



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
LABORATÓRIO DE POLÍMEROS

ÉRICO DE MOURA NETO

SÍNTESE DE NANOPÁTICULAS DA GALACTOMANANA DA FAVA DANTA
(*Dimorphandra gardneriana*) MODIFICADA

FORTALEZA

2013

ÉRICO DE MOURA NETO

**SÍNTESE DE NANOPATÍCULAS DA GALACTOMANANA DA FAVA DANTA
(*Dimorphandra gardneriana*) MODIFICADA**

**Tese submetida à coordenação do
programa de Pós-Graduação em
Química da Universidade Federal
do Ceará como requisito parcial
para a obtenção do grau de Doutor
em Química.**

**Orientadora: Professora Dra.
Regina Célia Monteiro de Paula**

**Co-Orientadora: Professora Dra.
Jeanny da Silva Maciel**

FORTALEZA

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

M888s Moura Neto, Érico de.
 Síntese de nanopátículas da galactomanana da fava danta (*dimorphandra gardneriana*) modificada /
Érico de Moura Neto. - 2013
 132 f. : il., color., enc. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2013.

Área de Concentração: Química.


Orientação: Profa. Dra. Regina Célia Monteiro de Paula.

Co-orientação: Profa. Dra. Jeanny da Silva Maciel.


1. Quitosana. 2. Nanopartículas. 3. Base de *Schiff*. 4. Auto-organização. I. Título.

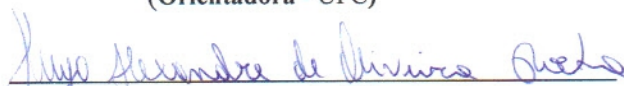
CDD 546

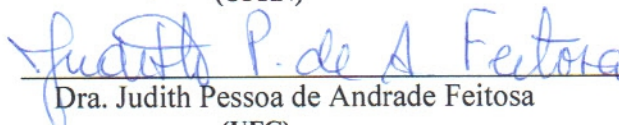
Esta Tese foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Doutor em Química, área de concentração Química, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e em cuja Biblioteca Central encontra-se à disposição dos interessados.



Érico de Moura Neto

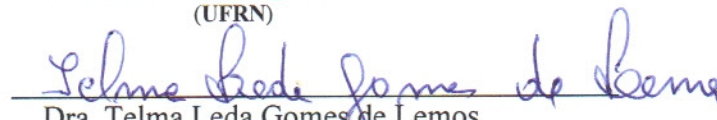
Tese aprovada em: 15/05/2013


Dra. Regina Célia Monteiro de Paula
(Orientadora - UFC)


Dr. Hugo Alexandre de Oliveira Rocha
(UFRN)


Dra. Judith Pessoa de Andrade Feitosa
(UFC)


Dra. Márcia Rodrigues Pereira
(UFRN)


Dra. Telma Leda Gomes de Lemos
(UFC)

Os filósofos limitaram-se a interpretar o mundo de diversas maneiras; o que importa é modificá-lo.

Karl Marx

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais, Érico e Maria Rosália e minhas queridas irmãs, Rubiane, Rejaine, Izabella e minhas sobrinhas Izadora e Bárbara, por todo esforço, carinho, dedicação amor, incentivo, que mesmo à distância sempre estiveram tão presentes.

À toda a minha família, avós, tias, tios, primos e primas que mesmo distante sempre demonstraram seu carinho e confiança na minha escolha.

Às minhas amigas Dalgiza e Tia Terezinha por nunca deixarem de incentivar o sonho da pós-graduação.

À minha orientadora Regina Célia Monteiro de Paula por todos os momentos de orientação e dedicação que proporcionaram a realização deste trabalho.

À minha co-orientadora Jeanny da Silva Maciel por todos os momentos desde a época do mestrado.

Às professoras Judith Feitosa e Pablyanna Cunha por todas as contribuições tão fundamentais para a construção deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Polímeros, em especial à diretoria (Ana Paula, Guilherme, Janaina e Paulo), por todas as ocasiões inesquecíveis e principalmente pelos momentos de distração.

À Ana Rosa, ao Venícios e a Natália pela ajuda durante todas as etapas deste trabalho.

Ao CENAURENM pelos espectros de ressonância magnética nuclear.

À CAPES, FUNCAP, CNPQ, rede Nanoglicobiotec e INOMAT pelo auxílio financeiro ao projeto.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo a preparação de nanopartículas de derivados da galactomanana. O polissacarídeo (galactomanana) foi extraído de sementes da *Dimorphandra gardneriana* com rendimento de $29\pm 3\%$ e razão manose/galactose (M:G) de $1,93\pm 0,02$. A galactomanana foi modificada por reação de sulfatação (FDS), oxidação (FDO) e por acilação com anidrido acético (FDAc) e com anidrido propiônico (FDPr). Os derivados foram utilizados no desenvolvimento de nanopartículas por interação com a quitosana via complexação polieletrólítica, por formação de base de *Schiff*, e por auto-organização. Os derivados da galactomanana foram caracterizados por espectroscopia na região do infravermelho (IV), por ressonância magnética nuclear, por análise elementar, por cromatografia de permeação em gel e por viscosidade intrínseca. O grau de substituição para reação de sulfatação foram 0,32 e 0,42. A razão de unidades glicosídicas/unidades oxidadas para os derivados oxidados foram 10:2; 10:4 e 10:8. Os derivados hidrofóbicos foram confirmados pelo aparecimento de uma nova absorção em 1740 cm^{-1} no IV, atribuída ao estiramento C=O e a insolubilidade em água. Nanopartículas com perfil unimodal foram obtidas nas três rotas estudadas. As partículas de quitosana e galactomanana sulfatada foram obtidas por complexação polieletrólítica com diâmetros variando de 10 ± 6 a 377 ± 29 nm, índice de polidispersividade de $0,11\pm 0,02$ a $0,5\pm 0,1$ e potencial zeta de -28 ± 2 a 59 ± 4 mV. Para as de quitosana e galactomanana oxidada obtidas via base de *Schiff* com diâmetros variando de 8 ± 2 a 20 ± 9 nm, índice de polidispersividade de $0,36\pm 0,04$ a $0,57\pm 0,08$ e potencial zeta de $0,4\pm 0,5$ a 14 ± 1 mV. Partículas de galactomanana modificadas hidrofobicamente foram obtidas via auto-organização com diâmetros variando de $35,3\pm 0,6$ a 213 ± 28 nm, índice de polidispersividade de $0,093\pm 0,003$ a $0,9\pm 0,1$ e potencial zeta de $-26,3\pm 0,9$ a -3 ± 2 mV. O diâmetro, potencial zeta e índice de polidispersividade são influenciados pela metodologia e derivado utilizado, mas para todos os derivados da galactomanana obteve-se, em pelo menos uma condição, nanopartículas compatíveis para um potencial uso como carreadores de fármacos. Fatores como: grau de modificação, razão, ordem de adição e concentração dos polissacarídeos, pH e a adição de fármaco influenciaram no

tamanho, índice de polidispersividade, potencial zeta e estabilidade em solução das partículas.

Palavras-chave: Nanopartículas. Galactomanana. Quitosana. Complexo Polieletrólítico. Base de *Schiff*. Auto-Organização.

ABSTRACT

This work aimed the preparation of nanoparticles galactomannan derivatives. The polysaccharide (galactomannan) was from seeds of *Dimorphandra gardneriana* with yield of $29\pm 3\%$ and mannose/galactose ratio (M:G) of 1.93 ± 0.02 . The galactomannan was modified by sulfation reaction (FDS), oxidation (FDO) and by acylation with acetic anhydride (FDAc) and propanoic (FDPr) and derivatives were used in the development of nanoparticles by interaction with chitosan by polyelectrolyte complexes, Schiff base formation and by self-assembled. Galactomannan derivatives were characterized by infrared spectroscopy (IR), nuclear magnetic resonance, elemental analysis, gel permeation chromatography and intrinsic viscosity. The degree of substitution for sulfation reaction were 0.32 and 0.42; the ratio of glycosidic/oxidized units in oxidized derivatives was 10:2; 10:4 and 10:8. The hydrophobic derivatives were confirmed by the appearance of new absorption at 1740 cm^{-1} in IR, assigned to C=O stretching and water insolubility. Nanoparticles with unimodal profile were obtained on three routes studied. The particles of chitosan and sulfated galactomannan were obtained by complexation polyelectrolytic with diameters ranging from 10 ± 6 to 377 ± 29 nm, polydispersity index from 0.11 ± 0.02 to 0.5 ± 0.1 and zeta potential of -28 ± 2 to 59 ± 4 mV. For chitosan and oxidized galactomannan nanoparticles, obtained by Schiff base, diameters ranging from 8 ± 2 to 20 ± 9 nm, polydispersity index from 0.36 ± 0.04 to 0.57 ± 0.08 and zeta potential of 0.4 ± 0.5 to 14 ± 1 mV were obtained. Hydrophobically modified galactomannan particles were obtained by self-assembled with diameters ranging from 35.3 ± 0.6 to 213 ± 28 nm, polydispersity index from 0.093 ± 0.003 to 0.9 ± 0.1 and zeta potential of -26.3 ± 0.9 to -3 ± 2 mV. The diameter, zeta potential and polydispersity index are influenced by the methodology and derived used, but for all derivatives of galactomannan at least one condition shows nanoparticles compatible for potential use as drug carriers. Factors such as degree of modification, ratio, order of addition and concentration of polysaccharides, pH and addition of drug have influence on size, polydispersity index, zeta potential and solution stability of the particles.

Keywords: Nanoparticles. Galactomannan. Chitosan. Polyelectrolytic complexes. Schiff base. Self-Assembled.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeito do tamanho da nanopartícula nas propriedades do sistema carreador de fármaco.....	17
Tabela 2 - Nanopartículas de quitosana preparadas via complexação polietrolítica....	22
Tabela 3 – Polissacarídeos modificados hidrofobicamente e o diâmetro das nanopartículas obtidas por auto-organização.....	27
Tabela 4 – Concentrações mínimas recomendadas para análise de tamanho de partícula.....	36
Tabela 5 – Dados experimentais da reação de sulfatação da galactomanana.....	44
Tabela 6 – Dados experimentais da reação de oxidação da galactomanana.....	44
Tabela 7 – Dados experimentais da reação de acilação da galactomanana da favadanta.....	46
Tabela 8 – Sinais de ^1H (ppm) para a galactomanana da <i>Dimorphandra Gardneriana</i>	52
Tabela 9 – Efeito da concentração do ácido monoclorosulfônico na reação de sulfatação da galactomanana.....	53
Tabela 10 – Comparação entre as condições da sulfatação e as características dos derivados de polissacarídeos obtidos.....	54
Tabela 11 – Efeito da quantidade de periodato na porcentagem de oxidação da galactomanana.....	61
Tabela 12 – Dados experimentais das alturas relativas de absorções para FD e derivados.....	66
Tabela 13 – Dados experimentais do rendimento das reações de acilação para FD e derivados.....	68
Tabela 14 – Dados experimentais do teste de solubilidade.....	69
Tabela 15 – Concentração de Associação Crítica para os derivados hidrofóbicos.....	72
Tabela 16 – Diâmetro (d) e Índice de Polidispersão (IPd) para as partículas obtidas via auto-organização da galactomanana modificada com anidrido propiônico (FDPr).....	97

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química parcial das galactomananas, manose (M) e galactose (G).	4
Figura 2 – (a) Vagens e (b) sementes da Fava Danta; (c) galactomanana extraída das sementes da Fava Danta.....	5
Figura 3 - Unidades repetitivas da quitosana 100% desacetilada (1) e quitina (2).....	7
Figura 4 – Ilustração esquemática da quitosana. Em pH baixo (abaixo de 6,0), grupos aminos da quitosanas estão protonados, conferindo comportamento policatiónico a quitosana. Em pH alto (acima de 6,5), aminas da quitosana estão desprotonada e reativas.	8
Figura 5 – Sulfatação de polissacarídeo com ácido monoclorsulfônico em piridina..	9
Figura 6 – Mecanismo para a reação de sulfatação de uma unidade glicosídica.	10
Figura 7 – Seletividade da reação de periodato de sódio com unidades de açúcar substituídas em diferentes posições.....	12
Figura 8 – Esquema da reação seletiva de oxidação de uma unidade de glucose da cadeia lateral de um polissacarídeo.	13
Figura 9 – Mecanismo da reação de acilação de uma manose da cadeia principal de uma galactomanana com anidrido acético.....	14
Figura 10 – Domínios de tamanho e representante típicos de coloides naturais e nanopartículas.	15
Figura 11 - Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido a parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas.....	17
Figura 12 – Representações estruturais da molécula de agentes reticulantes.	19
Figura 13 – Reticulação covalente da quitosana com um ácido dicarboxílico.....	20
Figura 14 – Representação estrutural do ânion tripolifosfato.	20
Figura 15 – Esquema da interação entre as cadeias de quitosana (polieletrólito catiônico) e um polieletrólito aniônico.....	23
Figura 16 – Estrutura e intumescimento sensível ao pH do meio de um complexo contendo quitosana. Carga negativa do outro polieletrólito (-); carga positiva da	

quitosana (+); interação iônica (○); quitosana (—); polieletrólito adicional (—).	24
Figura 17 – Representação esquemática de sistemas de liberação de fármacos formados por diferentes formas de auto-organização de polissacarídeos anfifílicos em solução aquosa. *Domínio hidrofóbico devido à associação dos grupos hidrofóbicos.	25
Figura 18 – N-acilação química da quitosana usando (a) cloreto de acila ou anidrido de cadeia linear, (b) ácido carboxílico na presença de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) e (c) anidrido de cadeia cíclica.	26
Figura 19 - Modelo de reação de formação de Base de <i>Schiff</i>	28
Figura 20 – Representação da estabilização (a) estérica e (b) eletrostática das nanopartículas.	30
Figura 21 – Princípio da esfera equivalente: esfera de mesmo volume. Esfera de diâmetro igual a 39 µm tem o mesmo volume de uma partícula cilíndrica de diâmetro e comprimentos iguais a 20 e 100 µm, respectivamente.....	32
Figura 22 – Diâmetros equivalentes para uma mesma partícula.	32
Figura 23 – Gráficos de distribuição de tamanho por número, volume e intensidade versus intensidade do sinal.....	35
Figura 24 – Esquema da dupla camada elétrica.	38
Figura 25 – Esquema de distribuição iônica ao redor de uma partícula carregada negativamente.	38
Figura 26 – Espectro na Região do Infravermelho para a galactomanana da fava danta (FD).	51
Figura 27 – Espectro de RMN ¹ H a 70°C em D ₂ O da fava danta.....	52
Figura 28 – Cromatograma para a galactomanana da fava danta (FD).	52
Figura 29 – Espectro na Região do Infravermelho para a galactomanana da fava danta (FD) e seus derivados sulfatados (FDS1 e FDS2).....	56
Figura 30 – Espectro de RMN ¹ H (a), ¹³ C BB (b) e ¹³ C DEPT (c) a 70°C em D ₂ O da fava danta sulfatada (FDS1).	57
Figura 31 – Cromatograma de GPC para soluções aquosas 0,1% m/v da galactomanana (FD) e dos derivados sulfatados (FDS) em fase móvel de NaNO ₃ 0,1 mol/L.	59
Figura 32 – Curvas de viscosidade para as soluções aquosas a 1% (m/v) de FD, FDS1 e FDS2, a 25 °C.....	60

Figura 33 – Espectro na região do infravermelho para FD e derivados oxidados (FDO).	61
Figura 34 – Espectro de RMN ¹ H a 70°C em D ₂ O da FDO10:4.	62
Figura 35 – Formação de um hemiacetal intra-residual.	63
Figura 36 – Cromatograma de GPC para soluções aquosas 0,1% m/v da galactomanana (FD) e dos derivados oxidados (FDO) em fase móvel de NaNO ₃ 0,1 mol/L.	63
Figura 37 – Espectro na região do infravermelho para a galactomanana e derivados: a) obtidos com anidrido propiônico e b) obtidos com anidrido acético.	65
Figura 38 – Gráfico do grau de substituição em função das condições reacionais dos derivados: ■ Derivados propiônicos; ○ Derivados acéticos.	67
Figura 39 – Estrutura química do pireno.	69
Figura 40 – Espectro de Fluorescência de excitação do pireno (6,0x10 ⁻⁷ mol/L) <i>versus</i> a concentração das nanopartículas dos derivados com anidrido propiônico ($\lambda_{em} = 390$ nm).....	70
Figura 41 – Espectro de Fluorescência de excitação do pireno (6,0x10 ⁻⁷ mol/L) <i>versus</i> a concentração das nanopartículas dos derivados com anidrido acético ($\lambda_{em} = 390$ nm).	71
Figura 42. Gráficos da intensidade da razão I_{337} / I_{334} do espectro de excitação do pireno <i>versus</i> logaritmo da concentração dos derivados em água.	72
Figura 43 – Perfil de distribuição de tamanho para as nanopartículas via complexação polieletrólítica de soluções 0,025% m/V de QT e FDS2 (**P<0,05 QT FDS2) e (*P<0,05 FDS2QT).	74
Figura 44 – Gráfico de índice de polidispersividade (a) e potencial zeta (b) <i>versus</i> razão n^+/n^- para nanopartículas QT e FDS2 de concentração 0,025% (m/V): (■) QT FDS2 e (○) FDS2QT. IPd ***P<0,05 – QT FDS2 e P>0,05 – FDS2QT e P ζ ***P<0,05.	75
Figura 45 – a) QT envolvendo toda a extensão da molécula da galactomanana produzindo núcleos neutros, compactos e superfície carregada. b) QT envolvendo muitas moléculas da galactomanana permanecendo no núcleo cargas isoladas causando repulsão. c) Após a completa interação entre cargas NH ₃ ⁺ e SO ₃ ⁻ , segmentos de quitosana podem recobrir a nanopartícula.	76
Figura 46 – Esquema ilustrativo de um modelo para formação de complexos polieletrólíticos de galactomanana sulfatada (poliânion) e quitosana (policátion), em diferentes razões de carga n^+/n^- (K).	78

Figura 47 – Perfil de distribuição de tamanho para as nanopartículas via complexação polieletrólítica de QT e FDS1 (**P<0,05 QTFDS1 e FDS1QT).....	79
Figura 48 – Gráfico de diâmetro versus razão n ⁺ /n ⁻ . Efeito do grau de sulfatação para as nanopartículas de soluções 0,025% m/V de QT e FDS: (■) FDS1 e (○) FDS2 (**P<0,05 QTFDS1, FDS1QT e QTFDS2) e (*P<0,05 FDS2QT).	80
Figura 49 – Gráfico de diâmetro versus ordem de adição dos polieletrólitos. Efeito da concentração nas nanopartículas de QT e FDS (**P<0,05).	81
Figura 50 – Gráfico de diâmetro versus tempo para as diferentes razões n ⁺ /n ⁻ para as nanopartículas de QT e FDS2 de concentração 0,025% (m/V) (P>0,05).	82
Figura 51 – Gráfico do diâmetro versus pH para as nanopartículas de soluções 0,025% m/V de QT e FDS2: (■) QTFDS2 e (○) FDS2QT na razão de cargas n ⁺ /n ⁻ = 1 (**P<0,05).....	83
Figura 52 – Estrutura química da primaquina.....	84
Figura 53 - Gráfico do diâmetro para as nanopartículas na razão de cargas n ⁺ /n ⁻ = 0,1. FDS2QT sem fármaco e FDS2QTP com fármaco.....	84
Figura 54 – Perfil de distribuição de tamanho para as nanopartículas via base de Schiff de soluções 0,1% m/V de QT e FDO10:4 (P>0,05).....	85
Figura 55 – Gráfico de índice de polidispersividade (a) (**P<0,05) e potencial zeta (b) (*P<0,05) versus razão molar –NH ₂ /–CHO para nanopartículas de QT e FDO10:4: (■) QTFDO e (○) FDOQT de concentração 0,1% (m/V).	87
Figura 56 – Perfil de distribuição de tamanho para as nanopartículas via base de Schiff de QT e FDO (P>0,05).	88
Figura 57 – Gráfico de diâmetro versus ordem de adição dos polissacarídeos. Efeito da concentração nas nanopartículas de QT e FDO10:4. Razão 0,1 e 10 (*P<0,05) e Razão 1 (P>0,05).....	89
Figura 58 – Gráfico do índice de polidispersividade versus razão –NH ₂ /–CHO. Efeito da concentração (■) 0,01% m/V e (○) 0,1% m/V para as nanopartículas de QT e FDO. QTFDO (**P<0,05) e FDOQT (*P<0,05).....	90
Figura 59 – Gráfico do potencial zeta versus razão –NH ₂ /–CHO. Efeito da concentração (■) 0,01% m/V e (○) 0,1% m/V para as nanopartículas de QT e FDO (**P<0,05).....	91
Figura 60 – Gráfico de diâmetro das nanopartículas de QT e FDO em função do tempo. Ordem de adição: QTFDO10:4 Razão 0,1; 1; 10 (P>0,05) e FDOQT Razão 0,1; 1; 10 (P>0,05); Razão 10 (**P<0,05).....	92

Figura 61 – Foto das amostras. a) Solução de QT com PRI e b) Suspensão após gotejamento de FDO e formação da base de <i>Schiff</i> .	92
Figura 62 - Gráfico do diâmetro para as nanopartículas na razão molar $-NH_2/-CHO = 0,1$. FDOQT sem fármaco e FDOQTP com fármaco.	93
Figura 63 – Perfil de distribuição de tamanho para as nanopartículas via auto-organização de derivados da galactomanana com anidrido propiônico (FDPr) após diálise (**P<0,05).	94
Figura 64 – Gráfico de índice de polidispersividade versus derivados hidrofóbicos com anidrido propiônico (■) FDPr (**P<0,05).	94
Figura 65 – Gráfico do potencial zeta versus derivados hidrofóbicos com anidrido propiônico (■) FDPr (**P<0,05).	95
Figura 66 – Perfil de distribuição de tamanho para as nanopartículas via auto-organização de derivados da galactomanana com anidrido propiônico (FDPr), razão goma:piridina:anidrido (■) 1:3:12, (○) 1:3:15, (▲) 1:6:12 e (◇) 1:6:15 após diálise e filtração (**P<0,05).	96
Figura 67 – Gráfico de diâmetro versus concentração para os derivados hidrofóbicos com anidrido propiônico FDPr (**P<0,05).	98
Figura 68 – Espectro na região do infravermelho para a primaquina difosfato e a primaquina livre de fosfato.	98
Figura 69 - Gráfico do diâmetro para as nanopartículas de galactomanana modificada com anidrido propiônico (FDPr1:6:12) sem fármaco e com fármaco.	99
Figura 70 – Perfil de distribuição de tamanho para as nanopartículas via auto-organização de galactomanana modificada com anidrido acético FDAc, razão goma:piridina:anidrido (■) 1:3:12, (○) 1:3:15, (▲) 1:6:12 e (◇) 1:6:15 (**P<0,05)	100
Figura 71 – Gráfico de diâmetro versus derivados hidrofóbicos com (■) anidrido acético FDAc e (○) com anidrido propiônico FDPr (**P<0,05).	101
Figura 72 – Efeito da secagem. Gráfico de diâmetro para os derivados hidrofóbicos com anidrido acético (FDAc) e anidrido propiônico FDPr.	102
Figura 73 – Gráfico de diâmetro das nanopartículas de galactomananas hidrofóbicas em função do tempo, com (■) anidrido acético (FDAc) (**P<0,05) e com (○) anidrido propiônico (FDPr), na razão goma:piridina:anidrido 1:6:12 (P>0,05).	103

Figura 74 – Gráfico da estabilidade das nanopartículas de galactomananas hidrofóbicas em função do tempo, com anidrido acético (FDAc) e com anidrido propiônico (FDPr): (□) 24 horas e (■) 810 dias. 103

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- Å:** Angstrom
- ABS:** absorvância
- ACS-py-FA:** ácido monoclorosulfônico com piridina em formamida
- CAC:** concentração de associação crítica
- cm:** centímetros
- CPE:** complexo polieletrólítico
- DCE:** dupla camada elétrica
- DEPT:** *distortionless enhancement by polarization transfer*
- DMAC:** dimetilacetamida
- DMF:** dimetilformamida
- DMSO:** dimetilsulfóxido
- FD:** galactomanana da fava danta (*Dimorphandra gardneriana*)
- FDac:** derivado da galactomanana da fava danta com anidrido acético
- FDO:** galactomanana da fava danta oxidada
- FDOQT:** partícula obtida pela adição de galactomanana oxidada à quitosana
- FDPr:** derivado da galactomanana da fava danta com anidrido propiônico
- FDS:** galactomanana da fava danta sulfatada
- FDSQT:** partícula obtida pela adição de galactomanana sulfatada à quitosana
- g:** grama
- G:** unidade glicosídica D-galactopiranosose
- GD** grau de desacetilação
- g/cm³:** grama por centímetro cubo
- g/L:** grama por litro
- g/mL:** grama por mililitro
- g/mol:** grama por mol
- GPC:** cromatografia de permeação em gel (*gel permeation chromatography*)
- GS:** grau de sulfatação
- h:** hora
- l_{em}:** comprimento de onda de emissão
- l_{ex}:** comprimento de onda de excitação
- IV:** espectroscopia de absorção na região do infravermelho

kg: quilograma

m: metro

M: unidade glicosídica D-manopiranoose

M:G: razão manose:galactose

Min: minuto

mL: mililitro

mV: milivolt

µm: micrômetro

nm: nanômetro

pH: potencial hidrogeniônico

ppm: partes por milhão

Pζ: potencial zeta

QT: quitosana

QTFDO: partícula obtida pela adição de quitosana à galactomanana oxidada

QTFDS: partícula obtida pela adição de quitosana à galactomanana sulfatada

RMN: espectroscopia de ressonância magnética nuclear

rpm: rotações por minuto

RS/UG: razão molar do reagente de sulfatação por unidade glicosídica

TPP: tripolifosfato

UFC: Universidade Federal do Ceará

US\$: valores em dólar

UV-VIS: ultravioleta-visível

V_e: volume de eluição

XPS: espectroscopia de fotoelétrons de Raios-X

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	03
1.1 Galactomanana	03
1.2 Quitosana	06
1.3 Modificação de Biopolímeros	09
1.3.1 Reação de Sulfatação	09
1.3.2 Reação de Oxidação	10
1.3.3 Reação de Acilação	13
1.4 Nanopartículas	14
1.4.1 Obtenção de Nanopartículas	18
1.4.1.1 Reticulação Covalente e Iônica	18
1.4.1.2 Complexação Polieletrólítica	21
1.4.1.3 Auto-Organização	24
1.4.1.4 Base de Schiff	28
1.4.2 Propriedades Intrínsecas das Nanopartículas	29
2 OBJETIVOS	41
2.1 Objetivos Específicos	41
3 METODOLOGIA	42
3.1 Materiais	42
3.2 Extração da galactomanana da semente da fava danta (<i>Dimorphandra gardneriana</i>)	42
3.3 Modificação da Galactomanana	43
3.3.1 Reação de Sulfatação	43
3.3.2 Reação de Oxidação	44
3.3.3 Reação de Acilação	45
3.4 Nanopartículas via complexação polieletrólítica de Quitosana e Galactomanana Sulfatada	46
3.5 Nanopartículas via Base de Schiff de Quitosana e Galactomanana Oxidada	46
3.6 Nanopartículas auto-organizadas de Galactomanana Hidrofóbica	47
3.7 Métodos de Análise	47
3.7.1 Análise Elementar	47
3.7.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho	47
3.7.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	48
3.7.4 Cromatografia de Permeação em Gel	48
3.7.5 Reometria	48
3.7.6 Espectroscopia de Fluorescência	48
3.7.7 Caracterização das partículas	49
3.7.8 Análise Estatística	49
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1 Caracterização da Galactomanana da Fava Danta	50
4.2 Caracterização dos Derivados Sulfatados	53

4.2.1 Efeito da Concentração de Ácido Monoclorosulfônico no Rendimento e no Grau de Sulfatação.....	53
4.2.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho.....	55
4.2.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.....	56
4.2.4 Cromatografia de Permeação em Gel.....	57
4.2.5 Reometria.....	59
4.3 Caracterização dos Derivados Oxidados.....	60
4.3.1 Determinação da Porcentagem de Oxidação da Galactomanana.....	60
4.3.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho.....	61
4.3.3 Ressonância Magnética Nuclear.....	62
4.3.4 Cromatografia de Permeação em Gel.....	63
4.4 Caracterização dos Derivados Hidrofóbicos.....	64
4.4.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho.....	64
4.4.2 Determinação do Grau de Substituição (GS) e Rendimento.....	65
4.4.3 Teste de Solubilidade.....	68
4.4.4 Concentração de Associação Crítica.....	69
4.5 Nanopartículas de galactomanana sulfatada via Complexação Polieletrólítica.....	73
4.5.1 Efeito da ordem de adição e da razão de cargas n^+/n^-	73
4.5.2 Índice de Polidispersividade (IPd) e Potencial Zeta ($P\zeta$).....	74
4.5.3 Mecanismo de Formação dos CPEs para de QT e FDS.....	76
4.5.4 Efeito do Grau de Sulfatação.....	78
4.5.5 Efeito da Concentração dos Políons.....	80
4.5.6 Estabilidade.....	81
4.5.7 Efeito do pH.....	83
4.5.8 Efeito da Adição de Fármaco.....	83
4.6 Nanopartículas de galactomana oxidada via base de Schiff.....	85
4.6.1 Efeito da ordem de adição e da razão molar $-NH_2/-CHO$	85
4.6.2 Índice de Polidispersividade (IPd) e Potencial Zeta ($P\zeta$).....	86
4.6.3 Efeito da concentração.....	87
4.6.4 Estabilidade.....	91
4.6.5 Efeito da Adição de Fármaco.....	91
4.7 Nanopartículas de galactomananas hidrofóbicas via auto-organização.....	93
4.7.1 Efeito da Razão de Goma:Piridina:Anidrido (G:P:A).....	93
4.7.2 Índice de Polidispersividade (IPd).....	94
4.7.3 Potencial Zeta.....	95
4.7.4 Efeito da Filtração.....	96
4.7.5 Efeito da concentração.....	97
4.7.6 Adição de Fármaco.....	98
4.7.7 Efeito do tipo de Anidrido.....	99
4.7.8 Efeito da secagem.....	101
4.7.9 Estabilidade em Solução.....	102
5 CONCLUSÃO.....	104
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106
APÊNDICE.....	119

1 INTRODUÇÃO

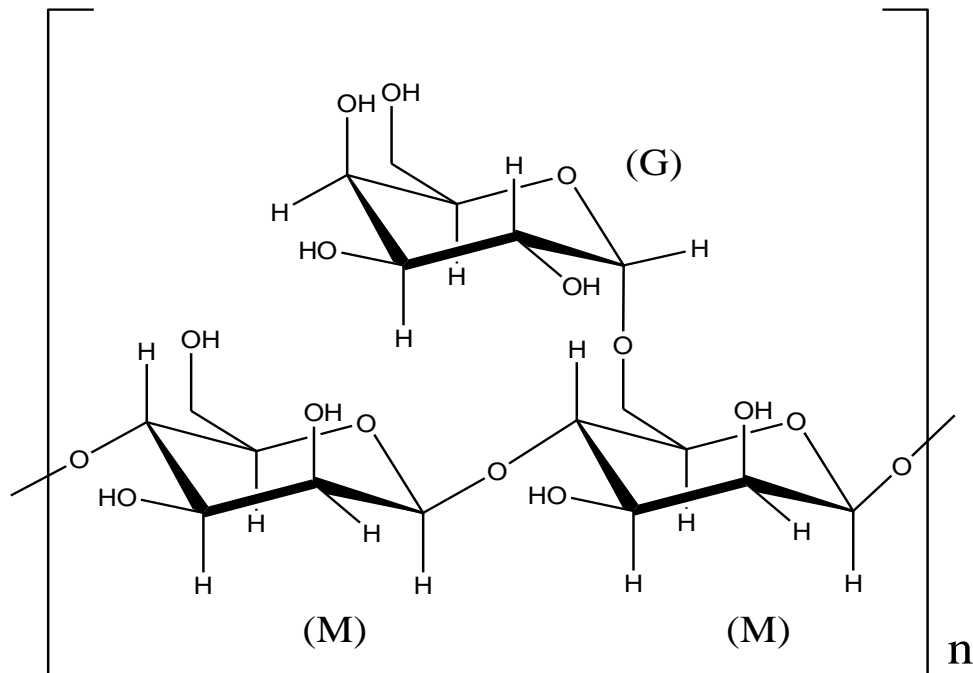
Os polissacarídeos pertencem a uma importante classe dos polímeros naturais e muitos autores têm estudado a relação entre a sua estrutura química e as propriedades físico-químicas destes polímeros, principalmente em solução. A aplicação de materiais poliméricos nos diversos campos da ciência, como na engenharia de tecidos (BI *et al.*, 2011), implantes de próteses (STASIAK *et al.*, 2011), liberação controlada de fármacos e genes (ZHENG *et al.*, 2012), proporcionou o desenvolvimento de matrizes poliméricas biocompatíveis e biodegradáveis (AZEVEDO, 2002).

1.1 Galactomanana

Galactomananas são polissacarídeos extraídos de sementes de leguminosas e de algumas fontes de microorganismos como fungos (DEA e MORRISON, 1975) e líquens (WORANOVICZ *et al.*, 1997). As galactomananas são encontradas, principalmente, no endosperma das sementes de plantas da família *Leguminosae* e são polímeros de reserva para nutri-las, durante a germinação (SINGHA, OBERLY e TOWNSEND, 1987). A degradação da galactomanana no endosperma é feita pela ação combinada das enzimas α -galactosidase, β -manase e β -manosidase manohidrolase (McCleary *et al.*, 1981).

Estes polissacarídeos são solúveis em água e formam dispersões estáveis altamente viscosas em baixas concentrações, que são levemente afetadas por variação de pH e por ciclos de aquecimento e resfriamento (VIEIRA, 2003; MEER, MEER e TINKER, 1975). Por apresentarem essas propriedades físico-químicas específicas, as galactomananas são utilizadas em várias aplicações, tais como: reforçadores e estabilizadores de emulsões e por sua atoxicidade, podem ser utilizadas na indústria têxtil, farmacêutica, biomédica, cosméticos e de alimentos (CARNEIRO-DA-CUNHA *et al.*, 2011; SRIVASTAVA e KAPOOR, 2005; VIEIRA *et al.*, 2007). Estruturalmente, as galactomananas apresentam uma cadeia principal formada por unidades β -(1 \rightarrow 4)-D-manose (M) com ramificações de α -(1 \rightarrow 6)-D-galactopiranosose (G) (ROBINSON, ROSS-MURPHY e MORRIS, 1982) (Figura 1).

Figura 1 - Estrutura química parcial das galactomananas, manose (M) e galactose (G).



Fonte: Autor.

De acordo com os resultados de CUNHA *et al.*, 2009, a galactomanana da *Dimorphandra gardneriana* contém, além de manose e galactose, uma pequena parcela de glucose (1,1%), menor que a quantidade normalmente presente na goma guar. Outros monossacarídeos, tais como, arabinose, xilose e ramnose detectados para a guar, não compõem a goma da *D. gardneriana* (CUNHA *et al.*, 2009). Apesar das galactomananas serem consideradas polissacarídeos neutros, este mesmo autor relata um teor de 2,8% de ácido urônico presente. De modo similar tem sido detectado, por exemplo, 0,8% (DEBON e TESTER, 2001) e 3,3% (CUNHA *et al.*, 2005) de ácido urônico na goma guar.

As galactomananas estão presentes em sementes de diversas espécies em todo mundo e as espécies mais utilizadas como fontes de galactomananas para utilização industrial, principalmente em alimentos, são a *Cyamopsis tetragonolobus* (goma guar) e *Ceratonia siliqua* (alfarroba) (CUNHA, de PAULA e FEITOSA, 2009). Estas gomas são compostas com razão M:G variável. A proporção de M/G varia entre 1,1 e 4 nas diferentes espécies (WHISTLER, 1973). A goma guar possui uma razão M:G que pode variar de 1,6 a 1,8 (CHENG, BROWN e PRUD'HOMME, 2002).

A razão M:G da galactomanana de *D. gardneriana* (1,84) (CUNHA *et al.*, 2009) é um valor próximo do encontrado para a goma guar (1,80) e menor que os valores

da goma tara (3,0) e goma locusta (4,0) (CUNHA *et al.*, 2009; CHENG, BROWN e PRUD'HOMME, 2002). Esta razão tem um importante papel na avaliação da solubilidade em água e na dependência da viscosidade da solução com a concentração do polímero (RINAUDO, 2001).

A solubilidade em água depende do conteúdo de galactose substituinte, assim mananas, por exemplo, que não apresentam substituição, são insolúveis em água (POLLARD e FISCHER, 2006; McCLEARY *et al.*, 1981) ao contrário das galactomananas que são solúveis em água e formam dispersões viscosas e estáveis (MEER, MEER e TINKER, 1975). A habilidade das galactomananas interagirem sinergicamente com outros polímeros, comportamento importante para aplicações industriais, é geralmente influenciada pela menor quantidade de unidades de galactose (MORRIS, 1990).

A Tabela 1 apresenta as aplicações para galactomananas, extraídas de sementes da flora brasileira, caracterizada por diferentes grupos de pesquisa (CUNHA, de PAULA e FEITOSA, 2009).

Dimorphandra gardneriana Tul. e *Dimorphandra mollis* Benth, popularmente conhecidas como faveira ou fava danta, pertencem à família *Leguminosae* e são árvores pequenas que habitam os cerrados. A *Dimorphandra mollis* é encontrada em Minas Gerais, São Paulo e Goiás, enquanto que a *Dimorphandra gardneriana* é uma espécie regional dos estados do Maranhão, Bahia, Piauí e Ceará (CUNHA *et al.*, 2009).

Os frutos destas faveiras são legumes verdes, indeiscente, com mesocarpo farináceo que se torna mais rígido e negro com o amadurecimento. As vagens podem medir até 15 cm de comprimento e apesar de servirem de alimento para alguns vertebrados, muito procuradas pelo gado, a planta é considerada tóxica para algumas espécies de Arthropoda (FAGUNDES, CAMARGOS e COSTA, 2011; TOMASSINI e MORS, 1966; CORRÊA, 1984). Todas as vagens produzem de 10 a 21 sementes alongadas e avermelhadas. O período de maturação das vagens e formação das sementes é de julho a agosto, podendo estender-se, em algumas áreas, até setembro (Figura 2).

Tabela 1 – Aplicações testadas para galactomananas brasileiras.

Origem	Aplicações
<i>Mimosa scabrella</i>	Formulações de xampu, pudim Matriz comatográfica para isolar lectina Matriz para liberação de fármacos Antiviral: febre amarela
<i>Adenantha pavonina</i>	Filmes Liberação de fármacos
<i>Leucena leucocephala</i>	Micropropagação de plantas Filmes finos Absorção de albumina Antiviral: febre amarela
<i>Dimorphandra mollis</i>	Aditivo na produção de papel
<i>Caesalpinia pulcherrina</i>	Meio de cultura de fungos Filmes finos Filmes para revestimento de frutos
<i>Schizolobium parahybum</i>	Matriz comatográfica para isolar lectina
<i>Cassia fastuosa</i>	Matriz comatográfica para isolar lectina Micropropagação de plantas
<i>Cassia sliqua</i>	Liberação controlada de genes

Fonte: CUNHA, de PAULA e FEITOSA, 2009.

Figura 2 – (a) Vagens e (b) sementes da Fava Danta; (c) galactomanana extraída das sementes da Fava Danta.



(a)



(b)



(c)

Fonte: (a) SEBRAE (2012), (b) FAVEIRO (2012), (c) MONTEIRO (2009).

Árvores de *Dimorphandra gardneriana* e *Dimorphandra mollis* são fontes de quercetina e especialmente rutina, um flavonóide com forte poder oxidante, atividade

anti-inflamatória, efeito anticancerígeno e capacidade de reduzir a fragilidade dos vasos sanguíneos (SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2012).

Nos primeiros quatro meses de 2012, a exportação deste farmoquímico atingiu o montante de US\$ 5.777.241,00. Só para a França foram, até março de 2012, US\$ 1.945.062,00, o que equivale a 45000 kg de rutina (ABIQUIFI, 2012). No ano de 2011, a exportação de rutina totalizou 403167 kg, o que equivale a US\$ 13.774.446,00, ocupando assim o quinto lugar no *ranking* das exportações de farmoquímicos (ABIQUIFI, 2012). Para produzir esta quantidade de rutina, 5000 toneladas de vagens foram utilizadas e baseando-se na quantidade de sementes por vagens, na massa de uma semente e no rendimento da extração de galactomanana da *D. gardneriana* (CUNHA *et al.*, 2009), 75 toneladas de galactomanana poderiam ter sido produzidas em 2011. Novas aplicações para a utilização da semente podem aumentar a viabilidade econômica destas culturas.

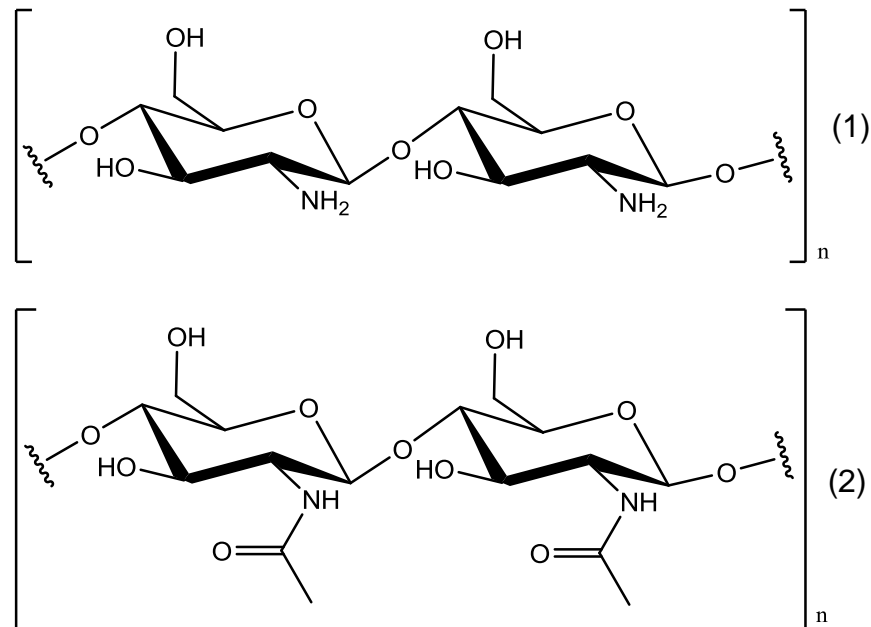
Recentemente o polissacarídeo da *D. gardneriana* foi caracterizado e suas propriedades são bem similares as da goma guar, já utilizada comercialmente como fonte de galactomanana (CUNHA *et al.*, 2009) e há estudos para que soluções de galactomanana da *D. gardneriana* sejam utilizadas como dispositivos viscosirúrgicos oftálmicos (OVD) por apresentarem características reológicas requeridas para um eficiente OVD (PIRES *et al.*, 2010), para que géis sejam utilizados na viscosuplementação das articulações do joelho humano em substituição às soluções de hialuronatos comerciais (Hilano G-F 20) ou ao próprio líquido sinovial (MONTEIRO, 2009) e modificada por sulfatação em atividade antiviral (MARQUES, 2011).

1.2 Quitosana

Quitosana (QT) é um copolímero de β -[1→4]-2-acetoamido-2-desoxi-D-glucopiranosose e β -[1→4]-2-amino-2-desoxi-D-glucopiranosose. A quitosana é obtida principalmente da desacetilação alcalina da quitina de exoesqueleto de crustáceos, tais como camarões e caranguejos (MUZZARELI, 1973). Os organismos marinhos são a principal fonte de quitina, pois é o componente do exoesqueleto de artrópodes, como os crustáceos e do endoesqueleto de moluscos (YAMADA e KAWASAKI, 2005). A quitina é o biopolímero mais abundante na natureza depois da celulose (VÁZQUEZ *et al.*, 2013).

A estrutura química da quitina e da quitosana é bastante semelhante, sendo que o fator que faz a distinção entre as duas é o número de unidades acetiladas (Figura 3). Segundo VÁZQUEZ *et al.* (2013) quitosana é obtida quando o grau de N-acetilação é inferior à 0,35. A hidrólise dos grupos acetamida da quitina pode ser obtida em meio ácido ou básico, porém a primeira condição não é utilizada devido à susceptibilidade das ligações glicosídicas à hidrólise ácida, o que levaria a diminuição da sua massa molar. A desacetilação em meio alcalino raramente é completa, já que quitosanas solúveis em pH menor que 6,0, são obtidas quando se atinge 60% ou mais, pois o prolongamento da reação provoca severa degradação das cadeias poliméricas (MARTHUR e NARANG, 1990).

Figura 3 - Unidades repetitivas da quitosana 100% desacetilada (1) e quitina (2).

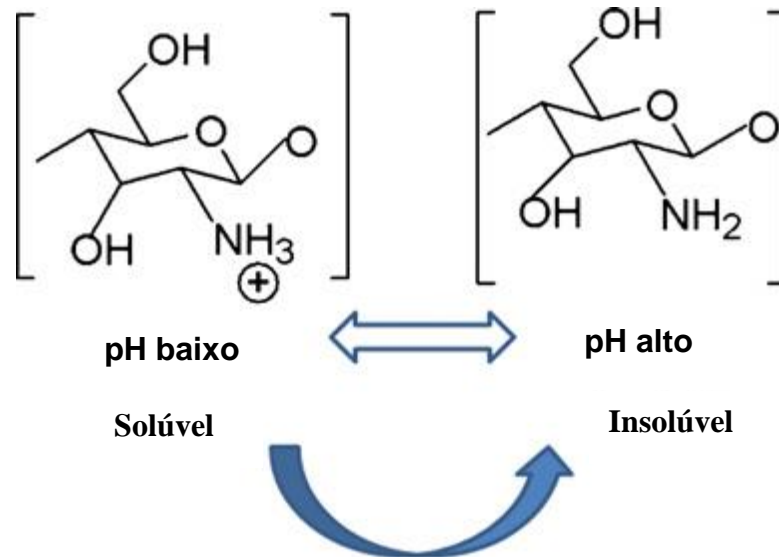


Fonte: Autor

As propriedades físico-químicas, biológicas e a conformação em solução da quitosana dependem da massa molar, do grau de desacetilação (GD) e da distribuição dos tipos das unidades constituintes da cadeia (acetilglucosamina e glucosamina) (SOUZA *et al.*, 2013). Os derivados obtidos por desacetilação da quitina são solúveis em meio ácido, quando o grau de acetilação é menor que 60% (SORLIER *et al.*, 2001). Em meio ácido os grupamentos amino livres da quitosana são protonados ($-NH_3^+$), o que a torna solúvel. À medida que o pH se aproxima de 6,5 há uma tendência à

precipitação devido ao aumento de grupamentos $-NH_2$ na estrutura (Figura 4) (DASH *et al.*, 2011).

