



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

ANTÔNIA CARLA DE JESUS OLIVEIRA

**OBTENÇÃO DE BIOPOLÍMERO MODIFICADO PARA SISTEMA DE
LIBERAÇÃO Anti-*Trypanosoma cruzi***

Recife – Pernambuco

2021

ANTÔNIA CARLA DE JESUS OLIVEIRA

**OBTENÇÃO DE BIOPOLÍMERO MODIFICADO PARA SISTEMA DE
LIBERAÇÃO Anti-*Trypanosoma cruzi***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Inovação Terapêutica.

Área de concentração: Fármacos, medicamentos e insumos essenciais para a saúde.

Orientadora: Prof^ª. Dr^a. Mônica Felts de La Roca Soares.

Coorientador: Prof^º. Dr. Jose Lamartine Soares Sobrinho.

Coorientadora: Prof^ª. Dr^a. Durcilene Alves da Silva.

Recife – Pernambuco

2021

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Oliveira, Antônia Carla de Jesus

Obtenção de biopolímero modificado para sistema de liberação *Anti-Trypanosoma cruzi* / Antônia Carla de Jesus Oliveira. - 2021.

106 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Mônica Felts de La Roca Soares.

Coorientadores: Prof. Dr. José Lamartine Soares Sobrinho, Profa. Dra. Durcilene Alves da Silva.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2021.

Inclui referências e apêndices.

1. Doença de chagas. 2. Doenças negligenciadas. 3. Farmacologia. I. Soares, Mônica Felts de la Roca (orientadora). II. Soares Sobrinho, José Lamartine (coorientador). III. Silva, Durcilene Alves da (coorientadora). IV. Título.

616.9363

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2021-180

ANTÔNIA CARLA DE JESUS OLIVEIRA

OBTENÇÃO DE BIOPOLÍMERO MODIFICADO PARA SISTEMA DE LIBERAÇÃO
Anti-Trypanosoma cruzi

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Inovação Terapêutica.

Aprovada em: 16/04/2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr. Dr. Jose Lamartine Soares Sobrinho (Coorientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Edson Cavalcanti Silva Filho (Examinador Externo)
Universidade Federal de Piauí

Prof^a. Dr^a. Silvia Stanisçuaski Guterres (Examinadora Externa)
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^o. Dr. Arnóbio Antônio da Silva Junior (Examinador Externo)
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Prof^o. Dr. Fabio Rocha Formiga (Examinador Externo)
Fiocruz – Pernambuco

À todas as pessoas que confiam na ciência.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me manter firme em todas as dificuldades enfrentadas até aqui!

Ao meu esposo **Cleyton Cunha**, por ser meu maior incentivador. A minha mãe **Antônia**, meu avô **Francisco Nere** e minhas tias **Maria e Expedita**, por serem meu porto seguro, por as orações e por entenderem a minha ausência.

A todos meus familiares pelo apoio que sempre me deram durante toda a minha vida.

Ao professor **Dr. José Lamartine** por toda a confiança, por nossas apostas (algumas não ganhei) e por sempre estar disposto a conversar sobre ciência. A professora **Dra. Mônica Soares** por todo incentivo e suporte dado para a realização desta pesquisa.

À professora **Dra. Durcilene Alves**, por me acompanhar desde a iniciação científica. Sou muito grata por todo conhecimento transmitido, por ter paciência comigo e por sempre estar disposta a fazer uma chamada de vídeo.

Ao professor **Dr. Edson Cavalcanti** por as valiosas contribuições dadas durante toda a minha vida científica.

Ao Professor **Dr. Fernando Hallwass** por toda a disponibilidade e as boas conversas sobre RMN.

À **Dra. Luíse Chaves** por toda disponibilidade, assistência e sugestões que engrandeceram este trabalho.

Ao Professor **Dr. Cesar Viseras** por todo acolhimento, colaboração e incentivo durante minha estada na **Universidad de Granada** (Granada – Espanha).

À **Fátima Garcia, Ana Borrego e Rita Espejo** pela ajuda e por todo suporte dedicado.

À **Thaís Cardoso** por todo acolhimento da chegada à saída de Recife e por todos os bons momentos compartilhados.

Ao **NCQMC**, onde esta pesquisa foi desenvolvida, pelo acolhimento. Aos bons amigos e companheiros de lab: **João Pontes, Yuri, Eliadna, Amanda, Renata, Taisa, Julia, Kayke, Ana Cristina, Emiliany (melhor IC do mundo), Dani, Izak, Dayane, Janira e Lucas** por todos os bons momentos compartilhados.

Aos Laboratórios **LTM-UFPE** e **NUDFAC-UFPE** por todo o suporte dado para a realização desta pesquisa.

À **Central analítica-UFPE** por as caracterizações realizadas, em especial a técnica **Eliete** por sempre ser tão solícita.

Ao laboratório **BIOTEC-UFDP** em especial **Fabio Ribeiro** e **Alyne Rodrigues** por as valiosas contribuições e amizade.

Ao laboratório **LIMAV-UFPI** pelas valiosas contribuições na execução dos experimentos apresentados neste estudo.

Ao professor **Dr. Klinger Rodrigues (UFDP)** por os ensaios de citotoxicidade.

Ao professor **Dr. Marcelo Sousa (UFRN)** e **Johny Wysllas** por os ensaios para *Trypanosoma cruzi*.

Aos amigos “los suricatos”, **Kiara, Jader, Brenda, Giovani, Mariana, Alana, Fernanda e Alex** por terem deixado Granada mais leve e divertida, mesmo em momentos tão difíceis. ¡Los guardo en mi corazón!

À **FACEPE** pelo auxílio financeiro.

À **UFPE**, aos professores e aos demais funcionários do Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, em especial **Paulo**, por todo o conhecimento repassado, dedicação e pela infraestrutura.

Gratidão a todos que direta e indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa.

RESUMO

A doença de Chagas, de acordo com a OMS, é considerada uma doença negligenciada e com altos índices de morbidade e mortalidade. O único fármaco disponível para o tratamento é o benznidazol (BNZ), com efeito terapêutico evidente na fase aguda, mas ineficaz na fase crônica. As demandas para melhorar a eficácia deste fármaco envolve o desenvolvimento de novos sistemas de liberação, tendo a produção de nanossistemas. Nesse contexto, o presente trabalho propõe o desenvolvimento de uma matriz polimérica para a produção de nanopartículas visando o carregamento do BNZ. A goma de cajueiro (GC) foi selecionada como matriz por possuir estrutura versátil. Ela foi modificada com o anidrido ftálico utilizando um reator de micro-ondas (MW). Foram obtidos três derivados de goma do cajueiro ftalada (GCF) e as características estruturais e físico-químicas foram investigadas por FTIR, GPC, análise elementar, RMN ^1H , grau de substituição, TG, DRX e solubilidade em fluido gástrico simulado (FGS) e água. O derivado GCF 1 foi utilizado como matriz para a obtenção de nanopartículas. Para otimização das propriedades do sistema, foi aplicado o desenho experimental de Plackett-Burman (DPB), no qual oito formulações foram produzidas com posterior avaliação das influências dos fatores como: quantidade de polímero, quantidade de fármaco, volume de fase aquosa e volume de solvente. Para esta triagem, as nanopartículas foram caracterizadas por DLS, potencial zeta, eficiência de encapsulação (EE) e *drug loading* (DL). Desta forma, foi observado que o tamanho de partícula, PDI, EE e DL, sofreram influência estatisticamente significativa. O potencial zeta não foi influenciado por nenhum dos fatores. A formulação 1, apresentou boas características, como alta EE $51,2 \pm 2,13\%$, DL de $25,6 \pm 1,06\%$, tamanho de $187,9 \pm 3,64$ nm, PDI de $0,24 \pm 0,015$ e potencial zeta de $-41,9 \pm 1,97$ mV, tornando-a uma boa escolha para o carregamento do BNZ. A formulação foi caracterizada por análise de FTIR, estabilidade em FGS e fluido intestinal simulado (FIG), ambos sem enzimas, em conjunto com a morfologia por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), ensaios de cinética e liberação *in vitro*. Atividade citotóxica foi avaliada frente a linhagem celular de macrófagos RAW 264.7 e a atividade anti-*T. cruzi* foi avaliada frente a cepa Y para as formas epimastigota e tripomastigota. As nanopartículas apresentaram boa estabilidade no FGS, contudo para o FIS foi observado aumento no tamanho e PDI das partículas corroborando com os dados de DLS e MEV. No estudo de liberação *in vitro* foi observado que em ambiente básico, as nanopartículas tendem a liberar maior percentual de BNZ, com adequação aos modelos cinéticos Peppas-Sahlin e Korsmeyer-Peppas para os fluidos gástrico e intestinal, respectivamente. As nanopartículas apresentaram excelente atividade antiparasitárias contra as formas epimastigota e tripomastigota, sem, no entanto,

apresentar citotoxicidade no ensaio correspondente. Com base nisso, a goma de cajueiro ftalada foi desenvolvida de forma eficiente apresentando-se como uma matriz biopolimérica inovadora com propriedades promissoras para a formação de nanopartículas visando o carreamento de BNZ. Além disso, tal sistema, se mostrou seguro e eficaz quanto ao efeito anti-*T. cruzi*, o que demonstra o desenvolvimento de uma potencial plataforma terapêutica.

Palavras-chave: Goma do cajueiro; Modificação química; Nanopartículas poliméricas; Doença de Chagas; Atividade anti-*T. cruzi*.

ABSTRACT

Chagas disease, according to the WHO, is considered a neglected disease with high rates of morbidity and mortality. The only drug available for treatment is benznidazole (BNZ), with an evident therapeutic effect in the acute phase, but ineffective in the chronic phase. The demands to improve the effectiveness of this drug involve the development of new delivery systems, having the production of nanosystems. In this context, the present work proposes the development of a polymeric matrix to produce nanoparticles aiming at carrying the BNZ. Cashew gum (CG) was selected as a matrix because of its versatile structure. It was modified with phthalic anhydride using a microwave reactor (MW). Three phthalate cashew gum (PCG) derivatives were obtained, and the structural and physicochemical characteristics were investigated by FTIR, GPC, elemental analysis, ^1H NMR, degree of substitution, TG, XRD and solubility in simulated gastric fluid (SGF) and water. The PCG 1 derivative was used as a matrix to obtain nanoparticles. To optimize the system properties, the Plackett-Burman (DPB) experimental design was applied, in which eight formulations were produced with subsequent evaluation of the influences of factors such as: polymer amount, drug amount, aqueous phase volume and volume of solvent. For this screening, the nanoparticles were characterized by DLS, zeta potential, encapsulation efficiency (EE) and drug loading (DL). Thus, it was observed that the particle size, PDI, EE and DL, suffered a statistically significant influence. The zeta potential was not influenced by any of the factors. Formulation 1 had good characteristics, such as high EE $51.2 \pm 2.13\%$, DL of $25.6 \pm 1.06\%$, size of 187.9 ± 3.64 nm, PDI of 0.24 ± 0.015 and zeta potential of -41.9 ± 1.97 mV, making it a good choice for BNZ loading. The formulation was characterized by FTIR analysis, stability in SGF and simulated intestinal fluid (SIF), both without enzymes, together with scanning electron microscopy (SEM) morphology, kinetic and *in vitro* release assays. Cytotoxic activity was evaluated against RAW 264.7 macrophage cell line and anti-*T. cruzi* was evaluated against strain Y for epimastigote and trypomastigote forms. The nanoparticles showed good stability in the SGF, however for the SIF an increase in the size and PDI of the particles was observed, corroborating with the DLS and MEV data. In the *in vitro* release study, it was observed that in a basic environment, nanoparticles tend to release a higher percentage of BNZ, with adaptation to the Peppas-Sahlin and Korsmeyer-Peppas kinetic models for gastric and intestinal fluids, respectively. The nanoparticles showed excellent antiparasitic activity against epimastigote and trypomastigote forms, without, however, showing cytotoxicity in the corresponding assay. Based on this, the phthalate cashew gum was efficiently developed, presenting itself as an innovative biopolymer matrix with promising

properties for the formation of nanoparticles aimed at carrying BNZ. Furthermore, this system proved to be safe and effective in terms of its anti-*T. cruzi*, which demonstrates the development of a potential therapeutic platform.

Keywords: Cashew gum; Chemical modification; Polymeric nanoparticles; Chagas disease; Anti-*T. cruzi* activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Transmissão vetorial e ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
Figura 2 –	Estrutura do benznidazol usado contra doença de Chagas.....	23
Figura 3 –	Sistemas de liberação pesquisado para o BNZ.....	24
Figura 4 –	Exsudato obtido do Cajueiro (A e B) e Goma do Cajueiro (C).....	29
Figura 5 –	Fragmento estrutural da goma do cajueiro.....	30
Figura 6 –	Esquema simplificado de modificação da goma do cajueiro ftalada.....	49
Figura 7 –	Espectros de FTIR de (A) GC, (B) GCF 1, (C) GCF 2 e (D) GCF 3.....	50
Figura 8 –	¹ H espectros de RMN de (A) GC, (B) GCF 1, (C) GCF 2 e (D) GCF 3.....	52
Figura 9 –	Curvas termogravimétricas (A) e curvas derivadas (B) da goma de cajueiro e derivados ftalados.....	54
Figura 10 –	Padrões de DRX de (A) anidrido ftálico, (B) GC, (C) GCF 1, (D) GCF 2 e (E) GCF 3.....	55
Figura 11 –	Imagem 3D por Microscopia de Força Atômica das nanopartículas carregadas com benznidazol (A-B) e nanopartículas brancas (C-D). Imagens com tamanhos de 10 e 2 µm e resolução de 512 pixels.....	58
Figura 12 –	Perfil de liberação <i>in vitro</i> das nanopartículas carregadas com benznidazol e benznidazol livre no fluido gástrico simulado.....	59
Figura 13 –	Gráficos de Pareto mostrando a significância das variáveis para (A) tamanho de partícula, (B) índice de polidispersão, (C) potencial zeta, (D) eficiência de associação e (E) <i>drug loading</i> . Os efeitos foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$, nível de confiança de 95%.....	71
Figura 14 –	Espectros de FTIR (A) GCF, (B) NP-BNZ e (C) BNZ.....	74
Figura 15 –	Morfologia das nanopartículas (A) NP-BNZ, (B) NP-GCF, (C) NP-BNZ em FGS e (D e E) NP-BNZ em FIS.....	77
Figura 16 –	Perfil de liberação da NP-BNZ e BNZ livre em fluido gástrico simulado e fluido intestinal simulado.....	79

- Figura 17 – Efeito da (A) GCF, (B) NP-GCF, (C) NP-BNZ e (D) BNZ sobre a viabilidade de macrófagos RAW 264,7 em 48 h de exposição. Os dados correspondem à média $\pm$ e.p.m ($n = 3$), analisados por *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, sendo *** $p < 0,001$ 81
- Figura 18 – Efeito no percentual de inibição (A) forma epimastigota e (B) forma tripomastigota em 24 h de exposição. Os dados correspondem à média $\pm$ e.p.m ($n = 3$), analisados por *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, sendo * $p < 0,001$ 83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Sistemas nanoestruturados para DC.....	26
Tabela 2 –	Modificações químicas realizadas na estrutura da GC.....	35
Tabela 3 –	Modificações químicas em polissacarídeos por radiação micro-ondas.....	38
Tabela 4 –	Peso molecular, GS e dados de análise elementar da GC e derivados ftalados.....	51
Tabela 5 –	Coeficiente de solubilidade e tempo de relaxamento T_2 da GC e derivados ftalados.....	55
Tabela 6 –	Fatores experimentais e seu nível.....	64
Tabela 7 –	Layout e respostas observadas das formulações a partir DPB.....	70
Tabela 8 –	Dados da análise de regressão para as respostas consideradas Y_1 – Y_5	74
Tabela 9 –	Dados de estabilidade das NP-BNZ em fluido gástrico e intestinal simulado.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BNZ	Benznidazol
CIM	Concentração inibitória mínima
DC	Doença de Chagas
<i>DL</i>	<i>Drug loading</i>
DMF	Dimetil formamida
DNDi	<i>Iniciativa</i> Medicamentos para Doenças Negligenciadas
DOE	<i>design</i> de experimentos
DRX	Difração de raios-X
DSS	Dodecil sulfato de sódio
ϵ'	Constante dielétrica
ϵ''	Perda dielétrica
FGS	Fluido gástrico simulado
FIS	Fluido intestinal simulado
FTIR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
GC	Goma de cajueiro
GS	Grau de substituição
GCF	Goma do cajueiro fitalada
GPC	Cromatografia de permeação em gel
LAFEPE	Laboratório Farmacêutico do Estado Pernambuco
MW	Micro-ondas
OMS	Organização Mundial de Saúde
DPB	<i>design</i> de Plackett-Burman
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
T ₂ H	Relaxamento transversal
tan δ	Tangente de perda

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	OBJETIVOS	18
1.1.1	Objetivo Geral	18
1.1.2	Objetivos Específicos.....	18
2	REFERENCIAL TEÓRICO	19
3	MÉTODO	41
4	RESULTADOS	42
4.1	ARTIGO 1 – SÍNTESE RÁPIDA POR MICRO-ONDAS DE GOMA DE CAJUEIRO FTALADA PARA SISTEMA DE ADMINISTRAÇÃO DE FÁRMACOS.....	42
4.2	ARTIGO 2 – DESIGN DE NANOPARTÍCULAS DE GOMA DO CAJUEIRO FTALADA CARREGADAS COM BENZNIDAZOL E EFICÁCIA Anti- <i>Trypanosoma cruzi</i>	61
5	CONCLUSÃO.....	85
	REFERÊNCIAS	86
	APÊNDICE A – LISTA DE PUBLICAÇÕES.....	105

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas (DC) mesmo após cem anos do seu descobrimento ainda é considerada um problema de saúde pública, sendo classificada de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma enfermidade negligenciada e de notificação compulsória (DIAS et al., 2016).

Apesar de sua incidência ter diminuído por conta de campanhas de saúde pública para erradicação do vetor, a DC é um importante problema em países latino-americanos e o número de infectados ainda é expressivo no contexto sanitário e social, necessitando de atenção e prioridade nesses países considerados endêmicos (GÓMEZ, GUTIERREZ e PEÑUELA, 2019). Devido à migração em grande escala de latino-americanos nas últimas décadas, a DC também se tornou um importante problema de saúde em países desenvolvidos, considerados não endêmicos tais como: Austrália, Canadá, Japão, Espanha e Estados Unidos (MEDEI et al., 2008; NUNES et al., 2013; ANTINORI et al., 2017).

A DC é conhecida como tripanossomíase americana e apresenta os quadros clínico com fase aguda e crônica, contudo é comum que os pacientes sofram de sintomas inespecíficos ou sejam clinicamente assintomáticos, o que promove um dos grandes desafios onde 80% das pessoas atingidas pela doença no mundo não possuem acesso ao diagnóstico e tratamento, o que ocasiona elevado impacto de morbimortalidade e o custo social da enfermidade (DIAS et al., 2016). Para o tratamento da doença, apenas dois fármacos estão disponíveis o nifurtimox, que não é comercializado no Brasil e em alguns países devido a sua alta toxicidade e o benznidazol (BNZ), que é produzido pelo Laboratório Farmacêutico do Estado Pernambuco (LAFEPE) (BONATI e CONFALONIERI, 2012).

O BNZ é o medicamento antiparasitário utilizado da linha de frente para tratamento da doença, no entanto, o seu potencial terapêutico é limitado devido suas características físico-químicas, especialmente por sua baixa solubilidade, que implica numa baixa permeabilidade ocasionando baixa atividade antiparasitária na fase crônica. Além do que, na fase aguda é necessário um tratamento com altas doses o que ocasiona diversos efeitos colaterais que levam ao abandono da terapia (SOARES-SOBRINHO et al., 2012; SCARIM, et al., 2018; RIBEIRO et al., 2020). Nesse contexto, surge a necessidade do desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos com o BNZ, visando superar as limitações físico-químicas e melhorar sua permeabilidade.

Uma das tecnologias que vem sendo bastante estudada é a produção de nanocarreadores aplicado a área de tecnologia farmacêutica. Estes carreadores têm demonstrado efeitos

positivos, na modulação da liberação de fármacos e na entrega direcionada a sítios específicos (VERMA et al., 2013).

Materiais de origem, particularmente polissacarídeos, tem sido bastante empregados como plataforma para entrega de fármacos, pois apresentam vantagens tais como, biodegradáveis, biocompatíveis, baixa toxicidade, além de oferecerem um ambiente que promovem melhor estabilidade física e química para os fármacos (LIU, WILLFÖR e XU, 2015). Nesse contexto, os polissacarídeos provenientes de exsudatos de plantas como a goma do cajueiro (GC), possuem uma estrutura passível de modificações químicas (RIBEIRO et al., 2016). Tais modificações proporcionam diversas alternativas do ponto de vista físico-químico, tornando-o um material atrativo para futuras aplicações, dentre elas na área farmacêutica (DIAS et al., 2016; SILVA et al., 2018).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como proposta modificar a goma do cajueiro com anidrido ftálico sob irradiação de micro-ondas, e assim obter novo biomaterial com caráter anfífilico e com aplicações na área de tecnologia farmacêutica no desenvolvimento de nanopartículas poliméricas para o carregamento do fármaco antichagásico benznidazol.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Desenvolver novo sistema nanoestruturado para a liberação do fármaco benznidazol, utilizando como matriz polimérica a goma do cajueiro modificada com anidrido ftálico.

1.1.2 Objetivos específicos

- Modificar a goma do cajueiro por meio de reação de ftalação utilizando micro-ondas;
- Caracterizar a goma de cajueiro ftalada pelas técnicas: espectroscopia na região de infravermelho (FTIR), cromatografia de permeação em gel (GPC), análise elementar, espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN ^1H), grau de substituição, análise térmica, difração de raio-X, solubilidade em meio aquoso;
- Desenvolver nanopartículas poliméricas utilizando como matriz a goma ftalada para a liberação benznidazol, fazendo uso ferramentas de desenho experimental;
- Caracterizar e avaliar a influência dos parâmetros tais como, tamanho hidrodinâmico, potencial zeta, índice de polidispersão, eficiência de encapsulação e *drug loading*, no monitoramento de formação das nanopartículas;
- Avaliar a estabilidade e morfologia das nanopartículas frente ao fluido gástrico simulado e fluido intestinal simulando. Avaliar perfil e a cinética de liberação das nanopartículas;
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* das nanopartículas;
- Avaliar a eficácia das nanopartículas frente aos ensaios *in vitro* contra as formas epimastigota e tripomastigota do *Trypanosoma cruzi*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 DOENÇA DE CHAGAS: EPIDEMIOLOGIA E TRANSMISSÃO

A DC é enfermidade considerada negligenciada, de notificação compulsória, e continua sendo um importante problema social e de saúde pública na América Latina e Central (KROPF, AZEVEDO e FERREIRA, 2000). Em paralelo as outras doenças tropicais negligenciadas, segundo a OMS, este tipo de enfermidade afeta populações com baixa visibilidade, pouca voz política e possui considerável impacto na morbidade e mortalidade (WHO, 2021).

Embora a DC seja endêmica da América Latina, onde afeta cerca de 5 a 7 milhões de pessoas, agora é uma doença de preocupação global principalmente devido ao movimento migratórios e tem se tornado um importante problema de saúde nos EUA, Canadá, Japão e na Europa, a maioria dos migrantes estão concentrados na Espanha, Itália, França, Reino Unido e Suíça (COURA e DIAS, 2009; ARZANEGUI et al., 2013; MUÑOZ-VILCHES et al., 2012; EDWARDS et al., 2015; NAVARRO et al., 2017). No panorama de investimento para a DC no ano de 2018 foi investido cerca de 21 milhões de dólares, esse valor foi distribuído nos segmentos de pesquisa básica, fármacos, vacina, diagnóstico e produtos de controle ao vetor (CHAPMAN et al., 2019).

No contexto histórico a DC foi descoberta em 1907 pelo médico brasileiro Carlos Chagas, é causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909). A transmissão vetorial é a forma de contágio mais comum nas regiões rurais da América Latina, estima-se que esse meio de transmissão seja responsável por aproximadamente 80% das infecções, e essa via de transmissão é intermediada por insetos vetores pertencem à subfamília Triatominae, que se alimenta do sangue de uma variedade de hospedeiros que varia de mamíferos a anfíbios (DIAS et al., 2016; SANTOS et al., 2020). Além da via vetorial, o *T. cruzi* pode ser transmitido por transfusão de sangue, transplante de órgãos, por via congênita, inoculação acidental em trabalhadores de laboratório ou transmissão oral pelo consumo de alimentos ou bebidas contaminados por fezes de insetos, com surtos epidêmicos ocasionais (CÓRDOBA-AGUILAR, 2020; RIOS et al., 2020).

No contexto nacional e de acordo com os dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), a transmissão oral vem ganhando relevância epidemiológica e é considerada uma das mais importantes vias de infecção no Brasil. A região Norte é a mais acometida com surtos relacionados pelo alto consumo de açaí (BARBOSA et al., 2018; SANTOS et al., 2020).

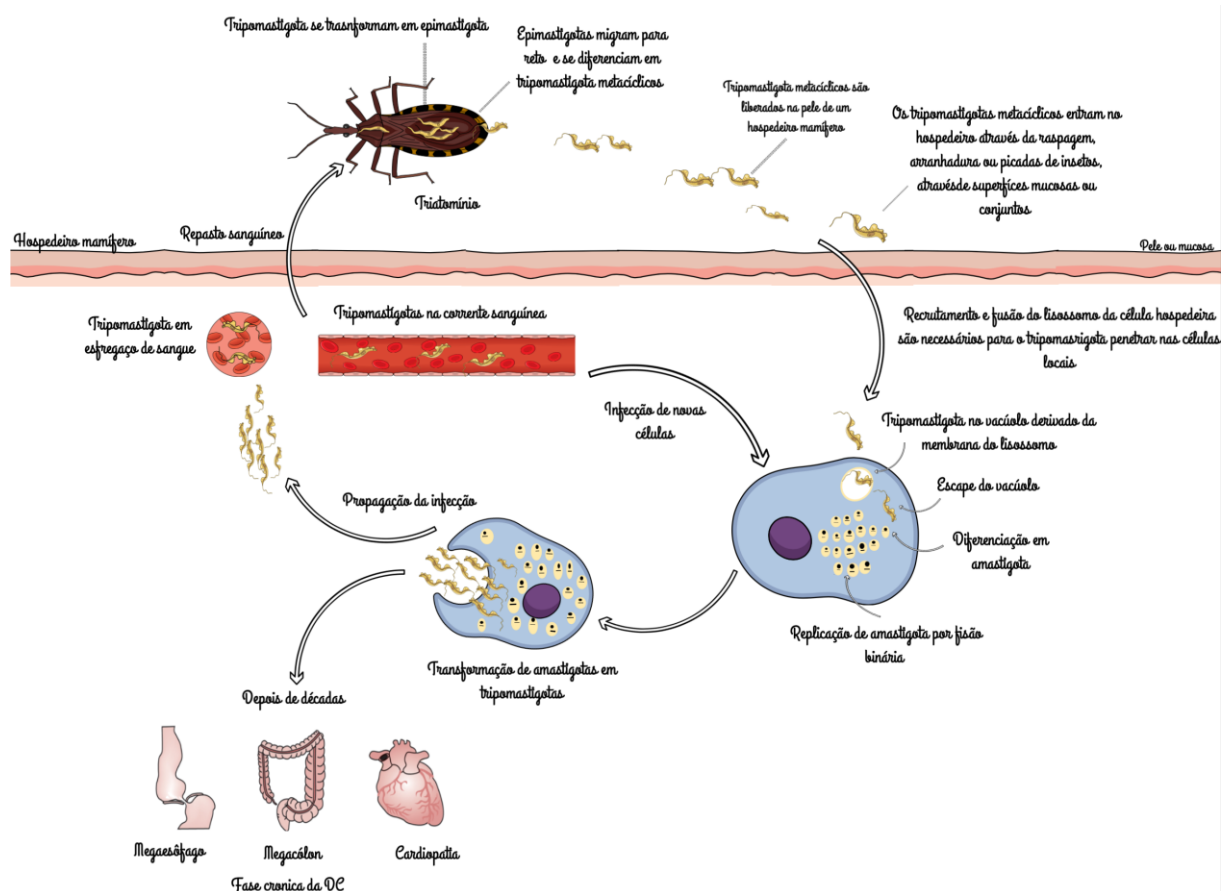
Em nível mundial este tipo de contaminação também tem ocorrido e um caso grave de contaminação oral, sucedeu-se em uma escola em Caracas na Venezuela, na qual ocorreram

103 casos de DC aguda entre crianças e adultos infectados após o consumo de suco de goiaba contaminado. Os achados clínicos observados nas pessoas infectadas foram, edema facial, gengivite e tosse seca, provavelmente em consequência da penetração do parasita em toda a cavidade oral, lábios ou mucosa faríngea. Sinais inespecíficos como febre, cefaleia e mialgias, também foram predominantemente observado (NOYA et al., 2010).

O *T. cruzi* apresenta um ciclo de vida bastante complexo, com vários estágios de desenvolvimento no inseto e no hospedeiro mamífero (Figura 1), sendo que cada uma fornece ao parasita certas vantagens adaptativa (DE SOUZA e BARRIAS, 2020; CÓRDOBA-AGUILAR, 2020). Na forma de transmissão vetorial, parte do ciclo vital do protozoário ocorre no vetor triatomíneo que durante o repasto sanguíneo, ingere as formas tripomastigotas de um hospedeiro mamífero infectado e uma vez no intestino médio do vetor se transformam nas formas epimastigotas que são capazes de se dividir, e subsequentemente, as epimastigotas migram para o reto para se tornarem tripomastigotas metacíclicos e são depositados com as fezes do vetor durante as refeições de sangue subsequentes (RASSI JR, RASSI e MARIN-NETO, 2010).

A transmissão para o novo hospedeiro ocorre à medida que os insetos se alimentam, e defecam na pele do hospedeiro e o parasita pode entrar através da lesão na pele, mucosa ou conjuntiva (PÉREZ-MOLINA et al., 2015). Uma vez dentro do corpo, eles são fagocitados pelos macrófagos no tecido celular subcutâneo no local da infecção. No citosol desse tecido eles se diferenciam em amastigotas. As formas amastigotas são capazes de se replicar por fusão binária, e de se transformarem em tripomastigotas e provocar ruptura celular, na qual se disseminam através dos vasos linfáticos e da corrente sanguínea para encontrar novas células a serem invadidas (SILVA-NETO et al., 2010). Embora qualquer célula de mamífero possa ser parasitada por estes organismos, eles apresentam tropismo por as células cardíacas, esôfago e colón (CLAYTON, 2010; STANAWAY e ROTH, 2015).

Figura 1 – Transmissão vetorial e ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: Adaptado de RASSI JR, RASSI e MARIN-NETO, (2010).

2.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A doença de Chagas pode se manifestar em 2 fases, cada uma apresentando diferentes síndromes clínicas.

