



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

LAÍS RAMOS MONTEIRO DE LIMA

**SÍNTESE DE COPOLÍMEROS E PRÓ-FÁRMACOS DE GALACTOMANANA
OXIDADA E DERIVADOS AMINADOS POR REAÇÃO DE FORMAÇÃO DE BASE
DE SCHIFF**

FORTALEZA

2021

LAÍS RAMOS MONTEIRO DE LIMA

SÍNTESE DE COPOLÍMEROS E PRÓ-FÁRMACOS DE GALACTOMANANA
OXIDADA E DERIVADOS AMINADOS POR REAÇÃO DE FORMAÇÃO DE BASE DE
SCHIFF

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química.
Área de concentração: Química

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

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- L698s Lima, Laís Ramos Monteiro de.
Síntese de copolímeros e pró-fármacos de galactomanana oxidada e derivados aminados por reação de formação de base de schiff / Laís Ramos Monteiro de Lima. – 2021.
108 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2021.
Orientação: Prof. Regina Célia Monteiro de Paula.
1. Copolímero. 2. Base de Schiff. 3. Nanopartícula. 4. Pró-fármaco. 5. Doxorrubicina. I. Título.
CDD 540
-

LAÍS RAMOS MONTEIRO DE LIMA

SÍNTESE DE COPOLÍMEROS E PRÓ-FÁRMACOS DE GALACTOMANANA
OXIDADA E DERIVADOS AMINADOS POR REAÇÃO DE FORMAÇÃO DE BASE DE
SCHIFF

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química.

Aprovada em: 01/04/2021.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof.^a Dra. Jeanny da Silva Maciel
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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

Prof.^a Dra. Durcilene Alves da Silva
Universidade Federal do Piauí (UFPI)

Prof. Dr. Adonay Rodrigues Loiola
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus por todo amor

Aos meus amados pais, Margarilene e Carlos

AGRADECIMENTOS

Ao meu bom e amado Deus, por ter me guiado e ajudado quando nem eu mesma acreditava que poderia ir mais uma milha. Te amo e te amarei eternamente.

Aos meus doces e queridos pais, Margarilene e Carlos, que sempre me apoiaram, amaram incondicionalmente e que nunca mediram esforços para que eu conseguisse realizar meus sonhos, muitas vezes deixando os deles para depois.

Aos meus irmãos, Karlene e Hiago, como sou feliz de ter dividido minha infância e adolescência com vocês, tenho todos esses momentos guardados no meu coração. E Karlene, ainda foi além e me deu a coisa mais linda da tia, Felipe. Te amo, meus amores.

À minha doce avó, Margarida (*in memoriam*), a senhora é merecedora de toda gratidão, pois sempre foi uma avó maravilhosa, que sempre cuidou e amou cada um de nós incondicionalmente. Que um dia possamos nos encontrar na glória.

Ao meu muito amado esposo Everton, como sou feliz de ser sua esposa. Das muitas coisas boas que aconteceram nesse doutorado, uma delas foi me casar com você. Você é tudo que eu sonhei e um pouco mais. Agradeço pela sua enorme paciência e por ajudar em todas as etapas desse trabalho.

À professora Dra. Regina Célia Monteiro de Paula, que teve paciência e me ajudou bastante a concluir este trabalho. Agradeço também aos demais professores que durante muito tempo me ensinaram e me mostraram o quanto o saber é bom.

Aos meus antigos e novos amigos, Irisvan, Carlos Rhamon, Matheus, Vanessa, Ribamar, Leonira, Maria e principalmente a Raelle Ferreira Gomes pelas conversas nos momentos alegres e tristes, e pelas muitas figurinhas para meu trabalho. Que Deus sempre os guie vocês e realize os sonhos e projetos. Esses são os meus mais sinceros votos.

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

Ao Laboratório Oncologia Experimental (LOE) e ao Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM), na pessoa da Dra. Cláudia do Ó Pessoa e a Dra. Maria Francilene Souza Silva, pelas análises de citotoxicidade.

À professora Dra. Durcilene Alves Silva, ao Ms. Fábio de Oliveira Silva Ribeiro e ao professor Dr. Jeanlex Soares de Sousa pelas análises de microscopia de força atômica.

Ao CENAUREM, pelas análises de ressonância magnética nuclear.

À Central Analítica, pelas análises de microscopia eletrônica de varredura.

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

À CAPES, pelo apoio à pesquisa e incentivo financeiro, e aos demais órgãos de fomento (CNPq, FUNCAP) e ao INOMAT.

“Assim como os céus são mais altos do que a terra, também os meus caminhos são mais altos que os vossos caminhos, e os meus pensamentos, mais altos do que os vossos pensamentos” (Isaías 55:9).

RESUMO

Os nanomateriais duplamente responsivos têm sido alvo de inúmeras pesquisas nos últimos anos em áreas como biomateriais e matriz para liberação de fármacos. Entre estes sistemas, destacam-se os copolímeros formados a partir do polímero termoresponsivo poli-(N-isopropilacrilamida) (PNIPAm). O presente trabalho apresenta uma nova rota para síntese de copolímeros de polissacarídeos com PNIPAm via reação de formação de base de *Schiff*. A reação utilizou como materiais a galactomanana extraída de sementes da *Delonix regia* oxidada e o poli-(N-isopropilacrilamida) aminado (PNIPAm-NH₂). O copolímero formado a partir da galactomanana com grau de oxidação 30% (CP_{30%}-M), bem como o próprio polissacarídeo oxidado (DRU-Ox_{30%}), foram utilizados para formar pró-fármacos com a doxorubicina (DOX), um fármaco anticancerígeno. Na síntese dos copolímeros, foram investigados os efeitos do grau de oxidação da cadeia principal (galactomanana) e da massa molar da cadeia lateral (PNIPAm-NH₂). Os materiais de partida, os copolímeros e pró-fármacos foram caracterizados por técnicas espectroscópicas e cromatográficas. Todos os copolímeros apresentaram concentração de agregação crítica (CAC) a 25 e 50 °C, sendo os valores a 25 °C maiores do que a 50 °C. A propriedade de auto-organização termo induzida dos copolímeros foi investigada por espalhamento de luz dinâmico (DLS). Os copolímeros apresentaram temperatura de transição (LCST) em 34-40 °C. O tamanho das nanopartículas, a 37 °C variou de 234 – 365 nm. Os copolímeros também apresentaram resposta à variação de pH, sendo as partículas em pH 5,0 maiores do que em pH 7,4. Os pró-fármacos CP_{30%}-M-DOX e DRU-Ox_{30%}-DOX apresentaram diâmetros médios de partículas de 180 e 191 nm e um perfil de liberação de fármaco pH-responsivo, onde observou-se um aumento significativo do fármaco liberado com a diminuição do pH (pH 5,0). A citotoxicidade dos pró-fármacos foi analisada em células tumorais (B16F10 e SNB-19) e não tumorais (L929). Os pró-fármacos não apresentaram atividade frente à linhagem L929, porém foram eficientes frente às células B16F10 e SNB-19.

Palavras-Chaves: copolímeros; base de *Schiff*; nanopartícula; pró-fármaco; doxorubicina.

ABSTRACT

Dual responsive nanomaterials have been the subject of numerous research in recent years in areas such as in biomaterials and matrix for drug release. Among these systems, the copolymers formed from the thermo-responsive polymer poly-(N-isopropylacrylamide) (PNIPAm) stand out. The present work presents a new route for synthesis of polysaccharide copolymers with PNIPAm via Schiff's base reaction. The reaction used as starting materials the oxidized galactomannan (extracted from *Delonix regia* seeds) and the amine poly-(N-isopropylacrylamide) (PNIPAm-NH₂). Copolymers formed from galactomannan with an oxidation degree of 30% (CP_{30%}-M), as well as the oxidized polysaccharide itself (DRU-Ox_{30%}) were used to form prodrugs with doxorubicin (DOX), an anti-cancer drug. In the synthesis of copolymers, the effects of the degree of oxidation of the main chain (galactomannan) and the molar mass of the side chain (PNIPAm-NH₂) were investigated. The starting materials, the copolymers and prodrugs were characterized by spectroscopic and chromatographic techniques. All copolymers showed critical aggregation concentration (CAC) at 25 and 50 °C, with values at 25 °C greater than 50 °C. The thermoinduced self-organization property of copolymers was investigated by dynamic light scattering (DLS). The copolymers showed a transition temperature (LCST) between 34-40 °C. Nanoparticles size at 37 °C ranged from 234 - 365 nm. Copolymers also showed a response to pH variation, with particles at pH 5.0 being greater than pH 7.4, probably due to hydrolysis of the imine bond. The CP_{30%}-M-DOX and DRUOx_{30%}-DOX prodrugs had average particle diameters between 180 and 191 nm and a pH-responsive drug release profile, where a significant increase in the released drug was observed with decreasing pH (pH 5.0). The cytotoxicity of prodrugs was analyzed against tumor (B16F10 and SNB-19) and non-tumor (L929) cells. The prodrugs did not show activity against non-tumor cells; however, they were efficient against B16F10 and SNB-19 cells.