Figura 4 – Ilustração esquemática da quitosana. Em pH baixo (abaixo de 6,0), grupos aminas da quitosana estão protonados, conferindo comportamento policatiónico a quitosana. Em pH alto (acima de 6,5), aminas da quitosana estão desprotonada e reativas.



Fonte: Adaptado de DASH *et al.* (2011).

A atividade antimicrobiana, capacidade de formação de filmes, alta adsorção, biodegradabilidade, biocompatibilidade e atoxicidade da quitina, da quitosana e dos seus derivados tornam esses biopolímeros amplamente utilizados em diferentes áreas da economia, como na agricultura, no tratamento de água, na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica e na medicina (VÁZQUEZ *et al.*, 2013).

Todas essas características levaram ao desenvolvimento de inúmeras aplicações biomédicas de sistemas nanoestruturados de quitosana e seus derivados (Tabela 2). Entre as aplicações biomédicas destacam-se a engenharia de tecidos na cicatrização de feridas e a utilização em administração de fármacos e diagnóstico de câncer (JAYAKUMAR *et al.*, 2010).

Tabela 2 – Sistemas nanoestruturados de quitosana para aplicações biomédicas.

Sistemas nanoestruturados de Quitosana	Aplicações
Nanopartículas	Liberção de fármacos; Terapia genética; Vacinas.
Lipossomas	Vacinas; Liberção de fármacos.
Partículas superparamagnéticas	Hipertermia (terapia); Separação magnética de células (terapia); Liberção de fármacos; Agente de contraste em ressonância magnética nuclear (diagnóstico).
Nanocompósitos	Restauração óssea (ortopedia, cirurgia maxilar).

Fonte: PENICHE e PENICHE, 2010.

1.3 Modificação de Biopolímeros

A Ciência de Polímeros tem dado grande importância na preparação e aplicação de novos materiais. Nesse sentido, sistemas poliméricos obtidos pela mistura e/ou associação de polímeros distintos recebem atenção dos pesquisadores e, para tanto, diversos tipos de modificações de polissacarídeos têm sido propostas (SILVA *et al.*, 2006).

As atividades biológicas dos polissacarídeos dependem de sua estrutura molecular, como sua composição monossacarídica, a ligação glicosídica da cadeia principal, grau de substituição, grau e tipo de ramificação e a conformação da cadeia principal, por isso, cada vez mais as pesquisas têm sido atraídas para a modificação molecular (MA *et al.*, 2012). Nos últimos anos, muitos autores têm relatado que as atividades biológicas foram relativamente melhoradas em função da modificação estrutural do polissacarídeos (WANG *et al.*, 2010a; TAO, ZHANG e ZHANG, 2009)

Vários tipos de modificações de polissacarídeos com distintos interesses têm sido propostos, desde aumentar a hidrofiliabilidade à adição de caráter hidrofóbico, com reações de acilações. Na busca de aumentar o caráter hidrofílico e aumentar os sítios

de interação com outros polímeros (polímeros sintéticos, polissacarídeos e proteínas) ou com metais, modificações tais como: carboximetilação, carboxilação, oxidação e sulfatação vêm sendo propostas.

1.3.1 Reação de Sulfatação

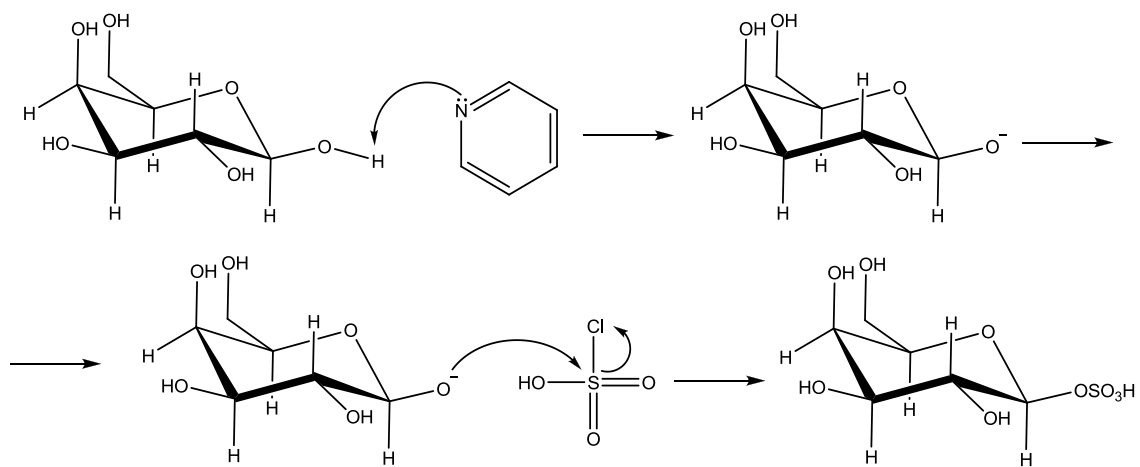
Sulfatação de polissacarídeos tem sido reportada para uma variedade de carboidratos, entre esses a goma do cajueiro (MOURA NETO *et al.*, 2011), polissacarídeo extraído da *Artemisia sphaerocephala* (WANG *et al.*, 2010a), da *Pleurotus tuber-regium* (TAO, ZHANG e ZHANG, 2009), da *Epimedium* (LU *et al.*, 2008), quitosana (SCHATZ *et al.*, 2005; BAUMANN e FAUST, 2001), galactomanana (ONO *et al.*, 2003), dextrana (SCHATZ *et al.*, 2004; CHEN, MOHANRAJ e PARKIN, 2003), pululana (ALBAN, SCHAUERETE e FRANZ, 2002; MÄHNER, LECHMER e NORDMEIER, 2001), galactana (VOGL, PAPER e FRANZ, 2000) e laminarina, são glucanas extraídas das algas marrons, principalmente do gênero *Laminaria* (O'Neill, 1955). O reagente utilizado na sulfatação de polissacarídeos é o ácido monoclorosulfônico (ClSO_3H) (GERESH, MAMONTOV e WEINSTEIN, 2002), mas outros autores utilizam um complexo de trióxido sulfúrico. Os solventes utilizados são geralmente formamida, dimetilformamida (DMF) (ALBAN, SCHAUERETE e FRANZ, 2002), dimetilsulfóxido (DMSO), trietilamina (SOEDA *et al.*, 2000) e piridina (WU *et al.*, 1998).

A sulfatação de polissacarídeos não só aumenta sua solubilidade em água, mas pode, também, alterar a conformação da cadeia, resultando na alteração de suas atividades biológicas (WANG *et al.*, 2010a). As propriedades de polissacarídeos sulfatados, tais como: atividade anticoagulante e antiinflamatória (ALBAN, SCHAUERETE e FRANZ, 2002), antiviral (ONO *et al.*, 2003), antioxidantes (WANG *et al.*, 2010a) e antitumoral (TAO, ZANG e ZHANG, 2009) dependem fortemente de sua estrutura, como por exemplo, do grau de sulfatação (GS), da posição da substituição, da distribuição dos grupos sulfatos (ALBAN, SCHAUERETE e FRANZ, 2002), da massa molar (BARBUCCI *et al.*, 1998), da conformação da cadeia (TAO, ZANG e ZHANG, 2009) e do tipo de ligação glicosídica (MULLOY, MOURÃO e GRAY, 2000). Assim, é importante estabelecer um método apropriado de sulfatação para cada polissacarídeo.

Quando uma unidade glicosídica é tratada para fins de sulfatação, o primeiro éster formado é o 6-sulfato (TURVEY, 1965), o que está de acordo com a mais alta reatividade das hidroxilas primárias em reações com agentes esterificantes. Entretanto, sabe-se que o 6-sulfato não é o único produto, pois pequena quantidade de dissulfatos são também formados (TURVEY, 1965).

A Figura 5 mostra o mecanismo para a sulfatação de uma unidade glicosídica com a substituição no carbono 1.

Figura 5 – Mecanismo para a reação de sulfatação de uma unidade glicosídica.



Fonte: Autor

1.3.2 Reação de Oxidação

A oxidação com periodato de sódio é uma reação simples e bastante usada como ferramenta na elucidação estrutural de carboidratos complexos (PERLIN e CASU, 1982). A oxidação de amido com periodato, até pouco tempo era um dos poucos exemplos no qual esta era empregada para obter novas propriedades com aplicações industriais (VEELAERT *et al.*, 1997). Mas, nos últimos anos, a oxidação com íons periodato tem sido utilizada para introduzir, em polissacarídeos e glicoproteínas, grupos dialdeídicos (KRISTIANSEN, POTTHAST e CHRISTENSEN, 2010).

A modificação por oxidação com periodato tem sido proposta para outros polissacarídeos como pectina (ZHANG *et al.*, 2012a), pululana (BRUNNEEL e SCHACHT, 1993), escleroglucana (CHRISTENSEN, AASPRONG e STOKKE, 2001),

goma guar (VARMA *et al.*, 1997), dextrana (SOKOLSKY-PAPKOV, DOMB e GOLENSER, 2006), goma arábica (NISHI e JAYAKRISHNAN, 2007; NISHI e JAYAKRISHNAN, 2004), goma Konjac (YU e XIAO, 2008) e goma do cajueiro (MOURA NETO, 2008).

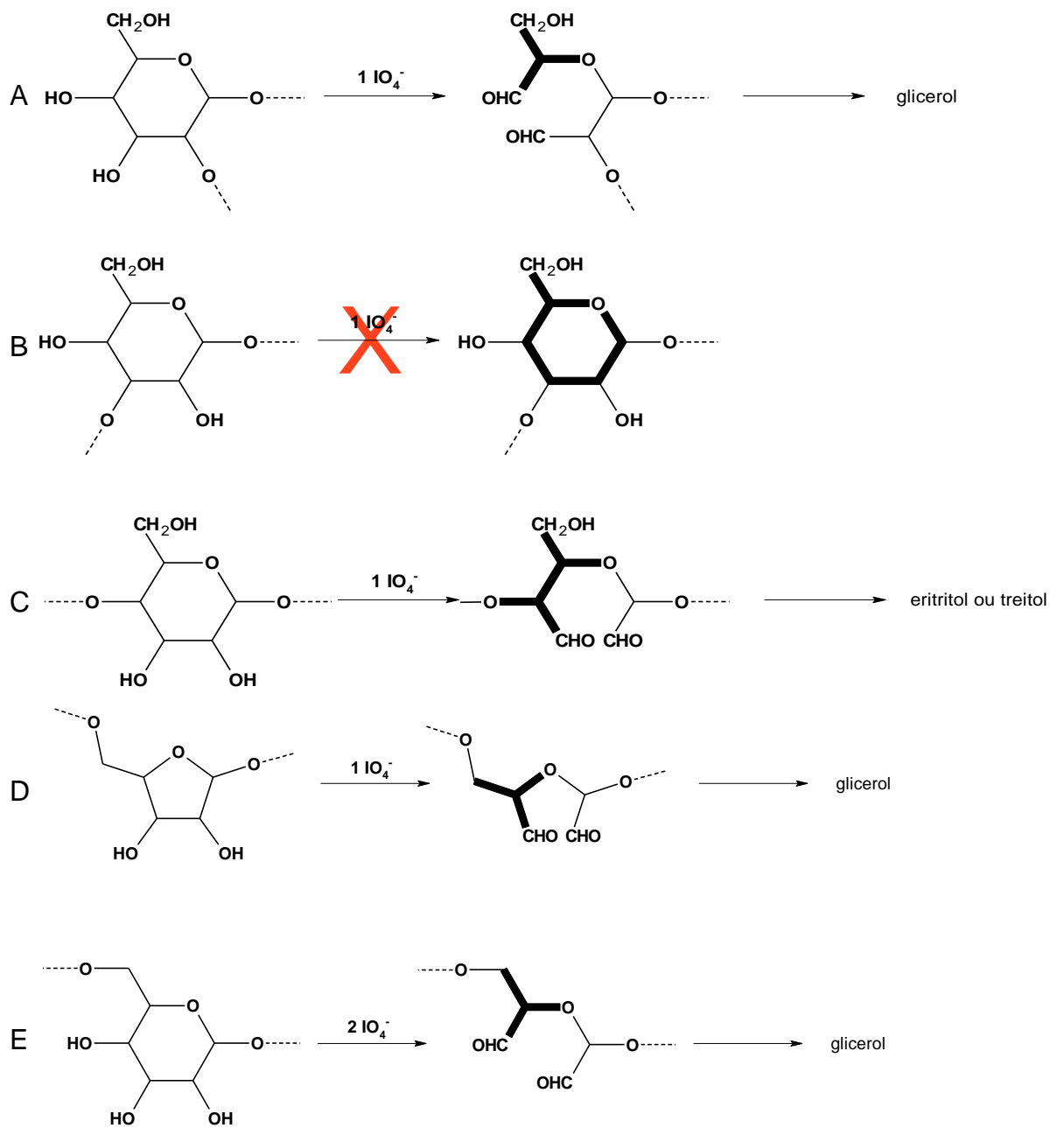
Periodato oxida seletivamente as cadeias laterais do polissacarídeo, se a cadeia principal não possuir nenhuma hidroxila vicinal. Assim, quando na cadeia principal as unidades dos monossacarídeos são ligadas (1→3), a oxidação com periodato leva a introdução de grupamentos aldeídos nas cadeias laterais, sem degradação da cadeia principal. A Figura 6 mostra diferentes unidades de açúcares reagindo com periodato de sódio. Observa-se que a única unidade não-oxidada é a B devido às ligações glicosídicas na posição 1 e 3 que não apresenta duas hidroxilas vicinais. Polissacarídeos como a goma do cajueiro (de PAULA, HEATLEY e BUDD, 1998) e escleroglucana (CHRISTENSEN, AASPRONG e STOKKE, 2001) apresentam esse tipo de ligação na sua cadeia principal.

A Figura 7 mostra o mecanismo básico da reação de oxidação de uma D-glucose de cadeia lateral (JACKSON e HUDSON, 1938). O mecanismo descrito assume que a ligação dos carbonos C(2) – C(3) e C(3) – C(4) do anel de glucose pode ser acessada por oxidação com periodato (AALMO e PAINTER, 1981). A reação ocorre quando a ligação C(3) – C(4) ou C(2) – C(3) é quebrada na primeira oxidação, originando grupamentos aldeídos nos respectivos carbonos (unidades S e S'). Esses intermediários podem existir em solução nas formas cíclicas e de hemiacetal (AALMO e PAINTER, 1981). Uma segunda oxidação complementar origina novos grupamentos aldeído, formando a unidade D (duplamente oxidada) com consequente liberação de ácido fórmico proveniente do C(3).

A análise do consumo de periodato possibilita a determinação da proporção de unidades oxidadas. O controle da estequiometria periodato/polissacarídeo pode produzir materiais com diferentes graus de oxidação.

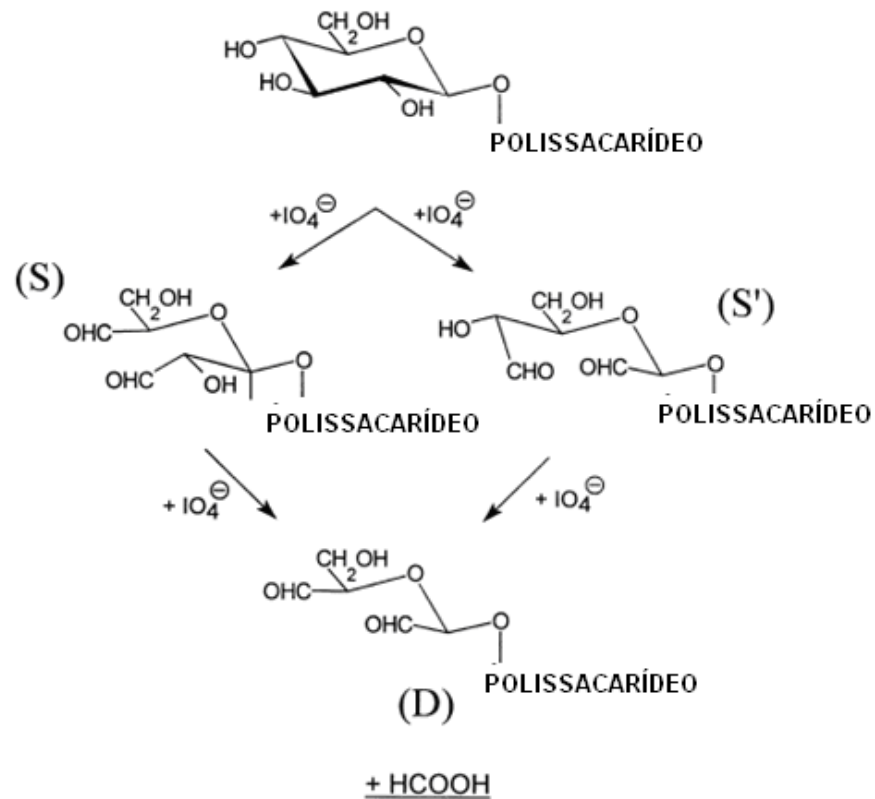
O estudo de derivados aldeídos funcionalizados é interessante devido a sua reatividade com grupamentos amina como os presentes na quitosana (MAGALHÃES JÚNIOR, 2012; KAMINAGA, KATO e MATSUO, 2004), proteínas, como a gelatina (YU e XIAO, 2008; MOURA NETO, 2008) e fármacos, como a primaquina (NISHI e JAYAKRISHNAN, 2007; NISHI e JAYAKRISHNAN, 2004) para a formação do grupo imina (-C=N-).

Figura 6 – Seletividade da reação de periodato de sódio com unidades de açúcar substituídas em diferentes posições.



Fonte: ASPINAL (1982).

Figura 7 – Esquema da reação seletiva de oxidação de uma unidade de glucose da cadeia lateral de um polissacarídeo.



Fonte: MAEDA *et al.* (2001).

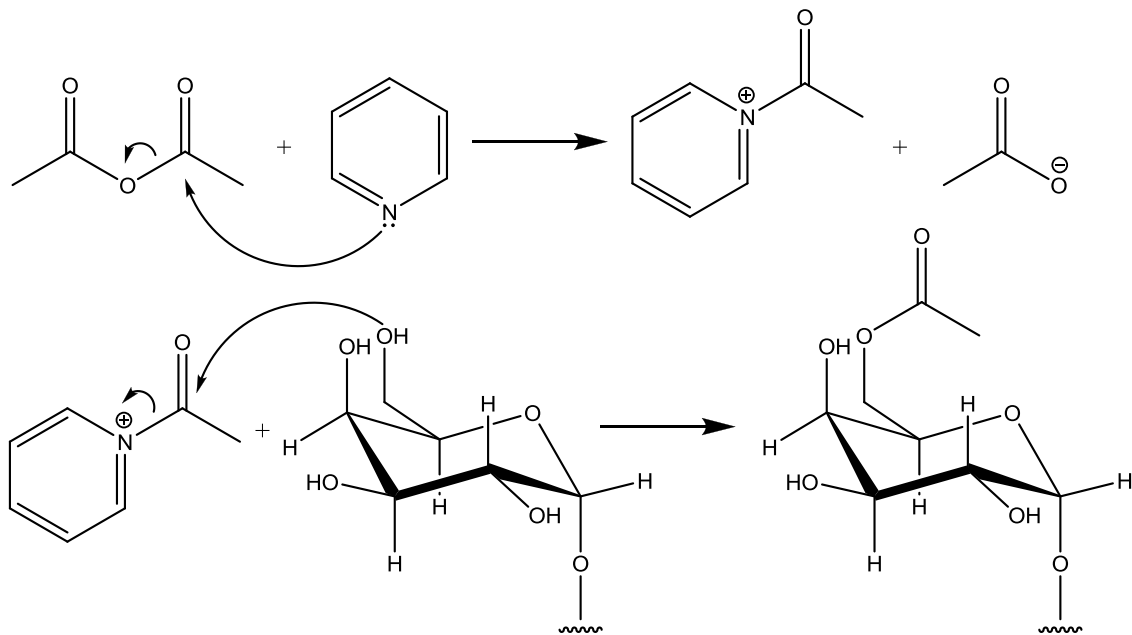
1.3.3 Reação de Acilação

Desde o início de 1980 a investigação de polímeros anfífilos tem sido uma área de pesquisa em expansão levando a um crescente número de publicações anuais (MEISTER e BLUME, 2007), devido as suas propriedades e potencial de utilização no setor farmacêutico, bioquímico e para aplicações médicas (VIEIRA *et al.*, 2003). Neste sentido reações de modificação com diferentes métodos têm sido reportadas na literatura para polissacarídeos, entre esses quitosana com butiraldeído e cianoborahidreto de sódio (SJOHOLM, COONEY e MINTEER, 2009), dextrana com hidróxido de tetrabutílamônio e 1,2-epoxidodecano (CARRIER *et al.*, 2011), dextrana com trietilamina e cloreto de p-hexilbenzoila (VIEIRA *et al.*, 2003), dextrana com anidrido propiônico em piridina e N,N-dimetilaminopiridina (HORNIG e HEINZE, 2007), pululana com cloreto de etila em dimetilacetamida e piridina (TERAMOTO e SHIBATA,

2006) e pululana com anidrido acético em formamida e piridina (JUNG, JEONG e KIM, 2003; ZHANG *et al.*, 2009).

A reação de acilação tem sido eficiente na introdução de grupos funcionais (Figura 8). No caso específico de polissacarídeos, a modificação hidrofóbica tem sido utilizada como uma forma alternativa para melhorar sistemas bifásicos de polímeros, que são amplamente utilizados para a separação e purificação de macromoléculas e organelas celulares (LU e TJERNELD, 1997), na obtenção de nanoesferas e/ou micropartículas utilizadas como sistemas de liberação controlada (ROUZES *et al.*, 2000; FOURNIER, LEONARD e DELLACHERIE, 1998). A presença de grupos hidrofóbicos vinculados à cadeia de polissacarídeo pode levar à formação de grandes agregados, que podem mudar as propriedades físico-químicas em solução como viscosidade, tensão superficial e solubilidade (VIEIRA *et al.*, 2003).

Figura 8 – Mecanismo da reação de acilação de uma galactose da cadeia lateral de uma galactomanana com anidrido acético.



Fonte: Autor

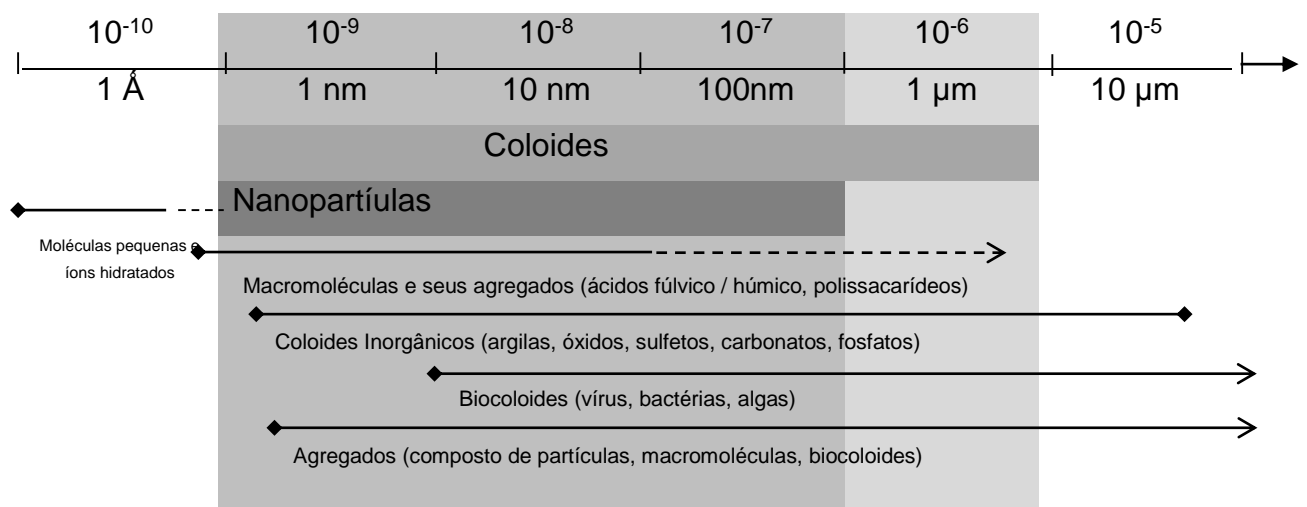
1.4 Nanopartículas

Nanociência é o estudo e o conhecimento das técnicas para produção de nanopartículas e a nanotecnologia consiste na aplicação desses conhecimentos para construção de novos materiais em escala industrial e está relacionada a diversas

áreas do conhecimento humano (química, medicina, biologia, física, engenharia, eletrônica e computação) (WILSON *et al.*, 2004).

A nanotecnologia desenvolve pesquisas e tecnologias com o objetivo de conhecer os fenômenos e os materiais em escala nanométrica (10^{-9} m) e criar estruturas, mecanismos e sistemas que possuam novas propriedades e funções devido às suas pequenas dimensões. As nanopartículas são comumente definidas como partículas com diâmetros menores que 100 nm, esta definição coloca as nanopartículas com dimensões semelhantes às de partículas ultrafinas (transportadas pelo ar) e como subpartículas coloidais (Figura 9) (CHRISTIAN *et al.*, 2008). Um sistema coloidal é, geralmente, um sistema composto por duas fases, uma das fases é o disperso e a outra é a dispersão. O estado físico da dispersão pode ser sólido, líquido e gasoso. Para sistemas coloidais onde a dispersão está na fase líquida dá-se o nome de dispersões, quando o disperso é sólido, de emulsões, quando o disperso é líquido e de aerossóis, quando o disperso é gasoso.

Figura 9 – Domínios de tamanho e representantes típicos de coloides naturais e nanopartículas.



Fonte: CHRISTIAN *et al.* (2008).

Nos últimos anos a nanotecnologia tornou-se uma das áreas mais atrativas e, por isso, o aumento de sua importância no campo da Química, Física, Ciência dos Materiais, Engenharia e Saúde se baseia no mais diversos tipos de materiais (polímeros, cerâmicas, metais, semi-condutores e compósitos) estruturados em escala nanométrica: nanopartículas, nanotubos e nanofibras, que por sua vez são formados por átomos ou moléculas (DURAN, MATTOSO e MORAIS, 2006). Os

materiais e sistemas nanoestruturados exibem propriedades e fenômenos físicos, químicos e/ou biológicos significativamente novos devido a sua escala (DURAN, MATTOSO e MORAIS, 2006). Atualmente a nanotecnologia é empregada em várias situações como em fibras e produtos têxtil (SOM *et al.*, 2011), na agricultura (NEETHIRAJAN e JAYAS, 2011), eletrônica (BHASKARAN, SRIRAM e MITCHELL, 2010), na área espacial (LIU *et al.*, 2007) e terapia médica (CHOI *et al.*, 2011).

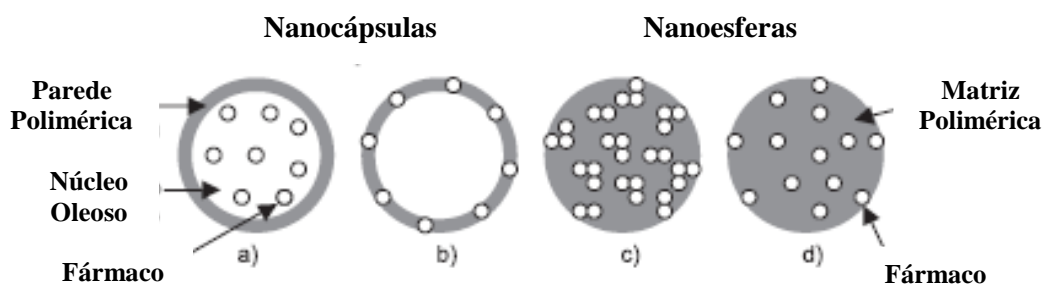
Na indústria farmacêutica, no que se refere às nanopartículas, o grande objetivo é utilizá-las como carreadores de fármacos. Um sistema polimérico para liberação de fármaco pode ser esquematizado e executado por diferentes metodologias de processamento. Materiais poliméricos farmacêuticos com pequena ou nenhuma toxicidade podem ser utilizados como membranas ou matrizes nas quais o fármaco é disperso ou dissolvido.

Os sistemas nanoparticulados utilizados como carreadores de fármacos compreendem sub-micro partículas com tamanho inferior a 1000 nm e com diferentes morfologias, incluindo nanoesferas, nanocápsulas, nanomicelas, nanolipossomas e nanofármacos (LIU *et al.*, 2008).

O termo “nanopartícula” inclui tanto as nanocápsulas quanto as nanoesferas, que se diferem segundo a sua composição e a sua organização estrutural. As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido a parede polimérica. Por outro lado, as nanoesferas, que não apresentam óleo em sua composição, são formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido (Figura 10) (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Nanopartículas com elevado tempo de circulação e com propriedades de atingir sítios específicos devem possuir duas características importantes: a primeira é o tamanho em torno de 100 nm ou menor em diâmetro e a segunda é possuir superfície hidrofílica para evitar assim sua eliminação por fagocitose (BRANNON-PEPPAS e BLANCHETE, 2004). A Tabela 3 mostra o efeito do tamanho da partícula nas propriedades do sistema carreador de fármacos.

Figura 10 - Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido a parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso na matriz polimérica das nanoesferas.



Fonte: SCHAFFAZICK, *et al.* (2003).

Tabela 3 - Efeito do tamanho da nanopartícula nas propriedades do sistema carreador de fármaco.

Tamanho (nm)	Efeito
5-10	As partículas podem ser removidas rapidamente pelos rins.
10-70	As partículas não são removidas pelo sistema renal, mas são pequenas o suficiente para penetrar em capilares muito pequenos.
70-200	Nesta faixa as partículas possuem maior tempo de circulação.
> 200	São usualmente removidas por fagocitose.

Fonte: VINAGRADOV, BRONICH e KABANOV (2002).

Nanocarreadores podem ser usados para liberar de forma controlada uma grande variedade de fármacos (ZHU, 2002), tais como: proteínas, componentes de vacinas, ácidos nucleicos e assim por diante (LIU *et al.*, 2008). Devido as suas diversas aplicações e funcionalidades, especialmente em terapias de liberação controlada do fármaco, os polímeros estão dentre os excipientes mais utilizados para a obtenção de formas farmacêuticas (RIOS, 2005).

Muitos polímeros têm sido examinados para produção de nanopartículas, inclusive polímeros naturais (AVADI *et al.*, 2010). Nanopartículas de polissacarídeos

apresentam as seguintes vantagens: a proteção do fármaco contra degradação *in vivo*, estabilidade e a capacidade para controlar a liberação de fármaco (LEMARCHAND, GREF e COUVREUR, 2004)

Conforme as características estruturais e propriedades físico-químicas as nanopartículas baseadas em polissacarídeos são obtidas, principalmente, pelas seguintes metodologias: reticulação covalente, reticulação iônica, complexação polieletrólítica e por auto-organização de polissacarídeos modificados hidrofobicamente (LIU *et al.*, 2008).

1.4.1 Obtenção de Nanopartículas

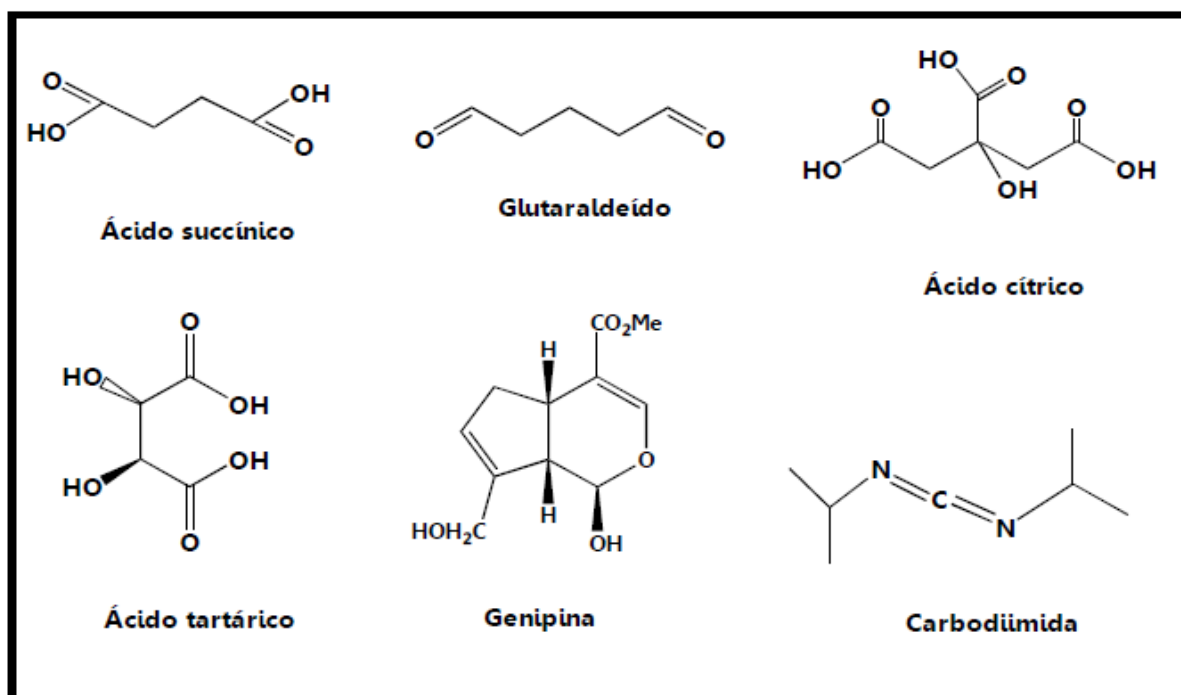
1.4.1.1 Reticulação Covalente e Iônica

A reticulação consiste na introdução de moléculas de baixa massa molar, chamadas de agentes reticulantes. A presença de grupos funcionais –OH, –COOH e –NH₂ na estrutura do polissacarídeo pode ser utilizada para a formação de ligações cruzadas através de reações com aldeídos ou com moléculas bifuncionais ou íons que permitem a formação de pontes entre as duas cadeias do polissacarídeo (HENNINK e VAN NOSTRUM, 2002). Dependendo da natureza do agente de reticulação as principais interações na cadeia são iônicas ou covalentes.

As propriedades dos políssacarídeos reticulados dependem principalmente do grau de reticulação e da razão molar do agente reticulante para o de unidades glicosídicas. Os reticulantes são utilizados para deixar a matriz polimérica estável durante mudanças de pH, melhorar suas propriedades mecânicas e conferir características que possam aumentar o tempo de liberação de fármacos em carreadores.

Quitosana é o polissacarídeo utilizado na preparação de nanopartículas por reticulação covalente empregando glutaraldeído como agente reticulante, porém a toxicidade do glutaraldeído limita a viabilidade como carreadores de fármacos (LIU *et al.*, 2008). Por isso, o uso de agentes reticulantes biocompatíveis torna a técnica promissora, por exemplo carbodiimida, ácidos di- e tricarboxílicos naturais, incluindo ácido succínico, ácido málico, ácido tártrico e ácido cítrico (BODNAR, HARTMANN e BORBELY, 2005) e genipina (KAIHARA, SUZUKI e FUJIMOTO, 2011). A Figura 11 mostra a estruturas de alguns agentes reticulantes.

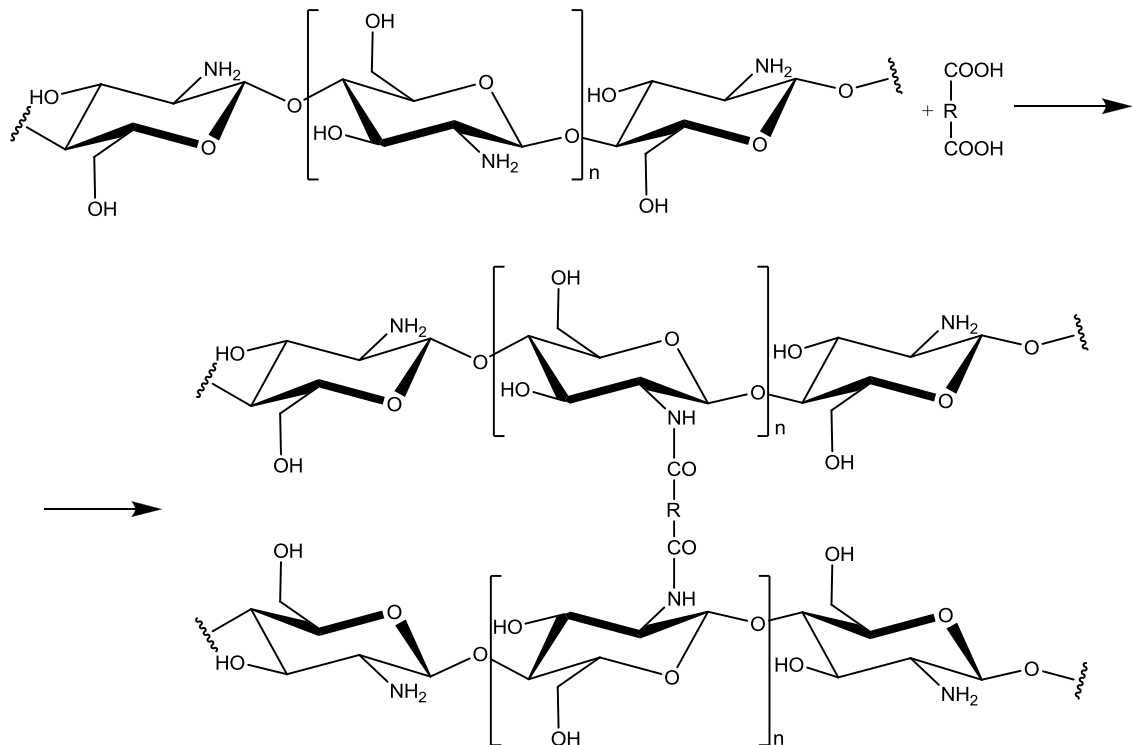
Figura 11 – Representações estruturais da molécula de agentes reticulantes.



Chen, Chang e Chen (2011) obtiveram nanopartículas de quitosana reticuladas com epícloridina, glutaraldeído e etilenoglicol. Essas nanopartículas apresentaram diâmetro variando de 170,2 a 210,6 nm e valores de potencial zeta (P ζ) que variam de 12,4 a 16,4 mV. A Figura 12 representa uma reação de reticulação da quitosana com um ácido dicarboxílico.

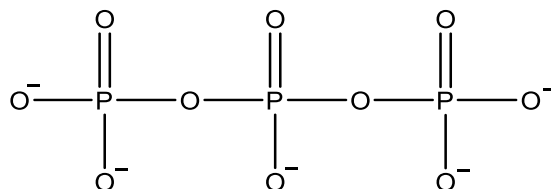
Comparada à reticulação covalente a reticulação iônica apresenta algumas vantagens como procedimentos simples e não apresenta condições drásticas na preparação. Para polissacarídeos carregados positivamente, polycations, o reticulante mais utilizado é tripolifosfato (TPP) (LIU *et al.*, 2008). O TPP (Figura 13) não é tóxico, possui ânions multivalentes e pode formar um gel por interação iônica entre cargas positivas dos grupos amina da quitosana e as suas cargas negativas.

Figura 12 – Reticulação covalente da quitosana com um ácido dicarboxílico.



Fonte: BODNAR, HARTMANN e BORBELY (2005).

Figura 13 – Representação estrutural do ânion tripolifosfato.



Nanopartículas obtidas por geleificação iônica de quitosana e TPP apresentaram diâmetro de 138 nm, índice de polidispersão de 0,026 e potencial zeta de 35 mV. As nanopartículas apresentaram boa estabilidade de armazenamento em temperatura ambiente por pelo menos 20 dias (FAN *et al.*, 2012).

1.4.1.2 Complexação Polieletrólítica

Complexos macromoleculares de diferentes polímeros naturais ou sintéticos são formados através de interações intermoleculares, como ligação de hidrogênio, forças de Coulomb e Van der Waals entre um polímero catiônico e um aniônico. De acordo com a natureza da interação, os complexos podem ser divididos em:

complexos polieletrólíticos (CPE), complexo por transferência de carga, complexos por ligação de hidrogênio e estereocomplexos (DUMITRIU, 2005). A formação de CPE ocorre sem a necessidade de moléculas catalisadoras ou inibidoras e em soluções aquosas, o que é uma grande vantagem sobre as reações de reticulação covalente.

A formação de complexos polieletrólíticos deriva da completa ou parcial condensação iônica das cargas opostas dos polímeros, que resulta da liberação dos contra-íons inicialmente ligados aos polieletrólitos, que leva ao aumento da entropia do sistema. Outros tipos de interações podem favorecer a formação dos CPE como ligações de hidrogênio, hidrofóbicas ou outras interações de van der Waals (DELAIR, 2011 e DROGOZ *et al.*, 2007). Outros fatores podem influenciar como a massa molar, a razão das cargas, o tamanho dos íons, a força iônica, a concentração, a ordem e a taxa de adição dos polieletrólitos e o pH do meio (DELAIR, 2011).

Janes, Calvo e Alonso (2001) fizeram observações a respeito de nanopartículas baseadas em polissacarídeos, com enfoque na preparação e aplicação de carreadores à base de quitosana para liberação de fármacos. Quitosana é um polímero catiônico que pode interagir com outros polímeros que possuem cargas negativas (poliânions) e por esta razão é um dos polissacarídeos mais utilizados na formação de CPE's. Os polissacarídeos mais utilizados como polímeros aniônicos na formação de CPE de quitosana são aqueles que contêm grupos carboxilato e sulfato, como mostrados na Tabela 4.

Tabela 4 - Nanopartículas de quitosana preparadas via complexação polietrolítica

Polieletrólitos	Grupo aniônico	Referência
Ácido Hialurônico	-COO ⁻	LU <i>et al.</i> , 2011
Alginato	-COO ⁻	ABRUZZO <i>et al.</i> , 2013 WANG <i>et al.</i> , 2011
Carboximetil Celulose	-COO ⁻	KAIHARA, SUZUKI e FUJIMOTO, 2011
Goma Angico	-COO ⁻	PAULA <i>et al.</i> , 2010 OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2009
Goma Arábica	-COO ⁻	AVADI <i>et al.</i> , 2010
Goma do Cajueiro Carboximetilada	-COO ⁻	SILVA <i>et al.</i> , 2010
Goma Kondagogu	-COO ⁻	NAIDU <i>et al.</i> , 2009
Pectina	-COO ⁻	HU <i>et al.</i> , 2011
Condroitina Sulfato	-OSO ₃ ⁻	HANSSON <i>et al.</i> , 2012 TSAI <i>et al.</i> , 2011 SHARMA <i>et al.</i> , 2012
Sulfato de Dextrana	-OSO ₃ ⁻	SARMENTO <i>et al.</i> , 2007 SCHATZ <i>et al.</i> , 2004 CHEN, MOHANRAJ e PARKIN, 2003

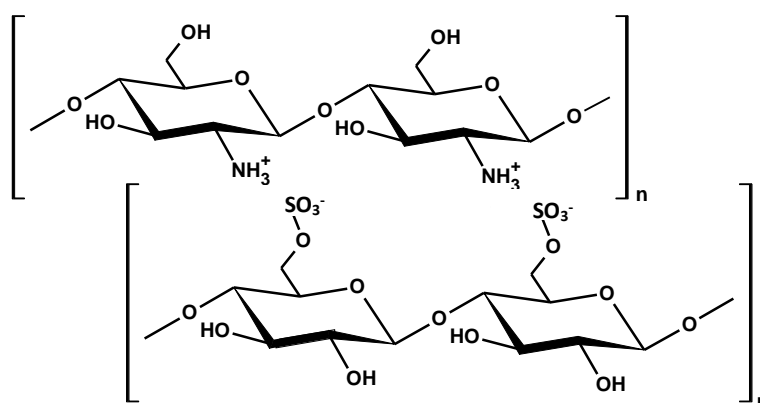
Segundo Tavares *et al.* (2012) as interações entre a quitosana e íons sulfato em dispersão em equilíbrio são obtidas pela diminuição da energia livre de Gibbs, Equação 1:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (1)$$

que tem dois componentes. O componente da entalpia (ΔH) é devido as interações do grupo negativo do poliânion com os grupos ($-NH_3^+$) da quitosana, que aproximam os poliânions, obtendo-se a reticulação iônica. O componente da entropia (ΔS) se deve a substituição dos contra-íons monovalentes do ácido utilizado na dissolução da quitosana, que antes da formação do complexo interagiam com os grupos ($-NH_3^+$), pelos grupos negativos do poliânion. Esses contra-íons tinham sua mobilidade restrita, mas ao serem substituídos se espalham homoganeamente pela solução, o que aumenta a entropia. Outra contribuição para o aumento da entropia se deve ao efeito hidrofóbico, que ocorre pelas interações entre as partes hidrofóbicas das cadeias poliméricas, que expulsam moléculas de água adsorvida (TAVARES *et al.*, 2012).

Complexos polieletrólíticos com quitosana apresentam interessante capacidade de intumescimento (BERGER e col., 2004). Esses complexos possuem numerosas aplicações como em membranas, em sistemas para imobilização de enzimas, em sensores ambientais, e também na preparação de matrizes utilizadas em sistemas de liberação controlada de fármaco. Na complexação polieletrólítica a atração eletrostática entre os grupos catiônicos de um polycation, como a quitosana, e os grupos aniônicos de um poliânion é a principal interação que leva à formação do complexo (Figura 14).