A fase aguda dura aproximadamente de 4 a 8 semanas e é frequentemente assintomática ou não reconhecida devido aos sintomas inespecíficos, embora haja um alto nível de parasitemia detectável microscopicamente, no entanto, esta diminui substancialmente a partir de 90 dias (MALIK, SINGH e AMSTERDAM, 2015). A lesão inicial depende de onde o parasita entra no corpo, e os sinais e sintomas incluem o sinal de Romaña (dificulta a abertura das pálpebras e causa secreção conjuntival limitada) e chagoma (um nódulo subcutâneo elevado e moderadamente doloroso) (DIAS et al., 2016). Esses sinais podem vir acompanhados por linfonodos locais aumentados e febre que pode durar várias semanas. Outros sintomas agudos incluem mal-estar, anorexia, hepatoesplenomegalia e linfadenopatias generalizadas (APT B et al., 2008; ÁLVAREZ-HERNÁNDEZ et al., 2016). Cerca de 5% das pessoas podem apresentar

fase aguda grave que predominantemente ocorre em crianças com menos 5 anos de idade, idosos e imunossuprimidos. Esta forma mais grave inclui miocardite fulminante resultando em uma ampla gama de anormalidades eletrocardiográficas e ecocardiográficas, e até mesmo morte secundária à insuficiência cardíaca congestiva (RASSI JR, RASSI e MARIN-NETO, 2010).

Se não forem tratados os sintomas da infecção aguda tendem se resolver espontaneamente ao longo de meses. Quando isso acontece, o paciente entra na fase indeterminada da DC, caracterizada por parasitemia indetectável, pois os parasitas passam a invadir os tecidos-alvo. Anticorpos específicos contra o *T. cruzi* se desenvolvem, e a maioria dos pacientes não desenvolvem sintomas ou comprometimento cardíaco ou digestivo (PÉREZ-MOLINA e MOLINA, 2018).

Aproximadamente 30 – 40% dos pacientes que estão na fase indeterminada podem avançar para a fase crônica, e manifestações específicas podem se desenvolver, ou seja, cardíaca e digestiva (megaesôfago e megacólon) ou cardiodigestiva, com baixos níveis de parasitemia flutuante, essas manifestações geralmente pode ocorrer 10 a 30 anos após a infecção inicial (Figura 1) (MATSUDA, MILLER e EVORA, 2009).

Na cardiopatia chagásica crônica, uma miocardite de baixa intensidade, lentamente progressiva e incessante leva ao comprometimento da função contrátil e à dilatação de todas as quatro câmaras do coração. Os exames histológicos mostram destruição generalizada de células miocárdicas, fibrose difusa, edema, infiltração de células mononucleares do miocárdio. A morte súbita é a principal causa de morte em pacientes com cardiopatia chagásica, seguida por insuficiência cardíaca refratária e tromboembolismo (TANOWITZ et al., 2009; NUNES et al., 2013; ECHAVARRÍA et al., 2019; CALDAS et al., 2019).

A doença gastrointestinal crônica é causada pela destruição dos gânglios autônomos intramurais, que afeta predominantemente o esôfago, o cólon ou ambos. No caso do esôfago leva à hipertrofia das camadas musculares e a perda progressiva da capacidade contrátil, isso resulta em dilatação e alongamento esofágico. Já no cólon resulta em disfunção motora e dilatação, causando distúrbios de absorção e secreção, se manifestando através de distensão abdominal, constipação progressiva, obstrução intestinal e isquemia (CARVALHO, GOLDENBERG e CARVALHO, 2017; MILLS, 2020).

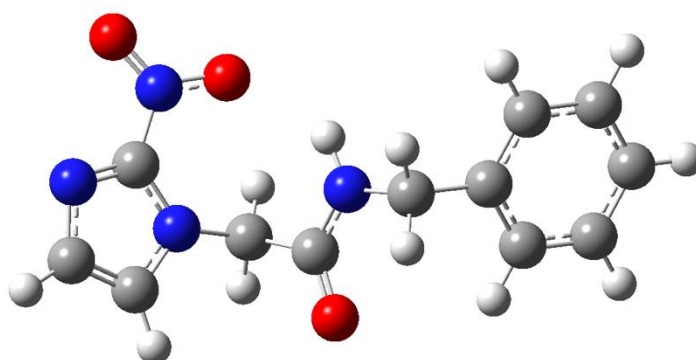
2.3 TRATAMENTO

2.3.1 Benznidazol

Os únicos fármacos disponíveis para a DC, são BNZ e nifurtimox (NFX), ambos lançados no início da década de 1970, são relativamente tóxicos e requerem administração prolongada (ANTUNES et al., 2016; URBINA, 2010). O BNZ é geralmente preferido ao NFX por causa de seu melhor perfil de tolerabilidade, penetração no tecido e, possivelmente, eficácia. O NFX teve o uso descontinuado no Brasil devido aos efeitos colaterais severos (BERMUDEZ et al., 2016).

O BNZ (Figura 2), é um derivado de 2-nitroimidazol que apresenta baixa solubilidade (SOARES-SOBRINHO et al., 2012). Diferentes mecanismos de ação são atribuídos ao BNZ. Um dos mecanismos pode ser atribuído a redução do grupo nitro ($-\text{NO}_2$) em grupo amina ($-\text{NH}_2$), por meio de enzimas nitroredutoras do tipo I presentes no parasita, essa redução promove a formação de espécies reativas de oxigênio e metabólitos eletrofílicos que promove o efeito tripanocida por fazer ligações covalentes com moléculas que são vitais para o parasita. Além disso, o BNZ pode aumentar a fagocitose e a lise do parasita e inibir o seu crescimento pela ação da enzima fumarato redutase-NADH (CAMPOS et al., 2017; SCARIM et al., 2018; MÜLLER KRATZ, 2018).

Figura 2 – Estrutura do benznidazol.



Fonte: Elaborado pelo autor.

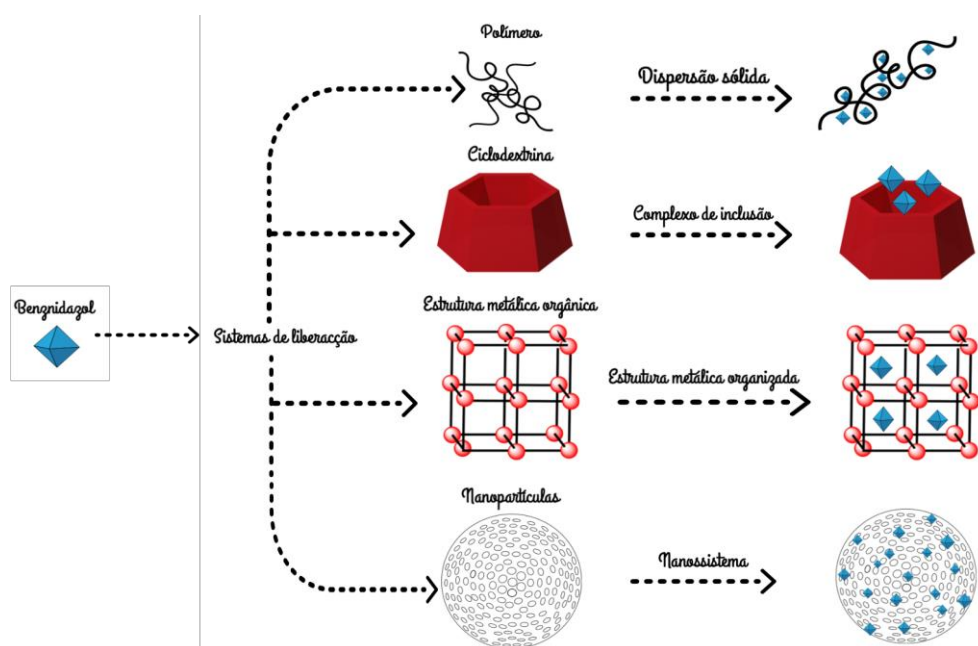
Para o tratamento recomenda-se que o BNZ seja administrado por via oral durante 60 dias, com doses de 5–7 mg/kg para adultos e 10 mg/kg para crianças (BERMUDEZ et al., 2016). Comercialmente o BNZ está disponível na forma de comprimidos de 100 mg para adultos e 12,5 mg para recém-nascidos e crianças até aos 2 anos de idade. Esta última apresentação foi registrada em 2011 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), resultado de uma

parceria entre o LAFEPE e a *iniciativa* Medicamentos para Doenças Negligenciadas (DNDi) (DNDi, 2011).

O BNZ é eficaz para infecções agudas, no entanto para os casos crônicos possui baixa efetividade. A baixa solubilidade, combinada a um tratamento de altas doses por um longo período de tempo, desencadeia reações adversas que incluem alergias na pele, supressão medula da óssea, dor abdominal, dor de cabeça, neuropatia periférica e insuficiência do fígado e dos rins (BOSQUESI et al., 2008; PONTES et al., 2010). A baixa solubilidade também afeta sua biodisponibilidade, diminuindo sua eficácia durante a fase crônica da infecção, quando os parasitas estão localizados principalmente nas células do músculo cardíaco, esôfago e colón (RASSI JR, RASSI e MARIN-NETO, 2010).

Diferentes estratégias, como, complexos de inclusão, dispersões solidas, estruturas orgânicas de metal e nanossistemas estão sendo buscados para superar a toxicidade e melhorar a permeabilidade do BNZ, isso porque a sua atividade em humanos não foi superada por nenhum outro antichagásico, a busca por novos sistemas de liberação seria em princípio uma decisão acertada (SOARES-SOBRINHO et al., 2012; MORILLA e ROMERO, 2015; MOURA FERRAZ et al., 2018). A Figura 3 resume os principais sistemas de liberação pesquisado para o BNZ.

Figura 3 – Sistemas de liberação pesquisados para o BNZ.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Dentre os principais sistemas de liberação apresentados, a nanotecnologia farmacêutica tem-se apresentado como potencial ferramenta para o tratamento dessa enfermidade, isso porque, são excelentes opções para incorporação de fármacos insolúveis, bem como o seu uso pode direcionar os agentes terapêuticos para o local da infecção e assim reduzir efeitos adversos no paciente (PRAYAG et al., 2020; SANTOS RAMOS et al., 2020; MOSQUEIRA, MAZZETI e BAHIA et al., 2021).

2.3.2 Nanotecnologia para DC

No que diz respeito às propriedades físico-químicas do BNZ, a nanotecnologia oferece estratégias inovadoras baseadas na redução do tamanho das partículas, para superar os problemas de solubilidade e permeabilidade. Uso desta tecnologia pode promover melhorias nas características biofarmacêuticas do BNZ, incluindo solubilidade aquosa, taxa de dissolução, biodistribuição, estabilidade durante a circulação do hospedeiro, biodisponibilidade, mecanismos de absorção, especificidade, eficácia e liberação modificada (MORILLA e ROMERO, 2015; ARRÚA et al., 2019; SANTOS RAMOS et al., 2020).

A baixa solubilidade aquosa dos fármacos promove resistência na sua dissolução no trato gastrointestinal (GI), resultando em baixa biodisponibilidade e baixa permeabilidade. O uso de plataformas de entrega de fármacos oferece uma oportunidade para melhorar eficiência de liberação dos fármacos administrados por via oral (ISLAN et al., 2017).

O uso das nanopartículas em geral oferecem imensos benefícios, tais como solubilização de ativos hidrofóbicos, melhoria na biodisponibilidade e proteção do fármaco da degradação física, química ou biológica (CRUCHO, BARROS, 2017). Além disso, esses sistemas permitem uma melhor interação entre as barreiras biológicas permitindo assim a entrega eficiente dos agentes terapêuticos para os locais alvo (DATE, JOSHI e PATRAVALE, 2007).

Diferentes formas de nanopartículas tem sido aplicadas nos sistemas de liberação de fármacos para as mais diversas doenças negligenciadas, como por exemplo lipossomas (VALLE et al., 2017), dendrímeros (GONZÁLEZ et al., 2018), nanopartículas lipídicas solidas (VIEIRA et al., 2018) e um grupo que vem se destacando são as nanopartículas poliméricas (CHAVES et al., 2018).

As nanopartículas poliméricas tem atraído bastante atenção e várias técnicas podem ser utilizadas para seu preparo, tais como como evaporação de solvente, diálise, nanoprecipitação e *salting-out* (RAO e GECKELER, 2011). O método de evaporação de solvente é bastante eficiente e consiste na solubilização do polímero na fase orgânica e depois essa fase é

emulsionada na fase aquosa (podendo ou não usar surfactante) sob alta velocidade ou ultrassom. A suspensão de nanopartículas é formada pela evaporação do solvente (CHAVES et al., 2017).

Uma outra vantagem na produção das nanopartículas é que tanto polímeros sintéticos como polímeros naturais podem ser utilizados e o uso dessas matrizes apresentam benefícios tais com, biodegradabilidade e biocompatibilidade (CRUCHO e BARROS, 2017).

Devido à falta de novos medicamentos para as doenças negligenciadas, a nanobiotecnologia tem surgido como um importante avanço para auxiliar o tratamento dessas doenças. O desenvolvimento de novos nanocarreadores têm tido efeito positivo e promissor no tratamento de vários tipos de doenças (ISLAN et al., 2017). Como o BNZ não é o fármaco ideal devido à sua toxicidade e baixa solubilidade em água, o uso da nanotecnologia tem sido particularmente desejável devido melhorar tais características e assim promover melhor custo-efetividade, sucesso da terapia da DC e melhor qualidade de vida dos pacientes (ROMERO e MORILLA, 2010).

Na tabela 1 é mostrado os principais trabalhos envolvendo nanopartículas para liberação do BNZ.

Tabela 1 – Sistemas nanoestruturados para DC.

Estudo	Resultados	Autores
A atividade de nanopartículas de polietilcianoacrilato carregadas com alopurinol contra <i>T. cruzi</i>	- Estudos <i>in vitro</i> , utilizando culturas de epimastigotas, demonstraram aumentos consideráveis na atividade tripanocida das nanopartículas carregadas com alopurinol	(GONZÁLEZ-MARTÍN et al., 2000)
Foi avaliado atividade <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> do H2bdtc como um composto livre e encapsulado em nanopartículas lipídicas sólidas (SLN)	- As SLN de H2bdtc reduziu efetivamente a parasitemia em camundongos de forma mais eficiente do que o BNZ. - Houve diminuição da inflamação e lesões do fígado e do coração. A taxa de sobrevivência dos camundongos infectados com <i>T. cruzi</i> foi de 100%.	(CARNEIRO et al., 2014)
Eficácia das nanopartículas (P180) de BNZ	- Inibição do crescimento amastigota em miócitos cardíacos primários - Todos os animais sobreviveram à infecção aguda com 15 doses de 25 ou 50 mg/kg/dia de BNZ durante o ensaio	(SCALISE et al., 2016)
Produção nanopartículas catiônicas para melhorar a atividade biológica do BNZ	- Foi usado PMMA (poli metil-metacrilato) - Eficiência de encapsulação > 80% - Biocompatibilidade demonstrada para células renais normais	(SANTOS-SILVA et al., 2017)

Nanopartículas carregadas de ácido ursólico com poli-ε-caprolactona	- A comparação <i>in vivo</i> das nanopartículas com BNZ, mostrou que o BNZ foi mais efetivo na morte do <i>T. cruzi</i> - No entanto o BNZ apresentou hepatotoxicidade - A nanopartículas não causaram citotoxicidade aos fibroblastos	(ABRIATA et al., 2017).
Quitosana enxertada em nanopartículas de sílica mesoporosa para transporte de BNZ	- As nanopartículas apresentaram um efeito notável na inibição do crescimento do <i>T. cruzi</i>	(NHAVERNE et al., 2018).
Avaliação a citotoxicidade de nanopartículas de carbonato de cálcio carregadas com benznidazol	- As nanopartículas foram capazes de reduzir a viabilidade das formas epimastigota, tripomastigota e amastigota de <i>T. cruzi</i> com maior potência quando comparado com BZN - O mecanismo de morte celular induzido por BZN e as nanopartículas foi avaliado, indicando que ambas as substâncias causaram necrose e alteraram o potencial de membrana mitocondrial	(TESSAROLO et al., 2018)
Nanopartículas baseadas em Eudragit® RS PO e Eudragit® RL PO como uma abordagem conveniente para aumentar a taxa de dissolução do BNZ	- A análise térmica revelou que diminuição da cristalinidade do BNZ - Eficiência de encapsulação das partículas foi superior a 78% - A cinética liberação seguiu modelo de Higuchi	(SEREMETA et al., 2019)
Eficácia antichagásica de nanoemulsões biocompatíveis óleo-em-água carregadas com BNZ	- Monitoramento das interações de compostos (surfactantes, óleo e co-solventes) para produzir nanoemulsões - Atividade <i>in vitro</i> antiparasitária revelaram que todas as formulações testadas induziram uma melhoria extraordinária da eficácia do fármaco em comparação com o fármaco puro	(STRECK et al., 2019)
O estudo avaliou as propriedades dos copolímeros (PLGA e Eudragit® E PO) no desempenho de nanopartículas carregadas com BNZ.	- As nanopartículas de PLGA apresentaram maior EE, no entanto, as NPs com EUD forneceu uma taxa de liberação mais lenta e uma ligeira eficácia antitumoral. - A atividade biológica da formulação com EUD apresentou melhores resultados com as linhagens de células normais	(SANTOS-SILVA et al., 2019b)
O estudo explorou a funcionalização de nanopartículas (PMMA) com o ácido siálico (SA) e colesterol (Chol), carregadas com BNZ	- Todas as formulações exibiram um perfil de liberação lento e foram estáveis por mais de 6 semanas. - As formulações foram biocompatíveis em células renais normais - As nanopartículas funcionalizadas com Chol apresentou melhor efeito anticâncer em células de câncer cervical de carcinoma humano e câncer colorretal humano	(SANTOS-SILVA et al., 2019a)
Biossíntese nanopartículas de prata estabilizadas com xilana contra <i>T. cruzi</i> .	- Essa nanopartícula foi capaz de causar a morte da cepa Y do trypanosoma <i>T. cruzi</i> pelo mecanismo de necrose,	(BRITO et al., 2020)

Produção de nanopartículas à base de cúrcuma e sua eficácia isolada ou combinada com BNZ	- Administração oral de uma nanoformulação à base de cúrcuma e combinada com BNZ foi capaz de reduzir a carga parasitária do miocárdio, hipertrofia cardíaca, inflamação e fibrose em camundongos infectados com <i>T. cruzi</i> .	(HERNÁNDEZ et al., 2021)
--	--	--------------------------

Fonte: Elaborado pelo autor.

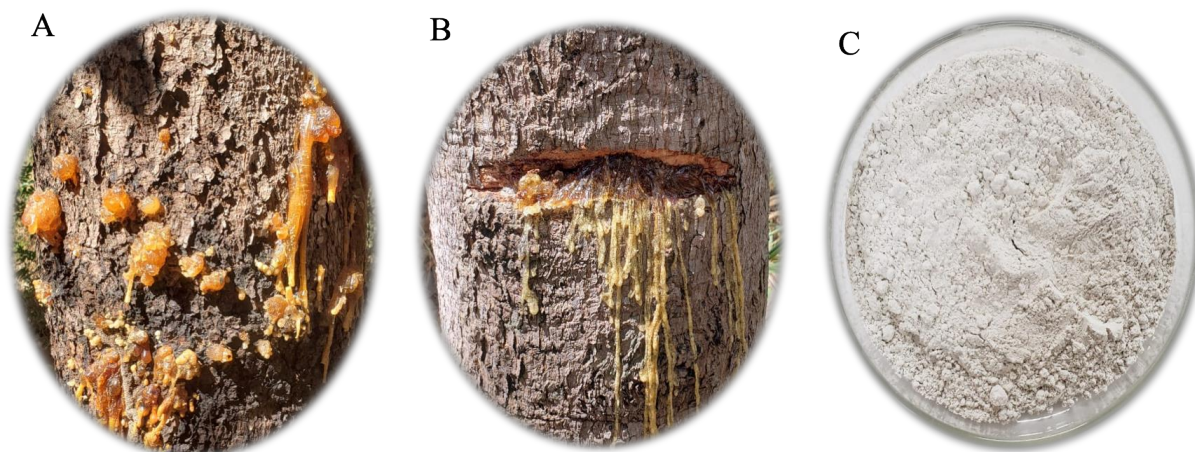
A produção de nanopartículas aplicadas para a quimioterapia da doença de chagas representa uma recente abordagem para melhorar a ação do BNZ, bem como para evitar os efeitos colaterais indesejáveis. Além disso, o uso desta abordagem propicia a utilização de matrizes que são biocompatíveis, biodegradáveis, proporcionam uma liberação controlada do fármaco e foi demonstrado a necessidade de uma menor concentração de BNZ para matar 50% das formas tripomastigotas de *T. cruzi*. No entanto, algumas limitações para esses sistemas precisam ser vencidas como, baixa capacidade de encapsulação, aglomeração de partículas, precipitação e recristalização do fármaco.

2.4 GOMA DO CAJUEIRO: PROPRIEDADES E APLICAÇÕES

2.4.1 Características gerais da goma do cajueiro

A goma de cajueiro (GC) (Figura 4 A) é um polissacarídeo de exsudato obtido de árvore *Anacardium occidentale* L., o processo de exsudação pode ocorrer naturalmente em resposta a agressões microbianas (Figura 4 A), por incisões feitas no tronco da árvore (Figura 4 B) ou por ataque químico, que consiste como mecanismo de proteção da árvore. O exsudato se apresenta no formato de resina, com a coloração tendendo do amarelo claro a âmbar (Figura 3) (OKOYE, ONYEKWELI e FATOKI, 2012).

Figura 4 – Exsudato obtido do Cajueiro (A e B) e Goma do Cajueiro (C).



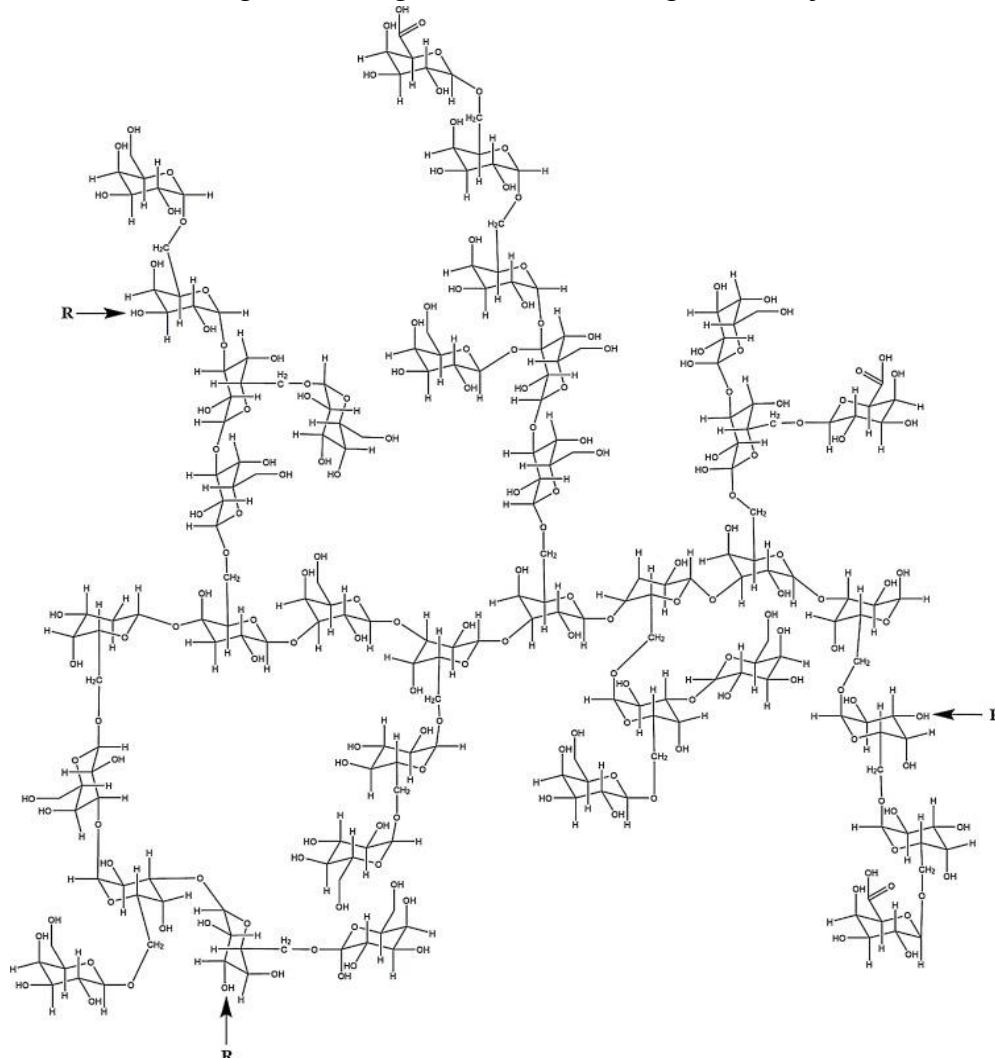
Fonte: Elaborado pelo autor.

O *Anacardium occidentale* L., popularmente conhecido como cajueiro é cultivado em muitos países de clima tropicais e subtropicais, no Brasil é nativo na região do nordeste e possui cerca de 465.426 hectares plantados (KUMAR et al., 2012; LIMA, MAIA e LIMA, 2013). Nos estudos de análise de composição da GC, foi observado que a do Brasil apresenta um maior conteúdo de galactose e menor teor de arabinose do que as gomas da Índia, Papua e Venezuela (ANDERSON e BELL, 1975; ANDERSON, BELL e MILLAR, 1974; DE PAULA, HEATLEY e BUDD, 1998).

A β -D-galactose (72%) é o principal açúcar presente na goma e quantidades substanciais de α -D-glicose (14%), α -L-arabinose (4-6%), α -L-ramnose (2-3%) e β -D-ácido glucurônico (4-5%) também estão presentes (DE PAULA, HEATLEY e BUDD, 1998). Para acomodar uma proporção tão grande de grupos terminais, a goma apresenta estrutura altamente ramificada,

logo é conhecida como heteropolissacarídeo. O fragmento estrutural da goma é mostrado na Figura 5.

Figura 5 – Fragmento estrutural da goma do cajueiro.



Fonte: Adaptado de RIBEIRO et al. (2016).

A análise estrutural da GC por ressonância magnética nuclear (RMN) ^{13}C revelou que o polissacarídeo consiste em uma cadeia principal exibindo ligações do tipo β -D-galactose (1 $\rightarrow$ 3) e de cadeias laterais β -D-galactose (1 $\rightarrow$ 6), esse padrão de ligação contribui para uma melhor solubilidade da molécula em ambiente aquoso. Glicose, arabinose, ramnose, e o ácido glucurônico estão presentes como grupos terminais. Por cromatografia de permeação em gel (GPC) a distribuição da massa molar foi investigada e exibiu dois picos principais de 28000 e 67000 g/mol (DE PAULA, HEATLEY e BUDD, 1998; PINTO et al., 1995; MOTHE, CORREIA e CARESTIAO, 2006).

A GC possui características de composição e físico-químicas semelhantes a goma arábica, e ambas apresentam baixa viscosidade (MOTHÉ e RAO, 2000). Este fato pode estar relacionado ao seu peso molecular e sua conformação ramificada que desempenham um papel dominante nas propriedades de solubilidade e viscosidade em soluções aquosas. A viscosidade da GC foi investigada na presença de eletrólitos como NaCl, CaCl₂ e AlCl₃, foi observado diminuição na viscosidade seguindo esta ordem, Al³⁺ > Ca²⁺ > Na⁺ (DE PAULA e RODRIGUES, 1995; ZAKARIA e RAHMAN, 1996).

Estudo de solubilidade da GC com as abordagens de degradação térmica e alteração do pH do meio de solução foram realizados. E o estudo demonstrou que GC não pode ser solubilizado pela degradação térmica em solução aquosa, isso porque na GC existe grandes agregados em solução aquosa e estes agregados não estão totalmente desintegrados mesmo a 190°C. Elevando o pH do meio de solução mostrou-se mais eficaz para sua dissolução, isto por conta da presença dos grupos de ácido carboxílico, no entanto, as moléculas de GC são degradadas em pH maior que 9 (KIM et al., 2018).

A cinética de decomposição térmica da GC, foi investigada por análise termogravimétrica em atmosfera de nitrogênio e em condições não isotérmicas. A GC apresentou três eventos de decomposição. A primeira perda de massa é atribuída à evaporação da umidade e o principal evento de decomposição começou em torno de 240 °C, o que está relacionado à decomposição de polissacarídeos e também há uma grande perda de massa. Os parâmetros cinéticos foram estimados pelos modelos de isoconversões de Friedman e Ozawa-Flynn-Wall, e a análise de regressão não-linear multivariada foi aplicada para estimar um provável mecanismo. Através dos modelos selecionados foi possível prever o tempo de vida útil da GC, que apresentou estabilidade muito alta com uma vida útil de 20 anos (MOTHÉ e FREITAS, 2018).

As propriedades biológicas para a GC também foram investigadas e os estudos sugerem que o polissacarídeo apresenta amplo potencial com efeitos tóxicos mínimos, incluindo, atividade antimicrobiana (ANUSH et al., 2018), anti-inflamatória (DORE et al., 2013), antioxidante (MOHSIN, MAHADEVAN e KURUP, 2014) e cicatrizante (DE SOUSA et al., 2019).

Uma emulsão de GC associada ao ácido ascórbico foi desenvolvida e seu efeito foi avaliado na fase inflamatória do processo cicatricial em camundongos. O tratamento proposto propiciou sinais de inflamação menos acentuado, compatível com o processo de reparação mais avançado do ponto de vista histopatológico (SCHIRATO et al., 2006).

Um estudo com a GC, avaliou efeitos antitumorais sobre sarcoma 180 em camundongos. Os testes foram feitos observando o efeito sobre o crescimento do tumor implantado subcutâneo na virilha direita dos animais. E a GC exibiu alta atividade inibitória contra um tumor sólido (MOTHÉ, SOUZA e CALAZANS, 2008).

O potencial efeito antimicrobiano da GC também foi avaliado por meio da determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Os resultados indicaram propriedades antimicrobianas da GC contra todos os micro-organismos testados, com exceção de *Candida albicans* e *Lactobacillus acidophilus*. A GC apresentou atividade antimicrobiana contra as bactérias Gram-positivas com CIM de 30 mg/mL (CAMPOS et al., 2012).

A GC mostrou um efeito antidiarreico significativo em ratos com diarreia induzida por óleo de mamona. A dose de 60 mg/kg de GC exibiu excelente atividade antidiarreica, este resultado pode ser explicado pela capacidade do GC de inibir a motilidade gastrointestinal e, assim, reduzir o acúmulo de líquido intestinal e a secreção de íons de água e cloreto no lúmen do intestino (ARAÚJO et al., 2015).

