UNIVERSIDADE DE SOROCABA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA, EXTENSÃO E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Victória Soares Soeiro

PRODUÇÃO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA PARA ESTABILIZAÇÃO DE SISTEMAS BASEADO EM NANOEMULSÕES E TRANSPORTE DE FÁRMACOS

Sorocaba/SP
2020

Victória Soares Soeiro

PRODUÇÃO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA PARA ESTABILIZAÇÃO DE SISTEMAS BASEADO EM NANOEMULSÕES E TRANSPORTE DE FÁRMACOS

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud
Coorientadora: Profa. Dra. Angela Faustino Jozala

Sorocaba/SP
2020

Ficha Catalográfica

Soeiro, Victória Soares
S664p Produção de nanocristais de celulose bacteriana para estabilização de sistemas baseado em nanoemulsões e transporte de fármacos / Victória Soares Soeiro. – 2020.
78 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud.
Coorientadora: Profa. Dra. Angela Faustino Jozala.
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2020.

1. Celulose bacteriana. 2. Nanocristais. 3. Nanocomplexos. I. Chaud, Marco Vinícius, orient. II. Jozala, Angela Faustino, coorient. III. Universidade de Sorocaba. IV. Título.

Elaborada por Maria Carla P. F. Gonçalves – CRB-8/6721

Victória Soares Soeiro

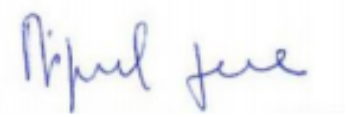
PRODUÇÃO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA PARA ESTABILIZAÇÃO DE SISTEMAS BASEADO EM NANOEMULSÕES E TRANSPORTE DE FÁRMACOS

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba.

Aprovado em: 27/08/2020

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud
Presidente da Banca Examinadora
Universidade de Sorocaba



Prof. Dr. Francisco Miguel Portela da Gama
Membro Titular da Banca Examinadora
Universidade do Minho

Prof. Dr. Norberto Aranha
Membro Titular da Banca Examinadora
Universidade de Sorocaba

AGRADECIMENTOS

À minha mãe e a minha família por sempre estarem comigo, me apoiando em todos os momentos. Quando eu não tinha mais esperanças, vocês estavam lá para me encorajar a seguir e não desistir dos meus sonhos. Obrigada por tudo!

Aos meus amigos que me ajudaram tanto diretamente quanto indiretamente para a concretização deste sonho. Vocês também estiveram comigo em momentos difíceis e foram meu suporte. Vocês são a família que eu escolhi, nunca se esqueçam disso.

Aos meus orientadores, Marco Vinicius Chaud e Angela Faustino Jozala, que além de me guiar, foram como um pai e uma mãe pra mim nessa jornada. Sem vocês, nada disso seria possível.

À Universidade de Sorocaba e a Univerisdade do Minho que me acolheram nessa trajetória, sendo fundamentais para a realização dos experimentos e tornando meu sonho, realidade.

Aos laboratórios LAPETOX (Laboratório em Pesquisa Toxicológica da UNISO), LaMInFe (Laboratório de Microbiologia Industrial e Processos Fermentativos) e LaBNUS (Laboratório de Biomateriais e Nanotecnologia da Uniso), onde desenvolvi a maior parte da minha pesquisa.

Ao Laboratório de física nuclear aplicada da Uniso e ao Laboratório de Biomateriais (LaBiomat) da PUC-SP, que abriram as portas para realizar análises que foram fundamentais para o meu trabalho.

Ao Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho e ao Prof. Miguel Gama que me recebeu em seu laboratório durante 3 meses para a realização do projeto bepe, onde pude evoluir tanto na parte de pesquisa como ser humano.

Aos meus colegas de laboratório, que me ajudaram durante a rotina do mestrado e que se tornaram pessoas muito especiais para mim e que eu quero levar para a vida toda.

Aos funcionários da UNISO que me ajudaram diversas vezes na realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), que financiou a bolsa de Mestrado (n° 2018/10508-5) e a bolsa BEPE (n° processo 2019/22626-5). As agências de fomento foram essenciais para a realização deste trabalho.

RESUMO

Sistemas emulsionados sem surfactantes são ecologicamente corretos e podem ser aplicados na área farmacêutica e alimentícia. Os nanocomplexos são estruturas auto organizadas compostas por um polissacarídeo ou polímero e o fármaco. Dito isso, uma opção capaz de estabilizar emulsões e os nanocomplexos é a aplicação dos nanocristais de celulose (NCC), proveniente de celulose bacteriana. A celulose bacteriana é produzida pela bactéria *Gluconacetobacter xylinus*, é desprovida de lignina e hemicelulose, tem alta pureza química, cristalinidade, é inerte metabolicamente, atóxica e não alergênica. Entretanto, o processo de obtenção das NCC, mais utilizado, gera resíduos ambientais decorrente da utilização de técnicas por hidrólise ácida. Um método para obtenção de NCC, com melhores características e menores danos ambientais, é a hidrólise da celulose por via enzimática, utilizando celulase. Por esta razão, neste trabalho, foi realizada a produção de NCC por hidrólise enzimática e sua aplicação em sistemas emulsionados e em nanocomplexos. Adiante no texto o leitor irá encontrar em cada capítulo uma avaliação e aplicação dos NCC. No capítulo I trazemos o referencial teórico do trabalho, onde debatemos sobre emulsões, emulsões pickering e nanocristais derivados de celulose bacteriana. No capítulo II, os NCC foram produzidos, caracterizados e avaliados afim de obter a melhor metodologia. O material foi obtido por um tratamento mecânico e hidrólise enzimática em cinco etapas e avaliando os parâmetros: tamanho, PDI e potencial zeta. Na amostra final, foi realizada o teste de NTA, MEV e TEM. Os resultados da produção de NCC demonstraram que os NCC da terceira centrifugação, com 72 horas de hidrólise foram menores em relação a tamanho e PDI. Após a escolha da melhor opção, desenvolvemos o capítulo III onde foram estudados sistema emulsionado contendo alginato e óleo de rícino recoberto por NCC. Foram realizadas caracterizações por FTIR, DSC, potencial zeta, microscopia óptica e MEV, que comprovaram a incorporação do NCC no sistema. No capítulo IV os NCC foram aplicados em nanocomplexos de alginato e anfotericina B e caracterizados por tamanho, PDI, potencial zeta, DSC, FTIR, Espectrometria UV-vis, teste de hemólise e citotoxicidade. Os NCC foram incorporados nos nanocomplexos, com baixa agregação da anfotericina B e cito e hemotoxicidade. Analisando todos os resultados obtidos diante aos capítulos podemos concluir que a hidrólise enzimática é uma alternativa para produção de NCC a partir de celulose bacteriana, sendo o tratamento mecânico e as operações unitárias fundamentais na construção do processo do material; e na avaliação dos sistemas formados, é possível realizar o recobrimento pelos NCC e poderão se tornar um sistema de liberação controlada de medicamentos.

Palavras-chave: Celulose Bacteriana. Nanocristais. Hidrólise enzimática. Sistema emulsionado. Nanocomplexos.

ABSTRACT

Emulsified systems without surfactants are environmentally friendly and can be applied in the pharmaceutical and food industry. Nanocomplexes are self-organized structures composed of a polysaccharide or polymer and a drug. An option capable of stabilizing emulsions and nanocomplexes is the application of cellulose nanocrystals (NCC), from bacterial cellulose. Bacterial cellulose is produced by the bacterium *Gluconacetobacter xylinus*, is devoid of lignin and hemicellulose, has high chemical purity, crystallinity, and is metabolically inert, non-toxic and non-allergenic. However, the process of obtaining the most widely used NCC generates environmental waste due to the use of acid hydrolysis techniques. One method for obtaining NCC, with better characteristics and less environmental damage, is the enzymatic hydrolysis of cellulose, using cellulase. For this reason, in this work, the production of NCC was carried out by enzymatic hydrolysis and its application in emulsified systems and in nanocomplexes. Later in the text the reader will find in each chapter an evaluation and application of the NCC. In chapter I we bring the theoretical framework of the work, where we debate about emulsions, pickering emulsions and nanocrystals derived from bacterial cellulose. In chapter II, the NCC were produced, characterized and evaluated in order to obtain the best methodology. The material was obtained by mechanical treatment and enzymatic hydrolysis in five stages and by evaluating the parameters: size, PDI and zeta potential. In the final sample, the NTA, SEM and TEM test was performed. The results of the production of NCC demonstrated that the NCC of the third centrifugation, with 72 hours of hydrolysis, were smaller in relation to size and PDI. After choosing the best option, we developed Chapter III where an emulsified system containing alginate and castor oil covered by NCC was studied. Characterizations were carried out by FTIR, DSC, zeta potential, optical microscopy and SEM, which proved the incorporation of NCC in the system. In Chapter IV, NCC were applied in alginate and amphotericin B nanocomplexes and characterized by size, PDI, zeta potential, DSC, FTIR, UV-vis spectrometry, hemolysis and cytotoxicity tests. The NCC were incorporated into the nanocomplexes, with low aggregation of amphotericin B, cyto and hemotoxicity. Analyzing all the results obtained, we can conclude that enzymatic hydrolysis is an alternative for the production of NCC from bacterial cellulose, with mechanical treatment and unit operations fundamental in the construction of the material process; and in the assessment of the systems formed, it is possible to perform the covering by the NCC and they could become a system for controlled release of drugs.

Key-words: Bacterial cellulose. Nanocrystals. Enzymatic hydrolysis. Emulsified system. Nanocomplexes.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µL	Microlitro
µM	Micromolar
A/O	Emulsão água/óleo
Alg	Amostra de alginato
Alg-AmB + NCC	Nanocomplexos de alginato e anfotericina recobertos por nanocristais de celulose bacteriana
Alg-AmB	Nanocomplexos de alginato e anfotericina
CMC	Concentração micelar crítica
DLS	Espalhamento dinâmico de luz
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier
g	Gramas
g/L	grama/litro
M	Molar
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
Min	Minutos
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mV	Milivoltz
NCC	Nanocristais de celulose bacteriana
nm	Nanômetro
NTA	Nanoparticles Tracking Analysis
O/A	Emulsão óleo/água
ºC	Graus Celsius
PDI	Índice de polidispersidade
pH	Potencial hidrogeniônico
PTFE	Politetrafluoretileno
q.s.p	Quantidade suficiente para
rpm	Rotação por minuto
SCB	Sistema de Classificação Biofarmacêutica
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão
UV-Vis	Ultravioleta visível

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I: BACTERIAL NANOCELLULOSE CRYSTALS AND PICKERING EMULSIONS: SUSTAINABLE PRODUCTION, APPLICATIONS AND LIMITATIONS

Figure 1 – Scheme of the classic oil/water emulsion……. 18
Figure 2 – Illustration of the oil/water Pickering emulsion 19
Figure 3 – Representation of enzymatic hydrolysis of bacterial cellulose to obtain nanocrystals…… 23

CAPÍTULO II: OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Figura 1 – Metodologia I para produção de nanocristais de celulose bacteriana (NCC)..... 29
Figura 2 – Curva da glicose liberada nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas..... 31
Figura 3 – Caracterização de tamanho das amostras de NCC produzidas em diferentes processos e avaliadas em no período de 0, 3, 7 e 21 dias..... 32
Figura 4 – Índice de polidispersidade (PDI) das amostras de NCC produzidas em diferentes processos e avaliadas em no período de 0, 3, 7 e 21 dias..... 34
Figura 5 – Potencial zeta das amostras de NCC produzidas em diferentes processos e avaliadas em no período de 0, 3, 7 e 21 dias..... 35
Figura 6 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da amostra de nanocristais de celulose bacteriana (NCC)..... 38
Figura 7 – Microscopia eletrônica de transmissão (MET) da amostra de nanocristais de celulose bacteriana (NCC)..... 39

CAPITULO III: PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM SISTEMA EMULSIONADO CONTENDO ALGINATO E ÓLEO DE RÍCINO RECOBERTO POR NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA

Figura 1 – Esquema do sistema de gelificação ionotrópica..... 44
Figura 2 – Amostra do sistema emulsionado realizado com óleo de rícino e alginato de sódio..... 46
Figura 3 – Teste de estabilidade do sistema emulsionado realizado com óleo de rícino e alginato de sódio..... 47
Figura 4 – Resultado do potencial zeta de superfície das partículas sem NCC..... 48
Figura 5 – Resultados da análise de DSC contendo o termograma das amostras de partículas, partículas + NCC e NCC..... 49
Figura 6 – Resultado da análise de FTIR contendo os espectros das amostras de partículas, partículas + NCC e NCC..... 51
Figura 7 – Microscopia óptica das partículas e partículas recobertas com NCC nos tempos 0, 6, 10, 24 e 48 horas 53
Figura 8 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das esfera e partículas recobertas por NCC por 48 horas 55

CAPITULO IV: ALGINATE-AMPHOTHERICIN B NANOCOMPLEXES COVERED BY NANOCRYSTALS FROM BACTERIAL CELLULOSE: PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERIZATION AND IN VITRO TOXICITY

Figure 1.A – Differential Scanning Calorimetry (DSC). B – Infrared spectrum by Fourier transform (FTIR). C – UV-Vis spectrometry. D – Design Production of Alg-AmB and Alg-AmB + NCC……... 64
Figure 2 – Percentage of hemolysis after treatment of red blood cells (A) Cytotoxicity of the renal cell line HEK293T (B) with Alg, Alg-AmB, Alg-AmB + NCC, AmBisome® and AmB…….... 66

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II: OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA
Tabela 1 – Análise de NTA..... 37

CAPITULO III: PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM SISTEMA EMULSIONADO CONTENDO ALGINATO E ÓLEO DE RÍCINO RECOBERTO POR NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA
Tabela 1 – Formulação do sistema emulsionado..... 43

CAPITULO IV: ALGINATE-AMPHOTHERICIN B NANOCOMPLEXES COVERED BY NANOCRYSTALS FROM BACTERIAL CELLULOSE: PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERIZATION AND IN VITRO TOXICITY
Table 1 – Formulation of alginate (Alg) e alginate-amphotericin B (Alg-AmB)…….. 60
Table 2 – Analysis of the size, PDI and zeta potential of Alg-AmB Alg-Amb+NCC... 63

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO **13**
OBJETIVO GERAL **15**
Objetivos Específicos **15**
CAPÍTULO I: BACTERIAL NANOCELLULOSE CRYSTALS AND PICKERING EMULSIONS: SUSTAINABLE PRODUCTION, APPLICATIONS AND LIMITATIONS **16**
Abstract **16**
Introduction **17**
Emulsion **18**
Pickering emulsion **19**
Bacterial cellulose **20**
Bacterial cellulose nanocrystals 21
Conclusion **25**
CAPÍTULO II: OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA **26**
Resumo **26**
Introdução **27**
Metodologia **28**
Produção da celulose bacteriana 28
Produção dos NCC 28
Análise do parâmetro de produção dos NCC 30
Caracterização dos NCC 30
Resultados e discussão **31**
Liberação de glicose dos NCC 31
Caracterização do tamanho dos NCC 32
Caracterização do PDI dos NCC 33
Caracterização do potencial zeta dos NCC 35
Caracterização dos NCC por NTA 37
Microscopia Eletrônica de Tramissão (MEV) e Microscopia eletrônica de varredura (TEM) 38
Conclusão **40**
CAPITULO III: PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM SISTEMA EMULSIONADO CONTENDO ALGINATO E ÓLEO DE RÍCINO RECOBERTO POR NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA **41**
Resumo **41**
Introdução **42**
Material e métodos **43**

Preparação do sistema emulsionado 43
Teste de estabilidade do sistema emulsionado 43
Obtenção das partículas por gelificação ionotrópica 44
Obtenção dos nanocristais de celulose bacteriana (NCC) 44
Incorporação do NCC no sistema 45
Caracterização morfológica e físico química das partículas 45
Resultados e discussão 46
Sistema emulsionado 46
Estabilidade da emulsão 46
Caracterização das partículas 47
Conclusão 56
CAPITULO IV: ALGINATE-AMPHOTHERICIN B NANOCOMPLEXES COVERED BY NANOCRYSTALS FROM BACTERIAL CELLULOSE: PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERIZATION AND *IN VITRO* TOXICITY 57
Abstract 57
Background 58
Methodology 59
Reagents 59
Obtaining bacterial cellulose nanocrystals (NCC) 59
Preparation of nanocomplexes 59
Nanocomplex coating 60
Physico-chemical characterization 60
In vitro toxicity 61
Statistical analysis 62
Results 63
Physico-chemical characterization of nanocomplexes 63
***In vitro* toxicity** 65
Discussion 67
Physical-Chemical analyses 67
Toxicity study 69
Conclusion 70
CONCLUSÃO 71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 72

INTRODUÇÃO

A celulose é um dos biopolímeros mais importantes do mundo, podendo ser empregada para a produção de nanocompósitos. A sua matéria-prima é quase inesgotável pois é derivada de diversos organismos, entre eles plantas, fungos, protozoários e bactérias (GORGIEVA; TRČEK, 2019; KLEMM et al., 2011; RUKA; SIMON; DEAN, 2012; ZHONG et al., 2013).

A celulose bacteriana é um material tridimensional livre de impurezas, como lignina, pectina e hemicelulose, com alto rendimento, pureza e viabilidade. É composta por nanofibras, que são atrativas para o desenvolvimento de materiais derivados, como os nanocristais (AZEREDO et al., 2019; DUGAN; GOUGH; EICHHORN, 2013).

Os nanocristais derivados da celulose bactériana (NCC) são fibras rompidas com domínios semicristalinos. São considerados nanomateriais ecologicamente amigáveis por causa da natureza renovável da matéria-prima (GEORGE et al., 2011; KLEMM et al., 2011; ROVERA et al., 2018).

A técnica mais comum para a produção dos NCC envolve etapas com ácidos, trazendo problemas ambientais. A solução mais viável é o emprego de enzimas capazes de hidrolisar a celulose bacteriana, sem perder as propriedades nativas do material, sendo uma rota alternativa e ecológica (ROVERA et al., 2018).

Devido à dimensão em nanoescala, os NCC possuem aplicação em diversas áreas do conhecimento, incluindo engenharia de tecidos como reforço em *scaffolds* (YAN et al., 2018a), na indústria farmacêutica (KALASHNIKOVA et al., 2013), indústria alimentícia e nanocompósitos (GEORGE et al., 2014).

Emulsões livres de surfactantes podem utilizar partículas ou polímeros para realização da estabilização. Ambos vão atuar na interface óleo/água da emulsão, formando uma barreira, impedindo a coalescência da fase dispersa (ARAIZA-CALAHORRA et al., 2017; CHEN et al., 2016).

Os nanocomplexos são estruturas auto organizadas compostas por um polímero e o fármaco. Este sistema possui vantagens como escala nano, estabilidade coloidal, dispersão em água, baixa toxicidade, ótimo custo-benefício e não utiliza solventes (GURUDEVAN; FRANCIS; JAYAKRISHNAN, 2018; NISHI et al., 2007; RAVICHANDRAN; JAYAKRISHNAN, 2018).

Essa dissertação teve por objetivo produzir nanocristais a partir da celulose bacteriana e aplicar em sistemas coloidais biomiméticos baseado em emulsões nanoestruturadas. Para tanto, a dissertação foi dividida em Capitulo I, que contém uma revisão bibliográfica sobre

emulsões, emulsões pickering e nanocristais de celulose; Capítulo II, com a produção de nanocristais de celulose bacteriana a partir de hidrólise enzimática, avaliando a melhor metodologia; o Capitulo III, com a produção e caracterização de um sistema emulsionado contendo alginato e óleo de rícino recoberto por nanocristais de celulose bacteriana; e o capítulo IV com nanocomplexos de alginato-anfotericina recobertos por celulose bacteriana: caracterização físico-química e toxicidade *in vitro*.

OBJETIVO GERAL

Produção de nanocristais de celulose bacteriana (NCC) para estabilização de sistemas coloidais biomiméticos baseado em emulsões nanoestruturadas para transporte transepitelial de fármacos e a aplicação em nanocomplexos de alginato e anfotericina

Objetivos Específicos

- Produzir por hidrólise enzimática nanocristais de celulose bacteriana,
- Caracterizar os nanocristais por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), Volume hidrodinâmico, potencial zeta, índice de polidispersidade por Espalhamento dinâmico de luz, microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e microscopia eletrônica de varredura (MEV),
- Produzir e caracterizar os sistemas nanoestruturados baseados em emulsão,
- Avaliar o comportamento de adsorção dos nanocristais na interface do sistema nanoestruturado e a estabilidade do sistema,
- Avaliar o efeito do tempo de contato dos nanocristais na superfície das partículas,
- Produzir nanocomplexos de alginato com anfotericina
- Recobrir os nanocomplexos com nanocristais de celulose bacteriana (NCC)
- Caracterizar os nanocomplexos por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), Volume hidrodinâmico, potencial zeta, índice de polidispersidade por Espalhamento dinâmico de luz, microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectrometria UV-vis, hemólise e citotoxicidade.