Keywords: copolymers; schiff's base; nanoparticle; pro-drug; doxorubicin

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Representação de copolímeros.....	22
Figura 2-	Esquema das estratégias “grafting from” e “grafting to”	24
Figura 3-	Reações de enxertia de PNIPAm por polimerização radicalar livre (A), reação de cicloadição azida-alcino (B) e reação de acoplamento por química de carbodiimidas (C).....	25
Figura 4-	Reação de formação de base de <i>Schiff</i>	26
Figura 5-	Mecanismo da reação de oxidação com periodato de sódio (NaIO ₄)	28
Figura 6-	Representação da estrutura das galactomananas.....	29
Figura 7-	Fórmula estrutural do monômero NIPAm (A) e seu polímero PNIPAm (B)..	31
Figura 8-	Interações das cadeias do PNIPAm em meio aquoso abaixo (A) e acima (B) da LCST.....	32
Figura 9-	Estrutura da doxorubicina (DOX).....	34
Figura 10-	Síntese do PNIPAm com terminação amina (PNIPAm-NH ₂)	38
Figura 11-	Esquema da reação de formação de base de <i>Schiff</i>	39
Figura 12-	Fluxograma da síntese dos copolímeros: análise da influência do tamanho da cadeia do PNIPAm-NH ₂ e o efeito da redução da ligação imina (A) e estudo do grau de oxidação (B).....	40
Figura 13-	Espectros na região do infravermelho do derivado oxidado sem pré-tratamento de ultrassom na região de 4000-400 cm ⁻¹ (A) e zoom da região de 1800 a 1500 cm ⁻¹ (B).....	47
Figura 14-	Espectros na região do infravermelho dos derivados oxidados com pré-tratamento de ultrassom na região de 4000-400 cm ⁻¹ (A) e zoom da região de 1800 a 1500 cm ⁻¹ (B).....	47

Figura 15-	Espectros de RMN ^1H (500 MHz, D_2O , 70°C) da galactomanana e dos derivados oxidados.....	49
Figura 16-	Cromatogramas de distribuição da massa molar por GPC da galactomanana e dos derivados oxidados.....	50
Figura 17-	Espectros na região do infravermelho dos PNIPAm- NH_2 sintetizados em diferentes tempos de reação na região de $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$	52
Figura 18-	Distribuição do diâmetro médio em função da temperatura ($25\text{-}50\text{ }^\circ\text{C}$) para os PNIPAm- NH_2 em diferentes tempos de reação.....	54
Figura 19-	Espectros na região do infravermelho dos PNIPAm- NH_2 sintetizados com diferentes proporções de AET:NIPAm na região de $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$	55
Figura 20-	Espectros de RMN ^1H (500 MHz, D_2O , $25\text{ }^\circ\text{C}$) dos PNIPAm- NH_2 sintetizados com diferentes proporções de AET:NIPAm.....	56
Figura 21-	Espectro de RMN ^{13}C (500 MHz, D_2O , $25\text{ }^\circ\text{C}$) do PNIPAm- $\text{NH}_2\text{-B}$	57
Figura 22-	Distribuição do diâmetro médio em função da temperatura ($25\text{-}50\text{ }^\circ\text{C}$) para os PNIPAm- NH_2 sintetizados com diferentes proporções de AET:NIPAm.....	58
Figura 23-	Espectros na região do infravermelho dos copolímeros CP-A, CP-A _R e CP-B na região de $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ (A) e zoom da região de $1800\text{ a }1500\text{ cm}^{-1}$ (B).....	60
Figura 24-	Espectros de RMN ^1H (500 MHz, D_2O , 25°C) dos copolímeros CP-A e CP-B.....	61
Figura 25-	Razão das intensidades (I_{338}/I_{334}) do espectro de excitação do pireno em função da concentração dos copolímeros CP-A, CP-A _R e CP-B a 25 e $50\text{ }^\circ\text{C}$	63
Figura 26-	Cromatogramas de distribuição da massa molar por GPC da DRO _{x10%} e dos copolímeros (CP-A, CP-A _R e CP-B)	65

Figura 27-	Distribuição do diâmetro médio em função da temperatura (25-50 °C) para os copolímeros CP-A, CP-A _R e CP-B.....	66
Figura 28-	Imagens de MFA de altura para as nanopartículas de CP-A(A) e CP-B(C) e de fase para CP- A(B) e de CP- B (D).....	68
Figura 29-	Distribuição de tamanhos de partícula dos copolímeros em pH 2,0. DRO _{x10%} , PNIPAm-NH ₂ -A, CP-A e CP-A _R no t= 0 (A), CP-A (B) e CP- A _R (C).....	70
Figura 30-	Viabilidade celular em células renais (HEK 293T) na presença da galactomanana oxidada (DRO _{x10%}), homopolímeros (PNIPAm-NH ₂ -A, PNIPAm- NH ₂ - B) e copolímeros (CP-A e CP-B)	71
Figura 31-	Espectros na região do infravermelho dos copolímeros CP _{10%} -M, CP _{20%} - M e CP _{30%} -M na região de 4000-400 cm ⁻¹	73
Figura 32-	Espectros de RMN ¹ H (500 MHz, D ₂ O, 25°C) dos copolímeros CP _{10%} - M, CP _{20%} -M e CP _{30%} -M.....	74
Figura 33-	Razão das intensidades (I ₃₃₈ /I ₃₃₄) do espectro de excitação do pireno em função da concentração dos copolímeros CP _{10%} -M, CP _{20%} -M e CP _{30%} -M a 25 e 50 °C.....	75
Figura 34-	Cromatogramas de distribuição da massa molar por GPC dos copolímeros CP _{10%} -M, CP _{20%} -M e CP _{30%} - M.....	77
Figura 35-	Distribuição do diâmetro médio em função da temperatura (25-50 °C) para os copolímeros CP _{10%} -M, CP _{20%} -M e CP _{30%} -M.....	78
Figura 36-	Variação do diâmetro médio em função do tempo para os copolímeros CP _{10%} - M, CP _{20%} -M e CP _{30%} - M em pH 7,4 e 5,0 a 37 °C.....	80
Figura 37-	Espectro na região do infravermelho do pró-fármaco CP _{30%} -M-DOX na região de 4000-400 cm ⁻¹ (A) e zoom da região de 1800 a 1500 cm ⁻¹ (B).....	83

Figura 38-	Espectro na região do infravermelho do pró-fármaco DRU-Ox _{30%} -DOX na região de 4000-400 cm ⁻¹ (A) e zoom da região de 1800 a 1500 cm ⁻¹ (B).....	83
Figura 39-	Espectros de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆ , 25 °C) dos pró-fármacos CP _{30%} - M- DOX e DRU-Ox _{30%} DOX.....	84
Figura 40-	Razão das intensidades (I338/I334) do espectro de excitação do pireno em função da concentração dos pró-fármacos CP _{30%} -M-DOX e DRU- Ox _{30%} - DOX a 25 e 50 °C.....	85
Figura 41-	Distribuição de tamanhos por DLS dos pró-fármacos CP _{30%} -M-DOX e DRU- Ox _{30%} -DOX a 37 °C.....	86
Figura 42-	MFA das amostras: CP _{30%} -M em (A) imagem 3D, (B) imagem 2D – Z-PHASE e gráfico de distribuição por diâmetro de partícula em (C); CP _{30%} -M-DOX em (D) imagem 3D, (E) imagem 2D – Z-PHASE e gráfico de distribuição por diâmetro de partícula em (F); DRU-OX _{30%} -DOX em (G) im imagem 3D, (H) imagem 2D – Z-PHASE e gráfico de distribuição por diâmetro de partícula em (I).....	88
Figura 43-	Perfil de liberação in vitro da DOX das nanopartículas dos pró-fármacos CP _{30%} - M-DOX e DRU-Ox _{30%} -DOX em PBS 7,4 e 5,0 a 37 °C.....	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Copolímeros de polissacarídeo e PNIPAm: rota de síntese/reagente e aplicação.....	30
Tabela 2-	Rendimento das reações de oxidação e grau de oxidação	45
Tabela 3-	Dados de massas molares da galactomanana e seus derivados oxidados determinadas por GPC.....	50
Tabela 4-	Dados de massas molares de pico (M_{pk}) dos PNIPAm-NH ₂ em diferentes tempos de reação.....	53
Tabela 5-	Rendimento e quantidade de NH ₂ dos PNIPAm-NH ₂ sintetizados com diferentes proporções AET:NIPAm.....	55
Tabela 6-	Dados de massas molares e LCST dos PNIPAm-NH ₂ sintetizados com diferentes proporções AET:NIPAm.....	58
Tabela 7-	Rendimento reacional e percentual de NIPAm dos copolímeros CP-A, CP- A _R e CP-B.....	59
Tabela 8-	Valores de CAC dos copolímeros CP-A, CP-A _R e CP-B a 25 e 50 °C.....	63
Tabela 9-	Temperatura de transição (LCST) e diâmetro médio a 45°C das nanopartículas dos copolímeros CP-A, CP-A _R e CP-B.....	66
Tabela 10-	Rendimento reacional e percentual de NIPAm (%) dos copolímeros CP _{10%} -M, CP _{20%} -M e CP _{30%} -M.....	72
Tabela 11-	Valores de CAC dos copolímeros CP _{10%} -M, CP _{20%} -M e CP _{30%} -M a 25 e 50 °C.....	76
Tabela 12-	Temperatura de transição (LCST) e diâmetro médio das nanopartículas a 37 °C dos copolímeros CP _{10%} -M, CP _{20%} -M e CP _{30%} -M.....	79
Tabela 13-	Eficiência de fármaco ligado (EFL) e carga de fármaco ligado (CFL) dos pró-fármacos CP _{30%} -M-DOX e DRU-Ox _{30%} -DOX.....	82

