



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

**JOSÉ RIBAMAR PAIVA JUNIOR**

**NANOPARTÍCULAS POR COMPLEXAÇÃO POLIELETROLÍTICA À BASE DE  
GOMA DO CAJUEIRO MODIFICADA/QUITOSANA PARA ENCAPSULAMENTO  
DO ACETATO DE TIMILA**

**FORTALEZA**

**2020**

JOSÉ RIBAMAR PAIVA JUNIOR

NANOPARTÍCULAS POR COMPLEXAÇÃO POLIELETROLÍTICA À BASE DE GOMA  
DO CAJUEIRO MODIFICADA/QUITOSANA PARA ENCAPSULAMENTO DO  
ACETATO DE TIMILA

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

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Judith Pessoa de Andrade Feitosa.

FORTALEZA

2020

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

---

- P168n Paiva Junior, José Ribamar.  
Nanopartículas por complexação polieletrólítica à base de goma do cajueiro modificada/quitosana para encapsulamento do acetato de timila / José Ribamar Paiva Junior. – 2020.  
83 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2020.  
Orientação: Profa. Dra. Judith Pessoa de Andrade Feitosa.
1. Nanopartícula. 2. Complexação polieletrólítica. 3. Liberação de fármacos. I. Título.

CDD 540

---

JOSÉ RIBAMAR PAIVA JUNIOR

NANOPARTÍCULAS POR COMPLEXAÇÃO POLIELETROLÍTICA À BASE DE GOMA  
DO CAJUEIRO MODIFICADA/QUITOSANA PARA ENCAPSULAMENTO DO  
ACETATO DE TIMILA

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

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Judith Pessoa de Andrade Feitosa (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Jeanny da Silva Maciel  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Flávia Oliveira Monteiro da Silva Abreu  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

A Deus.

Aos meus pais e meu irmão, por todo o apoio durante essa caminhada.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por todo amor e discernimento a mim concedido.

A minha família, em especial aos meus pais, José Ribamar Paiva e Maria Aldeneide de Sousa Paiva, ao meu irmão Thiago de Sousa Paiva, minha cunhada Fabiany Macedo, e aos meus padrinhos José de Castro e Maria de Castro. Obrigado por ser a minha maior torcida, por todo o apoio durante essa caminhada e todos os conselhos, amo vocês.

Aos meus amigos que tenho como irmãos Elias Teles, Italo Caldas, Germana Araújo, Scarlete Nunes, Gabriel Almeida, Milena Almeida, Wesley Marcos, Fernando Lobão, Wesley Matheus, Jardel Pinto e Ygor Oliveira, pelos momentos de descontração e apoio.

Um agradecimento aos meus amigos dos grupos de voluntariado (Agentes da Alegria e Espírito Solidário).

A Universidade Federal do Ceará (UFC) e em especial à prof.<sup>a</sup> Dra. Judith Pessoa de Andrade Feitosa, por sua orientação, paciência e por ter me recebido em sua equipe de pesquisa.

Aos meus companheiros de pesquisa do Laboratório de Polímeros (LabPol), principalmente aos meus amigos Carlos Rhamon, Irisvan Ribeiro, Carlos Pinheiro, Rodrigo Costa, Fabrício Queiroz, Vanessa Canafístula, Raelle Ferreira Gomes, Everton Lucas, Laís Ramos, Leonira Morais, Matheus Xavier, Túlio Aragão, João Luís e Ludmila Virna. Por todos os momentos de descontração, seja no interlab, seja na cantina. Muito obrigado a todos.

Aos companheiros de laboratório que ajudaram com as caracterizações dos materiais: Everton Lucas, Laís Ramos, Venícius Sombra e Nadia Aline.

Aos amigos que a UFC me trouxe: Joelson Oliveira, David Assis e Samuel Veloso obrigado por estarem ao meu lado.

Aos que me auxiliaram desde os meus primeiros passos na pesquisa: Professora Flávia Monteiro e Weibson Paz pelo auxílio, contribuição e apoio, neste tempo de pesquisa.

Ao CENAUREMN pelos espectros Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  obtidos.

Ao INOMAT pelo auxílio financeiro ao projeto.

Ao Conselho Nacional Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado cedida no período de pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

*“Para os crentes, Deus está no princípio das coisas. Para os cientistas, no final de toda reflexão.”*

*Max Planck*

## RESUMO

Neste trabalho, foram produzidas nanopartículas à base de quitosana e goma do cajueiro modificada utilizando a técnica de complexação polieletrólítica. Foram obtidos dois derivados da goma do cajueiro, um carboximetilado e outro sulfatado. As modificações foram confirmadas por FTIR e RMN  $^{13}\text{C}$ . O derivado carboximetilado exibiu uma degradação na cadeia confirmada por cromatografia em permeação em gel, enquanto o derivado sulfatado não apresentou mudança em sua massa molar de pico. As nanopartículas mostraram as bandas características dos polieletrólitos de partida no espectro de infravermelho. Em água destilada, ambos os sistemas apresentaram escala nanométrica. As nanopartículas com goma do cajueiro carboximetilada tiveram tamanho entre 150 e 195 nm, enquanto as nanopartículas com goma do cajueiro sulfatada apresentaram tamanho entre 145 e 285 nm. As menores nanopartículas foram àquelas dos sistemas QTGCM75 (sistema com quitosana e goma do cajueiro carboximetilada com  $n^+/n^-=0,75$ ) e QTGCS75 (sistema com quitosana e goma do cajueiro sulfatada com  $n^+/n^-=0,75$ ) com 154 e 149 nm, respectivamente. Quanto ao potencial zeta, o melhor sistema foi o QTGCM75, com -22,2 mV. Assim, o sistema QTGCM75 foi selecionado para prosseguir com o encapsulamento do acetato de timila. Foi obtida uma eficiência de encapsulamento de 41% e capacidade de carregamento de 24%. O sistema apresentou um perfil de liberação controlado, liberando 97% do acetato de timila encapsulado em 120 horas. Quanto à cinética de liberação, o sistema adequou-se ao modelo cinético de Korsmeyer-Peppas, indicando um mecanismo de liberação por difusão Fickiana e ao modelo de Higuchi. As nanopartículas apresentaram características promissoras para o encapsulamento do acetato de timila.

**Palavras-chave:** Nanopartícula. Complexação polieletrólítica. Liberação de fármacos.



## ABSTRACT

In this work, nanoparticles were produced based on chitosan and modified cashew gum using the technique of polyelectrolytic complexation. Two derivatives of cashew gum were obtained, one carboxymethylated and the other sulfated. The modifications were confirmed by FTIR and  $^{13}\text{C}$  NMR. The carboxymethylated derivative exhibited a chain degradation confirmed by gel permeation chromatography, while the sulfated derivative showed no change in its peak molar mass. The nanoparticles showed the characteristic bands of the starting polyelectrolytes in the infrared spectrum. In distilled water, both systems presented a nanometric scale. The nanoparticles with carboxymethylated cashew gum showed between 150 and 195 nm in size, while the nanoparticles with sulfated cashew gum were between 145 and 285 nm in size. The smallest nanoparticles were the QTGCM75 (system with chitosan and carboxymethylated cashew gum with  $n^+/n^-=0.75$ ) and QTGCS75 (system with chitosan and sulfated cashew gum with  $n^+/n^-=0.75$ ) systems with 154 and 149 nm, respectively. As for the zeta potential, the best system was the QTGCM75, with -22.2 mV. Thus, the QTGCM75 system was selected to proceed with the encapsulation of thymol acetate, obtaining an encapsulation efficiency of 41% and loading capacity of 24%. The system presented a controlled release profile, releasing 97% of the encapsulated thymol acetate in 120 hours. As for the release kinetics, the system was adapted to the Korsmeyer-Peppas kinetic model, indicating a release mechanism by Fickian diffusion and the Higuchi model. The nanoparticles showed promising characteristics for the encapsulation of thymol acetate.

**Keywords:** Nanoparticle. Polyelectrolytic complexation. Drug release.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Nº de cabeças de ovinos e caprinos no Brasil (a) e no Ceará (b) de 1975 à 2017.....	17
Figura 2	- Estrutura química do timol (a) e acetato de timila (b).....	20
Figura 3	- Estrutura química de alguns polímeros naturais e sintéticos.....	21
Figura 4	- Representação da interação entre polieletrólitos de cargas opostas.....	22
Figura 5	- Estrutura molecular da quitosana.....	23
Figura 6	- Principais constituintes da goma do cajueiro.....	25
Figura 7	- Estrutura provável de segmento da goma do cajueiro.....	26
Figura 8	- Unidade glicosídica carboximetilada.....	27
Figura 9	- Unidade glicosídica sulfatada.....	27
Figura 10	- Espectro de FTIR da QT.....	38
Figura 11	- Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da quitosana (500 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$ , 70 °C).....	39
Figura 12	- Espectro de FTIR do timol e do acetato de timila.....	40
Figura 13	- Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (a) e $^{13}\text{C}$ (b) do acetato de timila (500 MHz, 25 °C).....	41
Figura 14	- Curva de titulação do derivado GCM2 com NaOH.....	43
Figura 15	- Espectro de FTIR da GC e de seus derivados carboximetilados.....	45
Figura 16	- Espectro de FTIR da GC e de seus derivados sulfatados.....	46
Figura 17	- Cromatograma da GC e seus derivados GCM2 e GCS5.....	48
Figura 18	- Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ da GC (500 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ , 70 °C).....	51
Figura 19	- Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ da GCM2 (500 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ , 70 °C).....	52
Figura 20	- Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ da GCS5 (500 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ , 70 °C).....	53
Figura 21	- Espectro de RMN DEPT 135 da GC (500 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ , 70 °C).....	54
Figura 22	- Espectro de RMN DEPT 135 da GCM2 (500 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ , 70 °C).....	55
Figura 23	- Espectro de RMN DEPT 135 da GCS5 (500 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ , 70 °C).....	56
Figura 24	- Espectro de FTIR das NPs com GCM e os polieletrólitos de partida.....	58
Figura 25	- Espectro de FTIR das NPs com GCS e os polieletrólitos de partida.....	60
Figura 26	- Tamanho de partícula e índice de polidispersividade (a) e potencial zeta (b) das nanopartículas com GCM.....	62
Figura 27	- Distribuição de intensidade (%) x tamanho (d. nm) das nanopartículas com GCM.....	63

Figura 28	- Tamanho de partícula e índice de polidispersividade (a) e potencial zeta (b) das nanopartículas com GCS.....	64
Figura 29	- Distribuição de intensidade (%) x tamanho (d. nm) das nanopartículas com GCS.....	64
Figura 30	- Distribuição de intensidade (%) x tamanho (d. nm) do sistema QTGCM75AT.....	66
Figura 31	- Perfil de liberação <i>in vitro</i> do sistema QTGCM75AT em pH 7,4 (tampão fosfato).....	67
Figura 32	- Proposta de modelo de nanopartícula para encapsulamento do acetato de timila.....	68
Figura 33	- Perfis de liberação previstos mediante os modelos (a) ordem zero, (b) primeira ordem, (c) Higuchi, (d) Hixson-Crowell e (e) Korsmeyer-Peppas.	70

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Quantificação do timol em alguns óleos essenciais.....	19
Tabela 2	– Atividade biológica do timol.....	19
Tabela 3	– Condições de reação para a carboximetilação da GC.....	30
Tabela 4	– Condições de reação para a sulfatação da GC.....	31
Tabela 5	– Valores de expoentes e mecanismos de liberações correspondentes para o modelo de Korsmeyer-Peppas.....	36
Tabela 6	– Rendimento e GS das reações de modificações da GC.....	42
Tabela 7	– Teor de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre nos derivados GCS.....	43
Tabela 8	– Absorbância relativa dos derivados carboximetilados.....	44
Tabela 9	– Absorbância relativa dos derivados sulfatados.....	46
Tabela 10	– Volume de eluição e $M_{pk}$ da GC e seus derivados GCM2 e GCS5.....	48
Tabela 11	– Rendimento de obtenção das nanopartículas com GCM.....	57
Tabela 12	– Rendimento de obtenção das nanopartículas com GCS.....	57
Tabela 13	– Atribuições aos picos da quitosana e goma do cajueiro carboximetilada.....	59
Tabela 14	– Atribuições de algumas bandas dos complexos polieletrólíticos com goma do cajueiro carboximetilada.....	59
Tabela 15	– Atribuições aos picos da quitosana e goma do cajueiro sulfatada.....	61
Tabela 16	– Atribuições de algumas bandas dos complexos polieletrólíticos com goma do cajueiro sulfatada.....	61
Tabela 17	– Rendimento, diâmetro, IPD, potencial zeta, eficiência de encapsulamento e capacidade de carregamento do ensaio de encapsulamento do acetato de timila.....	66
Tabela 18	– Constantes de liberação e coeficientes de correlação das equações matemáticas aplicadas na liberação do acetato de timila.....	69

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AT	Acetato de timila
QT	Quitosana
PIB	Produto interno bruto
GC	Goma do cajueiro
GCM	Goma do cajueiro carboximetilada
GCS	Goma do cajueiro sulfatada
PE	Polieletrólito
CPE	Complexo polieletrólítico
NP	Nanopartícula
MM	Massa molar
Mpk	Massa molar de pico
ACA	Ácido cloroacético
V <sub>EL</sub>	Volume de eluição
FTIR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
GPC	Cromatografia por permeação em gel
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância magnética nuclear de prótons <sup>1</sup> H
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância magnética nuclear de <sup>13</sup> C
IPD	Índice de polidispersidade
GS	Grau de substituição
GA	Grau de acetilação
GD	Grau de desacetilação
RPM	Rotações por minuto
n <sup>+</sup> /n <sup>-</sup>	Razão teórica entre o número de mols com cargas positivas e negativas
QTGCM75	Nanopartícula com quitosana e goma do cajueiro carboximetilada n <sup>+</sup> /n <sup>-</sup> = 0,75
QTGCM100	Nanopartícula com quitosana e goma do cajueiro carboximetilada n <sup>+</sup> /n <sup>-</sup> = 1,00
QTGCM125	Nanopartícula com quitosana e goma do cajueiro carboximetilada n <sup>+</sup> /n <sup>-</sup> = 1,25
QTGCS75	Nanopartícula com quitosana e goma do cajueiro sulfatada n <sup>+</sup> /n <sup>-</sup> = 0,75
QTGCS100	Nanopartícula com quitosana e goma do cajueiro sulfatada n <sup>+</sup> /n <sup>-</sup> = 1,00
QTGCS125	Nanopartícula com quitosana e goma do cajueiro sulfatada n <sup>+</sup> /n <sup>-</sup> = 1,25
EE	Eficiência de encapsulamento
CC	Capacidade de carregamento

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
2	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
2.1	<b>Agropecuária e doenças parasitárias</b> .....	16
2.2	<b>Medicamentos convencionais e alternativos</b> .....	17
2.2.1	<i>Óleos essenciais</i> .....	18
2.3	<b>Nanotecnologia para encapsulamento</b> .....	20
2.4	<b>Matrizes poliméricas para sistemas de liberação controlada</b> .....	23
2.4.1	<i>Quitosana</i> .....	23
2.4.2	<i>Goma do cajueiro</i> .....	24
2.4.2.1	<i>Carboximetilação da goma do cajueiro</i> .....	26
2.4.2.2	<i>Sulfatação da goma do cajueiro</i> .....	27
3	<b>OBJETIVOS</b> .....	28
3.1	<b>Objetivo geral</b> .....	28
3.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	28
4	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	29
4.1	<b>Materiais</b> .....	29
4.2	<b>Acetilação do timol</b> .....	29
4.3	<b>Isolamento do polissacarídeo do exsudato de <i>Anacardium occidentale</i></b> .....	29
4.4	<b>Carboximetilação da goma do cajueiro</b> .....	30
4.5	<b>Sulfatação da goma do cajueiro</b> .....	30
4.6	<b>Purificação da quitosana</b> .....	31
4.7	<b>Determinação do grau de desacetilação da quitosana</b> .....	31
4.8	<b>Determinação do grau de substituição dos derivados da goma do cajueiro</b> .....	32
4.9	<b>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)</b> .....	32
4.10	<b>Análise elementar</b> .....	33
4.11	<b>Ressonância magnética nuclear (RMN)</b> .....	33
4.12	<b>Cromatografia de permeação em gel (GPC)</b> .....	33
4.13	<b>Preparo das nanopartículas por complexação polieletrólítica</b> .....	33
4.13.1	<i>Nanopartículas com quitosana e goma do cajueiro carboximetilada</i> .....	33

4.13.2	<i>Nanopartículas com quitosana e goma do cajueiro sulfatada</i> .....	34
4.14	<b>Ensaio de encapsulamento do acetato de timila</b> .....	34
4.14.1	<i>Eficiência de encapsulamento</i> .....	34
4.14.2	<i>Ensaio de liberação in vitro</i> .....	35
4.14.3	<i>Cinética de liberação in vitro e modelos matemáticos</i> .....	35
4.15	<b>Espalhamento dinâmico de luz (EDL)</b> .....	37
5	<b>RESULTADOS</b> .....	37
5.1	<b>Caracterização da quitosana</b> .....	38
5.1.1	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)</i> .....	38
5.1.2	<i>Determinação do grau de desacetilação da quitosana</i> .....	39
5.2	<b>Caracterização do acetato de timila</b> .....	39
5.2.1	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)</i> .....	40
5.2.2	<i>Ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C</i> .....	41
5.3	<b>Caracterização dos derivados de GC</b> .....	42
5.3.1	<i>Grau de substituição</i> .....	43
5.3.2	<i>FTIR dos derivados de GC</i> .....	44
5.3.3	<i>Cromatografia de permeação em gel dos derivados de GC</i> .....	47
5.3.4	<i>Ressonância magnética nuclear da GC e dos derivados</i> .....	49
5.4	<b>Obtenção das nanopartículas</b> .....	57
5.5	<b>Caracterização das nanopartículas</b> .....	58
5.5.1	<i>FTIR das nanopartículas</i> .....	58
5.5.2	<i>Espalhamento dinâmico de luz</i> .....	61
5.6	<b>Caracterização das nanopartículas com AT encapsulado</b> .....	65
5.6.1	<i>Espalhamento dinâmico de luz da NP com AT encapsulado</i> .....	65
5.6.2	<i>Ensaio de liberação in vitro</i> .....	66
5.6.3	<i>Análise cinética de liberação in vitro</i> .....	68
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	71
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	72

## 1 INTRODUÇÃO

A criação de caprinos e ovinos é muito comum no Brasil e de grande importância na economia. Segundo o IBGE e o Cepea/USP, o PIB brasileiro foi de 6,36 trilhões em 2017, onde 1,40 trilhão correspondem à contribuição do agronegócio. Em 2017, a pecuária contribuiu com 6,8% do PIB, movimentou 523,25 bilhões e foi responsável pela criação de 353.725 vagas de empregos com carteira assinada segundo o Ministério do Trabalho. Fica, comprovada, assim, sua importância no cenário nacional.

O setor de pequenos ruminantes (caprinos e ovinos) possui relevância mundial. A sua criação tem um papel socioeconômico muito importante, na preservação de ecossistemas, conservação da biodiversidade e fornecendo diversos produtos para o mercado (MARINO et al, 2016). Dentre os produtos de consumo fornecidos, encontram-se: lã, couro, carne e laticínios, tornando-se parte importante da economia brasileira. Entretanto, alguns fatores podem causar a diminuição da produtividade animal. Dentre os principais fatores encontra-se a infecção por parasitas gastrointestinais, que causa diminuição no apetite, perda de peso e danos no sistema gastrointestinal, ocasionando uma diminuição significativa na qualidade dos produtos obtidos a partir do rebanho, e gerando grande perda econômica (SILVA et al, 2018).

Vários medicamentos foram desenvolvidos a fim de tratar os diversos parasitas que, com frequência, atingem os rebanhos brasileiros. Algumas classes de medicamentos são: benzimidazóis, imidazotiazóis, spirindoles, benzenosulfonamida e organofosforados. O uso indiscriminado desses anti-helmínticos propiciou o desenvolvimento de resistência por parte dos nematoides, tornando mais difícil o combate contra a infecção parasitária (AMARANTE, 2014).

Dentre os parasitas gastrointestinais hematófagos, destaca-se o *Haemonchus contortus*, devido a sua grande incidência, e grande resistência desenvolvida frente a diversas classes de anti-helmínticos, tais como: aminoacetonitrilas, benzimidazol, lactonas macrocíclicas, salicilanilidas e triclabendazol (SANGSTER, COWLING & WOODGATE, 2018).

Buscando novos meios de combater a infecção helmíntica, óleos essenciais com potencial anti-helmíntico têm sido estudados, como os de: *Lippia sidoides*, *Mentha piperita*, *Hura crepitans*, *Carapa guianensis* e *Piper tuberculatum* (CARVALHO et al, 2012).

O acetato de timila é um derivado acetilado do timol, que é encontrado em pequenas quantidades em diversos óleos essenciais, como no óleo essencial de *Lippia sidoides* (VERAS et al, 2012), *Origanum vulgare* (KULISIC et al, 2004) e *Thymus vulgaris* (BOZIN et al, 2006).



Diversas atividades biológicas do timol são relatadas na literatura, como antibacteriano (XU et al, 2008 e WATTANASATCHA et al, 2012), antifúngico (ROMERO et al, 2009) e nematocida (CHOI et al, 2007). O timol, no entanto, apresenta toxicidade elevada, o que dificulta sua aplicação direta (TABARI et al, 2017). Uma alternativa para diminuir a sua toxicidade é a acetilação. Esses derivados (acetato de timila) mantêm sua atividade biológica, com eficiência comprovada frente ao nematoide *Haemonchus contortus* (ANDRÉ et al, 2017).

Os sistemas de liberação controlada têm sido amplamente estudados nos últimos anos, com grande aplicação na área farmacêutica e biomédica. Eles são utilizados para proteger e liberar com regularidade alguns princípios ativos, diminuindo a toxicidade e prolongando a sua atividade biológica. Alguns princípios ativos têm sua vida útil bastante restrita, pois sofrem grande degradação devido a sua reatividade, principalmente no meio ambiente, por fatores como luz, pH e calor (FELIX et al, 2016).

Encapsulamento é um processo que retém o material em um revestimento que isola e protege este contra o ambiente externo (IMBROGNO et al, 2015). As nanopartículas (NPs) à base de polissacarídeos têm sido amplamente estudadas devido à capacidade de encapsular princípios ativos de forma eficiente em suas matrizes poliméricas hidrofílicas, através de diferentes tipos de interação, incluindo as iônicas entre compostos com cargas elétricas opostas (ABREU, 2008).

As NPs são utilizadas para revestir os fármacos, visando evitar a degradação do princípio ativo, melhorar a eficácia de sua atividade, diminuir a sua toxicidade e expandir a sua atividade biológica (CLEMENTE-NAPIMOGA et al., 2012).

A quitosana (QT) é um polissacarídeo catiônico, derivado da quitina. É um polímero biodegradável e atóxico quando administrado via oral (OLIVEIRA et al, 2014), o que a torna aplicável para produção de partículas utilizáveis em sistemas de liberação controlada. A QT também é adequada à produção de partículas por complexação polieletrólítica.

Portanto, este trabalho tem como objetivo encapsular o acetato de timila em nanopartículas formadas por complexação polieletrólítica, utilizando quitosana e goma do cajueiro modificada como polieletrólitos, visando uma aplicação anti-helmíntica frente ao *Haemonchus contortus*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Agropecuária e doenças parasitárias

Agropecuária é um termo utilizado para se referir à agricultura e a pecuária. Ela tem um importante papel no desenvolvimento econômico brasileiro, tornando-se um dos pilares de sustentação da economia do país. Os principais produtos da agropecuária brasileira são: leite de vaca, leite de cabra, ovos de galinha, grãos, frutas, verduras, dentre outros, para o setor de alimentos, e lã para o setor de matéria-prima. É uma grande fonte de produção de alimentos e matéria-prima, tem contribuição importante no Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro e ainda é responsável por gerar grande número de empregos no setor (SOUZA et al., 2012).

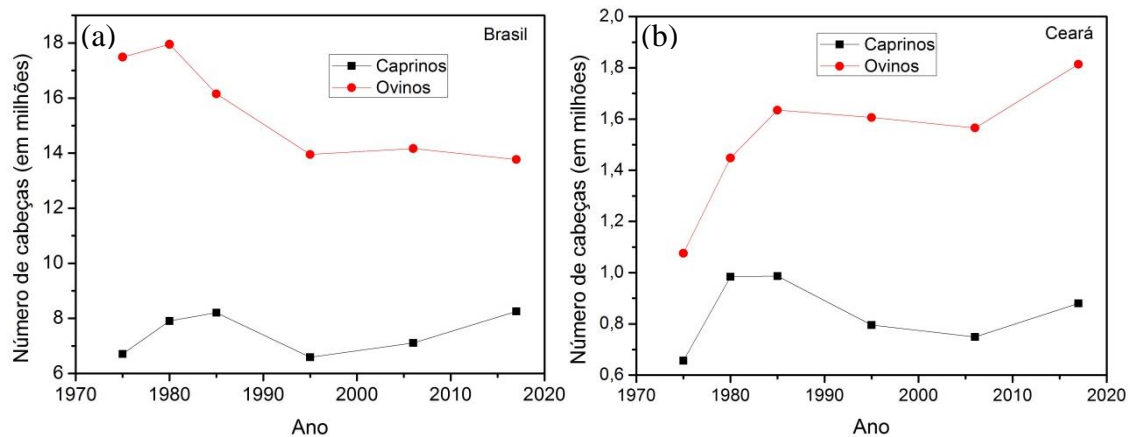
A pecuária, como um dos setores que compõe o mercado agropecuário, tem como principal destaque a criação de rebanhos, podendo ser bovinos, bubalinos, ovinos, caprinos, equinos ou suínos. Esses animais são utilizados tanto para suprir o mercado interno quanto para importações (carne, leite e outros).

Entretanto, a produção mundial de pequenos ruminantes sofre fortes impactos devidos a diversas enfermidades, que são causadas principalmente por parasitas gastrointestinais, que causam altas taxas de mortalidade (SALGADO & SANTOS, 2016). Dentre os parasitas gastrointestinais, destacam-se os *Teladorsagia circumcincta* (TURNBULL et al, 2019), *Trichostrongylus colubriformis* e *Trichostrongylus axei* (CINTRA et al, 2016), e o *Haemonchus contortus*.

Segundo Balic e colaboradores (2000), o *Haemonchus contortus* hospeda-se principalmente em caprinos e ovinos, dentro do ruminante, localiza-se no abomaso, desde o estágio L3. É um parasita hematófago que possui uma grande capacidade para posturas de ovos que é sustentada pela alimentação de sangue. Durante a infecção pode ocorrer grande perda de sangue, ocasionando anemia, falta de apetite, chegando até a eventual morte do animal (MILLER et al, 1998).

