



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

RAELLE FERREIRA GOMES

**EFEITO DA MASSA MOLAR DA GALACTOMANANA DE *DIMORPHANDRA*
GARDNERIANA NA FORMAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE COPOLÍMEROS DE
GALACTOMANANA/POLI-N-ISOPROPILACRILAMIDA**

FORTALEZA

2020

RAELLE FERREIRA GOMES

EFEITO DA MASSA MOLAR DA GALACTOMANANA DE *DIMORPHANDRA*
GARDNERIANA NA FORMAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE COPOLÍMEROS DE
GALACTOMANANA/POLI-*N*-ISOPROPILACRILAMIDA

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

Orientadora: Prof^ª. Dra. Regina Célia Monteiro de Paula.

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)

- G617e Gomes, Raelle Ferreira.
Efeito da massa molar da galactomanana de *Dimorphandra gardneriana* na formação de nanopartículas de copolímeros de galactomanana/poli-N-isopropilacrilamida / Raelle Ferreira Gomes. – 2020.
72 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2020.
Orientação: Profa. Dra. Regina Célia Monteiro de Paula.
1. Galactomanana. 2. Despolimerização. 3. Copolímero. 4. N-isopropilacrilamida. 5. Nanopartícula. I.
Título.

CDD 540

RAELLE FERREIRA GOMES

EFEITO DA MASSA MOLAR DA GALACTOMANANA DE *DIMORPHANDRA*
GARDNERIANA NA FORMAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE COPOLÍMEROS DE
GALACTOMANANA/POLI-N-ISOPROPILACRILAMIDA

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

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Regina Célia Monteiro de Paula (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª. Dra. Judith Pessoa de Andrade Feitosa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Francisco Helder Almeida Rodrigues
Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)

A Deus.

Aos meus pais e minhas irmãs.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelas oportunidades e por ser minha luz nos momentos de dúvidas.

Aos meus pais (Raimundo Gomes e Goreth Gomes) e minhas irmãs (Rayanne Gomes e Mayanne Gomes) por todo o apoio, amor, incentivo e suporte para enfrentar todos os obstáculos. E minha tia Edite por todo seu amor, carinho e cuidado.

A minha orientadora professora Regina de Paula pela oportunidade, orientação, confiança e suporte dado para a concretização deste trabalho. E as demais professoras do grupo, Judith Feitosa, Pablyana da Cunha e Jeanny Maciel pela colaboração.

Aos meus amigos, em especial a Laylla Rebeca, a Clívia Gomes e ao Lucas Amorim pelas conversas, incentivo e momentos de descontração.

Ao meu orientador dos tempos de iniciação científica Helder Almeida pelo apoio, ajuda e troca de conhecimentos que me possibilitaram chegar até aqui.

Aos meus queridos da UVA, Vanessa Canafístula e Neto Azevedo por todas as trocas de conhecimentos, auxílio, força, estadia e carinho.

A Laís Ramos, minha anja, por toda ajuda, incentivo, paciência, conversas, dúvidas tiradas e suporte dado durante toda a realização deste trabalho.

Ao Irisvan Ribeiro pelo apoio, conversas, dúvidas tiradas e ajuda dada durante a realização deste trabalho.

Ao Carlos Rhamon pelas conversas, risadas e ajuda nas análises de reologia.

A Maria Magalhães pelas dúvidas tiradas, conversas, ajuda e carinho.

Ao grupinho da cantina (Vanessa Canafístula, Irisvan Ribeiro, Carlos Rhamon, Ribamar Paiva, Matheus Xavier, Leonira Moraes, Laís Ramos e Everton Lucas) pelas conversas, apoio, ajuda, carinho, momentos de descontração e risadas.

Aos colegas do Laboratório de Polímeros pelos momentos de descontração, discussões científicas e ajuda de forma direta ou indireta.

A Laís Ramos, Everton Lucas, Venícios Gonçalves e Nádia Pitombeira pela ajuda com as caracterizações dos materiais.

Ao CENAUREM pelas análises de ressonância magnética nuclear.

A Universidade Federal do Ceará e a toda equipe do Programa de Pós-Graduação em Química.

Aos órgãos CNPq, FUNCAP e INOMAT pelo auxílio financeiro ao projeto.

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

We must not forget that when radium was discovered no one knew that it would prove useful in hospitals. The work was one of pure science. And this is a proof that scientific work must not be considered from the point of view of the direct usefulness of it. It must be done for itself, for the beauty of science, and then there is always the chance that a scientific discovery may become like the radium a benefit for humanity.

Marie Curie

RESUMO

A galactomanana da *Dimorphandra gardneriana* (DG) é um polissacarídeo neutro e hidrossolúvel composta por uma cadeia linear de unidades de manose com ramificações de unidades de galactose. Por apresentar massa molar elevada, processos de despolimerização utilizando hidrólise enzimática, ultrassom e hidrólise ácida foram utilizados para diminuir a massa molar e a viscosidade do polissacarídeo, possibilitando sua utilização na formação de nanopartículas. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da massa molar da galactomanana de *Dimorphandra gardneriana* modificada por diferentes processos de despolimerização na síntese de copolímero termossensível com *N*-isopropilacrilamida (NIPAM) e seu potencial como carreador de fármaco. A hidrólise ácida foi o método que resultou em menor redução da massa molar. Os materiais despolimerizados foram analisados por FT-IR e RMN ¹H e apresentaram estrutura química semelhante à da DG, entretanto um aumento na razão manose/galactose foi observado. A síntese dos copolímeros foi confirmada por FT-IR e RMN ¹H com o aparecimento de grupos característicos do poli-*N*-isopropilacrilamida (PNIPAM). Os copolímeros formados com galactomanana de menor massa molar apresentaram maior teor de enxertia de NIPAM, menor concentração de agregação crítica (CAC) e tamanho de partícula a 25 e 50 °C, indicando a influência da massa molar. Os copolímeros apresentaram temperatura de transição superior ao do homopolímero (PNIPAM) e uma redução no tamanho de partícula com o aumento da temperatura. Foram obtidas nanopartículas com tamanhos inferiores a 300 nm e estes materiais apresentaram eficiência de encapsulamento de indometacina variando de 29 a 63%. A nanopartícula com maior eficiência de encapsulamento apresentou uma liberação controlada com máximo de $55,3 \pm 3,2\%$ em 72 horas de estudo. Nanopartículas formadas por copolímeros à base de PNIPAM e galactomanana despolimerizada por hidrólise ácida, apresentam potencial aplicação em sistemas de liberação controlada de fármacos.

Palavras-chave: galactomanana; despolimerização; copolímero; *N*-isopropilacrilamida; nanopartícula.

ABSTRACT

Dimorphandra gardneriana (DG) galactomannan is a neutral, water-soluble polysaccharide composed of a linear chain of mannose units with branches of galactose units. Due to its high molar mass, depolymerization processes using enzymatic hydrolysis, ultrasound and acid hydrolysis were used to decrease the molar mass and the viscosity of the polysaccharide, enabling its use in the formation of nanoparticles. This work aimed to evaluate the effect of the molar mass of galactomannan of *Dimorphandra gardneriana* modified by different depolymerization processes in the synthesis of thermosensitive copolymer with *N*-isopropylacrylamide (NIPAM) and its potential as a drug carrier. Acid hydrolysis was the method that resulted in the least reduction in molar mass. The depolymerized materials were analyzed FT-IR and ¹H NMR and results show that chemical structures were similar to DG, however an increase in the mannose/galactose ratio was observed. The synthesis of copolymers was confirmed by FT-IR and ¹H NMR with the appearance of poly-*N*-isopropylacrylamide (PNIPAM) functional groups. Copolymers formed with galactomannan of lower molar mass showed higher NIPAM grafting content, lower critical aggregation concentration (CAC) and particle size at 25 and 50 °C, indicating the influence of molar mass. The copolymers showed a transition temperature higher than that of the homopolymer (PNIPAM) and a reduction in particle size with increasing temperature. Nanoparticles with sizes smaller than 300 nm were obtained and these materials showed indomethacin encapsulation efficiency ranging from 29 to 63%. The nanoparticle with greater encapsulation efficiency showed a controlled release with a maximum of 55,3 ± 3,2% in 72 hours of study. Nanoparticles formed by copolymers based on PNIPAM and galactomannan depolymerized by acid hydrolysis, have potential application in controlled drug delivery systems.

Keywords: galactomannan; depolymerized; copolymer; *N*-isopropylacrylamide; nanoparticle.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Estrutura de uma galactomanana com razão manose/galactose 2:1	15
Figura 2	– Esquema do processo de enxertia por <i>grafting to</i> (a) e <i>grafting from</i> (b)	18
Figura 3	– Representação esquemática da polimerização de enxertia por iniciação redox de um monômero (M) em uma estrutura polissacarídica	19
Figura 4	– Estruturas moleculares do monômero NIPAM (a) e de seu polímero PNIPAM (b)	20
Figura 5	– Comportamento das cadeias de PNIPAM abaixo (a) e acima (b) da LCST ..	21
Figura 6	– Representação esquemática de uma nanocápsula (a) e uma nanoesfera (b) .	22
Figura 7	– Representação de uma nanopartícula de galactomanana/PNIPAM	23
Figura 8	– Estrutura química da indometacina (IND)	23
Figura 9	– Formação da nanopartícula de galactomanana/PNIPAM	29
Figura 10	– Curva de calibração da IND em DMSO ($\lambda = 318 \text{ nm}$)	33
Figura 11	– Curva de calibração da IND em tampão fosfato (pH 7,4) com lauril sulfato de sódio 0,25% (m/v) ($\lambda = 320 \text{ nm}$)	34
Figura 12	– Espectros de absorção de FT-IR para a DG e seus derivados despolimerizados na faixa de frequência de $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$	36
Figura 13	– Espectro de RMN ^1H (500 MHz, D_2O , $70 \text{ }^\circ\text{C}$) para a DG	37
Figura 14	– Espectros de RMN ^1H (500 MHz, D_2O , $70 \text{ }^\circ\text{C}$) para os materiais despolimerizados	38
Figura 15	– Mecanismo de eluição de uma amostra por GPC	39
Figura 16	– Cromatograma de distribuição da massa molar por GPC para a DG e seus derivados despolimerizados	40
Figura 17	– Perfis de viscosidade <i>versus</i> taxa de cisalhamento de amostras de DG e de seus derivados despolimerizados com concentração 0,1% em água destilada a $25 \text{ }^\circ\text{C}$	42
Figura 18	– Perfis de viscosidade <i>versus</i> taxa de cisalhamento de amostras de DG e de	

seus derivados despolimerizados com concentração 1,0% em água destilada a 25 °C	43
Figura 19 – Representação da perda de unidades de galactose após processos de despolimerização	45
Figura 20 – Espectros de FT-IR da DG, do PNIPAM e dos copolímeros obtidos a partir da galactomanana despolimerizada na faixa de frequência de 4000-400 cm ⁻¹	46
Figura 21 – Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, D ₂ O, 25 °C) para o homopolímero (PNIPAM)	47
Figura 22 – Espectros de RMN ¹ H (500 MHz, D ₂ O, 25 °C) para os copolímeros de galactomanana despolimerizada/PNIPAM	48
Figura 23 – Cromatograma de distribuição da massa molar por GPC para os copolímeros de galactomanana despolimerizada por ultrassom e seu material de partida	50
Figura 24 – Variação da razão I ₃₃₈ /I ₃₃₄ para o pireno em função da concentração (2 x 10 ³ a 0,8 mg mL ⁻¹) dos copolímeros de galactomanana despolimerizada/PNIPAM a 25 e 50 °C	52
Figura 25 – Comportamento dos copolímeros antes (a) e depois da LCST (b)	54
Figura 26 – Relação do tamanho de partícula a cada aumento de 1 °C na temperatura (25 a 50 °C) para os copolímeros de galactomanana despolimerizada/PNIPAM na concentração 1 mg mL ⁻¹	56
Figura 27 – Relação dos diâmetros de partícula a 25 (■) e 50 °C (●) para os copolímeros sintetizados a 25 °C com a massa molar da galactomanana de partida	57
Figura 28 – Perfil de liberação <i>in vitro</i> da IND da nanopartícula CPDGA1/IND com 0,5 mg mL ⁻¹ de fármaco em tampão pH 7,4 + LSS 0,25% (m/v) a 37 °C	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Processos de despolimerização realizados	28
Tabela 2 – Denominação para os copolímeros obtidos	29
Tabela 3 – Valores da razão manose/galactose (M/G) e massa molar de pico para a DG e seus derivados despolimerizados	38
Tabela 4 – Rendimento das reações de enxertia (RE%) após purificação para os copolímeros sintetizados	44
Tabela 5 – Razão molar de NIPAM contido na estrutura da galactomanana para os copolímeros sintetizados	48
Tabela 6 – Teor de nitrogênio (N%) e NIPAM(%) presente nos copolímeros de galactomanana/PNIPAM	49
Tabela 7 – Valores de CAC para as nanopartículas obtidas por fluorescência	53
Tabela 8 – Tabela comparativa com todos os dados obtidos	58
Tabela 9 – Eficiência de encapsulamento e carga de fármaco das nanopartículas de CPDGA em relação a concentração de fármaco e ao teor de NIPAM	59
Tabela 10 – Valores dos coeficientes de determinação (R^2) obtidos a partir de equações dos modelos cinéticos para liberação de indometacina da nanopartícula de CPDGA1	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS	Absorbância
CAC	Concentração de agregação crítica
CAN	Nitrato de amônio cérico
Ce	Cério
CF%	Carga de fármaco
CPDG	Copolímero de <i>Dimorphandra gardneriana</i>
CPDGA	Copolímero de <i>Dimorphandra gardneriana</i> despolimerizada por hidrólise ácida
CPDGEU30	Copolímero de <i>Dimorphandra gardneriana</i> despolimerizada por hidrólise enzimática e por ultrassom por 30 minutos
CPDGEU60	Copolímero de <i>Dimorphandra gardneriana</i> despolimerizada por hidrólise enzimática e por ultrassom por 60 minutos
CPDGU30	Copolímero de <i>Dimorphandra gardneriana</i> despolimerizada por ultrassom por 30 minutos
CPDGU60	Copolímero de <i>Dimorphandra gardneriana</i> despolimerizada por ultrassom por 60 minutos
CPDGA/IND	Nanopartícula de copolímero de <i>Dimorphandra gardneriana</i> despolimerizada por hidrólise ácida com IND encapsulada
DG	<i>Dimorphandra gardneriana</i>
DGA	<i>Dimorphandra gardneriana</i> despolimerizada por hidrólise ácida
DGE	<i>Dimorphandra gardneriana</i> despolimerizada por hidrólise enzimática
DGEU30	<i>Dimorphandra gardneriana</i> despolimerizada por hidrólise enzimática e por ultrassom por 30 minutos
DGEU60	<i>Dimorphandra gardneriana</i> despolimerizada por hidrólise enzimática e por ultrassom por 60 minutos
DGU30	<i>Dimorphandra gardneriana</i> despolimerizada por ultrassom por 30 minutos
DGU60	<i>Dimorphandra gardneriana</i> despolimerizada por ultrassom por 60 minutos
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
DMSO	Dimetilsulfóxido

DSS	2,2-dimetilsilapentano-5-sulfonato de sódio
EE%	Eficiência de encapsulamento
FT-IR	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho
GPC	Cromatografia de permeação em gel
IND	Indometacina
LCST	Temperatura crítica de solução inferior
LSS	Lauril sulfato de sódio
M _{pk}	Massa molar de pico
M/G	Razão manose/galactose
N%	Teor de nitrogênio
NIPAM	<i>N</i> -isopropilacrilamida
NP	Nanopartículas poliméricas
PBS	Tampão fosfato
PNIPAM	Poli- <i>N</i> -isopropilacrilamida
RE%	Rendimento de enxertia
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
V _e	Volume de eluição

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Galactomanana	15
1.2	Despolimerização da galactomanana de <i>Dimorphandra gardneriana</i>	16
1.3	Copolimerização por enxertia	17
1.4	Polimerização via radicais livres	19
1.5	Poli- <i>N</i> -isopropilacrilamida (PNIPAM)	20
1.6	Nanopartículas poliméricas (NP)	21
1.7	Indometacina (IND)	23
2	OBJETIVOS	25
2.1	Objetivo geral	25
2.2	Objetivos específicos	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1	Materiais	26
3.2	Extração da galactomanana de <i>Dimorphandra gardneriana</i>	26
3.3	Processos de despolimerização da galactomanana	26
3.3.1	<i>Despolimerização por hidrólise enzimática (E)</i>	26
3.3.2	<i>Despolimerização por ultrassom (U)</i>	27
3.3.3	<i>Despolimerização por hidrólise ácida (A)</i>	27
3.4	Síntese dos copolímeros por enxertia	28
3.4.1	<i>Rendimento da reação de enxertia (RE%)</i>	29
3.5	Preparação das nanopartículas por auto-organização	29
3.6	Caracterização dos materiais de partida e dos copolímeros obtidos	30
3.6.1	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FT-IR)</i>	30
3.6.2	<i>Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H)</i>	30
3.6.3	<i>Cromatografia de permeação em gel (GPC)</i>	30
3.6.4	<i>Reologia de fluxo</i>	30
3.6.5	<i>Análise elementar (CHN)</i>	31
3.7	Caracterização das nanopartículas obtidas	31
3.7.1	<i>Concentração de agregação crítica (CAC)</i>	31
3.7.2	<i>Espalhamento de luz dinâmico (DLS)</i>	31
3.7.3	<i>Incorporação da indometacina (IND)</i>	32

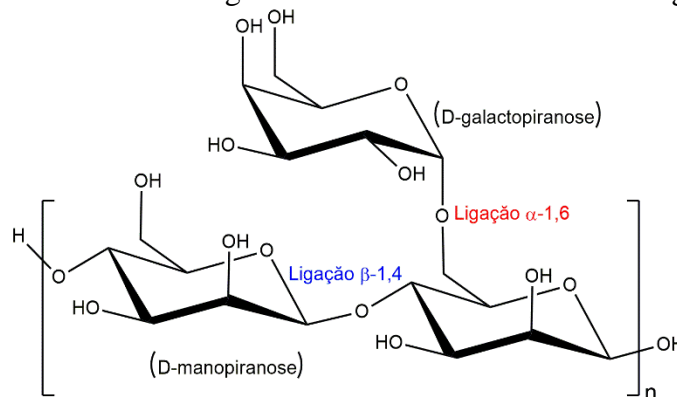
3.7.4	<i>Eficiência de encapsulamento (EE%) e carga de fármaco (CF%)</i>	32
3.7.5	<i>Estudo de liberação in vitro da IND da nanopartícula</i>	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1	Caracterização da DG e seus derivados despolimerizados	35
4.1.1	<i>Rendimento da extração por autoclave</i>	35
4.1.2	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FT-IR)</i>	35
4.1.3	<i>Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H)</i>	36
4.1.4	<i>Cromatografia de permeação em gel (GPC)</i>	39
4.1.5	<i>Reologia de fluxo</i>	42
4.2	Caracterização dos copolímeros por enxertia	44
4.2.1	<i>Rendimento da reação de enxertia (RE%)</i>	44
4.2.2	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FT-IR)</i>	45
4.2.3	<i>Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H)</i>	46
4.2.4	<i>Análise elementar (CHN)</i>	49
4.2.5	<i>Cromatografia de permeação em gel (GPC)</i>	49
4.3	Caracterização das nanopartículas	51
4.3.1	<i>Concentração de agregação crítica (CAC)</i>	51
4.3.2	<i>Espalhamento de luz dinâmico (DLS)</i>	54
4.3.3	<i>Eficiência de encapsulamento (EE%) e carga de fármaco (CF%)</i>	59
4.3.4	<i>Perfil de liberação in vitro da IND da nanopartícula</i>	60
5	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS	64
	APÊNDICE A – ESPECTRO DE RMN ¹H DO COPOLÍMERO DE GALACTOMANANA/POLI-N-ISOPROPILACRILAMIDA (CPDG)	72

1 INTRODUÇÃO

1.1 Galactomanana

As galactomananas são polissacarídeos neutros e hidrossolúveis compostos por uma cadeia linear de unidades β -(1 \rightarrow 4)-D-manopiranosose com unidades de α -(1 \rightarrow 6)-D-galactopiranosose como ramificação (Figura 1), encontradas em endosperma de sementes das plantas, especialmente de espécies da família *Leguminosae* (ROBINSON; ROSS-MURPHY; MORRIS, 1982; RODRIGUEZ-CANTO *et al.*, 2019). As espécies de maior importância comercial são a goma guar (*Cyamopsis tetragonolobus*), a goma alfarroba (*Ceratonia siliqua*) e a goma tara (*Caesalpinia spinosa*) (CUNHA; DE PAULA; FEITOSA, 2009; VILARÓ *et al.*, 2018).

Figura 1 – Estrutura de uma galactomanana com razão manose/galactose 2:1



Fonte: elaborada pela autora.

As galactomananas podem ser obtidas de diferentes espécies vegetais e apresentam a mesma natureza química, mas diferem entre si em relação a massa molar que varia de 10^5 a 10^6 g mol⁻¹ e na razão manose/galactose (M/G) que varia de 1:1 a 5:1. Essas diferenças influenciam na solubilidade, propriedades reológicas e aplicações (PRAJAPATI, *et al.*, 2013; PONZINI *et al.*, 2019). Essa classe de polissacarídeo é considerada um recurso renovável, uma vez que são obtidos de sementes, não havendo a necessidade de destruição da árvore. Compõem o segundo maior grupo de polissacarídeos de reserva no mundo, sendo o amido o primeiro. Pela abundância das espécies vegetais, são de fácil acesso e baixo custo (SALVALAGGIO *et al.*, 2015; ZHOU *et al.*, 2018).

A galactomanana extraída de sementes de *Dimorphandra gardneriana* Tul. (DG) se destaca por apresentar características semelhantes à da goma guar, sendo uma alternativa às gomas tradicionais (CUNHA *et al.*, 2009). Popularmente conhecida por faveira ou fava d'anta,

a planta *Dimorphandra gardneriana* é uma leguminosa nativa brasileira, naturalmente encontrada nos estados do Ceará, Piauí, Maranhão e Bahia (LANDIM; FEITOZA; COSTA, 2013).

O gênero *Dimorphandra* é de grande importância econômica, pois suas vagens apresentam concentrações apreciáveis de flavonoides, principalmente rutina e quercetina, que compõem 10,3% do fruto seco (HUBINGER; SALGADO; MOREIRA, 2009). Esses flavonoides ganham destaque na indústria farmacêutica por apresentarem propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, antimicrobiana e antitumorais (SANTOS; RODRIGUES, 2017).

Estudos com galactomananas oriundas de fontes não tradicionais (*Dimorphandra gardneriana*, *Sesbania cannabina*, *Caesalpinia pulcherrima* e *Delonix regia*) têm sido realizados, visando aplicação como formulação de dispositivos viscoscirúrgicos oftálmicos (PIRES *et al.*, 2010), na produção de sistemas de liberação de fármacos (ALMEIDA *et al.*, 2015), avaliação da atividade anticâncer *in vitro* (ZHOU *et al.*, 2018) e produção de hidrogéis injetáveis (LIMA *et al.*, 2020).

