



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

MARLON ERICK PEREIRA ROSA

**MICROCÁPSULA À BASE DE HIALURONATO DE SÓDIO PARA
ENCAPSULAÇÃO DE ÁCIDO ANACÁRDICO E POTENCIAL APLICAÇÃO EM
TRATAMENTO DE LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA E CÂNCER COLORRETAL**

**FORTALEZA
2025**

MARLON ERICK PEREIRA ROSA

MICROCÁPSULA À BASE DE HIALURONATO DE SÓDIO PARA ENCAPSULAÇÃO
DE ÁCIDO ANACÁRDICO E POTENCIAL APLICAÇÃO EM TRATAMENTO DE
LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA E CÂNCER COLORRETAL

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo.

Coorientadora: Dr^a. Louhana Moreira Rebouças.

FORTALEZA

2025

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

R695m Rosa, Marlon Erick Pereira.

Microcápsula à base de hialuronato de sódio para encapsulação de ácido anacárdico e potencial aplicação em tratamento de leucemia promielocítica e câncer colorretal / Marlon Erick Pereira Rosa. – 2025.
98 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2025.

Orientação: Profa. Dra. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo.
Coorientação: Profa. Dra. Louhana Moreira Rebouças.

1. Microcápsulas. 2. Ácido anacárdico. 3. Hialuronato de sódio. 4. Câncer. I. Título.

CDD 540

MARLON ERICK PEREIRA ROSA

MICROCÁPSULA À BASE DE HIALURONATO DE SÓDIO PARA ENCAPSULAÇÃO
DE ÁCIDO ANACÁRDICO E POTENCIAL APLICAÇÃO EM TRATAMENTO DE
LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA E CÂNCER COLORRETAL

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

Aprovada em: ____ / ____ / ____.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a. Dr.^a. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr.^a. Louhana Moreira Rebouças (Coorientadora)
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE)

Prof. Dr. Marcos Carlos de Mattos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Francisco Ernani Alves Magalhães
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

A Deus.

À minha mãe e amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por toda a força e perseverança para enfrentar os maus momentos.

À minha mãe, por ajudar-me nos momentos difíceis, escutando-me e aconselhando-me.

À Prof^a. Dr^a. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo, por sua excelente orientação e dedicação.

À Dr^a. Louhana Moreira Rebouças, pela orientação, paciência e por mostrar os melhores caminhos para eu conduzir meu trabalho.

Ao Laboratório de Polímeros e Inovação de Materiais (LabPIM), que tornou possível o desenvolvimento e realização dos experimentos. Agradeço a todos os integrantes do grupo, em especial à Cristine Vidal, Elano Nery, David Assis, Kamilla Silveira, Anderson Sousa e Marlon Lemos.

À Prof^a. Dr^a. Maria Teresa Salles Trevisan e ao Samuel Marques pelas análises quantitativas.

À Prof^a. Dr^a. Cláudia do Ó Pessoa e Pedro Mikael pelos Ensaios MTT do Laboratório de Oncologia Experimental do NPDM, UFC.

À Prof^a. Dr^a. Larissa Silva, ao Fernando Eugênio do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da UFC e ao Dr. Francisco Ernani Alves Magalhães, da Universidade Estadual do Ceará, pelo apoio técnico em testes toxicológicos.

À Central Analítica da Universidade Federal do Ceará pela realização das análises de SEM e FTIR.

Ao Complexo de Equipamentos e Laboratórios Multiusuários e Microscopia Avançada (CELMMA), da Universidade Estadual do Ceará, para realização das análises de EDS.

À banca examinadora por aceitar avaliar e dar suas valiosas contribuições ao meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcos Carlos de Mattos, à Prof^a. Dr^a. Pablyana Leila Rodrigues da Cunha e ao Dr. Daniel Pascoalino Pinheiro, que compuseram a banca do meu Exame Geral de Conhecimento, por todas as sugestões que tornaram esse trabalho cada vez melhor.

Aos meus amigos da graduação Caroline Braun, Mário Sérgio, Mariana Marquees, Débora Silva e Ismael Pinheiro por toda companhia e por deixar a graduação muito mais leve.

Às minhas amigas Ana Jade, Anita Carla, Thalia Nathiele, Maiara Silveira, Celina Vasconcelos e à minha prima Cibele Soares pela longa amizade.

À Universidade Federal do Ceará e ao Programa de Pós-Graduação em Química pela oportunidade e por toda a infraestrutura disponibilizada para o desenvolvimento do trabalho.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização dos meus experimentos.

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

“Eu, um universo de átomos, um átomo no universo”.

- Richard Feynman

RESUMO

No Brasil, o avanço da ciência permitiu que substâncias responsáveis por apresentar atividade antitumoral fossem isoladas a partir da fauna e da flora nativas, como o ácido anacárdico (AA), extraído do líquido da casca da castanha do caju. No entanto, este composto é hidrofóbico, tornando necessário o desenvolvimento de veículos eficientes para a sua administração em sistemas aquosos. Na literatura, há poucos trabalhos que encapsulam AA em sistemas de entrega seletiva para o tratamento de câncer. Assim, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver uma microcápsula à base do polissacarídeo hialuronato de sódio (HS), contendo como núcleo o AA, encapsulado a partir de nanoemulsão com óleo de licuri. Para isso, a nanoemulsão (NEAA) foi obtida através da técnica de ultrassonicação. A microcápsula (MCAA) foi formada após a adição de NEAA em uma solução aquosa de HS, seguido da secagem da mistura resultante com auxílio de um *spray dryer*. O tamanho de partícula da redispersão aquosa da MCAA possui valor de $292,1 \pm 1,2$ nm, sugerindo que a encapsulação polissacarídica da nanoemulsão foi eficiente e o potencial zeta ($-52,2 \pm 1,2$ mV) revelou aumento nos parâmetros de estabilidade em relação à nanoemulsão ($-29,7 \pm 1,6$ mV). A MCAA apresentou valor de Eficiência de Encapsulação igual a $95,06 \pm 1,22\%$. A Microscopia Eletrônica de Varredura revelou formato esférico para as partículas da MCAA em pó, com tamanho médio igual a $3,7 \pm 2,1$ μm . As microcápsulas obtiveram liberação *in vitro* acumulada de AA igual a $4,18 \pm 0,75\%$ em pH igual a 7,4, com uma liberação controlada de AA em relação ao princípio ativo livre ($27,33 \pm 3,85\%$) e mostraram liberação responsiva ao pH, com redução do percentual de AA em pH 6,8 ($2,83 \pm 0,39\%$) e pH 4,5 ($0,18 \pm 0,12\%$). Os testes *in vivo* não produziram toxicidade aguda em *zebrafish* ou alterações na atividade locomotora após o tratamento com a formulação. A IC₅₀ determinada para a formulação apresentou valores de 30,1 e $29,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ em células tumorais HCT-116 e HL-60, respectivamente, e não apresentou IC₅₀ detectável no intervalo de concentração testado para células não tumorais L-929. Assim, o processo de encapsulação de AA por meio de interações intermoleculares com o óleo de licuri e posteriormente com o HS permitiu reduzir a toxicidade nessas células em comparação ao AA não encapsulado (IC₅₀ = $0,70 \mu\text{g mL}^{-1}$ em L-929), sugerindo fortemente redução da toxicidade e de possíveis efeitos colaterais, sendo promissora para futuras aplicações em terapias contra o câncer.

Palavras-chave: microcápsulas; ácido anacárdico; hialuronato de sódio; câncer.

ABSTRACT

In Brazil, advances in science have allowed substances responsible for exhibiting antitumor activity to be isolated from native fauna and flora, such as anacardic acid (AA), extracted from the liquid from the shell of cashew nuts. However, this compound is hydrophobic, making it necessary to develop efficient vehicles for its administration in aqueous systems. In the literature, there are few studies that encapsulate AA in selective delivery systems for cancer treatment. Thus, the objective of the present work was to develop a microcapsule based on the polysaccharide sodium hyaluronate (HS), containing AA as the core, encapsulated from a nanoemulsion with licuri oil. For this, the nanoemulsion (NEAA) was obtained using the ultrasonication technique. The microcapsule (MCAA) was formed after adding NEAA to an aqueous solution of HS, followed by drying the resulting mixture using a spray dryer. The particle size of the aqueous redispersion of MCAA has a value of 292.1 ± 1.2 nm, suggesting that the polysaccharide encapsulation of the nanoemulsion was efficient and the zeta potential (-52.2 ± 1.2 mV) revealed an increase in stability parameters in relation to the nanoemulsion (-29.7 ± 1.6 mV). MCAA presented an Encapsulation Efficiency value equal to $95.06 \pm 1.22\%$. The Scanning Electron Microscopy revealed a spherical shape for the MCAA powder particles, with an average size of 3.7 ± 2.1 μm . The microcapsules achieved *in vitro* accumulated release of AA equal to $4.18 \pm 0.75\%$ at pH equal to 7.4, with a controlled release of AA in relation to the free active ingredient ($27.33 \pm 3.85\%$) and showed pH-responsive release, with a reduction in the percentage of AA at pH 6.8 ($2.83 \pm 0.39\%$) and pH 4.5 ($0.18 \pm 0.12\%$). *In vivo* tests did not produce acute toxicity in zebrafish or changes in locomotor activity after treatment with the formulation. The IC_{50} determined for the formulation presented values of 30.1 and $29.8 \mu\text{g mL}^{-1}$ in HCT-116 and HL-60 tumor cells, respectively, and did not present a detectable IC_{50} in the concentration range tested for non-tumor L-929 cells. Thus, the AA encapsulation process through intermolecular interactions with licuri oil and later with HS allowed a reduction in toxicity in these cells compared to non-encapsulated AA ($\text{IC}_{50} = 0.70 \mu\text{g mL}^{-1}$ in L-929), strongly suggesting a reduction in toxicity and possible side effects, being promising for future applications in cancer therapies.

Keywords: microcapsules; anacardic acid; sodium hyaluronate; cancer.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 1 | - Estado da arte para artigos de pesquisa, sem restrição de data, realizado na base de dados <i>Web of Science</i> , em 14 de maio de 2024 | 22 |
| Figura 2 | - Principais quimioterápicos utilizados no tratamento da leucemia promielocítica aguda | 25 |
| Figura 3 | - Principais quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer colorretal | 26 |
| Figura 4 | - Análise comparativa da porcentagem de liberação de fármacos em função do tempo para sistemas convencionais de entrega de drogas (CDDS) e novos sistemas de entrega de drogas (NDDS) | 27 |
| Figura 5 | - Representação de uma nanoemulsão do tipo água em óleo (A), de uma nanoemulsão do tipo óleo em água (B) e de uma nanoemulsão do tipo água em óleo em água (C) | 28 |
| Figura 6 | - Processo de formação de bolhas de cavitação na produção de nanoemulsão através do método ultrassônico | 29 |
| Figura 7 | - Liberação de fármacos a partir de sistemas microencapsulados | 30 |
| Figura 8 | - Etapas do processo de secagem de dispersões por <i>spray dryer</i> : (I) adição da dispersão no material de revestimento, (II) atomização da dispersão e (III) desidratação das partículas atomizadas | 32 |
| Figura 9 | - Representação esquemática da obtenção do LCC (A) e estruturas químicas dos compostos majoritários do LCC (B) | 33 |
| Figura 10 | - Estrutura química do polissacarídeo ácido hialurônico | 35 |
| Figura 11 | - Palmeira <i>Syagrus coronata</i> e seus frutos imaturos aproximando-se do tamanho maduro | 37 |
| Figura 12 | - Estrutura química do tensoativo Pluronic F127 | 38 |
| Figura 13 | - Estrutura química da sílica Aerosil 200 | 39 |
| Figura 14 | - Principais processos para o preparo da nanoemulsão NEAA | 42 |
| Figura 15 | - Principais processos para o preparo da microcápsula MCAA | 43 |
| Figura 16 | - Espectro de ¹ H-NMR do hialuronato de sódio | 51 |

| | |
|---|----|
| Figura 17 - Gráfico de distribuição da massa molar do hialuronato de sódio. M_n : massa molar numérica média, M_w : massa molar ponderal média e M_w/M_n : dispersão da massa molar | 53 |
| Figura 18 - Espectro de $^1\text{H-NMR}$ do óleo de licuri | 56 |
| Figura 19 - Esquema apresentando as fotografias da nanoemulsão com ácido anacárdico (NEAA), nanoemulsão controle (NEC), microcápsula com ácido anacárdico (MCAA) e microcápsula controle (MCC) | 58 |
| Figura 20 - Representação da redispersão aquosa da MCAA | 59 |
| Figura 21 - Micrografias obtidas por TEM da nanoemulsão NEAA (A) e da redispersão aquosa da microcápsula MCAA (B) | 61 |
| Figura 22 - Espectro Uv-Vis do ácido anacárdico e cardanol (A) e cromatogramas da MCAA em 278 nm (B) e 310 nm (C) | 64 |
| Figura 23 - Espectro de FTIR do Aerosil 200 (AERO), Pluronic F127 (PLU), óleo de licuri (LIC), ácido anacárdico (AA), hialuronato de sódio (HS), microcápsula com ácido anacárdico (MCAA) e microcápsula controle (MCC) | 65 |
| Figura 24 - Termograma de TGA e análise por DTG do Aerosil 200 (AERO), Pluronic F127 (PLU), óleo de licuri (LIC), ácido anacárdico (AA), hialuronato de sódio (HS), microcápsula com ácido anacárdico (MCAA) e microcápsula controle (MCC) | 69 |
| Figura 25 - Micrografias obtidas por SEM e distribuições de tamanhos da MCAA em 2000x (A) e da MCC em 2000x (B) | 72 |
| Figura 26 - Espectro EDS da MCAA (A) e da MCC (B) | 73 |
| Figura 27 - Perfil de liberação cumulativa de AA livre e AA a partir da MCAA | 74 |
| Figura 28 - Reação de conversão do sal MTT em azul de formazam a partir de enzimas mitocondriais | 76 |
| Figura 29 - Efeito da microcápsula com ácido anacárdico (MCAA) e da microcápsula controle (MCC) na atividade locomotora do <i>zebrafish</i> adulto no Teste de Campo Aberto (0-5 min). <i>Naive</i> : animais não tratados, veículo: água destilada estéril, <i>p.o.</i> : administração oral | 79 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Valores de composição mássica das nanoemulsões | 41 |
| Tabela 2 - Valores de composição mássica das microcápsulas | 43 |
| Tabela 3 - Deslocamentos químicos do hialuronato de sódio utilizado no preparo das microcápsulas | 52 |
| Tabela 4 - Resultados obtidos da composição percentual de elementos químicos na amostra de hialuronato de sódio através da Análise Elementar | 54 |
| Tabela 5 - Deslocamentos químicos do ácido anacárdico utilizado no preparo das microcápsulas | 54 |
| Tabela 6 - Deslocamentos químicos do óleo de licuri utilizado no preparo das microcápsulas | 56 |
| Tabela 7 - Composição percentual de ácidos graxos no óleo de licuri | 57 |
| Tabela 8 - Medidas de tamanho de partícula, PDI e potencial zeta das formulações | 60 |
| Tabela 9 - Figuras de mérito obtidas para a quantificação de ácido anacárdico | 62 |
| Tabela 10 - Valores de eficiência de encapsulação e capacidade de carreamento das formulações | 63 |
| Tabela 11 - Principais bandas do espectro de FTIR dos materiais de preparo e das formulações | 67 |
| Tabela 12 - Parâmetros obtidos através da TGA e DTG para os materiais de preparo e para as microcápsulas | 71 |
| Tabela 13 - Parâmetros de liberação e coeficientes de determinação dos modelos matemáticos de liberação de fármacos testados | 75 |
| Tabela 14 - IC ₅₀ em células de HL-60 (leucemia promielocítica), HCT-116 (carcinoma colorretal) e L-929 (fibroblasto murino) | 77 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------------------|---|
| ¹ H-NMR | Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio |
| AA | ácido anacárdico |
| AERO | Aerosil 200 |
| AH | ácido hialurônico |
| ATO | trióxido de arsênio |
| ATRA | ácido trans-retinoico |
| b | coeficiente angular |
| CCR | câncer colorretal |
| CD | cluster de diferenciação |
| CDDS | sistemas convencionais de entrega de drogas |
| CDR | liberação cumulativa de ativo |
| CENAUREMN | Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear |
| CL ₅₀ | concentração letal capaz de matar 50% dos animais |
| CL | cruzamentos de linha |
| cps | contagens por segundo |
| CSCs | células-tronco cancerígenas |
| DAD | detector de arranjo de diodos |
| DB-5 | (5%-fenil)-metilpolissiloxano |
| DLS | Espalhamento Dinâmico de Luz |
| DMEM | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> |
| DTG | Análise de Termogravimetria Derivada |
| EDS | Espectroscopia de Raios X por Dispersão de Energia |
| EE% | Eficiência de Encapsulação |
| EMBRAPA | Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| FTIR | Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier |
| GC-MS | Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas |
| GPC | Cromatografia de Permeação em Gel |
| HAT | histona acetiltransferase |
| HCT-116 | linhagem celular de carcinoma colorretal |

| | |
|------------------|---|
| HL-60 | linhagem celular de leucemia promielocítica |
| HPLC | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| IC ₅₀ | concentração inibitória média |
| INCA | Instituto Nacional de Câncer |
| INMETRO | Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial |
| L-929 | linhagem celular de fibroblasto murino |
| LBL | montagem camada por camada |
| LC% | Capacidade de Carreamento |
| LCC | líquido da casca da castanha |
| LIC | óleo de licuri |
| LMA | leucemias mieloides agudas |
| LOD | limite de detecção |
| LOE | Laboratório de Oncologia Experimental |
| LOQ | limite de quantificação |
| LPA | leucemia promielocítica aguda |
| m/v | massa/volume |
| MCAA | microcápsula com ácido anacárdico |
| MCC | microcápsula controle |
| MCF-7 | linhagem celular de câncer de mama |
| MDR | resistência a múltiplos fármacos |
| MEC | matriz extracelular |
| MM | massa molar |
| M _n | massa molar numérica média |
| MTT | sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium |
| M _w | massa molar ponderal média |
| MWCO | <i>Molecular Weight Cut-Off</i> |
| NDDS | novos sistemas de entrega de drogas |
| NEAA | nanoemulsão com ácido anacárdico |
| NEC | nanoemulsão controle |
| NPDM | Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos |
| PDI | índice de polidispersão |
| PLU | Pluronic F127 |
| R ² | coeficiente de determinação |

| | |
|------------------|--|
| RPMI | <i>Roswell Park Memorial Institute</i> |
| RSD | desvio padrão relativo |
| S _a | desvio-padrão do intercepto |
| SEM | Microscopia Eletrônica de Varredura |
| HS | hialuronato de sódio |
| SLNs | nanopartículas lipídicas sólidas |
| TEM | Microscopia Eletrônica de Transmissão |
| TGA | Análise Termogravimétrica |
| T _{máx} | temperatura na taxa máxima de perda de massa |
| UFC | Universidade Federal do Ceará |
| v/v | volume/volume |

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 19 |
| 2 | OBJETIVOS | 23 |
| 2.1 | Objetivo Geral | 23 |
| 2.2 | Objetivos Específicos | 23 |
| 3 | FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | 24 |
| 3.1 | Leucemia promielocítica aguda (LPA) | 24 |
| 3.2 | Câncer colorretal (CCR) | 25 |
| 3.3 | Novos sistemas de entrega de drogas (NDDS) | 26 |
| 3.3.1 | <i>Nanoemulsões</i> | 27 |
| 3.3.2 | <i>Microcápsulas polissacarídicas</i> | 30 |
| 3.4 | Considerações sobre os componentes da formulação | 32 |
| 3.4.1 | <i>Ácido anacárdico</i> | 32 |
| 3.4.2 | <i>Hialuronato de sódio</i> | 34 |
| 3.4.3 | <i>Óleo de licuri (<i>Syagrus coronata</i>)</i> | 36 |
| 3.4.4 | <i>Pluronic F127</i> | 37 |
| 3.4.5 | <i>Aerosil 200</i> | 38 |
| 4 | PARTE EXPERIMENTAL | 40 |
| 4.1 | Materiais | 40 |
| 4.2 | Caracterização das matérias-primas | 40 |
| 4.2.1 | <i>Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (¹H-NMR)</i> | 40 |
| 4.2.2 | <i>Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)</i> | 40 |
| 4.2.3 | <i>Análise Elementar</i> | 41 |
| 4.2.4 | <i>Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS)</i> | 41 |
| 4.3 | Preparo da nanoemulsão | 41 |
| 4.4 | Preparo da microcápsula | 42 |
| 4.5 | Análises de Tamanho de Partícula, Índice de Polidispersão e Potencial Zeta das formulações | 44 |
| 4.6 | Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) | 44 |
| 4.7 | Quantificação de ácido anacárdico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC - DAD) | 44 |
| 4.7.1 | <i>Obtenção da curva padrão de ácido anacárdico</i> | 44 |

| | | |
|---------------|---|----|
| 4.7.2 | <i>Validação de método</i> | 45 |
| 4.7.3 | <i>Eficiência de Encapsulação e Capacidade de Carreamento das formulações</i> | 46 |
| 4.8 | Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) | 46 |
| 4.9 | Análise Termogravimétrica (TGA) | 47 |
| 4.10 | Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) | 47 |
| 4.11 | Cinética de liberação <i>in vitro</i> | 47 |
| 4.12 | Avaliação do Potencial Citotóxico | 48 |
| 4.12.1 | <i>Cultura das células</i> | 48 |
| 4.12.2 | <i>Ensaios MTT</i> | 48 |
| 4.13 | Avaliação de segurança não clínica em zebrafish (<i>Danio rerio</i>) adulto | 49 |
| 4.13.1 | <i>Teste de Campo Aberto</i> | 49 |
| 4.13.2 | <i>Toxicidade Aguda em 96 horas</i> | 50 |
| 4.14 | Análises estatísticas | 50 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 51 |
| 5.1 | Caracterização do polissacarídeo hialuronato de sódio | 51 |
| 5.1.1 | <i>Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (¹H-NMR)</i> | 51 |
| 5.1.2 | <i>Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) e Análise Elementar</i> | 52 |
| 5.2 | Caracterização do ácido anacárdico | 54 |
| 5.2.1 | <i>Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio</i> | 54 |
| 5.3 | Caracterização do óleo de licuri | 55 |
| 5.3.1 | <i>Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio</i> | 55 |
| 5.3.2 | <i>Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS)</i> | 56 |
| 5.4 | Obtenção das formulações | 57 |
| 5.5 | Análises de Tamanho de Partícula, Índice de Polidispersão e Potencial Zeta das formulações | 58 |
| 5.6 | Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) | 60 |
| 5.7 | Quantificação de ácido anacárdico por HPLC-DAD | 62 |
| 5.7.1 | <i>Validação de método</i> | 62 |
| 5.7.2 | <i>Eficiência de Encapsulação e Capacidade de Carreamento das formulações</i> | 62 |
| 5.8 | Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) | 65 |
| 5.9 | Análise Termogravimétrica (TGA) | 68 |
| 5.10 | Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) | 71 |
| 5.11 | Cinética de liberação <i>in vitro</i> | 73 |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 5.12 | Avaliação do potencial citotóxico | 76 |
| 5.13 | Avaliação de segurança não clínica em <i>zebrafish</i> adulto | 78 |
| 6 | CONCLUSÃO | 80 |
| 7 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 80 |
| | REFERÊNCIAS | 81 |
| | APÊNDICE A - ESPECTRO DE $^1\text{H-NMR}$ DO AA | 92 |
| | APÊNDICE B - CROMATOGRAMAS DAS CORRIDAS | |
| | CROMATOGRÁFICAS DO AA UTILIZADO NO PREPARO DAS | |
| | FORMULAÇÕES (A), DA NANOEMULSÃO (B), DA MCAA (C) E DA | |
| | MCC (D) | 93 |
| | APÊNDICE C – REGRESSÕES LINEARES DOS MODELOS CINÉTICOS | |
| | PARA A LIBERAÇÃO <i>in vitro</i> DE AA A PARTIR DA MCAA EM pH 7,4 | |
| | | 94 |
| | APÊNDICE D – REGRESSÕES LINEARES DOS MODELOS | |
| | CINÉTICOS PARA A LIBERAÇÃO <i>in vitro</i> DE AA A PARTIR DA MCAA | |
| | EM pH 6,8 | 95 |
| | APÊNDICE E - PRODUÇÃO CIENTÍFICA RELACIONADA À | |
| | DISSERTAÇÃO | 96 |

1 INTRODUÇÃO

De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), câncer é a designação dada ao crescimento desordenado de células e compreende um conjunto de mais de 100 doenças. Segundo o INCA, são esperados, no Brasil, 704 mil novos casos de câncer para cada ano do triênio 2023-2025 (INCA, 2022). Dada a alta incidência dessa doença, diversas pesquisas são realizadas com o propósito de desenvolver-se novas terapias antineoplásicas.

Desse modo, o avanço da ciência no Brasil permitiu que substâncias responsáveis por apresentar atividade contra células cancerígenas fossem isoladas da fauna e flora brasileira. Com isso, espécies nativas tornaram-se foco de estudos, como exemplo tem-se o cajueiro (*Anacardium occidentale*). Essa árvore produz o pseudofruto conhecido como caju, no qual o fruto, a castanha do caju, fica preso (Bloise *et al.*, 2023).

A morfologia da casca da castanha do caju possui uma camada chamada mesocarpo, composta por alvéolos que são preenchidos pelo líquido da casca da castanha (LCC), subproduto agrícola e resíduo obtido durante o processamento da castanha de caju, no qual o componente principal é o ácido anacárdico (AA) (Bloise *et al.*, 2023).

O AA (ácido 2-hidroxi-6-alquilbenzoico) é, na verdade, uma mistura de compostos estruturalmente semelhantes ao ácido salicílico, substituídos com uma cadeia de hidrocarboneto com 15 átomos de carbono que varia no seu grau de insaturação, sendo mais frequentes cadeias tri-, di- e mono-insaturadas (Bloise *et al.*, 2023). Nos últimos anos, foram realizados muitos estudos acerca das propriedades farmacêuticas dessas substâncias, com destaque para sua aplicação como potencial agente antitumoral, sendo relatado na literatura sua atividade contra células de câncer pancreático (CAPAN-2, BXPC-3 e PANC-1) (Park *et al.*, 2018), de melanoma (B16-F10) (Tamura; Nitoda; Kubo, 2007) e de câncer de mama (4T1) (Gnanaprakasam; López-Baños; Vega, 2021), por exemplo.

Os lipídios fenólicos do LCC são capazes de gerar reconhecimento molecular por diferentes alvos terapêuticos, devido à combinação de características eletrônicas e hidrofóbicas. Suas estruturas com o anel fenólico e a longa cadeia hidrocarbonada, capazes de mimetizar os ácidos graxos, permitem atuar como moléculas sinalizadoras que regulam processos fisiológicos no metabolismo e nas respostas inflamatórias (Uliassi *et al.*, 2021).

As pesquisas supracitadas demonstram a função promissora do AA como um ativo antineoplásico. Porém, um dos grandes desafios que deve ser resolvido é o fato deste composto ser hidrofóbico, o que dificulta sua veiculação em sistemas aquosos. Além disso, outro aspecto limitante do tratamento é que quimioterápicos atingem também células sadias do organismo.

Assim, torna-se crucial desenvolver veículos eficazes que promovam liberação controlada e entrega seletiva de ativos, auxiliando na redução dos efeitos adversos (Sultana *et al.*, 2022).

Para melhorar a biodistribuição de ativos, nanoemulsões têm mostrado grandes êxitos em pesquisas farmacológicas. Estes sistemas são dispersões coloidais que consistem de dois líquidos imiscíveis, com um dos líquidos disperso na forma de gotículas (com tamanhos entre 20 e 500 nm), onde a estabilidade é alcançada pela combinação com tensoativos (Sharma *et al.*, 2010). Como um sistema de entrega, as gotículas intensificam a eficácia terapêutica de substâncias lipofílicas ao solubilizá-las no seu núcleo oleoso, aumentando a área superficial do ativo e minimizando as reações tóxicas (Preeti *et al.*, 2023). Portanto, a nanoemulsão foi utilizada para preparar uma formulação para veiculação de AA.

Como fase oleosa da nanoemulsão da presente invenção, foi utilizado o óleo de licuri para encapsular o AA. A *Syagrus coronata* (família Arecaceae), conhecida popularmente como licuri, é uma palmeira nativa do Brasil, encontrada principalmente nos estados de Alagoas, Bahia e Sergipe. Suas sementes possuem alto teor de óleo (49,2% m/m), muito utilizado para fins energéticos e medicinais (Araújo *et al.*, 2019; Noblick, 2017). Já o tensoativo utilizado foi o Pluronic F127, um copolímero não-tóxico aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA), formado por um bloco central de poli(óxido de propileno) (P₆₅), com caráter lipofílico, e por blocos nas extremidades de poli(óxido de etileno) (E₁₀₀), com caráter mais hidrofílico (Li *et al.*, 2023).

Para promover liberação controlada de droga farmacêutica, polímeros naturais têm sido estudados como matrizes encapsulantes de ativo, propriedade que é possibilitada dada à sua baixa toxicidade e biocompatibilidade. Os sistemas de liberação controlada possuem a capacidade de manter a concentração do fármaco constante na faixa terapêutica por um maior intervalo de tempo. Esta característica apresenta grande vantagem frente aos sistemas convencionais de administração, em que a concentração do fármaco aumenta até alcançar um pico máximo de dissolução, intensificando a ocorrência de efeitos colaterais adversos (Gupta; Maity; Sharma, 2023).

Um polímero estudado em sistemas mais seletivos de liberação é o ácido hialurônico (AH), polissacarídeo naturalmente encontrado na matriz extracelular do corpo humano na forma de hialuronato de sódio (HS). O AH possui unidades alternadas de ácido D-glucurônico e *N*-acetil-D-glucosamina, ligadas por ligações glicosídicas β (1→4) e β (1→3). Este polissacarídeo possui potenciais atividades biológicas para aplicações farmacológicas, como sua afinidade com a glicoproteína de superfície celular CD44 (Arpicco *et al.*, 2013). A exploração dessa interação torna-se interessante para tratamentos antineoplásicos visto que a

CD44 é superexpressa em muitos tipos de células cancerígenas (Thapa; Wilson, 2016). Portanto, o hialuronato de sódio torna-se uma escolha adequada para melhorar a quimioterapia adjuvante e neoadjuvante, visto que pode ser utilizado para entrega controlada e para aumentar a seletividade de ativos em células cancerígenas, através de sua interação com CD44.

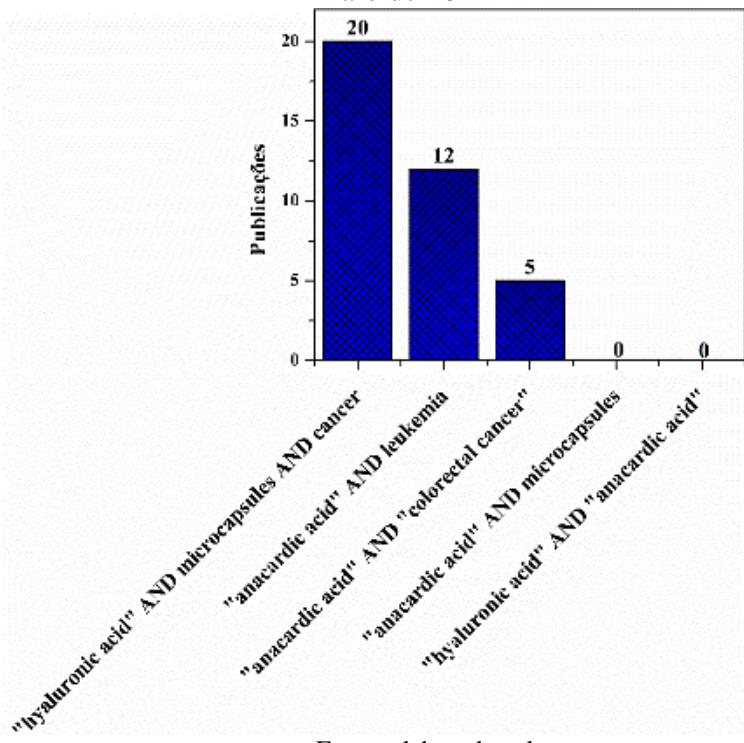
O AH já foi utilizado por Siram *et al.* (2023) como material de revestimento para aumentar a seletividade antitumoral. Os pesquisadores produziram nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs) de mesilato de imatinibe, usando palmitostearato de glicerila (mistura de mono-, di- e triacilgliceróis dos ácidos graxos palmítico e esteárico) como carreador lipídico e saponina de quillaja como tensoativo. Após o preparo, as SLNs foram revestidas com AH. Os estudos de citotoxicidade foram avaliados em células de câncer de mama (MCF-7) e sugeriram um efeito sinérgico, com menor IC₅₀ para a formulação revestida com AH.