Um dos problemas da pecuária é que os rebanhos estão vulneráveis a diferentes parasitas. Caprinos e ovinos constituem grande parte do rebanho da pecuária brasileira, e segundo o censo agropecuário do IBGE (2017) os rebanhos de ovinos e caprinos vêm crescendo no Brasil e no Ceará, nos últimos anos, como mostra a Figura 1.

Figura 1 - Nº de cabeças de ovinos e caprinos no Brasil (a) e no Ceará (b) de 1975 a 2017.



Fonte: Censo Agropecuário IBGE, 2017.

Apesar de alguma diminuição no tamanho do rebanho entre 1980 e 2000, de lá até 2017 o setor cresceu considerável, tanto em âmbito nacional quanto estadual.

## 2.2 Medicamentos convencionais e alternativos

A resistência contra alguns produtos terapêuticos, como anti-helmínticos ou antibióticos, é a principal adversidade a ser enfrentada no desenvolvimento de novos tratamentos (LEIGNEL et al, 2010).

Os compostos tradicionais utilizados no tratamento de nematoides já apresentam baixa eficácia devido à resistência desenvolvida (SANGSTER, COWLING & WOODGATE, 2018). O monepantel foi o composto lançado mais recente ao mercado, para o controle de vermes resistentes a múltiplos medicamentos. Entretanto, após alguns anos, a resistência ao monopantel já foi verificada em cabras e ovelhas (NICIURA et al, 2019).

O desenvolvimento de resistência aos anti-helmínticos pode se dar devido ao uso inadequado dos anti-helmínticos frente às contaminações, como subdosagens, ou uso indevido. De maneira ideal, os medicamentos para os quais os nematoides desenvolveram certa resistência deveriam ser descartados. Entretanto, devido às limitadas opções de tratamento disponíveis no mercado, a não utilização desses medicamentos torna-se inviável (RUFFELL et al, 2018).

Como alternativa no tratamento de nematoides, os óleos essenciais vêm ganhando visibilidade. Estudos na literatura já apontam atividade anti-helmíntica promissora em alguns óleos essenciais, tais como: os de *Thymus vulgaris* (FERREIRA et al, 2016), *Zanthoxylum simulans* (QI et al, 2015), *Eucalyptus citriodora* (ARAÚJO-FILHO et al, 2018) e *Artemisia*

*campestris* (ABIDI et al, 2018). Os óleos essenciais podem ser utilizados contra os nematoides de duas formas, isolados ou em conjunto com outros óleos essenciais (KATIKI et al, 2017)

### 2.2.1 Óleos essenciais

Esses compostos podem ser obtidos a partir de várias partes da planta, como caule, raiz, flores, entre outros. Tradicionalmente, eles são uma mistura de diversos compostos aromáticos (CALO et al, 2015). Geralmente, são pouco solúveis em água, e muito utilizados na indústria de perfumes e aromas (BURT, 2004). Os óleos essenciais podem ser preparados por diferentes técnicas, como: extração por fluido supercrítico (YOUSEFI et al, 2019), hidrodestilação por micro-ondas (FIDALGO et al, 2016) e hidrodestilação comum (GRANATA et al, 2018).

Eles podem apresentar as mais diversas atividades biológicas, como as já registradas na literatura: larvicida (CARVALHO et al, 2003), bactericida (PASAVENTO et al, 2015), e até anti-helmíntica (MACEDO et al, 2015). Contudo, devido à alta volatilidade e degradação dos óleos essenciais, o nanoencapsulamento tornou-se uma maneira viável de contornar essas adversidades.

Os compostos terpenóides são abundantes nos óleos essenciais, e são normalmente utilizados para tratar doenças, tanto em animais, quanto em humanos. Eles possuem também grande relevância no tratamento de helmintos em ruminantes, sendo utilizados tanto em formulação simples quanto associado com medicamentos anti-helmínticos tradicionais (LANUSSE et al, 2018).

O timol (2-isopropil-5-metilfenol) é um dos constituintes majoritários dos óleos essenciais das plantas dos gêneros *Lippia* e *Thymis* (GOMES et al, 2011; ELANDALOUSI et al, 2013). Ele apresenta atividade anti-helmíntica *in vitro* sobre o *H. contortus* (CAMURÇA-VASCONCELOS et al, 2007; ELANDALOUSI et al, 2013; FERREIRA et al, 2016).

O timol pode ser obtido a partir de diversos óleos essenciais como componente principal, sendo encontrado nos óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare*) (KULISIC et al, 2004), de tomilho (*Thymus vulgaris*) (BOZIN et al, 2006) e também de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*) (VERAS et al, 2012). A Tabela 1 mostra a composição de óleos essenciais quanto à presença de timol.

Tabela 1 - Quantificação de timol em alguns óleos essenciais.

Óleo essencial	% de timol	Referência
<i>Lippia sidoides</i>	84,9	Veras et al, 2012
<i>Origanum vulgare</i>	35,0	Kulisic et al, 2004
<i>Thymus vulgaris</i>	47,9	Bozin et al, 2006

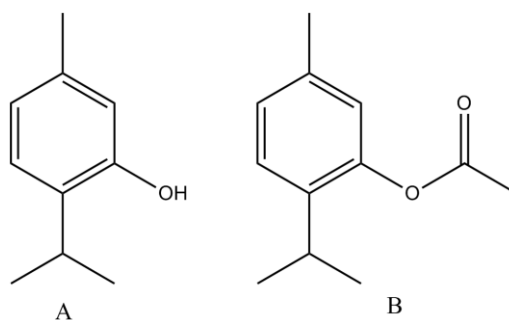
Na literatura há diversos relatos de atividades microbiológicas do timol, como: atividade antibacteriana (XU et al, 2008, WATTANASATCHA et al, 2012), anti-helmíntica (ANDRÉ et al, 2017; CHOI et al, 2007), antifúngica (ROMERO et al, 2009). Alguns exemplos são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 - Atividade biológica do timol.

Atividade Biológica	Efetivo contra	Referência
Antibacteriana	<i>Escherichia coli</i>	Xu et al (2008) Wattanasatcha et al (2012)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	
Antifúngica	<i>Myrothecium verrucaria</i>	Romero et al (2009)
	<i>Corynespora cassiicola</i>	
	<i>Erwinia psidii</i>	
	<i>Sclerotinia minor</i>	
	<i>Colletotrichum musae</i>	
Nematicida	<i>Fusarium moniliforme</i>	Choi et al (2007) André et al (2017)
	<i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	
	<i>Haemonchus contortus</i>	

Entretanto, devido à volatilidade do timol e a fácil oxidação no meio ambiente, o campo de aplicação se reduz. Ele é um composto fenólico que possui alta toxicidade (ANDRÉ et al, 2017). A substituição do radical hidroxila por um radical acetil torna-se uma alternativa para minimizar essa toxicidade e potencializar os efeitos biológicos do composto (ANDRÉ et al, 2016). O acetato de timila já mostrou possuir atividades ovicida, larvicida e adulticida frente ao *Haemonchus contortus*. (ANDRÉ et al, 2017). As estruturas químicas do timol e acetato de timila são apresentadas na Figura 2.

Figura 2 - Estrutura química do (A) timol e (B) acetato de timila.



Fonte: Próprio autor.

### 2.3 Nanotecnologia para encapsulamento

A nanotecnologia é utilizada como um meio de superar a barreira das ciências biológicas, aplicando nanoestruturas nos campos mais diversos da ciência, em especial na utilização em sistemas de liberação controlada para a aplicação de medicamentos (PATRA et al, 2018). Algumas adversidades na administração de medicamentos são: baixa biodisponibilidade, baixa solubilidade, baixa absorção e entrega específica do medicamento. Segundo Martinho e colaboradores (2011), o desenvolvimento de novos sistemas para administração de medicamentos pode ser uma opção para resolver esses obstáculos.

Nas últimas décadas foram desenvolvidos muitos estudos visando à elaboração de novos sistemas de liberação de fármacos, seja via oral ou intravenosa. A liberação controlada se torna uma alternativa em consequência da alta instabilidade dos fármacos, quando expostos a fatores como calor, luz ou oxigênio, quando utilizados pela terapia tradicional.

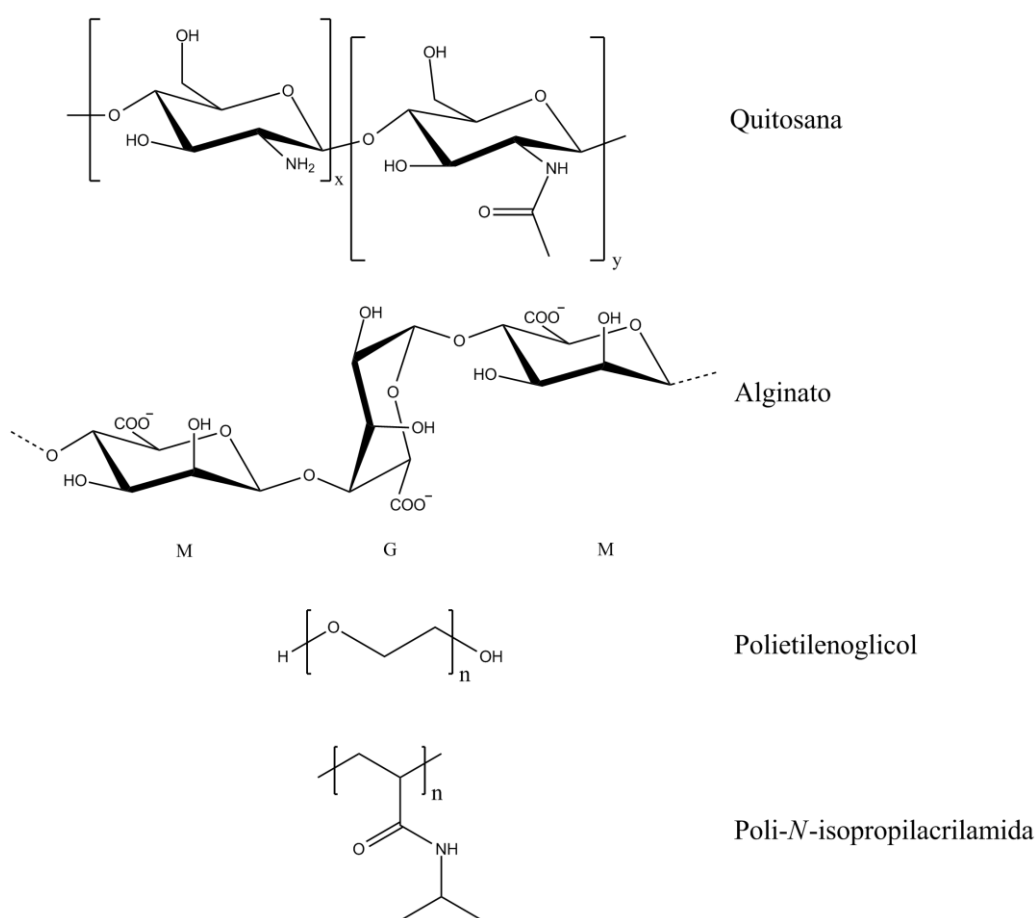
Visando contornar estes problemas, foram desenvolvidos diversos sistemas à base de polissacarídeos, seja através da modificação de polissacarídeos ou a partir da combinação de polissacarídeos, como hidrogel pH-responsivo (QIAN et al, 2019), nanopartículas (HASEEB et al, 2019) e filmes (VOSS et al, 2018). Os novos sistemas polissacarídicos têm como vantagem a proteção ao fármaco ou princípio ativo encapsulado, a biocompatibilidade, e uma liberação controlada do fármaco, mantendo-o dentro da faixa de atividade biológica. Assim, sistemas carreadores de fármacos à base de polissacarídeos têm alcançado resultados promissores na área de liberação controlada, mostrando-se uma área com grande potencial a ser explorado.

Dentre os novos sistemas de nanoencapsulamento para carregamento de fármacos, destaca-se a produção de nanopartículas, que possuem pelo menos uma dimensão menor ou igual a 100 nm (LAURENT et al, 2008). As nanopartículas podem ser classificadas quanto as

suas características físicas e químicas: metálicas, cerâmicas, semicondutoras, poliméricas e lipídicas (KHAN et al, 2019). Para a aplicação na liberação controlada de fármacos, as nanopartículas poliméricas são destaque.

As nanopartículas poliméricas podem ser formadas a partir de polímeros naturais como quitosana ou alginato (SILVA et al, 2011), ou sintéticos como polietilenoglicol (KERR et al, 2017) e poli-*N*-isopropilacrilamida (ADBIFAR et al, 2018). As estruturas de alguns polissacarídeos são apresentadas na Figura 3.

Figura 3 – Estrutura química de alguns polímeros naturais e sintéticos.

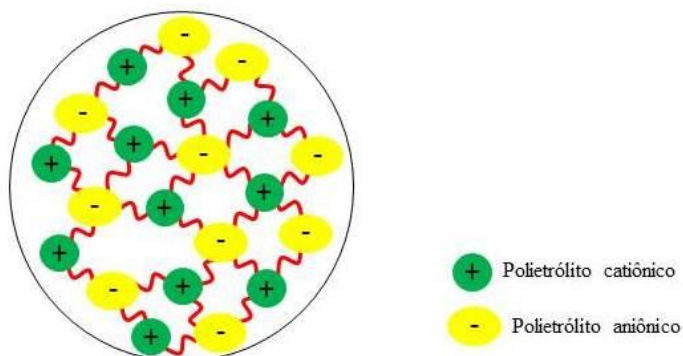


Fonte: Próprio autor.

As NPs poliméricas podem ser formadas de diferentes maneiras, como: auto-organização (FILIPPOV et al, 2016; DING et al, 2016), geleificação ionotrópica (SEVERINO et al, 2016; KIILL et al, 2017) ou complexação polieletrólítica (YE et al, 2017; WANG et al, 2018). Entretanto, o processo de complexação polieletrólítica possui certa vantagem, por não necessitar de uma reticulação iônica como a geleificação ionotrópica ou de funcionalização do material de partida como o método de auto-organização. A complexação polieletrólítica consiste

na mistura de soluções de polieletrólitos de cargas elétricas opostas, formando a estrutura da nanopartícula (YE et al, 2018). A Figura 4 ilustra a interação entre dois polieletrólitos.

Figura 4 – Representação da interação entre eletrólitos de cargas opostas.



Fonte: Próprio autor.

Os polieletrólitos são macromoléculas que possuem unidades monoméricas repetidas ao longo da cadeia e ionizam-se quando solubilizados em qualquer solvente ionizante (MEKA et al., 2017). Algumas propriedades dos polieletrólitos, como: conformação de cadeia, viscosidade, solubilidade, forças iônicas, dentre outras, podem sofrer alteração com a adição de outros grupos iônicos na cadeia (DAKHARA; ANAJWALA, 2010).

Segundo Meka et al. (2017), os polieletrólitos têm tendência de formar complexos com um ou mais íons de cargas opostas, podendo ser complexos do tipo: PE-PE, PE-Fármaco, PE-Ácido nucléico ou PE-Surfactante. A interação entre os polieletrólitos pode ocorrer por interações eletrostáticas, ligação de hidrogênio, forças de van der Waals ou interações dipolo.

A complexação de polieletrólitos vem sendo pesquisada há muitos anos, devido a sua relevância em muitas funções biológicas, dentre elas o armazenamento e a liberação de medicamentos. Os complexos polieletrólíticos (CPE) são estruturas tridimensionais formadas pela associação de polieletrólitos carregados de maneira oposta em solução (DAS & TSIANOU, 2017).

Diferentes combinações de polieletrólitos têm sido estudadas na formação de complexos polieletrólíticos, tais como: quitosana-sulfato de dermatano para diagnósticos e terapia de doenças vasculares (RASENTE et al., 2016), quitosana-sulfato de condroitina para aplicação na engenharia de tecidos (RODRIGUES et al., 2016), quitosana-carboximetilcelulose na liberação controlada de vancomicina (CERCHIARA et al., 2016), polialilamina-poliestireno sulfonato como base em biosensores eletroquímicos (IVANOV et al., 2019) e nanopartículas de



gelatina catiônica-alginato de sódio para a liberação controlada de curcumina (SARIKA & JAMES, 2016).

Vinogradov e colaboradores (2002) indicaram a faixa ideal de tamanho entre 70 e 200 nm para as nanopartículas serem utilizadas no carreamento de fármacos, pois partículas nessa faixa possuem um tempo maior de circulação no corpo. Partículas menores são removidas pelos rins ou penetram nos capilares. Partículas maiores habitualmente são removidas por fagocitose.

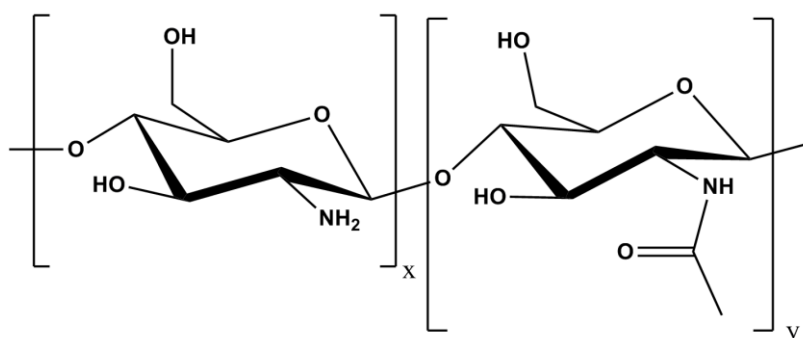
A força e estabilidade de um complexo polieletrólítico são dependentes da estrutura do polímero, distribuição das cargas em sua cadeia, natureza dos grupamentos carregados, temperatura e pH do meio reacional (AHUJA & BHATT, 2018).

## 2.4 Matrizes poliméricas para sistemas de liberação controlada

### 2.4.1 Quitosana

A quitosana tem duas propriedades importantes: a natureza catiônica e a alta densidade de cargas positivas em soluções ácidas. Assim, ela consegue formar complexos iônicos insolúveis com espécies polianiônicas solúveis em água, em condições neutras ou alcalinas. Desse modo, a quitosana pode reagir, por exemplo, com alginato, carboximetilcelulose, xantana, goma arábica e sulfato de condroitina, para formar complexos polieletrólíticos (RINAUDO, 2006; VASILIU, POPA & RINAUDO, 2005). A estrutura química da quitosana está representada na Figura 5.

Figura 5 - Estrutura molecular da quitosana.



Fonte: Próprio autor.

Os grupos amino da quitosana carregados positivamente quando em meio ácido podem interagir com os grupos aniônicos presentes nos polissacarídeos (goma do cajueiro, goma arábica, entre outras). A quitosana pode formar hidrogéis iônicos pelos processos de geleificação ionotrópica e por coacervação complexa. A presença de grupos amino na sua cadeia polimérica implica na presença de cargas positivas em valores de pH baixo, o que favorece a reação com outro polímero de carga oposta em solução aquosa. Estes hidrogéis podem oferecer propriedades similares aos produzidos com ligações covalentes, com a vantagem de não adicionar agentes de reticulação. Géis ionotrópicos são formados quando o ânion atua como reticulador iônico das cadeias de quitosana, e coacervatos complexos são obtidos pela complexação da quitosana com um poliânion (ABREU, 2008).

A quitosana possui atividades microbiológicas relatadas na literatura, como: atividade antifúngica (ZHANG et al., 2017), atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* (COSTA et al., 2017).

#### **2.4.2 Goma do cajueiro**

Os polissacarídeos podem ser obtidos a partir de algas (alginato, carragenanas), exsudatos de plantas (goma arábica, goma do cajueiro, goma caraia), sementes (goma guar), frutas (pectinas), tubérculos e cereais (amido), animais (quitina, quitosana, ácido hialurônico), fungos (glucanas), ou bactérias (xantana, dextrana) (CUNHA; DE PAULA; FEITOSA, 2009).

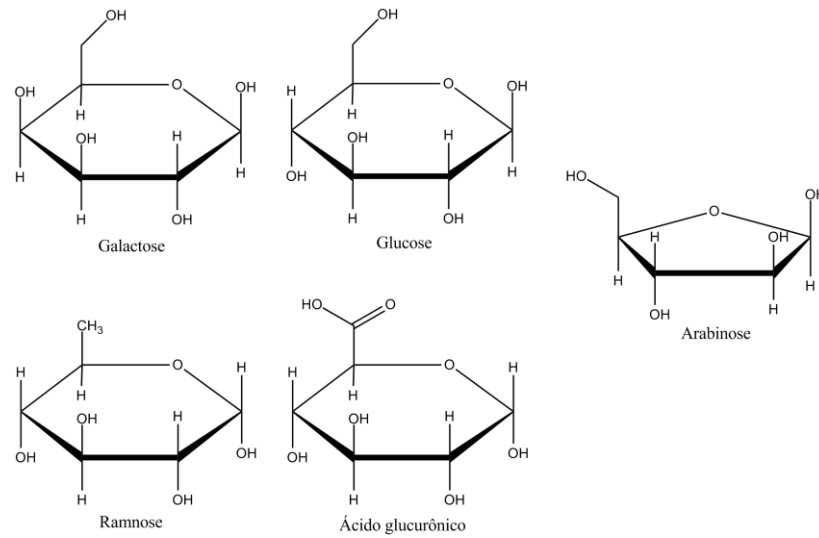
Os polissacarídeos de exsudatos são produzidos a partir de um mecanismo de defesa das plantas contra estresse por injúrias físicas ou ataque microbiano. São heteropolissacarídeos complexos, ramificados e polidispersos. Ácido glucurônico e galacturônico estão geralmente presentes (CUNHA; DE PAULA; FEITOSA, 2009).

A goma do cajueiro é um heteropolissacarídeo complexo extraído a partir do exsudato de *Anacardium occidentale*, árvore originária da região Nordeste do Brasil, conhecida popularmente como cajueiro. O exsudado é produzido naturalmente pelas células epiteliais da casca da planta em resposta a estímulos mecânicos ou ataques por patógenos (RIBEIRO et al., 2016).

A composição química das gomas varia com a espécie vegetal, o local geográfico, tipo de solo, condições do cultivo, dentre outros fatores. A goma do cajueiro isolada no Nordeste brasileiro é constituída principalmente por galactose (72-73%), glucose (11-14%), arabinose (4,6-5,0%), ramnose (3,2-4,0%), e ácido glucurônico (4,7-6,3%). A sua estrutura química é formada por uma cadeia principal de galactose (1→3), com ramificação de galactose

(1→6), tendo como grupos terminais a ramnose, ácido glucurônico e arabinose (PAULA et al, 1995 & 1998). Os principais constituintes são apresentados na Figura 6.

Figura 6 - Principais constituintes da goma do cajueiro.



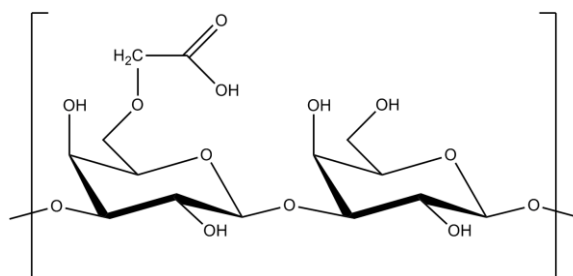
Fonte: Próprio autor.

Uma representação estrutural do polissacarídeo obtido do exsudato do cajueiro é representada na Figura 7.



A goma do cajueiro carboximetilada pode ser utilizada para a síntese de nanopartículas por técnica de complexação polieletrólítica (SILVA et al., 2010). A estrutura da unidade glicosídica carboximetilada é ilustrada na Figura 8.

Figura 8 - Unidade glicosídica carboximetilada.



Fonte: Próprio autor.

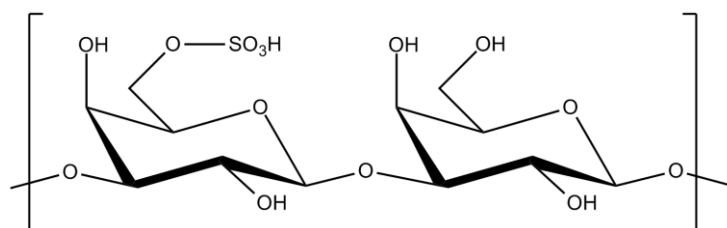
#### 2.6.2.2 Sulfatação da goma do cajueiro

A sulfatação consiste na introdução de um grupo  $-SO_3H$  (MOURA NETO et al., 2011) e visa, dentre outras finalidades, aumentar a carga do polieletrólito. Autores relatam que a sulfatação pode maximizar as atividades biológicas de alguns polissacarídeos, como atividade anticâncer (WEI et al, 2012), antioxidante (WANG et al, 2010), anticoagulante (LIANG et al, 2018), antiviral (LIU et al, 2013) e imunorreguladora (CHEN et al, 2015).

Existem três métodos bem estabelecidos na literatura para a reação de sulfatação de polissacarídeos, são eles: o método ácido clorosulfônico-piridina (QIAN et al, 2014), o método do ácido sulfúrico concentrado (JIANG et al, 2014) e o método trióxido de enxofre-piridina (SUN et al, 2015).

A sulfatação da goma do cajueiro é uma modificação favorável para a produção de nanopartículas por complexação polieletrólítica (MOURA NETO et al., 2011). A estrutura química da unidade glicosídica sulfatada é representada na Figura 9.

Figura 9 - Unidade glicosídica sulfatada.



Fonte: Próprio autor.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Produzir derivados funcionais da goma do cajueiro e encapsular o acetato de timila em nanopartículas à base de quitosana e derivado de goma do cajueiro, visando aplicação sobre nematoides gastrointestinais de ovinos.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Sintetizar e caracterizar o derivado acetilado do timol;
- Produzir derivados carboximetilados e sulfatados a partir da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale*);
- Caracterizar os derivados da goma do cajueiro;
- Preparar nanopartículas poliméricas pela técnica de complexação polieletrólítica, utilizando as matrizes polissacarídicas: quitosana, goma do cajueiro carboximetilada e goma do cajueiro sulfatada;
- Caracterizar os sistemas por tamanho de partícula, potencial zeta, IPD, FTIR;
- Encapsular o acetato de timila utilizando o melhor sistema;
- Caracterizar as nanopartículas em relação ao tamanho de partícula e potencial zeta; e
- Avaliar a eficiência de encapsulamento, rendimento e liberação do acetato de timila.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

O exsudato do cajueiro (*Anacardium occidentale*) foi fornecido pela EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). Álcool etílico P.A. e acetona P.A. foram adquiridos da Synth, dimetilsulfóxido e ácido monocloroacético foram obtidos da Vetec, complexo de trióxido de enxofre/piridina e timol foram adquiridos da Sigma-Aldrich. A quitosana foi adquirida da Polymar.