A estrutura química e as propriedades intrínsecas das galactomananas fazem com que elas tenham uma gama de aplicações industriais, mas a goma nativa apresenta algumas desvantagens (elevada massa molar e viscosidade) quando para seu uso na formação de sistemas nanocarreadores (THOMBARE *et al.*, 2016; LINARES *et al.*, 2019). Deste modo, processos de despolimerização incluindo enzimas, ultrasonicação, temperatura e ácido têm sido utilizados para melhorar ou personalizar as propriedades físico-químicas, possibilitando sua utilização na produção de materiais com características específicas (LI *et al.*, 2018a; RODRIGUEZ-CANTO *et al.*, 2019).

1.2 Despolimerização da galactomanana de *Dimorphandra gardneriana*

Os processos de despolimerização são métodos controlados que proporcionam a redução da massa molar e da viscosidade, com a diminuição do tamanho da cadeia dos polissacarídeos (LI *et al.*, 2018a). As despolimerizações por métodos enzimáticos e químicos são as mais comuns. Os métodos físicos como ultrasonicação e irradiação de micro-ondas vêm sendo também explorados para esta finalidade (PRAJAPAT; GOGATE, 2015a).

Métodos combinados vêm sendo aplicados com o intuito de proporcionar uma maior despolimerização destes polímeros. A despolimerização por hidrólise enzimática apresenta capacidade de modificar a estrutura química do polímero devido à sua especificidade, no entanto, algumas enzimas proporcionam uma baixa despolimerização (MAHAMMAD *et al.*, 2007). A ultrasonicação em frequências e níveis de intensidade

adequadas, combinada à hidrólise enzimática, pode melhorar os parâmetros físico-químicos (massa molar e viscosidade) dos polissacarídeos (PRAJAPAT; SUBHEDAR; GOGATE, 2016).

A ultrasonicação é um método físico de despolimerização promissor, que tem sido utilizado para alterar as propriedades estruturais e funcionais de polissacarídeos como a goma guar, quitosana, dextrana, pululana, xantana, pectina, amido, entre outros (RAOUFI *et al.*, 2019). O ultrassom gera cavitação na solução e causa microbolhas. Quando as microbolhas colapsam, a alta energia liberada é convertida em alta pressão e alta temperatura, e pode gerar efeitos físicos e químicos. Os efeitos físicos envolvem forças de cisalhamento e ondas de choque, já os efeitos químicos envolvem a formação de radicais livres, como os radicais hidróxido (-OH^{*}) e hidrogênio (-H^{*}), a partir da decomposição de moléculas de água dentro da cavitação (LI; LI; ZHU, 2018).

A despolimerização por hidrólise ácida é um método químico simples de implementar e apresenta uma vantagem de poder ser realizada em temperaturas elevadas, o que promove maior fluidez das amostras. O processo de despolimerização depende da fonte e concentração do polissacarídeo, do tipo de ácido, do pH do meio, da temperatura e do tempo de despolimerização (WANG; ELLIS; ROSS-MURPHY, 2000; LI *et al.*, 2018a). O ácido clorídrico se mostra o mais adequado para hidrolisar parcialmente polissacarídeos, uma vez que o processo de hidrólise é controlável com o tempo e a despolimerização ocorre de maneira branda em relação a outros ácidos (WANG *et al.*, 2016).

Devido as suas propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade, não toxicidade, entre outras, as galactomananas foram utilizadas em uma variedade de aplicações industriais, tais como: agentes espessantes, estabilizadores de dispersão e em formulações farmacêuticas (CAMPINA *et al.*, 2017; BUSCH *et al.*, 2018). No entanto, para tornar esse material ideal para uso na formação de nanopartículas, geralmente são produzidos novos materiais através da inserção de um polímero sintético ou pela polimerização de um monômero vinílico na cadeia do polissacarídeo, formando um copolímero (DE PAULA; FEITOSA; PAULA, 2015).

1.3 Copolimerização por enxertia

A copolimerização por enxertia é uma técnica promissora e simples de modificar as propriedades de polímeros sintéticos e naturais. Tem recebido considerável atenção nos últimos anos por produzir materiais biodegradáveis com propriedades que possibilitam sua

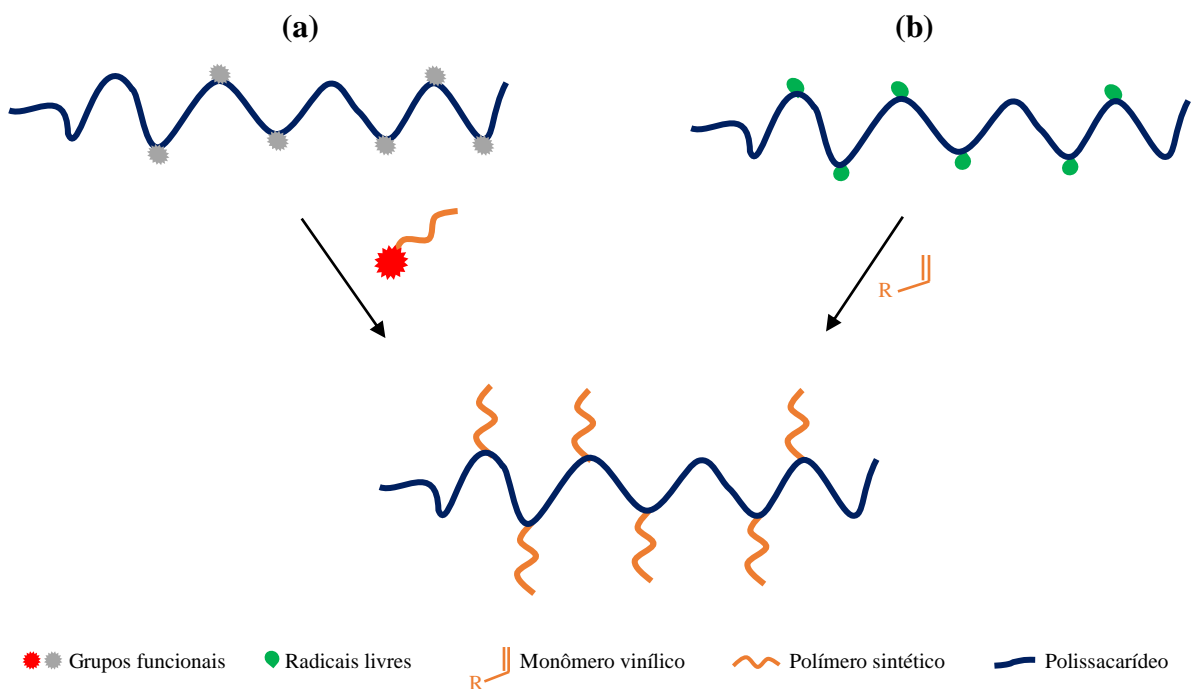
utilização na agricultura, aplicações biomédicas, entre outras (HOSSEINZADEH, 2009; KUMAR *et al.*, 2017).

As propriedades dos copolímeros são definidas pela natureza de seus constituintes, a proporção entre eles e a estrutura molecular (SONI; GOSH, 2018). Copolímeros à base de polissacarídeos consistem em uma cadeia principal de polissacarídeo e uma cadeia lateral de polímero sintético (DE PAULA; FEITOSA; PAULA, 2015).

O método de enxertia pode ser classificado de acordo com o mecanismo de iniciação e com o meio de enxertia. Em geral, a enxertia pode ser realizada por estratégias envolvendo *grafting to* e *grafting from*. A estratégia *grafting to* (Figura 2a), baseia-se na ligação covalente entre o grupo final funcionalizado do polímero pré-formado e o grupo funcional da cadeia principal do polissacarídeo. Já na *grafting from* (Figura 2b), ocorre o crescimento das cadeias do monômero diretamente nos grupos reativos (radicais) da cadeia do polissacarídeo (SHEELA *et al.*, 2016; ALY; EL-BISI, 2018).

A estratégia *grafting from* apresenta vantagem em relação a *grafting to*, por possibilitar uma maior enxertia do monômero na cadeia do polissacarídeo, uma vez que na *grafting to* as primeiras cadeias poliméricas enxertadas impedem a enxertia de outras cadeias (CHEN *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2015; GICQUEL *et al.*, 2019).

Figura 2 – Esquema do processo de enxertia por *grafting to* (a) e *grafting from* (b)



Fonte: elaborada pela autora.

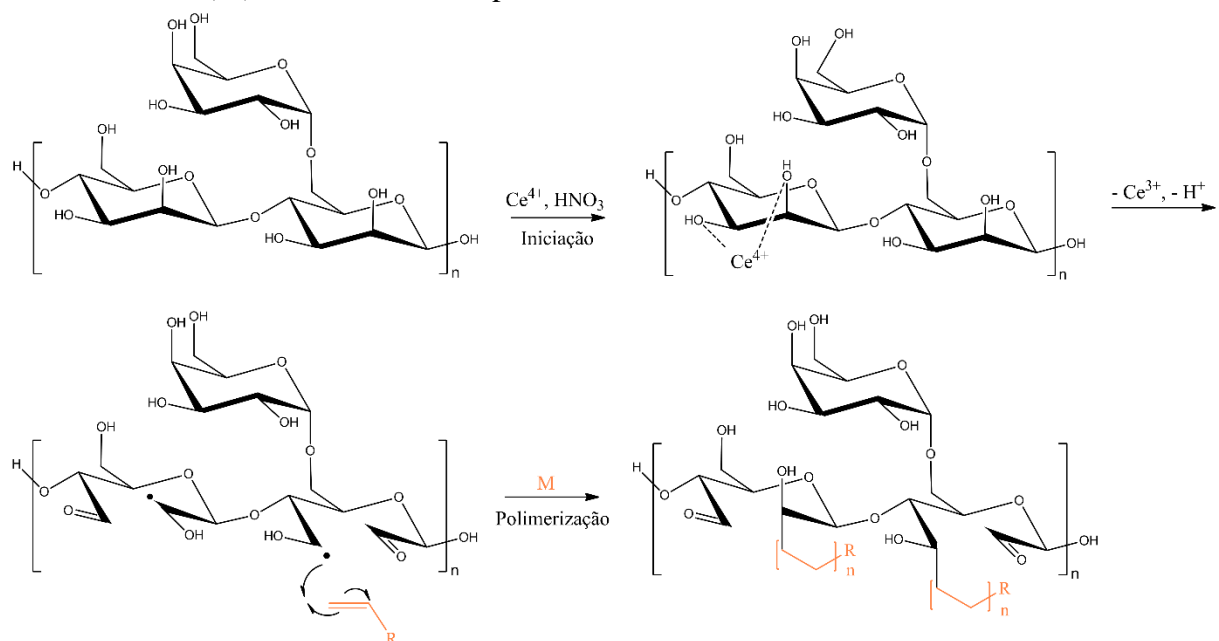
1.4 Polimerização via radicais livres

A polimerização via radicais livres é um método viável para a polimerização de uma ampla variedade de monômeros vinílicos. A enxertia desses monômeros tem sido realizada por iniciadores químicos, como o persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$), persulfato de amônio ($(NH_4)_2S_2O_8$) e nitrato de amônio cérico ($(NH_4)_2Ce(NO_3)_6$). Entre os iniciadores químicos, a enxertia na presença de íons cérico se mostra favorável por ser realizada sob condições brandas, as reações colaterais são mínimas e apresenta alta eficiência de enxertia (GOYAL; KUMAR; SHARMA, 2008; SHEELA *et al.*, 2016).

O nitrato de amônio cérico IV (CAN), um versátil oxidante, tem sido amplamente utilizado em reações de enxertia por apresentar alta reatividade, não toxicidade e atua como um ácido de Lewis compatível com a água (ISIKLAN, KURSUN, 2013).

A reação com íon cérico (Ce^{4+}) dissolvido em ácido nítrico consiste inicialmente na formação de um complexo entre o íon Ce^{4+} e as hidroxilas dos Carbono-2 e Carbono-3 das unidades monossacarídicas. Posteriormente, ele se decompõe em íons Ce^{3+} formando o radical livre nesses carbonos, a partir da abstração do hidrogênio. Esses radicais interagem com os grupos vinílicos do monômero (M) formando o copolímero por enxertia (Figura 3) (GURDAG; SARMAD, 2013).

Figura 3 – Representação esquemática da polimerização de enxertia por iniciação redox de um monômero (M) em uma estrutura polissacarídica



Fonte: Adaptado de Gurdag e Sarmad (2013).

O íon cérico tem sido amplamente empregado como iniciador na reação de enxertia de uma variedade de monômeros vinílicos como a acrilamida (GOYAL; KUMAR; SHARMA, 2008), a *N*-isopropilacrilamida (ABREU *et al.*, 2016) e o metil metacrilato (SCHLACHET *et al.*, 2019) em polissacarídeos.

Nos últimos anos aumentou o interesse em biomateriais inteligentes obtidos pela enxertia de polímeros sensíveis a estímulos como pH e/ou temperatura. O poli-*N*-isopropilacrilamida (PNIPAM) é um polímero sintético responsivo a temperatura, amplamente estudado devido à sua temperatura crítica de solução (32 °C) ser próxima da temperatura fisiológica, o que favorece sua aplicação no desenvolvimento de sistemas com interação biológica (CONZATTI *et al.*, 2019a; GICQUEL *et al.*, 2019).

1.5 Poli-*N*-isopropilacrilamida (PNIPAM)

O PNIPAM é um polímero sintético formado pelo monômero vinílico *N*-isopropilacrilamida (NIPAM) (Figura 4). É um polímero biocompatível e não tóxico com característica termoresponsiva devido a presença de um grupo hidrofóbico (isopropil) e um grupo hidrofílico (amida) (LIU *et al.*, 2017; GICQUEL *et al.*, 2019).

Figura 4 – Estruturas moleculares do monômero NIPAM (a) e de seu polímero PNIPAM (b)

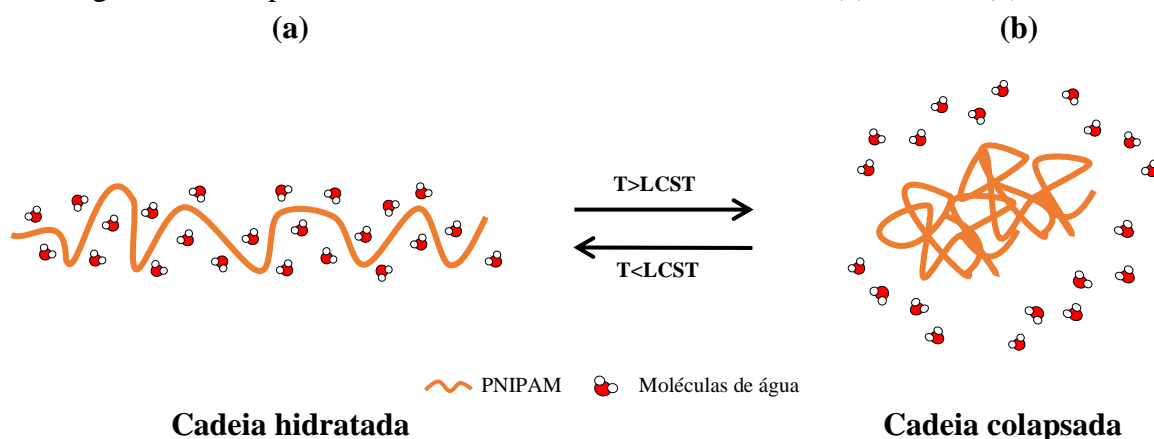


Fonte: elaborada pela autora.

A presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos no PNIPAM são responsáveis por alterar a temperatura crítica de solução inferior (LCST) em soluções aquosas. Em temperaturas inferiores à LCST, o polímero apresenta um caráter hidrofílico, suas cadeias estão expandidas e hidratadas, ocorrendo a formação de ligações de hidrogênio entre os grupos amida do PNIPAM e as moléculas de água (Figura 5a). Em temperaturas superiores à LCST, o polímero tem caráter hidrofóbico, com as cadeias desidratadas e colapsadas, ocorrendo a formação de ligações de hidrogênio entre os grupos amida do PNIPAM (Figura 5b). A LCST pode ser ajustada a partir da inserção de um polímero hidrofóbico que diminui a

LCST ou de um polímero hidrofílico que aumenta a LCST (LANZALACO; ARMELIN, 2017; LIU *et al.*, 2017).

Figura 5 – Comportamento das cadeias de PNIPAM abaixo (a) e acima (b) da LCST



Fonte: adaptado de Lanzalaco e Armelin, 2017.

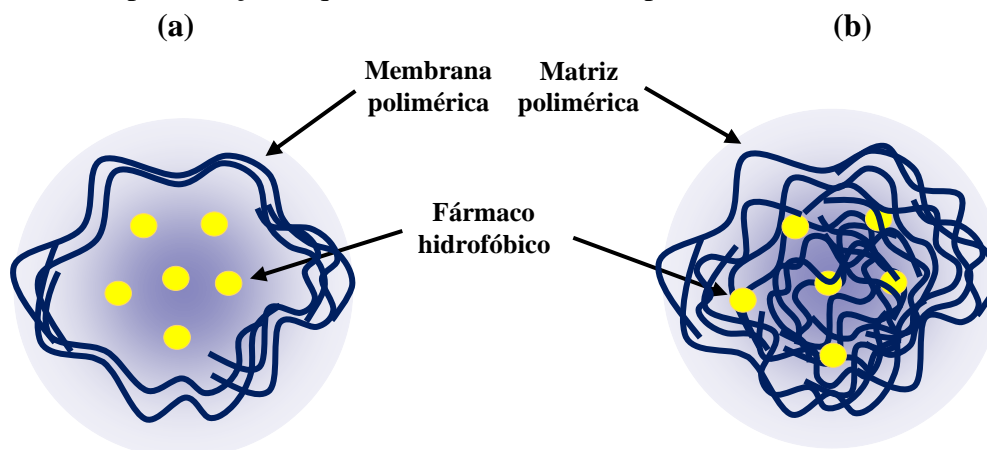
Devido a essa propriedade especial, o PNIPAM tem sido usado na formação de copolímeros com polissacarídeos para projetar nanopartículas poliméricas responsivas a estímulos para fins de carregamento de fármaco. Formação de nanopartículas com dextrana (TAN *et al.*, 2011), goma do cajueiro (ABREU *et al.*, 2016) e pululana (CONSTANTIN *et al.*, 2017) são alguns exemplos.

1.6 Nanopartículas poliméricas (NP)

As nanopartículas poliméricas (NP) são estruturas nanométricas que apresentam dimensão na faixa de 1 a 100 nm. No entanto, para fins farmacêuticos, podem ser classificados como nanopartículas os sistemas que apresentam dimensão com tamanho inferior a 1000 nm (WONG; WU; BENDAYAN, 2012; KHAN; SAEED; KHAN, 2019). Diversos fatores tornam esses materiais vantajosos para uso em formulações farmacêuticas e biomédicas, sendo: eficácia no encapsulamento de fármaco, liberação controlada, melhoram a biodisponibilidade, aumentam a eficácia terapêutica e reduzem os efeitos colaterais da medicação (KUSKOV *et al.*, 2017).

As nanopartículas podem se mostrar na forma de nanocápsulas ou nanoesferas, que diferem entre si em relação a composição e a organização estrutural. As nanocápsulas consistem em um sistema onde o fármaco é mantido confinado em uma cavidade envolta por uma membrana polimérica (Figura 6a), enquanto nas nanoesferas, o fármaco encontra-se dissolvido ou disperso na matriz polimérica (Figura 6b) (RIVAS *et al.*, 2017).

Figura 6 – Representação esquemática de uma nanocápsula (a) e uma nanoesfera (b)



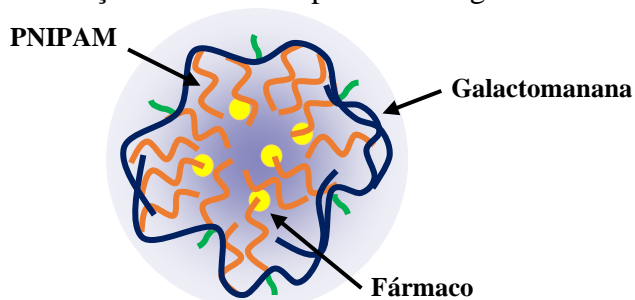
Fonte: elaborada pela autora.

As técnicas de encapsulamento de fármaco nas nanopartículas relatados na literatura, envolvem sonoquímica, secagem por pulverização, diálise ou nanoprecipitação. Dentre essas técnicas, a nanoprecipitação tem sido amplamente utilizada para encapsulamento de fármacos hidrofóbicos (SOUMYA; GHOSH; ABRAHAM, 2010; RIVAS *et al.*, 2017). O processo envolve dissolver o copolímero e o fármaco em um solvente comum e depois adicioná-los lentamente e com agitação moderada a um anti-solvente para o fármaco que seja miscível com o solvente orgânico, normalmente a água (GREENWALD; SASSON; BIANCO-PELED, 2013; BARTHOLD *et al.*, 2019).

As nanopartículas formadas a partir de polímeros naturais (alginato, dextrana, pululana, quitosana, goma do cajueiro, galactomanana) e polímeros sintéticos (poli-lactídeo, poli- ϵ -caprolactona, poli-etilenoglicol, poli-*N*-vinilpirrolidona, poli-*N*-isopropilacrilamida) têm recebido substancial atenção devido a sua versatilidade e por suas estruturas poderem ser modificadas no intuito de encapsular e liberar fármacos nos sítios de ação desejados, bem como para responder a estímulos externos ou fisiológicos específicos (KUSKOV *et al.*, 2017).

As nanopartículas do presente trabalho (Figura 7) apresentam o PNIPAM como núcleo hidrofóbico, que serve como espaço de carga para o fármaco hidrofóbico, e um invólucro hidrofílico (galactomanana) que estabiliza as nanopartículas e pode fornecer locais de ancoragem para as partes direcionadas (TAN *et al.*, 2011). As nanopartículas formadas foram utilizadas para encapsular um fármaco hidrofóbico, a indometacina.

Figura 7 – Representação de uma nanopartícula de galactomanana/PNIPAM

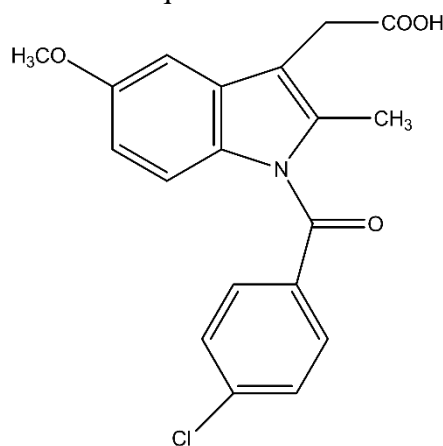


Fonte: elaborada pela autora.

1.7 Indometacina (IND)

A indometacina (Ácido 2-{1-[4-clorofenil]carbonil}-5-metoxi-2-metil-1H-indol-3-il}acético) (Figura 8) é um fármaco anti-inflamatório não-esteroidal usado no alívio de sintomas decorrente de processos inflamatórios, tais como distúrbios reumáticos, enxaquecas, dores pós-traumáticas e pós-operatórias (CARDIAL *et al.*, 2019).

Figura 8 – Estrutura química da indometacina (IND)



Fonte: elaborada pela autora.

É um fármaco hidrofóbico ácido (pKa 4,5), pouco solúvel em meio ácido ou neutro, mas solúvel em soluções alcalinas. Devido sua baixa solubilidade no meio estomacal, a IND pode mostrar baixa biodisponibilidade oral e causar efeitos colaterais devido ao contato prolongado com a mucosa (complicações gastrointestinais graves, aumento da pressão arterial e diminuição da função renal). Deste modo, é importante diminuir as dosagens da medicação e os efeitos colaterais, fornecendo a entrega do fármaco na área de interesse do corpo (KAMBUROVA *et al.*, 2017; DALMORO *et al.*, 2018).