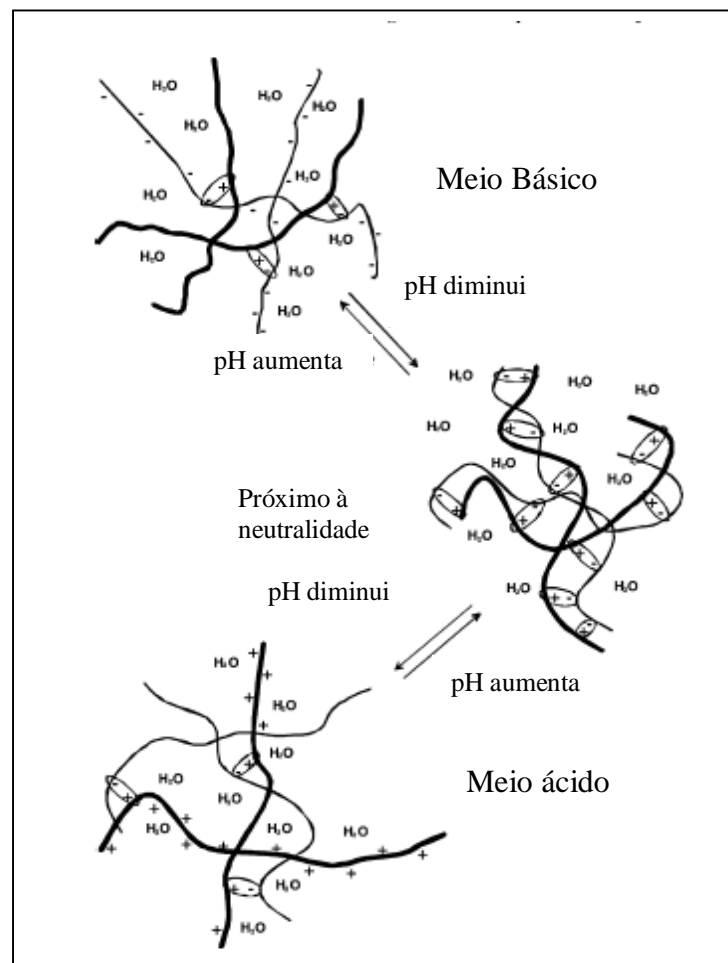
Figura 14 – Esquema da interação entre as cadeias de quitosana (polieletrólito catiônico) e um polieletrólito aniônico.



A Figura 15 mostra o efeito do pH nas cadeias dos CPE's. Observa-se que em meio básico há um maior número de cargas negativas devido à desprotonação de grupamentos iônicos do polieletrólito aniônico, enquanto que em meio ácido ocorre a

protonação de grupamentos iônico do polieletrólito catiônico (quitosana). Assim, dependendo da estabilidade do polímero aniônico em meio ácido pode ocorrer dissolução do complexo devido à alta solubilidade de quitosana em meio ácido.

Figura 15 – Estrutura e intumescimento sensível ao pH do meio de um complexo contendo quitosana. Carga negativa do outro polieletrólito (-); carga positiva da quitosana (+); interação iônica (○); quitosana (—); polieletrólito adicional (→).



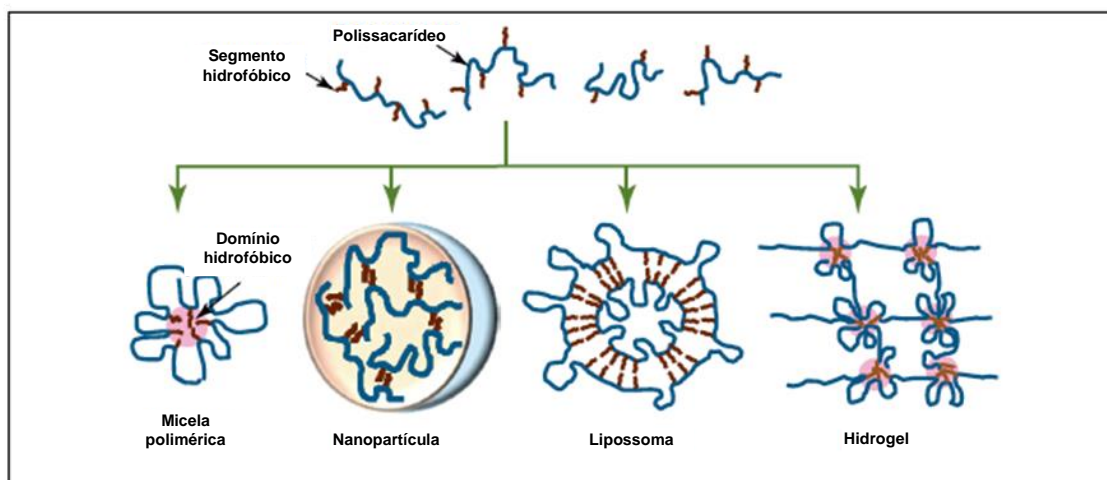
Fonte: BERGER *et al.* (2004).

1.4.1.3 Auto-Organização

Quando cadeias poliméricas hidrofílicas são enxertadas com segmentos hidrofóbicos, copolímeros anfifílicos são sintetizados. Em contato com meio aquoso, polímeros anfifílicos formam espontaneamente diferentes sistemas como micelas, nanopartículas, microesferas, lipossomas e hidrogéis (Figura 16) por associações

intra ou intermoleculares entre as porções hidrofóbicas, principalmente para minimizar a energia livre interfacial (HASSANI, HENDRA e BOUCHEMAL, 2012; LIU *et al.*, 2008). O sistema pode ser escolhido dependendo das propriedades físico-químicas do fármaco e da via de administração a ser utilizada.

Figura 16 – Representação esquemática de sistemas de liberação de fármacos formados por diferentes formas de auto-organização de polissacarídeos anfífilos em solução aquosa. *Domínio hidrofóbico devido à associação dos grupos hidrofóbicos.



Fonte: HASSANI, HENDRA e BOUCHEMAL (2012).

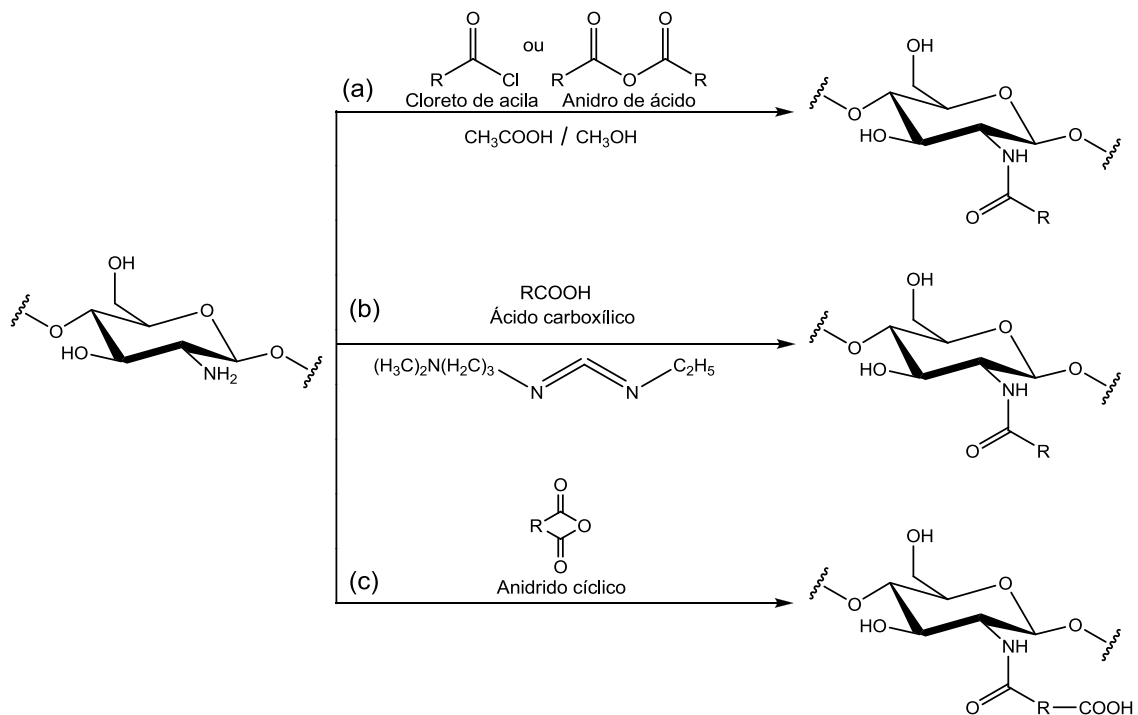
Micelas têm características únicas, que dependem do grupo hidrofóbico adicionado, da razão de grupos hidrofílicos/hidrofóbicos, como as características reológicas, pequeno raio hidrodinâmico (menores que 1 μm) com estrutura núcleo-concha e estabilidade termodinâmica (LIU *et al.*, 2008). Essas estruturas, em escala nano, têm recebido muita atenção devido as suas aplicações em diversas áreas, como a da ciência de coloides, da eletrônica, da tecnologia ambiental, de biotecnologia e da engenharia biomédica (JUNG, JEONG e KIM, 2003).

As nanopartículas, formadas por auto-organização, são geralmente compostas por um núcleo hidrofóbico e um invólucro hidrofílico. Essa natureza anfílica faz com que essas estruturas sejam um promissor carreador de fármacos hidrofóbicos (LECHFORD e BURT, 2007). Acredita-se que esse sistema é vantajoso, uma vez que o núcleo hidrofóbico é um sítio para incorporação do fármaco e que a superfície hidrofílica pode ser usada para evitar ataques biológicos, como os de macrófagos e de proteínas plasmáticas. A estabilidade termodinâmica e o tamanho reduzido tornam

essas nanopartículas veículos eficazes para a circulação prolongada na corrente sanguínea e para o direcionamento a tumores sólidos (JUNG, JEONG e KIM, 2003).

Polissacarídeos podem ser modificados quimicamente por enxertia de grupos hidrofóbicos devido à presença dos grupos hidroxila, no caso da quitosana, em função dos grupos amina. Em função da reatividade, três diferentes tipos de reações de acilação podem ocorrer. A Figura 17 apresenta as reações de N-acilação para a quitosana.

Figura 17 – N-acilação química da quitosana usando (a) cloreto de acila ou anidrido de cadeia linear, (b) ácido carboxílico na presença de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) e (c) anidrido de cadeia cíclica.



Fonte: HASSANI, HENDRA e BOUCHEMAL (2012).

O processo de auto-organização em polissacarídeos é similar ao que ocorre com outras moléculas anfifílicas como tensoativos e lípidios, ou seja, é controlado pelo equilíbrio entre a interação dos grupos hidrofóbicos e as cadeias hidrofílicas. A concentração na qual a formação dos agregados se inicia é chamada de concentração de associação crítica (CAC). Em concentrações elevadas há um aumento da viscosidade da solução devido às associações intermoleculares nas cadeias poliméricas em função da associação de grupos hidrofóbicos (HASSANI, HENDRA e BOUCHEMAL, 2012). A CAC pode ser determinada por calorimetria, fluorescência ou

tensão superficial (CHOI *et al.*, 2010). A Tabela 5 apresenta diferentes polissacarídeos modificados pela enxertia de grupos hidrofóbicos.

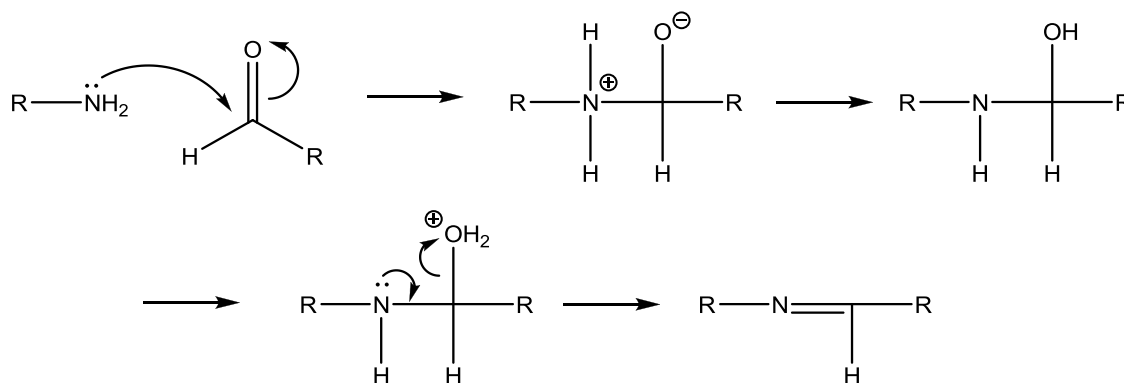
Tabela 5 – Polissacarídeos modificados hidrofobicamente e o diâmetro das nanopartículas obtidas por auto-organização.

Polissacarídeo	Molécula Hidrofóbica	Diâmetro (nm)	Referência
Dextrana	Ácidos Biliares	130-150	NICHIFOR <i>et al.</i> 1999
	Poli- β -ciclodextrina	~200	OTHMAN <i>et al.</i> , 2011
	1,2-epoxi-3-fenoxipropano	150-850	AUMELAS <i>et al.</i> , 2007
Ácido Hialurônico	Ácidos Biliares	237-424	CHOI <i>et al.</i> , 2010
Pululana	Vitamina H	~100	NA <i>et al.</i> , 2003
	Colesterol	50-150	SHIMODA <i>et al.</i> , 2012
		20-30	AKIYOSHI <i>et al.</i> , 1998
	Anidrido acético	186-423	ZHANG <i>et al.</i> , 2009
		128-416	JUNG, JEONG e KIM, 2003
1-hexadecanotiol	100-400	FERREIRA, COUTINHO e GAMA, 2011	
Glucomanana Konjac carboximetilada	Colesterol	391-1033	HA <i>et al.</i> 2011
Acetato de Celulose	Polissacarídeos Hidrofóbicos	89-159	KULTERER <i>et al.</i> , 2012
Curdlana carboximetilada	Sulfonilureia	164-227	NA <i>et al.</i> , 2000
Manana	Colesterol	~20	AKIYAMA <i>et al.</i> , 2007
	1-hexadecanotiol	100-500	FERREIRA, COUTINHO e GAMA, 2010

1.4.1.4 Base de Schiff

As bases de *Schiff* são iminas ($-C=N-$) formadas pela condensação de grupos carbonílicos ($-C=O$) com aminas ($-NH_2$) e são sintetizadas por um aldeído com uma amina apropriada em diferentes condições reacionais (Figura 18). Estas bases são intermediários importantes em diversas transformações enzimáticas, por serem susceptíveis à adição de reagentes nucleofílicos (ESTEVESS-SOUZA *et al.*, 2004). Os mecanismos, em especial, os de formação e hidrólise, são bem conhecidos, mas permanecem como objeto de investigação. Bases de *Schiff* têm mostrado significativa atividade biológica, como antifúngica, antimicrobiana, citotóxica e antitumoral (ESTEVESS-SOUZA *et al.*, 2004), as derivadas de aminas aromáticas têm uma vasta variedade de aplicações em muitos campos como na área biológica, na química inorgânica e analítica.

Figura 18 - Modelo de reação de formação de Base de *Schiff*



Atualmente muitos trabalhos têm sido publicados mostrando a síntese de nanopartículas a partir de reações de base de *Schiff*, como a de quitosana e catecol (ZHANG *et al.*, 2012b), dextrana oxidada e azida (ZHANG *et al.*, 2012c), goma arábica oxidada com primaquina (NISHI e JAYAKRISHNAN, 2007), ou a incorporação de fármacos a nanopartículas, como as de poli(ácido láctico) incorporadas com indometacina (GU *et al.*, 2007),

Uma aplicação para sistemas nanoparticulados formados via base de *Schiff* é no tratamento de tecidos cancerosos com liberação controlada do fármaco. Isso se deve ao fato do pH em torno de tecidos cancerosos ser mais ácido ($pH = 5-6$) do que em tecidos saudáveis e que a ligação $C=N$ formada pela reação entre o grupo amina

e o grupo aldeído sofrer hidrólise em meio ácido, portanto, haverá o intumescimento do sistema, levando a liberação do fármaco incorporado (ZHANG *et al.*, 2012c).

1.4.2 Propriedades Intrínsecas das Nanopartículas

A aplicação final das nanopartículas está diretamente relacionada à composição de sua superfície, portanto uma nanopartícula pode ser dividida em duas ou três camadas: uma superfície que pode muitas vezes ser funcionalizada, uma concha que pode ser obtida por um material com determinada função e o núcleo (CHRISTIAN *et al.*, 2008). A superfície da nanopartícula pode ser funcionalizada por íons metálicos, pequenas moléculas, surfactantes ou polímeros.

Diversas técnicas têm sido desenvolvidas e utilizadas para estudar a modificação da superfície de nanopartículas, como a determinação do potencial zeta ($p\zeta$), espectroscopia de fotoelétrons por Raios-X (XPS) e cromatografia de interação hidrofóbica. A eficiência da modificação pode ser medida pela carga da superfície, pela densidade dos grupos funcionais ou pela sua hidrofilicidade (SOPPIMATH *et al.*, 2001)

Segundo CHRISTIAN *et al.* (2008) o comportamento das nanopartículas está diretamente relacionado com suas propriedades intrínsecas, como a mobilidade, a energia superficial e a estabilização coloidal. O processo de difusão das nanopartículas é controlado por fatores como a força gravitacional, flutuabilidade e o movimento browniano. Esses fatores estão relacionados de acordo com a Lei de Difusão de Einstein, Equação 2.

$$D \cdot f = k \cdot T \quad (2)$$

onde, D é o coeficiente de difusão, f é o coeficiente de fricção para a partícula, k é a constante de Boltzmann e T é a temperatura. O coeficiente de fricção é definido pela Lei de Stokes, Equação 3.

$$f = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot \alpha \quad (3)$$

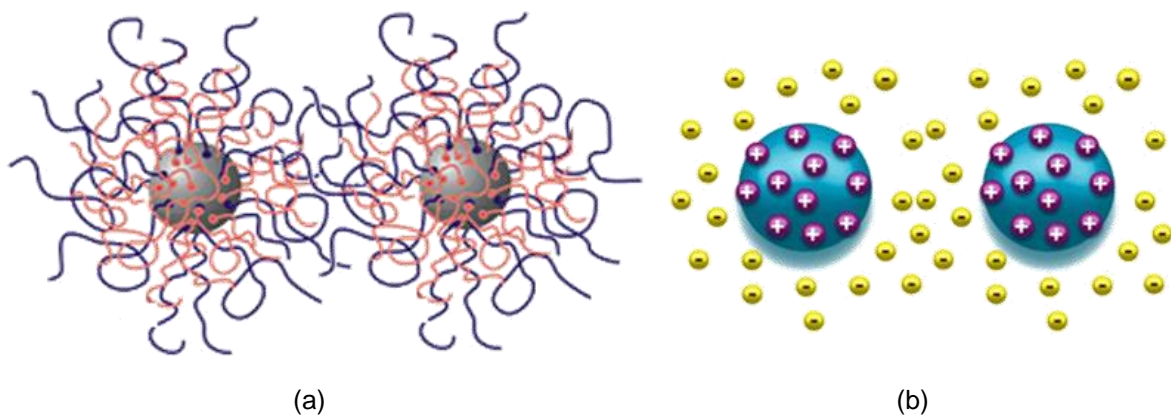
onde, η é a viscosidade do meio e α é o raio da partícula.

O coeficiente de difusão é inversamente proporcional ao raio da partícula e a média do deslocamento de uma partícula no tempo t será diretamente proporcional ao inverso da raiz quadrada do raio da partícula (CHRISTIAN *et al.*, 2008).

A pequena dimensão das nanopartículas pode levar a consideração de que essas formariam dispersões estáveis, devido ao movimento browniano a que estão sujeitas. Porém, em função da alta energia superficial qualquer colisão entre duas partículas pode acarretar em aglomeração e por conseguinte na precipitação das nanopartículas (CHRISTIAN *et al.*, 2008). Por isso, é necessário barreiras para impedir a aglomeração, como a estabilização por carga ou estérica (Figura 19).

A Figura 19(a) mostra a estabilização estérica que ocorre devido às interações entre as cadeias do polímero ou do polímero com o solvente presente na superfície das nanopartículas. Para haver a agregação o solvente deve ser excluído dentre as partículas ou em volta da cadeia do polímero o que é desfavorável energeticamente, criando assim uma barreira à agregação. Já na Figura 19(b) observa-se a superfície carregada da nanopartícula e associada à superfície contra-íons fortemente ligados, chamada de camada de Stern. A carga presente provoca uma repulsão eletrostática, proporcionando uma barreira à agregação (CHRISTIAN *et al.*, 2008). Em função da dependência da repulsão eletrostática a estabilização por cargas é muito mais sensível à variação da concentração iônica do meio.

Figura 19 – Representação da estabilização (a) estérica e (b) eletrostática das nanopartículas.



Fonte: Adaptado de CHRISTIAN *et al.* (2008).

2 OBJETIVOS

Preparar e caracterizar nanopartículas de derivados da galactomanana da *Dimorphandra gardneriana*.

2.1 *Objetivos Específicos*

Modificar a galactomanana da fava danta por reação de sulfatação, oxidação e inserção de grupos hidrofóbicos e caracterizar as amostras modificadas.

Preparar nanopartículas de galactomanana da fava danta sulfatada e quitosana via complexação polieletrólítica.

Preparar nanopartículas de galactomanana da fava danta oxidada com quitosana e primaquina via Base de *Schiff*.

Preparar nanopartículas de galactomanana da fava danta hidrofóbicas por auto-organização.

Caracterizar as nanopartículas quanto ao tamanho, potencial zeta e polidispersão.

3 METODOLOGIA

3.1 *Materiais*

A galactomanana da fava danta foi isolada, pelo método descrito por CUNHA *et al.* (2009), das sementes das vagens que foram coletadas na cidade do Crato – CE, em agosto-setembro de 2006. A amostra de quitosana (QT) utilizada tem massa molar $4,6 \times 10^5$ g/mol com grau de desacetilação de 82% (determinado por RMN ^1H), $\text{pKa} = 6,2$, cedida pela Polymar Ind. Ltda Ciência e Nutrição S/A (Fortaleza – CE).

A água deionizada utilizada para os experimentos apresentava resistividade de 18 M Ω .cm, obtida de deionizador com resina de troca iônica (ELGA, modelo PURELAB Classic).

A membrana de diálise foi obtida da Sigma-Aldrich com limite de massa molar de aproximadamente 12400 g/mol.

3.2 *Extração da galactomanana da semente da fava danta (Dimorphandra gardneriana)*

Uma massa de 20 gramas de semente de fava danta foi intumescida em 80 mL de água fervente por 20 minutos sob agitação magnética, seguida de um período de 24 h a temperatura ambiente sem agitação. As sementes intumescidas foram descascadas manualmente, separando-se o endosperma, retirando também o tegumento e o gérmen.

Os endospermas separados foram colocados em 200 mL de água sob agitação magnética por 16 horas para completar o intumescimento. Posteriormente foram adicionados 500 mL de água destilada e após uma rápida agitação a mistura foi processada em liquidificador. À solução viscosa obtida adicionou-se mais 500 mL de água e o sistema deixado sob agitação magnética por 2 horas. Logo em seguida, centrifugou-se esta solução por 30 minutos a 6000 rpm.

Após centrifugação, separou-se a solução sobrenadante e com o material sedimentado preparou-se uma suspensão, adicionando 150 mL de água destilada sob agitação magnética, a qual foi centrifugada a 6000 rpm por 30 minutos. À solução sobrenadante obtida nesta etapa misturou-se a solução sobrenadante anterior. A galactomanana solúvel no somatório de sobrenadantes foi precipitada, lentamente e

sob agitação moderada, em álcool etílico comercial 96% na proporção de 1:3 (volume de solução de goma/volume de álcool). O precipitado de galactomanana obtido foi recolhido em um funil de placa sinterizada porosidade média, lavado com álcool etílico e acetona P.A, sendo depois seco com ar quente. O material seco obtido foi denominado goma da fava danta (FD). Pesou-se o pó obtido e o procedimento teve seu rendimento calculado.

A FD foi caracterizada por espectroscopia na região do infravermelho e por espectroscopia de ressonância magnética nuclear, como descrito no tópico métodos de análise, item 3.7.

3.3 Modificação da Galactomanana

3.3.1 Reação de Sulfatação

Os derivados sulfatados da galactomanana foram preparados segundo método descrito por O'NEILL (1955) e ONO *et al.* (2003), no qual o ácido monoclorosulfônico (densidade 1,75 g/mL) é utilizado como reagente para sulfatação. Galactomanana (1,0 g, 6×10^{-3} mol de unidades glicosídicas) foi suspensa em 75,0 mL de dimetilformamida (DMF), durante 24 horas sob agitação. A esta suspensão adicionou-se 60 mL de piridina e manteve-se o sistema sob agitação por 3 horas. Após esse período o sistema, em frasco fechado, foi colocado em um banho de gelo onde adicionou-se o ácido monoclorosulfônico vagarosamente, 1 mL a cada 5 min.

O procedimento foi realizado com volume variado de ácido (8 e 13 mL) para obtenção de diferentes razões molares FD/ácido (Tabela 6). Após a adição total do ácido, manteve-se o sistema reacional em agitação por 12 horas sob refrigeração. À suspensão da galactomanana sulfatada (FDS) foi adicionado bicarbonato de sódio. A solução foi dialisada (acompanhada por condutância) contra água destilada até eliminação dos solventes e excesso de reagentes e depois liofilizada. O material obtido foi solubilizado em água, ajustado o pH para 7,0 e liofilizado.

Tabela 6 – Dados experimentais da reação de sulfatação da galactomanana.

Produto	Volume de SO₃HCℓ adicionado (mL)	Mols de SO₃HCℓ Adicionado	Razão Molar FD/ácido
FDS1	8,0	0,121	1:20
FDS2	13,0	0,195	1:33

3.3.2 Reação de Oxidação

A reação de oxidação parcial da galactomanana foi realizada por modificação do método descrito por CHRISTENSEN, AASPRONG e STOKKE (2001) e DAWLEE *et al.* (2005). A galactomanana (1,0 g, 6×10^{-3} mol de unidades glicosídicas) foi dissolvida em água destilada por 2 horas, utilizando-se três quantidades distintas de periodato de sódio, NaIO₄, de modo a obter razões molares de unidades glicosídicas/periodato de 10:2, 10:4 e 10:8 (Tabela 7).

A mistura reacional foi deixada por 24 horas à temperatura ambiente e após este período, etilenoglicol foi adicionado para parar a reação. A galactomanana oxidada (FDO) obtida foi dialisada contra água destilada (4 - 5 vezes) para eliminação do excesso de reagente e, então, liofilizada.

Tabela 7 – Dados experimentais da reação de oxidação da galactomanana.

Produto*	Mol de NaIO₄	Razão Molar
FDO10:2	$1,25 \times 10^{-3}$	10:2
FDO10:4	$2,5 \times 10^{-3}$	10:4
FDO10:8	$5,0 \times 10^{-3}$	10:8

*A numeração refere-se à relação FD/NaIO₄.

O grau de oxidação da galactomanana foi determinado por espectroscopia de absorção na região do UV-VIS, como descrito por GOMEZ, RINAUDO e VILLAR (2007). Neste método, utiliza-se um indicador preparado com volumes iguais de soluções de iodeto de potássio, KI, (20% m/v) e amido (1% m/v) dissolvidos em tampão fosfato pH 7,4. Para determinação do teor de periodato foram retirados 2,5 mL da solução reacional (antes da introdução de etilenoglicol) e misturados com 1,5 mL do indicador, em seguida, o volume foi completado para 5,0 mL com água destilada.

O complexo formado foi diluído adequadamente para ser analisado em um espectrofotômetro Hitachi U-2000 em 486 nm. A diferença entre a quantidade inicial e final de periodato corresponde à quantidade de unidades glicosídicas oxidadas.

A curva padrão do íon periodato foi utilizada para calcular a concentração de NaIO_4 não consumido durante a oxidação. A curva foi preparada a partir de uma solução estoque que foi diluída para obter soluções com concentração $1,57 \times 10^{-5}$, $1,96 \times 10^{-5}$, $2,35 \times 10^{-5}$, $2,75 \times 10^{-5}$ e $3,14 \times 10^{-5}$ mol/L, obtendo uma relação linear, $r = 0,990$ e a Equação 4

$$ABS = 0,02 + (2,6 \times 10^4 \cdot [IO_4^-]) \quad (4)$$

onde ABS é a absorvância medida e $[IO_4^-]$ é a concentração do íon periodato em mol/L.

3.3.3 Reação de Acilação

Os derivados hidrofóbicos da galactomanana foram obtidos segundo o método descrito por MOTOZATO *et al.* (1986) com modificações. A galactomanana (1,0 g, 6×10^{-3} mol de unidades glicosídicas) foi suspensa em 100 mL de formamida durante 24 horas a 50°C . Em seguida adicionou-se diferentes razões molares de goma:piridina:anidrido acético (FDAc) e de goma:piridina:anidrido propiônico (FDPr), foram preparadas e estão sumarizados na Tabela 8. A mistura reacional foi deixada por 24 horas à 50°C e após este período foi precipitada em água destilada. A galactomanana modificada obtida foi, então, liofilizada.

Os derivados sulfatados, oxidados e hidrofóbicos da galactomanana foram caracterizados por análise elementar, espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV), espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), cromatografia de permeação em gel (GPC), reometria e espectroscopia de fluorescência, como descrito no tópico métodos de análise, item 3.7.

Tabela 8 – Dados experimentais da reação de acilação da galactomanana da fava-danta.

Amostra	Volume Anidrido Acético (mL)	Volume Piridina (mL)	Razão molar goma:piridina:anidrido (G/P/A)
FDAc1:3:12	9,6	1,5	1:3:12
FDAc1:6:12	9,6	3,0	1:6:12
FDAc1:3:15	12,0	1,5	1:3:15
FDAc1:6:15	12,0	3,0	1:6:15
FDPPr1:3:12	9,6	1,5	1:3:12
FDPPr1:6:12	9,6	3,0	1:6:12
FDPPr1:3:15	12,0	1,5	1:3:15
FDPPr1:6:15	12,0	3,0	1:6:15

3.4 Nanopartículas via complexação polieletrólítica de Quitosana e Galactomanana Sulfatada

Soluções de 0,025% m/v de QT foram preparadas em ácido acético 1% e de 0,025% m/v de galactomanana da fava danta sulfatada (FDS1 e FDS2) em água deionizada e ambas foram filtradas em membrana de celulose millipore 0,45 µm.

A síntese dos complexos polieletrólíticos (CPE's) ocorreu pela adição do polication ao poliânion (QTFDS) ou pela adição do poliânion ao polication (FDSQT) através de uma bureta por gotejamento na vazão de aproximadamente 3 mL/min e sob agitação lenta de 150 rpm para as razões de cargas dos polieletrólitos n^+/n^- de 0,1; 1 e 10 em triplicata. A análise estatística foi feita através do programa PRISM.

As nanopartículas produzidas via complexação polieletrólítica foram caracterizadas conforme descrito no tópico métodos de análise, item 3.7.

3.5 Nanopartículas via Base de Schiff de Quitosana e Galactomanana Oxidada

Soluções 0,025% m/v de QT foram preparadas em ácido acético 1% e o pH foi ajustado para 6,5 pela adição de NaOH 1,0 mol/L. As soluções 0,025% m/v da galactomanana da fava danta oxidada (FDO10:4 e FDO10:8) foram preparadas em água deionizada. As soluções dos polissacarídeos foram filtradas em membrana de celulose millipore 0,45 µm.

A síntese das nanopartículas via base de Schiff ocorreu pela adição da quitosana à fava danta oxidada (QTFDO) ou pela adição da fava danta oxidada à quitosana (FDOQT) através de uma bureta por gotejamento na vazão de aproximadamente 3 mL/min e sob agitação lenta de 150 rpm para as razões de $-NH_2/-CHO$ n^+/n^- de 0,1; 1 e 10 em triplicata. A análise estatística foi feita através do programa PRISM.

As nanopartículas produzidas via base de *Schiff* foram caracterizadas conforme descrito no tópico métodos de análise, item 3.7.

3.6 Nanopartículas auto-organizadas de Galactomanana Hidrofóbica

Soluções de FDAc e FDPPr foram preparadas pela dissolução de 2 mg do polissacarídeo em 20 mL de dimetilsulfóxido e depois dialisadas contra água destilada com volume fixo de água (4,0 L) por três dias e acompanhadas por condutância. Ao final da diálise, o volume total foi medido e, assim, determinado à concentração real da solução das nanopartículas.

3.7 Métodos de Análise

3.7.1 Análise Elementar

Os teores de nitrogênio, carbono e enxofre foram determinados para as galactomananas sulfatadas por microanálise elementar utilizando o equipamento da Perkin-Elmer CHN 2400.

3.7.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em pastilhas de KBr e analisados num espectrômetro da SHIMADZU modelo 8300.

3.7.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear de 1H e ^{13}C (Broad Band e DEPT-135) de soluções das amostras (~2,5%) em D_2O foram obtidos em

equipamento Bruker Modelo Avance DRX500, com controle de temperatura, a 70°C e 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato de sódio (DSS) como padrão interno.

3.7.4 Cromatografia de Permeação em Gel

O volume de eluição (V_e) foi determinado por cromatografia de permeação em gel (GPC) em cromatógrafo SHIMADZU LC-10AD com detector de índice de refração RID-6A, coluna Ultrahydrogel linear 7,8 x 300 mm, com fase móvel de NaNO_3 0,1 mol/L, fluxo de 0,5 mL/min e o volume de amostra foi de 50 μL .

3.7.5 Reometria

As medidas de viscosidade aparente foram realizadas em um reômetro da TA Instruments modelo AR550, utilizando um sistema de cone placa 40 mm em temperatura ambiente.

3.7.6 Espectroscopia de Fluorescência

As soluções estoque do polissacarídeo hidrofóbico foram preparadas em dimetilsulfóxido (5,0 mg de polissacarídeo em 5 mL de DMSO) e depois dialisado contra água destilada por três dias. Foram retiradas 13 alíquotas (0,010 a 5 mL) e cada alíquota foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL. A cada solução do polissacarídeo foi adicionada uma alíquota de 10 μL de uma solução aquosa estoque de pireno ($6,0 \times 10^{-4}$ mol/L) e o volume completado com água destilada, obtendo-se uma concentração final de pireno de $6,0 \times 10^{-7}$ mol/L. As medidas foram realizadas em triplicata.

Os espectros de fluorescência foram obtidos usando espectômetro Hitachi F-4500, utilizando cubeta de quartzo. O espectro de emissão da fluorescência (350-400 nm) do ambiente pireno foi medido usando um comprimento de onda de excitação em de 390 nm. A razão de intensidades (I_1/I_3), da primeira I_1 sobre a terceira I_3 banda vibrônica do pireno, em 334 e 337 nm, respectivamente, foi usada para detectar a formação de microdomínios hidrofóbicos. O espectro de excitação (300-360 nm) foi medido usando um comprimento de onda de emissão de 374 nm. A razão de

intensidades (I_{337}/I_{334}) foi usada para determinar a concentração de associação crítica (CAC). A largura da fenda utilizada para todas as medidas foi de 5 nm.

3.7.7 Caracterização das partículas

O diâmetro hidrodinâmico, a distribuição de tamanho das nanopartículas e potencial zeta foram determinados a 25°C utilizando o equipamento Nano Zetasizer da Malvern modelo ZEN 3500, com feixe de luz vermelha contínua e comprimento de onda de 633 nm. O modelo matemático de análise foi por número em triplicata.

3.7.8 Análise Estatística

A análise estatística foi feita através do programa PRISM. O programa compara as variações de tamanho das repetições como também as variações de uma razão para outra. O resultado é obtido por valores menores ou maiores que P. Quando a análise indica $P < 0,05$ os valores são significativos e quando $P > 0,05$ os valores não são significativos. No caso do resultado ser significativo, o programa mostra que pode ser pouco significativo (* $P < 0,05$), significativo (** $P < 0,05$) e muito significativo (***) $P < 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização da Galactomanana da Fava Danta

O rendimento da galactomanana da fava danta foi calculado considerando-se a massa inicial de sementes postas para intumescer e a massa de galactomanana seca obtida após o método de extração. O valor do rendimento da galactomanana em relação à massa de semente foi de $29 \pm 3\%$. CUNHA *et al.* (2009) obtiveram 31% e MONTEIRO (2009) 32% para galactomanana extraída da mesma espécie de sementes. O rendimento da galactomanana da fava danta obtido neste trabalho foi bom e está dentro da faixa de rendimento observado para galactomananas extraídas de outras espécies: *Gleditsia macracantha* (21,7%) (RAKHMANBERDYEVA e SHASHKOV, 2005), *Trigonella foenumgraecum* (22,6%) (BRUMMER, CUI e WANG, 2003), *Cassia javanica* (26%) (ANDRADE *et al.*, 1999), *Caesalpinia pulcherrima* (25%) (CERQUEIRA *et al.*, 2009), *Gleditsia triacanthos* (24,73%) (CERQUEIRA *et al.*, 2009) e *Cyamopsis tetragonolobus* (24–35%) (DEA e MORRISON, 1975).

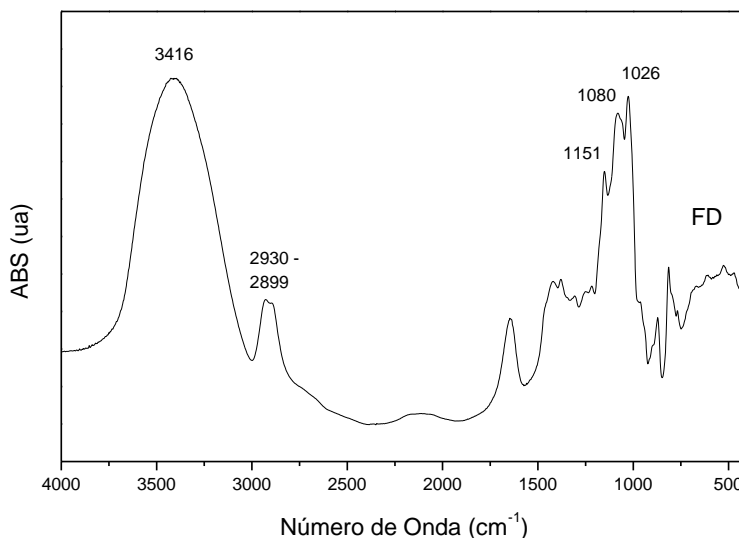
O teor de proteínas 1,76% foi estimado pelo teor de nitrogênio (0,30%) obtido por microanálise elementar, o cálculo levou em consideração um fator de conversão igual a 5,87 que é o usual para galactomananas (AZERO e ANDRADE, 2002). Proteína é um contaminante comum em polissacarídeos naturais e o teor obtido é uma quantidade considerável de proteína, considerando-se a aplicação farmacológica.

Em galactomananas extraídas de sementes de *Cyamopsis tetragonolobus* e de *Dimorphandra mollis* foram detectados um teor de proteína de 3,6 e 8,3-16,8% (CUNHA, 2006; PANEGASSI, SERRA e BUCKERIDGE, 2000), respectivamente. Entretanto, o método de obtenção da galactomanana da *D. mollis* é diferente. Nesse processo, as sementes da *D. mollis* são somente moídas e peneiradas. No trabalho de CUNHA *et al.* (2009), o teor de proteína para galactomanana obtida da espécie *D. gardneriana* utilizando a mesma metodologia empregada neste trabalho foi de 1,75%.

A Figura 20 apresenta o espectro na região do infravermelho para a galactomanana da fava danta, que apresenta bandas características de glicosídeos relativas ao estiramento da ligação do grupo $O - H$ ($3000 - 3500 \text{ cm}^{-1}$), ao estiramento da ligação do grupo $C - H$ ($2930 - 2899 \text{ cm}^{-1}$), ao estiramento da ligação do grupo

C – O de álcool (1026 e 1080 cm^{-1}), ao estiramento da ligação glicosídica C – O – C (1151 cm^{-1}) (GROSEV, BOZAC e PUPPELS, 2001).

Figura 20 – Espectro na Região do Infravermelho para a galactomanana da fava danta (FD).



A Figura 21 apresenta o espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H para a FD. Os sinais foram atribuídos com base nos dados relatados na literatura (Tabela 9) (CUNHA *et al.*, 2009). Observa-se no espectro de ^1H os sinais dos prótons anoméricos em δ 5,01 e 4,72 que foram atribuídos ao H-1 da α -D-galactose e β -D-manose, respectivamente. A razão M:G pode ser calculada diretamente das áreas dos sinais dos anoméricos obtendo-se um valor de $1,93 \pm 0,02$. A razão M:G para a galactomanana da mesma espécie com valores menores foram obtidos 1,82 (CUNHA *et al.*, 2009) e 1,21 (MONTEIRO, 2009). A razão M:G de galactomananas extraídas de diferentes espécies de sementes da flora brasileira varia de 1,1 a 4,0 (CUNHA *et al.*, 2009).

A Figura 22 apresenta a distribuição da massa molar para a FD. O valor foi estimado a partir de uma curva padrão de pululana, que permitiu calcular a massa molar de pico para a FD, $6,6 \times 10^6$ g/mol. Esse valor foi maior do que o obtido por CUNHA *et al.* (2009) $4,2 \times 10^6$ g/mol e por MONTEIRO (2009) $3,40 \times 10^6$ g/mol. Essa variação na massa molar de galactomanana também foi observada para a espécie *Dimorphandra mollis* que apresentou valores de $1,0 \times 10^5$ a $2,0 \times 10^6$ g/mol dependendo da etapa do processo de extração em que a fração foi obtida (FRANCO *et al.*, 1996).

Tabela 9 – Sinais de ^1H (ppm) para a galactomanana da *Dimorphandra gardneriana*.

Posição	^1H	
	Manose	Galactose
1	4,72	5,01
2	4,09	3,83
3	3,79	3,91
4	3,85 (3,82*)	4,00
5	3,53 (3,74*)	3,88
6	3,89 (3,99*)	3,75

*quando o resíduo anterior de D-manose é ramificado.

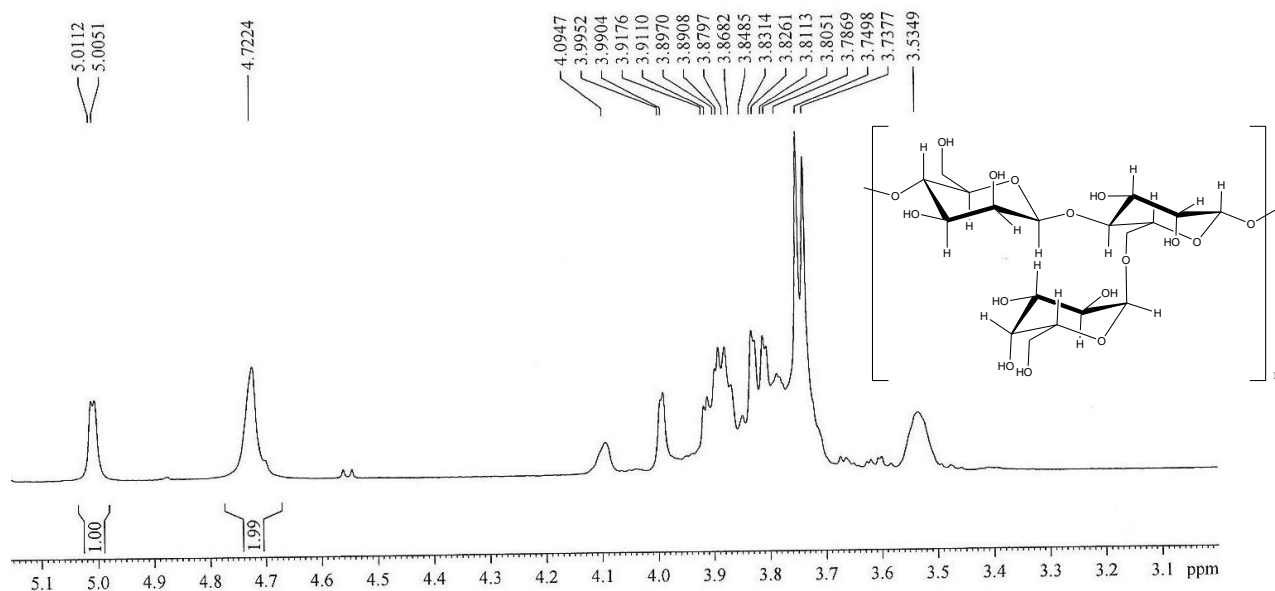
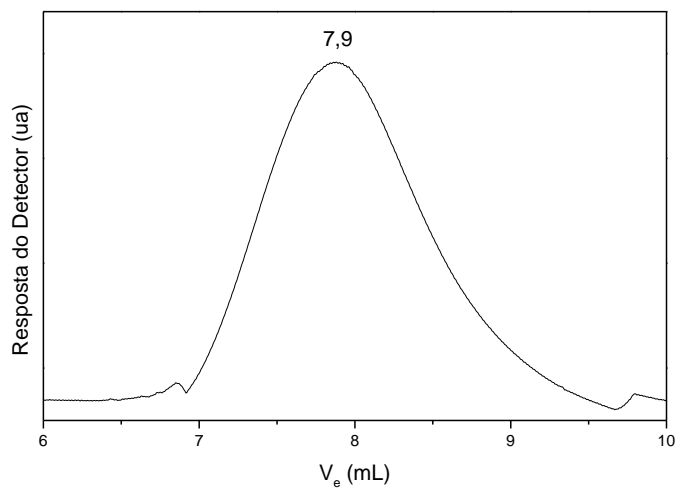
Figura 21 – Espectro de RMN ^1H a 70°C em D_2O da fava danta.

Figura 22 – Perfil cromatográfico (GPC) para a galactomanana da fava danta (FD).



4.2 Caracterização dos Derivados Sulfatados

4.2.1 Efeito da Concentração de Ácido Monoclorosulfônico no Rendimento e no Grau de Sulfatação

O grau de sulfatação (GS) foi determinado utilizando o teor de S (%) e C (%) obtido por microanálise (Tabela 10) e equação (5). A equação proposta é baseada na estrutura do polissacarídeo, considerando que o GS é definido como o número de grupos $-SO_3^-$ por unidade monossacarídica. Como na galactomanana os constituintes principais são hexoses (ROBINSON, ROSS-MURPHY e MORRIS, 1982) pode-se considerar então o GS como o número de grupos $-SO_3^-$ por 6 carbonos da unidade glicosídica (MELO *et al.*, 2002).

$$GS = \frac{\frac{\%S}{\text{massa atômica S}}}{\frac{\%C}{\text{massa atômica C} \times 6}} = 2,25 \cdot \frac{\%S}{\%C} \quad (5)$$

Tabela 10 – Efeito da concentração do ácido monoclorosulfônico na reação de sulfatação da galactomanana.