Foi investigado a atividade gastroprotetora da GC, sobre os danos gastrointestinal causados por naproxeno (NAP) em ratos machos. O pré-tratamento com GC (10 mg/kg) reduziu os danos macroscópicos e microscópicos induzidos pela NAP. A GC diminuiu significativamente as alterações induzidas por NAP nos níveis de mieloperoxidase, glutatona e malonildialdeído. A GC também retornou os níveis de muco aderente aos valores normais. Estes resultados sugeriram que a GC tem um efeito protetor contra o dano gastrointestinal através de mecanismos que envolvem a inibição da inflamação e o aumento da quantidade de muco aderente na mucosa (CARVALHO et al., 2015).

A GC foi testada usando ensaios imunoestimulantes e anti-inflamatórios *in vitro* de atividades de macrófagos peritoneais murinos. No ensaio de atividade imunoestimulante (sem tratamento prévio com lipopolissacarídeo - LPS), a GC aumentou a produção de interleucina (IL)-10 e diminuiu as concentrações de IL-6. Quando os macrófagos foram incubados na presença de LPS e GC, observou-se diminuição dos níveis de óxido nítrico e IFN- γ . Esses resultados podem explicar o uso popular do GC como um anti-inflamatório (YAMASSAKI et al., 2015).

Estudo realizado por SOUZA FILHO et al. (2018), foi desenvolvido um gel de orabase com a GC (GC-P), para avaliar a perda óssea alveolar no tecido periodontal de ratos, submetidos a periodontite induzida por ligadura. O tratamento com o gel reduziu significativamente a perda óssea alveolar e causou uma diminuição significativa atividade mieloperoxidase do tecido gengival. Assim, o gel GC-P apresentou um potencial adjuvante para o tratamento da

periodontite. A GC vem mostrando como uma possível fonte de novas descobertas biotecnológicas.

Biocompósitos de GC com argilas também tem sido desenvolvido. No estudo SILVA et al. (2020), foi desenvolvido um bionanocompósito à base de caulinita e GC, a incorporação e posterior liberação de mesilato de doxazosina e os resultados indicaram que o bionanocompósito é um material eficaz e promissor para a incorporação/liberação de fármacos.

A GC também foi aplicada na produção e estabilização de nanopartículas de óxido de zinco. As nanopartículas obtidas promoveram inibição significativa de leveduras do gênero *Candida*, em particular *Candida parapsilosis*. O material desenvolvido indica ser promissor para o uso dispositivos médicos ou em formulações farmacêuticas, como suporte para tratamentos antifúngicos (SOUZA et al., 2020).

Em um outro estudo foi avaliado o nível de contaminação da GC e sua toxicidade aguda em coelhos. Os resultados indicaram que os contaminantes presentes na GC eram seguros e dentro de níveis aceitáveis e que a goma não foi tóxica para coelhos, mesmo na dose de 5000 mg/kg, podendo assim ser economicamente valiosa explorá-la para fins farmacêuticos (OKOYE, ONYEKWELI e FATOKI, 2012).

2.4.2 Modificações químicas da goma de cajueiro

2.4.2.1 Modificações aplicada a área farmacêutica

As gomas são geralmente solúveis em água. Isto por conta da presença dos grupos –OH que formam ligações de hidrogênio com moléculas de água. Assim, as gomas apresentam desafios quando utilizadas na liberação de fármacos. No entanto elas são preferidas em comparação com materiais sintéticos devido à sua baixa toxicidade, baixo custo de aquisição, disponibilidade e além de serem metabolizadas pela microflora intestinal (PRAJAPATI et al., 2013; RANA et al., 2011).

Os problemas associados ao uso das gomas, incluem taxas descontroladas de hidratação, solubilidade dependente do pH e a possibilidade de contaminação microbiana. As reações de modificação química na sua estrutura não apenas minimizam esses inconvenientes, como também facilitam seu uso na entrega de fármacos (RIBEIRO et al., 2016). Várias modificações na GC já foram realizadas a fim de torná-las adequadas para aplicações na entrega de medicamentos.

Uma modificação que tem sido bastante explorada é a acetilação por anidrido acético. A GC foi acetilada utilizando uma rota com uso de piridina e nanopartículas poliméricas carregadas com indometacina (IND) foram produzidas pelo método de diálise. As

nanopartículas apresentaram tamanho médio de 179 nm. Na liberação *in vitro* foi observado uma *burst effect* nas primeiras duas horas, seguida por uma liberação controlada de IND até 72 h (PITOMBEIRA et al., 2015).

Com a GC acetilada os métodos de nanoprecipitação e diálise foram empregados para obtenção de nanopartículas carregadas com diclofenaco de dietilamina. As nanopartículas apresentaram uma eficiência da incorporação superior a 60% para ambos os métodos. O ensaio de citotoxicidade demonstrou que as partículas não tiveram efeito significativo sobre a viabilidade celular, verificando sua biocompatibilidade. O perfil de liberação mostrou uma liberação mais controlada em relação ao fármaco livre (DIAS et al., 2016). Essa goma também foi aplicada na produção de nanopartículas carreando alcaloide epiisopiloturina com o objetivo de aumentar a solubilidade e permitir a liberação lenta (RODRIGUES et al., 2019).

A GC também foi acetilada na presença de outros compostos. No trabalho de Lima et al., 2018, foi promovido a acetilação da GC catalisada com ácido sulfúrico. Na pesquisa foi avaliado a influência dos parâmetros temperatura, tempo de reação e proporção de GC e anidrido acético no grau de substituição. A goma modificada foi aplicada para o desenvolvimento de nanopartículas carregando a Anfotericina B. Já no trabalho de SILVA et al. (2019) foi desenvolvido um derivado acetilado de GC na presença de NaOH caracterizado por uma síntese livre de solventes. A modificação com NaOH apresentou um grau de substituição (GS) baixo comparada com as outras reações, assim não garantiu tanta hidrofobicidade para a GC. Por outro lado, essa modificação tida como mais branda gerou um caráter mais aniônico para a GC, o que proporcionou a produção de nanopartículas carregadas com insulina, por a técnica de complexação polieletrólítica.

A GC foi modificada utilizando o anidrido ftálico, que assim como a modificação por anidrido acético garante como característica a hidrofobicidade. A GC ftalada foi desenvolvida por meio de uma reação livre de solventes e foi aplicada na redução e estabilização de nanopartículas de prata, com potencial efeito antibacteriano (OLIVEIRA et al., 2019). A goma ftalada também foi aplicada na preparação de gel de nanopartículas de prata *in situ*. Foi avaliado modelos de cicatrização de feridas em ratos e foi observado que os géis promoveram uma melhor cicatrização (LUSTOSA et al., 2017).

Por meio de uma reação base de Schiff a GC foi oxidada e os biomateriais desenvolvidos foram caracterizados e a sua capacidade de servir como um dispositivo biomédico (*scaffold*) foi avaliado para aplicação na área de engenharia de tecidos (MACIEL et al., 2019; FERREIRA et al., 2021).

Com a GC também foram desenvolvidos copolímeros. A GC também foi enxertada com N-isopropilacrilamida por meio de polimerização por radicais para originar um copolímero sensível a estímulos. Nanopartículas com epirrubicina foram produzidas e não apresentaram atividade citotóxica contra as linhagens celulares intestinais Caco-2 e HT29-MTX. Assim, o copolímero de enxerto demonstrou bom potencial para uso em sistemas de liberação controlada de fármacos (ABREU et al., 2016).

Derivados hidrofóbicos de GC enxertada com poliácido láctico (PLA), foram produzidos para estabilizar as emulsões de Pickering carregadas anfotericina B. As emulsões foram obtidas por um novo método que combina nanoprecipitação com o processo de emulsificação espontânea e o sistema apresentou cerca de 21-47% de incorporação. As emulsões apresentaram estado menos agregado do que o observado na formulação comercial de anfotericina B (RICHTER et al., 2018). RICHTER et al. (2020), avaliou as razões molares da reação do copolímero de GC e PLA (1:1 e 1:10) por RMN e FTIR. O efeito da composição dos copolímeros obtidos foi estudado avaliando a produção de nanopartículas carregadas anfotericina B por método de dialise, foi observado que as nanopartículas produzidas com o copolímero 1:10 apresentaram melhor estabilidade.

O trabalho de Ribeiro et al. (2021), relatou a preparação de nanopartículas de epirrubicina a partir de um copolímero anfifílico obtido pelo enxerto de poli (ϵ -caprolactona) na estrutura da GC, via polimerização por abertura em anel. As nanopartículas apresentaram uma liberação lenta de epirrubicina com $93,0 \pm 4,0\%$ em 72 h, além de excelente biocompatibilidade, segundo ensaios de hemólise e citotoxicidade.

Por meio de todos esses estudos a GC e suas modificações químicas apresentaram propriedades físico-químicas e estruturais desejáveis, sugerindo sua utilidade com matriz polimérica para carreamento de diversas classes de fármacos.

Tabela 2 – Modificações químicas realizadas na estrutura da GC.

Modificação	Autores
Acetilação catalisada com piridina	(PITOMBEIRA et al., 2015; DIAS et al., 2016; RODRIGUES et al., 2019)
Acetilação catalisada com ácido sulfúrico	(LIMA et al., 2018)

Acetilação catalisada com NaOH	(SILVA et al., 2019)
Modificação com anidrido ftálico	(LUSTOSA et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2019)
Oxidação	(MACIEL et al., 2019; FERREIRA et al., 2021)
Copolímero com N-isopropilacrilamida	(ABREU et al., 2016).
Copolímero com poliácido láctico (PLA)	(RICHTER et al., 2018; RICHTER et al., 2020)
Copolímero com poli (ϵ -caprolactona)	(RIBEIRO et al., 2021)

Fonte: Elaborado pelo autor

2.4.2.2 Modificações aplicada a área diversas

As aplicações dos polissacarídeos modificados não se limitam apenas para área farmacêuticas, a literatura relata outras reações de modificação com aplicações bastante promissoras.

Hidrogéis superabsorventes foram fabricados usando GC modificada com acrilamida. A via de modificação foi viável devido à incorporação de metacrilato de glicidila na estrutura da GC para formar a GC-metacrilado, em uma mistura apropriada de água-DMSO e utilizando o TEMED como catalisador. Os hidrogéis foram classificados como material superabsorvente de água e com aplicações na agricultura (GUILHERME et al., 2005).

A GC foi carboximetilada em meio aquoso alcalino utilizando ácido monocloroacético (MCA) como agente eterificante. O GS variou na faixa de 0,10 a 2,21. Degradação do comprimento da cadeia foi verificada em todas as condições de reação estudadas. Levando em consideração a eficiência do MCA em relação à produção de GC carboximetilada, o melhor material apresentou DS de 0,90 e com uma menor degradação da cadeia (SILVA et al., 2004). Também foi sugerido o uso da goma do cajueiro carboximetilada como uma plataforma para a imobilização de anticorpos, que pode então ser usada como um biossensor para a detecção de bactérias (MELO et al., 2020).

A síntese da goma de cajueiro-g-poliacrilamida foi realizada a 60 °C por uma polimerização radical usando persulfato de potássio como o iniciador redox sob atmosfera de N₂. Uma série de copolímeros de enxerto, variando a concentração de acrilamida e mantendo a concentração do iniciador e do polissacarídeo constante, foram preparados. Foi observado aumento da viscosidade da goma o que é muito importante para novas aplicações (SILVA, de PAULA e FEITOSA, 2007).

A GC foi sulfatada em piridina:formamida usando ácido clorossulfônico como reagente. O grau de sulfatação é baixo, mas suficiente para aumentar a carga iônica do polímero e melhorar suas propriedades polieletrólíticas. A GC sulfatada ofereceu características adequadas para uso na preparação de nanopartículas de complexos polieletrólíticos (MOURA NETO et al., 2011).

No estudo desenvolvido por QUELEMES e colaboradores. (2017), apresentou uma rota de quaternização para GC usando um reagente de amônio quaternário. A goma modificada teve sua atividade anti-estafilocócica determinada por meio de teste de concentrações mínima inibitórias e bactericidas contra *Staphylococcus* spp., além disso, a biocompatibilidade das células de mamíferos também foi avaliada. O novo modificado apresentou promissora atividade antimicrobiana contra *S. aureus* resistente à metilicina e biocompatibilidade nas células testadas. Esses resultados mostraram que este material pode ser uma ferramenta promissora no desenvolvimento de biomateriais com ação antisséptica.

Copolímeros à base de GC enxertados com poliacrilamida (PAM) foram sintetizados por métodos assistidos por micro-ondas e ultrassom, utilizando persulfato de potássio como iniciador em meio aquoso. Os modificados apresentaram-se como ecologicamente corretos e apropriados para uso de tratamento de águas residuais industriais e domésticos (KLEIN et al., 2018).

A GC teve sua estrutura alterada por meio de uma reação de copolimerização, fazendo uso dos reagentes anidrido octenil succínico e anidrido tetrapropenil succínico a fim de obter um copolímero hidrofóbico, e com futuras aplicações em produtos agrícolas (BISWAS et al., 2020).

No trabalho de BRANDÃO et al. (2020) a goma do cajueiro acetilada com piridina foi utilizada na redução e estabilização de nanopartículas de prata. Foi observado que as nanopartículas apresentaram potencial para o desenvolvimento prático e rápido de impressões digitais latentes em superfícies porosas, o que permite o desenvolvimento de um produto para ser usado até mesmo em cenas do crime.

2.5 USO DE MICRO-ONDAS PARA MODIFICAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS

O uso de irradiação de micro-ondas (MW) tem sido explorado para o processo de modificação química de polissacarídeos. O interesse nessa fonte de energia surge da crescente demanda em se utilizar química limpa e ecológica. A irradiação por MW reduz de forma significativa o uso de solventes tóxicos, bem como o tempo de reação, além de garantir altos rendimentos e a diminuição de subprodutos que pode ser ocasionada pelo uso do método tradicional de aquecimento por meio da condução de calor (SOSNIK, GOTELLI e ABRAHAM, 2011). Esta característica tem sido explorada no campo desenvolvimento de novos materiais e literatura reporta trabalhos indicando o potencial da energia de MW para acelerar reações químicas, como mostra a Tabela 2.

Tabela 3 – Modificações químicas em polissacarídeos por radiação micro-ondas.

Modificação	Características gerais	Autores
Síntese de enxerto de poliacrilamida na goma ghatti	- As cadeias de poliacrilamida (PAM) foram enxertadas na da goma ghatti - Potencial aplicação como viscosificante - Possível aplicação como floculante para o tratamento de águas residuais	(RANI et al., 2012)
Modificação de glucomanano do Konjac com octenil succínico	- glucomanano do Konjac (KGM) foi esterificado com anidrido octenil succínico - Novo tipo de surfactante polimérico com boas habilidades tanto em hidrofílico como em lipofílico	(MENG et al., 2014)
Síntese de enxerto de alginato com (N, N'-dimetilacrilamida)	- A modificação do alginato de sódio foi realizada utilizando N, N'-dimetilacrilamida como monômero e Azobisisobutironitrila como iniciador - Verificou-se que o copolímero enxertado é biocompatível e termicamente mais estável que o alginato não enxertado.	(AKIN e IŞIKLAN, 2016)
Funcionalização hidrofílica do ácido poligalacturônico (PGA)	- Nova classe de surfactantes poliméricos à base de PGA é apresentado - A modificação hidrofílica de único passo com taurina - O material sintetizado a partir de PGA não apresentou citotoxicidade e têm o potencial uso como tensoativos	(ARIS et al., 2017)
Modificação <i>Colocasia esculenta</i> (L.) Schott por poliácido láctico (PLA)	- Este estudo descreve a síntese e caracterização do copolímero enxertado com PLA (CEM-g-PLA) - O enxerto de PLA no polissacarídeo alterou sua capacidade de absorção de água, solubilidade e poder de inchamento - Copolímero sintetizado apresenta potenciais aplicações no tratamento de águas residuais e liberação de fármacos	(MIJINYAWA, DURGA e MISHRA, 2018)

Preparação de flocculantes à base de goma de cajueiro (GC)	- Síntese de Copolímeros à base de GC enxertada com poliacrilamida (PAM) - Foi utilizado persulfato de potássio como iniciador em meio aquoso	(KLEIN et al., 2018)
--	--	----------------------

Fonte: Elaborado pelo autor.

As vantagens do aquecimento por MW surgem das interações dos materiais com ondas eletromagnéticas. Materiais como água, álcoois, líquidos iônicos e carbono absorvem a energia de MW, enquanto outros materiais, como plásticos, óleos e solventes não polares, são efetivamente transparentes, isto é, determinado exclusivamente pelas propriedades dielétricas dos materiais (KOMOROWSKA-DURKA et al., 2015).

As MW podem penetrar nas misturas de componentes e interagir de maneira diferente com várias fases. Os materiais suscetíveis à energia de MW aquecerão mais rapidamente em comparação com os materiais não sensíveis, gerando rapidamente grande gradiente de temperatura (SINGH, KUMAR e SANGHI, 2012).

Para que ocorra o aquecimento por MW, a substância deve possuir um momento de dipolo. Um dipolo é sensível ao campo elétrico externo e tenta se alinhar com o campo por rotação. Se submetido a uma corrente alternada, o campo elétrico é invertido a cada alteração e, portanto, os dipolos tendem a se mover juntos para seguir o campo elétrico inverso. Tal característica induz a rotação e o atrito das moléculas, que se dissipam como aquecimento interno homogêneo. O aquecimento por MW é diretamente dependente das propriedades dielétricas de uma substância, que é a constante dielétrica (ϵ') e perda dielétrica (ϵ''). A capacidade de um material de converter energia eletromagnética em energia térmica a uma determinada frequência e temperatura é calculada usando a equação (1) abaixo:

$$(\epsilon''/\epsilon' = \tan \delta) \quad \text{Equação. 1}$$

onde, ϵ'' representa a capacidade do material de converter energia absorvida em calor e ϵ' significa a capacidade do material de armazenar energia. A razão entre a perda dielétrica e a constante dielétrica é conhecida como tangente de perda ($\tan \delta$) (GABRIEL et al., 1998; MALLAKPOU e RAFIEE, 2008; S. CHANDRASEKARAN, SRINIVASAN e RAMANATHAN, 2012)

Os fornos de MW podem se apresentar como monomodo, que permite uma distribuição mais homogênea do campo elétrico e em termos energéticos são mais eficientes e leva a

melhores rendimentos na síntese orgânica. E multimodo (fornos domésticos), são caracterizadas por uma distribuição não homogênea do campo elétrico e a temperatura não pode ser medida de maneira simples e precisa (SURATI JAUHARI e DESAI, 2012).

As reações em MW podem ser classificadas como assistida por MW, onde iniciadores são adicionados à mistura de reação, e sua presença aumenta a capacidade de converter a energia de MW em energia térmica. E iniciada por MW, não são adicionados iniciadores, apenas a radiação é suficiente para promover a reação (KAUR e GUPTA, 2017).

3 MÉTODOS

O artigo I diz respeito a modificação da estrutura da goma do cajueiro com anidrido ftálico. É abordado a influência de micro-ondas no processo reacional, tomando como base a potência e o tempo de reação. Neste capítulo também é abordado com prelúdio a aplicação do derivado modificado como uma plataforma para a entrega do fármaco BNZ.

O artigo II diz respeito a avaliação dos fatores influenciam nas características das nanopartículas, para isso foi utilizado um desenho experimental de *design* de Plackett-Burman, além disso foi avaliado as propriedades biológicas *in vitro* das nanopartículas, frente a sua citotoxicidade em macrófagos RAW 267.4 e nas formas epimastigota e tripomastigota do *T. cruzi*.

Todas as técnicas e métodos estão detalhadamente descritos em cada artigo.

4 RESULTADOS

4.1 ARTIGO 1 – SÍNTESE RÁPIDA POR MICRO-ONDAS DE GOMA DE CAJUEIRO FTALADA PARA SISTEMA DE ADMINISTRAÇÃO DE FÁRMACOS

4.1.1 Introdução

Os biopolímeros envolvem uma classe promissora de materiais com uma ampla gama de aplicações, das quais destacam-se a saúde, especialmente para uso na área farmacêutica (CORDEIRO et al., 2017). As características como biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade e baixa imunogenicidade tornaram esses materiais candidatos para aplicação em sistemas de administração de medicamentos (PUSHPAMALAR et al., 2016). Os biopolímeros são derivados de organismos vivos e podem ser obtidos a partir de proteínas (JIANG e STENZEL, 2016) e polissacarídeos (BARCLAY et al., 2019).

Os polissacarídeos são compostos macromoleculares encontrados em quase todos os organismos vivos (JACOB et al., 2018). Eles estão presentes em sementes, caules e folhas de plantas, fluidos corporais de animais, conchas de crustáceos e insetos. Eles também podem ser extraídos de paredes celulares e fluidos extracelulares de bactérias, leveduras e fungos (GARCIA-VALDEZ, CHAMPAGNE e CUNNINGHAM, 2018).

A GC é um polissacarídeo de exsudado obtido do caule da árvore *Anacardium occidentale* L., que contém cerca de 72% de galactose, 14% de glicose, 4-6% de arabinose, 3-2% de ramnose e 4-5% de ácido glucurônico (de PAULA, HEATLEY e BUDD, 1998). Consiste em um polímero de cadeia ramificada com ligações do tipo (1 → 6) β-D-galactose e (1 → 3) β-D-galactose (de PAULA e RODRIGUES, 1995; de PAULA, HEATLEY e BUDD, 1998). As propriedades físicas apresentadas pela GC permitem que ela seja aplicada na área de alimento (OLIVEIRA et al., 2020), odontologia (HASNAIN et al., 2018) e na engenharia de tecido (BAL et al., 2020).

A GC por apresentar alta solubilidade em meio aquoso, pode ser utilizada como excipiente farmacêutico para projetar comprimidos de matriz hidrofílica e assim promover entrega controlada de medicamentos (OFORI-KWAKYE et al., 2016). No entanto, a sua solubilidade pode ser alterada para que suas aplicações se estendam aos sistemas de fármacos de baixa solubilidade aquosa (ABREU et al., 2016). A versatilidade deste material está associada aos grupos funcionais presentes em sua estrutura química, particularmente no grupo hidroxila primário (-CH₂-OH), que fornece maior reatividade química para a funcionalização,

o que permite aplicações no campo de produção de nanopartículas poliméricas (RIBEIRO et al., 2016; SUBBIAH, VEERAPANDIAN e YUN 2010).

Reações de hidrofobização na estrutura da GC permitiram a produção de novos sistemas de liberação que melhoraram a taxa de encapsulamento dos fármacos, bem como uma entrega modificada (RICHTER et al., 2020). Estudos promoveram hidrofobização pelo mecanismo de acetilação, fazendo uso de anidrido acético, e assim desenvolveram novos sistemas para liberação de fármacos de baixa solubilidade em água, como anfotericina B (LIMA et al., 2018), indometacina (PITOMBEIRA et al., 2015; CARDIAL et al., 2019) e diclofenaco de dietilamônio (DIAS et al., 2016).

Os anidridos são amplamente utilizados nas reações de modificação por conta do ambiente químico oferecido pelos grupos O-H dos polissacarídeos (VASCONCELOS SILVA et al., 2019; RODRIGUES et al., 2019). Uma classe de anidrido que oferece características físico-químicas aplicáveis a produção de nanopartículas é o anidrido ftálico por conta do grupo ftalado, que altera completamente o perfil de solubilidade dos polímeros (UBAIDULLA et al., 2007). Essa modificação tem atraído atenção no sistema de administração oral de medicamentos devido à sua baixa solubilidade em pH ácido e alta solubilidade em pH básico, protegendo os fármacos encapsulados do estresse ambiental e da digestão química/enzimática nos fluidos gástricos (GARCÍA-CASAS et al., 2017; AIEDEH et al., 2005).

A irradiação por MW tem atraído atenção como uma metodologia para modificação química de polissacarídeos. Uma das vantagens é que oferece uma maneira limpa, reduz o tempo de reação, pode proporcionar maior controle da reação, diminuindo a possível formação de subprodutos, garantindo maior reprodutibilidade dos produtos modificados e pode ser uma alternativa à substituição do aquecimento térmico convencional por placas de aquecimento, que apresenta como fator limitante o grande consumo de tempo (KUMAR et al., 2017; DESBRIÈRES, PETIT e REYNAUD, 2014; SINGH, KUMAR e SANGHI, 2012).

A síntese assistida por MW foi realizada para desenvolver uma nova classe de surfactantes à base de polissacarídeos derivados do ácido poligalacturônico (PGA). A síntese foi catalisada por MW com um tempo de reação de 15 min, enquanto a reação sob aquecimento convencional foi realizada por 16 horas (ARIS et al., 2017). Este método de reação ocorre quando as moléculas polares são expostas à irradiação de MW, onde elas tendem a se alinhar com o campo elétrico do MW, no entanto, as moléculas no meio de reação não conseguem se alinhar tão rápido, esse efeito cria um atrito entre as moléculas que geram o aquecimento do ambiente, e a energia eletromagnética é convertida em energia térmica (KALIA, SABAA e

KANGO, 2013; LOUPY, 2004). A GC apresenta ambiente químico favorável a esse tipo de reação (BAL et al., 2020).

O BNZ é o medicamento de escolha no tratamento da DC. A DC é uma infecção causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, endêmica na América Latina e considerada um importante problema de saúde pública (MALIK, SINGH e AMSTERDAM, 2015). Por se tratar de uma doença negligenciada, sua terapia é bastante limitada, tendo apenas o BNZ como fármaco para o tratamento (BERMUDEZ et al., 2016).

O BNZ possui baixa solubilidade aquosa que limita sua biodisponibilidade *in vivo* (ROMERO e MORILLA, 2010). É fornecido comercialmente como comprimidos de liberação imediata. O tratamento é administrado 2 a 3 vezes ao dia por 60 dias na maioria dos casos, e os efeitos colaterais limitam sua eficácia e segurança (GARCÍA, MANZO e JIMENEZ-KAIRUZ, 2018). Sugere-se que o uso da nanotecnologia seja uma boa estratégia para melhorar seu desempenho (SANTOS-SILVA et al., 2019b; SEREMETA et al., 2019).

Neste trabalho, avaliou-se a influência da irradiação de MW na modificação do GC com anidrido ftálico. Além disso, a goma de cajueiro fialada (GCF) foi usada como matriz polimérica para o desenvolvimento de nanopartículas carregadas com BNZ.

4.1.2 Materiais e métodos

4.1.2.1 Materiais

Anidrido ftálico puro e membrana de acetato de celulose (14000 Da) foram obtidos Sigma–Aldrich (St. Louis, USA). Dimetil formamida, acetona, dodecil sulfato de sódio (DSS), DMSO e HCl grau analítico foram obtidos da Dinâmica (SP – Brazil). O fármaco Benznidazol, utilizando nesta pesquisa foi doado por Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco – Lafepe (PE – Brazil).

4.1.2.2 Purificação da GC

O exsudato do cajueiro foi coletado de arvores do gênero *Anacardium occidentale* L., nativas de Parnaíba, Piauí–Brasil. A goma do cajueiro foi purificada pelo método proposto por (DE PAULA, HEATLEY e BUDD, 1998).

4.1.2.3 Reação de modificação

Goma do cajueiro (1,0 g) e anidrido ftálico (2,0 g) em 10,0 ml de DMF, foi irradiada em reator de micro-ondas (CEM Discover Microwave Reactor, USA). Foram obtidos três derivados de GCF: GCF 1 (160 W, 3 min de reação), GCF 2 (250 W, 3 min de reação) e GCF

3 (250 W, 8 min de reação). Todos os experimentos foram realizados a 80 °C. Os derivados ftalados foram precipitados lentamente com água deionizada e formou-se um produto sólido de cor esbranquiçada. Em seguida, o precipitado foi lavado com água e seco em estufa a 50 ° C.

4.1.2.4 Caracterização da goma do cajueiro ftalada

4.1.2.4.1 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR dos modificados foram obtidos no espectrômetro Perkin Elmer de 400, no módulo ATR, na faixa de 4000 a 700 cm⁻¹.

4.1.2.4.2 Cromatografia de permeação em gel (GPC)

A distribuição de massa molar foi determinada por cromatografia de permeação em gel em equipamento Shimadzu LC-20AD acoplado a um detector de índice de refração (RID-10A). Para a análise utilizou-se coluna polysep linear, 300 × 7,8 mm, utilizando NaNO₃(aq) 0,1 mol/L como eluente. A medida foi feita a 30°C, com fluxo de 1 mL/min e o volume injetado da amostra foi de 50 µL. Utilizando a curva a seguir:

$$\text{Log}_M = 14.33638 - 1.12336 \times V_e \quad \text{Equação. 2}$$

4.1.2.4.3 Análise Elementar

A porcentagem elementar foi obtida no equipamento analisador elementar - Perkin Elmer 2400 com o método Pregl-Dumas em atmosfera de oxigênio puro e detector de condutividade térmica.

4.1.2.4.4 Ressonância Magnética Nuclear

Goma bruta (30 mg) foi dissolvida em D₂O (0,7 mL). Derivados ftalados (30,0 mg) foram dissolvidos em D₂O (0,7 mL) basificados com NaOH 1 M (10,0 µL). Os espectros foram obtidos usando um espectrômetro Agilent NMR a 300 MHz. A fim de suprimir o sinal de água residual, foi aplicada a sequência de pulso PRESAT padrão.

O GS dos grupos ftalados foi calculado de acordo com a Equação (2), onde A é a área integral dos prótons ftalados (7,11-7,37 ppm), B é a área integral de 3,0 a 5,5 ppm, e *n* é a média ponderada da composição do GC pelo número de hidrogênios, que não sofrer troca química, em cada monossacarídeo (VASCONCELOS SILVA et al., 2019).

$$DS = \frac{A}{4} \times \frac{n}{B} \quad \text{Equação. 3}$$

4.1.2.4.5 Relaxometria RMN

O tempo de relaxamento transversal (T_2) foi medido no domínio do tempo, por meio de um relaxômetro Minispec MQ-60 (Bruker, Alemanha), no estado sólido do GC e derivados ftalados.

4.1.2.4.6 Difração de raios-X (DRX)

O perfil cristalográfico dos polissacarídeos foi determinado usando um difratômetro PANalytical (modelo X'Pert Pro) equipado com um detector de estado sólido X'Celerator e um suporte de amostra giratório. Os padrões de difractograma foram registrados usando montagens orientadas aleatoriamente com radiação $\text{CuK}\alpha$, operando a 45 kV e 40 mA, na faixa de 2θ 4° a 70° .

4.1.2.4.7 Análise térmica

A análise termogravimétrica foi realizada em Shimadzu (mod. TGA-50H), equipado com forno vertical e microbalança com precisão de 0,001 mg. Amostras de GC e derivados com aproximadamente 10 mg foram colocadas em cadinhos de alumínio e aquecidas de 20 a 600 $^\circ\text{C}$ a 10 $^\circ\text{C min}^{-1}$ em atmosfera de nitrogênio.