### 4.2 Acetilação do timol

A acetilação do timol foi executada seguindo a metodologia proposta por André e colaboradores (2017). O timol (1 g) foi acetilado pela adição de anidrido acético (15 mL) e acetato de sódio (1,5 g). A mistura foi submetida a refluxo durante 1 h, e posteriormente foram adicionados 20 mL de água destilada. A solução foi neutralizada para pH 7,0 com bicarbonato de sódio a 5% (m/v). A mistura da reação foi transferida para um funil de separação e lavada três vezes com clorofórmio (100 mL). A fase de clorofórmio contendo o material acetilado foi lavada com água destilada e depois seca com sulfato de sódio. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida. A confirmação química da obtenção do acetato de timila foi realizada por espectroscopia de infravermelho (FTIR) e RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ .

### 4.3 Isolamento do polissacarídeo do exsudato de *Anacardium occidentale*

O método para isolamento da goma do cajueiro foi adaptado do método desenvolvido por Rodrigues, de Paula e Costa (1993). Pesou-se 10 gramas do exsudato bruto em um béquer de 250 mL e solubilizou-se em 100 mL de água destilada. Após solubilização do polissacarídeo, a solução foi filtrada em um funil de placa sinterizada número 1 para a remoção dos resíduos maiores. A solução filtrada foi neutralizada adicionando-se NaOH  $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ . Adicionou-se 1 g de NaCl à solução filtrada para ajustar a força iônica. Após completa solubilização do NaCl, o polissacarídeo foi precipitado em 400 mL de álcool etílico. O precipitado foi filtrado em funil de placa sinterizada número 3. Ao final da filtração, lavou-se o precipitado com álcool etílico e acetona. Após ser lavado, o precipitado foi seco com ar quente.

#### 4.4 Carboximetilação da goma do cajueiro

A reação de carboximetilação da goma do cajueiro foi realizada seguindo a metodologia proposta por Silva e colaboradores (2004). As condições de reação estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3 – Condições de reação para a carboximetilação da GC

Amostra	Volume NaOH 10 mol.L <sup>-1</sup> (mL)	Ácido cloroacético (g)	Razão molar (GC/NaOH/ACA)
GCM1	5,5	2,62	1:2:1
GCM2	8,3	2,62	1:3:1
GCM3	11,0	5,25	1:4:2

A massa de goma do cajueiro foi mantida em 1 g e a temperatura a 55 °C.

Pesou-se 5 g (0,0309 mol) de goma do cajueiro e misturou-se com 5 mL de água destilada até se formar uma pasta homogênea. Adicionou-se a solução de NaOH 10 mol.L<sup>-1</sup>, e o sistema permaneceu sob agitação por 10 min. Em seguida, foi adicionado vagarosamente o ácido cloroacético e a mistura permaneceu sob agitação por 3 h a 55 °C. Ao final da reação, o sistema foi neutralizado utilizando HCl 1,0 mol.L<sup>-1</sup>. A solução foi dialisada contra água destilada por 5 dias utilizando uma membrana de diálise de largura de 76 mm e diâmetro de 49 mm com massa molar de corte de 14.000 g.mol<sup>-1</sup> até eliminar todos os reagentes em excesso ou sais adicionados. O produto carboximetilado foi recuperado através de liofilização utilizando um liofilizador Freezone 4.5 Labconco.

#### 4.5 Sulfatação da goma do cajueiro

A sulfatação da goma do cajueiro foi adaptada da metodologia utilizada por Sun et al. (2015). Em um erlenmeyer de 250 mL adicionou-se 100 mL de dimetilsulfóxido (seco em peneira molecular) mantendo a temperatura a 60 °C. Pesou-se 1 g da goma do cajueiro isolada e adicionou-se vagarosamente ao sistema. O sistema reacional permaneceu sob agitação por 30 min. Em seguida, pesou-se uma quantidade do complexo de trióxido de enxofre/piridina (SO<sub>3</sub>/piridina) e adicionou-se vagarosamente ao sistema reacional. O sistema permaneceu sob agitação, a 60 °C, por 3 h.

O sistema reacional foi então retirado da agitação e do aquecimento. Já em temperatura ambiente, o sistema foi neutralizado utilizando uma solução saturada de



$\text{NaHCO}_{3(\text{aq})}$ . O sistema neutralizado foi posto para diálise contra água destilada utilizando uma membrana de diálise de largura de 76 mm e diâmetro de 49 mm com massa molar de corte de  $14.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . O produto foi seco por liofilização utilizando um liofilizador Freezone 4.5 Labconco.

Para a síntese dos derivados sulfatados utilizou-se 3 proporções diferentes entre massa da goma do cajueiro e do complexo de  $\text{SO}_3/\text{piridina}$ , buscando a condição para a obtenção do maior grau de substituição (GS). As condições são mostradas na Tabela 4.

Tabela 4 - Condições de reação para a sulfatação da GC.

Amostra	Massa de $\text{SO}_3/\text{piridina}$ (g)	Razão molar $\text{SO}_3/\text{piridina:GC}$
GCS3	3	3:1
GCS4	4	4:1
GCS5	5	5:1

A massa de goma do cajueiro foi mantida em 1 g.

#### 4.6 Purificação da quitosana

A purificação da quitosana foi adaptada da metodologia proposta por Signini e Campana Filho (1998). Preparou-se 1 L de solução de quitosana 1% (m/v) em ácido acético 2% (v/v). Após a solubilização, a solução foi filtrada em funil de placa sinterizada número 1. A solução filtrada foi centrifugada por 15 min a 6000 RPM, o precipitado descartado e a solução novamente filtrada em funil de placa sinterizada número 3. Utilizou-se uma solução de NaOH  $1,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  para precipitar a quitosana (pH 10). Ao fim da precipitação, a solução foi novamente centrifugada por 15 min a 6000 RPM, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado exaustivamente com água destilada e posteriormente seco com metanol e jato de ar quente.

#### 4.7 Determinação do grau de desacetilação da quitosana

A quitosana foi solubilizada em  $\text{D}_2\text{O}$  em uma concentração de  $20 \text{ mg/mL}$ . Adicionou-se DCl para promover a solubilização da quitosana ( $\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$  30:1 v/v). O grau de desacetilação da quitosana foi determinado por ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  utilizando as equações 1 e 2:

$$\%GA = \frac{A_{CH_3}}{3A_{H_2}} \cdot 100 \quad (1)$$

$$\%GD = 100 - \%GA \quad (2)$$

Em que:  $A_{CH_3}$ : integração do sinal atribuído ao  $CH_3$

$A_{H_2}$ : integração do sinal atribuído ao  $H_2$

#### 4.8 Determinação do grau de substituição dos derivados da goma do cajueiro

O grau de substituição do derivado carboximetilado foi determinado por meio de titulação potenciométrica, adaptando a metodologia utilizada por Silva e colaboradores (2004). Preparou-se 25 mL de uma solução 0,3% (m/v) de GCM em água deionizada. A solução passou por uma coluna de troca iônica Amberlite IR-120H<sup>+</sup>, e a solução eluída da coluna foi titulada com NaOH 0,096 mol.L<sup>-1</sup> padronizado. O GS<sub>abs</sub> foi determinado pela razão molar de grupos de ácidos carboximetílicos para unidades monossacarídicas, utilizando a equação 3.

$$GS = \frac{\text{mol de } -CH_2COOH}{\text{mol de unidade monossacarídica}} \quad (3)$$

Em que: unidade monossacarídica: galactose (162 g.mol<sup>-1</sup>)

O grau de substituição dos derivados sulfatados foi determinado através de análise elementar, como descrito por Moura Neto e colaboradores (2011), utilizando a equação 4.

$$GS = \frac{\left( \frac{S\%}{\text{massa atômica do S}} \right)}{\left( \frac{C\%}{\text{massa atômica do C}} \right) 6} \quad (4)$$

#### 4.9 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A GC e os seus derivados foram caracterizados por FTIR a fim de confirmar a presença das bandas características do polissacarídeo modificado. Os CPE foram caracterizados a fim de confirmar a presença de bandas que comprovassem a presença dos componentes (quitosana e derivado da goma de cajueiro). As amostras foram analisadas em pastilhas de brometo de potássio (KBr) no espectrofotômetro Shimadzu® modelo IR Trace 100 na região entre 4000 e 400 cm<sup>-1</sup>.

#### 4.10 Análise Elementar

A GC e seus derivados foram analisados quanto ao teor de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre. As amostras foram analisadas utilizando um Analisador Elementar - Perkin Elmer 2400 series ii no modo CHNS.

#### 4.11 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos a partir da solução dos polissacarídeos em D<sub>2</sub>O, utilizando um espectrômetro Bruker modelo avance DRX-500.

#### 4.12 Cromatografia de permeação em gel (GPC)

A massa molar dos materiais foi estimada por cromatografia de permeação em gel utilizando um cromatógrafo Shimadzu LC-20AD com detector de índice de refração RID-10A. As análises foram realizadas com coluna PolySep Linear (7,8 mm × 300 mm), fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>, tendo solução aquosa de NaNO<sub>3</sub> 0,1 mol.L<sup>-1</sup> como eluente. O volume injetado de amostra foi de 50 µL. Para a construção da curva de calibração foram utilizados padrões de pululana Shodex P-82 (massas molares de 5,90 x 10<sup>3</sup> a 7,88 x 10<sup>5</sup> g.mol<sup>-1</sup>).

A curva utilizada para estimativa da massa molar está representada na equação 5:

$$\log MM = -1,139.V_{EL} + 14,41 \quad (R^2=0,991) \quad (5)$$

Em que: MM = massa molar; V<sub>EL</sub> = Volume de eluição.

#### 4.13 Preparo das nanopartículas por complexação polieletrólítica

O método de preparo das nanopartículas por complexação polieletrólítica foi adaptado de Silva (2010).

##### 4.13.1 Nanopartículas com quitosana e goma do cajueiro carboximetilada

Soluções 1,08% (m/v) de GCM em água destilada foram adicionadas a soluções de quitosana com concentração variando de 0,3 a 0,5% (m/v) em ácido acético 1% (v/v), na razão de 1:1 em volume, sob agitação. A adição da solução de GCM à solução de quitosana foi realizada com o auxílio de uma bomba dosadora peristáltica Milan<sup>®</sup>, com um fluxo de 1

mL.min<sup>-1</sup>. Após a formação do PEC, o pH da solução foi ajustado para 5,0 utilizando NaOH 1,0 mol.L<sup>-1</sup> para precipitar as nanopartículas. O sistema foi deixado em repouso por pelo menos 12 h, e depois centrifugado a 6000 RPM por 35 min. As nanopartículas separadas por centrifugação foram lavadas exaustivamente com água destilada e secas por liofilização.

#### ***4.13.2 Nanopartículas com quitosana e goma do cajueiro sulfatada***

Soluções 1,12% (m/v) de GCS em água destilada foram adicionadas a soluções de quitosana com concentração variando de 0,16 a 0,28% (m/v) em ácido acético 1% (v/v), na razão de 1:1 em volume, sob agitação. A adição da solução de GCS à solução de quitosana foi realizada com o auxílio de uma bomba dosadora peristáltica Milan<sup>®</sup>, com um fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>. Após a formação do PEC, o pH da solução foi ajustado para 5,0 utilizando NaOH 1,0 mol.L<sup>-1</sup> para precipitar as nanopartículas. O sistema foi deixado em repouso por pelo menos 12 h, e depois centrifugado a 6000 RPM por 35 minutos. As nanopartículas separadas por centrifugação foram lavadas exaustivamente com água destilada e secas por liofilização.

#### **4.14 Ensaio de encapsulamento do acetato de timila**

Adicionou-se 750 µL de Tween 80 e 100 µL de acetato de timila à solução de quitosana em ácido acético 1% (v/v), e agitou-se vigorosamente. O conjunto foi levado ao banho ultrassônico Quimis<sup>®</sup> por 15 minutos. A mistura foi agitada para a adição da solução de GC modificada, através de uma bomba dosadora peristáltica Milan<sup>®</sup>, com um fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>. Após a formação do CPE, o pH da solução foi ajustado para 5,0 utilizando NaOH<sub>(aq)</sub> 1,0 mol.L<sup>-1</sup>. A mistura foi deixada em repouso por 12 h, e depois centrifugada a 6000 RPM por 35 min. As nanopartículas separadas por centrifugação foram lavadas exaustivamente com água destilada e secas por liofilização, enquanto o sobrenadante foi reservado para determinação da concentração residual do acetato de timila.

##### ***4.14.1 Eficiência de encapsulamento***

A eficiência de encapsulamento do acetato de timila foi determinada através de espectroscopia de absorção na região do UV-visível. O comprimento de onda de absorbância máxima do acetato de timila é 273 nm. Foi construída uma curva de calibração do composto em álcool, resultando na equação 6.

$$y = 0,0024x - 0,0112 \quad (R^2=0,999) \quad (6)$$

Onde: y: absorvância e x: concentração do acetato de timila em ppm.

O sobrenadante foi analisado por UV-Vis para a determinação da quantidade de acetato de timila ainda livre e, indiretamente, para o cálculo do teor encapsulado.

#### 4.14.2 Ensaio de liberação *in vitro*

Pesou-se 20 mg de nanopartículas e dispersou-se em 3 mL de tampão fosfato (pH 7,4) e lauril 0,5% (m/v) e foram adicionados em uma membrana de diálise (massa molar de corte 14.000 g.mol<sup>-1</sup>). A membrana foi imersa em 30 mL de solução tampão. O sistema foi mantido fechado e à 37 °C, utilizando uma incubadora (Cientec CT-712R). Alíquotas de 3 mL foram retiradas do sistema em intervalos de tempo previamente determinados. As alíquotas foram analisadas em um espectrofotômetro UV-1800 (Shimadzu) no comprimento de onda de 273 nm. Ao fim da análise, a alíquota era devolvida ao sistema.

#### 4.14.3 Cinética de liberação *in vitro* e modelos matemáticos

Buscando investigar o mecanismo de liberação do acetato de timila das nanopartículas, analisaram-se os dados da liberação *in vitro* nos modelos cinéticos matemáticos a seguir: ordem zero, primeira ordem, Higuchi, Hixson-Crowell e Korsmeyer-Peppas.

Os modelos são exemplificados a seguir:

O modelo de cinética de ordem zero descreve a liberação com uma taxa que independe da concentração inicial.

$$Q_t = Q_0 + K_0 t \quad (7)$$

Em que: Q<sub>0</sub>: Quantidade de AT inicial; Q<sub>t</sub>: quantidade de AT no tempo t; K<sub>0</sub>: constante de ordem zero; t: tempo.

A cinética de primeira ordem define que a taxa de liberação é dependente da concentração inicial.

$$\log Q_t = \log Q_0 + K_1 t \quad (8)$$

Em que: K<sub>1</sub>: constante de primeira ordem.

O modelo de Higuchi é descrito para liberação de compostos a partir de matrizes insolúveis, onde a liberação é dependente da raiz quadrada do tempo, processo baseado na difusão Fickiana (HIGUCHI, 1963).

$$Q_t = Q_0 + K_H\sqrt{t} \quad (9)$$

Em que:  $K_H$ : constante de Higuchi.

O modelo de Hixson-Crowell estabelece que a liberação ocorre através de um sistema de dissolução, onde há uma alteração na área superficial e no diâmetro das partículas, por intumescimento (HIXSON & CROWELL, 1931).

$$\sqrt[3]{Q_t} - \sqrt[3]{Q_0} = K_{HC}t \quad (10)$$

Em que:  $K_{HC}$ : constante de Hixson-Crowell.

O modelo de Korsmeyer-Peppas descreve a liberação de sistemas poliméricos (KORSMEYER et al, 1983).

$$Q_t = K_{KP}t^n \quad (11)$$

Em que:  $K_{KP}$ : constante de Korsmeyer-Peppas e  $n$ : expoente de liberação que descreve o mecanismo de liberação.

Os diferentes mecanismos expressos pelo valor de  $n$  são exemplificados na Tabela 5.

Tabela 5 – Valores de expoentes e mecanismos de liberações correspondentes para o modelo de Korsmeyer-Peppas.

Expoente de liberação (n)	Mecanismo de liberação
$\leq 0,5$	Difusão Fickiana
$0,5 < n < 1,0$	Transporte anômalo
1	Transporte caso-II
$> 1,0$	Transporte super caso-II

#### **4.15 Espalhamento dinâmico de luz**

O diâmetro médio das nanopartículas, o índice de polidispersão (IPD) e o potencial zeta foram determinados por espalhamento dinâmico de luz, utilizando o equipamento Nano Zetasizer da Malvern® modelo ZS 3600, com leitor a laser de 633 nm, operado com um ângulo de 173°. Preparou-se uma dispersão dos complexos polieletrólíticos sólidos com uma concentração de 1 mg.mL<sup>-1</sup>, as amostras foram centrifugadas a 6000 rpm por 15 minutos antes da análise. Cada medida foi realizada em triplicata.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

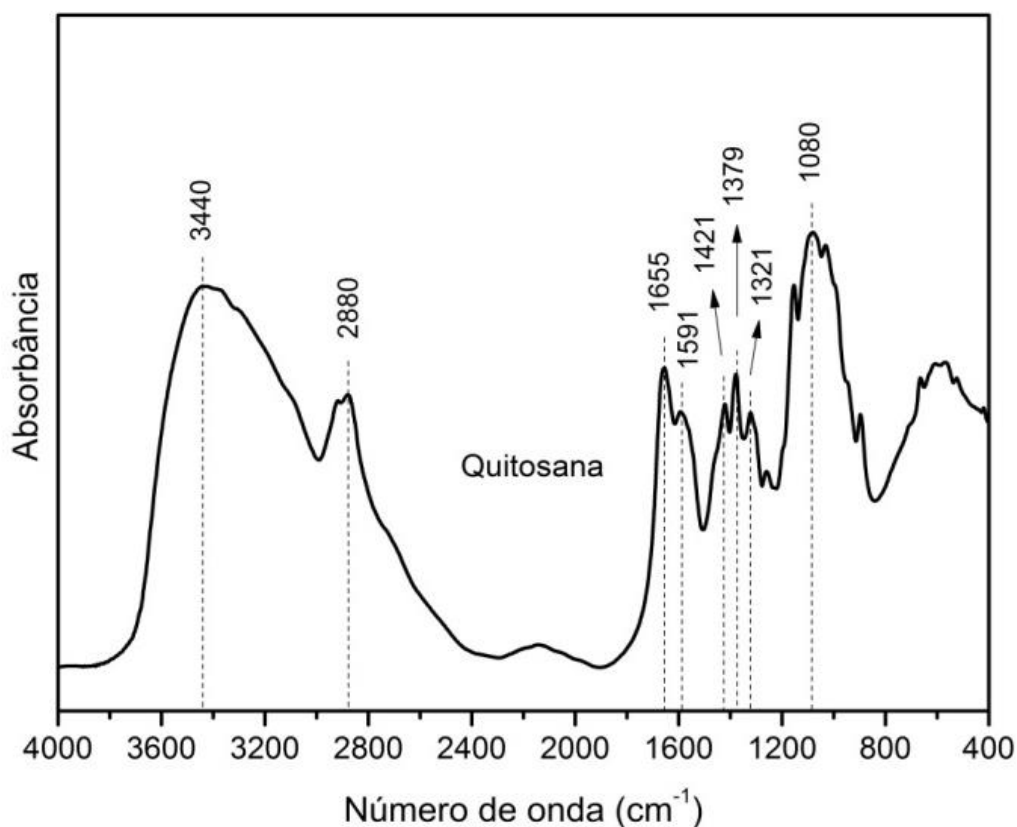
### 5.1 Caracterização da Quitosana

A QT foi caracterizada por FTIR e RMN  $^1\text{H}$ , e os resultados são expostos a seguir.

#### 5.1.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

O espectro de infravermelho da QT encontra-se na Figura 10. Ele mostra absorção em  $1080\text{ cm}^{-1}$ , atribuída à estrutura sacarídica, e outra em  $1591\text{ cm}^{-1}$ , relativa ao grupo amino (Qu, Wirsén e Albertsson, 2000). As absorções em  $1655$  e  $1321\text{ cm}^{-1}$  são referentes às amidas I e III, respectivamente. A banda em  $1379\text{ cm}^{-1}$  corresponde à deformação angular simétrica de  $\text{CH}_3$ . A absorção em  $1421\text{ cm}^{-1}$  é atribuída à deformação axial C-N. A banda larga em  $3440\text{ cm}^{-1}$  é referente ao estiramento O-H e N-H, e a banda presente em  $2880\text{ cm}^{-1}$  é atribuída aos estiramentos simétricos, e assimétricos, das ligações C-H dos anéis piranosídicos (PAWLAK & MUCHA, 2003). A quitosana apresentou os sinais característicos no espectro de FTIR.

Figura 10 – Espectro de FTIR da QT.

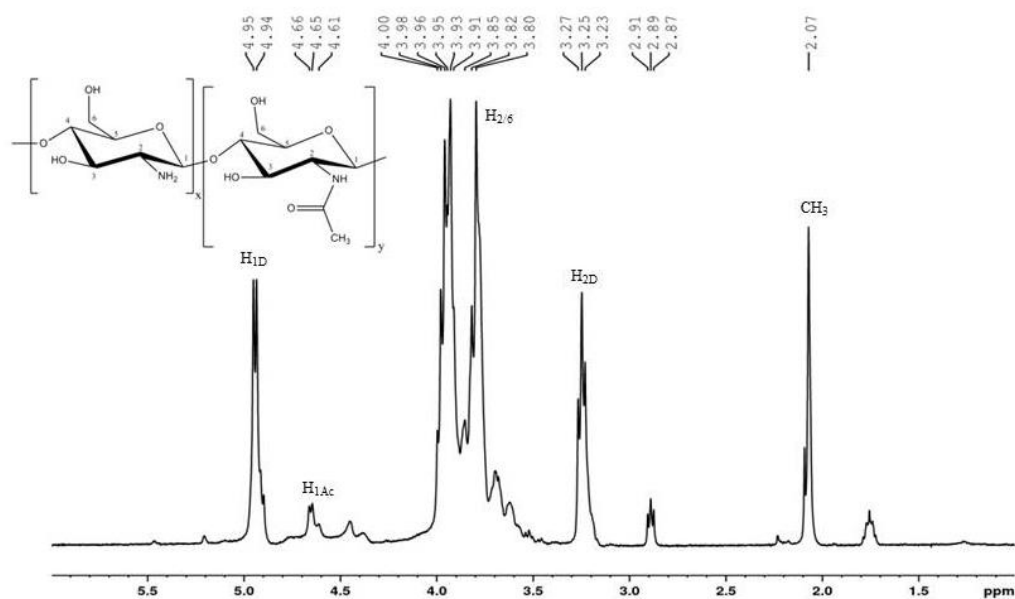




### 5.1.2 Determinação do grau de desacetilação da quitosana

O RMN  $^1\text{H}$  da quitosana apresentou todos os sinais característicos. Em 4,95 e 4,65 ppm os sinais são atribuídos ao  $\text{H}_1$  da porção desacetilada e acetilada, respectivamente. Os sinais entre 3,80 e 4,00 ppm são atribuídos aos hidrogênios  $\text{H}_{2-6}$  ( $\text{H}_2$ ,  $\text{H}_3$ ,  $\text{H}_4$ ,  $\text{H}_5$ ,  $\text{H}_6$  e  $\text{H}_6'$ ) (LAVERTU et al, 2003). A amostra de quitosana foi analisada por ressonância magnética nuclear de próton  $^1\text{H}$ . Utilizou-se do espectro de ressonância de  $^1\text{H}$  da quitosana para determinar seu grau de desacetilação (Figura 11). A área do sinal relativo aos prótons metílicos do grupo acetamido ( $\delta_{\text{CH}_3} = 2,07$  ppm) e a área do sinal relativo ao próton do carbono 2 do anel de glicosamina ( $\delta_{\text{H}_2} = 3,25$  ppm) foram utilizadas na equação 1 juntamente com a equação 2. Assim, foi determinado o grau de desacetilação igual a 77%, ou seja, grau de acetilação de 23%.

Figura 11 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da quitosana (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$ , 70 °C).



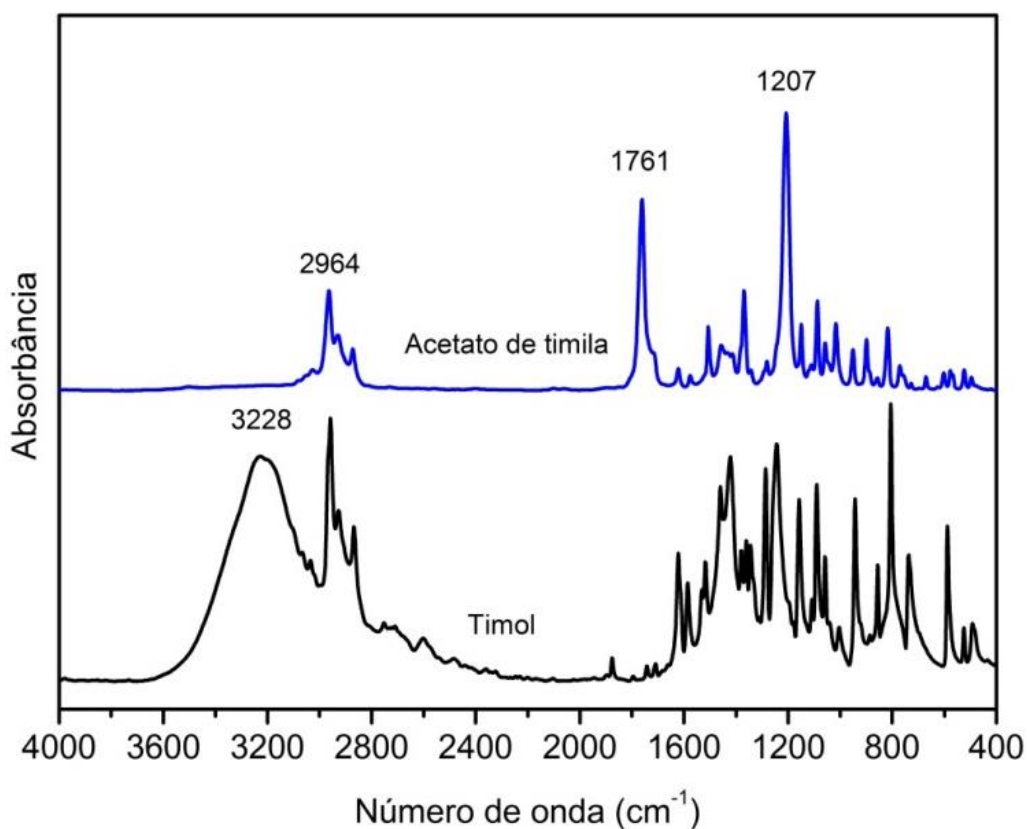
### 5.2 Caracterização do acetato de timila

O acetato de timila foi obtido com um rendimento de 86%, líquido a temperatura ambiente e coloração amarelada. O AT foi caracterizado por FTIR, RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ , os resultados são expostos a seguir.