Produto	RS/UG*	%S	% C	GS
FD	-	-	37,96	-
FDS1	19,5	4,66	33,26	0,32
FDS2	31,6	5,31	28,33	0,42

*RS – reagente de sulfatação e UG – unidade glicosídica

Diferentes valores de GS foram obtidos para os derivados sulfatados da galactomanana através da variação do valor de ácido monoclorosulfônico. Aumentar a razão RS/UG aumentou o GS para a galactomanana. Resultados semelhantes foram obtidos para a sulfatação de outros polissacarídeos. Comparando o GS de diferentes galactomananas (Tabela 11) nas mesmas condições reacionais é possível concluir que a reação utilizada neste trabalho conduziu a uma sulfatação menos eficiente do que à relatada por outros autores, que pode estar relacionada ao fato da maior concentração do polissacarídeos, portanto, soluções mais viscosas.

Tabela 11 – Comparação entre as condições da sulfatação e as características dos derivados de galactomananas extraídas de diferentes espécies.

Amostra	Razão M:G	Concentração do polissacarídeo (%m/v)	Reagente da sulfatação	RS/UG ^a	Temperatura (°C)	Rendimento ^b (%)	GS	Referência
<i>Mimosa scabrella</i>	1,1	0,5	ACS-pi-FA	31,5	4	-	0,62	ONO <i>et al.</i> (2003)
<i>Leucaena leucocephala</i>	1,4	0,5	ACS-pi-FA	31,5	4	-	0,50	
<i>Dimorphandra gardneriana</i>	1,99	0,7	ACS-pi-FA	19,5	4	54	0,32 ^c	Neste trabalho
		0,7	ACS-pi-FA	31,5	4	96	0,42 ^c	

^a razão molar do reagente de sulfatação por unidade glicosídica.

^b calculado pela equação (6).

^c calculado pela equação (5).

ACS-pi-FA – ácido monoclorosulfônico com piridina em formamida.

O rendimento foi calculado considerando a massa molar da unidade glicosídica na cadeia polimérica e o aumento da massa molar em função da introdução do grupo sulfato na cadeia do polissacarídeo, no caso uma galactomanana, portanto espera-se que a massa molar final dos derivados sulfatados seja de $162 + GS \times 102$ g/mol, onde 162 g/mol é a massa molar da unidade glicosídica na cadeia polimérica. A equação (6) expressa o modo mais adequado de se calcular o rendimento.

$$\text{Rendimento (\%)} = 100 \cdot \frac{m_f}{m_i \cdot \left(1 + \frac{GS \cdot 102}{162}\right)} \quad (6)$$

onde m_f e m_i são as massas dos derivados sulfatados e do polissacarídeo, respectivamente. E GS é o grau de sulfatação obtido pela equação 5.

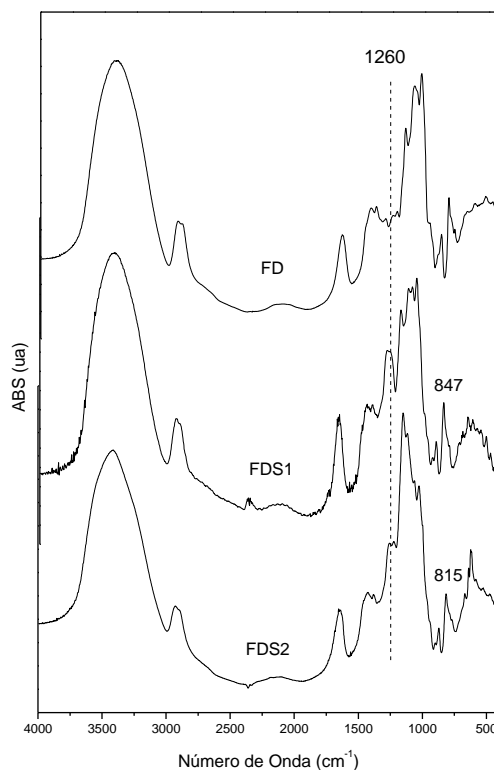
Uma comparação entre o rendimento da reação de sulfatação da galactomana da fava danta e outras galactomananas não foi possível uma vez que esse dado não está disponível.

4.2.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho

A modificação da goma foi confirmada pela comparação dos espectros na região do infravermelho da FD e dos derivados – FDS1 e FDS2 – (Figura 23) pelo aparecimento de uma nova banda na região de 1260 cm^{-1} , atribuída à vibração de estiramento assimétrico do $O = S = O$ e 847 e 815 cm^{-1} , atribuída à vibração simétrica do grupo $C - O - S$ associada ao grupo $C - O - SO_3$ (GROSEV, BOZAC e PUPPELS, 2001; MAHNER, LECHNER e NORDMEIER, 2001).

O aumento do grau de sulfatação levou, também, a uma diminuição do estiramento da ligação do grupo $C - O$ de alcoóis (1026 e 1080 cm^{-1}). Esse comportamento pode ser atribuído ao aumento da sulfatação, pois ocorre uma diminuição dos grupos alcoólicos substituídos por grupos sulfatos e a uma intensificação da banda de 1150 cm^{-1} (estiramento da ligação glicosídica) nos derivados que comprova a não degradação total da cadeia do polissacarídeo.

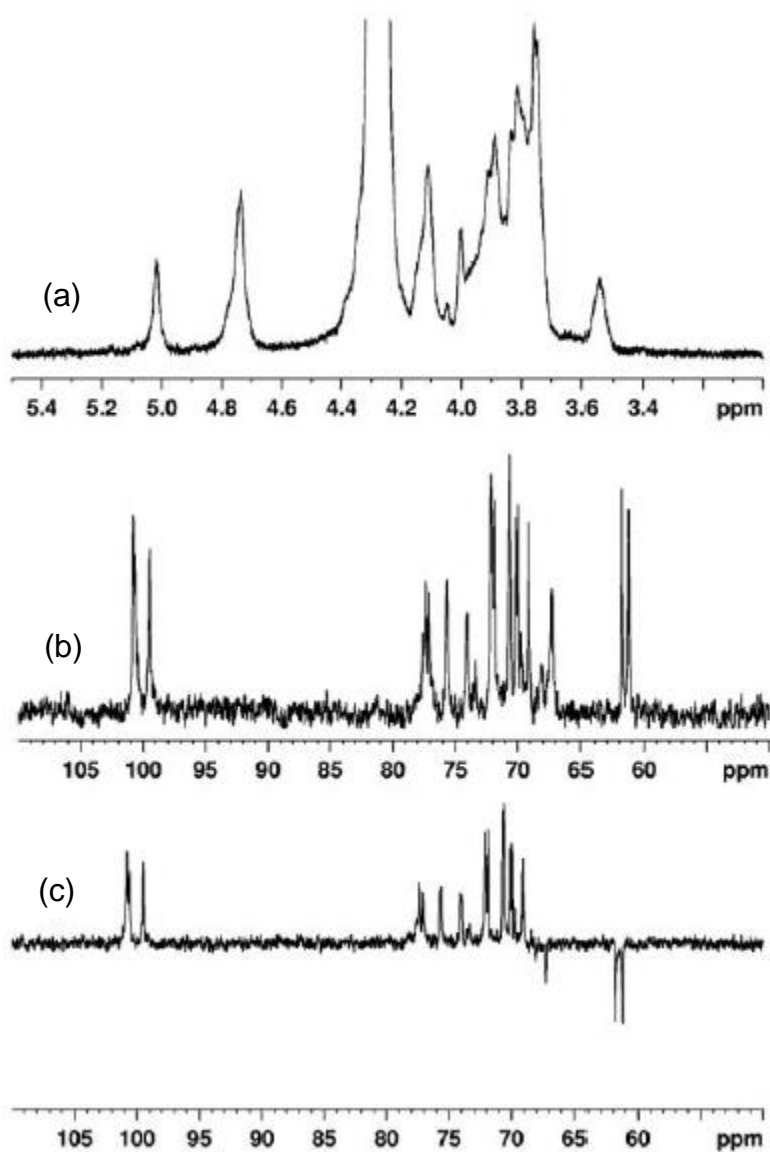
Figura 23 – Espectro na Região do Infravermelho para a galactomanana da fava danta (FD) e seus derivados sulfatados (FDS1 e FDS2).



4.2.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

A Figura 24 apresenta os espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H , ^{13}C BB e ^{13}C DEPT para o derivado sulfatado da galactomanana (FDS1). A razão M/G para o derivado FDS1 foi de $2,85 \pm 0,08$ (Figura 24a). Esse elevado valor sugere a perda de galactose durante a reação de sulfatação. No espectro de ^{13}C BB (Figura 24b) observa-se um novo sinal em δ 68,0, a substituição por grupos sulfatos desloca os sinais para região de maior deslocamento químico dos carbonos em cerca de δ 6-8 (CHRESTSNI *et al.*, 2009, MESTECHKINA, SHCHERBUKHIN e SHASHKOV, 2008 e MOURA NETO *et al.*, 2010), pela diminuição da blindagem devido a adição do grupo mais eletronegativo $-\text{SO}_3^-$, o que sugere a substituição pelo grupo sulfato no carbono C-6 das unidades monossacarídeos. O ^{13}C DEPT (Figura 24c) confirma a atribuição deste novo sinal, pela amplitude oposta ao sinal de $-\text{CH}_3$ e $-\text{CH}$ da substituição em carbonos primários $-\text{CH}_2$.

Figura 24 – Espectro de RMN ^1H (a), ^{13}C BB (b) e ^{13}C DEPT (c) a 70°C em D_2O da fava danta sulfatada (FDS1).



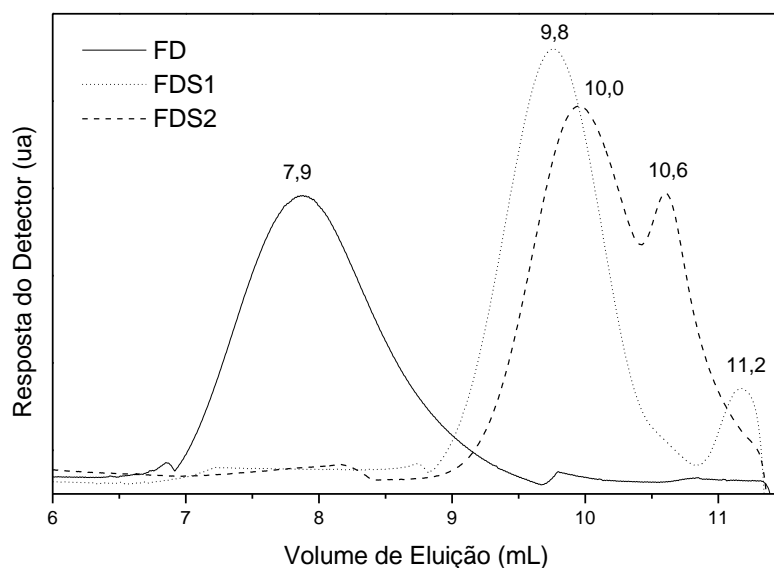
4.2.4 Cromatografia de Permeação em Gel

A massa molar e o grau de sulfatação são importantes parâmetros que influenciam as atividades biológicas (YANG *et al.*, 2003). A galactomanana tem massa molar média ponderal e numérica $3,9 \times 10^7$ e $1,9 \times 10^7$ g/mol (CUNHA *et al.*, 2009). O valor absoluto da massa molar média dos derivados sulfatados só pode ser determinada por GPC se o cromatógrafo for acoplado a um detector *multiangle laser light scattering (MALLS)*, que não necessita de padrões para

calibrar a coluna. Quando outros detectores são utilizados, como índice de refração, são necessários padrões de diferentes massas molares na calibração. Pululana é frequentemente utilizada para polissacarídeos. Infelizmente, esse padrão não é suficiente para polissacarídeos carregados ionicamente devido à rigidez da cadeia e extensão, como consequência da repulsão eletrostática.

Os cromatogramas de GPC para a galactomanana e derivados sulfatados podem ser visto na Figura 25 e foram utilizados para avaliar a degradação do polissacarídeo durante a reação de sulfatação. Observa-se um aumento no volume de eluição comparando as curvas de FD ($V_e = 7,9$ mL) com FDS1 ($V_e = 9,8$ mL) e FDS2 ($V_e = 10,0$ mL). Se nenhuma degradação ocorre na cadeia, era esperado que as amostras sulfatadas eluissem em um volume menor do que ao do polissacarídeo não-modificado, devido ao aumento da massa molar e da repulsão entre as cargas dos novos grupos.

Figura 25 – Cromatograma de GPC para soluções aquosas 0,1% m/v da galactomanana (FD) e dos derivados sulfatados (FDS) em fase móvel de NaNO_3 0,1 mol/L.



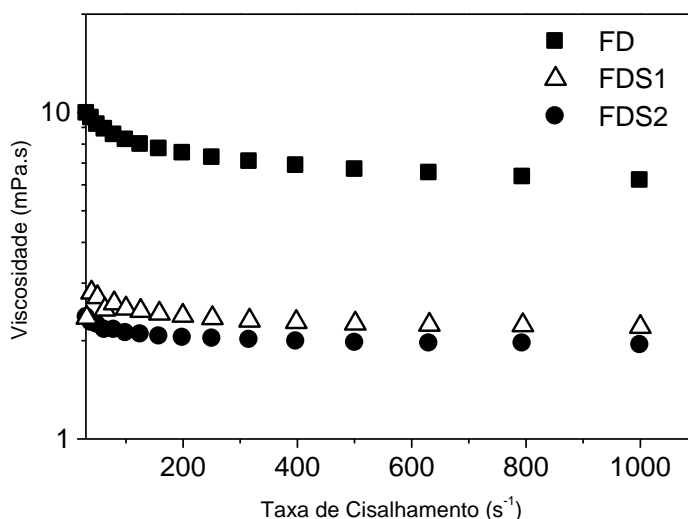
A massa molar aumentaria cerca de 20% em FDS1 ($GS = 0,32$) e 26% em FDS2 ($GS = 0,42$), mas o observado foi um aumento no V_e de 12,4% e 12,6% para FDS1 e FDS2, respectivamente. Esse aumento pode ser atribuído a uma possível degradação do polissacarídeo durante a reação, que é confirmada pelos picos de $V_e = 10,6$ e $11,2$ mL, para FDS1 e FDS2, respectivamente. A degradação, também, foi observada na sulfatação da galactomanana da *Lupinus polyphyllus* (VOGL, PAPER E FANZ, 2000) e da goma guar (WANG *et al.*,

2010b). O aumento da degradação com o aumento do grau de substituição foi descrito para a carboximetilação da goma do cajueiro (SILVA *et al.*, 2004) e para a oxidação de goma de cajueiro (CUNHA *et al.*, 2007).

4.2.5 Reometria

A Figura 26 apresenta o comportamento da viscosidade em função da taxa de cisalhamento. Pode-se observar uma redução da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento para a galactomanana não modificada (FD), indicando comportamento pseudoplástico. Já os derivados sulfatados (FDS1 e FDS2) praticamente não apresentam alteração na viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento, o que os aproxima de um comportamento Newtoniano. CUNHA *et al.*(2009) observaram que a diminuição da concentração da solução da galactomanana de 1,0 % para 0,1% (m/v) provocava a mudança no comportamento de pseudoplástico para Newtoniano. Essa mudança no comportamento observada para os derivados, mesmo em soluções de 1,0% (m/v), pode ser atribuída à repulsão provocada pelas cargas negativas adicionadas ao polissacarídeo neutro, o que causa repulsão entre as cadeias.

Figura 26 – Curvas de viscosidade para as soluções aquosas a 1% (m/v) de FD, FDS1 e FDS2, a 25 °C.



A viscosidade das soluções dos derivados sulfatados, em toda a extensão de cisalhamento aplicada, foi menor em relação a não modificada. Comportamento semelhante foi observado por CUNHA *et al.* (2006) para a

galactomanana de goma guar sulfatada, sendo que quando maior o grau de sulfatação maior foi a diminuição da viscosidade. Esse comportamento pode ser atribuído à degradação da cadeia do polissacarídeo, observada nos cromatogramas de permeação em gel, possivelmente ocasionada pelo ácido concentrado utilizado na reação de sulfatação.

4.3 Caracterização dos Derivados Oxidados

4.3.1 Determinação da Porcentagem de Oxidação da Galactomanana

A porcentagem de unidades glicosídicas oxidadas corresponde à diferença entre a quantidade adicionada e a concentração final de periodato. Os resultados obtidos estão sumarizados na Tabela 12. Para todas as reações observou-se o consumo quase completo do periodato de sódio. Resultado similar foi obtido com a oxidação de alginato de sódio (GOMEZ, RINAUDO e VILLAR, 2007) e com a goma do cajueiro (MOURA NETO, 2008).

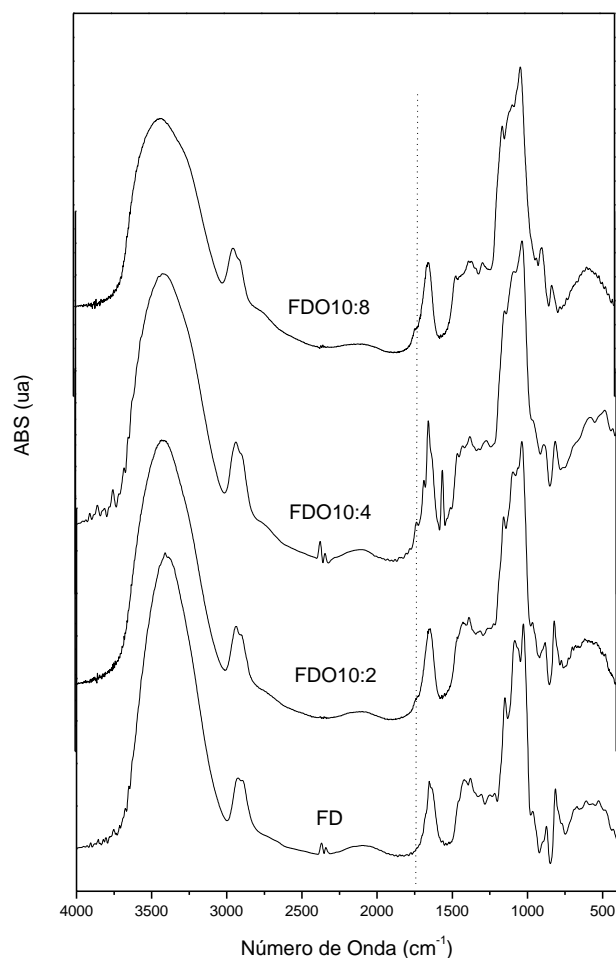
Tabela 12 – Efeito da quantidade de periodato na porcentagem de oxidação da galactomanana.

Produto	% de NaIO₄ consumido	Relação GC (mol de unidades glicosídicas)/ mol de unidades oxidadas
FDO10:2	99,9	10:2
FDO10:4	99,0	10:4
FDO10:8	99,0	10:8

4.3.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho

A Figura 27 apresenta os espectros na região do infravermelho para a FD e derivados oxidados. Observa-se o aparecimento de um ombro na região de 1730 cm^{-1} , atribuído ao estiramento $C = O$ de aldeídos, que sugere a modificação do polissacarídeo.

Figura 27 – Espectro na região do infravermelho para FD e derivados oxidados (FDO).



4.3.3 Ressonância Magnética Nuclear

Para confirmar a oxidação do polissacarídeo, o derivado FDO10:4 foi caracterizado por ressonância magnética nuclear de ^1H e o espectro é mostrado na Figura 28. O derivado apresenta os sinais atribuídos aos anoméricos da galactose e manose em δ 5,1 e 4,7, respectivamente (CUNHA *et al.*, 2009), e um novo sinal em δ 5,6 que pode ser atribuído à formação de um hemiacetal intra-residual entre um grupo aldeído e grupos hidroxilas (como exemplificado na Figura 29). O surgimento de novo sinal na região de deslocamento químico maior do que os característicos de próton anomérico (δ 4,5-5,0) foi, também, observado na oxidação de alginato de sódio com periodato de sódio indicando a formação do hemiacetal intra-residual (GOMEZ, RINAUDO e VILLAR, 2007).

Figura 28 – Espectro de RMN ^1H a 70°C em D_2O da FDO10:4.

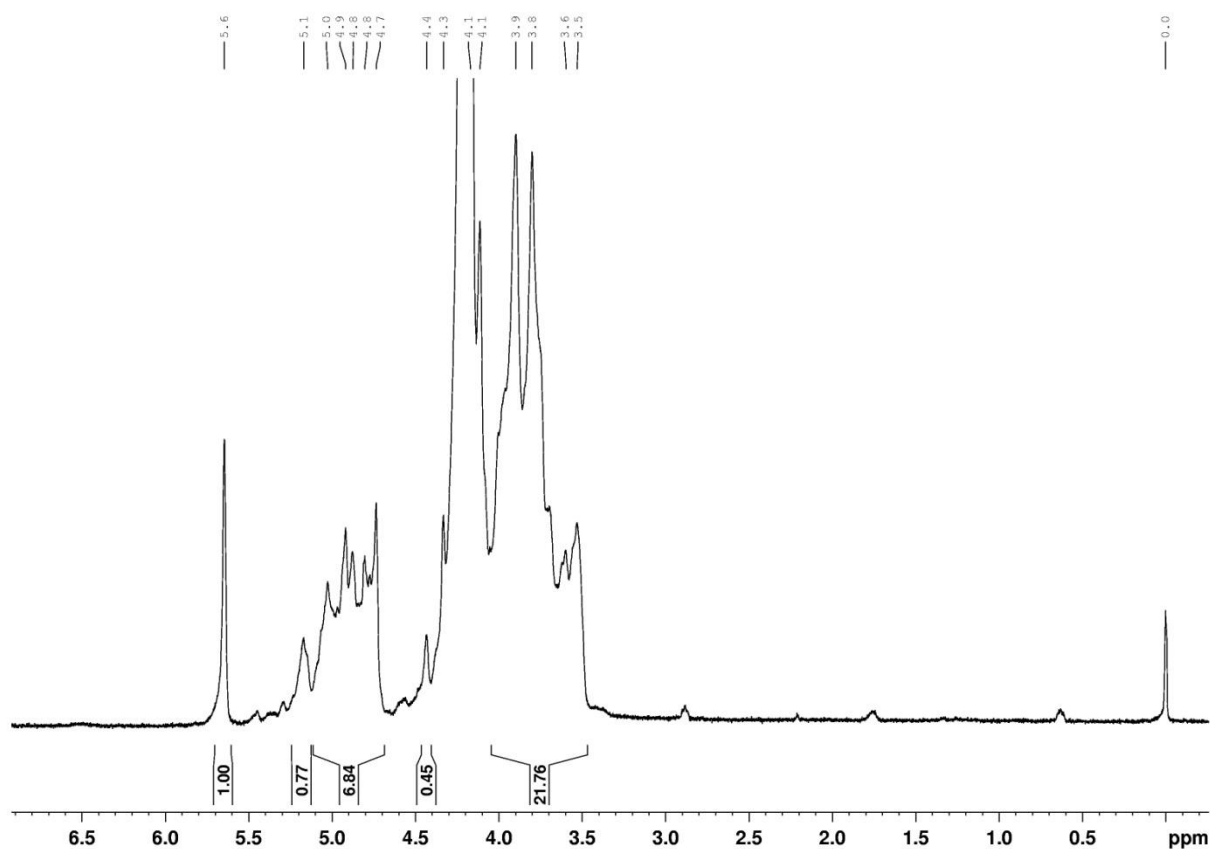
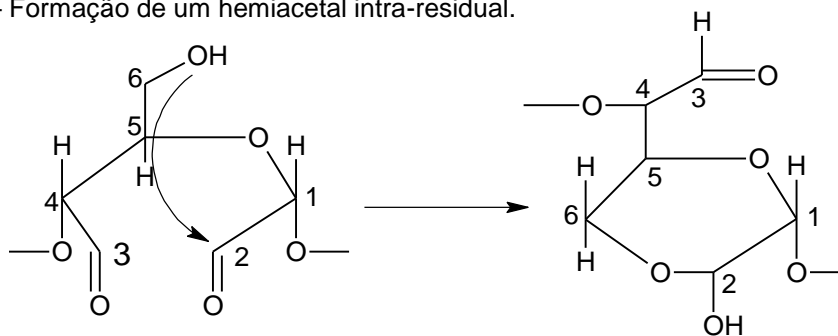


Figura 29 – Formação de um hemiacetal intra-residual.

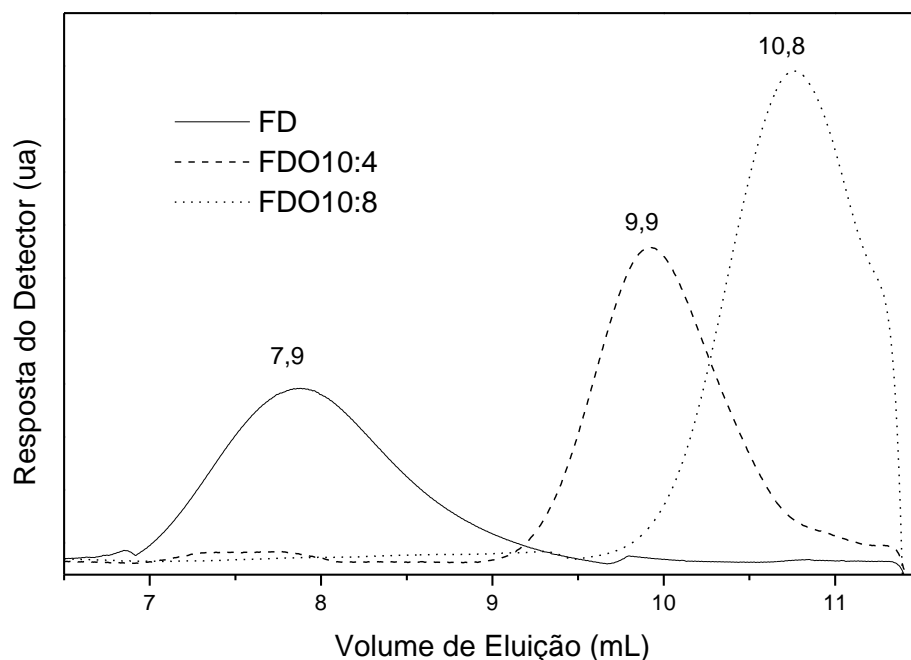


Fonte: BRUNEEL e SCHACHT (1993).

4.3.4 Cromatografia de Permeação em Gel

No cromatograma da FD e dos derivados oxidados (Figura 30) observa-se um aumento no volume de eluição (V_e) dos derivados.

Figura 30 – Cromatograma de GPC para soluções aquosas 0,1% m/v da galactomana (FD) e dos derivados oxidados (FDO) em fase móvel de NaNO_3 0,1 mol/L.



A massa molar de pico (MM_p) foi estimada utilizando os valores de V_e e uma curva padrão de pululana (Equação 7).

$$\log MM_p = 16,37 - 1,209 \cdot V_e \quad (7)$$

Os valores obtidos estão sumarizados na Tabela 13. Observa-se uma diminuição na massa molar. Essa diminuição foi de 200 e 3000 vezes para os derivados FDO10:4 e FDO10:8, respectivamente. O aumento de periodato de sódio durante a reação de oxidação, diminui a massa molar do derivado obtido, esse comportamento pode ser atribuído ao fato do periodato de sódio oxidar hidroxilas vicinais, e como na galactomanana a ligação glicosídica é 1→4, a oxidação pode ocorrer tanto na cadeia principal de manose ou nas unidades de galactose, o que pode levar a uma degradação do polissacarídeo, que é confirmada pela presença de um ombro no cromatograma do derivado FDO10:8.

Tabela 13 – Estimativa da massa molar de pico (MM_p) para a galactomanana e derivados oxidados.

Amostra	V_e (mL)	MM_p (g/mol)
FD	7,9	$6,6 \times 10^6$
FDO10:4	9,9	$2,5 \times 10^4$
FDO10:8	10,8	$2,1 \times 10^3$

4.4 Caracterização dos Derivados Hidrofóbicos

Os derivados hidrofóbicos da galactomanana da fava danta foram produzidos pela inserção de grupos acetila e propila por reação de acilação.

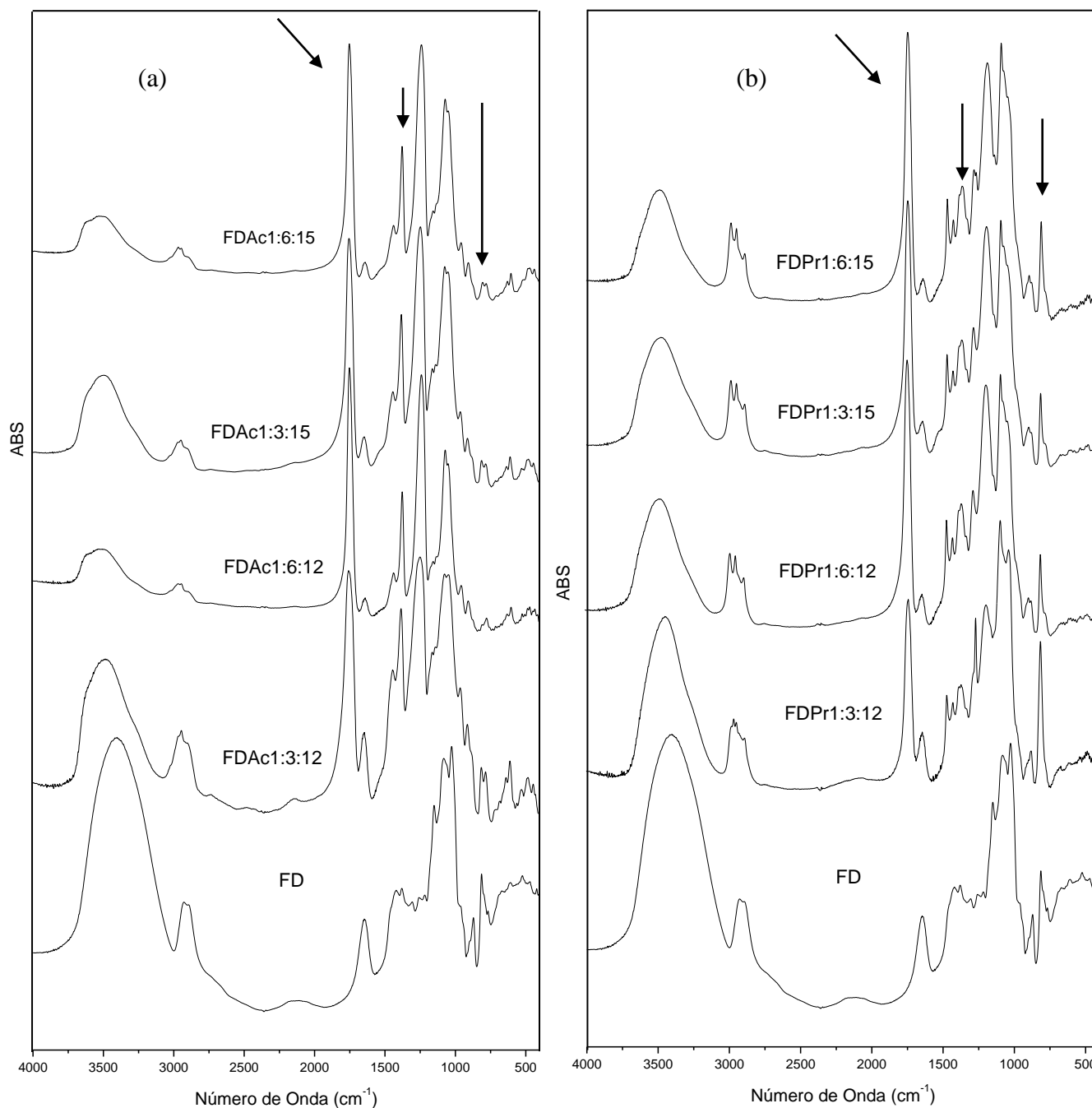
4.4.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho

A presença de grupos éster nos derivados foi identificada por comparação dos espectros na região do infravermelho da galactomanana da fava danta (FD) com os seus derivados (Figura 31). A presença de uma nova absorção em 1740 cm^{-1} , atribuída ao estiramento $C = O$ e a diminuição da intensidade da absorção em 3400 cm^{-1} , atribuída ao estiramento da ligação $O - H$, confirmam a formação dos derivados.

Para os espectros dos derivados obtidos com anidrido acético (FDAc's) observa-se ainda o aumento da intensidade da absorção de deformação $C - H$ em 1360 cm^{-1} (Figura 31a), já que para estes derivados há a introdução de um grupo CH_3 .

Já para dos derivados obtidos com anidrido propiônico (FDPr's) (Figura 31b) observa-se o aumento na intensidade das absorções em 1360 e 810 cm^{-1} atribuídas a deformação dos grupos CH_3 e CH_2 , como, também, o desdobramento do sinal na região de 2900 cm^{-1} , atribuído ao estiramento de grupo $C - H$, em duas absorções nos derivados, devido a presença dos grupos CH_3 e CH_2 (ZHANG *et al.*, 2009; JUNG, JEONG e KIM, 2003).

Figura 31 – Espectro na região do infravermelho para a galactomanana e derivados: a) obtidos com anidrido acético e b) obtidos com anidrido propiônico.



4.4.2 Determinação do Grau de Substituição (GS) e Rendimento

Para o grau de substituição dos derivados, foi feita uma estimativa através dos espectros na região do infravermelho, pela comparação da razão das áreas das absorções em 3400 e 1080 cm⁻¹, que são atribuídas aos estiramentos O–H e C–O, respectivamente. O GS relativo foi calculado considerando que a razão

obtida para a FD corresponde a nenhuma substituição e aplicando a Equação 8. A Tabela 14 apresenta os valores das áreas e sua razão para a FD, FDAc's e FDPPr's.

$$\% GS = \frac{(R_{FD} - R_{FDH}) \cdot 100}{R_{FD}} \quad (8)$$

em que R_{FD} é a razão entre as áreas das absorções obtidas para a FD e R_{FDH} é a razão obtida entre as absorções para os derivados.

Tabela 14 – Dados experimentais das alturas relativas de absorções para FD e derivados.

Amostra	Área		Razão das Intensidades	
	3400	1080	OH / C – O	GS (%)
FD	239,9	73,3	3,27	-
FDPPr1:3:12	41,3	13,2	3,12	4,59
FDPPr1:6:12	58,9	20,7	2,84	13,2
FDPPr1:3:15	61,5	20,7	2,97	9,17
FDPPr1:6:15	35,3	17,2	2,05	37,3
FDAc1:3:12	58,2	27,3	2,13	34,9
FDAc1:6:12	26,3	25,8	1,02	68,8
FDAc1:3:15	95,3	56,3	1,69	48,3
FDAc1:6:15	41,8	44,1	0,95	70,9

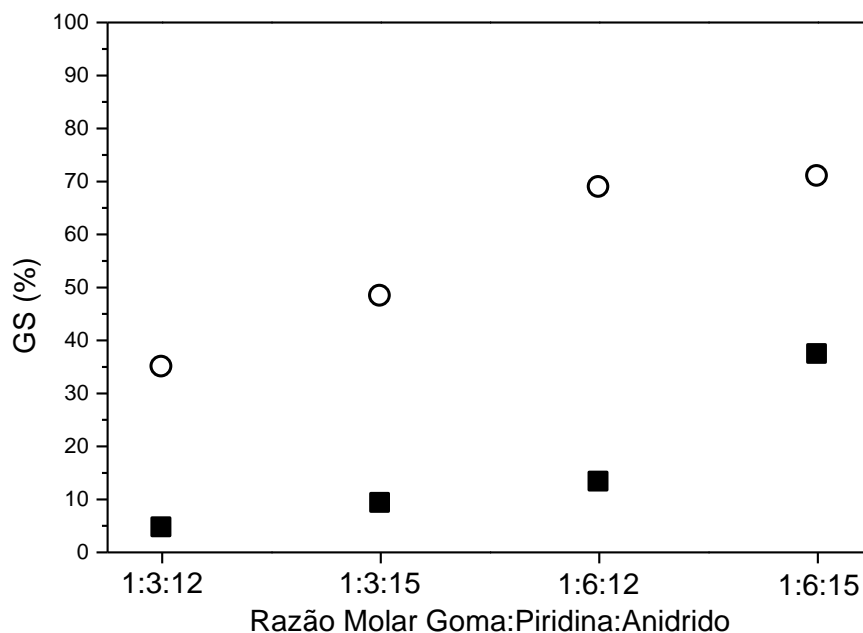
O grau de substituição para os derivados variaram de 4,59 a 37,3% para os derivados propiônicos (FDPPr) e de 34,9 a 70,9% para os derivados acéticos (FDAc). JUNG, JEONG e KIM (2003) obtiveram GS de 72, 94; 82,95 e 87,39% para derivados acéticos de pululana para razões goma:anidrido acético:piridina de 1:1,6:12, 1:2,3:12 e 1:4,7:12, respectivamente.

A Figura 32 apresenta a variação do grau de substituição dos derivados. Observa-se o aumento do GS com o aumento da quantidade molar de anidrido ou de piridina, mas não se observa uma relação linear. O aumento no grau de substituição é mais significativo quando há o aumento de piridina do que para o aumento de anidrido para todos os derivados. Para os derivados acéticos os valores foram sempre maiores que para os derivados propiônicos nas mesmas

condições reacionais, o que está relacionado com o menor volume do grupo acético, tornando-o mais reativo.

Figura 32 – Gráfico do grau de substituição em função das condições reacionais dos derivados:

■ Derivados propiônicos; ○ Derivados acéticos.



O rendimento foi calculado (Equação 9) a partir das massas iniciais e finais.

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{m_f}{m_i} \cdot 100 \quad (9)$$

em que m_f é a massa obtida após a reação, m_i é a massa inicial de FD utilizada.

A Tabela 15 resume os rendimentos obtidos. Rendimentos superiores a 100% foram obtidos, isso ocorre porque neste cálculo não foi levado em conta o aumento da massa provocado pela adição dos grupos acetila e propila para os derivados FDAc e FDPPr, respectivamente.

Tabela 15 – Dados experimentais do rendimento das reações de acilação para FD e derivados.

Amostra	m_i (g)	m_f (g)	Rendimento (%)
FDPr1:3:12	1,0250	1,1307	110,3
FDPr1:6:12	1,0030	1,2230	121,9
FDPr1:3:15	1,0040	1,3127	130,8
FDPr1:6:15	1,0036	1,1554	115,1
FDAc1:3:12	1,0087	1,0580	104,9
FDAc1:6:12	1,0055	1,3245	131,7
FDAc1:3:15	1,0018	0,9178	91,61
FDAc1:6:15	1,0009	1,1993	119,8

4.4.3 Teste de Solubilidade

A Tabela 16 resume os dados obtidos no teste de solubilidade realizado para a FD e derivados em diferentes solventes.

Tabela 16 – Dados experimentais do teste de solubilidade.

Amostra	Água	Etanol	DMSO	DMAC	CH₃Cl
FD	Solúvel	Insolúvel	Insolúvel	Insolúvel	Insolúvel
FDPr1:3:12	Insolúvel	Insolúvel	Solúvel	Insolúvel	Insolúvel
FDPr1:6:12	Insolúvel	Insolúvel	Solúvel	Insolúvel	Insolúvel
FDPr1:3:15	Insolúvel	Insolúvel	Solúvel	Insolúvel	Insolúvel
FDPr1:6:15	Insolúvel	Insolúvel	Solúvel	Insolúvel	Insolúvel
FDAc1:3:12	Insolúvel	Insolúvel	Solúvel	Solúvel	Solúvel
FDAc1:6:12	Insolúvel	Insolúvel	Solúvel	Solúvel	Solúvel
FDAc1:3:15	Insolúvel	Insolúvel	Solúvel	Insolúvel	Insolúvel
FDAc1:6:15	Insolúvel	Insolúvel	Solúvel	Insolúvel	Insolúvel

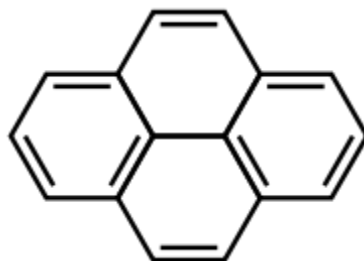
Os resultados sugerem que os derivados foram modificados e que a introdução dos grupos metilênicos modificou a polaridade dos derivados aumentando o caráter hidrofóbico, pois todos os derivados foram insolúveis em água e etanol, mas a modificação não os tornou completamente apolares, já que os derivados não se solubilizaram em clorofórmio (CH₃Cl), com exceção dos

derivados FDAc1:3:12 e 1:6:12. Observa-se, também, que todos os derivados dissolveram em dimetilsulfóxido (DMSO) e somente os derivados FDAc1:3:12 e 1:6:12 dissolveram em dimetilacetamida (DMAC).

4.4.4 Concentração de Associação Crítica

Antes de obter as nanopartículas dos derivados hidrofóbicos de polissacarídeos por auto-organização em meio aquoso utilizou-se a espectroscopia de fluorescência empregando pireno como substância ativa, a fim de determinar a concentração de associação crítica (CAC), ou seja, a concentração acima da qual haverá formação de colóides. Os derivados foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) e dialisados contra água destilada. A solução obtida foi diluída várias vezes e a cada alíquota foi adicionado 10 μL de uma solução de pireno (Figura 33) $6,0 \times 10^{-4}$ mol/L e então analisados no espectrofotômetro de fluorescência. Acredita-se que o pireno é preferencialmente solubilizado na estrutura núcleo-casca das nanoesferas, quando introduzido na fase aquosa (KOWN *et al.*, 1993).

Figura 33 – Estrutura química do pireno.



As Figuras 34 (derivados propiônicos) e 35 (derivados acéticos) mostram os espectros de excitação do pireno em várias concentrações dos derivados. A intensidade de fluorescência do pireno aumenta com o aumento da concentração de nanopartículas dos derivados. Comportamento semelhante foi obtido por JUNG, JEONG e KIM (2003) para pululana modificada com diferentes razões de anidrido acético.

Figura 34 – Espectro de excitação de Fluorescência do pireno ($6,0 \times 10^{-7}$ mol/L) *versus* a concentração das nanopartículas dos derivados com anidrido propiônico ($\lambda_{em} = 390$ nm).