4.1.2.4.8 Determinação da solubilidade

GC e derivados ftalados foram dissolvidos em água ultrapura e em fluido gástrico simulado (SGF) preparado de acordo com a USP34, sem enzimas. Todas as amostras estavam em estado supersaturado e foram agitadas por 24 h (Incubadora SHAKER SL 222, SOLAB, SP, Brasil). Seguiu-se centrifugação por $2260 \times g$ por 30 min (Excelsa II 206 - BL, Fanem, SP, Brasil). Após secagem na estufa a 50 $^\circ\text{C}$, a massa resultante (massa recuperada) foi pesada. Os experimentos foram realizados três vezes. A solubilidade foi calculada usando a Equação. (3):

$$S = \frac{m}{m_1} \times 100 \quad \text{Equação. 4}$$

m = massa inicial (m_i) – massa recuperada

S = coeficiente de solubilidade

4.1.2.5 Preparação e caracterização das nanopartículas

4.1.2.5.1 Preparação das nanopartículas de BNZ

As nanopartículas (NP-BNZ) foram preparadas seguindo a técnica de nanoprecipitação (CHAVES et al., 2018) com algumas modificações. GCF 1 (20,0 mg) e BNZ (4,0 mg) foram dissolvidos em 3,0 mL de acetona: DMSO (1: 1 v/v). A fase aquosa, composta de água ultrapura (10,0 mL) (Elix[®] Advantage pure water, Merk, Darmstadt, Alemanha), foi adicionada à fase orgânica e sonicada (Ultrasonic Tip Sonicator, Eco-sonics, SP, Brasil) por 2 min com amplitude de 70%. Em seguida, 10,0 mL de água foram utilizados como estabilizador para completar o volume final de 20,0 mL da solução.

A mistura foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente (25 °C) para a formação das nanopartículas e evaporação completa do solvente orgânico (AMINU, et al., 2013). Nanopartículas simples (sem fármaco) foram obtidas seguindo o mesmo procedimento. Todos os experimentos foram realizados em triplicada.

4.1.2.5.2 Caracterização das nanopartículas

As medições do tamanho de partícula, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta foram realizadas usando um Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd.), com um laser de 633 nm. A distribuição do tamanho de partícula foi medida usando espalhamento dinâmico de luz (DLS). O potencial zeta foi determinado por meio da mobilidade eletroforética das partículas, e as medidas foram realizadas em uma célula de eletroforese capilar dobrada. As medidas foram realizadas em triplicatas a 25 °C, com ângulo de detecção de 90 °.

A morfologia das nanopartículas foi analisada por Microscopia de Força Atômica (AFM) utilizando um equipamento TT-AFM (AFM Workshop, EUA) em modo de contato intermitente, utilizando ponteiros TED PELLA (TAP300 - G10) em uma frequência de amplitude de aproximadamente 252,70 kHz. As amostras foram diluídas a 1: 100 em água deionizada e deixadas em banho de ultrassom por 15 min. Uma alíquota de 10 µL de cada amostra foi retirada e depositada em uma superfície de mica e deixada por 15 min em temperatura ambiente para permitir a secagem da amostra e então analisada.

4.1.2.5.3 Determinação da eficiência de encapsulamento e drug loading

A quantificação de BNZ dentro das nanopartículas foi realizada pela determinação do fármaco não encapsulado, utilizando o método de ultracentrifugação (CHAVES et al., 2018). Brevemente, as amostras foram preparadas pela diluição das nanopartículas com dodecil sulfato de sódio (DSS) 0,1% (w/v), com pH ajustado para 3,5 (1 mol/L HCl).

As amostras foram centrifugadas a $17,828 \times g$ por 30 min (Centrifuga 5417R, Eppendorf). A absorbância do sobrenadante foi medida por espectroscopia UV-VIS (Vankel 50 UV-Vis, Varian) a 322 nm. Uma curva padrão foi obtida para BNZ a 0,1% (p/v) DSS. Todas as análises foram realizadas em triplicada. A eficiência de encapsulação (EE) e carga de droga (DL) foram calculadas usando a Equação. (4) e Equação (5).

$$EE = \frac{\text{quantidade de farmaco inicial} - \text{farmaco recuperado}}{\text{quantidade inicial de farmaco}} \times 100 \quad \text{Equação. 5}$$

$$DL = \frac{\text{quantidade inicial de farmaco} - \text{farmaco recuperado}}{\text{quantidade inicial de farmaco} + \text{quantidade inicial de polimero}} \times 100 \quad \text{Equação. 6}$$

4.1.2.5.4 Estudo de liberação *in vitro*

Os perfis de liberação para NP-BNZ e BNZ livre foram obtidos usando um sistema de diálise. As nanopartículas foram liofilizadas, ressuspensas em 2,0 mL de água, introduzidas na membrana de acetato de celulose com poros de exclusão molecular de 14,000 Da e dialisada contra 50 mL de SGF sem pepsina (USP 34) a 37 ° C por 240 min sob agitação (Incubadora SHAKER SL 222, SOLAB, SP, Brasil).

Em tempos pré-determinados (10, 20, 30, 45, 60, 120 e 240 min), amostras de 0,6 mL foram coletadas e quantificadas por espectroscopia UV-Vis (Vankel 50 UV-Vis, Varian). O fluido foi reabastecido para manter as condições *sink*. O perfil de liberação do BNZ livre foi realizado utilizando os mesmos parâmetros das nanopartículas. As análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos como média $\pm$ D.P. A análise estatística foi realizada usando two-way ANOVA seguida por um teste de Tukey ($p < 0,05$) usando Prism Software Versão 6 (Prism, Versão 6, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA).

4.1.3 Resultados e discussão

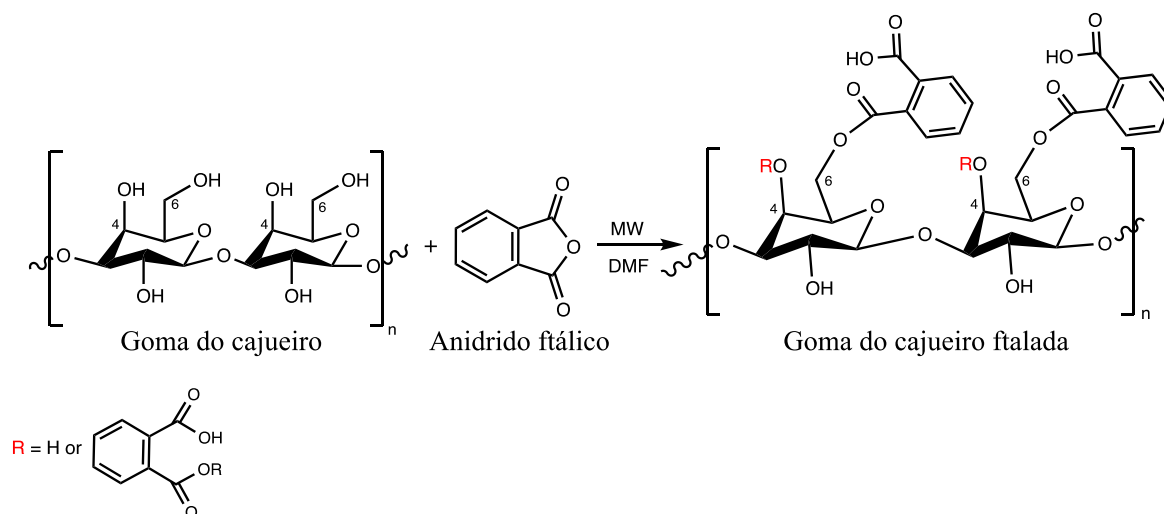
4.1.3.1 Reação de modificação iniciada por micro-ondas

No presente estudo, GC foi modificada usando um método de síntese iniciado por MW (Fig. 6). Nessa reação, as MW são absorvidas pelos grupos OH polares ligados ao polissacarídeo, levando à formação de sítios favoráveis para modificação (DESBRIÈRES et al., 2014). Além disso, ao usar um solvente polar, como o DMF, que possui uma constante dielétrica ($\tan \delta$: 0,161), ocorre transferência de energia para as moléculas do anidrido ftálico causando aquecimento dielétrico e produzindo outro conjunto de sítios reativos. Esses efeitos

gerados na cadeia polissacarídeo e no anidrido ftálico se recombinam e promovem a produção de polissacarídeos modificados (SILVA et al., 2012).

A GCF foi relatada em estudos anteriores (LUSTOSA et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2019). O processo foi realizado por um método convencional, que exigia altas temperaturas e longo tempo de síntese. As reações realizadas por MW apresentam alto desempenho em temperaturas mais baixas e menores tempo de reação.

Figura 6 – Esquema simplificado de modificação da goma do cajueiro ftalada.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.1.3.2 Caracterização do polissacarídeo

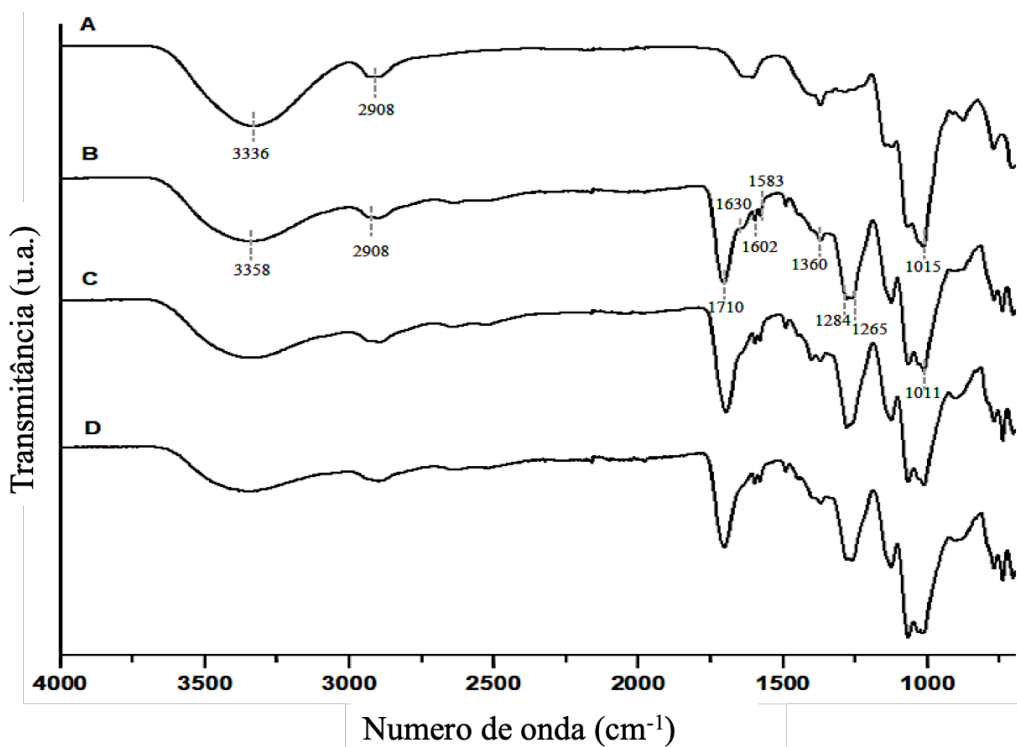
A Figura 7 (A – D) mostra os espectros de FTIR do GC e dos derivados modificados preparados sob diferentes condições. O espectro da GC apresentou bandas de absorção em torno de 3336, 2908 e 1015 cm^{-1} , mostrando vibrações características de O–H, C–H (carbono sp^3) e C–O–C (grupos éter glicosídicos), respectivamente (SILVA VASCONCELOS et al., 2019). Como controle, a GC foi posta em DMF e aquecida no MW sem a presença de anidrido ftálico, não foi observado alterações substanciais no padrão espectral.

Os espectros de FTIR da GC e dos derivados modificados mostraram pequenas alterações. No entanto, as bandas características permaneceram inalteradas em 3358, 2902 e 1011 cm^{-1} , correspondendo aos grupos O–H, C–H e C–O–C, respectivamente. Essa semelhança indica que o efeito do aquecimento por MW não alterou a estrutura primária do GC.

Novas bandas surgiram nos derivados modificados por volta de 1710 e 1360 cm^{-1} , são atribuídas às vibrações de alongamento C=O e C–O do ácido carboxílico, respectivamente. As

bandas em 1630, 1602 e 1583 cm^{-1} podem ser atribuídas às ligações C=C do grupo aromático. As duas bandas em 1284 e 1265 cm^{-1} podem ser atribuídas ao grupo éster (LUSTOSA et al., 2017). Comparando o espectro de FTIR obtido para a ftalação sintetizada por o método de aquecimento convencional (OLIVEIRA et al., 2019) e os espectros da Figura 7, foi confirmado que a reação por MW ocorreu com sucesso.

Figura 7 – Espectros de FTIR de (A) GC, (B) GCF 1, (C) GCF 2 e (D) GCF 3.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O peso molecular da GC e dos derivados ftalados foram estimados e são apresentados na Tabela 4. O peso molecular da GC corresponde ao relatado na literatura (SILVA et al., 2019). Observou-se que todos os derivados apresentaram redução no peso molecular. Isso se deve ao processo de modificação do polissacarídeo. Quando uma cadeia polimérica é submetida a estresse físico e químico, ligações inter e intramoleculares podem ser quebradas, diminuindo o peso molecular (ČÍŽOVÁ et al., 2008). GCF 3 apresentou maior peso molecular em relação ao GCF 2, isso pode ter ocorrido devido a exposição a maior potência e tempo de reação. Isso porque, nessas condições, pode ocorrer um incremento na temperatura de reação (LEWICKA, SIEMION e KURCOK, 2015; PETIT, REYNAUD e DESBRIERES, 2015). A reatividade dos grupos OH tende a aumentar com o aumento da temperatura, esse fenômeno pode causar

ligações cruzadas no polissacarídeo, promovendo maior peso molecular (WANG et al., 2014). No estudo de Xing et al. (2004), a radiação MW foi realizada para introduzir grupos N-sulfo e O-sulfo na quitosana. Foi observado que o aquecimento por MW é uma maneira conveniente de se obter uma ampla gama de produtos com diferentes pesos moleculares e DS, apenas alterando o tempo de irradiação ou as condições de energia. Esse efeito foi observado para a reação dos derivados ftalados.

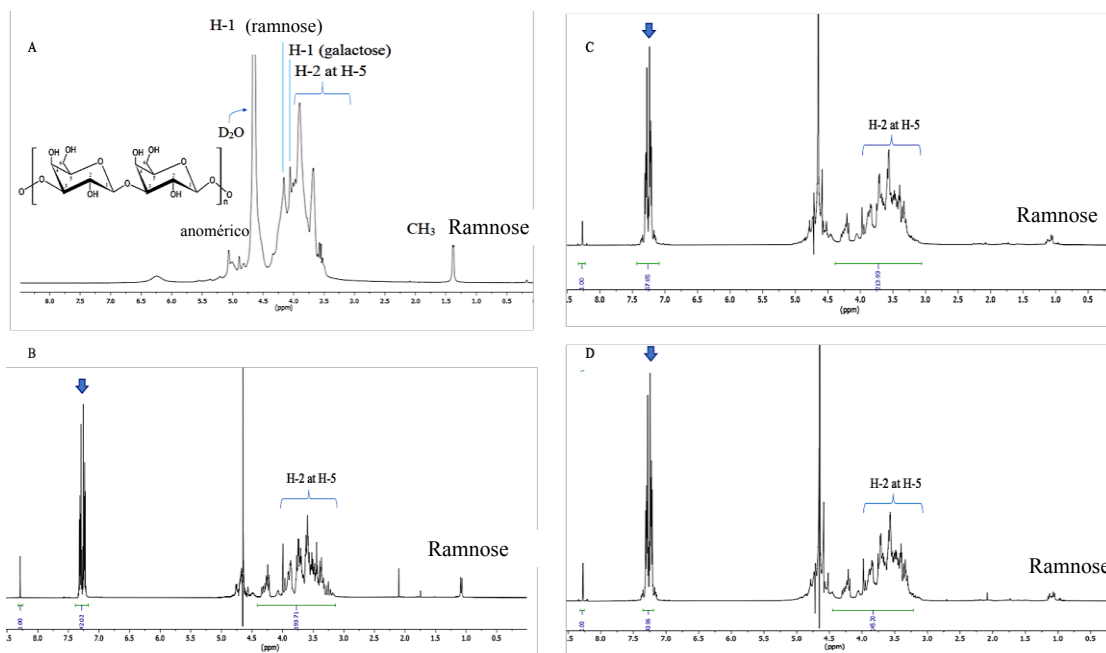
Tabela 4 – Peso molecular, GS e dados de análise elementar da GC e derivados ftalados.

	Peso molecular (g/mol)	GS	Carbono %	Hidrogênio%	C (mmol)	H (mmol)	C/H
GC	$2,12 \times 10^4$		39,10	6,6	3,25	6,54	0,49
GCF 1	$7,38 \times 10^3$	0,31	45,80	5,97	3,81	5,92	0,64
GCF 2	$3,72 \times 10^3$	0,39	47,58	5,89	3,96	5,84	0,67
GCF 3	$1,22 \times 10^4$	0,43	47,18	5,88	3,92	5,83	0,67

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os espectros de NMR ^1H da GC e os derivados modificados são mostrados na Figura 8 (A - D). GC e os derivados mostraram sinais do grupo metil presente na ramnose a 1,3 e 1,1 ppm, respectivamente. Os deslocamentos químicos de 3,5 a 4,0 ppm correspondem a H-2 a H-5. Os sinais em 4,3 e 4,8 indicam o H-1 da galactose e ramnose, respectivamente. A região de deslocamento químico de 4,6 para 5,0 refere-se aos prótons anoméricos (VASCONCELOS SILVA et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2019). Os sinais entre 7,1 e 7,4 ppm (seta azul) representam os novos sinais que caracterizam a presença dos hidrogênios do anel aromático do grupo ftalado inserido através da modificação.

Figura 8 —espectros de RMN ^1H de (A) GC, (B) GCF 1, (C) GCF 2 e (D) GCF 3.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os resultados do GS são apresentados na Tabela 4. O GS dos derivados modificados foi calculado com base nas integrais dos espectros de RMN ^1H , de acordo com a Equação 2 (VASCONCELOS SILVA et al., 2019). Para a síntese realizada a 160 W por 3 min (GCF1), o GS foi de 0,31. Os derivados produzidos a 250 W apresentaram valores de GS que variaram de 0,39 a 0,43. No estudo de Oliveira et al. (2019), onde a modificação foi realizada pelo método de aquecimento convencional, um valor máximo de GS de 0,31 foi obtido em um tempo de reação de 20 min. Na mesma razão GC/anidrido ftálico (m/m) e aumentando o tempo de reação para 8 min (GCF 3), um aumento no valor de GS (0,43) foi observado.

A Tabela 4 mostra os resultados da análise elementar de GC e dos derivados ftalados. Observou-se um aumento na razão carbono e hidrogênio (C/H) dos derivados modificados. Isso se deve à inserção do grupo ftalado na cadeia do polímero. Porém, a relação C/H entre os derivados apresentou valores semelhantes, corroborando com os resultados do GS por ^1H RMN.

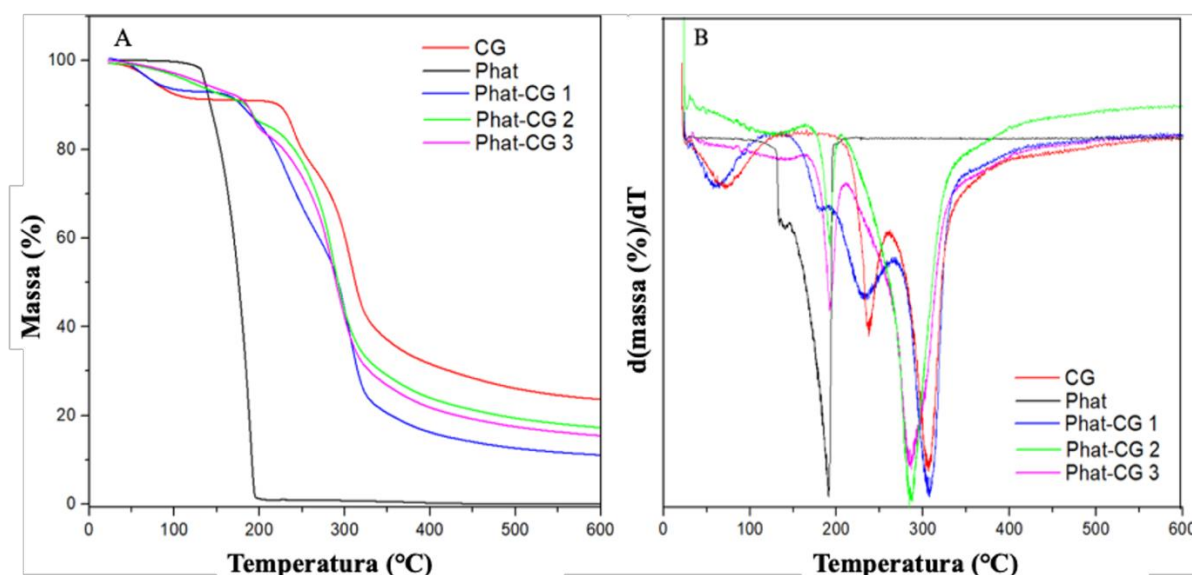
A Figura 9 (A e B) mostra as curvas TG/DTG para o GC e derivados ftalados. O primeiro evento na região de 35–130 °C para GC foi atribuído à perda de água e gás, onde o percentual de perda foi de 8,08%. O segundo evento para GC ocorreu em 214–265 °C, que corresponde à condensação de grupos hidroxila, já o terceiro evento ocorreu a 269–345 °C, que corresponde à degradação térmica da estrutura polissacarídeo com perda de massa de 15,15% e 41,21%, respectivamente (SILVA et al., 2006; CORDEIRO et al., 2017).

Para o derivado GCF 1, quatro eventos de degradação foram observados, com porcentagens de perda de massa de 6,8% (34–108 °C), 4,78% (147–118 °C), 24,16% (195–263 °C) e 39,79% (272–337 °C). Os derivados GCF 2 e GCF 3 apresentaram três eventos de degradação. As porcentagens de perda de massa para GCF 2 foram 6,23% (68–162 °C), 5,50% (172–337 °C) e 54,37% (208–338 °C). Para GCF 3, as porcentagens de perda de massa foram 4,84% (62–160 °C), 8,9% (166–207 °C) e 56,0% (215–333 °C). O primeiro evento observado para esses derivados apresentou menores valores de teor de umidade quando comparado a GC. Esses dados corroboram os valores observados para o GS, pois à medida que a derivado se torna mais substituída, o teor de água diminui, alterando a hidrofobicidade do material.

De acordo com as curvas TG/DTG, o segundo evento de perda de massa dos derivados pode ser relacionado ao anidrido ftálico enxertado na estrutura do polissacarídeo. É possível perceber que a maior perda de massa ocorreu com os derivados que apresentaram o maior valor do GS. Braz et al. (2018) estudou a modificação química da quitosana com anidrido maléico. Foi observado que à medida que o GS aumentou, houve também um aumento na variação da perda de massa, conforme observado neste estudo de GC com anidrido ftálico.

O terceiro e quarto eventos de decomposição do GCF 1 ocorreram em temperatura próxima à observada para o segundo e terceiro evento da GC, o que revela que a estabilidade térmica desta derivada não foi alterada. Por outro lado, os derivados GCF 2 e GCF 3 apresentaram perfis de decomposição semelhantes. Pode-se observar que as temperaturas de decomposição desses materiais modificados foram menores que as da GC, o que revela uma menor estabilidade térmica dos materiais modificados. Ao observar os eventos de degradação dos materiais GCF 2 e GCF 3, um evento a menos foi identificado quando comparado ao GCF 1. No entanto, um ombro foi observado nas curvas para GCF 2 (212–266 °C) e GCF 3 (215–266 °C), indicando sobreposição desse evento, que pode ter sido causada pela quantidade de material enxertado.

Figura 9 – Curvas termogravimétricas (A) e curvas derivadas (B) da goma de cajueiro e derivados ftalados.

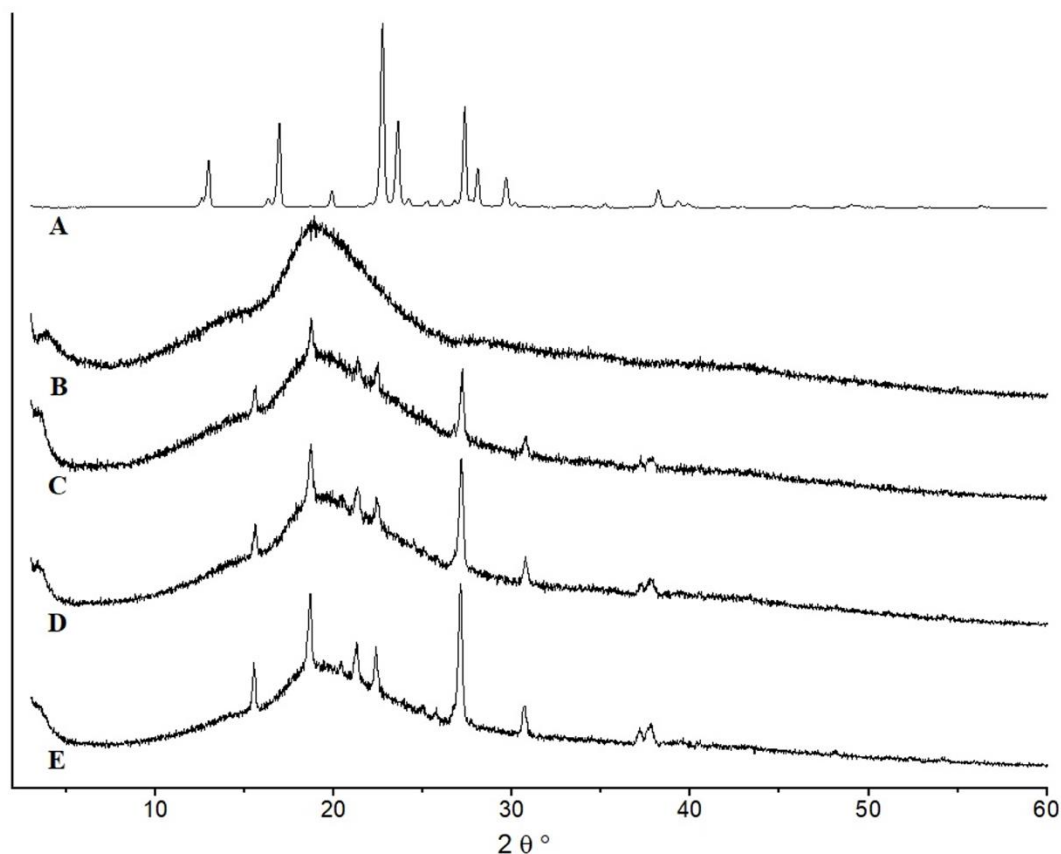


Fonte: Elaborado pelo autor.

A Figura 10 mostra os difratogramas do GC e dos derivados ftalados. A GC apresentou características com baixa cristalinidade, pois sua estrutura segue uma certa ordem microcristalina (SILVA et al., 2019). Os difratogramas dos derivados mostraram novos picos de difração a $2\theta = 15,4^\circ$, $18,7^\circ$, $21,27^\circ$, $22,38^\circ$, $27,13^\circ$, $30,78^\circ$, $37,19^\circ$ e $37,86^\circ$. Essas alterações revelam a incorporação do anidrido ftálico na cadeia do polímero, apresentando características mistas de amorficidade e cristalinidade. Espera-se que as modificações ocorram primeiro nos grupos hidroxila, localizados na superfície do polímero. Após o rearranjo da superfície, novos padrões cristalográficos podem surgir devido a interações químicas (TEIXEIRA et al., 2018). Todos os derivados seguiram o mesmo padrão de cristalinidade, entretanto, observou-se que o pico de intensidade aumentou com o aumento do GS.

Estudos relataram que mudanças com anidridos tendem a aumentar a cristalinidade dos polissacarídeos (ZANG et al., 2013; BRAZ et al., 2018). Isso é resultado das possíveis interações do anidrido ftálico com grupos hidroxila e, portanto, essas interações afeta o processo de crescimento do cristal (ZHANG e ZHANG, 2015). Após a modificação, em geral, ocorrem rearranjos na superfície dos polissacarídeos, e o surgimento de novos padrões sugere que se trata de interações π - π (MELO et al., 2010). Os anéis aromáticos são mais sujeitos a um processo de organização e, portanto, os movimentos moleculares podem ser limitados devido à sua rigidez, portanto, o empacotamento de cadeias poliméricas em redes cristalinas é facilitado (GUIMARÃES et al., 2007).

Figura 10 – Padrões de DRX de (A) anidrido ftálico, (B) GC, (C) GCF 1, (D) GCF 2 e (E) GCF 3.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 5 – Coeficiente de solubilidade e tempo de relaxamento T_2 da GC e derivados ftalados.

	T_2 (ms)	Solubilidade g/100g H ₂ O	Solubilidade em SGF g/100g H ₂ O
GC	0,42	94,47 ± 2,04	82,57 ± 5,77
GCF 1	0,15	27,56 ± 0,52	27,43 ± 3,57
GCF 2	0,15	30,22 ± 3,52	30,31 ± 2,25
GCF 3	0,15	26,33 ± 6,37	26,99 ± 4,86

Fonte: Elaborado pelo autor.

A Tabela 5 mostra os resultados dos experimentos de relaxometria de RMN T_2 . As medições de T_2 são correlacionadas à dinâmica molecular do polímero (VORON'KOA et al., 2017). Em comparação com o GC, as derivadas modificadas apresentaram tempos T_2 menores.

Isso significa que os derivados ftalados apresentaram menor mobilidade molecular em termos estruturais. A presença de grupos hidrofóbicos, que estão relacionados ao anel aromático, garante os domínios rígidos e, assim, diminui a mobilidade molecular. Essas observações são facilmente corroboradas pela análise de DRX, devido ao perfil cristalino os derivados ftalados apresentarem menor mobilidade nas cadeias poliméricas (SHAPIRO, 2011).

Os polissacarídeos geralmente exibem características estruturais distintas em termos de peso molecular, composição, padrão de ligação glicosídica e grau de ramificação (GOU et al., 2017). O estudo desses fatores determina as propriedades funcionais dos polissacarídeos, como a solubilidade, que é criticamente importante para várias aplicações na área de ciência farmacêutica (VASCONCELOS SILVA et al., 2019; XU et al., 2019).

A Tabela 5 mostra os coeficientes de solubilidade de GC e dos derivados ftalados em água Milli-Q e FGS sem pepsina. Na literatura, já está definido que GC apresenta boa solubilidade em ambientes aquosos (KIM et al., 2018). Esse fenômeno é devido à presença de vários grupos OH, o que leva a uma forte interação entre as moléculas de polissacarídeos por meio de ligações de hidrogênio. Portanto, o equilíbrio entre as interações polímero-água é energeticamente favorável e cria uma camada de solvatação ao redor da cadeia polimérica que mantém as moléculas de polissacarídeo separadas (MOTHÉ e RAO, 1999; NAYAK et al., 2019).

