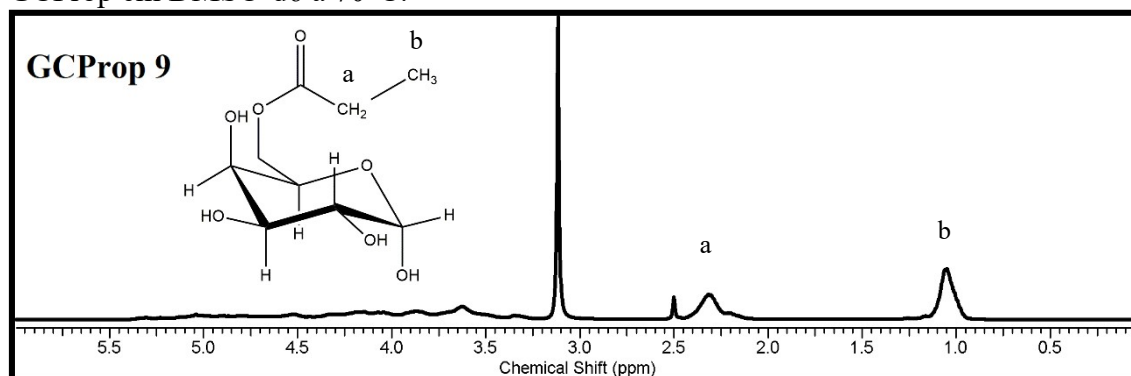
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 9 - Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio para o derivado GCAc 9 em DMSO-d₆ a 70°C.



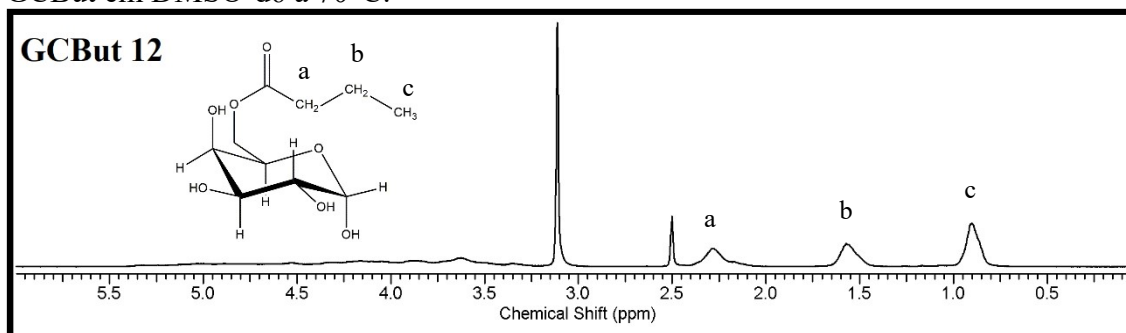
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 10 - Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio para o derivado GCProp 9 em DMSO-d₆ a 70°C.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 11 - Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio para o derivado GCBut em DMSO-d₆ a 70°C.



Fonte: Elaborada pela autora.

Comparado o espectro do derivado modificado com anidrido acético com o espectro da goma do cajueiro sem modificação, observa-se um novo sinal em 2,0 ppm para GCAC referente aos hidrogênios do grupo metila do anidrido acético (FIGURA 9).

Para o derivado CGProp, os sinais em 2,3 e 1,06 ppm são referentes aos hidrogênios do $-CH_2-$ e $-CH_3$ do grupo etila do anidrido propiônico, respectivamente (FIGURA 10). No derivado GCBut, os sinais da cadeia propílica do anidrido butírico aparecem em 2,28 e 1,57 ppm referente aos sinais relativos dos hidrogênios do $-CH_2-$ e em 0,9 ppm referente aos hidrogênios do $-CH_3$ (FIGURA 11). Este resultado corrobora com as duas novas bandas presentes nos espectros de infravermelho em 2985 e 2887 cm^{-1} para os derivados GCProp e em 2970 e 2879 cm^{-1} para os derivados GCBut, referente ao estiramento de CH dos grupos metil e metileno.

A diferença dos deslocamentos químicos observada para os sinais dos hidrogênios CH_3 entre os derivados GCAC, GCProp e GCBut pode ser atribuída ao efeito de proteção. A carbonila do grupo acil atua como um grupo retirador de elétrons, desprotegendo os hidrogênios do $-CH_3$ e fazendo com que o sinal se apresente em um campo mais baixo, com maior deslocamento químico. Com a inserção de grupos CH_2 para os derivados GCProp e GCBut, hidrogênios do grupo metila se tornam cada vez mais protegidos, sendo apresentados em deslocamentos químicos menores e com maior campo.

4.4 Análise Elementar

Na Tabela 5, estão dispostos os teores de carbono e hidrogênio da goma do cajueiro não modificada e de seus derivados acilados. A razão C/H da goma sem modificação

é inferior à razão C/H dos derivados modificados com os anidridos acético, propiônico e butírico, uma vez que há a introdução dos grupos acila após a reação de modificação. Quanto maior a razão C/H, maior a quantidade de grupos acila adicionado.

Tabela 5 - Teores de carbono e hidrogênio, quantidades molares dos elementos e razão molar C/H para a goma do cajueiro e os derivados acilados.

Amostra	C (%)	H (%)	C (g/mol)	H (g/mol)	C/H
Goma do cajueiro	34,13	6,57	2,84	6,57	0,43
GCAc 9	44,00	5,91	3,66	5,91	0,62
GCAc 12	43,18	5,81	3,59	5,81	0,62
GCAc 24	44,55	5,59	3,71	5,59	0,66
GCPop 9	45,23	6,52	3,77	6,52	0,58
GCPop 12	47,02	6,60	3,91	6,60	0,59
GCPop 24	44,99	6,24	3,74	6,24	0,59
GCBu 9	47,49	6,93	3,95	6,93	0,57
GCBu 12	48,92	7,08	4,07	7,08	0,57
GCBu 24	49,49	7,05	4,12	7,05	0,58

Fonte: Elaborada pela autora.

Para os derivados CGAc, a razão C/H é a mesma para os derivados GCAc 9 e CGAc 12, com valor de 0,62, enquanto que para o derivado GCAc 24 a razão é maior, com valor de 0,66. Estes resultados corroboram com os obtidos para a determinação do grau de substituição (seção 4.4), uma vez que há uma diferença desprezível entre o GS dos derivados GCAc 9 e GCAc 12 e uma diferença significativa entre estes e o derivado GCAc 24.

Em contrapartida, em relação aos derivados GCPop, os resultados de análise elementar e de determinação de GS divergem.

Para os derivados GCBu, não há diferença significativa entre a razão C/H dos derivados GCBu 9 e GCBu 12, com valor de 0,57, e esta é maior para o derivado GCBu 24, com valor de 0,58.

No trabalho de Oliveira (2017), a goma do cajueiro foi modificada com anidrido ftálico, variando a proporção GC:anidrido em massa, de 1:2 a 1:5 sendo determinada a razão C/H por meio de análise elementar e o grau de substituição por meio de titulação potenciométrica. Tal como para este trabalho, a razão C/H dos derivados acilados obtidos foi superior que a razão para a goma sem modificação. Entretanto, ao se comparar com o grau de

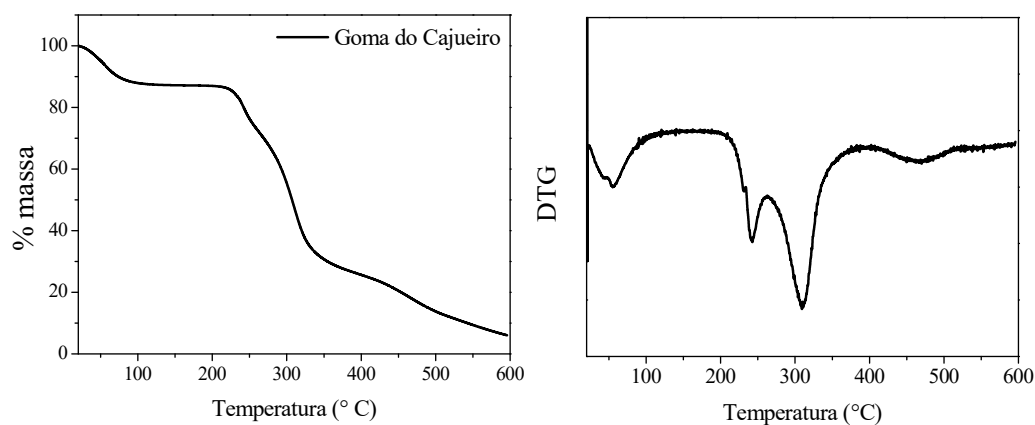
substituição, observa-se uma linearidade, onde o padrão de substituição tende a aumentar com o aumento da proporção de GC:anidrido, diferente do obtido para os derivados GCProp.

4.5 Análise Termogravimétrica

A análise termogravimétrica (TGA) é amplamente utilizada para estudar a estabilidade térmica de materiais poliméricos. Sua primeira derivada (DTG) fornece informações diretas sobre a decomposição térmica do material, onde o pico na curva de DTG representa a taxa máxima de perda de massa.

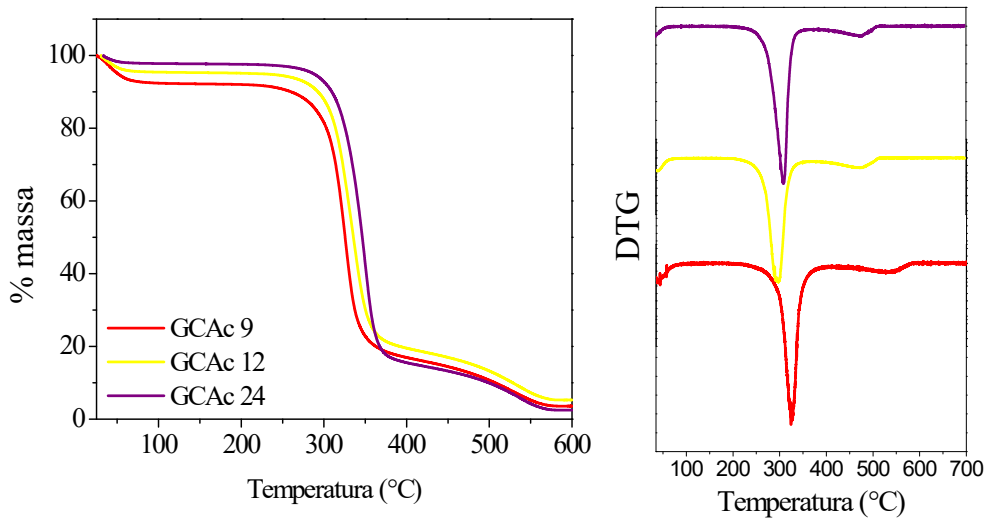
As curvas termogravimétricas e as curvas de DTG da goma do cajueiro não modificada e dos derivados acilados com anidridos acético e propiônico estão dispostos, respectivamente, nas Figuras 12, 13 e 14. Para a GC observam-se quatro eventos de perda de massa em 55, 242, 311 e 466 °C: o primeiro evento é atribuído à dessorção de umidade, o segundo e terceiro devidos à despolimerização com a liberação de água, CO e CH₄ e, por último, o quarto se relaciona à degradação da cadeia polimérica.

Figura 12 - Curvas termogravimétricas e DTG para a goma do cajueiro sem modificação em ar sintético, com taxa de aquecimento de 10 ° C/min.



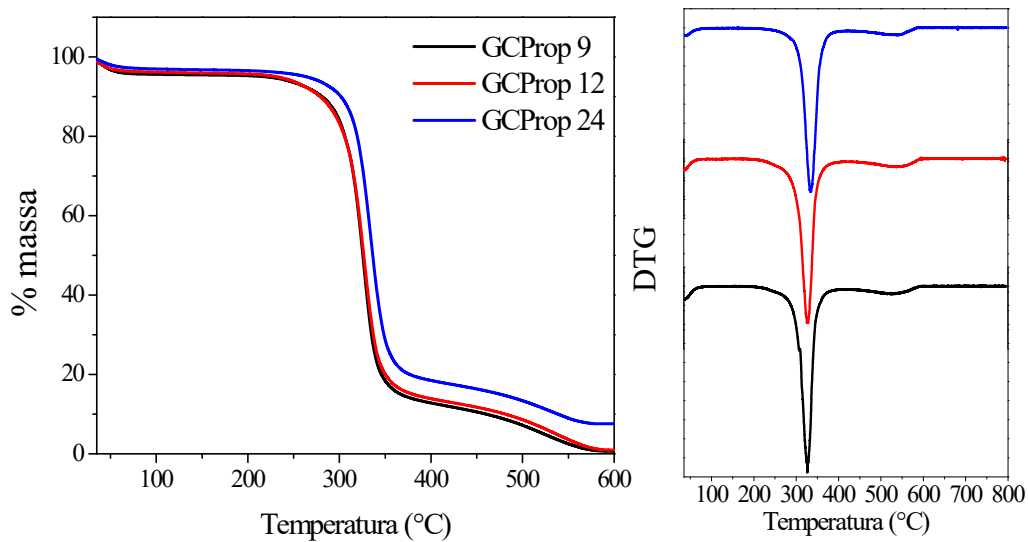
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 13 - Curvas termogravimétricas e DTG para os derivados GCAc em ar sintético, com taxa de aquecimento de 10 ° C/min.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 14 - Curvas termogravimétricas e DTG para os derivados CGProp em ar sintético, com taxa de aquecimento de 10 ° C/min.



Fonte: Elaborada pela autora.

Todos os derivados modificados apresentam apenas dois eventos de degradação térmica e estes ocorrem em temperaturas superiores ao primeiro evento de degradação da goma do cajueiro (242 °C), isto é, os produtos da reação de acilação têm maior estabilidade térmica que a goma sem modificação.

O primeiro evento para os derivados GCAC ocorreu em 324, 335 e 350 °C, com porcentagem de perda de massa de 76,1, 77,1 e 86,2%, para GCAC 9, GCAC 12 e GCAC 24, respectivamente.

Os derivados GCProp apresentaram porcentagem de perda de massa semelhantes aos derivados GCAC, nas temperaturas de 326, 328 e 332 °C, com porcentagem de perda de massa de 83,7, 83,0 e 82,5 %, para GCProp 9, GCProp 12 e GCProp 24, respectivamente.

A maltodextrina foi modificada com anidrido acético por Tupa *et al.* (2015) e Wu *et al.* (2018) e foi reportado uma temperatura mais elevada para o primeiro evento de degradação dos derivados modificados em relação ao primeiro evento de degradação do polissacarídeo sem modificação. Os autores atribuem estes resultados à condensação térmica entre as hidroxilas da cadeia da maltodextrina, que ocorre na degradação térmica em baixas temperaturas. Já para os derivados modificados, a estabilidade térmica do material aumenta com o aumento do grau de substituição, associado à substituição gradual dos grupos hidroxila por grupos acetila (TUPA *et al.*, 2015 e WU *et al.*, 2018). Tendência similar é observada no trabalho de Garg e Jana (2011), onde o amido foi modificado com os anidridos acético, propiônico e butírico. A estabilidade térmica do polissacarídeo acilado foi maior e as temperaturas de decomposição foram mais elevadas em relação ao polissacarídeo sem modificação e foram relacionadas a um maior grau de substituição.

Os derivados modificados da goma do cajueiro demonstram tendência semelhante de aumento da estabilidade térmica com o aumento da razão de anidrido adicionado, sendo mais pronunciada para os derivados GCAC e mais discreta para os derivados GCProp, corroborando os resultados obtidos para o grau de substituição.

4.6 Ensaio de Toxicidade

Ainda que vários modelos animais excelentes, tais como camundongos, ratos, coelhos e cães tenham sido utilizados recentemente em testes de toxicidade, aqueles apresentam sérias limitações (CABALLERO; CANDIRACCI, 2018). Experimentos tradicionais de avaliação da toxicidade necessitam de um número grande de animais, o que aumenta significativamente seus custos. O peixe-zebra foi utilizado neste trabalho, pois seu tamanho pequeno facilita sua manipulação e reduz os custos do experimento e é modelo animal semelhante a mamíferos em relação a estudo toxicológico (PYLATIUK *et al.*, 2014).

Na determinação de toxicidade, uma amostra cuja dose letal mediana (DL₅₀, dose necessária para matar 50% da população teste) for inferior a 1000 ppm é considerada tóxica.

Inicialmente, foi testada a goma do cajueiro sem modificação e, como esperado, esta não apresentou toxicidade, com valor de DL_{50} igual a 2473,9 ppm. Para os derivados modificados, foram testadas as condições GCAc 24, GCProp 24 e GCBut 24. Apenas o derivado GCAc 24 apresentou toxicidade ($DL_{50} = 723,23$ ppm) e os derivados GCProp 24 e GCBut 24 não foram considerados tóxicos no modelo animal de peixe-zebra.

Tomando-se por base os resultados com os derivados com maior proporção de anidrido adicionado, é razoável supor que, nas razões molares 9 e 12, os derivados GCProp e GCBut não são tóxicos.

4.7 Nanopartículas via Auto-organização

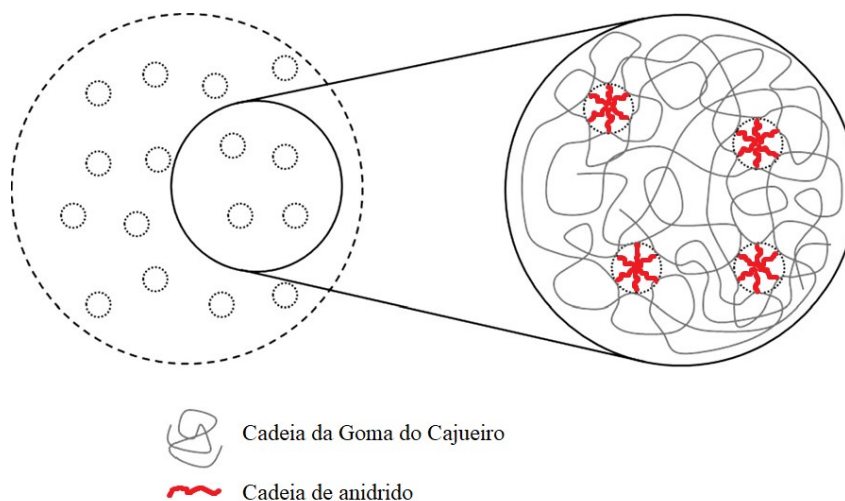
4.7.1 Tamanho de Partícula e Potencial Zeta

O tamanho de partícula é um parâmetro importante para nanocarreadores utilizados como sistemas de liberação de fármaco, pois determina tanto seu desempenho *in vivo* quanto sua estabilidade coloidal. Carreadores com partículas de tamanho pequeno apresentam menor toxicidade, quando comparados com o mesmo carreador com tamanho de partícula maior. Além disso, partículas menores tendem a acomodar melhor os fármacos (IMRAN *et al.*, 2016).

Outro fator crítico na caracterização de nanopartículas é o potencial zeta, pois este avalia a estabilidade físico-química e o comportamento do sistema em relação à presença de moléculas eletricamente carregadas. Quando o potencial zeta é relativamente elevado ($|\zeta| > 30$ mV), as forças eletrostáticas repulsivas do sistema superam as forças atrativas, características de um sistema relativamente estável, sem tendência a agregações (ROLAND *et al.*, 2003).

Uma representação esquemática da estrutura das nanopartículas de goma do cajueiro modificada é mostrada na Figura 15. Esta estrutura foi proposta para as nanopartículas levando-se em conta a grande ramificação das cadeias de goma do cajueiro e a capacidade de auto-organização em micelas das unidades monossacarídicas modificadas com os anidridos. Essas nanopartículas consistem em uma dispersão de domínios hidrofóbicos (unidades modificadas) em uma matriz hidrofílica estruturada pelas unidades restantes não modificadas da goma do cajueiro.

Figura 15 - Representação da estrutura de nanopartícula de goma do cajueiro modificada.



Fonte: Eenschooten et al. (2012, com adaptações).

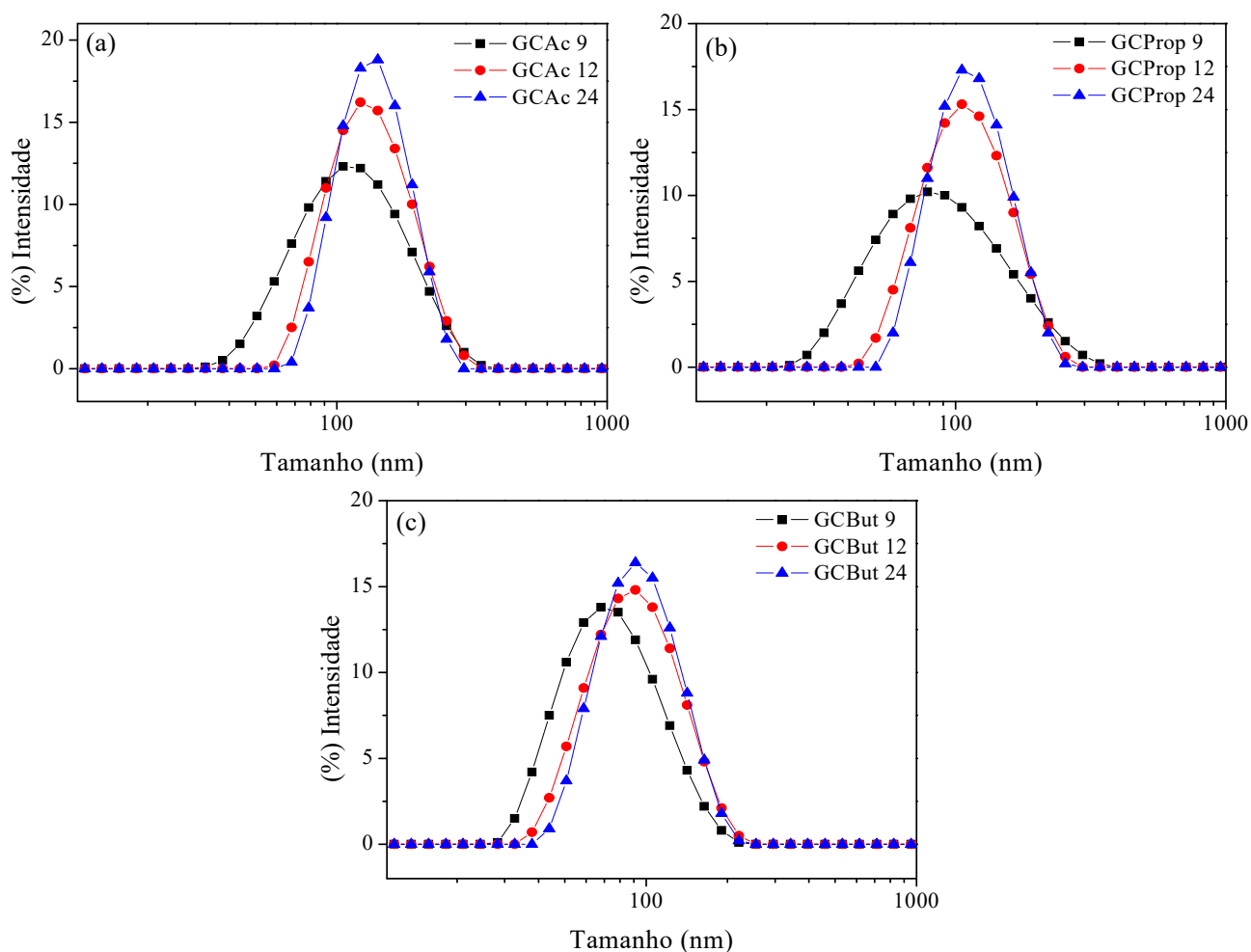
Os valores de tamanho de partícula, índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta para as nanopartículas formadas a partir dos derivados GCAc, GCProp e GCBut estão mostrados na Tabela 6. Todos os sistemas apresentaram distribuição de tamanho unimodal, sem sinais de agregação (FIGURA 16).

Tabela 6 - Tamanho de partícula, IPD e potencial zeta para as nanopartículas formadas via auto-organização.

Anidrido	Derivado	Tamanho (nm)	IPD	Potencial zeta (mV)
Acético	GCAc 9	102,8 ± 3,6	0,159	-33,6 ± 4,9
	GCAc 12	138,8 ± 2,1	0,076	-40,1 ± 0,3
	GCAc 24	131,6 ± 6,0	0,062	-41,9 ± 0,5
Propiônico	GCProp 9	85,0 ± 2,3	0,222	-41,3 ± 3,8
	GCProp 12	109,2 ± 6,7	0,145	-43,0 ± 2,6
	GCProp 24	120,3 ± 4,7	0,080	-36,5 ± 0,9
Butírico	GCBut 9	71,9 ± 5,9	0,149	-40,1 ± 2,3
	GCBut 12	76,3 ± 6,5	0,172	-41,0 ± 1,1
	GCBut 24	92,7 ± 2,8	0,130	-42,3 ± 2,1

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 16 - Distribuição de tamanho para as nanopartículas (a) GCAc, (b) GCProp e (c) GCBut.



Fonte: Elaborada pela autora.

Embora o derivado GCAc 24 tenha apresentado toxicidade no teste *in vivo* com o peixe-zebra, foram sintetizadas nanopartículas em todas as condições reacionais a fim de avaliar as características de nanopartículas formadas via auto-organização, pois este sistema pode ser utilizado para encapsulamento de outro princípio, que não para aplicação biológica.

Todos os derivados GCAc apresentaram tamanhos de partículas inferiores a 140 nm. Por um lado, ainda que GCAc 9 e GCAc 12 não apresentem graus de substituição diferentes ($1,65 \pm 0,07$ e $1,61 \pm 0,18$) respectivamente, nota-se um pequeno aumento do tamanho de partícula entre as condições GCAc 9 e GCAc 12. A diferença de GS entre GCAc 12 e GCAc 24 é pronunciada ($1,61 \pm 0,18$ e $2,21 \pm 0,002$), respectivamente, os tamanhos das nanopartículas são praticamente iguais, dentro da barra de erro.

Os valores de IPD de todas as nanopartículas GCAc foram menores do que 0,2, o que indica homogeneidade e organização destes sistemas. O sistema de NP GCAc 9

apresentou valor de IPD bastante superior comparado com as nanopartículas GCAC 24, sugerindo que o aumento da hidrofobicidade torna o sistema mais homogêneo.

Os valores de potencial zeta para os sistemas de nanopartículas GCAC foram todos negativos e seus módulos superiores a 30 mV, crescentes em relação ao aumento de anidrido na razão reacional.

Nos trabalhos de Dias *et al.* (2016) e Pitombeira *et al.* (2015) nanopartículas de goma do cajueiro modificada com anidrido acético foram sintetizadas via auto-organização em sistema de diálise utilizando os solventes acetona e DMSO, respectivamente. Com grau de substituição equivalente à condição GCAC 24, os tamanhos de partícula foram expressivamente superiores em acetona ($302,0 \pm 0,9$ nm) e com tamanho de partícula semelhante ao sistema em DMSO (179 nm). A diferença de tamanho entre os sistemas com acetona e DMSO se deve à diferença entre as interações polímero-solvente e água-solvente, alterando o processo de difusão da água e, conseqüentemente, induzindo mudanças no tamanho médio das partículas (GALINDO-RODRIGUEZ *et al.*, 2004).

Nanopartículas formadas por complexação polietrolítica de goma do cajueiro modificado com anidrido acético e insulina foram descritas por Silva *et al.* (2019). A confirmação da formação das nanopartículas foi dada pela presença do efeito de Tyndall, a partir da dispersão de luz, formando uma solução opalescente. A distribuição de tamanho, assim como para as nanopartículas deste trabalho foi unimodal. No entanto o tamanho obtido foi bastante superior, com valor de 470 nm (SILVA *et al.*, 2019).

Outra metodologia proposta para síntese de nanopartículas modificadas é a nanoprecipitação. Acevedo-Guevara *et al.* (2018) produziram nanopartículas a partir de amido acilado e, ainda que estas tenham valor de grau de substituição mais baixo (0,33) em comparação com as nanopartículas GCAC, o tamanho de partícula reportado no trabalho foi relativamente próximo (190 nm). Por outro lado, Zhang *et al.* (2009) produziram nanopartículas por nanoprecipitação a partir de pululana modificada com anidrido acético com grau de substituição equivalente ao das nanopartículas GCAC 9 e GCAC 12, obtendo valores de tamanho de partícula bastante superiores (367,5 e 423 nm) ao deste trabalho.

Para o segundo sistema de nanopartículas (GCProp), verifica-se um aumento do tamanho de partícula e diminuição de IPD com o aumento da proporção de anidrido na reação, apesar de não ser refletido no aumento do grau de substituição. O índice de polidispersão para estes sistemas diminuiu com o aumento da razão de anidrido adicionado, da mesma maneira que para as nanopartículas GCAC. O mesmo efeito também é verificado para as nanopartículas de amido produzidas por Paulos *et al.* (2016), sendo justificado pelo

autor devido as ligações de hidrogênio desorganizadas para os derivados menos substituídos na fase aquosa, resultando em um aumento da desordem do sistema.

O potencial zeta para as nanopartículas GCProp apresentaram valores negativos e variando de 36,5 a 43,0 mV, em módulo. Não se observa nenhuma tendência com o aumento da razão de anidrido adicionado.

Quanto maior for o potencial, mais provável que a suspensão seja estável, pois as partículas carregadas se repelem umas às outras e esta força supera a tendência natural à agregação (MALVERN, 2014), o que indica que as nanopartículas GCProp são sistemas bastante estáveis. Os valores negativos apresentados para o potencial zeta pode ser atribuído a presença de hidroxilas na superfície das nanopartículas (RIBEIRO *et al.*, 2017).

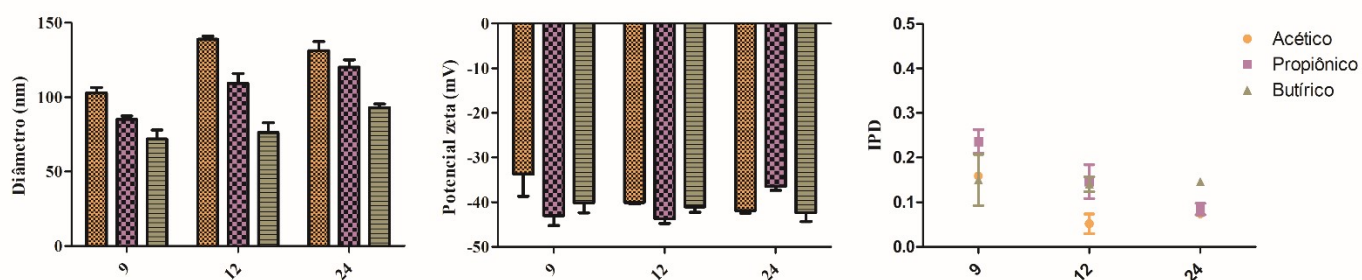
Ao avaliar as NP's formadas a partir do derivado GCBut, o tamanho de partícula apresentou diferenças significativas entre os sistemas GCBut 9 e GCBut 24 ($71,9 \pm 5,9$ e $92,7 \pm 2,8$). O mesmo comportamento foi observado para as nanopartículas GCProp.

Para o índice de polidispersão, os valores foram inferiores a 0,2, porém não se observa nenhuma regularidade em relação a razão de anidrido adicionada. O potencial zeta médio foi de aproximadamente -41 mV, o mesmo observado para os sistemas de nanopartículas GCAC e GCProp.

O ácido hialurônico foi modificado com anidrido succínico octenil no trabalho de Mayol *et al.*, (2014), com grau de substituição de 0,24, e as nanopartículas obtidas por auto-organização tiveram tamanho médio de 400 nm. O amido foi modificado também com o mesmo anidrido por Jiang *et al.* (2016), e os valores de GS obtidos foram de 0,024 e 0,036. Apesar desse baixo grau de substituição, as nanopartículas formadas por auto-organização tiveram tamanho superior (295 e 493 nm), quando comparadas às nanopartículas de GC modificada deste trabalho.

Analisando os nove sistemas de nanopartículas em conjunto (FIGURA 17), nota-se que todos apresentam tamanho de partícula inferior a 200 nm, adequado para sistemas injetados via endovenosa sem que haja embolização (HICKEY *et al.*, 2015).

Figura 17 - Tamanho de partícula, IPD e potencial zeta para as nanopartículas formadas via auto-organização.



Fonte: Elaborada pela autora.