### 5.2.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR do timol e do acetato de timila encontram-se na Figura 12. Eles mostram que após a acetilação a banda presente em  $3228\text{ cm}^{-1}$ , atribuída ao estiramento O-H, desapareceu. No derivado acetilado, surgiu uma nova banda em  $1761\text{ cm}^{-1}$ , atribuída ao estiramento do grupamento acetil inserido. A banda em  $2964\text{ cm}^{-1}$ , característica dos estiramentos simétrico e assimétrico das ligações C-H, permaneceu após a acetilação. A banda presente em  $1207\text{ cm}^{-1}$  é atribuída ao estiramento C-O-C de éster, presente no acetato de timila.

Figura 12 - Espectro de FTIR do timol e do acetato de timila em pastilha de KBr.

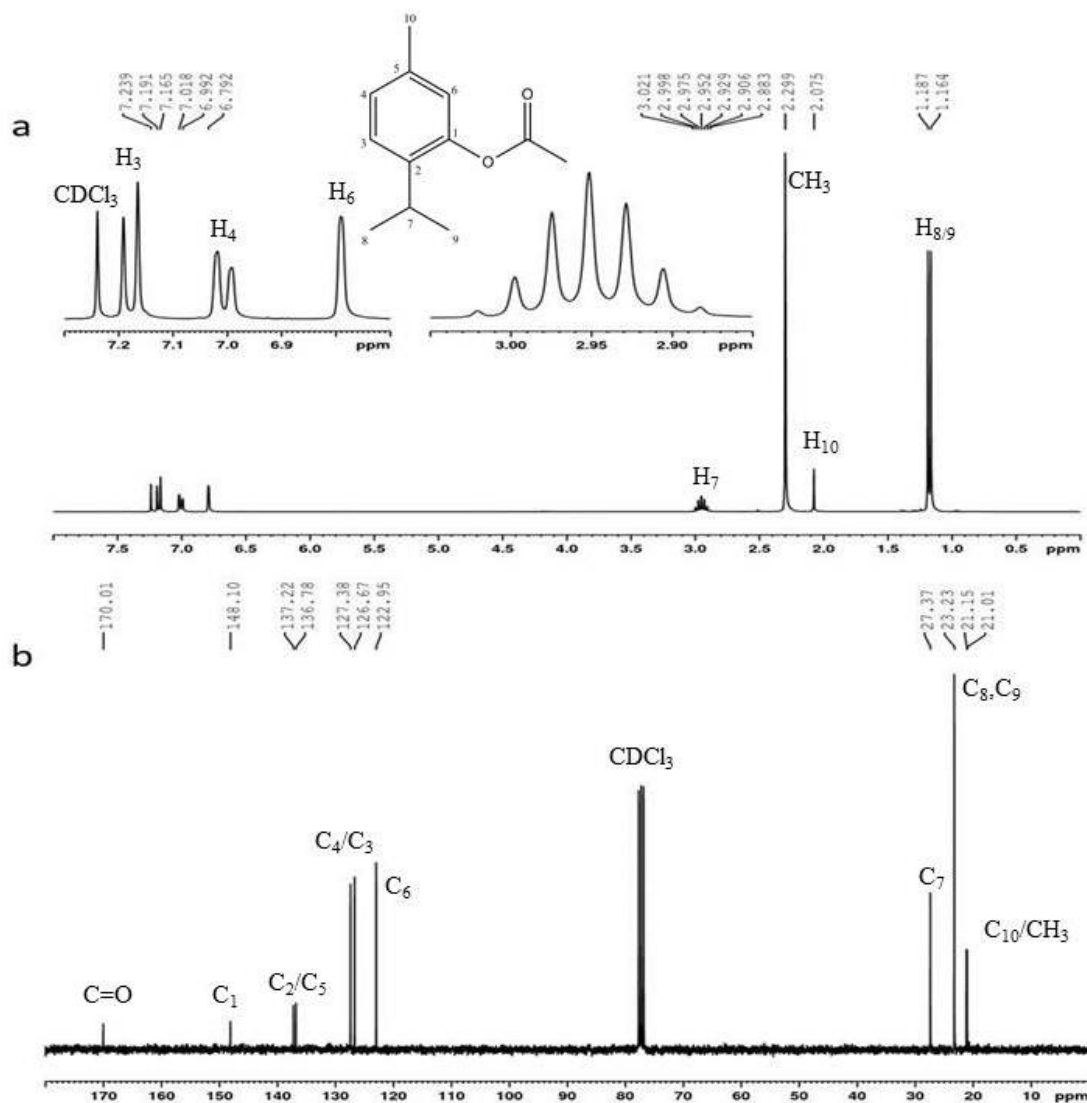


André et al. (2016 & 2017) obtiveram resultados semelhantes quando acetilaram o timol e o carvacrol, com o desaparecimento da banda atribuída ao estiramento O-H, e o surgimento da banda atribuída ao estiramento do grupo acetil.

### 5.2.2 Ressonância magnética nuclear de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$

O acetato de timila foi caracterizado por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , e o resultado encontra-se na Figura 13.

Figura 13 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (a) e  $^{13}\text{C}$  (b) do acetato de timila, (500 MHz, 25 °C).



Notou-se a presença de um sinal intenso ( $\delta = 2,29$  ppm) relativo aos prótons metálicos ligados no carbono vizinho à carbonila do grupo acetato. No espectro de RMN  $^1\text{H}$ , Figura 13a, os hidrogênios do anel aromático (H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub> e H<sub>6</sub>) apareceram entre 6,70 e 7,20 ppm. Um septeto em 2,95 ppm foi atribuído ao H<sub>7</sub>. O singlete em 2,07 ppm foi atribuído aos hidrogênios H<sub>10</sub>. Os hidrogênios H<sub>8</sub> e H<sub>9</sub> são relacionados ao dubleto em 1,17 ppm. No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , na Figura 13b, há um sinal em campo baixo ( $\delta = 170$  ppm) relativo ao carbono

da carbonila de éster do grupo acetato inserido na molécula. Os sinais na região de 122 e 150 ppm são atribuídos aos carbonos do anel aromático. O carbono 7 foi relacionado ao sinal e 27,37 ppm. Os carbonos 8 e 9 foram relacionados ao sinal em 23,23 ppm. Os sinais em 21,15 e 21,01 ppm foram atribuídos, respectivamente, ao carbono 10 e ao carbono do metil ligado à carbonila. Assim, foi possível a confirmação da acetilação do timol por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Resultados semelhantes foram encontrados quando Novato e colaboradores (2018) produziram o derivado acetilado do timol utilizando anidrido acético e piridina.

### 5.3 Caracterização dos derivados de GC

Os rendimentos das reações de modificação da GC (carboximetilação e sulfatação) foram realizados em massa e estão registrados na Tabela 6.

Tabela 6 – Rendimento e GS das reações de modificação da GC.

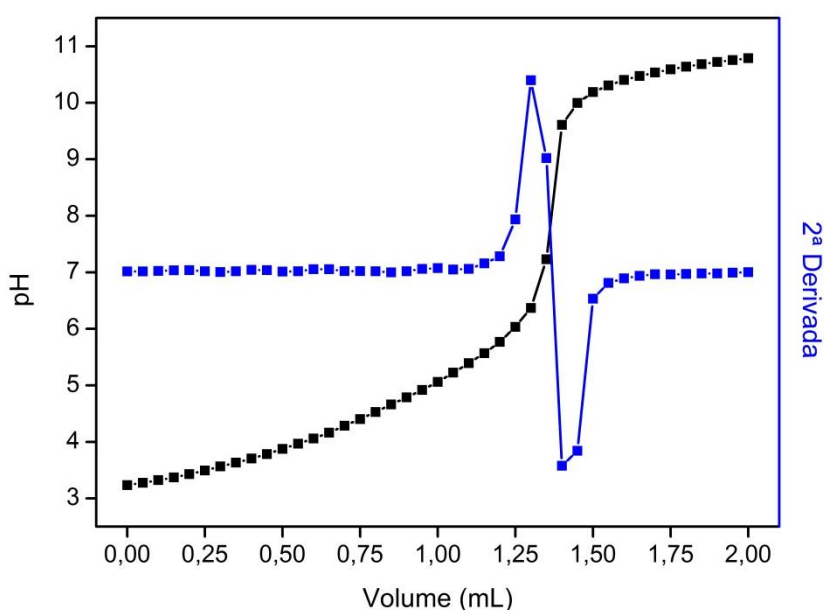
Modificações	Amostra	Rendimento (%)	GS
Carboximetilação	GCM1	44,2 ± 0,4	0,29 ± 0,01
	GCM2	44,5 ± 0,3	0,32 ± 0,03
	GCM3	21,8 ± 0,6	0,22 ± 0,03
Sulfatação	GCS3	42,4 ± 0,5	0,13 ± 0,01
	GCS4	48,1 ± 0,4	0,11 ± 0,01
	GCS5	39,3 ± 0,4	0,17 ± 0,00

Silva e colaboradores (2004) carboximetilaram a goma do cajueiro nas mesmas condições, e obtiveram rendimento de 45, 40 e 32%, respectivamente para os equivalentes às amostras GCM1, GCM2 e GCM3. O rendimento calculado das modificações foi de 44,2, 44,5% e 21,8%, respectivamente, utilizando o mesmo método que neste trabalho. Quanto às amostras sulfatadas, Moura Neto e colaboradores (2011) obtiveram rendimentos variando de 15 a 53%, quando sulfataram a goma do cajueiro utilizando o método com ácido clorossulfônico. Foi observado também que o rendimento diminuía com o aumento do grau de sulfatação. Foi observado que o menor rendimento obtido foi com a amostra GCS5, e que também corresponde a um maior grau de sulfatação.

### 5.3.1 Grau de substituição

Os derivados carboximetilados foram titulados em triplicata para a determinação do grau de substituição. As amostras GCM1, GCM2 e GCM3 tiveram grau de substituição de 0,29, 0,32 e 0,22, respectivamente. Observou-se que com o aumento da quantidade de NaOH houve um aumento do GS da GC até a GCM2, com um aumento em excesso de NaOH, o GS diminuiu na GCM3. A curva de titulação do derivado GCM2 encontra-se na Figura 14.

Figura 14 – Curva de titulação do derivado GCM2 com NaOH 0,096 mol.L<sup>-1</sup>.



Os derivados sulfatados (GCS3, GCS4, GCS5) foram analisados por microanálise para determinar o teor de enxofre presente em cada amostra. Os resultados encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7 - Teor de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre nos derivados GCS.

Amostra	Carbono	Hidrogênio	Nitrogênio	Enxofre	GS
GCS3	36,93 ± 0,11	7,12 ± 0,08	0,47 ± 0,07	2,13 ± 0,18	0,13 ± 0,01
GCS4	36,93 ± 0,03	7,06 ± 0,06	0,47 ± 0,06	1,86 ± 0,17	0,11 ± 0,01
GCS5	35,70 ± 0,06	6,83 ± 0,08	0,39 ± 0,01	2,64 ± 0,00	0,17 ± 0,00

O grau de substituição dos derivados sulfatados variou de 0,11 a 0,17, com a amostra GCS4 com o menor grau de substituição (0,11) e a amostra GCS5 com o maior grau de substituição (0,17). Observou-se que o grau de substituição não é diretamente proporcional

ao aumento da quantidade de complexo  $\text{SO}_3/\text{piridina}$  na reação. O nitrogênio detectado nas amostras pode ser devido à presença de proteínas nos polissacarídeos.

Moura Neto e colaboradores (2011) obtiveram graus de sulfatação variando de 0,02 a 0,88. Entretanto, os autores utilizaram o método do ácido clorosulfônico para sulfatar a goma do cajueiro. O método do ácido clorosulfônico envolve um meio reacional com o pH baixo, e baixa temperatura.

### 5.3.2 FTIR dos derivados de GC

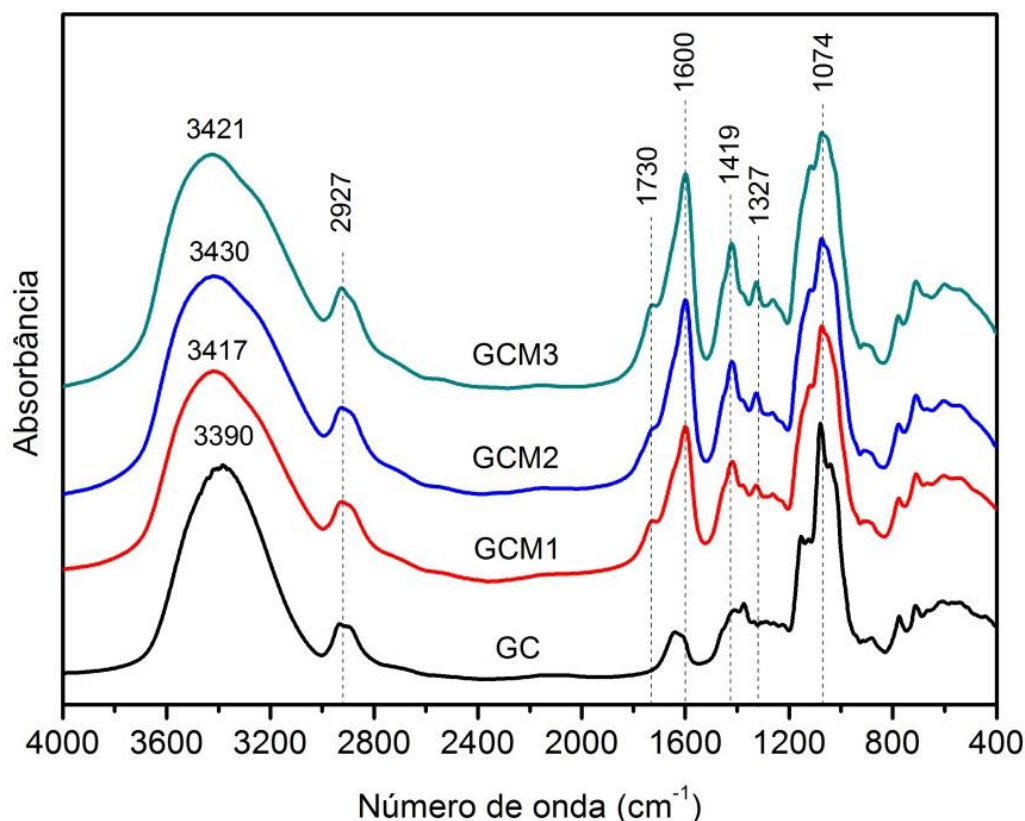
O espectro de infravermelho da GC e seus derivados carboximetilados encontram-se na Figura 15. Eles apresentam bandas próximas a  $3400\text{ cm}^{-1}$ , referente ao estiramento O-H, outra banda em  $2927\text{ cm}^{-1}$ , atribuídas ao estiramento C-H (PITOMBEIRA et al., 2015). Os derivados carboximetilados foram analisados quanto ao aumento do sinal em  $1600\text{ cm}^{-1}$  em relação ao sinal em  $2927\text{ cm}^{-1}$ . Os valores constam na Tabela 8.

Tabela 8 – Absorbância relativa dos derivados carboximetilados.

Amostra	$A_{1600}$	$A_{2927}$	$A_{\text{relativa}}$
GCM1	47,46	13,14	3,61
GCM2	63,24	12,84	4,93
GCM3	73,88	12,36	5,98

Os derivados carboximetilados exibem um aumento de intensidade relativa ( $A_{1600}/A_{2927}$ ) na banda presente em  $1600\text{ cm}^{-1}$ , atribuída ao estiramento simétrico do grupo carboxilato  $-\text{COO}^-$ , e um aumento de intensidade relativa na banda em  $1419\text{ cm}^{-1}$ , atribuída ao estiramento assimétrico do grupo carboxilato  $-\text{COO}^-$  (CHEN et al., 2014). O aumento da intensidade relativa nos derivados carboximetilados ocorre devido à inserção de grupamentos carboxílico no polissacarídeo. O aumento da intensidade relativa em  $1600\text{ cm}^{-1}$  e uma fraca absorbância em  $1730\text{ cm}^{-1}$  (referentes ao grupo  $-\text{COOH}$ ) indica que o polissacarídeo se encontra majoritariamente em sua forma salina (XU et al., 2009). O derivado carboximetilado GCM3 exibiu uma maior intensidade relativa na banda em  $1600\text{ cm}^{-1}$ , o que sugere um maior grau de substituição que os derivados GCM1 e GCM2. Entretanto, na titulação potenciométrica o derivado GCM2 apresentou um maior grau de substituição.

Figura 15 – Espectro de FTIR da GC e de seus derivados carboximetilados.



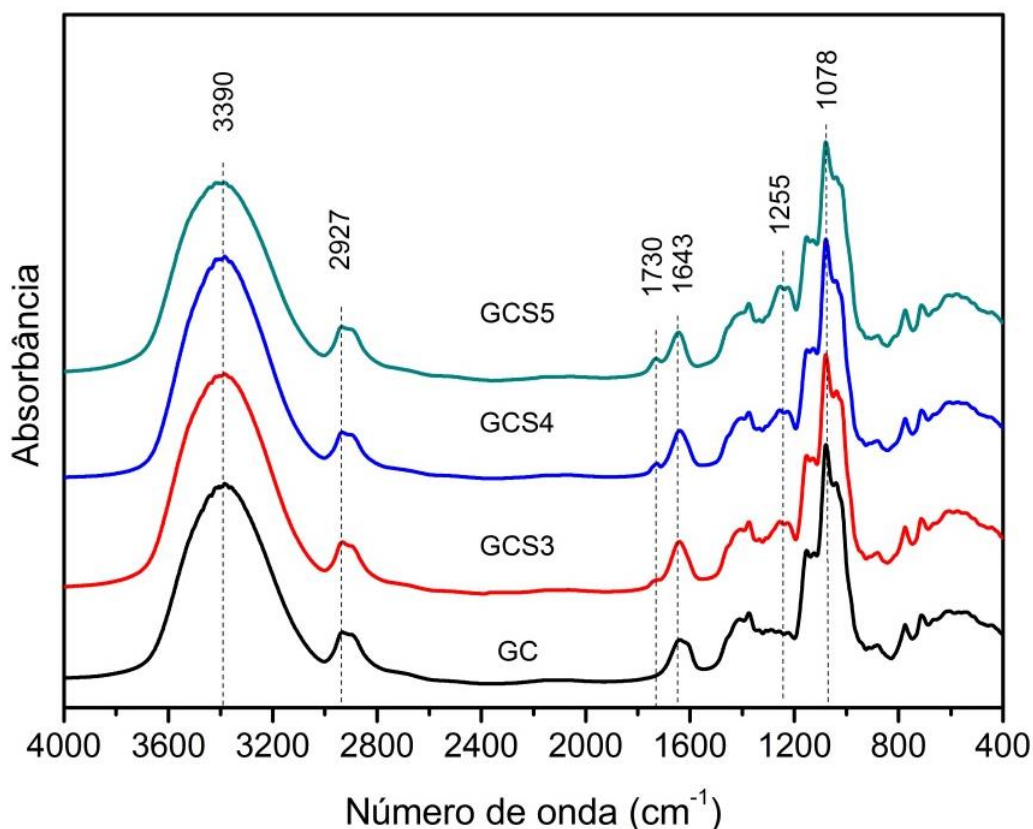
Resultados semelhantes foram obtidos por Silva e colaboradores (2004) na carboximetilação da goma do cajueiro e por Wang e colaboradores (2019) na carboximetilação do glucomanano do konjac. Os autores observaram o surgimento de uma banda próxima de  $1600 \text{ cm}^{-1}$  e outra em  $1420 \text{ cm}^{-1}$  atribuídas ao estiramento simétrico e assimétrico do grupo carboxila. O método utilizado por Wang e colaboradores (2019) utiliza o meio etanólico na reação, utilizando o hidróxido de sódio como base forte para formação do alcóxido, ácido cloroacético e temperatura de reação de  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Os espectros de infravermelho dos derivados sulfatados encontram-se na Figura 16. Eles apresentam uma nova banda em  $1255 \text{ cm}^{-1}$ , atribuída ao estiramento assimétrico da ligação no grupo S=O (MOURA NETO et al., 2011). Os derivados sulfatados foram analisados quanto ao aumento do sinal em  $1255 \text{ cm}^{-1}$  em relação ao sinal em  $2927 \text{ cm}^{-1}$ . Os valores estão mostrados na Tabela 9.

Tabela 9 – Absorbância relativa dos derivados sulfatados.

Amostra	A <sub>1255</sub>	A <sub>2927</sub>	A <sub>relativa</sub>
GCS3	5,37	12,56	0,43
GCS4	6,07	11,57	0,52
GCS5	7,78	13,49	0,58

Figura 16 – Espectro de FTIR da GC e de seus derivados sulfatados.



O derivado GCS5 exibiu uma banda de maior intensidade relativa ( $A_{1255}/A_{2927}$ ) em  $1255\text{ cm}^{-1}$  (0,68) quando comparada com os demais derivados sulfatados, o que sugere um grau de substituição maior. Os derivados GCS3 e GCS4 apresentaram intensidades relativas semelhantes na banda em  $1255\text{ cm}^{-1}$ , 0,43 e 0,45, respectivamente. Uma maior substituição no derivado GCS5 corrobora o resultado encontrado pela análise elementar.

Outros autores obtiveram resultados semelhantes quando sulfataram polissacarídeos. Zhang e colaboradores (2019) na sulfatação da galactomanana do feno grego (método do ácido clorosulfônico;  $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Zhang e colaboradores (2016) na sulfatação do exopolissacarídeo de *L. plantarum* (método do complexo  $\text{SO}_3/\text{py}$ ;  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Chen e colaboradores (2015) na sulfatação do polissacarídeo de *Ganoderma atrum* (método do ácido clorosulfônico;  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), Li e colaboradores (2017) na sulfatação do polissacarídeo de *Enteromorpha prolifera*



(método do ácido clorosulfônico; 90 °C) observaram no FTIR de seus derivados sulfatados uma banda em aproximadamente 1250 cm<sup>-1</sup>, atribuída ao estiramento S=O e 820 cm<sup>-1</sup>, atribuída à ligação C-O-S. Entretanto, a banda em 820 cm<sup>-1</sup> não foi observada nos derivados sulfatados da goma do cajueiro deste trabalho, podendo ser justificado por um menor grau de substituição no polissacarídeo.

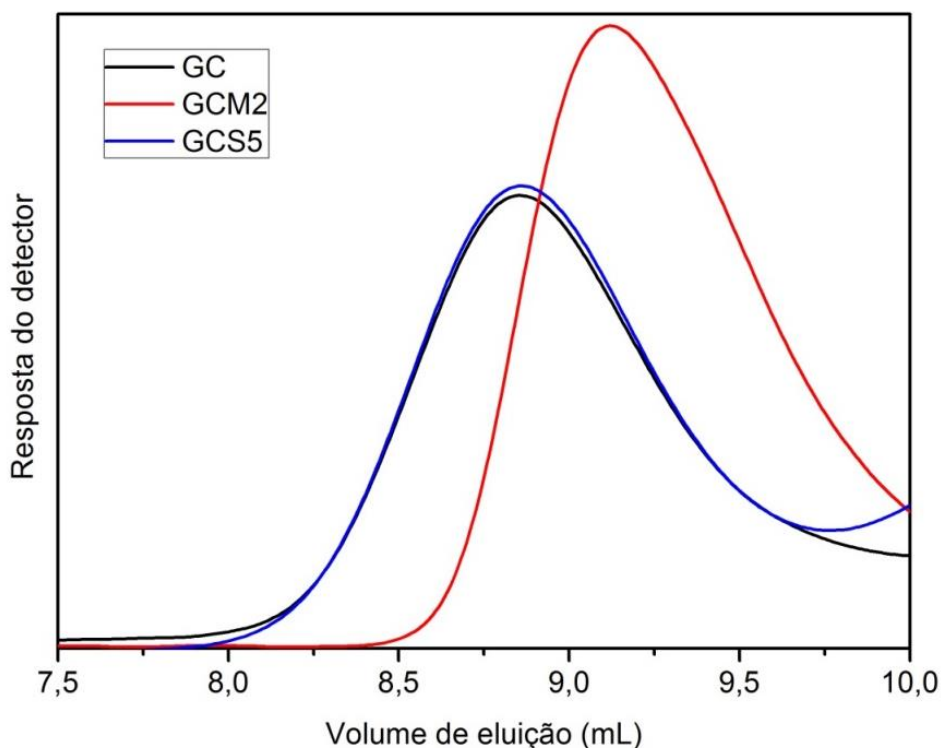
### 5.3.3 Cromatografia de permeação em gel dos derivados de GC

Para a caracterização por GPC foram escolhidas apenas os derivados GCM2 e GCS5, por apresentarem maiores valores de GS. Estes derivados foram utilizados para a obtenção das NPs por CPE.

As amostras foram analisadas buscando estimar a massa molar de pico ( $M_{pk}$ ) dos derivados da goma do cajueiro. Os cromatogramas de permeação em gel da GC e dos derivados GCM2 e GCS5 estão apresentados na Figura 17. O derivado carboximetilado da GC sofreu cisão em sua cadeia (degradação), observada pelo deslocamento do pico da GC de 8,86 para 9,12 mL. A possibilidade de uma nova conformação de cadeia (devido à inserção de grupos carregados) também pode ter influenciado no deslocamento do pico. A degradação ocorreu devido a uma hidrólise básica, ocasionada por um pH muito elevado no meio reacional. Comportamento semelhante também foi observado por Silva e colaboradores (2004), com o deslocamento do pico de 9,2 para 9,6 mL da goma do cajueiro natural para o derivado carboximetilado, indicando uma degradação semelhante na cadeia do polissacarídeo com diminuição da massa molar ( $M_{pk}$ ) de  $1,8 \times 10^5$  para  $1,1 \times 10^5$  g.mol<sup>-1</sup>.

Quanto ao derivado sulfatado, não houve um deslocamento do pico em relação ao polissacarídeo original. Era esperado um aumento de massa molar (deslocamento para um volume de eluição menor), já que há a inserção de um grupamento na cadeia. Entretanto, é possível a ocorrência de hidrólise durante a reação, o que ocasiona a diminuição da massa molar, mantendo assim o volume de eluição igual ao do polissacarídeo natural.

Figura 17 - Cromatograma da GC e seus derivados GCM2 e GCS5.



Os valores de volume de eluição e massa molar de pico são mostrados na Tabela 10.

Tabela 10 – Volume de eluição e  $M_{pk}$  da GC e seus derivados GCM2 e GCS5.