Tabela 14-	Avaliação da concentração inibitória média (CI ₅₀) das amostras frente as linhagens tumorais e não tumorais.....	91
Tabela 15-	Panorama geral dos copolímeros e pró-fármaco.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AET·HCl	cloridrato de 2-aminoetanotiol
CAC	Concentração de agregação crítica
CFL	Conteúdo de fármaco ligado
CP-B	Copolímero formado pelo PNIPAm-NH ₂ -B e DROx _{10%} na proporção em massa de 1:1
CP-A	Copolímero formado pelo PNIPAm-NH ₂ -A e DROx _{10%} na proporção em massa de 1:1
CP-A _R	Copolímero formado pelo PNIPAm-NH ₂ -A e DROx _{10%} na proporção em massa de 1:1, com redução da ligação imina
CP _{10%} -M	Copolímero formado pelo PNIPAm-NH ₂ -M e DRU-Ox _{10%} na proporção em massa de 1:1
CP _{20%} -M	Copolímero formado pelo PNIPAm-NH ₂ -M e DRU-Ox _{20%} na proporção em massa de 1:1
CP _{30%} -M	Copolímero formado pelo PNIPAm-NH ₂ -M e DRU-Ox _{30%} na proporção em massa de 1:1
CP _{30%} -M-DOX	Pró-fármaco de CP _{30%} -M e DOX
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
DROx _{10%}	Galactomanana oxidada 10%
DRU-Ox _{10%}	Galactomanana oxidada 10% com tratamento de ultrassom
DRU-Ox _{20%}	Galactomanana oxidada 20% com tratamento de ultrassom
DRU-Ox _{30%}	Galactomanana oxidada 30% com tratamento de ultrassom
DRU-Ox _{30%} -DOX	Pró-fármaco de DRU-Ox _{30%} e DOX
DSS	2,2-dimetilsilapentano-5-sulfonato de sódio
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOX	Doxorrubicina
EFL	Eficiência de fármaco ligado
FT-IR	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho
GPC	Cromatografia de permeação em gel
KPS	Persulfato de potássio
LCST	Temperatura crítica de solução inferior
M/G	Manose/Galactose

MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MFA	Microscopia de força atômica
M_{pk}	Massa molar de pico
M_n	Massa molar média numérica
M_w	Massa molar média ponderal
NIPAm	N-isopropilacrilamida
PBS	Tampão fosfato
PNIPAm-NH ₂	Poli-(N-isopropilacrilamida) com terminação amina
PNIPAm-NH ₂ -B	Poli-(N-isopropilacrilamida) com terminação amina com massa molar baixa ($7,3 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$)
PNIPAm-NH ₂ -M	Poli-(N-isopropilacrilamida) com terminação amina com massa molar média ($2,5 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$)
PNIPAm-NH ₂ -A	Poli-(N-isopropilacrilamida) com terminação amina com massa molar alta ($64,1 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$)
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
2.1	Copolímeros.....	22
2.2	Síntese de copolímero enxertado.....	23
2.3	Reação de formação de base de Schiff.....	26
2.4	Reação de oxidação.....	27
2.5	Galactomanana.....	28
2.6	Poli-(N-isopropilacrilamida)	31
2.7	Pró-fármacos poliméricos.....	33
3	OBJETIVOS.....	35
3.1	Objetivo geral.....	35
3.2	Objetivos específicos.....	35
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1	Materiais.....	36
4.2	Oxidação da galactomanana.....	36
4.2.1	<i>Determinação do grau de oxidação.....</i>	<i>37</i>
4.2.2	<i>Síntese do poli-(N-isopropilacrilamida) com terminação amina (PNIPAm-NH₂)</i>	<i>37</i>
4.2.3	<i>Determinação dos grupos NH₂.....</i>	<i>38</i>
4.2.4	<i>Reação de base de Schiff da galactomanana oxidada com poli- (N-isopropilacrilamida) com terminação amina (PNIPAm-NH₂)</i>	<i>38</i>
4.2.5	<i>Redução da ligação imina.....</i>	<i>39</i>
4.2.6	<i>Purificação dos copolímeros.....</i>	<i>39</i>
4.3	Estudo de estabilidade em meio ácido.....	40
4.4	Estabilidade da ligação imina.....	40
4.5	Síntese dos pró-fármacos.....	40
4.6	Liberação <i>in vitro</i> da DOX em diferentes valores de pH.....	41
4.7	Técnicas de caracterização.....	41
4.7.1	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR).....</i>	<i>41</i>
4.7.2	<i>Ressonância magnética nuclear (RMN).....</i>	<i>42</i>
4.7.3	<i>Análise elementar.....</i>	<i>42</i>

4.7.4	<i>Cromatografia de permeação em gel (GPC)</i>	42
4.7.5	<i>Concentração de agregação crítica (CAC)</i>	42
4.7.6	<i>Espalhamento de luz dinâmico (DLS)</i>	43
4.7.7	<i>Microscopia de força atômica (MFA)</i>	43
4.7.8	<i>Cultura de células</i>	44
4.7.9	<i>Citotoxicidade in vitro</i>	44
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1	Caracterização da galactomanana e dos derivados oxidados	45
5.1.1	<i>Rendimento e grau de oxidação</i>	45
5.1.2	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FT-IR)</i>	46
5.1.3	<i>Ressonância magnética nuclear (RMN)</i>	48
5.1.4	<i>Cromatografia de permeação em gel (GPC)</i>	49
5.2	Caracterização dos poli-(N-isopropilacrilamida) aminados	51
5.2.1	<i>Efeito do tempo de reação sobre as características do PNIPAm-NH₂</i>	51
5.2.2	<i>Efeito da variação da proporção de AET: NIPAm sobre as características do PNIPAm-NH₂</i>	54
5.3	Caracterização dos copolímeros: influência do tamanho da cadeia do PNIPAm- NH₂ e o efeito da redução da ligação imina	58
5.3.1	<i>Rendimento e percentual de NIPAm</i>	59
5.3.2	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FT-IR)</i>	59
5.3.3	<i>Ressonância magnética nuclear (RMN)</i>	61
5.3.4	<i>Concentração de agregação crítica (CAC)</i>	61
5.3.5	<i>Cromatografia de permeação em gel</i>	64
5.3.6	<i>Caracterização das nanopartículas</i>	65
5.3.6.1	<i>Espalhamento de luz dinâmico (DLS)</i>	65
5.3.6.2	<i>Microscopia de força atômica (MFA)</i>	68
5.3.6.3	<i>Estudo da estabilidade da ligação imina em pH 2,0</i>	69
5.3.7	<i>Ensaio de citotoxicidade in vitro</i>	70
5.4	Caracterização dos copolímeros: estudo do efeito do grau de oxidação	72
5.4.1	<i>Rendimento e percentual de NIPAm</i>	72
5.4.2	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FT-IR)</i>	73
5.4.3	<i>Ressonância magnética nuclear (RMN)</i>	74
5.4.4	<i>Concentração de agregação crítica (CAC)</i>	75

5.4.5	<i>Cromatografia de permeação em gel</i>	77
5.4.6	<i>Caracterização das nanopartículas</i>	78
5.4.6.1	<i>Espalhamento de luz dinâmico (DLS)</i>	78
5.4.6.2	<i>Estabilidade da ligação imina</i>	80
5.5	<i>Sínteses e caracterização dos pró-fármacos</i>	81
5.5.1	<i>Eficiência de fármaco ligado (%) e carga de fármaco ligado (%)</i>	82
5.5.2	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FT-IR) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</i>	82
5.5.3	<i>Concentração de agregação crítica (CAC)</i>	85
5.5.4	<i>Caracterização das nanopartículas</i>	86
5.5.4.1	<i>Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e Microscopia de força atômica (MFA)</i>	86
5.5.4.2	<i>Análise da liberação da DOX in vitro</i>	89
5.5.5	<i>Citotoxicidade in vitro</i>	90
5.6	<i>Panorama geral dos copolímeros e pró-fármacos</i>	92
6	CONCLUSÃO	94
	REFERÊNCIAS	96

1 INTRODUÇÃO

Em várias áreas da ciência, incluindo biomedicina, sensores, catalisadores e o ramo têxtil, tem-se estudado os materiais inteligentes termorresponsivos devido à sua capacidade de modificar suas características físicas como resultado de uma pequena variação de temperatura. Para a maioria dessas aplicações, são utilizados materiais nanoestruturados com diferentes morfologias, tais como nanopartículas, micelas e vesículas, formadas pela auto-organização de macromoléculas em torno da temperatura de transição crítica (LCST) (MICHAILOVA *et al.*, 2018; STUCKI *et al.*, 2018).