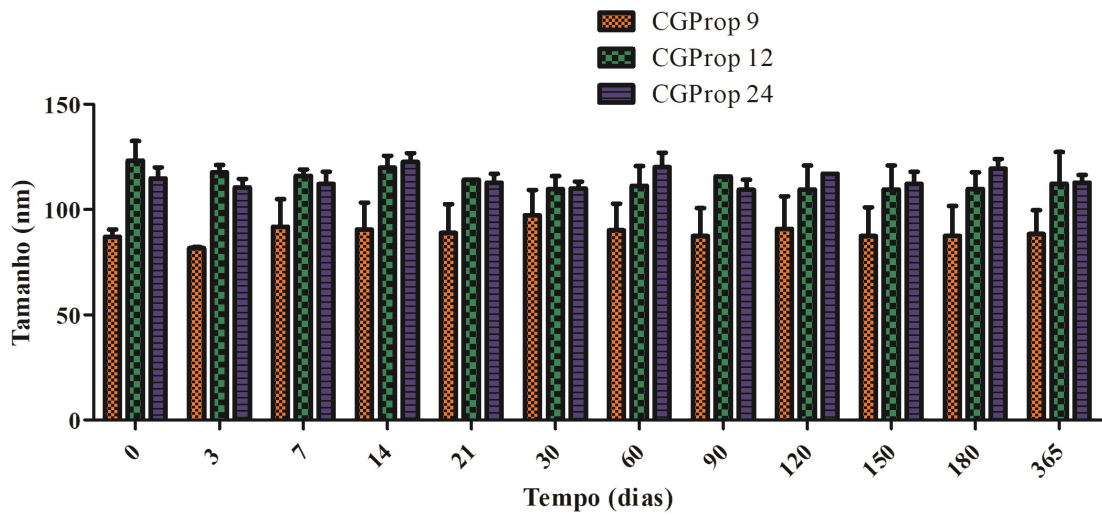
As nanopartículas GCAC apresentaram os maiores tamanhos de partícula, seguidas pelas GCProp e GCBut. Os valores de potencial zeta foram menores, em módulo, nas três condições de acilação para as nanopartículas GCAC, seguido das nanopartículas GCBut e GCProp.

4.7.2 Estabilidade Estoque

A vida de prateleira é considerada o intervalo de tempo durante o qual um produto farmacêutico, se estocado corretamente, mantém suas especificações. A vida-média é usada para estabelecer o prazo de validade de cada produto. Para produtos que devem ser estocados em refrigerador, os estudos de estabilidade de longa duração devem ser realizados à 5 ± 3 °C (BRASIL, 2010). A fim de se avaliar a estabilidade coloidal das nanopartículas acondicionadas sob refrigeração (4 ± 2 °C) em solução aquosa ao longo do tempo, foi realizado o estudo de estabilidade estoque.

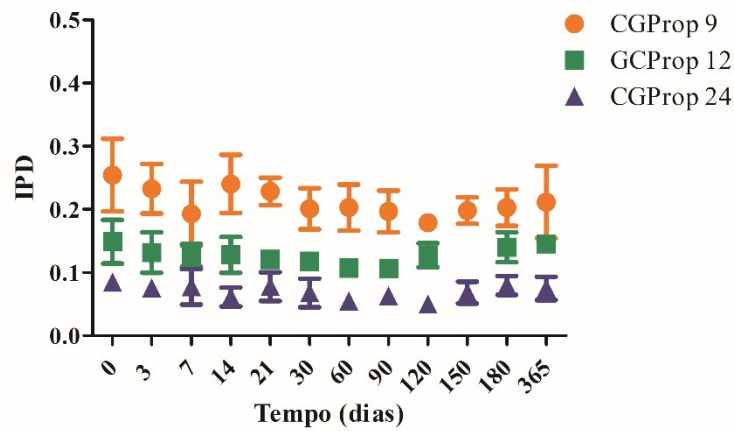
Os gráficos de tamanho de partícula e índice de polidispersão em função do tempo para as nanopartículas GCProp estão nas Figuras 18 e 19 e para as nanopartículas GCBut nas Figuras 20 e 21.

Figura 18 - Tamanho de partícula em função do tempo para as nanopartículas GProp acondicionadas sob refrigeração (4 ± 2 °C).



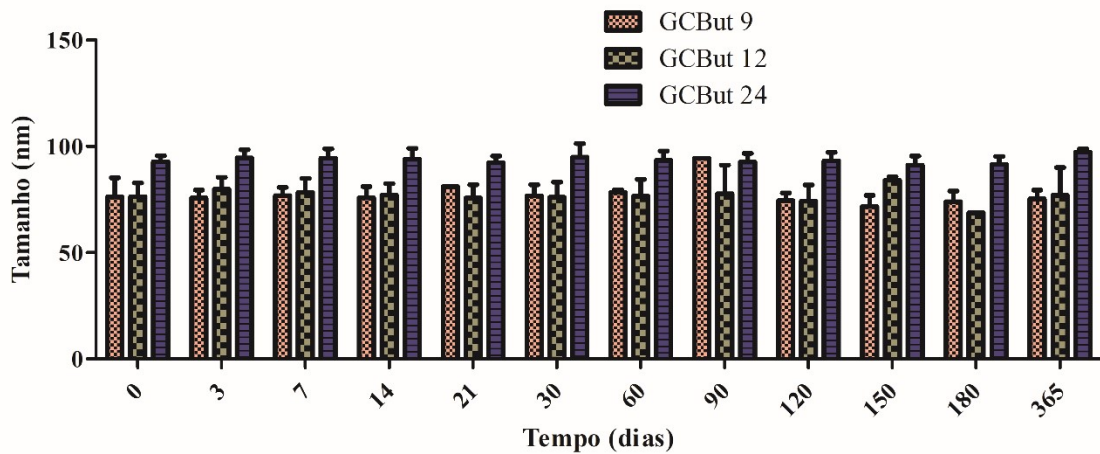
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 19 - Índice de polidispersão em função do tempo para as nanopartículas GProp acondicionadas sob refrigeração (4 ± 2 °C).



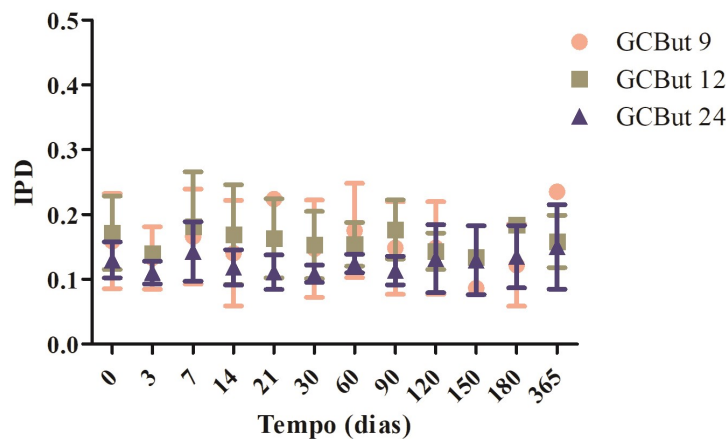
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 20 - Tamanho de partícula em função do tempo para as nanopartículas GCBut acondicionadas sob refrigeração (4 ± 2 °C).



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 21 - Índice de polidispersão em função do tempo para as nanopartículas GCBut acondicionadas sob refrigeração (4 ± 2 °C).



Fonte: Elaborada pela autora.

Os sistemas foram monitorados durante um ano. De maneira geral, nota-se que todas as nanopartículas tiveram comportamento bastante semelhante e se mantiveram estáveis durante todo o experimento. Os tamanhos de partículas não variaram significativamente. Os valores para os sistemas GCPop 9 ($93,6 \pm 11,6$ e $88,4 \pm 11,3$), GCPop 12 ($123,3 \pm 9,3$ e $112,3 \pm 14,9$), GCPop 24 ($114,8 \pm 5,2$ e $112,8 \pm 3,6$), GCBut 9 ($76,2 \pm 8,9$ e $75,3 \pm 4,1$), GCBut 12 ($76,3 \pm 3,5$ e $76,8 \pm 13,2$) e GCBut 24 ($92,7 \pm 2,8$ e $97,3 \pm 1,5$) para os tamanho de partícula inicial e após um ano de estoque, respectivamente. Todos os sistemas de nanopartículas permaneceram unimodais e sem sinais de agregação.

Analisando os gráficos de IPD, as nanopartículas GCProp permaneceram durante todo o experimento ($t = 365$) com a mesma tendência observada na caracterização inicial das nanopartículas com valores baixos de índice de polidispersão, menores do que 0,3.

Para as nanopartículas GCBut não se verifica uma tendência clara de variação de IPD com a hidrofobicidade dos sistemas, de modo que os valores permanecem semelhantes, dentro da faixa de erro.

As nanopartículas GCProp e GCBut, em todas as razões de anidrido, permaneceram físico-quimicamente estáveis sob refrigeração por um período bastante prolongado, o que potencializa sua aplicação como sistema de liberação de fármacos.

Nanopartículas de goma do cajueiro e ácido acrílico foram monitoradas por um período de um mês em relação ao tamanho de partícula. Partículas com menor razão goma/ácido acrílico mostraram melhor estabilidade, com valores permanecendo abaixo de 150 nm ao longo do experimento. Ao se quadruplicar a razão, os valores de tamanho de aproximadamente 600 nm, no primeiro dia aumentaram para aproximadamente 800 nm ao final dos 30 dias (SILVA *et al.*, 2009).

Outras nanopartículas sintetizadas à base de polissacarídeo também se mostraram estáveis por períodos menores. Nanopartículas de quitosana e sulfato de condroitina estocadas sob refrigeração (4 ± 2 °C) tiveram seu tamanho de partícula e potencial zeta monitorados durante um mês e nenhuma variação significativa foi observada para o tamanho ou potencial zeta (RODRIGUES *et al.*, 2015).

Nanopartículas de pululana modificada exibiram alta estabilidade estoque devido à introdução do colesterol, um grupo hidrofóbico que favorece a auto-organização e, por consequência, a formação de estruturas mais compactas e rígidas, com estabilidade aumentada (WANG *et al.*, 2014).

Nanomicelas de quitosana enxertadas com poli-lactídeo não apresentaram modificações significativas na distribuição do tamanho de partícula por um período de 15 dias, nas temperaturas estudadas de 4 e 25 °C (GE *et al.*, 2015).

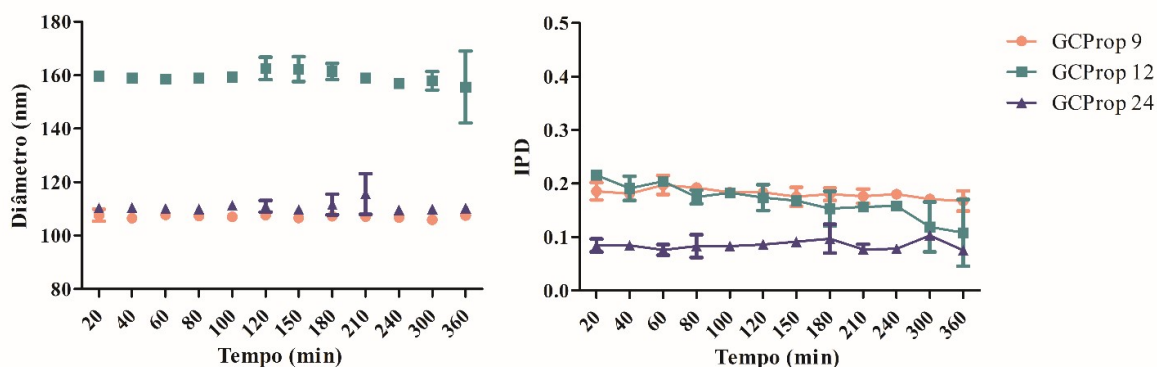
4.7.3 Estabilidade em Tampão HEPES

Soluções aquosas de eletrólitos simples são sistemas no quais a estabilidade coloidal de nanopartículas pode ser efetivamente quantificada. A estabilidade é determinada a partir do comportamento entre partículas, resultado de forças intermoleculares, como forças de van der Waals, repulsão da dupla camada elétrica e forças estruturais. O balanço dessas

forças determina a estabilidade coloidal de nanopartículas em solução aquosa (MOORE *et al.*, 2015).

Os ensaios de estabilidade foram realizados com solução de ácido piperazina eteno sulfônico (HEPES) 10 mmol/L e pH 7,4, um agente tampão orgânico zwitteriônico utilizado em cultura de células e considerado uma das 20 soluções tampão ideais para pesquisa em biologia e bioquímica. Os gráficos de estabilidade em função da variação de tamanho e IPD para os sistemas formados pelas as nanopartículas GCProp está na Figura 22.

Figura 22 - Tamanho de partícula e IPD para as nanopartículas GCprop em função do tempo em tampão HEPES 10 mmol/L (pH 7,4) a 37 ° C.



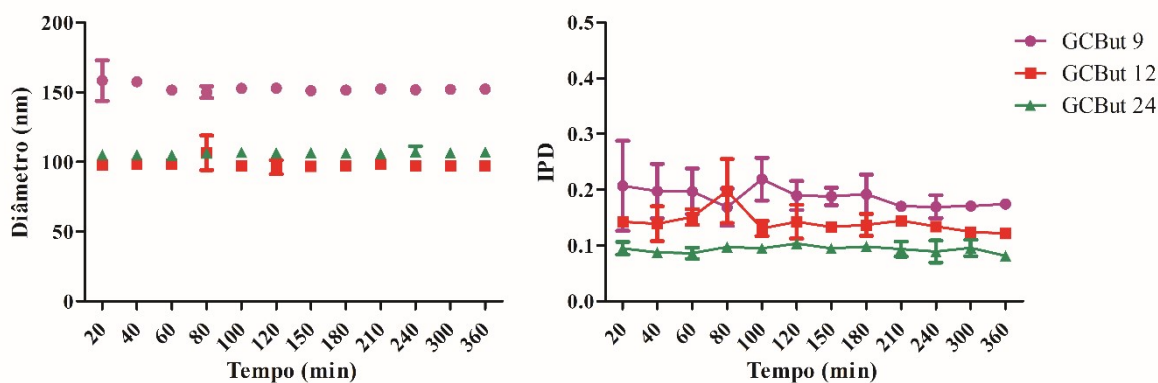
Fonte: Elaborada pela autora.

A partir da análise dos gráficos da Figura 22, nota-se que os sistemas de nanopartículas GCProp não sofreram variações consideráveis no tamanho de partícula quando em meio tamponado, HEPES 10 mmol/L (pH 7,4), tendo valores inferiores à 200 nm durante todo o ensaio. A variação de temperatura do sistema também não teve influência sobre qualquer mudança no volume hidrodinâmico, que inicialmente estava a temperatura ambiente e posteriormente foi mantida à 37 °C por seis horas.

Ao avaliar os índices de polidispersão para todos os três sistemas de nanopartículas, os valores se mantiveram abaixo de 0,25, sendo as nanopartículas GCProp 24 o sistema mais homogêneo e organizado em função do tempo.

Os gráficos de estabilidade em função da variação de tamanho e IPD e a distribuição de tamanho para os sistemas contendo as nanopartículas GCBut pode ser visto na Figura 23, ambos em tampão HEPES 10 mmol/L (pH 7,4).

Figura 23 - Tamanho de partícula e IPD para as nanopartículas GCBut em função do tempo em tampão HEPES 10 mmol/L (pH 7,4) a 37 ° C.

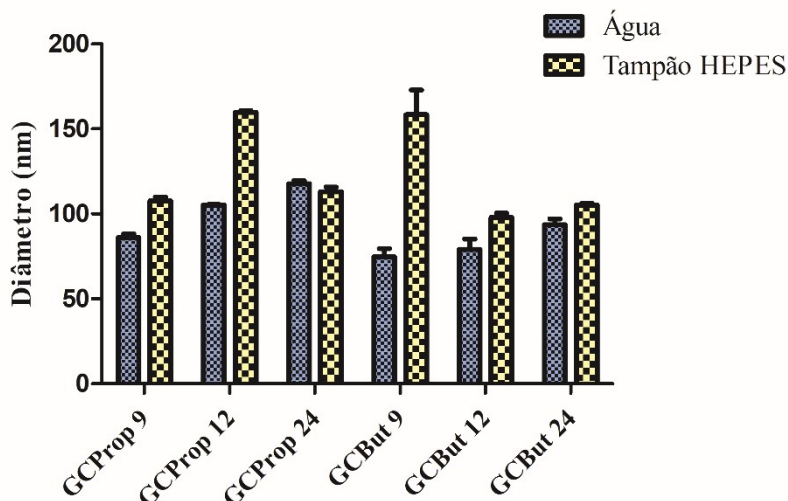


Fonte: Elaborada pela autora.

Do mesmo modo que para os sistemas GCProp, as nanopartículas GCBut não apresentaram mudanças no tamanho de partícula ao longo do tempo. Avaliando o índice de polidispersão, se verifica variações pequenas para os sistemas GCBut 9 e GCBut 12, enquanto que para as nanopartículas GCBut 24 praticamente não se observa diferença nos valores de IPD, isso indica que o aumento da hidrofobicidade, refletido no aumento do GS, influencia significativamente na estabilidade e organização do sistema.

A fim de avaliar a interação do tampão com a nanopartículas foi construído um gráfico com os tamanhos de partícula para os sistemas em água e após 20 min em contato com o tampão HEPES (FIGURA 24).

Figura 24 - Tamanho de partícula em água e após 20 min de contato com tampão HEPES para as nanopartículas modificadas com os anidridos propiônico e butírico.



Fonte: Elaborada pela autora.

Para todos os três sistemas de nanopartículas GCBUT e GCProp 9 e GCProp 12 foi possível observar um aumento do tamanho de partícula após o contato com o tampão HEPES, sendo bastante pronunciado para as nanopartículas GCProp 12 e GCBUT 9. Variações de tamanho após a incubação em meio com força iônica alta são comuns, e normalmente atribuídos à redução eletrostática entre as partículas (MOORE *et al.*, 2015).

O aumento pronunciado para as nanopartículas GCProp 12 e GCBUT 9, ao estarem em contato com tampão HEPES, pode ser atribuído também aos menores valores de GS ($1,15 \pm 0,09$ e $1,12 \pm 0,02$) o que faz com que mais hidroxilas estejam disponíveis para interagirem com os sais do tampão, provocando efeito de intumescimento e, por consequência, aumento do volume hidrodinâmico da partícula. Esse aumento só se observa para o primeiro ponto do gráfico de estabilidade ($t = 20$ min), tendo os demais tempos tamanhos de partícula bastante semelhante.

As NP's GCBUT 12 e GCBUT 24 não apresentaram modificações consideráveis quando comparados os seus tamanhos em água e em tampão, sendo eles de $76,3 \pm 6,1$ nm e $97,86 \pm 3,5$ nm em água e $92,7 \pm 2,5$ nm e $105,2 \pm 0,9$ nm em tampão, respectivamente.

A estabilidade de outros sistemas nanoparticulados compostos de polissacarídeos também foi estudada em diferentes condições. Nanopartículas de quitosana e alginato se mostraram estáveis quando colocadas em solução de tampão acetato (pH 4,3) à temperatura de 37°C por um período de 80 min (GOYCOOLEA *et al.*, 2009).

Conjugados de carragenana carboximetilada e gelatina foram avaliados em solução tampão fosfato pH 7,4 em três condições, à temperatura ambiente (30 ± 2 °C), sob refrigeração (4 ± 2 °C) e em temperatura elevada (70 ± 2 °C). Os sistemas se mostraram estáveis nas duas primeiras condições. Em altas temperaturas, as variações de tamanho de partícula e IPD foram justificadas devido a degradação do polímero. Os autores não mencionaram interação das nanopartículas com o tampão (APARNA *et al.*, 2018). A estabilidade de nanopartículas de quitosana sulfatada por Sandhya *et al.* (2018) também foi avaliada nas mesmas condições que Aparna *et al.*, (2018) e foram reportados resultados semelhantes. Para as nanopartículas modificadas de goma do cajueiro deste trabalho, o aumento da temperatura não foi suficiente para degradar os sistemas estudados e levar à agregação.

A estabilidade de nanopartículas de quitosana enxertada com poli-lactídeo foi avaliada em meio fisiológico à 37 °C por um período de 40 dias e elas apresentaram um expressivo aumento do tamanho de partícula entre os dias 6 e 16 de ensaio, sendo este justificado pelos autores através da agregação causado pela mudança nas propriedades elétricas da superfície das nanopartículas pela interação com íons cloreto da solução fisiológica (DI MARTINO; SEDLARIK, 2014).

4.7.4 Incorporação da Anfotericina B

A eficiência de encapsulamento (EE) tem sido uma das características mais importantes para sistemas de liberação de fármacos baseados em nanopartículas e seu resultado define o sucesso da terapia. O aumento da EE faz com que os sistemas carreadores possam liberar a droga por um período de tempo maior. Isso mantém os níveis ótimos de concentração de fármaco no plasma por um período maior de tempo, eliminando assim a necessidade de dosagens mais frequentes e sua toxicidade associada (IMRAN *et al.*, 2016).

Os valores percentuais de eficiência de encapsulamento da anfotericina B, obtidos por UV-vis, e os tamanhos de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta para as nanopartículas GCProp e GCBut estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Eficiência de encapsulamento, tamanho de partícula, IPD e potencial zeta para as nanopartículas com AmB encapsulada.

NP	Tamanho (nm)	IPD	Potencial Zeta (mV)	Eficiência de encapsulamento (%)
GCPprop 9	140,2 ± 8,5	0,319	-24,4 ± 2,8	78,5 ± 4,1
GCPprop 12	134,8 ± 4,0	0,171	-36,9 ± 1,2	85,8 ± 5,9
GCPprop 24	167,4 ± 7,9	0,159	-39,3 ± 2,0	94,4 ± 1,3
GCBut 9	122,9 ± 1,8	0,314	-28,1 ± 7,4	88,1 ± 5,0
GCBut 12	1420 ± 100	0,415	-23,8 ± 1,2	57,8 ± 0,9
GCBut 24	1253 ± 6,4	0,309	-29,9 ± 4,5	96,3 ± 4,6

Fonte: Elaborada pela autora.

Os valores de eficiência de encapsulamento variaram entre $57,8 \pm 0,9$ a $96,3 \pm 4,6$ % e apenas para as nanopartículas GCPprop se observa o aumento da EE com o aumento da razão de anidrido. Esse efeito era esperado também para os sistemas de nanopartículas GCBut, pois o aumento da porção hidrofóbica da nanopartícula possibilitaria uma maior interação com o anfotericina B. Por consequência, mais fármaco encapsulado. Tendência do aumento da eficiência de encapsulamento com o aumento do grau de substituição foi reportada também no trabalho de Gilani *et al.*, (2011).

Micelas de policarbonato foram sintetizadas por Wang *et al.* (2016) para o encapsulamento da AmB. Os autores partiram de uma massa inicial de 5 mg de fármaco, obtendo percentual de eficiência de encapsulamento máximo de $76,4 \pm 1,4$ %, o que significa que 3,82 mg de AmB foi incorporada às nanopartículas. Comparando com as nanopartículas de goma do cajueiro hidrofobizada, e considerando valor de EE máximo de $96,3 \pm 4,6$ %, a massa de AmB incorporada foi de 4,8 mg, valor superior ao observado por Wang *et al.*, (2016), indicando um excelente encapsulamento para as nanopartículas de goma do cajueiro hidrobobizada. Já Jabri *et al.* (2018), partindo também de uma massa inicial de 5 mg de AmB, obteve nanopartículas de lecitina e goma tragacanto com valores percentuais de EE de $86,5 \pm 1,3$ e $78,9 \pm 2,4$ %, semelhantes aos obtidos para as nanopartículas GCPprop 12 e GCPprop 9, respectivamente.

De maneira geral, elevados valores de eficiência de encapsulamento da AmB foram descritos na literatura. Nanopartículas de quitosana sulfatada sintetizadas por Sandhya *et al.* (2018) tiveram um valor de EE de $89 \pm 0,4$ %. Nanopartículas de quitosana ancoradas em PLGA para o encapsulamento duplo de fármaco tiveram EE de $70,2 \pm 4,8$ e $93,9 \pm 2,6$ % para AmB e doxorubicina, respectivamente (SINGH *et al.*, 2016). Conjugados de

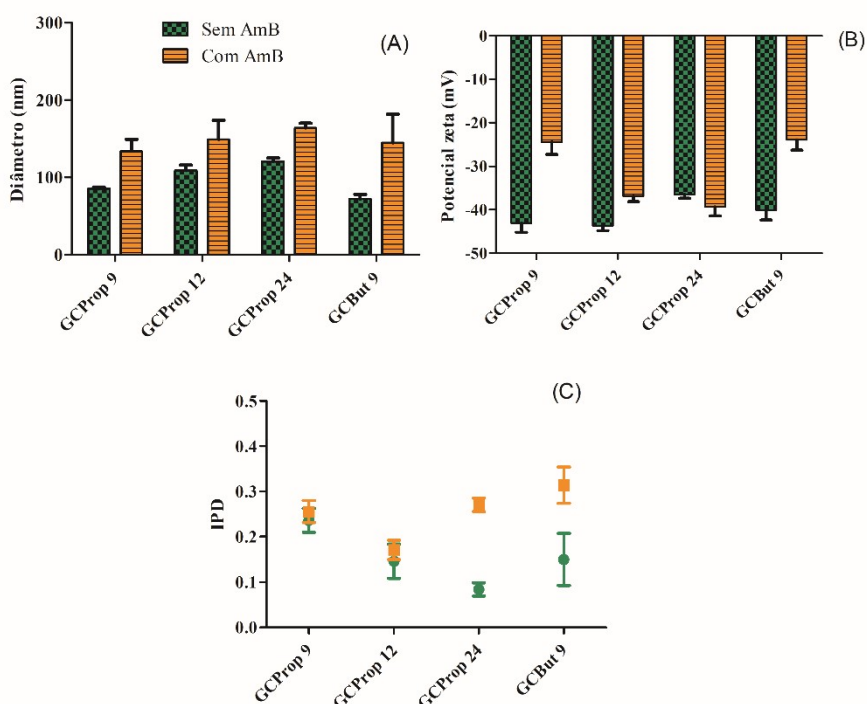
carragenana carboximetilada e gelatina, produzidos por Aparna *et al.* (2018), obtiveram percentual de EE máxima de $78 \pm 0,7$ %. Quitosana funcionalizada com caprolactona foi utilizada como material de partida de nanopartículas por nanoprecipitação, sendo o valor de EE de 70% (MARCANO *et al.*, 2018). Esses dados reforçam a eficiência de sistemas carreadores de fármacos formados por polissacarídeos, além de outras vantagens, como a biocompatibilidade e a proteção do fármaco.

Os tamanhos de partícula após o encapsulamento da AmB foram menores do que 350 nm para todos os sistemas de nanopartículas GCProp e apenas para as nanopartículas GCBut 9, o que as torna adequadas para aplicações biomédicas (NAJAFI *et al.*, 2016). Já os sistemas de nanopartículas GCBut 12 e GCBut 24 tiveram tamanhos maiores que 1 μm , apresentando-se na forma de agregados e indicando que estes sistemas não comportam de maneira eficiente a AmB.

Para o IPD, apenas as nanopartículas GCProp 12 e GCProp 24, sistemas mais hidrofóbicos, tiveram valores menores do que 0,2, reforçando que o aumento da hidrofobicidade mantém o sistema homogêneo, mesmo após o encapsulamento. Já para os sistemas menos hidrofóbicos, as nanopartículas GCProp 9 e GCBut 9, os valores de IPD foram bastante próximos (0,319 e 0,314) o que sugere que apesar dos sistemas não apresentarem agregações, o encapsulamento da AmB pode levar a sistemas dispersos. Os altos valores de IPD para as nanopartículas GCBut 12 e GCBut 24 já era esperado, por estarem na forma de agregados. Todos os valores de potencial zeta se apresentaram negativos, mesmo após o encapsulamento.

Analisando os sistemas de nanopartículas antes e após o encapsulamento (FIGURA 25), é possível verificar o aumento do tamanho de partícula após o encapsulamento da AmB. Isto ocorre provavelmente devido a interferências eletrostáticas do fármaco com a cadeia polimérica, que ocorrem durante a formação das nanopartículas com a AmB (DI MARTINO; SEDLARIK, 2014). O mesmo foi registrado por Wang *et al.* (2016) e Souza *et al.* (2015).

Figura 25 - Comparação do (a) tamanho de partícula, (b) potencial zeta e (c) IPD entre as nanopartículas com e sem AmB.



Fonte: Elaborada pela autora.

No trabalho de Pitombeira *et al.* (2015) tendência oposta foi reportada para nanopartículas de goma do cajueiro modificada com anidrido acético, onde o tamanho após o encapsulamento da indometacina foi menor do que para as nanopartículas livre de fármaco, com valores de 140 nm e 179 nm, respectivamente, apesar de serem formadas também por auto-organização.

Para os sistemas de nanopartículas, verifica-se uma diminuição do valor médio de potencial zeta quando comparados antes do encapsulamento da AmB para as nanopartículas GCProp (- 40,5 ± 3,7 mV) e GCBut (- 41,3 ± 1,1 mV) e após o encapsulamento da AmB para as nanopartículas GCProp (- 35,4 ± 4,8 mV) e GCBut (- 28,4 ± 1,33 mV). O mesmo efeito acontece para as nanopartícula de PLGA (SOUZA *et al.*, 2015), o que sugere a presença de moléculas de AmB adsorvidas na superfície da nanopartícula interagindo com as hidroxilas da goma do cajueiro, levando a uma diminuição, em módulo, do potencial elétrico.

O sistema de nanopartículas GCProp 24 se apresenta com maior potencial zeta em relação as outras nanopartículas encapsuladas (- 39,3 ± 2,0 mV), e ao se analisar o valor de eficiência de encapsulamento para este sistema, é possível verificar um valor de 94,4 ± 1,3 %, bastante próximo do encapsulamento máximo, o que sugere que não existem cadeias de AmB residuais suficientes interagindo com a estrutura hidrofílica da goma do cajueiro na

nanopartícula para diminuir, em módulo, o valor do potencial zeta.

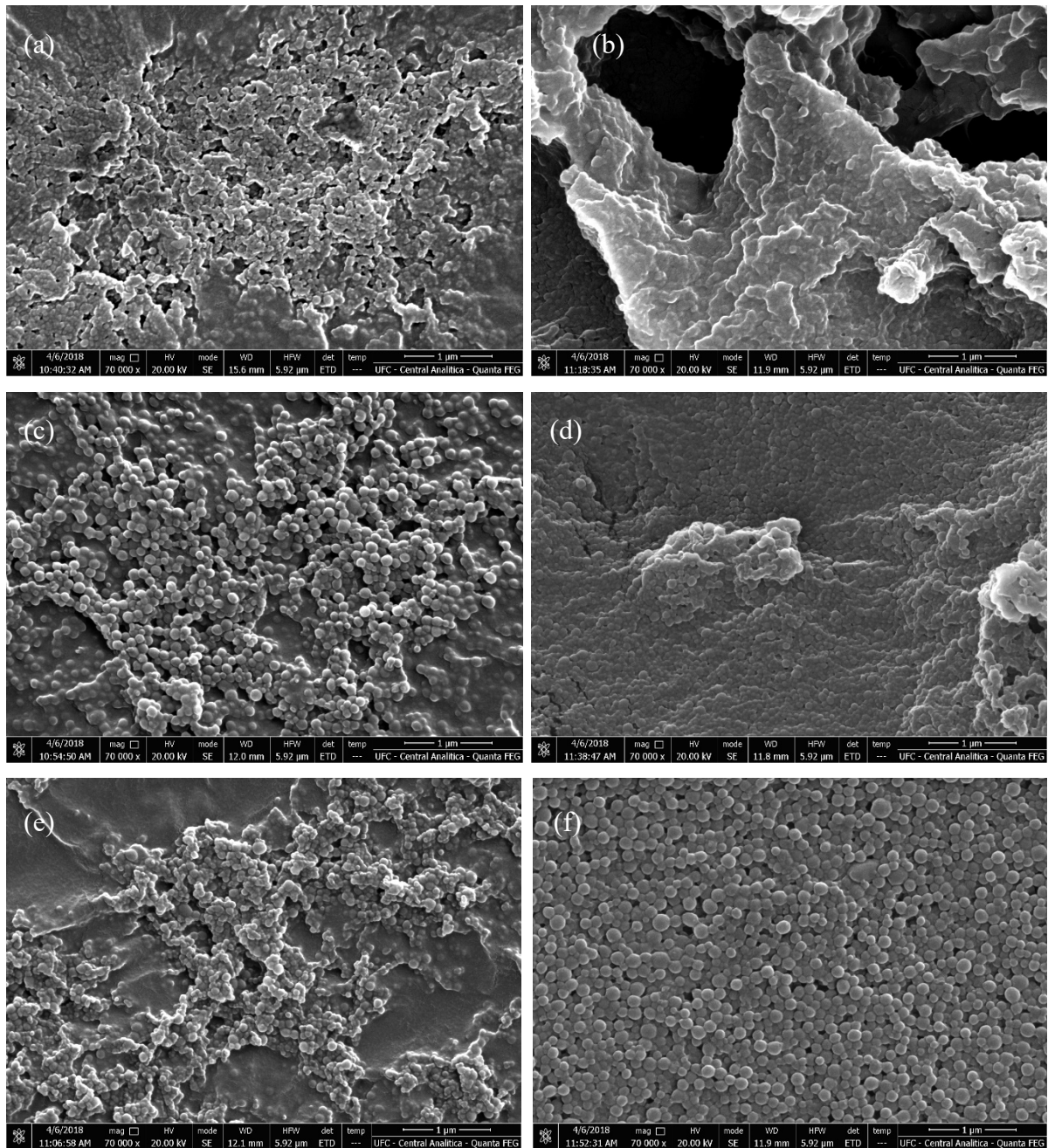
O aumento do valor de IPD após o encapsulamento (FIGURA 26c) é mais discreto para as nanopartículas GCProp 9 e GCProp 12, e bastante pronunciado para as nanopartículas GCProp 24 e GCBUT 9.