Já para o AA, a literatura reporta a estratégia de encapsulação de AA hidrogenado em lipossomas, através do método de filme fino de camada lipídica, ao solubilizá-lo com uma mistura de fosfolipídeos e colesterol em diclorometano, com posterior evaporação do solvente e hidratação com tampão PBS, suplementado com marcador de superfície anticorpo monoclonal CD133. A lipossoma apresentou eficácia contra células-tronco cancerígenas (CSCs) NTERA-2 (Vien *et al.*, 2022).

Nesse estudo, as microcápsulas foram obtidas a partir da encapsulação da nanoemulsão de AA com uma solução aquosa do polissacarídeo HS, seguido de secagem por aspersão. A formulação em pó seco fornece ao material encapsulado uma barreira física mais eficaz contra degradação física e química, reduz custos de armazenamento e amplia a faixa de vias de administração potenciais, incluindo administração intravenosa, intraperitoneal, oral, nasal e pulmonar (Costa *et al.*, 2021).

A combinação contemplada neste trabalho nunca foi realizada, conforme mostra o estado da arte para artigos de pesquisa da base de dados *Web of Science*, contendo as palavras-chave apresentadas na Figura 1, revelando o ineditismo da pesquisa. O comportamento anticâncer da formulação preparada foi testado contra células de leucemia promielocítica (HL-60) e carcinoma colorretal (HCT-116), que já possuíam estudos sobre o efeito de AA nessas linhagens tumorais, mas sem nenhuma formulação desenvolvida para tratamento.

Figura 1. Estado da arte para artigos de pesquisa, sem restrição de data, realizado na base de dados *Web of Science*, em 14 de maio de 2024



Fonte: elaborada pelo autor.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Preparar microcápsula polissacarídica à base de hialuronato de sódio contendo núcleo de ácido anacárdico encapsulado a partir de nanoemulsão para aplicação em tratamento de câncer.

2.2 Objetivos Específicos

- Preparar nanoemulsão contendo ácido anacárdico para encapsular com solução de hialuronato de sódio;
- Obter as microcápsulas em pó pela técnica de secagem por aspersão;
- Analisar o efeito da encapsulação polissacarídica;
- Realizar a quantificação de ácido anacárdico nas formulações para mensurar a eficiência do processo de encapsulação e a influência da temperatura de secagem;
- Estudar as características espectroscópicas, térmicas e morfológicas das microcápsulas;
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* das microcápsulas;
- Realizar um estudo cinético de liberação *in vitro* de ácido anacárdico a partir das microcápsulas preparadas;
- Avaliar a segurança não clínica das microcápsulas em *zebrafish* (*Danio rerio*) adulto.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

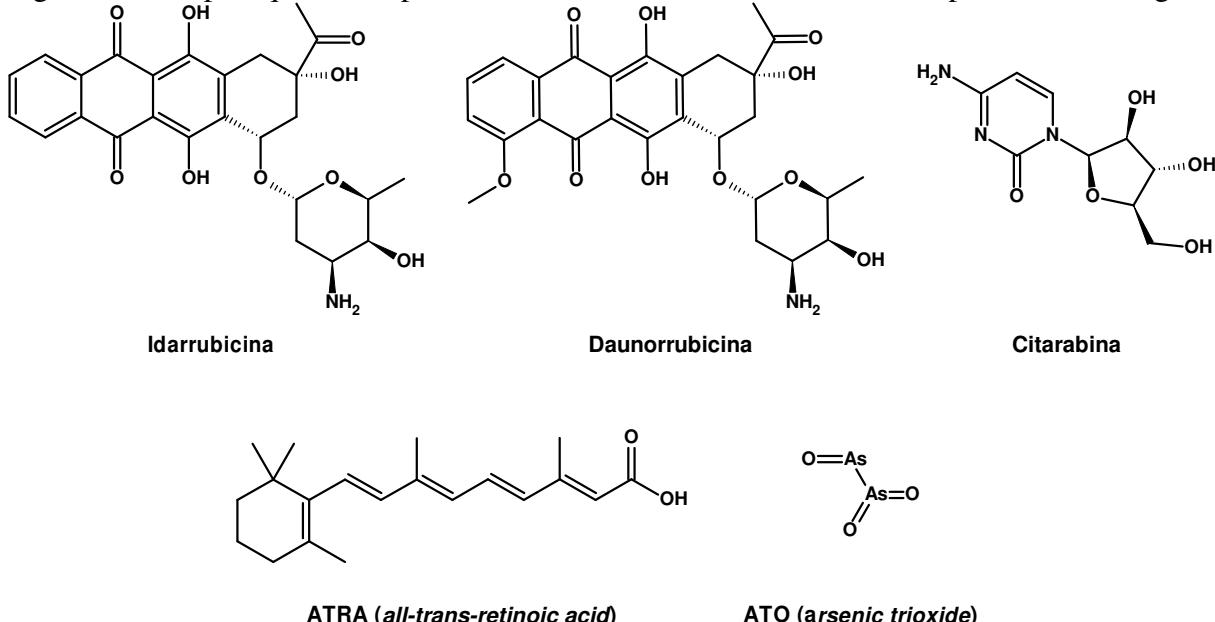
3.1 Leucemia promielocítica aguda (LPA)

A leucemia promielocítica aguda (LPA) é um subtipo das leucemias mieloides agudas (LMA) e se caracteriza pelo acúmulo de promielócitos, células imaturas da linhagem mieloide, na medula óssea e no sangue periférico. Esse tipo de leucemia se distingue por seu comportamento clínico, sendo uma doença agressiva que pode evoluir rapidamente para complicações fatais, especialmente devido a fenômenos hemorrágicos. Alguns sintomas principais da LPA são fadiga, febre, sangramentos, hematomas espontâneos e distúrbios de coagulação, que podem resultar em uma síndrome conhecida como coagulopatia consumptiva, potencialmente fatal (Bercier; Thé, 2024).

A introdução do ácido trans-retinoico (ATRA), com primeiro ensaio clínico realizado em 1988, e do trióxido de arsênio (ATO), com estudos realizados em 1997, representou um avanço significativo no tratamento da LPA, sendo amplamente indicado até os dias atuais, pois auxilia na melhoria do prognóstico ao proporcionar altas taxas de cura quando o tratamento é iniciado precocemente. O tratamento com o ATRA induz a diferenciação das células promielocíticas imaturas em células maduras e, em alguns casos, o ATO ajuda a superar a resistência ao ATRA em pacientes que não respondem a ele (Huang *et al.*, 1988; Chen *et al.*, 1997).

Apesar dos progressos, a resistência ao ATRA continua sendo um desafio clínico importante. Pacientes com mutações genéticas específicas ou com um quadro clínico mais grave podem não responder adequadamente apenas a esses dois agentes. Outro desafio a ser resolvido é alcançar a remissão completa e reduzir o risco de recaídas. Para esses pacientes, a combinação de ATRA e ATO deve ser associada a outras estratégias de tratamento. A Figura 2 apresenta as estruturas químicas dos quimioterápicos mais comumente utilizados no tratamento dessa neoplasia. O protocolo PETHEMA propõe uma terapia mais agressiva. Nessas situações, a combinação de idarrubicina ou daunorrubricina com citarabina e ATRA é indicada. Ambos os medicamentos pertencem à classe das antraciclinas, que interferem na síntese de DNA nas células tumorais, sendo eficazes na eliminação de células leucêmicas remanescentes. No entanto, a administração desses medicamentos exige monitoramento constante, devido aos riscos de toxicidade cardíaca e hepática associados ao tratamento com antraciclinas, além da ocorrência de náuseas, vômitos e alopecia (Jeddi *et al.*, 2010).

Figura 2. Principais quimioterápicos utilizados no tratamento da leucemia promielocítica aguda



Fonte: elaborada pelo autor.

3.2 Câncer colorretal (CCR)

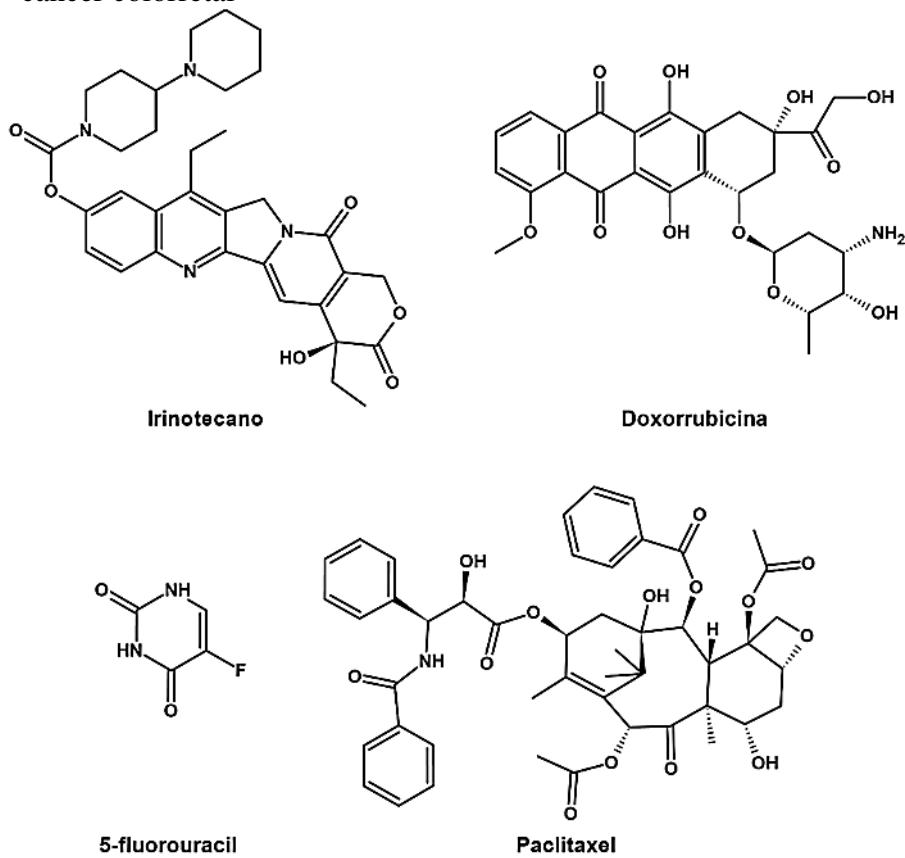
O câncer colorretal (CCR) é um tipo de câncer que se desenvolve a partir de células anormais do cólon (parte final do intestino grosso) ou do reto. É um dos tipos de câncer mais comuns no mundo e pode afetar pessoas de qualquer idade, porém é mais comum em adultos com mais de 50 anos. Segundo o INCA, a previsão é de aproximadamente 45.630 novos casos no Brasil para cada ano entre 2023 e 2025. Isso representa um risco estimado de 21,10 casos a cada 100 mil habitantes, afetando mais mulheres (23.660 casos) do que homens (21.970 casos).

Os principais fatores de risco para o CCR estão ligados a hábitos de vida, como a falta de atividade física, o sobrepeso, o consumo excessivo de álcool e tabaco, além de uma alimentação pobre em fibras, frutas, vegetais e carnes magras. Também existem fatores genéticos ou hereditários, como doenças inflamatórias intestinais crônicas e histórico pessoal ou familiar de adenomas ou CCR. Fatores profissionais, como a exposição a radiações, incluindo raios X e radiação gama, também são considerados importantes fatores de risco (INCA, 2023).

O CCR pode ser assintomático em seus estágios iniciais, mas à medida que a doença avança, os pacientes podem apresentar sintomas como alterações nos hábitos intestinais (diarreia, constipação ou sensação de que o intestino não se esvaziou completamente), sangue nas fezes ou fezes mais escuras, dor abdominal, perda de peso inexplicada, fadiga e anemia (Dickens; Ahmed, 2018).

O tratamento depende do estágio da doença, da saúde geral do paciente e de outras condições clínicas. Os principais tratamentos incluem cirurgia, em que há a remoção de partes do cólon ou reto onde o tumor está localizado. Esse procedimento é geralmente realizado como tratamento primário. Outra alternativa é a quimioterapia, usada para destruir células cancerígenas ou reduzir o tamanho do tumor, especialmente em casos de câncer avançado ou metastático. Os principais quimioterápicos utilizados na terapia do CCR, apresentados na Figura 3, são 5-fluorouracil, paclitaxel, irinotecano, doxorrubicina, entre outros. Porém, existem efeitos adversos com o uso destes quimioterápicos que devem ser rigorosamente acompanhados e a existência de tumores resistentes a múltiplos fármacos (MDR) exige o desenvolvimento de novas formulações para o sucesso do tratamento (Dickens; Ahmed, 2018).

Figura 3. Principais quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer colorretal



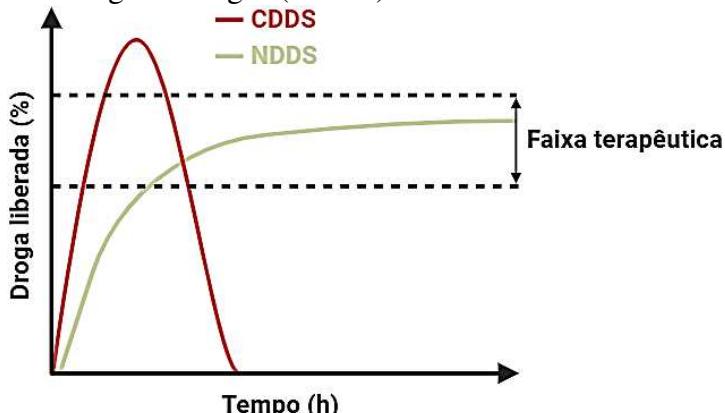
Fonte: elaborada pelo autor.

3.3 Novos sistemas de entrega de drogas (NDDS)

Os sistemas de entrega de fármacos podem ser divididos em dois grupos principais: os sistemas convencionais de entrega de drogas (CDDS) e os novos sistemas de entrega de

drogas (NDDS). A Figura 4 ilustra a administração de fármacos realizada através de CDDS em comparação com uma administração realizada através de NDDS. Nota-se que os CDDS costumam apresentar concentrações de medicamentos que oscilam durante o tratamento, exigindo administração frequente. Isso pode resultar em picos de concentração no sangue que, frequentemente, ultrapassam os limites de toxicidade, ocasionando efeitos colaterais indesejados. Por outro lado, os NDDS apresentam a capacidade de melhorar a eficácia do tratamento, tornando-o mais seguro e tolerável para os pacientes ao promover a liberação controlada de ativos e a redução dos efeitos adversos. Isso resulta na necessidade de menores doses de ativos, especialmente aqueles hidrofóbicos, devido à maior biodisponibilidade proporcionada pela formulação (Wang *et al.*, 2022).

Figura 4. Análise comparativa da porcentagem de liberação de fármacos em função do tempo para sistemas convencionais de entrega de drogas (CDDS) e novos sistemas de entrega de drogas (NDDS)



Fonte: elaborada pelo autor.

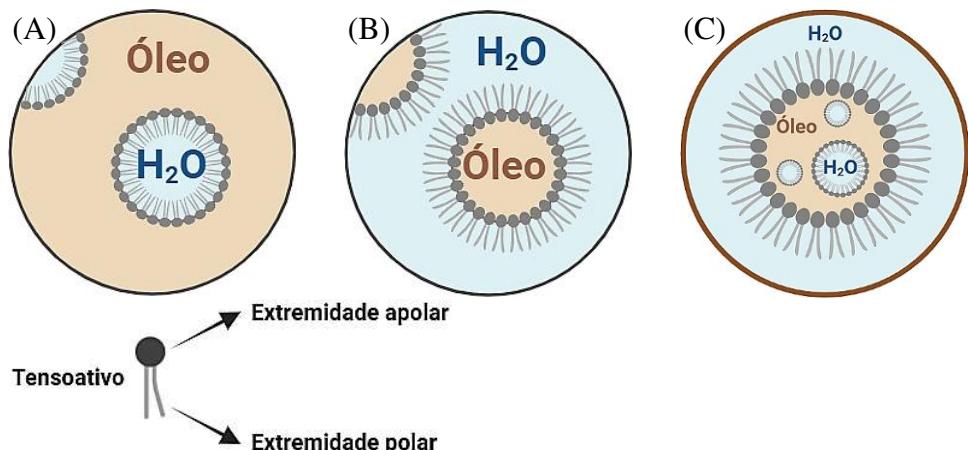
3.3.1 Nanoemulsões

As nanoemulsões são sistemas dispersos formados por dois líquidos imiscíveis, em que um dos líquidos está disperso na forma de gotículas extremamente pequenas no outro, geralmente na faixa de 20 a 500 nm de diâmetro, possuindo na interface entre esses líquidos um tensoativo capaz de estabilizar essa mistura (Sharma *et al.*, 2010). As nanoemulsões se destacam por suas gotículas serem tão pequenas que podem apresentar propriedades diferentes das emulsões convencionais, razão pela qual têm ganhado espaço como NDDS. Uma das características oriundas do pequeno tamanho é a resistência à coalescência das gotículas (união

de gotículas individuais) e à separação de fases, aumentando a estabilidade da dispersão (Singh *et al.*, 2017).

Dependendo dos constituintes e da distribuição relativa entre a fase interna/dispersa e a fase contínua, as nanoemulsões podem ser classificadas como bifásicas (água em óleo ou óleo em água) ou múltiplas nanoemulsões (água em óleo em água) (Figura 5). Normalmente, a fase presente em maior volume é considerada a fase contínua. A região polar de tensoativos geralmente proporciona uma barreira mais eficaz contra a coalescência do que uma região de hidrocarbonetos e favorece a produção de nanoemulsões do tipo óleo em água. Por isso, é viável obter nanoemulsões do tipo óleo em água com volumes de fase interna relativamente altos. Em contraste, as nanoemulsões água em óleo se invertem facilmente se o teor de água aumentar. Em múltiplas nanoemulsões, a fase aquosa interna é dispersa em uma fase oleosa, que por sua vez é distribuída em uma fase aquosa, formando um sistema único (Wilson *et al.*, 2022).

Figura 5. Representação de uma nanoemulsão do tipo água em óleo (A), de uma nanoemulsão do tipo óleo em água (B) e de uma nanoemulsão do tipo água em óleo em água (C)

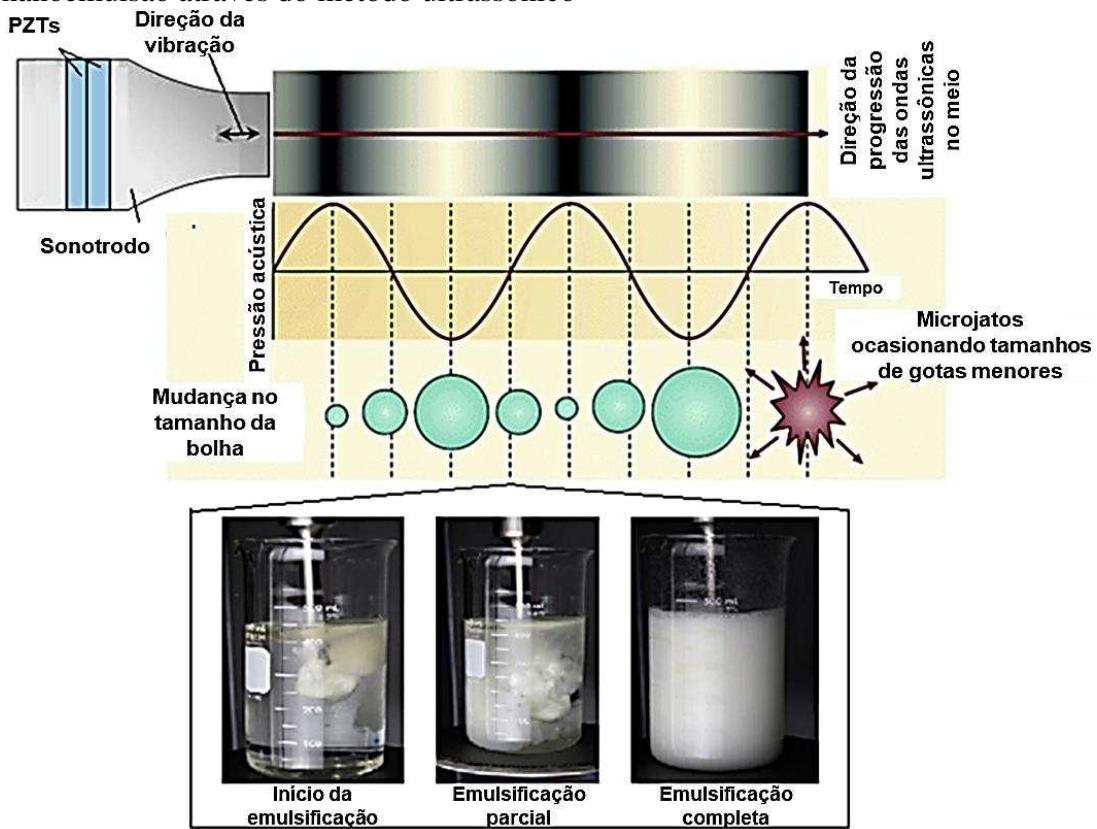


Fonte: elaborada pelo autor.

A pesquisa com nanoemulsões tem ganhado destaque na indústria farmacêutica em virtude de sua capacidade de encapsular uma ampla variedade de fármacos e ingredientes bioativos hidrofóbicos. Essa técnica garante maior biodisponibilidade dessas substâncias ao aumentar a superfície de contato entre os componentes, acelerando sua dissolução (Yu; Huang, 2012). Além disso, são capazes de proporcionar melhores características de penetração, podendo ser projetadas para atingir órgãos específicos (Zaafar *et al.*, 2024) e para serem absorvidas diretamente pelo sistema linfático, evitando o metabolismo de primeira passagem. Esse processo contribui para aumentar a biodisponibilidade e diminuir a dose de medicamentos que sofrem uma transformação hepática significativa (Khan *et al.*, 2013).

As nanoemulsões podem ser preparadas por diferentes métodos, como o método de homogeneização de alta pressão, que utiliza uma pressão muito alta para forçar a mistura de óleo e água, gerando gotículas muito pequenas (Echeverri *et al.*, 2020). Já o método de auto-nanoemulsificação, por sua vez, utiliza uma mistura específica de surfactantes e co-surfactantes para reduzir a tensão superficial entre as duas fases imiscíveis, resultando na formação espontânea da nanoemulsão (Kanwal *et al.*, 2019). Um método amplamente utilizado para o preparo de nanoemulsões envolve a aplicação de alta energia mecânica através de um sonicador, apresentado na Figura 6. Esse processo consiste na emissão de ondas ultrassônicas, que criam uma série de compressões e descompressões mecânicas em uma dispersão líquida, resultando na formação de bolhas de cavitação. Ao implodirem, essas bolhas de cavitação produzem ondas de choque que geram um jato de líquido circundante, responsáveis por aumentar a área interfacial das gotículas em escala nanométrica (Modarres-Gheisari *et al.*, 2019).

Figura 6. Processo de formação de bolhas de cavitação na produção de nanoemulsão através do método ultrassônico

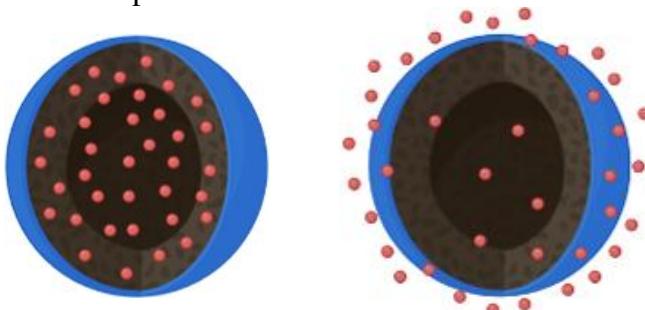


Fonte: adaptado de Modarres-Gheisari *et al.* (2019).

3.3.2 Microcápsulas polissacarídicas

As microcápsulas polissacarídicas (Figura 7) têm avançado significativamente nas aplicações como NDDS. As microcápsulas são compostas por um invólucro sólido à base de polissacarídeo e um núcleo líquido, apresentando tamanhos que podem variar de 1 a 1000 µm (Meng *et al.*, 2022). Esses sistemas se destacam por sua capacidade de alto carregamento de substâncias ativas e proteção dos ativos encapsulados de condições adversas, como luz, umidade e variações bruscas de pH (Rebouças *et al.*, 2023). Além disso, tais sistemas são capazes de contornar o problema do curto tempo de circulação *in vivo* de fármacos hidrofóbicos. A liberação controlada de fármacos é uma das principais vantagens da microencapsulação. Existem diversos mecanismos que controlam a liberação do fármaco, os principais são a difusão do fármaco, a erosão e o intumescimento do sistema matricial (Sun *et al.*, 2017).

Figura 7. Liberação de fármacos a partir de sistemas microencapsulados



Fonte: elaborada pelo autor.

A diversidade nas estruturas dessas microcápsulas, produzidas por diferentes métodos e estratégias, resulta em propriedades variadas que podem ser otimizadas para controlar de forma mais precisa a exposição ao fármaco. Essas partículas podem ser desenvolvidas para responder a condições específicas do organismo, como o pH (Xu *et al.*, 2016) ou a presença de enzimas (Ravanfar; Celli; Abbaspourrad, 2018), representando um avanço significativo na liberação de medicamentos em locais estratégicos do corpo. O design dessas cápsulas geralmente segue um processo em cinco etapas: circulação no organismo, acumulação no local desejado, penetração nas células, internalização e, por fim, a liberação do agente terapêutico. Além de sua aplicação como sistemas encapsulantes de fármacos, as microcápsulas apresentam potencial de uso em bioimagem (Du *et al.*, 2015) e em curativos de feridas (Yang *et al.*, 2021), podendo ser integradas a suportes como hidrogéis, filmes e tecidos (Meng *et al.*, 2022).

Os polissacarídeos são materiais naturais abundantes e renováveis, oferecem vantagens significativas para aplicações biomédicas como hidrofilicidade, estabilidade mecânica e possibilidade de modificação estrutural. A biodegradabilidade desses polímeros é uma característica crucial que torna os polissacarídeos ideais para sistemas de entrega de medicamentos, uma vez que permite que eles se decomponham no organismo, através de degradação enzimática e/ou hidrolítica, resultando em subprodutos biocompatíveis que minimizam efeitos inflamatórios e toxicidade. Dentre os polissacarídeos comumente utilizados em aplicações biomédicas, destacam-se ácido hialurônico, amido, alginato, celulose, pululana, quitosana, entre outros (Kurczewska, 2022).

A formação do invólucro das cápsulas polissacáridicas pode ocorrer através de métodos físicos ou químicos. A preparação química geralmente envolve reações que permitem a combinação de grupos ativos nos materiais da parede, formando ligações químicas estáveis. Um método eficiente para a síntese de microcápsulas é a polimerização *in situ*, que permite o controle sobre a formação do invólucro (Qi *et al.*, 2021).

A preparação de microcápsulas à base de polissacarídeos por métodos físicos é outra abordagem também eficiente, que se dá por diversas interações, como interações iônicas, hidrofílicas-hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. Diversos métodos podem ser utilizados, incluindo: método de emulsificação (Santamaría *et al.*, 2024), método de secagem por aspersão (Rosa *et al.*, 2025) e método de montagem camada por camada (LBL) (Kazemi-Andalib *et al.*, 2022).

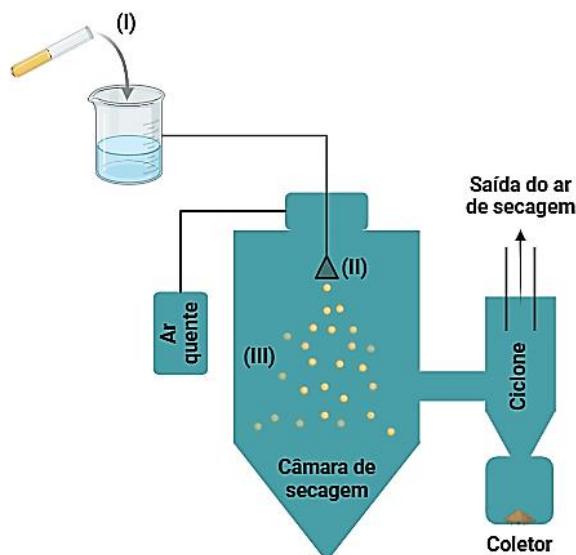
Para se escolher o método de preparação, as características do material e a aplicação desejada devem ser analisadas. Os métodos que são econômicos, convenientes e ecológicos são especialmente valorizados, pois podem ser aplicados industrialmente.

A realização da microencapsulação por meio da secagem por aspersão é feita através de um equipamento chamado *spray dryer*. Tal tecnologia proporciona vantagens significativas, como a produção de microcápsulas em um processo simples, contínuo e de baixo custo, fatores que viabilizam seu uso em larga escala. Em comparação com o preparo através da liofilização, a secagem por aspersão pode apresentar custos 30 a 50 vezes menores (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

As principais etapas da microencapsulação por secagem por aspersão estão apresentadas na Figura 8, elas incluem: (I) adição da dispersão no material de revestimento, (II) atomização da dispersão e (III) desidratação das partículas atomizadas. Para a secagem por aspersão de emulsões, a emulsão deve permanecer estável antes da secagem, com viscosidade suficientemente baixa para evitar a inclusão de ar nas partículas e as gotas de óleo devem ser

pequenas, pois gotículas grandes podem prejudicar a taxa de secagem devido a viscosidades elevadas que dificultam a atomização. A flexibilidade desta técnica de secagem permite a utilização de diferentes materiais de parede, como os polissacarídeos, resultando em partículas de alta qualidade (Silva *et al.*, 2020; Tambade *et al.*, 2020).

Figura 8. Etapas do processo de secagem de dispersões por *spray dryer*: (I) adição da dispersão no material de revestimento, (II) atomização da dispersão e (III) desidratação das partículas atomizadas



Fonte: elaborada pelo autor.