CAPÍTULO I: BACTERIAL NANOCELLULOSE CRYSTALS AND PICKERING EMULSIONS: SUSTAINABLE PRODUCTION, APPLICATIONS AND LIMITATIONS

Abstract

Emulsions are colloidal systems formed by immiscible liquids in the presence of surfactants. The disadvantages of surfactants is their adverse effects (irritation and hemolysis) such as environmental problems and alter the pharmacokinetics of the emulsified drug. The Pickering emulsion is an ecological option which uses particle-stabilized system that prevents the emulsion from coalescing and can be applied in the pharmaceutical and food sectors. Bacterial cellulose is a biopolymer produced by microorganisms. It has a good cost-benefit, high purity and crystallinity, and because of these proprieties, can be applied in several areas. Bacterial production of cellulose eliminates the step of removing lignin and hemicellulose, making the product more environmentally friendly. From bacterial cellulose it is possible to produce cellulose nanocrystals (NCC), which are rigid, rod-shaped particles with a good mechanical resistance, large surface area and low toxicity. The nanocrystals (NCC) can be produced in several ways, among them by acidic or enzymatic hydrolysis, and the use of acids generates environmental residues; the production of NCC by enzymatic hydrolysis is still poorly studied. In this review, we will address the characteristics, advantages and disadvantages of the conventional emulsion compared to the Pickering emulsion; and demonstrate the NCC characteristics, production methods and application in the pharmaceutical, food and materials engineering industries, highlighting the importance of systems and research in this field. The use of NCC has been growing, however the methodology applied for their production is restricted to acid hydrolysis. This review brings a possibility of utilizing NCC by enzymatic hydrolysis. Furthermore, the NCC by enzymatic hydrolysis is an attractive idea in the development of emulsified formulations, since they can replace chemical surfactants and give the product an ecological stamp of manufacturing production. This increases the pharmacotechnics and biopharmaceuticals advantages compared to the conventional emulsions.

Keywords: Emulsion. Pickering Emulsion. Bacterial Cellulose. Nanocrystals.

Introduction

Two-phase or three-phase systems composed of immiscible liquids have a high potential for free energy and are called emulsions. To avoid flocculation and phase separation, these systems are generally stabilized by surfactants (primary and secondary) and viscosifiers, respectively. However, the surfactants present in the emulsified system have undesirable adverse effects, and their by-products cause environmental problems (MORAIS et al., 2018; SOUSA et al., 2017; WANG et al., 2017; YI et al., 2017).

The Pickering emulsion is a surfactant-free system, stabilized through particles, classified as a colloidal system and an alternative to the use of surfactant from conventional emulsions (SY et al., 2018; ZHANG et al., 2018).

Cellulose is a very important biopolymer due to its raw material being almost inexhaustible, as it is produced by several organisms, including plants, fungi, protozoa and bacteria (GORGIEVA; TRČEK, 2019; KLEMM et al., 2011; RUKA; SIMON; DEAN, 2012; ZHONG et al., 2013). But the bacterial cellulose has advantages over others because it does not contain impurities such as lignin, pectin and hemicellulose. The species of choice for the production in research and applications in the health area, due to its higher yield, purity and viability is *Komagataeibacter xylinus* (ex-*Gluconacetobacter xylinus*)(AZEREDO et al., 2019; DUGAN; GOUGH; EICHHORN, 2013).

As it has multiple applications, bacterial cellulose becomes an attraction for obtaining nanomaterials. One of these materials is nanocrystals (NCC), which are broken fibers with acicular semicrystalline domains and considered ecologically friendly nanomaterials because of the renewable nature of the raw material (GEORGE et al., 2011; KLEMM et al., 2011; ROVERA et al., 2018).

NCC are used as reinforcement material, protecting the system and enabling the administration of the drug by different routes (LEE; CHENG, 2006; YAN et al., 2019). Therefore, they become attractive in the development of emulsified formulations, since they can replace chemical surfactants. Being able to increase the pharmacotechnical and biopharmaceuticals advantages when compared to conventional emulsions (AKHLAGHI; BERRY; TAM, 2013).

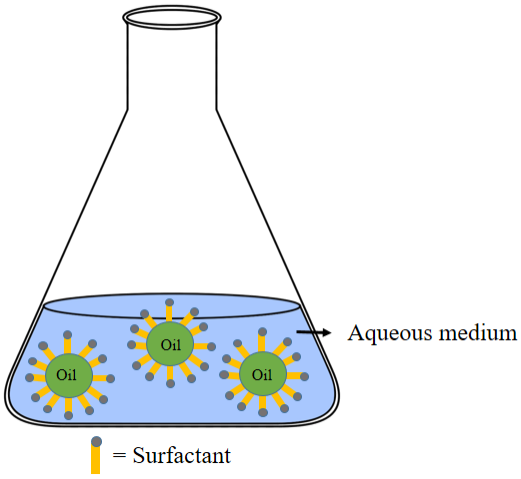
This review aims to discuss the pickering emulsion and bacterial cellulose nanocrystals their production, applications, and limitations.

Emulsion

Emulsions are immiscible liquid systems stabilized by surfactants, forming simple (oil/water or water/oil) or multiple (water/oil/water or oil /water/oil) systems (MORAIS et al., 2018; SOUSA et al., 2017).

The role of the surfactant in the system is to reduce the surface tension between the oil and the water phase, stabilizing the dispersed phase in the dispersing phase (Figure 1) which can be classified as cationic, anionic, non-ionic and amphoteric. The choice of surfactant is important as it stabilizes the system (SHARMA; MADAN; LIN, 2016).

Figure 1 – Scheme of the classic oil/water emulsion



In the pharmaceutical area, the parameters of size, distribution of drops, viscosity and interactions between the formulation and the drug are the most important, because through them the system stability is evaluated before the incorporation and release of the drugs (MORAIS et al., 2018; SOUSA et al., 2017).

The advantages of an emulsified system are: solubilize hydrophobic or oil-soluble drugs, control drug release, increase drug absorption, mask the taste and odor of active substances, increasing the palatability of the final product (KALE; DEORE, 2017).

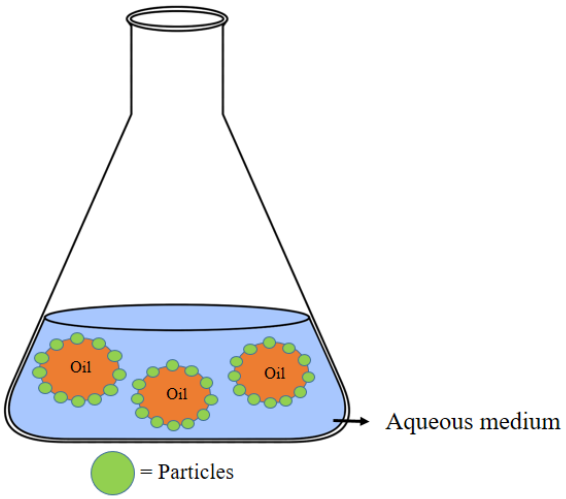
The disadvantages of conventional emulsions refer to the use of surfactants in the formulation, as they have adverse effects (irritation and hemolysis), their by-products cause environmental problems and alter the pharmacokinetics of the emulsified drug (WANG et al., 2017; YI et al., 2017).

Pickering emulsion

The Pickering emulsion is a surfactant-free system. In the Pickering emulsion, the stabilization of the O/W system is achieved with the use of hydrodispersible micro or nano particles that are irreversibly adsorbed at the interface (MARTINS et al., 2020; SY et al., 2018; ZHANG et al., 2018).

The stability of the system occurs due to the high energy of adsorption of the particles at the oil/water interface, forming a barrier that prevents coalescence of the dispersed phase (Figure 2). Another critical factor is the surface charges on the particles, formed by the dissociation of ionogenic groups and the differential ion adsorption of the solution. The net charge on the particle surface affects the ion distribution in its vicinity, increasing the concentration of counter ions giving rise to the zeta potential (ARAIZA-CALAHORRA et al., 2017; LAREDJ-BOUREZG et al., 2017; WANG et al., 2017).

Figure 2 - Illustration of the oil/water Pickering emulsion



The angle of contact of the particles with the oil / water or water / oil interface is important because it will define the type of emulsion to be formed. The hydrophilic particles will form an O/W emulsion and the hydrophobic W/O emulsion. Other parameters of the formulation, such as size and number of particles, percentage of oil phase and pH, can also change the emulsion (SY et al., 2018).

The particles must have an adequate biological safety profile and the ability to stabilize the system. Different types of particles (both natural and synthetic) have been applied, such as puerarin nanocrystals, chitosan, silicas, whey protein, starch, clays or the

drug's own nanocrystals to make systems self-stabilized (ELMOTASEM; FARAG; SALAMA, 2018; YI et al., 2017; ZHANG et al., 2018).

The advantages of the Pickering emulsion are: good physical stability, high resistance to coalescence, reduces damage to the environment, low cost-benefit, good reproducibility, easy scaling, increased bioavailability of the drug, reduced toxicity, use of different routes of administration , such as oral, ocular, dermal and protection against lipid pro-oxidizing agents in O/W system (LAREDJ-BOUREZG et al., 2017; WANG et al., 2017; YI et al., 2017).

A recurrent problem in the pharmaceutical area is the bioavailability of drugs limited by low water solubility and transepithelial permeability. With this technology, it is possible to increase bioavailability, modulate the release and / or permeation and to increase the physical-chemical and pre-absorptive stability of the drug. This group includes drugs from all SCB groups, including macromolecules (ELMOTASEM; FARAG; SALAMA, 2018; WANG et al., 2017; ZHANG et al., 2018).

Bacterial nanocrystals can be used in Pickering emulsions, as they are sustainable materials with versatility in size and shape. However, there are few studies related to drugs, which aroused interest in our research group (KALASHNIKOVA et al., 2013).

This novel drug-loading technique with high efficiency and sustained-releasing performance combined biocompatible BCNs with natural alginate

Bacterial cellulose

Bacterial cellulose is a biopolymer that has the same molecular structure as cellulose derived from plants, however it is obtained by fermentation of microorganisms and has more advantages, among them, high purity, higher degree of polymerization, high crystallinity and improved mechanical properties (GEORGE et al., 2011; GEORGE; SIDDARAMAIAH, 2012).

Membranes are produced from microorganisms of the genera *Acetobacter, Rhizobium, Agrobacterium, Aerobacter, Achromobacter Azotobacter, Salmonella, Escherichia* and *Sarcina* as a way for survive (SULAEVA et al., 2015).

Komagataeibacter xylinus (ex-*Gluconacetobacter xylinus*) is a Gram-negative bacterium that synthesizes and excretes bacterial cellulose fibers in a random manner, forming three-dimensional structures (NAGASHIMA; TSUJI; KONDO, 2016; YAMADA et al., 2012).

The most advantageous properties of cellulose membranes are: excellent tensile strength, elasticity, durability, biodegradability, high retention capacity and water absorption (99% of their weight). Due to the composition of the material in micro and nanofibers, it is non-toxic and non-allergenic (WU et al., 2016).

Bacterial cellulose is a product with a wide variety of applications in several areas of knowledge and because of its better cost-benefit, it is possible to explore the properties and applications of the material in the industry (BERNDT et al., 2013; DE OLYVEIRA et al., 2011; JOZALA et al., 2016). The main areas where bacterial cellulose can be used are in the textile, paper, food, pharmaceutical products, waste treatment, mining, refineries, among others (JOZALA et al., 2016).

With the control of the biofabrication process it is possible to vary the scale of the product, changing the structures from nano to macro. This is the main advantage so that the material can be applied in the field of biotechnology (QIU; NETRAVALI, 2014).

The application of bacterial cellulose in medical areas is due to its physical and biological properties, and can be used in the treatment of wounds and tissue engineering, replacing the skin, blood vessels, cornea, urethra, cartilage, artificial menisci and heart valves (FU et al., 2012; QIU et al., 2016).

Bacterial cellulose membranes can also be applied for the development of plastic materials, mainly as structural reinforcement of materials. This is possible thanks to its linear structure made of glucose, presenting high purity and crystallinity (between 60 to 90%), which allows the polymerization of the material (DE OLYVEIRA et al., 2011; QIU et al., 2016).

Bacterial cellulose nanocrystals

Cellulose nanocrystals, also known as nanowhiskers or nanofibers, are rigid rod-shaped particles, with cellulose chain segments, but with an almost perfect crystalline structure (HABIBI; LUCIA; ROJAS, 2010) and have good mechanical resistance, large surface area, low toxicity, and wide application (GEORGE; SABAPATHI, 2015).

According to Domingues et al. (2016), cellulose nanocrystals have different topological characteristics and charge densities according to the type of hydrolysis and the raw material used (vegetable or bacterial cellulose). Cellulose nanocrystals can be isolated by various treatments, including chemical, enzymatic or mechanical. The result

is needle-shaped nanostructures, making it an ideal surface for attaching various biomolecules (PIRICH et al., 2017).

Nanocrystals prepared with bacterial cellulose are of interest because of their renewable and sustainable origin. It is a cost-effective material with good biocompatibility and biodegradability (GEORGE et al., 2011; YAN et al., 2018a).

Although there is a lot of research on cellulose nanocrystals, when it comes to raw material derived from bacteria the data is still vague. An in-depth study is needed with more information on the influence of different fiber characteristics on the properties of nanocrystals (REINIATI; HRYMAK; MARGARITIS, 2017).

Obtaining bacterial cellulose nanocrystals

Currently, the two main techniques used to obtain bacterial cellulose nanocrystals are by acid hydrolysis and enzymatic hydrolysis.

Acid hydrolysis treatment is the most common methodology for obtaining bacterial cellulose nanocrystals. Hydrogen ions (H +) are able to diffuse between cellulose molecules and promote the breakdown of glycosidic bonds (VASCONCELOS et al., 2017).

The determinant parameters in the hydrolysis of nanocrystals are related to the concentration of acid, the type of acid, the cellulose / acid ratio, temperature and hydrolysis time. The difference in these parameters interferes with the structure, morphology and properties of the product (MARTÍNEZ-SANZ; LOPEZ-RUBIO; LAGARON, 2011; VASCONCELOS et al., 2017).

One of the methodologies for the production of nanocrystals uses bacterial cellulose ground in the laboratory, kept in the form of long fibers. Then, the material is subjected to a hydrolysis process with inorganic acids such as sulfuric acid and hydrochloric acid, in order to break the crystalline regions (more resistant) and obtain rod-shaped nanocrystals (GEORGE et al., 2014; PIRICH et al., 2017; VASCONCELOS et al., 2017).

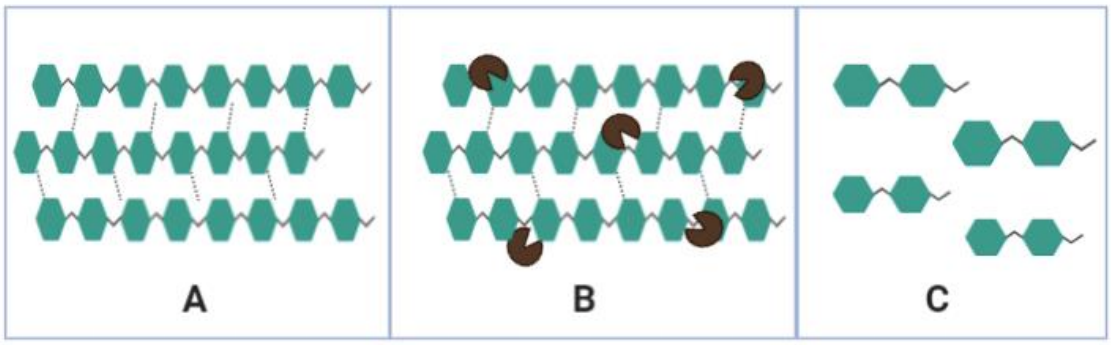
The length of the cellulose nanocrystals decreases according to the elapsed time of hydrolysis, increasing the crystallinity of the material. Regarding neutralization, the samples improved the thermostable characteristics and increased the crystallinity. In the face of dialysis, the material showed no improvement (MARTÍNEZ-SANZ; LOPEZ-RUBIO; LAGARON, 2011).

Vasconcelos et al. (2017) analysed the influence of the type of acid, concentration and reaction time on the morphology, crystallinity and thermal stability in the process of obtaining cellulose nanocrystals and showed that the difference in parameters influences the physical properties of the nanostructures, however the size of the nanocrystals was not changed.

The enzymatic process is considered cleaner and ecological because it does not generate residues to the environment besides maintaining the native properties of cellulose, being an alternative to obtain nanocrystals. The enzymatic methodology is more ecological process than the traditional method (which uses concentrated acids for hydrolysis)(GEORGE et al., 2011).

The enzyme most used for the production of nanocrystals are cellulolytic enzymes (cellulases), which have systems composed of endo-1,4-β-d-glucanases (endoglucanases), exo-1,4-β-d-glucanases (cellobiohydrolases) and 1,4-β-d-glucosidases. They have wide accessibility to bacterial cellulose (Figure 3A), which is possible thanks to the structural characteristics of the matrix, where the enzymes are able to penetrate evenly (Figure 3B), hydrolyzing the bonds (Figure 3C) (DOMINGUES et al., 2016; IOELOVICH, 2014).

Figure 3 – Representation of enzymatic hydrolysis of bacterial cellulose to obtain nanocrystals



Note: (a) Bacterial celllose; (b) Enzyme hydrolyzing the material; (c) Bacterial cellulose nanocrystals.

George et al. (2011) were one of the pioneers to use commercial cellulase in bacterial cellulose. The authors aimed to produce cellulose nanocrystals with the control of pH, temperature and time, in addition to comparing them with nanocrystals obtained by acid hydrolysis. The studies indicated that the nanocrystals obtained from enzymatic hydrolysis after 12 hours, obtained from 100 to 300 nm in length and diameter of 10-15

nm. Regarding thermal stability and mechanical properties, the material showed an improvement in these parameters compared to the traditional method.

Ioelovich (2014) studied the enzymatic hydrolysis of bacterial celluloses and microcrystalline cellulose (derived from cotton) to compare the structural characteristics of both. The author described that although the degree of crystallinity of the tested samples is similar, the degree of conversion of bacterial cellulose nanocrystals was higher than microcrystalline cellulose due to the porosity and nanostructured surface of the material.

Applications

Due to the nanoscale dimension, NCC have application in several areas of knowledge, including tissue engineering (YAN et al., 2018a) and in the pharmaceutical industry (KALASHNIKOVA et al., 2013), food industry and nanocomposites (GEORGE; SIDDARAMAIAH, 2012).

In the pharmaceutical area, Kalashnikova et al. (2011) carried out studies with nanocrystals of pure bacterial cellulose, without desulfation, modification or addition of surfactants in order to stabilize emulsions composed of hexadecane, obtaining stable nanoparticles for months, proving the theory that bacterial cellulose nanocrystals without modifications are capable of stabilizing an oil emulsion -irreversibly water. The coverage with nanocrystals increased the measure of sample addition, reaching the limit of 100% coverage. However, the emulsions obtained did not support centrifugation, where the droplets were deformed.

In the 2011 studies, Kalashnikova et al. suggested comparing the stabilization of emulsions with nanocrystals from different sources. In 2013, the authors published a work with this proposal where they used the following raw materials: bacterial cellulose, green algae and cotton. Regardless of the origin of the nanocrystals, the three samples managed to attach to the oil-water interface (KALASHNIKOVA et al., 2013).

Yan et al., (2017) carried out a study where they evaluated the emulsifying potential of cellulose nanocrystals and bacterial cellulose in Pickering emulsions to stabilize olive oil, which directs the subject to the food area. Both bacterial cellulose and nanocrystals derived from it were able to adsorb on the oil-water interface of the oil, resisting coalescence. However, due to sensitivity to pH and ionic strength, nanocrystals showed better application in the system.

Canthaxanthin is a pigment with high oxidizing activity of great interest in the pharmaceutical and food sectors. Hedjazi and Razavi (2018) carried out a study where they used cellulose nanocrystals (bacterial and cotton) to stabilize canthaxanthin emulsions. The authors identified an increase in the stability of the emulsion due to the increase in temperature generated by the increase in strength between nanocrystals. However, the plant cellulose nanocrystals showed better stability compared to that of bacterial origin due to the size of the nanocrystals, poor coverage and the “bridge” effect.

Conclusion

The Pickering emulsion are systems stabilized by particles, being widely explored in the literature in several areas of knowledge. The use of bacterial cellulose nanocrystals has been growing in this area, however the methodology applied for their production is restricted to acid hydrolysis, which causes damage to the environment.

Therefore, for future work, it is expected that the enzymatic methodology is explored, which besides being more ecological than the acid methodology, brings advantages to the system, as it maintains the native properties of bacterial cellulose.

CAPÍTULO II: OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Resumo

A produção dos nanocristais pode ser realizada de diversas maneiras, entre elas por hidrólise ácida ou enzimática, sendo que a utilização de ácidos geram resíduos e não mantém a estrutura nativa da celulose; já a produção de NCC por hidrólise enzimática ainda é pouco estudada. Neste trabalho, foi realizada a produção de nanocristais de celulose bacteriana através de hidrólise enzimática, caracterizando e avaliando a melhor metodologia. Para tanto, as amostras variaram o tempo de hidrólise enzimática (48 e 72 horas), as operações unitárias (duas ou três centrifugações) e o tipo de metodologia (I – ultra-turrax e filtração de 450 nm; II – homogeneizador de alta pressão e filtração de 220 nm). Os grupos foram mantidos a 8ºC e analisados nos dias 0, 4, 7 e 21 tendo como parâmetros avaliados: tamanho, índice de polidispersidade (PDI) e potencial zeta. Nas melhores amostras, foi realizado o teste de NTA. Os resultados demonstraram que os NCC da terceira centrifugação, com 72 horas de hidrólise foram menores em relação a tamanho, PDI e potencial zeta. A metodologia II melhorou a estabilidade e tornando-a mais homogênea. Portanto, a hidrólise enzimática é uma alternativa para produção de NCC a partir de celulose bacteriana, sendo o tratamento mecânico e as operações unitárias são fundamentais na construção do processo do material.