4.7.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Nas Figuras 26 e 27 é possível observar as imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) para as nanopartículas GCProp e GCBUT, respectivamente. As micrografias das nanopartículas sem AmB estão à esquerda e com AmB encapsuladas à direita. Os valores para os tamanhos de partículas obtidos através do MEV e do espalhamento dinâmico de luz (DLS) estão presentes na Tabela 8.

Todos os sistemas de nanopartículas GCProp se apresentam esféricas e com superfície lisa. A micrografia para as nanopartículas GCProp 9 + AmB (FIGURA 26b) evidencia um sistema agregado, com as nanopartículas aglomeradas em um único bloco. Isto pode ser justificado através do preparo da amostra, onde é gotejada a solução de nanopartículas no porta-amostras e a gota é seca em temperatura ambiente. O processo de secagem faz com que água evapore de “fora para dentro” da gota, arrastando as nanopartículas e promovendo a agregação.

Figura 26 - Micrografias para as nanopartículas (a) GCProp 9, (b) GCProp 9 + AmB, (c) GCProp 12, (d) GCProp 12 + AmB, (e) GCProp 24 e (f) GCProp 24 + AmB.



Fonte: Elaborada pela autora.

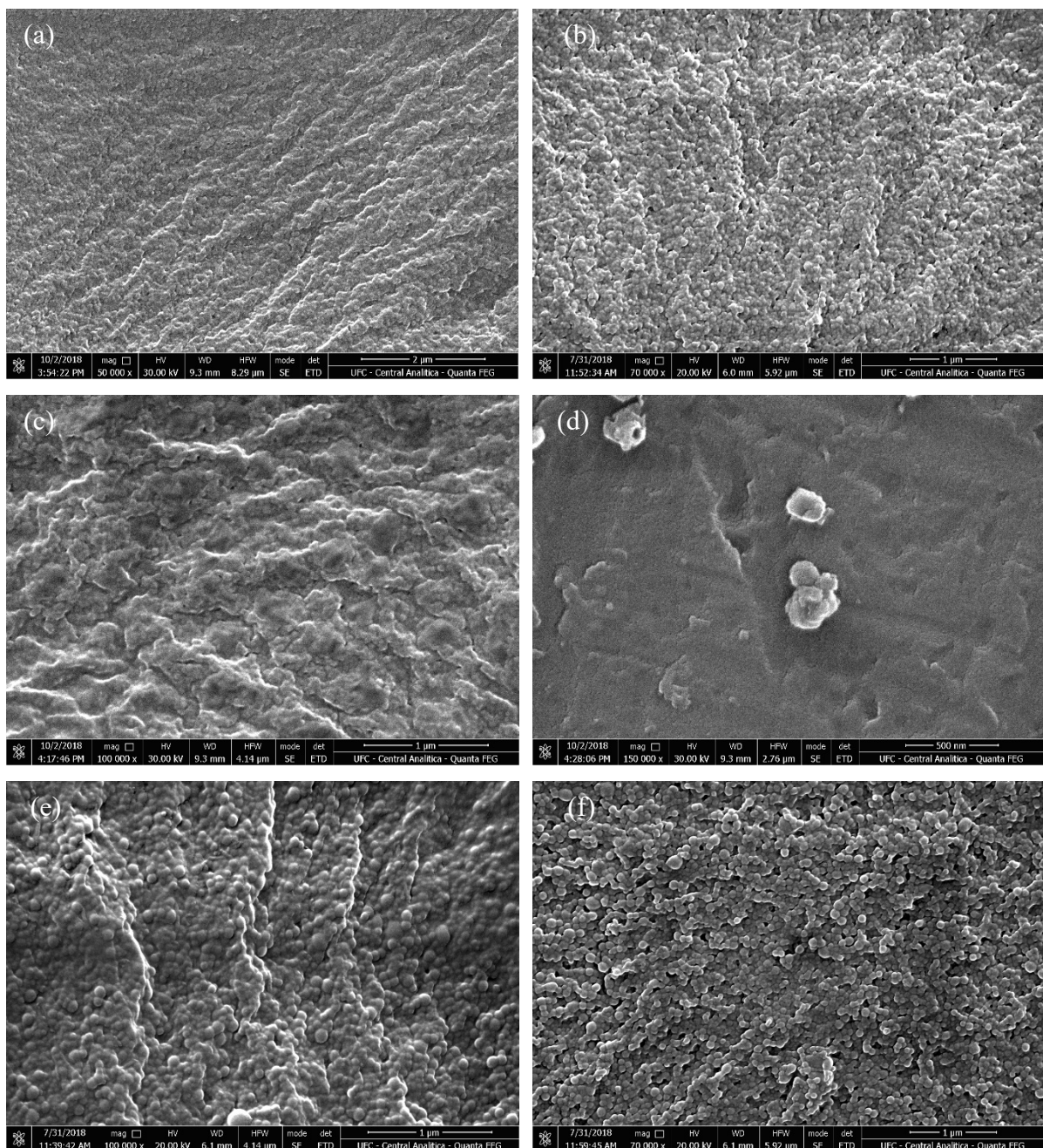
A micrografia para as nanopartículas GCProp 24 + AmB (FIGURA 26f) é bastante semelhante a que foi apresentada no trabalho de Pitombeira *et al.*, (2015), em que as nanopartículas hidrofobizadas após o encapsulamento do fármaco se apresentam com superfície bem mais definidas e sem mudança da estrutura pelo efeito da secagem.

Estruturas esféricas e de superfície lisa também são reportadas em nanopartículas com AmB encapsuladas nos trabalhos de Sandhya *et al.*, (2018), Marcano *et al.*, (2018),

Souza *et al.*, (2015) e AL-Quadeib *et al.*, (2015).

Analisando as micrografias para as nanopartículas GCBut (FIGURA 27), é possível verificar que o efeito da agregação devido ao preparo das amostras é bem mais pronunciado do que o observado para as nanopartículas GCProp, principalmente para as nanopartículas antes do encapsulamento, porém ainda se observam estruturas esféricas e de superfície lisa.

Figura 27 - Micrografias para as nanopartículas (a) GCBut 9, (b) GCBut 9 + AmB, (c) GCBut 12, (d) GCBut 12 + AmB, (e) GCBut 24 e (f) GCBut 24 + AmB.



Fonte: Elaborada pela autora.

A microscopia e o espalhamento dinâmico de luz fornecem informações sobre o tamanho de coloides, entretanto estes dados são obtidos de maneiras diferentes para as duas técnicas e a partir de princípios físicos diferentes. Quando o estudo é feito baseado na microscopia, o tamanho das partículas é obtido diretamente, e quando é feito por DLS o tamanho é obtido indiretamente, através da equação de Stokes-Einstein, por meio da difusão coloidal em solução (EENSCHOOTEN *et al.*, 2012).

O diâmetro das nanopartículas observadas por DLS são geralmente maiores que às obtidas pela técnica de microscopia, o que pode ser explicado pelo processo de preparo e as condições de observação da amostra, levando a alterações de suas propriedades. O MEV determina o diâmetro das partículas secas e sob vácuo, o que provavelmente as façam encolher. O DLS determina o diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas em solução aquosa, o que leva ao intumescimento das amostras (JIANG *et al.*, 2016; NAJAFI *et al.*, 2016 e ZHANG *et al.*, 2009).

O tamanho de partícula obtido a partir das micrografias para as nanopartículas foi ligeiramente menor do que o obtido por espalhamento dinâmico de luz (Tabela 8), o que já era esperado, pois o processo de preparo de amostra para o MEV exige que as NP's estejam secas, o que faz com que seu tamanho seja reduzido devido à remoção de água. As diferenças nos tamanhos para as duas técnicas também são reportadas por Zhang *et al.* (2009) e Najafi *et al.* (2016).

Tabela 8 - Tamanhos de partícula obtidos por MEV e espalhamento dinâmico de luz.

Nanopartícula	Sem AmB (nm)		Com AmB (nm)	
	MEV	DLS	MEV	DLS
GCPprop 9	83,1 ± 12,2	85,0 ± 2,3	93,8 ± 20,8	140,2 ± 8,5
GCPprop 12	110,9 ± 9,6	109,2 ± 6,7	106,6 ± 13,8	134,8 ± 4,0
GCPprop 24	92,4 ± 9,5	120,3 ± 4,7	132,7 ± 22,2	167,4 ± 7,9
GCBbut 9	64,9 ± 12,9	71,9 ± 5,9	70,9 ± 15,0	122,9 ± 1,8
GCBbut 12	163,7 ± 24,4	76,3 ± 6,5	170,0 ± 20,7	1420 ± 100
GCBbut 24	74,9 ± 5,8	92,7 ± 2,8	94,9 ± 25,6	1253 ± 6,4

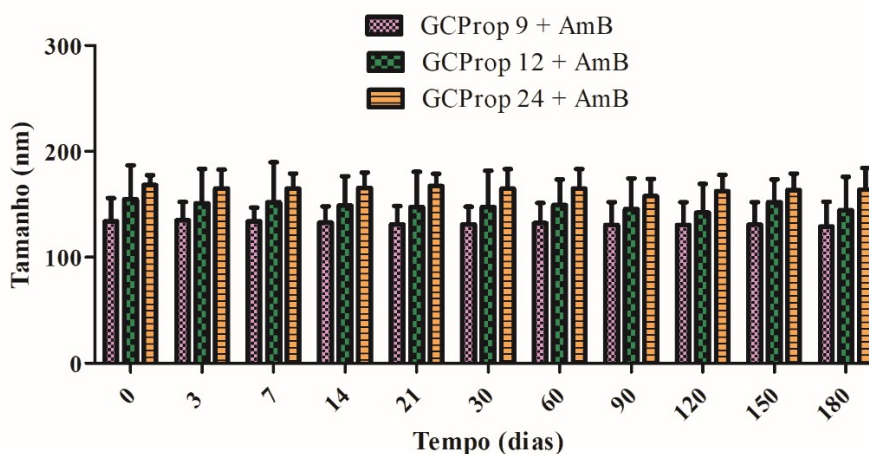
Fonte: Elaborada pela autora.

4.7.6 Estabilidade Estoque de Nanopartículas com Anfotericina B

A estabilidade estoque para as nanopartículas com anfotericina B encapsuladas foi realizada do mesmo modo que para as nanopartículas sem fármaco, através da avaliação do tamanho e índice de polispersão, porém por um período mais curto de tempo, de seis meses. As amostras foram acondicionadas em refrigerador (4 ± 2 °C). Foi realizado o experimento para todas três condições de nanopartículas GCProp e apenas para a nanopartícula GCBUT 9, sendo este sistema o único de nanopartícula do derivado com anidrido butírico a não se apresentar agregado após o encapsulamento da AmB.

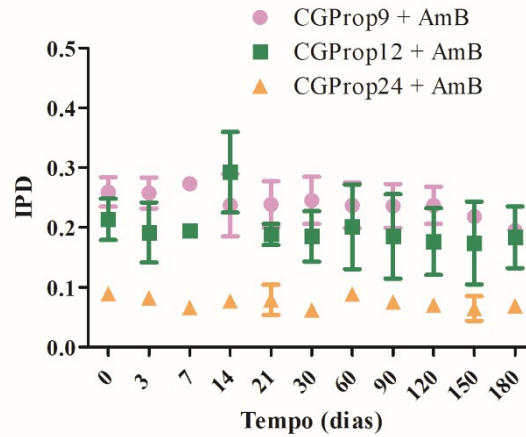
Os gráficos de tamanho de partícula e índice de polidispersão em função do tempo para as nanopartículas GCProp com AmB encapsuladas estão nas Figuras 28 e 29 e para as nanopartículas GCBUT na Figura 30.

Figura 28 - Tamanho de partícula em função do tempo para as nanopartículas GCProp + AmB acondicionadas sob refrigeração (4 ± 2 °C).



Fonte: Elaborada pela autora.

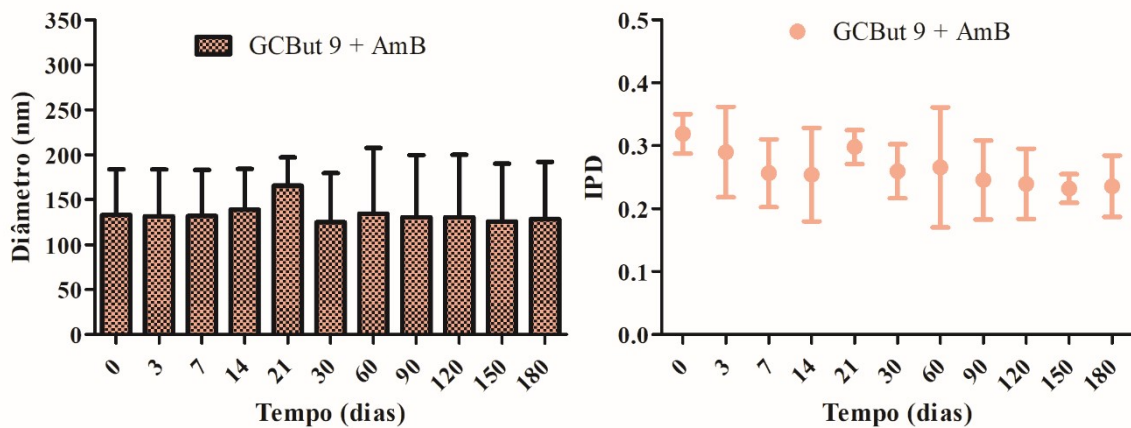
Figura 29 - Índice de polidispersão em função do tempo para as nanopartículas GCProp + AmB acondicionadas sob refrigeração (4 ± 2 °C).



Fonte: Elaborada pela autora.

As nanopartículas encapsuladas GCProp se mostraram com excelente estabilidade ao longo dos seis meses de experimento, sem variações expressivas no tamanho de partícula, permanecendo todas com tamanho menor do que 200 nm. Para os valores de índice de polidispersão, as nanopartículas GCProp 24 permanecem praticamente sem alterações.

Figura 30 - Tamanho de partícula e IPD em função do tempo para as nanopartículas GCBut 9 + AmB acondicionadas sob refrigeração (4 ± 2 °C).



Fonte: Elaborada pela autora.

Assim como os sistemas de nanopartículas com AmB encapsuladas GCProp, as nanopartículas GCBut 9 se mantiveram estáveis. O desvio padrão para o tamanho de partícula foi bem mais significativo, e os valores permaneceram menores do que 250 nm. O IPD para as nanopartículas também não sofreu alterações significativas ao longo dos seis meses de experimento.

A estabilidade estoque de nanocomplexos de quitosana com AmB encapsulada foi

avaliada também por seis meses e os sistemas mostraram estáveis, com variações de tamanho de partícula muito pequenas (KRISHNAN *et al.*, 2018). Nanopartículas de quitosana em PLGA com AmB incorporadas foram avaliadas por um período de seis meses e se mostraram estáveis (SINGH *et al.*, 2016).

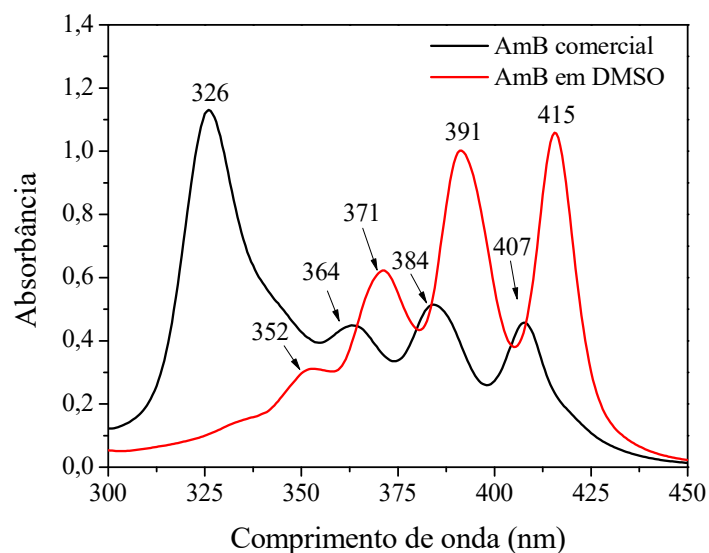
Alguns sistemas contendo AmB foram avaliados por período mais prolongado, como os conjugados de goma arábica e AmB, por oito meses (NISHI *et al.*, 2007), bem como por períodos menores, como as nanopartículas de lecitina e quitosana, por três meses (CHHONKER *et al.*, 2015). Ambos apresentaram excelente estabilidade, sem variações no tamanho de partícula no período estudado.

4.7.7 Estudo da Agregação da Anfotericina B

O espectro de UV-Vis de políenos são bastante sensíveis a mudanças conformacionais induzidas por diferentes interações moleculares, incluindo a agregação. As mudanças espectrais características da auto-agregação da AmB podem ser representadas pela razão entre as absorvâncias entre o primeiro pico (I), em 348 nm, pela absorvância do quarto pico (IV), em 409 nm (LEGRAND *et al.*, 1992). Esta razão tem valores em torno de 2 para espectro da espécie agregada e bem mais baixo, em torno de 0,25, para o caso da Anfotericina monomérica, por isso o grau de agregação da AmB pode ser facilmente monitorado utilizando essa razão (BARWICZ; CHRISTIAN; GRUDA, 1992).

O espectro de absorção da AmB dissolvida em DMSO pode ser visto na Figura 31. Em solventes orgânicos polares (metanol, etanol, DMF e DMSO) a AmB existe como uma dispersão molecular e seu espectro de absorção não é dependente da concentração (MAZERSKI *et al.*, 1990). Em meio aquoso e em baixas concentrações ($5,0 \times 10^{-7}$ mol/L), o espectro apresenta três bandas intensas em 410, 385, 365 nm e uma pequena banda em 344 nm, característica da sua forma monomérica. À medida em que o aumento da concentração for acima de 10^{-5} mol/L, a pequena banda em 344 nm aumenta sua intensidade e as outras bandas se deslocam de 410 para 420 nm, de 385 para 390 nm e de 365 para 368 nm, além de apresentarem redução em sua intensidade, indicando o aparecimento da forma agregada (LEGRAND *et al.*, 1992).

Figura 31 - Espectro de UV-Vis para solução comercial de AmB em água e em DMSO.



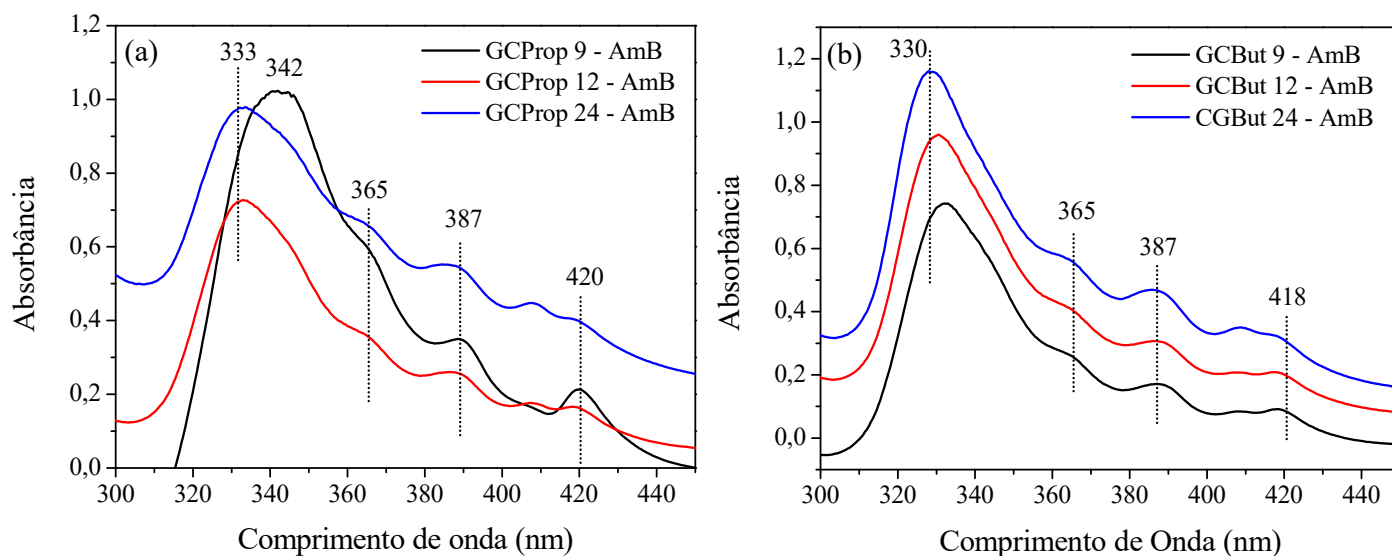
Fonte: Elaborada pela autora.

Para o espectro de solução de anfotericina B comercial da Sigma-Aldrich® em desoxicolato de sódio, na concentração de 2×10^{-5} mol/L (FIGURA 31) é possível observar um deslocamento entre as bandas do descrito na literatura, com banda intensa em 326 nm, característica de AmB na forma agregada, além da diminuição das bandas em 364, 384 e 407 nm, quando comparada ao espectro da AmB em sua forma monomérica.

O espectro de UV-vis para as nanopartículas GCProp e GCBut são apresentados na Figura 32. Para os espectros das nanopartículas GCProp com AmB encapsulada (FIGURA 32a) também se observou o deslocamento entre as bandas da AmB, do descrito na literatura, porém o perfil permanece semelhante. Há uma intensa banda em 342 nm para as nanopartículas GCProp 9 e em 333 nm para as nanopartículas GCProp 12 e GCProp 24. Outras três bandas características da AmB, com menor intensidade, são observadas nos comprimentos de onda de 365, 387 e 420 nm.

Os espectros para as nanopartículas GCBut (FIGURA 32b) são bastantes semelhantes aos das nanopartículas GCProp, com pequenas variações nos comprimentos de onda, apresentando bandas em aproximadamente 330, 365, 387 e 418 nm.

Figura 32 - Espectros de UV-vis para as nanopartículas (a) GCPProp e (b) GCBBut encapsuladas com AmB em água.



Fonte: Elaborada pela autora.

Espectros com perfis de absorção semelhantes são encontrados em micelas de policarbonato (WANG *et al.*, 2016), nanopartículas de dextrana (KANEIO *et al.*, 2014), nanomicelas de quitosana e ácido esteárico (GILANI *et al.*, 2011), complexos de ácido polimetacrílico (LES *et al.*, 2014), nanopartículas de quitosana e dextrana sulfatada (TIYABOONCHAI; LIMPEANCHOB, 2007) e em complexos lipídicos compostos de DMPC e DMAC (LARABI *et al.*, 2003) em água com AmB encapsulada.

A avaliação do estado de agregação da anfotericina B nas nanopartículas foi feita a partir da razão entre a banda do pico (I) e pico (IV), para as nanopartículas após sua formação por auto-organização em diálise e após seis meses de estoque em refrigeração (4 ± 2 °C). Os valores estão na Tabela 9.

Tabela 9 - Razão A_I/A_{IV} para as nanopartículas com AmB encapsulada.

Nanopartícula	Razão A_I/A_{IV}	Razão A_I/A_{IV} (após seis meses)
GCPprop 9	3,78	4,01
GCPprop 12	4,37	4,39
GCPprop 24	2,18	3,96
GCBut 9	7,10	8,10
GCBut 12	3,87	3,90
GCBut 24	3,31	4,11

Fonte: Elaborada pela autora.

Os valores para a razão entre as bandas A_I/A_{IV} dos espectros das nanopartículas GCPprop e GCBut evidenciam que a anfotericina B encapsulada em todos os sistemas se encontra na forma agregada. A razão entre as bandas I/IV foi maior para as nanopartículas GCBut 9, com valor de 7,10, indicando sistema com AmB extremamente agregada.

Para as nanopartículas GCPprop 24 foi observado um valor intermediário, de 2,18, sugerindo que o aumento da hidrofobicidade do sistema exerce alguma proteção à AmB contra a agregação.

As nanopartículas GCBut 12 e GCBut 24 se apresentaram na forma agregada pelo DLS, com tamanhos maiores que 1000 nm, porém ao analisar a AmB encapsulada dentro destes sistemas pelo espectro de absorção do UV-visível, o grau de agregação foi menor do que para as nanopartículas GCBut 9, que na análise por DLS apresentaram tamanho de $122,9 \pm 1,8$ nm. A AmB é uma molécula anfifílica e possui carga em meio neutro (MAZERSKI *et al.*, 1990). Esse fato sugere que há a interação dos grupos amino e carboxil da AmB com a parte hidrofílica da goma do cajueiro para as nanopartículas GCBut 12 e GCBut 24, aumentando significativamente seu volume hidrodinâmico (detectado pelo DLS) e diminuindo a extensão de agregação, analisada por espectrofotometria.

Moléculas de polímeros no estado monomérico são anfifílicas e em meio aquoso têm uma forte tendência de sofrer interações lipofílicas com outras moléculas monoméricas. Por isso, a dimerização de monômeros é o primeiro passo para a agregação. O passo subsequente é o crescimento dos agregados pela adição de novos dímeros (MAZERSKI *et al.*, 1990).

Os valores da razão entre as bandas A_I/A_{IV} após seis meses de estocagem em refrigeração aumenta para todos os sistemas, e pode ser justificado pela interação e

consequente adição de novos dímeros de AmB ao longo do tempo.

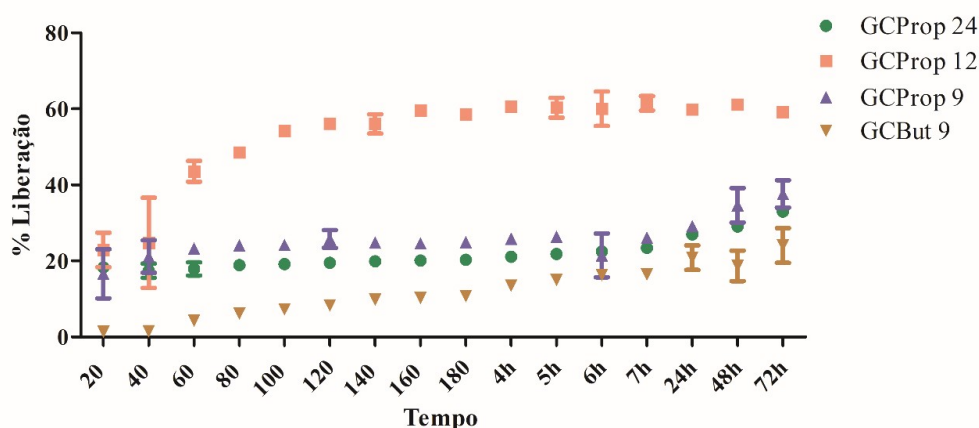
Na literatura existe uma discrepância de valores descritos da razão entre as bandas A_I/A_{IV} para as formulações comerciais, para o Fungizone® são reportados valores de 2,9 (MULLEN; CARTER e BAILLIE, 1997), 3,7 (TIYABOONCHAI; LIMPEANCHOB, 2007) e 6,4 (GILANI *et al.*, 2011 e WANG *et al.*, 2016). Para o Amphocil® e Ambisone® em solução de dextrose a 5 % a razão foi de 9,1 e 4,8, respectivamente (MULLEN, CARTER e BAILLIE, 1997). Esses valores podem variar dependendo das condições de análise como solvente, concentração e pH.

Comparando com as nanopartículas de goma do cajueiro modificado, apesar da AmB encapsulada se apresentar na forma agregada, os valores estão dentro da faixa encontrada para as formas comerciais já utilizadas.

4.7.8 Ensaio de Liberação *in Vitro*

Com o intuito de avaliar as nanopartículas aciladas como veículo para a liberação de anfotericina B, foram realizados ensaios de liberação *in vitro* em tampão fosfato pH 7,4 com adição de lauril sulfato de sódio 0,25% (m/v) (LSS) a fim de permitir a liberação da AmB para o meio aquoso (FIGURA 33). Outros autores também reportam a utilização de LSS dentro do sistema de liberação (ITALIA *et al.*, 2009; MARCANO *et al.*, 2018), bem como a utilização de outros surfactantes, como tween 80 (KRISHNAN *et al.*, 2018; SINGH *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2016) e desoxicolato de sódio (AL-QUADEIB *et al.*, 2015; VAN DE VEN *et al.*, 2012).

Figura 33 - Perfil de liberação *in vitro* da AmB para as nanopartículas GCProp e GCBut em tampão fosfato pH 7,4 + LSS 0,25 % (m/v).



Fonte: Elaborada pela autora.

Para os sistemas de nanopartículas de goma do cajueiro acilado com anidrido propiônico é possível observar uma rápida liberação na primeira hora de experimento (FIGURA 33), refletido em altos percentuais de liberação para as nanopartículas GCProp 9 ($25,7 \pm 2,3$ %), GCProp 12 ($56,1 \pm 0,73$ %) e GCProp 24 ($19,5 \pm 0,64$ %). Para as nanopartículas GCBut 9 esta tendência não é mantida, tendo uma liberação mais discreta, com percentual de $8,3 \pm 1,36$ % na primeira hora. O experimento é seguido por uma liberação controlada da AmB com percentuais máximos de liberação inferiores a 62 % após 72 h de ensaio para as nanopartículas GCProp 9 ($36,61 \pm 3,6$ %), GCProp 12 ($61,06 \pm 1,4$ %), GCProp 24 ($30,78 \pm 3,1$ %) e GCBut 9 ($24,06 \pm 4,54$ %).

Perfil de liberação semelhante foi encontrado para o complexo de quitosana e AmB, tendo liberação de aproximadamente 21 % nas primeiras 24 h, seguido por liberação de 44,5 % após 20 dias de experimento (KRISHNAN *et al.*, 2018).

O maior percentual de liberação para o sistema GCProp 12 ($61,06 \pm 1,4$ %) pode ser atribuído ao baixo valor de GS (1,15) o que faz com que a interação entre as cadeias do grupo acil e da molécula de AmB, um fármaco hidrofóbico, não sejam tão efetivas, havendo uma maior liberação para o meio. Embora o valor de GS para as nanopartículas GCBut seja similar (1,12) o percentual máximo de liberação foi menor ($24,06 \pm 4,54$ %), o que pode ser atribuído as cadeias do anidrido butírico serem maiores, fazendo com que a interação entre a droga seja maior, liberando menos anfotericina para o meio.

Italia *et al.*, (2009) e Tiyaboonchai e Limpeanchob (2007) justificam a rápida liberação da AmB em seus sistemas devido à moléculas da AmB terem migrado para a superfície externa da nanopartícula durante seu processo de formação, de modo que majoritariamente a AmB não está incorporada dentro da nanopartícula, mas sim adsorvida na superfície, fazendo com que a interação seja pequena e a liberação fácil.

Nanopartículas de sulfato de dextrana e quitosana apresentaram rápida liberação da AmB nos primeiros cinco minutos e um perfil de agregação semelhante ao verificado para as nanopartículas GCProp e GCBut (TIYABOONCHAI; LIMPEANCHOB, 2007). A diminuição da toxicidade para este sistema quando comparado à formulação comercial foi atribuída a uma liberação mais lenta e controlada do que às da micela de desoxicolato, presente no Fungizone®, o que resulta em um nível de AmB equilibrado no plasma. Além de disso a AmB é insolúvel em água, portanto o perfil de liberação *in vivo* tende a ser mais lento do que a estudada *in vitro*, o que pode levar a um aumento lento da concentração de AmB no plasma, evitando assim os efeitos tóxicos (TIYABOONCHAI; LIMPEANCHOB, 2007). Tendo em vista o perfil de liberação bastante controlado, esta hipótese pode ser aplicada aos

sistemas de nanopartícula de goma do cajueiro modificada sendo, portanto, necessários mais estudos para ser investigada e substanciada.

Vários modelos cinéticos têm sido propostos para avaliar a liberação de sistemas carreadores de fármaco. Para as nanopartículas aciladas foram aplicados os modelos de ordem zero, primeira ordem, Higuchi, Korsmeyer-Pepas e Hixon-Crowell (Tabela 10). Àquele que apresentar coeficiente de correlação mais próximo da unidade será o modelo mais apropriado.