Geralmente essas macromoléculas são copolímeros enxertados com caráter anfifílico, onde um segmento hidrofóbico e um hidrofílico (termorresponsivo) se organizam em solução aquosa em núcleo (hidrofóbico) e coroa (ATANASE *et al.*, 2017; WEI *et al.*, 2009). Contudo, recentemente, as atenções da comunidade científica têm se voltado para a síntese de copolímeros duplamente hidrofílicos, que consistem em dois segmentos hidrofílicos, sendo que um deles apresenta comportamento termorresponsivo (cadeia principal ou lateral). Em meio aquoso e mediante estímulos externos de temperatura, esses copolímeros se organizam em um núcleo e uma coroa, já que o segmento termorresponsivo transita de hidrofílico para hidrofóbico (WANG *et al.*, 2015; TU *et al.*, 2018).

O poli-(N-isopropilacrilamida) (PNIPAm) é um dos polímeros termoresponsivos mais utilizados na síntese de copolímeros duplamente hidrofílicos, devido ao fato de apresentar uma temperatura de transição (LCST) bem definida (32 °C) (GOMES *et al.*, 2020). A sua utilização na formação de copolímeros com polissacarídeos traz várias vantagens, incluindo biocompatibilidade e biodegradabilidade. As rotas de sínteses mais comuns para esses copolímeros estão baseadas de duas estratégias de enxertia diferentes, conhecida como *grafting from* (por exemplo, polimerização radicalar livre) e *grafting to* (por exemplo, química das carbodiiminas).

No método de polimerização radicalar livre, o monômero de N-isopropilacrilamida é polimerizado em um sítio ativo na cadeia do polissacarídeo. Já na síntese utilizando a química das carbodiiminas as cadeias pré-formadas do poli-(N-isopropilacrilamida) funcionalizadas com amina (PNIPAm-NH₂) reagem com grupos carboxílicos da cadeia do polissacarídeo. A vantagem da estratégia *grafting to* reside no fato de que as cadeias podem ser feitas sob medida e caracterizadas antes da reação de acoplamento (ZHANG *et al.*, 2015; SEIDI *et al.*, 2018).

A reação de formação de base de *Schiff* é uma reação de condensação entre um aldeído ou cetona e uma amina primária formando uma ligação imina, também conhecida como base de *Schiff*. Geralmente, os grupos aldeídos são introduzidos em polissacarídeos por meio de uma reação de oxidação utilizando periodato de sódio como agente oxidante. A ligação imina é covalente dinâmica, ou seja, apresenta reversibilidade dependendo do valor do pH do meio. Devido a essa característica, ela vem sendo utilizada para a formação de diversos materiais, como conjugados de polissacarídeos-fármacos (pró-fármaco) (LI *et al.*, 2017), hidrogéis injetáveis (LIMA *et al.*, 2020), *scaffolds* (MACIEL *et al.*, 2019) e nanopartículas (YAO *et al.*, 2011).

Apesar da facilidade, simplicidade e da possibilidade de a reação ocorrer em meio aquoso, não há relato de trabalhos em que essa metodologia, reação de formação de base de *Schiff*, tenha sido utilizada para produzir copolímeros duplamente hidrofílicos de PNIPAm-NH₂ e polissacarídeo, nem na utilização desses copolímeros para formação de pró-fármacos com doxorubicina (DOX). A DOX está entre os fármacos anticancerígenos mais estudados na formação de pró-fármaco. Da família das antraciclinas, é um agente quimioterápico eficaz e amplamente utilizado para o tratamento de uma ampla gama de tumores (VARELA-LÓPEZ *et al.*, 2019).

Galactomanana de *Delonix regia* é um polissacarídeo neutro, extraído do endosperma de semente que apresenta alta massa molar com estrutura geral composta por uma cadeia linear de unidades de β -D-manopiranosose (manose) com ramificações de α -D-galactopiranosose (galactose) ((PONZINI *et al.*, 2019). A razão molar manose / galactose (M/G) pode mudar dependendo do procedimento de extração, localização geográfica e temperatura onde as sementes foram coletadas podendo variar de 1,54 a 5,1 (CHEIRMADURAI, THANIKAIVELAN, MURALI, 2016., NWOKOCHA, WILLIAMS YADAN, 2018). Devido suas excelentes características físico-químicas a galactomanana de *Delonix regia* vem sendo utilizada em várias aplicações biomédicas.

Tendo em vista o supracitado, este trabalho propõe o desenvolvimento de uma nova metodologia para a síntese de copolímeros duplamente hidrofílicos de galactomanana de *Delonix regia* oxidada/PNIPAm funcionalizado com grupos amina e a formação de pró-fármacos do copolímero com DOX via reação de formação de base de *Schiff*.

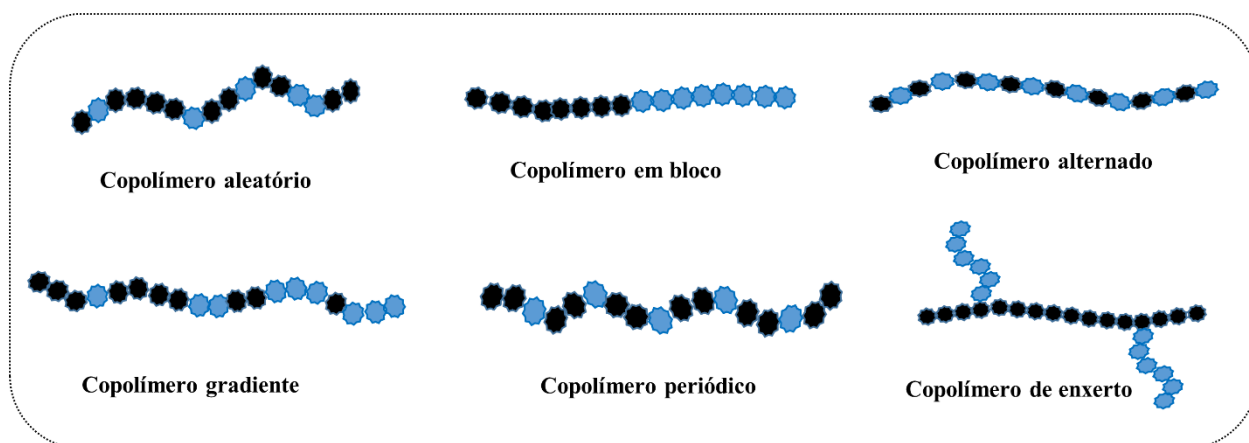
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Copolímeros

Os polímeros formados por mais de um tipo de monômero são designados como copolímeros. O início do estudo dos desses materiais é datado de 1930, período no qual foi desenvolvida a borracha sintética (HUANG; TURNER, 2017). Desde então, houve um crescente interesse nas pesquisas relacionadas à síntese e ao desenvolvimento de novos copolímeros. Isso se deve à possibilidade de obter copolímeros com propriedades específicas por meio de uma ampla variedade de combinações de monômeros.

Os copolímeros são categorizados de acordo com o arranjo dos monômeros em: aleatório (Khanlari et al. (2021), bloco (ALSUBAIE *et al.*, 2019), alternado (BRADY *et al.*, 2019), periódico (NTOUKAM *et al.*, 2020), gradiente (ALAM *et al.*, 2019) e enxertado (WANG *et al.*, 2019) (**Figura 1**).

Figura 1 - Representação de tipos de copolímeros



Fonte: Elaborada pela autora

Copolímeros de enxerto ou enxertados são geralmente macromoléculas formadas pela inserção de uma ou mais sequências de cadeias laterais em uma cadeia principal, sendo que essas sequências apresentam características constitucionais diferentes. Uma forma simples de representar os copolímeros enxertados é poliA-*g*-poliB, onde poliA é a cadeia principal e o poliB a cadeia lateral (YANG *et al.*, 2020). Os copolímeros enxertados podem ser divididos em dois tipos: anfifílicos e duplamente hidrofílicos.