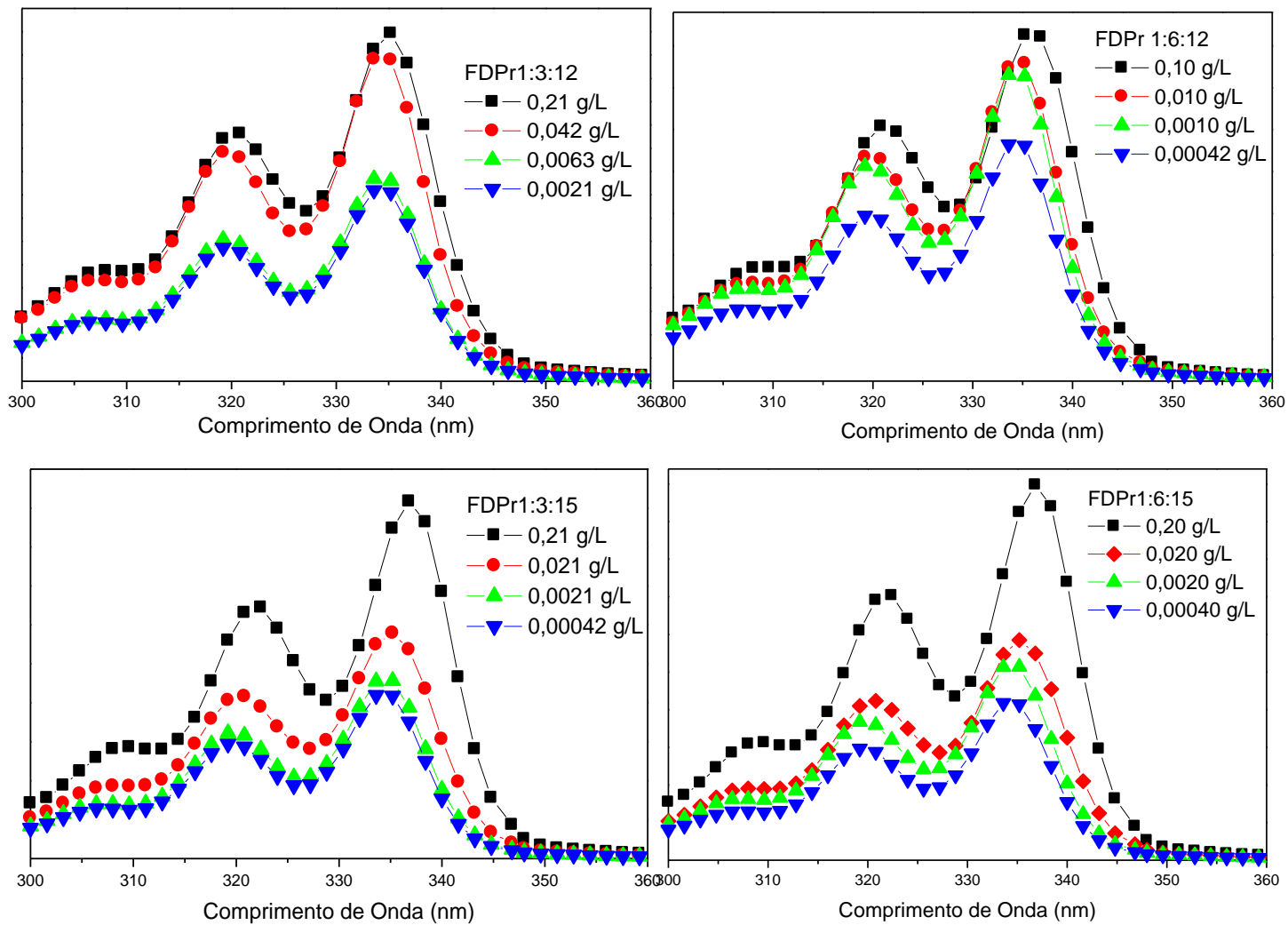
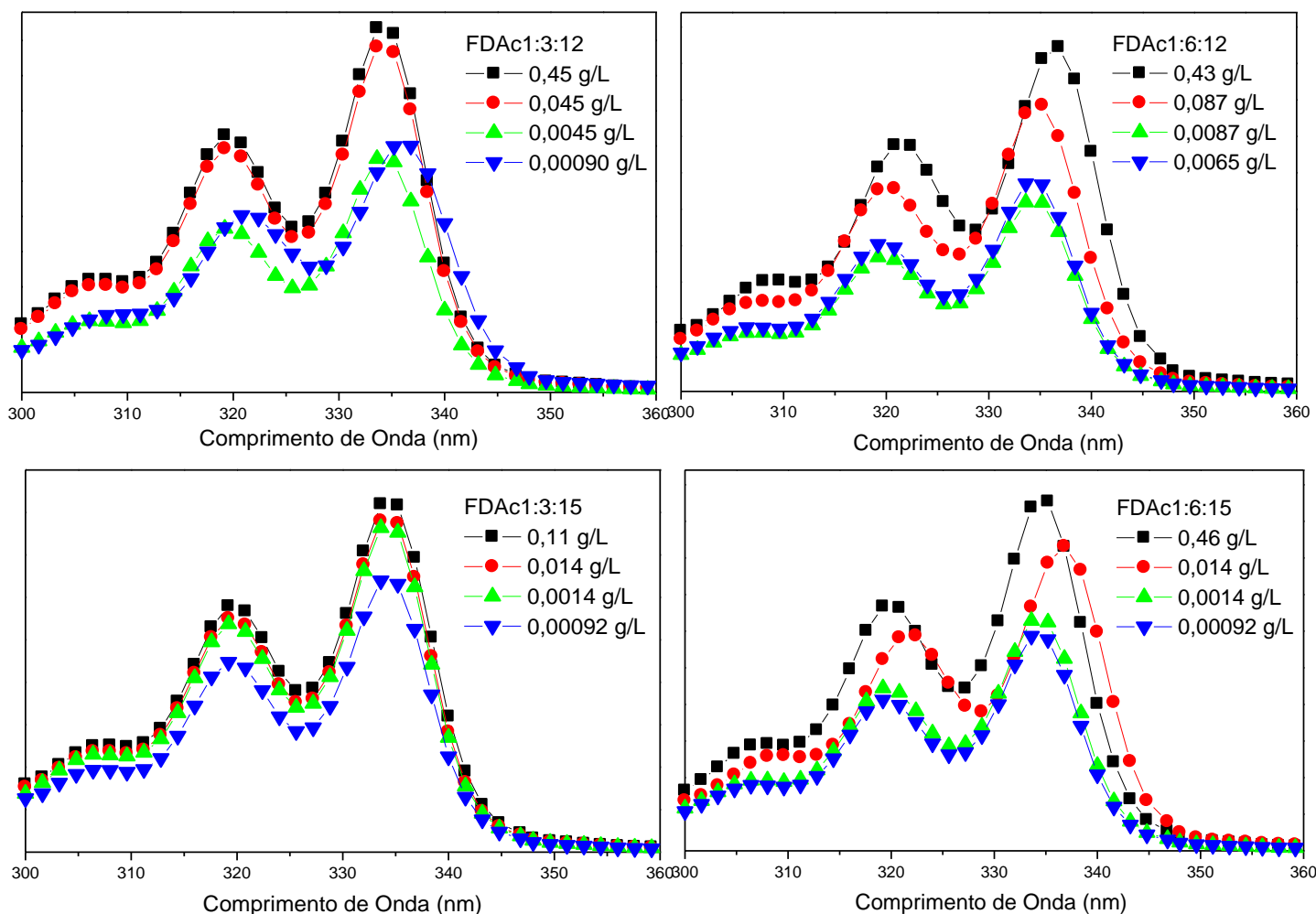
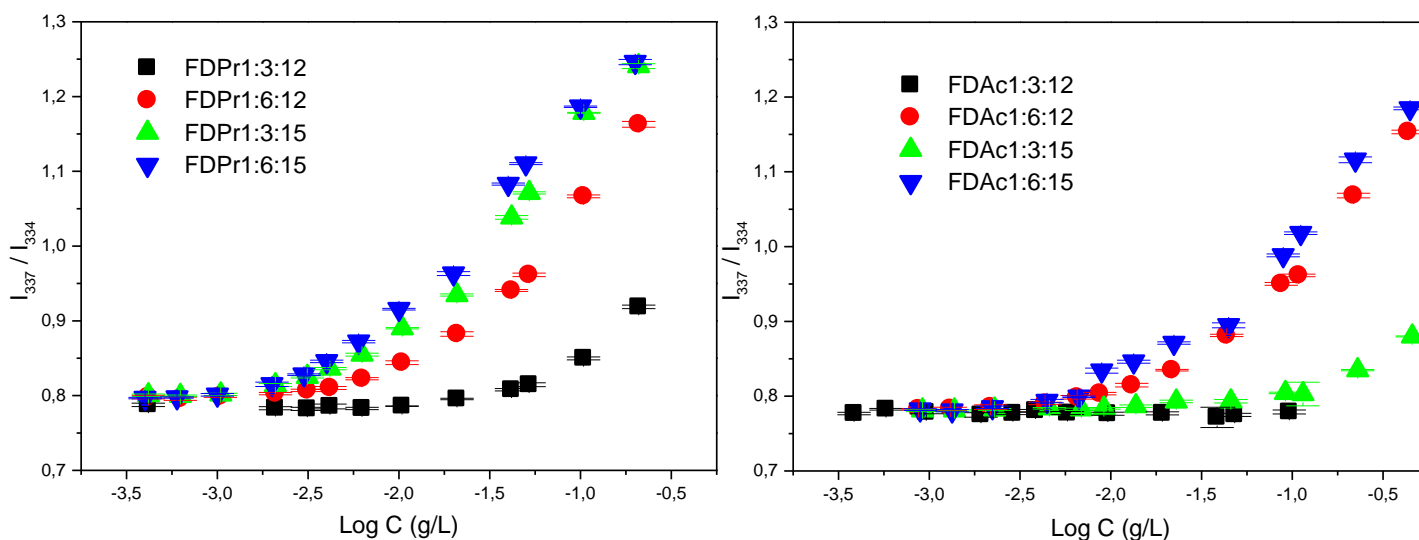


Figura 35 – Espectro de excitação de Fluorescência do pireno ($6,0 \times 10^{-7}$ mol/L) *versus* a concentração das nanopartículas dos derivados com anidrido acético ($\lambda_{em} = 390$ nm).



A CAC foi determinada a partir do gráfico da razão da intensidade I_{337} / I_{334} do espectro de excitação do pireno *versus* o logaritmo da concentração dos derivados de diferentes razões molares goma:piridina:anidrido, que são mostrados na Figura 36. Observa-se uma região constante para as concentrações extremamente baixas e uma mudança para uma região sigmóide. A interseção dessas duas regiões indica uma mudança no comportamento das nanopartículas e está relacionado à agregação das partículas, portanto é a concentração de associação crítica para as nanopartículas (JUNG, JEONG e KIM, 2003).

Figura 36 – Gráficos da intensidade da razão I_{337} / I_{334} do espectro de excitação do pireno *versus* logaritmo da concentração dos derivados em água.



A Tabela 17 apresenta os valores determinados para a concentração de associação crítica, que são dependentes das condições reacionais para a obtenção dos derivados. Observa-se que o aumento tanto de piridina como de anidrido diminui o valor da CAC. Comportamento semelhante foi obtido por JUNG, JEONG e KIM (2003) para pululana modificada com diferentes razões de anidrido acético. A CAC nos derivados com anidrido propiônico são sempre menores dos que àquelas com anidrido acético para todas as razões molares estudadas. O acréscimo de piridina diminui a CAC em torno de 50 %, enquanto que a mudança de anidrido acético para propiônico diminui a CAC numa magnitude de 10, para os derivados na razão 1:3:15 e 1:6:15. Esta tendência era esperada devido a formação de microambientes hidrofóbicos com o aumento da massa molar do anidrido (VIEIRA *et al.*, 2003).

Tabela 17 – Concentração de Associação Crítica para os derivados hidrofóbicos.

	Derivados Propiônicos				Derivados Acéticos			
	1:3:12	1:6:12	1:3:15	1:6:15	1:3:12	1:6:12	1:3:15	1:6:15
CAC (g/L)	0,032	0,014	0,0074	0,0033	-	0,16	0,054	0,022

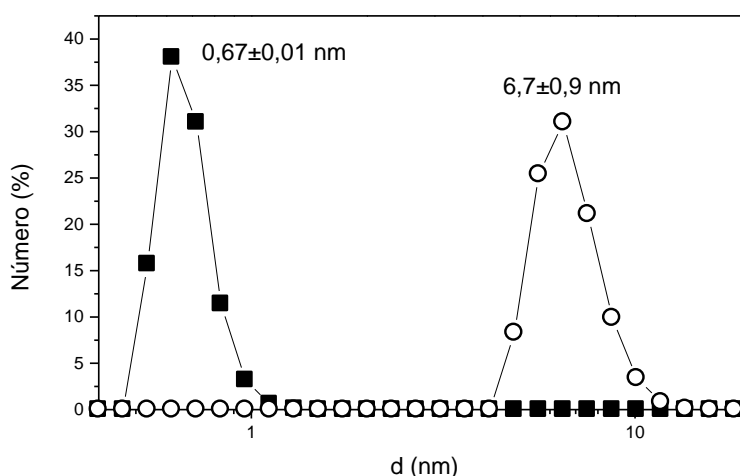
4.5 Nanopartículas de galactomanana sulfatada via Complexação Polieletrólítica

4.5.1 Efeito da ordem de adição e da razão de cargas n^+/n^-

Para estudar o efeito da ordem de adição no perfil de distribuição de tamanho de partícula foi utilizada a galactomanana sulfatada com DS = 0,42 (FDS2) nas razões de carga n^+/n^- 0,1, 1 e 10. Os sistemas foram deixados em repouso por 24 horas. Quando quitosana (QT) é adicionada à solução de FDS2 a amostra é denominada QTFDS2 e quando a solução de galactomanana sulfatada é adicionada à solução de QT a amostra foi denominada FDS2QT.

O perfil de distribuição para soluções 0,025% m/v de quitosana (QT) e galactomanana sulfatada (FDS2) DS = 0,42 é mostrado na Figura 37. Os tamanhos obtidos foram 0,67 e 6,7 nm, respectivamente, para QT e FDS2.

Figura 37 – Perfil de distribuição para as soluções 0,025% m/V de QT (■) e FDS2 (○).

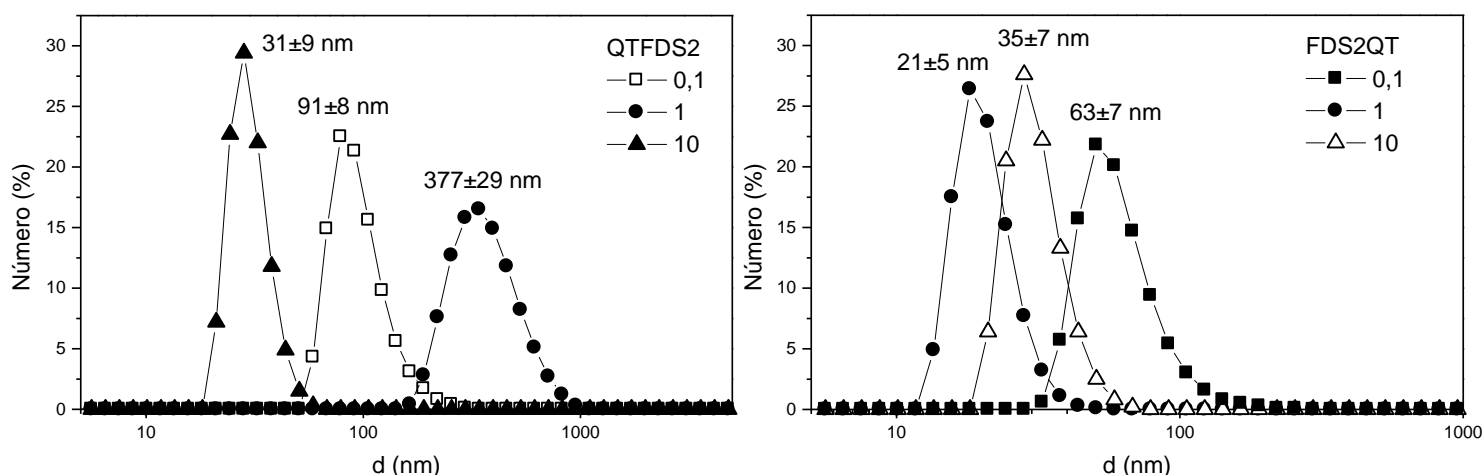


A Figura 38 mostra o perfil de distribuição para as amostras QTFDS2 e FDS2QT. Em ambos os perfis, partículas do tamanho de QT isolada (Figura 37) não foram observadas, indicando sua completa complexação. Os perfis para as partículas formadas são unimodais não importando a ordem de adição.

A ordem de adição pode afetar a complexação e o tamanho das partículas formadas (RUSU-BALAITA, DESBRIÈRES, RINAUDO, 2003; MAO *et al.*, 2006). Quando QT é adicionada à FDS2 (QTFDS2) o maior tamanho de partícula é formado quando a razão n^+/n^- é igual a 1, mas quando a ordem de adição é

invertida (FDS2QT) observa-se que o maior tamanho é quando há excesso do poliânion ($n^+/n^- = 0,1$).

Figura 38 – Perfil de distribuição de tamanho para as nanopartículas via complexação polieletrólítica de soluções 0,025% m/V de QT e FDS2 (**P<0,05 QTFDS2) e (*P<0,05 FDS2QT).



JINTAPATTANAKIT *et al.* (2007) observaram o efeito da ordem de adição em complexos polieletrólíticos de trimetilquitosana, insulina e tripolifosfato (TPP). Eles relatam que ao misturar insulina e trimetilquitosana ao TPP o tamanho da partícula era maior do que ao se misturar insulina e TPP e depois adicioná-lo a trimetilquitosana.

Ao comparar-se o comportamento do diâmetro das partículas ao variarmos a razão de cargas n^+/n^- , observa-se que para a ordem de adição FDS2QT, as partículas tendem a aumentar de tamanho quando as quantidades dos polieletrólitos são diferentes, ou seja, quando há excesso do poliânion ou do polication (razão $n^+/n^- = 0,1$ e 10). Ao inverter a ordem de adição (QTFDS2) o comportamento, também, se inverte as partículas diminuem de tamanho para as razões com excesso de polieletrólitos.

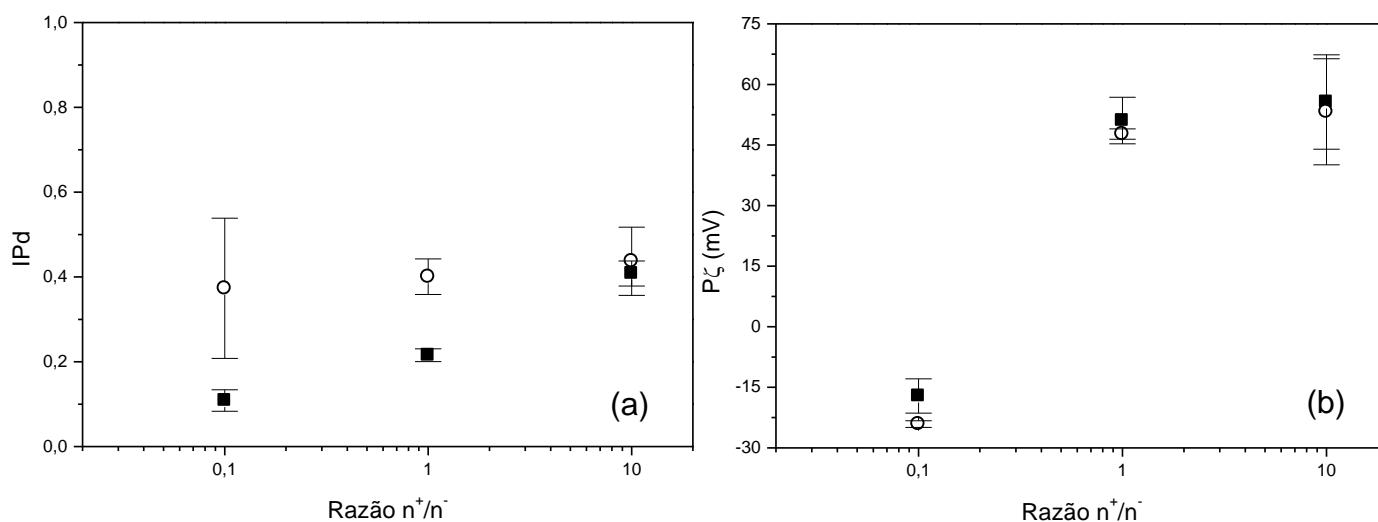
Nenhuma floculação foi observada nas razões estudadas. A visualização de opalescência ocorreu no gotejamento para a razão 0,1. Para os complexos de sulfato de dextrana e quitosana a floculação ocorre na razão próxima de 1 (SCHATZ *et al.*, 2005; SCHATZ *et al.*, 2004). Os autores constataram que a razão onde a floculação é observada depende das massas molares, tanto da quitosana como do sulfato de dextrana. A floculação ocorre se a massa molar do

sulfato de dextrana for maior do que à da quitosana. Neste estudo a massa molar dos derivados não foi determinada, mas a discussão realizada no item 4.2.4 sugere uma diminuição da massa molar dos derivados, este fator pode ser responsável pela não floculação dos CPEs e sim pela opalescência em 0,1, quando há excesso de poliânion.

4.5.2 Índice de Polidispersividade (IPd) e Potencial Zeta ($P\zeta$)

A Figura 39 apresenta o índice de polidispersividade e o potencial zeta para as partículas de QT e FDS2. Observa-se que o aumento da razão n^+/n^- aumenta o índice de polidispersividade, quando se adiciona QT a FDS2 (QTFDS2), porém esse comportamento não é observado quando se adicionada FDS2 a QT (FDS2QT).

Figura 39 – Gráfico de índice de polidispersividade (a) e potencial zeta (b) versus razão n^+/n^- para nanopartículas QT e FDS2 de concentração 0,025% (m/V): (■) QTFDS2 e (○) FDS2QT. IPd *** $P < 0,05$ – QTFDS2 e $P > 0,05$ – FDS2QT e $P\zeta$ *** $P < 0,05$.



Independentemente da ordem de adição, o potencial zeta diminui com a diminuição da razão n^+/n^- , chegando a valores negativos quando há excesso de poliânion, isto pode ser explicado pela gradativa neutralização das cargas positivas da quitosana ($-NH_3^+$) pelas cargas negativas da galactomanana sulfatada ($-SO_3^-$). Observa-se que quando há excesso de cargas negativas, o potencial apresenta valores negativos, isto indica que a nanopartícula está

recoberta com FDS. Para razões $n^+/n^- \geq 1$ os valores de potencial são positivos, indicando que quando a concentração de cargas catiônicas aumenta, a nanopartícula fica recoberta por QT. Para razão $n^+/n^- = 1$ a quantidade de cargas negativas e positivas é a mesma. Entretanto os resultados indicam que não houve uma completa neutralização das cargas, apesar da diminuição do valor do potencial zeta.

JINTAPATTANAKIT *et al.* (2007) sintetizaram complexos polieletrólíticos de trimetilquitosana (polication) e insulina (polianion) e verificaram que com a diminuição da razão de carga n^+/n^- os potenciais zeta diminuam sem, porém, atingirem valores negativos.

SARMENTO *et al.* (2006) verificaram que o potencial zeta era dependente da razão do polieletrólito, quitosana e sulfato de dextrana. O potencial zeta para essas nanopartículas é positivo na razão 2, se aproximou de zero na razão de carga 1 indicando que nessa razão o balanço de cargas positivas e negativas era similar. O potencial ficava mais negativo quando a razão de carga n^+/n^- diminuía.

CHEN, MOHANRAJ e PARKIN (2003) sintetizaram nanopartículas de quitosana e sulfato de dextrana para liberação de peptídeo. Os autores relatam que quando diminuía a razão de cargas positivas e negativas ocorria uma diminuição no potencial zeta das partículas. Resultado semelhante foi observado por ZHENG *et al.* (2007) na caracterização de nanopartículas de quitosana e ácido poliaspártico.

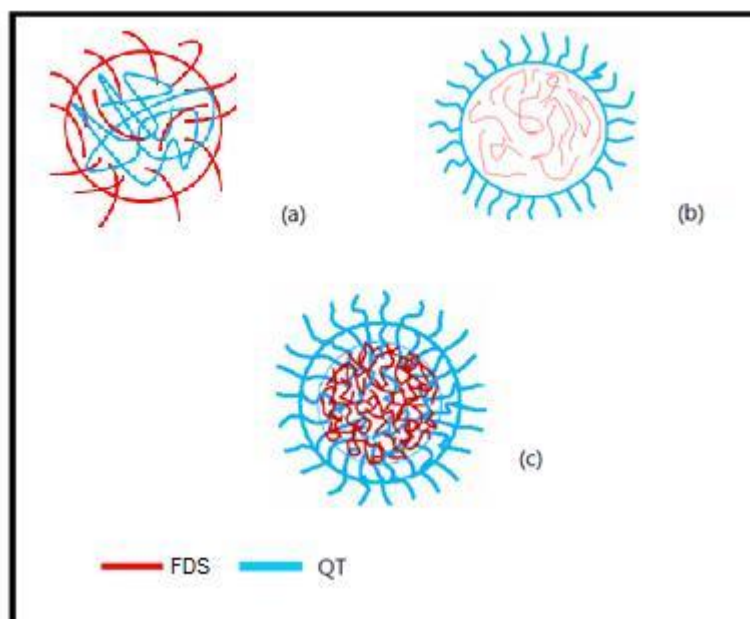
4.5.3 Mecanismo de Formação dos CPEs para de QT e FDS

A Figura 40 apresenta os diferentes modelos que explicam a formação do complexo polieletrólítico de polissacarídeo aniônico e quitosana (SCHATZ *et al.* (2004), SARMENTO *et al.* (2007) e JINTAPATTANAKIT *et al.* (2007)) de forma a estabelecer uma conclusão com os sistemas investigados neste trabalho.

O mecanismo da Figura 40a sugere que quando a galactomanana sulfatada está em excesso esta pode envolver todo o polication neutralizando suas cargas. Este mecanismo pode produzir partículas mais compactas com cargas neutralizadas em seu interior e excesso de cargas em sua superfície, o que indica uma estrutura mais estável como é o caso das partículas obtidas na

razão de cargas n^+/n^- 0,1, independente da ordem de adição. Os valores de diâmetros obtidos para a QTFDS2 e FDS2QT foram de 91 ± 8 nm e 63 ± 4 nm e de potencial zeta -17 ± 4 mV e $-24,1\pm 0,8$ mV, respectivamente.

Figura 40 – a) QT envolvendo toda a extensão da molécula da galactomanana produzindo núcleos neutros, compactos e superfície carregada. b) QT envolvendo muitas moléculas da galactomanana permanecendo no núcleo cargas isoladas causando repulsão. c) Após a completa interação entre cargas NH_3^+ e SO_3^- , segmentos de quitosana podem recobrir a nanopartícula.



Fonte: Adaptado de SCHATZ *et al.* (2004).

O pequeno tamanho apresentado pelas partículas QTFDS2 e FDS2QT na razão de cargas n^+/n^- 10, com diâmetros 32 ± 4 nm e 35 ± 7 nm e potencial zeta 56 ± 12 mV e 53 ± 13 mV, respectivamente, pode ser explicado ao considerar que quando a quitosana está em excesso esta pode envolver todo o poliânion, neutralizando suas cargas, portanto resultando em partículas menores.

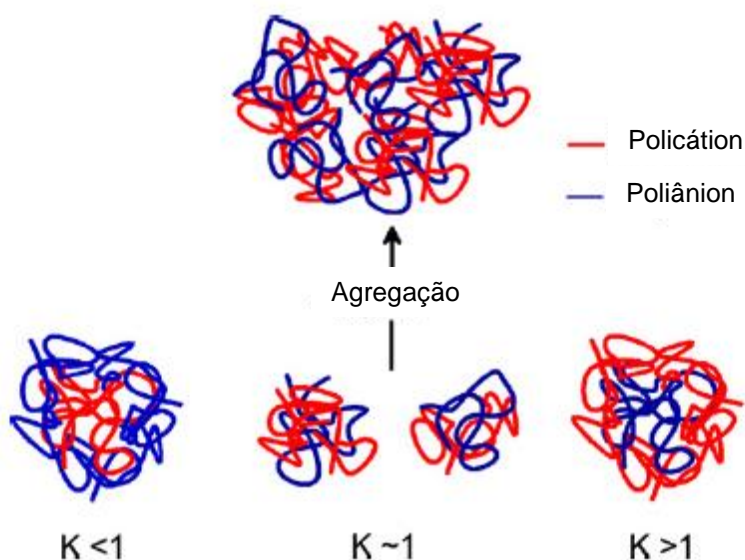
Na Figura 40b, a quitosana pode estar apenas envolvendo as moléculas de galactomanana sulfatada fazendo com que alguns segmentos fiquem isolados no interior da partícula sem sofrerem interação, facilitando a repulsão de cargas, o que justifica o aumento do tamanho das partículas e o potencial zeta positivo.

Na Figura 40c, este mecanismo pode ser relacionado à QTFDS2 na razão 1 (377 ± 28 nm e 51 ± 6 mV). Esta mudança de comportamento pode estar

relacionada com o processo de recobrimento, ou seja, após a completa interação de cargas é possível que a quitosana em excesso fique recobrindo a nanopartícula já formada em uma ou várias camadas. Isso provocaria repulsão intensa sobre as cargas do polycation que recobririam a partícula aumentando seu tamanho consideravelmente. Este fato pode ser confirmado pelos altos valores positivos de potencial zeta.

Para explicar as partículas na razão 1 pode-se utilizar o mecanismo proposto por SAETHER *et al.* (2008), que abordam que ao se aproximar da razão de cargas n^+/n^- igual a 1 há a estabilização das cargas. Há, portanto, formação de pequenas partículas, que dependendo das características do polycation e/ou do poliânion pode haver a agregação, levando à formação de partículas maiores (Figura 41). Portanto, ao se gotear quitosana sobre a galactomanana sulfatada (QTFDS2), ocorre à neutralização das cargas e posterior agregação, formando partículas de tamanho 377 ± 29 nm. Mas, ao se gotear galactomanana sulfatada à quitosana (FDS2QT), ocorre à neutralização das cargas, mas não há formação de agregados, portanto partículas menores (21 ± 5 nm) são obtidas.

Figura 41 – Esquema ilustrativo de um modelo para formação de complexos polieletrólíticos de galactomanana sulfatada (poliânion) e quitosana (polycation), em diferentes razões de carga n^+/n^- (K).



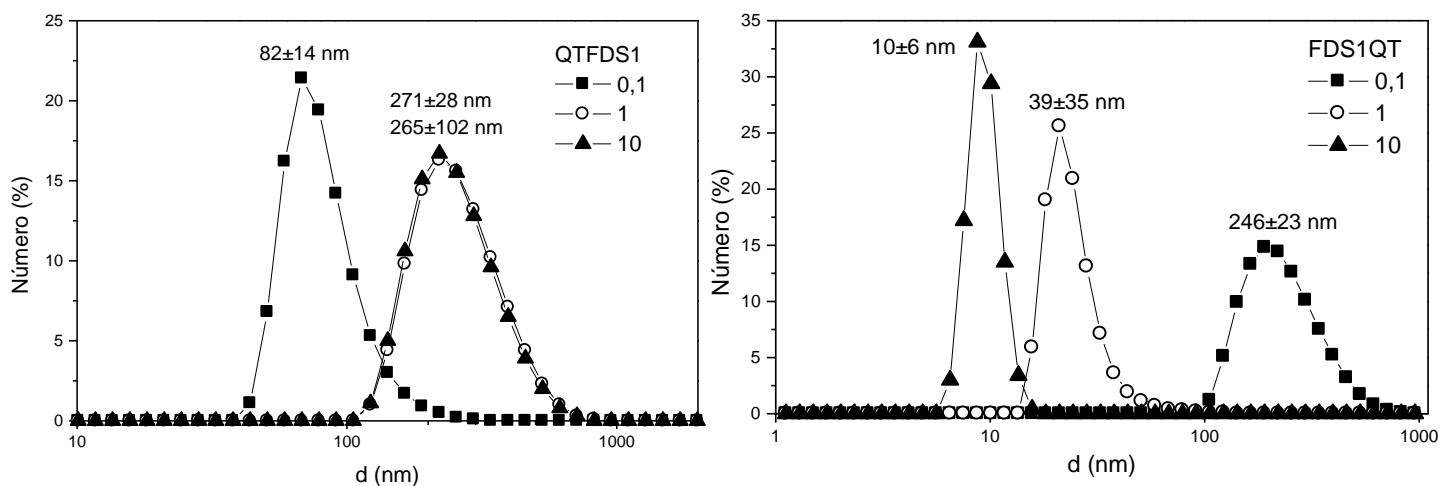
Fonte: Adaptado de SAETHER *et al.* (2008).

4.5.4 Efeito do Grau de Sulfatação

Para estudar o efeito do grau de sulfatação no perfil de distribuição de tamanho foi feita uma comparação entre os valores obtidos para a galactomanana sulfatada com $DS = 0,42$ (FDS2), discutidos na seção 4.5.1, com os diâmetros obtidos com a galactomanana sulfatada com $DS = 0,32$ (FDS1) nas razões de carga n^+/n^- 0,1, 1 e 10. Os sistemas foram, geralmente, deixados em repouso por 24 horas. Quando quitosana (QT) é adicionada à solução de FDS1 a amostra é denominada QTFDS1 e quando a solução de galactomanana sulfatada é adicionada à solução de QT a amostra foi denominada FDS1QT.

A Figura 42 mostra o perfil de distribuição para as amostras de QTFDS1 e FDS1QT. Em ambos, os perfis partículas do tamanho de QT isolada não foi observado, indicando sua completa complexação. Os perfis para as partículas formadas são unimodais não importando a ordem de adição.

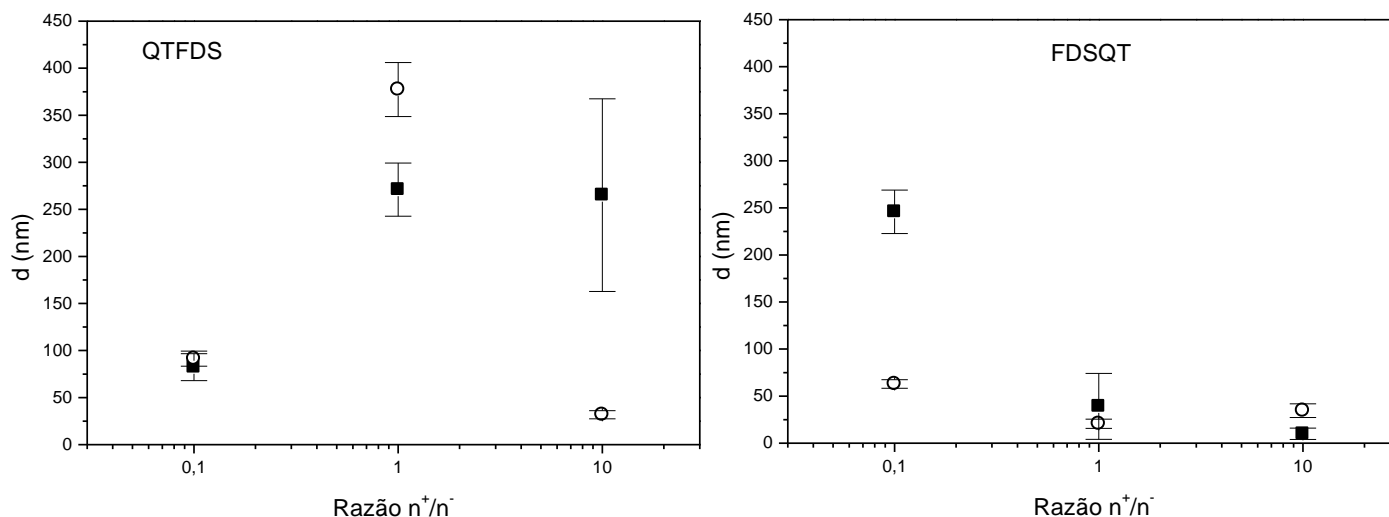
Figura 42 – Perfil de distribuição de tamanho para as nanopartículas via complexação polieletrólítica de QT e FDS1 (** $P < 0,05$ QTFDS1 e FDS1QT).



A Figura 43 mostra a variação no diâmetro das partículas devido à variação no grau de sulfatação (GS). Quando se adiciona QT a galactomanana sulfatada (QTFDS), o aumento no GS não muda o comportamento das nanopartículas, com exceção da razão de cargas n^+/n^- 0,1, que ao aumentar o GS houve uma diminuição do tamanho das partículas. Esse comportamento pode ser explicado devido à conformação dos CPEs, que ao adicionar QT sobre

FDS, a QT envolve a FDS e como a FDS2 tem maior GS, portanto tem mais grupos negativos por unidade glicosídica, a neutralização das cargas é mais efetiva, levando a uma diminuição das partículas.

Figura 43 – Gráfico de diâmetro versus razão n^+/n^- . Efeito do grau de sulfatação para as nanopartículas de soluções 0,025% m/V de QT e FDS: (■) FDS1 e (○) FDS2 (**P<0,05 QT FDS1, FDS1QT e QT FDS2) e (*P<0,05 FDS2QT).

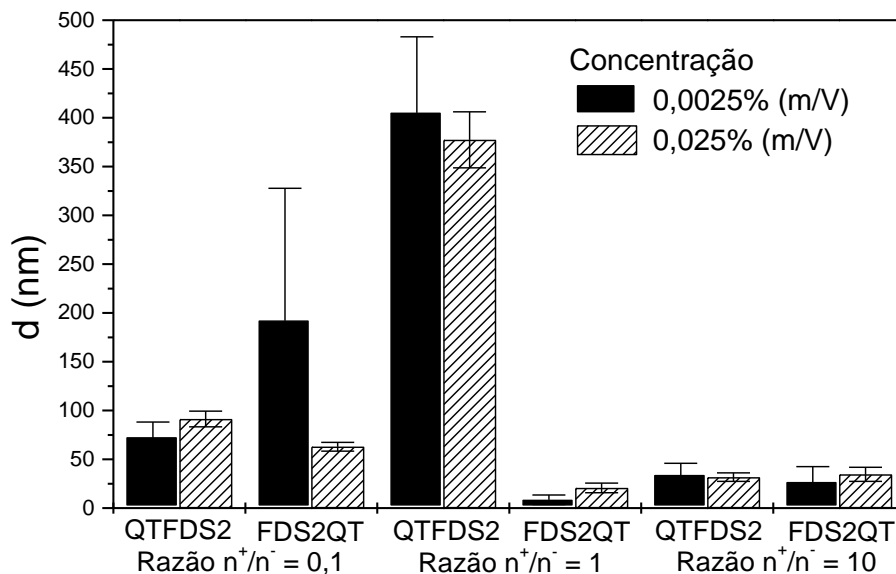


Ao adicionar a galactomanana sulfatada à QT (FDSQT), observa-se uma diminuição do tamanho com o aumento do GS, com exceção da razão 0,1. Essa mudança no perfil pode estar relacionado ao fato de que quando se adiciona FDS a QT, a FDS recobre a QT, e o excesso de carga negativa na superfície causa uma repulsão entre as cargas negativas, aumentando o tamanho das partículas, o que ocorrerá em maior intensidade quando maior for o GS.

4.5.5 Efeito da Concentração dos Poliíons

Outro fator que pode afetar o tamanho das partículas é a concentração das soluções do polication e do poliânion. A Figura 44 compara os CPEs formados nas concentrações 0,025% e 0,0025% (m/v) dos poliíons QT e FDS2 após 24 h da síntese, em diferentes razões molares de cargas e ordem de gotejamento.

Figura 44 – Gráfico de diâmetro *versus* ordem de adição dos polieletrólitos. Efeito da concentração nas nanopartículas de QT e FDS (**P<0,05).



Observa-se, de uma maneira geral, que a diminuição da concentração dos polións leva a uma diminuição do diâmetro das partículas, independentemente da ordem de adição. Para o derivado FDS2, na razão $n^+/n^- = 0,1$ e para a ordem de adição QTFDS2, na razão $n^+/n^- = 1$, houve um aumento da partícula com a diminuição da concentração. Este comportamento pode ser devido à compensação de cargas provocada por mudanças conformacionais dos polieletrólitos.

Comportamento semelhante foi observado para nanopartículas de quitosana e dextrana sulfatada (SD) devido à menor incorporação de íons adicionais existentes em soluções mais diluídas (SCHATZ *et al.*, 2004). Os autores utilizaram quitosana de concentração 10^{-3} g/mL e SD de concentrações 5×10^{-4} , 10^{-3} e 5×10^{-3} g/mL. Os resultados mostraram que com o aumento da concentração de SD ocorria um aumento no tamanho das partículas, porém a ordem de adição não alterou o tamanho das partículas. Os autores também estudaram o efeito da concentração da quitosana e a ordem de adição, utilizaram DS de concentração 10^{-4} g/mL e QT de concentrações 5×10^{-4} , 10^{-3} e 5×10^{-3} , 10^{-2} g/mL. Eles verificaram que com o aumento da concentração da quitosana houve um aumento do tamanho da maioria das partículas, porém novamente a ordem de adição dos polieletrólitos praticamente não alterou o tamanho.

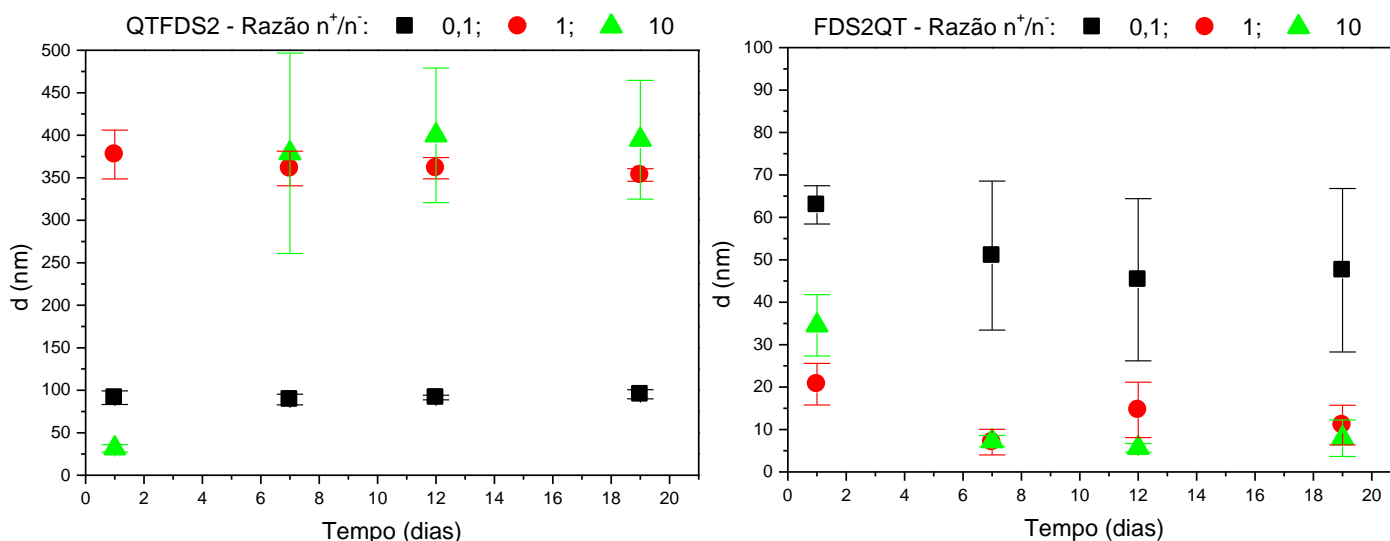
Nanopartículas de QT e tripolifosfato (TPP) foram sintetizadas por FAN *et*

al. (2012) e os autores verificaram que quando diminuía a razão de QT/TPP ocorria um diminuição dos tamanhos das nanopartículas. Em nanopartículas sulfobutileter- β -ciclodextrina e quitosana sintetizadas por MAHMOUD *et al.* (2011) ocorria um aumento do tamanho das nanopartículas quando aumentava-se a concentração dos polímeros.

4.5.6 Estabilidade

A Figura 45 apresenta o estudo da estabilidade das nanopartículas de QT e FDS2 em função do tempo para as razões de cargas n^+/n^- de 0,1; 1 e 10. Os CPEs em estudo foram obtidos na mesma concentração de 0,025% (m/V). Após a síntese, as soluções na razão 0,1 ficam opalescentes e não é observada floculação, porém este fenômeno pode ser avaliado pelo monitoramento do tamanho de partícula em função do tempo. O aumento ou a diminuição da partícula vai indicar que houve agregação e floculação, respectivamente.

Figura 45 – Gráfico de diâmetro versus tempo para as diferentes razões n^+/n^- para as nanopartículas de QT e FDS2 de concentração 0,025% (m/V) ($P>0,05$).



Para a ordem de adição QTFDS2, o experimento mostrou que não houve aumento ou diminuição significativa das partículas em função do tempo, portanto não foi observado agregação sem haver em seguida uma floculação, com exceção da razão 10, que houve agregação no intervalo dos primeiros seis dias,

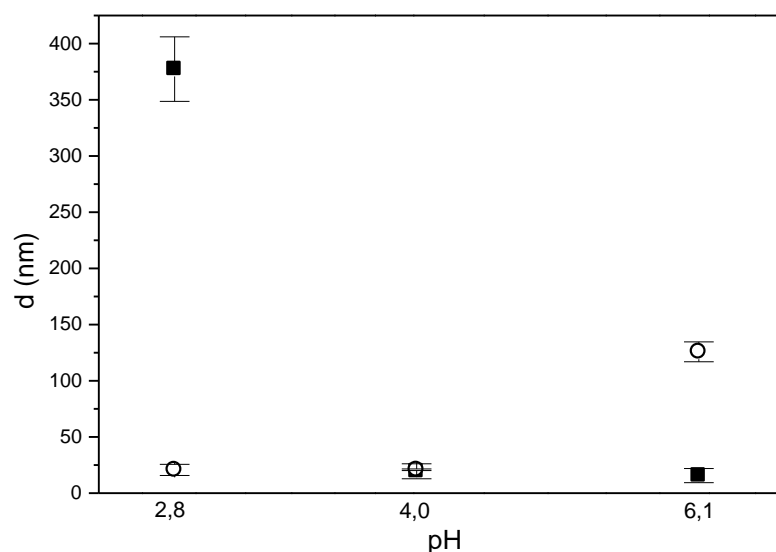
sem apresentar floculação. Após esse evento o tamanho não varia ($P>0,05$), mantendo-se estável durante o período estudado.

Para a ordem FDS2QT, observa-se a diminuição no tamanho das partículas nos primeiros seis dias para as razões n^+/n^- 1 e 10. Esse comportamento pode ser explicado pelo efeito da floculação, o que não foi observado macroscopicamente. Mas após esse período, o tamanho das partículas se manteve constante. Comportamento semelhante foi relatado por Oliveira *et al.* (2008) que sintetizaram nanopartículas de quitosana e goma do angico. As partículas com razão n^+/n^- igual a 1 foram monitoradas durante 26 dias e um discreto decréscimo no tamanho de partícula foi observado nos primeiros cinco dias seguido por uma estabilização no tamanho.

4.5.7 Efeito do pH

Com o objetivo de estudar a influência do efeito do pH no tamanho das partículas, foi adicionado uma solução de NaOH 10 mol/L a solução de quitosana 0,025% até atingir o pH de 4,0 e 6,1, respectivamente. Depois as partículas foram obtidas na razão n^+/n^- igual a 1 para as duas ordem de adição. A mudança no pH alterou o tamanho das partículas como mostrado na Figura 46.

Figura 46 – Gráfico do diâmetro versus pH para as nanopartículas de soluções 0,025% m/V de QT e FDS2: (■) QTFDS2 e (○) FDS2QT na razão de cargas $n^+/n^- = 1$ (***) $P<0,05$).

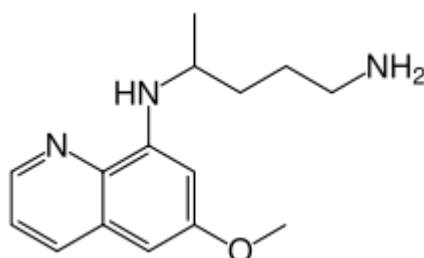


Para a ordem de adição QTFDS2 observa-se que o aumento do pH, diminui o tamanho das partículas, mas para a ordem FDS2QT o comportamento foi o contrário, o aumento do pH aumentou o tamanho das partículas. O aumento no tamanho das partículas próximo ao pKa da quitosana foi observado por Saether *et al.* (2008) para nanopartículas de quitosana e alginato. Esse aumento pode ser explicado pela agregação das nanopartículas devido a diminuição de grupos amina protonados, o que diminui as interações eletrostáticas.

4.5.8 Efeito da Adição de Fármaco

Para estudar o efeito da adição de fármaco, foram preparadas partículas na razão n^+/n^- igual a 0,1 para a ordem de adição de FDS2 em QT. O fármaco utilizado foi a primaquina difosfato (Figura 47), um metabólito para o tratamento de malária, e 100 mg foi solubilizado na solução de quitosana.