Tabela 10 - Modelos cinéticos para as nanopartículas GCProp e GCBut.

Modelo	Valores de R ²			
	GCProp 9	GCProp 12	GCProp 24	GCBut 9
Ordem zero	0,7365	0,0313	0,8604	0,6254
Primeira Ordem	0,6172	-0,02	0,8423	0,2446
Higuchi	0,8591	0,066	0,9729	0,7093
Hixon-Crowell	0,8968	0,8968	0,8968	0,8968
Korsmeyer-Pepas	0,7655	-0,02	0,9036	0,5183

Fonte: Elaborada pela autora.

Os modelos que melhor descrevem o perfil de liberação é o de Hixon-Crowell para as nanopartículas GCProp 9, GCProp 12 e GCBut 9, e o de Higuchi para as nanopartículas GCProp 24.

O modelo de Higuchi foi desenvolvido para sistemas de liberação matriciais homogêneos esféricos, onde assume-se que o sistema não é revestido na superfície e que sua matriz sofre alteração significativa na presença de água. Ele descreve que o processo de difusão é baseado na lei de Fick, onde a quantidade de fármaco liberada *versus* a raiz quadrada do tempo é linear. Já o modelo de Hixon-Crowell assume que a taxa de liberação é limitada pela taxa de dissolução das partículas do fármaco e não pela sua difusão que pode ocorrer através da matriz polimérica (COSTA; LOBO, 2001).

4.8 Preparação das Emulsões de Pickering

As emulsões foram preparadas a partir da mistura das fases, onde se resultou em uma formulação de emulsão com aparência macroscópica homogênea, de aspecto leitoso, branco e opalescente.

Inicialmente a produção das emulsões de Pickering ocorre com a formação das nanopartículas por nanoprecipitação. A goma do cajueiro modificada dissolvida em DMSO, quando adicionada à fase aquosa, forma, instantaneamente, as nanopartículas. Ao ser vertida a fase orgânica, contendo o Miglyol®, sob a fase aquosa, há a estabilização da gota de óleo pelas nanopartículas, havendo a formação das emulsões de Pickering sem a necessidade da utilização de surfactantes.

Diferentemente das nanopartículas de goma do cajueiro modificada, as nanopartículas de amido modificado com anidrido acético reportados por Tan *et al.*, (2014) não conseguiram estabilizar efetivamente a gota de óleo da emulsão proposta pelos autores, porque as nanopartículas estavam hidrofílicas demais. Apesar da modificação, para permanecer entre a interface óleo-água, sendo necessário a reação do amido com o anidrido ftálico, que possui cadeia hidrofóbica bem maior, para formação de emulsões estáveis (TAN *et al.*, 2014). Todas as nanopartículas de goma do cajueiro modificada com os anidridos propiônico e butírico apresentaram hidrofobicidade necessária para estabilizar a gota de óleo, em todas as condições estudadas.

Após a formação das emulsões, há o isolamento por centrifugação, que acelera o processo de formação do “*creaming*”, forçando as gotas a se concentrarem. O excesso de água é então excluído da emulsão (HU *et al.*, 2016), além de separar as nanopartículas maiores e livres, não adsorvidas na gota de óleo.

4.8.1 Nanopartículas via Nanoprecipitação

Como primeiro passo para o estudo do processo de formação das emulsões, o tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas preparadas por nanoprecipitação nas concentrações de 0,5, 1 e 2 mg/mL foi obtido por espalhamento dinâmico de luz e pode ser observado na Tabela 11.

Tabela 11 - Tamanho de partícula, IPD e potencial zeta para as nanopartículas formadas por nanoprecipitação.

Nanopartícula (nanoprecipitação)	Concentração (mg/mL)	Tamanho (nm)	IPD	Potencial zeta (mV)
GCProp 9	0,5	79,3 ± 6,5	0,329	-42,9 ± 1,5
	1	82,8 ± 5,2	0,373	-35,9 ± 2,9
	2	110,5 ± 13,2	0,373	-29,5 ± 1,4
GCProp 12	0,5	77,6 ± 13,8	0,296	-45,3 ± 2,7
	1	75,5 ± 8,0	0,543	-47,3 ± 6,2
	2	270,5 ± 7,7	0,553	-37,2 ± 1,7
GCProp 24	0,5	220,3 ± 2,6	0,355	-49,1 ± 2,6
	1	102,4 ± 3,8	0,353	-38,5 ± 6,6
	2	101,6 ± 4,9	0,444	-35,5 ± 3,2
GCBut 9	0,5	65,5 ± 0,5	0,289	-22,7 ± 4,4
	1	68,5 ± 0,4	0,289	-24,7 ± 1,4
	2	101,0 ± 15,1	0,343	-20,4 ± 0,2
GCBut 12	0,5	64,8 ± 2,6	0,337	-45,6 ± 4,7
	1	69,7 ± 1,5	0,335	-23,3 ± 1,2
	2	146,1 ± 0,8	0,216	-16,1 ± 0,9
GCBut 24	0,5	76,2 ± 0,6	0,205	-22,9 ± 2,4
	1	85,2 ± 0,9	0,213	-29,8 ± 0,2
	2	100,1 ± 1,7	0,205	-18,2 ± 1,0

Fonte: Elaborada pela autora.

Para as nanopartículas GCProp, o tamanho de partícula variou entre $77,6 \pm 13,8$ a $270,5 \pm 7,7$ nm. Para as nanopartículas GCProp 9 e GCProp 12 o tamanho aumentou com o aumento da concentração de polissacarídeo modificado. Já para as nanopartículas GCProp 24 se observa tendência inversa, onde há uma diminuição do tamanho com o aumento da concentração. É possível observar também que não há influência do grau de substituição no tamanho de partícula para as NP's GCProp 9 e GCProp 12 nas concentrações de 0,5 e 1 mg/mL, apesar da diferença considerável entre os valores de GS ($1,29 \pm 0,19$ e $1,15 \pm 0,09$). Na concentração de 2 mg/mL os tamanhos de partícula para as NP's GCProp 9 e GCProp 24 foram semelhantes.

Os valores de índice de polidispersão foram maiores do que 0,2 para todas as concentrações de nanopartículas GCProp, indicando que a nanoprecipitação leva à formação de sistemas de nanopartículas mais polidispersas.

Os valores de potencial zeta foram todos negativos e, diferente do tamanho de tamanho de partícula, tiveram seus valores, em módulo, diminuídos com o aumento da concentração.

Para as nanopartículas GCBut, os tamanhos variaram entre $64,8 \pm 2,6$ a $101,0 \pm 15,1$ nm e foram, de maneira geral, menores do que os tamanhos das nanopartículas GCProp. Para todos os derivados e em todas as concentrações o tamanho de partícula aumentou com o aumento da concentração de polissacarídeo.

Nanopartículas de goma do cajueiro modificadas com L-lactídeo formadas por nanoprecipitação também foram estudadas para a formação e estabilização de emulsões (RICHTER *et al.*, 2018). Do mesmo modo que para as nanopartículas modificadas com anidrido butírico, observou-se a dependência do tamanho de partícula com a concentração. Esta dependência da concentração é mais forte para os derivados menos hidrofóbicos de GC e L-lactídeo, enquanto que para os derivados GCBut não é tão pronunciada.

O aumento do tamanho de partícula com o aumento da concentração pode ser explicado em função do equilíbrio entre as fases dos solventes. O aumento da concentração faz com que uma quantidade maior de cadeias de polissacarídeo permaneça associada durante o processo de difusão do solvente orgânico na fase aquosa, levando à formação de nanopartículas maiores (GALINDO-RODRIGUEZ *et al.*, 2004). Além disso, com o aumento da concentração há um aumento da viscosidade da fase orgânica, o que promove um aumento da resistência de transferência de massa e a formação de nanopartículas com tamanho maior.

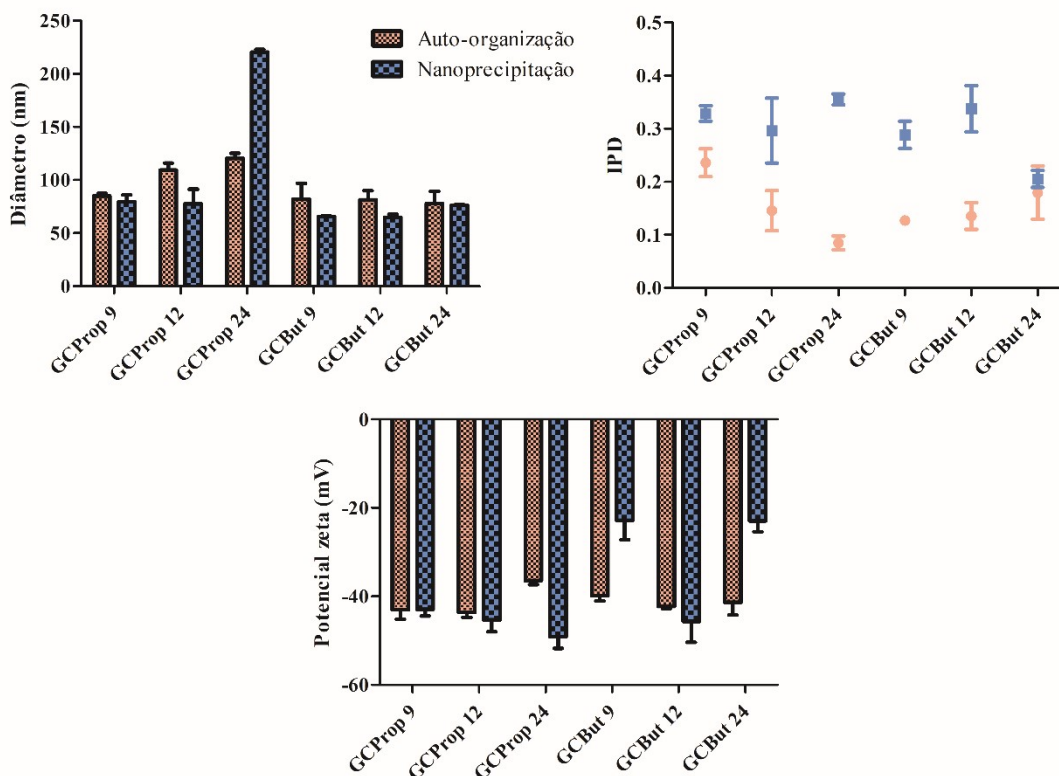
Analisando o índice de polidispersão para as nanopartículas formadas a partir do derivado com maior grau de substituição, GCBut 24 (GS = 1,72), os valores de IPD foram menores em relação as outras nanopartículas, indicando que a hidrofobicidade contribui para a formação de sistemas mais homogêneos.

O potencial zeta das nanopartículas GCBut, assim como para as nanopartículas GCProp, apresentou valores negativos. O aumento da concentração de polissacarídeo leva a uma diminuição, em módulo, dos valores de potencial zeta, o que indica que a utilização de alta concentração (2 mg/mL) de polissacarídeo leva à formação de sistemas menos estáveis.

Os sistemas formados por auto-organização e nanoprecipitação foram comparados utilizando-se concentrações de 0,4 mg/mL para as nanopartículas formadas por auto-

organização e de 0,5 mg/mL para as nanopartículas formadas por nanoprecipitação. Os valores de tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta estão na Figura 34.

Figura 34 - Tamanho de partícula, IPD e potencial zeta para as nanopartículas formadas por nanoprecipitação e auto-organização.



Fonte: Elaborada pela autora.

Comparando os tamanhos de partícula para as nanopartículas GCProp 9 não se observa variação com relação a formação por auto-organização ($85,0 \pm 2,3$ nm) ou por nanoprecipitação ($79,3 \pm 6,5$ nm). As nanopartículas GCProp 24 apresentaram tamanho de partícula bastante superior quando formadas pelo processo de nanoprecipitação ($220,3 \pm 2,6$ nm) do que por auto-organização ($120,3 \pm 4,7$ nm). Para os outros sistemas, os tamanhos de partículas foram menores quando formados por nanoprecipitação.

A formação de nanopartículas por nanoprecipitação pode ser explicada a partir de um processo turbulento de difusão entre duas fases líquidas desequilibradas (GALINDO-RODRIGUEZ *et al.*, 2004). É um processo rápido e os tamanhos de partículas menores são resultados de uma conformação mais compacta das macromoléculas ao se difundirem para a fase aquosa. Já o processo de auto-organização é lento, e após a formação há a estabilização

termodinâmica e possibilidade de rearranjos das nanopartículas, levando a tamanhos de partícula maiores (COSTALAT; DAVID; DELAIR, 2014).

Apesar dos tamanhos menores, os valores de IPD para as NP's formadas por nanoprecipitação foram maiores quando comparadas às produzidas por auto-organização, indicando que a rápida difusão de solvente para a formação de nanopartículas leva a formação de sistemas podispersos.

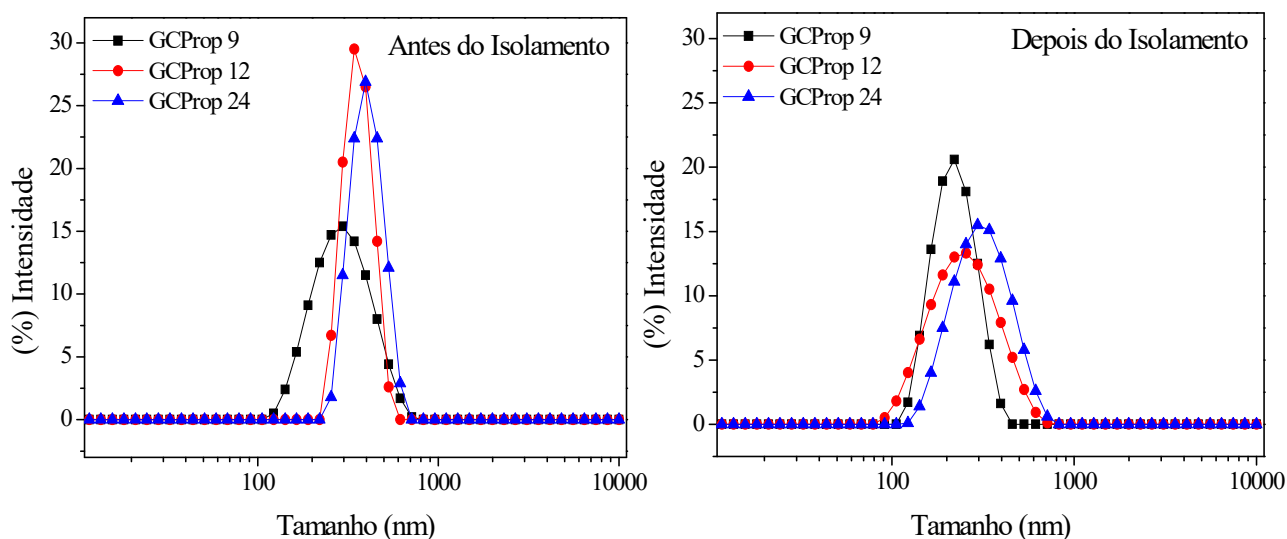
O potencial zeta para as nanopartículas GCProp 12, GCProp 24 e GCBut 12 foram maiores quando sintetizadas por nanoprecipitação.

Nanopartículas de goma do cajueiro hidrofobizadas com anidrido acético foram preparadas pelos métodos de auto-organização e nanoprecipitação no trabalho de Dias *et al.* (2016). Os resultados reportados para as NP's formadas por nanoprecipitação foram semelhantes aos obtidos neste trabalho, com tamanho de partícula de $79,39 \pm 0,608$ nm, IPD de 0,354 e potencial zeta de $-20,2 \pm 1,52$ mV. Entretanto, o tamanho de partícula foi superior ($302,0 \pm 0,971$ nm) aos obtidos para derivados GCProp e GCBut para as NP's formadas por auto-organização (DIAS *et al.*, 2016).

4.8.2 Tamanho de Partícula e Potencial Zeta das Emulsões de Pickering

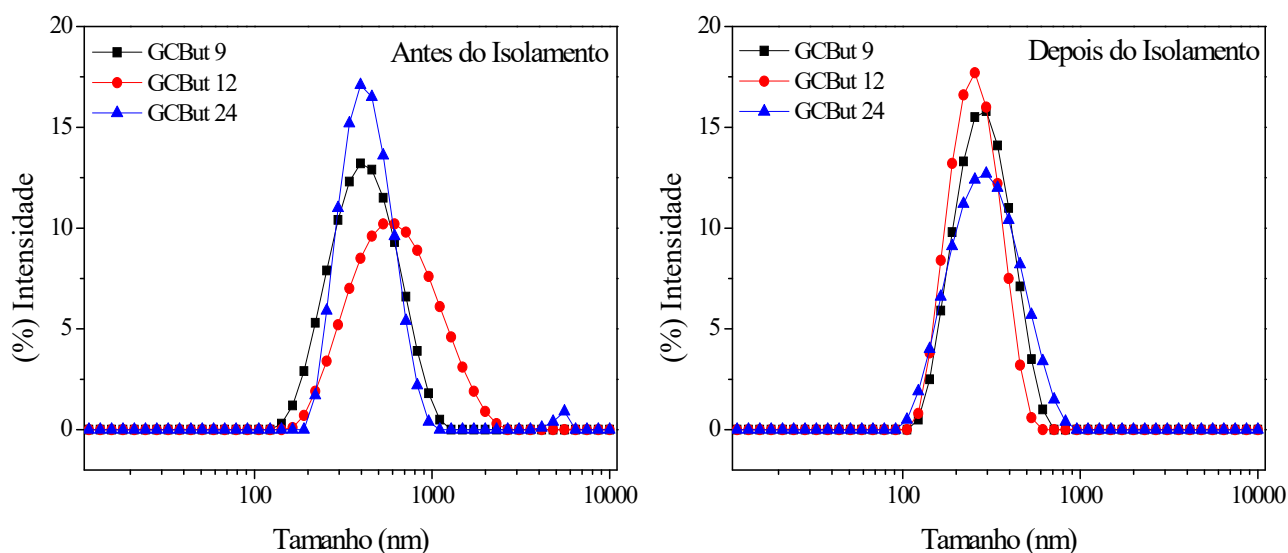
Nas Figuras 35 e 36 estão as distribuições de tamanho para as emulsões na maior concentração de polissacarídeo (2 mg/mL) antes e após o isolamento em centrífuga para as emulsões GCProp e GCBut, respectivamente. A distribuição de tamanho para todos os sistemas de emulsões apresentou-se unimodal, sem sinais de agregação, antes e após o isolamento, para todos os derivados e concentrações testadas.

Figura 35 – Distribuição de tamanho para as emulsões GCProp na maior concentração de polissacarídeo (2 mg/mL), antes e após o isolamento por centrifugação.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 36 – Distribuição de tamanho para as emulsões GCBut na maior concentração de polissacarídeo (2 mg/mL), antes e após o isolamento por centrifugação.



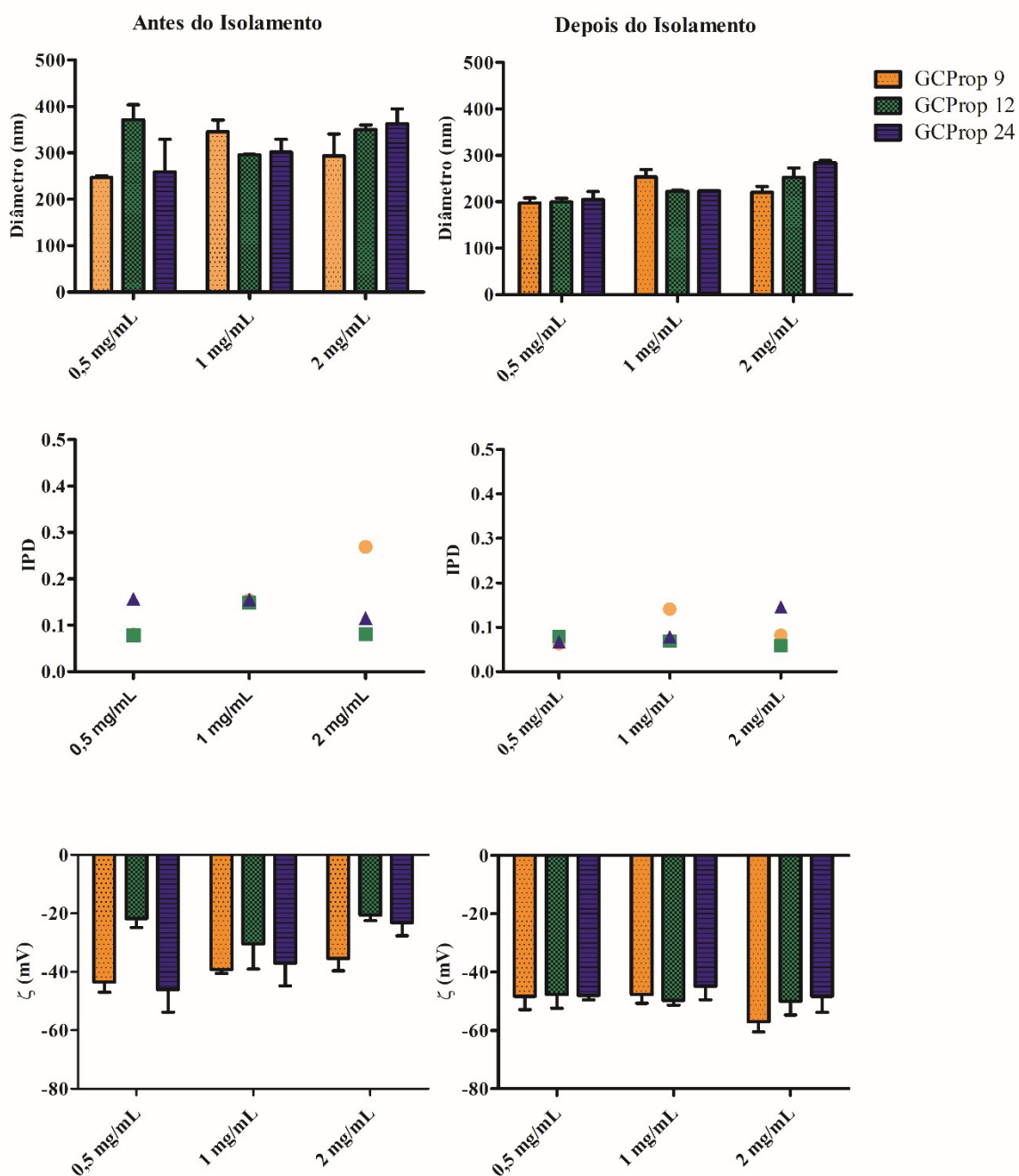
Fonte: Elaborada pela autora.

O resultado obtido neste trabalho é diferente do reportado para emulsões de goma do cajueiro e L-lactídeo, em que as emulsões apresentaram perfil de distribuição bimodal, com tamanhos máximos de aproximadamente 200 e 3500 nm, mesmo após o isolamento em centrífuga (RICHTER *et al.*, 2018). Nanocápsulas de quitosana encapsuladas com óleo

essencial proposta por Sotelo-Boyás *et al.* (2017) também apresentaram perfil bimodal, com tamanhos variando entre 190 e 700 nm e 900 e 6500 nm.

Os tamanhos de partícula, IPD e potencial zeta para as emulsões antes e após o isolamento por centrifugação estão presentes nas Figuras 37 e 38 para as emulsões com os derivados modificados com anidridos propiônico (GCProp), e butírico (GCBut), respectivamente. Todas as emulsões formadas são do tipo óleo em água, confirmadas pelo teste da gota após a observação de que as formulações são imediatamente dispersas quando colocadas em contato com água.

Figura 37 - Tamanho de partícula, IPD e potencial zeta para as emulsões formadas a partir dos derivados de GCProp antes e depois do isolamento.



Fonte: Elaborada pela autora.

Analisando inicialmente os sistemas de emulsões GCProp antes do isolamento (FIGURA 37), os tamanhos de partícula variaram entre $218,3 \pm 12,1$ e $371,2 \pm 32,2$ nm para as três concentrações estudadas. Para as emulsões CGProp 9 não há diferença estatística significativa no tamanho de partícula com o aumento da concentração (1 e 2 mg/mL), enquanto que para as emulsões GCProp 12 não há variação estatística significativa para nenhuma concentração estudada. Nas emulsões GCProp 24, o aumento do tamanho de

partícula é verificado entre a concentração intermediária, de 1 mg/mL ($301,9 \pm 26,8$ nm) e a concentração mais alta, de 2 mg/mL ($362,6 \pm 32,5$ nm).

Os valores de índice de polidispersão apresentaram tendência de aumento com a concentração apenas para as emulsões GCProp 9. Os valores de potencial zeta apresentaram diminuição, em módulo, com o aumento da concentração para a emulsão GCProp 24.

Ao se comparar os tamanhos de partícula após o isolamento (FIGURA 37), é possível observar uma diminuição do tamanho para as três concentrações estudadas, o que já era esperado, tendo em vista que o processo de centrifugação separa as nanopartículas de maior tamanho, e por consequência, com menor interação à gota de óleo, tornando o volume hidrodinâmico do sistema menor após o processo (RICHTER *et al.*, 2018).

Outra metodologia para separação das nanopartículas menos adsorvidas no sistema de emulsão foi proposta por Marefati *et al* (2017). A emulsão sintetizada a partir de grânulos de amido passou por tratamento de aquecimento a 70 °C por aproximadamente 4 min. Este procedimento foi análogo ao processo de isolamento por centrifugação para as emulsões de goma do cajueiro, levando também a uma diminuição do tamanho de partícula ao final do processo (MAREFATI *et al.*, 2017).

Analisando a variação de concentração de polissacarídeo nas emulsões isoladas, para a menor concentração estudada (0,5 mg/mL) não se observa diferença expressiva de tamanho de partícula para as emulsões GCProp 9 ($197,2 \pm 11,4$ nm), GCProp 12 ($199,7 \pm 7,9$ nm) e GCProp 24 ($204,9 \pm 16,7$ nm).

Para a concentração intermediária (1 mg/mL) a emulsão GCProp 9, que possui maior grau de substituição de (GS = 1,29), apresenta maior tamanho de partícula ($253,4 \pm 16,2$ nm), enquanto as emulsões GCProp 12 (GS = 1,15) e GCProp 24 (GS = 1,17), possuem tamanhos de $231,3 \pm 1,0$ e $223,4 \pm 0,7$ nm, respectivamente.

Na maior concentração estudada (2 mg/mL) tendência oposta é observada, onde a emulsão formada a partir do derivado mais hidrofóbico (GCProp 9) se apresenta com menor tamanho de partícula ($220,2 \pm 13,1$ nm) em relação as demais emulsões.

Por se tratar de um sistema desorganizado, antes do isolamento as emulsões não apresentam tendência definida no perfil de polidispersão com o aumento da concentração de polissacarídeo. Após o isolamento os valores de IPD foram menores do que 0,2, indicando que o isolamento por centrifugação além de diminuir o tamanho das emulsões leva à formação de sistemas mais homogêneos.

Os valores de IPD na menor concentração de polissacarídeo (0,5 mg/mL) foram semelhantes, mesma tendência observada para o tamanho de partícula nesta concentração. Na

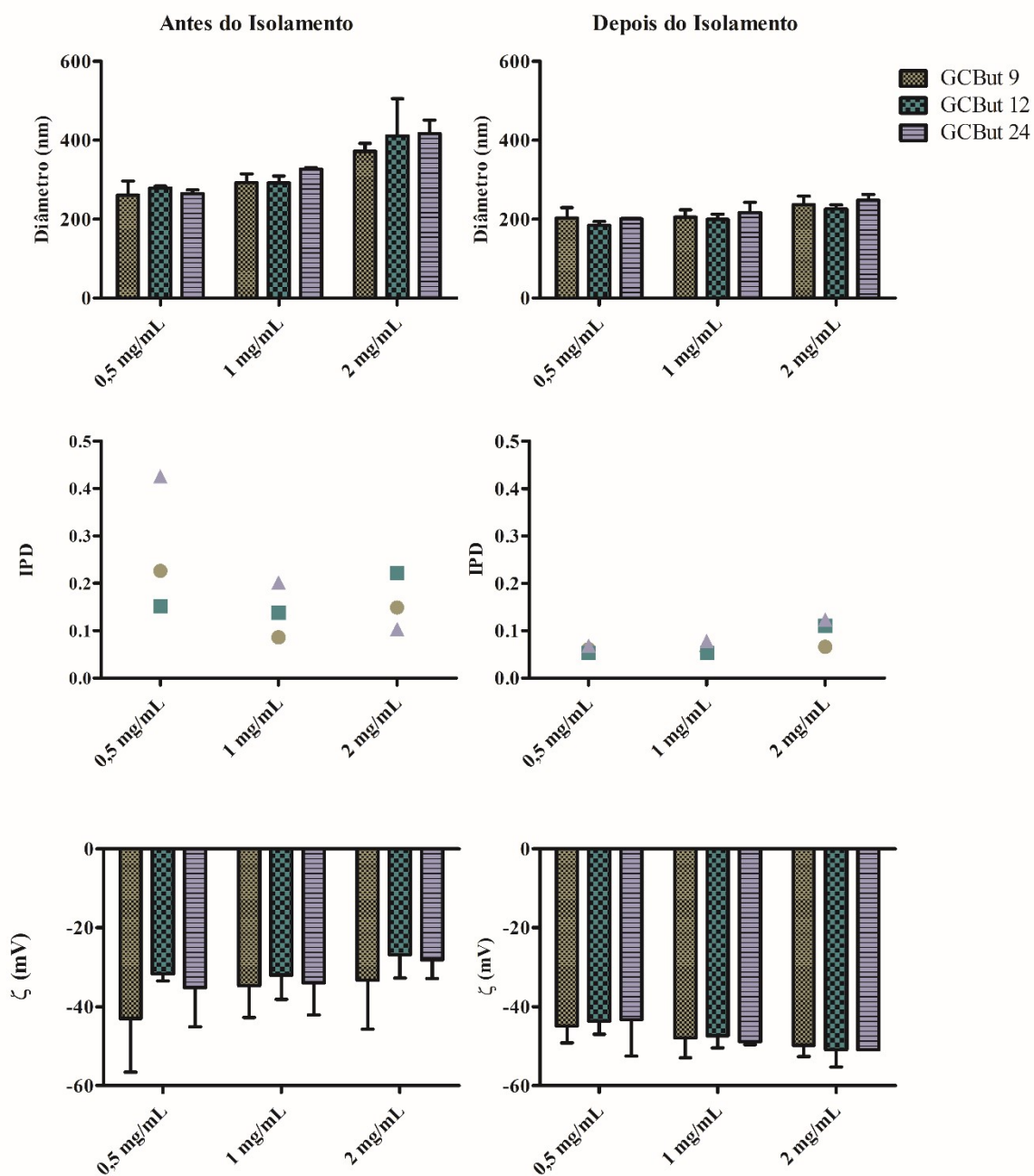
concentração intermediária (1 mg/mL) os valores de IPD permaneceram praticamente constante para as emulsões GCProp 12 (0,060) e GCProp 24 (0,065), enquanto que para a emulsão GCProp 9 o IPD foi maior (0,141). Na maior concentração (2 mg/mL) há uma diminuição do IPD para as emulsões GCProp 9 e GCProp 12.

Antes do isolamento, o potencial zeta sofre influência da concentração para a emulsão GCProp 24, havendo uma diminuição considerável dos valores, em módulo, com o aumento da concentração. Após o isolamento há o aumento dos valores de potencial zeta nas concentrações de 1 mg/mL ($-44,85 \pm 4,5$ mV) e 2 mg/mL ($-48,2 \pm 5,5$ mV) quando comparados os valores antes do isolamento ($-37,1 \pm 7,7$ e $-23,1 \pm 4,4$ mV), respectivamente. Para as emulsões GCProp 9 e GCProp 12 os valores de potencial zeta não variaram de maneira significativa entre as concentrações de 0,5 mg/mL ($-48,2 \pm 4,6$ e $-47,6 \pm 4,7$ mV), 1 mg/mL ($-47,6 \pm 3,0$ e $-49,6 \pm 1,6$ mV) e 2mg/mL ($-51,9 \pm 9,1$ e $-49,9 \pm 4,7$ mV), respectivamente.

Analisando as emulsões GCBut antes do isolamento (FIGURA 38), verifica-se uma dependência da concentração de polissacarídeo na fase aquosa com o tamanho das emulsões para as três condições. Este efeito é mais pronunciado para as emulsões na maior concentração (2 mg/mL).

Da mesma maneira que para as emulsões GCProp o processo de isolamento diminui o tamanho das emulsões GCBut, e a tendência de aumento do tamanho de partícula com o aumento da concentração também é observada para as emulsões GCBut.

Figura 38 - Tamanho de partícula, IPD e potencial zeta para as emulsões formadas a partir dos derivados de GCBu antes e depois do isolamento.



Fonte: Elaborada pela autora.