De modo a melhorar sua biodisponibilidade no organismo e reduzir os efeitos colaterais da administração, materiais formados por polímeros naturais e/ou sintéticos vêm sendo utilizados para o carreamento da IND. Nanopartículas de goma do cajueiro acetilada (PITOMBEIRA *et al.*, 2015), microesferas de hidrogel de PNIPAM/carboximetilquitosana (RODKATE; RUTNAKORNPITUK, 2016), nanopartículas de pululana/PNIPAM (CONSTANTIN *et al.*, 2017), membranas de quitosana/xantana (LOPES *et al.*, 2019) e emulsões de pickering de goma do cajueiro (CARDIAL *et al.*, 2019) são alguns exemplos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a formação de nanopartículas de copolímeros à base de poli-*N*-isopropilacrilamida e galactomanana (*Dimorphandra gardneriana*) de massas molares distintas obtidas por diferentes processos de despolimerização.

2.2 Objetivos específicos

- Despolimerizar a galactomanana por hidrólise enzimática, ultrassom ou hidrólise ácida;
- Caracterizar a galactomanana e seus derivados despolimerizados por espectroscopia na região do infravermelho (FT-IR) e ressonância magnética nuclear (RMN ¹H);
- Estimar a massa molar da galactomanana e de seus derivados despolimerizados por cromatografia de permeação em gel (GPC) e a viscosidade por reologia de fluxo;
- Sintetizar copolímeros de galactomanana/poli-*N*-isopropilacrilamida;
- Caracterizar os copolímeros por espectroscopia na região do infravermelho (FT-IR), ressonância magnética nuclear (RMN ¹H) e cromatografia de permeação em gel (GPC);
- Investigar a formação de nanopartículas via auto-organização de copolímeros de galactomanana/poli-*N*-isopropilacrilamida por fluorescência e por espalhamento de luz dinâmico (DLS);
- Determinar a eficiência de encapsulamento (EE) e carga de fármaco (CF) das nanopartículas incorporadas com o fármaco indometacina e avaliar o perfil e o mecanismo de liberação *in vitro*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

A enzima β -Galactosidase (*Kluyveromyces lactis*) (≥ 2600 U g⁻¹), o monômero *N*-isopropilacrilamida (NIPAM) 97% (m/m) e o fármaco indometacina (IND) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. O iniciador nitrato de amônio cérico (CAN) foi adquirido da Acrós Organics. O ácido acético, ácido clorídrico, ácido nítrico, hidróxido de sódio, fosfato de sódio, álcool etílico, acetona e dimetilsulfóxido (DMSO) foram adquiridos da Synth. O lauril sulfato de sódio e o fosfato de potássio são oriundos da Vetec.

A membrana de diálise com limite de massa molar 14.000 g mol⁻¹ foi adquirida da Sigma-Aldrich e com limite de massa molar 1.000 g mol⁻¹ da Spectra/por.

As sementes de Fava D'anta (*Dimorphandra gardneriana* Tul.) foram provenientes da Chapada do Araripe na região do Cariri-CE, coletadas em agosto de 2012.

3.2 Extração da galactomanana de *Dimorphandra gardneriana*

Sementes da galactomanana (50,0 g) foram lavadas e dispostas em placa de Petri encoberta com algodão umedecido com água destilada. A placa foi mantida em autoclave por uma hora e trinta minutos na pressão de trabalho (1,0 a 1,5 bar) para o intumescimento das sementes. Os endospermas foram separados manualmente da casca e do embrião e, em seguida, mantidos de um dia para o outro em água destilada. Para melhorar a homogeneização, foi adicionada água destilada (1500 mL) e os endospermas foram triturados por 20 minutos. A solução viscosa foi centrifugada (6000 rpm, 30 minutos, 25 °C) e o sobrenadante foi coletado e precipitado em álcool etílico (1:2 v/v). O precipitado obtido foi filtrado em funil de placa sinterizada n° 3, lavado três vezes com álcool etílico PA e acetona. A galactomanana (retida no filtro) foi macerada e seca em almofariz com ar quente. O material obtido foi denominado como DG.

3.3 Processos de despolimerização da galactomanana

3.3.1 Despolimerização por hidrólise enzimática (E)

A metodologia utilizada foi baseada na descrita por Brun-Graepi *et al.* (2010) e Sakakibara *et al.* (2017). A galactomanana (DG) foi dissolvida em 25 mL de água destilada sob agitação magnética por 24 horas a 25 °C para preparar uma solução de concentração 2,0% m/v. A enzima em solução foi dispersa em 25 mL de tampão acetato (pH 5,0) para preparar uma solução com concentração 32 U mL⁻¹. As duas soluções foram colocadas em uma cuba acoplada a um banho termostático com temperatura constante de 50 °C, permanecendo por 15

horas sob agitação magnética. Para finalizar a reação, a solução foi aquecida a 100 °C por 10 minutos e resfriada a temperatura ambiente. Posteriormente, a solução foi precipitada em álcool etílico hidratado (1:2 v/v) e redispersa em água destilada. Após três ciclos de precipitação/redispersão, foi lavada com acetona e, em seguida, macerada e seca em almofariz com ar quente, obtendo-se o material purificado que foi denominado de DGE.

3.3.2 Despolimerização por ultrassom (U)

A galactomanana (DG e DGE) foi dissolvida em 80 mL de água destilada sob agitação magnética por 24 horas a 25 °C para preparar uma solução de concentração 0,1% m/v. O processo de sonicação das soluções foi realizado utilizando um processador ultrassônico (VCX-750 ultrasonic) com dissipação de potência nominal de 20 W, operando com 30 s ON e 30 s OFF em dois intervalos de tempos (30 e 60 minutos) a 15 °C. Os materiais obtidos foram secos por liofilização. Os materiais obtidos a partir da DGE foram denominados de DGEU30 e DGEU60 e os obtidos a partir da DG foram denominados de DGU30 e DGU60. Os números 30 e 60 fazem referência aos tempos de sonicação.

3.3.3 Despolimerização por hidrólise ácida (A)

A galactomanana (DG) foi dissolvida em 50 mL de água destilada sob agitação magnética por 24 horas a 25 °C para preparar uma solução de concentração 1,0% m/v. A solução teve seu pH ajustado para 2,0 utilizando uma solução de ácido clorídrico 1 mol L⁻¹ e foi mantida sob agitação magnética por 5 horas na temperatura de 80 °C. Após este período, foi resfriada a temperatura ambiente e neutralizada com solução de hidróxido de sódio 1 mol L⁻¹. A solução foi dialisada em membrana de celulose (14.000 g mol⁻¹) contra água destilada (7 dias) para promover a retirada dos sais formados, com trocas de água a cada 24 horas e o fim da diálise foi determinado por condutividade. O material foi seco por liofilização e denominado de DGA.

A Tabela 1 apresenta o resumo dos processos de obtenção dos derivados despolimerizados.

Tabela 1 – Processos de despolimerização realizados

Materiais	Processo de despolimerização	Tempo de despolimerização (horas)
DGE	Hidrólise enzimática	15
DGEU30	Hidrólise enzimática e	0,5
DGEU60	ultrassom	1
DGU30	Ultrassom	0,5
DGU60	Ultrassom	1
DGA	Hidrólise ácida	5

Fonte: dados da pesquisa.

3.4 Síntese dos copolímeros por enxertia

Os copolímeros a partir de galactomanana foram sintetizados com base na metodologia proposta por Abreu *et al.* (2016), com modificações. Foi preparada uma solução de galactomanana com concentração 0,5% m/v em 20 mL de água destilada sob agitação magnética por 24 horas a 25 °C. Inicialmente, a solução foi borbulhada por 30 minutos com fluxo de nitrogênio. Em seguida, foi introduzido o iniciador CAN dissolvido em 1 mL de solução de ácido nítrico 0,1 mol L⁻¹ (razão molar unidade glicosídica:CAN = 1:0,14) para gerar radicais livres na galactomanana possibilitando a enxertia do monômero NIPAM. Posteriormente, o monômero NIPAM (razão molar DG:NIPAM = 1:1,5) foi adicionado e a reação prosseguiu por 6 horas sob agitação magnética e em atmosfera de nitrogênio. Para finalizar a reação, a solução foi neutralizada pela adição de solução de hidróxido de sódio 1 mol L⁻¹ e, em seguida, dialisada em membrana de celulose (14.000 g mol⁻¹) contra água destilada (7 dias), para promover a retirada dos materiais que não reagiram e o excesso de sais formados, com trocas de água a cada 24 horas e o fim da diálise foi determinado por condutividade. Os copolímeros obtidos foram secos por liofilização e denominados como exposto na Tabela 2.

O processo de purificação dos copolímeros foi realizado a fim de remover o homopolímero (PNIPAM) que não foi enxertado durante a reação. O copolímero (100 mg) foi disperso em acetona (25 mL) e mantido sob agitação magnética por 48 horas a 25 °C. O copolímero é insolúvel em acetona, enquanto que o homopolímero é solúvel. Após esse período, o copolímero, insolúvel em acetona, foi separado do homopolímero por centrifugação (6000 rpm, 15 minutos, 25 °C) e, posteriormente, foi redisperso em água destilada e seco por liofilização (AN *et al.*, 2010).

Tabela 2 – Denominação para os copolímeros obtidos

Galactomanana	Copolímeros
DG	CPDG
DGEU30	CPDGEU30
DGEU60	CPDGEU60
DGU30	CPDGU30
DGU60	CPDGU60
DGA	CPDGA1
	CPDGA2

Temperatura de reação = 25 °C, exceto CPDGA2 (T = 70 °C).

Fonte: dados da pesquisa.

3.4.1 Rendimentos da reação de enxertia (RE%)

O rendimento de enxertia foi obtido a partir da Equação 1.

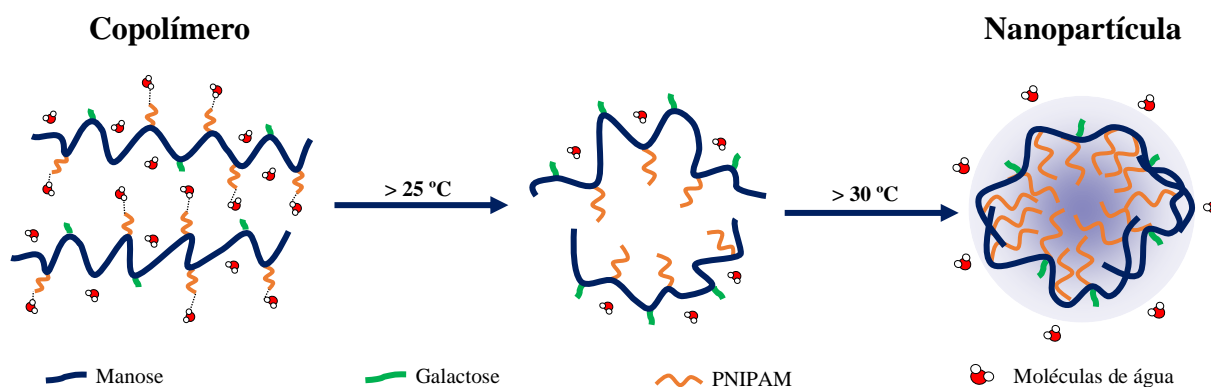
$$RE (\%) = \frac{m_{CPp}}{m_{DG} + m_{NIPAM}} \times 100\% \quad (1)$$

onde m_{CPp} é a massa de copolímero purificado (mg); m_{DG} a massa de galactomanana usada (mg) e m_{NIPAM} a massa de monômero usada (mg).

3.5 Preparação das nanopartículas por auto-organização

Os copolímeros que apresentam PNIPAM em sua composição possuem a característica termoresponsiva e em meio aquoso tendem a se auto-organizar formando as nanopartículas. Diante disto, as nanopartículas foram preparadas via auto-organização, utilizando soluções dos copolímeros com concentração 1 mg mL⁻¹ em água destilada, mediante aquecimento (Figura 9) (ABREU *et al.*, 2016).

Figura 9 – Formação da nanopartícula de galactomanana/PNIPAM



Fonte: elaborada pela autora.

3.6 Caracterização dos materiais de partida e dos copolímeros obtidos

3.6.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FT-IR)

Os espectros de absorção de FT-IR para a DG, os seus derivados despolimerizados, o PNIPAM e os copolímeros foram obtidos em pastilhas de brometo de potássio (KBr) através do espectrofotômetro Shimadzu IR Trace-100 na região de 4000 a 400 cm^{-1} .

3.6.2 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H)

Os espectros de ^1H da DG e de seus derivados despolimerizados em D_2O (2,5% m/v) a 70 °C e dos copolímeros e do PNIPAM em D_2O (2,5% m/v) a 25 °C foram obtidos em espectrômetro 500 MHz Bruker Avance DRX-500, utilizando o 2,2-dimetilsilapentano-5-sulfonato de sódio (DSS) como padrão interno (0,0 ppm).

3.6.3 Cromatografia de permeação em gel (GPC)

A determinação da distribuição de massa molar da DG, de seus derivados despolimerizados e dos copolímeros foi realizada por GPC através de um cromatógrafo Shimadzu LC-20AD acoplado a um detector de índice de refração (RID-10A), com uma coluna PolySep Linear (300 mm x 7,8 mm) como fase estacionária e nitrato de sódio (NaNO_3) (0,1 mol L^{-1}) como eluente, a um fluxo de 1 mL min^{-1} à 30 °C. Para calibração foram utilizados padrões de pululana Shodex P-82. As amostras, em água deionizada com concentração 1 mg mL^{-1} , foram filtradas em membrana de 0,22 μm e foi injetado um volume de 50 μL .

Os valores das massas molares de pico (M_{pk}) para a DG e seus derivados despolimerizados foram calculados a partir da curva padrão ($R^2 = 0,991$) (Equação 2), onde V_e representa o volume de eluição obtido nos cromatogramas de GPC.

$$\log M_{pk} = 14,4097 - 1,1392V_e \quad (2)$$

3.6.4 Reologia de fluxo

A viscosidade da DG e de seus derivados despolimerizados em soluções aquosas (0,1 e 1,0% m/v) foram avaliadas através de um reômetro TA Instruments Advanced AR-550, com geometria cone-placa de 60 mm de diâmetro a 25 °C com taxa de cisalhamento variando de 0,1-100 s^{-1} .

3.6.5 Análise elementar

O teor de NIPAM (NIPAM%) presente nos copolímeros foi calculado a partir da Equação 3 (GHIMICI; CONSTANTIN, 2011), utilizando o teor de nitrogênio (N%) obtido por microanálise elementar através de um Analisador Elementar Perkin Elmer-2400 series ii no modo CHN.

$$NIPAM(\%) = \frac{N\%}{14} \times 113 \quad (3)$$

onde 14 g mol⁻¹ representa a massa molar do nitrogênio e 113 g mol⁻¹ representa a massa molar do monômero (NIPAM).

3.7 Caracterização das nanopartículas obtidas

3.7.1 Concentração de agregação crítica (CAC)

A CAC foi determinada por fluorescência a partir do procedimento descrito por Patrizi *et al.* (2009). Uma solução estoque de pireno com concentração 5 x 10⁻⁷ mol L⁻¹ em 500 mL de água deionizada foi preparada a partir de 500 µL de uma solução de pireno com concentração 5 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ em acetona. A acetona foi evaporada por fluxo de nitrogênio.

As soluções dos copolímeros com concentrações de 2 x 10⁻³ a 0,8 mg mL⁻¹ foram preparadas por dissolução em solução de pireno com concentração 5 x 10⁻⁷ mol L⁻¹. Os espectros de fluorescência foram obtidos utilizando um espectrofluorímetro Shimadzu RF-6000 equipado com um banho termostatizado Eyela NTT-2200 ligado ao compartimento da célula. Os espectros de excitação (320-350 nm) foram obtidos usando um comprimento de onda de emissão (λ_{em}) de 374 nm. A razão de intensidade (I₃₃₈/I₃₃₄) contra a concentração logarítmica dos copolímeros foi usada para determinar a CAC. A largura da fenda para emissão e excitação (5 nm) foi usada para todas as medições. As amostras foram colocadas em cubeta de vidro e as medidas foram realizadas em duplicata à 25 e 50 °C. Para as medições a 50 °C, as soluções foram aquecidas por 4 minutos antes da obtenção dos espectros.

3.7.2 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

A temperatura de transição de fase (LCST) do copolímero, a qual ocorre a formação das nanopartículas por auto-organização e o diâmetro hidrodinâmico (D_h) das partículas, foi determinada por DLS em equipamento Malvern Nano Zeta Sizer ZS-3600, com laser no comprimento de onda de 633 nm e ângulo de espalhamento de 173°. A solução do

copolímero com concentração 1 mg mL^{-1} foi colocada em cubeta de vidro e aquecida no próprio equipamento. As medidas foram realizadas com um incremento de $1 \text{ }^\circ\text{C}$, no intervalo de 25 a $50 \text{ }^\circ\text{C}$, com tempo de equilíbrio de 4 minutos antes de cada análise.

3.7.3 Incorporação da indometacina (IND)

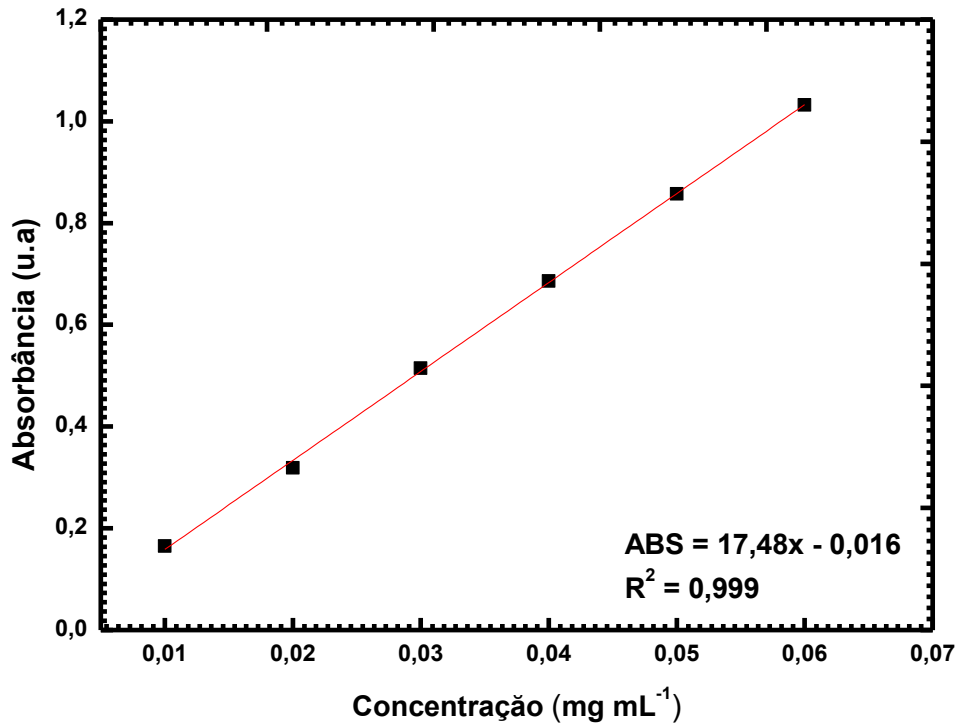
A incorporação da IND nas nanopartículas foi realizada pela técnica de nanoprecipitação a $40 \text{ }^\circ\text{C}$.

O copolímero (CPDGA1 e CPDGA2) e o fármaco foram dissolvidos em DMSO. A solução do fármaco com diferentes concentrações ($0,5$ e 1 mg mL^{-1}) foi adicionada à solução do copolímero com concentração 1 mg mL^{-1} e manteve sob agitação magnética por 30 minutos a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. A solução resultante foi gotejada em 20 mL de água destilada a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ sob agitação magnética e permaneceu por 5 minutos. Posteriormente, foi lentamente vertida em 20 mL de água destilada a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ sob agitação magnética e permaneceu por 10 minutos. A solução resultante foi dialisada em membrana de celulose ($14.000 \text{ g mol}^{-1}$) contra água destilada a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ por 48 horas para remover o solvente, em recipiente protegido da luz e o fim da diálise foi determinado por absorção ($190 - 300 \text{ nm}$) no espectrofotômetro UV-vis Shimadzu UV-1800. Os materiais foram secos por liofilização e denominados de CPDGA1/IND e CPDGA2/IND.

3.7.4 Eficiência de encapsulamento (EE%) e carga de fármaco (CF%)

A quantidade de IND encapsulada foi determinada dissolvendo 5 mg das nanopartículas (CPDGA1/IND e CPDGA2/IND) em 5 mL de DMSO sob agitação magnética a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, seguida de centrifugação (10.000 rpm , 30 minutos, $25 \text{ }^\circ\text{C}$), de modo que a matriz das nanopartículas fossem rompida e o fármaco encapsulado liberado. A determinação da eficiência foi feita por absorção, utilizando um espectrofotômetro UV-vis Shimadzu UV-1800 a 318 nm e foi calculada utilizando uma curva de calibração de IND em DMSO (Figura 10), relacionando a absorbância (ABS) com a concentração.

Figura 10 – Curva de calibração da IND em DMSO ($\lambda = 318 \text{ nm}$)



Fonte: dados da pesquisa.

A eficiência de encapsulamento (EE%) e o teor de carga de fármaco (CF%) foram determinados utilizando as Equações 4 e 5, respectivamente.

$$EE(\%) = \frac{m_{IND-NP}}{m_{IND-AD}} \times 100 \quad (4)$$

onde m_{IND-NP} é a massa de IND encapsulada (mg mL^{-1}) e m_{IND-AD} é a massa de IND adicionada nas nanopartículas (mg mL^{-1}).

$$CF(\%) = \frac{m_{IND-NP}}{m_{NP}} \times 100 \quad (5)$$

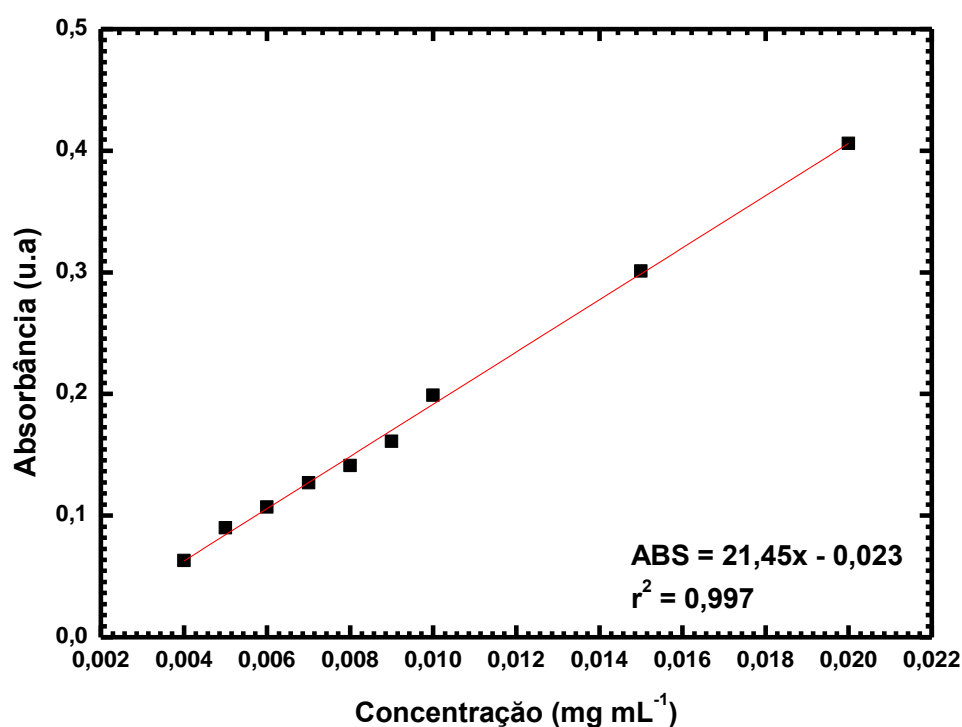
onde m_{IND-NP} é a massa de IND encapsulada (mg mL^{-1}) e m_{NP} é a massa de nanopartícula utilizada (mg mL^{-1}).