3.4 Considerações sobre os componentes da formulação

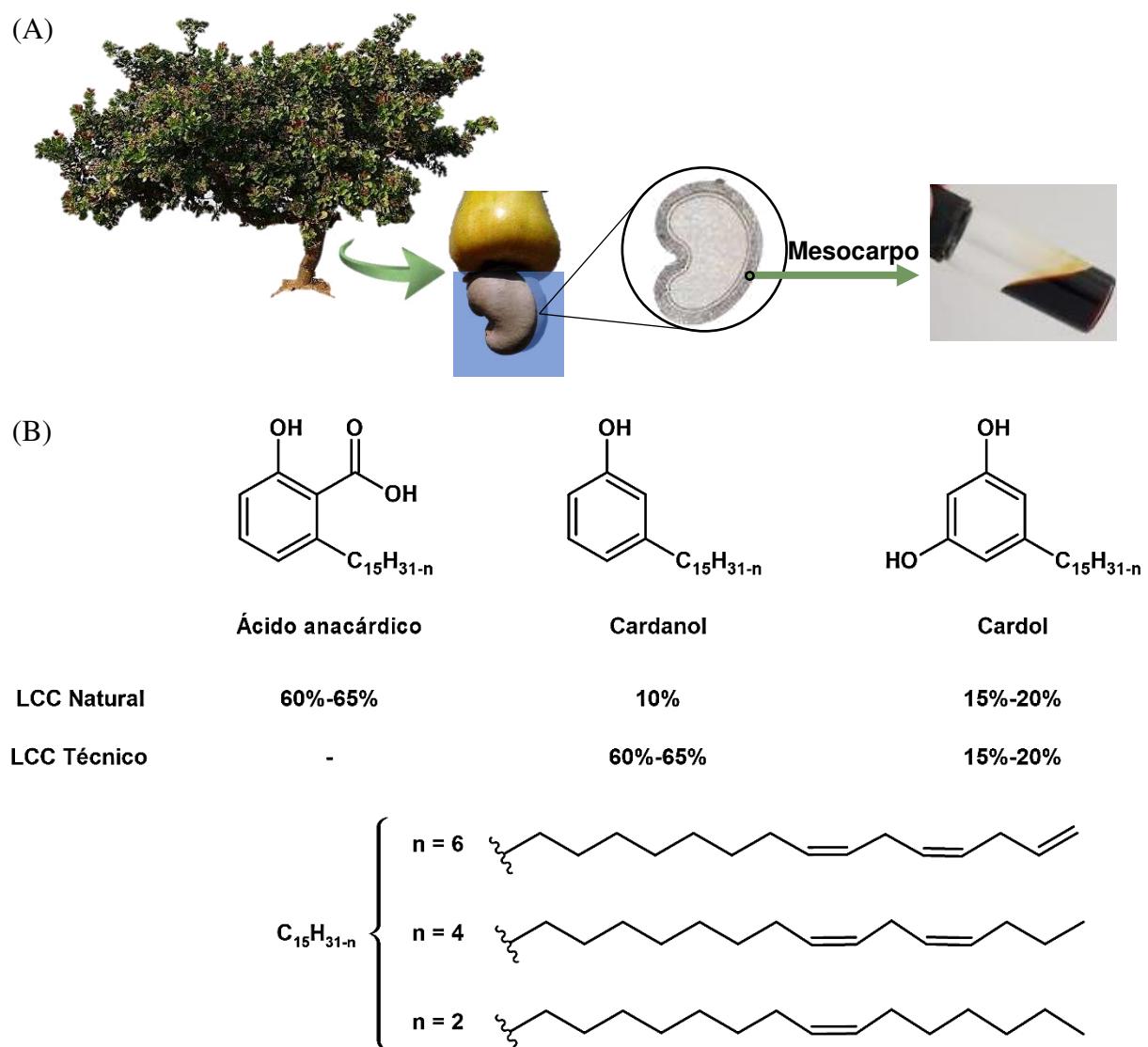
3.4.1 Ácido anacárdico

A família botânica Anacardiaceae abrange cerca de 81 gêneros e 800 espécies de árvores e arbustos. Dentre as espécies mais investigadas dessa família, destaca-se a *Anacardium occidentale*, nativa do Brasil e disseminada para outros países, principalmente em países asiáticos e africanos, devido à produção do fruto, a castanha do caju, e do pseudo-fruto, o caju. No Brasil, essa espécie é encontrada predominantemente nas zonas costeiras do Nordeste (Schulze-Kaysers; Feuereisen; Schieber, 2015). Em 2023, a Produção Agrícola Municipal (PAM) do Brasil registrou uma área colhida de 441.892 hectares pertencentes à produção de castanha de caju, resultando em uma produção de 127.931 toneladas e valor de produção de

453.163 reais. O estado do Ceará destaca-se como o principal produtor, seguido pelo estado do Rio Grande do Norte (IBGE, 2023).

A morfologia da casca da castanha de caju, representada na Figura 9A, apresenta uma camada esponjosa chamada mesocarpo, cujos alvéolos são preenchidos pelo líquido da casca da castanha do caju (LCC), uma fonte rica de lipídios fenólicos, responsável por 25 a 30% do peso do fruto *in natura*. Esses lipídios incluem ácidos anacárdicos, cardanol e cardol, cujas estruturas químicas estão apresentadas na Figura 9B. O LCC técnico, obtido por meio de processo termomecânico, é predominantemente composto por cardanol. Por outro lado, quando a extração ocorre a frio (extraído através do uso de solventes ou prensagem), os principais componentes são os ácidos anacárdicos (AA) (Hamad; Mubofu, 2015).

Figura 9. Representação esquemática da obtenção do LCC (A) e estruturas químicas dos compostos majoritários do LCC (B)



Fonte: elaborada pelo autor.

O AA é uma mistura de congêneres do ácido 2-hidroxi-6-alquilbenzoico, com cadeia alquil-C15, que pode ser saturada ou mono-, di- ou tri-insaturada. O AA é um resíduo valioso da agroindústria e representa uma biomassa renovável com grande potencial em química fina (Gartili *et al.*, 2024). O AA possui diversas propriedades farmacológicas reportadas na literatura, com notórios estudos como um agente antitumoral em diferentes tipos de câncer (Park *et al.*, 2018; Tamura; Nitoda; Kubo, 2007; Gnanaprakasam; López-Bañuelos; Vega, 2021). Além disso, o AA inibe o vírus da hepatite C (Hundt; Li; Liu, 2015), tem ação antibacteriana (Souza *et al.*, 2022) e apresenta potencial ansiolítico (Júnior *et al.*, 2018).

Balasubramanyam *et al.* (2003) descobriram que o AA exibe a capacidade de inibir a enzima histona acetiltransferase (HAT) p300 e fator associado p300/CBP. O bloqueio da enzima p300 coíbe a via NF-κB, responsável por regular a proliferação, sobrevivência e inflamação celular. Nesse estudo, a atividade inibidora da HAT p300 não se alterou após a hidrogenação da mistura insaturada de ácidos anacárdicos, eliminando, assim, a importância do grau de insaturação no mecanismo de inibição.

Anjum *et al.* (2021) desenvolveram nanopartículas lipídicas sólidas carregadas com AA, posteriormente revestidas com quitosana e DNase (Ana-SLNs-CH-DNase) para aplicação contra infecções bacterianas mediadas por biofilme. As nanopartículas desenvolvidas foram consideradas não tóxicas contra células de queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT), ao mesmo tempo que demonstraram eficácia antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* (concentração inibitória mínima igual a 1,56 µg ml⁻¹).

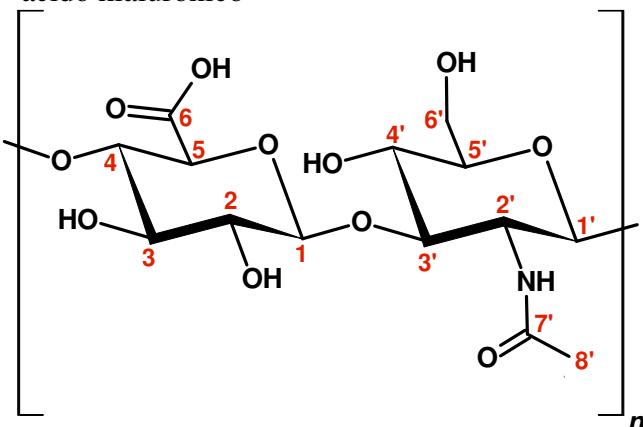
Um método eficiente para a extração de AA é realizado a partir da dissolução do LCC em acetona, seguido da adição de hidróxido de cálcio sob agitação. Terminado a etapa de adição, a reação ocorre sob agitação magnética constante por 3,5 h, com temperatura de 50 °C. Após a conclusão da reação, o precipitado de anacardato de cálcio é filtrado e lavado com acetona e seco, em seguida é tratado com água destilada e HCl. O AA é obtido através de extração com éter de petróleo, seguido de evaporação do solvente (Gandhi; Patel; Dholakiya, 2012).

3.4.2 Hialuronato de sódio

O ácido hialurônico (AH) é um polissacarídeo glicosaminoglicano não sulfatado, composto por uma estrutura linear de repetições de ácido D-glucurônico e *N*-acetil-D-glucosamina, unidos por ligações glicosídicas β (1→4) e β (1→3), como mostra a estrutura química apresentada na Figura 10. O AH foi inicialmente descoberto no humor vítreo do olho

bovino em 1934 (Meyer; Palmer, 1934), com sua primeira síntese *in vitro* ocorrendo em 1964 (Schiller, 1964). Sua estrutura química é em grande parte homogênea, com exceção de alguns resíduos de glucosamina que podem ser desacetylados ocasionalmente. Para fins biomédicos, o AH é produzido principalmente por fermentação microbiana, também pode ser extraído de cristas de galos e cordões umbilicais (Dosio *et al.*, 2016).

Figura 10. Estrutura química do polissacarídeo ácido hialurônico



Fonte: elaborada pelo autor.

Com base na distribuição da massa molar, o AH pode ser classificado como oligossacarídeo (O-AH, <10 kDa), AH de baixa massa molar (LMW-AH, 10–250 kDa), AH de massa molar média (MMW-AH, 250–1000 kDa), AH de alta massa molar (HMW-AH, >1000 kDa) e AH de massa molar ultra-alta (vHMW-AH, >6000 kDa) (Monslow; Govindaraju; Puré, 2015).

Em condições fisiológicas, o ácido hialurônico (que possui valor de pK_a dos grupos carboxila dos resíduos de ácido D-glucurônico entre 3-4) existe na forma ionizada, denominada hialuronato de sódio (HS), que se caracteriza por ser negativamente carregado e altamente hidrofílico. Este polímero é um dos principais componentes da matriz extracelular (MEC), estando amplamente distribuído em tecidos conjuntivos, epiteliais e neurais. Devido à presença na MEC, o HS é facilmente reconhecido e aceito pelo corpo, tornando-se uma excelente opção para utilização como sistema encapsulante de fármacos (Hirama *et al.*, 2021).

Além da biocompatibilidade anteriormente mencionada, outras vantagens são observadas no uso deste polissacarídeo em sistemas de liberação de medicamentos, como a facilidade de ligação dos fármacos ao HS e o aumento da meia-vida plasmática do medicamento, retardando o processo de eliminação (Han *et al.*, 2015). Além disso, há a possibilidade de intensificar a seletividade tumoral através da interação com a proteína cluster

de diferenciação (CD) CD44. A CD44 contém um ectodomínio amino-terminal que possui um domínio de ligação com HS, responsável pela ligação desse polissacarídeo na superfície de células específicas. Em condições fisiológicas normais, a CD44 está envolvida em processos como agregação e migração celular, além de desempenhar papéis em respostas inflamatórias e mecanismos de reparo. No entanto, a CD44 também está associada ao câncer, estando envolvida na invasão tumoral e nas metástases (Pashkina *et al.*, 2025).

Li e Howell (2010) preparam microcápsulas de HS (extraído de *Streptococcus equi* sp., MM $0,6\text{--}1,2 \times 10^6$ g mol $^{-1}$) e cisplatina, através da conjugação do ativo com os grupos carboxílicos do polissacarídeo, sob alta temperatura. Nesse trabalho, o HS atua como um transportador de matriz biodegradável e, ao mesmo tempo, como um agente de direcionamento para o receptor CD44. Em ensaios *in vitro*, observou-se que as células CD44+ OV2008 e A2780 internalizaram as micropartículas de forma mais eficaz em comparação com as células CD44- UCI101.

3.4.3 Óleo de licuri (*Syagrus coronata*)

A espécie *Syagrus coronata* pertence à família Arecaceae e à subfamília Arecoideae, sendo popularmente chamada de "licuri" ou "ouricuri" no Brasil. Essa palmeira possui altura média entre 8 e 11 m e se desenvolve em regiões semiáridas, com maiores proporções nos estados de Minas Gerais, Bahia, Sergipe e Alagoas (Noblick, 2017).

Os frutos da licuri apresentam duas partes especializadas: o mesocarpo carnoso, comestível e atrativo para a propagação da espécie, e o endocarpo duro, que protege a semente. Esses frutos estão disponíveis ao longo de todo o ano (cada árvore pode produzir quatro cachos por ano), com a produção mais intensa entre março, junho e julho. Seu plantio auxilia na recuperação de áreas degradadas e permite sua combinação com outras culturas (Lisboa *et al.*, 2020).

Os cachos de licuri (Figura 11) possuem em média 1.357 cocos pequenos, cada um com 2 a 3 cm de comprimento e aproximadamente 1,5 cm de diâmetro. Essas palmeiras fornecem uma fonte perene para a obtenção de óleos e gorduras, com elevado teor de óleo (49,2% m/m) no endosperma da semente do fruto, o que proporciona que o processo da extração de óleo dos frutos seja economicamente viável (Crepaldi *et al.*, 2001). O uso desse óleo na criação de produtos com maior valor agregado constitui uma estratégia eficiente para promover o desenvolvimento econômico da região.

Figura 11. Palmeira *Syagrus coronata* e seus frutos imaturos aproximando-se do tamanho maduro



Fonte: adaptada de Noblick (2017).

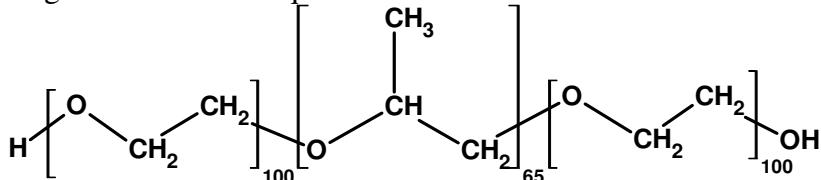
O óleo de licuri apresenta características promissoras para aplicações farmacêuticas. Os habitantes do campo, no Nordeste do Brasil, tradicionalmente utilizam o óleo de licuri para tratar micoes, dores nas costas, inflamações oculares e feridas (Rufino *et al.*, 2008).

Souza *et al.* (2021) analisaram a segurança biológica do óleo fixo de *S. Coronata*. Como resultado, as maiores concentrações do óleo apresentaram baixos níveis de citotoxicidade e não foi possível determinar a CL₅₀ em nenhum dos testes. O estudo de toxicidade aguda não revelou qualquer evidência de efeitos adversos em animais tratados com o óleo. Os rins, baço e fígado não apresentaram alterações morfológicas indicativas de processo patológico. Atividades mutagênicas ou genotóxicas não foram detectadas.

3.4.4 Pluronic F127

O Pluronic F127 (Figura 12) é um copolímero tribloco composto por um segmento central de poli(óxido de propileno), com 65 unidades, e dois blocos terminais de poli(óxido de etileno), com 100 unidades cada. Este copolímero, com massa molar de aproximadamente 12.500 Dalton, é amplamente utilizado em diversas formas de administração de medicamentos, como via oral, tópica, intranasal, vaginal, retal, ocular e parenteral (Li *et al.*, 2023). Além disso, o Pluronic F127 é um tensoativo não tóxico, aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*), e tem sido empregado na preparação de nanoemulsões devido às suas propriedades termorresponsivas.

Figura 12. Estrutura química do tensoativo Pluronic F127



Fonte: elaborada pelo autor.

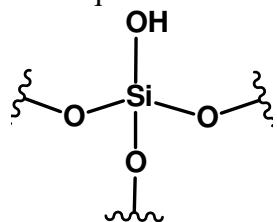
Os Pluronics têm demonstrado a capacidade de reverter a saída para o exterior da célula de transportadores P-gp, responsáveis por desempenhar um papel fundamental na resistência a múltiplos fármacos (MDR) em células tumorais. Eles exercem efeitos duplos, reduzindo a atividade ATPase da P-gp e esgotando os níveis de ATP intracelular necessários para o funcionamento da P-gp, contornando o problema da MDR (Akash; Rehman, 2015).

Nas concentrações ideais, esse copolímero apresenta características reversíveis entre soluções e géis, em temperaturas baixas e altas, por meio de rearranjo de sua estrutura no meio. Purnama *et al.* (2024) otimizaram formulações de nanoemulsões de queracetina termorresponsivas (T-QNE-Gs) para injeção intravítreia e examinaram sua atividade *in vitro* quanto à inibição de neovascularização induzida pelo fator de crescimento endotelial vascular-A (VEGF-A), a partir das células endoteliais pigmentares da retina. As T-QNE-Gs foram preparadas pela incorporação de géis compostos por diferentes proporções de Pluronic F127 e Pluronic F68, com uma concentração fixa de hidroxipropilmetylcelulose, em um concentrado de nanoemulsão de queracetina. O sistema otimizado apresentou fluidez adequada à temperatura ambiente ($27 \pm 1^\circ\text{C}$) e se transformou em gel a uma temperatura próxima à do segmento posterior do olho ($35 \pm 1^\circ\text{C}$). A formulação inibiu eficazmente a migração e a formação de tubos das células endoteliais da veia umbilical humana e supriu a expressão gênica e os níveis de proteína VEGF-A nas células do epitélio pigmentado da retina sob condições hipóxicas.

3.4.5 Aerosil 200

Aerosil 200 (Figura 13) é uma sílica pirogênica hidrofílica com uma área de superfície específica de $200 \pm 25 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, amplamente utilizada em diversas aplicações farmacêuticas e industriais devido às suas propriedades físicas e a sua segurança. Esse dióxido de silício coloidal ajuda a estabilizar algumas misturas químicas, atua como espessante e na formação de géis de suspensão, além de ser usado em preparações semissólidas. Também aumenta a eficiência do processo de secagem por *spray dryer*, evitando a aderência do produto seco às superfícies internas do equipamento (Li *et al.*, 2015; Tello *et al.*, 2023).

Figura 13. Estrutura química da sílica Aerosil 200



Fonte: elaborada pelo autor.

Dharankar *et al.* (2015) desenvolveram um sistema de administração de medicamentos autoemulsionante para administração oral de cetoprofeno, utilizando óleo de soja, Cremophor EL e Maisine 35-1, seguido da adsorção da formulação em Aerosil 200 e secagem em *spray dryer*. Os resultados mostraram que os lotes com maior quantidade de Aerosil 200 apresentaram melhores rendimentos no processo. Devido à sua natureza de fluxo livre (com pouca agregação) e ao tamanho de partícula muito pequeno, o adsorvente proporcionou propriedades de fluidez ideais, com uma maior quantidade de medicamento adsorvida na superfície.

Essas características fazem do Aerosil 200 um componente essencial para otimizar o processamento de formulações farmacêuticas, garantindo tanto a estabilidade do produto quanto a eficiência dos processos de secagem por *spray dryer*, por este motivo foi utilizado como componente da formulação.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Materiais

O polissacarídeo hialuronato de sódio foi adquirido de Quanao Biotech (Xi'an, China). O ácido anacárdico (90% de pureza, com percentuais de AA mono, di e tri-insaturados iguais a 31,08%, 17,73% e 51,18%, respectivamente) foi obtido do Laboratório de Polímeros e Inovação de Materiais, da Universidade Federal do Ceará (UFC). O óleo de licuri (*Syagrus coronata*) foi obtido de Licuri Brasil. Pluronic® F127, Aerosil® 200, etanol, tampão PBS e o sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Alemanha). A água foi obtida de um purificador Milli-Q.

4.2 Caracterização das matérias-primas

4.2.1 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio ($^1\text{H-NMR}$)

As análises de $^1\text{H-NMR}$ do hialuronato de sódio e do ácido anacárdico foram realizadas na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Os espectros foram obtidos utilizando um espectrômetro RMN, modelo Agilent DD2, após a solubilização do hialuronato de sódio em óxido de deutério e do ácido anacárdico em clorofórmio deuterado. O espectro de $^1\text{H-NMR}$ do óleo de licuri em clorofórmio deuterado foi obtido no Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) da UFC, em espectrômetro RMN, modelo Bruker Avance DRX 500. Os dados foram processados e analisados no software MestReNova (versão 8.0.0-10524).

4.2.2 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

A análise de GPC para determinação da massa molar do hialuronato de sódio foi realizada utilizando cromatógrafo de permeação em gel, modelo Shimadzu LC-20AD, equipado com um refratômetro diferencial como detector e uma coluna linear PolySep-GFC-P (7,8 mm × 300 mm), com a temperatura de forno igual a 35 °C. Nitrato de sódio (NaNO_3) 0,1 mol L⁻¹ contendo 0,02% (m/v) de azida (NaN_3) foi usado como eluente, com fluxo de 1,0 mL min⁻¹. Para realizar a injeção da amostra, o polissacarídeo foi solubilizado em água com concentração igual a 0,2 g L⁻¹ (Tosoh Bioscience GmbH, 2017). A solução polissacarídica foi

então filtrada em uma membrana de polietersulfona com poros de 0,45 µm. A curva de calibração foi preparada disposta de padrões de pululana (Fluka Analytical, St. Louis, EUA).

4.2.3 Análise Elementar

Para se obter a porcentagem de Carbono, Hidrogênio, Nitrogênio e Enxofre do hialuronato de sódio foi realizada a técnica de Análise Elementar, utilizando equipamento FLASH 2000 Series CHNS Automatic Elemental Analyzer, em parceria com a Universidade de Manchester, Inglaterra.

4.2.4 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS)

O óleo de licuri foi transesterificado para éster metílico através da reação com solução metanólica, catalisada por hidróxido de sódio. A composição de ácidos graxos foi obtida por GC/MS SHIMADZU QP-2010 ULTRA, equipado com uma coluna capilar (5%-fenil)-metilpolissiloxano (DB-5) (30 m × 0,25 mm), utilizando hélio como gás de arraste, com fluxo igual a 0,6 mL min⁻¹, em modo *splitless*. Foram preparadas soluções em acetato de etila com concentrações iguais a 1 mg mL⁻¹ e injetadas com 1 µL de volume. A temperatura do forno foi inicialmente ajustada em 120 °C e programada com taxa de aquecimento igual a 10 °C min⁻¹ até 300 °C, depois mantida por 10 min. As temperaturas do injetor e do detector foram 250 °C e 300 °C, respectivamente. O analisador quadrupolo foi ajustado para ionização eletrônica e escaneado em uma faixa entre 50 a 450 m/z (Pereira *et al.*, 2023).

4.3 Preparo da nanoemulsão

A microcápsula foi obtida a partir da encapsulação de uma nanoemulsão. As massas dos componentes da nanoemulsão estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Valores de composição mássica das nanoemulsões

| Formulação | Água (g) | Ácido anacárdico (g) | Óleo de licuri (g) | Pluronic F127 (g) |
|------------|----------|----------------------|--------------------|-------------------|
| NEAA | 12,8000 | 1,2437 | 0,5082 | 0,5000 |
| NEC | 12,8000 | - | 0,5087 | 0,5000 |

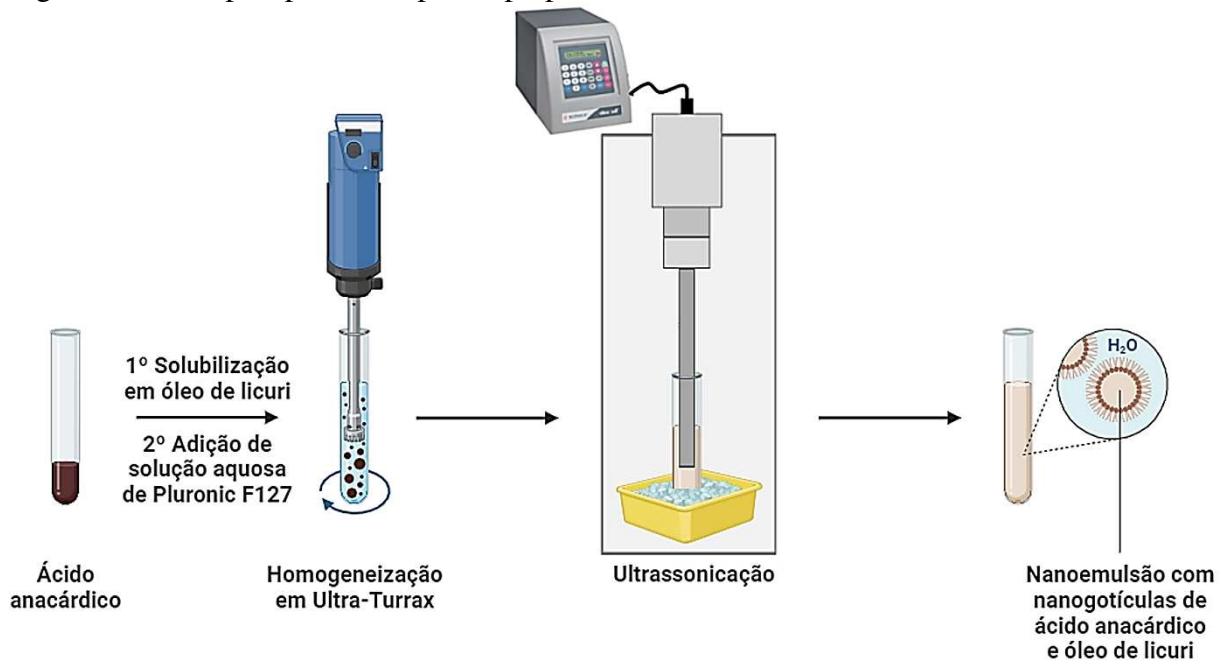
NEAA: nanoemulsão com ácido anacárdico, NEC: nanoemulsão controle.

Fonte: elaborada pelo autor.

Para o preparo da nanoemulsão, o ácido anacárdico foi, primeiramente, solubilizado em óleo de licuri, à temperatura ambiente (solução A). Em paralelo, o tensoativo Pluronic F127 foi solubilizado em água, a 5 °C, durante 20 min (solução B). Em seguida, verteu-se a solução B sobre a solução A, obtendo uma mistura que foi homogeneizada com o auxílio de um Ultra-Turrax, a 15000 rpm, por 2 min. Para obter a nanoemulsão, a dispersão resultante foi posteriormente levada à ultrassonicação em um sonicador com sonda, modelo Branson Sonifier W-450D, mantida em banho de gelo durante o processo, utilizando amplitude de 70%, durante 2 min, em ciclos de 10 s ligado e 10 s de repouso e potência de 90-110 W (Rebouças *et al.*, 2023).

O procedimento experimental para a obtenção da nanoemulsão NEAA está representado na Figura 14.

Figura 14. Principais processos para o preparo da nanoemulsão NEAA



Fonte: elaborada pelo autor.

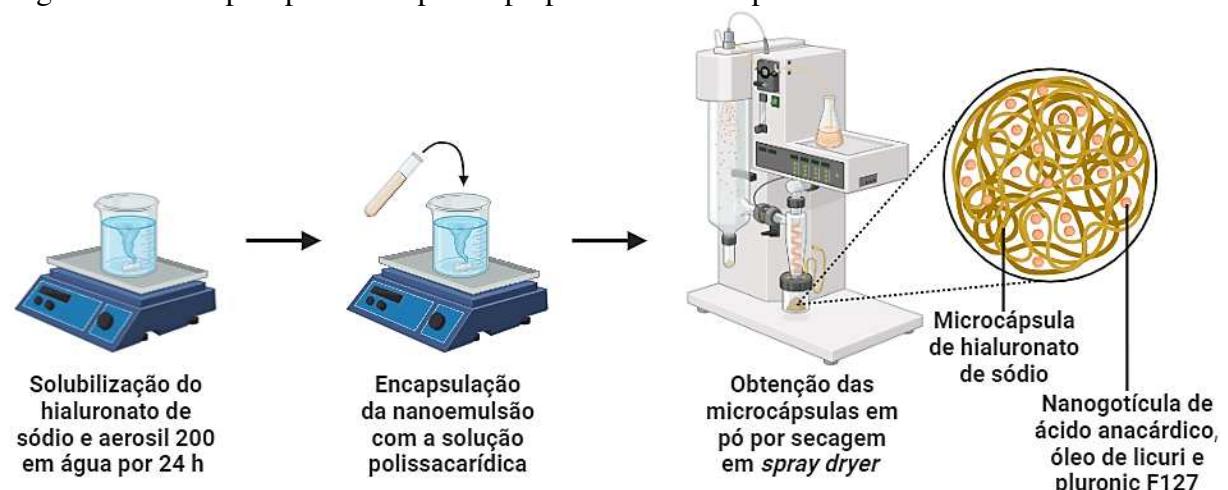
4.4 Preparo da microcápsula

Para o preparo da microcápsula, 2,00 g de hialuronato de sódio e 0,050 g do adjuvante de secagem Aerosil 200 foram previamente solubilizados em 600 mL de água destilada, sob agitação magnética constante a 520 rpm e temperatura à 45 °C, durante 24 h. A microcápsula em pó foi obtida após a adição da nanoemulsão na solução polissacarídica, seguido por secagem em *spray dryer*, modelo BUCHI Mini Spray Dryer B-290, com

temperatura de entrada e saída iguais à 170 °C e 142 °C, respectivamente, aspirador operando a 100% ($35 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$) e bomba operando a 15% ($4,5 \text{ mL min}^{-1}$). Durante a secagem, a dispersão aquosa das microcápsulas foi mantida em agitação magnética constante a 700 rpm, para auxiliar na homogeneização e evitar precipitação da formulação.

O procedimento experimental para a obtenção da microcápsula MCAA está representado na Figura 15.

Figura 15. Principais processos para o preparo da microcápsula MCAA



Fonte: elaborada pelo autor.

As massas utilizadas para a formulação das microcápsulas estão apresentadas na Tabela 2. Esses valores foram escolhidos para que a microcápsula apresentasse concentração suficiente de AA para se determinar a IC₅₀ em células tumorais, após resultados de testes preliminares de citotoxicidade. Além disso, a relação material de parede:núcleo (2:1) está dentro do intervalo usado em um estudo semelhante relatado na literatura (Gallardo *et al.*, 2013).

Tabela 2. Valores de composição mássica das microcápsulas

| Formulação | NEAA (g) | NEC (g) | Hialuronato de sódio (g) | Aerosil 200 (g) |
|------------|----------|---------|--------------------------|-----------------|
| MCAA | 7,9013 | - | 2,0000 | 0,0500 |
| MCC | - | 8,0000 | 2,0000 | 0,0500 |

MCAA: microcápsula com ácido anacárdico, MCC: microcápsula controle, NEAA: nanoemulsão com ácido anacárdico, NEC: nanoemulsão controle.

Fonte: elaborada pelo autor.

4.5 Análises de Tamanho de Partícula, Índice de Polidispersão e Potencial Zeta das formulações

As nanoemulsões e as redispersões das microcápsulas foram caracterizadas quanto ao tamanho de partícula (estimado pelo diâmetro médio hidrodinâmico) e índice de polidispersão (PDI) por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e quanto ao potencial zeta por Microeletroforese Doppler a Laser, utilizando equipamento Zetasizer Nano ZS90[®] (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). As nanoemulsões foram diluídas em água na proporção de 1/1000 (v/v). Para a solubilização do revestimento de hialuronato de sódio, as microcápsulas foram redispersas sob agitação magnética constante em água na concentração de 0,41 mg mL⁻¹, por 24 h, em temperatura ambiente. As medições foram realizadas em triplicata, a 25 °C e ângulo de 90°.

4.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

As morfologias das gotículas da nanoemulsão e da redispersão aquosa das microcápsulas foram observadas por meio de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM). A nanoemulsão NEAA foi diluída em água na proporção de 1/10 (v/v). Para a solubilização do revestimento de hialuronato de sódio, a microcápsula MCAA foi redispersa sob agitação magnética constante em água na concentração de 12,5 mg mL⁻¹, por 24 h, em temperatura ambiente. As amostras foram gotejadas em uma grade de cobre de malha 200. O excesso foi removido delicadamente com papel filtro. A coloração negativa com ácido fosfatúngstico foi realizada e as grades foram observadas em um TEM Zeiss EM 900, sob tensão de aceleração de 80 kV. O tamanho médio das gotículas da nanoemulsão e da redispersão aquosa das microcápsulas foi calculado medindo o diâmetro das partículas no software ImageJ (versão 1,54 g) (Sousa *et al.*, 2021).