Amostra	Volume de eluição (mL)	$MM_{pk} \times 10^{-4} \text{ (g.mol}^{-1}\text{)}$
GC	8,86	2,07
GCM2	9,12	1,05
GCS5	8,86	2,07

Resultados divergentes foram obtidos por Moura Neto e colaboradores (2011), ao sulfatar a goma do cajueiro. Os autores constataram que houve um pequeno deslocamento no volume de eluição do pico para volumes menores, podendo ser justificado pelo método utilizado para a sulfatação (método do ácido clorosulfônico), causando uma hidrólise ácida mais forte e atingindo um maior grau de substituição. Xiao e colaboradores (2019) também utilizaram o método do ácido clorosulfônico para sulfatar o polissacarídeo de *Sargassum pallidum*, e encontraram massas molares similares ao polissacarídeo nativo. Os autores justificaram a massa

molar próxima ao do polissacarídeo natural devido ao uso da *N,N*-dimetilformamida como solvente e o uso de temperatura mais moderada (70 °C).

#### **5.3.4 Ressonância magnética nuclear da GC e dos derivados**

A GC e seus derivados (GCM2 e GCS5) foram analisados por RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 com o propósito de confirmar as modificações propostas. Os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  estão mostrados nas Figuras 18-20. O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da GC, exibido na Figura 18, apresentou sinais atribuídos aos carbonos C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> e C<sub>5</sub> entre 70 e 85 ppm. Os sinais entre 60 e 65 ppm foram atribuídos aos carbonos metilênicos. Os sinais entre 100 e 110 ppm foram atribuídos aos carbonos anoméricos (SILVA et al, 2007). No espectro de  $^{13}\text{C}$  da GC não foi detectado o sinal do carbono de carbonila na região de campo baixo, já com o espectro de  $^{13}\text{C}$  do derivado carboximetilado GCM2 (Figura 19) foi possível observar este sinal ( $\delta = 179,59$  ppm). Observou-se ainda uma diminuição do sinal na região de carbonos anoméricos ( $\delta$  entre 90 e 110 ppm), devido à degradação da cadeia (como observado nos resultados de GPC).

No espectro da GCS5, exibido na Figura 20, notou-se uma pequena diminuição na intensidade dos sinais anoméricos ( $\delta$  entre 90 e 110 ppm) quando comparados com o espectro da GC (Figura 18), devido a resíduos de glicose e ramnose, mostrando indícios de uma leve degradação da cadeia (MOURA NETO et al., 2011). O aparecimento de um novo sinal ( $\delta = 69,62$  ppm) no espectro da GCS indica que a substituição ocorreu no oxigênio do carbono 6. A presença de grupos sulfato causa uma alteração no deslocamento químico para campos mais baixos nos carbonos  $\alpha$  ao grupo sulfato (WANG et al., 2009).

Os espectros de DEPT 135 da GC e dos derivados GCM2 e GCS5 encontram-se nas Figuras 21 a 23. O DEPT 135 da GC exibiu todos os sinais característicos do polissacarídeo (Figura 21). No DEPT 135 da GCM, exibido na Figura 22, foi possível observar um aumento da intensidade dos sinais na região de CH<sub>2</sub> entre 70 e 75 ppm, quando comparado com o DEPT 135 da GC, indicando uma substituição parcial nos carbonos C-2, C-4 e C-6, concluindo que ocorreu uma carboximetilação não seletiva no polissacarídeo. Resultado similar foi encontrado por Wang et al. (2019), quando fizeram a carboximetilação da glucomanana de konjac, com o aparecimento de um sinal próximo a 180 ppm, e sinais de degradação na região de anoméricos (aproximadamente 105 ppm).

Quando analisados pelo RMN  $^{13}\text{C}$  DEPT 135, com espectro exibido na Figura 23, o novo sinal na GCS ( $\delta = 69,10$  ppm) apareceu na direção oposta dos sinais de CH<sub>3</sub> e CH,

indicando a substituição no CH<sub>2</sub> (carbono 6). Assim, observou-se que a entrada de grupos sulfato ocorre preferencialmente no oxigênio do carbono 6.

Resultados semelhantes foram encontrados por Moura Neto e colaboradores (2011) na sulfatação da GC utilizando o método ácido clorosulfônico/piridina, Liu e colaboradores (2018) com a sulfatação do polissacarídeo de *Catathelasma ventricosum* pelo método do complexo de SO<sub>3</sub>/ piridina, Zhao e colaboradores (2019) na sulfatação do polissacarídeo da *Crassostrea gigas* pelo método do ácido clorosulfônico/piridina e Liu e colaboradores (2009) na sulfatação do polissacarídeo do *Phellinus ribis* utilizando o método ácido clorosulfônico/formamida. Foi observado deslocamento do sinal atribuído ao carbono 6 para campos mais baixos, acompanhando de uma diminuição dos sinais atribuídos aos carbonos anoméricos próximos a 100 ppm.

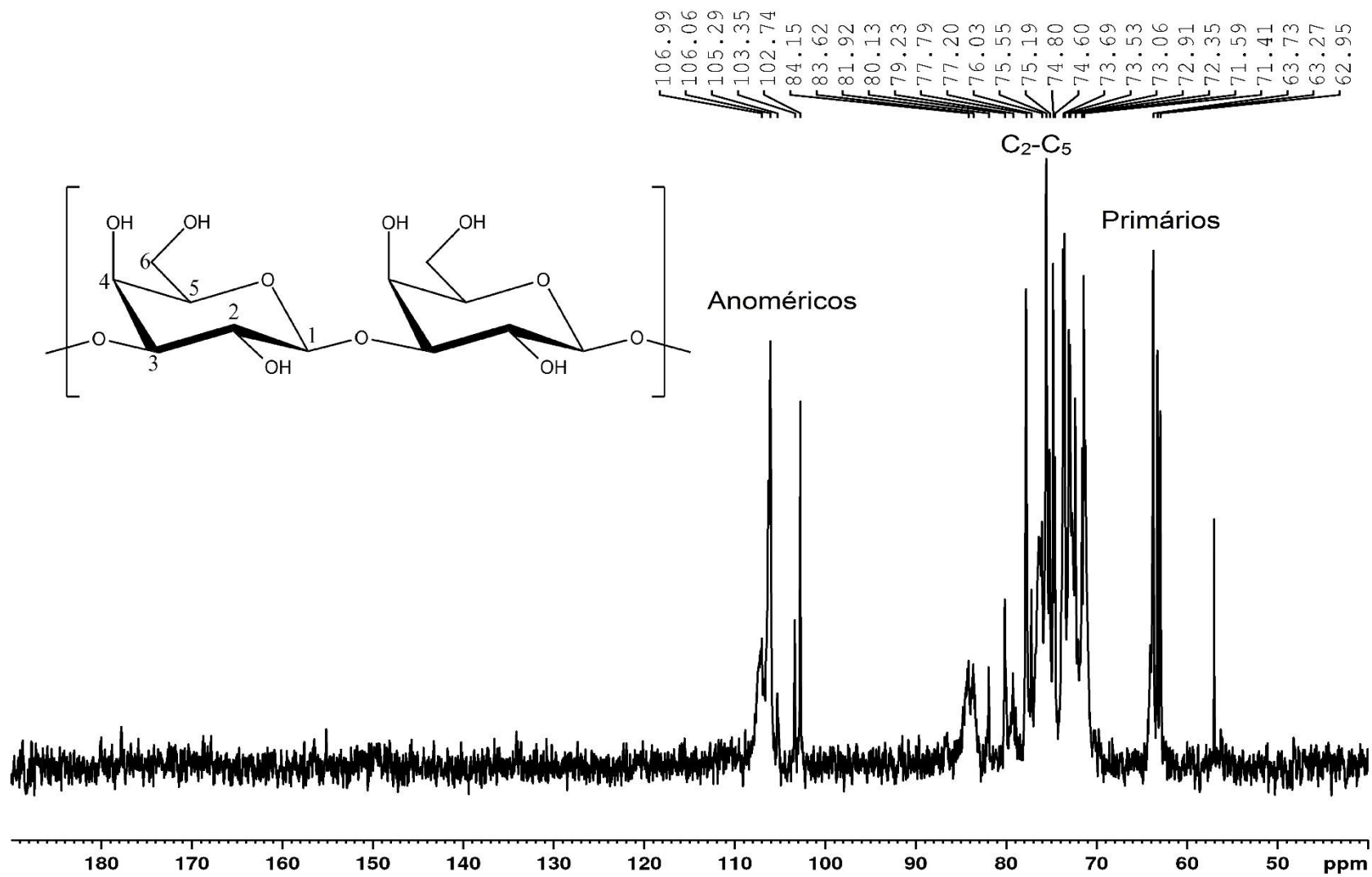
Figura 18 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da GC (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 70 °C).

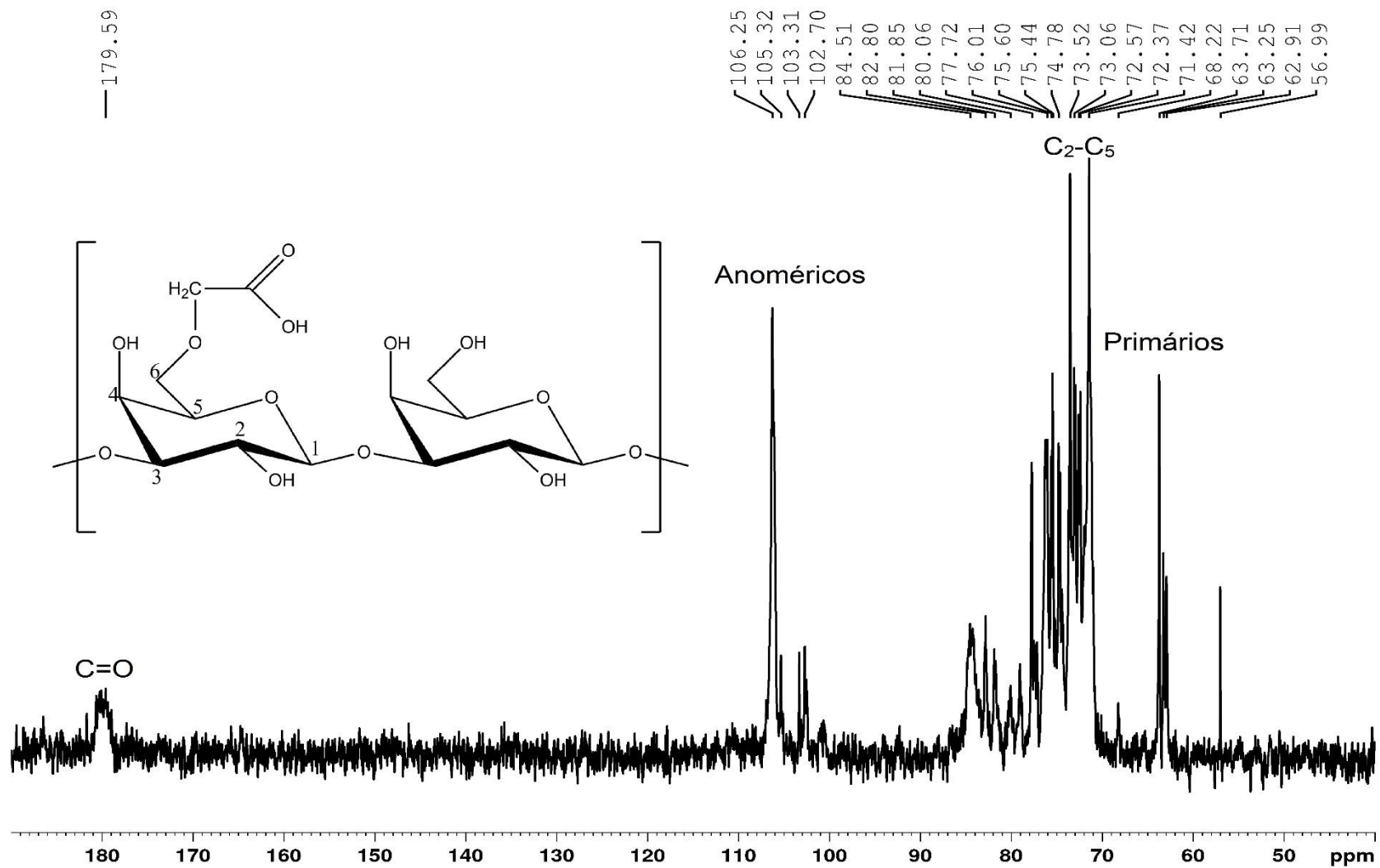
Figura 19 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da GCM2 (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 70 °C).

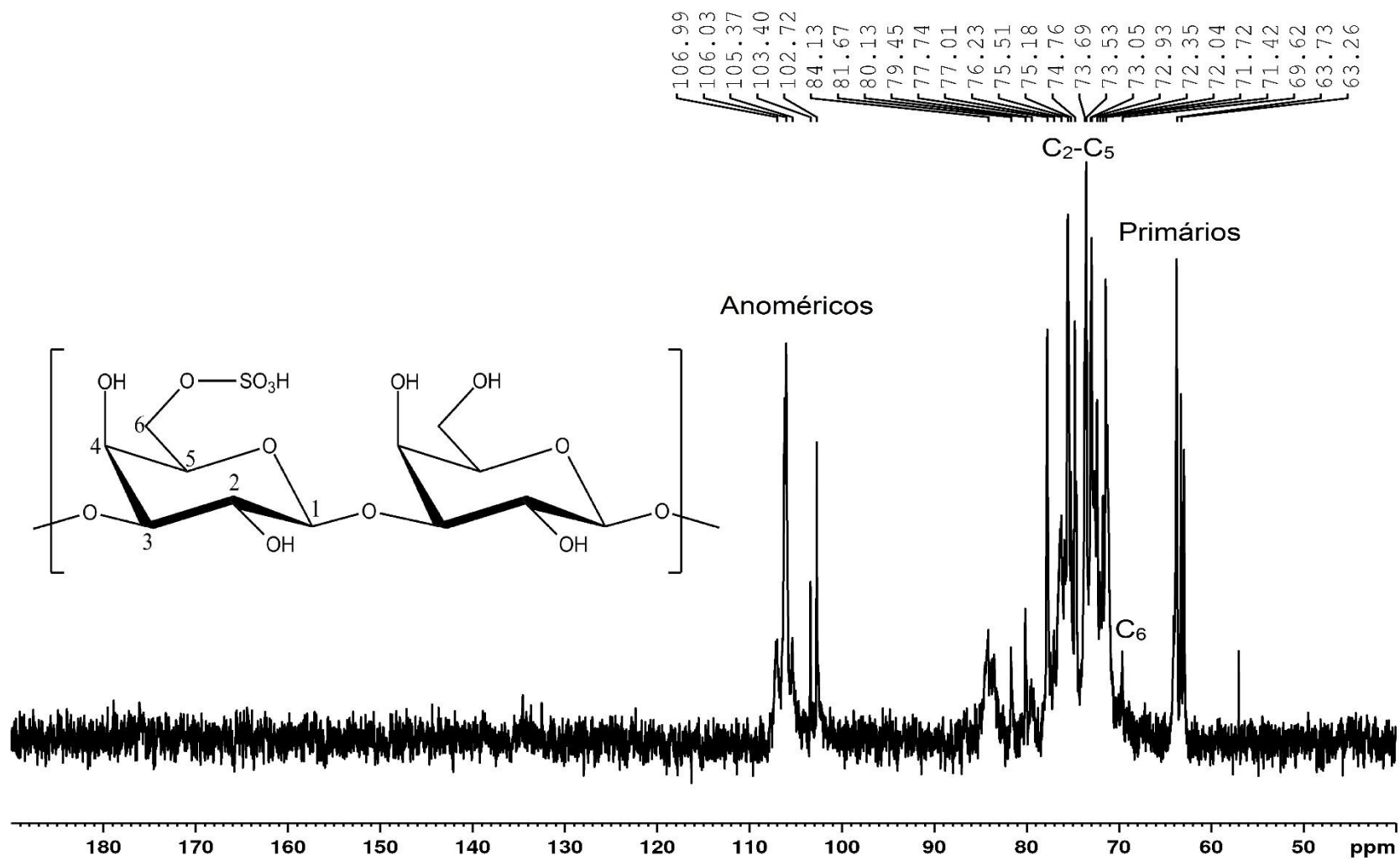
Figura 20 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da GCS5 (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 70 °C).

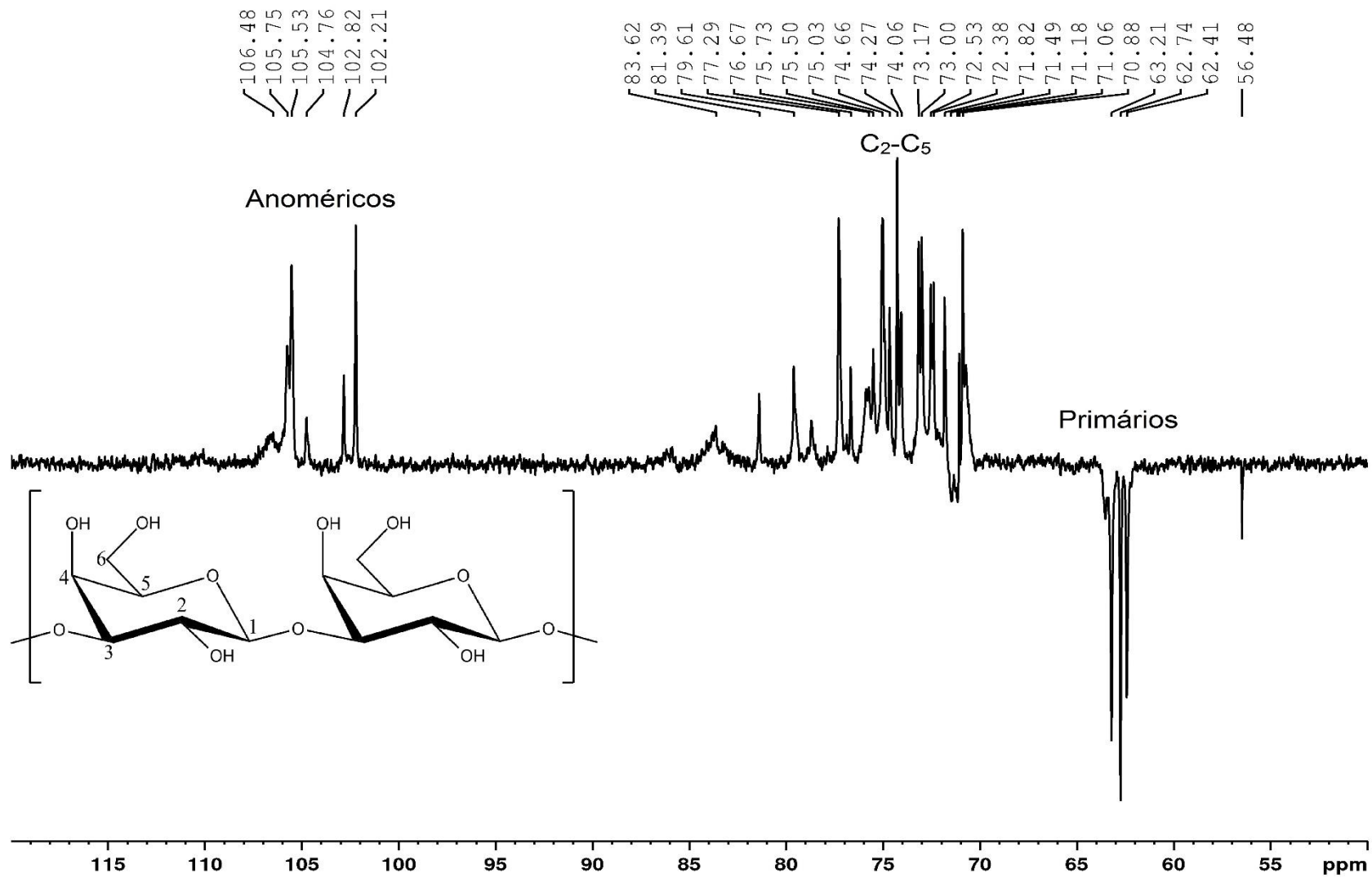
Figura 21 - Espectro de RMN DEPT 135 da GC (500 MHz, D<sub>2</sub>O, 70 °C).



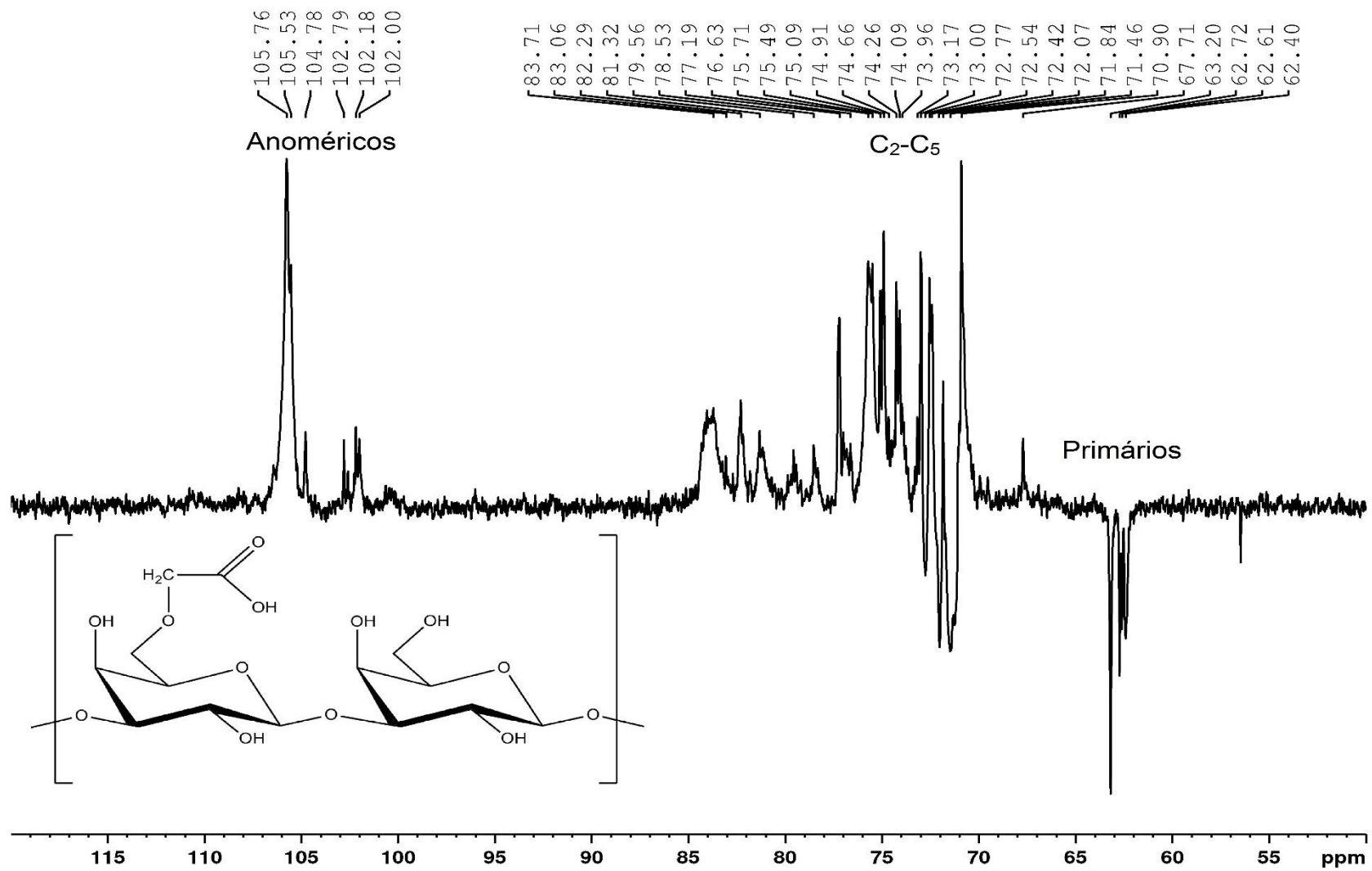
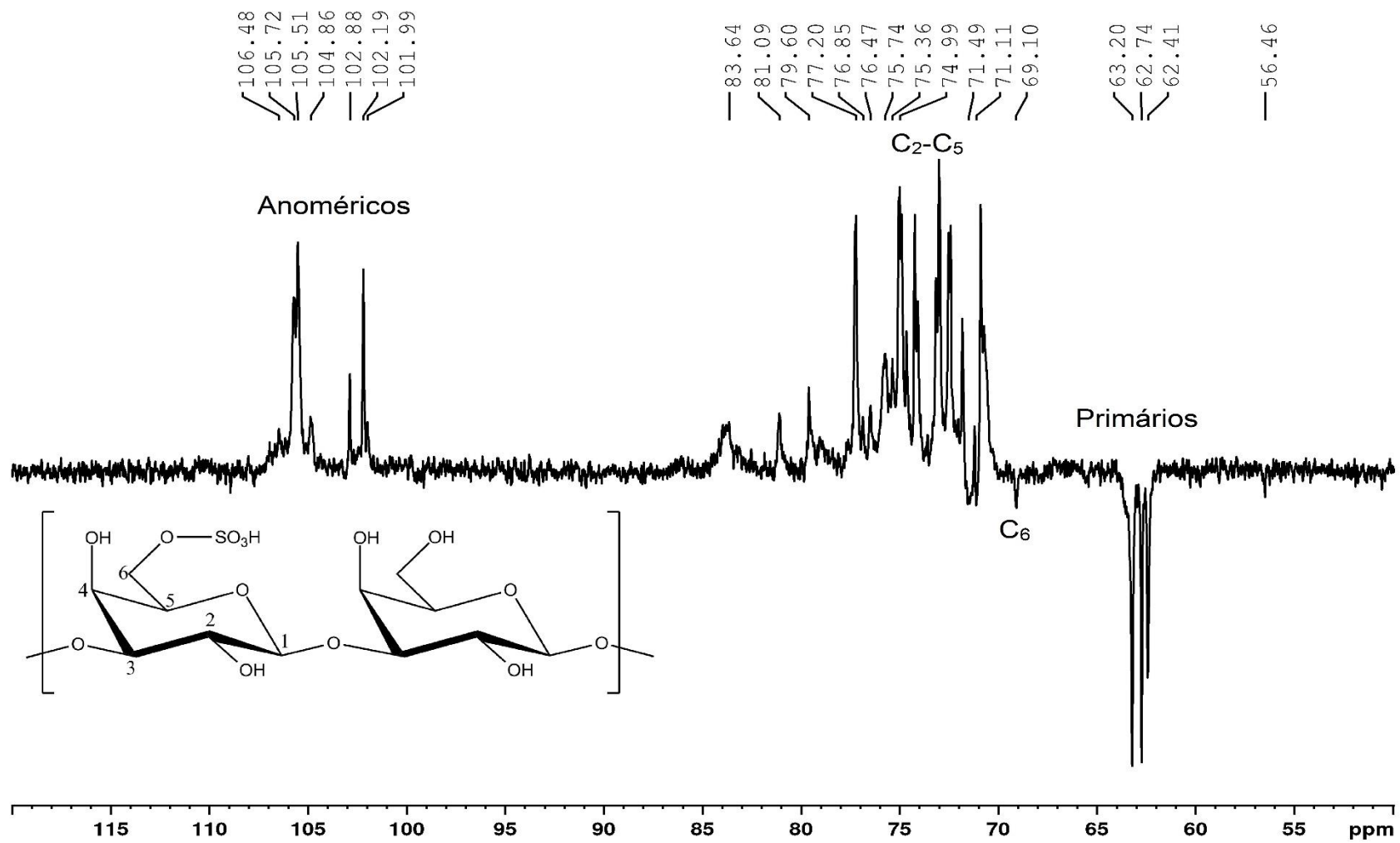
Figura 22 - Espectro de RMN DEPT 135 da GCM2 (500 MHz, D<sub>2</sub>O, 70 °C).