3.7.5 Estudo de liberação *in vitro* da IND da nanopartícula

O perfil de liberação *in vitro* da IND da nanopartícula CPDGA1/IND com $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ de fármaco foi obtida usando um sistema de diálise. A amostra dispersa em 3 mL de

solução tampão fosfato (PBS, pH 7,4) contendo lauril sulfato de sódio 0,25% (LSS) (m/v) foi introduzida em membrana de celulose (1.000 g mol^{-1}) e dialisada contra 20 mL de solução tampão pH 7,4 + LSS 0,25% (m/v) por 72 horas a 37 °C. Foram retiradas alíquotas de 3 mL em determinados intervalos de tempo e analisadas em um espectrofotômetro UV-vis Shimadzu UV-1800 a 320 nm. As medidas de absorbância foram convertidas na porcentagem de fármaco liberado de acordo com uma curva de calibração previamente construída (Figura 11).

Figura 11 – Curva de calibração da IND em tampão fosfato (pH 7,4) com lauril sulfato de sódio 0,25% (m/v) ($\lambda = 320 \text{ nm}$)



Fonte: dados da pesquisa.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização da DG e de seus derivados despolimerizados

4.1.1 Rendimento da extração por autoclave

O processo de extração do polissacarídeo das sementes da *D. gardneriana* por autoclave apresentou um rendimento de 33,0% em relação à massa das sementes. O valor obtido foi próximo aos relatados na literatura para a mesma espécie: 31,0% (CUNHA *et al.*, 2009) e 32,5% (PIRES *et al.*, 2010) que foram obtidos por método diferente.

A variação no rendimento dentro da mesma espécie está relacionada aos aspectos morfológicos, as condições de colheita (isto é, quantidade de endosperma na semente), a origem geográfica (variabilidade genética, clima e condições do solo) e pelo processo de extração (VILARÓ *et al.*, 2018).

4.1.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FT-IR)

A Figura 12 mostra os espectros de amostras da DG e de seus derivados despolimerizados por hidrólise enzimática, ultrassom e hidrólise ácida, os quais foram analisados por espectroscopia de FT-IR.

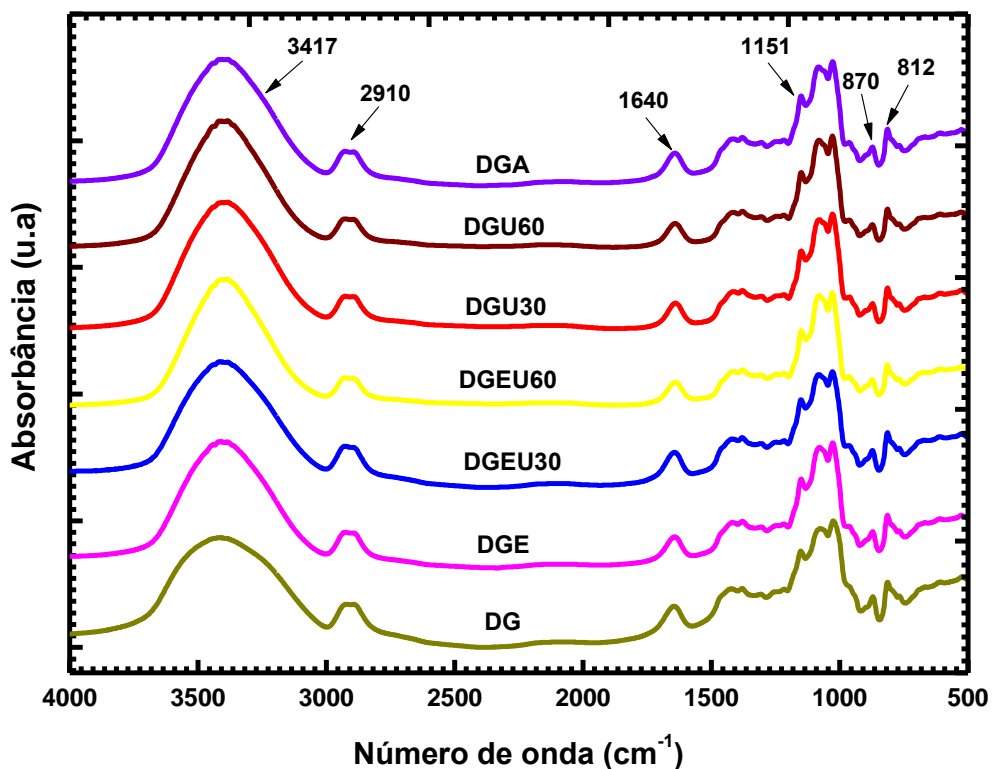
As bandas mostradas em 3417 e 2910 cm^{-1} são atribuídas aos estiramentos vibracionais dos grupos O-H e C-H, respectivamente. As bandas observadas em 1640 e 1395 cm^{-1} correspondem à água adsorvida e as deformações de CH_2 , respectivamente (MUDGIL *et al.*, 2012a; RODRIGUEZ-CANTO *et al.*, 2019).

As bandas de absorção entre 1151 e 1029 cm^{-1} representam os modos de estiramento acoplados de C-C-O, C-OH e C-O-C presentes nos anéis de piranose. Já as bandas de absorção representados em 870 e 812 cm^{-1} estão relacionados à presença das configurações anoméricas (conformeros α e β) e as ligações glicosídicas, atribuídas às unidades β -D-manopiranosose e α -D-galactopiranosose, respectivamente (LI *et al.*, 2018a; ZHOU *et al.*, 2018).

A semelhança observada nos espectros de absorção de FT-IR para os materiais, revela que, independente do processo de despolimerização, a natureza química do polissacarídeo se mantém inalterada.

Mudgil, Barak e Khatkar (2012a, b), ao hidrolisarem parcialmente a goma guar com a enzima celulase (*Aspergillus niger*), relataram que os materiais apresentaram perfil semelhante nos espectros de FTIR.

Figura 12 – Espectros de absorção de FT-IR para a DG e seus derivados despolimerizados na faixa de frequência de 4000-400 cm^{-1}



Fonte: dados da pesquisa.

4.1.3 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio ($\text{RMN } ^1\text{H}$)

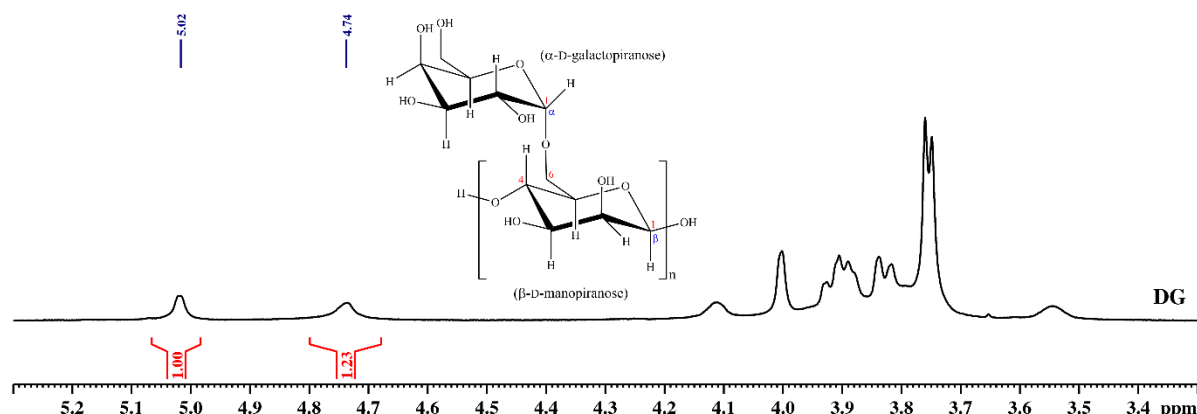
Os espectros de $\text{RMN } ^1\text{H}$ da DG e de seus derivados despolimerizados foram obtidos para confirmar e elucidar a estrutura. Os resultados são apresentados nas Figuras 13 e 14.

Nos espectros, os sinais em δ 4,74 e δ 5,02 ppm são designados aos prótons anoméricos da β -D-manopiranosose e da α -D-galactopiranosose, respectivamente (CUNHA *et al.*, 2009). Os sinais em δ 3,50-4,20 ppm correspondem aos demais prótons (H_2 - H_6) das unidades monossacarídicas da galactomanana (LI *et al.*, 2018b).

A razão M/G determina uma variedade de propriedades físico-químicas da galactomanana, tais como: a solubilidade, a viscosidade e capacidade de formar gel. Essa razão pode ser determinada a partir da integração das áreas relativas aos sinais anoméricos (CUNHA *et al.*, 2009; VILARÓ *et al.*, 2018).

A razão M/G para a DG neste trabalho foi de 1,23 (Figura 13). Cunha *et al.* (2009) ao extrair a mesma espécie obteve uma razão M/G de 1,82. A diferença na razão M/G neste caso, pode estar relacionado ao processo de extração do polissacarídeo e a origem do material vegetal.

Figura 13 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz, D_2O , 70 °C) para a DG



Fonte: dados da pesquisa.

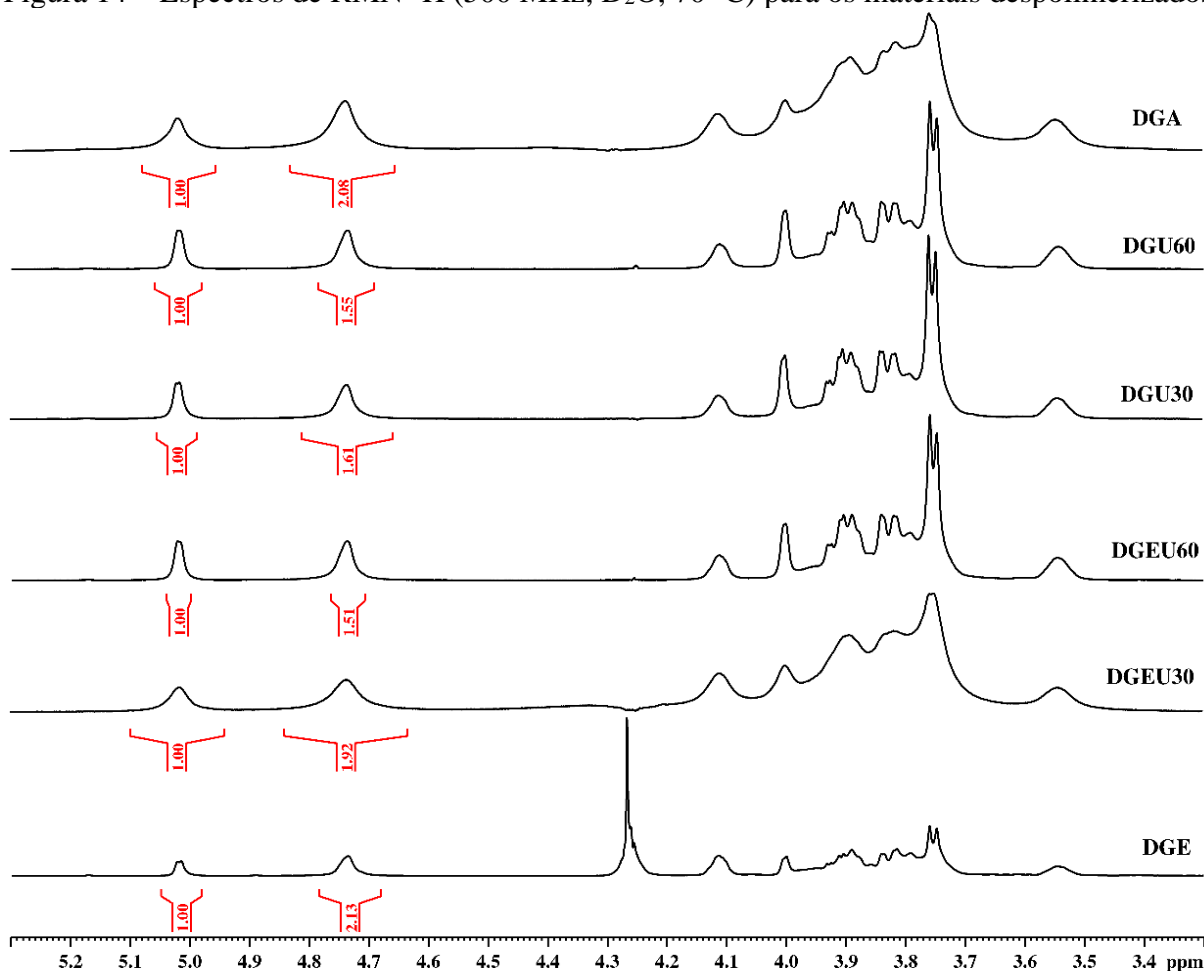
Ao sofrer hidrólise enzimática, a galactomanana apresentou um aumento na razão M/G de 1,23 (DG) para 2,13 (DGE) (Figura 14), indicando que houve quebra da ligação α -glicosídica durante o processo enzimático. A DGE ao ser sonicada por 30 minutos exibiu uma pequena redução da razão M/G para 1,92 e com o aumento da sonicação para 60 minutos, a razão M/G diminuiu para 1,51, indicando perda de unidades de manose, sendo a perda maior com o aumento do tempo de sonicação.

Para os materiais despolimerizados somente por ultrassom, ocorreu um aumento na razão M/G nos tempos de 30 e 60 minutos em relação a razão M/G da DG (1,23), sendo 1,61 (DGU30) e 1,55 (DGU60), o que caracteriza a perda de unidades de galactose (Figura 15). Entretanto, ao elevar o tempo de sonicação, observa-se uma redução de 1,61 (DGU30) para 1,55 (DGU60), caracterizando a perda de unidades de manose. No processo de sonicação, ocorre a ruptura das ligações glicosídicas, que podem ser induzidas por radicais livres reativos ou devido aos efeitos físicos da cavitação (PRAJAPAT; GOGATE, 2015b).

Após sofrer hidrólise ácida (DGA), a galactomanana mostrou um valor de M/G superior ao da DG (M/G = 1,23), sendo de 2,08. Esse aumento está relacionado à perda de unidades de galactose da cadeia do polissacarídeo durante o processo de hidrólise.

A diferença na razão M/G entre a DG e os derivados despolimerizados, deve-se ao fato da ruptura da cadeia da galactomanana ocorrer de forma aleatória, com cisões tanto na cadeia linear constituída de unidades de manose como nas unidades de galactose da ramificação (HOU *et al.*, 2018).

Figura 14 – Espectros de RMN ^1H (500 MHz, D_2O , 70 °C) para os materiais despolimerizados



Fonte: dados da pesquisa.

Na Tabela 3 encontram-se os valores da razão M/G para a DG e seus derivados despolimerizados.

Tabela 3 – Valores da razão manose/galactose (M/G) e massa molar de pico para a DG e seus derivados despolimerizados

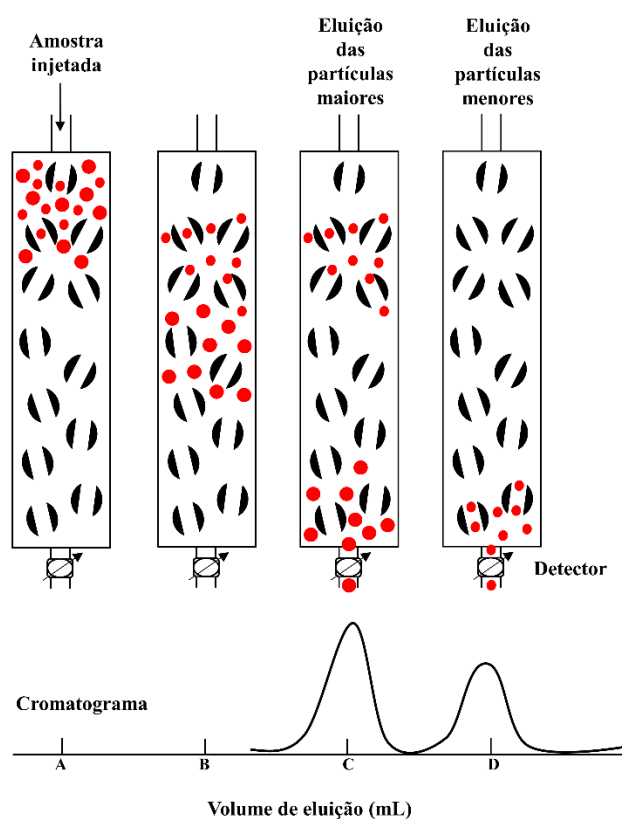
Galactomanana	Razão M/G	$M_{pk} \times 10^{-5} (\text{g mol}^{-1})$
DG	1,23	26,1
DGE	2,13	24,6
DGEU30	1,92	1,75
DGEU60	1,51	1,16
DGU30	1,61	1,85
DGU60	1,55	1,28
DGA	2,08	0,18

Fonte: dados da pesquisa.

4.1.4 Cromatografia de permeação em gel (GPC)

A análise de GPC consiste na separação de diferentes partículas em solução com base no seu volume hidrodinâmico e o processo de separação ocorre em coluna empacotada com um gel poroso (Figura 15). O volume de eluição é maior para partículas com volume hidrodinâmico pequeno, uma vez que estas são capazes de penetrar os poros do gel da coluna e, assim, levam um maior tempo para eluir. Já partículas com volume hidrodinâmico maior não são capazes de atravessar os poros e, assim, eluem mais rápido e apresentam menor volume de eluição (CANEVALORO JÚNIOR, 2006).

Figura 15 – Mecanismo de eluição de uma amostra por GPC



Fonte: Adaptado de Striegel *et al.* (2009).

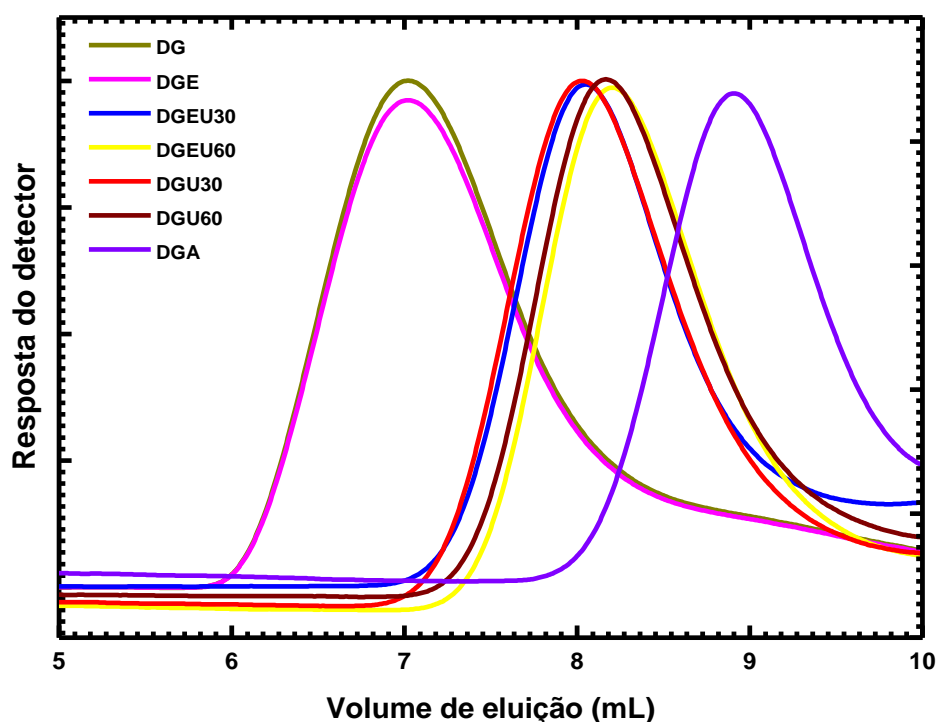
A Figura 16 mostra os cromatogramas de GPC para a DG e seus derivados despolimerizados, que foram utilizados para estimar a distribuição de massa molar dos materiais.

Os materiais despolimerizados por ultrassom e hidrólise ácida apresentaram um deslocamento acentuado do volume de eluição para a direita em relação à DG, indicando uma redução significativa na massa molar. Comportamento diferente foi observado para o material

despolimerizado por hidrólise enzimática (DGE) que apresentou volume de eluição próximo ao da DG. Os cromatogramas apresentaram um único pico, indicando uniformidade.

Buriti *et al.* (2014), ao hidrolisarem enzimaticamente (*Aspergillus niger*) a galactomanana de *Caesalpinia pulcherrima*, observou que a goma parcialmente hidrolisada ($2,47 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$) apresentou um deslocamento do volume de eluição para a direita no gráfico de GPC, demonstrando ter uma massa molar menor em relação à goma nativa ($8,03 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$).

Figura 16 – Cromatograma de distribuição da massa molar por GPC para a DG e seus derivados despolimerizados



Fonte: dados da pesquisa.

Os valores das massas molares de pico (M_{pk}) obtidos a partir da curva padrão ($R^2 = 0,991$) (Equação 2), onde V_e representa o volume de eluição obtido nos cromatogramas de GPC estão apresentados na Tabela 3.

$$\log M_{pk} = 14,4097 - 1,1392V_e \quad (2)$$

Os materiais despolimerizados por ultrassom ou hidrólise ácida apresentaram massas molares consideravelmente inferiores à da DG, o que pode estar relacionado a quebra das cadeias laterais e da ligação β -glicosídica (cadeia principal) do polímero (PRAJAPAT; SUBHEDAR; GOGATE, 2016; RAOUFI *et al.* 2018).

A DG apresentou massa molar na faixa dos valores encontrados em outros trabalhos (Tabela 3), de $7,00 \times 10^5$ a $6,00 \times 10^6$ g mol⁻¹ (CUNHA *et al.*, 2009; MOURA NETO *et al.*, 2014; ALMEIDA *et al.*, 2015). A diferença entre as massas molares para a mesma espécie pode ser atribuída a fonte e ao processo de extração do polissacarídeo.

A massa molar para a DGE foi semelhante à da DG, devido a hidrólise enzimática romper preferencialmente as unidades de galactose como observado no aumento da razão M/G (2,13). A distribuição de galactose na cadeia de manose não é uniforme, em algumas regiões pode conter mais galactose que em outras. Cheng, Brown e Prud'homme (2002), comentam que a enzima em solução se encontra dispersa e que as cadeias poliméricas próximas da enzima têm maior probabilidade de serem despolimerizadas.

A DGE quando sonicada por 30 minutos (DGEU30) apresentou uma redução significativa na massa molar, podendo estar relacionado a quebra de unidades de manose como observado na diminuição da razão M/G de 2,13 (DGE) para 1,92 (DGEU30). Com o aumento do tempo de sonicação para 60 minutos (DGEU60) mais manose foi quebrada (M/G de 1,92 para 1,51), levando a uma maior redução na massa molar.