Palavras-chave: Bacterial cellulose. Nanocrystals. Enzyme. Stability.

Introdução

A celulose bacteriana é um biopolímero que apresenta a mesma estrutura molecular da celulose derivada das plantas, porém é obtida através da fermentação de microrganismo e possui mais vantagens, entre elas, alta pureza, maior grau de polimerização, alta cristalinidade e propriedades mecânicas melhoradas (DUGAN; GOUGH; EICHHORN, 2013).

Com o controle do processo de biofabricação é possível variar a escala do produto, alterando as estruturas de nano até macro. Ao alterar os parâmetros, é possível obter partículas rígidas em formato de haste, denominados nanocristais de celulose (NCC) (HABIBI; LUCIA; ROJAS, 2010; QIU; NETRAVALI, 2014).

Os NCC possuem segmentos de cadeia de celulose, porém com uma estrutura cristalina quase perfeita e apresentam uma boa resistência mecânica, grande área de superfície, baixa toxicidade, e ampla aplicação. Trata-se de um material de um baixo custo e com boa biocompatibilidade e biodegradabilidade, renovável e sustentável por ser derivado da celulose bacteriana (GEORGE; SABAPATHI, 2015; YAN et al., 2018b).

As metodologias de produção dos NCC podem utilizar diferentes tratamentos, entre eles químicos, enzimáticos ou mecânicos (DUGAN; GOUGH; EICHHORN, 2013), podendo ser aplicados na indústria alimentícia (GEORGE et al., 2014), em nanotecnologia (PIRICH et al., 2017) e indústria farmacêutica(YAN et al., 2018b).

O processo enzimático é considerado eco-friendy pois não gera resíduos ao meio ambiente além de manter as propriedades nativas da celulose, como estrutura e estabilidade térmica, sendo uma alternativa para a obtenção dos nanocristais. Neste processo, são utilizados enzimas capazes de degradar a celulose (GEORGE et al., 2011).

Embora haja pesquisas em torno dos nanocristais de celulose, quando se trata da matéria-prima derivada de bactéria e empregando a hidrólise enzimática, os dados ainda são vagos. É necessário um estudo aprofundado com mais informações sobre a influência de diferentes parâmetros nas propriedades dos nanocristais. Portanto, o objetivo do trabalho foi obter nanocristais por hidrólise enzimática, alterando as operações unitários do processo afim de obter a melhor estabilidade do sistema.

Metodologia

Produção da celulose bacteriana

As celuloses bacterianas foram produzidas utilizando a bactéria *Komagataeibacter xylinus* (ATCC 53582), cultivada em meio *Hestrin&Schramm* (20 g/L glicose, 5 g/L peptona bacteriológica, 5 g/L extrato de levedura, 2,7 g/L Fosfato de sódio anidro; 1,5 g/L ácido cítrico monohidratado). O crescimento bacteriano foi realizado em Erlenmeyers de 125 mL com o volume de 50 mL de inóculo (10^6 UFC/mL) (JOZALA et al., 2014).

Os Erlenmeyers foram mantidos em repouso em estufa a 30ºC por 15 dias. As celuloses foram retiradas, lavadas e passaram pela etapa de branqueamento, com solução de hidróxido de sódio a 1 M. A celulose bacteriana foi mantido em agitador com barra magnética por uma hora e trinta minutos a 60ºC e foram enxaguadas até atingirem pH 7,0. O material foi armazenado em frascos com tampa contendo água ultrapura e posteriormente esterilizado à 121ºC por 15 minutos.

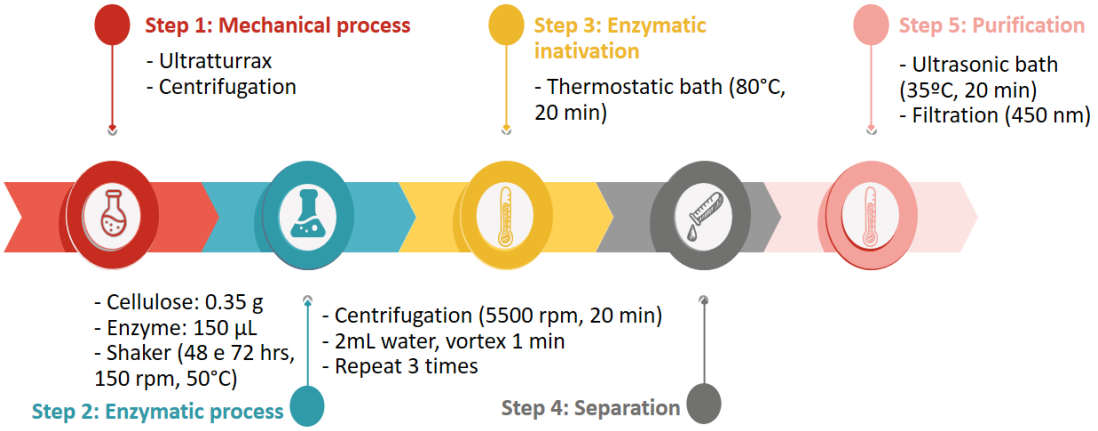
Produção dos NCC

A produção das NCC foi dividida em 2 metodologias, uma em complementação a outra. A primeira metodologia aplicada foi dividida em 5 etapas e a segunda metodologia foi realizada após a coleta dos resultados da primeira, onde foi modificada duas etapas.

Metodologia I: Produção em 5 etapas

A primeira metodologia aplicada para produção de nanocristais foi realizada em 5 etapas, como mostra a figura 1.

Figura 1 – Metodologia I para produção de nanocristais de celulose bacteriana (NCC)



Na primeira etapa foi realizado um processo mecânico com o equipamento ultra-turrax (IKA T25 digital) (12.500 rpm por 5 minutos – 3 vezes). O material foi centrifugado a 5500 rpm por 20 minutos e o corpo de fundo, massa de celulose, foi separado para a hidrólise enzimática.

Na segunda etapa, constituída pelo processo enzimático, 0,35g do corpo de fundo, com 99% de umidade determinado por balança de umidade foi disposto em um tubo tipo Falcon de 15 mL, adicionou-se 1 mL de solução tampão acetato (0,1 M, pH 5) e por fim 150 µL da celulase. Os tubos foram mantidos em agitador orbital com incubadora em 150 rpm a 50ºC por 48 e 72 horas.

Na terceira etapa, as amostras foram submetidas a inativação enzimática em banho termostático a 80ºC durante 20 minutos. Após o período determinado, adicionou-se 1 mL de água ultra purificada.

A quarta etapa foi composta por três centrifugações mantendo os parâmetros de 5500 rpm por 20 minutos. Após a primeira centrifugação, os sobrenadantes das amostras foram descartados, e aos corpos de fundo foram adicionados 2 mL de água ultra purificada e homogeneizados em vórtex por 1 minuto. As amostras foram centrifugadas pela segunda vez, sendo os sobrenadantes coletados e nomeados como amostras C. Novamente, 2 mL de água ultra purificada foi adicionada aos corpos de fundo. As amostras foram homogeneizadas em vórtex por 1 minuto e centrifugadas pela terceira vez. Os sobrenadantes foram coletados e nomeados como amostras E.

Na quinta etapa, as amostras C e E foram mantidas em banho ultrassônico por 20 minutos a 35ºC. Após o período, o material foi filtrado em filtro de PTFE de 450 nm e armazenado em tubos tipo eppendorf de 2 mL a 8°C por 21 dias.

Metodologia II: Produção com homogeneizador de alta pressão e filtração

A segunda metodologia para produção das NCC foi desenvolvida após coleta dos resultados da primeira metodologia, com modificação em duas operações unitárias do processo. Na etapa 1, após o tratamento mecânico por ultra trituração, a amostra foi submetida ao homogeneizador de alta pressão (Homo lab 2.20 FBF Italia) em 1400 bars, em dois ciclos. E na etapa 5, o filtro de 450 nm foi substituído por um filtro de 220 nm. Estas modificações foram realizadas afim de diminuir o tamanho e a aglomeração dos NCC, melhorando a estabilidade dos mesmos sem a utilização de conservantes nas amostras.

Análise do parâmetro de produção dos NCC

A análise do tempo de ação enzimática para produção dos NCC foi monitorada pela glicose liberada, valor de pH do processo e conversão da celulose em NCC. A glicose foi determinada por ensaio enzimático Sigma Glucose (GO) Assay Kit.

Caracterização dos NCC

A caracterização foi realizada para avaliar o tamanho, a polidispersidade e o potencial zeta pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) utilizando o equipamento BrookHaven – NanoBrook plus, em um ângulo de 90º a 25°C. As leituras foram realizadas nos tempos 0, 4, 7 e 21 dias para verificar o comportamento com relação a estabilidade, pois os NCC podem sofrer na variação de tamanho, degradação ou aglomerar ao longo do tempo. Nessas análises, as amostras foram diluídas na razão de 1:10 com água purificada em triplicata.

Já para NTA, foram caracterizadas somente as amostras da segunda parte do ensaio. O equipamento (NTA nanotech analyses) realizou a leitura de 1 mL das amostras diluídas na razão de 1:100.

As melhores amostras foram selecionadas e caracterizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). Para o MEV, o material foi diluído na proporção de 1:100. Foi adicionado encima da fita carbono, seco em estuda a 50°C por 2 horas e analisado no equipamento FEI Quanta 650 FEG.

Na análise de TEM, foi diluído 20 µL da amostra em 80 µL em água ultrapura. O material foi homogeneizado em vortex, ultrassonicado e 3 a 5 gotas de amostras foram colocadas na grade de carbono com um papel filtro.

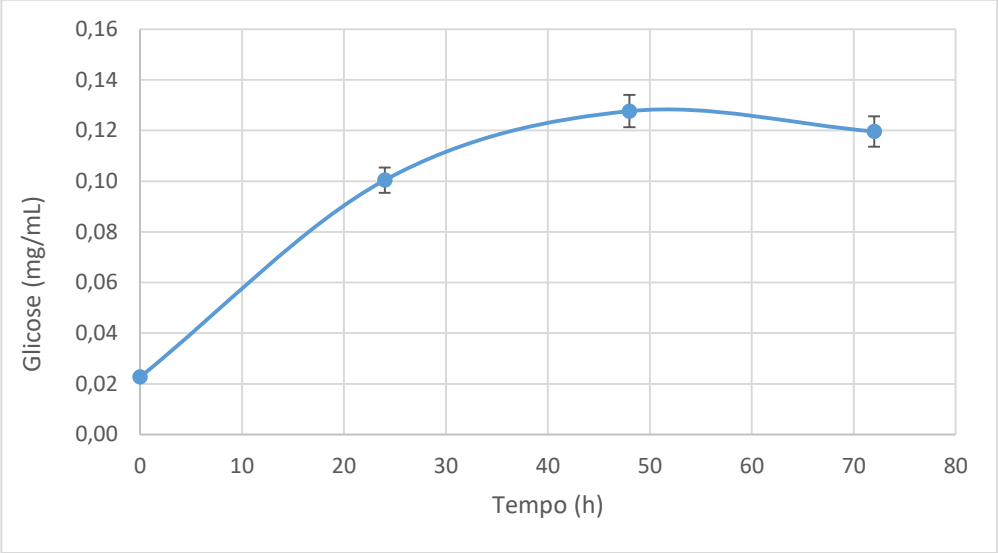
Resultados e discussão

Afim de indicar qual foi a melhor metodologia aplicada para produção de NCC por hidrolise enzimática, os resultados foram apresentados pela liberação de glicose no meio, caracterizações das amostras (tamanho, índice de polidispersidade e potencial zeta) com relação a sua estabilidade. Os parâmetros comparados foram: tempo de hidrólise (48 ou 72 horas), número de centrifugações (C – duas centrifugações e E – três centrifugações) e metodologia aplicada (I ou II).

Liberação de glicose dos NCC

A figura 2 representa a quantidade de glicose liberada no meio a partir da hidrolise enzimática sobre a celulose bacteriana.

Figura 2 – Curva da glicose liberada nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas



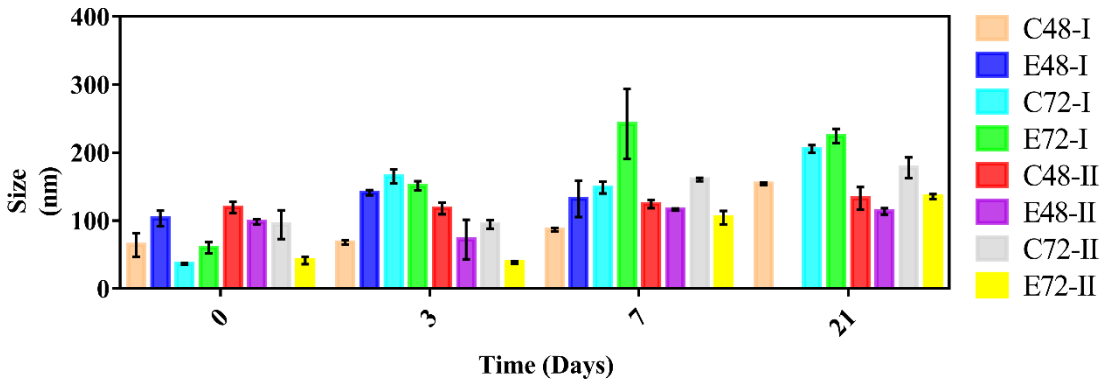
Podemos observar que entre 0 horas a 24 horas a massa de glicose aumentou 5 vezes, chegando a 0,1 mg/mL, pH 5. De 24 horas até 48h houve um aumento pequeno,

atingindo 0,12 mg/mL, pH 5. Esse valor se manteve até 72h. Por esta razão, utilizamos nas análises de caracterização as amostras contendo os NCC produzidos entre 48h e 72h.

Caracterização do tamanho dos NCC

Os resultados do tamanho das amostras foram apresentados na figura 3, comparando os valores durante 21 dias.

Figura 3 – Caracterização de tamanho das amostras de NCC produzidas em diferentes processos e avaliadas em no período de 0, 3, 7 e 21 dias.



Nota: Amostra C – duas centrifugações Amostra E – três centrifugações; Amostra 48 – 48 horas de hidrólise, Amostra 72 – 72 horas de hidrólise; Amostra I – ultra-turrax e filtração de 450 nm; Amostra II – homogeneizador de alta pressão e filtração de 220 nm.

Com relação ao tempo de estoque das amostras, podemos observar que o tamanho dos NCC variaram entre 36,9 ± 1,4 e 242,18 ± 51,5 nm, do primeiro ao vigésimo primeiro dia, sendo que todas as amostras apresentaram um aumento no valor de 4,1 a 303 % a partir do terceiro dia. De acordo com George et al., 2011, os NCC produzidos por hidrólise enzimática apresentam tamanhos entre 100-300 nm, portanto os nossos valores são compatíveis com o dado da literatura.

Podemos observar que as amostras de NCC hidrolisadas por 48 horas apresentaram e mantiveram o tamanho entre 64,59 ± 17,35 nm e 154,59 ± 2 nm durante os 21 dias de experimento. As amostras de 72 horas apresentaram valores entre 36,9 ± 1,35 nm e 242,18 ± 51,5 nm. No tempo de 72 horas houve uma diminuição do tamanho dos NCC, porém a variação de tamanho é menor no tempo 48 horas. Isto demostra que o fator tempo de hidrólise pode influenciar no parâmetro tamanho dos NCC.

KAFLE et al., 2015 analisou o tempo de hidrólise enzimática e observou que está diretamente ligado ao tamanho dos NCC. Portanto o tempo de reação é um parâmetro importante na metodologia de obtenção dos NCC, mas não um fator que irá interferir na estabilidade do tamanho.

Ao avaliar o número de centrifugações aplicado na obtenção das NCC (duas - C ou três - E) durante todo o teste, não é possível identificar mudanças no tamanho dos NCC, sendo que o tamanho variou de 36,9 ± 1,35 nm e 205,54 ± 5,79 nm para C e 38,67 ± 1,73 nm e 224,57 ± 10,49 nm para E. Porém, as amostras E48-II e E72-II apresentaram uma diminuição no parâmetro tamanho de 6,9 a 144,92 % durante os 21 dias de teste. Portanto, ao associar o tratamento mecânico, filtração e três centrifugações, é possível obter NCC com menor tamanho e maior estabilidade.

Empregando a metodologia I (sem homogeneizador e filtração) obteve-se NCC entre 36,9 ± 1,35 e 224,57 ± 10,49. Ao adicionar as operações unitárias (metodologia II), os valores variaram de 38,67 ± 1,73 e 177,8 ± 15,25. Assim, podemos observar que a adição das etapas influenciaram diretamente o tamanho dos NCC.

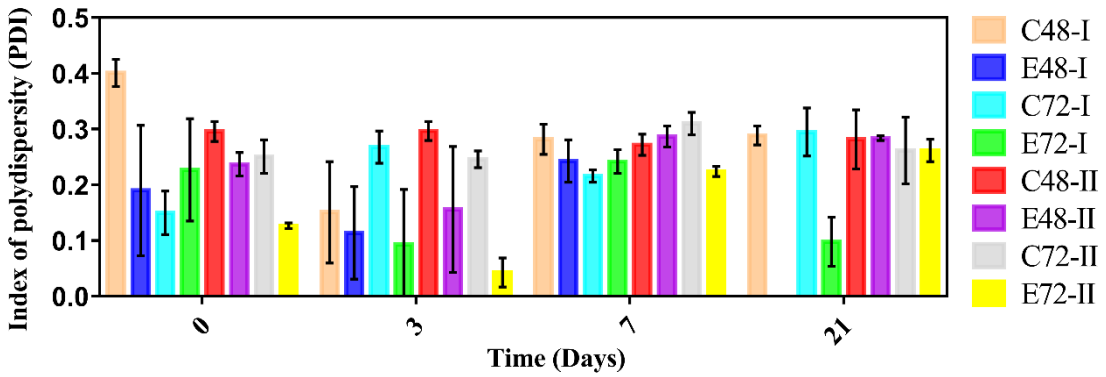
CHAUVE; FRASCHINI; JEAN, 2014 incluiram etapas de centrifugação e filtração com o objetivo de remover aglomerados na amostra final de NCC. Porém sua aplicação é restrita a hidrólise ácida e NCC de origem vegetal.

Em nossos estudos, foi possível afirmar que as operações unitárias, também são fundamentais para obter NCC de origem bacteriana menores e mais estáveis.

Caracterização do PDI dos NCC

Na figura 4, foram apresentados os resultados do índice de polidispersidade das amostras em relação a estabilidade durante 21 dias.

Figura 4 – Índice de polidispersidade (PDI) das amostras de NCC produzidas em diferentes processos e avaliadas em no período de 0, 3, 7 e 21 dias.



Nota: Amostra C – duas centrifugações Amostra E – três centrifugações; Amostra 48 – 48 horas de hidrólise, Amostra 72 – 72 horas de hidrólise; Amostra I – ultra-turrax e filtração de 450 nm; Amostra II – homogeneizador de alta pressão e filtração de 220 nm.

A figura 2 mostra os resultado do teste de índice de polidispersidade (PDI) das amostras de NCC. Podemos observar que os dados variaram entre 0,043 ± 0,026 e 0,401 ± 0,024 durante os 21 dias de teste, sendo que todas as amostras apresentaram uma valor mais estável a partir do dia 7.

Em relação ao tempo de hidrólise, os valores de PDI de 48 horas foram maiores do que do que as amostras de 72 horas. Os valores variaram durante todo o experimento entre 0,114 ± 0,083 e 0,401 ± 0,024 para 42 horas; 0,043 ± 0,026 e 0,295 ± 0,043 para 72 horas. Portanto, ao aumentar o tempo de hidrólise, é possível obter u m menor índice de polidispersidade das amostras.

Yan et al. (2017) analisou o PDI antes e depois da hidrólise da celulose bacteriana e o valor alterou de 0,41 para 0,25. Embora a metodologia empregada no estudo foi a hidrólise ácida, é importante a realização da etapa de hidrólise para diminuir os valores de PDI.

O fator número de centrifugações (C – duas e E – três) foi um parâmetro relevante para os valores de PDI. A variação do PDI durante os 21 dias para amostras C foi de 0,15 ± 0,039 e 0,401 ± 0,024; e para as amostras E foi de 0,043 ± 0,026 e 0,287 ± 0,019. Isto representa a formação de populações uniformes de NCC ao utilizar três centrifugações na metodologia.

As amostras realizadas sem homogeneização e filtração (metodologia I) apresentaram valores entre 0,114 ± 0,083 e 0,401 ± 0,024 durante todo o ensaio. Os

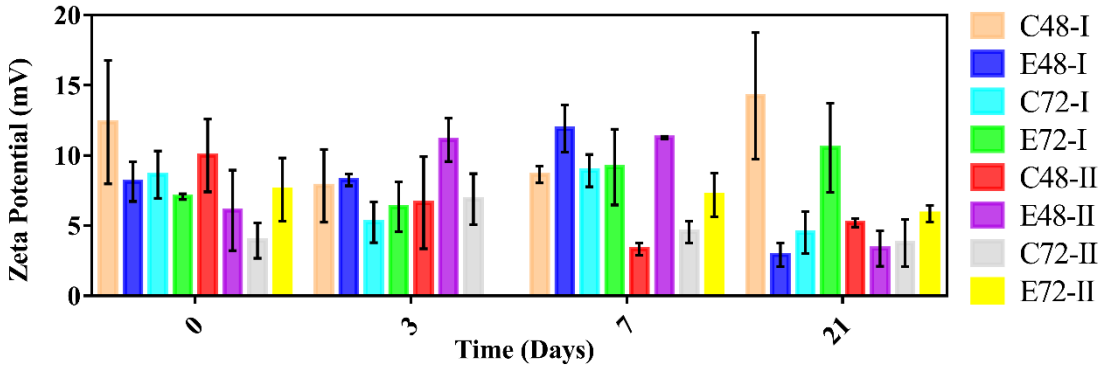
valores das amostras com a adição das operações unitárias (metodologia II) foram entre 0,043 ± 0,026 e 0,297 ± 0,017. Portanto, a metodologia II demonstrou menores valores de PDI, variação entre os dados e desvio padrão das amostras.