Figura 23 - Espectro de RMN DEPT 135 da GCS5 (500 MHz, D<sub>2</sub>O, 70 °C).

## 5.4 Caracterização das nanopartículas

Para a obtenção das NPs foram utilizados os polissacarídeos QT, GCM2 e GCS5. Os derivados foram escolhidos por apresentarem um maior grau de substituição, tornando assim os polieletrólitos mais carregados das respectivas series. A razão de cargas dos polieletrólitos ( $n^+/n^-$ ) foi calculada a partir da massa molar da unidade glicosídica ( $162 \text{ g.mol}^{-1}$ ) do GS (para GCM e GCS) e GD (QT), como mostram as equações 12 e 13.

$$n^- = n \times GS \quad (12)$$

$$n^+ = n \times GD \quad (13)$$

Onde: n: número de mols; GS: grau de substituição; GD: grau de desacetilação

Os valores dos rendimentos das NPs com GCM encontram-se na Tabela 11. Os rendimentos variaram entre 49 e 75%. O rendimento aumentou com o acréscimo de quitosana no sistema, o que indica que, até a razão  $n^+/n^- = 1,25$ , as interações entre as cadeias poliméricas estão fortes o suficiente para manter a estrutura da nanopartícula. As NPs com GCS apresentaram rendimento entre 31,7 e 66,9% (Tabela 12). Ao contrário das NPs com GCM, não se observou o mesmo efeito de aumento do rendimento com o aumento da quantidade de quitosana. A amostra QTGCS125 teve o menor rendimento, possivelmente indicando que na razão  $n^+/n^- = 1,25$  as interações começam a ser desfavorecidas.

Tabela 11 - Rendimento de obtenção das nanopartículas com GCM.

Amostra	Massa de QT (g)	$n^+/n^-$	Razão molar $n_{QT}:n_{GCM}$	Rendimento (%)
QTGCM75	0,075	0,75	2:7	49,5
QTGCM100	0,100	1,00	2:5	63,0
QTGCM125	0,125	1,25	1:2	74,8

A massa de GCM foi mantida em 0,27 g.

Tabela 12 - Rendimento das nanopartículas com GCS.

Amostra	Massa de QT (g)	$n^+/n^-$	Razão molar $n_{QT}:n_{GCS}$	Rendimento (%)
QTGCS75	0,040	0,75	1:7	62,8
QTGCS100	0,055	1,00	1:5	66,9
QTGCS125	0,070	1,25	1:4	31,7

A massa de GCS foi mantida em 0,28 g.

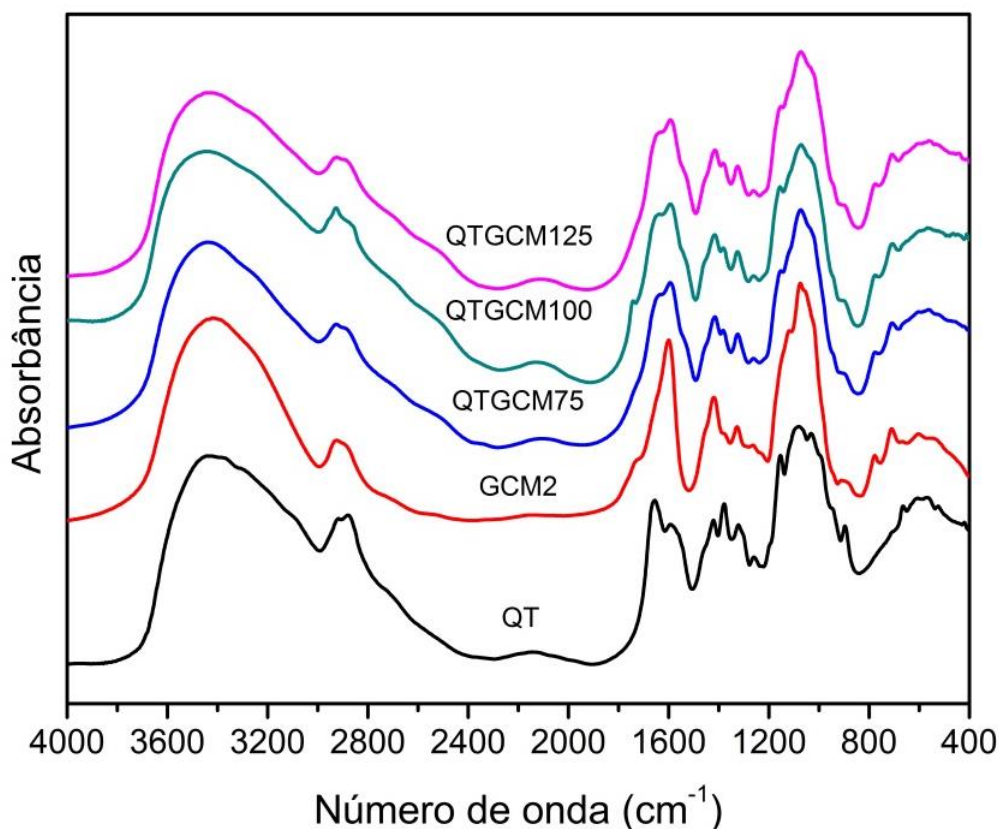
A diferença de comportamento entre as NPs com GCM e GCS pode ser justificada pela massa molar da GCM ( $1,05 \times 10^4 \text{ g.mol}^{-1}$ ) ser menor que a massa molar da GCS ( $2,07 \times 10^4 \text{ g.mol}^{-1}$ ), o que pode implicar em uma melhor conformação entre as cadeias da quitosana e da GCM.

## 5.5 Caracterização das nanopartículas

### 5.5.1 FTIR das nanopartículas

Os espectros de FTIR das nanopartículas produzidas por complexação polieletrólítica entre quitosana e GCM encontram-se na Figura 24. As NPs apresentaram bandas características dos polieletrólitos de partida: em  $3430 \text{ cm}^{-1}$  atribuída ao estiramento O-H (presentes na QT e na GCM) e N-H (presentes na QT), e as bandas presentes em  $1650$  e  $1323 \text{ cm}^{-1}$  atribuídas às amidas I e III da quitosana, respectivamente. A absorção larga presente em  $1595 \text{ cm}^{-1}$  atribuída ao estiramento C=O está presente na QT e na GCM. A absorção em  $1417 \text{ cm}^{-1}$  é atribuída à deformação axial C-N presente na quitosana.

Figura 24 - Espectro de FTIR das NPs com GCM e os polieletrólitos de partida.



Alguns sinais sofreram deslocamentos comparados ao material de partida, os sinais e números de onda do material de partida são exibidos na Tabela 13 e o dos complexos polieletrólitos na Tabela 14.

Tabela 13 – Atribuições aos picos da quitosana e goma do cajueiro carboximetilada (PAWLAK & MUCHA, 2003; WANG et al, 2019).

Amostra	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição
QT	1655	C=O de amida
	1591	NH <sub>2</sub>
	1421	Deformação axial C-N
	1379	Deformação angular simétrica CH <sub>3</sub>
	1321	Amida III
	1080	C-O e C-O-C da estrutura sacarídica
GCM2	1730	C=O do grupo COOH
	1600	Estiramento simétrico C=O do grupo COO <sup>-</sup>
	1419	Estiramento assimétrico C=O do grupo COO <sup>-</sup>
	1074	C-O e C-O-C da estrutura sacarídica

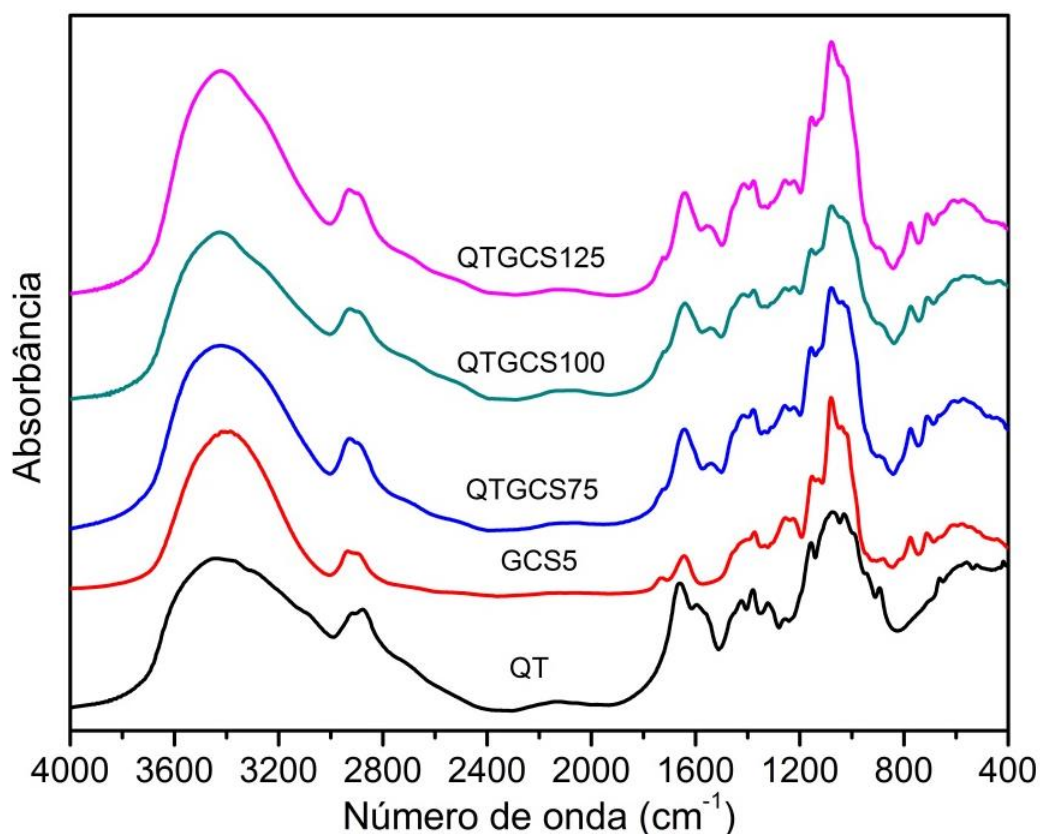
Tabela 14 – Atribuições de algumas bandas dos complexos polieletrólitos com goma do cajueiro carboximetilada.

Atribuição	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )		
	QTGCM75	QTGCM100	QTGCM125
C=O de amida	1641	1647	1645
Estiramento simétrico C=O do grupo COO <sup>-</sup> e NH <sub>2</sub>	1593	1593	1593
Estiramento assimétrico do grupo COO <sup>-</sup> e deformação axial C-N	1415	1415	1417
Deformação angular simétrica CH <sub>3</sub>	1382	1382	1382
Amida III	1325	1325	1325
C-O e C-O-C da estrutura sacarídica	1072	1070	1072

Os deslocamentos nas bandas presentes nos complexos polieletrólitos são justificados pelas interações entre os polissacarídeos na formação do CPE. Os espectros de FTIR das nanopartículas produzidas por complexação polieletrólítica entre quitosana e GCS encontram-se na Figura 25. Essas nanopartículas apresentaram bandas características dos polieletrólitos de partida: banda em 3415 cm<sup>-1</sup> atribuída ao estiramento O-H (presentes na QT

e na GCS) e N-H (presentes na QT). A absorção larga presente em  $1643\text{ cm}^{-1}$  é atribuída ao estiramento C=O presente na QT e GCS. A absorção presente em  $1417\text{ cm}^{-1}$  é atribuída à deformação axial C-N presente na quitosana. A banda em  $1255\text{ cm}^{-1}$ , característica do estiramento S=O da GCS, foi observada em todas as NPs.

Figura 25 - Espectro de FTIR das NPs com GCS e os polieletrólitos de partida.



Alguns sinais sofreram deslocamentos quanto ao material de partida, os sinais e números de onda do material de partida são exibidos na Tabela 15 e o dos complexos polieletrólíticos são exibidos na Tabela 16.

Os deslocamentos nas bandas presentes nos complexos polieletrólíticos são justificados pelas interações entre os polissacarídeos na formação do CPE.

Tabela 15 – Atribuição dos picos da quitosana e goma do cajueiro sulfatada (MOURA NETO et al, 2011).

Amostra	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição
QT	1655	C=O de amida
	1591	NH <sub>2</sub>
	1421	Deformação axial C-N
	1379	Deformação angular simétrica CH <sub>3</sub>
	1321	Amida III
	1080	C-O e C-O-C da estrutura sacarídica
GCS5	1730	C=O do grupo COOH
	1643	Estiramento simétrico C=O do grupo COO <sup>-</sup>
	1255	Estiramento assimétrico do grupo S=O
	1078	C-O e C-O-C da estrutura sacarídica

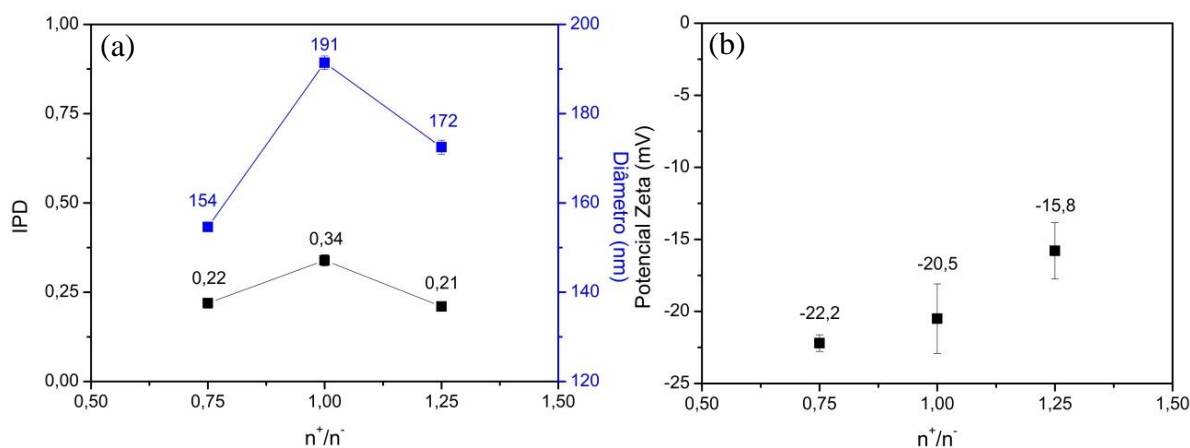
Tabela 16 – Atribuição de algumas bandas dos complexos polieletrólíticos com goma do cajueiro sulfatada.

Atribuição	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )		
	QTGCS75	QTGCS100	QTGCS125
C=O de amida e estiramento simétrico C=O do grupo COO <sup>-</sup>	1641	1641	1641
Estiramento assimétrico do grupo COO <sup>-</sup> e deformação axial C-N	1417	1415	1413
Deformação angular simétrica CH <sub>3</sub>	1379	1377	1377
Estiramento assimétrico do grupo S=O	1257	1257	1257
C-O e C-O-C da estrutura sacarídica	1078	1078	1078

#### 5.4.2 Espalhamento dinâmico de luz

As NPs foram caracterizadas por EDL para determinação do tamanho de partícula, potencial zeta e índice de polidispersividade em água destilada. As NPs apresentaram tamanho entre 150 e 195 nm. A QTGCM75 apresentou o menor tamanho, enquanto a QTGCM100 o maior, com 154 e 191 nm, respectivamente. Observou-se uma tendência no aumento do tamanho da NP com a igualdade teórica no balanço de cargas ( $n^+/n^- = 1,00$ ), e uma diminuição quando as cargas aniônicas ( $n^+/n^- = 0,75$ ) ou catiônicas ( $n^+/n^- = 1,25$ ) eram predominantes. Os resultados encontram-se na Figura 26.

Figura 26 – Tamanho de partícula e índice de polidispersividade (a) e potencial zeta (b) das nanopartículas com GCM em água destilada.

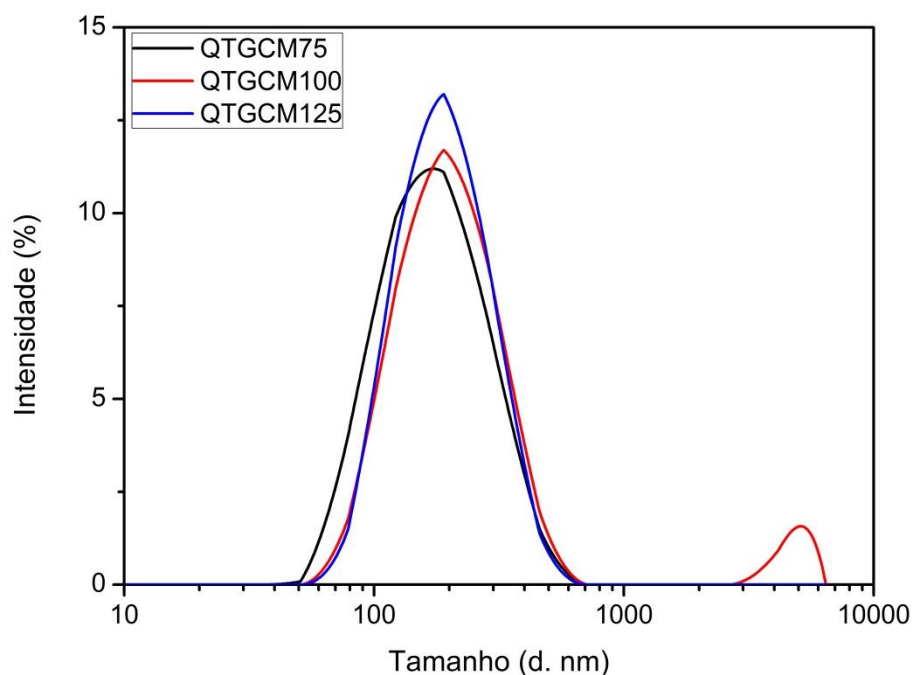


Entretanto, a QTGCM75 apresentou um menor tamanho, provavelmente devido a um menor tamanho de cadeia da GCM, ocasionando uma melhor interação entre a cadeia de GCM e QT com a proporção molar 2:7 (QT:GCM). Já quando as cargas catiônicas foram predominantes, o tamanho da partícula foi um pouco maior quando comparado com a QTGCM75, quando a razão molar é de 1:2 (QT:GCM). Quando houve predominância de cargas negativas ( $n^+/n^-=0,75$ ) o menor tamanho de partícula foi obtido, sugerindo um melhor empacotamento entre as cadeias de QT e GCM. A distribuição de tamanho de partícula das amostras encontra-se na Figura 27.

Isso sugere que a razão molar de 2:7 é a condição ideal para obter um menor tamanho de partícula, dados os GS e GD da GCM e QT, respectivamente. O IPD é utilizado para caracterizar a dispersão de um polímero. As NPs com menor tamanho de partícula (QTGCM75 e QTGCM125) apresentaram os menores valores de IPD, 0,22 e 0,21, respectivamente e apresentaram distribuição unimodal. O potencial zeta das NPs está ligado à estabilidade da emulsão. Quanto maior o potencial zeta, em módulo, mais estável o sistema, devido à repulsão entre as cargas na superfície das NPs. Todas as NPs apresentaram potencial zeta negativo, indicando que a GCM é predominante na parte exterior da estrutura, enquanto a quitosana encontra-se no interior. Observou-se também que o potencial tende a diminuir, em módulo, com o aumento da quantidade de quitosana, o que já era esperado, visto que a quitosana possui cargas positivas ao longo da cadeia.



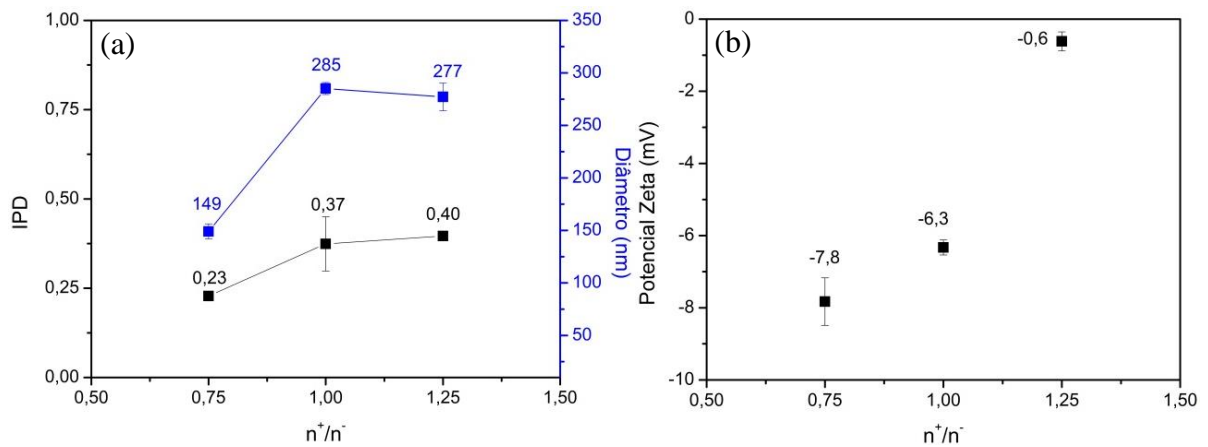
Figura 27 - Distribuição de intensidade (%) x tamanho (d. nm) das nanopartículas com GCM.



As NPs com GCS apresentaram tamanho entre 145 e 290 nm. Os resultados encontram-se na Figura 28. A QTGCS75 apresentou o menor tamanho, enquanto a QTGCS100 o maior, com 149 e 285 nm, respectivamente.

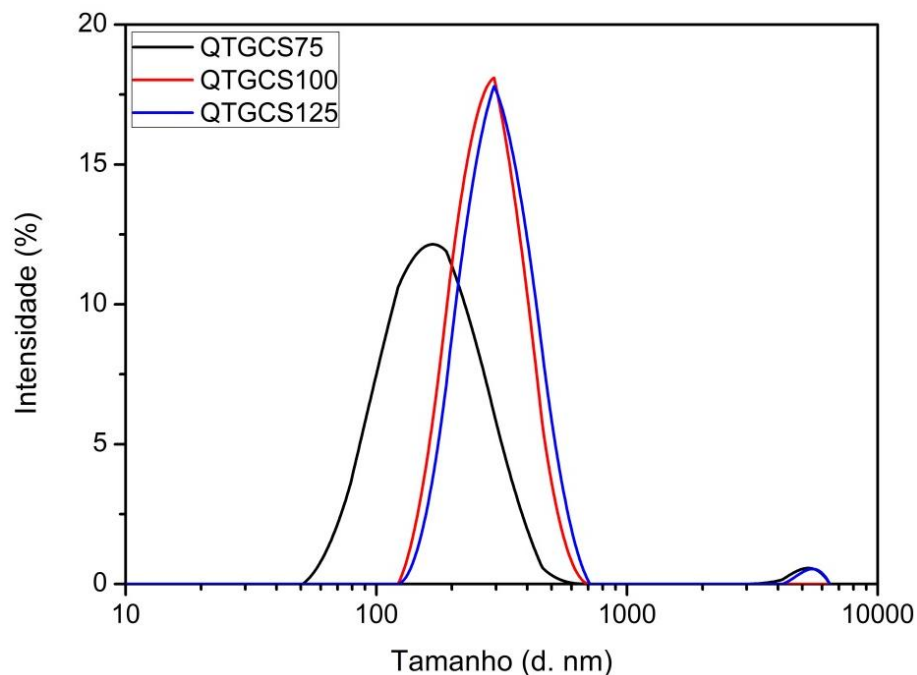
A tendência apresentada nas NPS com GCM também foi observada nas NPs com GCS, no aumento do tamanho da NP com a igualdade teórica no balanço de cargas ( $n^+/n^- = 1,00$ ), e uma diminuição quando as cargas aniônicas ( $n^+/n^- = 0,75$ ) ou catiônicas ( $n^+/n^- = 1,25$ ) eram predominantes. Entretanto, a QTGCS125 apresentou um tamanho de partícula bem próximo ao da QTGCS100. Assim, a razão molar ideal para obter um menor tamanho de partícula seria 1:7 (QTGCS75), dados os GS da GCS e o GD da QT, que lhe conferem uma melhor interação entre as cadeias.

Figura 28 – Tamanho de partícula e índice de polidispersividade (a) e potencial zeta (b) das nanopartículas com GCS em água destilada.



A QTGCS75, com menor tamanho de partícula (149 nm), apresentou o menor IPD entre as NPS com GCS (IPD = 0,23). Já as NPs QTGCS100 e QTGCS125 apresentaram os maiores valores de IPD entre todas as partículas produzidas neste trabalho, 0,37 e 0,40, respectivamente e apresentaram distribuição unimodal e bimodal, respectivamente. As distribuições de tamanho de partícula das amostras encontram-se na Figura 29. QTGCS75 e QTGCS125 apresentaram um pequeno volume em diâmetros maiores podendo ser justificado por aglomerados em solução.

Figura 29 - Distribuição de intensidade (%) x tamanho (d. nm) das nanopartículas com GCS.



Todas as NPs apresentaram potencial zeta negativo, mas foram bem menores (em módulo) do que aqueles das NPs com GCM, indicando uma menor estabilidade em solução. O potencial negativo sugere que a GCS está predominante distribuído na parte exterior da partícula, enquanto a quitosana encontra-se no interior. Os sistemas apresentaram a mesma tendência no potencial zeta com o aumento da quantidade de quitosana, com a QTGCS125 se aproximando do ponto isoelétrico em meio aquoso ( $\text{pH} = 7$ ).

Os resultados obtidos coincidem com os encontrados por Chen e colaboradores (2019), que produziram complexos polieletrólíticos à base de quitosana modificada e ácido hialurônico. Os autores obtiveram nanopartículas com diâmetro entre 160 e 385 nm e IPD entre 0,02 e 0,5. O tamanho hidrodinâmico de partícula também foi semelhante com o obtido por Anirudhan e colaboradores (2019), quando produziram um complexo polieletrólítico entre carboximetil quitosana e alginato de sódio para o carreamento de fármaco obtendo nanopartículas com diâmetro de 168 nm. Segundo Vinogradov e colaboradores (2002) nanopartículas com tamanho entre 70 e 200 nm possuem um maior tempo de circulação no organismo, favorecendo o seu uso na liberação de fármacos. Portanto, as NPs obtidas estão dentro da faixa de tamanho propício para uso de liberação de fármacos e similares.