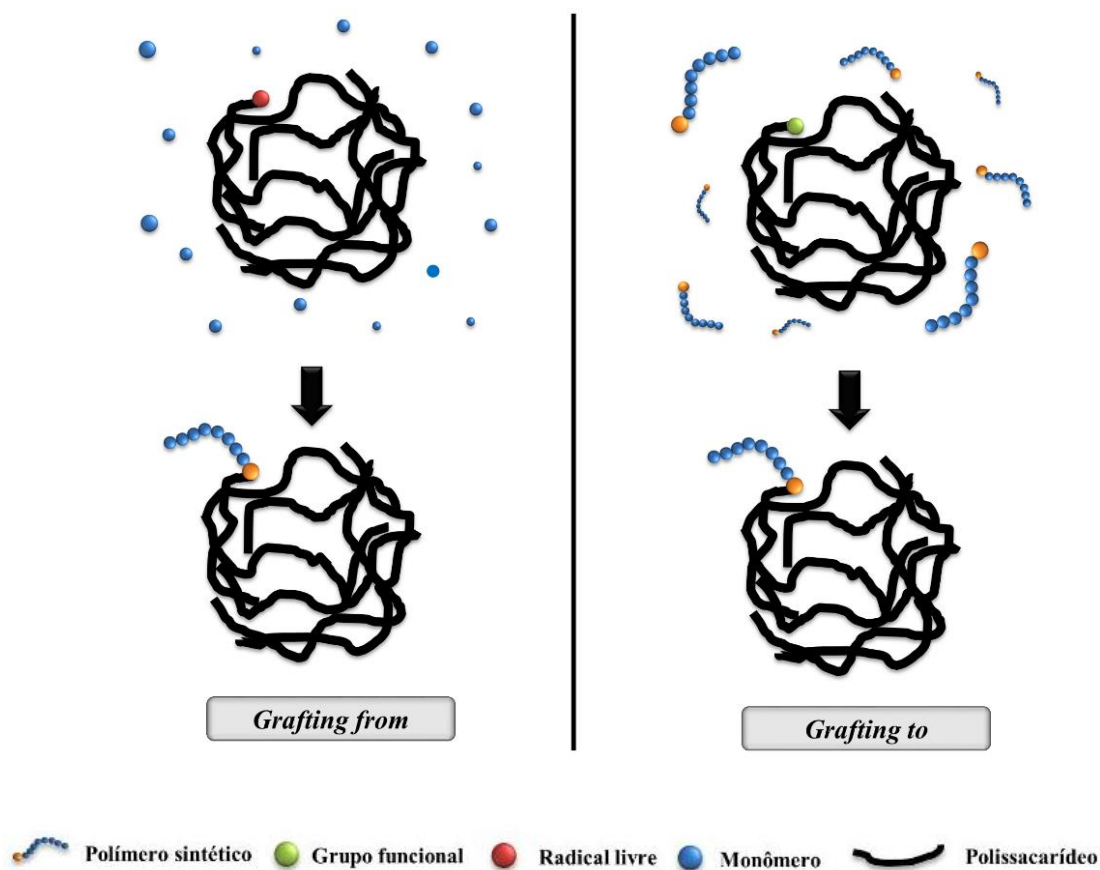
Os copolímeros anfifílicos apresentam segmentos hidrofílico/hidrofóbico. Os duplamente hidrofílicos, como o próprio nome indica, apresentam cadeia principal e lateral solúvel em água, porém com natureza química diferente. A cadeia principal promove apenas a solubilização em água, enquanto as cadeias laterais respondem a um estímulo externo. Ambas as cadeias hidrofílicas em solução aquosa são bem solvatadas e se comportam como clássicos homopolímeros hidrofílicos sem características anfifílicas, porém mediante estímulos externos tais como: temperatura, força iônica e pH, a hidrofobicidade de uma das cadeias é alterada tornando-se hidrofóbica, introduzindo assim a característica anfifílica ao copolímero. Estruturas funcionais como nanopartículas e micelas podem ser formadas com copolímeros anfifílicos (JUNDI *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2015; TU *et al.*, 2018).

2.2 Síntese de copolímero enxertado

As estratégias para a síntese de copolímeros enxertados podem ser classificadas em três grandes grupos: *grafting from*, *grafting to* e *grafting through*, sendo que as duas primeiras são as mais utilizadas (NOREEN *et al.*, 2020) (**Figura 2**). Na estratégia *grafting from* um sítio de iniciação é formado na cadeia principal tornando-a um macroiniciador. Em seguida, ocorre a polimerização dos monômeros nesse sítio (ATANASE *et al.*, 2017). Esse sítio (radical) pode ser formado por métodos físicos ou químicos, tais como: sistema redox, agente oxidantes fortes (Ce^{4+}) ou irradiação de alta ou baixa energia (**Figura 3A**). No entanto, a estratégia *grafting from* apresenta algumas desvantagens, como a formação indesejada de homopolímeros simultaneamente durante a reação e falta de controle sobre as estruturas poliméricas formadas (SHAVANDI; ALI, 2019).

Na estratégia *grafting to*, a síntese ocorre por reação de acoplamento entre o grupo funcional da cadeia principal e os grupos finais reativos das cadeias laterais pré-formadas. A vantagem dessa técnica é que as cadeias podem ser “feitas sob medida” e caracterizadas antes da reação de acoplamento (WANG *et al.*, 2015; SEIDI *et al.*, 2018). A reação utilizada para realizar o acoplamento depende dos grupos funcionais presentes na cadeia principal e lateral.

Figura 2 - Esquema das estratégias *grafting from* e *grafting to*

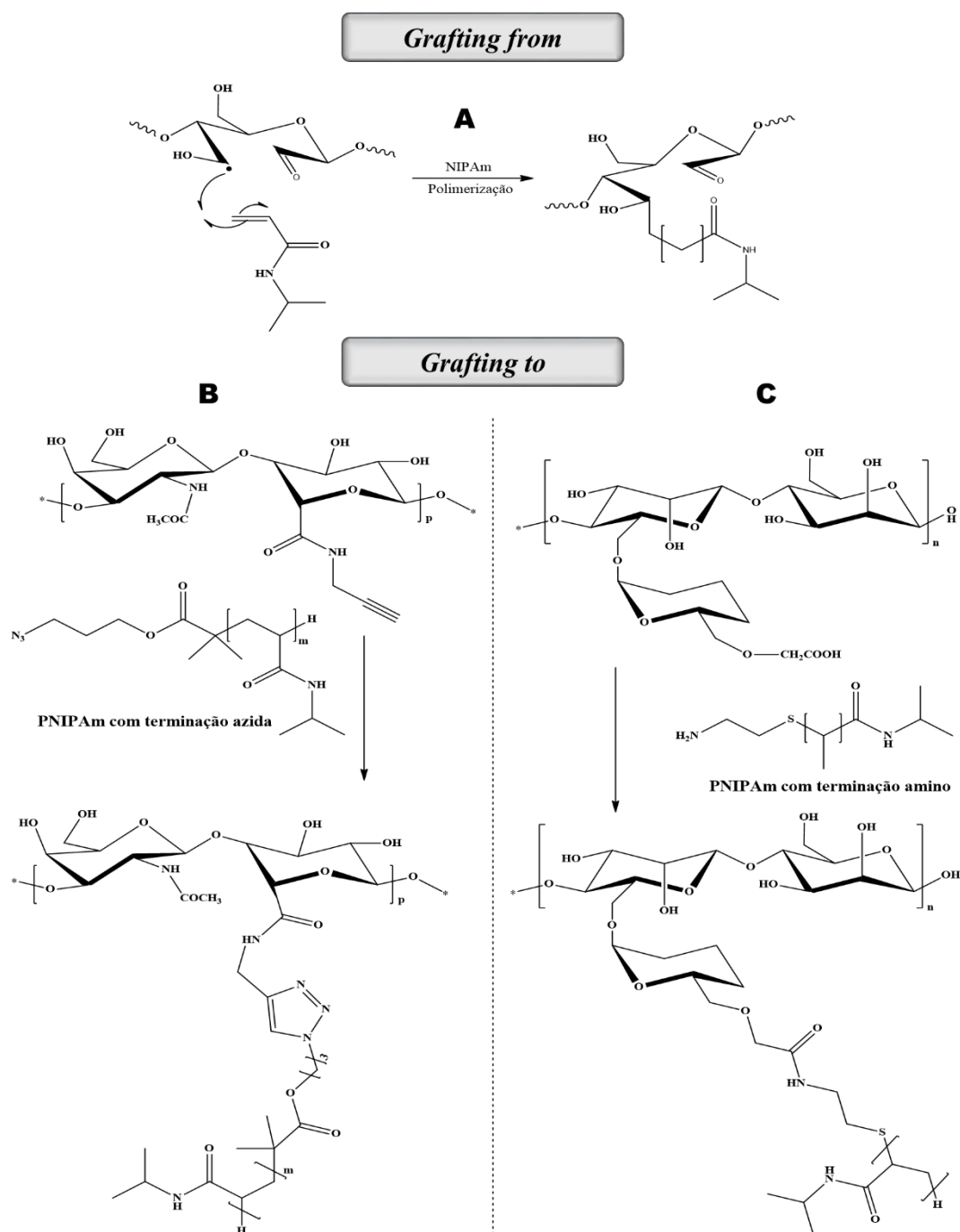


Fonte: Adaptada de Olson e colaboradores (2020).

Uma reação amplamente utilizada para a síntese de copolímeros enxertados duplamente hidrofílico, de polissacarídeo e polímero sensível a temperatura, ou seja, termorresponsivo, utilizando a estratégia *grafting to*, é a de acoplamento por química de carbodiimidas, onde amina e ácidos carboxílicos são acoplados utilizando o reagente 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) para a formação de amidas (**Figura 3C**).

Outras reações que também usam a estratégia *grafting to* são as reações *click*, caracterizadas por apresentarem alta eficiência, especificidade, facilidade de síntese e produtos facilmente purificáveis. Reações que atendem esses critérios são muitas, como as químicas de Diels-Alder e tiol-eno, cicloadição azida-alcino terminal catalisada por cobre, assim como as condensações (imina, hidrazona e oxima carbonila) (COLLINS *et al.*, 2016).