Apesar de apresentar grau de substituição intermediário ($GS = 1,65$), as emulsões GCBu 12 apresentaram menor tamanho de partícula do que as emulsões GCBu 9 e GCBu 24 nas concentrações 0,5 mg/mL ($202,8 \pm 17,3$ nm), 1 mg/mL ($205,0 \pm 18,7$ nm) e 2 mg/mL ($236,7 \pm 21,5$ nm).

Nanocápsulas de quitosana foram sintetizadas por Lozano *et al.* (2013) a partir de procedimento semelhante ao das emulsões de goma de cajueiro. Os valores de tamanho

reportado pelos autores foram menores, com valores variando entre 168 ± 5 nm a 151 ± 1 nm (LOZANO *et al.*, 2013).

Antes do isolamento há uma tendência mais definida dos valores de IPD com o aumento da concentração para as emulsões GCBut, diferente do observado para as emulsões GCProp. Na concentração mais baixa (0,5 mg/mL) o efeito da hidrofobicidade é bastante expressivo para os valores de IPD. A emulsão mais hidrofóbica GCBut 24 (GS = 1,72) possui um valor de IPD (0,426) maior que as emulsões GCBut 9 (0,224) e GCBut 12 (0,111). Já para concentrações intermediária (1 mg/mL) e alta (2 mg/mL) há uma expressiva diminuição do IPD para emulsão GCBut 24, com valores de 0,202 e 0,103, respectivamente.

Assim como para as emulsões GCProp, após o isolamento todos os valores de IPD são inferiores a 0,25 para as emulsões GCBut. Analisando o efeito da concentração, para as emulsões GCBut 9, GCBut 12 e GCBut 24 verifica-se o aumento dos valores de IPD com o aumento da concentração de polissacarídeo.

Para o potencial zeta há uma organização e um aumento das cargas superficiais após o isolamento, mesmo observado para as emulsões GCProp. Há também um ligeiro aumento dos valores, em módulo, com o aumento da concentração nas emulsões. Este aumento pode ser explicado como consequência de uma cobertura menos eficaz da superfície das emulsões. O Miglyol® é uma mistura de triglicerídeos de ácidos cápricos e caprílicos, e mesmo os ácidos graxos estando majoritariamente esterificados como triglicerídeos, existe uma pequena porção não-esterificada, que confere ao óleo uma leve acidez. Os grupos carboxilatos desta pequena fração ficam expostos a fase aquosa, daí o potencial negativo das gotículas de óleo (RICHTER *et al.*, 2018).

Nan *et al.* (2014) avaliaram o efeito da concentração na coalescência e estabilização das emulsões. Em baixas concentrações, abaixo de 0,5 % (m/m), as emulsões de quitosana e alginato sofreram expressiva coalescência após o preparo, levando a tamanhos de partícula grandes e a separação de fases. Com o aumento da concentração houve uma diminuição da coalescência e do tamanho, de modo que para estes sistemas há a necessidade de uma maior quantidade de partículas adsorvidas em volta da gota de óleo para estabilização efetiva das emulsões (NAN *et al.*, 2014). As emulsões GCBut também apresentaram o aumento do tamanho com o aumento da concentração. Foram necessárias concentrações mais baixas que as reportadas por Nan *et al.* (2014) para formação de emulsões estáveis.

Dentre os trabalhos publicados para síntese de emulsões estabilizadas por partículas sólidas, o procedimento experimental envolve apenas a produção das nanopartículas e sua homogeneização com a fase oleosa, sem o processo de centrifugação, o

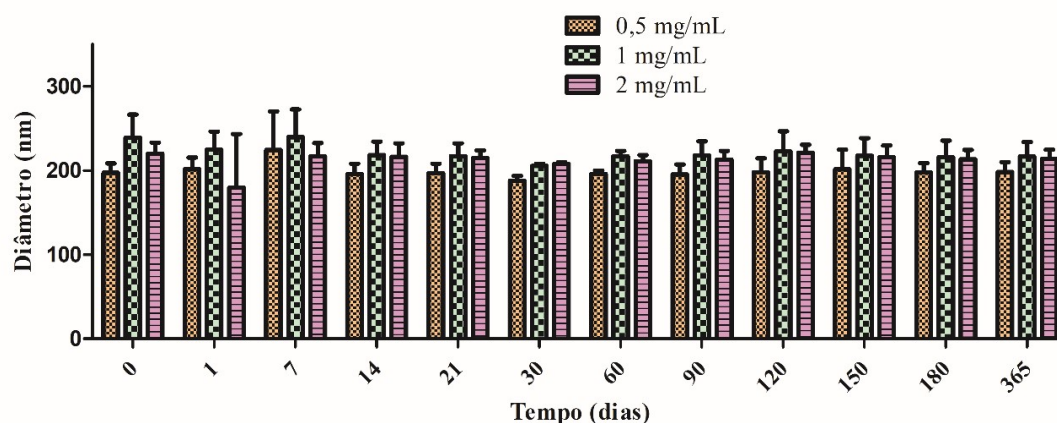
que faz com que o diâmetro da gota na emulsão seja expressivamente grande, como reportado por Marefati *et al.* (2017), onde as emulsões de amido com curcumina encapsulada apresentaram tamanho de $30,6 \pm 0,3 \mu\text{m}$. No trabalho de Hu *et al.*, (2016) emulsões formadas por nanopartículas de gliadina, uma proteína encontrada em cereais, também tiveram tamanhos micrométricos, com valores de $92,5$ a $60 \pm 0,5 \mu\text{m}$. Emulsões produzidas a partir de lactoferrina por Sarkar *et al.* (2018) apresentaram distribuição de partícula multimodal, com população majoritária (75 %) variando entre 1 e $100 \mu\text{m}$.

4.8.3. Estabilidade Estoque

Do mesmo modo que realizado para as nanopartículas via auto-organização, foram avaliadas as estabilidades para as emulsões em função do tamanho de partícula e do IPD por um período de um ano estocadas sob refrigeração ($4 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$). As emulsões são consideradas estáveis quando não há mudanças na distribuição do tamanho de partícula, estado de agregação ou arranjo espacial com o sistema coloidal no período de tempo de observação (CHUAH *et al.*, 2009).

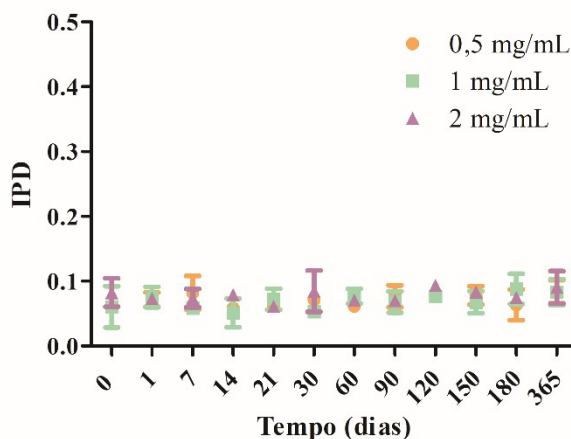
O tamanho de partícula e o índice de polidispersão em função do tempo para as emulsões mais hidrofóbicas, GCProp 9 ($\text{GS} = 1,29$) estão mostrados nas Figuras 39 e 40. Não há mudanças significativas do tamanho de partícula para nenhuma das concentrações estudadas, permanecendo estáveis e sem sinais de agregação durante o período de um ano. Os valores para o índice de polidispersão permaneceram todos abaixo de 0,15, o que indica que a hidrofobicidade influencia para uma maior uniformidade do sistema.

Figura 39 - Tamanho de partícula em função do tempo para as emulsões GCProp 9 acondicionadas sob refrigeração ($4 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) e produzidas com diferentes concentrações do derivado hidrofóbico.



Fonte: Elaborada pela autora.

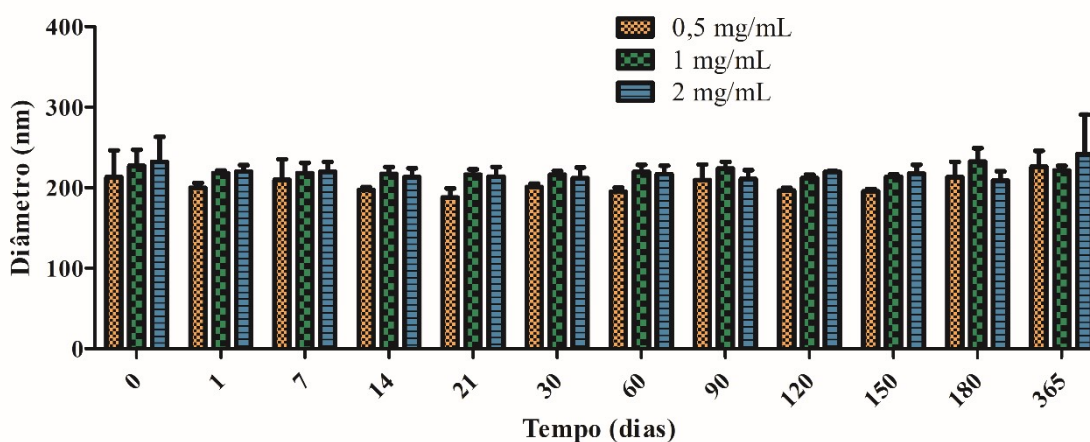
Figura 40 - Índice de polidispersão em função do tempo para as emulsões GCProp 9 acondicionadas sob refrigeração (4 ± 2 °C) e produzidas com diferentes concentrações do derivado hidrofóbico.



Fonte: Elaborada pela autora.

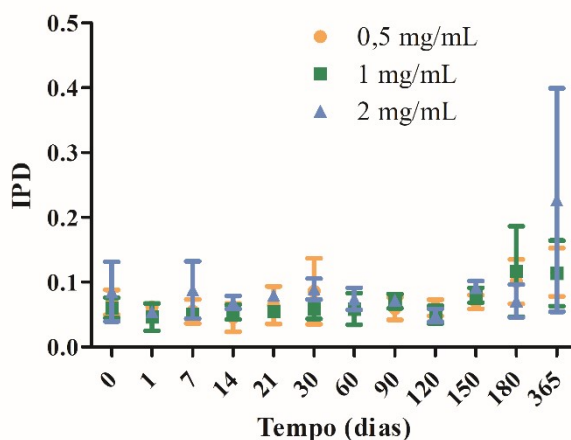
Avaliando a estabilidade das emulsões GCProp 12 (FIGURAS 41 e 42) é possível verificar que para as emulsões nas concentrações intermediária (1 mg/mL) e baixa (0,5 mg/mL) não há variação expressiva de tamanho de partícula no período estudado. Na concentração mais alta (2 mg/mL) há um ligeiro aumento do tamanho e IPD com um ano de estoque, o que indica que nessa condição a estabilidade não é tão prolongada quanto para os sistemas com menores concentrações de nanopartículas.

Figura 41 - Tamanho de partícula em função do tempo para as emulsões GCProp 12 acondicionadas sob refrigeração (4 ± 2 °C) e produzidas com diferentes concentrações do derivado hidrofóbico.



Fonte: Elaborada pela autora.

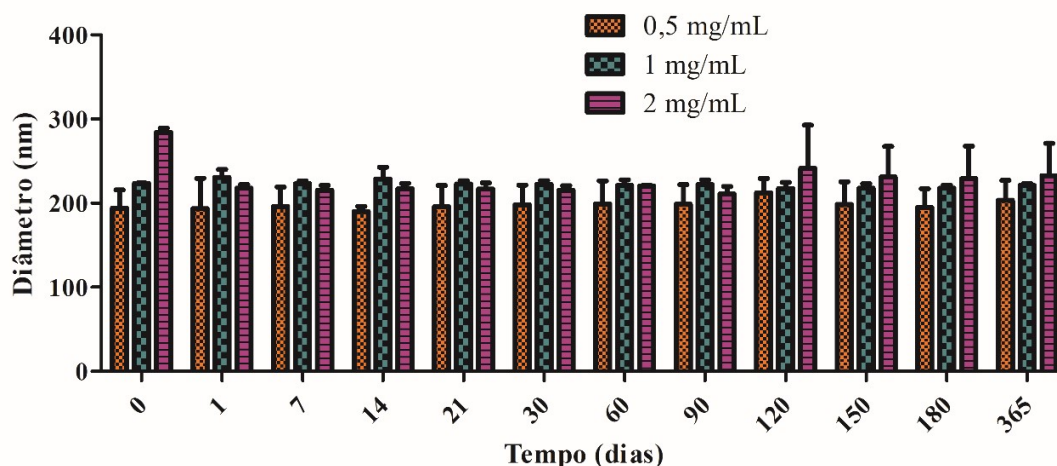
Figura 42 - Índice de polidispersão em função do tempo para as emulsões GCProp 12 acondicionadas sob refrigeração (4 ± 2 °C) e produzidas com diferentes concentrações do derivado hidrofóbico.



Fonte: Elaborada pela autora.

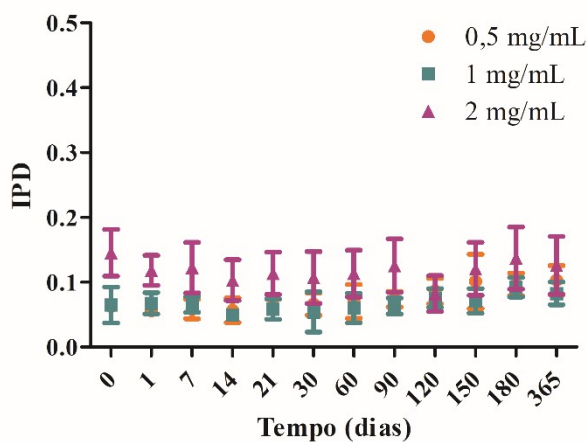
Perfil de estabilidade semelhante às emulsões GCProp 12 é verificado para as emulsões GCProp 24 (FIGURAS 43 e 44), onde nas concentrações intermediária (1 mg/mL) e baixa (0,5 mg/mL) as emulsões se mostraram estáveis por todo o período de um ano. Já para a maior concentração (2 mg/mL) estudada, diferente da emulsão GCProp 12, a emulsão GCProp 24 apresenta aumento do tamanho de partícula e do desvio padrão a partir do quarto mês de estoque, indicando um sistema não organizado e com estabilizada insatisfatória. Para as emulsões GCProp 9, GCProp 12 e GCProp 24, os valores de IPD foram menores do que 0,2 durante todo o período estudado.

Figura 43 - Tamanho de partícula em função do tempo para as emulsões GCProp 24 acondicionadas sob refrigeração (4 ± 2 °C) e produzidas com diferentes concentrações do derivado hidrofóbico.



Fonte: Elaborada pela autora.

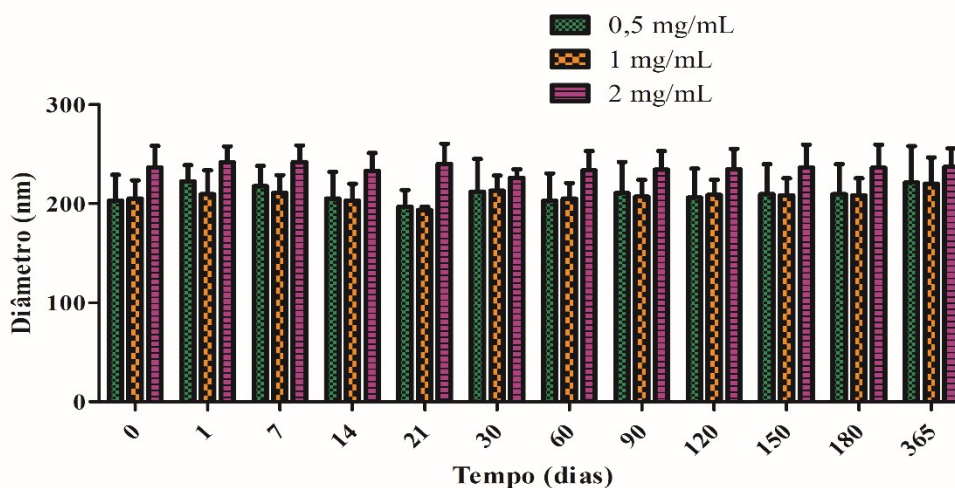
Figura 44 - Índice de polidispersão em função do tempo para as emulsões GCPop 24 acondicionadas sob refrigeração (4 ± 2 °C) e produzidas com diferentes concentrações do derivado hidrofóbico.



Fonte: Elaborada pela autora.

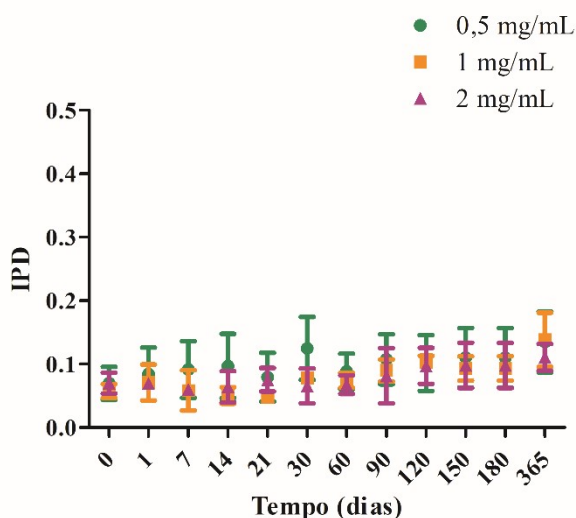
Os gráficos de estabilidade para as emulsões GCBut 9 estão nas Figuras 45 e 46. Semelhante ao observado para as emulsões GCPop 9, os tamanhos de partícula não variaram consideravelmente ao longo de um ano de experimento. Em todas as concentrações estudadas os valores de IPD foram inferiores a 0,2.

Figura 45 - Tamanho de partícula em função do tempo para as emulsões GCBut 9 acondicionadas sob refrigeração (4 ± 2 °C) e produzidas com diferentes concentrações do derivado hidrofóbico.



Fonte: Elaborada pela autora.

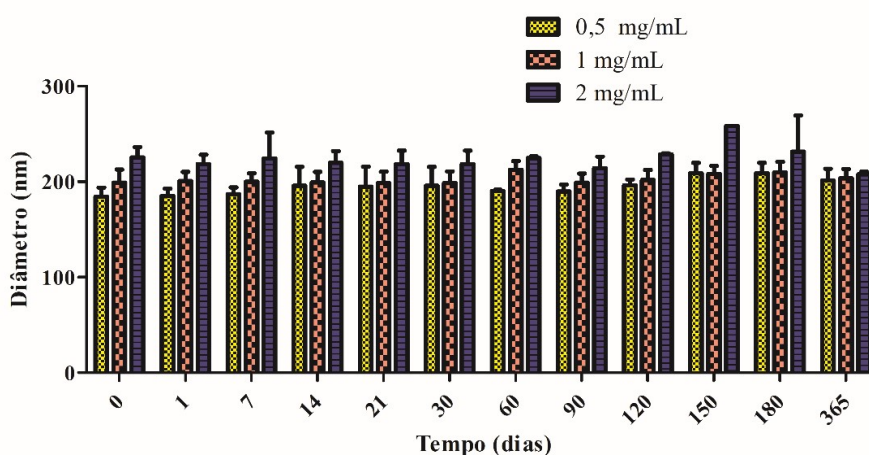
Figura 46 - Índice de polidispersão em função do tempo para as emulsões GCBUT 9 acondicionadas sob refrigeração (4 ± 2 °C) e produzidas com diferentes concentrações do derivado hidrofóbico.



Fonte: Elaborada pela autora.

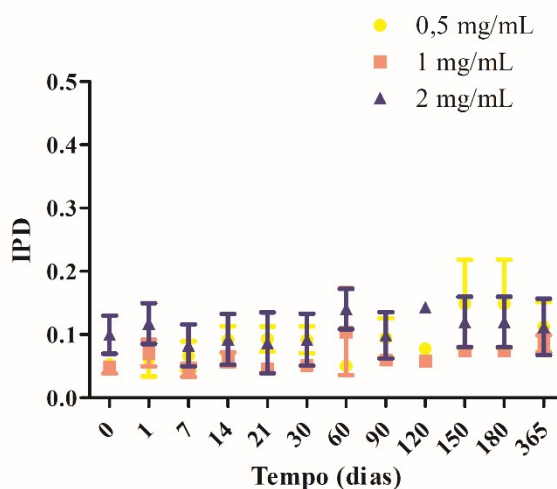
Para as emulsões GCBUT 12 não há variação expressiva de tamanho de partícula ao longo do tempo (FIGURA 47) para nenhuma das concentrações analisadas. Os valores de IPD para a emulsão GCBUT 12 (FIGURA 48) permaneceram constantes e abaixo de 0,2 durante todo o período analisado.

Figura 47 - Tamanho de partícula em função do tempo para as emulsões GCBUT 12 acondicionadas sob refrigeração (4 ± 2 °C) e produzidas com diferentes concentrações do derivado hidrofóbico.



Fonte: Elaborada pela autora.

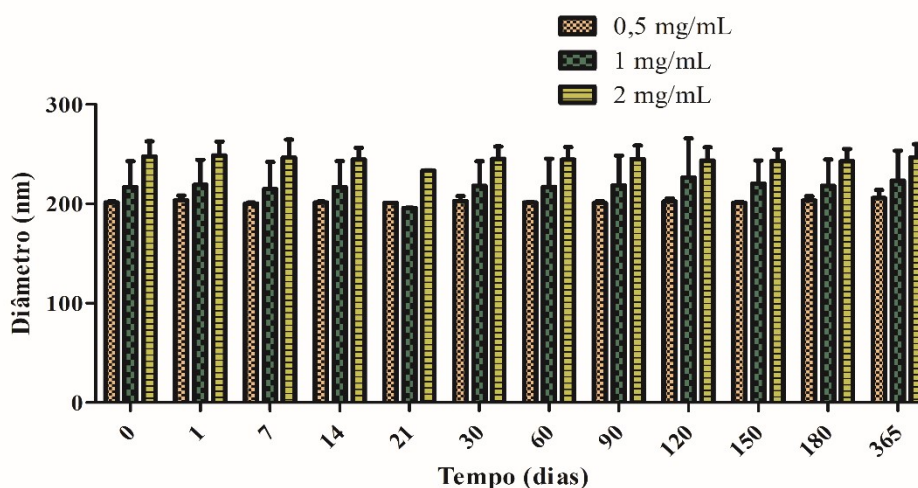
Figura 48 - Índice de polidispersão em função do tempo para as emulsões GCBut 12 acondicionadas sob refrigeração (4 ± 2 °C) e produzidas com diferentes concentrações do derivado hidrofóbico.



Fonte: Elaborada pela autora.

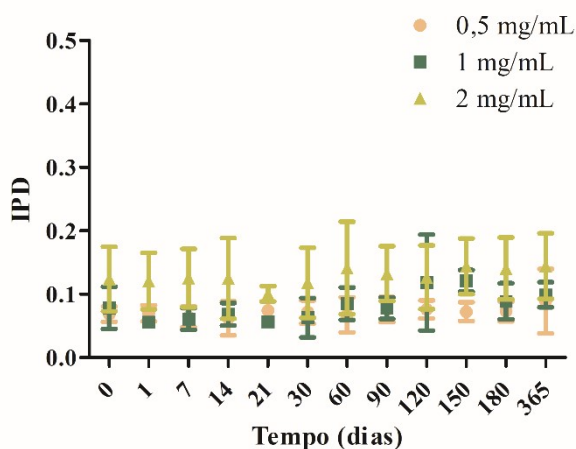
O perfil de tamanho de partícula para as emulsões GCBut 24 (FIGURA 49) possui perfil semelhante ao das emulsões GCBut 9 e GCBut 12, sem grandes alterações ao longo de um ano de experimento. Os valores de IPD (FIGURA 50) para as emulsões GCBut também foram menores do que 0,2 ao longo de um ano de análise.

Figura 49 - Tamanho de partícula em função do tempo para as emulsões GCBut 24 acondicionadas sob refrigeração (4 ± 2 °C) e produzidas com diferentes concentrações do derivado hidrofóbico.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 50 - Índice de polidispersão em função do tempo para as emulsões GCBut 24 acondicionadas sob refrigeração (4 ± 2 °C) e produzidas com diferentes concentrações do derivado hidrofóbico.



Fonte: Elaborada pela autora.

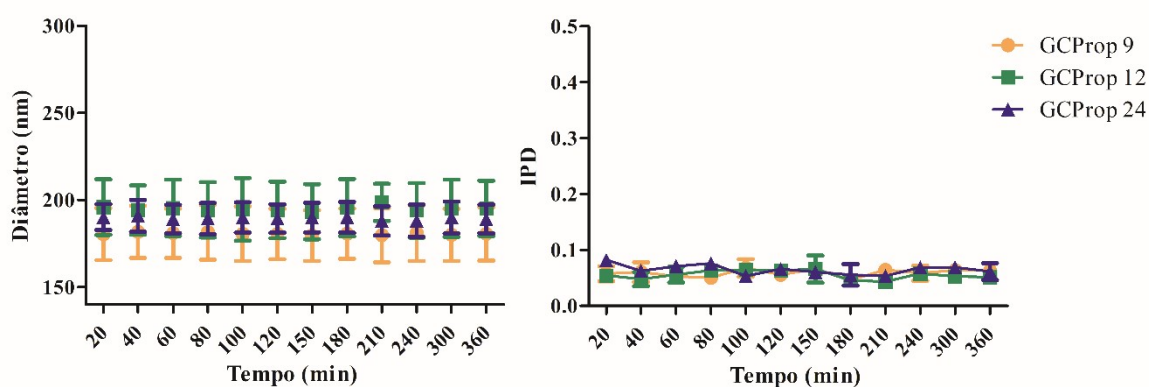
Emulsões de goma do cajueiro e L-lactídeo também foram avaliadas quanto à estabilidade nas mesmas condições que as emulsões de goma do cajueiro deste trabalho por um período de um mês. Não houve variações expressivas de tamanho ou IPD com o aumento da concentração de nanopartículas (RICHTER *et al.*, 2018). Diferente resultado foi observado para as emulsões de quitosana e tripolifosfato produzidas por Shah *et al.*, (2016), onde o aumento da concentração de nanopartículas favorece o aumento da estabilidade. Os autores atribuíram a estabilidade à adsorção de multicamadas de polissacarídeo e à formação de uma rede tridimensional que envolve as gotas da emulsão, prevenindo a coalescência (SHAH *et al.*, 2016).

Diferentes emulsões de Pickering também foram caracterizadas quanto à estabilidade estoque em outros trabalhos, porém por um tempo bem menor do que o analisado para as emulsões de goma do cajueiro modificada. Emulsões de Pickering estabilizadas por nanopartículas de amido acilado com anidrido succínico foram avaliadas por 35 dias a temperatura ambiente e se mantiveram estáveis durante o período estudado sem coalescência da emulsão (SONG *et al.*, 2015). A estabilidade de nanocápsulas de quitosana produzida por Lozano *et al.* (2013) foi estudada por período mais prolongado, de seis meses, a temperatura de 37 °C e as emulsões se mantiveram sem alterações durante todo o experimento.

4.8.4 Estabilidade em Tampão HEPES

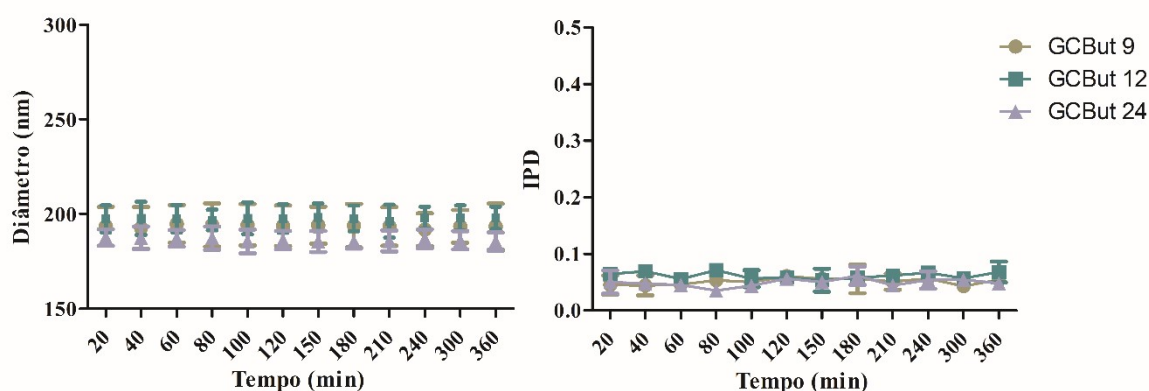
Para os ensaios de estabilidade foram utilizados apenas com as emulsões em baixa concentração (0,5 mg/mL), por ser a concentração mais próxima à solução de nanopartículas via auto-organização, podendo assim haver a comparação adequada entre os dois sistemas. Os gráficos da estabilidade em tampão HEPES 10 mmol (pH 7,4) a 37°C em função da variação de tamanho e IPD e para os sistemas formados pelas as emulsões GCProp estão na Figura 51 e para as emulsões GCBut na Figura 52.

Figura 51 - Tamanho de partícula e IPD para as emulsões GCProp em função do tempo em tampão HEPES 10 mmol/L (pH 7,4) a 37 °C.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 52 - Tamanho de partícula e IPD para as emulsões GCBut em função do tempo em tampão HEPES 10 mmol/L (pH 7,4) a 37°C.

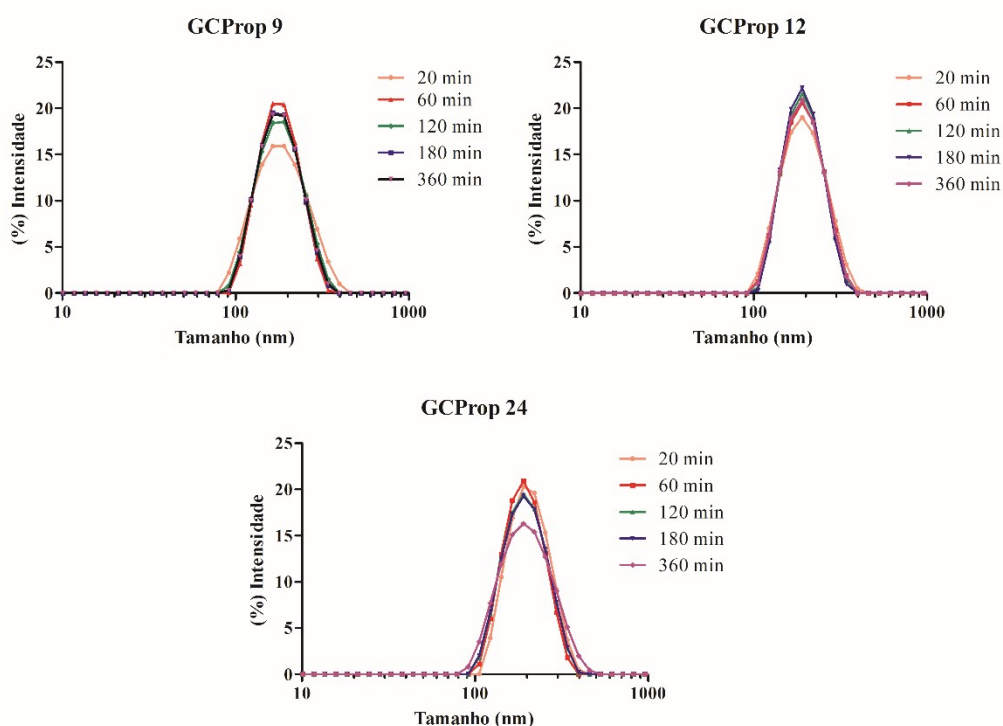


Fonte: Elaborada pela autora.

As nanopartículas formadas por auto-organização e os sistemas de emulsões GCProp e GCBut não sofreram variações expressivas no tamanho de partícula quando submetidas ao meio tamponado, tendo valores inferiores à 225 nm durante todo o ensaio.