Devido ao substituinte ftalado, os derivados modificados exibiram baixa solubilidade em água. Esse efeito é explicado pelas interações intramoleculares entre os segmentos poliméricos que causam agregação entre as cadeias poliméricas, o que dificulta sua solubilidade em meio aquoso (OLIVEIRA et al., 2019). Os resultados de solubilidade corroboram com as demais caracterizações já discutidas neste trabalho, indicando que a inserção do grupo ftalado ocorreu com sucesso em todos os derivados. Observou-se que a reação por MW ocorreu com a mesma eficiência em todas as condições reacional. A solubilidade em FGS foi avaliada com o objetivo de utilizar polímeros ftalados como possível matriz polimérica para transporte de fármacos. A literatura relata que a presença de grupos ftalados em condições ácidas tende a promover proteção aos fármacos (AIEDEH, TAHA e AL-KHATIB, 2005; UBAIDULLA et al., 2007).

4.1.3.3 Caracterização das nanopartículas

Dentre os derivados ftalados obtidos, o derivado GCF 1 foi selecionado para produzir nanopartículas. Este derivado foi escolhido por apresentar o padrão de decomposição térmica mais próximo ao observado para GC, e os picos de cristalinidade foram menos intensos quando

comparados aos demais derivados. No entanto, nanopartículas sem o fármaco foram obtidas com todos os derivados e caracterizadas de acordo com dados de tamanho, PDI e potencial zeta. Todos apresentaram características semelhantes.

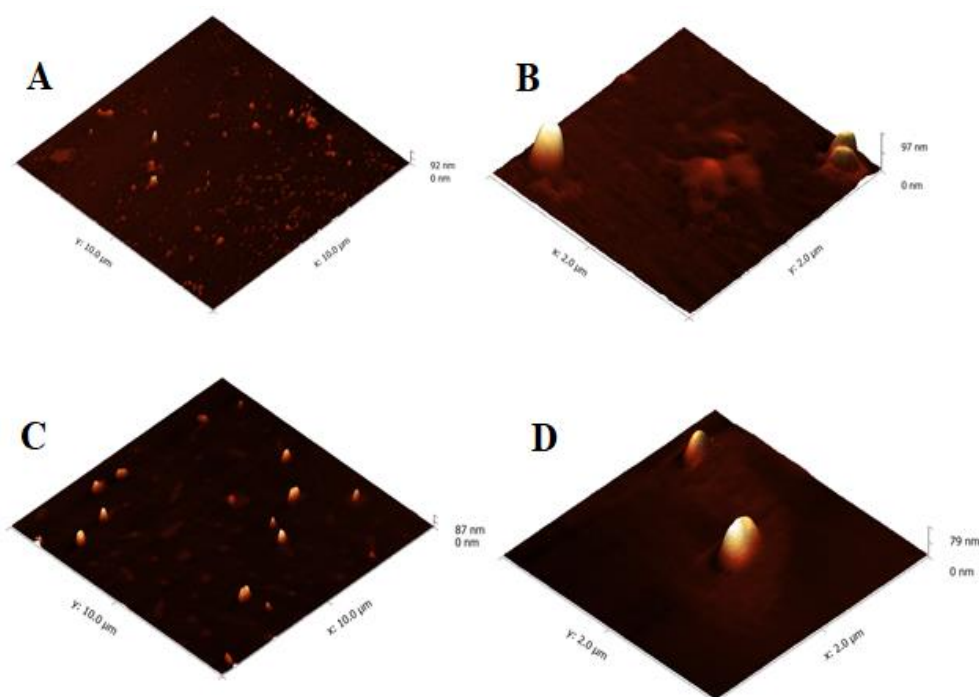
O método utilizado para a obtenção das nanopartículas poliméricas foi a nanoprecipitação. O polímero e o fármaco estão em uma fase orgânica que é miscível com água. Quando a fase aquosa é adicionada à fase orgânica, ocorre uma diminuição da tensão interfacial entre a fase aquosa e a fase orgânica, e a difusão do solvente orgânico na fase aquosa ocorre muito rapidamente, favorecendo a formação de nanopartículas (SUR et al., 2019). O processo de sonicação contribuiu para uma melhor distribuição do tamanho de partícula (KARAKUS et al., 2019; HEDAYATI, NIAKOUSARI e MOHSENPOUR, 2020).

A NP–BNZ apresentou tamanho hidrodinâmico médio de $288,4 \pm 8,5$ nm, PDI de $0,27 \pm 0,02$ e potencial zeta de $-31,8 \pm 0,9$ mV, que são considerados parâmetros adequados para nanossistemas monodispersos e estáveis (CRUCHO e BARROS, 2017). A eficiência de encapsulação e o *drug loading* foram 33,5% e 5,43%, respectivamente. Embora parâmetros adequados tenham sido alcançados a partir das nanopartículas produzidas, a eficiência de encapsulação poderia ter sido melhorada usando métodos de otimização que tendem a melhorar as taxas de carregamento de fármacos (SANTOS-SILVA et al., 2017). Nanopartículas brancas foram produzidas e apresentaram tamanho de $270,3 \pm 1,4$ nm, PDI $0,26 \pm 0,01$ e potencial zeta de $-32,8 \pm 1,8$ mV. Um ligeiro aumento no tamanho foi observado para as NP–BNZ quando comparado às nanopartículas brancas. Esse resultado corrobora com outros estudos e pode ser explicado pela presença do fármaco que pode reorganizar a matriz polimérica, proporcionando um aumento no tamanho (CHAVES et al., 2018; AMINU et al., 2020).

Na metodologia apresentada neste trabalho, não foi necessário o uso de surfactante na fase aquosa para a obtenção dos sistemas poliméricos. O derivado ftalado obtido no estudo possui características anfífilas, o que reduz a tensão superficial entre o nanossistema e a solução aquosa, permitindo a estabilização das nanoestruturas (MENDES et al., 2011; ROY et al., 2014). Essa evidência pode ser vista a partir da análise do potencial zeta, que é um parâmetro importante para a estabilidade das partículas (ABRIATA et al., 2017). As nanopartículas exibiram caráter aniônico, devido aos grupos ácidos que foram inseridos nas cadeias da GC. Esses resultados indicam que pode ser vantajoso usar um biopolímero modificado em vez de um polímero sintético de alto custo. Além disso, devido à alta hidrofobicidade do polímero sintético é necessário o uso de surfactantes para melhorar a estabilidade coloidal do sistema polimérico (CHAVES et al., 2018).

A morfologia das nanopartículas foi observada por AFM (Figura 11 A-D). Ambas as nanopartículas apresentaram morfologia esférica. Observou-se que os tamanhos médios das nanopartículas avaliados por AFM foram menores do que os determinados por DLS. A análise AFM contém informações sobre as três dimensões do sistema. Nas imagens, o eixo z é normalmente usado para determinar o diâmetro das partículas esféricas (SITTERBERG et al., 2010; EATON et al., 2017). A análise de tamanho determinada pelo DLS é uma medida indireta, pois as dimensões são avaliadas por meio do raio hidrodinâmico, medido a partir do espalhamento de luz (BHATTACHARJEE, 2016). Além disso, as camadas iônicas, a camada de solvatação e o comportamento de dispersão das partículas em solução são condições que influenciam a medição (EATON et al., 2017).

Figura 11 – Imagem 3D por Microscopia de Força Atômica das nanopartículas carregadas com benznidazol (A-B) e nanopartículas brancas (C-D). Imagens com tamanhos de 10 e 2 μm e resolução de 512 pixels.

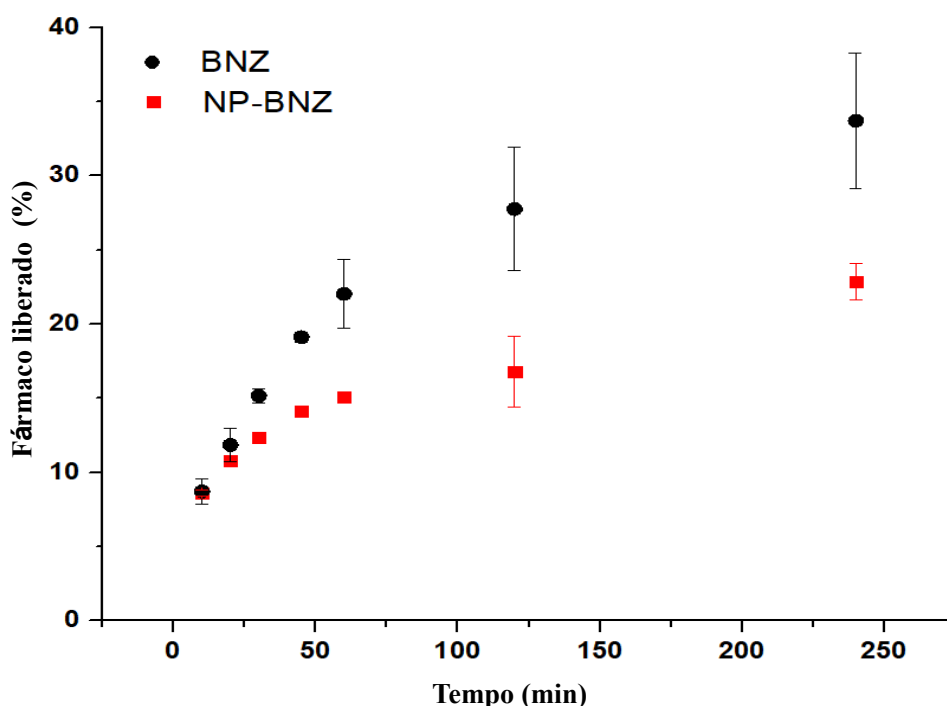


Fonte: Elaborado pelo autor.

O perfil de liberação *in vitro* das NP-BNZ foi estudado para avaliar seu desempenho como forma de administração oral. A Figura 12 mostra o perfil de liberação das NP-BNZ e BNZ livre sob condições de FGS sem a presença de enzimas. Como pode ser visto, tanto NP-BNZ ($8,6 \pm 0,2\%$) quanto BNZ livre ($8,7 \pm 0,8\%$) apresentaram taxas semelhantes nos momentos iniciais do estudo. Isso porque parte do BNZ permaneceu na superfície da

nanopartícula (SEREMETA et al., 2019). No entanto, em 120 min, NP-BNZ liberou cerca de $16,7 \pm 2,3\%$, enquanto para BNZ livre $27,7 \pm 4,1\%$. Após 240 min, NP-BNZ liberou cerca de $22,8 \pm 1,2\%$, enquanto para BNZ livre $33,7 \pm 4,5\%$. Essas diferenças foram estatisticamente significativas com $p < 0,0001$. Em comparação com a fármaco livre, a nanopartícula carregada com BNZ exibiu uma liberação contínua e consideravelmente mais lenta.

Figura 12 – Perfil de liberação *in vitro* das nanopartículas carregadas com benznidazol e benznidazol livre no fluido gástrico simulado.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Essa resistência das nanopartículas ao meio ácido pode ser explicada pelo baixo inchamento dos grupos ftalados no meio FGS, provavelmente devido às características hidrofóbicas do polímero. Nessas condições, os grupos carboxílicos presentes no sistema estão na forma não ionizada, o que os torna menos hidrofílicos. García et al. (2018) mostraram os perfis de liberação de BNZ em complexos interpolieletrólitos compostos por polissacarídeos (quitosana e alginato) e polímeros sintéticos (polimetacrilatos). Para ambos os sistemas, foi observada uma liberação lenta e prolongada de BNZ no meio de dissolução (FGS). No caso do sistema composto por polissacarídeo, observou-se menor liberação de BNZ em relação ao composto de polimetacrilato, devido às interações entre os grupos amino da quitosana e os

grupos ácidos do alginato, uma vez que a solubilidade da quitosana no meio gástrico é evitada pela rede de alginato, que é insolúvel em condições ácidas (KARUNA et al., 2018).

O derivado modificado utilizado neste trabalho pode se tornar uma plataforma interessante para a liberação modificada de fármacos. No entanto, testes de citotoxicidade e avaliação da eficácia de nanopartículas em cultura de células para *T. cruzi* ainda são necessários.

4.1.4 Considerações finais

Neste estudo, um método de síntese iniciado por MW para produzir goma de cajueiro ftalada foi realizado com sucesso. Foram preparados três derivados e realizada a caracterização estrutural e físico-química. A variação da potência e do tempo do MW influenciou as propriedades dos derivados. Observou-se que quanto maior a potência e o tempo do MW, maior a hidrofobização da goma do cajueiro. A temperatura e a agitação magnética foram mantidas de forma controlada para garantir a reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados, mostrando que a metodologia apresentada neste trabalho é mais eficiente que o método convencional de aquecimento térmico. Utilizando a tecnologia farmacêutica como estratégia, foi possível obter nanopartículas poliméricas utilizando goma cajueiro ftalada para administração de BNZ. Os resultados verificaram que, com a modificação, o polímero proporcionou maior proteção ao fármaco no ambiente de fluido gástrico simulado. Por fim, o sistema desenvolvido pode ser útil para o tratamento da doença de Chagas.

4.2 ARTIGO 2 – DESIGN DE NANOPARTÍCULAS DE GOMA DO CAJUEIRO FTALADA CARREGADAS COM BENZNIDAZOL E EFICÁCIA Anti-*Trypanosoma cruzi*

4.2.1 Introdução

Classificada pela OMS como doença negligenciada, a doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e possui poucas alternativas de tratamento disponíveis (PRATA, 2001; MALIK, SINGH e AMSTERDAM, 2015). Tendo apenas o BNZ como principal fármaco disponível comercialmente para o tratamento de pacientes (BERMUDEZ et al., 2016).

O BNZ possui eficácia comprovada durante a fase aguda da doença, onde as formas tripomastigota estão circulantes (BOCCHI et al., 2017; MORILLO et al., 2015). Durante a fase crônica sua eficácia é baixa, pois nesse estágio as formas amastigotas estão internalizadas nas células principalmente no coração e nos músculos digestórios, causando distúrbios como cardiopatia chagásica, megaesôfago e megacólon (SILVA JUNIOR et al., 2017; PÉREZ-MOLINA e MOLINA, 2018).

O BNZ possui baixa solubilidade em meio aquoso o que dificulta a sua permeabilidade nas barreiras biológicas (SANTOS-VALLE et al., 2019). O tratamento sugerido na fase aguda para adultos é baseado em comprimido que contém 100 mg de BNZ administrado por via oral e com duas ou três doses diárias por um período 60 dias. As altas doses, causam alta toxicidade e desencadeia diversas reações adversas, contribuindo para a não adesão do paciente a terapia. Na fase crônica não há indicação para o tratamento (LEONARDI et al., 2009; LIMA et al., 2011; SOARES-SOBRINHO et al., 2012; DIAS et al., 2016). Por mais que o BNZ apresente várias limitações em relação ao seu uso a literatura reporta que nenhuma outra molécula se mostrou tão efetiva contra a parasitemia causada por *T. cruzi* (MORILLA e ROMERO, 2015; BERMUDEZ et al., 2016; PÉREZ-MOLINA et al., 2020; SANTOS et al., 2020). Assim, diferentes estratégias estão sendo buscadas para superar suas limitações.

Nos últimos anos, novas formulações de BNZ foram desenvolvidas como dispersões sólidas (FIGUEIRÊDO et al., 2018; FONSECA-BERZAL et al., 2015; LIMA et al., 2011), complexos de inclusão (LEONARDI, BOMBARDIERE e SALOMON, 2013; SOARES-SOBRINHO et al., 2011; SOARES-SOBRINHO et al., 2012). E em particular os nanossistemas tem se mostrado bastante promissores, isso pois oferecem um ambiente que promove uma melhor biodisponibilidade aos fármacos hidrofóbicos (NHAVENE et al., 2018; SANTOS-SILVA et al., 2017; SEREMETA et al., 2019). A formulação ideal contra o *T. cruzi*, deve ser de fácil acesso e baixo custo, ou seja, devem ser destinados à via oral, em um regime posológico

de uma vez ao dia durante 30 dias, com uma segurança superior ao BNZ e eficácia não inferior ou idealmente superior ao BNZ (MORILLA e ROMERO, 2015). Nesse sentido as nanopartículas se apresentam como potenciais escolhas, além do mais elas podem ser produzidas utilizando materiais de fácil acesso.

A classe de materiais que possuem potencial uso para produzir nanocarreadores são os biopolímeros, isso devido à sua biocompatibilidade e baixa toxicidade (LING et al., 2018; SHANKAR e RHIM, 2018). Um biopolímero oriundo da flora brasileira, conhecida como GC, que é um heteropolissacarídeo obtido do exsudato do *Anacardium occidentale* L., tem demonstrado potencial uso na área de tecnologia farmacêutica, isto porque sua estrutura química tem se mostrado bastante versátil para a introdução de grupos funcionais, o que potencializa seu uso como matriz para produção de nanopartículas poliméricas, pois a presença dos grupamentos químicos inseridos durante o processo de síntese facilita o empacotamento de fármacos (DIAS et al., 2016; LIMA et al., 2018; PITOMBEIRA et al., 2015; SILVA et al., 2019). Além disso, alguns grupamentos químicos, tais como os ácidos carboxílicos, podem propiciar vantagens físico-químicas como, resistência em ambiente ácido, o que favorece a entrega de fármacos por via oral, como é o caso da modificação por ftalação (OLIVEIRA et al., 2021).

Uma ferramenta que tem sido bastante utilizada para otimizar a produção de produtos farmacêuticos que atendam atributos críticos de qualidade é *designs* de experimentos (BASTOGNE, 2017). O design de Plackett-Burman (DPB) é um tipo de desenho que surge com estratégias de triagem que podem ser usadas para identificar fatores críticos com um número razoável de execuções experimentais e um bom grau de precisão (BAHADORI et al., 2019). Já que durante a produção de nanopartículas vários fatores podem afetar o desempenho (CHAVES et al., 2017; RAHMAN et al., 2010).

Diante do exposto o presente estudo concentrou-se na concepção de nanossistemas usando delineamento experimental para o desenvolvimento de nanopartículas poliméricas de goma de cajueiro modificada por ftalação carregadas com BNZ. E assim avaliar os parâmetros críticos que influenciam suas características como, tamanho de partícula, PDI, Potencial Zeta, eficiência de encapsulação e *drug loading*. Além disso, avaliar seu comportamento em fluidos digestivos simulados em conjunto com Microscopia Eletrônica de Varredura, desempenho da liberação do fármaco e a citotoxicidade para macrófagos e para cepas de *T. cruzi*.

4.2.2 Materiais e métodos

4.2.2.1 Materiais usados

Dimetilformamida (DMF), acetona, dodecil sulfato de sódio (DSS), DMSO e HCl grau analítico foram obtidos da Dinâmica (SP – Brasil). Anidrido ftálico puro, meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), soro fetal bovino (SFB), antibióticos penicilina e estreptomicina, brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difeniltetrazólio (MTT) e membrana de acetato de celulose (14000 Da) foram obtidos Sigma–Aldrich (St. Louis, USA). O fármaco Benznidazol (BNZ), foi gentilmente doado por Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco – LAFEPE (PE – Brasil).

4.2.2.2 Preparação e caracterização da goma do cajueiro fitalada (GCF)

O exsudato do cajueiro foi coletado de árvores do gênero *Anacardium occidentale* L., nativas de Ilha Grande de Santa Isabel, Piauí - Brasil. A goma do cajueiro ($M_w = 2,12 \times 10^4$ g/mol) foi purificada pela metodologia proposta por (DE PAULA, HEATLEY e BUDD, 1998).

A modificação da (1,0 g) goma do cajueiro com (2,0 g) anidrido ftálico em (10,0 mL) DMF, deu-se por meio do uso da irradiação em reator de micro-ondas (CEM Discover Microwave Reactor, USA) na potência de 160W e tempo 3 minutos, utilizando temperatura de 80°C e agitação média. O produto final (GCF) da reação foi precipitado e lavado em água e liofilizado (OLIVEIRA et al., 2021).

O polímero modificado foi caracterizado por espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier, usando um espectrofotômetro PerkinElmer, espectro 400, com módulo ATR, na faixa de 4000 a 700 cm^{-1} .

4.2.2.3 Preparação das nanopartículas de goma fitalada

As nanopartículas foram preparadas seguindo a técnica de nanoprecipitação (CHAVES et al., 2018). Resumidamente, uma quantidade de GCF (10,0 ou 20,0 mg) e BNZ (10,0 ou 20,0 mg) foram dissolvidos em mistura de solventes acetona e DMSO na proporção (1:1 v/v), em volumes especificados (0,5 ou 1,0 mL). A fase orgânica foi adicionada à fase aquosa composta somente por água deionizada (10,0 ou 20,0 mL), e sonicada durante 2 min com amplitude de 70% (Sonicador de ponteira ultrassônico, Eco-sonics, SP- Brasil). Volume final de fase aquosa foi ajustado para 20,0 mL. As nanopartículas foram mantidas sob agitação magnética, a temperatura ambiente para a completa evaporação da fase orgânica. O valor de cada variável foi selecionado de acordo com o desenho experimental (ver Seção 4.2.2.4).

4.2.2.4 Design experimental

Os principais parâmetros que podem influenciar nas características das NP-BNZ foram avaliadas através da construção de um DPB. O projeto foi elaborado com quatro fatores (n=4) e oito experimentos, usando o software STATISTICA 10 (StatSoft®, Dell Software, Round Rock, TX, EUA). A equação utilizada é modelo de interação de primeira ordem:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \dots + \beta_n X_n \quad \text{Equação. 7}$$

onde Y é a resposta, β_0 é uma constante e β_i são os coeficientes dos valores de resposta, X_i são os fatores sob investigação.

Os parâmetros escolhidos foram quantidade de polímero (X_1); quantidade de fármaco (X_2); volume da fase aquosa (X_3); volume da fase orgânica (X_4). A seleção do nível de parâmetro foi baseada em estudo preliminar e na literatura. Os dois níveis de fatores independentes para triagem do desenho e domínio do experimento de cada variável foram resumidos na Tabela 5. Variáveis não estudadas, incluindo solvente orgânico utilizado (acetona/DMSO); método de preparação da nanopartícula; método de evaporação de solvente (agitação magnética); volume final das nanopartículas (20 mL); amplitude (70%), foram fixados. As respostas selecionadas foram: tamanho de partícula (Y_1), índice de polidispersão (PDI, Y_2), Potencial Zeta (Y_3), eficiência de encapsulação (Y_4) e *drug loading* (Y_5).

Tabela 6 – Fatores experimentais e seu nível.

Fator	Significância do fator	Nível (-1)	Nível (+1)
X_1	Polímero (mg)	10	20
X_2	Fármaco (mg)	10	20
X_3	volume da fase aquosa (mL)	10	20
X_4	volume da fase orgânica (mL)	0,5	1

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.2.5 Caracterização das nanopartículas carregadas com BNZ

4.2.2.5.1 Tamanho, PDI e Potencial Zeta

As medidas do tamanho das partículas e o Índice de Polidispersão (PDI) foram realizados através do espalhamento dinâmico de luz (espectroscopia de correlação de fótons). A carga superficial das nanopartículas foi determinada por eletroforese doppler laser. As análises foram realizadas no Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical). As medidas foram feitas em triplicada a 25°C, com ângulo de detecção de 90°.

4.2.2.5.2 *Análise de Infravermelho por Transformada de Fourier*

As nanopartículas carregadas com BNZ e o BNZ livre foram caracterizadas por espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier, usando um espectrofotômetro PerkinElmer, espectro 400, com módulo ATR, na faixa de 4000 a 700 cm^{-1} .

4.2.2.5.3 *Estabilidade e morfologia das nanopartículas carregadas com BNZ*

A estabilidade das nanopartículas carregadas com BNZ foram realizadas em meio gástrico simulado (USP 34) sem a presença de enzimas e meio intestinal simulado (USP) sem a presença de enzimas. Brevemente, 5 mL de nanopartículas foram adicionadas as 5 mL de cada tampão, as amostras foram mantidas a temperatura 23 °C.

A estabilidade foi monitorada utilizando o Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical) e foram avaliados o tamanho de partícula, PDI e potencial zeta em tempos pré-determinados 2 h, 24 h e 48 h. As medidas foram realizadas em triplicada a 25°C, com ângulo de detecção de 90°.

Após 48 h foi realizada a análise morfológica das nanopartículas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Aproximadamente, 10 μL de cada amostra foi depositada em suporte através de fita adesivas, secas em estufa por 24 h e metalizadas com ouro. Foi utilizado o equipamento GEMINI (FESEM) CARL Zeiss.

4.2.2.5.4 *Determinação da eficiência de associação e drug loading*

A quantificação de BNZ dentro das nanopartículas de GCF foi realizada pela determinação do fármaco não encapsulado, aplicando o método de ultracentrifugação (CHAVES et al., 2018). Brevemente, as amostras foram preparadas pela diluição adequada de NP-BNZ com DSS 0,1% (pH 3,4), para garantir que o fármaco não aprisionado permanecesse solúvel. As amostras foram centrifugadas a $17.828 \times g$ por 30 min (**Centrifuga 5417R, Eppendorf**). A absorbância do sobrenadante foi medida por espectroscopia UV-VIS (Vankel 50 UV-Vis, Varian) a 322 nm. Curvas padrão foram obtidas para BNZ em DSS 0,1% (pH 3,4). Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$). A eficiência de encapsulação (EE) e o *drug loading* (DL) foram calculados seguindo as equações:

$$EE = \frac{\text{quantidade de farmaco inicial} - \text{farmaco recuperado}}{\text{quantidade de farmaco inicial}} \times 100 \quad \text{Equação. 8}$$

$$DL = \frac{\text{quantidade de farmaco inicial} - \text{farmaco recuperado}}{\text{quantidade de farmaco inicial} + \text{quantidade de polimero inicial}} \times 100 \quad \text{Equação. 9}$$

4.2.2.6 Estudos de liberação *in vitro* das nanopartículas carregadas com benznidazol

A determinação do perfil de liberação das NP-BNZ e do BNZ livre foram obtidos em fluidos digestivos simulados sem enzimas, utilizado sistema de membrana dialise (14.000 Da). As nanopartículas foram liofilizadas, ressuspensas em 2,0 mL de água e incubadas em 120 mL de fluido gástrico simulado (FGS) sem pepsina (USP 34) a 37 °C por 120 min sob agitação, seguido de incubação em 120 mL de fluido intestinal simulado (FIS) sem pancreatina (USP 34) até 600 min. Aliquotas foram coletadas e substituídas pelo mesmo volume de meio de incubação fresco em tempos pré-determinados. As amostras foram quantificadas por espectroscopia UV-Vis. As análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos como média $\pm$ D.P.

A eficiência de dissolução (ED%) foi determinada através dos gráficos de porcentagem de BNZ liberado (%) em função do tempo conforme descrito na Equação 10.

$$ED = \frac{ASC_t}{A_r} \quad \text{Equação. 10}$$

Onde ASC é a área sob a curva do perfil de dissolução calculada através da integração da curva do perfil de liberação das NP-BNZ (t: FGS e FIS) e A_r é a área definida pela ordenada (100% de dissolução) e pela abscissa (tempo igual a 120 e 450 min).

Os parâmetros para determinar os dados da cinética de liberação das nanopartículas foram analisados estatisticamente pelo software DDSolver. O modelo foi selecionado de acordo com o coeficiente de correlação ajustado (R^2_{adj}). Para os FGS e FIS os modelos que melhor se adequaram foram Peppas-Sahlin (Eq. 11) e Korsmeyer-Peppas (Eq. 12), respectivamente (Eq. 5):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K_1 t^m + K_2 t^{2m} \quad \text{Equação. 11}$$

K_1 : é a constante que representa a contribuição da difusão Fickiana.

K_2 : é a constante que representa a contribuição do relaxamento no mecanismo de liberação.

m : é o coeficiente de difusão Fickiano.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K t^n \quad \text{Equação. 12}$$

K: é a constante cinética.

n: é o coeficiente de liberação

4.2.2.7 Ensaio *in vitro* de citotoxicidade

Foram utilizados macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 mantidos no Laboratório de Doenças Infecciosas (LADIC) da Universidade Federal do Delta do Parnaíba (UFDPAr). Os macrófagos foram cultivados em frascos de cultura contendo meio DMEM suplementado com 10 % de SFB e 1 % de antibióticos penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) à 37 °C e 5 % de CO₂.

Para os ensaios de citotoxicidade, os macrófagos foram cultivados em placa de 96 poços contendo 100 µL de meio DMEM suplementado na quantidade de 1×10^5 macrófagos por poço. Essas células foram incubadas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂ por 4 h para adesão celular. Após esse tempo, foram feitas duas lavagens com meio DMEM previamente aquecido a 37°C para retirada das células que não aderiram. Posteriormente, foram adicionados 100 µL de DMEM suplementado contendo as soluções-estoque dos compostos (GCF, NP-GCF, NP-BNZ e BNZ) em triplicata, nas concentrações seriadas de 31,25 a 250 µM e incubados a 37 °C e 5% de CO₂ por 48 h. Ao final desse período, foram adicionados 10 µL de MTT atingindo a concentração de 5 mg/mL e incubados por mais 4 h. Em seguida o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 100 µL de DMSO em todos os poços. Ao final do processo, a placa foi colocada sob agitação por cerca de 30 min em agitador de Kline para dissolução completa do formazan. Por último, foi realizada a leitura da absorbância a 550 nm em leitora de placa. A significância na redução da viabilidade foi calculada a partir da Análise de Variância (ANOVA), seguido pelo pós-teste de Tukey para comparação entre os grupos, sendo $*p < 0,05$; $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$ em comparação ao controle. Todas as análises foram realizadas no programa GraphPad Prism, v. 5.0.

Os valores de CC₅₀ (concentração citotóxica) para os macrófagos foram calculados usando o software *GraphPad Prism* versão 5.0. Para este cálculo foi utilizado o modelo de regressão não linear. Os valores representam a média ± E.P.M. calculada em três experimentos independentes.

4.2.2.8 Atividade antiparasitária *in vitro*

4.2.2.8.1 Cultivo do parasita

As formas epimastigota da cepa Y de *T. cruzi* foram cultivados em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) suplementados com SFB a 10% e antibiótico estreptomicina/penicilina a 5% e mantidos a 27°C. Para obtenção das formas tripomastigotas foi utilizado a metodologia desenvolvida por Contreras et al. (1985), na qual a culturas das formas epimastigotas após 7 dias de cultivo foram lavadas em PBS 1x e em seguida ressuspensas em meio TAU por 2 horas em completo repouso, após o período foi adicionado L-prolina e bicarbonato de sódio 1,4 M na proporção de 1:4 (v/v) e colocadas em repouso por 4 dias de acordo com a metodologia. Após o período foi realizado a verificação da diferenciação por microscopia de câmara clara.