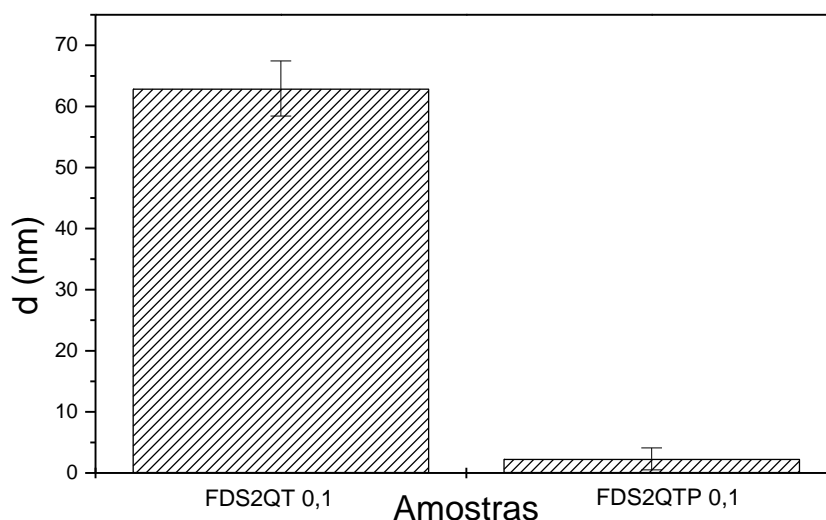
Figura 47 – Estrutura química da primaquina.



A Figura 48 compara o tamanho das partículas obtidas com e sem o fármaco. A adição da primaquina levou à uma diminuição significativa no diâmetro das nanopartículas, essa diminuição pode ser explicada pela estabilização das cargas, formando partículas estáveis.

CEGNAR e KERK (2010) observaram a diminuição dos complexos polieletrólíticos de alginato (poliânion) e quitosana (policátion) pela adição de ovalbumina (fármaco protéico de carga positiva), a diminuição se deve ao encolhimento das moléculas de alginato pela interação com a ovalbumina.

Figura 48 - Gráfico do diâmetro para as nanopartículas na razão de cargas $n^+/n^- = 0,1$. FDS2QT sem fármaco e FDS2QTP com fármaco.



4.6 Nanopartículas de galactomana oxidada via base de Schiff

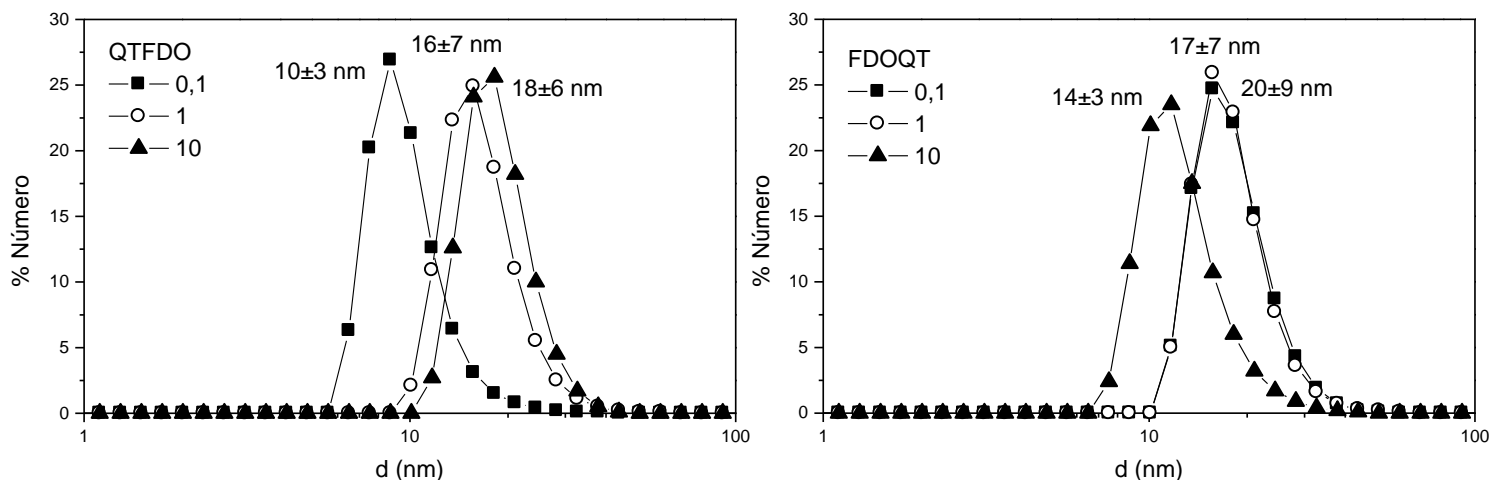
4.6.1 Efeito da ordem de adição e da razão molar $-NH_2/-CHO$

Para estudar o efeito da ordem de adição no perfil de distribuição de tamanho foi utilizada a galactomanana oxidada com razão de oxidação 10:4 (FDO10:4) nas razões molares dos grupos $-NH_2/-CHO$ 0,1, 1 e 10. Os sistemas foram deixados em agitação de 150 rpm por 24 horas. Quando quitosana (QT) é adicionada à solução de FDO10:4 a amostra é denominada QTFDO e quando a solução de galactomanana oxidada é adicionada à solução de QT a amostra foi denominada FDOQT.

A Figura 49 mostra o perfil de distribuição para as amostras QTFDO e FDOQT. Em ambos os perfis, partículas do tamanho de QT isolada não foi observado, indicando sua completa reticulação via base de Schiff. Os perfis para as partículas formadas são unimodais não importando a razão e a ordem de adição. O tamanho das nanopartículas não foi afetado pela ordem de adição dos polissacarídeos e nem pela razão dos grupos $-NH_2/-CHO$.

GU *et al.* (2007) obtiveram um aumento de 50-70 nm no tamanho das partículas de ácido polilático-colesterol-dextrana dialdeídica quando essas reagem via base de Schiff com transferrina.

Figura 49 – Perfil de distribuição de tamanho para as nanopartículas via base de Schiff de soluções 0,1% m/V de QT e FDO10:4 ($P > 0,05$).



4.6.2 Índice de Polidispersividade (IP_d) e Potencial Zeta ($P\zeta$)

A Figura 50 apresenta o índice de polidispersividade e o potencial zeta para as partículas de QT com FDO10:4. Observa-se que o aumento da razão –NH₂/–CHO aumenta o índice de polidispersividade quando se adiciona a QT à FDO (QTFDO) e uma diminuição ao se adicionar FDO à QT (FDOQT).

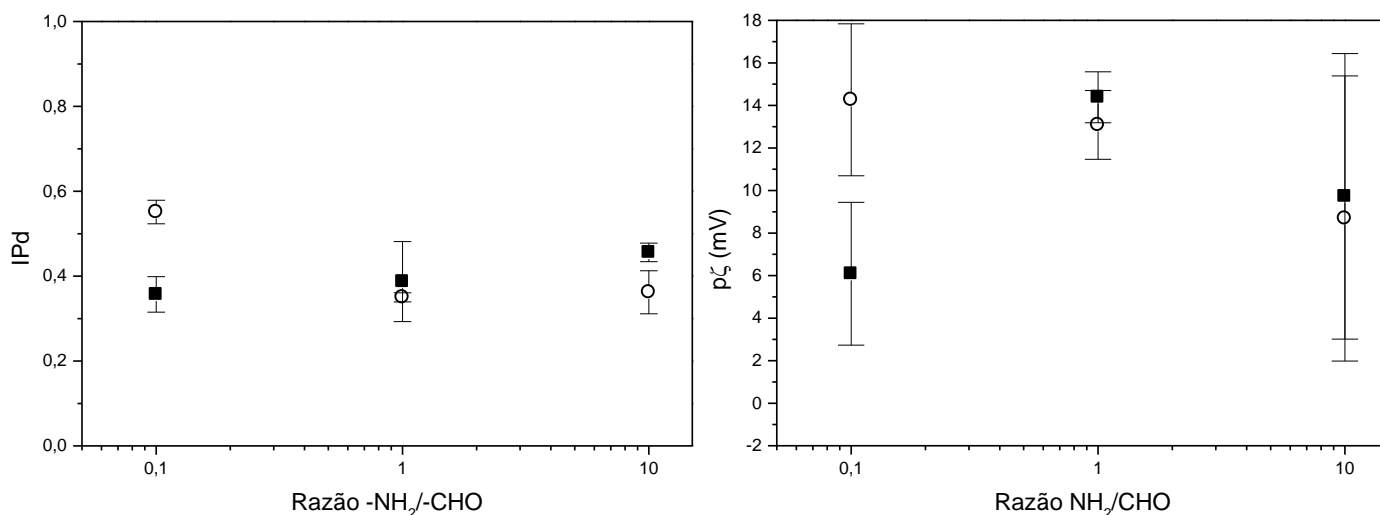
Os maiores valores do índice de polidispersividade são observados quando há excesso de grupos aldeídos, na razão 0,1, quando se adiciona FDO à QT (FDOQT). Esses valores tornam-se praticamente iguais, independente da ordem de adição quando a razão é 1.

O potencial zeta para as partículas obtidas de QT e FDO10:4 apresentaram valores positivos em qualquer condição estudada. Para a ordem de adição QTFDO observa-se que o potencial zeta é maior na razão –NH₂/–CHO independente da concentração e o valor diminui quando há excesso de alguns dos grupos. Para a ordem de adição FDOQT observa-se uma diminuição do potencial ao aumentar a razão –NH₂/–CHO, sendo que ao se comparar as razões 1 e 10, praticamente não há variação.

DU *et al.* (2010) verificaram que nanopartículas de quitosana (QT) reticuladas com glutaraldeído (GL) tinham potencial zeta em torno de 20 mV e que o aumento na razão GL/QT ocorria uma diminuição do potencial de 23 mV para 18 mV devido à redução do número de grupo amino primário da quitosana e que a massa molar da quitosana não altera o potencial zeta.

Em nanopartículas de trimetilquitosana conjugada com cisteína (YIN e col., 2009) o potencial zeta variou de 12 mV a 19 mV, e o potencial da superfície das nanopartículas aumentava com o aumento do grau de substituição da trimetilquitosana.

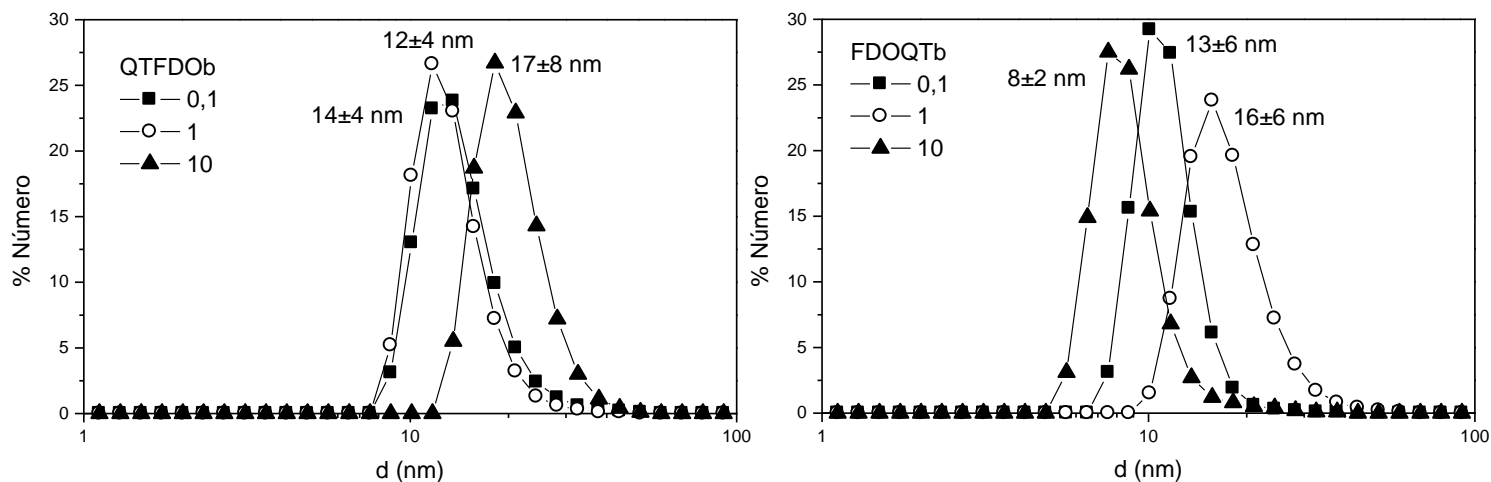
Figura 50 – Gráfico de índice de polidispersividade (a) (**P<0,05) e potencial zeta (b) (*P<0,05) versus razão molar $-NH_2/-CHO$ para nanopartículas de QT com FDO10:4: (■) QTFDO com (○) FDOQT de concentração 0,1% (m/V).



4.6.3 Efeito da concentração

Para estudar o efeito da concentração no perfil de distribuição de tamanho foi feita uma comparação entre os valores obtidos na concentração 0,1% (m/V), discutidos na seção 4.6.1, com diâmetros obtidos na concentração 0,01% (m/V), nas mesmas razões molares $-NH_2/-CHO$ 0,1, 1 e 10. Quando quitosana (QT) foi adicionada à solução de galactomanana oxidada (FDO) a amostra é denominada (QTFDOb) e quando a solução de FDO é adicionada à solução de QT a amostra foi denominada (FDOQTb). A Figura 51 mostra o perfil de distribuição na concentração 0,01% (m/V) para as amostras QTFDOb e FDOQTb. Em ambos os perfis, partículas do tamanho de QT isolada não foi observado, indicando sua completa reticulação via base de *Schiff*. Os perfis para as partículas formadas são unimodais não importando a razão e a ordem de adição. O tamanho das nanopartículas não foi afetado pela ordem de adição dos polissacarídeos e nem pela razão dos grupos $-NH_2/-CHO$.

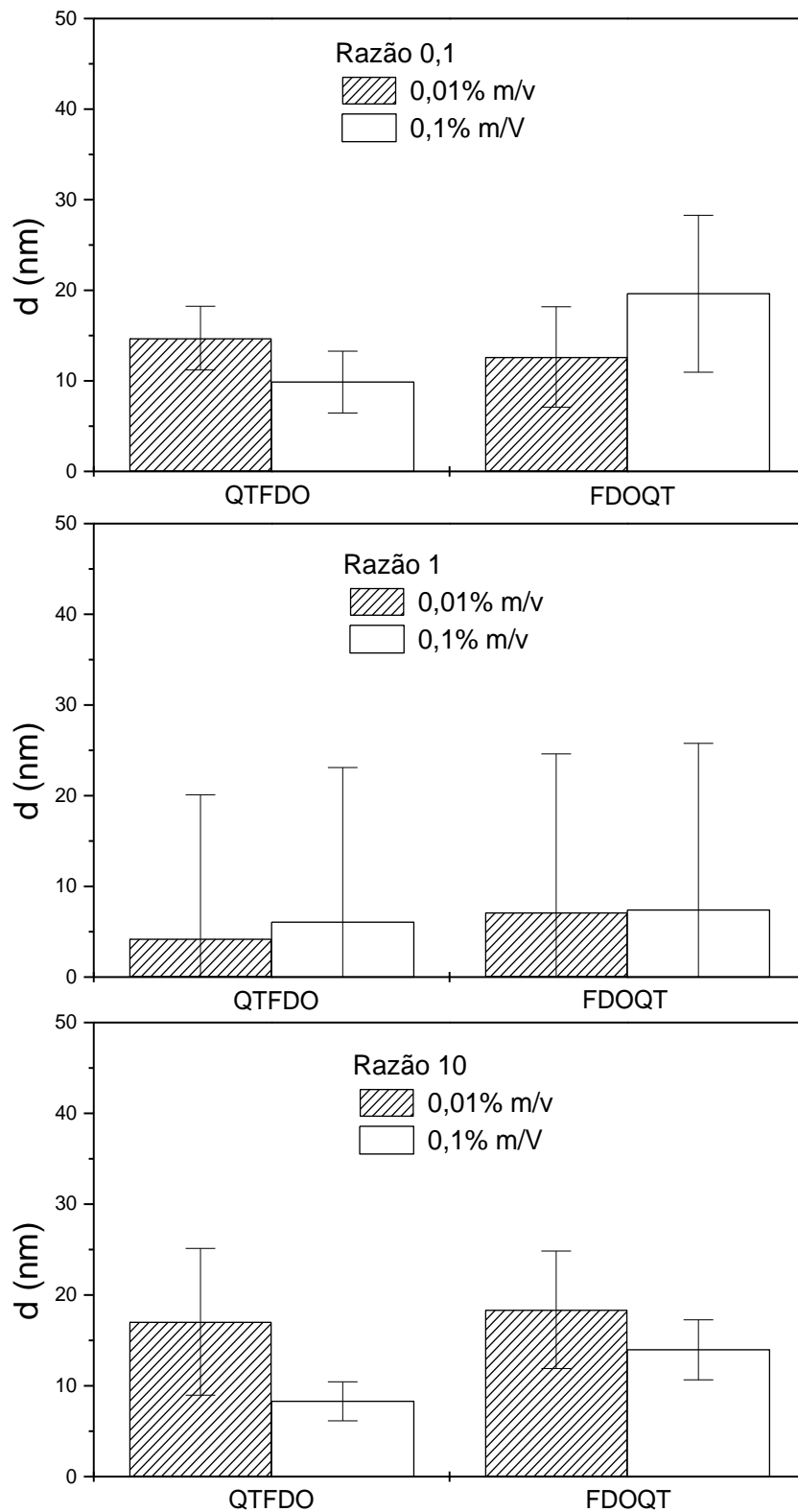
Figura 51 – Perfil de distribuição de tamanho para as nanopartículas de soluções 0,01% (m/v) via base de Schiff de QT e FDO ($P>0,05$).



A Figura 52 compara as partículas formadas via base de Schiff nas concentrações 0,1% e 0,01% (m/v) de QT e FDO10. Observa-se que na razão 10 o aumento da concentração leva a uma diminuição do tamanho das partículas, independente da ordem de adição. Nessa condição existe excesso de grupos amina disponíveis para a formação da reação de base de Schiff com os grupos aldeído da galactomanana oxidada, portanto, o aumento da concentração permite maior número de ligações, levando a uma diminuição no tamanho das partículas.

Já para a razão 0,1, situação com excesso de grupos aldeídos, quando se adiciona QT a FDO o tamanho das partículas diminui com o aumento da concentração, que foi o mesmo comportamento observado para a razão 10. Quando a QT é adicionada, aos poucos várias cadeias da FDO interagem com a QT, permitindo uma maior eficiência na reticulação, por isso, partículas com tamanhos menores. Mas ao adicionar FDO à QT o comportamento é o contrário, ou seja, o aumento da concentração aumenta o tamanho das partículas. Isso pode ser explicado pelo fato da QT interagir com as primeiras cadeias de FDO adicionadas, mas com o excesso, haverá um recobrimento destas partículas, tornando-as maiores. Na razão 1, a diferença entre os valores não foi significativa ($P>0,05$).

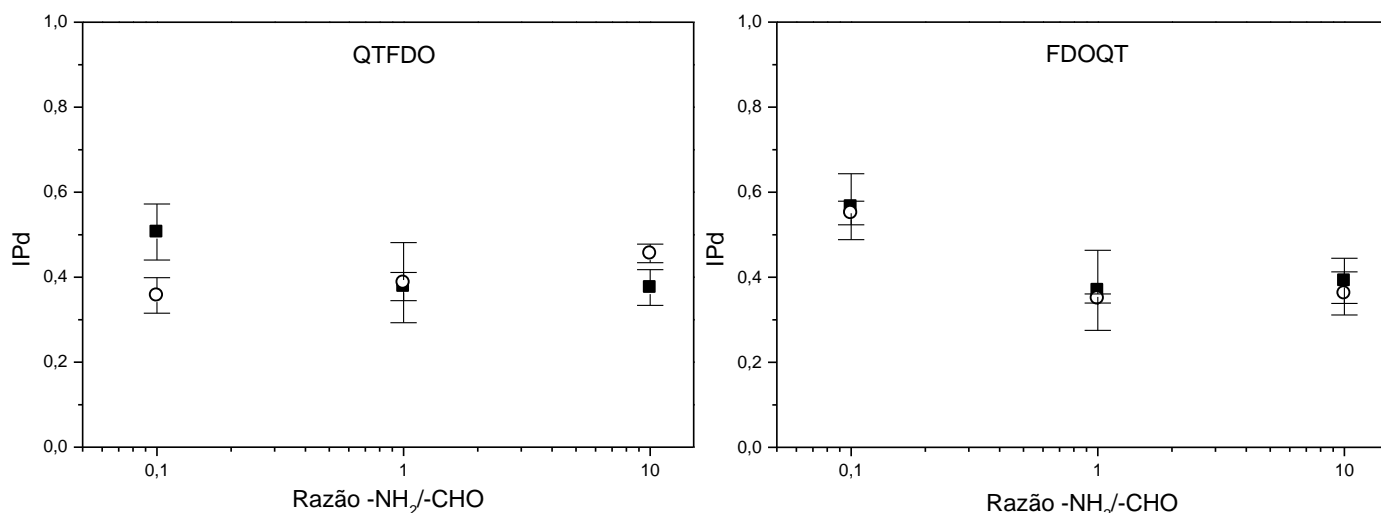
Figura 52 – Gráfico de diâmetro versus ordem de adição dos polissacarídeos. Efeito da concentração nas nanopartículas de QT e FDO10:4. Razão 0,1 e 10 (* $P < 0,05$) e Razão 1 ($P > 0,05$).



A Figura 53 apresenta o índice de polidispersividade para as partículas de QT e FDO nas concentrações 0,01 e 0,1% (m/V). Observa-se que ao adicionar a solução de QT à solução de FDO (QTFDO) o índice de polidispersividade aumenta com o aumento da concentração, quando há excesso de quitosana, razão $-NH_2/-CHO$ igual a 10. O comportamento contrário é observado quando o excesso é de galactomanana oxidada, razão $-NH_2/-CHO$ igual a 0,1, o índice de polidispersividade diminui com o aumento da concentração.

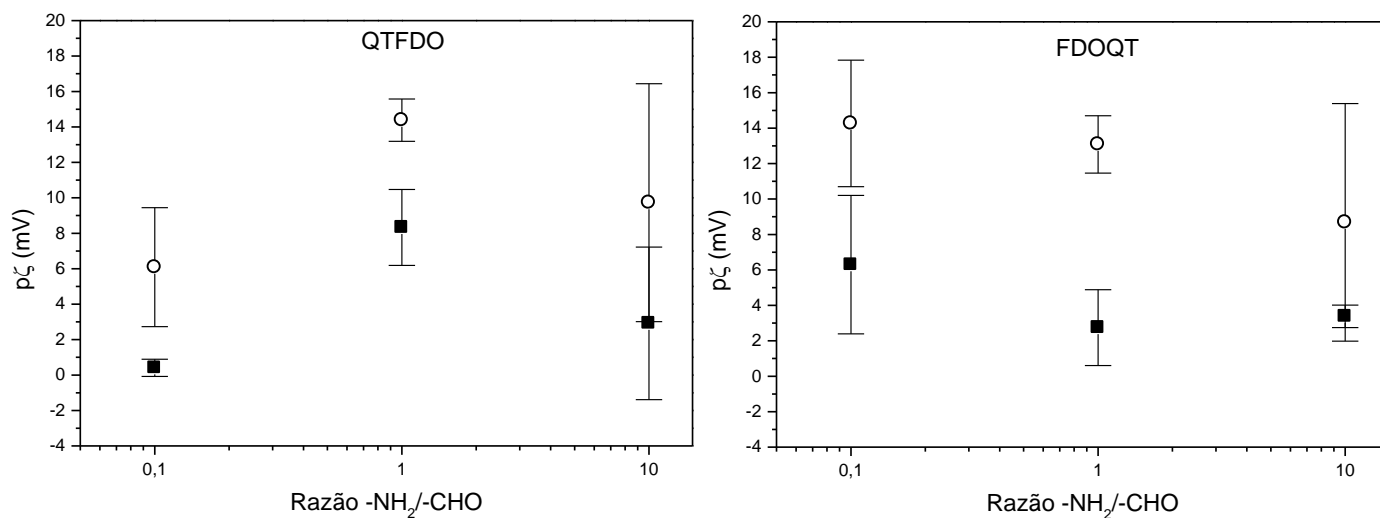
Mas quando a quantidade de quitosana e galactomanana oxidada é idênticas, razão $-NH_2/-CHO$ igual a 1, não se observa variação para o índice de polidispersividade com a variação da concentração.

Figura 53 – Gráfico do índice de polidispersividade versus razão $-NH_2/-CHO$. Efeito da concentração (■) 0,01% m/V e (○) 0,1% m/V para as nanopartículas de QT e FDO. QTFDO (**P<0,05) e FDOQT (**P<0,05).



A Figura 54 mostra o potencial zeta para as partículas de QT e FDO nas concentrações 0,01 e 0,1% (m/V). Observa-se que ao adicionar a solução de QT à FDO (QTFDO) o potencial zeta aumenta com o aumento da concentração para todas as razões $-NH_2/-CHO$ estudadas. Já para as partículas obtidas pela adição da solução de FDO à QT (FDOQT) observa-se o comportamento contrário, ou seja, há uma diminuição do potencial zeta com o aumento da concentração para todas as razões $-NH_2/-CHO$ estudadas.

Figura 54 – Gráfico do potencial zeta versus razão $-NH_2/-CHO$. Efeito da concentração (■) 0,01% m/v e (○) 0,1% m/v para as nanopartículas de QT e FDO (**P<0,05).



4.6.4 Estabilidade

A Figura 55 apresenta o estudo da estabilidade das nanopartículas de QT e FDO10:4 em função do tempo para as razões molares dos grupos $-NH_2/-CHO$ de 0,1; 1 e 10. As nanopartículas em estudo foram obtidas na mesma concentração de 0,1% (m/v). Observa-se que durante sete dias não houve variação significativa no diâmetro das nanopartículas ($P>0,05$), com exceção para as nanopartículas obtidas pela adição de FDO em QT (FDOQT) na razão 10, onde houve um aumento de 62% após os sete dias (**P<0,05).

4.6.5 Efeito da Adição de Fármaco

Para estudar o efeito da adição de fármaco, foram preparadas partículas de soluções 0,1% m/v de FDO10:4 gotejadas em QT na razão molar dos grupos $-NH_2/-CHO$ igual a 0,1. O fármaco utilizado foi a primaquina difosfato (Figura 40), um metabólito empregado no tratamento de malária que foi solubilizado na solução de quitosana na concentração de 0,1% m/v.

A primaquina (PRI) apresenta grupos amina, que podem reagir via base de *Schiff* com os grupos aldeídos da galactomanana oxidada. Segundo NISHI e JAYAKRISHNAN (2007) o grupo amina primária alifática terá uma reatividade desigual ao grupo amina aromática, o que confere à primaquina a possibilidade

de ser utilizada na preparação de hidrogel polímero-fármaco, onde o fármaco age como agente reticulante. A formação do grupo imina pode ser confirmado pela mudança de coloração, como mostrado na Figura 56, da solução amarelada de QT com PRI para róseo.

Figura 55 – Gráfico de diâmetro das nanopartículas de QT e FDO em função do tempo. Ordem de adição: QT/FDO10:4 Razão 0,1; 1; 10 ($P>0,05$) e FDO/QT Razão 0,1; 1; 10 ($P>0,05$); Razão 10 ($***P<0,05$).

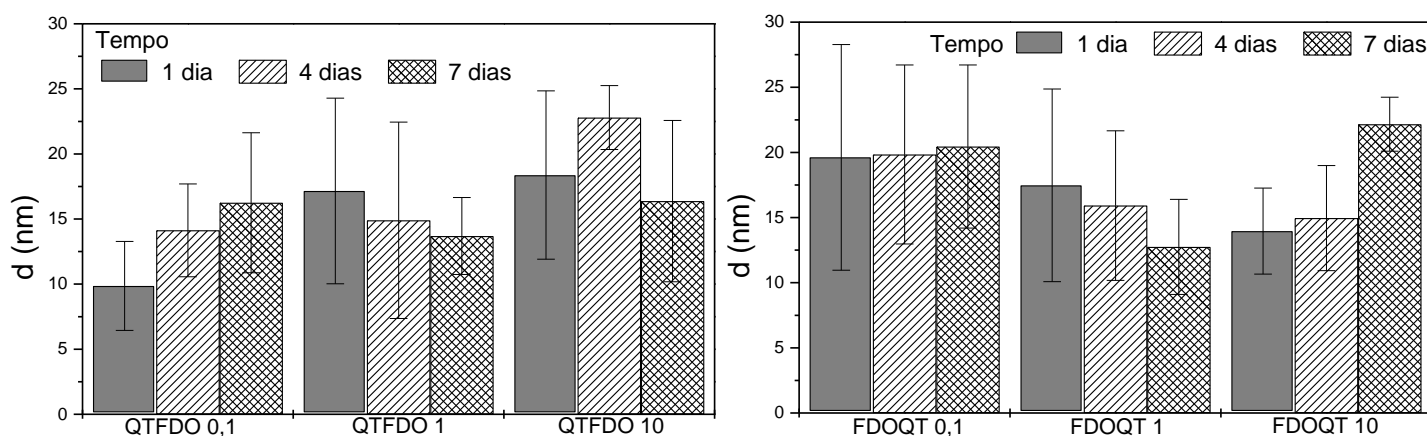


Figura 56 – Foto das amostras. a) Solução de QT com PRI e b) Suspensão após gotejamento de FDO e formação da base de Schiff.



(a)

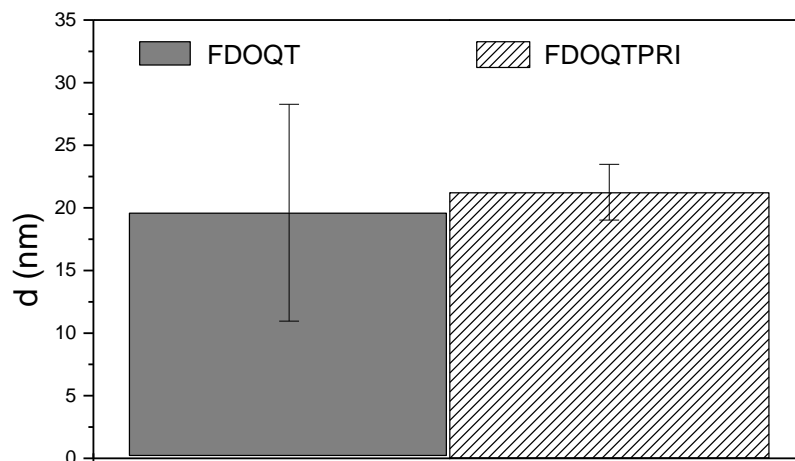


(b)

A Figura 57 compara o tamanho das partículas obtidas com e sem a presença do fármaco. A adição da primaquina não alterou o tamanho das nanopartículas, mas levou a diminuição significativa, 74%, no valor do erro, ou seja, levou a produção de nanopartículas com maior reprodutibilidade, que pode

ser confirmado pela diminuição de 51% no índice de polidispersividade com a adição do fármaco de $0,55 \pm 0,03$ para $0,27 \pm 0,02$.

Figura 57 - Gráfico do diâmetro para as nanopartículas na razão molar $-\text{NH}_2/-\text{CHO} = 0,1$. FDOQT sem fármaco e FDOQTP com fármaco.



4.7 Nanopartículas de galactomananas hidrofóbicas via auto-organização

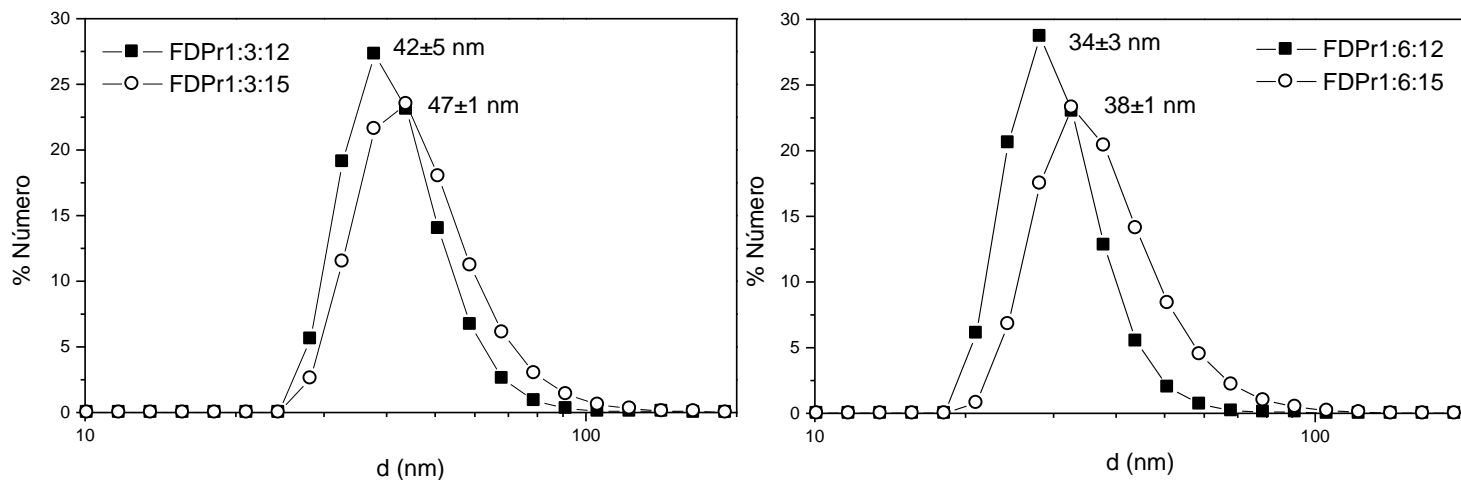
4.7.1 Efeito da Razão de Goma:Piridina:Anidrido (G:P:A)

Para estudar o efeito da razão de goma:piridina:anidrido (G:P:A) no perfil de distribuição de tamanho foi utilizada a galactomanana modificada com anidrido propiônico nas razões (G:P:A) 1:3:12, 1:3:15, 1:6:12 e 1:6:15. A Figura 58 mostra o perfil de distribuição para as partículas que são unimodais não importando a razão.

Quando se compara o aumento da razão molar de anidrido propiônico, FDP1:3:12 com FDP1:3:15 e FDP1:6:12 com FDP1:6:15, observa-se um aumento no tamanho das nanopartículas, mas ao se comparar o aumento da razão molar de piridina, FDP1:3:12 com FDP1:6:12 e FDP1:3:15 com FDP1:6:15, observa-se uma diminuição no tamanho das nanopartículas. O aumento da razão molar de anidrido sugere um aumento na quantidade de grupos hidrofóbicos nos derivados e o aumento das nanopartículas pode ser explicado pelo aumento da repulsão estérica causada no núcleo das nanopartículas que são formadas pelos grupos hidrofóbicos. KULTERER *et al.* (2012) obtiveram partículas menores de acetato de celulose ao aumentar seu

caráter hidrofílico pela introdução hidroximetilcelulose e carboximetilcelulose.

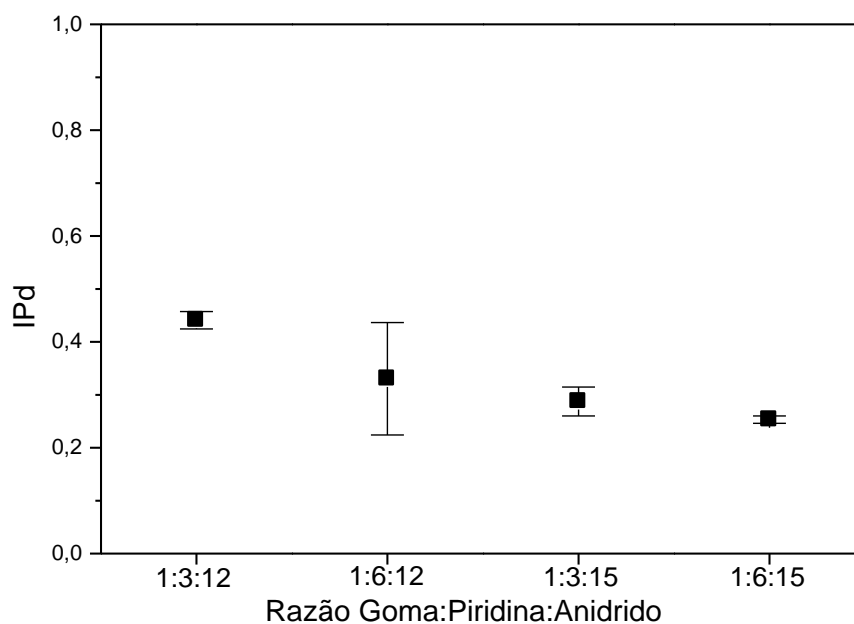
Figura 58 – Perfil de distribuição de tamanho para as nanopartículas via auto-organização de derivados da galactomanana com anidrido propiônico (FDPr) após diálise (**P<0,05).



4.7.2 Índice de Polidispersividade (IPd)

A Figura 59 apresenta o índice de polidispersividade para as nanopartículas obtidas a partir dos derivados hidrofóbicos da galactomanana. Observa-se que o aumento da razão molar dos reagentes leva a uma diminuição do IPd.

Figura 59 – Gráfico de índice de polidispersividade versus derivados hidrofóbicos com anidrido propiônico (■) FDPr (**P<0,05).

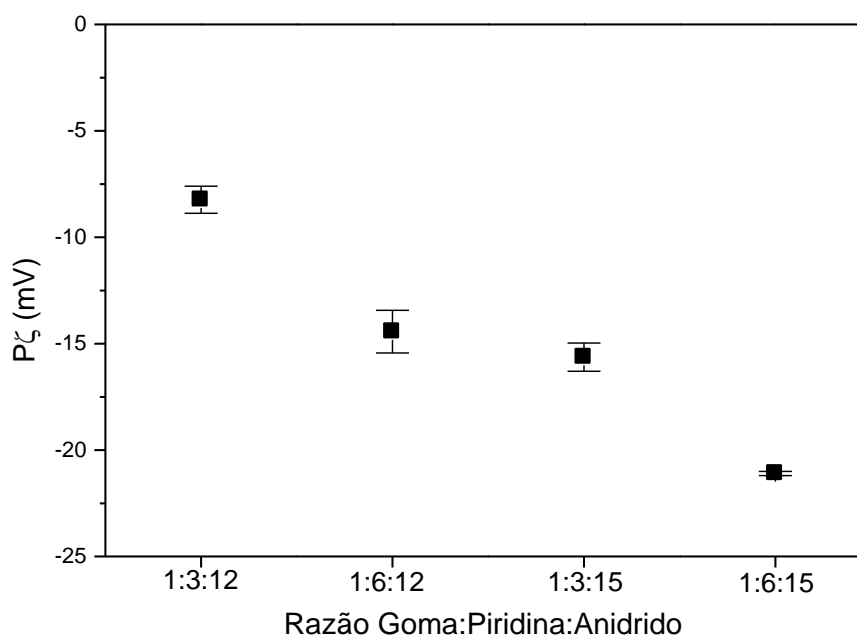


4.7.3 Potencial Zeta

O potencial zeta para as partículas obtidas dos derivados hidrofóbicos da galactomanana apresentaram valores negativos em qualquer condição estudada (Figura 60). Mesmo comportamento foi observado para nanopartículas de glucomanana Konjac carboximetilada com colesterol. Segundo o autor a carga negativa do grupo carboximetila foi distribuída na superfície das nanopartículas, devido ao seu caráter hidrofílico (HA *et al.*, 2011). Observa-se que o aumento na razão de goma:piridina:anidrido leva a uma diminuição do potencial zeta das nanopartículas.

HASSANI, HENDRA e BOUCHEMAL (2012) verificaram que nanopartículas de heparina modificada hidrofobicamente tinham potencial zeta de -56 mV. KULTERER *et al.* (2012) observaram que a funcionalização das nanopartículas de acetato de celulose (-37 mV) com polissacarídeos hidrofílicos como hidroxietilcelulose, carboximetilcelulose e quitosana de baixa massa molar levou ao aumento do potencial zeta, -21 , -27 e -19 mV, respectivamente chegando a valores positivos com a aminocelulose (24 mV).

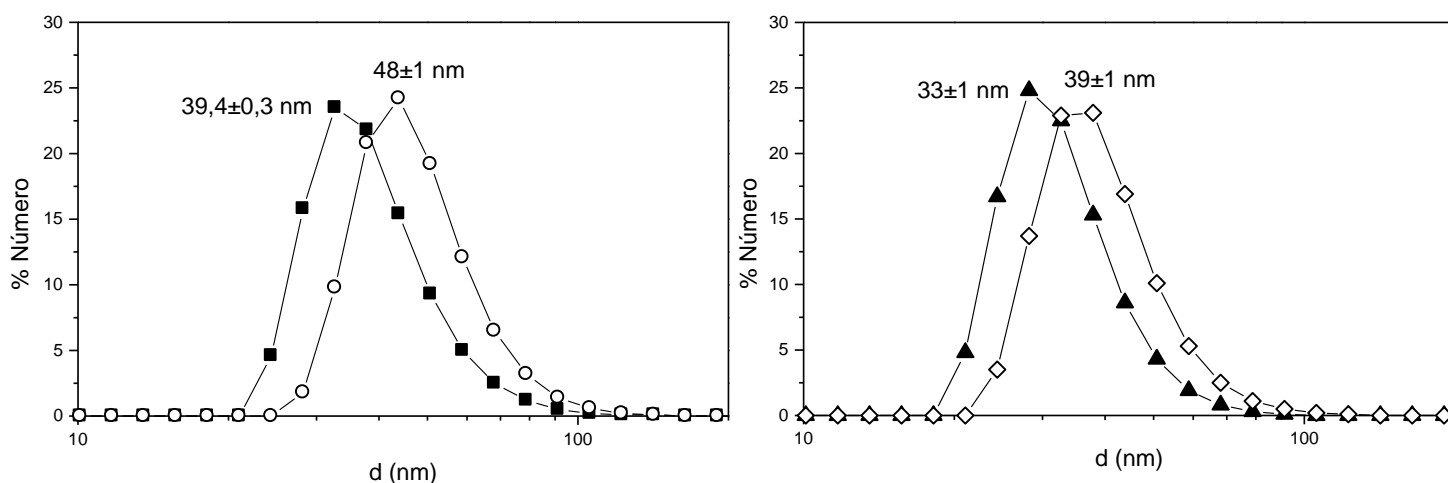
Figura 60 – Gráfico do potencial zeta *versus* derivados hidrofóbicos com anidrido propiônico (■) FDP (*** $P < 0,05$).



4.7.4 Efeito da Filtração

Para estudar o efeito da filtração no perfil de distribuição de tamanho foi feita uma comparação entre os valores obtidos para a galactomanana modificada com anidrido propiônico após diálise, discutidos na seção 4.7.1, com os diâmetros obtidos após diálise e filtração em membrana de celulose milipore 0,45 μm . A Figura 61 mostra o perfil de distribuição para as partículas que são unimodais não importando a razão.

Figura 61 – Perfil de distribuição de tamanho para as nanopartículas via auto-organização de derivados da galactomanana com anidrido propiônico (FDPPr), razão goma:piridina:anidrido (■) 1:3:12, (○) 1:3:15, (▲) 1:6:12 e (◇) 1:6:15 após diálise e filtração (***) $P < 0,05$.



Quando se compara o aumento da razão molar de anidrido propiônico, FDPPrF1:3:12 com FDPPrF1:3:15 e FDPPrF1:6:12 com FDPPrF1:6:15, observa-se um aumento no tamanho das nanopartículas, mas ao se comparar o aumento da razão molar de piridina, FDPPrF1:3:12 com FDPPrF1:6:12 e FDPPrF1:3:15 com FDPPrF1:6:15, observa-se uma diminuição no tamanho das nanopartículas. O aumento da razão molar de anidrido sugere um aumento na quantidade de grupos hidrofóbicos nos derivados e o aumento das nanopartículas pode ser explicado pelo aumento da repulsão estérica causada no núcleo das nanopartículas que são formadas pelos grupos hidrofóbicos.

A Tabela 18 apresenta o diâmetro das partículas obtidas via auto-organização para a galactomanana modificada com anidrido propiônico antes e após filtração. Observa-se que o processo de filtração não alterou o diâmetro

das partículas, com exceção para a amostra FDP1:3:12 onde nota-se uma redução no tamanho. Mas o índice de polidispersividade (IPd) diminui com o processo de filtração, que é um importante parâmetro no estudo do tamanho das nanopartículas, pois determina a quantidade de partículas com mesmo tamanho que estão presentes em solução e para polímeros naturais, valores de IPd menores que 0,4 são considerados de baixa polidispersividade e valores maiores que 0,4 consideram-se nanopartículas com elevada polidispersividade (SEATHER *et al.*, 2008 e SCHATZ *et al.*, 2005).

Tabela 18 – Diâmetro (d) e Índice de Polidispersão (IPd) para as partículas obtidas via auto-organização da galctomanana modificada com anidrido propiônico (FDP1).

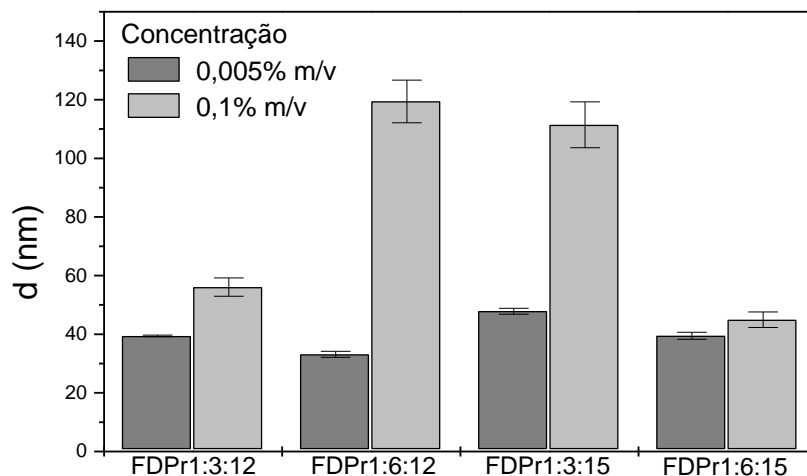
	antes da filtração		após a filtração	
	d (nm)	IPd	d (nm)	IPd
FDP1:3:12	42±5	0,44±0,02	39,4±0,3	0,43±0,05
FDP1:3:15	47±1	0,29±0,03	48±1	0,128±0,004
FDP1:6:12	34±3	0,3±0,1	33±1	0,23±0,01
FDP1:6:15	38±1	0,253±0,007	39±1	0,161±0,002

4.7.5 Efeito da concentração

Outro fator que pode afetar os tamanhos das partículas é a concentração das soluções dos polissacarídeos. A Figura 62 compara as partículas formadas via auto-organização nas concentrações 0,1% e 0,005% (m/v) para os derivados hidrofóbicos obtidos pela reação com anidrido propiônico (FDP1) após diálise e filtração, em diferentes razões molares de anidrido propiônico e piridina.