## **5.6 Caracterização das nanopartículas com acetato de timila encapsulado**

Para o ensaio de encapsulamento do acetato de timila (AT) foi escolhido o sistema QTGCM75, pois apresentou as melhores características de tamanho de partícula (154 nm), estabilidade em solução (potencial zeta = -22,2 mV) e baixo índice de polidispersividade (0,22).

### ***5.6.1 Espalhamento dinâmico de luz da NP com acetato de timila encapsulado***

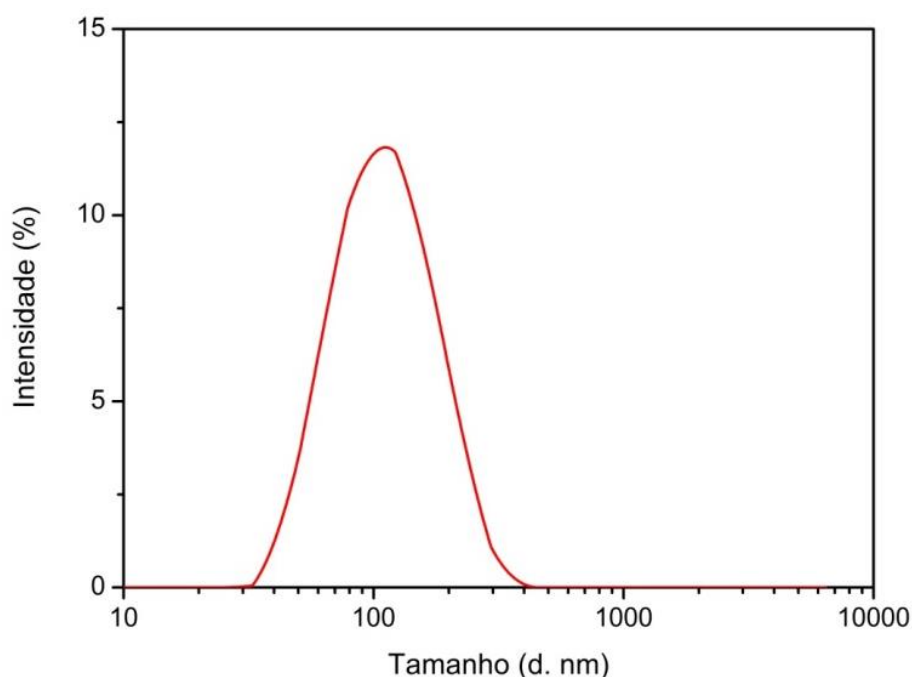
Os resultados de EDL para o sistema com acetato de timila encapsulado se encontram na Tabela 17. Quando comparado com o sistema QTGCM75, o rendimento caiu de 49,5% para 37,7% e a eficiência de encapsulamento foi de 41%. Já a capacidade de carreamento, que consiste da razão entre a massa de acetato de timila encapsulado e a massa de NP, foi de 24%. O tamanho de partícula diminuiu de 154 para 97 nm com distribuição unimodal, como mostra a Figura 30.

Tabela 17: Rendimento, diâmetro, IPD, potencial zeta, eficiência de encapsulamento e capacidade de carregamento do ensaio de encapsulamento do acetato de timila.

	Rend.	Diâmetro (nm)	IPD	Potencial zeta (mV)	EE	CC
QTGCM75AT	37,7% ± 1,7	97 ± 2	0,25 ± 0,03	-26 ± 1	41,00%	24,00%

EE: Eficiência de Encapsulamento / CC: Capacidade de Carregamento

Figura 30 - Distribuição de intensidade (%) x tamanho (d. nm) do sistema QTGCM75AT.



O potencial zeta negativo sugere que a goma do cajueiro carboximetilada está majoritariamente na superfície da nanopartícula, enquanto a quitosana está na parte mais interna.

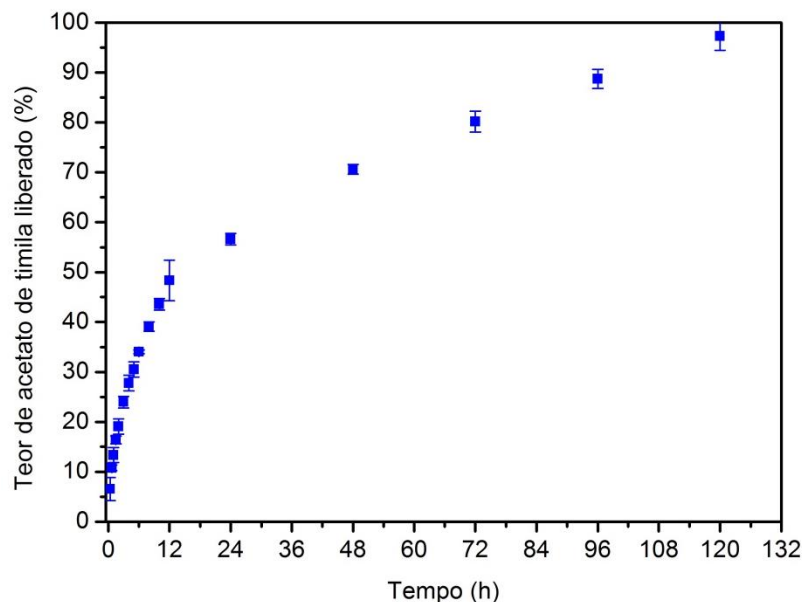
A diminuição do tamanho de partícula no encapsulamento pode ser justificada pelo uso do surfactante Tween 80, que auxilia na formação da emulsão entre a QT e o acetato de timila. O potencial zeta aumentou em módulo, de -22,2 para -26,0 mV. Resultados similares foram encontrados por Hosseini e colaboradores (2013) quando encapsularam óleo essencial de orégano (que possui timol em sua composição) com sistema quitosana /tripolifosfato, e obtiveram nanopartículas com diâmetro entre 280 e 400 nm. Entretanto, obtiveram eficiência de encapsulamento inferior (5 a 25%), e capacidade de carregamento bem inferior (1,0 a 2,5%) ao atingido por este trabalho. Potencial zeta semelhante (-22 mV) foi obtido por Baldim et al. (2019), quando encapsularam o óleo essencial de *Lippia sidoides* em um nanossistema lipídico

utilizando o método de inversão de fase, com 80% de eficiência para o encapsulamento do óleo essencial, que possui timol em sua composição.

### 5.6.2 Ensaio de liberação *in vitro*

O resultado do ensaio de liberação *in vitro* do sistema QTGCM75AT encontra-se na Figura 31. O ensaio mostrou que na primeira hora foram liberados aproximadamente 13% do AT encapsulado. Após 6 h aproximadamente 34%, e cerca de 50% foram liberados nas primeiras 12 h de ensaio. Após as 12 h, a liberação tornou-se mais lenta, liberando aproximadamente 97% em 120 h de ensaio. A liberação inicial ocorrendo de forma mais acelerada pode ser justificada pelo AT presente na superfície da NP, pela erosão da superfície, e/ou intumescimento da NP, liberando assim o AT encapsulado nas proximidades da superfície. De 24 a 120 h, a liberação foi mais lenta, sendo atribuído ao AT que se encontrava encapsulado na parte mais interna da NP.

Figura 31 – Perfil de liberação *in vitro* do sistema QTGCM75AT em pH 7,4 (tampão fosfato).



Hosseini et al (2013) quando encapsularam o óleo essencial de orégano, que possui o timol e o carvacrol como componentes majoritários, com um sistema quitosana/tripolifosfato relataram uma rápida liberação nos momentos iniciais do ensaio *in vitro*, justificada pela possível presença de óleo essencial na superfície da NP. Esmaili & Asgari (2015), quando

encapsularam o óleo essencial de *Carum copticum*, utilizando um sistema quitosana/tripolifosfato, também observaram uma liberação inicial brusca, de aproximadamente 65% em 5 h de ensaio *in vitro*. Esta rápida liberação inicial também foi atribuída ao óleo essencial presente na superfície da NP e/ou encapsulado próximo à superfície. De acordo com os resultados obtidos, propõe-se que a estrutura da nanopartícula seja da forma representada na Figura 32.

Figura 32 – Proposta de modelo de nanopartícula para encapsulamento de acetato de timila.



Fonte: Próprio autor.

### 5.6.3 Análise cinética de liberação *in vitro*

Os parâmetros foram utilizados para identificar qual modelo teórico se ajusta mais aos dados obtidos nas observações experimentais. O modelo que melhor se adequa foi selecionado a partir do coeficiente de correlação ( $R^2$ ) dos seguintes modelos: ordem zero, primeira ordem, Higuchi, Hixson-Crowell e Korsmeyer-Peppas. O modelo que obtiver o maior coeficiente de correlação é considerado o mais ajustado à liberação.

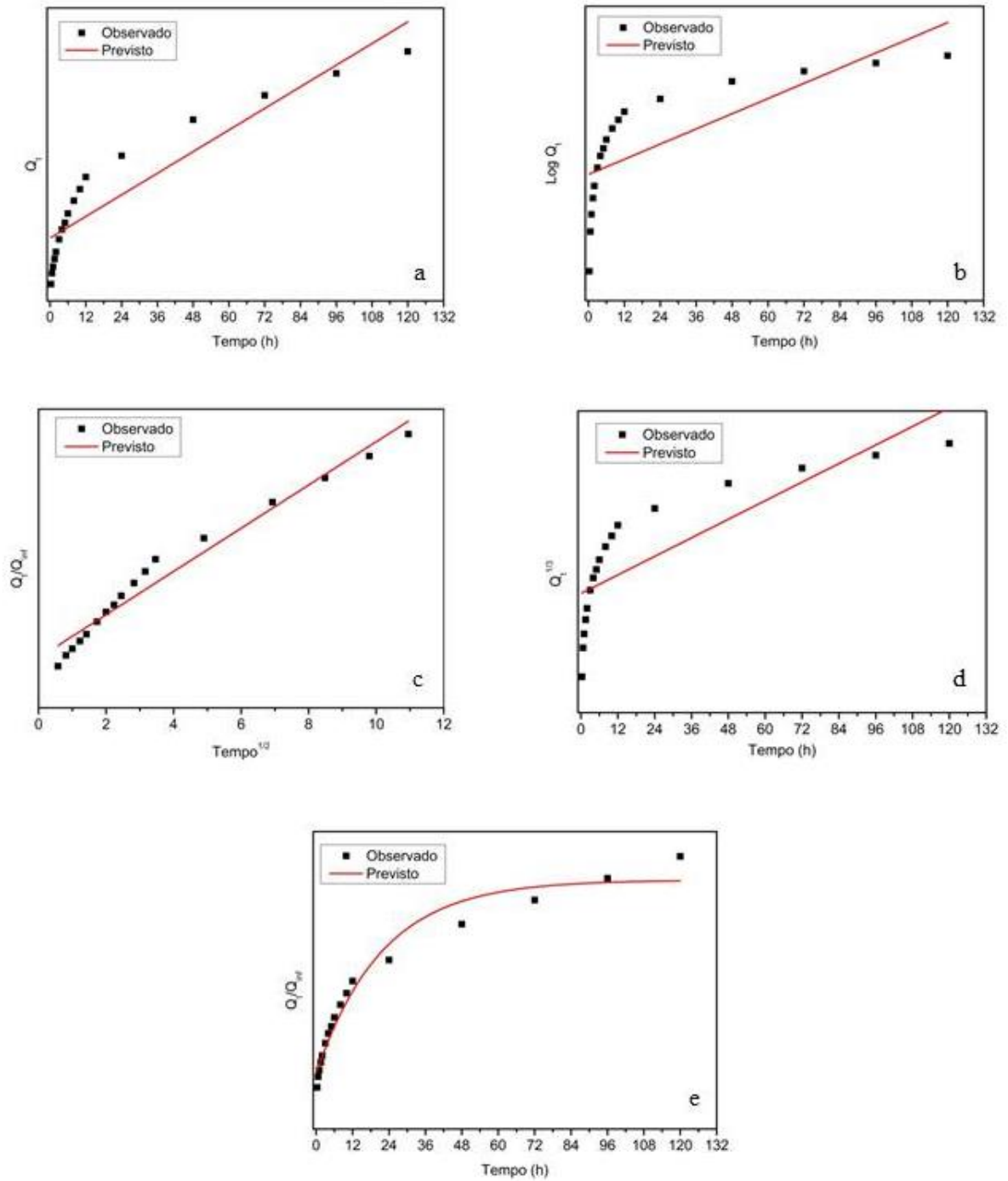
Na Tabela 18 encontram-se os resultados da análise matemática. Os valores de coeficiente de correlação obtidos indicaram que o modelo que mais se adapta aos dados obtidos experimentalmente é o modelo de Korsmeyer-Peppas, com o  $R^2 = 0,9764$ . O valor do expoente de liberação obtido no modelo adequado ( $n = 0,4352$ ) indica que o mecanismo de liberação do AT ocorre por meio de difusão Fickiana. Os gráficos com o perfil previsto e observado para cada modelo encontram-se na Figura 33.

Tabela 18 – Constantes de liberação e coeficientes de correlação das equações matemáticas aplicadas na liberação do acetato de timila.

Ordem zero		Primeira ordem		Higuchi		Hixson-Crowell		Korsmeyer-Peppas		
R <sup>2</sup>	K <sub>0</sub> (h <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	K <sub>1</sub> (h <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	K <sub>H</sub> (h <sup>-1/2</sup> )	R <sup>2</sup>	K <sub>HC</sub> (h <sup>-1/3</sup> )	R <sup>2</sup>	K (h <sup>-1</sup> )	n
0,854	1,230	0,572	0,007	0,968	0,087	0,682	0,022	0,976	0,143	0,435

Outro modelo que obteve um bom coeficiente de correlação foi o de Higuchi (R<sup>2</sup> = 0,9683). Este modelo é baseado no mecanismo de difusão Fickiana, corroborando o modelo matemático de Korsmeyer-Peppas.

Figura 33 – Perfis de liberação previstos mediante os modelos (a) ordem zero, (b) primeira ordem, (c) Higuchi, (d) Hixson-Crowell e (e) Korsmeyer-Peppas.





## 6 CONCLUSÃO

O timol foi acetilado com sucesso, com sua modificação confirmada por FTIR, RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$  e 86% de rendimento. Foram obtidos derivados carboximetilados (GS: 0,22 - 0,32) e sulfatados (GS: 0,11 - 0,17) da goma do cajueiro, e foram produzidas nanopartículas a partir de goma do cajueiro modificada e quitosana. Os sistemas com GCM apresentaram rendimento de 49 a 75%, com tamanho de partícula variando entre 154 a 191 nm, já os sistemas com GCS apresentaram rendimento de 31 a 67%, com tamanho de partícula variando entre 149 e 285 nm. Todas as nanopartículas apresentaram potencial zeta negativo. O sistema QTGCM75 ( $n^+/n^- = 0,75$ ) apresentou as melhores características, com tamanho de partícula 154 nm e -22,2 mV de potencial zeta. Esse sistema foi utilizado para o encapsulamento do acetato de timila. A eficiência de encapsulamento foi de 41% e a capacidade de carregamento do sistema foi de 24%. O perfil de liberação *in vitro* do sistema QTGCM75AT foi controlado, liberando 97% do acetato de timila encapsulado em 120 horas. O modelo cinético que mais se adequou à liberação do acetato de timila foi o Korsmeyer-Peppas, com o mecanismo de liberação sendo através de difusão Fickiana. Assim, o sistema de nanopartícula por complexação polieletrólítica entre quitosana e goma do cajueiro carboximetilada mostrou-se promissor para o encapsulamento do acetato de timila, podendo ser avaliado futuramente para aplicação frente ao nematoide *H. contortus*.

## REFERÊNCIAS

- ABIDI, A.; SEBAI, E.; DHIBI, M.; ALIMI, D.; REKIK, M.; B'CHIR, F.; MAIZELS, R.M.; AKKARI, H. Chemical analyses and anthelmintic effects of *Artemisia campestris* essential oil. **Veterinary Parasitology**, [S.I.], v. 263, p. 59-65, 2018.
- ABREU, F.O.M.S. **Síntese e caracterização de hidrogéis biodegradáveis à base de quitosana com morfologia controlada com potencial aplicação como carreadores de fármacos, in depto de materiais**. 2008. 198f. Tese (Doutorado em Engenharia de Materiais) - Escola de Engenharia Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2008.
- ADIBFAR, A.; AMOABEDINY, G.; ESLAMINEJAD, M. B.; MOHAMADI, J.; BAGHERI, F.; DOULABI, B. Z. VEGF delivery by smart polymeric PNIPAM nanoparticles affects both osteogenic and angiogenic capacities of human bone marrow stem cells. **Materials Science and Engineering: C**, [S.I.], v. 93, p. 790-799, 2018.
- AHUJA, M.; BHATT, D. C. Polyelectrolyte complex of carboxymethyl gum katira-chitosan: Preparation and characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S.I.], v. 106, p. 1184-1191, 2018.
- ALI, S.; KHAN, I.; KHAN, S. A.; SOHAIL, M.; AHMED, R.; REHMAN, A.; ANSARI, M.S.; MORSY, M. A. Electrocatalytic performance of Ni@ Pt core-shell nanoparticles supported on carbon nanotubes for methanol oxidation reaction. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, [S.I.], v. 795, p. 17-25, 2017.
- AMARANTE, A. F. T. Os parasitas de ovinos. São Paulo: Editora UNESP, 2014.
- ANDRE, W. P.; RIBEIRO, W. L.; CAVALCANTE, G. S.; dos SANTOS, J. M.; MACEDO, I. T.; de PAULA, H. C.; de FREITAS, R. M.; de MORAIS, S. M.; de MELO, J. V.; BEVILAQUA, C. M.L. Comparative efficacy and toxic effects of carvacryl acetate and carvacrol on sheep gastrointestinal nematodes and mice. **Veterinary Parasitology**, [S.I.], v. 218, p. 52-58, 2016.
- ANDRÉ, W.P.P.; CAVALCANTE, G.S.; RIBEIRO, W.L.C.; DOS SANTOS, J.M.L.; MACEDO, I.T.F.; DE PAULA, H.C.B.; MORAIS, S.M.; MELO, J.V.; BEVILAQUA, C.M.L. Anthelmintic effect of thymol and thymol acetate on sheep gastrointestinal nematodes and their toxicity in mice. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, [S.I.], v. 26, p. 323-330, 2017.
- ANIRUDHAN, T.S.; SEKHAR, C.V.; NAIR, S.S. Polyelectrolyte complexes of carboxymethyl chitosan/alginate based drug carrier for targeted and controlled release of dual drug. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [S.I.], v. 51, p. 569-582, 2019.
- ARAÚJO-FILHO, J.V.; RIBEIRO, W.L.C.; ANDRÉ, W.P.P.; CAVALCANTE, G.S.; GUERRA, M.C.M.; MUNIZ, C.R.; MACEDO, I.T.F.; RONDON, F.C.M.; BEVILAQUA, C.M.L.; OLIVEIRA, L.M.B. Effects of *Eucalyptus citriodora* essential oil and its major component, citronellal, on *Haemonchus contortus* isolates susceptible and resistant to synthetic anthelmintics. **Industrial Crops and Products**, [S.I.], v. 124, p. 294-299, 2018.

- AYDIN, R.; PULAT, M. 5-Fluorouracil encapsulated chitosan nanoparticles for pH-stimulated drug delivery: evaluation of controlled release kinetics. **Journal of Nanomaterials**, [S.I.], v. 2012, p. 42-51, 2012.
- BALDIM, I.; TONANI, L.; KRESS, M.R.V.Z.; OLIVEIRA, W.P. *Lippia sidoides* essential oil encapsulated in lipid nanosystem as an anti-*Candida* agent. **Industrial Crops & Products**, [S.I.], v. 127, p. 73-81, 2019
- BALIC, A.; BOWLES, V.M.; MEEUSEN, E.N. The immunobiology of gastrointestinal nematode infections in ruminants, **Advances in Parasitology**, [S.I.], v. 45, p. 181-241, 2000.
- BOZIN, B.; MIMICA-DUKIC, N.; SIMIN, N.; ANACKOV, G. Characterization of the Volatile Composition of Essential Oils of Some Lamiaceae Spices and the Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Entire Oils, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S.I.], v. 54, p. 1822-1828, 2006.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal of Food Microbiology**, [S.I.], v. 94(3), p. 223-253, 2004.
- CALO, J. R.; CRANDALL, P. G.; O'BRYAN, C. A.; RICKE, S. C. Essential oils as antimicrobials in food systems—A review. **Food Control**, [S.I.], v. 54, p. 111-119, 2015.
- CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; BEVILAQUA, C.M.L.; MORAIS, S.M.; MACIEL, M.V.; COSTA, C.T.C.; MACEDO, I.T.F.; OLIVEIRA, L.M.B.; BRAGA, R.R.; SILVA, R.A.; VIEIRA, L.S. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. **Veterinary Parasitology**, [S.I.], v. 148(3-4), p. 288-294, 2007.
- CARVALHO, A. F. U.; MELO, V. M. M.; CRAVEIRO, A. A.; MACHADO, M. I. L.; BANTIM, M. B.; RABELO, E. F. Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. against *Aedes aegypti* Linn. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S.I.], v. 98(4), p. 569-571, 2003.
- CARVALHO, C. O.; CHAGAS, A. C. S.; COTINGUIBA, F.; FURLAN, M.; BRITO, L. G.; CHAVES, F.C.M.; STEPHAM, M.P.; BIZZO, H.R.; AMARANTE, A. F. The anthelmintic effect of plant extracts on *Haemonchus contortus* and *Strongyloides venezuelensis*. **Veterinary Parasitology**, [S.I.], v. 183(3-4), p. 260-268, 2012.
- Censo Agropecuário 2017: resultados preliminares, Rio de Janeiro: IBGE, 2018.
- CERCHIARA, T.; ABRUZZO, A.; PAROLIN, C.; VITALI, B.; BIGUCCI, F.; GALLUCCI, M. C.; NICOLETTA, F.P.; LUPPI, B. Microparticles based on chitosan/ carboxymethylcellulose polyelectrolyte complexes for colon delivery of vancomycin. **Carbohydrate Polymers**, [S.I.], v. 143, p. 124-130, 2016.
- CHEN, Y.; ZHANG, H.; WANG, Y.; NIE, S.; LI, C.; XIE, M. Sulfated modification of the polysaccharides from *Ganoderma atrum* and their antioxidant and immunomodulating activities. **Food Chemistry**, [S.I.], v. 186, p. 231-238, 2015.

- CHEN, Y.; ZHANG, H.; WANG, Y.; NIE, S.; LI, C.; XIE, M. Acetylation and carboxymethylation of the polysaccharide from *Ganoderma atrum* and their antioxidant and immunomodulating activities. **Food Chemistry**, [S.I.], v. 156, p. 279-288, 2014.
- CHOI, I.H.; KIM, J.; SHIN, S.C.; PARK, I.K. Nematicidal activity of monoterpenoids against the pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*), **Russian Journal of Nematology**, [S.I.], v. 15, p. 35-40, 2007.
- CINTRA, M.C.R.; TEIXEIRA, V.N.; NASCIMENTO, L.V.; SOTOMAIOR, C.S. Lack of efficacy of monepantel against *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. **Veterinary Parasitology**, [S.I.], v. 216, p. 4-6, 2016.
- CLEMENTE-NAPIMOGA, J.T.; MOREIRA, J.A.; GRILLO, R.; MELO, N.F.S.; FRACETO, L.F.; NAPIMOGA, M.H. 15d-PGJ2-loaded in nanocapsules enhance the antinociceptive properties into rat temporomandibular hypernociception. **Life Sciences**, [S.I.], v. 90, p. 944-949, 2012.
- COSTA, E.M.; SILVA, S.; VEIGA, M.; VICENTE, S.; TAVARIA, F.K.; PINTADO, M.E. Investigation of chitosan's antibacterial activity against vancomycin resistant microorganisms and their biofilms. **Carbohydrate Polymers**, [S.I.], v. 174, p. 369-376, 2017.
- 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**, [S.I.], v. 32, p. 649-660, 2009.
- CUNHA, P.L.R.; MACIEL, J.S.; SIERAKOWSKI, M.R.; PAULA, R.C.M.; FEITOSA, J.P.A. Oxidation of cashew tree gum exudate polysaccharide with TEMPO reagent. **Journal of Brazilian Chemical Society**, [S.I.], v. 18, p. 85-92, 2007.
- DAKHARA, S.; ANAJWALA, C. Polyelectrolyte complex: A pharmaceutical review. **Systematic Reviews in Pharmacy**, [S.I.], v. 1(2), p. 121, 2010.
- DAS, B.P.; TSIANOU, M. From polyelectrolyte complexes to polyelectrolyte multilayers: Electrostatic assembly, nanostructure, dynamics, and functional properties. **Advances in Colloid and Interface Science**, [S.I.], v. 244, p. 71-89, 2017.
- DE PAULA, R. C. M.; RODRIGUES, J. F. Composition and rheological properties of cashew tree gum, the exudate polysaccharide from *Anacardium occidentale L.* **Carbohydrate Polymers**, [S.I.], v. 26(3), p. 177-181, 1995.
- DING, T.; RUDRUM, A. W.; HERRMANN, L. O.; TUREK, V.; BAUMBERG, J. J. Polymer-assisted self-assembly of gold nanoparticle monolayers and their dynamical switching. **Nanoscale**, [S.I.], v. 8, p. 15864-15869, 2016.
- ELANDALOUSI, R.B.; AKKARI, H.; B'CHIR, F.; GHARBI, M.; MHADHBI, M.; AWADI, S.; DARGHOUTH, M.A., *Thymus capitatus* from Tunisian arid zone: Chemical composition and *in vitro* anthelmintic effects on *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, [S.I.], v. 197(1-2), p. 374-378, 2013.

ESMAEILI, A.; ASGARI, A. *In vitro* release and biological activities of Carum copticum essential oil (CEO) loaded chitosan nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S.I.], v. 81, p. 283-290, 2015.

FELIX, P. H. C.; BIRCHAL, V. S.; BOTREL, D. A.; MARQUES, G. R.; BORGES, S. V. Physicochemical and thermal stability of microcapsules of cinnamon essential oil by spray drying. **Journal of Food Processing and Preservation**, [S.I.], v. 41(3), e12919, 2017.

FERREIRA, L.E.; BENINCASA, B.I.; FACHIN, A.L.; FRANÇA, S.C.; CONTINI, S.S.H.T.; CHAGAS, A.C.S.; BELEBONI, R.O. *Thymus vulgaris* L. essential oil and its main component thymol: Anthelmintic effects against *Haemonchus contortus* from sheep. **Veterinary Parasitology**, [S.I.], v. 228, p. 70-76, 2016.