4.2.2.8.2 Ensaio de resazurina

Os parasitas foram cultivados durante 5 a 7 dias para alcançar o final da fase log. Para tal atividade antiparasitária, os parasitas foram diluídos e contados com auxílio da câmara de Neubauer e utilizados na concentração de 1×10^7 parasitas/mL. Em seguidas foram plaqueados 200 µL em cada poço em placas de 96 poços, em um sistema de triplicatas e posteriormente foi aplicado os compostos (GCF, NP-GCF, NP-BNZ e BNZ) variando as concentrações de 1 a 100 µg. Em seguida, foram analisados a viabilidade das diferentes cepas do parasita no período de 24 horas após o tratamento. Utilizou-se como controle positivo o BNZ. Para avaliar essa viabilidade dos parasitas tratados com os diferentes compostos em diferentes concentrações, foi realizado o ensaio de redução da resazurina (Sigma Aldrich), que consistiu na aplicação de 20 µL de resazurina na concentração de 1mM em todos os poços de testes após as 24 horas de tratamento composto. Este processo de redução da resazurina tem a durabilidade de 24 horas após aplicação e em seguida foi realizado a leitura no leitor de microplacas (Epoch, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) utilizando os comprimentos de onda 570nm e 600nm. Na qual o percentual de inibição foi calculado pela seguinte formula:

$$\% \text{ Inibição} = 100 - ((A_{570t} - (A_{600t} \times R_0)) / (A_{570c} - (A_{600c} \times R_0))) \times 100 \quad \text{Equação. 12}$$

A_{570t}: Absorção do tratamento no comprimento de onda 570 nm.

A_{600t}: Absorção do tratamento no comprimento de onda 600nm.

A_{570c}: Absorção do controle no comprimento de onda 570nm.

A_{600c}: Absorção do controle no comprimento de onda 600nm.

R0: Fator de correção do Meio interagindo com a resazurina, sendo obtido pela seguinte fórmula:

$$R0 = C_{\text{meio } 570 \text{ nm}} / C_{\text{meio } 600 \text{ nm}} \quad \text{Equação. 13}$$

Cmeio570nm: Absorbância do meio no comprimento de onda de 570 nm.

Cmeio600nm: Absorbância do meio no comprimento de onda de 600 nm

A significância na redução da viabilidade foi calculada a partir da Análise de Variância (ANOVA), seguido pelo pós-teste de Tukey para comparação entre os grupos, sendo $*p < 0,001$ em comparação ao controle. Todas as análises foram realizadas no programa GraphPad Prism, v. 5.0.

Os valores de IC₅₀ (concentração inibitória) foram calculados usando o software *GraphPad Prism* versão 5.0. Para este cálculo foi utilizado o modelo de regressão não linear. Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. calculada em três experimentos independentes.

4.2.3 Resultados e discussão

4.2.3.1 Goma do cajueiro fitalada

A GCF foi obtida por meio de um processo de reação que envolve aquecimento por micro-ondas. Sendo é um polímero aniônico, como pode ser observado para os dados do potencial zeta, na seção 4.2.3.2. Essa característica esta intimamente ligada com a presença dos grupos fitalados que foram inseridos como, éster, anel aromático e ácido, mostrados na Figura 14 -A, no espectro de FTIR, o que comprova a modificação.

A presença desses grupos garante hidrofobicidade na cadeia polimérica, contudo, nem todas as hidroxilas (-OH) presentes nos monossacarídeos da GC foram substituídas. Essa característica proporciona a GCF um caráter anfifílico (OLIVEIRA et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2021). Deste modo esse polímero modificado torna-se uma boa escolha como matriz para a produção de nanopartículas polimérica, como discutido adiante.

4.2.3.2 Design Experimental

Método de preparação das nanopartículas poliméricas podem influenciam em várias características, logo torna-se crucial estabelecer condições no desenvolvimento de formulações de nanopartículas (CHAVES et al., 2017). Neste sentido, o DPB tende a ser uma ferramenta adequada para avaliar formulações de nanopartículas e analisar fatores críticos (VANAJA, RANI e 2007). Este estudo envolveu a produção de oito formulações baseadas em quatro fatores. As formulações projetadas e as respostas obtidas são mostradas na Tabela 7.

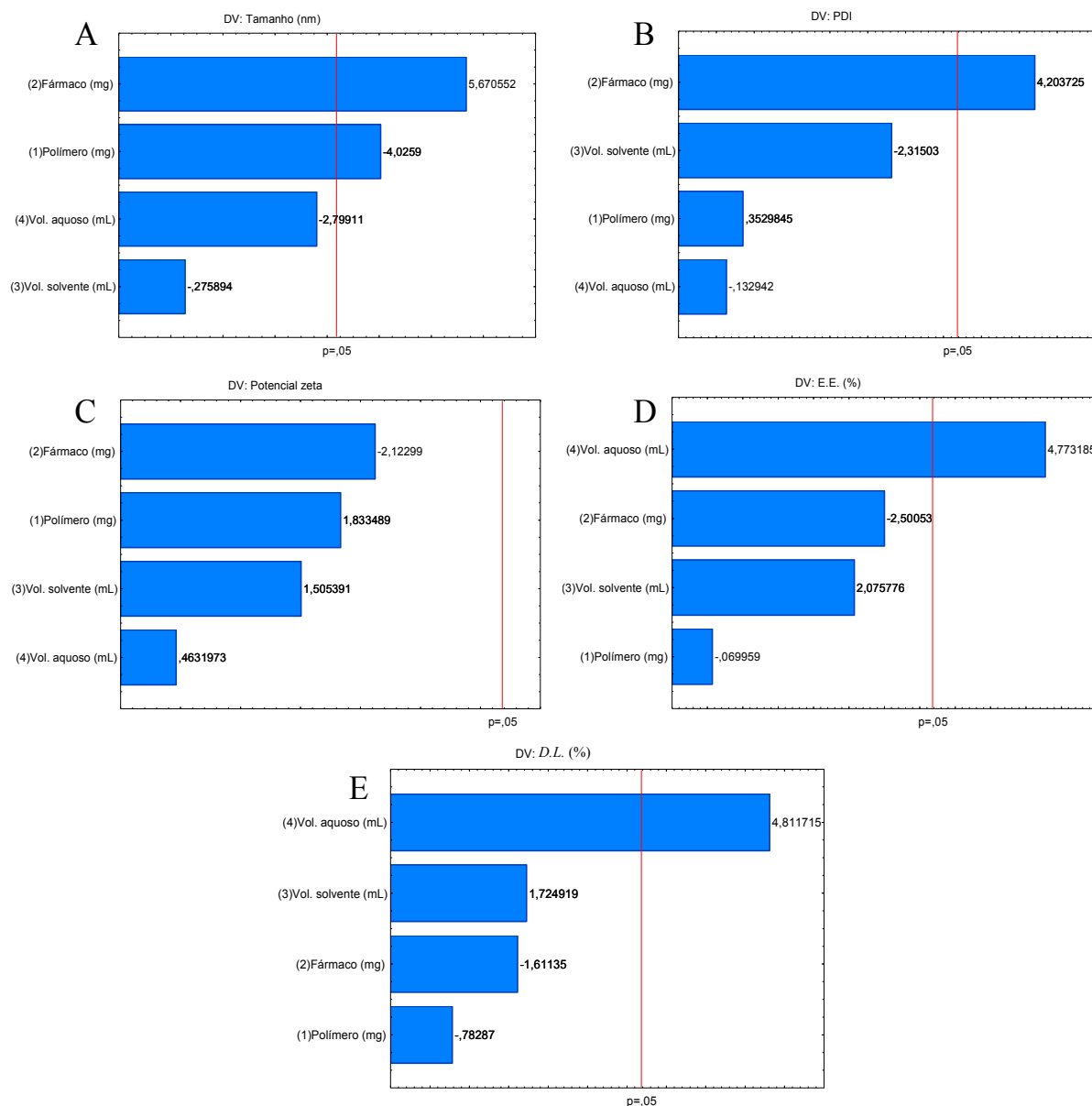
Tabela 7 – Layout e respostas observadas das formulações a partir DPB

Formulação	X ₁ (mg)	X ₂ (mg)	X ₃ (mL)	X ₄ (mL)	(Y ₁) (nm)	(Y ₂)	(Y ₃) (mV)	(Y ₄) (%)	(Y ₅) (%)
F1	10	10	1,0	20	187,9	0,24	-41,9	51,20	25,60
F2	20	10	1,0	10	167,4	0,27	-34,0	22,43	7,49
F3	10	20	1,0	10	351,1	0,42	-42,5	3,84	2,53
F4	20	20	1,0	20	184,0	0,38	-39,9	37,54	18,70
F5	10	10	0,5	20	179,5	0,28	-39,2	32,66	16,28
F6	20	10	0,5	10	154,2	0,31	-40,0	12,97	4,34
F7	10	20	0,5	10	332,5	0,58	-52,0	7,24	4,85
F8	20	20	0,5	20	244,8	0,64	-42,7	20,60	10,32

Variáveis independentes: Polímero (X₁); Fármaco (X₂); Volume de fase orgânica (X₃); volume da fase aquosa (X₄). **Variáveis dependentes:** Tamanho de partícula (Y₁); Índice de polidispersão (PDI, Y₂); Potencial Zeta (Y₃); Eficiência de associação (Y₄); *drug loading* (Y₅).

Na Figura 13 os gráficos de Pareto são apresentados. São mostrados os efeitos quantitativos das variáveis independentes nas variáveis dependentes. O sinal negativo do coeficiente indica que o aumento no valor da variável independente diminui o valor da variável resposta e vice-versa (SHAH et al., 2013).

Figura 13 – Gráficos de Pareto mostrando a significância das variáveis para (A) tamanho de partícula, (B) índice de polidispersão, (C) potencial zeta, (D) eficiência de associação e (E) *drug loading*. Os efeitos foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$, nível de confiança de 95%.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Para o tamanho de partícula (Y_1) as formulações obtidas variaram de 154,2 nm (F1) a 351,1 nm (F3) (Tabela 7). A análise de regressão mostrou que a quantidade de fármaco (X_2) e a quantidade de polímero (X_1) interferiram significativamente nos níveis de tamanho, nessa ordem de significância (Figura 13 A). O sinal positivo para o coeficiente de regressão revelou

que o aumento na quantidade do fármaco aumentou o tamanho de partícula. As formulações F3 e F7, foram as que apresentaram maior tamanho de partícula.

Uma possível explicação para este resultado é que apenas uma quantidade fixa de fármaco pode ser incorporada em uma determinada quantidade do polímero, um aumento adicional na quantidade de fármaco pode gerar uma fase dispersa mais viscosa resultando em partículas maiores e favorecendo a formação precipitados e cristais de BNZ (SHARMA, MADAN e LIN, 2016). Essa tendência pode ser atribuída ao fato de que a matriz polimérica pode ser tornar saturada por moléculas de fármaco quando uma alta concentração fármaco é usada, ou seja, as formulações que apresentaram tamanhos mais elevados não tinham polímero suficiente para encapsular e estabilizar o BNZ (RAFIEI e HADDADI, 2019).

Em relação a quantidade de polímero foi observado valor negativo para o coeficiente, o que indica que aumento na quantidade de polímero diminuiu o tamanho médio das partículas. Este fato ocorreu devido a quantidade de polímero usado ter sido igual e superior a quantidade de fármaco, logo houve uma menor precipitação do fármaco e as partículas que apresentaram os menores tamanho tiveram maiores valores de E.E.

Os valores de PDI (Y_2) das formulações testadas variaram de 0,24 (F1) a 0,64 (F8) (Tabela 7). De acordo com a análise de regressão, a quantidade de fármaco (X_2) foi o único fator que teve influência estatisticamente significativa no PDI (Figura 13 B). O coeficiente positivo, evidencia que quanto maior a quantidade de fármaco maior o PDI. Esse fato se deve a presença de fármaco precipitado, proporcionando formulações polidispersas. Esses dados corroboram com a discussão para o tamanho de partícula.

Os valores de Potencial Zeta (Y_3) das formulações variaram de -34,0 mV (F2) a -52,0 mV (F7) (Tabela 7). De acordo com a análise de regressão das respostas, nenhum fator teve influência estatisticamente significativa (Figura 13 C). Com tudo, todas as formulações apresentaram valores de Potencial Zeta superiores a $|-30|$ mV sugerindo comportamento estável para todas as formulações (RAHMAN et al., 2010; SAHANA et al., 2008). O potencial zeta negativo está relacionado com a natureza da GCF, devido aos presentes na sua estrutura.

O EE (Y_4) das formulações preparadas variou de 3,84% (F3) a 51,20% (F1) (Tabela 7). A análise de regressão evidenciou que volume de fase aquosa interferiu significativamente na EE (Figura 13 D). O sinal positivo revelou que à medida que o volume da fase aquosa é aumentado, o conteúdo de fármaco das partículas produzidas aumenta. Esse fato pode ser explicado devido a GCF apresentar grupos -OH e grupo hidrofóbico ftalado. Devido a sua natureza anfifílica, nanopartículas poliméricas foram capazes de se auto montar em soluções aquosas, bem como os grupos hidrofóbicos foram capazes de servir como reservatórios para

BNZ. Além disso na fase aquosa não foi necessário o uso de surfactante. O aumento do volume de água pode ter favorecido para um melhor equilíbrio entre grupos hidrofílicos e hidrofóbicos do polímero durante o processo de sonicação e posteriormente evaporação do solvente, propiciando formulações mais estáveis e com maior quantidade de fármaco.

O *DL* (Y_5) das formulações variaram de 2,53 % (F3) a 25,6 % (F1) (Tabela 7). A análise de regressão mostrou que o volume de fase aquosa interferiu significativamente nos valores de *DL* (Figura 13 E). O sinal positivo do coeficiente revelou que os valores de *DL* aumentam com o aumento do volume de fase aquosa. Este resultado estar de acordo com o observado e discutido para a E.E.

Por meio da triagem utilizando o DPB, os efeitos dos fatores nas NP-BNZ foram avaliados e utilizando análise de regressão foi possível verificar a correlação matemática e seus valores de p , que estão expressos na Tabela 8. Os coeficientes de determinação (R^2) indicaram possível concordância entre os valores previstos e os observados.

Apesar de DPB não ser comumente usado para obter formulação ótima, com base nos resultados obtidos pode-se observar que a F1, com (X_1) com 10,0 mg de GCF, (X_2) com 10,0 mg de BNZ, (X_3) com 1,0 mL de solvente e (X_4) com 20,0 mL de fase aquosa, apresentou potenciais características, como alta E.E. com $51,2 \pm 2,13$ %, *DL* $25,6 \pm 1,06$ %, tamanho $187,9 \pm 3,64$ nm, PDI $0,24 \pm 0,015$ e potencial zeta de $-41,9 \pm 1,97$ mV, tornando-a uma boa escolha para o carregamento do BNZ. Nanopartículas sem o BNZ (NP-GCF) foram obtidas como controle, e apresentaram valores de tamanho de partícula, PDI e potencial zeta de $237,7 \pm 13,7$ nm, $0,37 \pm 0,037$ e $-33,45 \pm 2,05$ mV, respectivamente.

Tabela 8 – Dados da análise de regressão para as respostas consideradas $Y_1 - Y_5$.

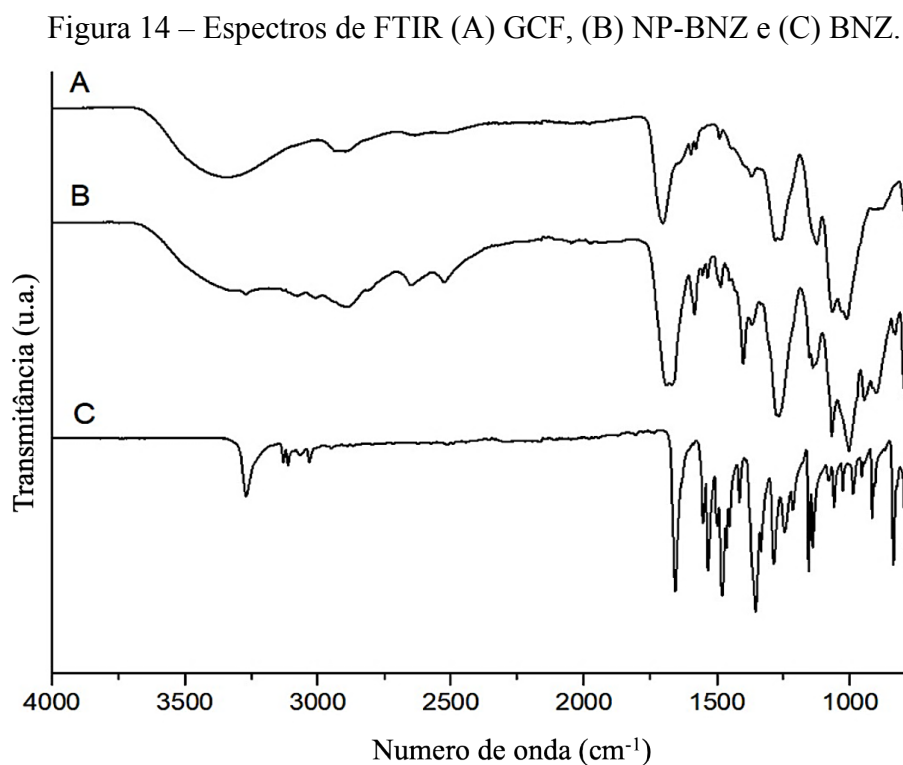
	Tamanho (Y_1)		PDI (Y_2)		Zeta (Y_3)		E.E. (Y_4)		D.L. (Y_5)	
	Coefficiente	p-Valor	Coefficiente	p-Valor	Coefficiente	p-Valor	Coefficiente	p-Valor	Coefficiente	p-Valor
β_0	225,17	0,0001	0,3933	0,0007	-41,52	0,000067	23,5600	0,00253	11,2637	0,0035
X_1	-37,5750	0,0275*	0,0096	0,7474	2,375	0,1640	-0,1750	0,9486	-1,0512	0,4908
X_2	52,9250	0,0108*	0,1146	0,0245*	-2,7500	0,1238	-6,2550	0,0876	-2,1637	0,2054
X_3	-2,5750	0,8005	-0,0631	0,1035	1,9500	0,2292	5,1925	0,1295	2,3162	0,183
X_4	-26,1250	0,0679	0,0036	0,9026	0,6000	0,6747	11,9400	0,0174*	6,4612	0,0170*
	$R^2 = 0,943$		$R^2 = 0,885$		$R^2 = 0,775$		$R^2 = 0,9174$		$R^2 = 0,907$	

β_0 : valor médio; Polímero (X_1); Fármaco (X_2); Volume de fase aquosa (X_3); Volume da fase orgânica (X_4). Valor mais significativo*.

4.2.3.3 Caracterização das nanopartículas de benznidazol

4.2.3.3.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

Os espectros infravermelhos das nanopartículas carregadas com BNZ e de seus componentes individuais (GCF e BNZ) são mostrados na Figura 14.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O espectro de FTIR da GCF apresentou bandas em 3340, 2931 e 1016 cm^{-1} , que corresponde as vibrações de O-H de álcool, C-H de carbono sp^3 e C-O-C referente as ligações glicosídicas, respectivamente. As bandas em 1701 e 1376 cm^{-1} , atribuídas às vibrações de alongamento C=O e C-O do ácido carboxílico, respectivamente. As bandas em 1638, 1608 e 1580 cm^{-1} podem ser atribuídas às ligações C=C do grupo aromático. As duas bandas em 1286 e 1261 cm^{-1} podem ser atribuídas ao grupo éster (OLIVEIRA et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2021).

O espectro de FTIR do BNZ apresentou bandas em 3267 cm^{-1} referente a deformação axial da ligação N-H das amidas secundárias presentes no fragmento de acetamida. Na região entre 3131 e 3000 cm^{-1} foram observadas deformações axiais simétricas e assimétricas referentes C-H do aromático. A banda de amida I foi observada em 1652 cm^{-1} , característica da ligação C=O, já a banda de amida II foi observada em 1551 cm^{-1} , característico de N-H. As bandas em 1535 e 1359 cm^{-1} são referentes a deformação axial assimétrica e simétrica do NO_2 (SOARES-SOBRINHO et al., 2012).

O espectro da NP-BNZ na região de O-H em 3353 cm^{-1} apresentou banda mais estreita, esse fenômeno pode estar relacionado a ligações intermoleculares entre GCF e o BNZ. Foi observado uma pequena banda em 3267 cm^{-1} , que corresponde ao grupo N-H da amida secundária, a diminuição dessa banda pode ser devido a formação de uma ponte de hidrogênio com o hidrogênio do grupo hidroxila da GCF. Foi observado o deslocamento das bandas de C=O da carbonila da GCF e da C=O da amida I para 1690 e 1665 cm^{-1} . Houve redução nas bandas de amida II e NO_2 , sugerindo que tais grupamentos participaram da interação (GARCÍA, MANZO e JIMENEZ-KAIRUZ, 2018; ESPINOSA, GALVIS-OVALLOS e ROZO, 2018).

4.2.3.3.2 Estabilidade e Morfologia das nanopartículas

A Tabela 9 mostra a estabilidade coloidal das NP-BNZ em fluidos gastrointestinais. O tamanho das nanopartículas foi monitorado por DLS, a fim de avaliar a ocorrência de formação de aglomerados.

Tabela 9 – Dados de estabilidade das NP-BNZ em fluido gástrico simulado (FGS) e fluido intestinal simulado (FIS).

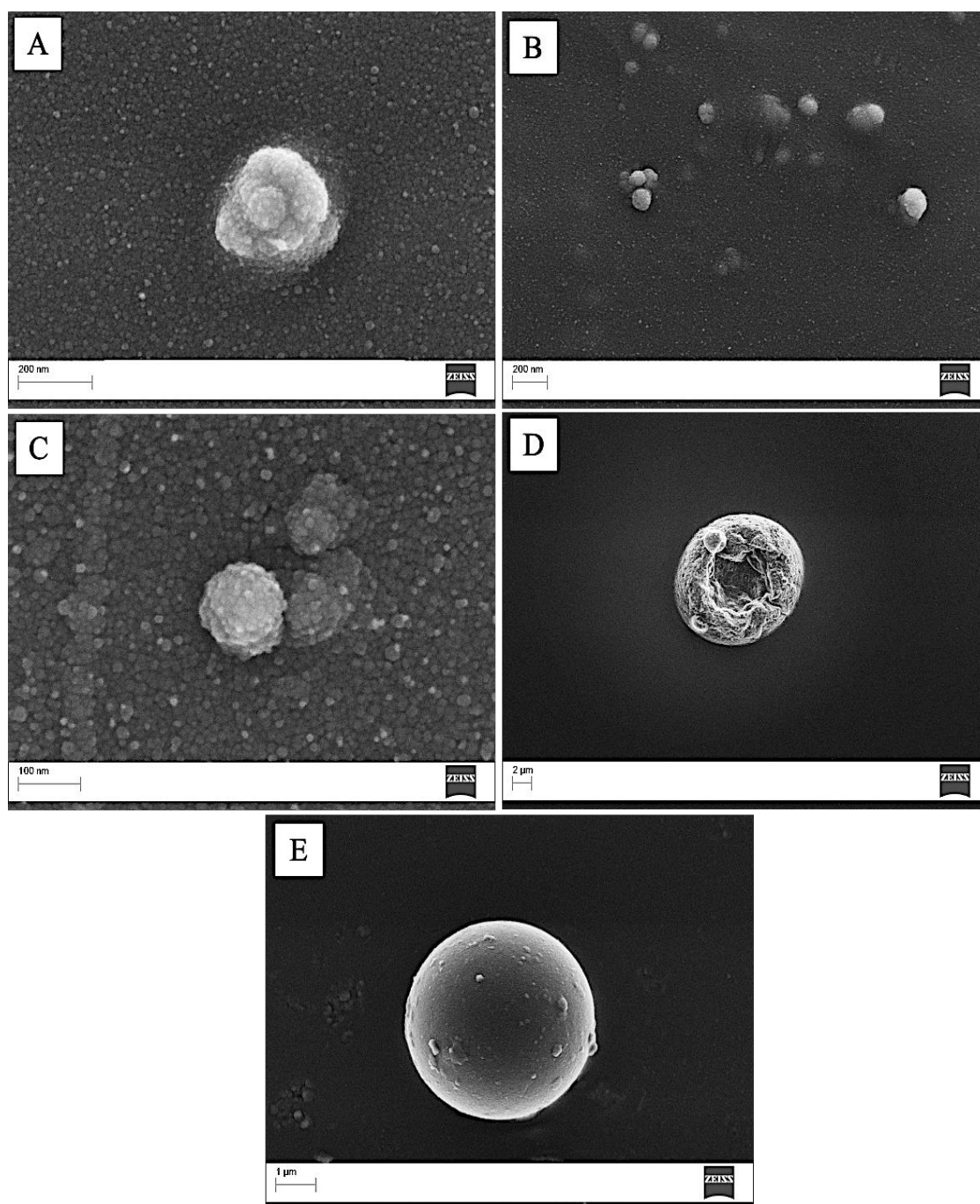
	Tamanho (nm)		PDI		Zeta (mV)	
	FGS	FIS	FGS	FIS	FGS	FIS
Controle	185,8 ±6,6		0,33 ±0,01		- 45,83 ±2,85	
2 horas	81,3 ±9,0	670,0 ±149,9	0,12 ±0,03	0,60 ±0,08	-17,0 ±3,3	-30,6 ±0,5
24 horas	138,9 ±13,0	614,9 ±137,9	0,10 ±0,01	0,63 ±0,09	-24,4 ±1,9	-16,0 ±1,7
48 horas	146,6 ±14,6	737,6 ±119,1	0,10 ±0,01	0,61 ±0,08	-24,4 ±3,6	-14,4 ±4,6

Fonte: Elaborado pelo autor.

Com 48 horas em meio gástrico foi observado diminuição no tamanho das partículas e no PDI, assim como redução nos valores do potencial zeta também. Essas alterações podem estar relacionadas aos grupos ácidos da GCF que podem estar protonados, o que reduz a repulsão e favorece que as cadeias poliméricas estejam mais próximas, esse fato propicia baixa solubilidade no ambiente ácido (ZHOU et al., 2016; HALES et al., 2017). Por outro lado, em fluido intestinal as partículas apresentaram tamanhos maiores e o sistema se mostrou polidisperso, como mostra na Tabela 9. Em pH 6,8 os grupamentos ácidos tendem a ser desprotonados e o polímero tende a inchar e se dissolver, tal fato é observado nas imagens de MEV (Figura 15 D e E) para a NP-BNZ em FIS (FANG et al., 2020). Esses resultados demonstraram que as nanopartículas apresentaram estabilidade em condições gástricas, o que indicando que o sistema possui potencial para entrega oral de BNZ.

A morfologia das nanopartículas controle foi avaliada por MEV como mostra a Figura 15. As nanopartículas apresentaram morfologia esférica e as carregadas com fármaco apresentaram superfície rugosa, tal efeito deve-se a presença do BNZ (SEREMETA et al., 2019).

Figura 15 – Morfologia das nanopartículas (A) NP-BNZ, (B) NP-GCF, (C) NP-BNZ em FGS e (D e E) NP-BNZ em FIS.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.3.3.3 Estudos de liberação e cinética da NP-BNZ *in vitro*

Os estudos de liberação *in vitro* foram realizados em FGS e FIS a 37 °C para simular condições fisiológico devido a formulação ter sido projetada para ser administrada por via oral (Figura 16).

Em FGS nos primeiros 30 minutos de ensaio não houve liberação do BNZ incorporado nas nanopartículas e em 120 minutos as nanopartículas liberaram cerca de $12,6 \pm 3,4\%$ de fármaco. Por outro lado, o BNZ livre liberou cerca de $10,3 \pm 4,3\%$ e $28,6 \pm 4,1\%$ em 30 e 120 minutos, respectivamente.

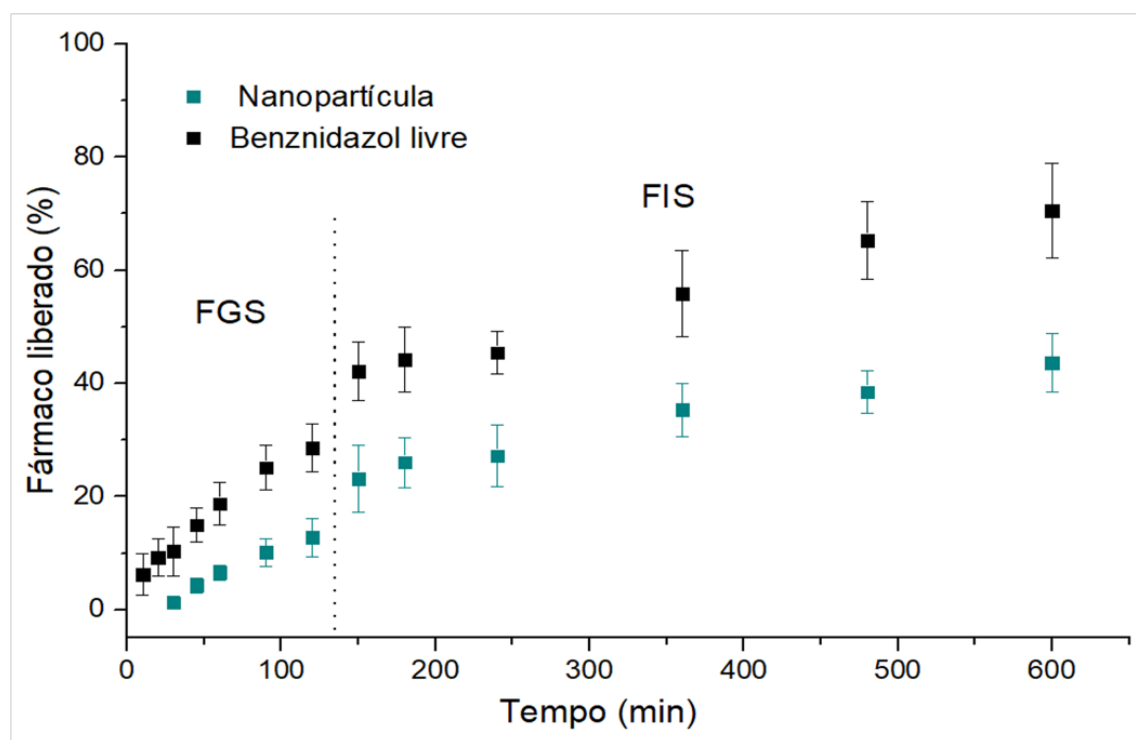
Com a mudança para o FIS foi observado uma liberação mais rápida tanto para a NP-BNZ como para o BNZ, no entanto, a nanopartícula liberou uma quantidade de fármaco inferior ao BNZ livre. Em 600 minutos foi observado um percentual de liberação de $43,7 \pm 3,4\%$ e $70,5 \pm 8,3\%$ para a NP-BNZ e BNZ livre, respectivamente.

O perfil de liberação das nanopartículas é influenciado pelas propriedades físico-química do polímero, que foi discutido na seção de estabilidade (HE et al., 2017; SUR et al., 2019). Assim, o resultado de ambos os ensaios pode ser corroborado, onde as NP-BNZ se mantiveram estáveis em FGS e em FIS houve um aumento e desestruturação no tamanho e na forma das partículas (Figura 15 D). O perfil de liberação das nanopartículas reforça o seu potencial uso por via oral, já que o BNZ é totalmente absorvido por via digestiva (SOARES-SOBRINHO et al., 2007).