O PDI determina o grau de uniformidade das amostras. Há trabalhos na literatura que utilizaram filtração, centrifugação ou ultracentrifugação afim de diminuir a heterogeneidade dos NCC e concluíram que, assim como no nosso trabalho, essas operações unitárias são capazes deixar as amostras mais uniformes e com um menor índice de polidispersidade (BAI; HOLBERY; LI, 2009; CHAUVE; FRASCHINI; JEAN, 2014; DANAEI et al., 2018; ELAZZOUZI-HAFRAOUI et al., 2008).

Caracterização do potencial zeta dos NCC

O gráfico exposto na figura 5 contém os resultados do teste de potencial zeta das amostras de NCC que foram comparados durante 21 dias.

Figura 5 – Potencial zeta das amostras de NCC produzidas em diferentes processos e avaliadas em no período de 0, 3, 7 e 21 dias.



Nota: Amostra C – duas centrifugações Amostra E – três centrifugações; Amostra 48 – 48 horas de hidrólise, Amostra 72 – 72 horas de hidrólise; Amostra I – ultra-turrax e filtração de 450 nm; Amostra II – homogeneizador de alta pressão e filtração de 220 nm.

. Os dados obtidos apresentaram valores entre 2,93 ± 0,85 mV e 14,24 ± 4,52 mV, sendo que todas as amostras apresentaram valores positivos e variados ao longo do teste. Na literatura foi encontrado valores negativos para os NCC a partir de hidrólise enzimática. A justificativa é devido ao ponto isoelétrico da celulases ser no pH 4-4,3. A nossa metodologia utiliza operações unitárias capazes de separar a celulase do NCC,

portanto a mesma não possui influência no potencial zeta das amostras (DOMINGUES et al., 2016).

Em relação ao parâmetro tempo de hidrólose durante os 21 dias, as amostras de 42 horas apresentaram valores entre 2,93 ± 0,85 mV e 14,24 ± 4,52 mV. Já as amostras de 72 horas, os valores foram 3,76 ± 1,68 mV e 10,56 ± 3,17 mV. Portanto os resultados não demostraram mudança significativa neste parâmetro.

Os resultados em relação ao número de centrifugações também não apresentaram diferença significativa durante o período do teste. Para duas centrifugações (amostra C), os valores variaram entre 3,335 ± 0,44 mV e 14,24 ± 4,52 mV, enquanto para três centrifugações (amostra E), os dados variaram entre 2,93 ± 0,85 mV e 11,91 ± 1,69 mV.

A metodologia I (sem homogeneizador e filtração) teve valores entre 2,93 ± 0,85 mV e 14,24 ± 4,52 mV durante os 21 dias. Para a metodologia II com as operações unitárias, os dados foram entre 3,37 ± 1,27 mV e 11,28 ± 0,1 mV. Isto indica que a alteração das operações unitárias não possui forte influência no parâmetro avaliado.

Um dos grandes problemas encontrados ao produzir os NCC por hidrólise enzimática é a reagregação pós-hidrólise, que ocorre devido a erosão aleatória da superfície cristalina das partículas (ROVERA et al., 2018).

O processo enzimático dos NCC é a razão para que a carga elétrica dos mesmos seja nula ou próxima de zero. Porém isto é um problema que deve ser abordado pois precisamos ter NCC mais estáveis ao longo do tempo. A sugestão de Rovera et al., (2018) é a utilização de surfactantes ou polieletrólitos para modificar a superfície dos NCC. Porém é sabido que os surfactantes apresentam efeitos adversos (irritação e hemólise), e seus subprodutos acarretam em problemas ambientais (WANG et al., 2017; YI et al., 2017).

A ampla utilização da hidrólise com ácidos é devido a sua facilidade de obter NCC mais estáveis. O ácido atua na superfície dos NCC, estabilizando-os eletrostaticamente com cargas negativa, sem alterar a superfície do nanomaterial e formando uma dispersão homogênea em meio aquoso (ARSERIM-UÇAR et al., 2020). Contudo, ao empregar a hidrólise enzimática no processo, é obtido um produto mais limpo e ecológico sem gerar resíduos ao meio ambiente (GEORGE et al., 2011).

Caracterização dos NCC por NTA

As amostras com os melhores resultados de tamanho, PDI e zeta foram escolhidas para o ensaios de NTA (Tabela 1), sendo as amostras C72-II (segunda centrifugação, 72 horas de hidrólise, metodologia II) e E72 – II (terceira centrifugação, 72 horas de hidrólise, metodologia II).

Tabela 1 – Análise de NTA

Amostra	Concentração (nanopartículas/mL)
C72 – II	$1{,}66 \times 10^{11} \pm 3{,}72 \times 10^{9}$
E72 – II	$1{,}57 \times 10^{11} \pm 4{,}47 \times 10^{9}$

Nota: Amostra C – duas centrifugações; Amostra E – três centrifugações; Amostra 72 – 72 horas de hidrólise. Amostra I – ultra-turrax e filtração de 450 nm; Amostra II – homogeneizador de alta pressão e filtração de 220 nm.
Fonte: elaboração própria.

O teste de NTA (*Nanoparticles Tracking Analysis*) é uma técnica que determina o índice de refração de nanopartículas suspensas. O método utiliza a taxa de movimento browniano, podendo avaliar o tamanho e a concentração de nanopartículas na amostra. Nos trabalhos encontrados, somente foi analisado o tamanho dos NCC (JUÁREZ-LUNA et al., 2019; NISKANEN et al., 2019).

Podemos observar na tabela 2, que não houve diferença estatística entre as amostras, sendo assim a concentração das nanopartículas independem das operações unitárias. Entretanto para outros parâmetros essas operações foram fundamentais. Nas duas amostras a massa inicial de celulose seca foi de 0,35mg/mL o que gerou aproximadamente $1{,}6 \times 10^{9}$ NCC/mL.

ROVERA et al., 2018 calcularam o rendimento de NCC através de espectrofotômetro e por peso do produto liofilizado. E observaram que se tratando de um material em escala nanométrica, o NTA se torna interessante para quantificar o material pois é mais específico.

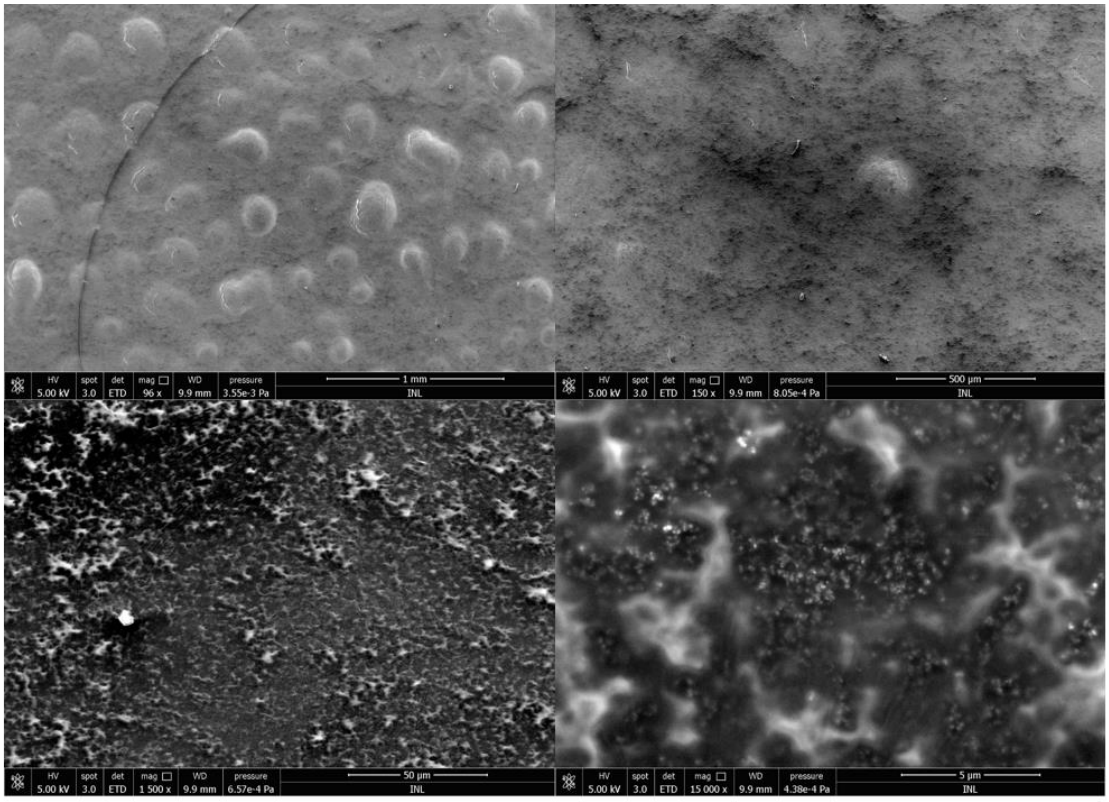
Em outro artigo, KAFLE et al., 2015 realizaram um experimento com celulose bacteriana afim de verificar as alterações estruturais que os materiais sofreram em

diferentes períodos de hidrólise e foi concluído que a maior taxa de conversão ocorreu durante as 12 primeiras horas, sendo avaliada em 44 a 50%, diminuindo gradualmente.

Microscopia Eletrônica de Tramissão (MEV) e Microscopia eletrônica de varredura (TEM)

Os resultados da análise de microscopia eletrônica de transmissão (MET) dos NCC foram expostos na figura 6.

Figura 6 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da amostra de nanocristais de celulose bacteriana (NCC)



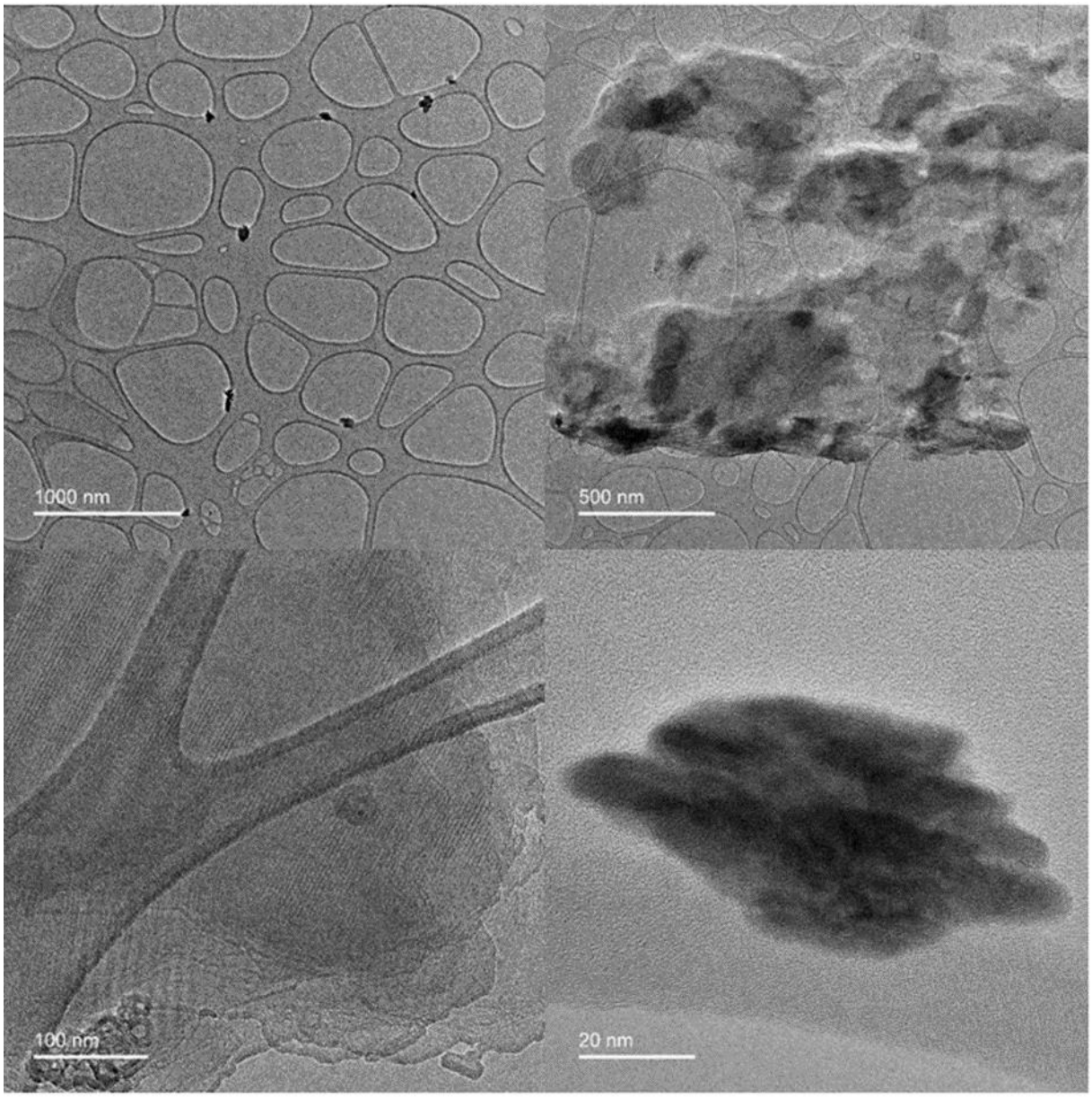
Nota: Nanocristais de celulose bacteriana (NCC) com aumento de 96, 150, 1500 e 15000 x.

Nas imagens do teste de MEV não foi possível analisar com clareza a presença e o tamanho dos NCC devido a aglomeração dos mesmos. Ao buscar na literatura, não foi encontrado nenhum trabalho de NCC produzidos por hidrólise enzimática com imagens de MEV, possivelmente por apresentar o mesmo problema de aglomeração encontrado

no nosso trabalho. Uma das possíveis hipóteses deste resultado é a falta da etapa de metalização para a realização da análise.

Os resultados da análise de microscopia eletrônica de transmissão (MET) dos NCC foram expostos na figura 7.

Figura 7 – Microscopia eletrônica de transmissão (MET) da amostra de nanocristais de celulose bacteriana (NCC)



Nota: Nanocristais de celulose bacteriana (NCC) na escala de 1000, 500, 100 e 20 nm.

Nas imagens do teste de TEM também não foi possível analisar com clareza a presença e o tamanho dos NCC devido a aglomeração dos mesmos. Acreditamos que a amostra estava com uma alta concentração de (NCC), o que dificultou a leitura da amostra.

Na literatura, foram encontradas metodologias de TEM distintas da nossa. No trabalho de George et al., (2011), foi utilizada uma grade de cobre revestida a carbono. Já no artigo de Rovera et al., (2018), além de utilizar a mesma metodologia que o anterior, adicionou acetato de urânio para realizar a leitura das amostras.

Uma alternativa encontrada pelo nosso grupo de pesquisa foi a repetição dos testes nos parâmetros encontrados na literatura e também realizar o teste de microscopia de força atônica (MFA), onde seja possível verificar com mais clareza o tamanho e o formato dos NCC.

Conclusão

A hidrólise enzimática é uma alternativa para produção de NCC a partir de celulose bacteriana, porém a aglomeração do nanomaterial é um grande empecilho da técnica. O tratamento mecânico e as operações unitárias são uma solução para melhorar a metodologia de produção dos NCC, influenciando nos parâmetros de tamanho, PDI e potencial zeta das amostras, melhorando as propriedades do NCC.

A metodologia que aplica três centrifugações, com 72 horas de hidrólise apresentou os melhores resultados em relação a tamanho e PDI. Ao aprimorar a técnica, adaptando a metodologia, os valores foram ainda melhores (em torno de 45%).

Este artigo indica um processo contendo operações unitárias para obtenção de NCC de tamanhos que variam entre 41,67 ± 5,55 nm e 135,5 ± 43,56 nm; com PDI entre 0,043 ± 0,026 e 0,262 ± 0,018 durante 21 dias; sem gerar resíduos ao meio ambiente, podendo ser classificado como um processo verde. em um futuro próximo, Essas NCC poderão ser aplicadas em embalagens de alimento ou ainda, para estabilização de produtos farmacêuticos.

CAPITULO III: PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM SISTEMA EMULSIONADO CONTENDO ALGINATO E ÓLEO DE RÍCINO RECOBERTO POR NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA

Resumo

O objetivo deste trabalho foi obter sistemas baseado em emulsões e aplicar a geleificação ionotrópica (*click reaction*). A técnica de *click reaction* foi do tipo dropwise-*top down* sob cisalhamento constante. As partículas obtidas foram lavadas com água purificada para remover o excesso de componentes da reação, e mergulhadas em dispersão aquosa de NCC durante 6, 10, 24 e 48 horas. A dispersão aquosa das partículas revestidas com NCC foi congelado a -80ºC e liofilizada. As partículas foram caracterizadas antes e após o revestimento usando microscopia, espectroscopia na região do infravermelho, calorimetria exploratória diferencial e diferencial elétrico de superfície (potencial zeta). As análises dos resultados mostraram partículas esféricas, uniformes, com dimensões micrométrica, potencial zeta negativo, estabilidade física e térmica. Após adsorção dos NCC nas micropartículas, houve alterações nos espectros de DSC e FTIR, resultantes da presença dos NCC como agente de revestimento. O resultado deste trabalho traz uma contribuição incremental para o avanço do conhecimento na área de ciências farmacêuticas e dos alimentos, possibilitando o engenheiramento de sistemas com composição mista de biomateriais para liberação modificada de fármaco, macromolécula, nutrientes, conservantes, liberação alvo específica, teranóstico e suporte para vacinas de 3ª (vetores de DNA) e 4ª gerações.

Palavras-chave: Nanocristais de celulose. Partículas. Gelificação ionotrópica.

Introdução

Emulsões são sistemas de líquidos imiscíveis estabilizados por surfactantes, formando sistemas simples (óleo / água ou água / óleo) ou múltiplos (água/óleo/água ou óleo/água/óleo) (MORAIS et al., 2018; SOUSA et al., 2017) As vantagens de um sistema emulsionado são: solubilizar simultaneamente fármacos hidrofílicos e lipossolúveis, controlar a liberação do fármaco, aumentar a permeação de fármacos, mascarar sabor e odor, melhorando a palatabilidade do produto final (KALE; DEORE, 2017).

As desvantagens das emulsões convencionais são referentes ao uso de tensoativo da formulação, pois apresentam efeitos adversos (irritação e hemólise) e seus subprodutos acarretam em problemas ambientais (WANG et al., 2017; YI et al., 2017).

Emulsões livres de surfactantes podem utilizar partículas ou polímeros para realização da estabilização. Ambos vão atuar na interface óleo/água da emulsão, formando uma barreira, impedindo a coalescência da fase dispersa (ARAIZA-CALAHORRA et al., 2017; CHEN et al., 2016).

O alginato é um polímero extraído de fontes naturais, que é amplamente empregado na área farmacêutica e em engenharia de tecidos. Este material possui diversas vantagens, entre elas a facilitação da coagulação sanguínea, ativação do sistema imunológico, efeito bactericida, entre outras (NG et al., 2017; YAN et al., 2018a)

A gelificação ionotrópica é um processo onde ocorre uma interação entre o polímero e um agente de carga oposta. Essa técnica utiliza polímeros de origens naturais para produzir biomateriais biocompatíveis e biodegradáveis, além de possuir a capacidade de incorporar agentes lipossolúveis (BENAVIDES et al., 2016; PATEL et al., 2017).

O óleo de rícino é um material viscoso, amarelo pálido, não volátil e não seco extraído da semente de mamona (*Ricinus communis*). Este produto possui um ótimo custo-benefício e um prazo de validade longo, pois impede a formação de peróxido (PATEL et al., 2016). Ao processar ou refinar o óleo, é possível aplicar na indústria farmacêutica para administração de fármacos em sistemas livres de surfactantes (LYU et al., 2016).

Há uma crescente mudança de surfactantes de origem sintética por biopolímeros naturais, pois se trata de produtos biodegradáveis e que não prejudicam o meio ambiente (JIA et al., 2016). Os nanocristais de origem bacteriana podem ser utilizam em sistemas sem surfactantes, pois trata-se de material sustentável com versatilidade de tamanho e

morfologia. Porém há poucos estudos relacionado a fármacos, o que despertou o interesse em nosso grupo de pesquisa (KALASHNIKOVA et al., 2013).

O objetivo deste estudo foi produzir sistema emulsionado contendo alginato e óleo de rícino e verificar a estabilização do mesmo; recobri-lo com nanocristais de celulose bacteriana e realizar caracterização morfológica e físico-química.

Material e métodos

Preparação do sistema emulsionado

A emulsão foi obtida da mistura de uma fase aquosa com uma fase oleosa modificada da literatura (DEEPAK; HARI, 2013). A tabela 1 traz a formulação do sistema emulsionado.