4.7 Quantificação de ácido anacárdico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC - DAD)

4.7.1 Obtenção da curva padrão de ácido anacárdico

A curva padrão de calibração para a quantificação do ácido anacárdico foi obtida a partir de oito soluções ($n = 8$) do ácido anacárdico tri-insaturado (0,0078 – 1,0 mg mL⁻¹), sendo

todos os padrões dissolvidos em metanol. As soluções foram analisadas por cromatografia líquida e os espectros de absorção UV–Vis de cada um dos picos cromatográficos foram inseridos na biblioteca espectral do equipamento.

As análises cromatográficas de todas as amostras (padrões e formulações) foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência, modelo Agilent 1260 Infinity (Alemanha), equipado com coluna de fase reversa C-18 (Latek *hypersil ODS-2*, 5 µm, 4,0 × 250 mm, Alemanha) e detector de arranjo de diodos, modelo Agilent 1260 Infinity G1315D, 1260 DAD VL (Alemanha). A fase móvel seguiu eluição isocrática de uma mistura contendo 800 mL de acetonitrila, 100 mL de água deionizada e 10 mL de ácido acético. O tempo de corrida cromatográfica foi de 35 min, realizada a 25 °C, sendo a taxa de vazão de solvente de 1 mL min⁻¹ e 5 min de postrun. O cromatógrafo foi programado para detecção dos compostos de interesse em três diferentes comprimentos de onda (254, 278 e 310 nm). Os ácidos anacárdicos foram quantificados em 254 nm, sendo esta escolha baseada na análise dos espectros de absorção UV–Vis e dos valores dos coeficientes de determinação (R^2), obtidos nas curvas de calibração. As condições do método de quantificação estão de acordo com Freitas *et al.* (2022), com modificações.

4.7.2 Validação de método

O método de HPLC foi validado de acordo com o guia de validação de métodos analíticos do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) para linearidade, precisão (repetibilidade), recuperação, limite de quantificação (LOQ), limite de detecção (LOD) e seletividade. O estudo de linearidade foi realizado nas concentrações de 7,8, 15,6, 31,25, 62,5, 125, 250, 500 e 1000 µg mL⁻¹. A precisão foi avaliada quanto à repetibilidade, com n = 6. Os parâmetros LOD e LOQ foram determinados através das curvas de calibração dos padrões, obtendo a partir dessas os valores de desvio-padrão do intercepto (S_a) e o coeficiente angular da curva analítica (b). O LOD foi calculado seguindo a Equação 1 (INMETRO, 2020).

$$\text{LOD} = \frac{3S_a}{b} \quad (1)$$

A Equação matemática para determinação do LOQ é apresentada a seguir (Equação 2).

$$\text{LOQ} = \frac{10S_a}{b} \quad (2)$$

4.7.3 Eficiência de Encapsulação e Capacidade de Carreamento das formulações

Para avaliação das amostras (AA livre, nanoemulsões e microcápsulas), foram preparadas soluções metanólicas que foram homogeneizadas inicialmente em agitador tipo vórtex por 1 min, seguido de dissolução em banho ultrassônico, modelo Bandelin Sonorex – RK100 (Alemanha), por 5 min. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas em uma centrífuga modelo Eppendorf – 5415R (Alemanha), por 5 min, 13000 rpm, temperatura de 25 °C, e inseridas em *vials* para análises cromatográficas, realizadas em triplicata (Lertsuthiwong *et al.*, 2008).

Para determinar a eficiência de encapsulação da nanoemulsão, 0,5 g de NEAA foi centrifugado em uma membrana Vivaspin Turbo 15, 3000 MWCO (Sartorius), a 4000 x g e temperatura de 27 °C, em uma centrífuga Allegra 25R (Sartorius, 2016). A concentração de ácido anacárdico foi determinada no filtrado em triplicata, seguindo o método indireto (Rebouças *et al.*, 2022).

Os cálculos da Eficiência de Encapsulação (EE%) e da Capacidade de Carreamento (LC%) para NEAA e MCAA seguiram as fórmulas apresentadas nas Equações 3 e 4 (Cui *et al.*, 2022).

$$\text{EE\%} = \frac{M}{M_0} \times 100 \quad (3)$$

$$\text{LC\%} = \frac{M}{W} \times 100 \quad (4)$$

Onde, M = quantidade de ácido anacárdico encapsulado, M₀ = quantidade de ácido anacárdico adicionado no preparo da formulação e W = quantidade total da formulação (em massa para microcápsulas ou em volume para nanoemulsão).

4.8 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR dos componentes da formulação foram obtidos em um espetrômetro, modelo Shimadzu IRTtracer-100. Para o ácido anacárdico e óleo de licuri, a

leitura da transmitância foi realizada em cristal de ATR. Para os demais componentes, 5 mg da amostra foram misturados e prensados com brometo de potássio, grau espectroscópico.

4.9 Análise Termogravimétrica (TGA)

Os termogramas dos componentes da formulação foram obtidos em parceria com o Departamento de Física da UFC, em equipamento de análise termogravimétrica/térmica diferencial, modelo Shimadzu DTG – 60H, com atmosfera inerte de nitrogênio e fluxo igual a 70 mL min^{-1} . As medidas termogravimétricas foram efetuadas no intervalo de temperatura de 20°C até 800°C , taxa de aquecimento constante de $10^\circ\text{C min}^{-1}$, utilizando um cadinho de alumina como porta amostra.

4.10 Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)

A morfologia das microcápsulas em pó foi observada com auxílio de microscópio eletrônico de varredura, modelo Quanta 400 FEG a 5-6 kV (FEI, Hillsboro, OR, América), após fixagem das amostras em *stubs* metálicos e pulverização com prata. O tamanho médio das microcápsulas foi calculado medindo o diâmetro de 100 partículas no *software* ImageJ (versão 1.54g) (Wetteland; Nguyen; Liu, 2016). As análises de EDS foram realizadas utilizando SEM de alta resolução (FEG, *field emission gun*) modelo Crossbeam 350, com detector de Espectroscopia de Raios X por Dispersão de Energia (EDS), com tecnologia SDD (*silicon drift detector*) acoplado a um Detector de Elétrons Retroespalhados, com tensão de tração de 15 kV, corrente de feixe padrão, ponto de feixe de 1 μm , vida útil de 128 s, 50.000 contagens por segundo (cps) e energia máxima de 20 keV.

4.11 Cinética de liberação *in vitro*

Os experimentos de cinética de liberação *in vitro* de AA a partir das microcápsulas foram realizados em células de difusão do tipo Franz, com área de difusão de $1,77 \text{ cm}^2$ e compartimento receptor com capacidade de 12 mL, utilizando membrana de diálise (MCWO 12-14 kDa, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). Etanol/tampão PBS (com valores de pH iguais a 7,4, 6,8 e 4,5), na proporção de 30/70 (v/v), foi utilizado como meio para preencher o compartimento receptor.

Uma suspensão de 0,02 g de microcápsula (contendo 3,49 mg de AA) em 1 mL de meio foi adicionada ao compartimento doador, após homogeneização em homogeneizador do tipo vórtex por 15 min. Amostras de 1 mL foram coletadas do compartimento receptor em intervalos de tempo pré-determinados para quantificar a liberação de AA através do método HPLC descrito na Seção 4.7.1. O mesmo volume de alíquotas coletadas foi substituído por meio fresco. Os experimentos foram realizados em triplicata para as microcápsulas e para AA livre, mantendo agitação magnética constante a 200 rpm e temperatura de $37,0 \pm 0,5$ °C.

Os dados de liberação *in vitro* do ativo foram linearizados de acordo com os modelos matemáticos de liberação de Ordem Zero, Primeira Ordem, Higuchi, Hixson-Crowell e Weibull. Para elucidar o mecanismo de liberação, o logaritmo da porcentagem cumulativa de AA liberado versus *log* do tempo foi plotado no modelo matemático de Korsmeyer-Peppas e o coeficiente difusional (*n*) foi obtido como inclinação da curva.

4.12 Avaliação do Potencial Citotóxico

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados no Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM), no Laboratório de Oncologia Experimental (LOE), vinculado à Faculdade de Medicina da UFC.

4.12.1 Cultura das células

As linhagens celulares HCT-116 (carcinoma de cólon humano), HL-60 (leucemia promielocítica) e L-929 (fibroblasto murino) foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA). As linhagens tumorais foram cultivadas em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 e a linhagem L-929 foi cultivada em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM). Os meios foram suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina-estreptomicina), sendo mantidos em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de dióxido de carbono (CO₂).

4.12.2 Ensaios MTT

As células foram plaqueadas nas concentrações de 7×10^4 , 30×10^4 , 7×10^4 céls mL⁻¹ para as linhagens HCT-116, HL-60 e L-929, respectivamente. As amostras de microcápsulas foram dispersadas em DMSO, na concentração estoque de 8,7 mg mL⁻¹ e

testadas na faixa de concentração de 0–43,5 µg mL⁻¹. As placas foram incubadas com os compostos por 72 h em estufa a 5% de CO₂, a 37 °C. Ao término deste período, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante removido. Em seguida, foram adicionados 100 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium) e as placas foram incubadas na estufa por 3 h. Então, as placas foram centrifugadas e a solução de MTT retirada. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado de formazan com 100 µL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa, modelo VICTOR® Nivo™ Multimode Microplate Reader, a 595 nm (Mossman, 1983).

Realizou-se teste do MTT utilizando diluição seriada dos compostos. As absorbâncias obtidas no teste foram utilizadas para calcular a IC₅₀ (concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular) das amostras através de regressão não-linear, usando o programa GraphPad Prism (versão 8.0). Cada amostra foi testada em triplicata em três experimentos independentes.

4.13 Avaliação de segurança não clínica em zebrafish (*Danio rerio*) adulto

Zebrafish (*Danio rerio*) adulto foi utilizado como modelo para avaliação da atividade locomotora (Teste de Campo Aberto) e toxicidade aguda em 96 h (Magalhães *et al.*, 2017). Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA - UECE), sob protocolo nº 04009489/2023, conforme OECD (1992) referenciado pela Diretiva EU 2010/63/EU para experimentos com animais. Os peixes foram obtidos da Agroquímica: Comércio de Produtos Veterinários LTDA (Ceará, Brasil), sendo selvagens, com idade entre 60 e 90 dias, tamanhos entre 3,5 ± 0,5 cm e faixa de peso de 0,4 ± 0,1 g. Grupos de 36 peixes foram aclimatados a 25 °C, em aquários de vidro (40 x 20 x 25 cm), com água desclorada (anticloro ProtecPlus®), pH 7,0, equipados com bombas de ar com filtros submersos, em ciclo circadiano de 14:10 h claro/escuro. Os peixes receberam ração (Spirulina®) *ad libitum* 24 horas antes dos experimentos.

Após os experimentos, os animais foram sacrificados por imersão em água gelada (2-4 °C), por 10 min, até a perda dos movimentos operculares (CONCEA, 2018).

4.13.1 Teste de Campo Aberto

Os animais (n = 6/grupo) foram tratados com a redispersão aquosa da MCAA, nas concentrações de 57,7 ou 28,9 ou 7,2 µg mL⁻¹ e redispersão aquosa da MCC na concentração

de 57,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$, ou veículo (água destilada estéril). Os tratamentos foram realizados por via oral, com 20 μL das amostras. Foi incluído um grupo de peixes sem tratamentos (*Naive*). Após o tratamento, os peixes foram deixados em repouso por 1 h, em seguida transferidos para placas de Petri de vidro (10 x 15 cm), contendo a água do aquário, marcadas com quatro quadrantes e a atividade locomotora foi analisada através da contagem do número de cruzamentos de linha (CL) de cada peixe durante 5 min.

4.13.2 Toxicidade Aguda em 96 horas

Os animais ($n = 6/\text{grupo}$) foram tratados com a redispersão aquosa da MCAA, nas concentrações de 57,7 ou 28,9 ou 7,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e redispersão aquosa da MCC na concentração equivalente a 57,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$, ou veículo (água destilada estéril). Os tratamentos foram realizados por via oral, com 20 μL das amostras. Os peixes foram então deixados em repouso e o número de peixes mortos em cada grupo foi registrado após 96 h de tratamento. O grupo veículo foi utilizado como controle. O método matemático Trimmed Spearman-Karber foi utilizado para calcular a concentração letal capaz de matar 50% dos animais (CL₅₀), possuindo intervalo de confiança de 95% (Arellano-Aguilar *et al.*, 2015).

4.14 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando GraphPad Prism (versão 8.0.1). Para comparação de vários grupos, foi aplicada análise de variância (ANOVA) unidirecional com Teste de Diferença Honestamente Significativa (HSD) de Tukey, considerando $p < 0,05$ como diferença estatisticamente significativa.

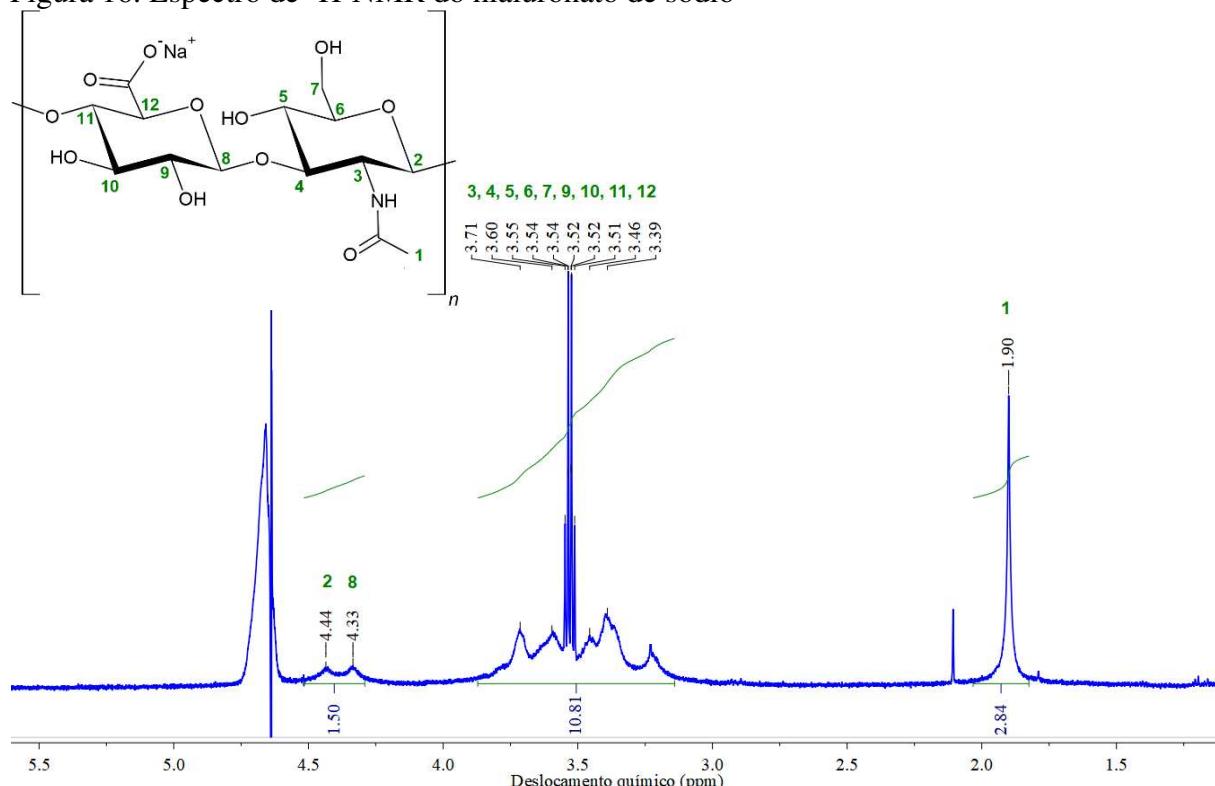
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do polissacarídeo hialuronato de sódio

5.1.1 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio ($^1\text{H-NMR}$)

O espectro de $^1\text{H-NMR}$ do polissacarídeo HS, apresentado na Figura 16, mostra um sinal em um deslocamento químico igual a 1,90 ppm, gerado pelos prótons metila (H1), presentes no grupo *N*-acetil (-NHCOCH₃). Os prótons ligados aos carbonos dos anéis de açúcares (H3, H4, H5, H6, H7, H9, H10, H11 e H12) foram detectados nos sinais do intervalo de deslocamento químico de 3,39–3,71 ppm e os prótons anoméricos H8 e H2, ligados aos carbonos adjacentes aos dois átomos de oxigênio, foram identificados em 4,33 e 4,44 ppm, respectivamente. A relação do número de prótons metila *N*-acetil/prótons anoméricos está próxima ao valor teórico 3/2, corroborando a estrutura do HS. O sinal em 4,66 ppm pertence à fração não deutera da solvente óxido de deutério. A Tabela 3 mostra deslocamentos químicos de espectro semelhante reportado na literatura (Ret *et al.*, 2019).

Figura 16. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ do hialuronato de sódio



Fonte: elaborada pelo autor.

Tabela 3. Deslocamentos químicos do hialuronato de sódio utilizado no preparo das microcápsulas

| ¹ H | Deslocamento químico (ppm) | Valor de referência (ppm) (Ret <i>et al.</i> , 2019) |
|---------------------------------|----------------------------|---|
| 1 | 1,90 | 1,96 |
| 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12 | 3,39-3,71 | 3,33-3,90 |
| 8 | 4,33 | 4,41 |
| 2 | 4,44 | 4,51 |

Fonte: elaborada pelo autor.

5.1.2 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) e Análise Elementar

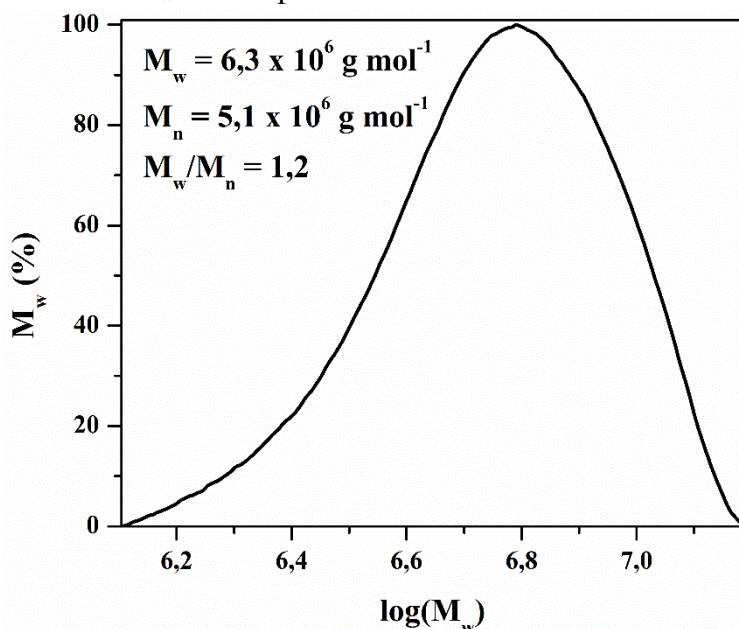
A massa molar (MM) do HS é uma propriedade que influencia diretamente a sua atividade biológica, o que torna sua determinação de fundamental importância (Bohaumilitzky *et al.*, 2017). Dentre os diferentes tipos de MM de polímeros, neste trabalho, foram determinados os valores de massa molar numérica média (M_n) e massa molar ponderal média (M_w), através da GPC.

Por definição, a M_n é igual a massa total da amostra do polissacarídeo dividida pelo número total de cadeias. Esse parâmetro torna-se importante para avaliar a influência em propriedades que dependem apenas do número de unidades repetidas e não da sua massa ou tamanho. Já para a M_w , a massa de cada cadeia contribui de maneira ponderada para o cálculo da média da MM do polissacarídeo. Ou seja, a M_w considera também o tamanho molecular, ao invés de apenas os números de cadeias do polímero (Shrivastava, 2018).

Outro parâmetro importante é a dispersão de MM, que é obtida através do quociente M_w/M_n e indica a homogeneidade da distribuição dos tamanhos das cadeias poliméricas. O polímero é classificado como monodisperso quando M_w é igual a M_n . Nesse caso, todas as cadeias poliméricas têm a mesma massa molar (comprimentos iguais). Quando o valor da dispersão é maior que 1, o polímero é classificado como polidisperso, apresentando maior variação nos valores de massas molares das cadeias (Hoyos-Leyva *et al.*, 2017).

O polissacarídeo utilizado neste trabalho é caracterizado por possuir alto valor de MM, ou seja, acima de 10^6 g mol^{-1} , como mostra os resultados para a análise de GPC na Figura 17. Apesar de não possuir dispersão de MM monodispersa, a distribuição pode ser classificada como estreita, uma vez que a diferença entre M_w e M_n é relativamente pequena.

Figura 17. Gráfico de distribuição da massa molar do hialuronato de sódio. M_n : massa molar numérica média, M_w : massa molar ponderal média e M_w/M_n : dispersão da massa molar



Fonte: elaborada pelo autor.

Possuindo alto valor de MM, o ácido hialurônico apresenta efeitos potenciais relatados na literatura como preenchimento, inibidor de angiogênese, anti-inflamatório (Jabbari; Babaeipour; Saharkhiz, 2023) e mucoadesivo (Serra *et al.*, 2023).

O ácido hialurônico com MM acima de 10^6 g mol^{-1} , conforme o seu derivado utilizado neste trabalho, possui maior afinidade com a glicoproteína de superfície celular CD44, possuindo uma ligação quase irreversível, enquanto a interação do ácido hialurônico de baixa massa molar é reversível (Arpicco *et al.*, 2013). A CD44 é superexpressa em muitos tipos de células cancerígenas, sendo uma marcadora de células-tronco cancerígenas (CSCs), por exemplo. Também está associada à regulação da metástase através do recrutamento de CD44 para a superfície celular, interagindo com ligantes da matriz extracelular (Thapa; Wilson, 2016).

Os resultados da Análise Elementar da amostra, apresentados na Tabela 4, estão próximos da fórmula $C_{14}H_{22}NNaO_{11}$ ($403,31 \text{ g mol}^{-1}$), referente ao monômero do HS. O valor do percentual de enxofre abaixo do limite de detecção do equipamento indica a ausência de contaminantes que contenham esse elemento, como polissacáideos sulfatados. A porcentagem de carbono abaixo do valor teórico pode ser proveniente de resíduos de glucosamina desacetilados ocasionalmente e o valor percentual de nitrogênio próximo ao teórico indica a ausência de proteínas residuais (Alcântara *et al.*, 2023; Dosio *et al.*, 2016).

Tabela 4. Resultados obtidos da composição percentual de elementos químicos na amostra de hialuronato de sódio através da Análise Elementar

| | Carbono (%) | Hidrogênio (%) | Nitrogênio (%) | Enxofre (%) |
|---|--------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|
| Amostra | 34,26 | 6,29 | 3,09 | <0,1 |
| Valor de referência (Alcântara <i>et al.</i> , 2023) | 33,11 | 5,48 | 3,78 | 1,99 |
| Valor teórico | 41,69 | 5,51 | 3,47 | - |

Fonte: elaborada pelo autor.

5.2 Caracterização do ácido anacárdico

5.2.1 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

O espectro de $^1\text{H-NMR}$ do AA, apresentado no Apêndice A, mostra um sinal entre 0,85-0,90 ppm, gerado a partir da ressonância dos hidrogênios metila ($\text{H}20'$). Os sinais em 1,23-1,38 ppm são atribuídos aos hidrogênios metilênicos da cadeia alquílica ($\text{H}8$, $\text{H}9$, $\text{H}10$, $\text{H}11$, $\text{H}16'$, $\text{H}17'$, $\text{H}18''$ e $\text{H}19'$). O hidrogênio $\text{H}7$ é identificado a partir dos sinais em 1,56-1,59 ppm. Os sinais em 1,98-2,05 ppm são gerados pelos hidrogênios $\text{H}12$, $\text{H}15'$ e $\text{H}18'$. Os sinais no intervalo de 2,74-2,81 ppm são atribuídos aos hidrogênios $\text{H}15$ e $\text{H}18$. O hidrogênio $\text{H}6$ é identificado pelo sinal centrado em 2,95 ppm. Os sinais em 4,95-5,04 ppm pertencem ao último hidrogênio ligado ao carbono da cadeia alquílica do ácido anacárdico trieno ($\text{H}20$). Os sinais nos deslocamentos químicos entre 5,29-5,43 ppm indicam a presença dos hidrogênios $\text{H}1$, $\text{H}13$, $\text{H}14$, $\text{H}16$ e $\text{H}17$. O hidrogênio vinílico $\text{H}19$ do ácido anacárdico trieno é indicado pelos sinais em 5,76-5,83 ppm. Os sinais centrados em 6,75 ppm e 6,85 ppm e o triploto em 7,34 ppm são atribuídos aos hidrogênios do anel aromático, sendo eles, respectivamente, para, orto e meta em relação à hidroxila ($\text{H}3$, $\text{H}5$ e $\text{H}4$) (Oliveira *et al.*, 2023). A Tabela 5 mostra deslocamentos químicos de espectro semelhante reportado na literatura (Bezerra *et al.*, 2022).

Tabela 5. Deslocamentos químicos do ácido anacárdico utilizado no preparo das microcápsulas

continua

| ^1H | Deslocamento químico (ppm) | Valor de referência (ppm) (Bezerra <i>et al.</i>, 2022) |
|--------------------------------------|-----------------------------------|--|
| 20' | 0,87 | 0,90 |
| 8, 9, 10, 11, 16', 17', 18'', 19' | 1,30 | 1,33 |
| 7 | 1,57 | 1,61 |

Tabela 5. Deslocamentos químicos do ácido anacárdico utilizado no preparo das microcápsulas

| ¹ H | Deslocamento químico (ppm) | Valor de referência (ppm) (Bezerra <i>et al.</i> , 2022) | conclusão |
|-------------------|-------------------------------|---|-----------|
| | | | |
| 12, 15', 18' | 2,00 | 2,04 | |
| 15, 18 | 2,78 | 2,80 | |
| 6 | 2,95 | 2,98 | |
| 20 | 4,99 | 4,98 | |
| 1, 13, 14, 16, 17 | 5,36 | 5,35 | |
| 19 | 5,79 | 5,81 | |
| 3 | 6,75 | 6,78 | |
| 5 | 6,85 | 6,87 | |
| 4 | 7,34 | 7,36 | |
| 2 | 11,00 | 10,71 | |

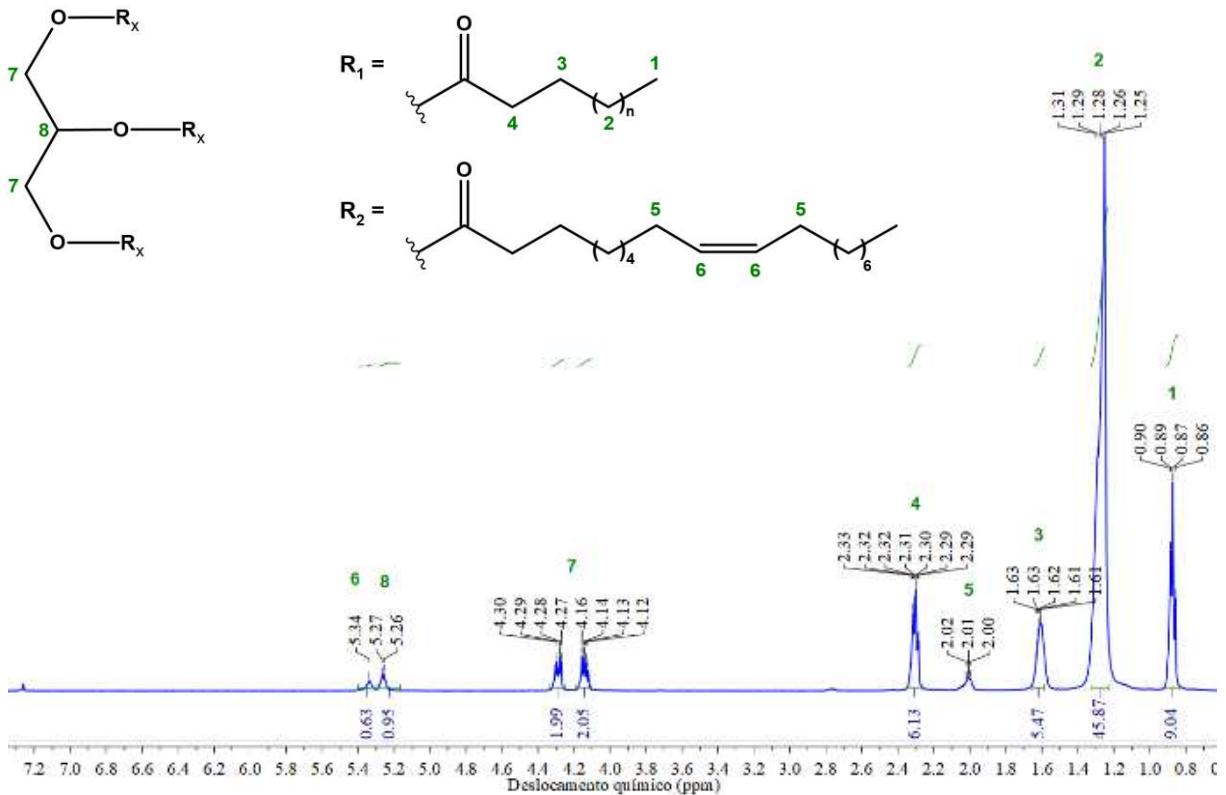
Fonte: elaborado pelo autor.

5.3 Caracterização do óleo de licuri

5.3.1 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

O resultado para a análise de ¹H-NMR do óleo de licuri está apresentado na Figura 18. Os sinais nos deslocamentos químicos iguais a 0,86-0,90 ppm e 1,25-1,31 ppm são gerados pelos prótons metila (H1) e pelos prótons metilênicos (H2), ligados à cadeia alquilíca do grupo acila. Os sinais em 1,61-1,63 ppm e 2,29-2,33 ppm são atribuídos aos prótons metilênicos do grupo acila, ligados ao carbono β (H3) e ao carbono α (H4), respectivamente. Os prótons alílicos da cadeia alquilíca (H5) geram os sinais em 2,00-2,02 ppm. Os sinais em 4,12-4,30 ppm são relativos aos prótons do grupo metíleno da unidade de glicerol esterificado do triglicerídeo (H7). Os sinais em 5,26-5,27 ppm são provenientes do próton presente na estrutura esterificada do glicerol (H8) e o próton vinílico (H6) é identificado pelo sinal em 5,34 ppm. A Tabela 6 mostra deslocamentos químicos de espectro semelhante reportado na literatura (Popescu *et al.*, 2015).

Figura 18. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ do óleo de licuri



Fonte: elaborada pelo autor.

Tabela 6. Deslocamentos químicos do óleo de licuri utilizado no preparo das microcápsulas

| ^1H | Deslocamento químico (ppm) | Valor de referência (ppm) (Popescu <i>et al.</i> , 2015) |
|--------------|----------------------------|---|
| 1 | 0,87 | 0,87 |
| 2 | 1,27 | 1,30 |
| 3 | 1,62 | 1,62 |
| 5 | 2,01 | 2,03 |
| 4 | 2,30 | 2,32 |
| 7 | 4,22 | 4,22 |
| 8 | 5,26 | 5,26 |
| 6 | 5,34 | 5,37 |

Fonte: elaborada pelo autor.