Foi calculado a ED para as NP-BNZ e para o BNZ livre em ambos os fluidos. A ED para as nanopartículas em FGS foi cerca de 6,11% e para FIS foi de 35,63%. Para o BNZ livre foi observado 17,36% para FGS e 58,98%. Os resultados obtidos mostraram que as NP-BNZ apresentaram uma menor ED em ambos os fluidos, quando comparadas ao BNZ livre.

De modo geral, as nanopartículas exibiram uma liberação contínua e consideravelmente mais lenta do que o fármaco livre, em ambos os meios. Esse fato pode estar relacionado a distribuição homogênea do fármaco, bem como ao pequeno tamanho das nanopartículas, o que resulta em uma liberação contínua do BNZ (SANTO-SILVA et al., 2017; SANTOS-SILVA et al., 2019a). Além disso, o fato de as nanopartículas terem liberado uma menor quantidade de fármaco, esse fenômeno pode promover uma melhor atividade biológica, isso porque evita que o fármaco seja liberado antes de chegar ao local alvo de absorção (SANTOS-SILVA et al., 2019b).

Figura 16 – Perfil de liberação da NP-BNZ e BNZ livre em fluido gástrico simulado (FGS) e fluido intestinal simulado (FIS).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Vários fatores influenciam no comportamento da matriz polimérica durante o processo de liberação e o seu estudo permite compreender de qual maneira o fármaco é liberado da matriz polimérica (ARGIN, S.; KOFINAS, P.; LO, 2014). O modelo matemático que descreve a cinética de liberação *in vitro* da NP-BNZ foi avaliado para cada fluido estudado.

Para o FGS foi observado que o modelo proposto por Peppas-Sahlin, com R^2_{adj} 0,96 melhor se adequa a esse fluido. Esse modelo é baseado na suposição de que se é possível calcular os mecanismos difusão e o mecanismo relaxamento, como é visto na equação 11 (SIEPMANN e PEPPAS, 2012).

Como o valor K_1 (-0,704) foi negativo e o valor de K_2 (0,262) positivo, indicando que a liberação por difusão Fickiana foi inibida e o mecanismo de liberação foi por contribuição relaxacional do caso II (MAX, et al., 2018; ARAGÓN et al., 2018). O valor de m foi 0,45 e considerando a forma esférica da nanopartícula o valor dentro do intervalo de $0,43 < n < 0,85$ (BIZEAU e MERTZ, 2020). A liberação relaxacional do caso II está relacionado ao mecanismo de transporte do fármaco associado a tensão e transição do estado vítreo do polímero que aumentam de volume em fluidos (PEPPAS e SAHLIN, 1989). Como a GC passou por o processo de ftalação, onde a presença desses grupos proporciona um regiões cristalinas e uma

estrutura menos flexível. Contudo, a presença dos grupos -OH que não foram substituídos, garante a presença de grupos hidrofílicos e esses grupos em contato com FGS podem promover tensão na cadeia polimérica.

O modelo descrito por Korsmeyer-Peppas melhor se adequou para a liberação em FIS, com R^2_{adj} 0,98 e n 0,44. Para este modelo quando o valor de n está dentro do intervalo de $0,43 < n < 0,85$ indica um transporte não-Fickiano ou anômalo, onde ocorrem dois fenômenos, sendo liberação controlada pela difusão e intumescimento, simultaneamente (CIRO et al., 2020).

O fenômeno de difusão ocorre quando o meio de dissolução penetra na matriz, o fármaco é dissolvido e após a dissolução se difunde para fora do polímero (BOOSTANIS e JAFARI, 2021). No processo de intumescimento à medida que a matriz entra em contato com o meio, ela tem a capacidade de absorver o meio principalmente através dos poros do sistema matricial e com isso aumentar de tamanho. A dissolução do polímero no meio pode ser lenta devido à necessidade de se desembaraçar as cadeias de poliméricas e esse fenômeno pode resultar no processo de erosão.

Os dados observados para o modelo Korsmeyer-Peppas e o ensaio de liberação podem ser corroborados, pois no FIS estudado as nanopartículas apresentaram um maior percentual de fármaco liberado. Esse fenômeno pode ter ocorrido devido as propriedades dos grupos funcionais da GCF, já que em ambiente tendendo a basicidade tendem a inchar, o que explica a maior liberação do fármaco neste meio. As imagens realizadas no estudo de estabilidade também corroboram com esta hipótese, pois é possível observar aumento no tamanho da partícula, bem como sua degradação (Figura 15 D e E).

4.2.3.4 Estudo de viabilidade celular

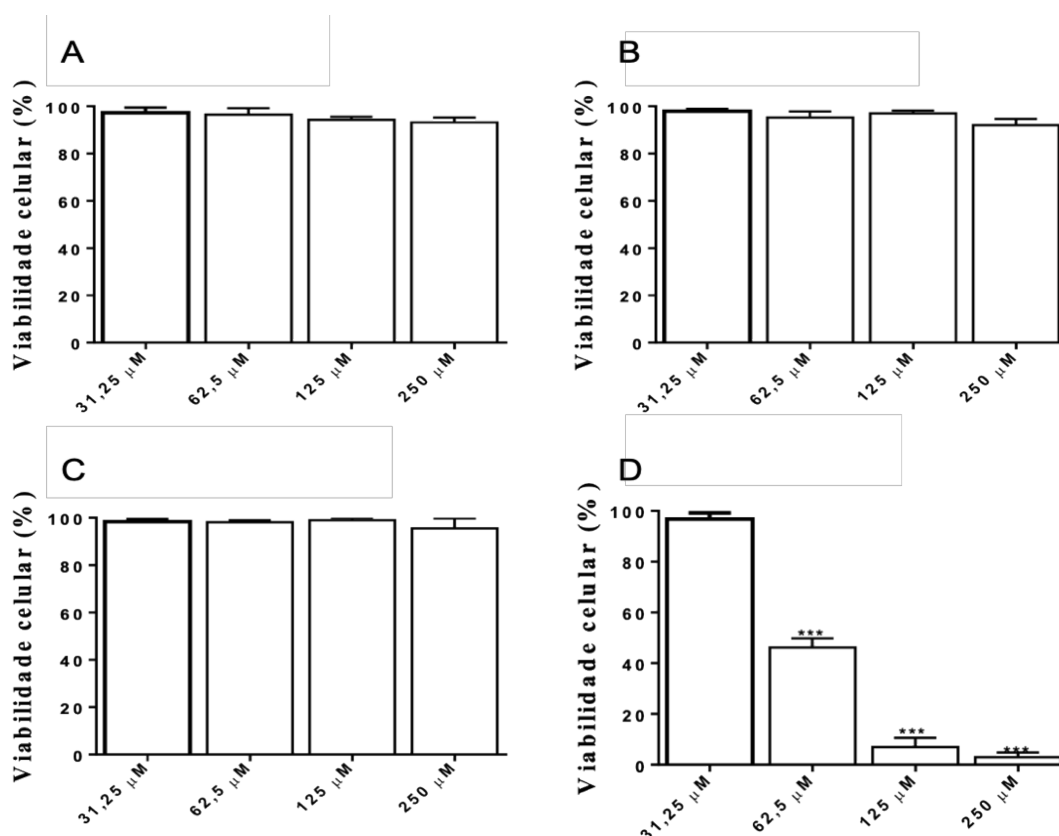
A atividade citotóxica foi determinada pelo método do MTT. A Figura 17 mostra a viabilidade celular *in vitro* da GCF, NP-GCF, NP-BNZ e BNZ utilizando a linhagem celular de macrófagos RAW 264.7.

Foi observado que as amostras GCF, NP-GCF e NP-BNZ induziram baixos níveis de morte celular ao longo de um período de 48 horas como mostra a Figura 5 A, B e C. Já para o BNZ livre foi observado efeito tóxico estatisticamente significativo nas concentrações mais altas do fármaco (Figura 17 D). Foram observados valores de CC_{50} para NP-BNZ, NP-GCF e a GCF ($>250 \mu\text{g/mL}$) superiores ao valor observado para o BNZ livre ($CC_{50} 79,23 \pm 1,3 \mu\text{g/mL}$), revelando a segurança da formulação NP-BNZ em relação a linhagem celular testada.

A viabilidade celular observada para o sistema NP-BNZ pode estar relacionada com a liberação lenta do BNZ, o que pode ter afetado positivamente a redução da toxicidade, em

comparação com o fármaco isolado. Já que a literatura reporta que o BNZ apresenta toxicidade para as células do hospedeiro mamífero e no caso dos macrófagos pode induzir alterações metabólicas (LOPEZ, TANOWITZ E GARG, 2018). Além disso, os resultados para polímero modificado sugerem que seu uso é seguro para a preparação das nanopartículas. Os resultados incentivaram a continuidade do trabalho, e possibilitaram a escolha das concentrações utilizadas para formas epimastigota e tripomastigota do *T. cruzi*.

Figura 17 – Efeito da (A) GCF, (B) NP-GCF, (C) NP-BNZ e (D) BNZ sobre a viabilidade de macrófagos RAW 264,7 em 48 h de exposição. Os dados correspondem à média $\pm$ e.p.m (n = 3), analisados por *One-way ANOVA* seguido pelo pós-teste de Tukey, sendo *** $p < 0,001$.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.3.5 Atividade antiparasitária *in vitro*

O desempenho da NP-BNZ foi avaliado para formas epimastigota e tripomastigota do *T. cruzi* (Figura 18).

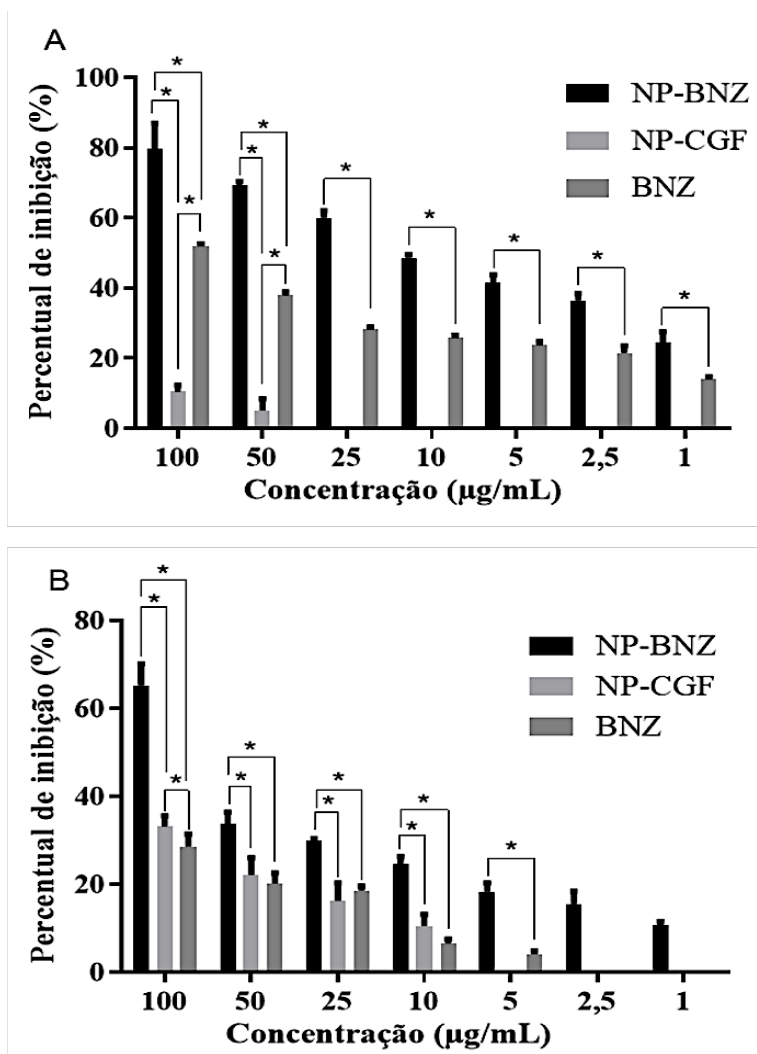
No tratamento realizado por 24 horas, o BNZ presente nas nanopartículas foi capaz de inibir as formas epimastigotas, correspondendo a, $79,6 \pm 7,42\%$, $69,3 \pm 1,15\%$, $60,0 \pm 2,01\%$ e

48,5 $\pm$ 0,95% para as concentrações de 100; 50; 25 e 10 μ g/mL, respectivamente. A IC₅₀ da cultura foi de 9,8 $\pm$ 1,5 μ g/mL. O BNZ na sua forma livre inibiu, 51,8 $\pm$ 0,72%, 37,9 $\pm$ 0,86%, 28,3 $\pm$ 0,65% e 25,8 $\pm$ 0,65% para as concentrações de 100, 50, 25 e 10 μ g/mL, respectivamente. e a IC₅₀ de 64,8 $\pm$ 11,0 μ g/mL.

Com base nos resultados e com a múltipla comparação entre os grupos (NP-BNZ e BNZ) foi observado diferença estatística entre todas as concentrações testadas ($p < 0,001$). A formulação desenvolvida melhorou a eficácia do BNZ em todas as concentrações quando comparadas ao fármaco livre, os valores obtidos para IC₅₀ confirma este resultado. A nanopartícula branca apresentou inibição somente nas concentrações de 100 e 50 μ g/mL, correspondendo a um percentual de 10,4 $\pm$ 1,82% e 5,09 $\pm$ 3,37%, respectivamente.

Já no tratamento para as formas tripomastigotas, o BNZ contido nas nanopartículas carregadas foi capaz de inibir cerca de 65,2 $\pm$ 4,86%, 33,7 $\pm$ 2,69%, 29,7 $\pm$ 0,61% e 24,5 $\pm$ 1,74% para as concentrações de 100, 50, 25 e 10 μ g/mL, respectivamente, IC₅₀ de 55,0 $\pm$ 9,8 μ g/mL. Na sua forma livre o BNZ foi capaz de inibir, 28,6 $\pm$ 2,80%, 20,1 $\pm$ 2,37%, 18,5 $\pm$ 0,98% e 6,4 $\pm$ 1,04% e para as concentrações de 100, 50, 25 e 10 μ g/mL, respectivamente, IC₅₀ de 112,3 $\pm$ 4,2 μ g/mL. Para essa forma parasitaria a nanopartícula branca apresentou inibição nas concentrações de 100, 50, 25 e 10 μ g/mL, correspondendo cerca de 33,1 $\pm$ 2,40%, 22,1 $\pm$ 3,89%, 16,2 $\pm$ 4,04% e 10,5 $\pm$ 2,65%, respectivamente.

Figura 18 – Efeito no percentual de inibição (A) forma epimastigota e (B) forma tripomastigota em 24 h de exposição. Os dados correspondem à média $\pm$ e.p.m (n = 3), analisados por *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, sendo $*p < 0,001$.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Para a forma tripomastigota as nanopartículas contendo BNZ mostraram-se mais eficaz em promover uma maior redução da viabilidade do parasita, quando comparada com o fármaco livre. Análise estatística entre os grupos revelou que a NP-BNZ e BNZ livre apresentaram diferença estatística em todas as concentrações testadas ($p < 0,001$). A comparação entre BNZ livre e a NP-GCF apresentou diferença estatística apenas na concentração mais alta de 100 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,001$). E NP-BNZ e NP-GCF apresentou diferença em todas as concentrações ($p < 0,001$).

Os bons resultados observados para a eficácia da nanopartícula carregada com BNZ frente as formas parasitárias epimastigota e tripomastigota podem estar relacionados com o tamanho de partícula, pois partículas pequenas desempenham um papel fundamental na adesão

e interação com as células biológicas (ARRÚA et al., 2019). Isso porque elas adquirem as melhores propriedades de captação celular devido uma melhor interação interfacial com a membrana celular em comparação com as partículas de tamanho maior (WIN & FENG, 2005; ABRIATA et al., 2017). A literatura relata trabalhos onde o BNZ encapsulado na forma de nanopartícula reduz as taxas de sobrevivência do parasita, produzindo efeitos inibitórios contra as formas epimastigota e tripomastigota, quando comparados ao BNZ livre (TESSAROLO et al., 2018; NHAVERNE et al., 2018; STRECK et al., 2019). A baixa efetividade do BNZ livre pode estar associada ao uso da cepa Y de *T. cruzi* que é conhecida como cepa nitroderivada moderadamente resistente (CAMPOS et al., 2014).

Nanopartículas de GCF carregadas com BNZ, promoveram melhores respostas frente as formas epimastigota e tripomastigota. Além de não ter sido observado citotoxicidade para a linhagem de macrófagos RAW 264.7. Tornando-a plataforma promissora para a entrega oral do BNZ. Contudo, é necessário realizar ensaios em modelos *in vivo* para a forma aguda e crônica da doença de Chagas, bem como avaliar vários níveis de toxicidade, a fim de garantir a segurança para a formulação desenvolvida.

4.2.4 Considerações finais

Para este estudo conclui-se que as nanopartículas carregadas com BNZ apresentaram formas esféricas, tamanho menores que 200 nm e alta eficiência de carregamento do BNZ. Assim, foi observado que as partículas apresentaram baixo percentual de liberação em FGS e uma liberação mais acentuada em FIS, e para cada meio foi observado um modelo matemático de liberação. Além de terem apresentado baixa toxicidade para macrófagos e boa eficácia contra *T. cruzi*. Os resultados preliminares apontam seu potencial uso como formulação oral e desse modo, as nanopartículas surgem como uma estratégia para melhorar o tratamento da DC.

5 CONCLUSÃO

- Pode-se concluir que o uso de micro-ondas em diferentes potências e tempo de reação foram eficientes para a modificação da goma do cajueiro fталada;
- As caracterizações estruturais e físico-químicas revelaram que os derivados obtidos apresentaram diferentes características. E o grau de substituição influencia em determinadas propriedades dos polímeros, como, cristalinidade, comportamento térmico e solubilidade;
- Todos os derivados apresentaram baixa solubilidade em água e em fluido gástrico simulado, o que os tornam viáveis para a aplicação em sistemas de liberação de fármacos por via oral;
- Foram obtidas nanopartículas poliméricas carregadas com o fármaco antichagásico benznidazol utilizando o modificado fталado 1, este derivado foi escolhido pois apresentou estabilidade térmica mais próxima a observada para a goma do cajueiro;
- As nanopartículas obtidas apresentaram interessantes características físico-químicas, como boa estabilidade no ambiente ácido e baixa estabilidade no ambiente básico;
- Na liberação *in vitro* também foi observado um menor percentual de fármaco liberado no ambiente ácido e no meio básico foi observado maior percentual;
- Os modelos matemáticos que descrevem a cinética de liberação foram Peppas-Sahlin para fluido gástrico e Korsmeyer-Peppas para o fluido intestinal;
- As nanopartículas carregadas com o fármaco, sem o fármaco e o biopolímero, apresentaram biocompatibilidade com linhagem celular de macrófagos RAW 264.7;
- As nanopartículas carregadas com benznidazol apresentaram expressivo efeito tripanocida, contra as formas epimastigota e tripomastigota do *Trypanosoma cruzi*.

Baseado em todos os dados apresentados as nanopartículas de goma do cajueiro fталada com benznidazol apresentam-se como potencial alternativa eficaz e segura para a veiculação oral do benznidazol.

REFERÊNCIAS

- ABREU, C. M. W. S. et al. Synthesis and characterization of non-toxic and thermo-sensitive poly(N-isopropylacrylamide)-grafted cashew gum nanoparticles as a potential epirubicin delivery matrix. **Carbohydrate Polymers**, v. 154, p. 77–85, 2016.
- ABRIATA, J. P. et al. Poly-epsilon-caprolactone nanoparticles enhance ursolic acid in vivo efficacy against *Trypanosoma cruzi* infection. **Materials Science and Engineering C**, v. 77, p. 1196–1203, 2017.
- AIEDEH, K. M.; TAHA, M. O.; AL-KHATIB, H. Evaluation of chitosan succinate and chitosan phthalate as enteric coating polymers for diclofenac sodium tablets. **Journal of drug delivery science and technology**, v. 15, n. 3, p. 207-211, 2005.
- AKIN, A.; İŞIKLAN, N. Microwave assisted synthesis and characterization of sodium alginate-graft-poly(N,N'-dimethylacrylamide). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 530–540, 2016.
- ÁLVAREZ-HERNÁNDEZ, D.-A. et al. Chagas disease: Current perspectives on a forgotten disease. **Revista Médica del Hospital General de México**, v. 81, p. 154–164, 2016.
- AMINU, N. et al. Development and evaluation of triclosan loaded poly-ε-caprolactone nanoparticulate system for the treatment of periodontal infections. **Journal of nanoparticle research**, v. 15, n. 11, p. 1-15, 2013.
- AMINU, N. et al. A dual-action chitosan-based nanogel system of triclosan and flurbiprofen for localised treatment of periodontitis. **International journal of pharmaceutics**, v. 570, p. 118659, 2019.
- ANDERSON, D. M. W.; BELL, P. C. Structural analysis of the gum polysaccharide from *anacardium occidentale*. **Analytica Chimica Acta**, v. 79, p. 185–197, 1975.
- ANDERSON, D. M. W.; BELL, P. C.; MILLAR, J. R. A. Composition of Gum Exudates *Anacardium occidentale*. **Phytochemistry**, v. 13, p. 2189–2193, 1974.
- ANTINORI, S. et al. Chagas disease in Europe: a review for the internist in the globalized world. **European Journal of Internal Medicine**, v. 43, p. 6-15, 2017.
- ANTUNES, A. F. et al. Chronic Heart Disease after Treatment of Oral Acute Chagas Disease. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, p. 184–186, 2016.
- ANUSH, S. M. et al. Synthesis of pyrazole-based Schiff bases of Chitosan: Evaluation of antimicrobial activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 119, p. 446–452, 2018.

APT B, W. et al. Parte II. Enfermedad de Chagas en el adulto, la infancia y adolescencia. **Rev Chil Infect**, v. 25, p. 194–199, 2008.

ARAGÓN, J. et al. Polymeric electrospun scaffolds for bone morphogenetic protein 2 delivery in bone tissue engineering. **Journal of colloid and interface science**, v. 531, p. 126–137, 2018.

ARGIN, S.; KOFINAS, P.; LO, Y. M. The cell release kinetics and the swelling behavior of physically crosslinked xanthan–chitosan hydrogels in simulated gastrointestinal conditions. **Food Hydrocolloids**, v. 40, p. 138–144, 2014.

ARAÚJO, T. S. L. et al. Antidiarrheal activity of cashew GUM, a complex heteropolysaccharide extracted from exudate of *Anacardium occidentale* L. in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 174, p. 299–307, 2015.

ARIS, Z. F. M. et al. Microwave-assisted synthesis and characterization of hydrophilically functionalized polygalacturonic acid. **Carbohydrate Polymers**, v. 155, p. 432–439, 2017.

ARRÚA, E. C. et al. Nanocarriers for effective delivery of benznidazole and nifurtimox in the treatment of chagas disease: A review. **Acta tropica**, v. 198, p. 105080, 2019.

ARZANEGUI, O. A. et al. Prevalencia de la infección por *Trypanosoma cruzi* y transmisión vertical en mujeres gestantes latinoamericanas en un área de salud de Vizcaya. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 31, p. 210–216, 2013.

BAHADORI, Fatemeh et al. Development and optimization of a novel PLGA-Levan based drug delivery system for curcumin, using a quality-by-design approach. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 138, p. 105037, 2019.

BAL, T. et al. *In vitro* evaluations of free radical assisted microwave irradiated polyacrylamide grafted cashew gum (CG) biocompatible graft copolymer (CG-g-PAM) as effective polymeric scaffold. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 56, p. 101572, 2020.

BARBOSA, R. L. et al. Virulence of *Trypanosoma cruzi* from vector and reservoir in natura açai pulp resulting in food-borne acute Chagas disease at Pará State, Brazil. **Experimental Parasitology**, 2018.

BARCLAY, T. G. et al. Review of polysaccharide particle-based functional drug delivery. **Carbohydrate polymers**, v. 221, p. 94–112, 2019.

BASTOGNE, T. Quality-by-design of nanopharmaceuticals – a state of the art. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 13, p. 2151–2157, 2017.

BERMUDEZ, J. et al. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas

disease. **Acta Tropica**, v. 156, p. 1–16, 2016.

BISWAS, A. et al. Hydrophobic modification of cashew gum with alkenyl succinic anhydride. **Polymers**, v. 12, n. 3, p. 514, 2020.

BIZEAU, J.; MERTZ, D. Design and applications of protein delivery systems in nanomedicine and tissue engineering. **Advances in Colloid and Interface Science**, p. 102334, 2020.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential—what they are and what they are not? **Journal of controlled release**, v. 235, p. 337-351, 2016.

BOLETIM INFORMATIVO. Boletim epidemiológico - Doença de Chagas Aguda e distribuição espacial dos triatomíneos de importância epidemiológica, Brasil 2012 a 2016. **Secretaria de Vigilância em Saúde | Ministério da Saúde**, v. 50, 2019.

BONATI, M.; CONFALONIERI, V. M. Global rights for global diseases. The shortage of benznidazole case. **European Journal of Public Health**, v. 22, 2012.

BRAZ, E. M. A. et al. Modified chitosan-based bioactive material for antimicrobial application: Synthesis and characterization. **International journal of biological macromolecules**, v. 117, p. 640-647, 2018.

BRANDÃO, M. S. et al. Acetylated cashew-gum-based silver nanoparticles for the development of latent fingerprints on porous surfaces. **Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management**, v. 14, p. 100383, 2020.

BOCCHI, E. A. et al. Chronic Chagas Heart Disease Management: From Etiology to Cardiomyopathy Treatment. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 70, n. 12, p. 1510–1524, 2017.

BOOSTANI, S.; JAFARI, S. M. A comprehensive review on the controlled release of encapsulated food ingredients; fundamental concepts to design and applications. **Trends in Food Science & Technology**, 2021.

BOSQUESI, P. L. et al. Toxicidade de fármacos nitrofurânicos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, p. 231–238, 2008.

BRITO, T. K. et al. Synthesis of silver nanoparticle employing Corn Cob Xylan as a reducing agent with anti-*trypanosoma cruzi* activity. **International journal of nanomedicine**, v. 15, p. 965, 2020.

CARDIAL, M.R. L. et al. Pickering emulsions stabilized with cashew gum nanoparticles as indomethacin carrier. **International journal of biological macromolecules**, v. 132, p. 534-540, 2019.

CALDAS, I. S. et al. Parasitaemia and parasitic load are limited targets of the aetiological treatment to control the progression of cardiac fibrosis and chronic cardiomyopathy in *Trypanosoma cruzi*-infected dogs. **Acta Tropica**, v. 189, p. 30–38, 2019.

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

CAMPOS, M. C. et al. Genome-wide mutagenesis and multi-drug resistance in American trypanosomes induced by the front-line drug benznidazole. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2017.

CARNEIRO, Z. A. et al. *In vitro* and *in vivo* trypanocidal activity of H2bdtc-loaded solid lipid nanoparticles. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 5, p. e2847, 2014.

CARVALHO, A. B.; GOLDENBERG, R. C. D. S.; CAMPOS DE CARVALHO, A. C. Cell therapies for Chagas disease. **Cytotherapy**, v. 19, p. 1339–1349, 2017.

CARVALHO, N. S. et al. Gastroprotective properties of cashew gum, a complex heteropolysaccharide of *Anacardium occidentale*, in naproxen-induced gastrointestinal damage in rats. **Drug Development Research**, v. 76, p. 143–151, 2015.

CHAGAS, C. Nova tripanozomiaze humana. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, 1909.

CHANDRASEKARAN, S.; RAMANATHAN, S.; BASAK, T. Microwave material processing—a review. **AIChE Journal**, v. 58, n. 2, p. 330–363, 2012.

CHAPMAN, N. et al. Neglected Disease Research and Development: Uneven Progress. **Policy Cures Research**, 2019.

CHAVES, L. L. et al. PH-sensitive nanoparticles for improved oral delivery of dapsone: Risk assessment, design, optimization and characterization. **Nanomedicine**, v. 12, n. 16, p. 1975–1990, 2017.

CHAVES, L. L. et al. Development of PLGA nanoparticles loaded with clofazimine for oral delivery: Assessment of formulation variables and intestinal permeability. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 112, p. 28–37, 2018.

ČÍŽOVÁ, A. et al. Carboxymethyl starch octenylsuccinate: Microwave-and ultrasound-assisted synthesis and properties. **Starch-Stärke**, v. 60, n. 8, p. 389–397, 2008.

CIRO, Y. et al. Production, physicochemical characterization, and anticancer activity of methotrexate-loaded phytic acid-chitosan nanoparticles on HT-29 human colon adenocarcinoma cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 243, p. 116436, 2020.

CLAYTON, J. Chagas' disease: pushing through the pipeline. **Nature**, 2010.

CONTRERAS, V. T. et al. *In vitro* differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Molecular and biochemical parasitology*, 16(3), 315-327 (1985).

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

CÓRDOBA-AGUILAR, Alex. Chagas bugs and *Trypanosoma cruzi*: Puppets and puppeteer? **Acta Tropica**, v. 211, p. 105600, 2020.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, 2009.

CRUCHO, C. I. C.; BARROS, M. T. Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. **Materials Science and Engineering C**, v. 80, p. 771–784, 2017.

DA SILVA JUNIOR, G. B. et al. Chagas disease-associated kidney injury – A review. **Nefrología Latinoamericana**, v. 14, n. 1, p. 22–26, 2017.

DATE, A. A.; JOSHI, M. D.; PATRAVALE, V. B. Parasitic diseases: Liposomes and polymeric nanoparticles versus lipid nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 505–521, 2007.

DE OLIVEIRA, A. P. et al. The role of CCR5 in Chagas disease - a systematic review. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 45, p. 132–137, 2016.

DE SOUZA, W.; BARRIAS, E S. May the Epimastigote Form of *Trypanosoma cruzi* be infective? **Acta Tropica**, p. 105688, 2020.

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

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

DESBRIÈRES, J.; PETIT, C.; REYNAUD, S. Microwave-assisted modifications of polysaccharides. **Pure and Applied Chemistry**, v. 86, n. 11, p. 1695-1706, 2014.

DIAS, J. C. P. et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, p. 1–10, 2016.

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

DNDi - Drugs Neglected Diseases initiative. **New Child-Adapted Chagas Disease Treatment Approved for Registration** (2011). <http://www.dndi.org/2011/media-centre/press-releases/paedbenz/> (Acesso 21 março 2021).

DORE, C. M. P. G. et al. A sulfated polysaccharide, fucans, isolated from brown algae *Sargassum vulgare* with anticoagulant, antithrombotic, antioxidant and anti-inflammatory effects. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, p. 467–475, 2013.

EATON, P. et al. A direct comparison of experimental methods to measure dimensions of synthetic nanoparticles. **Ultramicroscopy**, v. 182, p. 179-190, 2017.

ECHAVARRÍA, N. G. et al. Chagas disease: chronic Chagas cardiomyopathy. **Current problems in cardiology**, p. 100507, 2019.

EDWARDS, M. S. et al. Perinatal screening for chagas disease in southern Texas. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v. 4, p. 67–70, 2015.