Observa-se que para todas as razões o aumento da concentração leva a um aumento do tamanho das partículas. Mesmo comportamento foi observado para nanopartículas obtidas de derivados hidrofóbicos de dextrana (AUMELAS *et al.*, 2007). GONÇALVES e GAMA (2008) observaram uma ligeira dependência entre o tamanho das nanopartículas e a concentração da dextrana hidrofóbica.

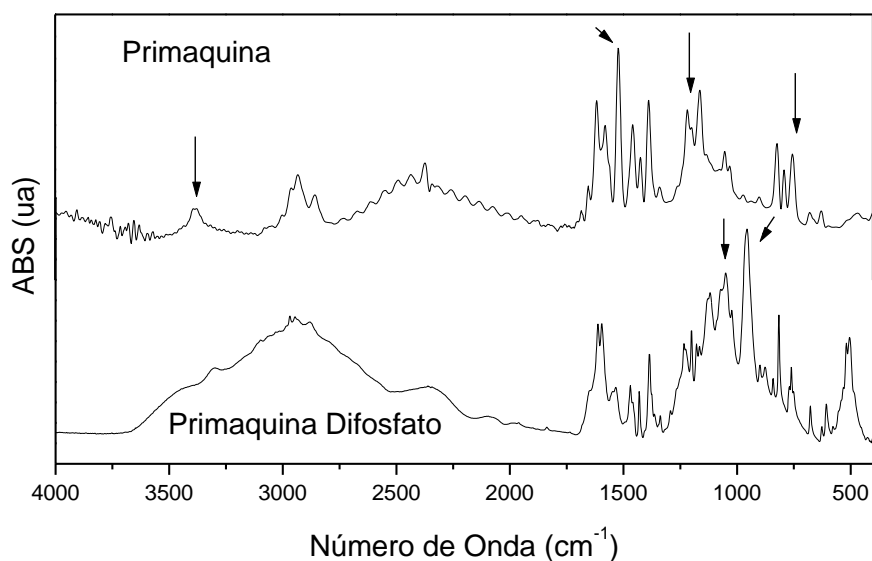
Figura 62 – Gráfico de diâmetro *versus* concentração para os derivados hidrofóbicos com anidrido propiônico FDPPr (**P<0,05).



4.7.6 Adição de Fármaco

Para estudar o efeito da adição de fármaco, a primaquina difosfato foi alcalinizada com hidróxido de amônio para se tornar apolar e livre dos grupos fosfatos, segundo metodologia descrita por SINGH e VINGKAR (2008) e caracterizada por espectroscopia na região do infravermelho. No espectro da primaquina difosfato (Figura 63) observa-se bandas em 1049 e 957 cm^{-1} referentes aos grupamentos PO_4^{3-} , e HPO_4^{2-} .

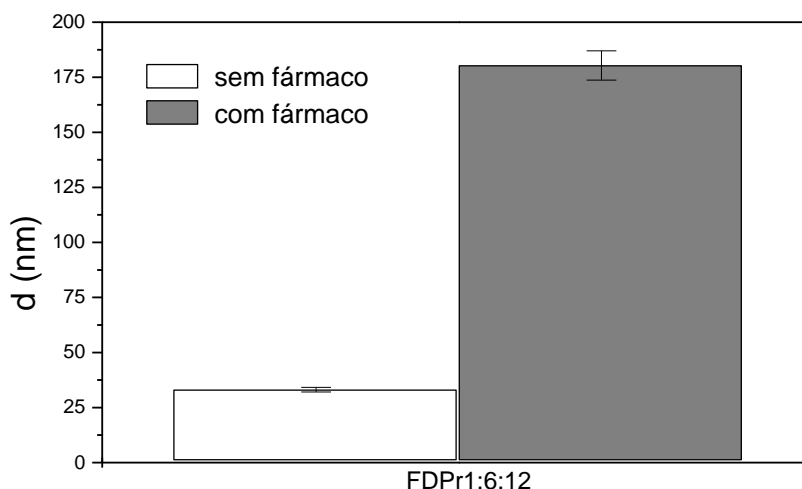
Figura 63 – Espectro na região do infravermelho para a primaquina difosfato e a primaquina livre de fosfato.



Comparando os dois espectros apresentados na Figura 63, observa-se o aparecimento de bandas em 3393 e 1521 cm^{-1} referente ao estiramento e deformação de N-H livre no espectro da primaquina livre, mostrando que houve a remoção desse íon.

Nanopartículas de derivados hidrofóbicos da galactomanana e primaquina foram preparadas pelo método da diálise, dissolvendo goma e fármaco em DMSO e dialisadas contra água deionizada. A Figura 64 compara o tamanho das partículas obtidas com e sem a presença do fármaco. A adição da primaquina levou a um aumento significativo no diâmetro das nanopartículas. Mesmo comportamento foi observado por ZHANG *et al.* (2009) para nanopartículas de acetato de pululana e de acetato de pululana com o fármaco epiburicina. Esse aumento pode ser explicado pelo aumento da região dos microdomínios hidrofóbicos pela presença do fármaco.

Figura 64 - Gráfico do diâmetro para as nanopartículas de galactomanana modificada com anidrido propiônico (FDPr1:6:12) sem fármaco e com fármaco.

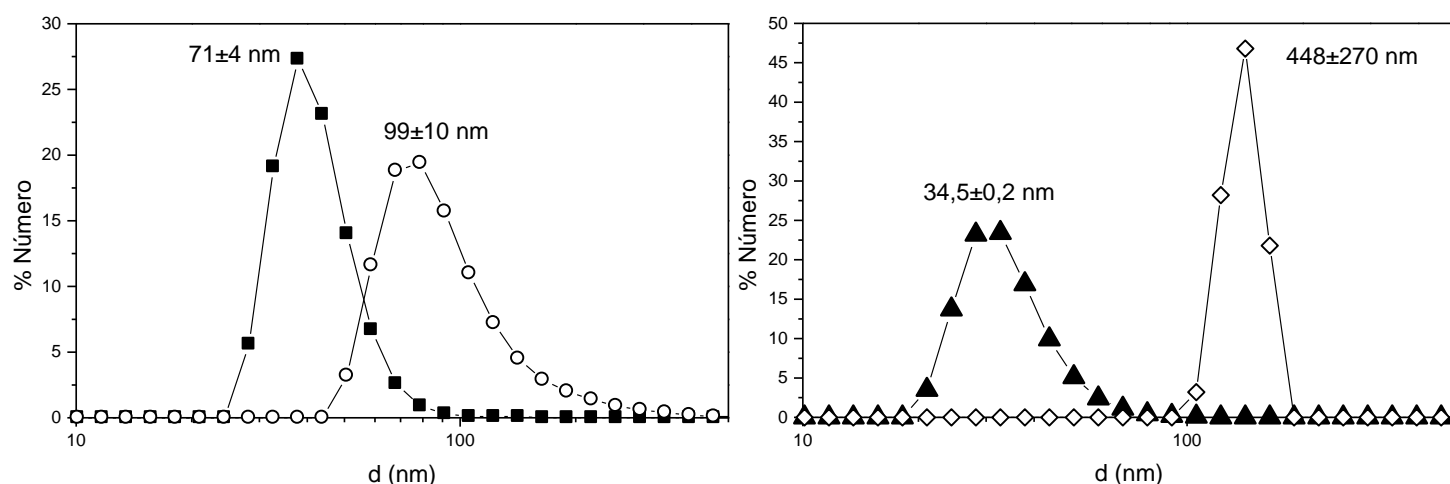


4.7.7 Efeito do tipo de Anidrido

Para estudar o efeito do tipo de anidrido no perfil de distribuição de tamanho foi feita uma comparação entre os valores obtidos para a galactomanana modificada com anidrido propiônico (FDPr), discutidos na seção 4.7.1, com os diâmetros obtidos com a galactomanana modificada com anidrido acético (FDAc) nas razões molares de goma:piridina:anidrido 1:3:12, 1:3:15, 1:6:12 e 1:6:15.

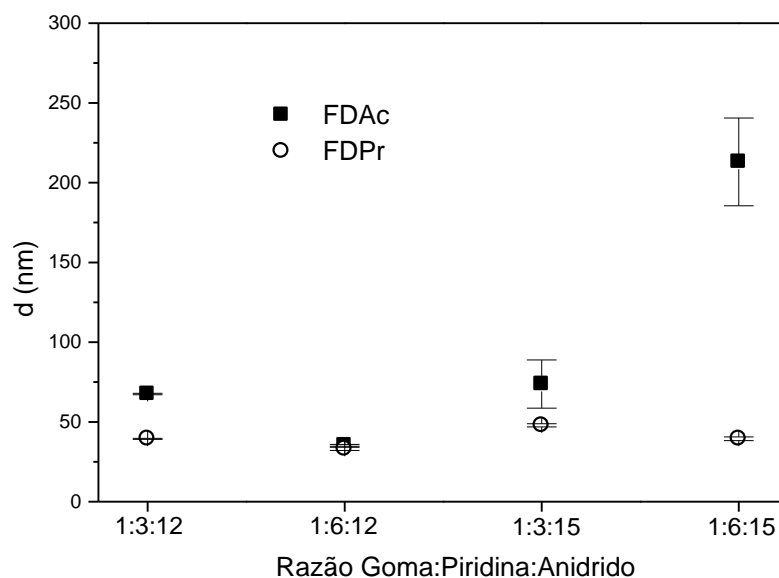
A Figura 65 mostra o perfil de distribuição para as amostras de FDAc. O perfil é unimodal não importando a razão de goma:piridina:anidrido.

Figura 65 – Perfil de distribuição de tamanho para as nanopartículas via auto-organização de galactomanana modificada com anidrido acético FDAc, razão goma:piridina:anidrido (■) 1:3:12, (○) 1:3:15, (▲) 1:6:12 e (◇) 1:6:15 (**P<0,05).



A Figura 66 mostra que o tipo de anidrido altera o tamanho das partículas.

Figura 66 – Gráfico de diâmetro *versus* derivados hidrofóbicos com (■) anidrido acético FDAc e (○) com anidrido propiônico FDPPr (**P<0,05).



Observa-se que para todas as razões de goma:piridina:anidrido as nanopartículas obtidas a partir dos derivados com anidrido acético foram maiores do que as obtidas com anidrido propiônico. Isso pode ser explicado pelo fato do

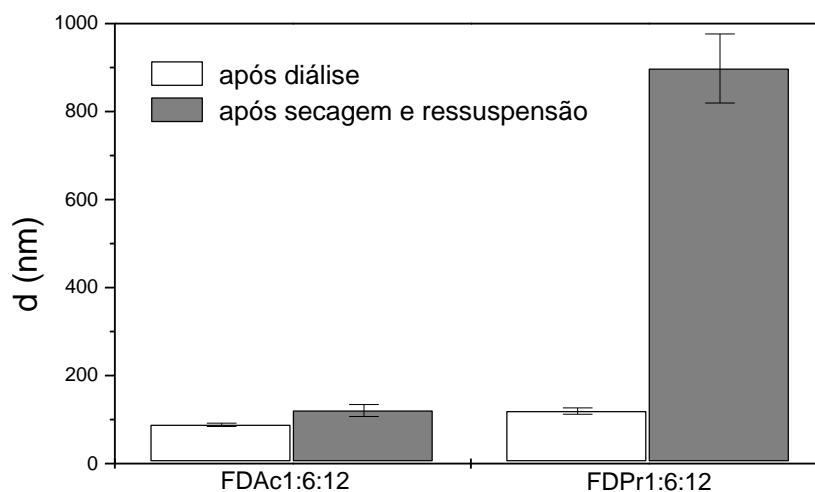
anidrido acético ser mais reativo que o anidrido propiônico. Portanto, os derivados obtidos terão mais grupos hidrofóbicos o que aumenta a repulsão estérica no núcleo dos agregados, tornando as partículas maiores.

Segundo Zhang *et al.* (2009), o aumento da hidrofobicidade do derivado leva a um aumento das nanopartículas, devido à maior resistência à transferência de massa, pelo fato da diminuição no processo de difusão do solvente apolar do núcleo hidrofóbico para a fase aquosa.

4.7.8 Efeito da secagem

Um parâmetro importante para avaliar a utilidade das nanopartículas para uma determinada aplicação é a estabilidade em relação aos processos de armazenamento, como liofilização, *spray drying*, centrifugação e redispersão (KULTERER *et al.*, 2012). A Figura 67 mostra o diâmetro das partículas em solução e após secagem por liofilização e redispersão por 48 horas com agitação de 150 rpm para as nanopartículas de galactomananas modificadas com anidrido acético (FDAc) e anidrido propiônico (FDPr) na razão molar goma:piridina:anidrido 1:6:12 e observa-se que o processo de secagem não levou a um aumento significativo para FDAc, mas houve um grande aumento para o FDPr. Esse grande aumento se deve à agregação das partículas causado pelo estresse que o processo de liofilização provoca.

Figura 67 – Efeito da secagem. Gráfico de diâmetro para os derivados hidrofóbicos com anidrido acético (FDAc) e anidrido propiônico FDPr.

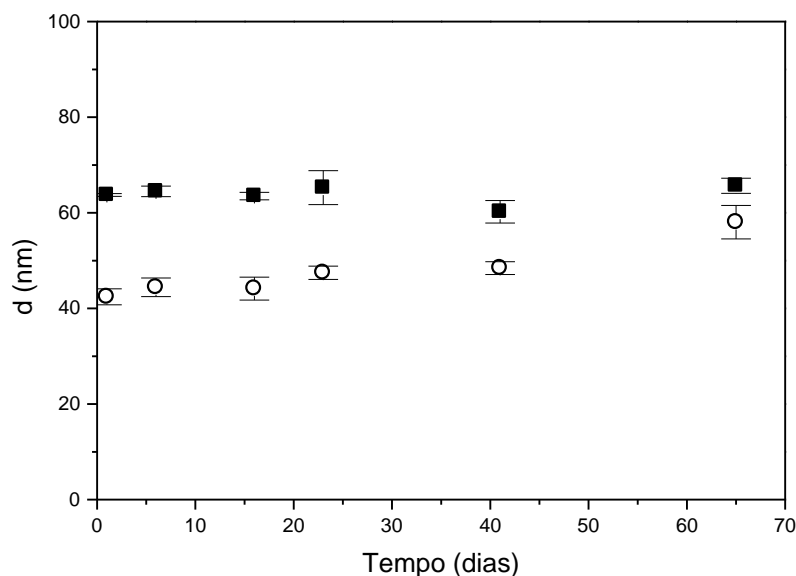


4.7.9 Estabilidade em Solução

A Figura 68 apresenta o estudo da estabilidade das nanopartículas de galactomananas hidrofóbicas modificadas com anidrido acético (FDAc) e anidrido propiônico (FDPr) na razão molar goma:piridina:anidrido 1:3:12 em função do tempo mantidas em temperatura ambiente. As nanopartículas em estudo foram obtidas na mesma concentração de 0,005% (m/V). Observa-se que durante os sessenta e cinco dias não houve variação significativa no diâmetro das nanopartículas ($P>0,05$) para o derivado com anidrido propiônico (FDPr), mas para o derivado acético (FDAc) houve um aumento de 36,8% no diâmetro durante o período estudado. Esse comportamento pode ser explicado pelo maior caráter hidrofóbico dos derivados propiônicos, devido ao maior grupo substituinte, que leva à formação de microdomínios mais compactos o que aumenta a estabilidade coloidal (GONÇALVES e GAMA, 2008).

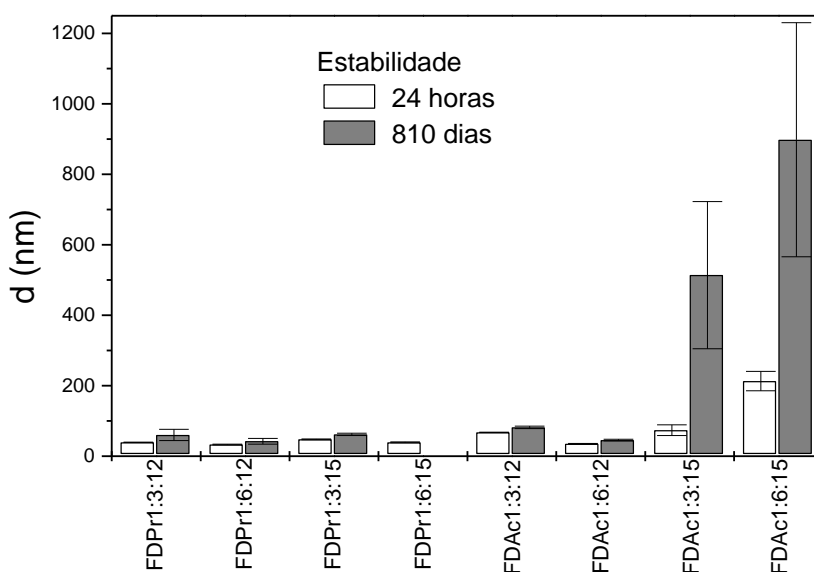
O estudo da estabilidade de nanopartículas de acetato de celulose durante 28 dias apresentou o mesmo resultado, houve um aumento no tamanho das nanopartículas de acetato de celulose e de acetato de celulose com quitosana de baixa massa molar e para as nanopartículas de acetato de celulose com hidroxietilcelulose, carboximetilcelulose e aminocelulose não houve modificação significativa (KULTERER *et al.*, 2012).

Figura 68 – Gráfico de diâmetro das nanopartículas de galactomananas hidrofóbicas em função do tempo, com (○) anidrido acético (FDAc) (** $P<0,05$) e com (■) anidrido propiônico (FDPr), na razão goma:piridina:anidrido 1:6:12 ($P>0,05$).



A Figura 69 apresenta o diâmetro das partículas após estocagem por 810 dias sob refrigeração (4°C), observa-se um pequeno aumento no tamanho das nanopartículas para a maioria dos derivados, somente os derivados obtidos pela reação anidrido acético na razão molar 1:3:15 e 1:6:15 houve um grande aumento no tamanho, devido a agregação.

Figura 69 – Gráfico da estabilidade das nanopartículas de galactomananas hidrofóbicas em função do tempo, com anidrido acético (FDAc) e com anidrido propiônico (FDPPr): (□) 24 horas e (■) 810 dias.



4.6 Comparação das Características das Nanopartículas de Galactomanana

A Tabela 19 apresenta um sumário dos valores de diâmetro, potencial zeta e índice de polidispersividade para os diferentes tipos de nanopartículas obtidas a partir da galactomanana da *D. gardneriana* modificada. Observa-se que esses parâmetros são influenciados pela metodologia e derivado utilizado. As nanopartículas obtidas via base de Schiff apresentaram os menores diâmetros, já os complexos polieletrólitos as maiores nanopartículas, mas para todos os derivados da galactomanana obteve-se, em pelo menos uma condição, nanopartículas com diâmetro, potencia zeta e índice de polidispersividade compatíveis para um potencial uso como carreadores de fármacos.

Tabela 19. Dados experimentais de diâmetro (d), potencial zeta (Pζ) e índice de polidispersividade (IPd) para as nanopartículas de galactomanana da *Dimorphandra gardneriana* modificada.

Metodologia	Concentração	Derivado	Ordem de Adição	Razão	d (nm)	Pζ (mV)	IPd
Complexação Polieletrólítica com Quitosana	0,025% m/v	FDS1	QTFDS1	0,1 ^a	82±14	-24±5	0,15±0,02
				1 ^a	271±28	31±5	0,19±0,01
				10 ^a	265±102	59±4	0,32±0,02
			FDS1QT	0,1 ^a	246±23	-28±2	0,11±0,02
				1 ^a	39±35	29,6±0,9	0,28±0,01
				10 ^a	10±6	9±2	0,5±0,1
		FDS2	QTFDS2	0,1 ^a	91±8	-17±4	0,11±0,03
				1 ^a	377±29	51±6	0,22±0,01
				10 ^a	31±9	56±12	0,41±0,03
			FDS2QT	0,1 ^a	63±7	- 24,1±0,8	0,3±0,2
				1 ^a	21±5	48±1	0,40±0,04
				10 ^a	35±7	53±13	0,44±0,08
Base de Schiff com Quitosana	0,1% m/v	FDO10:4	QTFDO	0,1 ^b	10±3	6±3	0,36±0,04
				1 ^b	16±7	14±1	0,39±0,01
				10 ^b	18±6	10±7	0,46±0,02

			0,1 ^b	20±9	14±4	0,55±0,03	
		FDOQT	1 ^b	17±7	13±2	0,35±0,01	
			10 ^b	14±3	9±7	0,36±0,05	
			1:3:12 ^c	42±5	-8,2±0,6	0,44±0,02	
			1:6:12 ^c	34±3	-14±1	0,3±0,1	
		FDPPr	-	1:3:15 ^c	47±1	- 15,6±0,7	0,29±0,3
			1:6:15 ^c	38±1	- 21,1±0,1	0,253±0,007	
Auto-organização	0,005% m/v		1:3:12 ^c	71±4	-8,9±0,8	0,21±0,02	
		FDAc	-	1:6:12 ^c	34,5±0,2	- 17,5±0,4	0,342±0,003
			1:3:15 ^c	99±10	-11±1	0,23±0,05	
			1:6:15 ^c	447±269	-5,7±0,2	0,8±0,1	

^a Razão molar de grupos positivos ($-NH_3^+$) por grupos negativos ($-SO_3^-$).

^b Razão molar de grupos amina ($-NH_2$) por grupos aldeído ($-CHO$).

^c Razão molar de goma:piridina:anidrido.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A galactomanana foi extraída das sementes da *Dimorphandra gardneriana* com rendimento de 29% e razão M:G de $1,93 \pm 0,02$. O polissacarídeo foi modificado por sulfatação obtendo derivados com grau de sulfatação de 0,32 e 0,42, por oxidação com derivados com razão molar de unidades glicosídicas e unidades oxidadas de 10:2, 10:4 e 10:8 e derivados hidrofóbicos a partir da reação com anidrido acético ou propiônico.

Nanopartículas com perfil unimodal de quitosana e galactomanana sulfatada foram obtidas por complexação polieletrólítica com diâmetros variando de 10 ± 6 a 377 ± 29 nm, índice de polidispersividade de $0,11 \pm 0,02$ a $0,5 \pm 0,1$ e potencial zeta de -28 ± 2 a 59 ± 4 mV. Fatores como: grau de sulfatação, razão de cargas n^+/n^- , ordem de adição dos polieletrólitos e concentração e pH das soluções dos polieletrólitos e a adição de fármaco influenciaram no tamanho, índice de polidispersividade, potencial zeta e estabilidade em solução das partículas.

Nanopartículas com perfil unimodal de quitosana e galactomanana oxidada foram obtidas via base de *Schiff* com diâmetros variando de 8 ± 2 a 20 ± 9 nm, índice de polidispersividade de $0,36 \pm 0,04$ a $0,57 \pm 0,08$ e potencial zeta de $0,4 \pm 0,5$ a 14 ± 1 mV. Fatores como: razão molar $-NH_2/-CHO$, ordem de adição e concentração dos polissacarídeos e adição de fármaco influenciaram no tamanho, índice de polidispersividade, potencial zeta e estabilidade em solução das partículas.

Nanopartículas com perfil unimodal de galactomanana modificadas hidrofobicamente com anidrido acético ou propiônico foram obtidas via auto-organização com diâmetros variando de $35,3 \pm 0,6$ a 213 ± 28 nm, índice de polidispersividade de $0,093 \pm 0,003$ a $0,9 \pm 0,1$ e potencial zeta de $-26,3 \pm 0,9$ a -3 ± 2 mV. Fatores como: razão molar de goma:piridina:anidrido, tipo de anidrido, concentração das soluções, secagem e a adição de fármaco influenciaram no tamanho, índice de polidispersividade, potencial zeta e estabilidade em solução das partículas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AALMO, K. M., PAINTER, T. J., Periodate-oxidation of methyl glycopyranosides: rate coefficients and relative stabilities of intermediate hemiacetals. *Carbohydrate Research* **1981**, 89(1), 73-82.
- ABIQUIFI Site: <http://www.abiquifi.org.br/mercado_estatisticas.html> Acesso em 27 de junho de 2012.
- ABRUZZO, A., BIGUCCI, F., CERCHIARA, T., SALADINI, B., GALLUCCI, M. C., CRUCIANI, F., VITALI, B., LUPPI, B., Chitosan/alginate complexes for vaginal delivery of chlorhexidine digluconate. *Carbohydrate Polymers* **2013**, 91, 651-658.
- ALBAN, S., SCHAUERTE, A., FRANZ, G., Anticoagulant sulfated polysaccharides: Part I. Synthesis and structure-activity relationships of new pullulan sulfates. *Carbohydrate Polymers* **2002**, 47(3), 267-276.
- AKIYAMA, E., MORIMOTO, N., KUJAWA, P., OZAWA, Y., WINNIK, F. M., AKIYOSHI, K., Self-assembled nanogels of cholesteryl-modified polysaccharides: Effect of the polysaccharide structure on their association characteristics in the dilute and semidilute regimes. *Biomacromolecules*, **2007**, 8, 2366-2373.
- AKIYOSHI, K., KOBAYASHI, S., SHICHIBE, S., MIX, D., BAUDYS, M., KIM, S. W., SUNAMOTO, J., Self-assembled hydrogel nanoparticle of cholesterol-bearing pullulan as a carrier of protein drugs: Complexation and stabilizations of insulin. *Journal of Controlled Release*, **1998**, 54, 313-320.
- ANDRADE, C. T.; AZERO, E. G.; LUCIANO, L.; GONÇALVES, M. P.; Solution properties of the galactomannans extracted from the seeds of *Caesalpinia pulcherrima* and *Cassia javanica*: comparison with locust bean gum. *International Journal of Biological Macromolecules*, **1999**, 26, 181-185.
- ASPINAL, G. O., **The polysaccharides**. *Academic Press*, v. 1, cap 2, 1982.
- AUMELAS, A., SERRERO, A., DURAND, A., DELLACHERIE, E., LEONARD, E., Nanoparticles of hydrophobically modified dextrans as potential drug carrier systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2007**, 59, 74-80.
- AVADI, M. R., SADEGHI, A. M. M., MOHAMMADPOUR, N., ATYABI, S. A. F., DINARVAND, R., RAFIEE-TEHRANI, M., Preparation and

- characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method. *Nanomedicine*, **2010**, 6, 58-63.
- AZERO, E. G., ANDRADE, C. T., Testing procedures for galactomannan purification. *Polymer Testing*, **2002**, 21, 551-556
- AZEVEDO, M. M. Nanoesferas e a Liberação Controlada de Fármacos. Monografia - **Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas** – Unicamp, 2002.
- BARBUCCI, R., LAMPONI, S., MAGNANI, A., RENIER, D., The influence of molecular weight on the biological activity of heparin like sulphated hyaluronic acids. *Biomaterials* **1998**, 19, 801-806.
- BAUMANN, H., FAUST, V., Concepts for improved regioselective placement of o-sulfo, n-sulfo, n-acetyl, and n-carboxymethyl groups in chitosan derivatives. *Carbohydrate Research*, **2001**, 331(1), 43-57.
- BERGER J., REIST M., MAYER J. M, FELT O., GURNY R., Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **2004**, 57, 35-52.
- BHASKARAN, M.; SRIRAM, S.; MITCHELL, D. Characterisation of silicide thin films for semiconductor and nanotechnology electronics. **Applied Physics in the 21st Century (Horizons in World Physics)**, ed. Raymond P. Valencia, Nova Science Publishers: New York, USA. **2010**, 273-300.
- BI, L.; CAO, Z.; HU, Y.; SONG, Y.; YU, L.; YANG, B.; MU, J.; HUANG, Z.; HAN, Y. Effects of different cross-linking conditions on the properties of genipin-cross-linked chitosan/collagen scaffolds for cartilage tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **2011**, 22, 51–62.
- BODNAR, M., HARTMANN, J. F., BORBELY, J., Preparation and characterization of chitosan-based nanoparticles. *Biomacromolecules*, **2005**, 6, 2521-2527.
- BRANNON-PEPPAS, L; BLANCHETE, J. O. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy . *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2004**, 56, 1649-1659.

- BRUMMER, Y., CUI, W., WANG, Q., Extraction, purification and physicochemical characterization of fenugreek gum. *Food Hydrocolloids*, **2003**, *17*, 229.
- BRUNEEL, D., SCHACHT, E., Chemical modification of pululan .1. periodate-oxidation. *Polymer* **1993**, *34*(12), 2628-2632.
- CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G., CERQUEIRA, M. A., SOUZA, B. W. S., TEIXEIRA, J. A., VICENTE, A. A., Influence of concentration, ionic strength and pH on zeta potential and mean hydrodynamic diameter of edible polysaccharide solutions envisaged for multilayered films production. *Carbohydrate Polymers* **2011**, *85*, 522-528.
- CARRIER, O., COVIS, R., MARIE, E., DURAND, A., Inverse emulsions stabilized by a hydrophobically modified polysaccharide. *Carbohydrate Polymers*, **2011**, *84*, 599-604.
- CEGNAR, M., KERC, J., Self-assembled polyelectrolyte nanocomplexes of alginate, chitosan and ovalbumin. *Acta Chimica Slovenica*, **2010**, *57*, 431-441.
- CERQUEIRA, M. A., PINHEIRO, A. C., SOUZA, B. W. S., LIMA, A. M. P., RIBEIRO, C., MIRANDA, C., TEIXEIRA, J. A., MOREIRA, R. A., COIMBRA, M. A., GONÇALVES, M. P., VICENTE, A. A., Extraction, purification and characterization of galactomannans from non-traditional sources. *Carbohydrate Polymers*, **2009**, *75*, 408-414.
- CHEN, C-Y.; CHANG, J.-C.; CHEN, A.-H. Competitive biosorption of azo dyes from aqueous solution on the template crosslinked-chitosan nanoparticles. *Journal of Hazardous Materials*, **2011**, *185*, 430-441.
- CHEN, Y., MOHANRAJ, V., PARKIN, J., Chitosan-dextran sulfate nanoparticles for delivery of an anti-angiogenesis peptide. *Letters in Peptide Science*, **2003**, *10*, 621-629.
- CHENG, Y., BROWN, K. M., PRUD'HOMME, R. K., Characterization and intermolecular interactions of hydroxypropyl guar solutions. *Biomacromolecules*, **2002**, *3*, 456-461.
- CHRESTANI, F., SIERAKOWSKI, M. R., UCHOA, D. E. A., NOZAWA, C., SASSAKI, C. G. L., GORIN, P. A. J., ONO, L. *In vitro* antiherpetic and antirotaviral activities of a sulfate prepared from *Mimosa scabrella*

- galactomannan. *International Journal of Biological Macromolecules*, **2009**, *45*, 453–457.
- CHOI, W.; KIM, J.-Y.; KANG, C.; BYEON, C.; KIM, Y.; TAE, G. Tumor Regression In Vivo by Photothermal Therapy Based on Gold-Nanorod-Loaded, Functional Nanocarriers. *ACS Nano*, **2011**, *5*, 1995–2003.
- CHOI, K. Y., CHUNG, H., MIN, K. H., YOON, H. Y., KIM, K., PARK, J. H., KWON, I. C., JEONG, S. Y., Self-assembled hyaluronic acid nanoparticles for active tumor targeting. *Biomaterials*, **2010**, *31*, 106-114.
- CHRISTENSEN, B. E., AASPRONG, E., STOKKE, B. T., Gelation of periodate oxidised scleroglucan (scleraldehyde). *Carbohydrate Polymers* **2001**, *46*(3), 241-248.
- CHRISTIAN, P., VON DER KAMMER, F., BAALOUSHA, M., HOFMANN, T., Nanoparticles: structure, properties, preparation and behavior in environmental media. *Ecotoxicology*, **2008**, *17*, 326-343.
- CORRÊA, M. P., Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas, Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, V. I e II, **1984**, p. 267 e p. 370-375.
- CUNHA, P. L. R., VIEIRA, I. G. P., ARRIAGA, A. M. C., de PAULA, R. C. M., FEITOSA, J. P. A., Isolation and characterization of galactomannan from *Dimorphandra gardneriana Tul.* seeds as a potential guar gum substitute, *Food Hydrocolloids*, **2009**, *23*, 880-885.
- CUNHA, P. L. R., de PAULA, R. C. M., FEITOSA, J. P. A., Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico, *Química Nova*, **2009**, *32*, 649-660.
- CUNHA, P. L. R., MACIEL, J. S., SIERAKOWSKI, M. R., DE PAULA, R. C. M., FEITOSA, J. P. A., Oxidation of cashew tree gum exudate polysaccharide with TEMPO reagent. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2007**, *18*(1), 85-92.
- CUNHA, P. L. R., Desenvolvimento de polissacarídeos com ação terapêutica em osteoartrite. Tese apresentada ao Departamento de Química Orgânica e Inorgânica/UFC **2006**.
- CUNHA, P. L. R., CASTRO, R. R., ROCHA, F. A. C., DE PAULA, R. C. M., FEITOSA, J. P. A., Low viscosity hydrogel of guar gum: Preparation and

- physicochemical characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, **2005**, *37*, 99-104.
- DASH, M.; CHIELLINI, F.; OTTENBRITEB, R. M., CHIELLINI, E. Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical Applications. *Progress in Polymer Science*, **2011**, *36*, 981–1014.
- DAWLEE, S., SUGANDHI, A., BALAKRISHNAN, B., LABARRE, D., JAYAKRISHNAN, A., Oxidized chondroitin sulfate-cross-linked gelatin matrixes: A new class of hydrogels. *Biomacromolecules* **2005**, *6(4)*, 2040.
- DEA, I. C. M., MORRISON, A., Chemistry and Interactions of Seed Galactomannans. *Advanced Carbohydrate Chemical Biochemistry*, **1975**, *31*, 241-312.
- DEBON, S. J. J., TESTER, R. F., In vitro binding of calcium, iron and zinc by non-starch polysaccharides. *Food Chemistry*, **2001**, *73*, 401-410.
- DELAIR, T., Colloidal polyelectrolyte complexes of chitosan and dextran sulfate towards versalite nanocarriers of bioactive molecules. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **2011**, *78*, 10-18.
- De PAULA, R. C. M., HEATLEY, F., BUDD, P. M., Characterization of *Anacardium occidentale* exudate polysaccharide. *Polymer International*, **1998**, *45*, 27-35.
- DROGOZ, A., DAVID, L., ROCHAS, C., DOMARD, A., DELAIR, T., Polyelectrolite complexes from polysaccharides: Formation and stoichiometry monitoring. *Langmuir*, **2007**, *23*, 10950-10958.
- DU Y-Z., YING X-Y., WANG L., ZHAI Y., YUAN H., YU R-S., FU-QIANG HU F-Q., Sustained release of ATP encapsulated in chitosan oligosaccharide nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, **2010**, *392*, 164-169.
- DURAN, N.; MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P. C. **Nanotecnologia: Introdução, preparação, caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. São Paulo: Artliber Editora, 2006.
- ESTEVES-SOUZA, A., ECHEVARRIA, A., SANT'ANNA, C. M. R., NASCIMENTO, M. G., Estudo experimental e teórico da redução de bases de Schiff derivadas da 3,3-difenilpropilamina. *Química Nova*, **2004**, *27*, 72-75.

- FAGUNDES, M., CAMARGOS, M. G., COSTA, F. V., A qualidade do solo afeta a germinação das sementes e o desenvolvimento das plântulas de *Dimorphandra mollis* Benth. (Leguminosae: Mimosoideae). *Acta Botânica Brasilica*, **2011**, 25(4), 908-915.
- FAN, W., WEI YANB, ZUSHUN XUB, HONG NI. Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2012**, 90, 21-27.
- FAVEIRO. Disponível em: < <http://timblindim.wordpress.com/arvores/faveiro/>>
Acesso em: junho de 2012.
- FERREIRA, S. A., COUTINHO, P. J. G., GAMA, F. M., Synthesis and characterization of self-assembled nanogels made of pullulan. *Materials*, **2011**, 4, 601-620.
- FERREIRA, S. A., COUTINHO, P. J. G., GAMA, F. M., Self-assembled nanogel made of mannan: Synthesis and characterization. *Langmuir*, **2010**, 26(13), 11413-11420.
- FOURNIER, C., LEONARD, M., DELLACHERIE, E., EPR spectroscopy analysis of hydrophobically modified dextran-coated polystyrene. *Journal of Colloid and Interface Science*, **1998**, 198, 27-33.
- FRANCO, T. T., RODRIGUES, N. R., SERRA, G. E., PANEGASSI, V. R., BUCKERIDGE, M. S., Characterization of storage cell wall polysaccharides from Brazilian legume seeds and the formation of aqueous two-phases systems. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, **1996**, 680(1-2), 255-261.
- GERESH, S., MAMONTOV, A., WEINSTEIN, J., Sulfation of extracellular polysaccharides of red microalgae: preparation, characterization and properties. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **2002**, 50(3), 179-187.
- GOMEZ, C. G., RINAUDO, M., VILLAR, M. A., Oxidation of sodium alginate and characterization of the oxidized derivatives. *Carbohydrate Polymers* **2007**, 67, 296-304.

- GONÇALVES, C., GAMA, F. M., Characterization of the self-assembly process of hydrophobically modified dextrin. *European Polymer Journal*, **2008**, *44*, 3529-3534.
- GU, M.-Q., YUAN, X.-B., KANG, C.-S., ZHAO, Y.-H., TIAN, N.-J., PU, P.-Y., SHENG, J., Surface biofunctionalization of PLA nanoparticles through amphiphilic polysaccharide coating and ligand coupling: Evaluation of biofunctionalization and drug releasing behavior. *Carbohydrate Polymers*, **2007**, *67*, 417-426
- GROSEV, V. M., BOZAC, R., PUPPELS, G. J., Vibrational spectroscopic characterization of wild growing mushrooms and toadstools. *Spectrochimica Acta part A*, **2001**, *57*, 2815-2829
- HA, W., WU, H., WANG, X.-L., PENG, L.-S., DING, L.-S., ZHANG, S., LI, B.-J., Self-aggregates of cholesterol-modified carboxymethyl konjac glucomannan conjugate: Preparation, characterization, and preliminary assessment as a carrier of etoposide. *Carbohydrate Polymers*, **2011**, *86*, 513-519.
- HANSSON, A., DI FRANCESCO, T., FALSON, F., ROUSSELLE, P., JORDAN, O., BORCHARD, G., Preparation and evaluation of nanoparticles for directed tissue engineering. *International Journal of Pharmaceutics*, **2012**, *439*, 73-80.
- HASSANI, L. N., HENDRA, F., BOUCHEMAL, K., Auto-associative amphiphilic polysaccharides as drug delivery systems. *Drug Discovery Today*, **2012**, *17*(11), 608-614.
- HENNINK, W. E., VAN NOSTRUM, C. F., Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, *54*(1), 13-36.
- HORNIG, S., HEINZE, T., Nanoscale structures of dextran esters, *Carbohydrate Polymers*, **2007**, *68*, 280-286.
- HU, B., WANG, S. S., LI, J., ZENG, X. X., HUANG, Q. R., Assembly of Nanoparticles from Bioactive Peptides and Chitosan. *Journal of Physical Chemistry B*, **2011**, *115*(23), 7515-7523.
- JACKSON, E. L., HUDSON, C. S., The structure of the products of the periodic acid oxidation of starch and cellulose. *Journal of America Chemical Society* **1938**, *60*(5), 989-991.

- JANES, K. A.; CALVO, P.; ALONSO, M. J., Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2001**, *47*, 83-97.
- JAYAKUMAR, R., MENON, D., MANZOOR, K., NAIR, S. V., TAMURA, H., Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials – a short review. *Carbohydrate Polymer*, **2010**, *82*, 227-232.
- JINTAPATTANAKIT, A., JUNYAPRASERT, V. B., MAO, S., SITTERBERG, J., BAKOWSKY, U., KISSEL, T., Peroral delivery of insulin using chitosan derivatives: A comparative study of polyelectrolyte nanocomplexes and nanoparticles. *Pharmaceutical Nanotechnology*, **2007**, *324*, 240-249.
- JUNG, S.-W., JEONG, Y.-I., KIM, S.-H., Characterization of hydrophobized pullulan with various hydrophobicities. *International Journal of Pharmaceutics*, **2003**, *254*, 109-121.
- KAIHARA, S., SUZUKI, Y., FUJIMOTO, K., *In situ* synthesis of polysaccharide nanoparticles via polyion complex of carboxymethyl cellulose and chitosan. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2011**, *85*, 343-348.
- KAMINGA, J., KATO, Y., MATSUO, R., Polysaccharide composite for use in food, drug and cosmetic field, consist of oxidized polysaccharide which introduces carboxyl group or its salt to sixth position of pyranose ring of polysaccharide by oxidation and chitosan. JP2004002586-A; JP4310967-B2, Japão: **2004**.
- KRISTIANSEN, K. A., POTTHAST, A., CHRISTENSEN, B. E. Periodate oxidation of polysaccharides for modification of chemical and physical properties. *Carbohydrate Research* **2010**, *345*, 1264-1271.
- KULTERER, M. R., REICHEL, V. E., KARGL, R., KÖSTLER, S., SARBOVA, V., HEINZE, T., STANA-KLEINSCHEK, K., RIBITSCH, V., Functional polysaccharide composite nanoparticles from cellulose acetate and potential applications. *Advanced Functional Materials*, **2012**, *22*(8), 1749-1758.
- KWON, G., NAITO, M., YOKOYAMA, M., OKANO, T., SAKURAI, Y., KATAOKA, K., Micelles based on AB block copolymers of poly(ethylene oxide) poly(β -benzyl-L-aspartate). *Langmuir* **1993**, *9*, 945-949.

- LETCHEFORD, K., BURT, H., A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **2007**, 65(3), 259-269.
- LEITE, G. L. D., SILVA, F. W. S., GUANABENS, R. E. M., FERNANDES, L. A., FIGUEIREDO, L. S., SILVA, L. F., NPK and flavonoids affecting insect populations in *Dimorphandra mollis* seedlings. *Acta Scientiarum. Agronomy*, **2012**, 34(1), 17-22
- LEMARCHAND, C., GREF, R., COUVREUR, P., Polysaccharide-decorated nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **2004**, 58, 327-341.
- LIEBERT, T., HORNIG, S., HESSE, S., HEINZE, T., Nanoparticles on the basis of highly functionalized dextrans. *Journal of the American Chemical Society*, **2005**, 127(30), 10484-10485.
- LIU, Z., JIAO, Y., WANG, Y., ZHOU, C., ZHANG, Z., Polysaccharide-based nanoparticles as drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2008**, 60, 1650-1662.
- LIU, T.; MUSINSKI, L.; PATEL, P.; GALLIMORE, A.; GILCHRIST, B.; KEIDAR, M. Nanoparticle Electric Propulsion for Space Exploration. *Space Technology and Applications International Forum*, **2007**, 880, 787-794.
- LU, H-D.; ZHAO, H-Q.; WANG, K.; LV, L-L. Novel hyaluronic acid–chitosan nanoparticles as non-viral gene delivery vectors targeting osteoarthritis. *International Journal of Pharmaceutics*, **2011**, 420, 358-365.
- LU, Y., WANG, D., HU, Y., HUANG, X., WANG, J., Sulfated modification of epimedium polysaccharide and effects of modifiers on cellular infectivity of IBDV. *Carbohydrate Polymers*, **2008**, 71, 180-186.
- LU, M., TJERNELD, F., Interaction between tryptophan residues and hydrophobically modified dextran. Effect on partitioning of peptides and proteins in aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography A*, **1997**, 766, 99-108.
- MA, L., CHEN, H., ZHANG, Y., ZHANG, N., FU, L., Chemical modification and antioxidant activities of polysaccharide from mushroom *Inonotus obliquus*. *Carbohydrate Polymers*, **2012**, 89, 371-378.

- MAEDA, H., RAMBONE, G., COVIELLO, T., YUGUCHI, Y., URAKAWA, H., ALHAIQUE, F., KAJIWARA, K., Low-degree oxidized scleroglucan and its hydrogel. *International Journal of Biological Macromolecules* **2001**, 28(5), 351-358.
- MAHMOUD, A.; EL-FEKYA, G. S.; GHADA, R. K.; AWAD, E. A. Chitosan/sulfobutylether- β -cyclodextrin nanoparticles as a potential approach for ocular drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, **2011**, 413, 229-236.
- MÄHNER, C., LECHNER, M. D., NORDMEIER, E., Synthesis and characterization of dextran and pullulan sulphate. *Carbohydrate Research* **2001**, 331(2), 203-208.
- MAO S., BAKOWSKY, U., JINTAPATTANAKIT A., KISSEL T., Self-assembled polyelectrolyte nanocomplexes between chitosan derivatives and insulin. *Journal Pharmaceutics Science*, **2006**, 95, 1035-1048.
- MARQUES, M. M. M., Plantas como agentes bioativos contra o dengue: atividade larvicida e antiviral. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia/UECE **2011**.
- MATHUR, N. K.; NARANG, C. K.; Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. *Journal of Chemical Education*, **1990**, 67, 938-942.
- McCLEARY, B. V., AMADO, R., WAIBEL, R., NEUKOM, H., Effect of galactose content on the solution and interaction properties of guar and carob galactomannans. *Carbohydrate Research*, **1981**, 92(2), 269-285.
- MEER, G., MEER, W. A., TINKER, J., Water-soluble gums. Their past, present, and future. *Food Technology*, **1975**, 29, 22-28.
- MEISTER, A., BLUME, A., Self-assembly of bipolar amphiphiles, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **2007**, 12, 138-147.
- MELO, M. R. S., FEITOSA, J. P. A., FREITAS, A. L. P., de PAULA, R. C. M., Isolation and characterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cornea*. *Carbohydrate Polymers* **2002**, 49, 491-498.