A DG apresentou uma redução considerável na massa molar ao ser sonicada por 30 e 60 minutos. Nos 30 minutos de sonicação, ocorreu a quebra da cadeia de manose e de unidades de galactose com o aumento observado na razão M/G de 1,23 (DG) para 1,61 (DGU30). Aumentando o tempo para 60 minutos, mais unidades de manose foram quebradas, corroborando com a diminuição da razão M/G de 1,65 (DGU30) para 1,55 (DGU60).

Moléculas grandes, quando expostas a ultrasonicação, sofrem facilmente uma rápida redução de tamanho. Com o aumento do tempo de sonicação, a despolimerização torna-se pequena quando a intensidade cavitacional chega a um determinado ponto, o que leva à redução do efeito de cisalhamento e, conseqüentemente, à quantidade de radicais livres (HOU *et al.*, 2018; RAOUFI *et al.* 2018). Ma *et al.* (2018), ao despolimerizar pectina por ultrassom, relatam que o processo de despolimerização consistiu em um rápido declínio dos 0 a 30 minutos, e um estágio estável dos 30 a 60 minutos.

A hidrólise ácida da galactomanana (DGA) apresentou valor de massa molar duas ordens de grandeza inferior à da DG, indicando que houve uma quebra maior da cadeia de manose em relação aos demais processos, além de perda de unidades de galactose como observado no aumento da razão M/G de 1,23 (DG) para 2,08 (DGA).

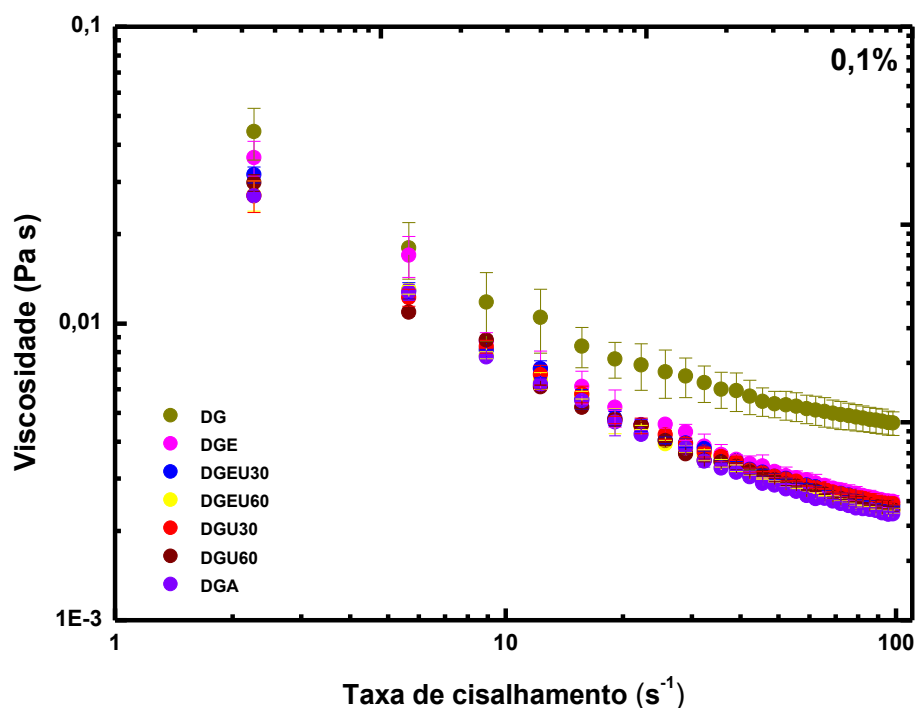
4.1.5 Reologia de fluxo

Com o intuito de formar copolímeros a partir de galactomanana despolimerizada, estudou-se a viscosidade do fluido para os materiais com o aumento da taxa de cisalhamento. Nas Figuras 17 e 18 encontra-se a reologia de fluxo para a DG e seus derivados despolimerizados nas concentrações de 0,1% e 1,0% com a taxa de cisalhamento variando de 0,1-100 s^{-1} a 25 °C, respectivamente.

Nota-se um leve comportamento pseudoplástico em baixas taxas de cisalhamento para os materiais nas concentrações estudadas, ocasionado por parâmetros estruturais, tais como: a massa molar e a distribuição das unidades de galactose na cadeia de manose (BURITI *et al.*, 2014; HOU *et al.* 2018).

Na Figura 17, observa-se que os derivados despolimerizados apresentam uma pequena redução na viscosidade em relação a DG, sendo de 5 mPa s (DG) para 3 mPa s a 55 s^{-1} e se mostram quase superponíveis. A viscosidade semelhante para os derivados despolimerizados, indica que em baixas concentrações, a massa molar e a razão M/G não influencia. A redução na viscosidade para a DGE em relação a DG que apresentam massa molar semelhante, pode estar relacionada a perda de unidades de galactose observada com o aumento da razão M/G de 1,23 (DG) para 2,13 (DGE).

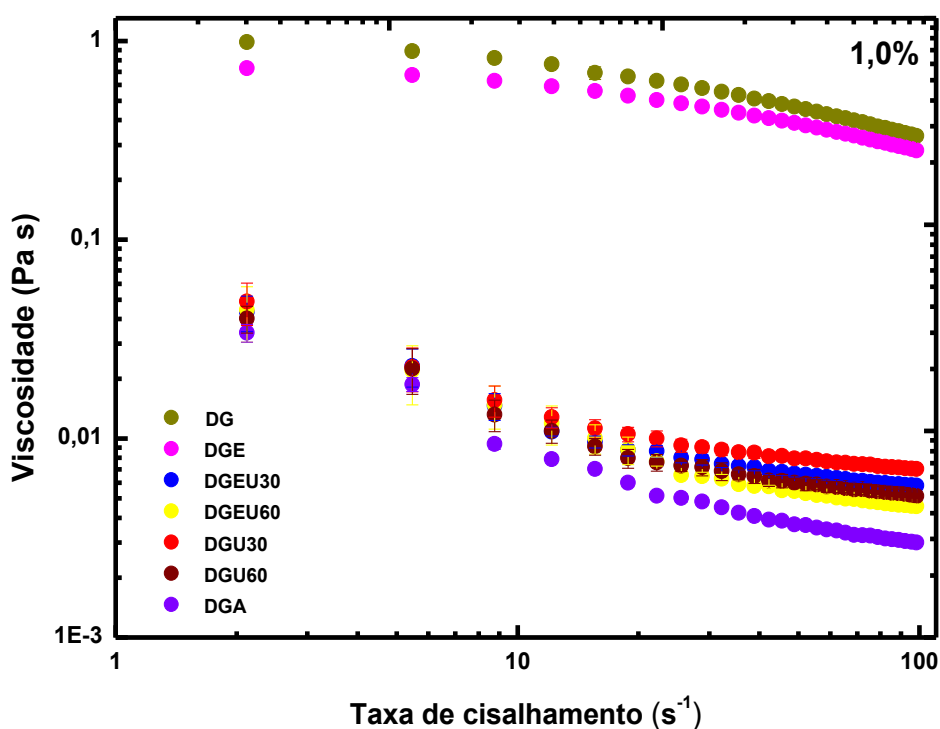
Figura 17 – Perfis de viscosidade *versus* taxa de cisalhamento de amostras de DG e de seus derivados despolimerizados com concentração 0,1% em água destilada a 25 °C



Fonte: dados da pesquisa.

Com o aumento da concentração para 1,0%, mudanças significativas são observadas nas curvas de fluxo dos derivados despolimerizados (Figura 18). Os materiais despolimerizados por ultrassom ou hidrólise ácida apresentaram viscosidade consideravelmente inferior em relação a DG e a DGE e uma tendência decrescente na viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento.

Figura 18 – Perfis de viscosidade *versus* taxa de cisalhamento de amostras de DG e de seus derivados despolimerizados com concentração 1,0% em água a 25 °C



Fonte: dados da pesquisa.

A DG e a DGE apresentam massa molar semelhante (mesma ordem de grandeza) (Tabela 3). Deste modo, a redução na viscosidade de 440 mPa s (DG) para 360 mPa s (DGE) a 55 s^{-1} pode estar relacionado a perda de unidades de galactose observado com o aumento da razão M/G de 1,23 (DG) para 2,13 (DGE). George, Shah e Shrivastav (2009) comentam que unidades de galactose, quando em solução aquosa, tendem a interagir com as moléculas de água circundante, causando aumento na viscosidade da solução. Como ocorreu perda de unidades de galactose, a viscosidade reduziu.

Entre os materiais despolimerizados por ultrassom (mesma ordem de grandeza na massa molar), os de maior massa molar (DGEU30 e DGU30) apresentaram viscosidade superior à dos seus correspondentes (DGEU60 e DGU60). A redução na viscosidade foi de 6

mPa s (DGEU30) para 5 mPa s (DGEU60) e de 8 mPa s (DGU30) para 6 mPa s (DGU60) a 55 s^{-1} .

Em relação a DGA, tanto a massa molar reduzida como a perda de unidades de galactose afetam na viscosidade, proporcionando a menor viscosidade (3 mPa s a 55 s^{-1}) dentre os materiais.

A redução na viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento, em ambas as concentrações, é ocasionada pela perda da estrutura emaranhada (devido as unidades de galactose) do polissacarídeo causada pelas forças hidrodinâmicas geradas após a aplicação do cisalhamento (PRAJAPAT; SUBHEDAR; GOGATE, 2016; RAOUFI *et al.*, 2018).

Deduz-se que os materiais despolimerizados por ultrassom ou hidrólise ácida se tornam promissores na formação de copolímeros, uma vez que apresentaram viscosidade consideravelmente inferior a DG, o que favorece a enxertia do monômero.

4.2 Caracterização dos copolímeros por enxertia

4.2.1 Rendimento da reação de enxertia (RE%)

A enxertia de PNIPAM em polissacarídeos vem ganhando destaque, por desenvolver materiais com caráter responsivo a temperatura. Os copolímeros de galactomanana despolimerizada/PNIPAM apresentaram rendimento superior ao formado por DG/PNIPAM (Tabela 4).

Tabela 4 – Rendimento das reações de enxertia (RE%) após purificação para os copolímeros sintetizados

Copolímeros	RE%
CPDG	38,4
CPDGEU30	41,2
CPDGEU60	53,4
CPDGU30	41,9
CPDGU60	54,3
CPDGA1	43,6
CPDGA2	56,2

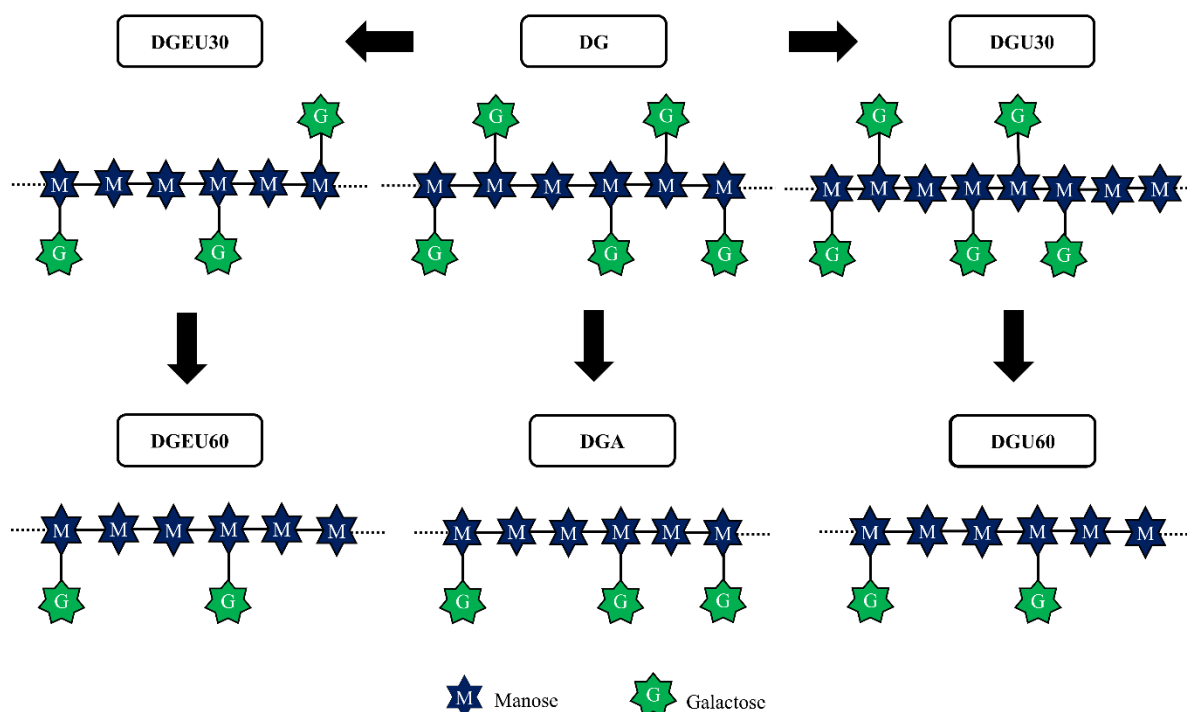
Temperatura de reação = 25 °C, exceto CPDGA2 (T = 70 °C).

Fonte: dados da pesquisa.

Fazendo-se uma relação no valor obtido na razão M/G entre a DG e os derivados despolimerizados, observa-se na Figura 19 que os materiais DGEU60, DGU60 e DGA tiveram uma perda maior de unidades de galactose. Os copolímeros CPDGEU60 e CPDGU60 apresentaram o maior rendimento reacional e entre os copolímeros CPDGA, o aumento da temperatura (70 °C) favoreceu uma maior enxertia (CPDGA2). Com a perda de unidades de

galactose, têm-se uma maior quantidade de unidades de manose livres para o CAN formar radicais e, assim, o NIPAM ser enxertado. A formação de radicais consiste através de um único processo de transferência de elétrons o que reduz a formação de homopolímeros (KUMAR *et al.*, 2017).

Figura 19 – Representação da perda de unidades de galactose após os processos de despolimerização



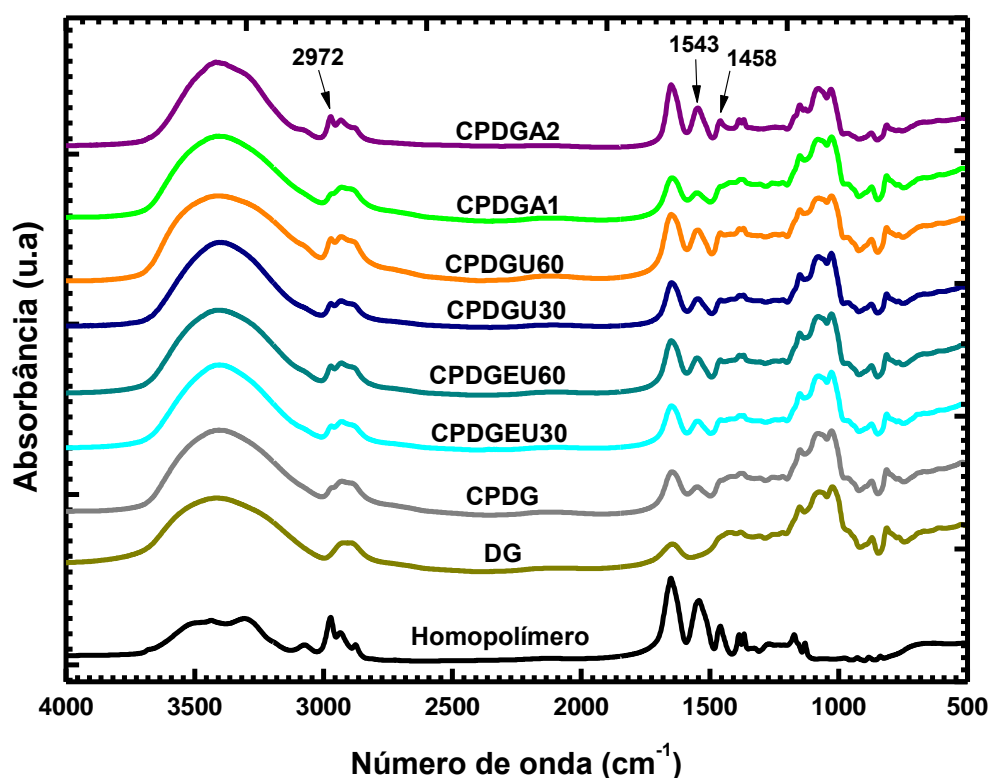
Fonte: elaborada pela autora.

4.2.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FT-IR)

Na Figura 20 encontram-se os espectros de FT-IR para os copolímeros sintetizados a fim de confirmar a presença das cadeias de PNIPAM enxertadas na estrutura da galactomanana.

O espectro do homopolímero apresenta bandas em $3100-3600\text{ cm}^{-1}$ correspondente ao estiramento N-H de amida e em 2972 cm^{-1} devido à vibração de estiramento C-H do grupo isopropil (ORTIZ *et al.*, 2018). As bandas em 1649 e 1543 cm^{-1} correspondem ao estiramento C=O da amida I e à vibração de deformação N-H da amida II, respectivamente (GUPTA; GHUTE; BADIGER, 2011). Já as bandas em 1458 , 1381 e 1368 cm^{-1} são associadas às deformações simétrica e assimétrica do grupo isopropil ($-\text{C}(\text{CH}_3)_2$) (LUO *et al.*, 2018).

Figura 20 – Espectros de FT-IR da DG, do PNIPAM e dos copolímeros de galactomanana/PNIPAM na faixa de frequência de 4000-400 cm^{-1}



Fonte: dados da pesquisa.

Os espectros dos copolímeros apresentam as bandas características da galactomanana em 3417 cm^{-1} (ν O-H), 2910 cm^{-1} (ν C-H), 870 cm^{-1} (ν C-O-C, 1 \rightarrow 4) e 812 cm^{-1} (ν C-O-C, 1 \rightarrow 6) e novas bandas características do homopolímero em 1458 cm^{-1} [δ - C(CH₃)₂], 1543 cm^{-1} (δ N-H, amida II) e 2972 cm^{-1} (ν C-H). A banda característica do PNIPAM em 1649 cm^{-1} (ν C=O, amida I), se encontra sobreponível a banda de água na mesma região. Esses resultados indicam a enxertia do homopolímero na cadeia da galactomanana.

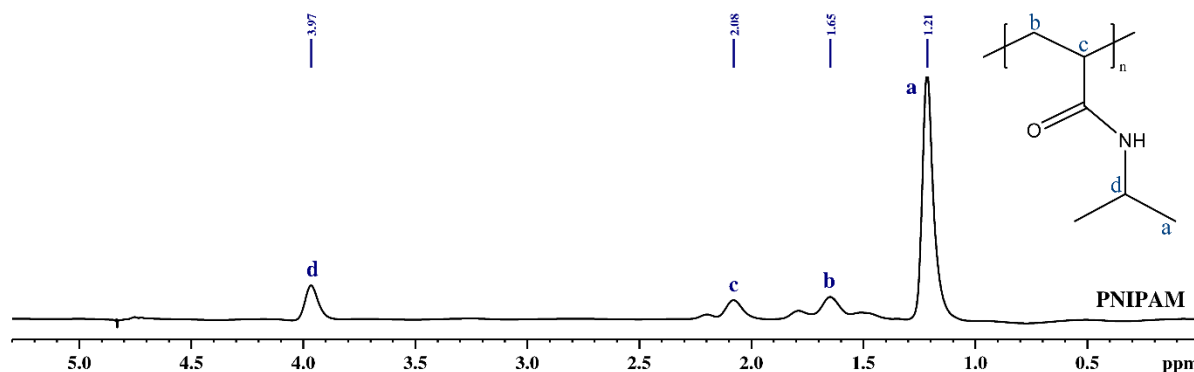
Gupta, Ghute e Badiger (2011), ao sintetizarem copolímeros à base de carboximetil guar com PNIPAM, indicaram a enxertia do homopolímero por FT-IR através do surgimento das bandas de amida I (ν C=O) e amida II (δ N-H) na estrutura do copolímero.

4.2.3 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H)

Na Figura 21 encontra-se o espectro de RMN para o PNIPAM. Os sinais característicos do homopolímero foram analisados baseado em dados reportados na literatura (LUO *et al.*, 2018).

O sinal intenso em 1,21 ppm (a, 6H, CH₃) foi atribuído aos seis prótons metil do grupo isopropil. Os sinais em 1,65 ppm (b, 2H, CH₂) e 2,08 ppm (c, 1H, CH-CH₂) correspondem aos prótons metileno e metino, respectivamente, e o sinal em 3,97 ppm (d, 1H, CH-NH) atribuído ao próton do grupo isopropil ligado à função amida.

Figura 21 – Espectro de RMN ¹H (500 MHz, D₂O, 25 °C) para o homopolímero (PNIPAM)



Fonte: dados da pesquisa.

Nos espectros dos copolímeros (Figura 22), observa-se em δ 5,02 ppm o sinal do próton anomérico (H₁) da unidade de galactose da galactomanana e os sinais a (CH₃), b (CH₂) e c (CH-CH₂) atribuídos ao PNIPAM, confirmando a reação de enxertia. O sinal d (CH-NH) do PNIPAM sobreposto pelos sinais dos prótons do anel de piranose (H₂-H₆) da galactomanana estão contidos na região de δ 3,50-4,20 ppm.