ESPINOSA, R. et al. Life expectancy analysis in patients with Chagas' disease: prognosis after one decade (1973-1983). **International Journal of Cardiology**, v. 8, n. 1, p. 45–56, 1985.

ESPINOSA, Y. R.; GALVIS-OVALLOS, F.; ROZO, A. M. Purification of the antichagasic benznidazole from the commercial preparation Rochegan: characterization of inclusion complexes with β -cyclodextrin. **Journal de Ciencia e Ingenieria**, v. 10, n. 1, p. 32-38, 2018.

FANG, X. et al. Effect of molecular weight and pH on the self-assembly microstructural and emulsification of amphiphilic sodium alginate colloid particles. **Food Hydrocolloids**, v. 103, p. 105593, 2020.

FIGUEIRÊDO, C. B. M. et al. Enhanced delivery of fixed-dose combination of synergistic antichagasic agents posaconazole-benznidazole based on amorphous solid dispersions. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 119, p. 208–218, 2018.

FONSECA-BERZAL, C. et al. Novel solid dispersions of benznidazole: Preparation, dissolution profile and biological evaluation as alternative antichagasic drug delivery system. **Experimental Parasitology**, v. 149, p. 84–91, 2015.

FERREIRA, C. R. N. et al. Synthesis and characterization of scaffolds produced under mild conditions based on oxidized cashew gums and carboxyethyl chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 176, p. 26-36, 2021.

GABRIEL, C. et al. Dielectric Parameters Relevant to Microwave Dielectric Heating.

Chemical Society Reviews, v. 27, 1998.

GARCÍA-CASAS, I. et al. Generation of quercetin/cellulose acetate phthalate systems for delivery by supercritical antisolvent process. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, p. 79-86, 2017.

GARCÍA, M. C. et al. Preclinical pharmacokinetics of benznidazole-loaded interpolyelectrolyte complex-based delivery systems. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 122, p. 281-291, 2018.

GARCÍA, M. C.; MANZO, R. H.; JIMENEZ-KAIRUZ, A. Polysaccharides-based multiparticulated interpolyelectrolyte complexes for controlled benznidazole release. **international Journal of Pharmaceutics**, v. 545, n. 1-2, p. 366-377, 2018.

GARCIA-VALDEZ, O.; CHAMPAGNE, P.; CUNNINGHAM, M. F. Graft modification of natural polysaccharides via reversible deactivation radical polymerization. **Progress in Polymer Science**, v. 76, p. 151-173, 2018.

GÓMEZ, L. A.; GUTIERREZ, F. R. S.; PEÑUELA, O. A. *Trypanosoma cruzi* infection in transfusion medicine. **Hematology, transfusion and cell therapy**, v. 41, n. 3, p. 262-267, 2019

GONZÁLEZ-MARTÍN, G. et al. Allopurinol encapsulated in polycyanoacrylate nanoparticles as potential lysosomotropic carrier: Preparation and trypanocidal activity. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 49, p. 137-142, 2000.

GONZÁLEZ, B. et al. Mesoporous silica nanoparticles decorated with polycationic dendrimers for infection treatment. **Acta biomaterialia**, v. 68, p. 261-271, 2018.

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

GUIMARÃES, D. H. et al. Synthesis and characterization of polyesters derived from glycerol and phthalic acid. **Materials Research**, v. 10, n. 3, p. 257-260, 2007.

GUO, M. Q. et al. Polysaccharides: structure and solubility. **Solubility of polysaccharides**, p. 7-21, 2017.

HALES, D. et al. A quality by design (QbD) study on enoxaparin sodium loaded polymeric microspheres for colon-specific delivery. **European Journal of pharmaceutical sciences**, v. 100, p. 249-261, 2017.

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

HE, Bo et al. Loading of anthocyanins on chitosan nanoparticles influences anthocyanin degradation in gastrointestinal fluids and stability in a beverage. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1671-1677, 2017.

HEDAYATI, S.; NIAKOUSARI, M.; MOHSENPOUR, Z. Production of tapioca starch nanoparticles by nanoprecipitation-sonication treatment. **International journal of biological macromolecules**, v. 143, p. 136-142, 2020.

HERNÁNDEZ, M. et al. Dual chemotherapy with benznidazole at suboptimal dose plus curcumin nanoparticles mitigates *Trypanosoma cruzi*-elicited chronic cardiomyopathy. **Parasitology International**, v. 81, p. 102248, 2021.

ISLAN, G. A. et al. Nanopharmaceuticals as a solution to neglected diseases: Is it possible? **Acta Tropica**, v. 170, p. 16–42, 2017.

JACOB, J. et al. Biopolymer based nanomaterials in drug delivery systems: A review. **Materials today chemistry**, v. 9, p. 43-55, 2018.

JIANG, Y.; STENZEL, M. Drug delivery vehicles based on albumin–polymer conjugates. **Macromolecular bioscience**, v. 16, n. 6, p. 791-802, 2016.

KALIA, S.; SABAA, M. W.; KANGO, S. Polymer grafting: A versatile means to modify the polysaccharides. In: **Polysaccharide based graft copolymers**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2013. p. 1-14.

KARAKUS, Selcan et al. Influence of ultrasound irradiation on the intrinsic viscosity of guar gum–PEG/rosin glycerol ester nanoparticles. **International journal of biological macromolecules**, v. 141, p. 1118-1127, 2019.

KARUNA, D. S. et al. Chitosan phthalate: A novel polymer for the multiparticulate drug delivery system for diclofenac sodium. **Advances in Polymer Technology**, v. 37, n. 6, p. 2013-2020, 2018.

KAUR, L.; GUPTA, G. D. A review on microwave assisted grafting of polymers. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 8, p. 422–426, 2017.

KIM, S. et al. Solubilization of cashew gum from *Anacardium occidentale* in aqueous medium. **Carbohydrate Polymers**, p. 205–209, 2018.

KLEIN, J. M. et al. Preparation of cashew gum-based flocculants by microwave- and ultrasound-assisted methods. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107,

p. 1550–1558, 2018.

KOMOROWSKA-DURKA, M. et al. A concise review on microwave-assisted polycondensation reactions and curing of polycondensation polymers with focus on the effect of process conditions. **Chemical Engineering Journal**, v. 264, p. 633–644, 2015.

KROPF, S. P.; AZEVEDO, N.; FERREIRA, L. O. Chagas disease: the construction of a scientific fact and of a public health problem in Brazil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 5, p. 347–365, 2000.

KUMAR, D. et al. A review on the modification of polysaccharide through graft copolymerization for various potential applications. **The open medicinal chemistry journal**, v. 11, p. 109, 2017.

LEONARDI, D. et al. Development of novel formulations for Chagas' disease: Optimization of benznidazole chitosan microparticles based on artificial neural networks. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 367, n. 1–2, p. 140–147, 2009.

LEONARDI, D.; BOMBARDIERE, M. E.; SALOMON, C. J. Effects of benznidazole: Cyclodextrin complexes on the drug bioavailability upon oral administration to rats. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 62, p. 543–548, 2013.

LEWICKA, K.; SIEMION, P.; KURCOK, P. Chemical modifications of starch: Microwave effect. **International Journal of Polymer Science**, v. 2015, 2015.

LIMA, A. A. N. et al. The Use of Solid Dispersion Systems in Hydrophilic Carriers to Increase Benznidazole Solubility. **Agrarforschung Schweiz**, v. 100, p. 2443–2451, 2011.

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

LIMA, R. E. M.; MAIA, L. K. R.; LIMA, J. Produção de Goma a Partir do Cajueiro. **Centro Científico Conhecer**, 2013.

LIU, J.; WILLFÖR, S.; XU, C. A review of bioactive plant polysaccharides: Biological activities, functionalization, and biomedical applications. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 5, n. 1, p. 31–61, 2015.

LING, K. et al. Alginate/Chitosan microparticles for gastric passage and intestinal release of therapeutic protein nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 295, n. December 2018, p. 174–186, 2018.

LOUPY, A. Solvent-free microwave organic synthesis as an efficient procedure for green chemistry. **Comptes Rendus Chimie**, v. 7, n. 2, p. 103–112, 2004.

LOPEZ, M.; TANOWITZ, H.B.; GARG, N.J. Patogênese da Doença de Chagas Crônica: Macrófagos, Mitocôndrias e Estresse Oxidativo. *Curr Clin Micro Rpt* **5**, 45–54 (2018)

LUSTOSA, A. K. M. F. et al. In situ synthesis of silver nanoparticles in a hydrogel of carboxymethyl cellulose with phthalated-cashew gum as a promising antibacterial and healing agent. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, 2017.

MA, X. et al. Injectable hydrogels based on the hyaluronic acid and poly (γ -glutamic acid) for controlled protein delivery. *Carbohydrate polymers*, v. 179, p. 100-109, 2018.

MACIEL, J. S. et al. Oxidized cashew gum scaffolds for tissue engineering. *Macromolecular Materials and Engineering*, v. 304, n. 3, p. 1800574, 2019.

MALIK, L. H.; SINGH, G. D.; AMSTERDAM, E. A. Chagas Heart Disease: An Update. *American Journal of Medicine*, v. 128, 2015.

MALLAKPOUR, S.; RAFIEE, Z. Application of Microwave-assisted Reactions in Step-growth Polymerization: A Review. *Iranian Polymer Journal*, v. 17, p. 907–935, 2008.

MATSUDA, N. M.; MILLER, S. M.; EVORA, P. R. B. The chronic Gastrointestinal manifestations of Chagas' disease. *American Journal of Gastroenterology*, v. 64, p. 1219–1224, 2009.

MEDEI, E. H. et al. Envolvimento de Auto-Anticorpos na Fisiopatologia da doença de Artigo de Revisão. *Arq Bras Cardiol*, v. 91, n. 4, p. 281–286, 2008.

MENDES, A. C. et al. Palmitoylation of xanthan polysaccharide for self-assembly microcapsule formation and encapsulation of cells in physiological conditions. *Soft Matter*, v. 7, n. 20, p. 9647-9658, 2011.

MELO, A. M. A. et al. Preparation and characterization of carboxymethyl cashew gum grafted with immobilized antibody for potential biosensor application. *Carbohydrate polymers*, v. 228, p. 115408, 2020.

MELO, J. C. P. et al. Exploring the favorable ion-exchange ability of phthalylated cellulose biopolymer using thermodynamic data. *Carbohydrate research*, v. 345, n. 13, p. 1914-1921, 2010.

MENG, F. et al. Preparation and properties of konjac glucomannan octenyl succinate modified by microwave method. *Food Hydrocolloids*, v. 38, p. 205–210, 2014.

MIJINYAWA, A. H.; DURGA, G.; MISHRA, A. Isolation, characterization, and microwave assisted surface modification of *Colocasia esculenta* (L.) Schott mucilage by grafting polylactide. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 119, p. 1090–1097, 2018.

MILLS, R. M. Chagas Disease. Epidemiology and Barriers to Treatment. **The American Journal of Medicine**, 2020.

MOHSIN, S.; MAHADEVAN, R.; MURALEEDHARA KURUP, G. Free-radical-scavenging activity and antioxidant effect of ascophyllan from marine brown algae *Padina tetrastromatica*. **Biomedicine and Preventive Nutrition**, v. 4, p. 75–79, 2014.

MORILLA, M. J.; ROMERO, E. L. Nanomedicines against Chagas disease: an update on therapeutics, prophylaxis and diagnosis. **Nanomedicine**, v. 10, n. 3, p. 465-481, 2015.

MORILLO, C. A. et al. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. **New England Journal of Medicine**, v. 373, p. 1295–1306, 2015.

MOSQUEIRA, V. C. F.; MAZZETI, A. L.; BAHIA, M. T. Nanomedicines against Chagas disease. In: **Applications of Nanobiotechnology for Neglected Tropical Diseases**. Academic Press, 2021. p. 169-189.

MOTHE, C. G.; RAO, M. A. Rheological behavior of aqueous dispersions of cashew gum and gum arabic: effect of concentration and blending. **Food hydrocolloids**, v. 13, n. 6, p. 501-506, 1999.

MOTHÉ, C. G.; RAO, M. A. Thermal behavior of gum arabic in comparison with cashew gum. **Thermochimica acta**, v. 357, p. 9-13, 2000.

MOTHÉ, C. G.; DE FREITAS, J. S. Lifetime prediction and kinetic parameters of thermal decomposition of cashew gum by thermal analysis. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 131, p. 397–404, 2018.

MOTHÉ, C. G.; SOUZA, I. A. DE; CALAZANS, G. M. T. Antitumor activity of cashew gum from *Anacardium* L. **Agro Food Industry**, v. 19, p. 50–52, 2008.

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

MOURA FERRAZ, L. R. et al. Technological innovation strategies for the specific treatment of Chagas disease based on Benznidazole. **Acta tropica**, v. 185, p. 127-132, 2018.

MÜLLER KRATZ, J. et al. Clinical and pharmacological profile of benznidazole for treatment of Chagas disease. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 11, n. 10, p. 943-957, 2018.

MUÑOZ-VILCHES, M. J. et al. Cribado de Chagas en mujeres gestantes latinoamericanas. Experiencia en el Poniente Almeriense. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 30, p. 380–382, 2012.

NAVARRO, M. et al. Hunting hidden parasites: *Trypanosoma cruzi*. **The Lancet**, v. 390, n. 10096, p. 724-726, 2017.

NAYAK, A. K. et al. Cashew gum in drug delivery applications. In: **Natural Polysaccharides in Drug Delivery and Biomedical Applications**. Academic Press, 2019. p. 263-283.

NHAVENE, E. P. F. et al. Chitosan grafted into mesoporous silica nanoparticles as benznidazol carrier for Chagas diseases treatment. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 272, p. 265–275, 2018.

NOYA, B. A. DE et al. Large Urban Outbreak of Orally Acquired Acute Chagas Disease at a School in Caracas, Venezuela. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 201, p. 1308–1315, 2010.

NUNES, M. C. P. et al. Chagas disease: An overview of clinical and epidemiological aspects. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, p. 767–776, 2013.

OKOYE, E. I.; ONYEKWELI, A. O.; FATOKI, O. O. Evaluation of LD 50 of Cashew Gum and the Comparative Study of its Functionality in Cotrimoxazole Granule and Tablet Formulations. **British Journal of Pharmacology and Toxicology**, v. 3, p. 156–164, 2012.

OLIVEIRA, A. C. de J. et al. Solvent-free production of phthalated cashew gum for green synthesis of antimicrobial silver nanoparticles. **Carbohydrate polymers**, v. 213, p. 176-183, 2019.

OLIVEIRA, A. C. de J. et al. Microwave-initiated rapid synthesis of phthalated cashew gum for drug delivery systems. **Carbohydrate Polymers**, v. 254, p. 117226, 2021.

OLIVEIRA, W. Q. et al. Complex coacervates of cashew gum and gelatin as carriers of green coffee oil: The effect of microcapsule application on the rheological and sensorial quality of a fruit juice. **Food Research International**, v. 131, p. 109047, 2020.

PEPPAS, N. A.; SAHLIN, J.J. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. **International journal of pharmaceutics**, v. 57, n. 2, p. 169-172, 1989.

PÉREZ-MOLINA, J. A. et al. Trypanocidal treatment of Chagas disease. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, 2020.

PÉREZ-MOLINA, J. A. et al. Old and new challenges in Chagas disease. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 15, p. 1347–1356, 2015.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **The Lancet**, v. 391, p. 82–94, 2018.

PETIT, C.; REYNAUD, S.; DESBRIERES, J. Amphiphilic derivatives of chitosan using microwave irradiation. Toward an eco-friendly process to chitosan derivatives. **Carbohydrate polymers**, v. 116, p. 26-33, 2015.

PINTO, G. L. et al. Comparison of three anacardiaceae gum exudates. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 23, n. 2, p. 151–156, 1995.

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

PONTES, V. M. O. DE et al. Reações adversas em pacientes com doença de Chagas tratados com benzonidazol , no Estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, p. 182–187, 2010.

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

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of chagas disease. **The Lancet infection disease**, v. 1, n. September, p. 92–100, 2001.

PRAYAG, K. et al. Nanotechnological interventions for treatment of trypanosomiasis in humans and animals. **Drug delivery and translational research**, v. 10, p. 945-961, 2020.

PUSHPAMALAR, J. et al. Biodegradable polysaccharides for controlled drug delivery. **ChemPlusChem**, v. 81, n. 6, p. 504, 2016.

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

RAFIEI, P.; HADDADI, A. A robust systematic design: Optimization and preparation of polymeric nanoparticles of PLGA for docetaxel intravenous delivery. **Materials Science and Engineering: C**, v. 104, p. 109950, 2019.

RAHMAN, Z. et al. Understanding the quality of protein loaded PLGA nanoparticles variability by Plackett-Burman design. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 389, n. 1–2, p. 186–194, 2010

RANA, V. et al. Modified gums: Approaches and applications in drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 1031–1047, 2011.

RANI, P. et al. Microwave assisted synthesis of polyacrylamide grafted gum ghatti and its application as flocculant. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p. 275–281, 2012.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-1402, 2010.

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

RIBEIRO, A. J. et al. Gums' based delivery systems: Review on cashew gum and its derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 147, p. 188–200, 2016.

RIBEIRO, Vanessa et al. Current trends in the pharmacological management of Chagas disease. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 12, p. 7-17, 2020.

RIBEIRO, I. S. et al. Poly (ϵ -caprolactone) grafted cashew gum nanoparticles as an epirubicin delivery system. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2021.

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

RICHTER, A. R. et al. Self-assembling cashew gum-graft-poly lactide copolymer nanoparticles as a potential amphotericin B delivery matrix. **International journal of biological macromolecules**, v. 152, p. 492-502, 2020.

RIOS, L. et al. Epidemiology and pathogenesis of maternal-fetal transmission of *Trypanosoma cruzi* and a case for vaccine development against congenital Chagas disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1866, n. 3, p. 165591, 2020.

RODRIGUES, J A. et al. Acetylated cashew gum-based nanoparticles for the incorporation of alkaloid epiisopiloturine. **International journal of biological macromolecules**, v. 128, p. 965-972, 2019.

ROMERO, E. L.; MORILLA, M. J. Nanotechnological approaches against Chagas disease. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, p. 576–588, 2010.

ROY, A. et al. Hydrophobically modified xanthan: an amphiphilic but not associative polymer. **Biomacromolecules**, v. 15, n. 4, p. 1160-1170, 2014.

SAHANA, D. K. et al. PLGA Nanoparticles for Oral Delivery of Hydrophobic Drugs: Influence of Organic Solvent on Nanoparticle Formation and Release Behavior *In Vitro* and *In Vivo* Using Estradiol as a Model Drug. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 97, p. 1530–1541, 2008.

SANTOS, E. F. et al. Acute Chagas disease in Brazil from 2001 to 2018: A nationwide

spatiotemporal analysis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 14, n. 8, 2020.

SANTOS RAMOS, M. A. et al. Nanotechnological strategies for systemic microbial infections treatment: A review. **International Journal of Pharmaceutics**, p. 119780, 2020.

SANTOS, S. S. et al. Searching for drugs for Chagas disease, leishmaniasis and schistosomiasis: a review. **International journal of antimicrobial agents**, v. 55, n. 4, p. 105906, 2020

SANTOS-SILVA, A. M. et al. Designing structural features of novel benznidazole-loaded cationic nanoparticles for inducing slow drug release and improvement of biological efficacy. **Materials Science and Engineering C**, v. 78, p. 978–987, 2017.

SANTOS-SILVA, A. M. et al. Self-assembled benznidazole-loaded cationic nanoparticles containing cholesterol/sialic acid: Physicochemical properties, *in vitro* drug release and *in vitro* anticancer efficacy. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 9, p. 2350, 2019a.

SANTOS-SILVA, A. M. et al. Hydrophilic and hydrophobic polymeric benznidazole-loaded nanoparticles: Physicochemical properties and *in vitro* antitumor efficacy. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 51, p. 700-707, 2019b.

SANTOS-VALLE, A. B. C. et al. Nanomedicine strategies for addressing major needs in neglected tropical diseases. **Annual Reviews in Control**, v. 48, p. 423-441, 2019.

SCALISE, M. L. et al. Promising efficacy of benznidazole nanoparticles in acute trypanosoma cruzi murine model: *In-vitro* and *in-vivo* studies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, p. 388–393, 2016.

SCARIM, C. B. et al. Current advances in drug discovery for Chagas disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 155, p. 824–838, 2018.

SCHIRATO, G. V. et al. O polissacarídeo do *Anacardium occidentale* L. na fase inflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas. **Ciência Rural**, v. 36, p. 149–154, 2006.

SEREMETA, K. P. et al. Development and characterization of benznidazole nano- and microparticles: A new tool for pediatric treatment of Chagas disease? **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 2019.

SHAPIRO, Yury E. Structure and dynamics of hydrogels and organogels: An NMR spectroscopy approach. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 9, p. 1184-1253, 2011.

SHAH, S. R. et al. Application of Plackett–Burman screening design for preparing glibenclamide nanoparticles for dissolution enhancement. **Powder Technology**, 235, 405-411, 2013.

- SHARMA, N.; MADAN, P.; LIN, S. Effect of process and formulation variables on the preparation of parenteral paclitaxel-loaded biodegradable polymeric nanoparticles: A co-surfactant study. **Asian journal of pharmaceutical sciences**, v. 11, n. 3, p. 404-416, 2016.
- SHANKAR, S.; RHIM, J. W. Preparation of sulfur nanoparticle-incorporated antimicrobial chitosan films. **Food Hydrocolloids**, v. 82, p. 116–123, 2018.
- SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced drug delivery reviews**, v. 64, p. 163-174, 2012.
- SILVA, A. M. G. et al. Avanços na síntese química: síntese assistida por micro-ondas. **Sociedade Portuguesa de Química**, p. 61-69, 2012.
- SILVA, D. A. et al. Characterization of crosslinked cashew gum derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, n. 1, p. 16-26, 2006.
- SILVA, D. A.; DE PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A. Graft copolymerisation of acrylamide onto cashew gum. **European Polymer Journal**, v. 43, p. 2620–2629, 2007.
- SILVA, D. A. et al. Carboxymethylation of cashew tree exudate polysaccharide. **Carbohydrate Polymers**, v. 58, p. 163–171, 2004.
- SILVA, E. L. V. et al. Solvent-free synthesis of acetylated cashew gum for oral delivery system of insulin. **Carbohydrate polymers**, v. 207, p. 601-608, 2019.
- SILVA, E. L. V. et al. Nanostructured polymeric system based of cashew gum for oral administration of insulin. **Matéria (Rio de Janeiro)**, v. 24, n. 3, 2019.
- SILVA, M. C. C. et al. Kaolinite/cashew gum bionanocomposite for doxazosin incorporation and its release. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 161, p. 927-935, 2020.
- SILVA-NETO, M. A. C. et al. Cell Signaling During *Trypanosoma cruzi* Development in Triatominae. **The Open Parasitology Journal**, v. 4, p. 188–194, 2010.
- SINGH, V.; KUMAR, P.; SANGHI, R. Use of microwave irradiation in the grafting modification of the polysaccharides - A review. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 37, p. 340–364, 2012.
- SITTERBERG, J. et al. Utilising atomic force microscopy for the characterisation of nanoscale drug delivery systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 74, n. 1, p. 2-13, 2010.

SOARES-SOBRINHO, J. L. et al. Delineamento de alternativas terapêuticas para o tratamento da doença de Chagas. **Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology**, v. 36, n. 2, p. 103-118, 2007.

SOARES-SOBRINHO, J. L. et al. Improving the solubility of the antichagasic drug benznidazole through formation of inclusion complexes with cyclodextrins. *Química Nova*, v. 34, n. 9, p. 1534-1538, 2011.

SOARES-SOBRINHO, J. L. et al. Benznidazole drug delivery by binary and multicomponent inclusion complexes using cyclodextrins and polymers. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 2, p. 323–330, 2012.

SOUSA, F. D. et al. Hydrogel and membrane scaffold formulations of Frutalin (breadfruit lectin) within a polysaccharide galactomannan matrix have potential for wound healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 121, p. 429–442, 2019.

SOUZA, J. M. T. et al. Sustainably produced cashew gum-capped zinc oxide nanoparticles show antifungal activity against *Candida parapsilosis*. **Journal of Cleaner Production**, v. 247, p. 119085, 2020.

SOSNIK, A.; GOTELLI, G.; ABRAHAM, G. A. Microwave-assisted polymer synthesis (MAPS) as a tool in biomaterials science: How new and how powerful. **Progress in Polymer Science**, v. 36, p. 1050–1078, 2011.

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

STANAWAY, J. D.; ROTH, G. The Burden of Chagas Disease Estimates and Challenges. **Global Heart**, v. 10, p. 139–144, 2015.

STRECK, L. et al. Tailoring microstructural, drug release properties, and antichagasic efficacy of biocompatible oil-in-water benznidazol-loaded nanoemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 555, p. 36–48, 2019.

SUBBIAH, R.; VEERAPANDIAN, M.; S YUN, K. Nanoparticles: functionalization and multifunctional applications in biomedical sciences. **Current medicinal chemistry**, v. 17, n. 36, p. 4559-4577, 2010.

SUR, S. et al. Recent developments in functionalized polymer nanoparticles for efficient drug delivery system. **Nano-Structures & Nano-Objects**, v. 20, p. 100397, 2019.

SURATI, M. A.; JAUHARI, S.; DESAI, K. R. A brief review : Microwave assisted organic reaction. **Archives of Applied Science Research**, v. 4, p. 645–661, 2012.

STRECK, L. et al. Tailoring microstructural, drug release properties, and antichagasic efficacy of biocompatible oil-in-water benznidazol-loaded nanoemulsions. **International journal of pharmaceutics**, v. 555, p. 36-48, 2019.

TANOWITZ, H. B. et al. Perspectives on *Trypanosoma cruzi*-Induced Heart Disease (Chagas Disease). **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 51, p. 524–539, 2009.

TEIXEIRA, P. R. S. et al. Chemically modified babassu coconut (*Orbignya* sp.) biopolymer: characterization and development of a thin film for its application in electrochemical sensors. **Journal of Polymer Research**, v. 25, n. 5, p. 1-11, 2018.

UBAIDULLA, U. et al. Chitosan phthalate microspheres for oral delivery of insulin: preparation, characterization, and *in vitro* evaluation. **Drug delivery**, v. 14, n. 1, p. 19-23, 2007.

URBINA, J. A. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. **Acta Tropica**, v. 115, p. 55–68, 2010.

VALLE, M. J. DE J. et al. Albumin micro/nanoparticles entrapping liposomes for itraconazole green formulation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 106, p. 159–165, 2017.

VORON'KO, N. G. et al. Complexation of κ -carrageenan with gelatin in the aqueous phase analysed by ^1H NMR kinetics and relaxation. **Carbohydrate polymers**, v. 169, p. 117-126, 2017.

VERMA, N. K. et al. Magnetic core-shell nanoparticles for drug delivery by nebulization. **Journal of nanobiotechnology**, v. 11, n. 1, p. 1, 2013.

VIEIRA, A. C. C. et al. Mucoadhesive chitosan-coated solid lipid nanoparticles for better management of tuberculosis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 536, p. 478–485, 2018.

WANG, J. et al. Synthesis and characterization of phosphorylated galactomannan: the effect of DS on solution conformation and antioxidant activities. **Carbohydrate polymers**, v. 113, p. 325-335, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **Chagas disease (also known as American trypanosomiasis)**. World Health Organization, 2021.

XING, R. et al. Preparation of low-molecular-weight and high-sulfate-content chitosans under microwave radiation and their potential antioxidant activity *in vitro*. **Carbohydrate research**, v. 339, n. 15, p. 2515-2519, 2004.

XU, Y. et al. Chemically modified polysaccharides: Synthesis, characterization, structure activity relationships of action. **International journal of biological macromolecules**, v. 132, p. 970-977, 2019.

YAMASSAKI, F. T. et al. Effect of the native polysaccharide of cashew-nut tree gum exudate on murine peritoneal macrophage modulatory activities. **Carbohydrate Polymers**, v. 125, p. 241–248, 2015.

ZAKARIA, M. B.; RAHMAN, Z. A. Rheological properties of cashew gum. **Carbohydrate Polymers**, v. 29, p. 25–27, 1996.

ZHANG, C. et al. Synthesis of konjac glucomannan phthalate as a new biosorbent for copper ion removal. **Journal of Polymer Research**, v. 20, n. 1, p. 1-14, 2013.

ZHANG, X.; ZHANG, Y. Poly (butylene succinate-co-butylene adipate)/cellulose nanocrystal composites modified with phthalic anhydride. **Carbohydrate polymers**, v. 134, p. 52-59, 2015.

ZHOU, M. et al. Low density lipoprotein/pectin complex nanogels as potential oral delivery vehicles for curcumin. **Food Hydrocolloids**, v. 57, p. 20-29, 2016.

APÊNDICE A- LISTA DE PUBLICAÇÕES

• ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORAMENTO

- **Este trabalho refere-se ao artigo I apresentado nesta tese**
 - OLIVEIRA, A. C.J. et al. Microwave-initiated rapid synthesis of phthalated cashew gum for drug delivery systems. **Carbohydrate Polymers**, v. 254, p. 117226, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117226>
- **Trabalho desenvolvido durante o mestrado e concluído no primeiro ano do doutorado**
 - OLIVEIRA, A. C. et al. Solvent-free production of phthalated cashew gum for green synthesis of antimicrobial silver nanoparticles. **Carbohydrate polymers**, v. 213, p. 176-183, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.02.033>
- **Trabalho desenvolvido em parceria com laboratório NCQMC, onde fui responsável em desenvolver e fornecer a goma do cajueiro modificada por acetilação**
 - SILVA, E. de L.V. et al. Solvent-free synthesis of acetylated cashew gum for oral delivery system of insulin. **Carbohydrate polymers**, v. 207, p. 601-608, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.11.071>

• PATENTES DEPOSITADAS DURANTE O DOUTORAMENTO

- **O presente pedido refere-se ao patenteamento do processo de modificação da goma do cajueiro apresentado no artigo I desta tese**
 - BR 10 2021 004787 9 – " PROCESSO DE MODIFICAÇÃO DA GOMA DO CAJUEIRO FTALADA FAZENDO USO DE UM REATOR DE MICRO-ONDAS", instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. depósito: 14/03/2021.
- **Nestes pedidos de patente foi responsável em fornecer o material goma do cajueiro acetilada**
 - BR 10 2021 004778 0 – "SISTEMAS NANOPARTICULADOS A PARTIR DO POLISSACARÍDEO MODIFICADO DE *Anacardium occidentale* L. (GOMA DO CAJUEIRO) PARA O TRATAMENTO DO HIV PEDIÁTRICO", instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. depósito: 12/03/2021.

Neste pedido de patente foi responsável em fornecer o material goma do cajueiro acetilada

- BR 10 2020 003525 8 – “COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA VEICULAÇÃO DE ATIVO OU HORMÔNIO E LIBERAÇÃO CONTROLADA, RESPECTIVO PROCESSO DE OBTENÇÃO SUSTENTÁVEL E USOS”. instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. depósito: 20/02/2020.