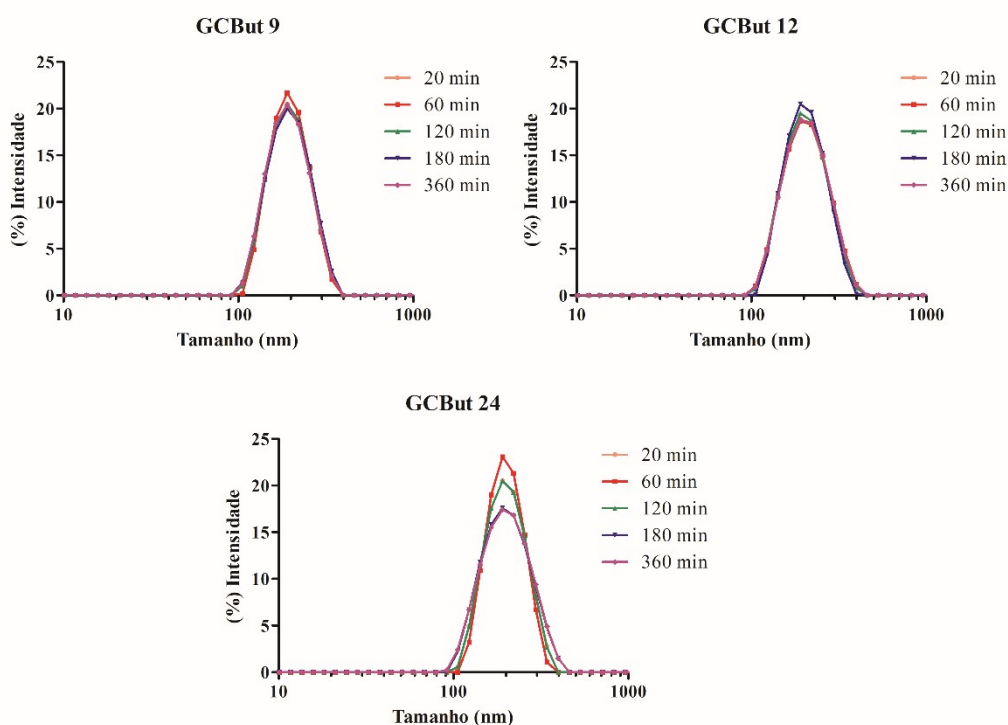
A variação de temperatura do sistema também não teve nenhuma influência sobre qualquer mudança no perfil de distribuição de partículas ou volume hidrodinâmico (FIGURAS 53 e 54), permanecendo todos os sistemas com perfil unimodal, indicando que o aumento da temperatura não leva desestabilização das emulsões.

Figura 53 – Distribuição de tamanho para as emulsões GCProp em tampão HEPES 10 mmol/L (pH 7,4) a 37°C.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 54 - Distribuição de tamanho para as emulsões GCBut em tampão HEPES 10 mmol/L (pH 7,4) a 37°C.



Fonte: Elaborada pela autora.

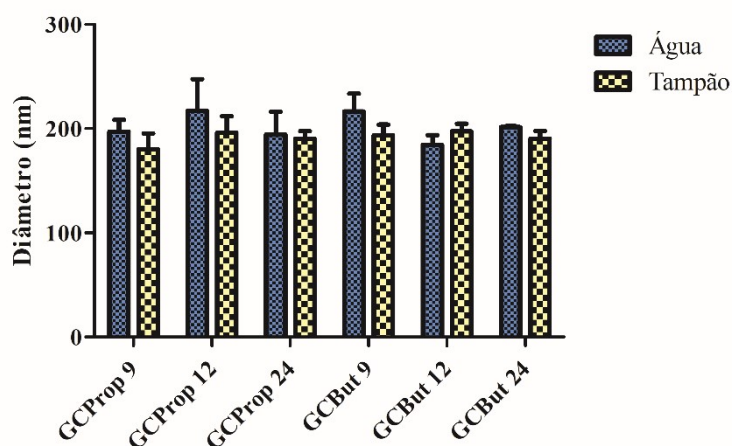
Emulsões de quitosana e triglicerídeos sintetizadas por Mwangi *et al.* (2016) foram incubadas em temperaturas variando entre 30 e 90 °C por 30 min e o tamanho de partícula foi medido num período de sete dias. As emulsões permaneceram estáveis em temperaturas de até 50°C. A desestabilização em temperaturas maiores foi atribuída ao aumento do movimento browniano das partículas de quitosana com consequente aumento da energia cinética do sistema. Os autores justificam que o aumento do movimento do sistema resulta na redistribuição de partículas na interface da gota de óleo, podendo provocar a dessorção e exposição da superfície da gota de óleo, levando a coalescência (MWANGI *et al.*, 2016). A temperatura de 37 °C utilizada no experimento de estabilidade das emulsões deste trabalho não foi alta o suficiente para aumentar a energia cinética das partículas.

Os valores de índice de polidispersão para as emulsões foram menores que os obtidos para as nanopartículas formadas por auto-organização para o mesmo ensaio. Os valores de IPD para as emulsões permaneceram inferiores a 0,1 para todos os sistemas de emulsão GCProp e GCBut, enquanto que para as nanopartículas GCProp e GCBut os valores foram de 0,25 e 0,3, respectivamente.

A fim de avaliar a interação do tampão com as emulsões foi construído um gráfico

com os tamanhos de partícula para os sistemas em água e após 20 min em contato com o tampão HEPES (FIGURA 55). É possível observar que não houve influência do tampão para o intumescimento das emulsões, sendo os valores ligeiramente menores do que os valores para as emulsões em água.

Figura 55 - Tamanho de partícula em água e após 20 min em contato com tampão HEPES para as emulsões GCProp e GCBut.



Fonte: Elaborada pela autora.

4.8.5 Incorporação da Anfotericina B

O uso de nanocápsulas é relatado para proteção de diferentes sistemas para aplicações farmacêuticas ou cosméticas, especialmente para substâncias que degradam em temperatura acima de 40°C que são sensíveis à oxidação em presença de água, por variação de pH ou por efeito de luz ultravioleta (MÜLLER; CARTER; BAILLIE, 2004).

Para o encapsulamento da AmB foram preparadas emulsões na concentração final de 0,5 mg/mL do derivado hidrofóbico na fase aquosa. Os valores para a eficiência de encapsulamento (EE %) da AmB podem ser vistos na Tabela 12.

Tabela 12 - Eficiência de encapsulamento para as emulsões GCProp e GCBut.

Emulsão	Eficiência de encapsulamento (%)
GCProp 9	21,8 ± 1,0
GCProp 12	41,9 ± 4,6
GCProp 24	26,6 ± 3,3
GCBut 9	55,2 ± 0,1
GCBut 12	44,9 ± 5,9
GCBut 24	33,3 ± 4,2

Fonte: Elaborada pela autora.

Diferente das nanopartículas via auto-organização, para as emulsões de Pickering existe a possibilidade do encapsulamento da anfotericina B tanto na matriz das nanopartículas que estabilizam a gota de óleo quanto dentro da gota de Mygliol®. Não foi possível determinar onde efetivamente o fármaco foi incorporado, pois para a análise da EE houve a necessidade de destruir todo o sistema, a partir da dissolução em DMSO, liberando o fármaco para sua quantificação.

Os valores percentuais de eficiência de encapsulamento para as emulsões variaram entre 21,8 ± 1,0 E 55,2 ± 0,1 %, valores bem mais baixos que os obtidos para as nanopartículas via auto-organização, que variaram entre 57,8 ± 0,9 E 96,3 ± 4,6 %. Os valores mais baixos de EE para as emulsões foi atribuído ao pequeno volume de Miglyol® que compõe o núcleo oleoso, o que limita a quantidade de AmB incorporada, diminuindo a porcentagem de encapsulamento. Outra possibilidade é que o processo de centrifugação para o isolamento das emulsões separa as nanopartículas maiores e com fraca interação com a gota de óleo, que também continham AmB dentro de sua matriz, também remove moléculas de fármaco adsorvidas na superfície das nanopartículas, o que faz com que o percentual de encapsulamento diminuía, em comparação com as nanopartículas via auto-organização.

Para as emulsões GCProp não houve nenhuma tendência do valor de eficiência de encapsulamento com o grau de substituição, de modo que as emulsões GCProp 12 (GS =1,15) e GCProp 24 (GS = 1,17) obtiveram valores de EE diferentes, de 41,9 ± 4,6 e 26,6 ± 3,3 %, respectivamente. Para as emulsões GCBut é possível observar uma diminuição dos valores de EE com o aumento do grau de substituição. Para esses sistemas o aumento da hidrofobicidade do sistema aumenta a interação entre a nanopartícula e a gota de óleo, diminuindo a incorporação da anfotericina B.

Emulsão de goma do cajueiro e L-lactídeo foram encapsuladas com AmB e

utilizado mesmo procedimento de isolamento em centrífuga, e apresentou eficiência de encapsulamento próximo aos das emulsões GCProp 9 e GCProp 24, com valores de $21,1 \pm 7,9 \%$ e $21,7 \pm 5,6 \%$, partindo-se de uma mesma massa inicial de AmB (RICHTER *et al.*, 2018).

Valores elevados de eficiência de encapsulamento foram reportados para sistemas contendo óleo para o encapsulamento de AmB, como nanocápsulas de quitosana e lecitina com valor de $97,8 \pm 2,11 \%$ (ASTHANA *et al.*, 2013), nanoemulsões de colesterol, com EE de $99 \pm 1 \%$ (CALDEIRA *et al.*, 2015) e microemulsões contendo surfactantes não iônicos com incorporação variando entre 70 e 90 % (SILVA *et al.*, 2013). Todos estes sistemas tem como procedimento de encapsulamento apenas a homogeneização da fase oleosa com o fármaco, sem a etapa por centrifugação.

O tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta para as emulsões GCProp e GCBut encapsuladas com AmB antes e após o isolamento em centrífuga estão na Tabela 13.

Tabela 13 - Tamanho de partícula, IPD e potencial zeta para as emulsões encapsuladas com AmB antes e após o isolamento em centrífuga.

Antes do isolamento			
Emulsão	Tamanho (nm)	IPD	Potencial zeta (mV)
GCProp 9	$257,5 \pm 31,9$	0,209	$-21,1 \pm 2,4$
GCProp 12	$273,5 \pm 9,5$	0,284	$-21,3 \pm 6,1$
GCProp 24	$243,3 \pm 11,3$	0,185	$-25,5 \pm 3,9$
GCBut 9	$251,9 \pm 22,5$	0,260	$-18,6 \pm 4,2$
GCBut 12	$305 \pm 1,6$	0,315	$-21,5 \pm 7,6$
GCBut 24	$387,3 \pm 43,2$	0,382	$-18,4 \pm 9,1$
Após o isolamento			
Emulsão	Tamanho (nm)	IPD	Potencial zeta (mV)
GCProp 9	$199,5 \pm 23,7$	0,189	$-30,1 \pm 1,2$
GCProp 12	$208,1 \pm 1,4$	0,142	$-46,9 \pm 3,7$
GCProp 24	$236,7 \pm 35,4$	0,299	$-43,8 \pm 3,2$
GCBut 9	$611,3 \pm 8,6$	0,462	$-24,2 \pm 4,5$
GCBut 12	$744,2 \pm 163$	0,606	$-26,6 \pm 0,9$
GCBut 24	1802 ± 688	0,617	$-25,9 \pm 3,2$

Fonte: Elaborada pela autora.

Para as emulsões GCProp encapsuladas com AmB é possível observar, da mesma maneira que para as emulsões sem fármaco, há uma diminuição do tamanho de partícula após o processo de isolamento. Todas as emulsões permaneceram com tamanhos inferiores a 250 nm, o que as torna aptas para utilização como sistema de liberação controlada (HICKEY *et al.*, 2015). Efeito inverso foi verificado para as emulsões GCBut, onde o tamanho de partícula aumenta expressivamente para valores maiores do que 500 nm após o isolamento em todas as condições de emulsão.

Uma explicação para o aumento do tamanho de partícula para as emulsões GCBut encapsuladas com AmB após o isolamento seria que o processo de centrifugação ao acelerar a formação do *creaming* e remoção da água promoveu a repulsão entre as cadeias hidrofóbicas da goma do cajueiro modificada e das moléculas de anfotericina B, aumentando o volume hidrodinâmico dos sistemas. É possível também observar o efeito do grau de substituição, onde o aumento do tamanho de partícula aumenta com o grau de substituição, e por consequência da hidrofobicidade da partícula.

As emulsões GCBut 9 e GCBut 12 não se apresentaram na forma agregada, mas não são ideais para utilização nos ensaios de liberação *in vitro*, pois possuem tamanhos maiores do que os indicados como sistemas de liberação controlada, com valores de $611,3 \pm 8,62$ e $744,2 \pm 163$ nm, respectivamente. A emulsão GCBut 24 teve tamanho de 1802 ± 688 nm, se mostrando um sistema agregado, sendo também descartada como sistema para carregamento AmB.

Os valores de IPD para as emulsões GCProp 9 e GCProp 12 diminuíram após o isolamento, e apenas para a emulsão GCProp 24 houve um pequeno aumento de 0,185 para 0,299. Como esperado, para as emulsões GCBut os valores de IPD foram maiores do que 0,3, indicando sistemas desorganizados.

Todos os valores de potencial zeta permaneceram negativos após o encapsulamento da AmB, e os valores aumentaram, em módulo, para todas as emulsões GCProp. Para as emulsões GCBut os valores foram menores, que 30 mV, em módulo, confirmando a instabilidade dos sistemas.

Analisando o tipo de anidrido e o grau de substituição, verifica-se que as emulsões GCProp possui cadeia hidrofóbica composta de dois carbonos e grau de substituição variando entre 1,15 a 1,29. Todos os sistemas permaneceram com tamanhos pequenos e sem sinais de agregação após o encapsulamento da AmB. Para as emulsões GCBut, que possuem cadeia hidrofóbica maior, com três carbonos, e grau de substituição superior (1,12 a 1,72), os tamanhos de partícula após o encapsulamento foram expressivamente maiores, indicando que

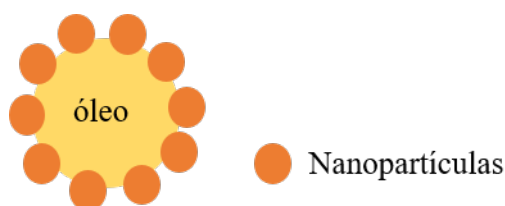
os sistemas de emulsão formados a partir de goma do cajueiro modificada mais hidrofóbica não comportam bem a anfotericina B.

Analisando os tamanhos de partícula para as emulsões GCProp 9 e GCProp 12 não há variação do tamanho para as emulsões sem fármaco ($197,2 \pm 11,24$ nm e $199,7 \pm 7,9$ nm) ou após o encapsulamento da AmB ($199,5 \pm 23,7$ nm e $208,1 \pm 1,48$ nm), respectivamente. Apenas para a emulsão GCProp 24 há um aumento, com pequena variação de tamanho da emulsão sem fármaco ($204,9 \pm 16,7$ nm) para a emulsão encapsulada com AmB ($236,7 \pm 35,4$). Dos Santos *et al.* (2017) sintetizaram nanocápsulas compostas de triglicerídeos de cadeia média e reportaram um pequeno aumento no diâmetro das gotas promovido pela incorporação de AmB, variando de 136 ± 5 nm para 148 ± 2 nm (DOS SANTOS *et al.*, 2017).

4.8.6 Microscopia de Força Atômica

A organização estrutural das emulsões de *Pickering* é de uma gota de óleo, Miglyol®, rodeada por nanopartículas de goma do cajueiro acilado, como sugerido na Figura 56. A superfície do sistema não deve ser completamente lisa, podendo ter relevos devido à adsorção irregular de nanopartículas.

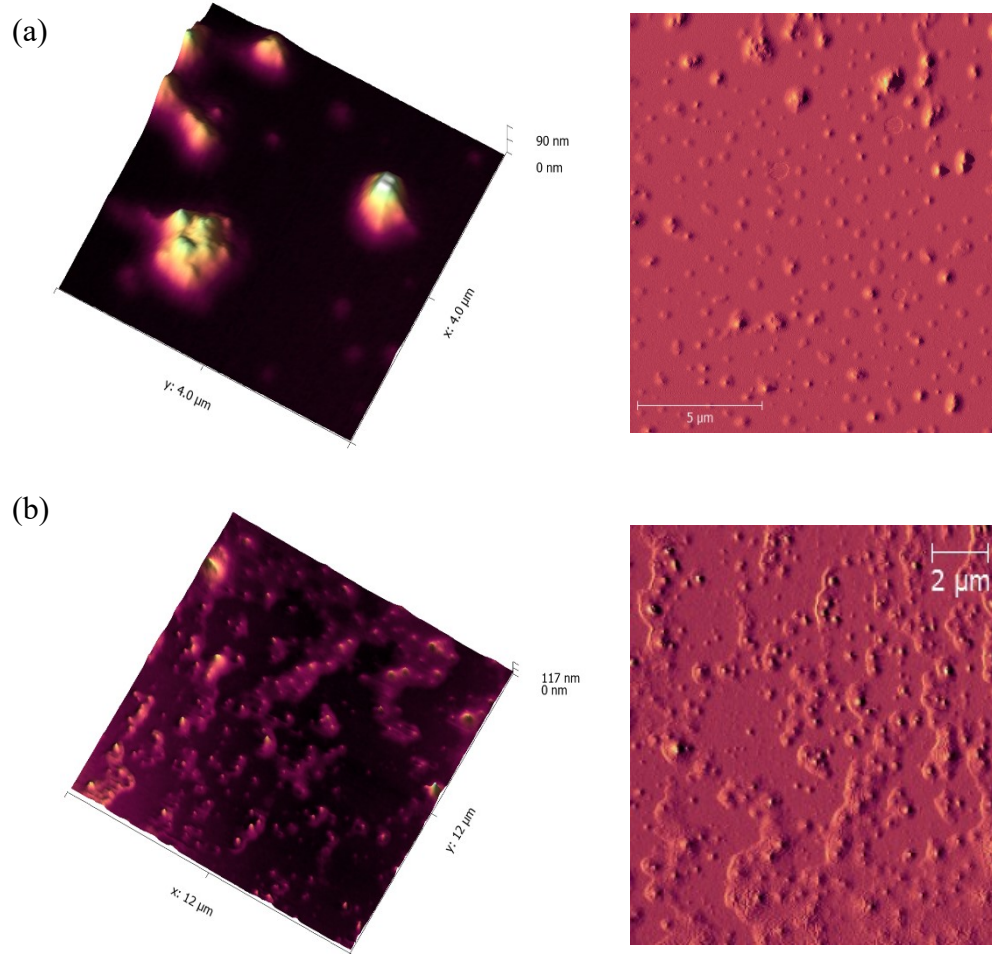
Figura 56 - Estrutura sugerida para emulsão de Pickering.



Fonte: Elaborada pela autora.

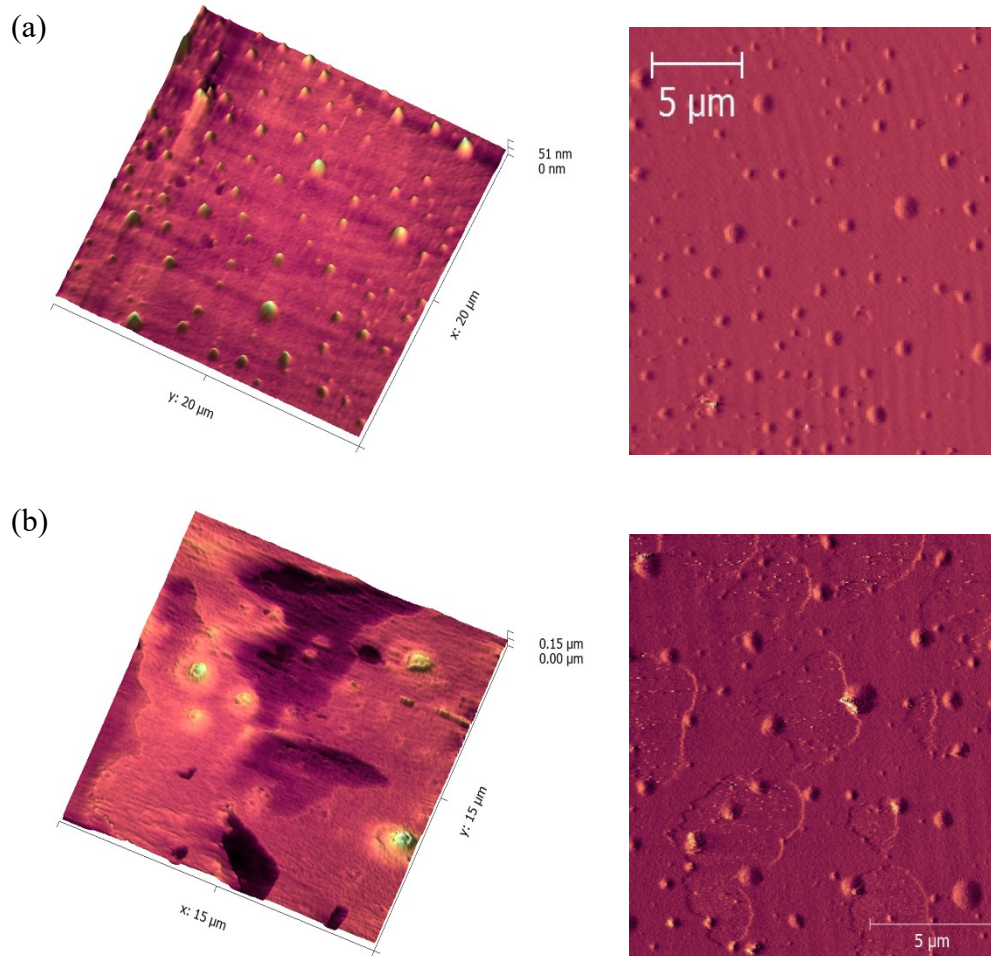
As características estruturais das emulsões sintetizadas neste trabalho foram elucidadas pela microscopia de força atômica e as imagens para as emulsões GCProp 9 estão na Figura 57 e para as emulsões GCBUT na Figura 58.

Figura 57 - Imagens de microscopia de força atômica tridimensionais (esquerda) e de amplitude (direita) para as emulsões GCProp 9 (a) sem AmB e (b) com AmB encapsulada.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 58 - Imagens de microscopia de força atômica tridimensionais (esquerda) e de amplitude (direita) para as emulsões GCBUT 9 (a) sem AmB e (b) com AmB encapsulada.



Fonte: Elaborada pela autora.

Para as duas emulsões analisadas, GCProp 9 e GCBUT 9, foi possível confirmar a hipótese da disposição das nanopartículas ao redor da gota de óleo. É bastante nítido nas imagens tridimensionais para a emulsão GCProp 9 sem AmB (FIGURA 58a) e emulsão GCBUT 9 com AmB (FIGURA 59b) as irregularidades na superfície da emulsão. No trabalho de El-Gogary *et al.* (2014), nanocápsulas de PLGA e polietileno glicol foram caracterizadas por microscopia de força atômica e apesar das imagens tridimensionais se apresentarem com superfície lisa e completamente esférica, as imagens de MFA de fase evidenciaram a presença de um halo na borda da nanocápsula que também foi favorável à hipótese de que o invólucro polimérico de polietileno glicol rodeia o núcleo oleoso.

A técnica de microscopia de força atômica permite a visualização das emulsões em um estado parcialmente seco. Nas imagens de amplitude é possível observar manchas ao redor da superfície das emulsões, como uma espécie de recobrimento, que pode ser atribuído à goma do cajueiro remanescente em solução, que não se adsorveu à gota de óleo na forma de

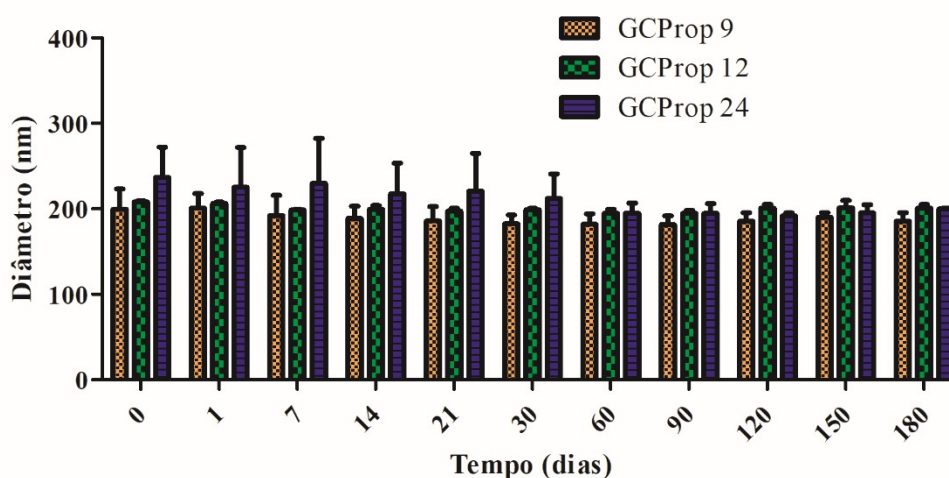
nanopartícula. Este efeito é mais pronunciado para as emulsões encapsuladas com anfotericina B, podendo ser atribuído também a moléculas de anfotericina B adsorvida na superfície das nanopartículas.

Emulsões de Pickering formadas por nanopartículas de amido também foram analisadas por microscopia de força atômica e as medições mostraram que, diferente das emulsões de goma do cajueiro deste trabalho, sua estrutura era plana e de forma irregular. Segundo o autor, esta estrutura semelhante a um disco plano poderia estabilizar melhor em comparação com outras emulsões que usam partículas esféricas, pois permite o empilhamento, sendo compactadas ao redor da gota de óleo (COSSU *et al.* 2015).

4.8.7 Estabilidade Estoque Emulsões com Anfotericina B

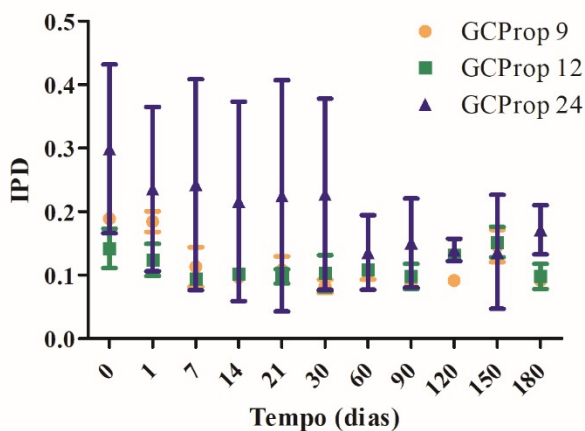
A estabilidade estoque para os sistemas com AmB encapsulada foi realizada apenas para as emulsões GCProp, num período de seis meses, sob refrigeração (4 ± 2 °C) e os valores de tamanho de partícula e índice de polidispersão em função do tempo estão nas Figuras 59 e 60, respectivamente. Não foi realizado o experimento de estabilidade para as emulsões GCBut por serem sistemas com tamanho acima do indicado como ideal para uma matriz carreadora de fármaco (emulsões GCBut 9 e GCBut 12) e por estar na forma agregada logo após sua síntese com AmB (emulsão GCBut 24).

Figura 59 - Tamanho de partícula em função do tempo para as emulsões GCProp com AmB encapsulada acondicionadas sob refrigeração (4 ± 2 °C).



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 60 - Índice de polidispersão em função do tempo para as emulsões GCProp com AmB encapsulada acondicionadas sob refrigeração ($4 \pm 2^\circ\text{C}$).



Fonte: Elaborada pela autora.

Para as emulsões encapsuladas GCProp 9 e GCProp 12 não se observa alteração significativa do tamanho de partícula durante todo o período de estoque, enquanto que para a emulsão GCProp 24 é possível verificar um aumento do tamanho de partícula e barra de erro considerável nos primeiros trinta dias. Após esse período, o sistema se organiza e mantém seu tamanho durante cinco meses.

Os valores de IPD para as emulsões encapsuladas GCProp 9 e GCProp 12 se mantêm estáveis sem variações expressivas ao longo do experimento e com valores inferiores a 0,2, indicando excelente homogeneidade destes sistemas ao acomodar a anfotericina B por um período prolongado de tempo. As emulsões GCProp 24 apresentaram valores de IPD grande e desvios expressivos nos primeiros trinta dias, assim como o tamanho de partícula, e ao final do primeiro mês há uma diminuição considerável, e seus valores permanecem constantes até o final do experimento.

Nanocápsulas de quitosana com AmB encapsulada, assim como as emulsões GCProp 9 e GCProp 12, se mostraram estáveis por um período de seis meses, porém a estocagem foi feita à temperatura de 37°C , diferente das emulsões de goma do cajueiro, que permaneceram sobre refrigeração (LOZANO *et al.*, 2013).

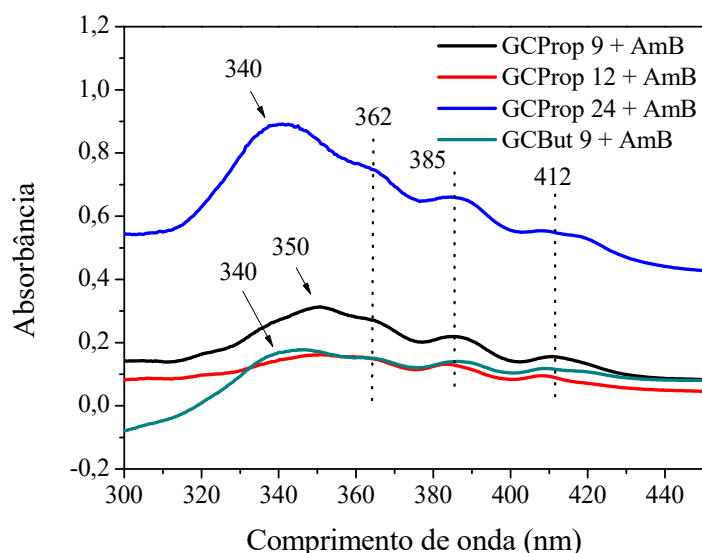
Nanoemulsões formadas a partir de diferentes óleos e AmB não apresentaram mudanças significativas de tamanho de partícula após o estoque por trinta dias, em temperaturas de 4 e 25°C . A aparência física a olho nu, assim como para as emulsões de goma do cajueiro era de uma solução translúcida, com coloração amarela. Para o sistema estocado à 40°C houve a desestabilização e separação de fases após 15 dias de estoque (SOSA *et al.*, 2017).

Caldeira *et al.*, (2015) sintetizaram nanoemulsões formadas de cadeias de colesterol e estearilamina com AmB e também avaliaram a estabilidade estoque por um período de seis meses e para os sistemas sem colesterol ou na concentração de 0,25 %, e a desestabilização das emulsões foi evidente após trinta dias de estoque. Ao se aumentar a concentração de colesterol para 0,5 % houve a estabilização do sistema ao longo dos seis meses, indicando que a interação hidrofóbica entre as moléculas de colesterol e AmB aumenta a estabilidade (CALDEIRA *et al.*, 2015). Para as emulsões de goma do cajueiro deste trabalho o aumento entre as interações hidrofóbicas, refletido pela diferença entre o grau de substituição entre emulsões GCProp 9 e GCProp 12 não influenciou na estabilidade dos sistemas.

4.8.8 Estudo da Agregação da Anfotericina B

Assim como o ensaio de estabilidade, o estudo da agregação foi realizado para as todas as emulsões GCProp e apenas para GCBut 9, e seus espectros de UV-vis está presente na Figura 61.

Figura 61 - Espectro de UV-vis para as emulsões GCProp e GCBut com AmB encapsulada.



Fonte: Elaborada pela autora.

Assim como para as nanopartículas com AmB encapsulada, o perfil do espectro de UV-vis para as emulsões é bastante semelhante, com uma intensa banda em 350 nm para as

emulsões GCProp 9 e GCProp 12, e em 340 nm para as emulsões GCProp 24 e GCBut 9.

Outras três bandas características da AmB, com menor intensidade, são observadas em 362, 385 e 412 nm, em comprimentos de onda bastante semelhante aos das nanopartículas.

A razão entre as bandas A_I/A_{IV} também foi calculada a fim de se avaliar o estado de agregação da AmB dentro das emulsões, e o resultado pode ser visto na Tabela 14. Segundo a literatura, a AmB é considerada em sua forma agregada quando esta razão é superior a dois, reportado inicialmente por Bolard *et al.* (1980). Para todas as emulsões encapsuladas é possível verificar que esta razão possui valor menor, o que indica que a matriz das emulsões de Pickering, formada por nanopartículas de goma do cajueiro modificado e Mygliol® conseguiu, de maneira efetiva, proteger o fármaco da agregação.

Tabela 14 - Razão A_I/A_{IV} para as emulsões encapsuladas com AmB.

Emulsão	Razão A_I/A_{IV}	Razão A_I/A_{IV}	
		(após seis meses)	Nanopartícula*
GCProp 9	1,54	1,42	4,01
GCProp 12	1,69	1,97	4,39
GCProp 24	1,61	1,25	3,96
GCBut 9	1,50	1,72	8,10

*Valores de razão A_I/A_{IV} para as nanopartículas via auto-organização após seis meses de estoque.

Fonte: Elaborada pela autora.

A seletividade para os esteróis depende do estado de agregação do fármaco. A anfotericina B em sua forma monomérica se associa com o esterol na membrana celular dos fungos. Na sua forma agregada pode formar poros no colesterol que constitui a membrana, o que a torna tóxica para as células hospedeiras (LARABI *et al.*, 2004). Observando os valores da razão entre as bandas A_I/A_{IV} é possível sugerir que o encapsulamento da AmB nas emulsões GCProp e GCBut leva a uma diminuição da toxicidade.