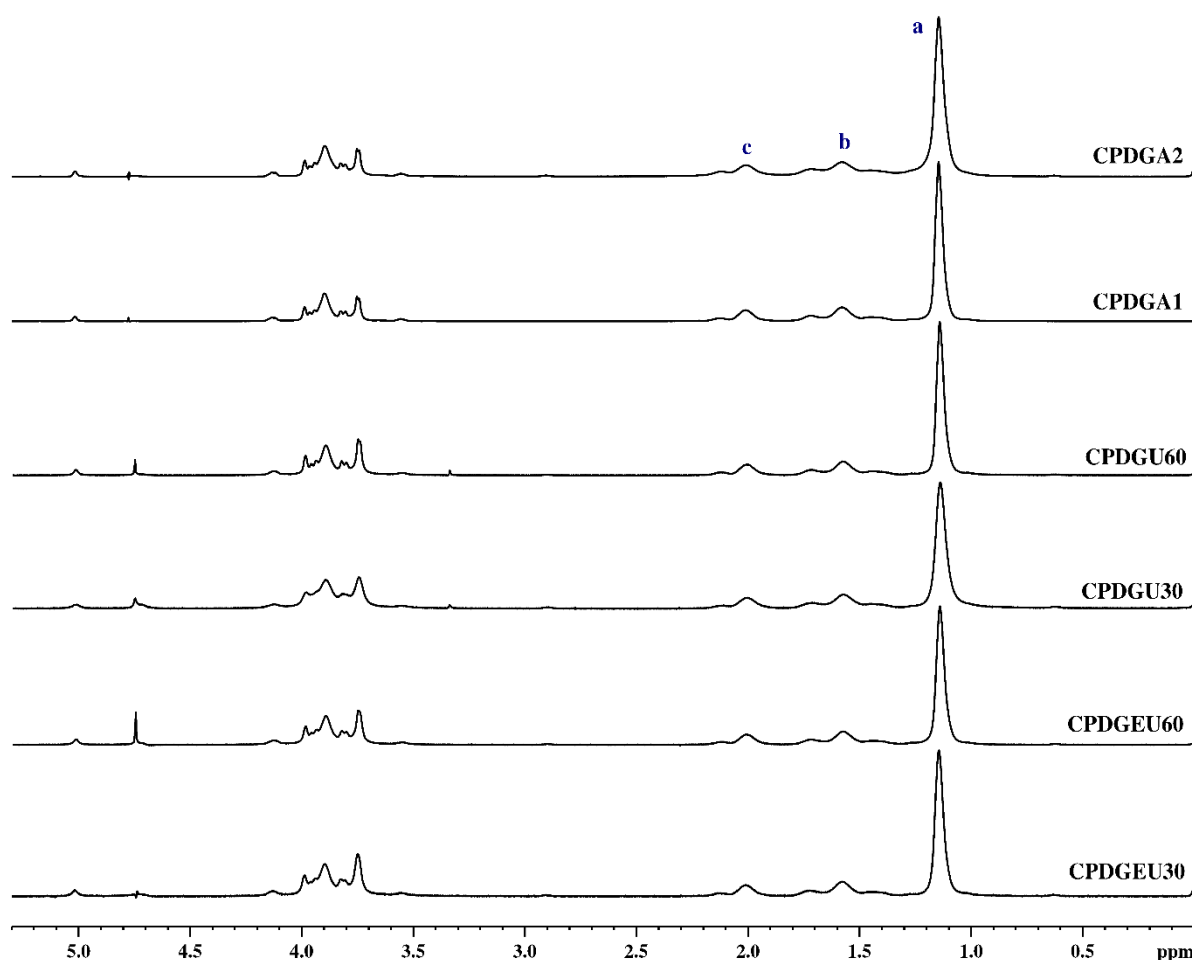
Ciociu *et al.* (2018), ao analisaram a reação de enxertia do NIPAM na estrutura do alginato por RMN ¹H, observaram a presença dos prótons do PNIPAM na região de 0,90-2,20 ppm (-CH₃ e -CH₂-CH-) e a do próton do -CH junto com os prótons do alginato na região de 3,40-4,30 ppm.

O valor da integral da área dos prótons metílicos do grupo isopropil (1,14 ppm) do homopolímero dividido por 6 e o da área do próton anomérico (5,02 ppm) da galactomanana foi utilizado para calcular a razão molar de unidades de NIPAM enxertadas nas unidades estruturais da galactomanana (Tabela 5) (GHIMICI; CONSTANTIN, 2011).

Para o copolímero CPDG não foi possível calcular a razão, devido à proximidade da banda de água na região do próton anomérico da galactomanana (Apêndice A). Entre cada grupo de copolímeros que utilizou a galactomanana despolimerizada por ultrassom na síntese, observa-se que a maior razão de enxertia de NIPAM ocorreu nos formados a partir dos materiais com a maior perda de unidades de galactose e manose (menor massa molar) (CPDGU60 e CPDGEU60). Para os copolímeros formados a partir da DGA, ambos

apresentam razão de enxertia de NIPAM superior ao dos demais copolímeros, o que pode estar relacionado a DGA ter a menor massa molar, além de perda de unidades de galactose. Com o aumento da temperatura na síntese do copolímero CPDGA2, ocorre um aumento na solubilidade do polissacarídeo, favorecendo uma maior enxertia. Os copolímeros CPDGEU60, CPDGU60 e CPDGA2 apresentaram os maiores teores de NIPAM enxertada.

Figura 22 - Espectros de RMN ^1H (500 MHz, D_2O , 25 °C) para os copolímeros de galactomanana despolimerizada/PNIPAM



Fonte: dados da pesquisa.

Tabela 5 – Razão molar de NIPAM contido na estrutura da galactomanana para os copolímeros sintetizados

Copolímeros	$A_{1,14}$	$A_{1,14}/A_{5,02}$
CPDG	-	-
CPDGEU30	34,4	5,7
CPDGEU60	35,4	5,9
CPDGU30	37,8	6,3
CPDGU60	44,2	7,4
CPDGA1	78,9	13,2
CPDGA2	97,6	16,3

Temperatura de reação = 25 °C, exceto CPDGA2 (T = 70 °C).

Fonte: dados da pesquisa.

4.2.4 Análise elementar

A fim de elucidar a presença de NIPAM nos copolímeros sintetizados, realizou-se a análise do teor de nitrogênio por microanálise elementar, onde o valor obtido foi utilizado para calcular o teor de NIPAM (Tabela 6).

Tabela 6 – Teor de nitrogênio (N%) e de NIPAM(%) presente nos copolímeros de galactomanana/PNIPAM

Copolímeros	N%	NIPAM%
CPDG	0,88 ± 0,02	7,1 ± 0,2
CPDGEU30	1,42 ± 0,03	11,5 ± 0,3
CPDGEU60	1,86 ± 0,02	15,0 ± 0,2
CPDGU30	1,66 ± 0,01	13,4 ± 0,2
CPDGU60	1,99 ± 0,02	16,1 ± 0,2
CPDGA1	3,82 ± 0,01	30,8 ± 0,1
CPDGA2	4,14 ± 0,02	33,4 ± 0,2

Temperatura de reação = 25 °C, exceto CPDGA2 (T = 70 °C).

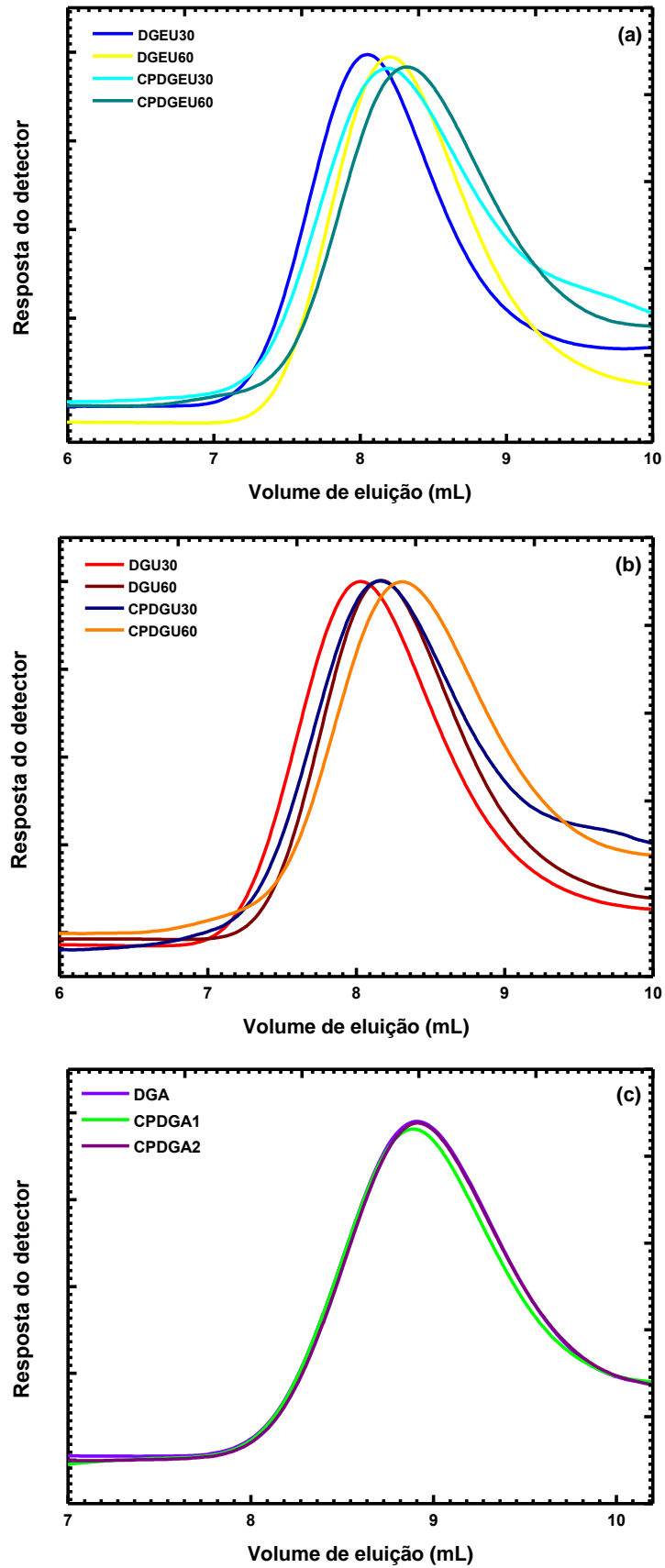
Fonte: dados da pesquisa.

Como observado pelo teor obtido por RMN ¹H (Tabela 5), os copolímeros obtidos a partir das galactomananas de menor massa molar e com a maior perda de unidades de galactose (CPDGEU60, CPDGU60 e CPDGA2) apresentaram os maiores teores de NIPAM enxertada. O copolímero CPDG apresentou o menor percentual de NIPAM em sua composição dentre os todos os copolímeros, o que pode estar relacionado a maior massa molar da galactomanana de partida e quantidade de unidades de galactose na estrutura.

4.2.5 Cromatografia de permeação em gel (GPC)

Na Figura 23 encontra-se os cromatogramas de GPC para os copolímeros sintetizados. Foi possível observar uma distribuição unimodal para todos.

Figura 23 – Cromatograma de distribuição da massa molar por GPC para os copolímeros de galactomanana despolimerizada e seu material de partida



Fonte: dados da pesquisa.

Os copolímeros obtidos a partir de galactomanana sonicada (Figura 23a,b) apresentaram um pequeno deslocamento do volume de eluição para valores maiores em relação ao volume de eluição do material de partida. Esse comportamento pode estar relacionado a enxertia de NIPAM na cadeia da galactomanana, afetando a conformação e provocando uma diminuição do volume hidrodinâmico da partícula. Para os copolímeros obtidos a partir da DGA, o volume de eluição se mostra quase sobreponível à do material de partida (Figura 23c), o que pode estar relacionado às maiores quantidades de NIPAM enxertada (Tabelas 5 e 6), ocasionando a agregação das partículas e tendo, assim, partículas com volume hidrodinâmico maior.

Ao correlacionar cada grupo de copolímeros, observa-se que os obtidos a partir de galactomanana de menor massa molar e que apresentaram o maior teor de NIPAM enxertada (CPDGEU60, CPDGU60 e CPDGA2), exibiram volume de eluição superior ao dos seus correspondentes (CPDGEU30, CPDGU30 e CPDGA1) e ao material de partida, tendo, portanto, nos coloides partículas com volume hidrodinâmico pequeno.

Yang *et al.* (2015) ao analisarem por GPC copolímeros de celulose-*g*-PNIPAM com diferentes proporções de PNIPAM observaram um volume de eluição maior em comparação com o da celulose e explicaram que esse comportamento pode ser devido as diferentes relações entre o volume hidrodinâmico e a massa molar da celulose e do copolímero.

4.3 Caracterização das nanopartículas

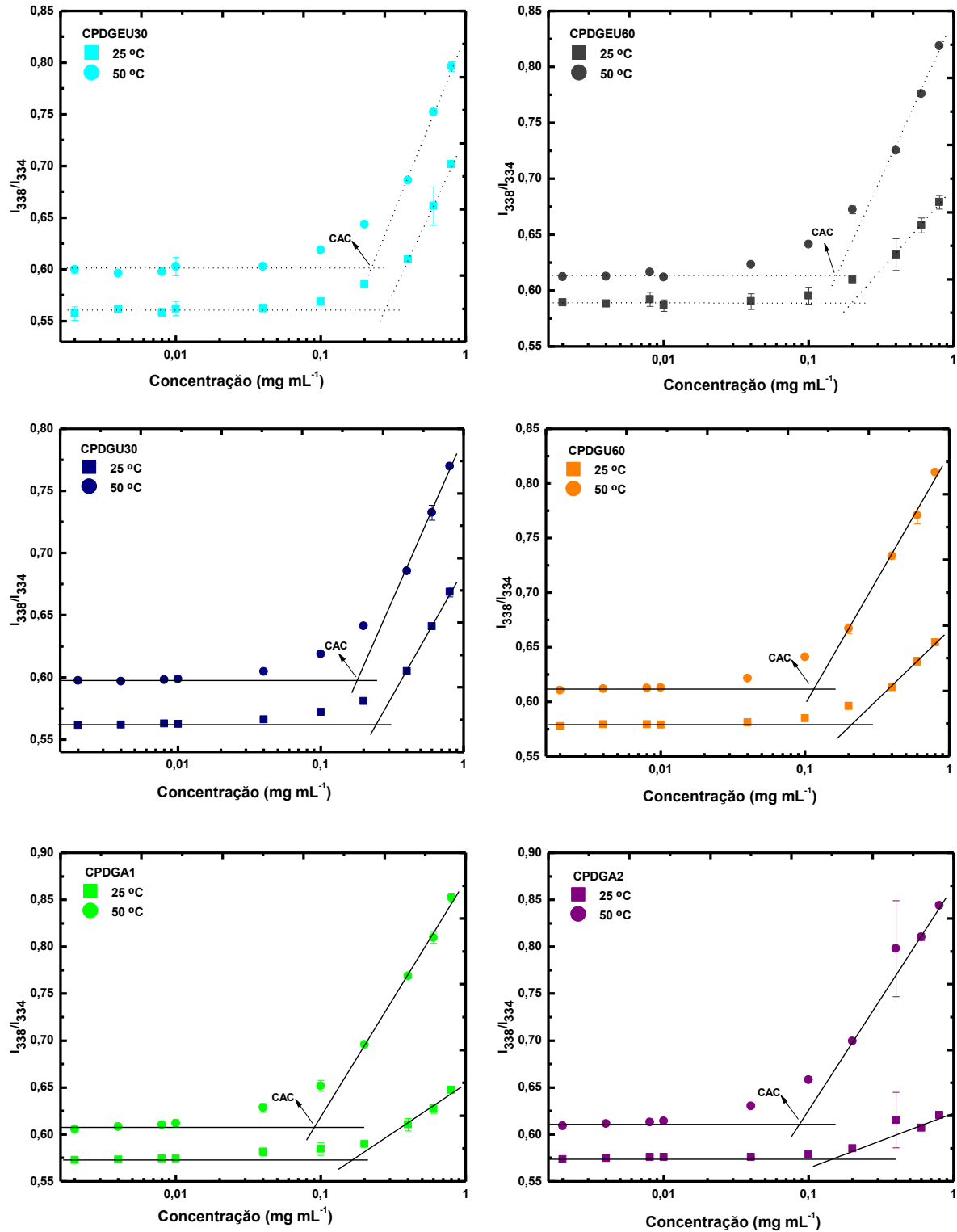
4.3.1 Concentração de agregação crítica (CAC)

Para avaliar a formação das nanopartículas, as propriedades fotofísicas de soluções de copolímeros em meio aquoso foram investigadas por fluorescência utilizando como sonda hidrofóbica o pireno, cujo espectro de excitação é sensível ao ambiente circundante.

A variação da razão de intensidade (I_{338}/I_{334}) do espectro de excitação do pireno com a concentração dos copolímeros (2×10^{-3} a $0,8 \text{ mg mL}^{-1}$) a 25 e 50 °C é mostrada na Figura 24. A razão I_{338}/I_{334} se manteve constante em baixas concentrações e aumentou drasticamente com o aumento da concentração. Essas alterações são indicativas da partição do pireno entre o meio aquoso e hidrofóbico. Em baixas concentrações têm-se um ambiente polar aquoso. Em altas concentrações têm-se um microambiente menos polar, relativo aos micro-

domínios hidrofóbicos onde as moléculas de pireno são preferencialmente solubilizadas (GUPTA; GHUTE; BADIGER, 2011; CONSTANTIN *et al.*, 2017).

Figura 24 – Variação da razão I_{338}/I_{334} para o pireno em função da concentração (2×10^{-3} a $0,8 \text{ mg mL}^{-1}$) dos copolímeros de galactomanana despolimerizada/PNIPAM a 25 e 50 °C



Fonte: dados da pesquisa.

A CAC corresponde a concentração mínima de copolímero necessária para a formação das nanopartículas. Os valores de CAC foram determinados pela interseção entre as retas antes e após o ponto de inflexão (Figura 24) e estão apresentados na Tabela 7. Todos os copolímeros apresentaram formação de agregados a 25 e 50 °C, sendo os valores de CAC a 50 °C inferiores aos valores a 25 °C, devido a diferença na hidratação entre a cadeia principal e a cadeia lateral após a transição de fase. A formação de agregados a 25 °C, explica o fato de os copolímeros terem apresentado volume de eluição superior ao do seu material de partida por GPC. Abreu *et al.* (2016) explicam que a formação de agregados a 25 °C, ocorre devido as cadeias de PNIPAM enxertada terem tendência a se agregar por meio de auto-organização, mesmo em temperaturas inferiores a LCST (32 °C).

Acima da LCST (a 50 °C), as cadeias do PNIPAM tendem a sofrer desidratação formando agregados em menores concentrações, indicando que para a formação das nanopartículas uma concentração de copolímero entre 0,08 e 0,23 mg mL⁻¹ é suficiente. Com a exposição a solução aquosa de auto-agregados poliméricos, as moléculas de pireno participam preferencialmente dentro ou perto dos micro-domínios hidrofóbicos, em vez da fase aquosa (GUO *et al.*, 2019).

Os menores valores de CAC para o CPDGEU60, CPDGU60 e CPDGA2 em ambas as temperaturas se deve ao maior percentual de NIPAM enxertada, que leva a um aumento da fração hidrofóbica no copolímero ocasionando uma maior contração das cadeias e a formação de agregados em uma condição mais diluída.

Abreu *et al.* (2016) obtiveram comportamento semelhante ao deste trabalho ao sintetizarem copolímeros de goma do cajueiro com PNIPAM. Copolímeros de dextrana com PNIPAM apresentaram redução no valor da CAC de 0,096 para 0,031 mg mL⁻¹ com o aumento das unidades da cadeia enxertada (PATRIZI *et al.*, 2009).

Tabela 7 – Valores de CAC para as nanopartículas obtidas por fluorescência

Copolímeros	CAC (mg mL ⁻¹)	
	25 °C	50 °C
CPDG	0,21	0,12
CPDGEU30	0,28	0,23
CPDGEU60	0,19	0,16
CPDGU30	0,25	0,18
CPDGU60	0,21	0,11
CPDGA1	0,16	0,09
CPDGA2	0,15	0,08

Temperatura de reação = 25 °C, exceto CPDGA2 (T = 70 °C).

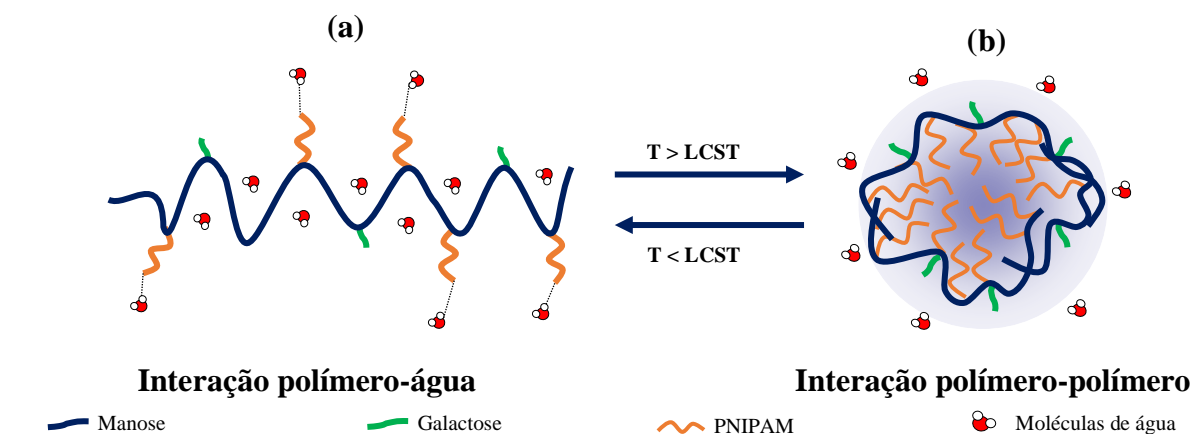
Fonte: dados da pesquisa.

4.3.2 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

As análises de DLS foram realizadas para compreender a agregação termossensível dos copolímeros em solução aquosa mediante aquecimento de 25 a 50 °C. A partir dessa análise foi possível determinar a temperatura de transição (LCST). Nela, os copolímeros se auto-organizam formando as nanopartículas. O tamanho de partícula antes e após a LCST também pode ser determinado.

Quando a temperatura do meio é superior a LCST do PNIPAM, a sua transição de fase ocorre levando a cadeia mudar para uma estrutura globular compacta, resultando na agregação dos copolímeros com o PNIPAM hidrofóbico como núcleo e a galactomanana hidrofílica na região da superfície (Figura 25). A agregação é causada pela perda da ligação de hidrogênio entre as moléculas de água e os grupos amida do PNIPAM, e a formação de interações hidrofóbicas entre grupos isopropílicos e ligações de hidrogênio entre os grupos amida (YANG *et al.*, 2013; KHIMANI *et al.*, 2019).

Figura 25 – Comportamento dos copolímeros antes (a) e depois da LCST (b)



Fonte: elaborada pela autora.

O ponto no qual ocorre uma diminuição ou um aumento súbito no tamanho da partícula com o aumento da temperatura é considerado a LCST dos copolímeros. Ela se encontra na intersecção de uma reta passando pelo ponto de inflexão da curva e uma reta horizontal passando pelos pontos após a transição (PATRIZI *et al.*, 2009; ABREU *et al.*, 2016).

A partir da Figura 26 foi possível obter os valores de LCST para cada copolímero. Todos os copolímeros apresentaram LCST superior ao do homopolímero (32 °C) e o maior valor obtido foi para o copolímero CPDG (Tabela 8), provavelmente devido à presença de uma porção hidrofílica (galactomanana). Os copolímeros CPDGEU30 e CPDGEU60, que

possuem as menores quantidades de NIPAM enxertada, apresentaram LCST próxima de 36 °C. Para os copolímeros CPDGEU30, CPDGEU60 e CPDGA1, a LCST foi cerca de 35 °C. Já para o copolímero CPDGA2, que possui a maior quantidade de NIPAM enxertada, a LCST foi de 34 °C.