Tabela 1 – Formulação do sistema emulsionado

	Reagente	**Quantidade (g)**
Fase oleosa	Óleo de rícino hidroxilado e etoxilado (OR-HE) EHL13	35
Fase aquosa	Alginato de sódio média viscosidade	3,75
	Mistura de tensoativo* EHL 12,86	2,5
	Água ultra purificada	209

Nota: *Tween 80 EHL 15 (80%) e Span 80 EHL 4,3 (20%).

O OR-HE foi aquecido para diminuir a viscosidade (~ 60°C), e a fase aquosa foi aquecida para uma temperatura ligeiramente superior (~ 65°C). A fase aquosa foi dispersa na fase oleosa sob agitação constante e vigorosa, a dispersão foi resfriada livremente até 25º C. A emulsão obtida foi homogeneizada sob pressão de 600 bar (60 10^3 kPa) por dois ciclos (Homo lab 2.20 FBF Italia).

Teste de estabilidade do sistema emulsionado

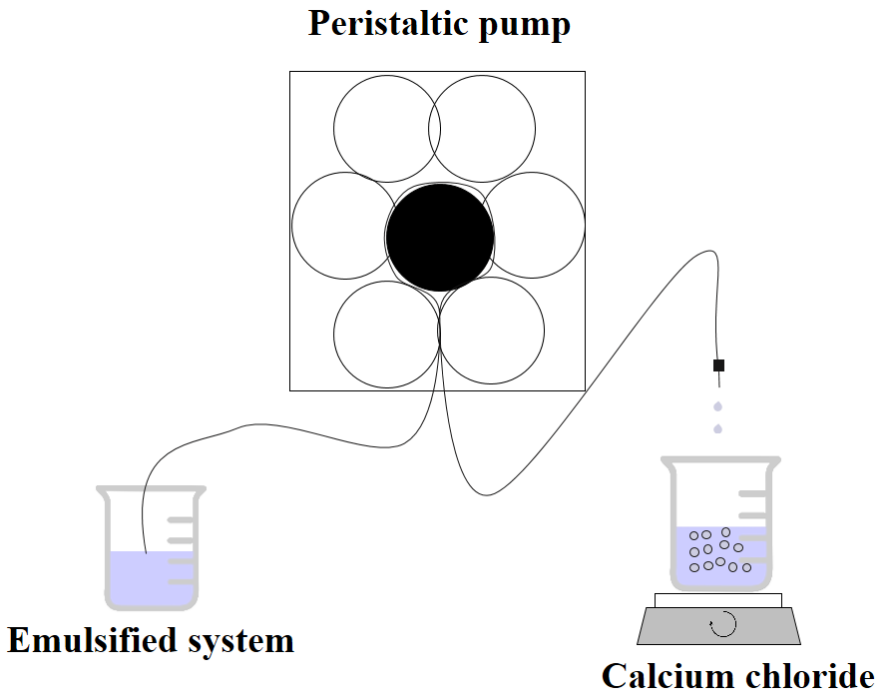
A técnica utilizada para avaliar a estabilidade do sistema foi adaptada de Kalashnikova et al (2013) e foi dividida em duas condições, (i) 5 g da amostra foi

centrifugada a 3400 rpm por 15 minutos; (ii) 5 g do material foi congelado a -18°C por 1 hora, mantido em banho termostático a 37°C por 15 minutos e centrifugado a 3.400 rpm por 15 minutos. Ao final dos testes, foi avaliada se houve a separação de fase nas amostras.

Obtenção das partículas por gelificação ionotrópica

Para a obtenção das partículas, foi aplicada a tecnologia de gelificação ionotrópica (Figura 1). O sistema emulsionado foi transferido gota a gota por uma agulha de insulina para uma solução de cloreto de cálcio a 2M com auxílio de uma bomba peristáltica mantidas permanentemente sob agitação com uma velocidade constante por uma hora.

Figura 1 – Esquema do sistema de gelificação ionotrópica



Obtenção dos nanocristais de celulose bacteriana (NCC)

A produção dos NCC foi realizada seguindo metodologia desenvolvida pelo nosso grupo de pesquisa (*In press*). O processo de cinco etapas emprega o tratamento mecânico da celulose bacteriana (obtida da bactéria *G. xylinus*) associada a hidrólise enzimática. Os NCC apresentaram tamanho de 41,67 ± 5,55 nm e índice de polidispersidadade de 0,127 ± 0,005.

Incorporação do NCC no sistema

As partículas foram lavadas em água ultra purificada para remover o excesso de cálcio que não reagiu com o alginato de sódio. Após a lavagem, 4 g das partículas foram imersas em 50 mL de solução tampão pH 8,5 mantidas em agitador orbital a 100 rpm durante 1 hora a 25°C.

Após o período, 2g da amostra de partículas foram coletadas e mantidas em contato com 10 mL de NCC em agitador orbital em 100 rpm a 25°C até ocorrer o recobrimento completo das partículas (48 horas), enquanto os outros 2 gramas foram mantidos em água ultrapura como amostra padrão.

Caracterização morfológica e físico química das partículas

As partículas foram caracterizadas pelas técnicas de potencial zeta, calorimetria exploratária diferencial (DSC), espectrometria no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura (MEV) de acordo com as metodologias do nosso grupo de pesquisa (ALVES et al., 2018).

O potencial zeta das partículas na ausência de NCC foi medido pelo equipamento SurPASS 3 (Anton paar). A análise foi realizada em duplicata, sob pressão entre 200 e 600 bars para os valores de pH entre 4,5 e 9.

A caracterização de DSC foi realizada pelo equipamento Thermal Analyzer (Shimadzu TA-60, Kyoto, Japão). Foi embalado 2 mg de cada amostra em uma panela de alumínio hermeticamente cravada e aquecida em nitrogênio seco com fluxo de 50mL/min de 25 a 400°C. Para a amostra de NCC foi utilizada uma taxa de aquecimento de 2°C/min enquanto para as partículas e partículas + NCC foi de 10°C/min.

As amostras dos NCC, da esfera e da esfera + NCC foram analisadas por FT-IR (Shimadzu, IRAffinity-1, Kyoto, Japão) via Labsolutions Software v.2.10. As amostras foram elaboradas em discos KBr por uma prensa hidráulica. Os espectros de infravermelho foram emitidos na faixa de 400 cm^{-1} – 4000 com resolução de 4cm^{-1} e 32 scans.

As partículas foram observadas em microscópio ótico para verificar se houveram alterações na morfologia das amostras esfera e esfera + NCC. As imagens foram feitas nos tempos 0, 6, 10, 24 e 48 horas, observando a diferença entre eles.

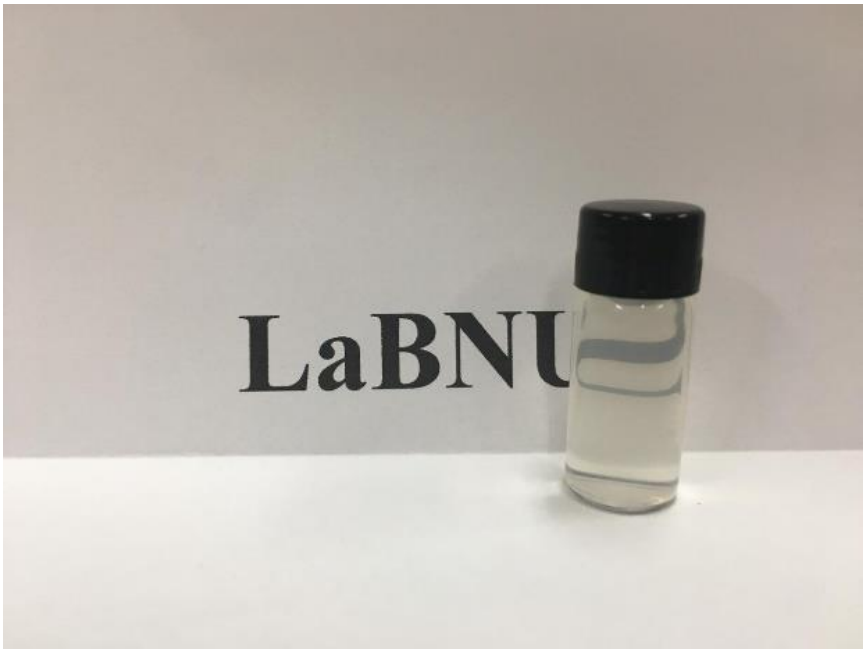
Para a leitura no MEV, as partículas foram dispostas em uma solução de 1% de sacarose, mantidas a -80°C em ultrafreezer por 24 horas e liofilizadas por 72 horas. As amostras foram fixadas com fita carbono, submetidas a metalização por 2 minutos (DH-29010SCTR Smart Coater) e lidas no equipamento de microscopia eletrônica de varredura (JSMIT200).

Resultados e discussão

Sistema emulsionado

O sistema emulsionado se apresentou translúcido, o que indica uma formação de micelas em escala nano (Figura 2). O sistema não apresentou separação de fases ou floculação e demonstrou-se um sistema estável.

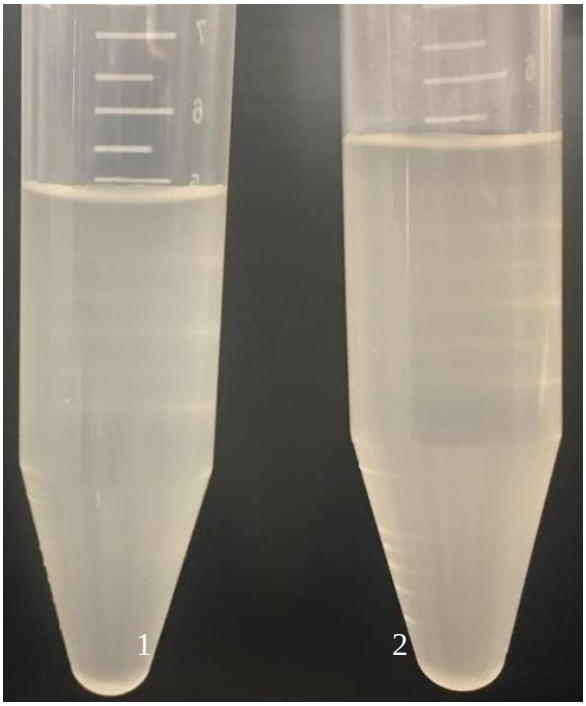
Figura 2 – Amostra do sistema emulsionado realizado com óleo de rícino e alginato de sódio



Estabilidade da emulsão

Na figura 3 não foi possível observar separação de fases em ambos os testes de estabilidade das amostras, o que indica uma resistência da amostra ao estresse aplicado nas mesmas.

Figura 3 – Teste de estabilidade do sistema emulsionado realizado com óleo de rícino e alginato de sódio



Nota: 1 - Teste de centrifugação; 2 - Teste de congelamento + banho termostático + centrifugação.

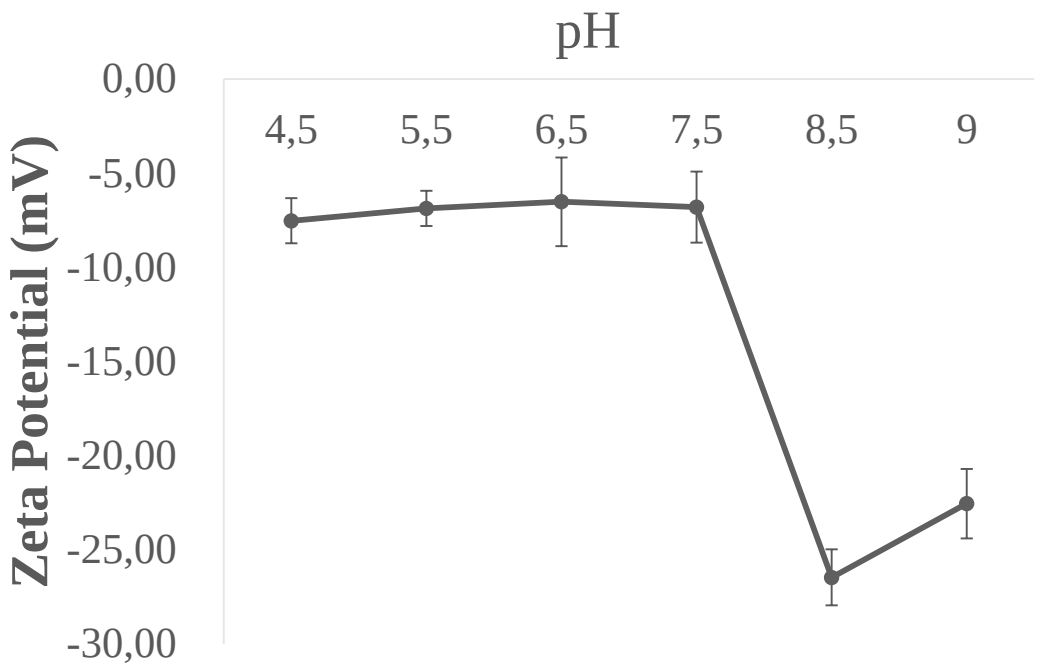
A centrifugação da amostra é aplicada para acelerar o processo de separação de fases, simulando o tempo de prateleira do produto (KALASHNIKOVA, 2012). Portanto, o sistema emulsionado avaliado pode ser considerado estável, pois mesmo submetido a condições de estresse, o material se manteve uniforme.

Caracterização das partículas

Potencial Zeta de superfície

Na figura 4, estão apresentados os resultados dos testes de potencial zeta da superfície das partículas sem NCC, em diferentes valores de pH.

Figura 4 – **Resultado do potencial zeta de superfície das partículas sem NCC**



Como relatado em um artigo *inpress* do nosso grupo de pesquisa, o potencial zeta dos NCC é majoritariamente positivo. Portanto, para ocorrer a adsorção dos NCC na superfície das partículas, o valor das partículas deve ser negativo.

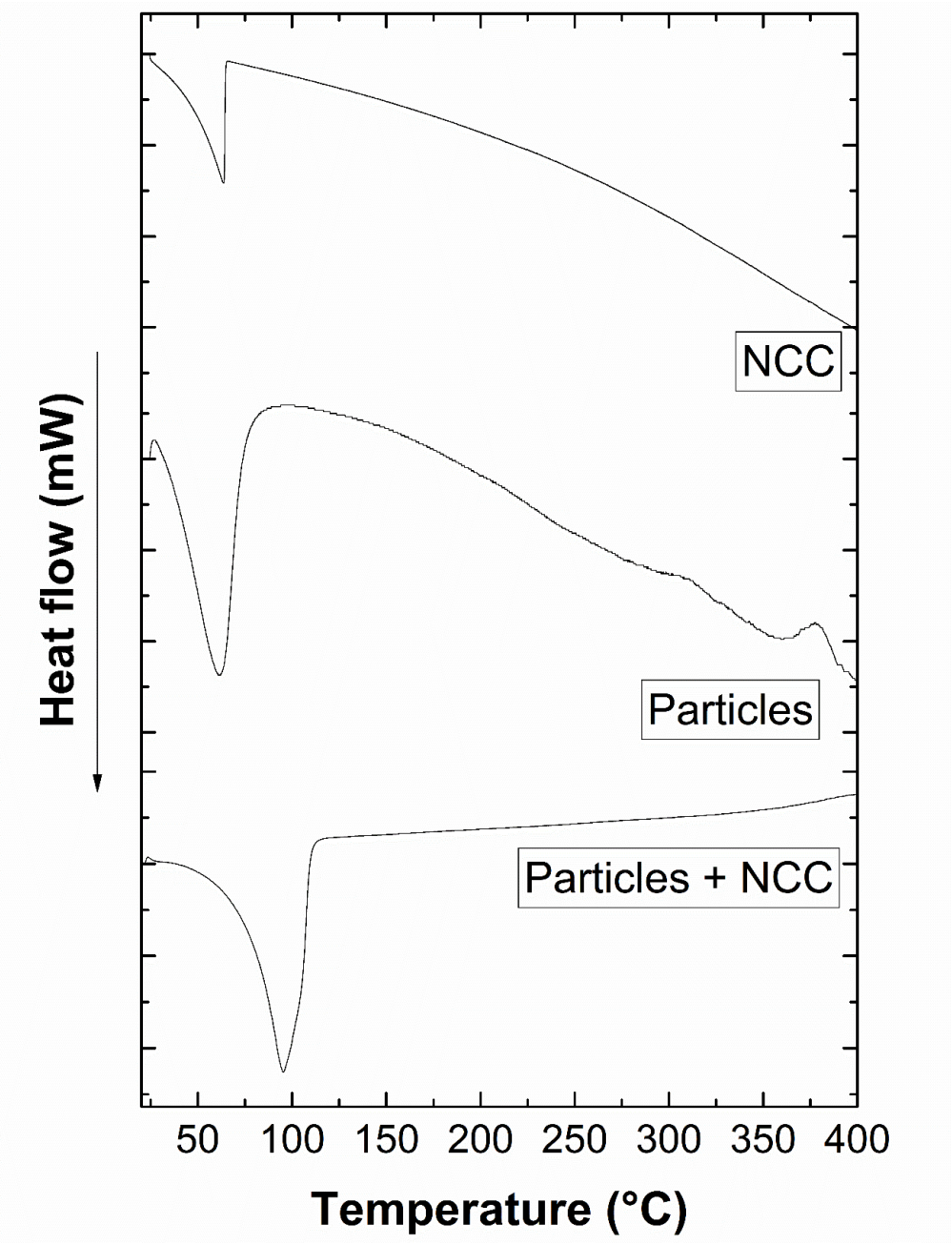
Os resultados do teste realizado indicaram que o potencial zeta é negativo e atinge o maior valor de -26,46 ± 1,48 mV em pH 8,5, sendo escolhida a melhor condição para realizar o recobrimento das partículas com o NCC devido ao maior valor de potencial zeta do ensaio.

Um trabalho encontrado na literatura descreve o potencial zeta das partículas contendo alginato como negativo, na faixa de – 15,7 ± 1,7 mV e -9,8 ± 1,2 mV, o que indica que a nossa esfera está de acordo com o resultados desses autores (ADEBISI; CONWAY, 2013).

Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

O DSC (Calorimetria exploratória diferencial) foi realizado afim de investigar a interação dos compostos. Os resultados do teste foram apresentados pelos termogramas das amostras de partículas, partículas + NCC e NCC (Figura 5).

Figura 5 – **Resultados da análise de DSC contendo o termograma das amostras de partículas, partículas + NCC e NCC**



Nota: NCC - Nanocristais de celulose bacteriana

Fonte: elaboração própria.

No termograma das partículas, os valores encontrados foram de 64,65 °C (pico endotérmico) e 784,46 J/g (entalpia de fusão). Dois picos exotérmicos foram encontrados em 308 e 378°C, devido a desidratação e despolimerização do alginato (PATEL, 2013; SARMENTO et al., 2006). Foi identificado um decaimento na curva devido a mudança do comportamento calorífico (MARTÍNEZ-GÓMEZ et al., 2017). Na literatura há divergentes valores para partículas de alginato, principalmente devido a diferença de formulações. Foi encontrado valores de pico de 70,29 e 91,846 °C, com entalpia de 181,3 e 211,49 J/g (AHUJA; BHATIA; SAINI, 2016; KASSEM et al., 2015).

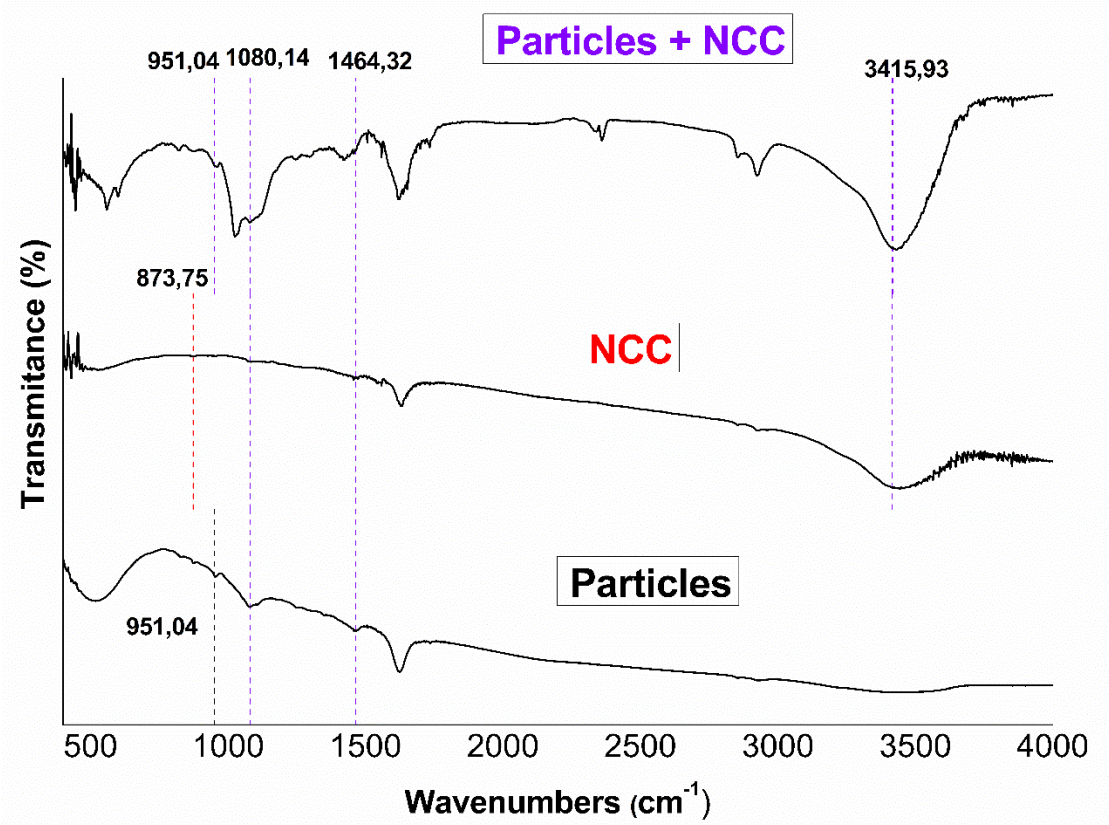
Os valores do termograma de NCC foram 62,65 °C para temperatura do pico endotérmico e 128,07 J/g de entalpia de fusão. Assim como na amostra das partículas, é observado um decaimento da curva (GEORGE; SIDDARAMAIAH, 2012). Não há na literatura termograma de NCC por hidrólise enzimática, porém os dados de NCC por hidrólise ácida para pico endotérmico estão na faixa de 140–195°C com a entalpia variando entre 51 a 95 J/g, indicando que a metodologia aplicada interfere no resultado dos termogramas (VASCONCELOS et al., 2017).