FIDALGO, A.; CIRIMINNA, R.; CARNAROGLIO, D.; TAMBURINO, A.; G. M. L.; CRAVOTTO, G.; GRILLO, G.; ILHARCO, L.M.; PAGLIARO, M. Eco-friendly extraction of pectin and essential oils from orange and lemon peels. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, [S.I.], v. 4(4), p. 2243-2251, 2016.

FILIPPOV, S. K.; BOGOMOLOVA, A.; KABEROV, L.; VELYCHKIVSKA, N.; STAROVOYTOVA, L.; CERNOCHOVA, Z.; ROGERS, S.E.; LAU, W.M.; KHUTORYANSKIY, V.V.; COOK, M. T. Internal nanoparticle structure of temperature-responsive self-assembled PNIPAM-b-PEG-b-PNIPAM triblock copolymers in aqueous solutions: NMR, SANS, and light scattering studies. **Langmuir**, [S.I.], v. 32(21), p. 5314-5323, 2016.

GE, H.; LUO, D. Preparation of carboxymethyl chitosan in aqueous solution under microwave irradiation. **Carbohydrate Research**, [S.I.], v. 340(7), p. 1351-1356, 2005.

GOMES, S.V.F.; NOGUEIRA, P.C.L.; MORAES, V.R.S. Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. **Eclética Química**, [S.I.], v. 36(1), p. 64-77, 2011.

GRANATA, G.; STRACQUADANIO, S.; LEONARDI, M.; NAPOLI, E.; CONSOLI, G.M.L.; CAFISO, V.; STEFANI, S.; GERACI, C. Essential oils encapsulated in polymer-based nanocapsules as potential candidates for application in food preservation. **Food Chemistry**, [S.I.], v. 269, p. 286-292, 2018.

HALEEM, N.; ARSHAD, M.; SHAHID, M.; TAHIR, M. A. Synthesis of carboxymethyl cellulose from waste of cotton ginning industry. **Carbohydrate Polymers**, [S.I.], v. 113, p. 249-255, 2014.

HASEEB, M. T.; KHALIQ, N. U.; YUK, S. H.; HUSSAIN, M. A.; BASHIR, S. Linseed polysaccharides based nanoparticles for controlled delivery of docetaxel: Design, in vitro drug release and cellular uptake. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [S.I.], v. 49, p. 143-151, 2019.

HIGUCHI, T. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S.I.], v. 52, p. 1145-1149, 1963.

HIXSON, A. W.; CROWELL, J. H. Dependence of reaction velocity upon surface and agitation. **Industrial & Engineering Chemistry**, [S.I.], v. 23, p. 923-931, 1931.

HOSSEINI, S.F.; ZANDI, M.; REZAEI, M.; FARAHMANDGHAVI, F. Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and *in vitro* release study. **Carbohydrate Polymers**, [S.I.], v. 95, p. 50-56, 2013.

IMBROGNO, A.; DRAGOSAVAC, M. M.; PIACENTINI, E.; VLADISAVLJEVIC, G. T.; HOLDICH, R. G.; GIORNO, L. Polycaprolactone multicore-matrix particle for the simultaneous encapsulation of hydrophilic and hydrophobic compounds produced by membrane emulsification and solvent diffusion processes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S.I.], v. 135, p. 116-125, 2015.

IVANOV, A.; DAVLETSHINA, R.; SHARAFIEVA, I.; EVTUGYN, G. Electrochemical biosensor based on polyelectrolyte complexes for the determination of reversible inhibitors of acetylcholinesterase. **Talanta**, [S.I.], v. 194, p. 723-730, 2019.

JANA, P.; MITRA, T.; SELVARAJ, T. K. R.; GNANAMANI, A.; KUNDU, P. P. Preparation of guar gum scaffold film grafted with ethylenediamine and fish scale collagen, cross-linked with ceftazidime for wound healing application. **Carbohydrate Polymers**, [S.I.], v. 153, p. 573-581, 2016.

JIANG, J.; MENG, F. Y.; HE, Z.; NING, Y. L.; LI, X. H.; SONG, H.; WANG, J.; ZHOU, R. Sulfated modification of *longan* polysaccharide and its immunomodulatory and antitumor activity *in vitro*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S.I.], v. 67, p. 323-329, 2014.

KATIKI, L.M.; BARBIERI, A.M.E.; ARAÚJO, R.C.; VERÍSSIMO, C.J.; LOUVANDINI, H.; FERREIRA, J.F.S. Synergistic interaction of ten essential oils against *Haemonchus contortus* *in vitro*. **Veterinary Parasitology**, [S.I.], v. 243, p. 47-51, 2017.

KERR, C.; DEROSA, C. A.; DALY, M. L.; ZHANG, H.; PALMER, G. M.; FRASER, C. L. Luminescent Difluoroboron  $\beta$ -Diketonate PLA-PEG Nanoparticle. **Biomacromolecules**, [S.I.], v. 18(2), p. 551-561, 2017.

KHAN, I.; SAEED, K.; KHAN, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. **Arabian Journal of Chemistry**, [S.I.], v.12, p. 908-931, 2017.

KIILLL, C.P.; BARUD, H.S.; SANTAGNELI, S. H.; RIBEIRO, S.J.L.; SILVA, A.M.; TERCJAK, A.; GUTIERREZ, J.; PIRONI, A.M.; GREMIÃO, M.P.D. Synthesis and factorial design applied to a novel chitosan/sodium polyphosphate nanoparticles via ionotropic gelation as an RGD delivery system. **Carbohydrate Polymers**, [S.I.], v. 157, p. 1695-1702, 2017.

KONDURI, M. K.; FATEHI, P. Synthesis and characterization of carboxymethylated xylan and its application as a dispersant. **Carbohydrate Polymers**, [S.I.], v. 146, p. 26-35, 2016.

KORSMEYER, R. W.; GURNY, R.; DOELKER, E.; BURI, P.; PEPPAS, N.A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, [S.I.], v. 15, p. 25-35, 1983.

KRENTSEL, L.; CHAUBET, F.; REBROV, A.; CHAMPION, J.; ERMAKOV, I.; BITTOUN, P.; FERMANDJIAN, S.; LITMANOVICH, A.; PLATÉ, N.; JOZEFONVICZ, J. Anticoagulant activity of functionalized dextrans. Structure analyses of carboxymethylated dextran and first Monte Carlo simulations. **Carbohydrate Polymers**, [S.I.], v. 33(1), p. 63-71, 1997.

KULISIC, T.; RADONIC, A.; KATALINIC, V.; MILOS, M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food Chemistry**, [S.I.], v. 85, p. 633–640, 2004.

LANUSSE, C.; CANTON, C.; VIRKEL, G.; ALVAREZ, L.; COSTA-JUNIOR, L.; LIFSCHITZ, A. Strategies to optimize the efficacy of anthelmintic drugs in ruminants. **Trends in Parasitology**, [S.I.], v. 34, p. 664-682, 2018.

LAURENT, S.; FORGE, D.; PORT, M.; ROCH, A.; ROBIC, C.; VANDER ELST, L.; MULLER, R. N. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. **Chemical Reviews**, [S.I.], v. 108(6), p. 2064-2110, 2008.

LAVERTU, M.; XIA, Z.; SERREQI, A. N.; BERRADA, M.; RODRIGUES, A.; WANG, D.; BUSCHMANN, M.D.; GUPTA, A. A validated <sup>1</sup>H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [S.I.], v. 32(6), p. 1149-1158, 2003.

LEIGNEL, V.; SILVESTRE, A.; HUMBERT, J.F.; CABARET, J. Alternation of anthelmintic treatments: a molecular evaluation for benzimidazole resistance in nematodes. **Veterinary Parasitology**, [S.I.], v. 172, p. 80-88, 2010.

LI, J.; CHI, Z.; YU, L.; JIANG, F.; LIU, C. Sulfated modification, characterization, and antioxidant and moisture absorption/retention activities of a soluble neutral polysaccharide from *Enteromorpha prolifera*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S.I.], v. 105, p. 1544-1553, 2017.

LI, Y.; WU, C.; WU, T.; WANG, L.; CHEN, S.; DING, T.; HU, Y. Preparation and characterization of citrus essential oils loaded in chitosan microcapsules by using different emulsifiers. **Journal of Food Engineering**, [S.I.], v. 217, p. 108-114, 2018.

LIANG, L.; AO, L.; MA, T.; NI, Y.; LIAO, X.; HU, X.; SONG, Y. Sulfated modification and anticoagulant activity of pumpkin (*Cucurbita pepo*, Lady Godiva) polysaccharide. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S.I.], v. 106, p. 447-455, 2018.

LIU, C.; CHEN, H.; CHEN, K.; GAO, Y.; GAO, S.; LIU, X.; LI, J. Sulfated modification can enhance antiviral activities of *Achyranthes bidentata* polysaccharide against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) *in vitro*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S.I.], v. 52, p. 21-24, 2013.

LIU, Y.; LIU, C.; TAN, H.; ZHAO, T.; CAO, J.; WANG, F. Sulfation of a polysaccharide obtained from *Phellinus ribis* and potential biological activities of the sulfated derivatives. **Carbohydrate Polymers**, [S.I.], v. 77(2), p. 370-375, 2009.

LIU, Y.; TANG, Q.; DUAN, X.; TANG, T.; KE, Y.; ZHANG, L.; LI, C.; LIU, A.; SU, Z.; HU, B. Antioxidant and anticoagulant activities of mycelia polysaccharides from *Catathelasma ventricosum* after sulfated modification. **Industrial Crops and Products**, [S.I.], v. 112, p. 53-60, 2018.

MACEDO, I. T. F.; OLIVEIRA, L. M. B. D.; RIBEIRO, W. L. C.; SANTOS, J. M. L.D., SILVA, K. D. C.; ARAÚJO FILHO, J. V. D.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; BEVILAQUA, C. M. L. Anthelmintic activity of *Cymbopogon citratus* against *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, [S.I.], v. 24(3), p. 268-275, 2015.

MACIEL, J. S.; SILVA, D. A.; PAULA, H. C.; De PAULA, R. C. M. Chitosan/carboxymethyl cashew gum polyelectrolyte complex: synthesis and thermal stability. **European Polymer Journal**, [S.I.], v. 41(11), p. 2726-2733, 2005.

MACIEL, J.S. **Géis de goma do cajueiro e derivados com quitosana: síntese, caracterização e ensaios preliminares em sistemas de liberação de fármacos**. 144f. Tese (Doutorado em Química), Fortaleza, Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2005.

MARINO, R.; ATZORI, A.S.; D'ANDREA, M.; LOVANE, G.; TRABALZA-MARINUCCI, M.; RINALDI, L. Climate change: Production performance, health issues, greenhouse gas emissions and mitigation strategies in sheep and goat farming. **Small Ruminant Research**, [S.I.], v. 135, p. 50-59, 2016.

MARTINHO, N.; DAMGÉ, C.; REIS, C.P. Recent advances in drug delivery systems. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, [S.I.], v. 2 p. 510-526, 2011.

MEKA, V. S.; SING, M. K.; PICHIKA, M. R.; NALI, S. R.; KOLAPALLI, V. R.; KESHARWANI, P. A comprehensive review on polyelectrolyte complexes. **Drug Discovery Today**, [S.I.], v. 22(11), p. 1697-1706, 2017.

MILLER, J. E.; BAHIRATHAN, M.; LEMAIRE, S. L.; HEMBRY, F. G.; KEARNEY, M. T.; BARRAS, S. R. Epidemiology of gastrointestinal nematode parasitism in Suffolk and Gulf Coast Native sheep with special emphasis on relative susceptibility to *Haemonchus contortus* infection. **Veterinary Parasitology**, [S.I.], v. 74(1), p. 55-74, 1998.

MOURA NETO, E. D.; MACIEL, J. D. S.; CUNHA, P. L.; de PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. Preparation and characterization of a chemically sulfated cashew gum polysaccharide. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [S.I.], v. 22(10), p.1953-1960, 2011.

NICIURA, S. C. M.; CRUVINEL, G.G.; MORAES, C.V.; CHAGAS, A.C.S.; ESTEVES, S.N.; BENAVIDES, M.V.; AMARANTE, A.F.T. In vivo selection for *Haemonchus contortus* resistance to monepantel. **Journal of Helminthology**, [S.I.], v. 94, 2020.

NOVATO, T.; GOMES, G.A.; ZERINGÓTA, V.; FRANCO, C.T.; OLIVEIRA, D.R.; MELO, D.; CARVALHO, M.G.; DAEMON, E.; MONTEIRO, C.M.O. *In vitro* assessment of the acaricidal activity of carvacrol, thymol, eugenol and their acetylated derivatives on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) **Veterinary Parasitology**, [S.I.], v. 260, p. 1-4, 2018.



- OLIVEIRA, E.F.; PAULA, H.C.B.; PAULA, R.C.M. Alginate/cashew gum nanoparticles for essential oil encapsulation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S.I.], v. 113, p. 146-151, 2014.
- PATRA, J.K.; DAS, G.; FRACETO, L.F.; CAMPOS, E.V.R.; RODRIGUEZ-TORRES, M.; ACOSTA-TORRES, L.S.; DIAZ-TORRES, L.A.; GRILLO, R.; SWAMY, M.K.; SHARMA, S.; HABTEMARIAM, S.; SHIN, H.S. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. **Journal of Nanobiotechnology**, [S.I.], v. 16(1), p. 71, 2018.
- PAULA, R. C. M.; HEATLEY, F.; BUDD, P. M. Characterization of *Anacardium occidentale* exudate polysaccharide. **Polymer International**, [S.I.], v. 45, p. 27-35, 1998.
- PAWLAK, A.; MUCHA, M. Thermogravimetric and FTIR studies of chitosan blends. **Thermochimica Acta**, [S.I.], v. 396(1-2), p. 153-166, 2003.
- PESAVENTO, G.; CALONICO, C.; BILIA, A. R.; BARNABEI, M.; CALESINI, F.; ADDONA, R.; MENCARELLI, L.; CARMAGNINI, L.; DI MARTINO, M.C.; NOSTRO, A. L. Antibacterial activity of Oregano, Rosmarinus and Thymus essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beef meatballs. **Food Control**, [S.I.], v. 54, p. 188-199, 2015.
- PITOMBEIRA, N. A.; NETO, J. G. V.; SILVA, D. A.; FEITOSA, J. P.; PAULA, H. C.; de PAULA, R. C. Self-assembled nanoparticles of acetylated cashew gum: Characterization and evaluation as potential drug carrier. **Carbohydrate Polymers**, [S.I.], v. 117, p. 610-615, 2015.
- QI, H.; WANG, W.X.; DAI, J.L.; ZHU, L. In vitro anthelmintic activity of *Zanthoxylum simulans* essential oil against *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, [S.I.], v. 211, p. 223-227, 2015.
- QIAN, C.; ZHANG, T.; GRAVESANDE, J.; BAYSAH, C.; SONG, X.; XING, J. Injectable and self-healing polysaccharide-based hydrogel for pH-responsive drug release. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S.I.], v. 123, p. 140-148, 2019.
- QIAN, X. P.; ZHA, X. Q.; XIAO, J. J.; ZHANG, H. L.; PAN, L. H.; LUO, J. P. Sulfated modification can enhance antiglycation abilities of polysaccharides from *Dendrobium huoshanense*. **Carbohydrate Polymers**, [S.I.], v. 101, p. 982-989, 2014.
- QU, X.; WIRSEN, A.; ALBERTSSON, A. C. Effect of lactic/glycolic acid side chains on the thermal degradation kinetics of chitosan derivatives. **Polymer**, [S.I.], v. 41(13), p. 4841-4847, 2000.
- RASENTE, R. Y.; IMPERIALE, J. C.; LÁZARO-MARTÍNEZ, J. M.; GUALCO, L.; OBERKERSCH, R.; SOSNIK, A.; CALABRESE, G. C. Dermatan sulfate/chitosan polyelectrolyte complex with potential application in the treatment and diagnosis of vascular disease. **Carbohydrate Polymers**, [S.I.], v. 144, p. 362-370, 2016.

RIBEIRO, A.J.; SOUZA, F.R.L.; BEZERRA, J.M.N.A.; OLIVEIRA, C.; NADVORNY, D.; ROCA SOARES, M.F.RNUNES, L.C.C.; SILVA-FILHO, E.C.; VEIGA, F.; SOBRINHO, J.L.S. Gums' based delivery systems: review on cashew gum and its derivatives. **Carbohydrate Polymers**, [S.I.], v. 147, p. 188–200, 2016.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, [S.I.], v. 31, p. 603-632, 2006.

RODRIGUES, M. N.; OLIVEIRA, M. B.; COSTA, R. R.; MANO, J. F. Chitosan/chondroitin sulfate membranes produced by polyelectrolyte complexation for cartilage engineering. **Biomacromolecules**, [S.I.], v. 17(6), p. 2178-2188, 2016.

ROMERO, A.L.; SPECIAN, V.; OLIVEIRA, R.C.; DINIZ, S.S.S. Atividade do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) contra fungos fitopatogênicos. **UNOPAR Científica: Ciências Biológicas e da Saúde**, [S.I.], v. 11, p. 15-18, 2009.

RUFFELL, A.; RAZA, A.; ELLIOTT, T.P.; KOTZE, A.C. The use of the larval development assay for predicting the *in vivo* efficacy of levamisole against *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary Parasitology**, [S.I.], v. 260, p. 6-11, 2018.

SALGADO, J.A.; SANTOS, C.D.P. Overview of anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes of small ruminants in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, [S.I.], v. 25, p. 3-17, 2016.

SANGSTER, N. C.; COWLING, A.; WOODGATE, R. G. Ten events that defined anthelmintic resistance research. **Trends in Parasitology**, [S.I.], v. 34(7), p. 553-563, 2018.

SANTOS, J.M.L.; VASCONCELOS, J.F.; FROTA, G.A.; FREITAS, E.P.; TEIXEIRA, M.; VIEIRA, L.S.; BEVILÁQUA, C.M.L.; MONTEIRO, J.P. Quantitative molecular diagnosis of levamisole resistance in populations of *Haemonchus contortus*. **Experimental Parasitology**, [S.I.], v. 205, p. 107734, 2019.

SARIKA, P. R.; JAMES, N. R. Polyelectrolyte complex nanoparticles from cationised gelatin and sodium alginate for curcumin delivery. **Carbohydrate Polymers**, [S.I.], v. 148, p. 354-361, 2016.

SEVERINO, P.; SILVA, C.F.; SILVA, M.A.; SANTANA, M.H.A.; SOUTO, E.B. Chitosan cross-linked pentasodium tripolyphosphate micro/nanoparticles produced by ionotropic gelation. **Sugar Technology**, [S.I.], v. 18(1), p. 49-54, 2016.

SHAH, N.N.; SONI, N.; SINGHAL, R.S. Modification of proteins and polysaccharides using dodecenyl succinic anhydride: Synthesis, properties and applications-A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S.I.], v. 107, p. 2224-2233, 2018.a

SIGNINI, R.; CAMPANA-FILHO, S. P. Purificação e caracterização de quitosana comercial. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, [S.I.], v. 8(4), p. 63-68, 1998.

SILVA, D.A.; PAULA, R.C.M.; FEITOSA, J.P.; BRITO, A.C.; MACIEL, J.S.; PAULA, H.C.B. Carboxymethylation of cashew tree exudate polysaccharide. **Carbohydrate Polymers**, [S.I.], v. 58(2), p. 163-171, 2004.

SILVA, D.A.; PAULA, R.C.M.; FEITOSA, J.P.A.; Graft copolymerisation of acrylamide onto cashew gum. **European Polymer Journal**, [S.I.], v. 43, p. 2620-2629, 2007.

SILVA, D. A.; MACIEL, J. S.; FEITOSA, J. P. A.; PAULA, H. C. B.; PAULA, R. C. M. Polysaccharide-based nanoparticles formation by polyelectrolyte complexation of carboxymethylated cashew gum and chitosan. **Journal of Materials Science**, [S.I.], v. 45(20), p. 5605-5610, 2010.

SILVA, F.F.; BEZERRA, H. M. F. F.; FEITOSA, T. F.; VILELA, V. L. R. Nematode resistance to five anthelmintic classes in naturally infected sheep herds in Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, [S.I.], v. 27(4), p. 423-429, 2018.

SILVA, M.S.; COCENZA, D.S.; GRILLO, R.; MELO, N.F.S.; TONELLO, P.S.; OLIVEIRA, L.C.; CASSIMIRO, D.L.; ROSA, A.H.; FRACETO, L.F. Paraquat-loaded alginate/chitosan nanoparticles: preparation, characterization and soil sorption studies. **Journal of Hazardous Materials**, [S.I.], v. 190(1-3), p. 366-374, 2011.

SOUZA, R. D. S.; WANDER, A. E.; DA CUNHA, C. A.; MEDEIROS, J. A. V. Competitividade dos principais produtos agropecuários do Brasil Vantagem comparativa revelada normalizada. **Revista de Política Agrícola**, [S.I.], v. 21(2), p. 64-71, 2012.

SUN, Y.; SUN, W.; GUO, J.; HU, X.; GONG, G.; HUANG, L.; CAO, H.; WANG, Z. Sulphation pattern analysis of chemically sulphated polysaccharide LbGp1 from *Lycium barbarum* by GC-MS. **Food Chemistry**, [S.I.], v. 170, p. 22-29, 2015.

TABARI, M.A.; YOUSSEFI, M.R.; MAGGI, F.; BENELLI, G. Toxic and repellent activity of selected monoterpenoids (thymol, carvacrol and linalool) against the castor bean tick, *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, [S.I.], v. 245, p. 86-91, 2017.

TURNBULL, F.; DEVANEY, E.; MORRISON, A. A.; LAING, R.; BARTLEY, D. J. Genotypic characterisation of monepantel resistance in historical and newly derived field strains of *Teladorsagia circumcincta*. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, [S.I.], v. 11, p. 59-69, 2019.

VAN DEN BROM, R.; MOLL, L.; KAPPERT, C.; VELLEMA, P. *Haemonchus contortus* resistance to monepantel in sheep. **Veterinary Parasitology**, [S.I.], v. 209(3-4), p. 278-280, 2015.

VASILIU, S.; POPA, M.; RINAUDO, M. Polyelectrolyte capsules made of two biocompatible natural polymers, **European Polymer Journal**, [S.I.], v. 41, p. 923-932, 2005.

VERAS, H.N.H.; RODRIGUES, F.F.G.; COLARES, A.V.; MENEZES, I.R.A.; COUTINHO, H.D.M.; BOTELHO, M.A.; COSTA, J.G.M. Synergistic antibiotic activity of volatile compounds from the essential oil of *Lippia sidoides* and thymol, **Fitoterapia**, [S.I.], v. 83, p. 508-512, 2012.

VINOGRADOV, S. V.; BRONICH, T. K.; KABANOV, A. V. Nanosized cationic hydrogels for drug delivery: preparation, properties and interactions with cells. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.I.], v. 54(1), p. 135-147, 2002.

WANG, F.; YANG, Y.; JU, X.; UDENIGWE, C.C.; HE, R. Polyelectrolyte complex nanoparticles from chitosan and acylated rapeseed cruciferin protein for curcumin delivery. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S.I.], v. 66(11), p. 2685-2693, 2018.

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**, [S.I.], v. 81(4), p. 897-905, 2010.

WANG, L. H.; HUANG, G. Q.; XU, T. C.; XIAO, J. X. Characterization of carboxymethylated konjac glucomannan for potential application in colon-targeted delivery. **Food Hydrocolloids**, [S.I.], v. 94, p. 354-662, 2019.

WANG, Z. M.; LI, L.; XIAO, K. J.; WU, J. Y. Homogeneous sulfation of bagasse cellulose in an ionic liquid and anticoagulation activity. **Bioresource Technology**, [S.I.], v. 100(4), p. 1687-1690, 2009.

WATTANASATCHA, A.; RENGPIPAT, S.; WANICHWECHARUNGRUANG, S.; Thymol nanospheres as an effective anti-bacterial agent, **International Journal of Pharmaceutics**, [S.I.], v. 434, p. 360– 365, 2012.

XIAO, H.; FU, X.; CAO, C.; LI, C.; CHEN, C.; HUANG, Q. Sulfated modification, characterization, antioxidant and hypoglycemic activities of polysaccharides from *Sargassum pallidum*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S.I.], v. 121, p. 407-414, 2019.

XU, J.; LIU, W.; YAO, W.; PANG, X.; YIN, D.; GAO, X. Carboxymethylation of a polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* enhances its antioxidant activities *in vitro*. **Carbohydrate Polymers**, [S.I.], v. 78(2), p. 227-234, 2009.

XU, J.; ZHOU, F.; JI, B.P.; PEI, R.S.; XU, N. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**, [S.I.], v. 47, p. 174-179, 2008.

XU, X.; XUE, C.; CHANG, Y.; CHEN, F.; WANG, J. Conformational and physicochemical properties of fucosylated chondroitin sulfate from sea cucumber *Apostichopus japonicus*. **Carbohydrate Polymers**, [S.I.], v. 152, p. 26-32, 2016.

YE, C.C.; ZHAO, F.Y.; WU, J.K.; WENG, X.D.; ZHENG, P.Y.; MI, Y.F.; AN, Q.F.; GAO, C.J. Sulfated polyelectrolyte complex nanoparticles structured nanofiltration membrane for dye desalination. **Chemical Engineering Journal**, [S.I.], v. 307, p. 526-536, 2017.

YOUSEFI, M.; RAHIMI-NASRABADI, M.; POURMORTAZAVI, S. M.; WYSOKOWSKI, M.; JESIONOWSKI, T.; EHRLICH, H.; MIRSADEGHI, S. Supercritical Fluid Extraction of Essential Oils. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, [S.I.], v. 118, p. 182-193, 2019.

ZHANG, J.; TAN, W.; ZHANG, Z.; SONG, Y.; LI, Q.; DONG, F.; GUO, Z. Synthesis, characterization, and the antifungal activity of chitosan derivatives containing urea groups. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S.I.], v. 5, p. 1061-1067, 2018.

ZHANG, Z.; LIU, Z.; TAO, X.; WEI, H. Characterization and sulfated modification of an exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* ZDY2013 and its biological activities. **Carbohydrate Polymers**, [S.I.], v. 153, p. 25-33, 2016.

ZHANG, Z.; WANG, H.; CHEN, T.; ZHANG, H.; LIANG, J.; KONG, W.; YAO, J.; ZHANG, J.; WANG, J. Synthesis and structure characterization of sulfated galactomannan from fenugreek gum. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S.I.], v. 125, p. 1184-1191, 2019.

ZHAO, G.; ZHAI, X.; QU, M.; TONG, C.; LI, W. Sulfated modification of the polysaccharides from *Crassostrea gigas* and their antioxidant and hepatoprotective activities through metabolomics analysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S.I.], v. 129, p. 386-395, 2019.