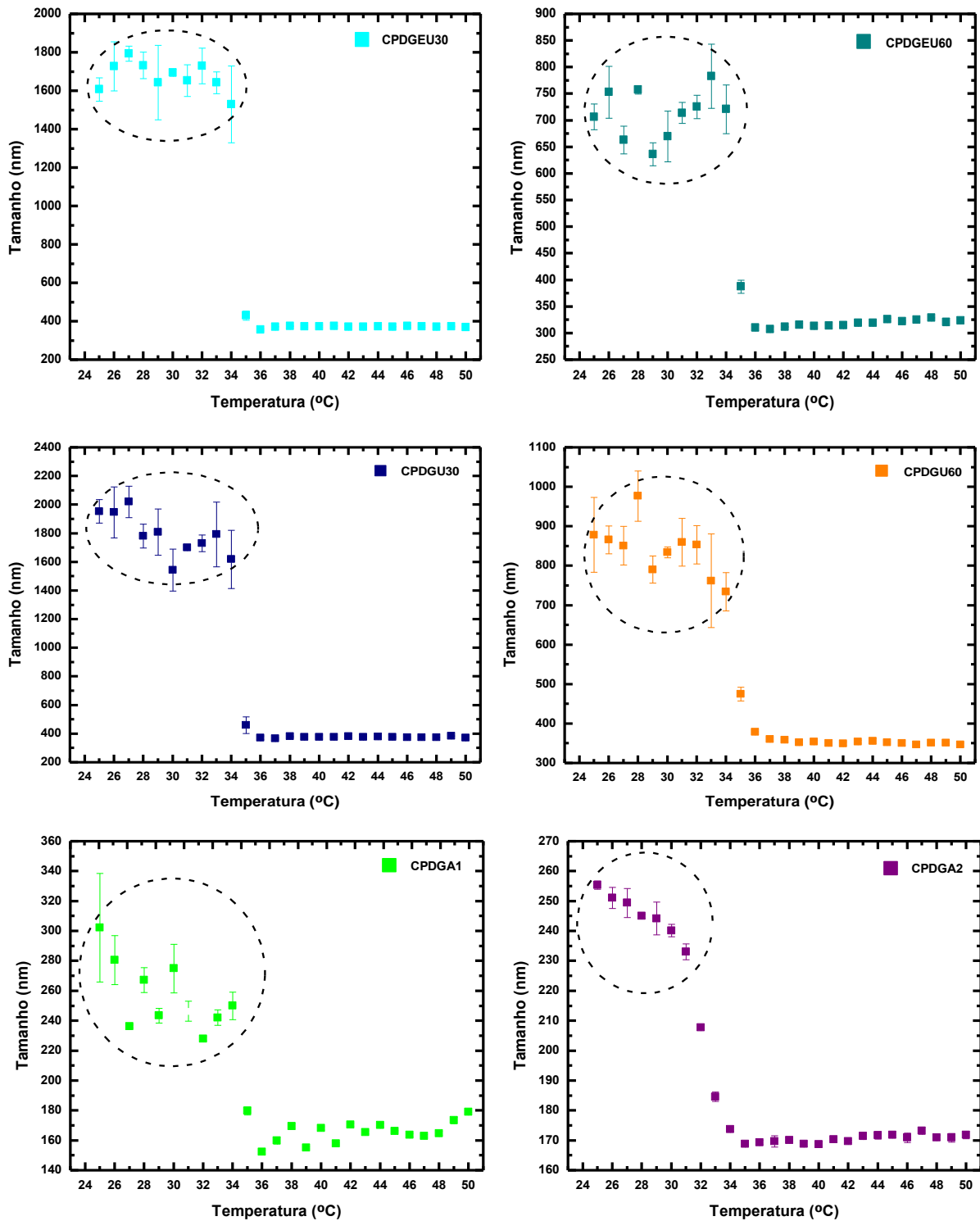
A transição de fase é resultado de um equilíbrio entre a hidrofiliicidade e a hidrofobicidade na cadeia polimérica, ou seja, uma maior porção hidrofílica (galactomanana) muda o equilíbrio hidrofílico/hidrofóbico para uma natureza mais hidrofílica e a LCST muda para temperaturas mais altas. Em contraste, uma maior porção hidrofóbica (PNIPAM) muda a LCST para temperaturas mais baixas (ZHANG *et al.*, 2009; ABREU *et al.*, 2016).

Comportamento semelhante ao deste trabalho foi observado no trabalho de Yang *et al.* (2015), onde a LCST de copolímeros de celulose-g-PNIPAM diminuiu à medida que as unidades de NIPAM enxertada aumentava. Os autores corresponderam esse fenômeno ao fato de a LCST ser determinada pelo balanço entre as interações de PNIPAM-água e interações de PNIPAM-PNIPAM.

O tamanho de partícula (ou diâmetro hidrodinâmico) de materiais sensíveis à temperatura apresenta uma mudança súbita de grande para pequeno ou vice-versa, através da LCST. A tendência decrescente no tamanho das partículas com o aumento da temperatura observada na Figura 26 está relacionada com o tamanho das cadeias laterais, onde copolímeros com cadeias laterais longas mostram uma transição de espiral para globular levando a diminuição do tamanho, em contraste, copolímeros com cadeias laterais curtas tendem a aumentar o tamanho devido uma conversão de segmento para agregado (YANG *et al.*, 2013).

As nanopartículas de copolímeros de galactomanana despolimerizada/PNIPAM apresentaram tamanho de partícula significativamente inferior em relação a nanopartícula de copolímero de DG/PNIPAM a 25 e 50 °C, os valores estão apresentados na Tabela 8. As nanopartículas dos copolímeros CPDGEU60, CPDGEU60 e CPDGA2 apresentaram diâmetro hidrodinâmico inferior ao dos seus correspondentes (CPDGEU30, CPDGEU30 e CPDGA1) em ambas as temperaturas, o que pode estar relacionado a maior porção hidrofóbica presente nestes copolímeros, levando a contração das partículas. Na temperatura de 50 °C, as partículas apresentaram diâmetro inferior que a 25 °C, devido à desidratação das cadeias de PNIPAM gerando uma estrutura mais compacta.

Figura 26 – Relação do tamanho de partícula a cada aumento de 1 °C na temperatura (25 a 50 °C) para os copolímeros de galactomanana despolimerizada/PNIPAM na concentração 1 mg mL⁻¹



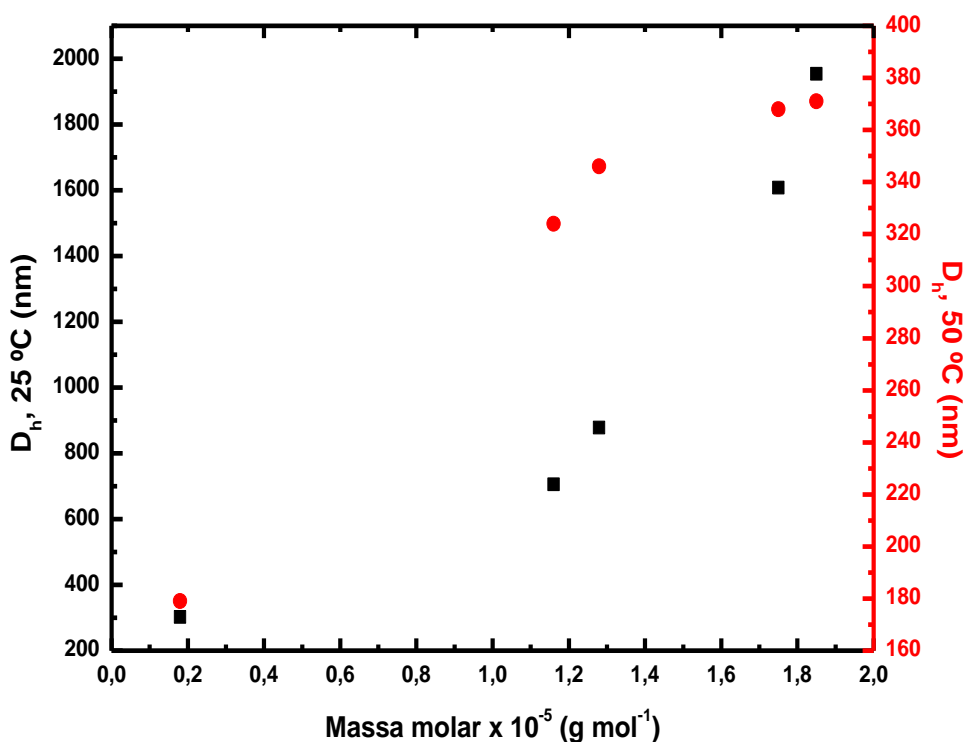
Fonte: dados da pesquisa.

Ao correlacionar o diâmetro de partícula dos copolímeros sintetizados a 25 °C e a massa molar da galactomanana de partida, observa-se uma tendência de aumento no diâmetro das partículas com o aumento da massa molar da galactomanana utilizada na síntese dos

copolímeros, tanto a 25 como a 50 °C (Figura 27). Deste modo, a fim de se obter partículas com $D_h > 300$ nm, o mais recomendável seria a utilização de materiais com massa molar de 10^5 g mol⁻¹, já para se obter partículas com $D_h < 300$ nm, a utilização de materiais com massa molar de 10^4 g mol⁻¹ seria o mais apropriado.

Wersig *et al.* (2018) comentaram que os tamanhos de partículas mais adequados para acumulação no tecido inflamado são abaixo de 300 nm. Como no presente trabalho foi utilizado o fármaco antiinflamatório indometacina, se torna favorável a utilização das nanopartículas de copolímeros CPDGA1 e CPDGA2 para o carreamento do fármaco.

Figura 27 – Relação dos diâmetros de partícula a 25 (■) e 50 °C (●) para os copolímeros sintetizados a 25 °C com a massa molar da galactomanana de partida



Fonte: dados da pesquisa.

Tabela 8 – Tabela comparativa com os dados obtidos

Galactomanana	Massa molar x 10 ⁻⁵ (g mol ⁻¹)	Razão M/G	Copolímeros	Teor de NIPAM		LCST (°C)	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	
				RMN	Análise elementar		25 °C	50 °C
DG	26,1	1,23	CPDG	-	7,1	36,5	3251 ± 361,4	695 ± 32,3
DGEU30	1,75	1,92	CPDGEU30	5,7	11,5	36,2	1608 ± 60,6	368 ± 4,0
DGEU60	1,16	1,51	CPDGEU60	5,9	15,0	35,8	707 ± 24,4	324 ± 2,0
DGU30	1,85	1,61	CPDGU30	6,3	13,4	35,1	1954 ± 81,1	371 ± 2,3
DGU60	1,28	1,55	CPDGU60	7,4	16,1	35,4	878 ± 94,7	346 ± 4,6
DGA	0,18	2,08	CPDGA1	13,2	30,8	35,2	302 ± 36,2	179 ± 0,4
			CPDGA2	16,3	33,4	34,0	255 ± 1,4	172 ± 1,2

Temperatura de reação dos copolímeros = 25 °C, exceto CPDGA2 (T = 70 °C).
 Fonte: dados da pesquisa.

4.3.3 Eficiência de encapsulamento (EE%) e carga de fármaco (CF%)

Para avaliar a capacidade de aprisionamento de IND das nanopartículas de CPDGA1 e CPDGA2, a eficiência de encapsulamento (EE%) e a carga de fármaco (CF%) foram determinadas e os valores estão mostrados na Tabela 9.

Notavelmente a eficiência de encapsulamento e a carga de fármaco dependem do teor de NIPAM enxertada na galactomanana e da concentração inicial de IND. O aumento do teor de NIPAM para a mesma quantidade de fármaco, reduziu a EE% e a CF%. A EE% diminuiu de 62,8 para 30,7% com o aumento na quantidade inicial de IND de 0,5 para 1,0 mg mL⁻¹, indicando que o sistema tem uma capacidade limitada de aprisionar a IND, resultando em mais perda de fármaco durante o processo de encapsulamento e, consequentemente, reduzindo a EE%.

A carga de fármaco é um parâmetro importante no desenvolvimento de sistemas nanocarreadores, uma vez que para uma CF% baixa, uma quantidade significativa de sistema será necessário para alcançar um efeito terapêutico. Porém, aliada a uma alta EE%, têm-se um sistema que libera o fármaco por um período de tempo maior, proporcionando um efeito terapêutico com dosagens reduzidas da medicação (IMRAN *et al.*, 2016; BAKHSHAYESH *et al.*, 2020). A nanopartícula CPDGA1/IND com a menor concentração de fármaco (0,5 mg mL⁻¹) apresentou a maior EE%, o que a torna promissora para liberação *in vitro* de IND.

Tabela 9 – Eficiência de encapsulamento e carga de fármaco das nanopartículas de CPDGA em relação a concentração de fármaco e ao teor de NIPAM

Copolímeros	Teor de NIPAM (Análise elementar)	Concentração inicial de IND (mg mL ⁻¹)	EE%	CF%
CPDGA1	30,8	0,5	62,8 ± 3,6	3,0 ± 0,4
		1,0	30,7 ± 1,0	3,1 ± 0,1
CPDGA2	33,4	0,5	46,8 ± 5,6	2,3 ± 0,3
		1,0	28,9 ± 4,3	2,9 ± 0,4

Temperatura de reação: CPDGA1 = 25 °C e CPDGA2 = 70 °C.

Fonte: dados da pesquisa.

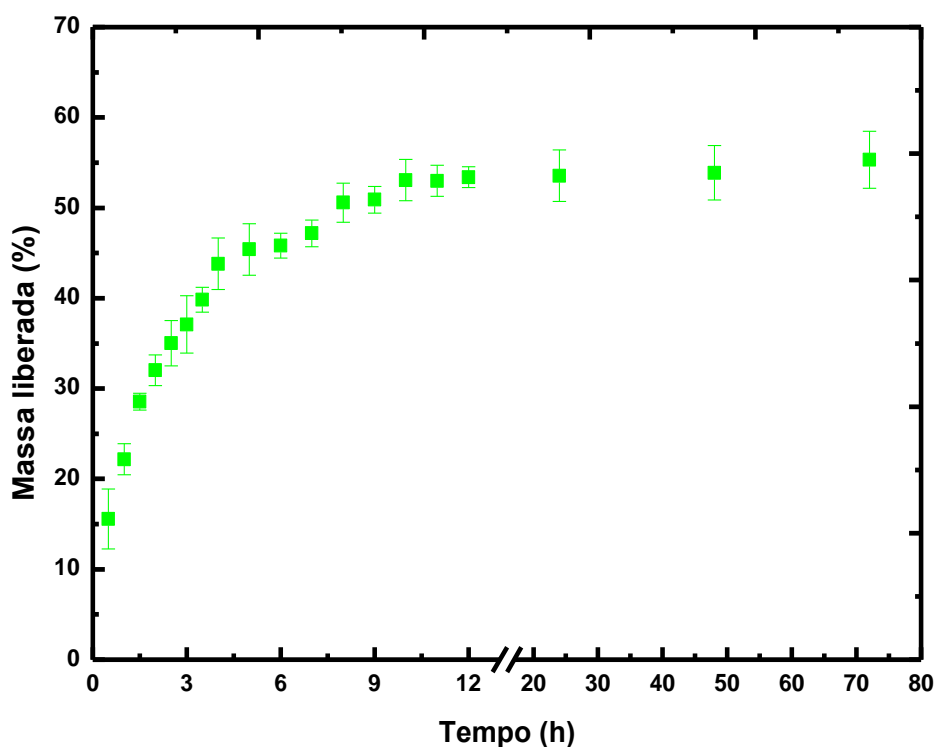
A eficiência de encapsulamento de indometacina obtida neste trabalho está em concordância com os relatados na literatura ao utilizar sistemas de polissacarídeo/PNIPAM: nanopartículas de dextrana/PNIPAM (CF entre 29 e 12%) apresentaram eficiência de mais de 70% (TAN *et al.*, 2011). Sun *et al.* (2013) relataram eficiência entre 51 e 60% ao usar microesferas de alginato/PNIPAM revestidas com quitosana (CF entre 8 e 10%). Rodkate e Rutnakornpituk (2016) obtiveram eficiência de 95% ao usar microesferas de hidrogel de

carboximetilquitosa/PNIPAM (CF = 2,7%). Nanopartículas de pululana/PNIPAM (CF entre 18 e 29%) apresentaram eficiência entre 36 e 58% (CONSTANTIN *et al.*, 2017).

4.3.4 Perfil de liberação *in vitro* da IND da nanopartícula

O perfil de liberação *in vitro* da IND da nanopartícula CPDGA1/IND com 0,5 mg mL⁻¹ de fármaco em função do tempo está mostrado na Figura 28. Observa-se uma liberação gradual com 45,4 ± 2,8% de IND sendo liberada da nanopartícula em 5 horas, seguido de uma liberação controlada com máximo de 55,3 ± 3,2% em 72 horas de experimento. O fato de a IND não ter sido liberada completamente da nanopartícula, pode ser atribuído ao efeito das interações hidrofóbicas entre a IND e o PNIPAM no núcleo da nanopartícula. A liberação lenta está relacionada a conformação colapsada do PNIPAM em temperaturas superiores a LCST (32 °C).

Figura 28 – Perfil de liberação *in vitro* da IND da nanopartícula CPDGA1/IND com 0,5 mg mL⁻¹ de fármaco em tampão pH 7,4 + LSS 0,25% (m/v) a 37 °C



Fonte: dados da pesquisa.

Para a análise do mecanismo de liberação da IND a partir da nanopartícula CPDGA1/IND (1:0,5), foram aplicados os modelos de ordem zero, primeira ordem, Hixon-

Crowell, Higuchi e Korsmeyer-Peppas. O modelo que melhor se adequa foi selecionado a partir do maior valor de coeficiente de determinação (R^2) (Tabela 10).

Tabela 10 – Valores dos coeficientes de determinação (R^2) obtidos a partir de equações dos modelos cinéticos para liberação de indometacina da nanopartícula de CPDGA1

Modelos cinéticos	Valores de R^2
Ordem zero	0,842
Primeira ordem	0,754
Hixon-Crowell	0,788
Higuchi	0,939
Korsmeyer-Peppas	0,973

Fonte: dados da pesquisa.

O perfil de liberação da IND da nanopartícula se adequou melhor ao modelo de Korsmeyer-Peppas ($R^2 = 0,973$) que descreve a liberação de fármacos de sistemas poliméricos baseado na difusão e/ou no relaxamento das cadeias poliméricas (Equação 6) (KORSMEYER *et al.*, 1983).

$$\frac{Q_t}{Q_\infty} = kt^n \quad (6)$$

onde Q_t é a quantidade de IND liberada em um determinado tempo t , Q_∞ é a quantidade de IND liberada em um tempo infinito, k é a constante cinética de liberação e n é o expoente de liberação.

O valor de n é relacionado com a forma geométrica do sistema de liberação e determina o mecanismo de liberação. Para formas esféricas, o valor de $n \leq 0,43$ indica difusão Fickiana, valor de n entre 0,43 e 0,85 indica um transporte anômalo e $n \geq 0,85$ indica transporte caso-II (relaxamento das cadeias poliméricas) (PITOMBEIRA *et al.*, 2015). O valor de n obtido foi de 0,36, indicando que a liberação ocorre através de um mecanismo de difusão Fickiana.

O tempo para a liberação máxima da indometacina da nanopartícula CPDGA1/IND (1:0,5) (CF = 3,0%, $D_h = 170,6$ nm) deste estudo apresentou um perfil de liberação lenta, apresentando comportamento distinto dos obtido para outras nanopartículas de polissacarídeo/PNIPAM. Para nanopartículas de dextrana/PNIPAM (CF = 11,9%, $D_h = 140,0$ nm) foi liberado cerca de 85% de IND em 14 horas, com a liberação sendo realizada contra água destilada a 37 °C e através de um mecanismo de transporte anômalo (TAN *et al.*, 2011). Nanopartículas de pululana/PNIPAM (CF = 26,4%, $D_h = 249,3$ nm) apresentaram um máximo

de liberação de 85% em 6 horas, com a liberação sendo realizada contra tampão 7,4 a 37 °C (CONSTANTIN *et al.*, 2017). A diferença no perfil de liberação entre estes sistemas pode estar relacionada ao diâmetro da partícula, a CF% e ao solvente utilizado no processo de liberação.

Uma liberação lenta leva ao aumento da biodisponibilidade do fármaco, prolongando sua manutenção no local alvo e o efeito terapêutico (KALAM *et al.*, 2016). Isso indica que nanopartículas de CPDGA1 pode ser considerado um bom sistema de distribuição controlada de fármaco para a indometacina.

5 CONCLUSÃO

As técnicas de despolimerizações utilizadas possibilitaram obter diferentes massas molares para a galactomanana e redução na viscosidade, entretanto houve mudança na razão manose/galactose dos produtos despolimerizados. A maior redução de massa molar ocorreu utilizando a hidrólise ácida que proporcionou uma redução em duas ordens de grandeza da massa molar da galactomanana.

A síntese de enxertia de NIPAM na galactomanana foi confirmada por FT-IR e RMN ^1H . Os copolímeros formados com a galactomanana de menor massa molar, apresentaram maior enxertia de NIPAM, com conseqüente menor concentração de agregação crítica (CAC) e tamanho de partícula. Uma correlação de aumento de tamanho de partícula dos copolímeros com o aumento da massa molar da galactomanana de partida foi verificada.

Nanopartículas poliméricas com tamanhos variando de 302 a 179 nm foram obtidas utilizando copolímeros de PNIPAM e galactomanana despolimerizada por hidrólise ácida. Essas nanopartículas apresentaram máximo de eficiência de encapsulamento de indometacina de $62,8 \pm 3,6\%$. A nanopartícula de CPDGA1 liberou $55,3 \pm 3,2\%$ de indometacina de forma lenta e por mecanismo de difusão Fickiana em 72 horas de estudo. A nanopartícula de CPDGA1 mostra ser um sistema eficiente para carrear o fármaco indometacina.

REFERÊNCIAS

ABREU, C. M. W. S.; PAULA, H. C. B.; SEABRA, V.; FEITOSA, J. P. A.; SARMENTO, B.; DE PAULA, R. C. M. Synthesis and characterization of non-toxic and thermo-sensitive poly(*N*-isopropylacrylamide)-grafted cashew gum nanoparticles as a potential epirubicin delivery matrix. **Carbohydrate Polymers**, v. 154, p. 77–85, 2016.

ALMEIDA, R. R.; MAGALHÃES, H. S.; de SOUZA, J. R. R.; TREVISAN, M. T. S.; VIEIRA, I. G. P.; FEITOSA, J. P. A.; ARAÚJO, T. G.; RICARDO, N. M. P. S. Exploring the potential of *Dimorphandra gardneriana* galactomannans as drug delivery systems. **Industrial Crops and Products**, v. 69, p. 284-289, 2015.

ALY, A. A.; EL-BISI, M. K. Chapter 11 – Grafting of polysaccharides: Recent advances. **Biopolymer Grafting: Synthesis and Properties**. 1. ed. Elsevier, 2018. 50 p.

AN, J.; YUAN, X.; LUO, Q.; WANG, D. Preparation of chitosan-graft-(methyl methacrylate)/Ag nanocomposite with antimicrobial activity. **Polymer International**, v. 59, p. 62–70, 2010.

BAKSHSHAYESH, A. R. D.; AKBARZADEH, A.; ALIHEMMATI, A.; NASRABADI, H. T.; MONTASERI, A.; DAVARAN, S.; ABEDLAHIA, A. Preparation and characterization of novel anti-inflammatory biological agents based on piroxicam-loaded poly- ϵ -caprolactone nano-particles for sustained NSAID delivery. **Drug Delivery**, v. 27, p. 269-282, 2020.

BARTHOLD, S.; HITTINGER, M.; PRIMAVESSY, D.; ZAPP, A.; GROB, H.; SCHNEIDER, M. Preparation of maltodextrin nanoparticles and encapsulation of bovine serum albumin – Influence of formulation parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 142, p. 405-410, 2019.

BRUN-GRAEPPPI, A. K. A. S.; RICHARD, C.; BESSODES, M.; SCHERMAN, D.; NARITA, T.; DUCOURET, G.; MERTEN, O.-W. Study on the sol-gel transition of xyloglucan hydrogels. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, p. 555-562, 2010.

BURITI, F. C. A.; DOS SANTOS, K. M.; SOMBRA, V. G.; MACIEL, J. S.; TEIXEIRA SÁ, D. M. A.; SALLES, H. O.; OLIVEIRA, G.; PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A.; MOREIRA, A. C. O. M.; MOREIRA, R. A.; EGITO, A. S. Characterisation of partially hydrolysed galactomannan from *Caesalpinia pulcherrima* seeds as a potential dietary fibre. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 512-521, 2014.