5.3.2 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS)

A GC-MS foi realizada para determinar a composição percentual de ácidos graxos no óleo de licuri, o resultado está apresentado na Tabela 7. Os valores obtidos estão próximos dos valores determinados no trabalho de Cavalcanti *et al.* (2022). Com isso, foi possível determinar que o óleo é composto por triglicerídeos formados por seis tipos diferentes de ácidos graxos, sendo cinco deles saturados, com composição majoritária do ácido láurico, seguido pelo

ácido oleico, único insaturado, possuindo apenas uma ligação dupla em sua cadeia alquílica. A relativa baixa porcentagem de ácidos graxos insaturados favorece a estabilidade oxidativa em comparação com outros óleos (Salles *et al.*, 2010).

Tabela 7. Composição percentual de ácidos graxos no óleo de licuri

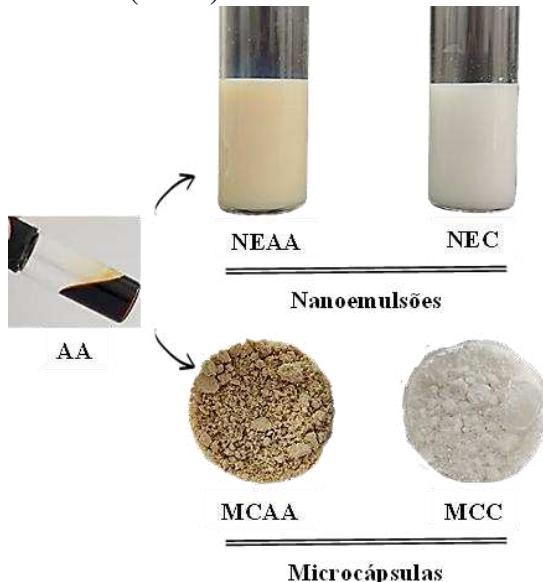
| Ácido graxo | Tempo de retenção (min) | Área (%) | Valor de Referência (Cavalcanti <i>et al.</i>, 2022) |
|---|--------------------------------|-----------------|---|
| Ácido decanoico (ácido cáprico) C10:0 | 4,441 | 7,87 | 6,27 |
| Ácido dodecanoico (ácido láurico) C12:0 | 6,446 | 42,13 | 41,97 |
| Ácido tetradecanoico (ácido mirístico) C14:0 | 8,578 | 16,14 | 14,35 |
| Ácido hexadecanoico (ácido palmítico) C16:0 | 10,624 | 9,18 | 7,46 |
| Ácido 9-octadecenoico (ácido oleico) C18:1 | 12,328 | 19,52 | 12,47 |
| Ácido octadecanoico (ácido esteárico) C18:0 | 12,526 | 5,15 | 4,22 |

Fonte: elaborada pelo autor.

5.4 Obtenção das formulações

As fotografias das formulações preparadas estão apresentadas na Figura 19. As microcápsulas preparadas apresentaram-se em forma de pó com alguns aglomerados. A MCC possui coloração branca, já a MCAA possui coloração bege devido a presença do ácido anacárdico, o mesmo vale para as nanoemulsões controle (NEC) e carregada com ativo (NEAA).

Figura 19. Esquema apresentando as fotografias da nanoemulsão com ácido anacárdico (NEAA), nanoemulsão controle (NEC), microcápsula com ácido anacárdico (MCAA) e microcápsula controle (MCC)



Fonte: elaborada pelo autor.

Os rendimentos dos processos de secagens da MCAA e da MCC foram 32,4% e 32,9%, respectivamente. Josino *et al.* (2021) obtiveram rendimento de 37% na secagem de micropartículas de fluoxetina encapsulada com galactomanana, utilizando o mesmo *spray dryer*, com temperatura de entrada e saída iguais à 120 °C e 90 °C, respectivamente, aspirador operando a 35 m³ h⁻¹ e bomba operando a 10 mL min⁻¹. A adsorção do pó nos componentes de vidro do equipamento é o principal fator para explicar os valores do rendimento.

5.5 Análises de Tamanho de Partícula, Índice de Polidispersão e Potencial Zeta das formulações

O tamanho de partícula, o índice de polidispersão e o potencial zeta são importantes parâmetros para a caracterização e a análise da estabilidade de sistemas nanoestruturados. O uso do método de DLS para o dimensionamento de dispersões é estabelecido na literatura como uma técnica precisa e segura, em que é possível estimar o tamanho de nanogotículas através da variação na dispersão da luz proveniente do movimento browniano das partículas. A medida é relacionada ao tamanho dado que partículas menores movimentam-se de forma mais veloz do que aquelas com maiores dimensões (Ahire; Gorle, 2021).

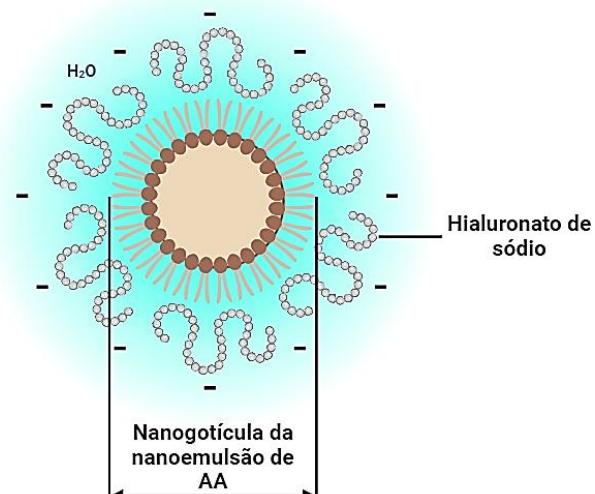
O tamanho de partícula para as nanoemulsões e para as redispersões das microcápsulas em água, apresentado na Tabela 8, confirma a escala nanométrica para as formulações desenvolvidas.

Quanto ao PDI, esta é uma medida utilizada para averiguar a distribuição dos tamanhos, sendo denominada de monodispersa quando a distribuição possui valores de PDI entre 0-0,1, moderadamente dispersa quando possui valores entre 0,1-0,4 e polidispersa quando seu valor é acima de 0,4 (Sharma *et al.*, 2018). Esse parâmetro pode ser utilizado como indicador de estabilidade tendo em vista que altos valores de PDI, geralmente acima de 0,4, favorecem mecanismos de desestabilização por amadurecimento de Ostwald, em que gotículas maiores englobam as menores até posterior separação de fases (Moradi; Anarjan, 2018).

O resultado do PDI das formulações indica que as distribuições de tamanhos dos sistemas são moderadamente dispersas. Assim, desfavorecendo mecanismos de desestabilização por amadurecimento de Ostwald, exceto no caso da redispersão da microcápsula controle.

A diferença nos valores de tamanho e PDI entre as nanoemulsões e as redispersões pode ser atribuída a um maior invólucro hidrodinâmico da redispersão da MCAA, causado por cadeias poliméricas hidratadas. Porém, esses resultados ainda sugerem que a redispersão pode ser corretamente considerada como uma nanoemulsão revestida com HS, como mostra a Figura 20, uma vez que os valores de tamanho estão no intervalo característico desses sistemas (20 a 500 nm) (Sharma *et al.*, 2010), indicando que microencapsulação polissacarídica da NEAA e NEC foi bem-sucedida (Li *et al.*, 2011).

Figura 20. Representação da redispersão aquosa da MCAA



Fonte: elaborada pelo autor.

O potencial zeta é uma medida do potencial elétrico de interface entre um líquido preso a uma superfície e a fase contínua que compõe uma dispersão. Sua determinação é baseada em um método rápido e amplamente utilizado, realizado através da observação da migração das partículas do coloide para os eletrodos, após aplicação de um campo elétrico no sistema, em que as interações elétricas são provenientes de espécies carregadas eletricamente (Ahire; Gorle, 2021).

Essa análise também pode ser utilizada como indicadora de estabilidade, visto que altos valores, em módulo, de potencial zeta revela a ocorrência mais intensa de repulsões eletrostáticas, dificultando a agregação das partículas da dispersão coloidal. De acordo com a literatura, dispersões com valores de potencial zeta, em módulo, entre 0-10 mV são classificadas como muito instáveis, entre 10-20 mV são relativamente estáveis, entre 20-30 mV são moderadamente estáveis e acima de 30 mV são altamente estáveis (Cano-Sarmiento *et al.*, 2018).

O resultado para a medida do potencial zeta para as formulações mostra um aumento no parâmetro de estabilidade coloidal (gerado pelas repulsões eletrostáticas) das redispersões das microcápsulas em relação às nanoemulsões. Isto pode ser explicado pela existência de grupos funcionais eletricamente carregados do hialuronato de sódio (COO^-) na superfície das partículas (Serra *et al.*, 2023).

Tabela 8. Medidas de tamanho de partícula, PDI e potencial zeta das formulações

| Formulação | Tamanho de partícula (nm) | PDI | Potencial zeta (mV) |
|---------------------|----------------------------|------------------------------|----------------------------|
| NEAA | $196,8 \pm 2,7^{\text{a}}$ | $0,137 \pm 0,016^{\text{a}}$ | $-29,7 \pm 1,6^{\text{a}}$ |
| NEC | $134,0 \pm 1,5^{\text{b}}$ | $0,168 \pm 0,011^{\text{a}}$ | $-20,0 \pm 1,2^{\text{b}}$ |
| Redispersão da MCAA | $292,1 \pm 1,2^{\text{c}}$ | $0,312 \pm 0,004^{\text{b}}$ | $-52,2 \pm 1,2^{\text{c}}$ |
| Redispersão da MCC | $207,5 \pm 3,6^{\text{d}}$ | $0,568 \pm 0,016^{\text{c}}$ | $-36,9 \pm 1,8^{\text{d}}$ |

MCAA: microcápsula com ácido anacárdico, MCC: microcápsula controle, NEAA: nanoemulsão com ácido anacárdico, NEC: nanoemulsão controle. Os dados representam média \pm desvio padrão. Diferentes letras sobreescritas na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras ($p < 0,05$).

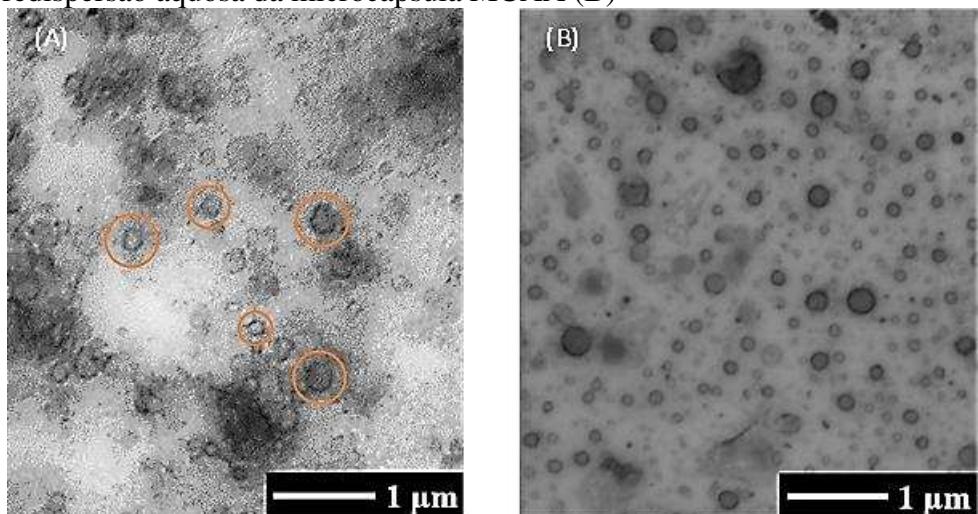
Fonte: elaborada pelo autor.

5.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

A micrografia da nanoemulsão NEAA (Figura 21A) mostrou gotas aproximadamente esféricas com diâmetros de $177,3 \pm 36,5$ nm. A morfologia das gotículas da

redispersão aquosa da MCAA (Figura 21B) é esférica, com tamanho de $178,8 \pm 60,7$ nm. Novamente, estes resultados confirmam o encapsulamento da nanoemulsão. Os maiores valores de tamanho de partícula observados para as formulações analisadas por DLS podem ser atribuídos a um maior invólucro hidrodinâmico, especialmente MCAA, causado por cadeias poliméricas hidratadas.

Figura 21. Micrografias obtidas por TEM da nanoemulsão NEAA (A) e da redispersão aquosa da microcápsula MCAA (B)



Fonte: elaborada pelo autor.

Pradana e Ritthidej (2023) preparam microcápsulas pela técnica de *spray dryer*, utilizando uma nanoemulsão de ácido asiático (triterpenoide natural encontrado na *Centella asiatica*) e óleo de palma e maltodextrina como componente de material de invólucro. A redispersão da micropartícula também mostrou gotículas de tamanho nanométrico semelhantes à nanoemulsão pura.

Nos tumores, a vasculatura (vasos sanguíneos) tende a ser anormal, com poros irregulares e dilatados entre as células endoteliais. Esses poros são tipicamente maiores que os dos vasos sanguíneos normais, com tamanho de corte ≥ 200 nm (Khawar; Kim; Kuh, 2015), o que torna a formulação desenvolvida promissora para o tratamento, permitindo o acúmulo de nanogotículas no microambiente tumoral.

5.7 Quantificação de ácido anacárdico por HPLC-DAD

5.7.1 Validação de método

Os resultados da determinação das figuras de mérito para a quantificação do AA por HPLC, apresentados na Tabela 9, mostram valores aceitáveis para as concentrações testadas, conforme o guia de validação de método do INMETRO (INMETRO, 2020).

Tabela 9. Figuras de mérito obtidas para a quantificação de ácido anacárdico

| | |
|--|------------------------|
| LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | 7,68 |
| LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | 25,6 |
| R^2 (linearidade) | 0,9999 |
| Repetibilidade (RSD%) n=6 | 2,18 |
| Recuperação (%) n=3 (454 $\mu\text{g mL}^{-1}$) | 90% |
| Equação linear | $y = 4,8444x + 5,9194$ |

LOD: limite de detecção, LOQ: limite de quantificação, RSD: desvio padrão relativo.

Fonte: elaborada pelo autor.

Os cromatogramas obtidos para as análises cromatográficas do AA utilizado no preparo e das formulações estão apresentados no Apêndice B. Os tempos de retenção obtidos para o AA1, AA2 e AA3 do AA puro foram 6,117, 7,940 e 11,512 min, respectivamente, e da MCAA foram 6,121, 7,938 e 11,491 min, respectivamente. A análise cromatográfica para a formulação controle (MCC) não apresentou picos cromatográficos nesse intervalo de tempo de retenção. Ou seja, o método identifica somente AA nesse tempo de retenção.

5.7.2 Eficiência de Encapsulação e Capacidade de Carreamento das formulações

A quantificação por HPLC é comumente utilizada para determinação de concentração de ativos carreados em formulações. Nessa técnica, componentes de uma mistura são particionados através de sua interação física com uma coluna cromatográfica (fase estacionária) e um solvente (fase móvel), auxiliando na separação de interferentes (Tekkeli; Kiziltas, 2017). Desse modo, o percentual da eficiência de encapsulação e da capacidade de carreamento de AA nas formulações NEAA e MCAA, determinados por HPLC, estão listados na Tabela 10.

Tabela 10. Valores de eficiência de encapsulação e capacidade de carreamento das formulações

| Formulação | Eficiência de encapsulação (%) | Capacidade de carreamento (%) |
|-------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
| NEAA | >99,97 | 7,02 ± 0,03 |
| MCAA | 95,06 ± 1,22 | 17,44 ± 0,22 |

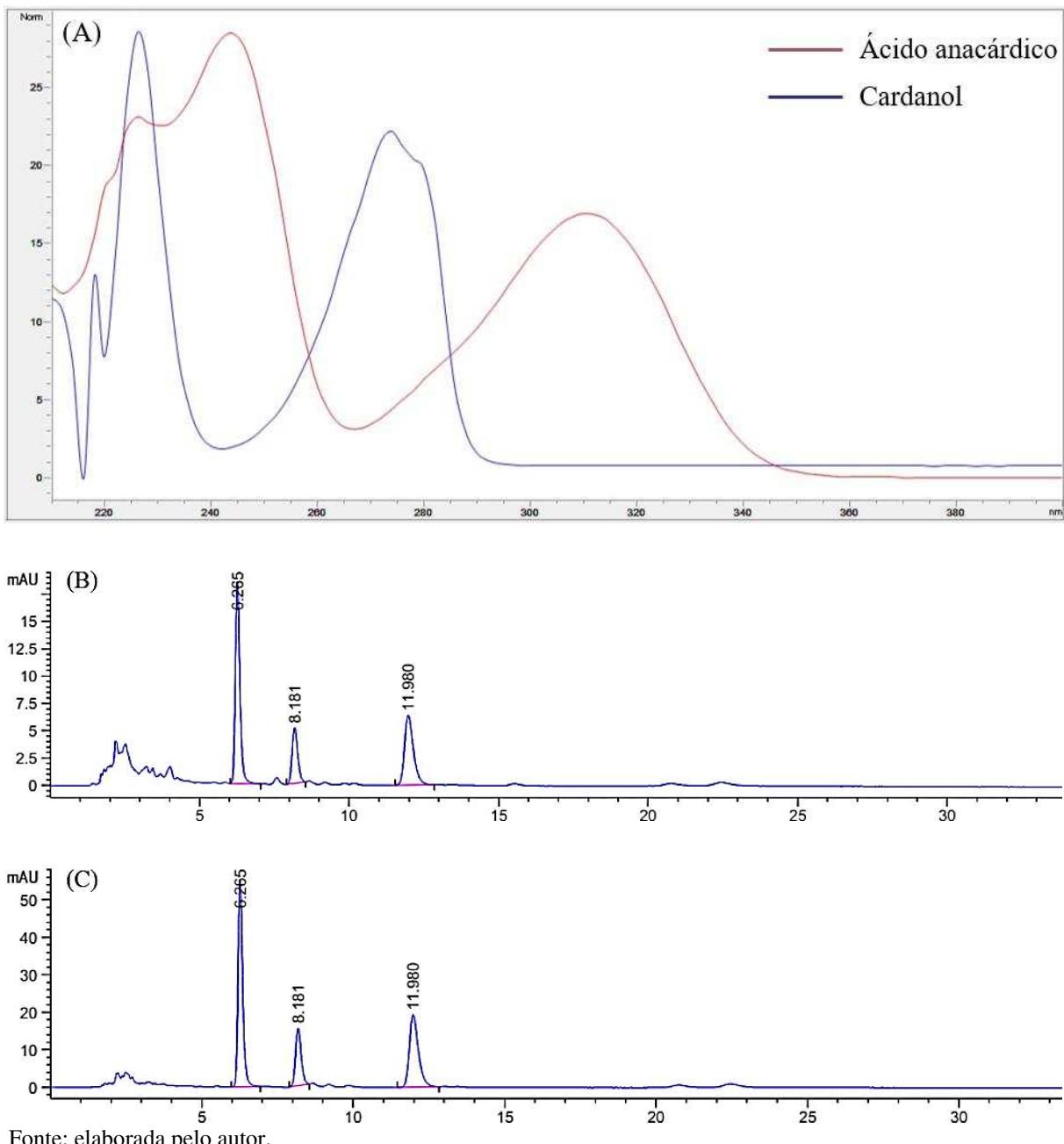
MCAA: microcápsula com ácido anacárdico, NEAA: nanoemulsão com ácido anacárdico.

Fonte: elaborada pelo autor.

O alto valor de EE% da formulação NEAA pode ser atribuído à hidrofobicidade do AA, oriunda da cadeia carbônica apolar, estando solúvel somente na fase dispersa da nanoemulsão, composta pelo óleo de licuri (Bloise *et al.*, 2023).

A microcápsula obteve EE% igual a 95,06 ± 1,22%, esse resultado está na faixa aceitável de acordo com o parâmetro de recuperação do guia de validação do INMETRO (90-107%) para a concentração testada. Esse percentual revela que houve poucas perdas no processo de encapsulação da nanoemulsão na microcápsula, indicando que não ocorreu reação significativa de descarboxilação de AA devido à temperatura do processo de secagem, comprovado, também, pela ausência de picos referentes ao cardanol no cromatograma obtido em 278 nm (Figura 22B). É reportado na literatura que os polissacarídeos proporcionam uma eficiência de encapsulação eficaz devido à sua grande estrutura química (Gonçalves; Estevinho; Rocha, 2022).

Figura 22. Espectro Uv-Vis do ácido anacárdico e cardanol (A) e cromatogramas da MCAA em 278 nm (B) e 310 nm (C)



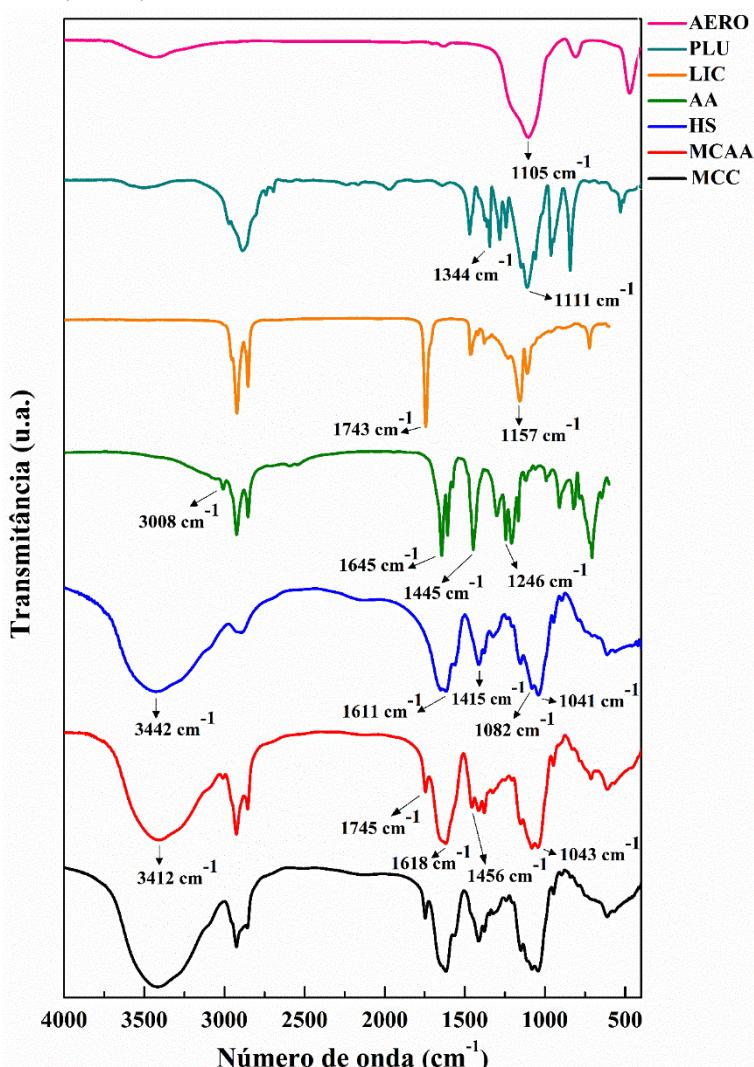
Fonte: elaborada pelo autor.

Rebouças *et al.* (2023) encontraram valores semelhantes à EE% da MCAA ao microencapsular com solução polissacarídica hesperidina e ácido betulínico e posteriormente realizar secagem por aspersão, sendo seus valores iguais à $98,15 \pm 0,34\%$ e $99,76 \pm 0,22\%$, respectivamente.

5.8 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A análise dos modos vibracionais oriundos de ligações químicas, através da FTIR, é um dos métodos mais rápidos e eficientes no auxílio da elucidação estrutural de substâncias, por meio da identificação de grupos funcionais (Bureau; Cozzolino; Clark, 2019). Neste estudo, a FTIR foi utilizada como ferramenta suplementar para se obter percepções qualitativas acerca da composição da formulação. Os espectros dos componentes puros e das microcápsulas estão apresentados na Figura 23.

Figura 23. Espectro de FTIR do Aerosil 200 (AERO), Pluronic F127 (PLU), óleo de licuri (LIC), ácido anacárdico (AA), hialuronato de sódio (HS), microcápsula com ácido anacárdico (MCAA) e microcápsula controle (MCC)



Fonte: elaborada pelo autor.

O espectro de absorção de infravermelho do Aerosil 200 apresenta uma banda em 1105 cm⁻¹, pertencente à vibração de estiramento simétrico da ligação Si-O (Fayed; Osman; Maghraby, 2016). O Pluronic F127 possui bandas em seu espectro nos números de onda iguais a 1344 cm⁻¹ e 1111 cm⁻¹, que são atribuídas às vibrações de deformação angular da ligação O-H e às vibrações de estiramento C-O-C, respectivamente (Yu *et al.*, 2017).

O óleo de licuri possui espectro similar ao de outros óleos de fontes vegetais reportados na literatura devido à composição por triglicerídeos, com bandas características em 1743 cm⁻¹ e 1157 cm⁻¹, geradas pela vibração de estiramento C=O e pela vibração de estiramento assimétrico C-O, respectivamente, pertencentes ao grupo éster (Magalhães *et al.*, 2020).

Analizando o espectro de FTIR do ácido anacárdico, nota-se uma banda em 3008 cm⁻¹, atribuída à vibração de estiramento da ligação C-H, presente no anel aromático. A vibração de estiramento assimétrico da ligação C=O do grupo carboxila é identificada pela banda em 1645 cm⁻¹. A banda em 1246 cm⁻¹ é gerada pela vibração de estiramento da ligação fenólica C–O (Oliveira *et al.*, 2023).

No espectro de FTIR do hialuronato de sódio, nota-se a presença de uma banda larga centrada no número de onda 3442 cm⁻¹, relativa a vibrações de estiramento da ligação O-H intra e intermolecular juntamente com o estiramento da ligação de hidrogênio N-H do grupo *N*-acetil. As bandas geradas pelas vibrações de estiramento assimétrico e simétrico do grupo COO⁻ aparecem em 1611 cm⁻¹ e 1415 cm⁻¹, respectivamente. Carboidratos apresentam uma região espectral característica no intervalo de 1200 a 950 cm⁻¹, assim, as bandas em 1151 cm⁻¹, 1082 cm⁻¹ e 1041 cm⁻¹ são atribuídas ao sistema hemiacetálico das unidades de sacarídeo (Alcântara *et al.*, 2023).

O espectro de FTIR da MCAA apresenta bandas características do hialuronato de sódio, semelhança esperada uma vez que este polissacarídeo é seu componente majoritário. A banda em 1745 cm⁻¹ pode estar relacionada com a presença do óleo de licuri. A banda em 1456 cm⁻¹ pode sugerir a presença de AA, dada a sua ausência no espectro da microcápsula controle e proximidade da banda 1445 cm⁻¹ do componente puro. Albano *et al.* (2019) produziram nanopartículas polímero-lipídicas de docetaxel e também observaram pequenas mudanças no número de onda das bandas de absorção dos compostos puros e quando combinados na formulação. Nesta pesquisa, o palmitato de cetila deslocou a banda de 2915 cm⁻¹ (puro) para 2919 cm⁻¹ (nanopartícula). Os autores sugeriram que o pequeno deslocamento indica uma mudança no ambiente local do palmitato de cetila dentro da nanopartícula.

A Tabela 11 apresenta as principais bandas dos materiais de preparo e das microcápsulas com suas respectivas atribuições e comparação com a literatura.

Tabela 11. Principais bandas do espectro de FTIR dos materiais de preparo e das formulações

| Amostra | Número de onda (cm ⁻¹) | Valor de referência (cm ⁻¹) | Atribuição | Referência |
|---------|------------------------------------|---|------------------------------------|--------------------------------|
| AERO | 3441 | 3448 | vSiO-H | Fayed <i>et al.</i> , 2016 |
| | 1105 | 1110 | v _s Si-O | Fayed <i>et al.</i> , 2016 |
| | 810 | 810 | v _{as} Si-O | Fayed <i>et al.</i> , 2016 |
| | 472 | 474 | δSi-O | Fayed <i>et al.</i> , 2016 |
| PLU | 2889 | 2889 | vC-H | Yu <i>et al.</i> , 2017 |
| | 1469 | 1469 | δ-CH ₂ - | Yu <i>et al.</i> , 2017 |
| | 1344 | 1344 | δO-H | Yu <i>et al.</i> , 2017 |
| | 1111 | 1111 | v _{as} C-O-C | Yu <i>et al.</i> , 2017 |
| LIC | 2922 | 2924 | v _{as} -CH ₂ - | Magalhães <i>et al.</i> , 2020 |
| | 2852 | 2849 | v _s -CH ₂ - | Magalhães <i>et al.</i> , 2020 |
| | 1743 | 1745 | vC=O | Magalhães <i>et al.</i> , 2020 |
| | 1157 | 1161 | v _{as} C-O | Magalhães <i>et al.</i> , 2020 |
| AA | 3008 | 3010 | vC-H (aromático) | Oliveira <i>et al.</i> , 2023 |
| | 2924 | 2927 | v _{as} -CH ₂ - | Oliveira <i>et al.</i> , 2023 |
| | 2852 | 2855 | v _s -CH ₂ - | Oliveira <i>et al.</i> , 2023 |
| | 1645 | 1647 | v _{as} C=O | Oliveira <i>et al.</i> , 2023 |
| | 1606 | 1608 | vC=C (aromático) | Oliveira <i>et al.</i> , 2023 |
| | 1445 | 1450 | vC=C (aromático) | Oliveira <i>et al.</i> , 2023 |
| | 1300 | 1302 | vC-O (ácido carboxílico) | Oliveira <i>et al.</i> , 2023 |
| | 1246 | 1246 | vC-O (fenólico) | Oliveira <i>et al.</i> , 2023 |
| AH | 3442 | 3445 | vOH + vNH | Alcântara <i>et al.</i> , 2023 |
| | 1558 | 1569 | δN-H (Banda amida II) | Alcântara <i>et al.</i> , 2023 |
| | 1415 | 1416 | v _s COO ⁻ | Alcântara <i>et al.</i> , 2023 |
| MCAA | 1151, 1082, 1041 | 1154, 1083, 1042 | vC-O-C, vC-OH | Alcântara <i>et al.</i> , 2023 |
| | 3412 | - | vO-H + vN-H | - |
| MCC | 2926 | - | v _{as} -CH ₂ - | - |
| | 2855 | - | v _s -CH ₂ - | - |
| | 1745 | - | vC=O | - |
| | 1618 | - | v _{as} COO ⁻ | - |
| | 1414 | - | v _s COO ⁻ | - |
| | 1151, 1080, 1043 | - | vC-O-C, vC-OH | - |

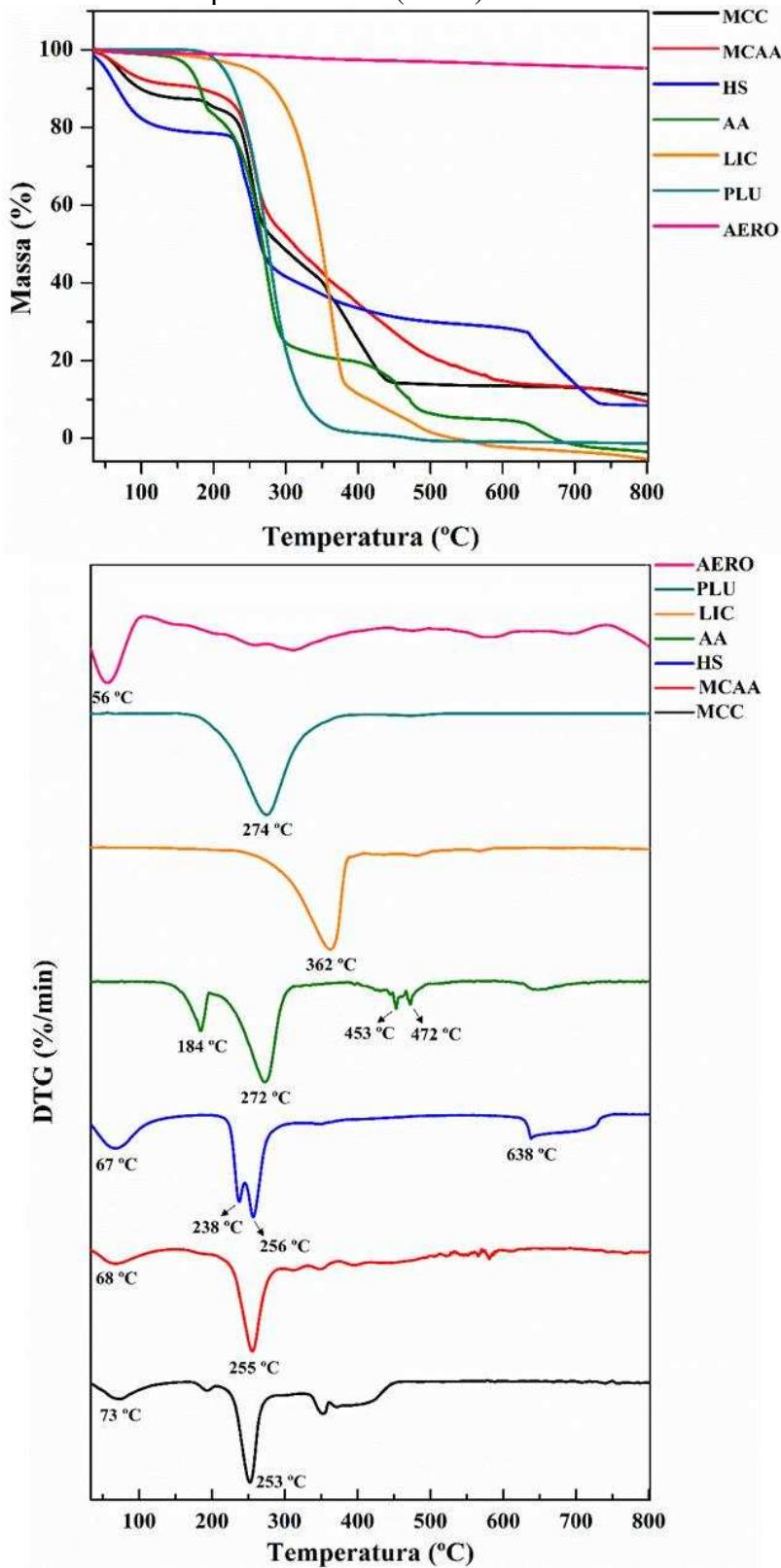
v: estiramento, δ: dobramento, s: simétrico, as: assimétrico, AERO: Aerosil 200, PLU: Pluronic F127, LIC: óleo de licuri, AA: ácido anacárdico, HS: hialuronato de sódio, MCAA: microcápsula com ácido anacárdico, MCC: microcápsula controle.