- MESTECHKINA, N. M., SHCHERBUKING, V. D., SHASHKOV, A. S. Structural features of semi-synthetic galactomannan sulfates. *Russian Chemical Bulletin*, **2008**, 57, 1779-1983.
- MONTEIRO, A. A. S., Síntese e Caracterização de Géis de Galactomanana de Fava Danta (*Dimorphandra gardineriana*) para Aplicação Biológica. Dissertação apresentada ao Departamento de Química Orgânica e Inorgânica/UFC **2009**.
- MORRIS, E. R., Mixed polymer gels. In: Harris, P., *Food Gels*, London: Elsevier Applied Science. **1990**, 291.
- MOTOZATO, Y., IHARA, H., TOMODA, T., HIRAYAMA, C., Preparation and gel-permeation chromatographic properties of pullulan spheres. *Journal Of Chromatography*, **1986**, 355(2), 434-441.
- MOURA NETO, E., MACIEL, J. S., CUNHA, P. L. R., de PAULA, R. C. M., FEITOSA, J. P. A., Preparation and characterization of a chemically sulfated cashew gum polysaccharide. *Journal of the Brazilian Chemistry Society*, **2011**, 22(10), 1953-1960.
- MOURA NETO, E., Desenvolvimento de Novos Materiais à base de Goma do Cajueiro (*Anacardium Occidentale*): Derivados e Microesferas com Gelatina. Dissertação apresentada ao Departamento de Química Orgânica e Inorgânica/UFC **2008**.
- MULLOY, B., MOURÃO, P. A. S., GRAY, E., Structure/function studies of anticoagulant sulphated polysaccharides using NMR. *Journal Of Biotechnology* **2000**, 77(1), 123-135.
- MUZZARELLI, R., Chitosan, In: Muzzarelli (Ed.), *Natural Chelating Polymers*, Pergamon Press, Oxford, **1973**, 144.
- NAIDU, V. G. M., MADHUSUDHANA, K., SASHIDHAR, R. B., RAMAKRISHNA, S., KHAR, R. K., AHMED, F. J., DIWAN, P. V., Polyelectrolyte complexes of gum kondagogu and chitosan, as diclofenac carriers. *Carbohydrate Polymers*, **2009**, 76, 464-471.
- NA, K., LEE, T. B., PARK, K.-H., SHIN, E.-K., LEE, Y.-B., CHOI, H.-K., Self-assembled nanoparticles of hydrophobically-modified polysaccharide bearing vitamin H as a targeted anti-cancer drug delivery system. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2003**, 18, 165-173.

- NA, K., PARK, K.-H., KIM, S. W., BAE, Y. H., Self-assembled hydrogel nanoparticles from curdlan derivatives: characterization, anti-cancer drug release and interaction with a hepatoma cell line (HepG2). *Journal of Controlled release*, **2000**, 69, 225-236.
- NEETHIRAJAN, S.; JAYAS, D. Nanotechnology for the Food and Bioprocessing Industries. *Food and Bioprocess Technology*, **2011**, 4, 39-47.
- NEUKOM, H., Galactomannans: Properties and Applications. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, London, **1989**, 22, 41-45.
- NICHIFOR, M., LOPES, A., CARPOV, A., MELO, E., Aggregation in water of dextran hydrophobically modified with bile acids. *Macromolecules*, **1999**, 32, 7078-7085.
- NISHI, K. K., JAYAKRISHNAN, A., Self-gelling primaquine-gum arabic conjugate: an injectable controlled delivery system for primaquine. *Biomacromolecules* **2007**, 8, 84-90.
- NISHI, K. K., JAYAKRISHNAN, A., Preparation and in vitro evaluation of primaquine-conjugated gum arabic microspheres. *Biomacromolecules* **2004**, 5, 1489-1495.
- OLIVEIRA, M. A., CIARLINI, P. C., FEITOSA, J. P. A., de PAULA, R. C. M., PAULA, H. C. B., Chitosan/"angico" gum nanoparticles: Synthesis and characterization. *Materials Science and Engineering C*, **2008**, 29, 448-451.
- O'NEILL, A. N., Sulfated derivatives of laminarin. *Canadian Journal Of Chemistry* **1955**, 33(6), 1097-1101.
- ONO, L., WOLLINGER, W., ROCCO, I. M., COIMBRA, T. L. M., GORIN, P. A. J., SIERAKOWSKI, M. R., In vitro and in vivo antiviral properties of sulfated galactomannans against yellow fever virus (BeH111 strain) and dengue 1 virus (Hawaii strain). *Antiviral Research* **2003**, 60(3), 201-208.
- OTHMAN, M., BOUCHEMAL, K., COUVREUR, P., DESMAËLE, D., MORVAN, E., POUGET, T., GREF, R., A comprehensive study of the spontaneous formation of nanoassemblies in water by a Lock-and-Key interaction between two associative polymers. *Journal of Colloid and Interface Science*, **2011**, 354(2), 517-527.

- PANEGASSI, V. R.; SERRA, G. E.; BUCKERIDGE, M. S.; Potencial tecnológico do galactomanano de sementes de faveiro (*Dimorphandra mollis*) para uso na indústria de alimentos. *Ciência e Tecnologia Alimentar*, **2000**, 20(3).
- PAULA, H. C. B., SOMBRA, F. M., ABREU, F. O. M. S., de PAULA, R. C. M., *Lippia sidoides* essential oil encapsulation by angico gum/chitosan nanoparticles. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **2010**, 21(12), 2359-2366.
- PENICHE, H., PENICHE C., Chitosan nanoparticles: a contribution to nanomedicine. *Polymer International*, **2010**, 60, 883-889.
- PERLIN, A. S., CASU, B., The Polysaccharide, ed. Aspinall G. O., *Academic Press I* **1982**, 131
- Phytochemicals Site: <<http://www.phytochemicals.info/phytochemicals/rutin>> Acesso em Março, 2009.
- PIRES, N. R., CUNHA, P. L. R., de PAULA, R. C. M., FEITOSA, J. P. A., JAMACARU, F. V. F., MORAES FILHO, M. O., Viscoelásticos oftálmicos: comparação entre os comerciais e formulações de galactomanana de *Dimorphandra gardneriana*. *Química Nova*, **2010**, 33(8), 1709-1713.
- POLLARD, M. A., FISCHER, P., Partial aqueous solubility of low-galactose-content galactomannans—What is the quantitative basis? *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **2006**, 11, 184-185.
- RAKHMANBERDYEVA, R. K., SHASHKOV, A. S., Structure of galactomannans from *Gleditsia delavayi* and *G-aquatica* by H-1 and C-13 NMR spectroscopy. *Chemistry of Natural Compounds*, **2005**, 41, 14-16.
- RINAUDO, M.; Relation between the molecular structure of some polysaccharides and original properties in sol and gel states. *Food Hydrocolloids*, **2001**, 15, 433-440.
- RIOS, M. Polymers for Controlled Release: Formulation Follows Function. *Pharmaceutical Technology*, **2005**, 29, 42-50.
- ROBINSON, G., ROSS-MURPHY, S. B., MORRIS, E. R., Viscosity-molecular weight relationships, intrinsic chain flexibility, and dynamic solution properties of guar galactomannan. *Carbohydrate Research*, **1982**, 107, 17-32.

- ROUZES, C., GREF, R., LEONARD, M., DELGADO, A. D., DELLACHERIE, E., Surface modification of poly(lactic acid) nanospheres using hydrophobically modified dextrans as stabilizers in an o/w emulsion/evaporation technique. *Journal of Biomedical Materials Research*, **2000**, *50*, 557-565.
- RUSU-BALAITA L., DESBRIÈRES J., RINAUDO M., Formation of a biocompatible polyelectrolyte complex: chitosan-hyaluronan complex stability. *Polymer Bulletin*, **2003**, *50*, 91-98.
- SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, E., RUIZ, J. M., FERRERES, F., MORENO, D. A., Phenolic profiles of cherry tomatoes as influenced by hydric stress and rootstock technique. *Food Chemistry*, **2012**, *134*, 775-782.
- SARMENTO B., RIBEIRO A., VEIGA F., FERREIRA D., Development and characterization of new insulin containing polysaccharide nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2006**, *53*, 193-202.
- SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERREZ, S.S., FREITAS, L. L., POHLMANN, A. R., Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*, **2003**, *26*, 726-737.
- SCHATZ, C., DOMARD, A., VITON, C., PICHOT, C., DELAIR, T., Formation of polyelectrolyte complex particles from self-complexation of N-sulfated chitosan. *Biomacromolecules*, **2005**, *6*, 1642-1647.
- SCHATZ, C., LUCAS, J.-M., VITON, C., DOMARD, A., PICHOT, A., DELAIR, T., Formation and properties of positively charged colloids based on polyelectrolyte complexes of biopolymers. *Langmuir*, **2004**, *20*(18), 7766-7788.
- SAETHER, H. V., HOLME, H. K., MAURSTAD, G., SMIDSRAD, O., STOKKE, B. T., Polyelectrolyte complex formation using alginate and chitosan. *Carbohydrate Polymers*, **2008**, *74*, 813-821.
- SARMENTO, B., RIBEIRO, A., VEIGA, F., FERREIRA, D., NEUFELD, R., Oral bioavailability of insulin contained in polysaccharide nanoparticles. *Biomacromolecules*, **2007**, *8*, 3054-3060.

- SEBRAE. Disponível em: <http://www.sebrae.com.br/setor/fruticultura/o-setor/frutas-de-a-a-f/fava-danta/integra_bia/ident_unico/1032> Acesso em: maio de 2012.
- SHARMA, S., MUKKUR, T. K. S., BENSON, H. A. E., CHEN, Y., Enhanced immune response against pertussis toxoid by IgA-loaded chitosan-dextran sulfate nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2012**, *101*, 233-244.
- SHIMODA, A., SAWADA, S.-I., KANO, A., MARUYAMA, A., MOQUIN, A., WINNIK, F. M., AKIYOSHI, K., Dual crosslinked hydrogel nanoparticles by nanogel bottom-up method for sustained-release delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2012**, *99*, 38-44.
- SILVA, D. A., MACIEL, J. S., FEITOSA, J. P. A., PAULA, H. C. B., de PAULA, R. C. M., Polysaccharide-based nanoparticles formation by polyelectrolyte complexation of carboxymethylated cashew gum and chitosan. *Journal of Materials Science*, **2010**, *45*, 5605-5610.
- SILVA, D. A., FEITOSA, J. P. A., PAULA, H. C. B., de PAULA, R. C. M., Synthesis and characterization of cashew gum/acrylic acid nanoparticles. *Materials Science and Engineering C*, **2009**, *29*, 437-441.
- SILVA, D. A., FEITOSA, J. P. A., MACIEL, J. S., PAULA, H. C. B., de PAULA, R. C. M., Characterization of crosslinked cashew gum derivatives. *Carbohydrate Polymers*, **2006**, *66*, 16-26.
- SILVA, D. A., DE PAULA, R. C. M., FEITOSA, J. P. A., DE BRITO, A. C. F., MACIEL, J. S., PAULA, H. C. B., Carboxymethylation of cashew tree exudate polysaccharide. *Carbohydrate Polymers*, **2004**, *58*(2), 163.
- SINGHA, S., OBERLY, G. H., TOWNSEND, E. C., Changes in nutrient composition and pH of the culture medium during in vitro shoot proliferation of crabapple and pear. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, **1987**, *11*, 209-220.
- SJOHOLM, K. H., COONEY, M., MINTEER, S. D., Effects of degree of deacetylation on enzyme immobilization in hydrophobically modified chitosan. *Carbohydrate Polymers*, **2009**, *77*, 420-424.
- SOEDA, S., KOZAKO, T., IWATA, K., SHIMENO, H., Oversulfated fucoidan inhibits the basic fibroblast growth factor-induced tube formation by human

- umbilical vein endothelial cells: its possible mechanism of action. *Biochimica Et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* **2000**, 1497(1), 127-134.
- SOKOLSKY-PAPKOV, M., DOMB, A. J., GOLENSER, J., Impact of Aldehyde content on amphotericin B-dextran imine conjugate toxicity. *Biomacromolecules* **2006**, 7(5), 1529-1535.
- SOM, C., WICK, P., KRUG, H., NOWACK, B., Environmental and health effects of nanomaterials in nanotextiles and façade coatings. *Environment International*, **2011**, 37, 1131-1142.
- SOPPIMATH, K. S., AMINABHAVI, T. M., KULKAMI, A. R., RUDZINSKI, W. E., Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*, **2001**, 70, 1-20.
- SORLIER, P.; DENUZIERE, A.; VITON, C.; DOMARD, A. Relation between the degree of acetylation and the electrostatic properties of chitin and chitosan. *Biomacromolecule*, **2001**, 2, 765-772.
- SOUZA, H. K. S., CAMPIÑA, J. M., SOUSA, A. M. M., SILVA, F., GONÇALVES, M. P., Ultrasound-assisted preparation of size-controlled chitosan nanoparticles: Characterization and fabrication of transparent biofilms. *Food Hydrocolloids*, **2013**, 31(2), 227-236.
- SRIVASTAVA, M., KAPOOR, V. P. Seed galactomannans: An overview. *Chemistry & Biodiversity*, **2005**, 2, 295–317.
- STASIAK, J.; ZAFFORA, A.; COSTANTINO, M. L.; MOGGRIDGE, G. D. A real time SAXS study of oriented block copolymers during fast cyclical deformation, with potential application for prosthetic heart valves. *Soft Matter*, **2011**, 7, 11475-11482.
- TAO, Y., ZHANG, Y., ZHANG, L., Chemical modification and antitumor activities of two polysaccharide-protein complexes from *Pleurotus tuber-regium*. *International Journal of Biological Macromolecules*, **2009**, 45, 109-115.
- TAKAHASHI, H., SAWADA, S., AKLYOSHI, K., Amphiphilic polysaccharide nanoballs: a new building block for nanogel biomedical engineering and artificial chaperones. *ACSnano*, **2011**, 5(1), 337-345.

- TAVARES, I. S., CARONI, A. L. P. F., DANTAS NETO, A. A., PEREIRA, M. R., FONSECA, J. L. C., Surface charging and dimensions of chitosan coacervated nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2012**, *90*, 254-258.
- TERAMOTO, N., SHIBATA, M., Synthesis and properties of pullulan acetate. Thermal properties, biodegradability, and a semi-clear gel formation in organic solvents, *Carbohydrate Polymers*, **2006**, *63*, 476-481.
- TOMASSINI, E., MORS, W. B., *Dimorphandra mollis* Benth. e *D. gardneriana* Tul., novas e excepcionais fontes de rutina. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, **1966**, *38*, 321-323.
- TSAI, H.-Y., CHIU, C.-C., LIN, P.-C., CHEN, S.-H., HUANG, S.-J., WANG, L.-F., Antitumor efficacy of doxorubicin released from crosslinked nanoparticulate chondroitin sulfate/chitosan polyelectrolyte complexes. *Macromolecular Bioscience*, **2011**, *11*, 680-688.
- TURVEY, J. R.; *Advanced Carbohydrate Chemistry*, 1965, **20**: 183.
- VARMA, A. J., KOKANE, S. P., PATHAK, G., PRADHAN, S. D., Thermal behavior of galactomannan guar gum and its periodate oxidation products. *Carbohydrate Polymers* **1997**, *32*(2), 111-114.
- VÁZQUEZ, J. A., RODRÍGUEZ-AMADO, I., MONTEMAYOR, M. I., FRAGUAS, J., GONZÁLEZ, M. P., MURADO, M. A., Chondroitin sulfate, hyaluronic acid and chitin/chitosan production using marine waste sources: characteristics, applications and eco-friendly processes: a review. *Marine Drugs* **2013**, *11*, 747-774.
- VEELAERT, S., de WIT, D., GOTLIEB, K. F., VERHÉ, R., The gelation of dialdehyde starch. *Carbohydrate Polymers* **1997**, *32*(2), 131-139.
- VENDRUSCOLO, C. W., Goma xantana e galactomanana (*M. scabrella*): Desenvolvimento de matrizes hidrofílicas para liberação modificada de teofilina. Dissertação de Mestrado. Universidade do Vale do Itajaí, **2005**.
- VIEIRA, I. G. P., MENDES, F. N. P., GALLÃO, M. I., BRITO, E. S., NMR study of galactomannans from the seeds of mesquite tree (*Prosopis juliflora* (Sw) DC). *Food Chemistry*, **2007**, *101*, 70-73.
- VIEIRA, N. A. B., MOSCARDINI, M. S., TIERA, V. A. O., TIERA, M. J., Aggregation behavior of hydrophobically modified dextran in aqueous

- solution: a fluorescence probe study. *Carbohydrate Polymers*, **2003**, *53*, 137-143.
- VIEIRA, I. G. P., Estudo químico de *Dimorphandra gardneriana* (Leguminosae) e preparação de complexos de flavanóides com fosfolipídeos. Tese submetida ao Departamento de Química Orgânica e Inorgânica/UFC, **2003**.
- VINOGRADOV, S.V.; BRONICH, T.K.; KABANOV, A.V. Nanosize cationic hydrogels for drug delivery: preparation, properties and interaction with cells. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2002**, *54*, 135-147.
- VOGL, H., PAPER, D. H., FRANZ G., Preparation of sulfated linear (1→4)- β -galactan with variable degrees of sulfation. *Carbohydrate Polymers*, **2000**, *41*, 185-190.
- WANG, Q.; JAMAL, S.; DETAMORE, M. S.; BERKLAND, C. PLGA-chitosan/PLGA-alginate nanoparticle blends as biodegradable colloidal gels for seeding human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **2011**, *96*, 520-527.
- WANG, J., GUO, H., ZHANG, J., WANG, X., ZHAO, B., YAO, J., WANG, Y., Sulfated modification, characterization and structure-antioxidant relationships of *Artemisia sphaerocephala* polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, **2010a**, *81*, 897-905.
- WANG, X., WANG, J., ZHANG, J., ZHAO, B., YAO, J., WANG, Y. Structure-antioxidant relationships of sulfated galactomannan from guar gum. *International Journal of Biological Macromolecules*, **2010b**, *46*, 59-66.
- WHISTLER, R. L., Solubility of Polysaccharides and their behaviour in solution. In: Carbohydrates in Solution. *ACS Advances in Chemistry Series*, **1973**, *117*, 242.
- WILSON, M., KANNANGARA, K., SMITH, G., SIMMONS, G., RAGUSE, B., Nanotechnology: basic science and emerging technologies. *Ed Chapman & Hall*, UNSW Press: Sidney, **2004**.
- WORANOWICZ, S. M., GORIN, P. A. J., MARCELLI, M. P., TORRIS, G., IACOMINI, M., Structural studies on the galactomannans of lichens of the genus *Cladonia*. *The Lichenologist*, **1997**, *29*, 471-481.

- WU, S. J., CHUN, M. W., SHIN, K. H., TOIDA, T., PARK, Y., LINHARDT, R. J., KIM, Y. S., Chemical sulfonation and anticoagulant activity of acharan sulfate. *Thrombosis Research* **1998**, 92(6), 273-281.
- YAMADA, T., KAWASAKI, T., Microbial synthesis of hyaluronan and chitin: New approaches. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **2005**, 99, 521-528.
- YANG, J., DU, Y., WEN, Y., LI, T., HU, L., Sulfation of chinese lacquer polysaccharides in different solvents. *Carbohydrate Polymers* **2003**, 52, 397-403.
- YIN, L.; DING, J.; HE, C.; CUI, L.; TANG, C.; YIN, C. Drug permeability and mucoadhesion properties of thiolated trimethyl chitosan nanoparticles in oral insulin delivery. *Biomaterials*, **2009**, 30, 5691-5700.
- YU, H., XIAO, C., Synthesis and properties of novel hydrogels from oxidized konjac glucomannan crosslinked gelatin for in vitro drug delivery. *Carbohydrate Polymers* **2008**, 72, 479-489.
- YU, H., WANG, W., CHEN, X., DENG, C., JING, X., Synthesis and characterization of the biodegradable polycaprolactone-graft-chitosan amphiphilic copolymers. *Biopolymers*, **2006**, 83, 233-242
- ZENG, Z., PATEL, J., LEE, S.-H., McCALLUM, M., TYAGI, A., YAN, M., SHEA, K. J., Synthetic polymer nanoparticle-polysaccharide interactions: a systematic study. *Journal of the American Chemical Society*, **2012**, 134, 2681-2690.
- ZHANG, X., LI, S., SUN, L., JI, L., ZHU, J., FAN, Y., TAI, G., ZHOU, Y., Further analysis of the structure and immunological activity of an RG-I type pectin from *Panax ginseng*. *Carbohydrate Polymers*, **2012a**, 89, 519-525.
- ZHANG, Y., THOMAS, Y., KIM, E., PAYNE, G. F., pH- and voltage-responsive chitosan hydrogel through covalente cross-linking with catechol. *The Journal of Physical Chemistry B*, **2012b**, 116(5), 1579-1585.
- ZHANG, J., XU, X.-D., LIU, Y., LIU, C.-W., CHEN, X.-H., LI, C., ZHUO, R.-X., ZHANG, X.-Z., Design of an "active defense" system as drug carriers for cancer therapy. *Advanced Functional Materials*, **2012c**, 22(8), 1704-1710.
- ZHANG, H.-Z., GAO, F.-P., LIU, L.-R., LI, X.-M., ZHOU, Z.-M., YANG, X.-D., ZHANG, Q.-G., Pullulan acetate nanoparticles prepared by solvent

diffusion method for epirubicin chemotherapy, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2009**, 71, 19-26.

ZHU, Y. **Properties of polymeric drug delivery systems prepared by hot-melt extrusion**. 2002. Tese (Doutorado), Faculty of the Graduate School of the University of Texas, Austin, 2002.

ZHENG Y., WANG C., HU J., FU J., DONG L., WU L., SHEN X., Nanoparticles based on the complex of chitosan and polyaspartic acid sodium salt: Preparation, characterization and the use for 5-fluorouracil delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **2007**, 67, 621-631.

APÊNDICE

CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS POR DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO

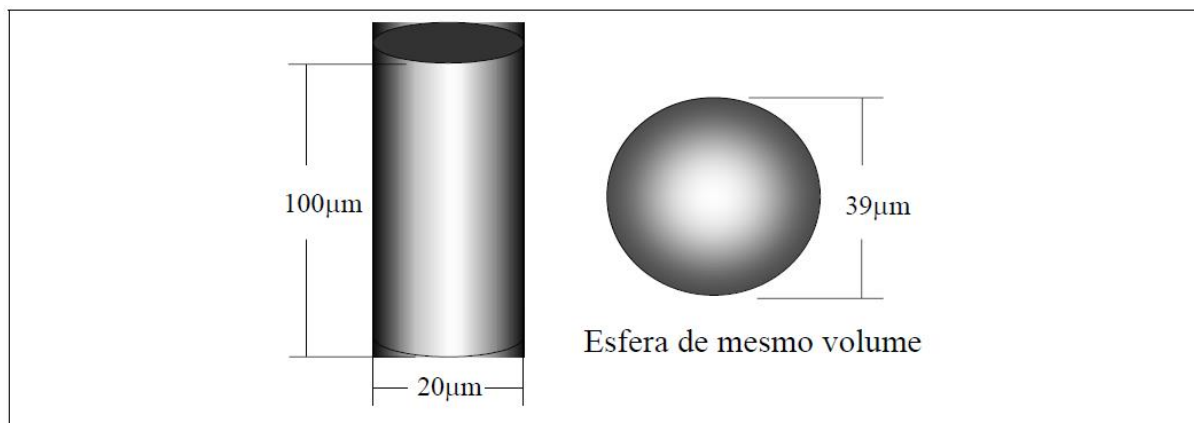
A aplicação como carreadores de fármacos é a principal aplicação de nanopartículas. Observa-se que o tamanho da partícula afeta a liberação do fármaco, pois as partículas menores oferecem maior área superficial, portanto maior parte do fármaco estará exposto com a superfície, tornando a liberação mais rápida (SUNDAR, KUNDU e KUNDU, 2010).

O tamanho das partículas e a distribuição de tamanho são as mais importantes características das nanopartículas, quando essas são usadas como carreadores de fármacos, pois podem definir a distribuição *in vivo*, a ação biológica, a toxicidade e o alvo da liberação do fármaco. Além disso, podem influenciar na capacidade de incorporação e na liberação do fármaco e na estabilidade das nanopartículas (SINGH e LILLARD JUNIOR, 2009).

Portanto, o tamanho da partícula é uma variável de grande interesse para diferentes processos, com impacto direto nas características do produto final. As partículas são estruturas tridimensionais, em sua maioria irregulares, polidispersas (de vários tamanhos) e com diferentes propriedades físico-químicas. No entanto, os métodos utilizados para determinação de tamanho fornecem como resposta, em princípio, um número, com o qual se pretende representar essa grandeza física (SANTOS *et al.*, 2004). A esfera é uma forma geométrica possível de ser completamente representada por um único número no espaço tridimensional.

Porém, uma dada partícula pode ser representada por diferentes esferas com base em uma de suas diferentes propriedades, como a dimensão, a área projetada, a área superficial, o volume, a velocidade de sedimentação, massa, dentre outras. O princípio da esfera equivalente consiste em relacionar alguma dessas propriedades com o diâmetro de uma esfera (Figura 1) (SANTOS *et al.*, 2004).

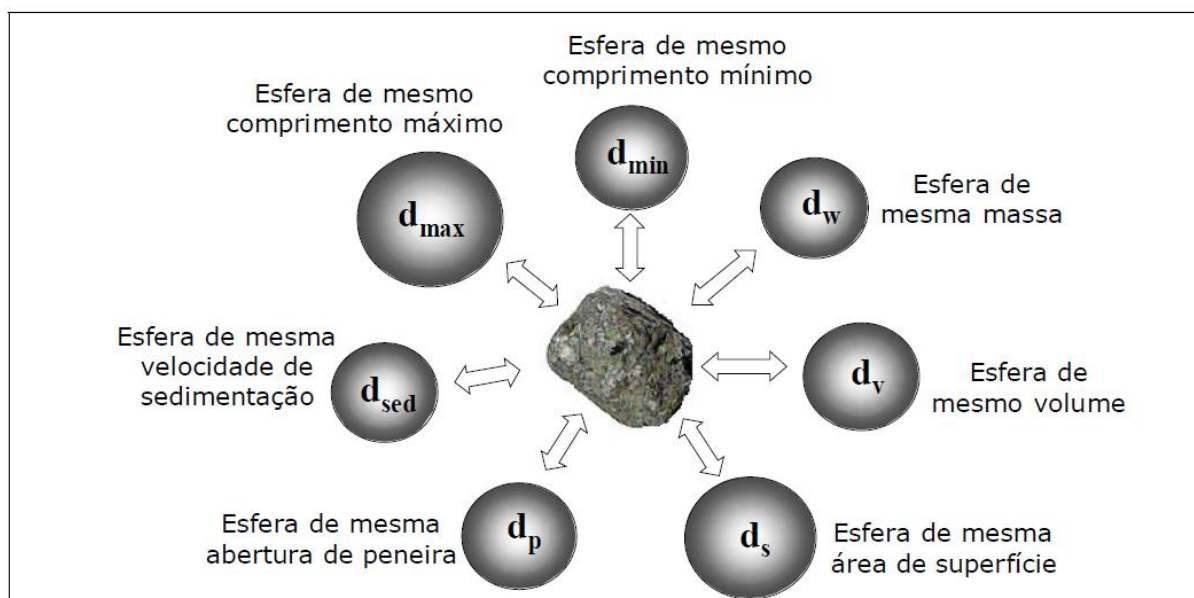
Figura 1 – Princípio da esfera equivalente: esfera de mesmo volume. Esfera de diâmetro igual a $39\ \mu\text{m}$ tem o mesmo volume de uma partícula cilíndrica de diâmetro e comprimentos iguais a $20\ \mu\text{m}$ e $100\ \mu\text{m}$, respectivamente.



Fonte: RAWLE (2002).

Portanto, ao relacionar diferentes propriedades de uma mesma partícula a um diâmetro de esfera equivalente, podem ser obtidos diferentes valores deste parâmetro como ilustrado na Figura 2.

Figura 2 – Diâmetros equivalentes para uma mesma partícula.



Fonte: RAWLE (2002).

Atualmente, a determinação do tamanho de partículas é feita por espectroscopia de correlação de fóton ou por espalhamento dinâmico da luz e geralmente verificada por microscopia eletrônica por varredura ou transmissão

(SINGH e LILLARD JUNIOR, 2009). Conforme o método empregado na determinação do tamanho de partículas, podem ser verificadas diferenças, uma vez que a microscopia eletrônica fornece uma imagem da partícula isolada do meio, enquanto, que a espectroscopia de correlação de fótons possibilita a determinação do raio hidrodinâmico das partículas em suspensão (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Na técnica de espalhamento dinâmico da luz o tamanho de partículas Browniano é determinado para suspensões coloidais em escalas nano e submicro. Ao iluminar uma solução de partículas em movimento Browniano com uma luz monocromática (laser) haverá um descolamento *Doppler* quando a luz atingir a partícula, mudando o seu comprimento de onda que está diretamente ligado ao tamanho das partículas. É possível determinar a distribuição de tamanho e descrever o movimento médio das partículas medindo o coeficiente de difusão e utilizando uma função de autocorrelação (SUNDAR, KUNDU e KUNDU, 2010).

Na medida de tamanho, em equipamento Zetasizer, por espalhamento dinâmico da luz, as partículas devem estar dispersas em um determinado meio com movimento randômico. Há basicamente dois modelos matemáticos que descrevem o espalhamento nesse equipamento. Uma para as partículas que são muito menores que $0,05 \mu\text{m}$, neste caso, o espalhamento é denominado espalhamento *Rayleigh* e outro, para as partículas cujo tamanho está ente $0,05$ a $100 \mu\text{m}$, onde o espalhamento *Mie* é o mais apropriado, pois ele consegue descrever multiespalhamentos gerados durante a análise. Outro modelo matemático pode ser utilizado quando as partículas são maiores que $100 \mu\text{m}$, que é o espalhamento de *Fraunhofer* (KECK e MULLER, 2008).

As partículas em suspensão podem apresentar interferência construtiva ou destrutiva com a intensidade da luz dispersa numa certa direção. Segundo HASSELLÖV *et al.* (2008), o equipamento faz medidas ao longo de curtos períodos de tempo (δt) e, em seguida, correlaciona a intensidade no tempo (t_0) com o tempo ($t_0 + \delta t$) na ordem de micro-milisegundos. Partículas pequenas (com maior difusão) perdem a correlação (a memória da sua posição anterior) mais rapidamente do que partículas maiores.

A intensidade do espalhamento é calculado como uma função de autocorrelação, mostrada na Equação 1.

$$g(\tau) = \left| \frac{G(\tau) - \langle I \rangle^2}{\gamma} \right|^{1/2} = Ae^{-2\Gamma\tau} \quad (1)$$

onde $g(\tau)$ é a função de autocorrelação de campo, $\langle I \rangle^2$ é a linha de base e γ é o fator de coerência, que expressa a eficiência da correlação de fótons. A é uma constante específica do equipamento, Γ é a taxa de decaimento e τ tempo de decaimento. Γ pode ser convertido no coeficiente de difusão, D , usando a relação da Equação 2.

$$D = \frac{\Gamma}{q^2} \quad (2)$$

onde q é o vetor de onda que é descrita pela a seguinte relação da Equação 3.

$$q = 4\pi\eta \sin\left(\frac{\pi}{4}\right) \quad (3)$$

onde η é o índice de refração do solvente e λ é o comprimento da luz incidente. Se o coeficiente de difusão é conhecido, o raio hidrodinâmico, R_h , pode ser calculado pela Equação 4 de Stokes-Einstein

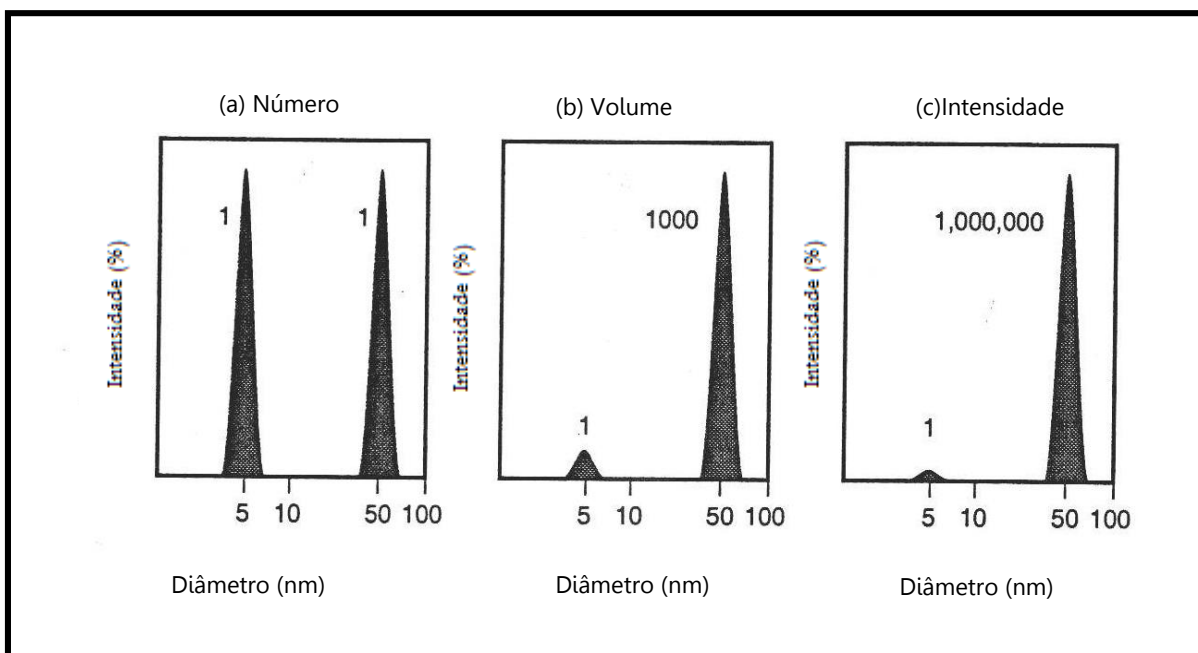
$$R_h = \frac{kT}{6\pi\eta D} \quad (4)$$

onde k é a constante de Boltzmann e T é a temperatura absoluta.

Para diâmetros $d < \frac{\lambda}{20}$, então a intensidade de espalhamento, $I \sim d^6$, de acordo com a aproximação de *Rayleigh*, enquanto que para $\frac{\lambda}{20} < d < \sim \lambda$, então $I \sim d^2$ (aproximação de *Debye*). As vantagens do espalhamento da luz dinâmica são a simplicidade e a rapidez da operação, além da mínima perturbação à amostra. As limitações são de interpretação, especialmente para sistemas polidispersos e a revisão crítica dos dados obtidos (HASSELLÖV *et al.*, 2008).

O resultado da medida por espalhamento de luz pode ser obtido por diferentes diâmetros equivalentes, intensidade, volume ou número. Matematicamente, o cálculo para conversão dos três tipos das análises de volume, número e intensidade tem pouca diferença, contudo as consequências de cada conversão podem ser surpreendentes. Uma maneira simples de descrever a diferença entre intensidade, volume e número é considerar uma amostra que contém partículas com somente dois tamanhos (5 e 50 nm), cada tamanho corresponde a 50% do total de partículas presente na amostra. A Figura 3 apresenta os gráficos de distribuição de tamanho de partículas versus intensidade do sinal para os três tipos de análise. Observa-se que para o gráfico de distribuição de número (Figura 3a), a intensidade dos sinais é igual para os dois tamanhos (1:1) já que existe o mesmo número de partículas para cada tamanho (ZETASIZER, 2005).

Figura 3 – Gráficos de distribuição de tamanho por número, volume e intensidade versus intensidade do sinal.



Fonte: ZETASIZER (2005).

A Figura 3b mostra o resultado de distribuição de volume. A área do pico para partículas de 50 nm é 1000 vezes maior do que o pico para partículas de 5 nm (razão de 1:1000). Isto é devido ao volume da partícula de 50 nm ser 1000 vezes maior que a partícula de 5 nm (volume da esfera é igual a $4/3\pi r^3$). Já o gráfico de intensidade (Figura 23c), a área do pico para partículas de 50 nm e

agora 1000000 vezes maior do que para partículas de 5 nm (razão 1:1000000). Isto é devido as partículas grandes espalharem mais luz do que partículas pequenas (a intensidade do espalhamento da partícula é proporcional a sexta parte do seu diâmetro – aproximação de *Rayleigh*) (ZETASIZER, 2005).

Outro fator que influencia nos valores de tamanho é a concentração da dispersão a ser medida. Se a concentração da amostra é muito baixa, o espalhamento de luz não é suficiente para realizar a medida. Isto não é comum ocorrer com o Zetasizer, exceto em circunstâncias extremas. Mas, se a amostra é muito concentrada, então o espalhamento de luz por uma partícula será espalhada por outra (isso é conhecido como multiespalhamento). A concentração máxima é, também, governada pelo ponto no qual não é mais permitido que a amostra se difunda livremente (interações entre partículas) (ALLEN, 1992).

A Tabela 1 apresenta o intervalo de concentração recomendado para uma boa medida em relação ao tamanho das partículas. Esses valores são aproximados para amostras com densidade próxima de 1 g/cm³, e considerando que as partículas têm uma diferença razoável no índice de refração para o dispersante.

Tabela 1 – Concentrações mínimas recomendadas para análise de tamanho de partícula.

Tamanho de partícula	Concentração mínima Recomendada	Concentração máxima Recomendada
< 10 nm	0,5 g/L	Somente limitada pelo material da amostra: interação, agregação, geleificação, etc.
10 nm a 100 nm	0,1 g/L	5 % em massa
100 nm a 1 µm	0,01 g/L (10 ⁻³ % massa)	1 % em massa
> 1 µm	0,1 g/L (10 ⁻² % massa)	1 % em massa

Fonte: JILLAVENKATESA *et al.* (2001).

Antes de fazer as medidas, todos os líquidos devem ser filtrados para evitar a contaminação da amostra. O tamanho do poro do filtro deve ser escolhido com cuidado, visto que se uma amostra é de 10 nm, então uma partícula de poeira de 50 nm será um contaminante na dispersão. Dispersões aquosas podem ser filtradas em membranas de 0,2 μm . A contaminação por poeira é um fator que interfere, pois a quantidade de luz espalhada aumenta com a quantidade de poeira na dispersão (JILLAVENKATESA *et al.*, 2001).

Alguns autores utilizam ultrassom para remover bolhas de ar ou destruir aglomerados. Entretanto, isto deve ser aplicado cuidadosamente para que não haja danos às partículas originais formadas (TANG e LIM, 2003). Limites para o uso de ultrasonicadores em termos de intensidade e tempo de aplicação são fortemente dependentes da amostra e alguns materiais podem se agregar com o uso do ultrassom. Emulsões e lipossomas não devem ser sonicados (SMITH *et al.*, 2009).

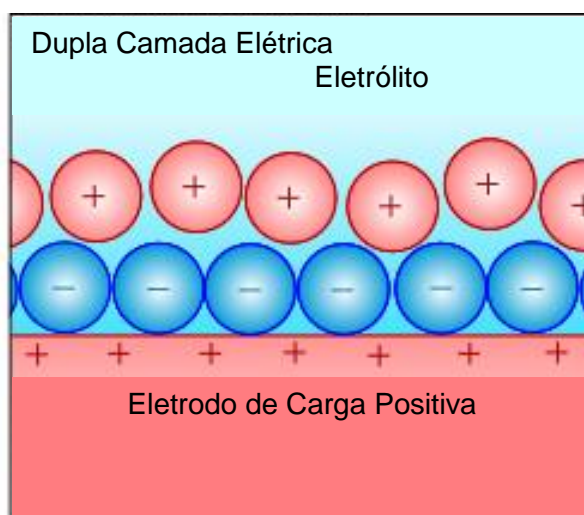
CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS POR POTENCIAL ZETA

A estabilidade das nanopartículas é analisada por meio do potencial zeta, uma vez que as cargas superficiais podem impedir a aglomeração devido à repulsão eletrostática. Além de fornecer informação sobre a natureza do material encapsulado ou que reveste a superfície da nanopartícula (SUNDAR, KUNDU e KUNDU, 2010). Muitas substâncias adquirem cargas elétricas na superfície quando postas em contacto com um líquido polar (água). As cargas das partículas dispersas em sistemas coloidais têm origem na formação de uma dupla camada de íons em sua superfície, devido a uma adsorção seletiva de um dos íons do eletrólito ou devido à ionização de suas moléculas superficiais (LIMA *et al.*, 2008a, b).

A teoria da dupla camada elétrica (DCE), utilizada para explicar os fenômenos eletrocinéticos, supõe sistemas coloidais diluídos, com uma fase sólida suspensa em um meio líquido. Esta consiste em uma camada de íons firmemente ligados à fase sólida dispersa (cargas fixas na superfície), chamados íons determinantes do potencial, e para neutralizar a carga superficial das partículas, uma quantidade equivalente de íons carregados com carga oposta, os contra-íons, dispersos na fase fluida, próximos à interface (Figura 4). Os íons

dispersos na fase fluida que possuam a mesma carga dos íons determinantes do potencial são chamados de co-íons, tendem a ser repelidos pela carga da superfície da partícula, produzindo assim um balanço dinâmico de cargas na interface. A carga da superfície influencia a distribuição dos íons em sua proximidade: os contra-íons são atraídos pela superfície e os co-íons são repelidos para longe (LIMA *et al.*, 2008c).

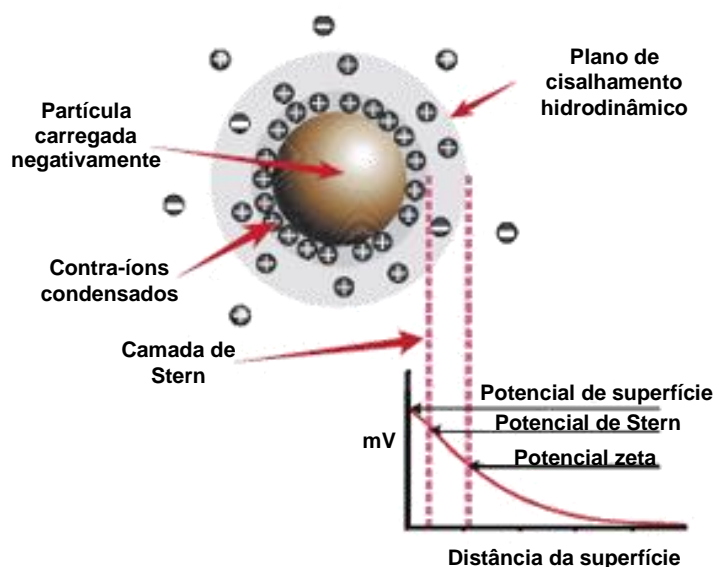
Figura 4 – Esquema da dupla camada elétrica.



Existem diversos modelos que descrevem a distribuição das cargas na dupla camada elétrica. O modelo de Stern supõe que os íons possuem tamanho finito, assim, a DCE se divide em duas partes bem distintas, separadas pelo plano de Stern que se localiza a uma distância da superfície igual ao raio dos íons hidratados (Figura 5). Este modelo prevê a adsorção específica de íons, além da adsorção puramente eletrostática (SHAW, 1975).

A Figura 5 evidencia a adsorção específica de contra-íons polivalentes ou tensoativos que leva à reversão do sinal da carga dentro do plano de Stern (Ψ_0 e Ψ_δ de sinais contrários). Por outro lado, a adsorção de co-íons poderia resultar em Ψ_0 e Ψ_δ de mesmo sinal, mas com valor absoluto maior. A expressão para o modelo de Stern é dada pela Equação 5 (SHAW, 1975).

Figura 5 – Esquema de distribuição iônica ao redor de uma partícula carregada negativamente.



$$\frac{\varepsilon' \cdot (\Psi_0 - \Psi_{St})}{\delta_{St}} + \frac{\sigma_m}{1 + \frac{N_{Av}}{n_0 \cdot V_m} \exp\left[\frac{z \cdot e \cdot \Psi_{St} + \Phi}{k \cdot T}\right]} - \sqrt{8 \cdot n_0 \cdot \varepsilon \cdot k \cdot T} \cdot \sinh\left[\frac{z \cdot e \cdot \Psi_{St}}{2 \cdot k \cdot T}\right] = 0 \quad (5)$$

onde ε' é a permissividade da camada de Stern, Ψ_0 e Ψ_{St} é o potencial na superfície e no plano de Stern, δ_{St} é a espessura da camada de Stern, N_{Av} é o número de Avogrado, n_0 é a concentração dos íons, σ_m é a densidade de carga correspondente a uma monocamada, V_m é o volume molar do solvente, Φ é o termo do componente de Van der Waals na energia de adsorção e k é uma constante.

Como pode ser visto pela Equação 8, a determinação do potencial elétrico no plano de Stern é bastante complexa, pela necessidade do conhecimento de vários parâmetros. Por essa razão, são feitas medidas de potencial no plano de cisalhamento da dupla camada elétrica, denominado potencial zeta ($P\zeta$), obtido por medidas eletrocínéticas. O potencial nessa região decai com o aumento da distância da superfície até, a uma distância suficientemente grande, atingir o potencial da suspensão. Esse potencial é convencionado como potencial zero. Em um campo elétrico, cada partícula e os íons mais fortemente ligados à mesma se movem como uma unidade e o potencial no plano de cisalhamento entre essa unidade e o meio circundante é chamado de potencial zeta (TECHNICAL NOTE, 2012).

O potencial zeta é o potencial elétrico no plano hidrodinâmico de cisalhamento e depende não somente da superfície da partícula, mas do dispersante e pode ser afetado pelo pH ou pela força iônica do meio. A interação das partículas se dá pela magnitude do potencial zeta e não por sua carga de superfície.

Esse potencial pode ser determinado experimentalmente e, como ele reflete a carga efetiva nas partículas, ele se correlaciona com a repulsão eletrostática entre elas e com a estabilidade da suspensão. O potencial Zeta é um indicador útil dessa carga e pode ser usado para prever e controlar a estabilidade de suspensões ou emulsões coloidais (ZETASIZER, 2005).

Quanto maior o potencial Zeta, mais provável é que a suspensão seja estável, pois as partículas carregadas se repelem umas as outras e essa força supera a tendência natural à agregação. A medida do potencial Zeta é com frequência a chave para compreender processos de dispersão e agregação em aplicações tão diversas quanto à purificação da água, moldes cerâmicos ou a formulação de tintas e cosméticos (TECHICAL NOTE, 2012).

A estabilidade das nanopartículas em suspensão irá depender do balanço entre as forças repulsivas e atrativas existentes no meio. A magnitude da medida de potencial Zeta é um indicativo da força repulsiva que está presente e pode ser usada para prever a estabilidade do material.