Figura 3 - Reações de enxertia de PNIPAm por polimerização radical livre (A), reação de cicloadição azida-alcino (B) e reação de acoplamento por química de carbodiimidas (C)



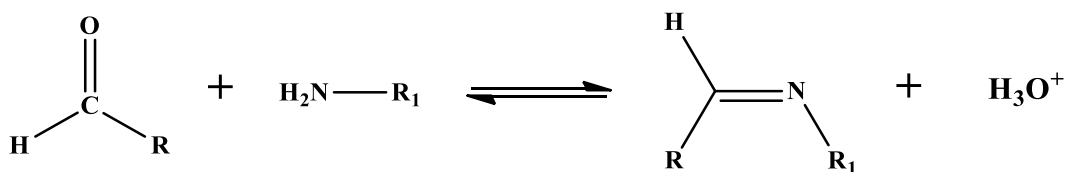
Fonte: Elaborada pela autora

Um outro tipo de reação *click* promissora para a síntese de copolímeros, porém pouco investigada, é a reação de formação de base de *Schiff*.

2.3 Reação de formação de base de Schiff

A reação de formação de base de Schiff foi descoberta pelo químico alemão Hugo Joseph Schiff, em 1864. É uma reação de condensação entre classes de compostos que tem grupos funcionais amina (amina primária, hidroxilamina, hidrazinas etc.) e carbonila (aldeídos e algumas cetonas) formando a ligação imina, conhecida como base de Schiff (**Figura 4**) (XIN; YUAN, 2012). Um dos pontos positivos dessa reação é o fato dela ocorrer em temperatura ambiente, sem necessidade de catalisadores e ter a água como o único subproduto (BUI; BROOK, 2019).

Figura 4 - Reação de formação de base de Schiff



Fonte: Elaborada pela autora

Hidrogéis e nanoestruturados formados por reação de formação de base de Schiff vêm sendo utilizados para remoção de metais pesados, já que materiais que contêm átomos doadores de elétrons como N, O e S são capazes de formar complexos com alguns íons metálicos (CHEN *et al.*, 2019; SONG *et al.*, 2019). Formação de emulsões de Pickering também é uma das aplicações, onde gotas de óleo são estabilizadas por nanopartículas formadas por base de Schiff (PANG *et al.*, 2020).

Uma outra área que vem utilizando materiais formados por reação de formação de base de Schiff entre polissacarídeo-polissacarídeo ou polissacarídeo-polímero sintético é a engenharia de tecidos. Entre esses materiais pode-se citar os hidrogéis injetáveis e os *scaffolds*. Um exemplo é o trabalho de Yang e colaboradores (2013) que sintetizaram hidrogel injetável a partir de dextrana oxidada (Dex-CHO) e carboximetil celulose funcionalizada com hidrazina (CMC-NHNH₂) e Maciel e colaboradores (2019) que produziram *scaffolds* de goma do cajueiro oxidada e gelatina por reação de base de Schiff.

O grupo imina, formado pela reação de base de Schiff, também tem encontrado aplicação na área biomédica, devido à natureza reversível da ligação C=N com o pH. Em condições fisiológicas (pH 7,4) a ligação é estável, todavia é prontamente clivável sob condições ácidas (ANTONY *et al.*, 2019).

As ligações iminas, por serem pH-responsivas, têm se mostrado promissores em liberação de fármacos anticancerígenas. Isso ocorre porque os tecidos e células cancerígenas apresentam pH típicos de 6,5-7,2, enquanto os componentes intracelulares, como endo/lisossomos, podem atingir pH de até 4,5 (FENG *et al.*, 2017). Devido a esses microambientes com baixo pH, as ligações pH-responsivas podem funcionar como direcionadores para a liberação desses fármacos em células específicas.

Os copolímeros também são excelentes candidatos para aplicações biomédicas, como liberação de fármaco. Porém a síntese de copolímero utilizando essa rota (base de *Schiff*) ainda é um campo pouco explorado, apesar de ser uma rota simples, rápida e de baixo custo. Na literatura existe apenas um trabalho, que relata o enxerto de cadeias pré-formadas de polietileno glicol aminado em carboximetilcelulose oxidada via reação de formação de base de *Schiff* (BORDALLO *et al.*, 2015).

Para que alguns desse polissacarídeos fossem utilizados na reação de base de *Schiff* foi necessária uma reação de oxidação, já que eles não apresentam grupos aldeídos em sua estrutura.

2.4 Reação de oxidação

Polissacarídeos que apresentam em sua estrutura dióis vicinais (hidroxilas vizinhas) podem ser oxidados seletivamente para introduzir grupos aldeídos, formando assim polissacarídeos dialdeídos (PDA) (KESHK *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2019; GUO *et al.*, 2014). Os polissacarídeos com ligações glicosídicas (1→2), (1→4) e (1→6) são excelentes candidatos, pois apresentam dióis vicinais (KRISTIANSEN; POTTHAST; CHRISTENSEN, 2010).

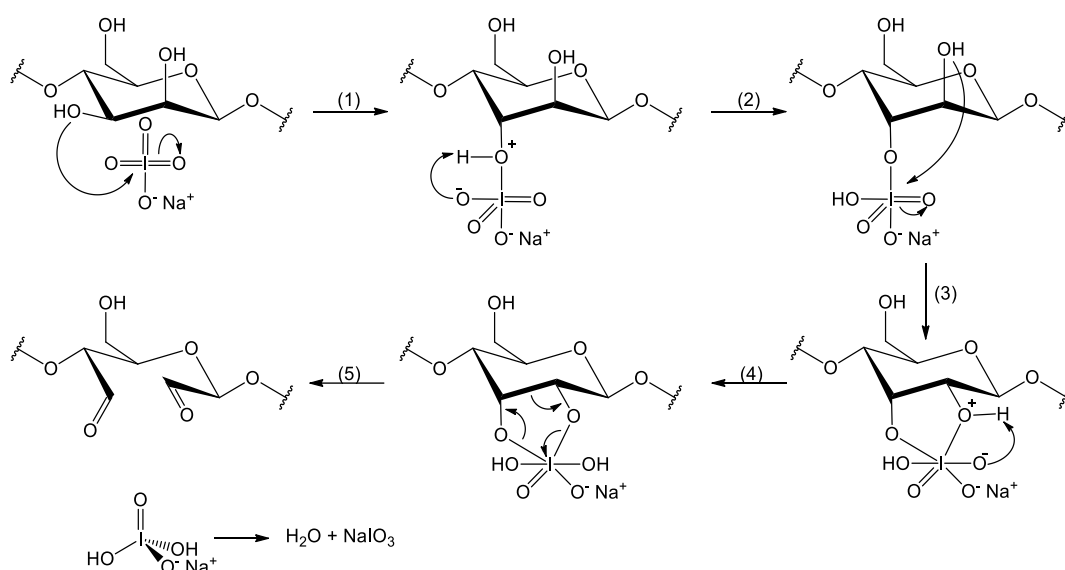
A reação de oxidação utilizando periodato de sódio promove oxidação seletiva dos polissacarídeos. O mecanismo de reação de dióis vicinais com periodato de sódio é ilustrado na **Figura 5**. Antes da clivagem da ligação ocorre a formação de um intermediário cíclico denominado éster de periodato. Em seguida ocorre a clivagem da ligação carbono-carbono que gera os dialdeídos (DING; WU, 2020; SILVA *et al.*, 2020).

Apesar da reação de oxidação ser simples, utilizar baixa quantidade de agente oxidante e ter a possibilidade de ser realizada em meio aquoso, a formação do intermediário cíclico pode ser afetada pela geometria do substrato, bem como pelo pH e temperatura da reação (CHEMIN *et al.*, 2016; DING; WU, 2020). Além disso, a reação é exotérmica e o periodato apresenta alta sensibilidade a luz. Devido a essas condições, a oxidação de polissacarídeos com

periodato é frequentemente conduzida no escuro em temperatura não superior a 30 °C e com pH no intervalo de 3-7 (KHOLIYA *et al.*, 2016)

A modificação da estrutura dos polissacarídeos após a oxidação é acompanhada por algumas mudanças nas características químicas e físicas. Após a oxidação, as cadeias apresentam maior flexibilidade que permite um maior empacotamento da macromolécula. Geralmente os PDAs apresentam menor massa molar, devido as duplas oxidações (C2-C3 e C3-C4), que levam a liberação de ácido fórmico em unidades terminais ou ramificações (LIMA *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2020; DING; WU., 2020). Outras características importantes dos PDAs são a baixa reatividade e labilidade hidrolítica em condições fisiológicas.