Fonte: elaborada pelo autor.

5.9 Análise Termogravimétrica (TGA)

A TGA e análise de termogravimetria derivada (DTG) são métodos que permitem mensurar mudanças na massa de uma amostra enquanto a temperatura aumenta, sendo útil na avaliação de eventos térmicos como decomposição e produção de compostos voláteis ou gasosos e no estudo de composição de revestimento de nanomateriais (Loganathan *et al.*, 2017). Logo, essas técnicas foram realizadas para avaliar a influência dos componentes na estabilidade térmica da formulação. Os resultados dos termogramas estão representados na Figura 24.

Figura 24. Termograma de TGA e análise por DTG do Aerosil 200 (AERO), Pluronic F127 (PLU), óleo de licuri (LIC), ácido anacárdico (AA), hialuronato de sódio (HS), microcápsula com ácido anacárdico (MCAA) e microcápsula controle (MCC)



Fonte: elaborada pelo autor.

O gráfico de TGA da sílica Aerosil 200 aparentemente não apresenta eventos de perda de massa durante todo o intervalo de temperatura analisado. Porém, ao observar a DTG, nota-se um pico abaixo de 108 °C, proveniente da evaporação de umidade adsorvida. Esse resultado é esperado dado a natureza hidrofílica e pirogênica desse material. Análises semelhantes são reportadas no trabalho de Battiston *et al.* (2023).

A curva resultante da análise térmica do Pluronic F127 possui um único evento térmico, no qual há a decomposição térmica total do tensoativo, com temperatura na taxa máxima de perda de massa ($T_{máx}$) em 274 °C (Hendricks; Watkins; Carter, 2011).

O termograma do óleo de licuri mostra que a degradação térmica ocorre em uma única etapa, com 100% de perda de massa em $T_{máx}$ igual a 362 °C. Esse comportamento também é observado na análise de óleos vegetais oriundos de outras fontes de coco (García-Silva *et al.*, 2024).

Para o ácido anacárdico, são observados três eventos térmicos. O primeiro ocorre no intervalo de temperatura de 161 °C-195 °C ($T_{máx}$ em 184 °C), e é atribuído ao processo de descarboxilação do ácido anacárdico, convertendo-se em cardanol. A massa perdida (0,55 mg) equivale à massa de dióxido de carbono produzido a partir de 4,29 mg de ácido anacárdico, presente no início da reação, ou $1,25 \times 10^{-5}$ mol (considerando o composto majoritário AA tri-insaturado). O segundo evento possui $T_{máx}$ igual a 272 °C e o terceiro evento de degradação acontece no intervalo de 412 °C-496 °C em duas etapas, como mostra a DTG ($T_{máx}$ iguais a 453 °C e 472 °C).

A curva de TGA do hialuronato de sódio apresenta três eventos de perda de massa. O primeiro acontece com $T_{máx}$ de 67 °C e é atribuído ao processo de evaporação de água, proveniente da umidade. O segundo evento, a fusão do HS, inicia em 228 °C. Pela análise da curva de DTG, nota-se que esse fenômeno ocorre em duas etapas, com maiores intensidades nas temperaturas de 238 °C e 256 °C, em que há, primeiramente, a quebra parcial da estrutura química, produzindo resíduos que se decompõem posteriormente. O terceiro evento é decorrente da degradação dos resíduos do polissacarídeo, tendo $T_{máx}$ igual a 638 °C. Etapas semelhantes de perda de massa são relatadas na literatura (Jiang *et al.*, 2015).

O termograma gerado para a MCAA possui picos de temperatura de eventos térmicos em 68 °C, que pode ser atribuído à evaporação de água proveniente de umidade adsorvida, e 255 °C, que pode estar relacionado à fusão do polissacarídeo de revestimento da microcápsula, dado a proximidade desse valor com o obtido pela curva de DTG do HS puro (256 °C). Vale ressaltar que o evento de degradação onde há a descarboxilação do AA não foi observado no termograma da MCAA, indicando que o ativo está disperso na matriz polimérica,

uma vez que na faixa de temperatura dessa reação ainda não há eventos térmicos de degradação relacionados ao polissacarídeo de revestimento, corroborando o fato de que não houve reação de descarboxilação detectável durante a secagem por *spray dryer* (temperatura de secagem igual a 170 °C), como verificado pelas análises em HPLC.

A Tabela 12 apresenta alguns parâmetros térmicos obtidos através da TGA e DTG para os materiais de preparo e para as formulações.

Tabela 12. Parâmetros obtidos através da TGA e DTG para os materiais de preparo e para as microcápsulas

| Amostra | T _i (°C) | T _{máx} (°C) | T _f (°C) | Perda de massa (%) | Massa residual (%) |
|---------|---------------------|-----------------------|---------------------|--------------------|--------------------|
| AERO | 25 | 56 | 108 | 0,8 | 95,2 |
| PLU | 231 | 274 | 320 | 100 | 0 |
| LIC | 304 | 362 | 392 | 100 | 0 |
| AA | 161 | 184 | 195 | 17,6 | |
| | 236 | 272 | 296 | 61,5 | |
| | 412 | 453, 472 | 496 | 15,7 | |
| AH | 35 | 67 | 106 | 21 | 8,4 |
| | 228 | 238, 256 | 286 | 45 | |
| | 603 | 638 | 727 | 25 | |
| MCAA | 39 | 68 | 106 | 9,3 | 9,3 |
| | 236 | 255 | 272 | 36 | |
| MCC | 43 | 73 | 105 | 12,2 | 11,2 |
| | 240 | 253 | 267 | 37,5 | |
| | 330 | 353 | 438 | 33,14 | |

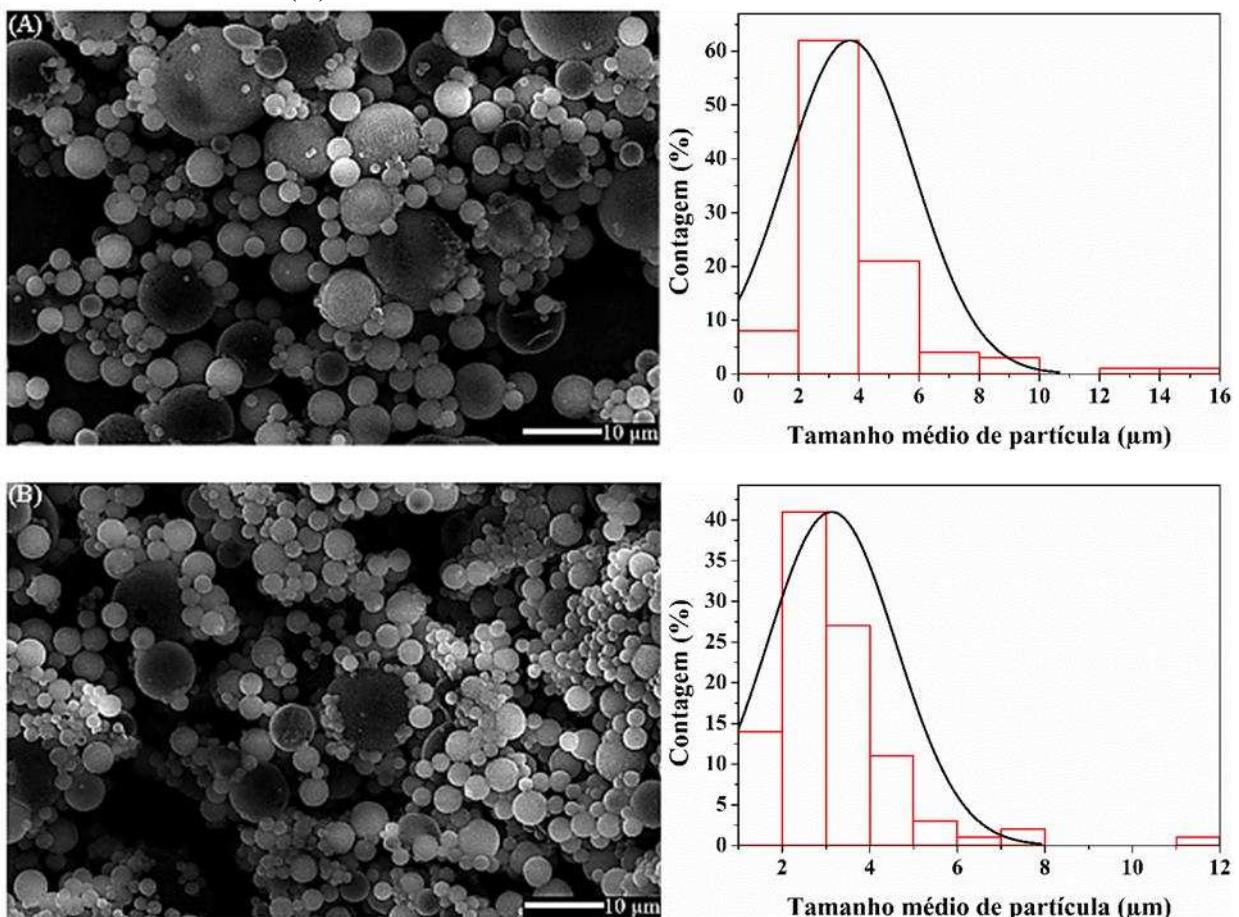
T_i: temperatura de início da perda de massa, T_{máx}: temperatura na taxa máxima de perda de massa, T_f: temperatura final da perda de massa, AERO: Aerosil 200, PLU: Pluronic F127, LIC: óleo de licuri, AA: ácido anacárdico, HS: hialuronato de sódio, MCAA: microcápsula com ácido anacárdico, MCC: microcápsula controle.

Fonte: elaborada pelo autor.

5.10 Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)

A SEM é uma técnica amplamente utilizada pela sua eficiência na análise de fenômenos de superfície de materiais microestruturados, com destaque para a caracterização da morfologia (forma e tamanho) e topografia (textura) (Sharma *et al.*, 2018). Dessa forma, foram obtidas as micrografias para caracterização das microcápsulas em pó, apresentadas na Figura 25. Pela análise das micrografias obtidas para as microcápsulas, nota-se que a MCAA e a MCC possuem, principalmente, estruturas esféricas sólidas com superfícies lisas, sem rugosidade, com distribuição uniforme de contraste e limites delimitados, podendo facilmente distinguir uma microcápsula de outra. Os diâmetros das partículas de MCAA e MCC são, respectivamente, $3,7 \pm 2,1 \mu\text{m}$ e $3,1 \pm 1,5 \mu\text{m}$.

Figura 25. Micrografias obtidas por SEM e distribuições de tamanhos da MCAA em 2000x (A) e da MCC em 2000x (B)

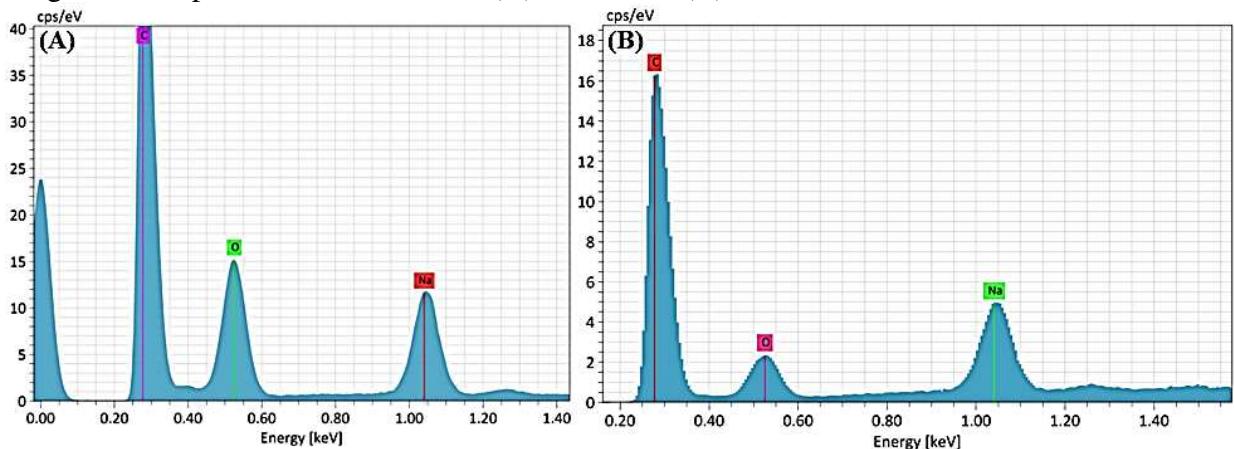


Fonte: elaborada pelo autor.

O processo de secagem por *spray dryer* pode estar diretamente relacionado com a morfologia do produto obtido. Em uma comparação entre as técnicas de secagem por liofilização e secagem por *spray dryer*, Mukhtar *et al.* (2021) observaram que nanopós de quitosana e ácido hialurônico secos por liofilização não eram perfeitamente esféricas e lisas, apresentando agregação entre as partículas, já as amostras secas por aspersão possuíram morfologia esférica e com limites delimitados entre as superfícies.

A análise EDS (Figura 26) das microcápsulas mostra a presença de C, O e Na como os elementos mais abundantes. O metal vem do processo de formação do invólucro da cápsula com HS. Todos os elementos encontrados na estrutura química do AA (C e O), presentes na microcápsula MCAA, também são encontrados nas estruturas químicas dos componentes da MCC (Jamshidnejad; Afshar; RazmjooKhollari, 2018).

Figura 26. Espectro EDS da MCAA (A) e da MCC (B)



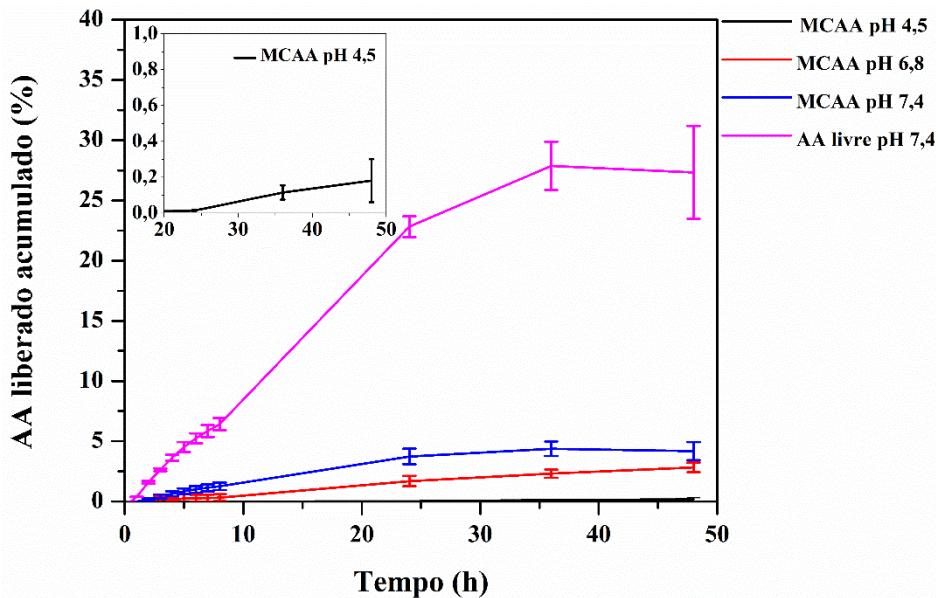
Fonte: elaborada pelo autor.

5.11 Cinética de liberação *in vitro*

Um dos desafios do tratamento antineoplásico é evitar que a concentração do princípio ativo atinja um valor acima da faixa terapêutica, dado os efeitos adversos causados pela superdosagem. Portanto, faz-se necessário o desenvolvimento de carreadores que ajustem as propriedades físico-químicas limitantes do ativo para aplicações *in vivo*, controlando sua liberação no organismo (Bayer, 2023). Além disso, a maioria dos carreadores de fármacos entra nas células por meio de endocitose, onde a membrana celular envolve o carreador para formar uma vesícula interna, conhecida como endossomo. No entanto, o ambiente dentro do endossomo e do lisossomo (com o qual o endossomo se funde) é ácido, este processo pode degradar tanto o fármaco como o carreador (Varkouhi *et al.*, 2011).

Assim, foi realizado um estudo de cinética de liberação *in vitro* para a formulação preparada em meios de liberação com valores de pH iguais a 7,4 (pH do sangue mimetizado), 6,8 (microambiente tumoral) e 4,5 (lisossomos). O perfil de liberação obtido para o AA livre e para o AA encapsulado na MCAA está apresentado na Figura 27.

Figura 27. Perfil de liberação cumulativa de AA livre e AA a partir da MCAA



Fonte: elaborada pelo autor.

Os resultados para as porcentagens de liberação cumulativa de AA (CDR) a partir da microcápsula estão na Tabela 13. A redução da porcentagem em pH 4,5 e seu aumento em pH 6,8 oferece um mecanismo de liberação responsivo ao pH, à medida que a substância é liberada no tecido circundante ou no espaço extracelular, protegendo o AA do ambiente lisossômico (Varkouhi *et al.*, 2011). A redução na liberação de AA deve estar relacionada à diminuição da carga líquida da cadeia polimérica (as cargas negativas dos grupos COO⁻ do HS são neutralizadas com a diminuição do pH, resultando em grupos COOH), o que levará a uma transição de uma conformação expandida para uma conformação retraída do polímero. Além disso, alterações na carga eletrostática podem influenciar a solubilidade do polímero em água. À medida que a carga líquida diminui, a hidrofilicidade das cadeias poliméricas também diminui (Bazban-Shotorbani *et al.*, 2017).

O encapsulamento polissacarídico da nanoemulsão com núcleo oleoso de AA também permitiu que a liberação ocorresse de forma controlada no pH mimetizado do sangue, quando comparado à substância livre, com aumento gradativo na disponibilidade do ativo no meio. Este perfil é desejável porque permite controlar a absorção e distribuição tecidual do ativo, reduzindo seus efeitos toxicológicos (Bayer, 2023).

A CDR para AA livre após 48 h foi igual a $27,33 \pm 3,85\%$ ($574,5 \pm 81,0 \mu\text{g}$). Alguns fatores podem ter contribuído para o platô de liberação da substância, como a realização do experimento em condição *non-sink*. Para atingir a condição *sink* do AA, a relação entre a massa da substância e o volume do compartimento receptor deve ser bastante baixa, devido à alta

hidrofobicidade do AA (Baby *et al.*, 2021). Uma consequência disso é que a quantificação do composto se torna muito difícil devido à sua baixa concentração no meio de liberação. Além disso, como a membrana de diálise atua como uma barreira de difusão, o AA pode ter se acumulado nesta barreira quando a taxa de liberação do compartimento doador para a membrana é maior do que a taxa de difusão da membrana para o compartimento receptor, comportamento também observado por Abouelmagd *et al.* (2015).

A liberação lenta de AA a partir de matrizes poliméricas já foi relatada anteriormente na literatura, Paiva Filho *et al.* (2019) obtiveram taxas de liberação de 6% para AA em nanopartículas *core-shell* de quitosana e alginato nas primeiras 48 h de experimento. A liberação controlada do ativo também permitiu que a formulação desenvolvida apresentasse atividade antifúngica contra cepas dermatófitos.

Os resultados obtidos da liberação do princípio ativo a partir da MCAA foram testados em modelos matemáticos de liberação e a avaliação do modelo que melhor se ajustou foi realizada comparando os valores do coeficiente de determinação (R^2) das curvas. Devido à liberação extremamente baixa em pH 4,5, não foi possível obter dados suficientes para modelagem cinética neste valor de pH. Os resultados de R^2 para liberação em pH 7,4 e 6,8 estão apresentados na Tabela 13 (curvas nos Apêndices C e D). Portanto, o modelo matemático de Higuchi foi o que melhor se adequou à liberação de AA, com R^2 igual a 0,9971 e 0,9970, em pH 7,4 e 6,8, respectivamente. Este modelo descreve a liberação de fármacos solúveis ou pouco solúveis a partir de um sistema de matriz polimérica, que pode ser semissólido ou sólido, considerando que o mecanismo de liberação é a difusão Fickiana (Higuchi, 1963).

Tabela 13. Parâmetros de liberação e coeficientes de determinação dos modelos matemáticos de liberação de fármacos testados

| Amostra (MCAA) | R^2 | | | | | | CDR (%) (em 48 h) | CMR (μg) (em 48 h) |
|-------------------|---------------|-------------------|---------|----------------------|--------------------|---------|----------------------|------------------------------------|
| | Ordem Zero | Primeira Ordem | Higuchi | Korsmeyer- Peppas | Hixson- Crowell | Weibull | | |
| pH 7,4 | 0,9780 | 0,9784 | 0,9971 | 0,9424 | 0,9783 | 0,8239 | 4,18 ± 0,75 | 145,7 ± 26,0 |
| pH 6,8 | 0,9831 | 0,9838 | 0,9970 | 0,9865 | 0,9836 | 0,9117 | 2,83 ± 0,39 | 98,7 ± 13,6 |
| pH 4,5 | - | - | - | - | - | - | 0,18 ± 0,12 | 6,3 ± 4,2 |

MCAA: microcápsula com ácido anacárdico, CDR: droga cumulativa liberada, CMR: massa cumulativa liberada.
Fonte: elaborada pelo autor.

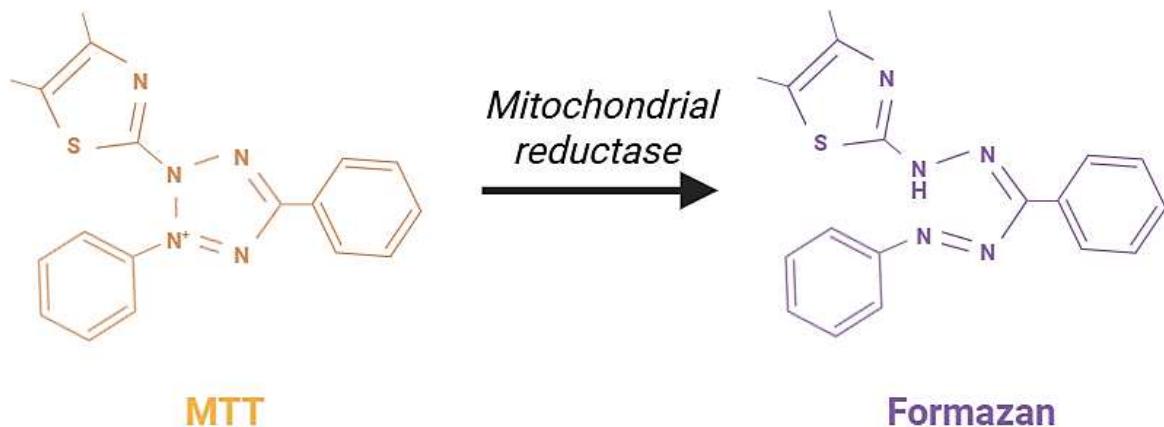
O mecanismo de liberação do ativo pode ser elucidado através do coeficiente difusional (n) da reta do modelo matemático de Korsmeyer-Peppas. Para formas esféricas, os mecanismos podem ser classificados como Difusão Fickiana ($n \leq 0,45$), como Transporte Não-Fickiano ($0,45 < n < 0,89$), como Caso II de Transporte ($n = 0,89$) e como Super Caso II de

Transporte ($n > 0,89$). Portanto, o tipo de liberação foi classificado como Super Caso II, pois os valores obtidos para n foram iguais a 1,49 e 1,24 para liberação em pH 7,4 e 6,8, respectivamente. Neste tipo de transporte ocorrem simultaneamente difusão, intumescimento, relaxamento e erosão das cadeias poliméricas, presentes no revestimento da microcápsula (Ritger; Peppas, 1987). A difusão, entretanto, deve ser o mecanismo predominante, conforme assumido no modelo de Higuchi.

5.12 Avaliação do potencial citotóxico

O ensaio MTT para a avaliação da citotoxicidade é um método rápido e sensível, no qual enzimas mitocondriais presentes em células metabolicamente ativas reduzem o sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, como mostra o esquema na Figura 28. A partir da análise colorimétrica dessa conversão, torna-se possível examinar a viabilidade e o estado metabólico celular (Berridge *et al.*, 1996).

Figura 28. Reação de conversão do sal MTT em azul de formazan a partir de enzimas mitocondriais



Fonte: elaborado pelo autor.

Desse modo, o ensaio MTT permitiu determinar a IC₅₀ da microcápsula com AA frente as linhagens celulares tumorais HCT-116 e HL-60, sendo seus valores médios iguais a 30,1 µg mL⁻¹ e 29,8 µg mL⁻¹, respectivamente, expressos em termos de concentração de AA, como mostra a Tabela 14.

Tabela 14. IC₅₀ em células de HL-60 (leucemia promielocítica), HCT-116 (carcinoma colorretal) e L-929 (fibroblasto murino)

| Amostras | Células HCT-116 | | Células HL-60 | | Células L-929 | |
|------------------|---|------------------|---|------------------|---|------------------|
| | IC ₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Desvio padrão | IC ₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Desvio padrão | IC ₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Desvio padrão |
| Ácido anacárdico | 10,0 | 8,8-11,3 | 1,42 | 1,14-1,77 | 0,70 | 0,47-1,03 |
| MCAA | 30,1 | 24,8-37,9 | 29,8 | 23,1-42,3 | >43,5 | - |
| MCC | >43,5 | - | >43,5 | - | >43,5 | - |
| Doxorrubicina | 0,7 | 0,5-0,9 | 0,02 | 0,01-0,03 | 0,9 | 0,9-1,0 |

MCAA: microcápsula com ácido anacárdico, MCC: microcápsula controle.

Fonte: elaborada pelo autor.

Nos testes de citotoxicidade em células de L-929 (não tumorais), a MCAA não apresentou valor detectável de IC₅₀ no intervalo de concentrações testado, indicando a eficiência da formulação em comparação com o ácido anacárdico livre (IC₅₀ = 0,70 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em L-929). Este fato sugere fortemente que a encapsulação de AA permite reduzir os efeitos colaterais adversos do tratamento, através da ação antitumoral com maior seletividade das microcápsulas, potencializando o efeito terapêutico do ativo.

A redução da citotoxicidade pode estar relacionada com a presença da glicoproteína de superfície celular receptora de ácido hialurônico, CD44, nessas células. De acordo com Zhou *et al.* (2016) e Liu *et al.* (2007), a CD44 já foi observada em células HCT-116 e HL-60, respectivamente, sugerindo que essa glicoproteína pode ser uma forte marcadora dessas linhagens cancerígenas. Dessa forma, a maior seletividade da MCAA contra as linhagens tumorais pode ser proveniente da interação da cápsula polissacarídica com a CD44, uma vez que o ácido hialurônico com massa molar acima de 10^6 g mol^{-1} , como o seu derivado utilizado neste trabalho, possui maior afinidade com a CD44, possuindo ligação quase irreversível, facilitando a entrega do ativo (Arpicco *et al.*, 2013).

Apesar da citotoxicidade ser facilmente determinada utilizando o ensaio de MTT, esse teste não permite realizar afirmações acerca do mecanismo de ação do ativo (Berridge *et al.*, 1996). Embora não seja totalmente compreendido, a literatura relata alguns mecanismos moleculares para a atividade anticâncer do AA. Tan *et al.* (2017) investigaram o efeito de AA em células de câncer de próstata e observaram a indução de morte celular, causada, principalmente, por estresse do retículo endoplasmático, proveniente do acúmulo de proteínas mal enoveladas nessa organela, e por aumento da expressão da proteína DAPk3, que participa de múltiplas vias de sinalização de apoptose e autofagia, desempenhando função antitumoral ao inibir a metástase.

Subramanian, Francis e Devasena (2014) prepararam partículas de nanocompósito de quitosana-amido carregadas com análogo de bis-demetóxi curcumina (BDMCA-CS) e testaram o efeito anticancerígeno em células MCF-7 (linhagens celulares de câncer de mama) e VERO (células epiteliais renais de macaco africano), no intervalo de concentração igual a 1,953-1000 µg mL⁻¹ de BDMCA-CS. Foi encontrado valor de IC₅₀ igual a 62,5 µg mL⁻¹ para MCF-7, enquanto concentrações superiores a 250 µg mL⁻¹ de BDMCA-CS induziram 50% de morte celular em células VERO. Vien *et al.* (2022) encapsularam AA hidrogenado em lipossomas com o marcador de superfície anticorpo monoclonal CD133 e testaram sua eficácia contra células cancerígenas NTERA-2, que possuem receptores para o marcador de superfície, obtendo IC₅₀ igual a 75,83 ± 6,70 µM (26,43 ± 2,33 µg mL⁻¹). Estes resultados mostram a eficiência do encapsulamento com HS realizado neste trabalho, pois mantém alta citotoxicidade com AA, com maior seletividade.