O termograma da amostra partículas + NCC apresentou ser mais estável do que das partículas e dos NCC. Não houve a presença de picos exotérmicos que caracteriza uma interação do alginato com os NCC. A temperatura do pico endotérmico foi de 95,17°C com entalpia de fusão de 918,80 J/g. É relatado na literatura que ao utilizar NCC associados a polímeros, ocorre o aumento da temperatura de fusão, entalpia e comportamento cristalino (GEORGE et al., 2011), como também é observado na nossa amostra. Isto indica que os NCC estão adsorvidos à superfície das partículas, contribuindo para aumentar a estabilidade das mesmas.

Espectrometria no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A técnica de espectrometria foi utilizada afim de comparar os picos característicos das amostras e identificá-los de acordo com os dados da literatura. Os resultados são apresentados através dos espectros das amostras de partículas, partículas + NCC e NCC (Figura 6).

Figura 6– Resultado da análise de FTIR contendo os espectros das amostras de partículas, partículas + NCC e NCC



Nota: NCC - Nanocristais de celulose bacteriana

Para a amostra de partículas, foram encontrados picos em 1460 cm^{-1}, 1107 cm^{-1}, 935 cm^{-1}, 800 cm^{-1} e 700 cm^{-1}. Na literatura, os picos característicos de alginato são observadas em 1460 cm^{-1} (assimétrica de alongamento), 1107 e 935 cm^{-1} (C \\ O alongamento do anel e C \\ O alongamento com deformações C \\ C \\ H e C \\ O \\ H), 800 e 700 cm^{-1} (ácidos manurônico e gulurônico) (LAROSA et al., 2018).

No espectro de NCC, os picos característicos foram: 3362 cm^{-1}, 1429 cm^{-1}, 1371 cm^{-1},1163 cm^{-1}, 1110 cm^{-1}, 1059 cm^{-1} e 897 cm^{-1}. Outros autores relataram que os picos característicos de celulose são: 3362 cm^{-1} (alongamento OH), 1429 cm^{-1} (deformação angular CH), 1371 cm^{-1} (deformação angular simétrica CH), 1163 cm^{-1} (estiramento assimétrico das ligações glicósidas C\O\C), 1110 cm^{-1} e 1059 cm^{-1} (estiramento de C\OH e C\C\OH nos álcoois secundários e primários) e 897 cm^{-1} (deformação angular CH), que se assemelham com os que foram observado no espectro (VASCONCELOS et al., 2017).

Na amostra partículas + NCC, os picos identificados foram: 3431,36 cm^{-1}, 951,04 cm^{-1}, 1080,14 cm^{-1} e 1464,32cm^{-1}. O pico 3431,36 cm^{-1} é semelhante ao encontrado na

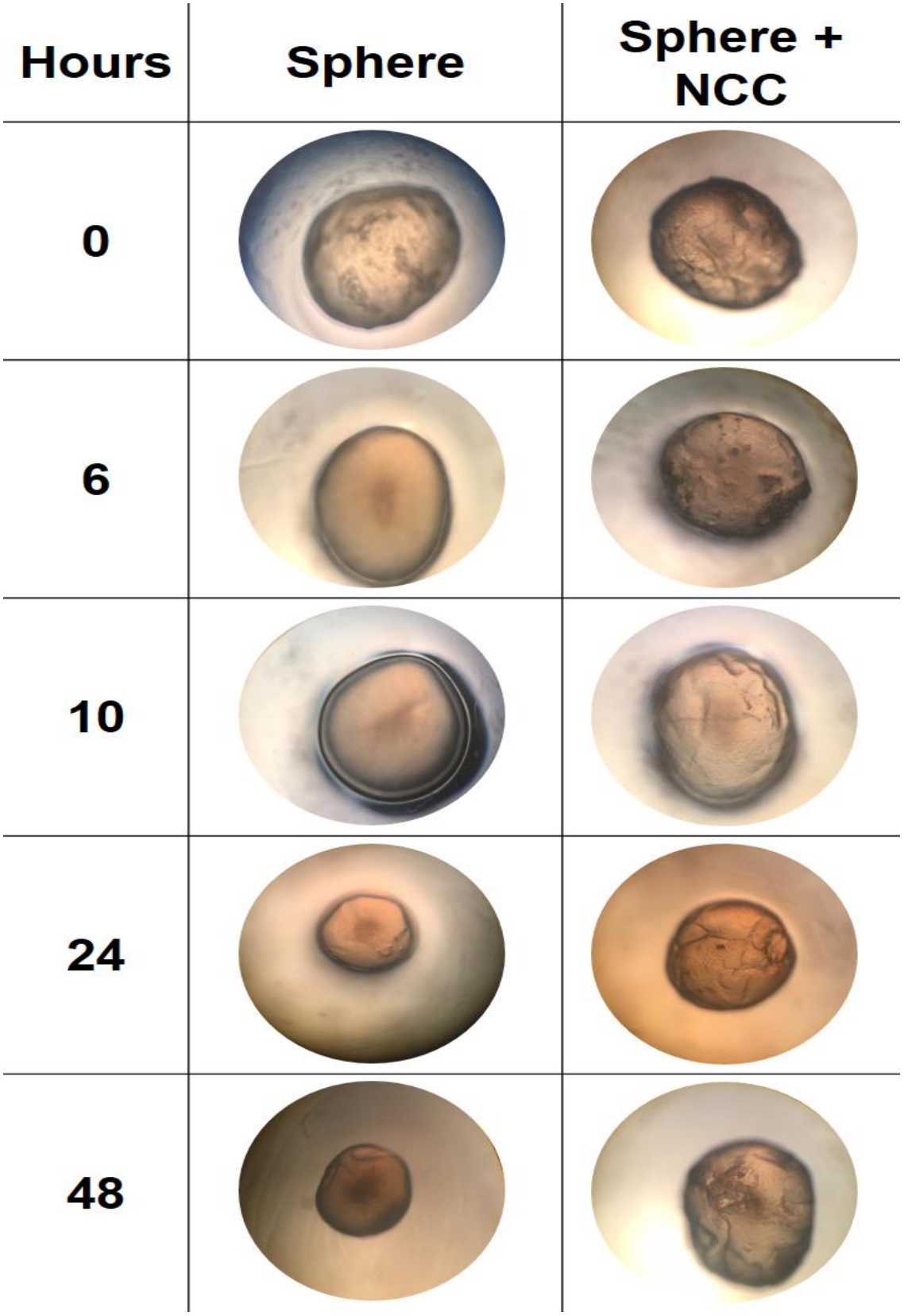
amostra de NCC. O pico 951,04 cm^{-1} foi observado na amostras esfera padrão. Já os picos 1080,14 cm^{-1} e 1464,32cm^{-1} estão presentes em ambas as amostras.

A partir dos dados desta análise, foi confirmada a presença de grupamentos característicos da amostras padrão (NCC e partículas) na amostra incorporada (partículas + NCC), comprovando a influência dos componentes na amostra analisada.

Microscopia óptica

Os resultados são apresentados na Figura 7.

Figura 7 – **Microscopia óptica das partículas e partículas recobertas com NCC nos tempos 0, 6, 10, 24 e 48 horas**



Nota: NCC - Nanocristais de celulose bacteriana

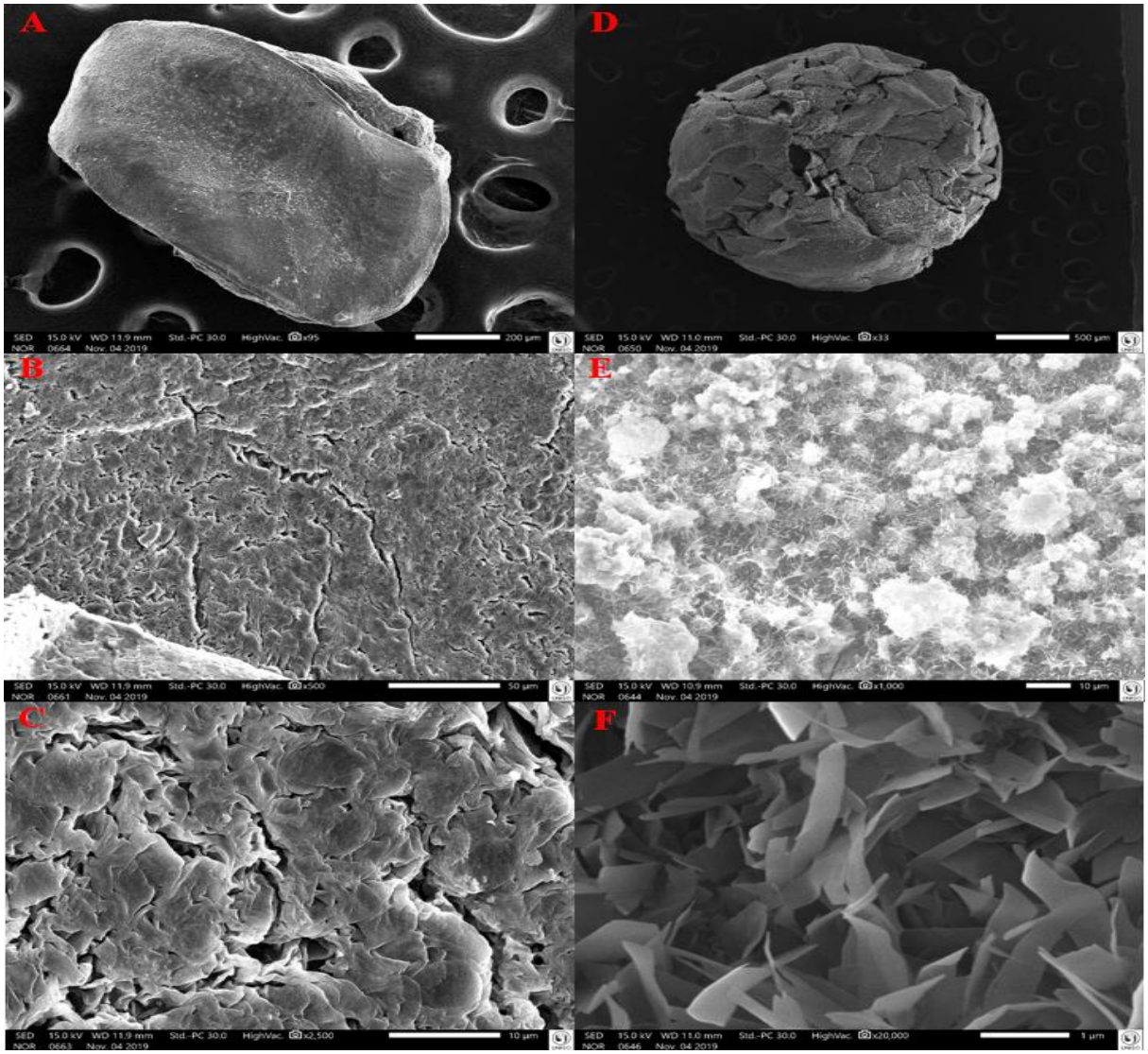
É possível observar que todas as partículas possuem formato arredondado porém houve diferença entre a amostra padrão e a amostra com NCC em relação a superfície. A amostra com NCC apresentou irregularidade, enquanto a outra amostra apresentou a superfície menos rugosa.

Resultados semelhantes foram apresentados no trabalho de Ahuja; Bhatia; Saini (2016) ao realizar a microscopia das amostras, descrevendo-as como esféricas, porém com forma irregular e com superfícies rugosas, variando de tamanho de acordo com a formulação da amostra.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise de microscopia eletrônica produz imagens 3D do material com alta resolução (ALEXIS; GUANG; GUIARO, 2017). Os dados obtidas no teste estão expostos na Figura 8.

Figura 8 – **Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das partículas e partículas recobertas com NCC por 48 horas**



Nota: A, B e C - Partículas de alginato com aumento de 95, 500 e 2500 x; D, E e F - Partículas de alginato + NCC com aumento de 33, 1000 e 20000 x.

Nas imagens da microscopia, ao analisar a figura A, é possível observar que houve uma alteração na morfologia das partículas que contém NCC (figura D). Ao comparar as figuras B e E, é observado grânulos em E que não estão presentes em B. Os grânulos maiores provavelmente são provenientes da sacarose utilizada na liofilização do material. Foi possível identificar a morfologia dos NCC na figura F, comprovando que os mesmos aderiram na superfície das partículas, demonstrando a eficácia da incorporação.

Ao comparar as partículas de alginato com os dados da literatura, é observado uma semelhança nas imagens obtidas por MEV, onde é identificado partículas uniformes

(SANTAGAPITA; MAZZOBRE; BUERA, 2012). No trabalho de Kalashnikova et al. (2013), o grupo de pesquisadores analisaram por MEV uma emulsão pickering estabilizada por NCC. Nas imagens foi identificado NCC recobrindo a extensão da gota, similares ao nossos dados.

Conclusão

Os resultados mostraram que foi possível obter uma emulsão estável com a formulação de alginato e óleo de rícino utilizada no estudo. A metodologia de gelificação ionotrópica foi eficaz para produzir partículas uniformes.

Ao incorporar os NCC no material, houve mudanças nos testes de caracterização em comparação ao padrão. Na análise de DSC, o termograma da amostra apresentou mudança na temperatura do pico de fusão e na entalpia da amostra em relação a esfera padrão devido a presença dos NCC. Nas medidas de FTIR a amostra incorporada apresentou picos tanto das partículas quando dos NCC, confirmando a presença de grupamentos semelhantes.

A microscopia óptica revelou um formato arredondado das amostras e uma alteração na superfície das partículas. Com a utilização do MEV foi confirmada a incorporação dos NCC, podendo observar os NCC na superfície das partículas.

Após a realização das análises, é possível concluir que o sistema emulsionado permaneceu estável, e a partir desta formulação foi produzido partículas por gelificação ionotrópica. Pela caracterização morfológica e físico-química, foi comprovado o recobrimento por NCC, podendo trazer maior estabilidade ao sistema.

CAPITULO IV: ALGINATE-AMPHOTHERICIN B NANOCOMPLEXES COVERED BY NANOCRYSTALS FROM BACTERIAL CELLULOSE: PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERIZATION AND *IN VITRO* TOXICITY

Abstract

Background: Nanostructured systems free of surfactants have pharmacotechnical and biopharmaceutical advantages, in addition to being a green process. Amphotericin B (AmB) is a drug with anti-leishmanial and anti-fungal potential, but its low water solubility and permeability limit its therapeutic use. Therefore, it could profit from being incorporated into nanostructured systems. In the present study, a self-assembled nanocomplex of alginate (Alg), a polysaccharide extracted from natural sources that can be used in the pharmaceutical area, and AmB was produced in order to improve the limited therapeutic use of the drug (Alg-AmB). Further, as a reinforcing component, cellulose nanocrystals (NCC) were ionically adsorbed into the surface of the nanocomplex systems (Alg-AmB + NCC). **Results:** Despite some polydispersity (0.523 ± 0.073), this straightforward process allowed to obtain water soluble particles with a hydrodynamic size of 258.87 ± 10.41 nm and charge of -62.93 ± 2.02 mV. Furthermore, the ionic adsorption of the NCC into the Alg-AmB nanocomplex surface was confirmed by an increase in the particle size (466.3 ± 17.57 nm) and a small surface charge decrease (-55.75 ± 1.23 mV). The amorphous inclusion complex of AmB into the polysaccharide chain network in both formulations was confirmed by DSC and FTIR. AmB in the nanocomplexes was in supper-aggregated form and showed good biocompatibility, being significantly less cytotoxic *in vitro* against kidney cells and significantly less hemolytic comparatively to the free-drug. **Conclusions:** Results indicate Alg-AmB nanocomplex can be considered an economical, non-toxic alternative to improve the AmB therapeutic effect. Furthermore, NCC coating of the nanocomplexes brought additional protection to the system without compromised the advantages attributed to the developed formulation.

Keywords: Bacterial cellulose. Nanocrystals. Amphotericin B. Alginate. Nanocomplexes.

Background

Amphotericin B (AmB) is a polyene antibiotic that is either used as a gold standard therapy for fungal infections, as it does not cause microbial resistance (GRAY et al., 2012), or a second-line treatment for visceral leishmaniasis (TORRADO et al., 2008). Despite being a drug widely used for more than half a century, AmB present several limitations such as low water solubility and low permeability, in addition to high toxicity, especially nephrotoxicity. (RICHTER et al., 2018).

Different formulations containing AmB are marketed, such as AmBisome® and Abelcet®, which are based on lipids andand very expensive. Therefore, drug delivery systems have been used nowadays in order to overcome AmB limitations and improve its therapeutic efficacy.encapsulating the drug in a nanocomplex system was an alternative found to solve the product problems. (GUPTA et al., 2015).

Nanocomplexes are self-organized structures composed of a polymer (in many cases natural polysaccharides) and the drug. This system has advantages such as nano scale, high stability, good dispersion in water, low toxicity, with excellent cost-benefit and does not use solvents. In the literature, there are several works that use different types of polymers, such as dextrin (SILVA-CARVALHO et al., 2020), gum arabic (NISHI et al., 2007), albumin (GURUDEVAN; FRANCIS; JAYAKRISHNAN, 2018) and alginate (RAVICHANDRAN; JAYAKRISHNAN, 2018). For this research, we chose to work with alginate.

Alginate is a polymer extracted from natural sources, widely used in the pharmaceutical area and in tissue engineering. This material has several advantages, including the activation of the immune system, nontoxicity, biocompatibility and biodegradability (NG et al., 2017; THI et al., 2020; YAN et al., 2018a). In our research, in order to reinforce and cover the system with alginate, it was applied bacterial cellulose nanocrystals (NCC).

NCC can be used as reinforcement material of the drug delivery systems, protecting them and enabling the administration of the drug by different routes (LEE; CHENG, 2006; YAN et al., 2019). NCC are formed from the action of cellulase in contact with bacterial cellulose. This material has a renewable and sustainable origin, with a good cost-benefit, good biocompatibility and biodegradability, besides presenting a good mechanical resistance, large surface area, low toxicity (GEORGE et al., 2011; GEORGE; SABAPATHI, 2015; YAN et al., 2018a).

Therefore, the objective of this work was the development nanocomplexes of alginate with AmB and evaluate the system covered by NCC in an order to reforce and cover to protect the AmB.

Methodology

Reagents

Amphotericin B (AmB, molecular weight of 924.08 g/mol) powder from Streptomyces sp., resazurin Sodium salt, sodium alginate, triton X-100, sodium tetraborate decahydrate were purchased from Sigma-Aldrich (Missouri, USA). Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS) and penicillin-streptomycin were obtained from Merck Millipore (Massachusetts, USA). Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640. Glutamax supplemented medium and L-glutamine (GlutaMAX™-I) was purchased from Gibco (Massachusetts, USA). Dimethylsulfoxide (DMSO ATCC® 4-X™) solution for cell culture was acquired from American Type Culture Collection (ATCC, Virginia, USA). Dialysis tubing with a molecular weight cut-off of 1000 Da was obtained from Orange Scientific (Braine-l'Alleud, Belgium). AmBisome® was kindly provided by Gilead Sciences.

Obtaining bacterial cellulose nanocrystals (NCC)

The production of the NCC was carried out following the methodology developed by our research group (In press). The five-step process uses the mechanical treatment of bacterial cellulose, obtained from the bacterium *G. xylinus* according to Jozala et al. (2014) (JOZALA et al., 2014), associated with enzymatic hydrolysis. The NCC had a size of 41.67 ± 5.55 nm and an index of polydispersity of 0.127 ± 0.005.

Preparation of nanocomplexes

The nanocomplexes were prepared according to the methodology of Silva-Carvalho et al. (2020) (SILVA-CARVALHO et al., 2020). In the formulation, borate buffer (pH 11), sodium alginate and amphotericin B were used, following the proportions described in table 1.

Table 1 – Formulation of alginate (Alg) e alginate-amphotericin B (Alg-AmB).

Formulations	***Borate buffer pH 11 (mL)***	***Sodium alginate (mg)***	***Amphotericin B (mg)***
Alg	9.6	120	-
Alg-AmB	9.6	96	24

The samples were kept under agitation at 4 °C for 48 hours without interference from light. In the next step, the dialysis process was carried out on a membrane from 12000 to 14000 KDa. The membrane with the sample was immersed in 5 L of distilled water under agitation at 4 °C, without light interference, for 30 hours. During the process, the water was changed three times to remove the salts, until reaching the pH value in the range of 5.5-5.7. Then, the samples were collected, frozen at -80 °C for 24 hours, and lyophilized. The final yield of the process was 73.72%.