Figura 5 - Mecanismo da reação de oxidação com periodato de sódio (NaIO_4)



Fonte: Elaborada pela autora

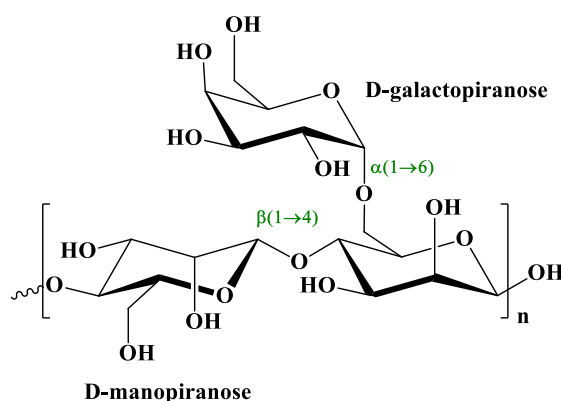
Vários polissacarídeos vêm sendo modificados com periodato, tais como: nanocristais de celulose (DONG; LI, 2018), celulose (MU *et al.*, 2012), amido (KESHK *et al.*, 2019), goma arábica, goma xantana (GE *et al.*, 2015; GUO *et al.*, 2014), ácido hialurônico (DOMINGUES *et al.*, 2015), dextrana (CURCIO *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2017), quitosana (BAM *et al.*, 2019; KESHK *et al.*, 2017), alginato (BANKS *et al.*, 2019; RAVICHANDRAN; JAYAKRISHNAN, 2018) goma do cajueiro (MACIEL *et al.*, 2019) e algumas galactomananas (LIMA *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2020).

2.5 Galactomanana

As galactomananas são polissacarídeos neutros de alta massa molar, presente principalmente no endosperma de sementes das espécies das leguminosas, onde servem como fonte de carbono e energia para a germinação da planta (KODIRALIEVA *et al.*, 2020; PONZINI *et al.*, 2019). Os primeiros estudos com espécies que armazenam galactomananas em suas sementes foram realizados por Nadelmann em 1890, incluindo uma espécie tropical, *Schizolobium sp* (BUCKERIDGE *et al.*, 2000).

A estrutura geral das galactomananas consiste em uma cadeia linear de unidades de β -D-manopiranosose (manose) unidas por ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 4) e ramificações α -D-galactopiranosose (galactose) ligada a manose por ligação α -(1 \rightarrow 6) (**Figura 6**) (COELHO *et al.*, 2020; SUN *et al.*, 2018).

Figura 6 - Representação da estrutura das galactomananas



Fonte: Elaborada pela autora

As mais importantes fontes de galactomananas já comercializadas são a goma locusta bean (*Ceratonia siliqua*), goma guar (*Cyamopsis tetragonolobus*) e goma tara (*Caesalpinia spinosa*), devido as suas aplicações (RODRIGUEZ-CANTO *et al.*, 2020; CERQUEIRA *et al.*, 2011). Porém, muitas outras galactomananas vêm sendo estudadas, como a *Gleditsia triacanthos* (XU *et al.*, 2020), *Caesalpinia pulcherrima* (MARQUES *et al.*, 2019), *Adenanthera pavonina* (GOMES *et al.*, 2020), *Cassia fistula* (SILVA *et al.*, 2020) e *Delonix regia* (LIMA *et al.*, 2020), exemplos de novas fontes desse tipo de polissacarídeo.

A razão molar manose/galactose (M/G), relação entre a quantidade de unidade de manose em relação a galactose, em galactomananas extraídas de *Delonix regia* varia de 1,54 a 5,10 e depende do método de extração, localização geográfica e período de coleta das sementes (CHEIRMADURAI, THANIKAIVELAN, MURALI, *et al.*, 2016; NWOKOCHA,

WILLIAMS YADAN, 2018; RODRIGUEZ-CANTO *et al.*, 2019; TAMAKI; TERUYA; TAKO, 2010; FIGUEIRÓ *et al.*, 2004). A razão molar manose/galactose (M/G) é uma das propriedades mais importantes das galactomananas, pois influência várias propriedades físicas do polímero, tais como solubilidade em água e comportamento reológico (SHARMA *et al.*, 2020; PONZINI *et al.*, 2019).

A galactomananana de *Delonix regia* vem sendo estudada desde 1972 (KAPOOR., 1972) por diversos autores e o potencial deste polissacarídeo em aplicações biomédicas como: hidrogel injetável para engenharia de tecidos (LIMA *et al.*, 2020), para tratamento de osteoartrite (NASCIMENTO *et al.*, 2020), nanopartícula para liberação ocular (OGUNJIMI *et al.*, 2017), nanopartícula para liberação de ondansetron (DEVKAR *et al.*, 2014), *scaffold* como curativo antimicrobiano (CHEIRMADURAI, THANIKAIVELAN, MURALI, *et al.*, 2016), matriz para comprimidos antipsicóticos (KRISHNARAJ *et al.*, 2012), encapsulamento de ácido ascórbico (SOUZA *et al.*, 2015), de papaína (BETANCUR-ANCONA *et al.*, 2011), agente de suspensão para grânulos de amoxicilina seca (OKOYE *et al.*, 2014) e agente aglutinante para comprimidos de paracetamol (ADETOGUN; ALEBIOWU, 2009) vêm sendo investigados.

Tabela 1- Copolímeros de polissacarídeo e PNIPAm: rota de síntese/reagente e aplicação

Polissacarídeo	Rota de síntese/ reagente	Aplicação	Referência
Galactomanana	Polimerização radicalar livre /CAN e química das carbodiimina /EDC	Carreamento de fármaco	GOMES <i>et al.</i> , 2020 e GUPTA <i>et al.</i> , 2011
Goma do cajueiro	Polimerização radicalar livre /CAN	Carreamento de fármaco	ABREU <i>et al.</i> , 2016
Carragenana	Polimerização radicalar livre /KMnO ₄	Copolímero	GAWEL <i>et al.</i> , 2013
Quitosana	Polimerização radicalar livre /CAN e química das carbodiimina /EDC	Hidrogel e Carreamento de fármaco	MELLATI <i>et al.</i> , 2017, LAI; LUO, 2017
Celulose	Polimerização radicalar por transferência de átomo /CuBr e química das carbodiimina /EDC/NHS	Potencial para aplicação biomédica	MARQUES <i>et al.</i> , 2016, YANG <i>et al.</i> , 2015

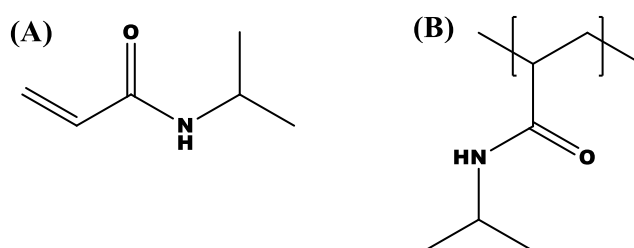
Dextrana	Polimerização radical por transferência de átomo /CuBr e química das carbodiimina /EDC/NHS	Carreamento de fármaco	BLANCO-FERNANDEZ <i>et al.</i> , 2017, ANASTASE-RAVION <i>et al.</i> , 2001
Alginato	Química das carbodiimina /EDC/NHS	Hidrogel e Hidrogel injetável	TAN <i>et al.</i> , 2012 LENCINA <i>et al.</i> , 2014
Ácido hialurônico	Reação de cicloadição/ CuAcs	Potencial para carreamento de fármaco	SEELBACH <i>et al.</i> , 2015

2.6 Poli-(N-isopropilacrilamida)

A poli-(N-isopropilacrilamida) (PNIPAm) é um polímero sintético sensível à temperatura que pertence à família dos poli-(N-substituído acrilamida), onde a propriedade termossensível do mesmo foi estudada sistematicamente pela primeira vez em 1968 por Heskins e Guillet (HESKINS; GUILLET, 1968).

O PNIPAm (**Figura 7**) é o polímero termoresponsivo mais estudado em aplicações biomédicas tais como: liberação de fármacos, engenharia de tecido e biosseparação (DOBERENZ *et al.*, 2020; NAGASE, OKANO, KANAZAWA., 2018 WEI *et al.*, 2009). O polímero apresenta mudança de solubilidade em meio aquoso como resposta a variação da temperatura.