5.13 Avaliação de segurança não clínica em *zebrafish* adulto

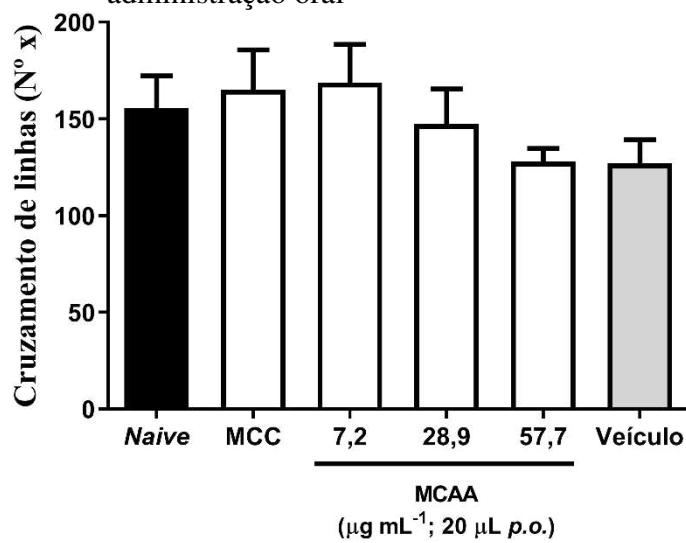
Neste estudo, o *zebrafish* foi escolhido como modelo animal para avaliar a toxicidade aguda e as alterações na atividade locomotora após tratamento com a formulação devido à sua alta similaridade com o genoma humano (70-80%), alta fecundidade e pequeno tamanho, o que permite testes simultâneos em um grande número de réplicas sob as mesmas condições de tratamento, tornando os resultados mais estatisticamente convincentes (Jia *et al.*, 2019). Em comparação com o modelo de roedores, o *zebrafish* permite uma avaliação mais rápida dos efeitos de substâncias tóxicas, visto que seu desenvolvimento ocorre em questão de dias. Além disso, a transparência dos embriões permite a visualização em tempo real de processos biológicos, como a formação de órgãos e a resposta a agentes tóxicos. Seu uso na avaliação de segurança não clínica para novos carreadores de ativos já está estabelecido na literatura (Luss *et al.*, 2023).

No teste de toxicidade aguda em 96 h, a redispersão da microcápsula MCC não foi tóxica contra o *zebrafish*. Este resultado confirma a biocompatibilidade dos materiais precursores utilizados no preparo da MCAA. Da mesma forma, nenhuma concentração testada da MCAA foi classificada como tóxica, portanto, CL₅₀ > 57,7 µg mL⁻¹. Silva *et al.* (2021) testaram complexos metálicos de AA utilizando quelantes de cobre e zinco e também não observaram toxicidade aguda de AA contra *zebrafish* adultos.

Em relação ao estudo da atividade locomotora do *zebrafish* tratado (Figura 29), nenhuma amostra apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em comparação

aos grupos *Naive* e Veículo, portanto não foi observado efeito sedativo e/ou comprometimento locomotor dos animais nas doses testadas.

Figura 29. Efeito da microcápsula com ácido anacárdico (MCAA) e da microcápsula controle (MCC) na atividade locomotora do *zebrafish* adulto no Teste de Campo Aberto (0-5 min). *Naive*: animais não tratados, veículo: água destilada estéril, *p.o.*: administração oral



Fonte: elaborada pelo autor.

A ausência de efeito sedativo e/ou comprometimento locomotor no Teste Locomotor é um indicador crucial na avaliação de tratamentos de câncer. Medicamentos sedativos ou que comprometem a locomoção podem induzir um comportamento letárgico, diminuindo a atividade do animal e imitando o sintoma de fadiga observado em pacientes com câncer. Quando, no entanto, não se observa tal efeito no modelo de *zebrafish*, isso indica que o tratamento provavelmente não está afetando o equilíbrio neurofisiológico do organismo, permitindo que o animal mantenha sua atividade física e disposição, demonstrando um efeito antifadiga (Zhang *et al.*, 2025). Em um cenário clínico, isso é crucial, pois os pacientes com câncer já enfrentam um estado de esgotamento físico e mental devido à doença e ao tratamento. Dessa forma, um medicamento que cause sedação excessiva ou diminua a atividade locomotora pode agravar esses sintomas (Bercier; Thé, 2024).

Estes resultados sugerem que a MCAA é segura para aplicações *in vivo*, reforçando os resultados obtidos para a liberação lenta e controlada de AA a partir da MCAA e para a maior seletividade tumoral apresentada no ensaio MTT.

6 CONCLUSÃO

A técnica de secagem por *spray dryer* para produção de microcápsulas polissacarídicas com núcleo oleoso a partir de nanoemulsão de AA foi realizada com sucesso, obtendo-se microcápsulas em pó com formato microscópico esférico. O processo de encapsulação foi capaz de impedir a ocorrência detectável de descarboxilação do AA durante a secagem, como evidenciaram as análises de FTIR, TGA e EE%. As microcápsulas obtiveram liberação mais lenta e controlada de AA em relação ao princípio ativo livre em pH 7,4 e apresentaram liberação responsiva ao pH, com quase nenhum percentual de AA liberado em pH 4,5, o que impede sua entrega ao lisossomo celular. Os testes *in vivo* não produziram toxicidade aguda em *zebrafish* ou alterações na atividade locomotora após o tratamento com a formulação. Além disso, a MCAA aumentou a seletividade na entrega de AA contra linhagens celulares de câncer (HCT-116 e HL-60), sem apresentar citotoxicidade detectável para a linhagem celular não tumoral (L-929) na faixa de concentração testada, resultado que pode estar relacionado tanto com a liberação controlada de AA das microcápsulas quanto com a interação da cápsula de hialuronato de sódio com marcadores de superfície celular (CD44), superexpressos em células tumorais. Assim, a MCAA parece ser uma forma promissora e segura de tratar essas neoplasias, com alta probabilidade de reduzir os efeitos colaterais tóxicos durante o tratamento.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como considerações finais, espera-se que este trabalho proporcione uma contribuição significativa na literatura sobre produção de formulações micro- e nanoestruturadas aplicadas ao tratamento de neoplasias e na valorização de matérias-primas naturais nativas através do seu uso em produtos de química fina com maior valor agregado. O Apêndice E contém as principais contribuições científicas geradas pelos resultados desta dissertação, incluindo a publicação de um artigo científico, o depósito de duas patentes e a participação em evento científico.

REFERÊNCIAS

- ABOUELMAGD, S. A. *et al.* Release kinetics study of poorly water-soluble drugs from nanoparticles: are we doing it right?. **Molecular Pharmaceutics**, v. 12, n. 3, p. 997–1003, 2015.
- AHIRE, K.; GORLE, A. P. An overview on methods of preparation and characterization of nanoemulsion. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 8, p. 897-908, 2021.
- AKASH, M. S. H.; REHMAN, K. Recent progress in biomedical applications of Pluronic (PF127): Pharmaceutical perspectives. **Journal of Controlled Release**, v. 209, p. 120–138, 2015.
- ALBANO, J. M. R. *et al.* Rational design of polymer-lipid nanoparticles for docetaxel delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 175, p. 56–64, 2019.
- ALCÂNTARA, L. O. *et al.* Extraction and characterization of hyaluronic acid from the eyeball of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 226, p. 172–183, 2023.
- ANJUM, M. M. *et al.* Anacardic acid encapsulated solid lipid nanoparticles for *Staphylococcus aureus* biofilm therapy: chitosan and DNase coating improves antimicrobial activity. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 11, n. 1, p. 305–317, 2021.
- ARAÚJO, P. H. M. *et al.* Catalytic Deoxygenation of the Oil and Biodiesel of Licuri (*Syagrus coronata*) To Obtain n-Alkanes with Chains in the Range of Biojet Fuels. **ACS Omega**, v. 4, n. 14, p. 15849–15855, 2019.
- ARELLANO-AGUILAR, O. *et al.* Use of the zebrafish embryo toxicity test for risk assessment purpose: Case study. **Journal of FisheriesSciences.com**, v. 9, n. 4, p. 52–62, 2015.
- ARPICCO, S. *et al.* Hyaluronic acid-coated liposomes for active targeting of gemcitabine. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 85, n. 3, p. 373–380, 2013.
- BABY, T. *et al.* Microfluidic synthesis of curcumin loaded polymer nanoparticles with tunable drug loading and pH-triggered release. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 594, p. 474-484, 2021.
- BALASUBRAMANYAM, K. *et al.* Small Molecule Modulators of Histone Acetyltransferase p300. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 21, p. 19134–19140, 2003.
- BATTISTON, L. L. *et al.* Towards a Correlation Between Iron/Cobalt Content, Support Pore Size and Metal Particle Size in Supported Catalysts. **ChemNanoMat**, v. 9, n. 10, 2023.
- BAYER, I. S. Controlled Drug Release from Nanoengineered Polysaccharides. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 5, p. 1364, 2023.

- BAZBAN-SHOTORBANI, S. *et al.* Revisiting structure-property relationship of pH-responsive polymers for drug delivery applications. **Journal of Controlled Release**, v. 253, p. 46-63, 2017.
- BERCIER, P.; THÉ, H. D. History of Developing Acute Promyelocytic Leukemia Treatment and Role of Promyelocytic Leukemia Bodies. **Cancers**, v. 16, n. 7, p. 1351, 2024.
- BERRIDGE, M. V. *et al.* The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. **Biochemica**, v. 4, p. 14-19, 1996.
- BEZERRA, T. T. *et al.* In vitro antileishmanial activity of sustainable anacardic acid and cardol based silver nanoparticles on *L. braziliensis*. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 619, p. 121698, 2022.
- BLOISE, E. *et al.* Advances in Nanomaterials Based on Cashew Nut Shell Liquid. **Nanomaterials**, v. 13, n. 17, p. 2486, 2023.
- BOHAUMILITZKY, L. *et al.* A Trickster in Disguise: Hyaluronan's Ambivalent Roles in the Matrix. **Frontiers in Oncology**, v. 7, n. 9, 2017.
- BUREAU, S.; COZZOLINO, D.; CLARK, C. J. Contributions of Fourier-transform mid infrared (FT-MIR) spectroscopy to the study of fruit and vegetables: A review. **Postharvest Biology and Technology**, v. 148, p. 1–14, 2019.
- CANO-SARMIENTO, C. *et al.* Zeta Potential of Food Matrices. **Food Engineering Reviews**, v. 10, n. 3, p. 113–138, 2018.
- CAVALCANTI, C. P. L. *et al.* Licuri oil improves feedlot performance and modifies ruminal fauna of Santa Inês ewes. **Livestock Science**, v. 265, p. 105093, 2022.
- CHEN, G. Q. *et al.* Use of Arsenic Trioxide (As_2O_3) in the Treatment of Acute Promyelocytic Leukemia (APL): I. As_2O_3 Exerts Dose-Dependent Dual Effects on APL Cells. **Blood**, v. 89, n. 9, p. 3345–3353, 1997.
- CONCEA. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa N° 37. de 15 de fevereiro de 2018. Diretrizes da Prática de Eutanásia.
- COSTA, C. *et al.* Solid Dosage Forms of Biopharmaceuticals in Drug Delivery Systems Using Sustainable Strategies. **Molecules**, v. 26, n. 24, p. 7653, 2021.
- CREPALDI, I. C. *et al.* Composição nutricional do fruto de licuri (*Syagrus coronata* (Martius) Beccari). **Brazilian Journal of Botany**, v. 24, n. 2, p. 155–159, 2001.
- CUI, X. *et al.* A novel ligand-modified nanocomposite microparticles improved efficiency of quercetin and paclitaxel delivery in the non-small cell lung cancer. **Drug Delivery**, v. 29, n. 1, p. 3123–3133, 2022.
- DHARANKAR, S. D. *et al.* Spray-Dried Solid Self-Emulsifying Delivery System of Ketoprofen: Development and Its Characterization. **Drying Technology**, v. 33, n. 15-16, p. 2002–2011, 2015.

- DICKENS, E.; AHMED, S. Principles of cancer treatment by chemotherapy. **Surgery (Oxford)**, v. 36, n. 3, p. 134-138, 2018.
- DOSIO, F. *et al.* Hyaluronic acid for anticancer drug and nucleic acid delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 97, p. 204–236, 2016.
- DU, Q. *et al.* Encapsulating ionic liquid and Fe₃O₄ nanoparticles in gelatin microcapsules as microwave susceptible agent for mr imaging-guided tumor thermotherapy. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 7, n. 24, p. 13612–13619, 2015.
- ECHEVERRI, J. D. *et al.* Study of *in vitro* and *in vivo* carbamazepine release from coarse and nanometric pharmaceutical emulsions obtained via ultra-high-pressure homogenization. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 4, p. 53, 2020.
- EU Directive 2010/63/EU. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2010/63/2019-06-26>. Acesso em: 20 abr. de 2024.
- FAYED, N.; OSMAN, M.; MAGHRABY, G. Enhancement of dissolution rate and intestinal stability of candesartan cilextil. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 6, n. 5, p. 102–111, 2016.
- FREITAS, E. R. *et al.* Calcium anacardate in the diet of broiler chickens: performance, carcass characteristics and meat quality. **Livestock Science**, v. 1, p. 105002, 2022.
- GALLARDO, G. *et al.* Microencapsulation of linseed oil by spray drying for functional food application. **Food Research International**, v. 52, n. 2, p. 473–482, 2013.
- GANDHI, T.; PATEL, M.; DHOLAKIYA, B. K. Studies on effect of various solvents on extraction of cashew nut shell liquid (CNSL) and isolation of major phenolic constituents from extracted CNSL. **Scholars Research Library**, v. 2, n. 1, p. 135–142, 2012.
- GARCÍA-SILVA, I. *et al.* Synthesis and Characterization of Thiolated Nanoparticles Based on Poly (Acrylic Acid) and Algal Cell Wall Biopolymers for the Delivery of the Receptor Binding Domain from SARS-CoV-2. **Pharmaceutics**, v. 16, n. 7, p. 891, 2024.
- GARTILI, A. *et al.* CNSL-based plasticizers, a promising sustainable alternative to phthalates, a review. **RSC Sustainability**, v. 3, p. 81-111, 2024.
- GHARSALLAOUI, A. *et al.* Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v. 40, n. 9, p. 1107–1121, 2007.
- GNANAPRAKASAM, J. N. R.; LÓPEZ-BAÑUELOS, L.; VEGA, L. Anacardic 6-pentadecyl salicylic acid induces apoptosis in breast cancer tumor cells, immunostimulation in the host and decreases blood toxic effects of taxol in an animal model. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 410, p. 115359, 2021.

- GONÇALVES, A.; ESTEVINHO, B. N.; ROCHA, F. Spray-drying of oil-in-water emulsions for encapsulation of retinoic acid: Polysaccharide- and protein-based microparticles characterization and controlled release studies. **Food Hydrocolloids**, v. 124, p. 107193, 2022.
- GUPTA, U.; MAITY, D; SHARMA, V. K. Recent advances of polymeric nanoplatforms for cancer treatment: smart delivery systems (SDS), nanotheranostics and multidrug resistance (MDR) inhibition. **Biomedical Materials**, v. 19, n. 1, p. 012003, 2023.
- HAMAD, F.; MUBOFU, E. Potential Biological Applications of Bio-Based Anacardic Acids and Their Derivatives. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 4, p. 8569–8590, 2015.
- HAN, X. *et al.* Stealth CD44-targeted hyaluronic acid supramolecular nanoassemblies for doxorubicin delivery: Probing the effect of uncovalent pegylation degree on cellular uptake and blood long circulation. **Journal of Controlled Release**, v. 197, p. 29–40, 2015.
- HENDRICKS, N. R.; WATKINS, J. J.; CARTER, K. R. Formation of hierarchical silica nanochannels through nanoimprint lithography. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, n. 37, p. 14213, 2011.
- HIGUCHI, T. Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, n. 12, p. 1145-1149, 1963.
- HIRAMA, H. *et al.* Monodispersed sodium hyaluronate microcapsules for transdermal drug delivery systems. **Materials Advances**, v. 2, n. 21, p. 7007–7016, 2021.
- HOYOS-LEYVA, J. D. *et al.* Structural characterization of aroid starches by means of chromatographic techniques. **Food Hydrocolloids**, v. 69, p. 97–102, 2017.
- HUANG, M. *et al.* Use of All-Trans Retinoic Acid in the Treatment of Acute Promyelocytic Leukemia. **Blood**, v. 72, n. 2, p. 567–572, 1988.
- HUNDT, J.; LI, Z.; LIU, Q. The Inhibitory Effects of Anacardic Acid on Hepatitis C Virus Life Cycle. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, e0117514, 2015.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2023. **Produção Agropecuária**. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/castanha-de-caju-cultivo/br>. Acesso em: 03 fev. de 2025.
- INCA. Instituto Nacional de Câncer, 2023. **Câncer de cólon e reto**. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa/sintese-de-resultados-e-comentarios/cancer-de-colon-e-reto>. Acesso em: 03 fev. de 2025.
- INCA. Instituto Nacional de Câncer, 2022. **Estimativa**. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa>. Acesso em: 15 de nov. de 2023.
- INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial, 2020. Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos, DOQ-CGCRE-008.

- JABBARI, F.; BABAEIPOUR, V.; SAHARKHIZ, S. Comprehensive review on biosynthesis of hyaluronic acid with different molecular weights and its biomedical applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 240, p. 124484, 2023.
- JAMSHIDNEJAD, Z.; AFSHAR, A.; RAZMJOOKHOLLARI, M. A. Synthesis of self-healing Smart Epoxy and Polyurethane Coating by Encapsulation of Olive Leaf Extract as Corrosion Inhibitor. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 13, n. 12, p. 12278-12293, 2018.
- JEDDI, R. *et al.* Treatment of acute promyelocytic leukemia with PETHEMA LPA 99 protocol: a Tunisian single center experience. **Hematology**, v. 15, n. 4, p. 204–209, 2010.
- JIA, H. R. *et al.* Nanomaterials meet zebrafish: Toxicity evaluation and drug delivery applications. **Journal of Controlled Release**, v. 311–312, p. 301-318, 2019.
- JIANG, B.-P. *et al.* Water-soluble hyaluronic acid–hybridized polyaniline nanoparticles for effectively targeted photothermal therapy. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 3, n. 18, p. 3767–3776, 2015.
- JOSINO, M. A. A. *et al.* Development and in vitro evaluation of microparticles of fluoxetine in galactomannan against biofilms of *S. aureus* methicillin resistant. **Carbohydrate Polymers**, v. 252, p. 117184, 2021.
- JÚNIOR, A. L. G. *et al.* Anxiolytic effect of anacardic acids from cashew (*Anacardium occidentale*) nut shell in mice. **IUBMB Life**, v. 70, n. 5, p. 420–431, 2018.
- KANWAL, T. *et al.* Design and development of permeation enhancer containing self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) for ceftriaxone sodium improved oral pharmacokinetics. **Journal of Molecular Liquids**, v. 289, p. 111098, 2019.
- KAZEMI-ANDALIB, F. *et al.* Hollow microcapsule with pH-sensitive chitosan/polymer shell for *in vitro* delivery of curcumin and gemcitabine. **European Polymer Journal**, v. 162, p. 110887, 2022.
- KHAN, A. A. *et al.* Advanced drug delivery to the lymphatic system: lipid-based nanoformulations. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 2733–2744, 2013.
- KHAWAR, I. A.; KIM, J. H.; KUH, H. J. Improving drug delivery to solid tumors: priming the tumor microenvironment. **Journal of Controlled Release**, v. 201, p. 78-89, 2015.
- KURCZEWSKA, J. Recent Reports on Polysaccharide-Based Materials for Drug Delivery. **Polymers**, v. 14, n. 19, p. 4189, 2022.
- LERTSUTTHIWONG, P. *et al.* Preparation of alginate nanocapsules containing turmeric oil. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, n. 2, p. 209-214, 2008.
- LI, S. D.; HOWELL, S. B. CD44-targeted microparticles for delivery of cisplatin to peritoneal metastases. **Molecular Pharmaceutics**, v. 7, n. 1, p. 280–290, 2010.

LI, S. *et al.* Progress in Pluronic F127 Derivatives for Application in Wound Healing and Repair. **International Journal of Nanomedicine**, v. 18, p. 4485–4505, 2023.

LI, X. *et al.* Microencapsulation of nanoemulsions: novel Trojan particles for bioactive lipid molecule delivery. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 1313-1325, 2011.

LI, X. *et al.* Preparation and characterization of azithromycin - Aerosil 200 solid dispersions with enhanced physical stability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 486, n. 1-2, p. 175–184, 2015.

LISBOA, M. G. *et al.* Oleochemistry potential from Brazil northeastern exotic plants. **Biochimie**, v. 178, p. 96–104, 2020.

LIU, J. *et al.* Down-regulation of CD44 contributes to the differentiation of HL-60 cells induced by ATRA or HMBA. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 4, n. 1, p. 59-63, 2007.

LOGANATHAN, S. *et al.* 2^a ed. **Thermal and Rheological Measurement Techniques for Nanomaterials Characterization**, [s.l.]: Elsevier, 2017.

LUSS, A. L. *et al.* Toxicity Evaluation and Controlled-Release of Curcumin-Loaded Amphiphilic Poly-N-vinylpyrrolidone Nanoparticles: *In Vitro* and *In Vivo* Models. **Pharmaceutics**, v. 16, n. 1, p. 8, 2023.

MAGALHÃES, F. E. A. *et al.* Adult zebrafish (*Danio rerio*): An alternative behavioral model of formalin-induced nociception. **Zebrafish**, v. 14, n. 5, p. 422–429, 2017.

MAGALHÃES, T. S. S. A. *et al.* Development and Evaluation of Antimicrobial and Modulatory Activity of Inclusion Complex of *Euterpe oleracea* Mart Oil and β-Cyclodextrin or HP-β-Cyclodextrin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 3, p. 942, 2020.

MENG, Q. *et al.* Advances in polysaccharide-based nano/microcapsules for biomedical applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 220, p. 878–891, 2022.

MEYER, K.; PALMER, J. W. THE POLYSACCHARIDE OF THE VITREOUS HUMOR. **Journal of Biological Chemistry**, v. 107, n. 3, p. 629–634, 1934.

MODARRES-GHEISARI, S. M. M. *et al.* Ultrasonic nano-emulsification – A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 52, p. 88–105, 2019.

MONSLOW, J.; GOVINDARAJU, P.; PURÉ, E. Hyaluronan – a functional and structural sweet spot in the tissue microenvironment. **Frontiers in Immunology**, v. 6, p. 231, 2015.

MORADI, S.; ANARJAN, N. Preparation and characterization of α-tocopherol nanocapsules based on gum Arabic-stabilized nanoemulsions. **Food Science and Biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 413–421, 2018.

MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MUKHTAR, M. *et al.* Freeze-dried vs spray-dried nanoplex DPIs based on chitosan and its derivatives conjugated with hyaluronic acid for tuberculosis: In vitro aerodynamic and in silico deposition profiles. **European Polymer Journal**, v. 160, p. 110775, 2021.

NOBLICK, L. R. A revision of the genus Syagrus (Arecaceae). **Phytotaxa**, v. 294, n. 1, p. 1–262, 2017.

OECD. Organisation for Economic Co-operation and Development, 1992. **Guideline for testing acute toxicity in fishes. Test No.** Disponível em: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948241.pdf>. Acesso em: 20 abr. de 2024.

OLIVEIRA, S. *et al.* Design and Evaluation of Dual Release from Anacardic Acid-Based Polyurea Nanocapsules Components. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 34, n. 4, 2023.

PAIVA FILHO, J. C. *et al.* Design of chitosan-alginate core-shell nanoparticles loaded with anacardic acid and cardol for drug delivery. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 29, n. 4, e2019060, 2019.

PARK, M. *et al.* Anacardic acid inhibits pancreatic cancer cell growth, and potentiates chemotherapeutic effect by Chmp1A - ATM - p53 signaling pathway. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 18, n. 71, 2018.

PASHKINA, E. *et al.* Hyaluronic Acid-Based Drug Delivery Systems for Cancer Therapy. **Cells**, v. 14, n. 2, p. 61, 2025.

PEREIRA, S. A. *et al.* *In situ* transesterification of the catolé coconut (*Syagrus Cearensis*) utilizing experimental design by Taguchi method. **Industrial Crops and Products**, v. 205, p. 117490, 2023.

POPESCU, R. *et al.* Discrimination of vegetable oils using NMR spectroscopy and chemometrics. **Food Control**, v. 48, p. 84-90, 2015.

PRADANA, A. T.; RITTHIDEJ, G. C. Spray Drying of Asiatic Acid-Palm Oil in Maltodextrin: Improving the Nanoemulsion Characteristics. **International Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 19, n. 1, p. 21-33, 2023.

PREETI *et al.* Nanoemulsion: An Emerging Novel Technology for Improving the Bioavailability of Drugs. **Scientifica**, v. 2023, p. 1–25, 2023.

PURNAMA, L. O. M. J. *et al.* Formulation development of thermoresponsive quercetin nanoemulgels and *in vitro* investigation of their inhibitory activity on vascular endothelial growth factor-A inducing neovascularization from the retinal pigment epithelial cells. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 100, p. 106005, 2024.

QI, Z. *et al.* Fabrication of epoxy sustained-release coatings loaded with urushiol microcapsules containing essential oil for inhibition on drug-resistant *Helicobacter pylori* and *Staphylococcus aureus*. **Progress in Organic Coatings**, v. 161, p. 106459, 2021.

RAVANFAR, R.; CELLI, G. B.; ABBASPOURRAD, A. Controlling the Release from Enzyme-Responsive Microcapsules with a Smart Natural Shell. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 10, n. 6, p. 6046–6053, 2018.

REBOUÇAS, L. M. *et al.* Linseed Oil Nanoemulsion with Pluronic® F127 Loaded with Betulinic Acid: Preparation, Rheology, MTT Assay and in vitro Release Kinetics. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 33, n. 11, p. 1319-1331, 2022

REBOUÇAS, L. M. *et al.* Microcapsules based on alginate and guar gum for co-delivery of hydrophobic antitumor bioactives. **Carbohydrate Polymers**, v. 301, p. 120310, 2023.

RET, D. *et al.* Exact determination of the degree of substitution of high molar mass hyaluronan by controlling the conformation in solution. **Carbohydrate Polymers**, v. 204, p. 124-130, 2019.

RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. **Journal of Controlled Release**, v. 5, n. 1, p. 37-42, 1987.

ROSA, M. E. P. *et al.* Sodium hyaluronate microcapsules to promote antitumor selectivity of anacardic acid. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 296, p. 139616, 2025.

RUFINO, M. U. L. *et al.* Conhecimento e uso do ou-ricuri (*Syagrus coronata*) e do babaçu (*Orbignya phalerata*) em Buíque, PE, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 22, n. 4, p. 1141-1149, 2008.

SALLES, K. T. S. *et al.* Characterization of *Syagrus coronata* (Mart.) Becc. oil and properties of methyl esters for use as biodiesel. **Industrial Crops and Products**, v. 32, n. 3, p. 518–521, 2010.

SANTAMARÍA, E. *et al.* Formation of Microcapsules of Pullulan by Emulsion Template Mechanism: Evaluation as Vitamin C Delivery Systems. **Gels**, v. 10, n. 6, p. 355, 2024.

SARTORIUS. **Manual tubo ultracentrifugação Vivaspin**. UK, 2016

SCHILLER, S. Synthesis of hyaluronic acid by a soluble enzyme system from mammalian tissue. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 15, n. 3, p. 250-255, 1964.

SCHULZE-KAYSERS, N.; FEUEREISEN, M. M.; SCHIEBER, A. Phenolic compounds in edible species of the Anacardiaceae family – a review. **RSC Advances**, v. 5, n. 89, p. 73301–73314, 2015.

SERRA, M. *et al.* Microbial Hyaluronic Acid Production: A Review. **Molecules**, v. 28, n. 5, p. 2084, 2023.

- SHARMA, N. *et al.* Nanoemulsion: A new concept of delivery system. **Chronicles of Young Scientists**, v. 1, n. 2, p. 2–6, 2010.
- SHARMA, S. K. *et al.* **Handbook of Materials Characterization**. Cham, Switzerland: Springer International Publishing AG, 2018.
- SHRIVASTAVA, A. **Introduction to Plastics Engineering**. 1^a ed. [s.l.]: William Andre Publishing, 2018.
- SILVA, T. M. *et al.* New Spray-Dried Microcapsule Based on Brazilian Cashew Polysaccharide (*Anacardium othonianum* Rizz.) and Maltodextrin as Wall Material. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 28, n. 3, p. 854–862, 2020.
- SILVA, W. M. B. *et al.* Anacardic Acid Complexes as Possible Agents Against Alzheimer's Disease Through Their Antioxidant, *In vitro*, and *In silico* Anticholinesterase and Ansiolic Actions. **Neurotoxicity Research**, v. 39, n. 2, p. 467–476, 2021.
- SINGH, Y. *et al.* Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 252, p. 28–49, 2017.
- SIRAM, K. *et al.* Fabrication of Hyaluronic Acid Surface Modified Solid Lipid Nanoparticles Loaded with Imatinib Mesylate for Targeting Human Breast Cancer MCF-7 Cells. **Journal of Cluster Science**, v. 34, p. 921–931, 2023.
- SOUSA, A. C. C. *et al.* Starch-based magnetic nanocomposite for targeted delivery of hydrophilic bioactives as anticancer strategy. **Carbohydrate Polymers**, v. 264, p. 118017, 2021.
- SOUZA, N. O. *et al.* Physicochemical and microbiological assessment of a dental adhesive doped with cashew nut shell liquid. **Odontology**, v. 110, n. 3, p. 434–443, 2022.
- SOUZA, T. G. S. *et al.* Biological safety of *Syagrus coronata* (Mart.) Becc. Fixed oil: Cytotoxicity, acute oral toxicity, and genotoxicity studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 272, p. 113941, 2021.
- SUBRAMANIAN, S. B.; FRANCIS, A. P.; DEVASENA, T. Chitosan–starch nanocomposite particles as a drug carrier for the delivery of bis-desmethoxy curcumin analog. **Carbohydrate Polymers**, v. 114, p. 170–178, 2014.
- SULTANA, A. *et al.* Nano-based drug delivery systems: Conventional drug delivery routes, recent developments and future prospects. **Medicine in Drug Discovery**, v. 15, p. 100134, 2022.
- SUN, Q. *et al.* Rational Design of Cancer Nanomedicine: Nanoproperty Integration and Synchronization. **Advanced Materials**, v. 29, n. 14, p. 1606628, 2017.
- TAMBADE, P. B. *et al.* Flaxseed Oil Microcapsules Prepared Using Soy Protein Isolate and Modified Starch: Process Optimization, Characterization and *In Vitro* Release Behaviour. **Agricultural Research**, v. 9, n. 4, p. 652–662, 2020.