Ao avaliar o estado de agregação da anfotericina B nas emulsões após estoque em ambiente protegido da luz e refrigerado (4 ± 2 °C) é possível observar que não houve mudanças significativas no estado de agregação, com todos os valores para a razão A_I/A_{IV} menores do que dois, diferente do que é encontrado para as nanopartículas (Tabela 14), onde há o aumento significativo do estado de agregação, sugerindo que além da prevenção da agregação após o encapsulamento, a matriz da emulsão protege contra a agregação por um

período prolongado de tempo.

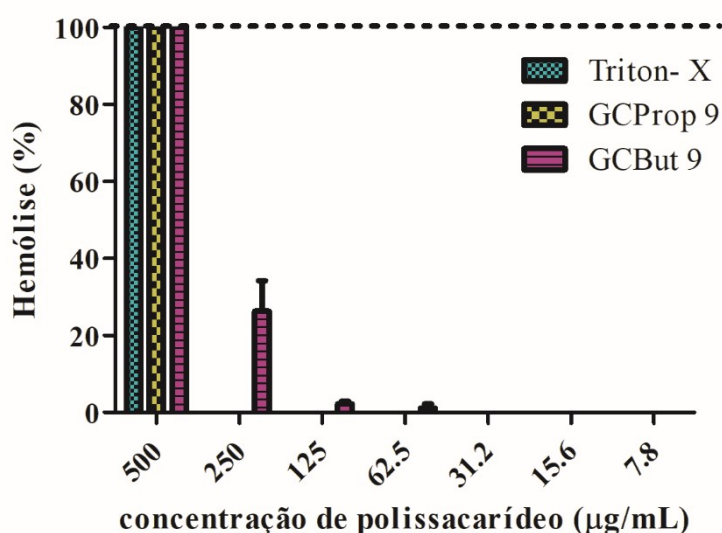
A diferença de hidrofobicidade entre os sistemas, refletida através do grau de substituição, não influencia no estado de agregação final da AmB, de modo que as emulsões GCprop 9 (GS = 1,29) e GCBut 9 (GS = 1,12) apresentaram valores para a razão A_I/A_{IV} semelhantes.

4.8.9 Ensaio de Hemólise

A incubação dos eritrócitos com Triton-X (0,1 %), utilizado como controle positivo, causa 100% de hemólise nas células vermelhas, quebrando a hemácia e levando a liberação da hemoglobina, o que faz com que a solução fique turva após a centrifugação. Já a solução salina (0,9 %), utilizada como controle negativo, exerce uma pressão osmótica equivalente a da membrana celular, preservando a integridade da célula (ITALIA *et al.*, 2009).

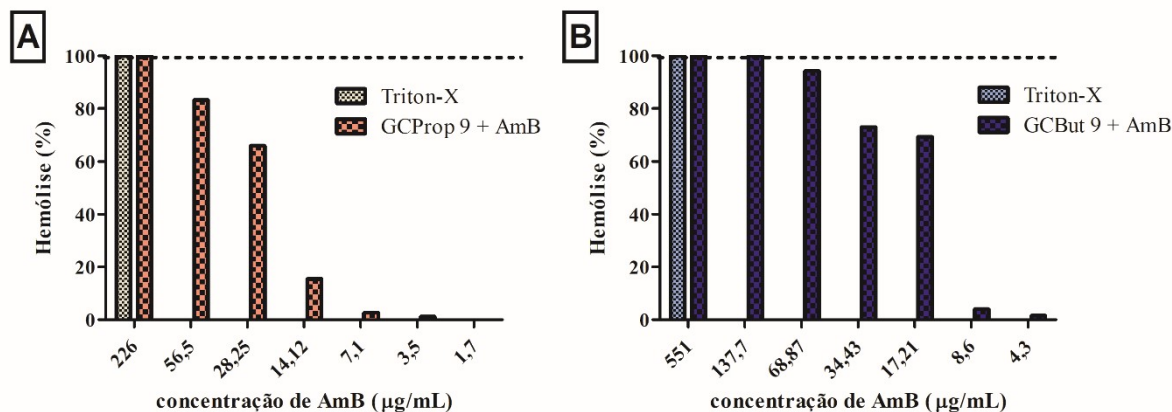
A extensão da hemólise causada após a incubação com eritrócitos isolados de sangue humano pode ser vista na Figura 62 para as emulsões GCProp 9 e GCBut 9 sem AmB e na Figura 63 para as emulsões GCProp 9 e GCBut 9 após o encapsulamento da AmB.

Figura 62 - Extensão de hemólise para as emulsões GCProp 9 e GCBut 9 sem AmB.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 63 - Extensão de hemólise para as emulsões (a) GCProp 9 e (b) GCBut 9 com AmB encapsulada.



Fonte: Elaborada pela autora.

As concentrações das soluções para as emulsões sem anfotericina B foi calculada a partir da concentração inicial de goma do cajueiro modificada utilizada na síntese (FIGURA 63). Como esperado, o Triton-x utilizado como padrão positivo apresentou hemólise de 100 %.

Para as emulsões sem AmB, na primeira concentração analisada (500 $\mu\text{g/mL}$) as emulsões GCProp 9 e GCBut 9 apresentaram hemólise de 100 %. A partir da concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ não se observa danos às hemácias quando em contato com a emulsão GCProp 9, indicando excelente biocompatibilidade para a matriz mesmo em altas concentrações de polissacarídeo. Para a emulsão GCBut 9, é possível observar atividade hemolítica nas concentrações de 250 $\mu\text{g/mL}$ ($26,3 \pm 7,9$ %), 124 $\mu\text{g/mL}$ ($2,2 \pm 0,7$ %) e 62,5 $\mu\text{g/mL}$ ($1,2 \pm 0,4$ %). Apesar da presença de atividade hemolítica para a emulsão GCBut 9 após três diluições, a extensão do dano às hemácias é muito pequena, o que ainda confere à emulsão boa compatibilidade.

Para as emulsões encapsuladas com AmB (FIGURA 63), a determinação da concentração de anfotericina B foi feita a partir da eficiência de encapsulamento, sendo as concentrações iniciais de AmB para a emulsão GCProp 9 de 226 $\mu\text{g/mL}$ e para a emulsão GCBut 9 de 551 $\mu\text{g/mL}$. As emulsões GCProp 9 e GCBut 9 encapsuladas com AmB, assim como as matrizes sem fármaco, apresentaram atividade hemolítica total na primeira concentração analisada.

A emulsão GCProp 9 encapsulada com AmB (FIGURA 63a) apresentou hemólise acima de 50 % nas concentrações de 56,5 $\mu\text{g/mL}$ ($83,3 \pm 28,9$ %) e 28,25 $\mu\text{g/mL}$ ($65,9 \pm 31,5$ %), porém nas concentrações abaixo de 14,12 $\mu\text{g/mL}$, há uma queda expressiva da extensão

do dano às hemácias, com percentuais de hemólise inferiores a 16 %.

Para a emulsão GCBut 9 encapsulada com AmB (FIGURA 63b) é possível observar atividade hemolítica alta, acima de 50 % nas concentrações de anfotericina variando entre 137,7 a 17,21 $\mu\text{g/mL}$, indicando que a matriz da emulsão não conseguiu evitar de maneira satisfatória a hemólise nas concentrações mais altas. Para a emulsão GCProp 9 também houve uma expressiva diminuição do percentual de hemólise nas concentrações mais baixas de anfotericina B de 8,6 $\mu\text{g/mL}$ ($6,1 \pm 3,0$ %) e 4,3 $\mu\text{g/mL}$ ($2,44 \pm 0,5$ %).

A hemólise do Fungizone® foi avaliada em diferentes trabalhos. Na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ foram reportados diferentes percentuais de hemólise, sendo de $78,7 \pm 1,8$ % (WANG *et al.*, 2016) e 100% (ASTHANA *et al.*, 2013). Em concentração mais baixa, de 10,5 $\mu\text{g/mL}$, o dano foi de 50 %. Soluções de AmB em DMSO foram testadas nas concentrações de 10, 20 e 40 $\mu\text{g/mL}$ e apresentaram valores de atividade hemolítica de $18,4 \pm 16,2$, $99,7 \pm 1,2$ e $103,9 \pm 2,1$ %, respectivamente (DOS SANTOS *et al.*, 2017).

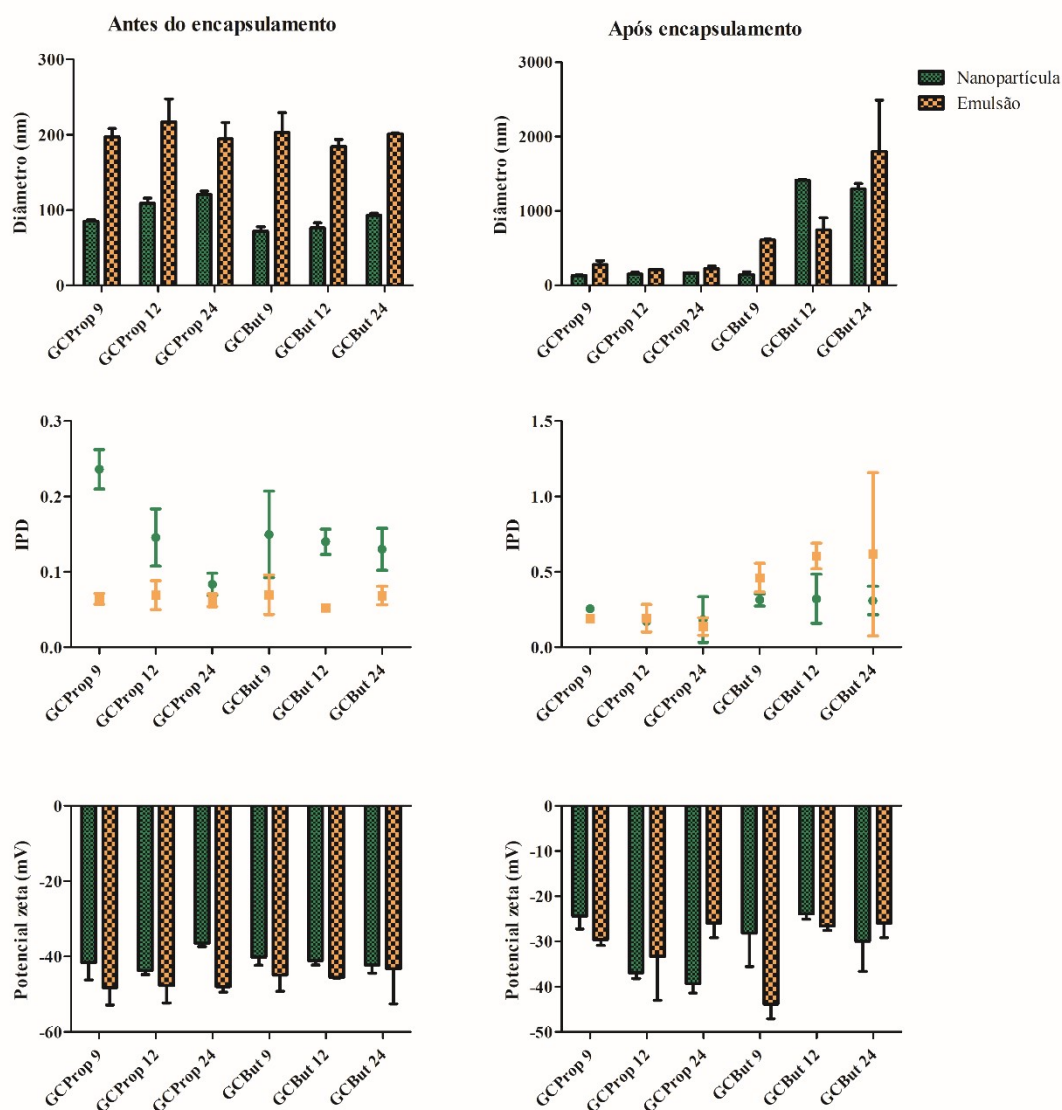
A razão para uma maior extensão de hemólise causada pelo Fungizone® pode ser explicada pelo fato de que esta formulação é uma dispersão micelar de AmB com desoxicolato de sódio, que é um surfactante e induz a hemólise, além do próprio dano causado somente pela AmB (ITALIA *et al.*, 2009).

4.8.10 Análise Comparativa entre Nanopartículas e Emulsões

O tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas formadas via auto-organização e das emulsões foram comparados e os resultados estão na Figura 64.

Analisando os tamanhos de partículas para as nanopartículas via auto-organização e emulsões (FIGURA 64) é possível observar um nítido aumento do tamanho final para o processo de emulsificação em relação às nanopartículas, seja eles com ou sem a anfotericina B. Para os sistemas sem AmB, nanopartículas e emulsões apresentaram tamanhos menores do que 250 nm. Ao se incorporar o fármaco em suas matrizes, as nanopartículas GCBut 9 e GCBut 12 e todas as emulsões GCBut apresentaram tamanhos superiores ao indicado para utilização em sistemas biológicos.

Figura 64 - Tamanho de partícula, índice de polispersão e potencial zeta para as nanopartículas via auto-organização e emulsões antes e após o encapsulamento da AmB.



Fonte: Elaborada pela autora.

Apesar do maior tamanho de partículas, as emulsões antes do encapsulamento da AmB apresentaram valores de IPD menores do que o das nanopartículas. Após o encapsulamento da AmB, os valores de IPD foram semelhantes entre nanopartículas e emulsões para os sistemas GCProp. Para os sistemas GCBut as emulsões apresentaram valores superiores em todas as condições.

Os valores de potencial zeta são menores, em módulo, para todas as nanopartículas antes do encapsulamento, da AmB em comparação com os sistemas de emulsão, porém após o encapsulamento as nanopartículas GCProp 24 e GCBut 24 apresentam valores maiores do que o das emulsões.

Analisando as estabilidades estoque sob refrigeração (4 ± 2 °C) e em tampão HEPES a 37 °C para os dois sistemas antes do encapsulamento, é difícil escolher o melhor, pois todos apresentaram excelente estabilidade frente aos dois experimentos. Ao se incorporar a AmB às matrizes se observa melhor desempenho de estabilidade estoque a nanopartícula GCProp 24, que apresenta valor de IPD inferior a 0,1 durante todo o tempo de estoque, e a emulsão GCProp 9 onde se observam valores de tamanho de partícula praticamente sem alteração e IPD menor do que 0,2.

Os sistemas que melhor encapsularam a AmB foram a nanopartícula GCProp 24 ($94,4 \pm 1,3$ %) e a emulsão GCProp 9 ($21,8 \pm 1,0$ %). Apesar de estes não serem os maiores valores de eficiência para os sistemas de nanopartículas e emulsões, a escolha dos melhores sistemas foi atrelada aos parâmetros de tamanho, IPD e potencial zeta, que refletem na estabilidade dos sistemas em acomodar a anfotericina B.

Ao avaliar o grau de agregação entre os dois melhores sistemas, a emulsão GCProp 9 apresentou AmB em sua forma não agregada, com valor para a razão entre as bandas I/IV de 1,54. A nanopartícula GCProp 24 apresenta AmB encapsulada já em sua forma agregada, com valor de 2,18.

Após a escolha do melhor sistema de emulsão e nanopartícula foi possível observar que não há diferença expressiva entre as duas matrizes antes do encapsulamento com AmB, tendo a nanopartícula GCProp 24 tamanho de $167,4 \pm 7,9$ nm, IPD de 0,159 e potencial zeta de $-39,3 \pm 2,0$ mV, já para a emulsão GCProp 9 o tamanho foi de $199,5 \pm 23,7$ nm, IPD de 0,189 e carga superficial de $-30,1 \pm 1,2$ mV, indicando a importância da caracterização dos carreadores principalmente após o encapsulamento com o fármaco modelo.

5 CONCLUSÕES

A reação de acilação da goma do cajueiro com os anidridos acético, propiônico e butírico foi eficaz para a produção de polímero anfifílico, sendo confirmada pelas técnicas de espectroscopia da região do infravermelho e ressonância magnética nuclear de hidrogênio.

O grau de substituição (GS), obtido por titulação potenciométrica, variou entre 1,12 a 2,21 e apenas para os derivados acilados com os anidridos acético e butírico houve o aumento do GS com o aumento da proporção de anidrido adicionado ao meio reacional.

A análise termogravimétrica demonstrou que a modificação da goma do cajueiro leva a produtos com maior estabilidade térmica quando comparados à goma sem modificação.

O derivado GCAC 24 apresentou toxicidade frente à *zebra fish*, enquanto os derivados GCPProp e GCBut se mostraram biocompatíveis.

As nanopartículas formadas via auto-organização apresentaram perfil unimodal e sem sinais de agregação. Além disso apresentaram excelente estabilidade, tanto para os ensaios com tampão HEPES a 37 °C, quanto para o estoque sob refrigeração (4 ± 2 °C) por período prolongado para todos os sistemas antes do encapsulamento da anfotericina B.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi eficaz em elucidar a morfologia das nanopartículas, indicando que o encapsulamento da AmB não afeta a estrutura superficial dos sistemas.

A formação das emulsões de Pickering foi instantânea ao misturar as duas fases, orgânica e aquosa. Para todos os sistemas, a melhor concentração de polissacarídeo utilizado para a formar as emulsões foi de 0,5 mg/mL. Para a estabilidade em função do tempo, as emulsões GCPProp foi a mais estável em relação a mudança de tamanho.

As emulsões apresentaram valores de tamanho de partícula e potencial zeta maiores valores de IPD menores, quando comparadas às nanopartículas sem fármaco.

A microscopia de força atômica (MFA) confirmou a hipótese estrutural para a superfície das emulsões de goma do cajueiro modificado.

Os valores de eficiência de encapsulamento foram significativamente menores para as emulsões do que para as nanopartículas e foi observado o aumento do tamanho de partícula tanto para emulsões quanto para nanopartículas após o encapsulamento da AmB, entretanto a AmB está menos agregada no sistema de emulsão.

O ensaio de liberação *in vitro* para as nanopartículas evidenciou uma liberação controlada da AmB, com liberação total menor do que 100 % no período de 72 h.

A estabilidade estoque para os sistemas após o encapsulamento da AmB mostrou

que os sistemas de nanopartícula GCProp 24 e de emulsão GCProp 9 são os melhores em acomodar a anfotericina B a longo prazo, mantendo constantes os parâmetros físico-químicos de tamanho de partícula e índice de polidispersão.

A atividade hemolítica mostrou que a emulsão GCProp 9 exibe uma extensão de dano pequeno aos eritrócitos, mesmo em altas concentrações de AmB, indicando um sistema com boa biocompatibilidade.

REFERÊNCIAS

- ABEND, S. *et al.* Stabilization of emulsions by heterocoagulation of clay minerals and layered double hydroxides. **Colloid and Polymer Science**, v. 276, p. 730–737, 1998.
- ABREU, C. M. W. S. *et al.* Synthesis and characterization of non-toxic and thermo-sensitive poly(N-isopropylacrylamide)-grafted cashew gum nanoparticles as a potential epirubicin delivery matrix. **Carbohydrate Polymers**, v. 154, p. 77–85, 2016.
- ABREU, F. O. M. S. *et al.* Chitosan/cashew gum nanogels for essential oil encapsulation. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 4, p. 1277–1282, 2012.
- ACEVEDO-GUEVARA, L. *et al.* Development of native and modified banana starch nanoparticles as vehicles for curcumin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 111, p. 498–504, 2018.
- AGNIHOTRI, S. A.; MALLIKARJUNA, N. N.; AMINABHAVI, T. M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 100, n. 1, p. 5–28, 2004.
- AKBARZADEH, A. *et al.* Liposome: classification, preparation and applications. **Nanoscale Research Letters**, v. 22, n. 8, p. 1–9, 2013.
- AL-QUADEIB, B. T. *et al.* Stealth Amphotericin B nanoparticles for oral drug delivery: In vitro optimization. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 23, n. 3, p. 290–302, 2015.
- AMORIM, D. R. B. *et al.* Electrical, structural and thermal properties of new conductive blends (PANICG) based on polyaniline and cashew gum for organic electronic. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 6, p. 1-15, 2018.
- APARNA, V. *et al.* Carboxymethylated ι-carrageenan conjugated amphotericin B loaded gelatin nanoparticles for treating intracellular *Candida glabrata* infections. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 110, p. 140–149, 2018.
- ARAIZA-CALAHORRA, A.; AKHTAR, M.; SARKAR, A. Recent advances in emulsion-based delivery approaches for curcumin: From encapsulation to bioaccessibility. **Trends in Food Science and Technology**, v. 71, p. 155–169, 2018.
- ARAÚJO, I. M. S. *et al.* Contribution of the cashew gum (*Anacardium occidentale L.*) for development of layer-by-layer films with potential application in nanobiomedical devices. **Materials Science and Engineering C**, v. 32, n. 6, p. 1588–1593, 2012.
- ARAÚJO, J. **Programa Nacional de Pesquisa do caju**. Fortaleza, 1991.
- ARAÚJO, T. S. L. *et al.* Antidiarrheal activity of cashew GUM, a complex heteropolysaccharide extracted from exudate of *Anacardium occidentale L.* in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 174, p. 299–307, 2015.

- ASTHANA, S. *et al.* Immunoadjuvant chemotherapy of visceral leishmaniasis in hamsters using amphotericin B-encapsulated nanoemulsion template-based chitosan nanocapsules. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 4, p. 1714–1722, 2013.
- ATARIAN, M. *et al.* Formulation of Pickering sunflower oil-in-water emulsion stabilized by chitosan-stearic acid nanogel and studying its oxidative stability. **Carbohydrate Polymers**, v. 210, p. 47–55, 2019.
- BARAU, C.; BRAUN, J.; VINCENT, C. Pharmacokinetic study of raltegravir in HIV-infected patients with end-stage liver disease: the LIVERAL-ANRS 148 study. **clinical infectious diseases**, v. 59, p. 1177–1184, 2014.
- BARBOSA, J. P.; NEVES, A. R.; SILVA, A. M. Nanostructured lipid carriers loaded with resveratrol modulate human dendritic cells. **International journal of nanomedicine**, v. 11, p. 3501–3516, 2016.
- BARWICZ, J.; CHRISTIAN, S.; GRUDA, I. Effects of the aggregation state of amphotericin B on its toxicity to mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, n. 10, p. 2310–2315, 1992.
- BELOQUI, A.; SOLINIS, M. A. Nanostructured lipid carriers: promising drug delivery systems for future clinics. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 12, n. 1, p. 143–161, 2016.
- BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337–351, 2016.
- BILATI, U.; ALLÉMANN, E.; DOELKER, E. Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 24, n. 1, p. 67–75, 2005.
- BINKS, B. P. Colloidal particles at liquid interfaces. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 9, n. 48, p. 6298–6299, 2007.
- BITTENCOURT, C. R.; DE OLIVEIRA FARIAS, E. A.; BEZERRA, K. C.; *et al.* Immobilization of cationic antimicrobial peptides and natural cashew gum in nanosheet systems for the investigation of anti-leishmanial activity. **Materials Science and Engineering C**, v. 59, p. 549–555, 2016.
- BOLARD, J.; SEIGNEURET, M.; BOUDET, G. Interaction between phospholipid bilayer membranes and the polyene antibiotic amphotericin b lipid state and cholesterol content dependence. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 599, p. 280–293, 1980.
- BOTREL, D. A. *et al.* Properties of spray-dried fish oil with different carbohydrates as carriers. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 13, p. 4181–4188, 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Leishmaniose Visceral**. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Miltefosina para o tratamento da Leishmaniose Tegumentar. **Conitec**, p. 27, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual De Vigilância Da Leishmaniose Tegumentar**. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Farmacopéia Brasileira. **Diário Oficial da União**, v. 1, p. 546, 2010.

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

CABALLERO, M. V.; CANDIRACCI, M. Zebrafish as Toxicological model for screening and recapitulate human diseases. **Journal of Unexplored Medical Data**, v. 3, n. 2, p. 4, 2018.

CALDEIRA, L. R. *et al.* Nanoemulsions loaded with amphotericin B: A new approach for the treatment of leishmaniasis. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 70, p. 125–131, 2015.

CALVO, P.; REMUNAN-LOPEZ, C. Development of positively charged colloidal drug carriers: chitosan-coated polyester nanocapsules and submicron-emulsions. **Colloid and Polymer Science**, v. 275, n. 1, p. 46–53, 1997.

CAMPOS, D. A. *et al.* Study of antimicrobial activity and atomic force microscopy imaging of the action mechanism of cashew tree gum. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 1, p. 270–274, 2012.

CASTRO, R. A. O. *et al.* Electrosynthesis and characterization of polypyrrole/cashew gum composite grown on gold surface in aqueous medium. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 12, n. 1, p. 50–61, 2017.

CHANG, H; Yeh, M. Clinical development liposome- based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 49–60, 2012.

CHENG, C. J. *et al.* A holistic approach to targeting disease with polymeric nanoparticles. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 14, n. 4, p. 239–47, 2015.

CHEVALIER, Y.; BOLZINGER, M. A. Emulsions stabilized with solid nanoparticles: Pickering emulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 439, p. 23–34, 2013.

CHHONKER, Y. S. *et al.* Amphotericin-B entrapped lecithin/chitosan nanoparticles for prolonged ocular application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 1451–1458, 2015.

CHUAH, A. M. *et al.* Effect of chitosan on the stability and properties of modified lecithin stabilized oil-in-water monodisperse emulsion prepared by microchannel emulsification. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 3, p. 600–610, 2009.

COMUNIAN, T. A. *et al.* Enhancing stability of echium seed oil and beta-sitosterol by their coencapsulation by complex coacervation using different combinations of wall materials and crosslinkers. **Food Chemistry**, v. 252, p. 277–284, 2018.

CORDEIRO, M. S. F. *et al.* Biopolymers and pilocarpine interaction study for use in drug delivery systems (DDS). **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 127, n. 2, p. 1777–1785, 2017.

CORTESI, R.; VALACCHI, G.; MURESAN, X. M. Nanostructured lipid carriers (NLC) for the delivery of natural molecules with antimicrobial activity: production, characterization and *in vivo* studies. **Journal of Microencapsulation**, v. 34, n. 1, p. 63–72, 2017.

COSSU, A. *et al.* Antifungal activity against *Candida albicans* of starch Pickering emulsion with thymol or amphotericin B in suspension and calcium alginate films. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 493, n. 1–2, p. 233–242, 2015.

COSTA, P.; LOBO, J. M. S. L. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, p. 123–133, 2001.

COSTALAT, M.; DAVID, L.; DELAIR, T. Reversible controlled assembly of chitosan and dextran sulfate : A new method for nanoparticle elaboration. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, p. 717–726, 2014.

CSERHATI, T.; FORGACS, E.; OROS, G. Biological activity and environmental impact of anionic surfactants. **Environment International**, v. 28, n. 5, p. 337–348, 2002.

CUNHA, P. L. R. *et al.* Oxidation of cashew tree gum exudate polysaccharide with TEMPO reagent. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 1, p. 85–92, 2007.

DANAEI, M.; DEGHANKHOLD, M.; ATAIEI, S.; *et al.* Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p. 1–17, 2018.

DARTORA, P. C.; LOUREIRO, M.; FORTE, M. M. Crystallization kinetics and morphology of poly(lactic acid) with polysaccharide as nucleating agent. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 134, n. 3, p. 1705–1713, 2018.

DAS, B.; NAYAK, A. K.; NANDA, U. Topical gels of lidocaine HCl using cashew gum and Carbopol 940: Preparation and *in vitro* skin permeation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 62, p. 514–517, 2013.

DAS, S. *et al.* Miltefosine loaded albumin microparticles for treatment of visceral leishmaniasis: formulation development and *in vitro* evaluation. **Polymer advanced Technology**, v. 22, p. 172–179, 2010.

DESTREBATS, M. *et al.* Emulsions stabilised by whey protein microgel particles: towards food-grade Pickering emulsions. **Soft matter**, v. 10, n. 36, p. 6941–54, 2014.

DIAS, S. F. L. *et al.* Acetylated cashew gum-based nanoparticles for transdermal delivery of diclofenac diethyl amine. **Carbohydrate Polymers**, v. 143, p. 254–261, 2016.

DIRO, E. *et al.* Atypical manifestations of visceral leishmaniasis in patients with HIV in north Ethiopia: A gap in guidelines for the management of opportunistic infections in resource poor settings. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 122–129, 2015.

DONOVICK, R. *et al.* Amphotericin A and B, antifungal antibiotics produced by a streptomycete I. *in vivo* studies. **Antibiotic Annual**, v. 579, p. 1956, 1955.

DUERAMAE, I. *et al.* Self-assembly of acetylated dextran with various acetylation degrees in aqueous solutions: Studied by light scattering. **Carbohydrate Polymers**, v. 161, p. 306, 2017.

EENSCHOOTEN, C. *et al.* Novel self-associative and multiphasic nanostructured soft carriers based on amphiphilic hyaluronic acid derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 1, p. 444–451, 2012.

EISSA, M. M. *et al.* Miltefosine lipid nanocapsules for single dose oral treatment of *schistosomiasis mansoni*: A preclinical study. **PLoS ONE**, v. 10, n. 11, p. 1–22, 2015.

EL-GOGARY, R. I. *et al.* Polyethylene glycol conjugated polymeric nanocapsules for targeted delivery of quercetin to folate-expressing cancer cells *in vitro* and *in vivo*. **ACS Nano**, v. 8, n. 2, p. 1384–1401, 2014.

ESPADA, R. *et al.* Effect of aggregation state on the toxicity of different amphotericin B preparations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 361, n. 1–2, p. 64–69, 2008.

ESTRADA-FERNÁNDEZ, R. *et al.* Stabilization of oil-in-water-in-oil (O1/W/O2) Pickering double emulsions by soluble and insoluble whey protein concentrate-gum Arabic complexes used as inner and outer interfaces. **Journal of Food Engineering**, v. 221, p. 35–44, 2018.

FEDOROVA, A. F.; ROGOVIN, Z. A. A study of the relative reactivity of the hydroxyl groups of cellulose in esterification in an acidic medium. **Polymer Science U.S.S.R.**, v. 4, n. 5, p. 1189–1194, 1963.

FERNANDES, R. V. DE B. *et al.* Cashew gum and inulin: New alternative for ginger essential oil microencapsulation. **Carbohydrate Polymers**, v. 153, p. 133–142, 2016.

FIGUEIREDO, A. A. *et al.* Topical protection of mice laryngeal mucosa using the natural product cashew gum. **Laryngoscope**, v. 128, n. 5, p. 1157–1162, 2018.

FILIPPIN, F. B.; SOUZA, L. C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 167–194, 2006.

FORATO, L. A. *et al.* Effect of cashew gum-carboxymethylcellulose edible coatings in extending the shelf-life of fresh and cut guavas. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 5, p. 68–74, 2015.

FUJISAWA, S.; TOGAWA, E.; KURODA, K. Nanocellulose-stabilized Pickering emulsions and their applications. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 18, n. 1, p. 959–971, 2017.

GALINDO-RODRIGUEZ, S. *et al.* Associated with nanoparticle formation in the salting-out-emulsification-difusion and nanoprecipitations methods. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 8, p. 1428–1439, 2004.

GANIS, P. *et al.* Polyene macrolide antibiotic amphotericin B. Crystal structure of the N-iodoacetyl derivative. **Journal of the American Chemical Society**, v. 93, n. 18, p. 4560–4564, 1971.

GARG, S.; JANA, A. K. Characterization and evaluation of acylated starch with different acyl groups and degrees of substitution. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 4, p. 1623–1630, 2011.

GE, S. *et al.* Characterizations of Pickering emulsions stabilized by starch nanoparticles: Influence of starch variety and particle size. **Food Chemistry**, v. 234, p. 339–347, 2017.

GE, W. *et al.* Characterization and antioxidant activity of β -carotene loaded chitosan-graft-poly(lactide) nanomicelles. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 169–176, 2015.

GESTRANIUS, M. *et al.* Phase behaviour and droplet size of oil-in-water Pickering emulsions stabilised with plant-derived nanocellulosic materials. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 519, p. 60–70, 2017.

GILANI, K. *et al.* Development of respirable nanomicelle carriers for delivery of amphotericin B by jet nebulization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 1, p. 252–259, 2011.

GILBERT, S. B.; CHRISTOPHER, R. T. Modern pharmaceutics. **Modern Pharmaceutics**. p.265–268., 2002. Londres: CRC press.

GOMEZ-ESTACA, J. *et al.* Encapsulation of an astaxanthin-containing lipid extract from shrimp waste by complex coacervation using a novel gelatin-cashew gum complex. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 155–162, 2016.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Visceral Leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338–349, 2004.

GOWTHAMARAJAN, K. *et al.* Development of buccal tablets for curcumin using *Anacardium occidentale* gum. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 4, p. 1177–1183, 2012.

GOWTHAMARAJAN, K. *et al.* Preliminary study of *Anacardium occidentale* gum as binder in formulation of paracetamol tablets. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 2, p. 506–511, 2011.