BUSCH, V. M.; DELGADO, J. F.; SANTAGAPITA, P. R.; WAGNER, J. R.; BUERA, M. P. Rheological characterization of *vinal* gum, a galactomannan extracted from *Prosopis ruscifolia* seeds. **Food Hydrocolloids**, v. 74, p. 333-341, 2018.

CANEVALORO JÚNIOR, S. V.; **Ciência dos polímeros**: um texto básico para tecnólogos e engenheiros. 2. ed. São Paulo: Artliber, 2006. 280 p.

CAMPINA, P.; PONZINI, E.; ROSSI, B.; FARRIS, S.; SILVETTI, T.; MERLINI, L.; BRASCA, M.; GRANDORI, R.; GALANTE, Y. M. Aerogels of enzymatically oxidized galactomannans

from leguminous plants: Versatile delivery systems of antimicrobial peptides and enzymes. **Carbohydrate Polymers**, v. 158, p. 102-111, 2017.

CARDIAL, M. R. L.; PAULA, H. C. B.; da SILVA, R. B. C.; BARROS, J. F. S.; RICHTER, A. R.; SOMBRA, F. M.; de PAULA, R. C. M. Pickering emulsions stabilized with cashew gum nanoparticle as indomethacin carrier. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 132, p. 534-540, 2019.

CHEN, C.; LIU, M.; GAO, C.; LU, S.; CHEN, J.; YU, X.; DING, E.; YU, C.; GUO, J.; CUI, G. A convenient way to synthesize comb-shaped chitosan-graft-poly(*N*-isopropylacrylamide) copolymer. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 621-628, 2013.

CHENG, Y.; BROWN, K. M.; PRUD'HOMME, R. K. Preparation and characterization of molecular weight fractions of guar galactomannans using acid and enzymatic hydrolysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 31, p. 29-35, 2002.

CIOCOIU, O.-N.; STAIKOS, G.; VASILE, C. Thermoresponsive behavior of sodium alginate grafted with poly(*N*-isopropylacrylamide) in aqueous media. **Carbohydrate Polymers**, v. 184, p. 118-126, 2018.

CONSTANTIN, M., BUCATARIU, S., STOICA, I., FUNDUEANU, G. Smart nanoparticles based on pullulan-g-poly(*N*-isopropylacrylamide) for controlled delivery of indomethacin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 94, p. 698-708, 2017.

CONZATTI, G. AYADI, F.; CAVALIE, S.; CARRÈRE, N. TOURRETTE, A. Thermosensitive PNIPAM grafted alginate/chitosan PEC. **Applied Surface Science**, v. 467-468, p. 940-948, 2019a.

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**, v. 32, n. 3, p. 649-660, 2009.

CUNHA, P. L. R.; VIEIRA, I. G. P.; ARRIAGA, A. M. C.; DE PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A. Isolation and characterization of galactomannan from *Dimorphandra gardneriana* Tul. seeds as a potential guar gum substitute. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 880-885, 2009.

DALMORO, A.; BOCHICCHIO, S.; NASIBULLIN, S. F.; BERTONCIN, O.; LAMBERTI, G.; BARBA, A. A.; MOUSTAFINE, R. I. Polymer-lipid hybrid nanoparticles as enhanced indomethacin delivery systems. **European Journal of Pharmaceutics Sciences**, v. 121, p. 16-28, 2018.

GEORGE, A.; SHAH, P. A.; SHRIVASTAV, P. S. Guar gum: Versatile natural polymer for drug delivery applications. **European Polymer Journal**, v. 112, p. 722-735, 2019.

GHIMICI, L.; CONSTANTIN, M. Novel thermosensitive flocculating agent based on pullulan. **Journal of Hazardous Materials**, v. 192, p. 1009-1016, 2011.

GICQUEL, E.; MARTIN, C.; HERUX, L.; JEAN, B.; BRAS, J. Adsorption versus grafting of poly(*N*-isopropylacrylamide) in aqueous conditions on the surface of cellulose nanocrystals. **Carbohydrate Polymers**, v. 210, p. 100-109, 2019.

GOYAL, P.; KUMAR, V.; SHARMA, P. Graft copolymerization of acrylamide onto tamarind kernel powder in the presence of ceric ion. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 108, p. 3696-3701, 2008.

GREENWALD, M. B. Y.; SASSON, S. B.; BIANCO-PELED, H. A new method for encapsulating hydrophobic compounds within cationic polymeric nanoparticles. **Journal of Microencapsulation**, v. 30, p. 580-588, 2013.

GUO, Y.; SONG, R.; FENG, R.; DAI, G.; LIANG, Y.; PU, D.; ZHANG, X.; YE, Z. Thermoresponsive behavior of graft copolymers based on poly(*N,N*-dimethylacrylamide-*co*-diacetoneacrylamide) side chains. **Journal of Applied Polymer Science**, p. 47051-47061, 2019.

GUPTA, N. R.; GHUTE, P. P.; BADIGER, M. V. Synthesis and characterization of thermo-sensitive graft copolymer of carboxymethyl guar and poly(*N*-isopropylacrylamide). **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 74-80, 2011.

GURDAG, G.; SARMAD, S. Chapter 2 – Cellulose graft copolymers: Synthesis, properties, and applications. **Polysaccharide Based Graft Copolymers**. 1. ed. Springer, 2013. 42 p.

HAN, W. J.; CHOI, H. J. Role of bio-based polymers on improving turbulent flow characteristics: materials and application. **Polymers**, v. 9, p. 209-232, 2017.

HOSSEINZADEH, H. Ceric-initiated free radical graft copolymerization of acrylonitrile onto kappa carrageenan. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 114, p. 303-412, 2009.

HOU, F.; FAN, L.; MA, X.; WANG, D.; WANG, W.; DING, T.; YE, X.; LIU, D. Degradation of carboxymethylcellulose using ultrasound and β -glucanase: Pathways, kinetics and hydrolysates' properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 201, p. 514-521, 2018.

HUBINGER, S. Z.; SALGADO, H. R. N.; MOREIRA, R. R. D. Controles físico-químico, químico e microbiológico dos frutos de *Dimorphandra mollis* Benth., Fabaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.3, p.690-696, 2009.

IMRAN, M.; SHAH, M. R.; ULLAH, F.; ULLAH, S.; ELHISSI, A. M. A.; NAWAZ, W.; AHMAD, F.; SADIQ, A.; ALI, I. Sugar-based novel niosomal nanocarrier system for enhanced oral bioavailability of levofloxacin. **Drug Delivery**, v. 23, p. 3653–3664, 2016.

ISIKLAN, N.; KURSUM, F. Synthesis and characterization of graft copolymer of sodium alginate and poly(itaconic acid) by the redox system. **Polymer Bulletin**, v, 70, p. 1065-1084, 2013.

KALAM, M. A.; KHAN, A. A.; KHAN, S.; ALMALIK, A.; ALSHAMSAN, A. Optimizing indomethacin-loaded chitosan nanoparticle size, encapsulation, and release using Box-Behnken experimental design. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 87, p. 329-340, 2016.

KAMBUROVA, K.; MITAROVA, K.; RADEVA, T. Polysaccharide-based nanocapsules for controlled release of indomethacin. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 519, p. 199-204, 2017.

KHAN, I.; SAEED, K.; KHAN, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12, p. 909-931, 2019.

KHIMANI, M.; YUSA, S.-i.; ASWAL, V. K.; BAHADUR, P. Aggregation behavior of double hydrophilic block copolymers in aqueous media. **Journal of Molecular Liquids**, v. 276, p. 47-56, 2019.

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

KUMAR, D.; PANDEY, J.; KUMAR, P. A review on the modification of polysaccharide through graft copolymerization for various potential applications. **The Open Medicinal Chemistry Journal**, v. 11, p. 109-126, 2017.

KUSKOV, A. N.; KULIKOV, P. P.; GORYACHAYA, A. V.; TZATZARAKIS, M. N.; DOCEA, A. O.; VELONIA, K.; SHTILMAN, M. I.; TSATSAKIS, A. M. Amphiphilic poly-*N*-vinylpyrrolidone nanoparticles as carriers for non-steroidal, anti-inflammatory drugs: *In vitro* cytotoxicity and *in vivo* acute toxicity study. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 13, p. 1021-1030, 2017.

LANDIM, L. P.; FEITOZA, G. S.; da COSTA, J. G. M. Development and validation of a HPLC method for the quantification of three flavonoids in a crude extract of *Dimorphandra gardneriana*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, p. 58-64, 2013.

LANZALACO, S.; ARMELIN, E. Poly(*N*-isopropylacrylamide) and copolymers: A review on recent progresses in biomedical applications. **Gels**, v. 3, p. 36-66, 2017.

LI, D.; YANG, N.; ZHANG, Y.; GUO, L.; SANG, S.; JIN, Z.; XU, X. Structural and physicochemical changes in guar gum by alcohol-acid treatment. **Carbohydrate Polymers**, v. 179, p. 2-9, 2018a.

LI, D.; ZHANG, Y.; YANG, N.; JIN, Z.; XU, X. Impact of electrical conductivity on acid hydrolysis of guar gum under induced electric field. **Food Chemistry**, v. 259, p. 157-165, 2018b.

LI, M.; LI, J.; ZHU, C. Effect of ultrasound pretreatment on enzymolysis and physicochemical properties of corn starch. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 111, p. 848-856, 2018.

LIMA, E. L.; VASCONCELOS, N. F.; MACIEL, J. S.; ANDRADE, F. K.; VIEIRA, R. S.; FEITOSA, J. P. A. Injectable hydrogel based on dialdehyde galactomannan and *N*-succinyl chitosan: a suitable platform for cell culture. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 31, p. 1-13, 2020.

LINARES, N. C.; FALCO, M. D.; BENOIT-GELBER, I.; GRUBEN, B. S.; PENG, M.; TSANG, A.; MAKELA, M. R.; de VRIES, R. P. The presence of trace components

significantly broadens the molecular response of *Aspergillus niger* to guar gum. **New Biotechnology**, v, 51, p. 57-66, 2019

LIU, M.; SONG, X.; WEN, Y.; ZHU, J. L.; LI, J. Injectable thermoresponsive hydrogel formed by alginate-*g*-poly(*N*-isopropylacrylamide) that releases doxorubicin-encapsulated micelles as a smart drug delivery system. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 9, p. 35673-35682, 2017.

LOPES S. A.; VEIGA, I. G.; BIERHALZ, A. C. K.; PIRES, A. L. R.; MORAES, A. N. Physicochemical properties and release behavior of indomethacin-loaded polysaccharide membranes. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 68, p. 956-964, 2019.

LUO, L.-J.; HUANG, C.-C.; CHEN, H.-C.; LAI, J.-Y.; MATSUSAKI, M. Effect of deacetylation degree on controlled pilocarpine release from injectable chitosan-*g*-poly(*N*-isopropylacrylamide) carriers. **Carbohydrate Polymers**, v. 197, p. 375-384, 2018.

MA, X.; WANG, D.; CHEN, W.; ISMAIL, B. B.; WANG, W.; LV, R.; DING, T.; YE, X.; LIU, D. Effects of ultrasound pretreatment on the enzymolysis of pectin: Kinetic study, structural characteristics and anti-cancer activity of the hydrolysates. **Food Hydrocolloids**, v. 79, p. 90-99, 2018.

MAHAMMAD, S.; COMFORT, D. A.; KELLY, R. M.; KHAN, S. A. Rheological properties of guar galactomannan solutions during hydrolysis with galactomannanase and α -galactosidase enzyme mixtures. **Biomacromolecules**, v. 8, p. 949-956, 2007.

MOURA NETO, E.; SOMBRA, V. G.; RICHTER, A. R.; ABREU, C. M. W. S.; MACIEL, J. S.; CUNHA, P. L. R.; ONO, L.; SIERAKOWSKI, M. R.; FEITOSA, J. P. A.; DE PAULA, R. C. M. Chemically sulfated galactomannan from *Dimorphandra gardneriana* seed: Characterization and toxicity evaluation. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 1013–1017, 2014.

MUDGIL, D.; BARAK, S.; KHATKAR, B. S. Effect of enzymatic depolymerization on physicochemical and rheological properties of guar gum. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p. 224-228, 2012b.

MUDGIL, D.; BARAK, S.; KHATKAR, B. S. X-ray diffraction, IR spectroscopy and thermal characterization of partially hydrolyzed guar gum. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, p. 1035-1039, 2012a.

ORTIZ, J. A.; MATSUHIRO, B.; ZAPATA, P. A.; CORRALES, T.; CATALINA, F. Preparation and characterization of maleoylagarose/PNIPAAm graft copolymers and formation of polyelectrolyte complexes with chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 182, p. 81-91, 2018.

PATRIZI, M. L.; PIANTANIDA, G.; COLUZZA, C.; MASCI, G. ATRP synthesis and association properties of temperature responsive dextran copolymers grafted with poly(*N*-isopropylacrylamide). **European Polymer Journal**, v. 45, p. 2779-2787, 2009.

- DE PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. A.; PAULA, H. B. Polysaccharide based copolymers as supramolecular systems in biomedical applications. **Current Drug Targets**, v. 16, p. 1591–1605, 2015.
- PIRES, N. R.; CUNHA, P. L. R.; DE PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A. Viscoelásticos oftálmicos: comparação entre os comerciais e formulações de galactomanana de *Dimorphandra gardneriana*. **Química Nova**, v. 33, n. 8, p. 1709-1713, 2010.
- PITOMBEIRA, N. A. O.; VERAS NETO, J. G.; SILVA, D. A.; FEITOSA, J. P. A.; PAULA, H. C. B.; DE PAULA, R. C. M. Self-assembled nanoparticles of acetylated cashew gum: Characterization and evaluation as potential drug carrier. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 610-615, 2015.
- PONZINI, E.; NATALELLO, A.; USAI, F.; BECHMANN, M.; PERI, F.; MULLER, N.; GRANDORI, R. Structural characterization of aerogels derived from enzymatically oxidized galactomannans of fenugreek, sesbania and guar gums. **Carbohydrate Polymers**, v. 207, p. 510-520, 2019.
- PRAJAPAT, A. L.; GOGATE, P. R. Intensification of degradation of guar gum: Comparison of approaches based on ozone, ultraviolet and ultrasonic irradiations. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 98, p. 165-173, 2015b.
- PRAJAPAT, A. L.; GOGATE, P. R. Intensification of depolymerization of aqueous guar gum using hydrodynamic cavitation. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 93, p. 1-9, 2015a.
- PRAJAPAT, A. L.; SUBHEDAR, P. B.; GOGATE, P. R. Ultrasound assisted enzymatic depolymerization of aqueous guar gum solution. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 29, p. 84-92, 2016.
- PRAJAPATI, V. D.; JANI, G. K.; MORADIYA, N. G.; RANDEIRA, N. P.; NAGAR, B. J.; NAIKWADI, N. N.; VARIYA, B. C. Galactomannan: A versatile biodegradable seed polysaccharide. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 60, p. 83–92, 2013.
- RAOUFI, N.; KADKHODAEI, R.; FANG, Y.; PHILLIPS, G. O. Ultrasonic degradation of persian gum and gum tragacanth: Effect on chain conformation and molecular properties. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 52, p. 311-317, 2019.
- RIVAS, C. J. M.; TARHINI, M.; BADRI, W.; MILADI, K.; GREIGE-GERGES, H.; NAZARI, Q. A. RODRIGUEZ, S. A. G.; ROMÁN, R. A.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 532, p. 66-81, 2017.
- ROBINSON, G.; ROSS-MURPHY, S. B.; MORRIS, E. R. Viscosity–molecular weight relationship, intrinsic chain flexibility and dynamic solution properties of guar galactomannan. **Carbohydrate Research**, v. 107, p. 17-32, 1982.
- RODRIGUEZ-CANTO, W.; CHEL-GUERRERO, L.; FERNANDEZ, V. V. A.; AGUILAR-VEJA, M. *Delonix regia* galactomannan hydrolysates: Rheological behavior and physicochemical characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 206, p. 573-582, 2019.

- RODKATE, N.; RUTNAKORNPITUK, M. Multi-responsive magnetic microsphere of poly(*N*-isopropylacrylamide)/carboxymethylchitosan hydrogel for drug controlled release. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 251-259, 2016.
- SAKAKIBARA, C. N.; SIERAKOWSKI, M. R.; CHASSENIEUX, C.; NICOLAI, T.; de FREITAS, R. A. Xyloglucan gelation induced by enzymatic degalactosylation; Kinetics and the effect of the molar mass. **Carbohydrate Polymers**, v. 174, p. 517-523, 2017.
- SALVALAGGIO, M. O.; FREITAS, R. A.; FRANQUETO, E. M.; KOOP, H. S.; SILVEIRA, J. L. M. Influence of the extraction time on macromolecular parameters of galactomannans. **Carbohydrate Polymers**, v.116, p. 200–206, 2015.
- SANTOS, D. S.; RODRIGUES, M. M. F. Atividades farmacológicas dos flavonoides: um estudo de revisão. **Estação Científica**, v. 7, n. 3, p. 29-35, 2017.
- SCHLACHET, I.; TROUSIL, J.; RAK, D.; KNUDSEN, K. D.; PAVLOVA, E.; NYSTROM, B. SOSNIK, A. Chitosan-graft-poly(methyl methacrylate) amphiphilic nanoparticles: Self-association and physicochemical characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 212, p. 412-420, 2019.
- SHEELA, B.; KALAIARASI, K.; VIJAYALAKSHMI, K.; SUDHA, P. N. Optimization of grafting parameters of nylon6-graft-acrylic acid copolymer using ceric ammonium nitrate as an initiator. **International Journal of Applied and Advanced Scientific Research**, v. 1, n. 2, p. 9-16, 2016.
- SOUMYA, R. S.; GHOSH, S.; ABRAHAM, E. T. Preparation and characterization of guar gum nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, p. 267-269, 2010.
- SONI, S. R.; GHOSH, A. Chapter 9 – Grafting onto biopolymers: application in targeted drug delivery. **Biopolymer Grafting: Applications**. 1. ed. Elsevier, 2018. 54 p.
- STRIEGEL, A. M.; YAU, W. W.; KIRKLAND, J. J.; BLY, D. D. **Modern Size-Exclusion Liquid Chromatography: Practice of Gel Permeation and Gel Filtration Chromatography**. 2. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2009. 494 p.
- SUN, X.; SHI, J.; XU, X.; CAO, S. Chitosan coated alginate/poly(*N*-isopropylacrylamide) beads for dual responsive drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 59, p. 273-281, 2013.
- TAN, S.; ZHAO, D.; YUAN, D.; WANG, H.; TU, K.; WANG, L.-Q. Influence of indomethacin-loading on the micellization and drug release of thermosensitive dextran-graft-poly(*N*-isopropylacrylamide). **Reactive & Functional Polymers**, v. 71, p. 820-827, 2011.
- THOMBARE, N.; JHA, U.; MISHRA, S.; SIDDIQUI, M. Z. Guar gum as a promising starting material for diverse applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 88, p. 361-372, 2016.

VILARÓ, P.; BENNADJI, Z.; BUDELLI, E.; MOYNA, G.; PANIZZOLO, L.; FERREIRA, F. Isolation and characterization of galactomannans from *Prosopis affinis* as potential gum substitutes. **Food Hydrocolloids**, v. 77, 711-719, 2018.

WANG, L. C.; WU, H.; JI, J.; XUE, F.; LIU, R. Preparation, analysis and antioxidant evaluation of the controlled product of polysaccharide from *Mactra veneriformis* by mild acid hydrolysis. **Carbohydrate Polymers**, v. 137, p. 709-718, 2016.

WANG, Q.; ELLIS, P. R.; ROSS-MURPHY, S. B. The stability of guar gum in an aqueous system under acidic conditions. **Food Hydrocolloids**, v. 14, p. 129-134, 2000.

WERSIG, T.; KROMBHOLZ, R.; JANICH, C.; MEISTER, A.; KRESSLER, J.; MADER, K. Indomethacin functionalised poly(glycerol adipate) nanospheres as promising candidates for modified drug release. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 123, p. 350-361, 2018.

WONG, H. L.; WU, X. Y.; BENDAYAN, R. Nanotechnological advances for the delivery of CNS therapeutics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 686-700, 2012.

YANG, L.; LIU, T.; SONG, K.; WU, S.; FAN, X. Effect of intermolecular and intramolecular forces on hydrodynamic diameters of poly(*N*-isopropylacrylamide) copolymers in aqueous solutions. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 127, p. 4280-4287, 2013.

YANG, L.-l., ZHANG, J.-m., HE, J.-s., ZHANG, J., GAN, Z.-h. Synthesis and characterization of temperature-sensitive cellulose-graft-poly(*N*-isopropylacrylamide) copolymers. **Chinese Journal of Polymer Science**, v. 33, p. 1640-1649, 2015.

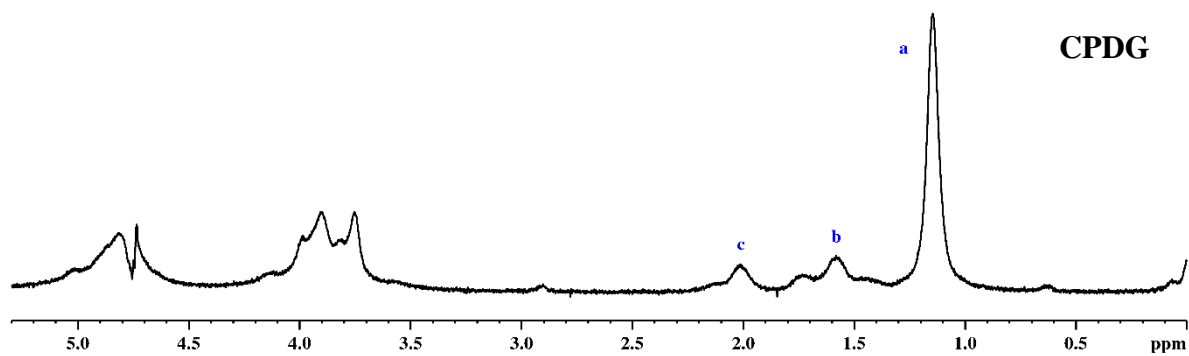
ZHANG, J.; CUI, Z.; FIELD, R.; MOLONEY, M. G.; RIMMER, S.; YE, H. Thermo-responsive microcarriers based on poly(*N*-isopropylacrylamide). **European Polymer Journal**, v. 67, p. 346-364, 2015.

ZHANG, H.-f.; ZHONG, H.; ZHANG, L.-l.; CHEN, S.-b.; ZHAO, Y.-j.; ZHU, Y.-l. Synthesis and characterization of thermosensitive graft copolymer of *N*-isopropylacrylamide with biodegradable carboxymethylchitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 785-790, 2009.

ZHOU, M.; YANG, L.; YANG, S.; ZHAO, F.; XU, L.; YONG, Q. Isolation, characterization and *in vitro* anticancer activity of an aqueous galactomannan from the seed of *Sesbania cannabina*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 113, p. 1241-1247, 2018.

**APÊNDICE A – ESPECTRO DE RMN ^1H DO COPOLÍMERO DE
GALACTOMANANA/POLI-*N*-ISOPROPILACRILAMIDA (CPDG)**

Figura A1 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, D_2O , 25 °C) para o copolímero CPDG



Fonte: dados da pesquisa.