Nanocomplex coating

The nanocomplexes Alg and Alg-AmB were covered with NCC. For that, the lyophilized nanocomplexes were dispersed in water in the proportion of 1 mg/mL. After dispersion, 1 ml of the nanocomplexes was added to 1 ml of 0.01% NCC suspension. This sample was kept on rotatory shaker (20 rpm) at 25 °C for 24 hours.

Physico-chemical characterization

For the physico-chemical characterization the following parameters were used: size, index of polydispersity, zeta potential, differential scanning calorimetry, infrared spectrometry by Fourier transform and UV-Vis spectrometry.

For the evaluation of the size, index of polydispersity and surface potential of the particles (zeta potential), the Zetasizer equipment (ZEN3600) was used, at an angle of 173º, at 25 °C for dynamic light scattering (DLS), Index of Polydispersity and zeta potential. The samples Alg-AmB and Alg-AmB + NCC were analysed in six times.

To characterize the stability of the nanocomplexes, Differential Scanning Calorimetry (DSC) was used. The characterization was performed by the DSC 6000 equipment (PERKIN ELMER | STEC INSTRUMENTS) in a nitrogen atmosphere with a flow of 20 mL/min, in the heating range of 25 – 250 °C with a heating rate of 10°C/min.

The test was re-performed with the samples AmB, alginate (Alg), bacterial cellulose nanocrystals (NCC), alginate + AmB (physical mixture), Alg-AmB and Alg-AmB + NCC.

The characterization of the chemical groups was carried out by spectrometry in the infrared by Fourier transform (FTIR). The samples, nanocomplexes Alg and Alg-AmB, were analysed by the technique of KBr tablets with 2 mg of sample and 200 mg of KBr. The infrared spectra were obtained in the range of 4000–400 cm^{-1} in the Bruker Alpha II equipment, with a resolution of 4 cm^{-1} and 12 scans. The analyzed samples were: pure alginate, Alg and Alg-AmB.

In addition, the samples were analyzed by UV-vis spectroscopy in the 300-450 nm range using a UV-Visible visible spectrophotometer (JASCO V-560) with 5 nm resolution and scanning speed of 400 nm/min. The nanocomplexes Alg and Alg-AmB were dispersed in distilled water (1 mg of sample/mL). The material was diluted again to 10 µM in distilled water in order to avoid saturation of the test. AmB control was performed using 1082 µM diluted in borate buffer (0.1 M, pH 11). As with nanocomplexes, the solution was diluted to 10 µM with distilled water. To perform the measurement, 200 µL of the solutions were analyzed in a quartz cuvette. The absorbance ratio of peak I (315-350) to peak IV (408-410) was used to monitor the aggregation status of AmB and the results were evaluated for the quantification of AmB in the sample.

In vitro toxicity

The *in vitro* toxicity tests used a commercial sample of AmBisome® as a control. This drug is for injectable use and has a liposonal formulation containing AmB. The use of AmBisome® is mentioned in several articles in the literature due to its low toxicity (GURUDEVAN; FRANCIS; JAYAKRISHNAN, 2018; NISHI et al., 2007; SERRANO et al., 2013).

Hemolysis test

The hemolysis test assesses the percentage of erythrocyte rupture. Both the protocol and the animal's blood were derived from the work of Silva-Carvalho et al. (2020) (SILVA-CARVALHO et al., 2020). Blood was collected from a healthy dog with the owners' consent on everything with EDTA. The whole blood was centrifuged for 10

min (4 °C, 1200 g) and the supernatant was discarded. Red blood cells were resuspended in phosphate buffer solution (pH 7.4).

The resuspended red blood cells were counted in a Neubauer chamber. In a 48-well plate, 450 µL of red blood cells at a concentration of 1 x 10^8 cells / mL were placed in contact with 50 µL of the samples, at concentrations of 1, 2, 4, 8, 16 and 32 µM AmB, Alg, Alg -AmB, Alg-AmB + NCC and AmBisome®. The plate was incubated with shaking for 30 minutes (37 °C, 120 rpm).

After the period, the solutions were collected and centrifuged for 10 min (4 ° C, 1200 G). The supernatants were collected and analyzed by UV-Vis spectrophotometry, with absorbance at 540 nm (referring to hemoglobin). Complete lysis (100%) was admitted by hemoglobin released with 1% triton X-100 (positive control).

Citotoxicity

This cell line was selected due to the toxicity of AmB in renal cells. A HEK293T monolayer (1 × 10^4 cell/well) was incubated for 24 h (37 °C in a 5% CO_2 atmosphere) with AmB, AmBisome®, Alg and Alg-AmB, at concentrations of 0.78, 1, 17, 1.76, 2.63, 3.95, 5.93, 8.89, 13.33, 20, 30, 45 and 67.5 µM. After the incubation period, 10% (v / v) of a 2.5 mM resazurin solution was added to each well and the plates were incubated again under the same conditions as above for 4 hours.

Fluorescence was measured (λex 560 / λem 590) in a SpectraMAX GeminiXS microplate reader (Molecular Devices LLC, California, USA). The results were expressed as the mean percentage ± SD of viable cells in relation to the positive control condition considered to be 100% viable cells.

Statistical analysis

Data from toxicity tests were expressed as mean ± standard deviation. Analysis of Variance (ANOVA) followed by the Duncan test were used to verify differences among treatment protocols, and p values <0.05 were considered significant. Results were analyzed using Statistica® v. 8.0 (Dell, Round Rock, TX, USA) and GraphPad Prism® v. 6.0 (San Diego, CA, USA).

Results

Physico-chemical characterization of nanocomplexes

The size, index of polydispersity (PDI) and zeta potential of the alginate nanocomplexes with amphotericin (Alg-AmB) and the nanocomplexes covered by NCC (Alg-AmB + NCC) are shown in table 2.

Table 2 – **Analysis of the size, PDI and zeta potential of Alg-AmB Alg-Amb+NCC)**

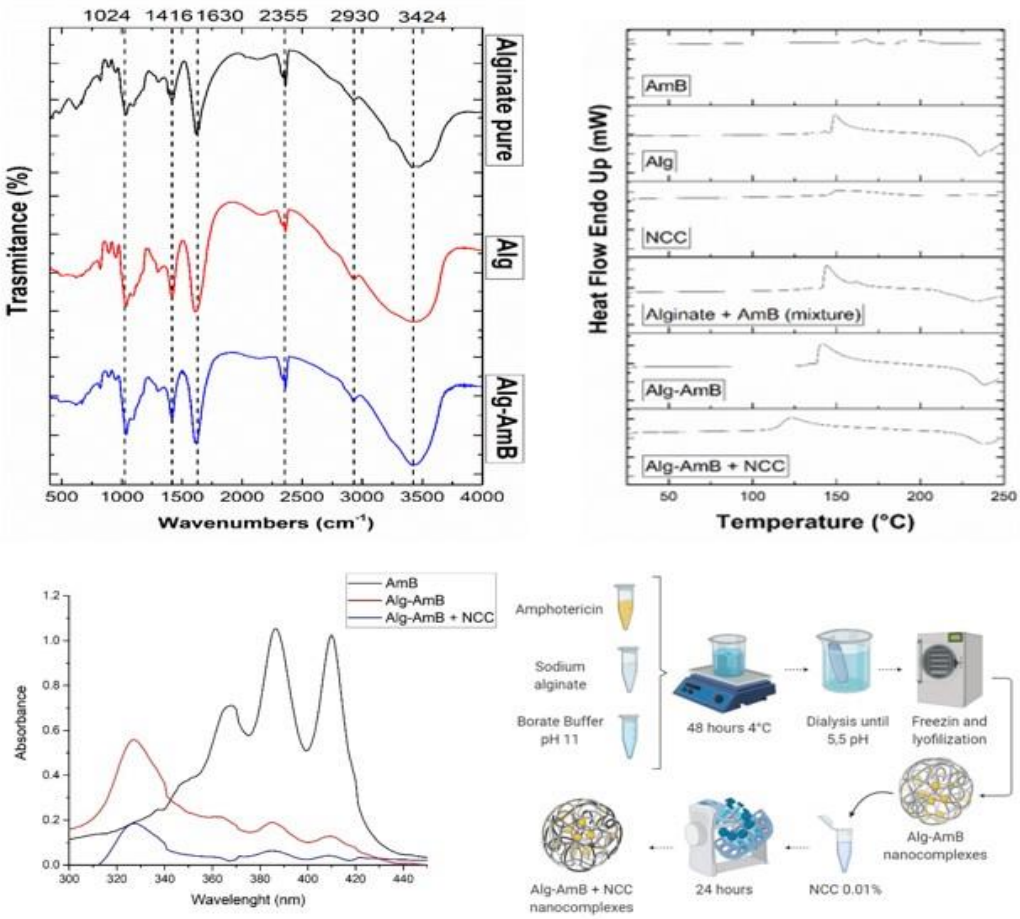
	Alg-AmB	**Alg-AmB + NCC**
Size (nm)	258,87 ± 10,41	466,3 ± 17,57
Index of polydispersity	0,523 ± 0,073	0,420 ± 0,05
Zeta potential (mV)	-62,93 ± 2,02	-55,75 ± 1,23

Both nanocomplexes maintained their size on the nanometer scale. However, there was a significant increase in the size of the Alg-AmB + NCC nanocomplex, possibly due to coating by the NCC. However, when added NCC in nanocomplexes, the polydispersity index decrease.

Due to the positive characteristic of the nanocrystals, the zeta potential of the nanocomplexes increased in the sample containing NCC. This increase was indicated the possibility of nanocomplexes coating.

Figure 1 shows Differential Scanning Calorimetry (DSC) data for AMB, Alg, NCC, Alginate + AmB (physical mixture), Alg-AmB and Alg- AmB + NCC.

Figure 1.A – Differential Scanning Calorimetry (DSC). B – Infrared spectrum by Fourier transform (FTIR). C **– UV-Vis spectrometry. D – Design Production of Alg-AmB and Alg-AmB + NCC**



Note: A – DSC analysis of AmB, Alg, NCC, alginate + AmB (mixture), Alg-AmB and Alg-AmB + NCC. B – FTIR of pure alginate, Alg and Alg-AmB. C – UV-Vis spectrometry of the AmB, Alg-AmB and Alg-AmB + NCC.

In our amphotericin sample, we found this peak in 167 °C degrees. The NCC sample produced by enzymatic hydrolysis peaked at 151 ° C. The physical formation of the mixture of AmB and alginate showed peaks at 144 °C, referring to alginate, and at 161 °C, referring to AmB. On the other hand, when nanocomplexes (Alg-AmB) were formed, the DSC showed only one peak at 141 °C for alginate.

The DSC value for Alg-AmB + NCC sample showed a similar peak to Alg-AmB, but with a slightly lower temperature, at 123 °C. This indicates when NCC was added in the formulation, there was a decrease in the temperature.

Figure 1.B shows the FTIR data of the samples of pure alginate, Alg and Alg-AmB.

The wavelength band 3424 cm^{-1} present in all samples refers to the O-H stretching vibrations of the alginate. The weak band at 2930 cm^{-1} represents the stretching vibrations C-H; the bands 1630 and 1416 cm^{-1} are asymmetrical and symmetrical stretching vibrations of the CO=O group and the COO- group. Furthermore, the band around 1024 cm-1 refers to the vibrations of the ring elongation C=O and C=O, with deformations of C=C=H and C=O=H (LAROSA et al., 2018; RAVICHANDRAN; JAYAKRISHNAN, 2018).

In the Alg-AmB sample, the AmB wavelength bands were observed compare with the data from the literature where showed the following bands: OH stretching vibration (3434 cm^{-1}), CH flexion vibrations and CH_3 oscillation (1024 cm^{-1}) (FRANCIS; GURUDEVAN; JAYAKRISHNAN, 2018). The hypothesis was the other bands are overlapped by the alginate bands.

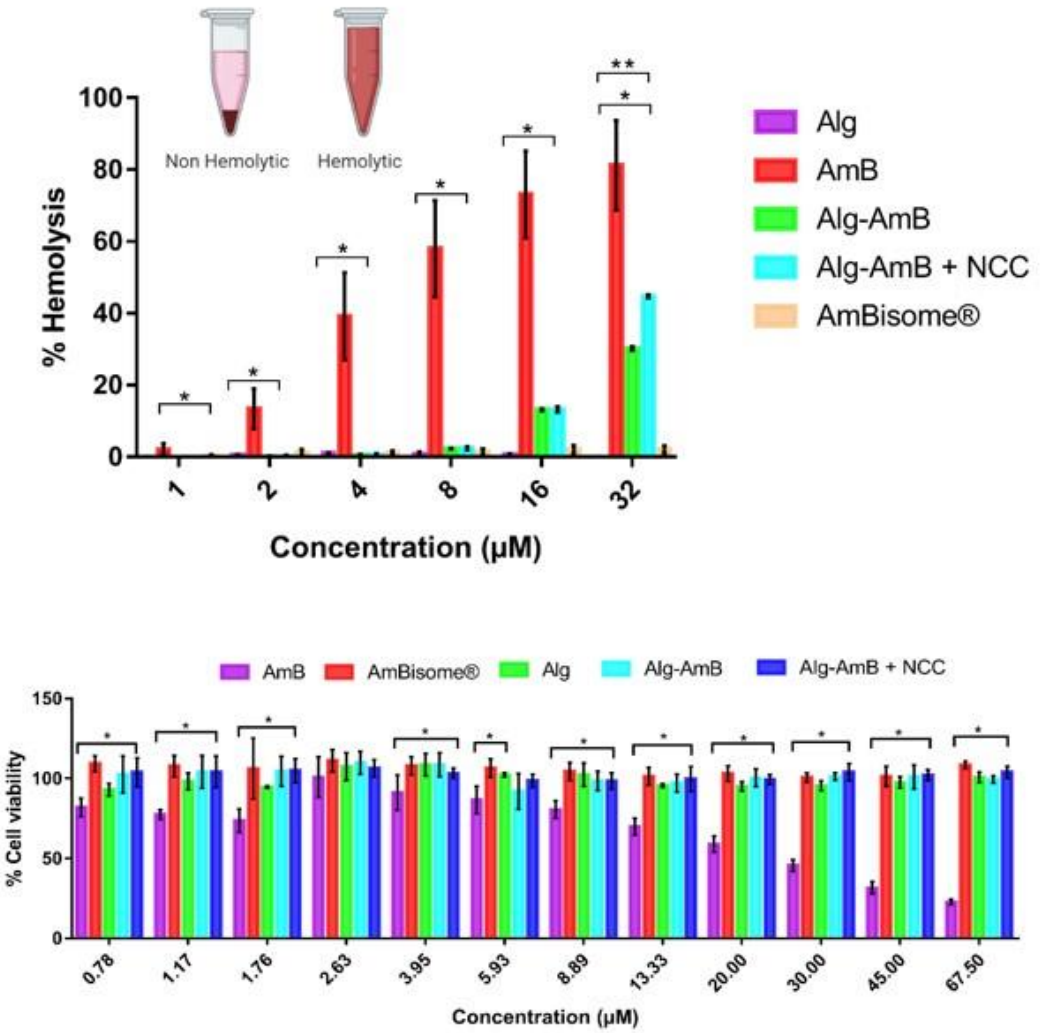
The Figure 1.C shows the UV-vis spectra of the AmB, Alg-AmB nanocomplex and Alg-AmB + NCC.

In this study, AmB was firstly dissolved in 0.1 M borate buffer pH 11 and then diluted in water exists in a monomeric state, as the ratio Abs_{349}/Abs_{410} was 0.36. Considering the Alg-AmB nanocomplex, peak I shifted to lower wavelength (327 nm) and the ratio between the peaks I and IV (Abs_{327}/Abs_{410}) was 4.38, showing AmB exists in a supper-aggregated state in the formulation, which, as referred above, is associated to a low toxicity. Despite promoting a decrease in the absorbance intensity, NCC addition to the nanocomplex surface does not affected the supper-aggregated state of AmB since it was observed a ratio of 4.45 (Abs_{327}/Abs_{409}).

In vitro toxicity

The hemolysis test was performed for the samples of AmB, Alg, Alg-AmB, Alg-AmB + NCC and AmBisome in concentrations of 1, 2, 4, 8, 16 and 32 µM (Figure 2.A).

Figure 2 – Percentage of hemolysis after treatment of red blood cells (A) Cytotoxicity of the renal cell line HEK293T (B) with Alg, Alg-AmB, Alg-AmB + NCC, AmBisome® and AmB.



Note: A – AmB (*) and Alg-AmB (**) were compared to the other groups by the Duncan test ($p<0,05$). B – AmB (*) was compared to the other groups by the Duncan test ($p<0.05$).

The standard sample of Alg showed insignificant values of hemolysis lower than 2%, in all concentration. In our results, AmB hemolysis showed results between 1.97 ± 1.66% and 81.18 ± 12.50%.

When was added alginate to the formulation (Alg-AmB), there was a decrease in toxicity of 90% compared to standard AmB, with hemolysis values from -0.08% to 30.25 ± 0.50%. When coated with NCC, the values were similar (-0.3 ± 0.19% and 44.7 ±

0.50%). Even at high concentrations, our sample reduce the rate of hemolysis in compare of standard AmB.

The hemolytic values observed in AmBisome® sample were 0.34 ± 0.33% and 2.13 ± 1%. Although AmBisome's hemolysis values are lower than those found in the Alg-AmB formulation, when compared with free AmB, there was a significant decrease, indicating a decrease in the hemolytic percentage in the sample due to the incorporation of incorporating AmB in alginate nanocomplexes.

In the Figure 2.B it is possible to observe the cytotoxicity data for the samples of AmB, Alg, Alg-AmB, Alg-AmB + NCC and AmBisome®.

The Alg showed cell viability between 93.01 ± 3.83% and 108.66 ± 7.04%. The AmB sample data indicated concentration-dependent toxicity. On the other hand, the Alg-AmB nanocomplexes demonstrated less toxicity than free AmB. Cell viability was high, ranging between 97.16 ± 5.61% and 109.86 ± 7.06%.

For the Alg-AmB + NCC nanocomplex, the cell viability values were similar to the sample without NCC, varying between 98.55 ± 5.06% and 106.40 ± 5.35%, demonstrating safety use of coating with NCC.

The cell viability found for AmBisome® was 101.40 ± 6.23% to 111.29 ± 6.92%. When comparing the results of the commercial sample, AmBisome® with the Alg-AmB and Alg-AmB + NCC nanocomplexes, there was no significant difference between them, indicating the nanocomplexes, with or without NCC, as safe as the commercial one.

Discussion

Physical-Chemical analyses

Taheri and Mohammadi (2015) (TAHERI; MOHAMMADI, 2015) utilized cellulose nanocrystals to cover a hydroquinone system and they demonstrated an increase in particle size. The way to obtain smaller particles is important, because expanding the routes of administration. Systems with polymers nanoparticles of size around 200 nm are absorbed by the spleen, lung and liver (GUPTA et al., 2015).

Therefore, the nanocomplexes method is capable of producing smaller particles than ionotropic gelification method. Senna et al. (2018) (SENNA et al., 2018) produced particles by ionotropic gelation and observed the production of particles of 1.2 ± 0.34

mm. Compared to our work, these particles were about 3 times larger than the nanocomplex coated by NCC.

One study with alginate particles containing miltefosine obtained by the ionotropic gelation and emulsification method showed a polydispersity index of 0.43 ± 0.14 (SPADARI et al., 2019), similar to the data found in our study.

Comparatively in another study, the zeta potential of alginate particles obtained by ionotropic gelation showed negative values in the range of -15.7 ± 1.7 and -9.8 ± 1.2 mV. However, when adding chitosan in the formulation, there was a change in zeta potential due to the coating (ADEBISI; CONWAY, 2013).

AmB is characterized by two endothermic peaks in its crystalline form (ZU et al., 2014), our AmB standard sample showed peaks at 167 °C (melting point) and 198 °C, similar to the temperatures found by these authors. The alginate sample showed an endothermic peak at 149 °C which demonstrates the degradation of the biopolymer (PATEL et al., 2017; SARMENTO et al., 2006).

Similar data to NCC data obtained by acid hydrolysis, with the peak in the range 140–195 ° C showed by (VASCONCELOS et al., 2017).

The absence of AmB peak indicates that there was a change from crystalline to amorphous state, demonstrating the formation and perfecting the alginate and AmB nanocomplexes (AL-QUADEIB et al., 2015).

In a study, the association of alginate with the polymer poly [N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide] and the drug camptothecin, the authors showed the characteristic peak of camptothecin was absent due to the drug being compatible with the polymers and its high dispersion in the formulation (MOHANRAJ; RAJIV, 2017).

The same condition occurred in a study whose objective was to use NCC as a reinforcement for a film containing polylactic acid, concluding there was an increase in crystallinity (WARDHONO; KANANI; RAHMAYETTY, 2019). George et al., 2011 reported the utilization of NCC associated with polymers and showed there was an increase in the parameters of glass transition, melting temperature, enthalpy and crystalline behaviour.

The degree of AmB aggregation can be determined by the ratio of the first to the fourth peak in the UV-Vis spectra, being a value of < 1 associated to the monomeric form and a value of > 2 to a supper-aggregated form (BARWICZ; CHRISTIAN; GRUDA, 1992; GUPTA et al., 2015; NISHI et al., 2007; RAVICHANDRAN; JAYAKRISHNAN, 2018). In solution, the AmB has three different states that affect its activity and

pharmacokinetical characteristics, such as monomers, in this state AmB is water soluble normally associates with ergosterol in fungal and protozoan cell membranes; oligomers, in this state small water aggregates are toxic towards host cells and present very low solubility; and poly-aggregates, that also referred as supper-aggregates present low *in vitro* and *in vivo* toxicity (NISHI et al., 2007; RAVICHANDRAN; JAYAKRISHNAN, 2018).