- TAMURA, S.; NITODA, T.; KUBO, I. Effects of salicylic acid on mushroom tyrosinase and B16 melanoma cells. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 62, n. 3-4, p. 227-233, 2007.
- TAN, J. *et al.* Anacardic acid induces cell apoptosis of prostatic cancer through autophagy by ER stress/DAPK3/Akt signaling pathway. **Oncology Reports**, v. 38, n. 3, p. 1373–1382, 2017.
- TEKKELI, S. E. K.; KIZILTAS, M. V. Current HPLC Methods for Assay of Nano Drug Delivery Systems. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 13, p. 1588-1594, 2017.
- TELLO, P. *et al.* Microfluidization and characterization of phycocyanin-based emulsions stabilised using a fumed silica. **LWT**, v. 184, p. 115077, 2023.
- THAPA, R.; WILSON, G. D. The Importance of CD44 as a Stem Cell Biomarker and Therapeutic Target in Cancer. **Stem Cells International**, v. 2016, p. 2087204, 2016.
- Tosoh Bioscience GmbH®. **GPC Application Notebook for Polymer Analysis**. 2017.
- ULIASSI, E. *et al.* Cashew Nut Shell Liquid (CNSL) as a Source of Drugs for Alzheimer's Disease. **Molecules**, v. 26, n. 18, p. 5441, 2021.
- VARKOUHI, A. K. *et al.* Endosomal escape pathways for delivery of biologicals. **Journal of Controlled Release**, v. 151, n. 3, p. 220–228, 2011.
- VIEN, L. T. *et al.* A New Liposomal Formulation of Hydrogenated Anacardic Acid to Improve Activities Against Cancer Stem Cells. **Natural Product Communications**, v. 17, n. 6, 2022.
- WANG, C. *et al.* Recent advances in anti-multidrug resistance for nano-drug delivery system. **Drug Delivery**, v. 29, n. 1, p. 1684–1697, 2022.
- WETTELAND, C. L.; NGUYEN, N.-Y. T.; LIU, H. Concentration-dependent behaviors of bone marrow derived mesenchymal stem cells and infectious bacteria toward magnesium oxide nanoparticles. **Acta Biomaterialia**, v. 35, p. 341–356, 2016.
- WILSON, R. J. *et al.* Nanoemulsions for drug delivery. **Particuology**, v. 64, p. 85-97, 2022.
- XU, F. *et al.* Preparation of magnetic and pH-responsive chitosan microcapsules via sonochemical method. **Journal of Microencapsulation**, v. 33, n. 2, p. 191–198, 2016.
- YANG, M. *et al.* Preparation, characterization and wound healing effect of alginate/chitosan microcapsules loaded with polysaccharides from nostoc commune vaucher. **Biomedical Materials**, v. 16, n. 2, 025015, 2021.
- YU, H.; HUANG, Q. Improving the oral bioavailability of curcumin using novel organogel-based nanoemulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 21, p. 5373–5379, 2012.

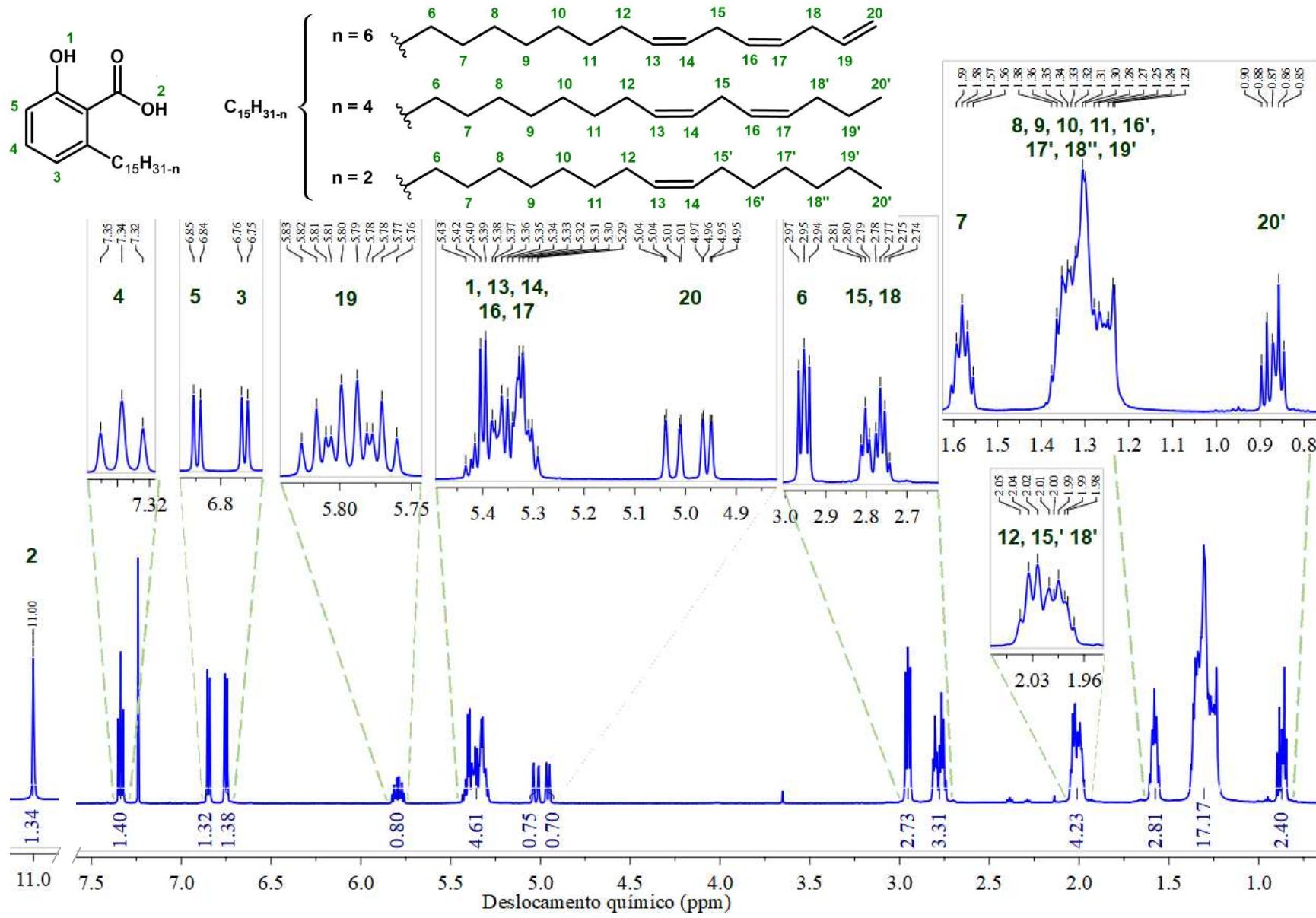
YU, S. *et al.* A novel pH-induced thermosensitive hydrogel composed of carboxymethyl chitosan and poloxamer cross-linked by glutaraldehyde for ophthalmic drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 155, p. 208–217, 2017.

ZAAFAR, D. *et al.* Preparation and characterization of Sorafenib nano-emulsion: impact on pharmacokinetics and toxicity; an *in vitro* and *in vivo* study. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 14, n. 11, p. 3089–3111, 2024.

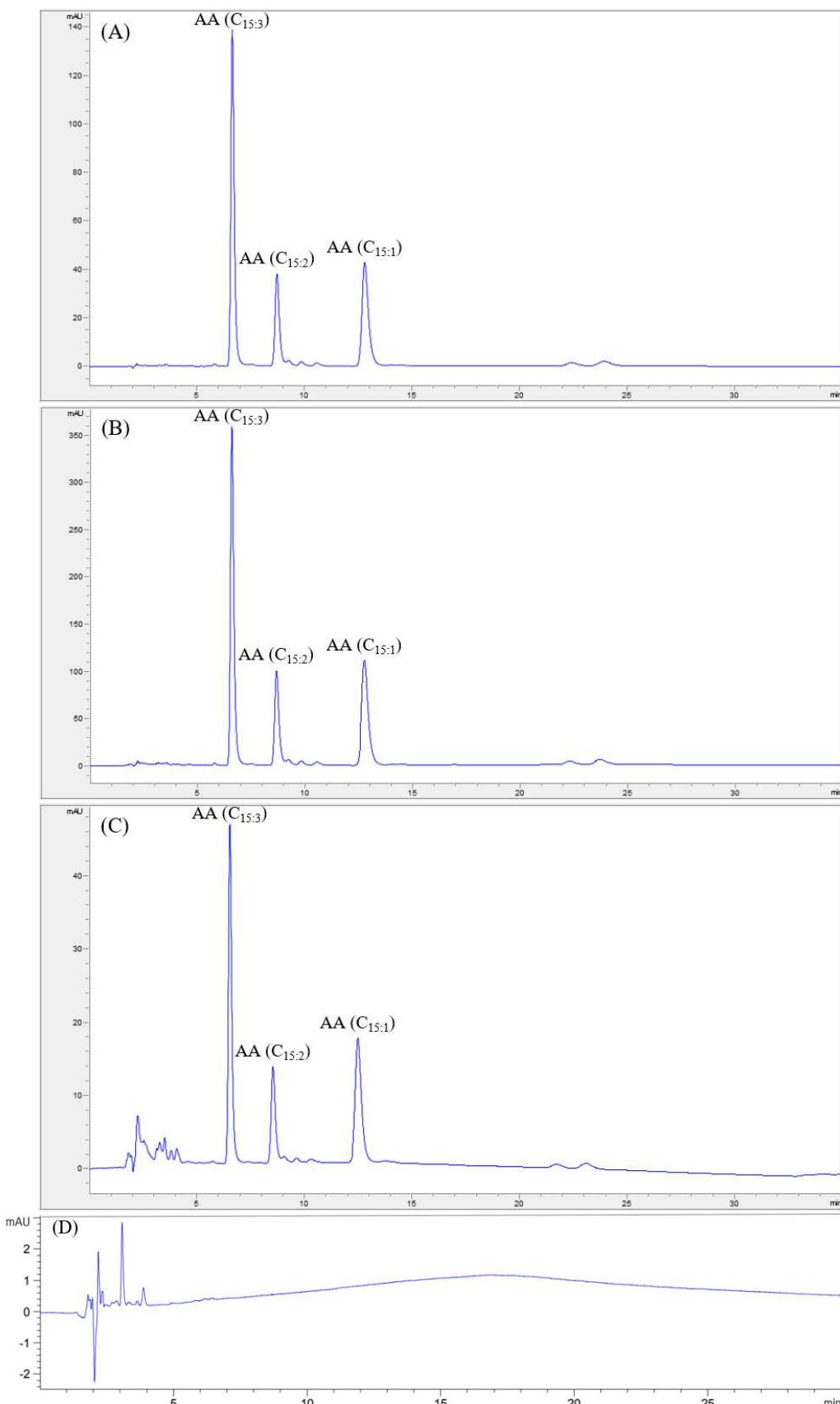
ZHANG, L. *et al.* Preliminary investigation of anti-fatigue effects and potential mechanisms of meiju oral liquid in mouse and zebrafish models. **PLoS ONE**, v. 20, n. 3, e0316761, 2025.

ZHOU, J. Y. *et al.* Role of CD44^{high}/CD133^{high} HCT-116 cells in the tumorigenesis of colon cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 7, p. 7657-7666, 2016.

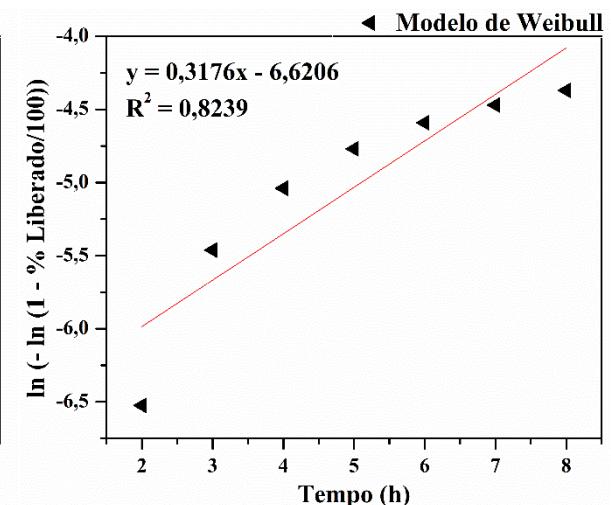
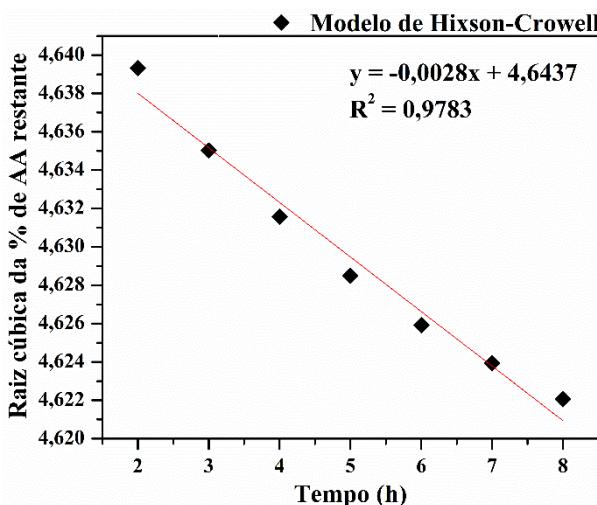
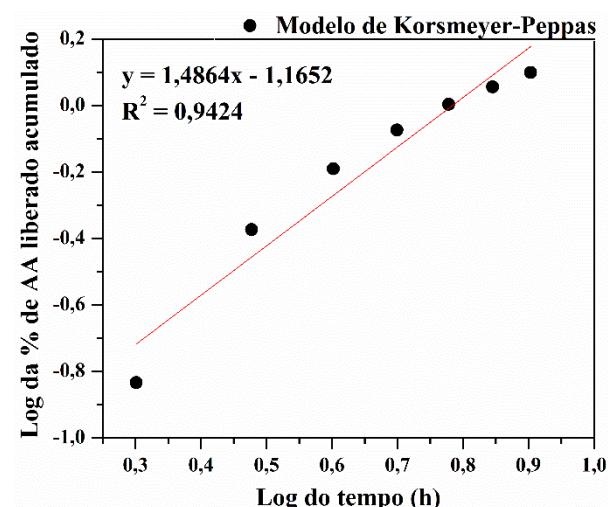
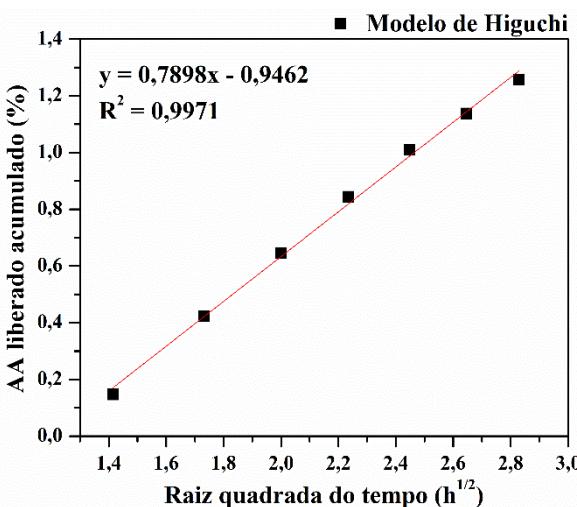
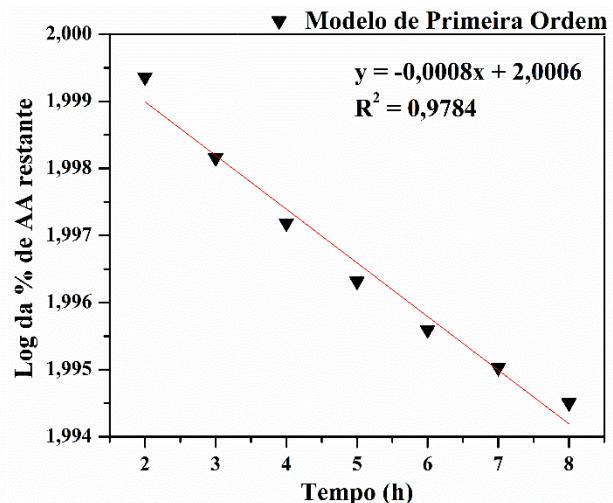
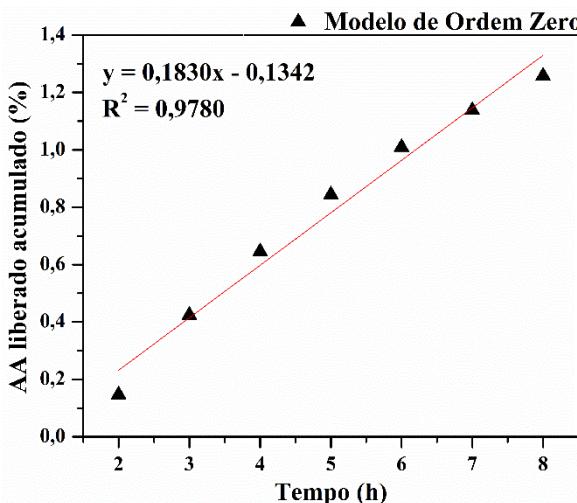
APÊNDICE A - ESPECTRO DE $^1\text{H-NMR}$ DO AA



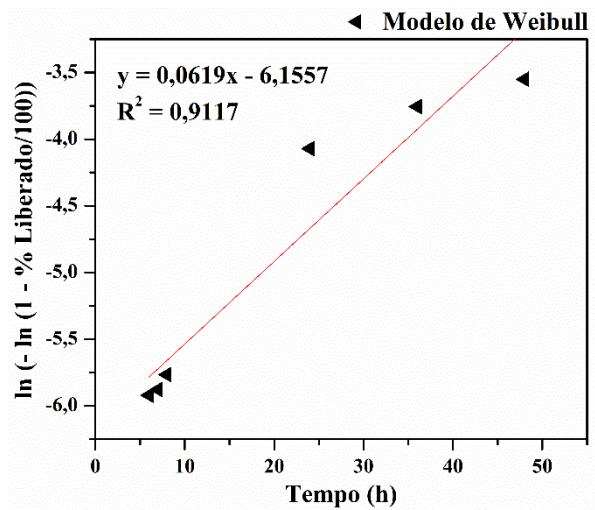
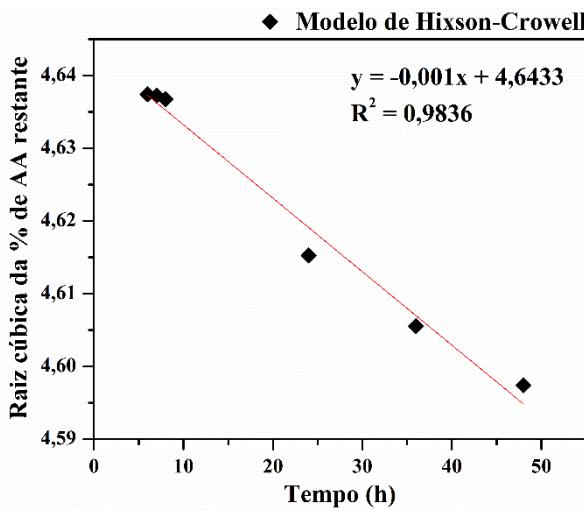
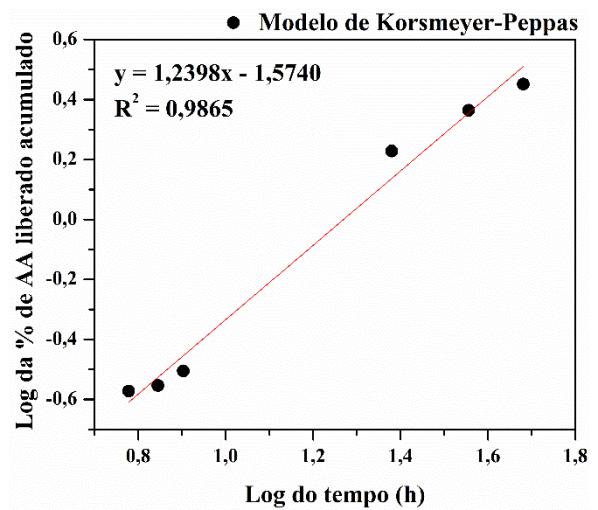
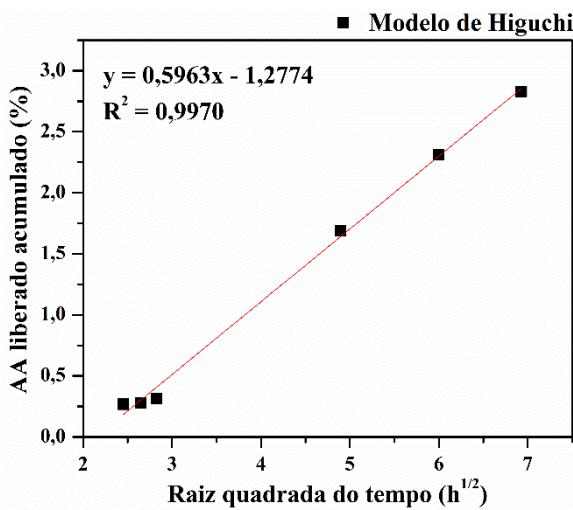
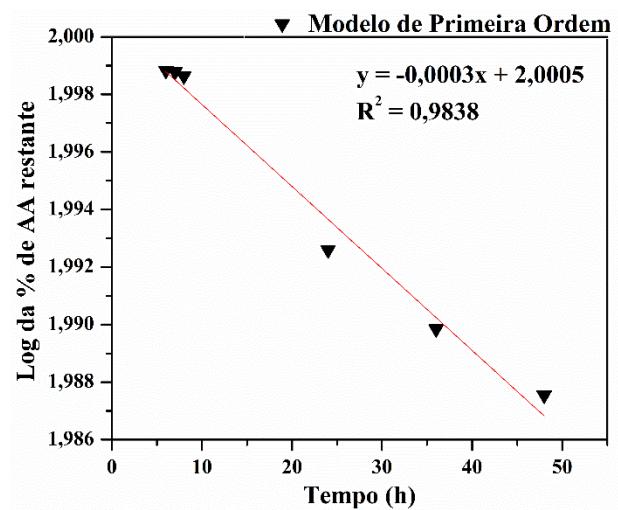
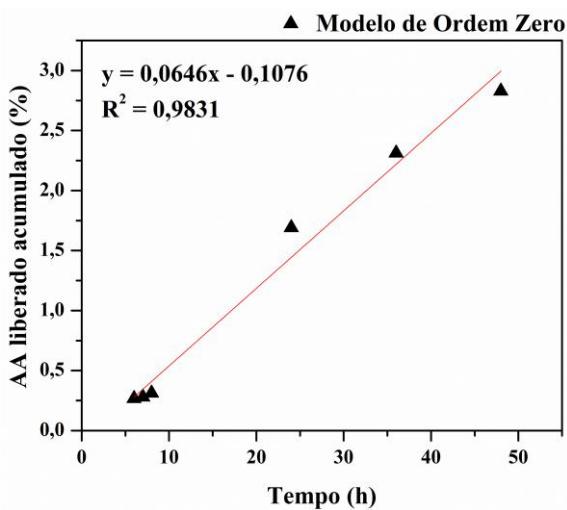
APÊNDICE B - CROMATOGRAMAS DAS CORRIDAS CROMATOGRÁFICAS DO AA UTILIZADO NO PREPARO DAS FORMULAÇÕES (A), DA NANOEMULSÃO (B), DA MCAA (C) E DA MCC (D)



APÊNDICE C – REGRESSÕES LINEARES DOS MODELOS CINÉTICOS PARA A LIBERAÇÃO *in vitro* DE AA A PARTIR DA MCAA EM pH 7,4



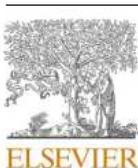
APÊNDICE D – REGRESSÕES LINEARES DOS MODELOS CINÉTICOS PARA A LIBERAÇÃO *in vitro* DE AA A PARTIR DA MCAA EM pH 6,8



APÊNDICE E - PRODUÇÃO CIENTÍFICA RELACIONADA À DISSERTAÇÃO

Artigo Publicado

International Journal of Biological Macromolecules 296 (2025) 139616



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijbiomac



Sodium hyaluronate microcapsules to promote antitumor selectivity of anacardic acid



Marlon E.P. Rosa^a, Louhana M. Rebouças^{a,b}, Samuel P.D. Marques^a, Larissa M.R. Silva^c, Fernando E.T. Cunha^c, Pedro M.S. Costa^d, David A. de Assis^a, Kamilla B. Silveira^e, Celli R. Muniz^f, Maria T.S. Trevisan^a, Cláudia Pessoa^d, Nágila M.P.S. Ricardo^{a,*}

^a Laboratory of Polymers and Materials Innovation, Department of Organic and Inorganic Chemistry, Federal University of Ceará, Campus of Pici, 60440-900 Fortaleza, CE, Brazil

^b Federal Institute of Education, Science and Technology of Ceará, 60410-426 Fortaleza, CE, Brazil

^c Department of Food Engineering, Federal University of Ceará, 60356-000 Fortaleza, CE, Brazil

^d Laboratory of Experimental Oncology, Center for Research and Drug Development, Federal University of Ceará, 60430-275 Fortaleza, CE, Brazil

^e Federal Institute of Education, Science and Technology of Sertão Pernambucano, 56316-686 Petrolina, PE, Brazil

^f Tropical Agroindustry Embrapa, 60511-110 Fortaleza, CE, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Microcapsules
Anacardic acid
Sodium hyaluronate
Anticancer

ABSTRACT

Anacardic acid (AA) is a phenolic lipid extracted from cashew nutshell liquid that has antitumor activity. Given the high hydrophobicity of this compound and aiming to create efficient vehicle for its administration in aqueous systems, the objective of the present work was to develop a microcapsule (MCAA) by spray dryer technique, based on the polysaccharide sodium hyaluronate (SH), containing AA as its core, encapsulated from nano-emulsion. The Encapsulation Efficiency of MCAA presented value equal to 95.06 ± 1.22 %. *In vitro* release kinetic study showed a pH-responsive release, with greater release of AA from MCAA at pH 6.8 and 7.4 and almost none at pH 4.5, which prevents its delivery to the cellular lysosome. Tests on zebrafish did not show acute toxicity within 96 h or change in locomotor activity. The IC₅₀ determined in the MTT assay for the formulation presented values of 30.1 and 29.8 µg mL⁻¹ in HCT-116 and HL-60 cells, respectively, and did not present a detectable IC₅₀ in the concentration range tested for non-tumoral L-929 cells. Thus, encapsulation with sodium hyaluronate polysaccharide allowed a reduced toxicity in these cells compared to non-encapsulated AA (IC₅₀ = 0.70 µg mL⁻¹, in L-929), maintaining the inhibition of cancer cell growth. These results suggest adverse effects reduction, making MCAA promising for future applications in antineoplastic therapies.

ROSA, MARLON E.P.; REBOUÇAS, LOUHANA M.; MARQUES, SAMUEL P.D.; SILVA, LARISSA M.R.; CUNHA, FERNANDO E.T.; COSTA, PEDRO M.S.; DE ASSIS, DAVID A.; SILVEIRA, KAMILLA B.; MUNIZ, CELLI R.; TREVISAN, MARIA T.S.; PESSOA, CLÁUDIA; RICARDO, NÁGILA M.P.S. Sodium hyaluronate microcapsules to promote antitumor selectivity of anacardic acid. INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES, v. 296, p. 139616, 2025.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.139616>

Patente depositada I



870230096843
 01/11/2023 13:59

 29409162310467967

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2023 022927 1

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): COMPOSIÇÃO E USO DE MICROCAPSULA À BASE DE ÁCIDO ANACÁRDICO DA CASTANHA DO CAJU E ÁCIDO HIALURÔNICO PARA APLICAÇÃO EM TERAPIA DE LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA E DE CÂNCER COLORRETAI

Resumo: A presente invenção trata-se de uma microcápsula polimérica à base de ácido anacárdico e ácido hialurônico para aplicação em terapia de leucemia promielocítica e de câncer colorretal, caracterizada por compreender: ácido hialurônico, ácido anacárdico, sílica hidrofilica, óleo de côco de Syagrus coronata e copolímero em bloco de polí(óxido de etileno) polí(óxido de propileno). Este sistema possui ação comprovada in vitro contra células de HL60 (leucemia promielocítica) e HCT-116 (câncer colorretal). Possuindo como diferencial a associação de um ativo derivado da castanha do caju, o ácido anacárdico em nanogotículas de óleo de Syagrus coronata, associado estrategicamente ao polissacarídeo ácido hialurônico para compor o sistema microencapsulado.

ROSA, M. E. P.; REBOUÇAS, L. M.; RICARDO, N. P. S.; RICARDO, NÁGILA MARIA PONTES SILVA; MAIA, D. S.; TREVISAN, M. T.; PESSOA, C.; PEDRO, M.S.C.; DANTAS, S. P.; TREVISAN, M. T. S. COMPOSIÇÃO E USO DE MICROCAPSULA À BASE DE ÁCIDO ANACÁRDICO DA CASTANHA DO CAJU E ÁCIDO HIALURÔNICO PARA APLICAÇÃO EM TERAPIA DE LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA E DE CÂNCER COLORRETAI. 2023, Brasil.

Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020230229271, título: "COMPOSIÇÃO E USO DE MICROCAPSULA À BASE DE ÁCIDO ANACÁRDICO DA CASTANHA DO CAJU E ÁCIDO HIALURÔNICO PARA APLICAÇÃO EM TERAPIA DE LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA E DE CÂNCER COLORRETAI", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 01/01/2023

Patente depositada II



República Federativa do Brasil
 Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
 Comércio e Serviços
 Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102023010669-2 A2

(22) Data do Depósito: 31/05/2023

(43) Data da Publicação Nacional:
10/12/2024

(54) Título: COMPOSIÇÃO E USO DE NANOEMULGEL ANTIFÚNGICO À BASE DE ÁCIDO ANACÁRDICO E ÁCIDO HIALURÔNICO PARA APLICAÇÃO TÓPICA

(51) Int. Cl.: A61K 36/88; A61K 31/192; A61K 31/728; A61K 9/06; A61P 31/10.

(52) CPC: A61K 36/88; A61K 31/192; A61K 31/728; A61K 9/06; A61P 31/10.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ.

(72) Inventor(es): NÁGILA MARIA PONTES SILVA RICARDO; DAVID ALVES DE ASSIS; DEYSE DE SOUSA MAIA; LÍVIA GURGEL DO AMARAL VALENTE SÁ; LOUHANA MOREIRA REBOUÇAS; HÉLIO VITORIANO NOBRE JÚNIOR; MARLON ERICK PEREIRA ROSA.

(57) Resumo: COMPOSIÇÃO E USO DE NANOEMULGEL ANTIFÚNGICO À BASE DE ÁCIDO ANACÁRDICO E ÁCIDO HIALURÔNICO PARA APLICAÇÃO TÓPICA. A presente invenção trata-se de um nanoemulgel para aplicação no tratamento de infecção fúngica caracterizado por compreender ácido hialurônico, água e nanoemulsão à base de ácido anacárdico hidrogenado ou não hidrogenado, óleo de semente de Syagrus coronata (óleo de Licuri), copolímero em bloco de poli(óxido de etileno) poli(óxido de propileno) e água. Este sistema possui óleos com ação comprovada in vitro contra *Candida albicans* e outros fungos. Possuindo como diferencial o uso de ativos originados da casca da castanha do cajú nanoestruturados na forma de gel antifúngico natural.

RICARDO, N. M. P. S.; RICARDO, N. M. P. S.; ASSIS, D. A.; ROSA, M. E. P.; REBOUÇAS, L. M.; NOBRE JUNIOR, H. V.; SA, L. G. A. V.; MAIA, D. S. COMPOSIÇÃO E USO DE NANOEMULGEL ANTIFÚNGICO À BASE DE ÁCIDO ANACÁRDICO E ÁCIDO HIALURÔNICO PARA APLICAÇÃO TÓPICA. 2023, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020230106692, título: "COMPOSIÇÃO E USO DE NANOEMULGEL ANTIFÚNGICO À BASE DE ÁCIDO ANACÁRDICO E ÁCIDO HIALURÔNICO PARA APLICAÇÃO TÓPICA", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 31/05/2023

Apresentação em evento científico



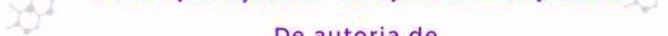
XIV SEMANA DA QUÍMICA VII WORKSHOP DA PÓS-GRADUAÇÃO

Inovando métodos, empreendendo soluções



Certificamos que o trabalho intitulado:

**Microcápsulas Polissacarídicas À Base De Ácido Anacárdico
Para Aplicação Em Terapia Antineoplásica**



De autoria de

**Marlon Erick Pereira Rosa, Louhana Moreira
Rebouças, Nágila Maria Pontes Silva Ricardo**

foi apresentado durante a **XIV Semana da Química e VII
Workshop da Pós-graduação em Química (UFC/Campus do
Pici)** nos dias 18 a 22 de setembro de 2023

Prof. Norberto de Kássio Vieira Monteiro
Coordenador geral da XIV SQ