GOYCOOLEA, F. M. *et al.* Chitosan-alginate blended nanoparticles as carriers for the transmucosal delivery of macromolecules. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 7, p. 1736–1743, 2009.

GRÖNDAHL, M.; TELEMAN, A.; GATENHOLM, P. Effect of acetylation on the material properties of glucuronoxylan from aspen wood. **Carbohydrate Polymers**, v. 52, n. 4, p. 359–366, 2003.

GU, C. *et al.* Preparation of polysaccharide derivatives chitosan-graft-poly(ϵ -caprolactone)

amphiphilic copolymer micelles for 5-fluorouracil drug delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 116, p. 745–750, 2014.

GUILHERME, M. R. *et al.* Synthesis of a novel superabsorbent hydrogel by copolymerization of acrylamide and cashew gum modified with glycidyl methacrylate. **Carbohydrate Polymers**, v. 61, n. 4, p. 464–471, 2005.

HAMILL, R. J. Amphotericin B formulations: A comparative review of efficacy and toxicity. **Drugs**, v. 73, n. 9, p. 919–934, 2013.

HARGREAVES, P. L.; NGUYEN, T.; RYAN, R. O. Spectroscopy studies of Amphotericin B solubilized in nanoscale bilayer membranes. **Biochimica et Biophysica (BBA) – Biomembranes**, v. 1758, p. 38–44, 2006.

HASNAIN, M. S. *et al.* Extraction and characterization of cashew tree (*Anacardium occidentale*) gum; use in aceclofenac dental pastes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 116, p. 1074–1081, 2018.

HERWALDT, B. L.; BERMAN, J. D. Recommendations for treating leishmaniasis with sodium stibogluconate (Pentostam) and review of pertinent clinical studies. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, p. 296–306, 1992.

HICKEY, J. W. *et al.* Control of polymeric nanoparticle size to improve therapeutic delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 219, p. 535–547, 2015.

HILLERY, A. M. Supramolecular lipid drug delivery systems: from laboratory to clinic. A review of the recently introduced commercial liposomal and lipid-based formulations of amphotericin B. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 24, n. 2, p. 345–363, 1997.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumental**. 6^a ed. Porto Alegre, 2009.

HONG, L. F. *et al.* Characterisation of physicochemical properties of propionylated corn starch and its application as stabiliser. **Food Technology and Biotechnology**, v. 53, n. 3, p. 278–285, 2015.

HUANG, Z. *et al.* RGD-modified PEGylated paclitaxel nanocrystals with enhanced stability and tumor-targeting capability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 556, n. November 2018, p. 217–225, 2018.

HUNTER, A. C.; MOGHIMI, S. M. Smart polymers in drug delivery: A biological perspective. **Polymer Chemistry**, v. 8, n. 1, p. 41–51, 2017.

IGBINEWEKA, O. *et al.* Evaluating the efficacy of topical silver nitrate and intramuscular antimonial drugs in the treatment of cutaneous leishmaniasis in sokoto, Nigeria. **African Journal of Clinical and Experimental Microbiology**, v. 13, p. 90–97, 2012.

IMRAN, M. *et al.* Sugar-based novel niosomal nanocarrier system for enhanced oral bioavailability of levofloxacin. **Drug Delivery**, v. 23, n. 9, p. 3653–3664, 2016.

- ISHAQ, Z. A. *et al.* Development and in vitro evaluation of cost effective amphotericin B polymeric emulsion. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 46, n. September 2017, p. 66–73, 2018.
- ITALIA, J. L. *et al.* Biodegradable nanoparticles improve oral bioavailability of amphotericin B and show reduced nephrotoxicity compared to intravenous fungizone®. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 6, p. 1324–1331, 2009.
- JABRI, T. *et al.* Fabrication of lecithin-gum tragacanth muco-adhesive hybrid nano-carrier system for in-vivo performance of Amphotericin B. **Carbohydrate Polymers**, v. 194, p. 89–96, 2018.
- JAIN, S. *et al.* Gelatin Coated Hybrid Lipid Nanoparticles for Oral Delivery of Amphotericin B. **Molecular Pharmaceutics**, v. 4, n. 9, p. 2542-2553, 2012.
- JEE, J. P.; MCCOY, A.; MECOZZI, S. Encapsulation and release of amphotericin B from an ABC triblock fluoruous copolymer. **Pharmaceutical Research**, v. 29, n. 1, p. 69–82, 2012.
- JIANG, S. *et al.* Preparation and characterization of octenyl succinic anhydride modified taro starch nanoparticles. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, p. 1–11, 2016.
- KANEO, Y. *et al.* Nanoparticles of hydrophobized cluster dextrin as biodegradable drug carriers: Solubilization and encapsulation of amphotericin B. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 24, n. 4, p. 344–351, 2014.
- KHAN, B. A. *et al.* Basics of pharmaceutical emulsions: A review. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, n. 25, p. 2715–2725, 2011.
- KHOSA, A.; REDDI, S.; SAHA, R. N. Nanostructured lipid carriers for site-specific drug delivery. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 103, n. April, p. 598–613, 2018.
- KIM, H. S. *et al.* Biodegradable and injectable hydrogels as an immunosuppressive drug delivery system. **Materials Science and Engineering C**, v. 98, p. 472–481, 2019.
- KLEIN, J. M. *et al.* Preparation of cashew gum-based flocculants by microwave- and ultrasound-assisted methods. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 1550–1558, 2018.
- KRISHNAN, R. A. *et al.* Protective nature of low molecular weight chitosan in a chitosan–Amphotericin B nanocomplex – A physicochemical study. **Materials Science and Engineering C**, v. 93, p. 472–482, 2018.
- KUMAR, A. *et al.* Development of cashew gum and its derivatives for sustained released drug delivery system: by response surface methodology. **International Journal of Pharmaceutical Science**, v. 6, n. 10, p. 2–10, 2014.
- LAM, S.; VELIKOV, K. P.; VELEV, O. D. Pickering stabilization of foams and emulsions with particles of biological origin. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 19, n. 5, p. 490–500, 2014.

LARABI, M. *et al.* New lipid formulation of amphotericin B : spectral and microscopic analysis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1664, p. 172–181, 2004.

LARABI, M. *et al.* Toxicity and Antileishmanial Activity of a New Stable Lipid Suspension of Amphotericin B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 12, p. 3774–3779, 2003.

LEGRAND, P. *et al.* Effects of aggregation and solvent on the toxicity of amphotericin B to human erythrocytes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, n. 11, p. 2518–2522, 1992.

LEITE, Á. J. *et al.* The potential of cashew gum functionalization as building blocks for layer-by-layer films. **Carbohydrate Polymers**, v. 174, p. 849–857, 2017.

LEMARCHAND, C.; GREF, R.; COUVREUR, P. Polysaccharide-decorated nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 2, p. 327–341, 2004.

LES, K. A. *et al.* Poly(methacrylic acid) complexation of amphotericin B to treat neglected diseases. **Polymer Chemistry**, v. 5, n. 3, p. 1037, 2014.

LETCHFORD, K.; BURT, H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 65, n. 3, p. 259–269, 2007.

LI, S. *et al.* Starch granules as Pickering emulsifiers: Role of octenylsuccinylation and particle size. **Food Chemistry**, v. 283, p. 437–444, 2019.

LIMA, M. R. *et al.* Hydrophobization of cashew gum by acetylation mechanism and amphotericin B encapsulation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 523–530, 2018.

LIMA, V. P. M. S. Cultura do cajueiro no Nordeste do Brasil. Banco do Nordeste. p. 486, 1998. Fortaleza.

LIU, M.; CHEN, M.; YANG, Z. Design of amphotericin B oral formulation for antifungal therapy. **Drug Delivery**, v. 24, n. 1, p. 1–9, 2017.

LIU, Z. *et al.* Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 15, p. 1650–1662, 2008.

LOZANO, M. V. *et al.* Intracellular delivery of docetaxel using freeze-dried polysaccharide nanocapsules. **Journal of Microencapsulation**, v. 30, n. 2, p. 181–188, 2013.

LUQUE-ALCARAZ, A. G. *et al.* Preparation of chitosan nanoparticles by nanoprecipitation and their ability as a drug nanocarrier. **RSC Advances**, v. 6, n. 64, p. 59250–59256, 2016.

LUSTOSA, A. K. M. F. *et al.* In situ synthesis of silver nanoparticles in a hydrogel of carboxymethyl cellulose with phthalated-cashew gum as a promising antibacterial and healing

agent. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 11, 2017.

MACIEL, J. DA S. *et al.* Formation of cashew gum thin films onto silicon wafers or amino-terminated surfaces and the immobilization of Concanavalin A on them. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, n. 3, p. 522–529, 2007.

MAGALHÃES, G. A. *et al.* Chitosan/*Sterculia striata* polysaccharides nanocomplex as a potential chloroquine drug release device. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 88, p. 244–253, 2016.

MAGALHÃES, G. A. *et al.* Microspheres of chitosan/carboxymethyl cashew gum (CH/CMCG): Effect of chitosan molar mass and CMCG degree of substitution on the swelling and BSA release. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 2, p. 217–222, 2009.

MALVERN. Zetasizer Nano Series. **Malvern Instruments Ltd**, p. 20, 2014.

MALVERN. Zeta potential theory. **Malvern Zetasizer SZ User Manual**, p. 1–11, 2013.

MALVERNS. Inform White Paper: Dynamic Light Scattering, Common terms defined. **Malvern Guides**, p. 1–6, 2011.

MARCANO, R. G. *et al.* Chitosan functionalized poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles for amphotericin B delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 202, p. 345–354, 2018.

MAREFATI, A. *et al.* Storage and digestion stability of encapsulated curcumin in emulsions based on starch granule Pickering stabilization. **Food Hydrocolloids**, v. 63, p. 309–320, 2017.

DI MARTINO, A.; SEDLARIK, V. Amphiphilic chitosan-grafted-functionalized polylactic acid based nanoparticles as a delivery system for doxorubicin and temozolomide co-therapy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 474, n. 1–2, p. 134–145, 2014.

MAYOL, L. *et al.* Amphiphilic hyaluronic acid derivatives toward the design of micelles for the sustained delivery of hydrophobic drugs. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, n. 1, p. 110–116, 2014.

MAZERSKI, J.; GRZYBOWSKA, J.; BOROWSKI, E. Influence of net charge on the aggregation and solubility behaviour of amphotericin B and its derivatives in aqueous media. **European Biophysics Journal**, v. 18, n. 3, p. 159–164, 1990.

MCCLEMENTS, D. J. **Food emulsions: Principles, practice and techniques**. 2 ed. Boca Raton: CRC press, 2005.

MEDINA, J. C. *et al.* Caju: da cultura ao processamento e comercialização (série frutas tropicais - 4), 1978. Governo do Estado de São Paulo.

MERHAV, H.; MIELES, L. Amphotericin B lipid complex in the treatment of invasive fungal infections in liver transplant patients. **Transplantation Proceedings**, v. 29, n. 6, p. 2670–2674, 1997.

MERLIN, J. *et al.* Paclitaxel loaded poly-d,l-lactide-co-glycolide nanoparticles: Enhanced

anticancer effect in non-small cell lung carcinoma cell line. **Biomedicine and Preventive Nutrition**, v. 3, n. 1, p. 1–9, 2013.

MOEN, M. D.; LYSENG-WILLIAMSON, K. A.; SCOTT, L. J. Liposomal amphotericin B. A review of its use as empirical therapy in febrile neutropenia and in the treatment of invasive fungal infection. **Drugs**, v. 69, n. 3, p. 361–392, 2009.

MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A. C. Factors controlling nanoparticle pharmacokinetics: an integrated analysis and perspective. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 52, n. 1, p. 481–503, 2012.

MOORE, T. L. *et al.* Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 17, p. 6287–6305, 2015.

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

MORIZOT, G. *et al.* Healing of Old World cutaneous leishmaniasis in travelers treated with fluconazole: Drug effect or spontaneous evolution? **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, n. 1, p. 48–52, 2007.

MOSIMANN, V. *et al.* Liposomal amphotericin B treatment of Old World cutaneous and mucosal leishmaniasis: A literature review. **Acta Tropica**, v. 182, p. 246–250, 2018.

MOTOZATO, Y. *et al.* Preparation and gel permeation chromatographic properties of pullulan spheres. **Journal of Chromatography A**, v. 355, p. 434–437, 1986.

MOURA NETO, E. *et al.* Preparation and characterization of a chemically sulfated cashew gum polysaccharide. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 10, p. 1953–1960, 2011.

MULLEN, A. B.; CARTER, K. C.; BAILLIE, A. J. Comparison of the efficacies of various formulations of amphotericin B against murine visceral leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 10, p. 2089–2092, 1997.

MÜLLER, C. R. *et al.* Degradação e estabilização do diclofenaco em nanocápsulas poliméricas. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 555–560, 2004.

MWANGI, W. W. *et al.* Effects of environmental factors on the physical stability of pickering-emulsions stabilized by chitosan particles. **Food Hydrocolloids**, v. 60, p. 543–550, 2016.

MYUNG, G. Rapid evaluation of water in oil emulsion stability by turbidity ratio measurements. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 230, p. 213–215, 2000.

NAGAVARMA, B. V. N.; YADAV, H. K. S.; AYZAZ, A.; VASUDHA, L. S.; SHIVAKUMAR, H. G. Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles- A review. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 5, n. SUPPL. 3, p. 16–23, 2012.

NAJAFI, S. H.; BAGHAIE, M.; ASHORI, A. Preparation and characterization of acetylated starch nanoparticles as drug carrier: Ciprofloxacin as a model. **International Journal of**

Biological Macromolecules, v. 87, p. 48–54, 2016.

NAN, F. *et al.* Uniform chitosan-coated alginate particles as emulsifiers for preparation of stable Pickering emulsions with stimulus dependence. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 456, n. 1, p. 246–252, 2014.

NASERI, N.; VALIZADEH, H.; MILANI, P. Z. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: structure, preparation and application. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 5, n. 3, p. 305–313, 2015.

NEUMANN, A.; BAGINSKI, M.; CZUB, J. How do sterols determine the antifungal activity of Amphotericin B? Free Energy of Binding between the Drug and Its Membrane Targets. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 51, p. 18266–18272, 2010.

NISHI, K. K. *et al.* Amphotericin B-gum arabic conjugates: Synthesis, toxicity, bioavailability, and activities against Leishmania and fungi. **Pharmaceutical Research**, v. 24, n. 5, p. 971–980, 2007.

NOROUZI, M.; NAZARI, B.; MILLER, D. W. Injectable hydrogel-based drug delivery systems for local cancer therapy. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 11, p. 1835–1849, 2016.

OFORI-KWAKYE, K.; ASANTEWAA, Y.; KIPO, S. L. Physicochemical and binding properties of cashew tree gum in metronidazole tablet formulations. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 4, p. 105–109, 2010.

OLIVEIRA, A. C. DE J. **Goma de cajueiro ftalada para aplicações como biomaterial no desenvolvimento de nanopartículas : metálicas e poliméricas goma de cajueiro ftalada para aplicações como biomaterial no desenvolvimento de nanopartículas : metálicas e poliméricas**. 2017. Dissertação. Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, 2017.

DE OLIVEIRA, E. F.; PAULA, H. C. B.; DE PAULA, R. C. M. Alginate/cashew gum nanoparticles for essential oil encapsulation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 113, p. 146–151, 2014.

OLIVEIRA, M. A. *et al.* Performance evaluation of cashew gum and gelatin blend for food packaging. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 17, n. April, p. 57–64, 2018.

ORYAN, A. Plant-derived compounds in treatment of leishmaniasis. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 16, p. 1–19, 2015.

OURA, M.; STERNBERG, T. H.; WRIGHT, E. T. A new antifungal antibiotic, amphotericin B. **Antibiotic Annual**, v. 3, p. 566–573, 1955.

PAULA, A. *et al.* Evaluation of the application of cashew gum as an excipient to produce tablets. **Polimeros**, v. 5169, n. 4, p. 302–308, 2018.

PAULA, H. C. B. *et al.* Alginate/cashew gum floating bead as a matrix for larvicide release. **Materials Science and Engineering C**, v. 32, n. 6, p. 1421–1427, 2012.

PAULA, H. C. B. *et al.* Protective Effect of Cashew Gum nanoparticles on natural larvicide

from *Moringa oleifera* seeds. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 124, p. 1778–1784, 2012.

PAULA, R. C. M. DE; HEATLEY, F.; BUDD, P. M. Characterization of *Anacardium occidentale* Exudate Polysaccharide. **Polymer International**, v. 45, n. 1, p. 27–35, 1998.

DE PAULA, R. C. M.; RODRIGUES, J. F. Composition and rheological properties of cashew tree gum, the exudate polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, n. 3, p. 177–181, 1995.

PAULOS, G. *et al.* Fabrication of acetylated dioscorea starch nanoparticles: Optimization of formulation and process variables. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 31, p. 83–92, 2016.

PITOMBEIRA, N. A. O. *et al.* Self-assembled nanoparticles of acetylated cashew gum: Characterization and evaluation as potential drug carrier. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 610–615, 2015.

PORTO, B. C.; CRISTIANINI, M. Effect of dynamic high pressure on emulsifying and encapsulant properties of cashew tree gum. **Carbohydrate Polymers**, v. 186, n. January, p. 350–357, 2018.

PRAJAPATI, V. D. *et al.* Pharmaceutical applications of various natural gums, mucilages and their modified forms. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1685–1699, 2013. Elsevier Ltd.

PYLATIUK, C. *et al.* Automatic zebrafish heartbeat detection and analysis for zebrafish embryos. **Zebrafish**, v. 11, n. 4, p. 379–383, 2014.

QUELEMES, P. V. *et al.* Development and antibacterial activity of cashew gum-based silver nanoparticles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 3, p. 4969–4981, 2013.

QUELEMES, P. V. *et al.* Quaternized cashew gum: An anti-staphylococcal and biocompatible cationic polymer for biotechnological applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 567–575, 2017.

QUIÑONES, J. P.; PENICHE, H.; PENICHE, C. Chitosan based self-assembled nanoparticles in drug delivery. **Polymers**, v. 10, n. 3, p. 1–32, 2018.

RAEMDONCK, K. *et al.* Polysaccharide-based nucleic acid nanoformulations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 9, p. 1123–1147, 2013.

RAMESAN, M. T. *et al.* Structural, mechanical and electrical properties biopolymer blend nanocomposites derived from poly (vinyl alcohol)/cashew gum/magnetite. **Materials Research Express**, v. 5, n. 1, 2018a.

RAMESAN, M. T. *et al.* Influence of magnetite nanoparticles on electrical, magnetic and thermal properties of chitin/cashew gum biopolymer nanocomposites. **Polymer Composites**, v. 39, p. 540–549, 2018b.

RAMESAN, M. T. *et al.* Effect of silver doped zinc oxide as nanofiller for the development of

biopolymer Nanocomposites from Chitin and Cashew Gum. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 26, n. 7, p. 2983–2991, 2018 c.

RAMESAN, M. T. *et al.* Multifunctional ternary composites of poly (vinyl alcohol)/cashew tree gum/pumice particles. **Polymer Composites**, v. 39, n. 1, p. 38–45, 2018d.

RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science**, v. 36, p. 887–913, 2011.

RIBEIRO, A. C. *et al.* Synthesis and characterization of acetylated amylose and development of inclusion complexes with rifampicin. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 267–274, 2017.

RIBEIRO, R. C. C. *et al.* Cashew gum: A new depressor for limestone in the phosphate minerals flotation. **Minerals Engineering**, v. 16, n. 9, p. 873–875, 2003.

RICHTER, A. R. *et al.* Pickering emulsion stabilized by cashew gum- poly-L-lactide copolymer nanoparticles: Synthesis, characterization and amphotericin B encapsulation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 164, p. 201–209, 2018.

RODRIGUES, J. F.; PAULA, R. C. M. DE; COSTA, S. M. O. Métodos de Isolamento de Gomas Naturais : Comparação Através da Goma do Cajueiro (*Anacardium occidentale L*). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 16, n. 2, p. 31–36, 1993.

RODRIGUES, S. *et al.* Biocompatibility and stability of polysaccharide polyelectrolyte complexes aimed at respiratory delivery. **Materials**, v. 8, n. 9, p. 5647–5670, 2015.

ROLAND, I. *et al.* Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 263, n. 1–2, p. 85–94, 2003.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; OWEN, S. C. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 5 ed. Londres, 2006.

SAARI, H.; RAYNER, M.; WAHLGREN, M. Effects of starch granules differing in size and morphology from different botanical sources and their mixtures on the characteristics of Pickering emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 89, p. 844–855, 2019.

SALVATI, A. *et al.* Transferrin-functionalized nanoparticles lose their targeting capabilities when a biomolecule corona adsorbs on the surface. **Nature Nanotechnology**, v. 8, p. 137–143, 2013.

SÁNCHEZ-RIVERA, M. M. *et al.* Acetylation of banana (*Musa paradisiaca L.*) and maize (*Zea mays L.*) starches using a microwave heating procedure and iodine as catalyst: Partial characterization. **Starch/Stärke**, v. 62, n. 3–4, p. 155–164, 2010.

SANDHYA, M. *et al.* Amphotericin B loaded sulfonated chitosan nanoparticles for targeting macrophages to treat intracellular *Candida glabrata* infections. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 110, p. 133–139, 2018.

SANTANA, R. S.; LUPATINI, E. O.; LEITE, S. N. Registro e incorporação de tecnologias no SUS: barreiras de acesso a medicamentos para doenças da pobreza? **Ciência & Saúde**

Coletiva, v. 22, n. 5, p. 1417–1428, 2017.

DOS SANTOS, D. C. M. *et al.* A new nanoemulsion formulation improves antileishmanial activity and reduces toxicity of amphotericin B. **Journal of Drug Targeting**, v. 26, n. 4, p. 357–364, 2017.

SARKAR, A. *et al.* Pickering emulsions co-stabilized by composite protein/ polysaccharide particle-particle interfaces: Impact on in vitro gastric stability. **Food Hydrocolloids**, v. 84, n. May, p. 282–291, 2018.

SAZGARNIA, A. *et al.* Antiparasitic effects of gold nanoparticles with microwave radiation on promastigots and amastigots of leishmania major. **International Journal of Hyperthermia**, v. 29, p. 79–86, 2013.

SCHRADE, A.; LANDFESTER, K.; ZIENER, U. Pickering-type stabilized nanoparticles by heterophase polymerization. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6823–6839, 2013.

SERRANO, L. A. L.; PESSOA, P. F. A. P. Aspectos econômicos da cultura do cajueiro. p. 1–193, 2016.

SHAFIEI, R. *et al.* Emergence of co-infection of visceral leishmaniasis in HIV-positive patients in northeast Iran: A preliminary study. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 12, n. 2, p. 173–178, 2014.

SHAH, B. R. *et al.* Preparation and optimization of Pickering emulsion stabilized by chitosan-tripolyphosphate nanoparticles for curcumin encapsulation. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 369–377, 2016.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. SUPPL., p. 163–174, 2012.

SILVA, A. E. *et al.* Development of oil-in-water microemulsions for the oral delivery of amphotericin B. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 454, n. 2, p. 641–648, 2013.

DA SILVA, D. P. B. *et al.* Chemical characterization and pharmacological assessment of polysaccharide free, standardized cashew gum extract (*Anacardium occidentale* L.). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 213, p. 395–402, 2018.

SILVA, Í. G. M.; LUCAS, E. F. Rheological Properties of Xanthan Gum, Hydroxypropyl Starch, Cashew Gum and Their Binary Mixtures in Aqueous Solutions. **Macromolecular Symposia**, v. 380, n. 1, p. 1–9, 2018.

DA SILVA, L. *et al.* Optimization of cashew gum and chitosan for microencapsulation of pequi oil by complex coacervation. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 42, n. 3, p. 1–8, 2018.

SILVA, E. L. *et al.* Solvent-free synthesis of acetylated cashew gum for oral delivery system of insulin. **Carbohydrate Polymers**, v. 207, p. 601–608, 2019.

- SILVA, F. *et al.* Cashew gum and maltodextrin particles for green tea (*Camellia sinensis* var *Assamica*) extract encapsulation. **Food Chemistry**, v. 261, p. 169–175, 2018.
- SILVA, T. M. *et al.* Study of the cashew gum polysaccharide for the horseradish peroxidase immobilization - Structural characteristics, stability and recovery. **Materials Science and Engineering C**, v. 30, n. 4, p. 526–530, 2010.
- SILVA, D. A. *et al.* Synthesis and characterization of cashew gum/acrylic acid nanoparticles. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, n. 2, p. 437–441, 2009.
- SILVA, D. A. *et al.* Graft copolymerisation of acrylamide onto cashew gum. **European Polymer Journal**, v. 43, n. 6, p. 2620–2629, 2007.
- SILVA, D. A. *et al.* Characterization of crosslinked cashew gum derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, n. 1, p. 16–26, 2006.
- SILVA, D. A. *et al.* Carboxymethylation of cashew tree exudate polysaccharide. **Carbohydrate Polymers**, v. 58, n. 2, p. 163–171, 2004.
- SILVERSTEIN, M. S. PolyHIPEs: Recent advances in emulsion-templated porous polymers. **Progress in Polymer Science**, v. 39, n. 199–234, 2014.
- SIMOVIC, S.; GHOUCHI-ESKANDAR, N.; PRESTIDGE, C. A. Pickering emulsions for dermal delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 21, n. 1, p. 123–133, 2011.
- SINGH, P. K. *et al.* Macrophage-targeted chitosan anchored PLGA nanoparticles bearing doxorubicin and amphotericin B against visceral leishmaniasis. **RSC Advances**, v. 6, n. 75, p. 71705–71718, 2016.
- SONG, X. *et al.* Preparation and characterizations of Pickering emulsions stabilized by hydrophobic starch particles. **Food Hydrocolloids**, v. 45, p. 256–263, 2015.
- SONG, Y. B. *et al.* Self-assembled micelles based on hydrophobically modified quaternized cellulose for drug delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 83, p. 313–320, 2011.
- SONG, Y. *et al.* Effect of acetylation on antioxidant and cytoprotective activity of polysaccharides isolated from pumpkin (*Cucurbita pepo*, lady godiva). **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 1, p. 686–691, 2013.
- SOSA, L. *et al.* Amphotericin B releasing topical nanoemulsion for the treatment of candidiasis and aspergillosis. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 13, n. 7, p. 2303–2312, 2017.
- SOTELO-BOYÁS, M. E. *et al.* Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles and nanocapsules incorporated with lime essential oil and their antibacterial activity against food-borne pathogens. **LWT - Food Science and Technology**, v. 77, p. 15–20, 2017.
- SOUZA, A. C. O. *et al.* Activity and in vivo tracking of Amphotericin B loaded PLGA nanoparticles. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 95, p. 267–276, 2015.

SOUZA FILHO, M. D. *et al.* Orabase formulation with cashew gum polysaccharide decreases inflammatory and bone loss hallmarks in experimental periodontitis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 1093–1101, 2018.

DE SOUZA, V. B. *et al.* Functional properties and encapsulation of a proanthocyanidin-rich cinnamon extract (*Cinnamomum zeylanicum*) by complex coacervation using gelatin and different polysaccharides. **Food Hydrocolloids**, v. 77, p. 297–306, 2018.

STETEFELD, J.; MCKENNA, S. A.; PATEL, T. R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. **Biophysical Reviews**, v. 8, n. 4, p. 409–427, 2016.

TAMJIDI, F.; SHAHEDI, M.; VARSHOSAZ, J. Nanostructured lipid carriers (NLC): a potential delivery system for bioactive food molecules. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 19, p. 29–43, 2013.

TAN, H.; MARRA, K. G. Injectable, biodegradable hydrogels for tissue engineering applications. **Dental Materials**, v. 3, p. 1746–1767, 2010.

TAN, Y. *et al.* Triglyceride-water emulsions stabilised by starch-based nanoparticles. **Food Hydrocolloids**, v. 36, p. 70–75, 2014.

TIYABOONCHAI, W.; LIMPEANCHOB, N. Formulation and characterization of amphotericin B-chitosan-dextran sulfate nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 329, n. 1–2, p. 142–149, 2007.

TRUONG, N. P.; WHITTAKER, M. R.; MAK, C. W. The importance of nanoparticles shape in cancer drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 12, n. 1, p. 129–142, 2015.

TUPA, M. V. *et al.* Organocatalytic acetylation of starch: Effect of reaction conditions on DS and characterisation of esterified granules. **Food Chemistry**, v. 170, p. 295–302, 2015.

VAN DE VEN, H.; *et al.* PLGA nanoparticles and nanosuspensions with amphotericin B: Potent in vitro and in vivo alternatives to Fungizone and AmBisome. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 3, p. 795–803, 2012.

WALZ, M.; HIRTH, T.; WEBER, A. Investigation of chemically modified inulin as encapsulation material for pharmaceutical substances by spray-drying. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 536, p. 47–52, 2018.

WANG, H.; SINGH, V.; BEHRENS, S. H. Image charge effects on the formation of Pickering emulsions. **Journal of Physical Chemistry Letter**, v. 3, p. 2986–2990, 2012.

WANG, H. *et al.* Enhanced anti-tumor efficacy by co-delivery of doxorubicin and paclitaxel with amphiphilic methoxy PEG-PLA copolymer nanoparticles. **Biomaterials**, v. 31, p. 8281–8290, 2011.

WANG, J. *et al.* Fabrication of monodisperse drug-loaded poly(lactic-co-glycolic acid)–chitosan core-shell nanocomposites via pickering emulsion. **Composites Part B:**

Engineering, v. 121, p. 99–107, 2017.

WANG, J. *et al.* Fabrication of sustained-release and antibacterial citronella oil-loaded composite microcapsules based on Pickering emulsion templates. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 135, n. 25, p. 1–9, 2018.

WANG, Y. *et al.* Biodegradable functional polycarbonate micelles for controlled release of amphotericin B. **Acta Biomaterialia**, v. 46, p. 211–220, 2016.

WANG, Y. *et al.* PH-sensitive pullulan-based nanoparticles for intracellular drug delivery. **Polymer Chemistry**, v. 5, n. 2, p. 423–432, 2014.

WEBER, S.; ZIMMER, A.; PARDEIKE, J. Solid lipid nanoparticle (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for pulmonary applications: a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 86, n. 2, p. 7–22, 2014.

WEN, C. *et al.* Preparation and stabilization of D-limonene Pickering emulsions by cellulose nanocrystals. **Carbohydrate polymers**, v. 112, p. 695–700, 2014.

WILCOCK, B. C. *et al.* C2'-OH of amphotericin B plays an important role in binding the primary sterol of human cells but not yeast cells. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, n. 23, p. 8488–8491, 2013.

WINGARD, J. R. Efficacy of amphotericin B lipid complex injection (ABLC) in bone marrow transplant recipients with life-threatening systemic mycoses. **Bone Marrow Transplantation**, v. 19, n. 4, p. 343–347, 1997.

WU, D. *et al.* Preparation and characterization of acetylated maltodextrin and its blend with poly(butylene adipate-co-terephthalate). **Carbohydrate Polymers**, v. 181, p. 701–709, 2018.

WU, J.; MA, G. H. Recent studies of pickering emulsions: Particles make the difference. **Small**, v. 12, n. 34, p. 4633–4648, 2016.

XIE, J. *et al.* Preparation, characterization and antioxidant activities of acetylated polysaccharides from *Cyclocarya paliurus* leaves. **Carbohydrate Polymers**, v. 133, p. 596–604, 2015.

XU, C. *et al.* Acetylation and characterization of spruce (*Picea abies*) galactoglucomannans. **Carbohydrate Research**, v. 345, n. 6, p. 810–816, 2010.

YE, F. *et al.* Elucidation of stabilizing oil-in-water Pickering emulsion with different modified maize starch-based nanoparticles. **Food Chemistry**, v. 229, p. 152–158, 2017.

YU, Y. *et al.* Polylactide-graft-doxorubicin nanoparticles with precisely controlled drug loading for pH-triggered drug delivery. **Biomacromolecules**, v. 15, n. 2, p. 524–532, 2014.

YUAN, Z. *et al.* Enhanced antitumor efficacy of 5-fluorouracil loaded methoxy poly(ethylene glycol)-poly(lactide) nanoparticles for efficient therapy against breast cancer. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 128, p. 489–497, 2015.

ZHANG, H. *et al.* Pullulan acetate nanoparticles prepared by solvent diffusion method for epirubicin chemotherapy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 71, n. 1, p. 19–26, 2009.

ZHAO, X. *et al.* Thermal responsive fluorescent nanocomposites based on carbon dots. **RSC Advances**, v. 5, p. 15187–15193, 2015.

ZOPPE, J. O.; VENDITTI, R. A.; ROJAS, O. J. Pickering emulsions stabilized by cellulose nanocrystals grafted with thermo-responsive polymer brushes. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 369, n. 1, p. 202–209, 2012.