Toxicity study

Fungizone® and AmBisome® are drugs with low toxicity found in the pharmaceutical market. This is due to the super-aggregated state of amphotericin, showed values of the ratio of 2.9 and 4.8 (respectively), demonstrating that our nanocomplexes have similar data in relation to commercial formulations (GURUDEVAN; FRANCIS; JAYAKRISHNAN, 2018; MULLEN; CARTER, 1997).

The hemolysis test is important in studies with nanocomplexes or nanoparticles containing AmB, as there is evidence of hemolytic anemia caused by the use of free AmB (JAIN; KUMAR, 2010; VÁSQUEZ MARCANO et al., 2018).

About alginate sample, similar results were found by Silva-Carvalho et al. (2020), indicating the importance of using safe polysaccharides for the formation of the nanocomplex.

The AmB has a high hemotoxicity even at low concentrations, due to the aggregate conformation (VÁSQUEZ MARCANO et al., 2018). Conjugates and ionic cross-linked polymeric nanoparticles of AmB with alginate show less hemotoxicity and greater hemocompatibility than free AmB, possibly due to the protective effect of the polysaccharide and the change in conformation of the super-aggregated state (GUPTA et al., 2015; RAVICHANDRAN; JAYAKRISHNAN, 2018).

The importance of cytotoxicity test with this strain is due to the nephrotoxicity associated with the use of free AmB (GURUDEVAN; FRANCIS; JAYAKRISHNAN, 2018). Therefore, it is important to understand the behaviour of nanocomplexes in this type of cells.

The non-toxicity and the capacity for cell proliferation of alginate have already been described in the literature (GUPTA et al., 2015). In a study, the authors were utilized AmB solution from a concentration of 15.6 µg/mL and observed cell death in renal cells (FRANCIS; GURUDEVAN; JAYAKRISHNAN, 2018).

Ravichandran and Jayakrishnan, 2018 tested AmB and alginate conjugates to verify cytotoxicity and observed a decrease in toxicity compared to free AmB.

Conclusion

AmB is a model drug used as antileishmaniasis and antifungal, but it has a high cytotoxicity and hemolytic effect. When developing a nanocomplex, the great advantage is to direct the formulation to the drug's action sites. In our study, the development of an alginate nanocomplexes with AmB decreased the hemolytic and cytotoxic effect of the drug. In addition, coating the nanocomplexes with the NCC, produced by enzymatic way, brought additional protection to the system and without compromised the advantages attributed to the developed formulation, which can be considered a cost benefit, non-toxic and safe as the commercial one.

CONCLUSÃO

A hidrólise enzimática é uma alternativa para produção de NCC a partir de celulose bacteriana, sem gerar resíduos ao meio ambiente. Embora na literatura haja trabalhos similares ao desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa, a utilização de NCC produzidos por via enzimática é pouco explorada, o que torna o nosso trabalho inovador e diferencial.

A metodologia enzimática associada ao tratamento mecânico e com operações unitárias ideais foi capaz de melhorar as propriedades do NCC, além de manter o sistema mais estável.

A aplicação dos NCC em ambos os sistemas foi bem sucedida, sendo capaz de revestir a superfície tanto das partículas quanto dos nanocomplexos. Os NCC podem ser empregados como uma camada extra de proteção, trazendo mais estabilidade ao sistema e tornando-os aptos para a liberação controlada de medicamentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEBISI, A. O.; CONWAY, B. R. Preparation and characterisation of gastroretentive alginate beads for. **Journal of microencapsulation**, v. 31, n. 1, p. 58–67, 2013.

AHUJA, M.; BHATIA, M.; SAINI, K. Sodium alginate – arabinoxylan composite microbeads : preparation and characterization. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 46, n. 7, p. 645–653, 2016.

AKHLAGHI, S. P.; BERRY, R. C.; TAM, K. C. Surface modification of cellulose nanocrystal with chitosan oligosaccharide for drug delivery applications. **Cellulose**, v. 20, n. 4, p. 1747–1764, maio 2013.

AL-QUADEIB, B. T. et al. Stealth Amphotericin B nanoparticles for oral drug delivery : In vitro optimization. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 23, n. 3, p. 290–302, 2015.

ALEXIS, O. D. P.; GUANG, Y.; GUIARO, M. N. New Approach for Skin Repair by Using Bacterial Cellulose Altered with Paraffin and Porous Bacterial Cellulose based Scaffold with Alginate New Approach for Skin Repair by Using Bacterial Cellulose Altered with Paraffin and Porous Bacterial Cellulose base. **Journal of Analytical & Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 3, p. 6–12, 2017.

ALVES, T. F. R. et al. Intestinal Permeability Studies of Ibuprofen Solid Dispersion. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 40, n. 4, p. 546–554, 2018.

ARAIZA-CALAHORRA, A. et al. Pickering emulsion stabilized by protein nanogel particles for delivery of curcumin: Effects of pH and ionic strength on curcumin retention. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 10, n. 1, p. 83–96, 2017.

ARSERIM-UÇAR, D. K. et al. Characterization of Bacterial Cellulose Nanocrystals: Effect of Acid Treatments and Neutralization. **Food Chemistry**, p. 127597, 2020.

AZEREDO, H. M. C. et al. Bacterial Cellulose as a Raw Material for Food and Food Packaging Applications. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 3, p. 7, 2019.

BAI, W.; HOLBERY, Æ. J.; LI, Æ. K. A technique for production of nanocrystalline cellulose with a narrow size distribution. **Cellulose**, v. 16, p. 455–465, 2009.

BARWICZ, J.; CHRISTIAN, S.; GRUDA, I. Effects of the aggregation state of amphotericin B on its toxicity to mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, n. 10, p. 2310–2315, 1992.

BENAVIDES, S. et al. Development of alginate microspheres containing thyme essential oil using ionic gelation. **Food Chemistry**, v. 204, p. 77–83, 2016.

BERNDT, S. et al. Antimicrobial porous hybrids consisting of bacterial nanocellulose and silver nanoparticles. **Cellulose**, v. 20, n. 2, p. 771–783, 2013.

CHAUVE, G.; FRASCHINI, C.; JEAN, B. Separation of Cellulose Nanocrystals. In: **Handbook of green materials**. [s.l: s.n.]. p. 73–87.

CHEN, Y. et al. Surfactant-Free Emulsions with Erasable Triggered Phase Inversions. **Langmuir**, v. 32, n. 42, p. 11039–11042, 2016.

DANAEI, M. et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p. 57, 2018.

DE OLYVEIRA, G. M. et al. Bacterial Nanocellulose for Medicine Regenerative. **Journal of Nanotechnology in Engineering and Medicine**, v. 2, n. 3, p. 034001, 2011.

DEEPAK, S. N.; HARI, B. N. V. Optimization , Development and evaluation of Microemulsion for the release of combination of Guaifenesin and Phenylephrine. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, n. 09, p. 48–56, 2013.

DOMINGUES, A. A. et al. Interfacial properties of cellulose nanoparticles obtained from acid and enzymatic hydrolysis of cellulose. **Cellulose**, v. 23, n. 4, p. 2421–2437, 2016.

DUGAN, J. M.; GOUGH, J. E.; EICHHORN, S. J. Bacterial cellulose scaffolds and cellulose nanowhiskers for tissue engineering. **Nanomedicine**, v. 8, n. 2, p. 287–298, 2013.

ELAZZOUZI-HAFRAOUI, S. et al. The Shape and Size Distribution of Crystalline Nanoparticles Prepared by Acid Hydrolysis of Native Cellulose. **Biomacromolecules**, v. 9, p. 57–65, 2008.

ELMOTASEM, H.; FARAG, H. K.; SALAMA, A. A. A. In vitro and in vivo evaluation of an oral sustained release hepatoprotective caffeine loaded w/o Pickering emulsion formula – Containing wheat germ oil and stabilized by magnesium oxide nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 547, n. 1–2, p. 83–96, 2018.

FRANCIS, A. P.; GURUDEVAN, S.; JAYAKRISHNAN, A. **Synthetic polymannose as a drug carrier: synthesis, toxicity and anti-fungal activity of polymannose-amphotericin B conjugates**. [s.l.] Taylor & Francis, 2018. v. 29

FU, L. et al. Skin tissue repair materials from bacterial cellulose by a multilayer fermentation method. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 24, p. 12349, 2012.

GEORGE, J. et al. Bacterial cellulose nanocrystals exhibiting high thermal stability and their polymer nanocomposites. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, n. 1, p. 50–57, 2011.

GEORGE, J. et al. Hybrid HPMC nanocomposites containing bacterial cellulose nanocrystals and silver nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 105, n. 1, p. 285–292, 2014.

GEORGE, J.; SABAPATHI, S. N. Cellulose nanocrystals: Synthesis, functional properties, and applications. **Nanotechnology, Science and Applications**, v. 8, p. 45–54, 2015.

GEORGE, J.; SIDDARAMAIAH. High performance edible nanocomposite films containing bacterial cellulose nanocrystals. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 3, p. 2031–2037, 2012.

GORGIEVA, S.; TRČEK, J. Bacterial Cellulose : Production , Modification and Perspectives in Biomedical Applications. **Nanomaterials**, v. 9, n. 10, p. 1352, 2019.

GRAY, K. C. et al. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 7, p. 2234–2239, 2012.

GUPTA, P. K. et al. Self Assembled Ionically Sodium Alginate Cross-Linked Amphotericin B Encapsulated Glycol Chitosan Stearate Nanoparticles: Applicability in Better Chemotherapy and Non-Toxic Delivery in Visceral Leishmaniasis. **Pharmaceutical Research**, v. 32, n. 5, p. 1727–1740, 2015.

GURUDEVAN, S.; FRANCIS, A. P.; JAYAKRISHNAN, A. **Amphotericin B-albumin conjugates: Synthesis, toxicity and anti-fungal activity**. [s.l.] Elsevier B.V, 2018. v. 115

HABIBI, Y.; LUCIA, L. A.; ROJAS, O. J. Cellulose nanocrystals: Chemistry, self-assembly, and applications. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 6, p. 3479–3500, 2010.

HEDJAZI, S.; RAZAVI, S. H. A comparison of Canthaxanthine Pickering emulsions, stabilized with cellulose nanocrystals of different origins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 489–497, 2018.

IOELOVICH, M. Study of enzymatic hydrolysis of bacterial nanocellulose. **American Journal of BioScience**, v. 2, n. 1, p. 13–16, 2014.

JAIN, J. P.; KUMAR, N. Development of amphotericin B loaded polymersomes based on (PEG)3-PLA co-polymers: Factors affecting size and in vitro evaluation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 5, p. 456–465, 2010.

JIA, Y. et al. Surfactant-free emulsions stabilized by tempo-oxidized bacterial cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 907–915, 2016.

JOZALA, A. F. et al. Bacterial cellulose production by Gluconacetobacter xylinus by employing alternative culture media. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 3, p. 1181–1190, 2014.

JOZALA, A. F. et al. Bacterial nanocellulose production and application: a 10-year overview. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 5, p. 2063–2072, 2016.

JUÁREZ-LUNA, G. N. et al. Enzymatically assisted isolation of high-quality cellulose nanoparticles from water hyacinth stems. **Carbohydrate Polymers**, v. 220, n. May, p. 110–117, 2019.

KALASHNIKOVA, I. ET AL. Modulation of cellulose nanocrystals amphilic properties to stabilize oil/water interface (supporting info). **Biomacromolecules**, v. 13, n. 1, p. 267–275, 2012.

KALASHNIKOVA, I. et al. New Pickering emulsions stabilized by bacterial cellulose nanocrystals. **Langmuir**, v. 27, n. 12, p. 7471–9, 2011.

KALASHNIKOVA, I. et al. Cellulosic nanorods of various aspect ratios for oil in water Pickering emulsions. **Soft Matter**, v. 9, n. 3, p. 952–959, 2013.

KALE, S. N.; DEORE, S. L. Emulsion Micro Emulsion and Nano Emulsion : A Review. **Systematic Reviews in Pharmacy**, v. 8, n. 1, p. 39–47, 2017.

KASSEM, A. A. et al. Development of mucoadhesive microbeads using thiolated sodium alginate for intrapocket delivery of resveratrol. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 487, n. 1–2, p. 305–313, 2015.

KLEMM, D. et al. Nanocelluloses: A new family of nature-based materials. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 50, n. 24, p. 5438–5466, 2011.

LAREDJ-BOUREZG, F. et al. Pickering emulsions stabilized by biodegradable block copolymer micelles for controlled topical drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 531, n. 1, p. 134–142, 2017.

LAROSA, C. et al. International Journal of Biological Macromolecules Characterisation of bare and tannase-loaded calcium alginate beads by microscopic , thermogravimetric , FTIR and XRD analyses. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 115, p. 900–906, 2018.

LEE, J.; CHENG, Y. Critical freezing rate in freeze drying nanocrystal dispersions. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 111, n. 1–2, p. 185–92, mar. 2006.

LYU, B. et al. Preparation and application of castor oil/nano-TiO2 composite fatliquoring agent via a Pickering emulsion method. **Journal of Cleaner Production**, v. 126, p. 711–716, 2016.

MARTÍNEZ-GÓMEZ, F. et al. In vitro release of metformin hydrochloride from sodium alginate / polyvinyl alcohol hydrogels. **Carbohydrate Polymers**, v. 155, p. 182–191, 2017.

MARTÍNEZ-SANZ, M.; LOPEZ-RUBIO, A.; LAGARON, J. M. Optimization of the nanofabrication by acid hydrolysis of bacterial cellulose nanowhiskers. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 1, p. 228–236, 2011.

MARTINS, D. et al. A dry and fully dispersible bacterial cellulose formulation as a stabilizer for oil-in-water emulsions. **Carbohydrate Polymers**, v. 230, n. July 2019, p. 115657, 2020.

MOHANRAJ, S.; RAJIV, S. Preparation and characterization of camptothecin-loaded alginate/poly[N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide] hydrogel beads for anticancer treatment. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 66, n. 15, p. 781–790, 2017.

MORAIS, A. R. DO V. et al. In-vitro and in-vivo antileishmanial activity of inexpensive Amphotericin B formulations: Heated Amphotericin B and Amphotericin B-loaded microemulsion. **Experimental Parasitology**, v. 192, p. 85–92, 2018.

MULLEN, A. B.; CARTER, K. C. Comparison of the Efficacies of Various

Formulations of Amphotericin B against Murine Visceral Leishmaniasis. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, v. 41, n. 10, p. 2089–2092, 1997.

NAGASHIMA, A.; TSUJI, T.; KONDO, T. A uniaxially oriented nanofibrous cellulose scaffold from pellicles produced by Gluconacetobacter xylinus in dissolved oxygen culture. **Carbohydrate Polymers**, v. 135, p. 215–224, 2016.

NG, W. Y. et al. Monoolein-alginate beads as a platform to promote adenosine cutaneous localization and wound healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 1104–1111, 2017.

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

NISKANEN, I. et al. Determining the complex refractive index of cellulose nanocrystals by combination of Beer-Lambert and immersion matching methods. **Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer**, v. 235, p. 1–6, 2019.

PATEL, M. A. et al. The effect of ionotropic gelation residence time on alginate cross-linking and properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 155, p. 362–371, 2017.

PATEL, M. C. G. T. M. Compatibility study of quetiapine fumarate with widely used sustained release excipients. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry volume**, v. 111, p. 2103–2108, 2013.

PATEL, V. R. et al. Castor oil: Properties, uses, and optimization of processing parameters in commercial production. **Lipid Insights**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2016.

PIRICH, C. L. et al. Piezoelectric immunochip coated with thin films of bacterial cellulose nanocrystals for dengue detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 92, n. February, p. 47–53, 2017.

QIU, K.; NETRAVALI, A. N. A review of fabrication and applications of bacterial cellulose based nanocomposites. **Polymer Reviews**, v. 54, n. 4, p. 598–626, 2014.

QIU, Y. et al. Bacterial cellulose and bacterial cellulose-vaccarin membranes for wound healing. **Materials Science and Engineering C**, v. 59, p. 303–309, 2016.

RAVICHANDRAN, V.; JAYAKRISHNAN, A. Synthesis and evaluation of anti-fungal activities of sodium alginate-amphotericin B conjugates. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 1101–1109, 2018.

REINIATI, I.; HRYMAK, A. N.; MARGARITIS, A. Recent developments in the production and applications of bacterial cellulose fibers and nanocrystals. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, n. 4, p. 510–524, 2017.

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.

ROVERA, C. et al. Enzymatic hydrolysis in the green production of bacterial cellulose nanocrystals. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 6, n. 6, p. 7725–7734, 2018.

RUKA, D. R.; SIMON, G. P.; DEAN, K. M. Altering the growth conditions of Gluconacetobacter xylinus to maximize the yield of bacterial cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 2, p. 613–622, 2012.

SANTAGAPITA, P. R.; MAZZOBRE, M. F.; BUERA, P. Invertase stability in alginate beads Effect of trehalose and chitosan inclusion and of drying methods. **FRIN**, v. 47, n. 2, p. 321–330, 2012.

SARMENTO, B. et al. Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, p. 1–7, 2006.

SENNA, J. P. et al. Dual alginate-lipid nanocarriers as oral delivery systems for amphotericin B. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 32, n. 5, p. 187–194, 2018.

SERRANO, D. R. et al. Hemolytic and pharmacokinetic studies of liposomal and particulate amphotericin B formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 447, n. 1–2, p. 38–46, 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.

SILVA-CARVALHO, R. et al. Development of dextrin-amphotericin B formulations for the treatment of Leishmaniasis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 153, p. 276–288, 2020.

SOUSA, G. D. et al. Biopharmaceutical Assessment and Irritation Potential of Microemulsions and Conventional Systems Containing Oil from Syagrus cearensis for Topical Delivery of Amphotericin B Using Alternative Methods. **AAPS PharmSciTech**, v. 18, n. 5, p. 1833–1842, 2017.

SPADARI, C. DE C. et al. Alginate nanoparticles as non-toxic delivery system for miltefosine in the treatment of candidiasis and cryptococcosis. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 5187–5199, 2019.

SULAEVA, I. et al. Bacterial cellulose as a material for wound treatment: Properties and modifications: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1547–1571, 2015.

SY, P. M. et al. Pickering nano-emulsion as a nanocarrier for pH-triggered drug release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 549, n. 1–2, p. 299–305, 2018.

TAHERI, A.; MOHAMMADI, M. The use of cellulose nanocrystals for potential application in topical delivery of hydroquinone. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 86, n. 1, p. 882–886, 2015.

THI, N. et al. Fabrication of alginate microspheres for drug delivery : A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 153, p. 1035–1046, 2020.

TORRADO, J. J. et al. Amphotericin B Formulations and Drug Targeting. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 97, n. 7, p. 2405–2425, 2008.

VASCONCELOS, N. F. et al. Bacterial cellulose nanocrystals produced under different hydrolysis conditions: Properties and morphological features. **Carbohydrate Polymers**, v. 155, p. 425–431, 2017.

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

WANG, J. et al. Fabrication of monodisperse drug-loaded poly(lactic-co-glycolic acid)–chitosan core-shell nanocomposites via pickering emulsion. **Composites Part B: Engineering**, v. 121, p. 99–107, 2017.

WARDHONO, E. Y.; KANANI, N.; RAHMAYETTY, A. &. Development of polylactic acid (PLA) bio- composite films reinforced with bacterial cellulose nanocrystals (BCNC) without any surface modification. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 0, n. 0, p. 1–8, 2019.

WU, Z. Y. et al. Bacterial Cellulose: A Robust Platform for Design of Three Dimensional Carbon-Based Functional Nanomaterials. **Accounts of Chemical Research**, v. 49, n. 1, p. 96–105, 2016.

YAMADA, Y. et al. Description of Komagataeibacter gen. nov., with proposals of new combinations (Acetobacteraceae). **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 58, n. 5, p. 397–404, 2012.

YAN, H. et al. Synthesis of bacterial cellulose and bacterial cellulose nanocrystals for their applications in the stabilization of olive oil pickering emulsion. **Food Hydrocolloids**, v. 72, p. 127–135, 2017.

YAN, H. et al. A novel and homogeneous scaffold material: preparation and evaluation of alginate/bacterial cellulose nanocrystals/collagen composite hydrogel for tissue engineering. **Polymer Bulletin**, v. 75, n. 3, p. 985–1000, 2018a.

YAN, H. et al. A novel and homogeneous scaffold material: preparation and evaluation of alginate/bacterial cellulose nanocrystals/collagen composite hydrogel for tissue engineering. **Polymer Bulletin**, v. 75, n. 3, p. 985–1000, 2018b.

YAN, H. et al. Biointerfaces Entrapment of bacterial cellulose nanocrystals stabilized Pickering emulsions droplets in alginate beads for hydrophobic drug delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 177, p. 112–120, 2019.

YI, T. et al. A new drug nanocrystal self-stabilized Pickering emulsion for oral delivery of silybin. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, p. 420–427, 2017.

ZHANG, J. et al. Development of an oral compound pickering emulsion composed of nanocrystals of poorly soluble ingredient and volatile oils from traditional chinese

medicine. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 4, p. 1. – 13, 2018.

ZHONG, C. et al. Metabolic flux analysis of Gluconacetobacter xylinus for bacterial cellulose production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 14, p. 6189–6199, 2013.

ZU, Y. et al. Preparation and characterization of amorphous amphotericin B nanoparticles for oral administration through liquid antisolvent precipitation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 53, n. 1, p. 109–117, 2014.