Figura 7 - Fórmula estrutural do monômero NIPAm (A) e seu polímero PNIPAm (B)



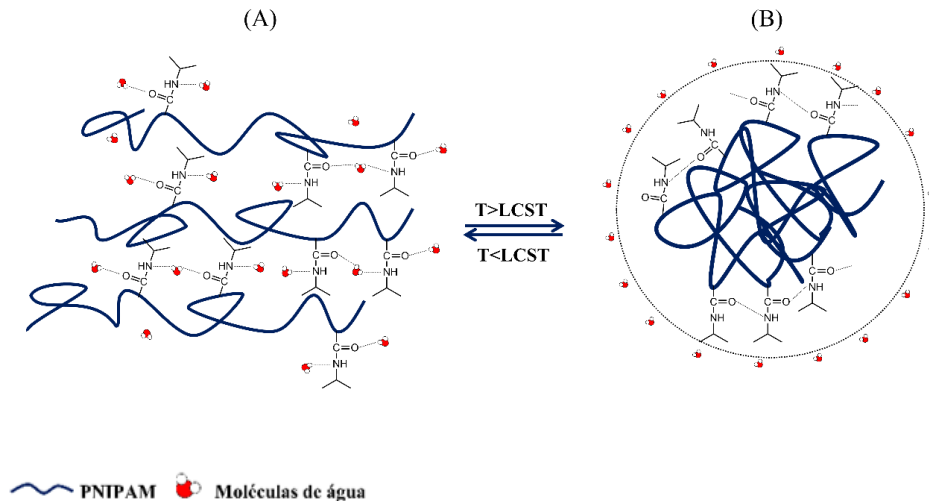
Fonte: Elaborada pela autora

Em uma determinada temperatura o indicativo de dissolução de um polímero em um certo solvente é quando o ΔG da solução é negativo, com base na equação de energia livre de Gibbs (TANG *et al.*, 2021). Ao considerar a termodinâmica do processo, em uma solução aquosa de PNIPAm em temperatura abaixo da LCST (*Low Critical Solution Temperature*, Temperatura Crítica de Solução Inferior), a dissolução é favorecida pelas ligações de

hidrogênio entre os grupos amida hidrofílicos e as moléculas de água. Esse processo, exotérmico, tem ΔH negativo ($\Delta H < 0$). Devido a orientação molecular específica exigida pelas ligações de hidrogênio, ocorre a formação de uma camada organizada de moléculas de água levando assim a diminuição da entropia do sistema ($\Delta S < 0$) (WINNIK., 1990). Mesmo com a contribuição positiva do termo entrópico ($-T\Delta S$) na energia livre de Gibbs da solução, o termo entálpico (ΔH) é preponderante na relação. Sendo assim, temos que, abaixo da LCST, o ΔG da solução é negativo e o PNIPAm é dissolvido em solução aquosa (TANG *et al.*, 2021).

Com o aumento da temperatura, acima da LCST, ocorre o fortalecimento das interações hidrofóbicas entre os grupos isopropil em detrimento das ligações de hidrogênio (GONZATTI *et al.*, 2019). Esse aumento de temperatura favorece a mudança das funções termodinâmicas, já que a magnitude do $|\Delta H|$ se torna menor devido à perda das ligações de hidrogênio e o efeito hidrofóbico contribui para uma entropia negativa adicional, tendo $|\Delta H| < |T\Delta S|$, a mistura vai apresentar ΔG de solução positivo. As cadeias do PNIPAm desidratam e agregam formando uma estrutura globular compacta (**Figura 8**) (TANG *et al.*, 2021, SCHILD; TIRRELL, 1990).

Figura 8 - Interações das cadeias do PNIPAm em meio aquoso abaixo (A) e acima (B) da LCST



Fonte: Elaborada pela autora

Uma das características mais importantes dos polímeros termorresponsivos é a temperatura de transição (LCST). A do PNIPAm é em torno de 32 °C e pode ser modelada pela massa molar, concentração e mudança no balanço hidrofílico/hidrofóbico por meio da copolimerização via reação de enxertia (PILIPENKO *et al.*, 2020; LENCINA *et al.*, 2014). O

aumento das interações hidrofílicas resulta em maiores LCST, enquanto as interações hidrofóbicas resultam em valores menores (ALMEIDA *et al.*, 2012).

A enxertia do PNIPAm em polissacarídeos aumenta a quantidade de ligações de hidrogênio ($\Delta H < 0$), favorecendo assim a dissolução do copolímero e resultando em uma LCST maior que a do PNIPAm. Gomes e colaboradores (2020) sintetizaram copolímero de galactomanana de fava d'anta hidrolisada e não-hidrolisada com PNIPAm por meio de polimerização radicalar, e os copolímeros apresentaram LCST de 35-36 °C. Blanco-Fernandez e colaboradores (2017) produziram copolímero de dextrana e PNIPAm com LCST de 35 °C. Já Abreu e colaboradores (2016) obtiveram LCST variando de 35-37°C para os copolímeros de goma do cajueiro e PNIPAm

2.7 Pró-fármacos poliméricos

O conceito de pró-fármaco polimérico surgiu no início de 1975 como sendo a conjugação do polímero com um fármaco hidrofóbico através de uma ligação covalente, como por exemplo, uma ligação imina (RINGSDORF, 1975; LI *et al.*, 2018).

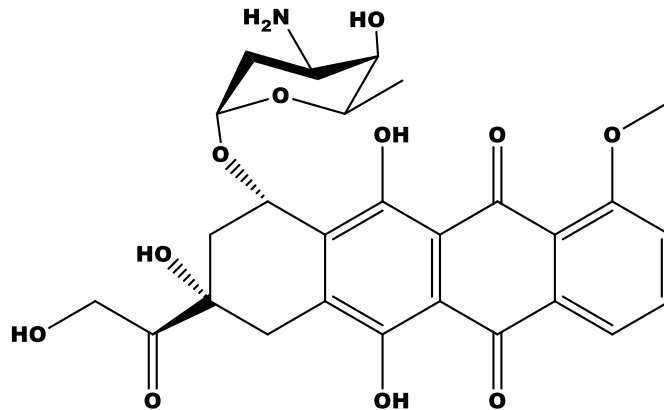
A utilização de conjugados tem atenuado os efeitos colaterais frente a utilização do fármaco livre. Isso se deve a três fatores: a solubilidade de vários fármacos hidrofóbicos é melhorada devido a conjugação com polímeros hidrofílicos; o pró-fármaco apresenta características anfifílicas, podendo assim, se organizar espontaneamente em nanopartículas, aumentando sua estabilidade; o retículo-endotelial apresenta baixa sensibilidade para reconhecer e recolher as nanopartículas, o que leva as mesmas a terem uma meia vida prolongada no plasma sanguíneo (CAI *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2016 (a)).

Conjugados de polissacarídeos e fármacos anticancerígenos formados via ligações covalentes dinâmicas ou “*smart*”, principalmente às pH-responsivas, têm se mostrado promissores. Isso ocorre porque os tecidos e células cancerígenas apresentam pH típicos de 6,5-7,2, enquanto os componentes intracelulares, como endo/lisossomos, podem atingir pH de até 4,5 (FENG *et al.*, 2017). Devido a esses microambientes com baixo pH, as ligações pH-responsivas podem funcionar como direcionadores para a liberação desses fármacos em células específicas.

Entre os fármacos anticancerígenos mais estudados na formação de pró-fármacos está a doxorubicina (DOX) (**Figura 9**). Da família das antraciclinas a DOX é um agente quimioterápico eficaz e amplamente utilizado para o tratamento de câncer de fígado, mama,

pulmão, ovário, estômago, leucemia aguda etc. A DOX leva à morte celular porque ao se difundir na célula, suas interações no núcleo alteram a síntese do DNA (VARELA-LÓPEZ *et al.*, 2019). Esse comportamento não se limita as células cancerígenas, ou seja, não é específico, estende-se também as células saudáveis, provocando graves efeitos colaterais (ARRUDA *et al.*, 2019).

Figura 9 - Estrutura da doxorubicina (DOX)



Fonte: Elaborada pela autora

Zhang e colaboradores (2019) realizaram uma triagem entre três conjugados de polissacarídeo e DOX formados por base de *Schiff*. Os resultados mostraram que o conjugado com dextrana e DOX se auto-organiza em nanopartículas de longa circulação e é sensível ao pH. Os testes *in vitro* e *in vivo* mostraram que as nanopartículas podem ser endocitadas por células tumorais e apresentam uma rápida liberação sob o ambiente ácido intracelular, além de apresentar reação adversa reduzidas em comparação a DOX livre.

Para que a dextrana e outros polissacarídeos fossem utilizados na reação de base de *Schiff* foi necessária uma reação de oxidação, já que os mesmos não apresentam grupos aldeídos em sua estrutura

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Propor uma nova rota de síntese para o copolímero de poli-(N-isopropilacrilamida) e galactomanana via reação de formação de base de *Schiff*. Em seguida, empregar esses copolímeros no desenvolvimento de pró-fármacos com doxorrubicina.

3.2 Objetivos específicos

- Estudar a reação de oxidação da galactomanana de *Delonix regia* com periodato de sódio;
- Analisar o efeito do grau de oxidação da galactomanana na formação dos copolímeros e nas suas propriedades;
- Avaliar o efeito do tempo reacional e proporção de AET:NIPAm na massa molar do poli-(N-isopropilacrilamida) aminado (PNIPAm-NH₂) e nas suas respectivas propriedades;
- Analisar o efeito do tamanho das cadeias do (PNIPAm-NH₂) na formação dos copolímeros e nas suas características, como tamanho de partículas, concentração de agregação crítica, volume hidrodinâmico e citotoxicidade;
- Estudar a propriedade de resposta ao pH da base de *Schiff* nas nanopartículas;
- Avaliar a citotoxicidade dos copolímeros, frente a linhagens de células saudáveis;
- Investigar a síntese dos pró-fármacos utilizando os copolímeros e doxorrubicina (DOX) e analisar suas propriedades associadas;
- Determinar o efeito de resposta ao pH dos pró-fármacos por meio da liberação de DOX em diferentes valores de pH;
- Avaliar a citotoxicidade tanto dos pró-fármacos quanto dos materiais de partidas frente a linhagens de células tumorais e saudáveis.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

A galactomanana foi extraída de sementes de *Delonix regia* (*D. regia*) coletadas na Universidade de Fortaleza (UNIFOR), Fortaleza, Brasil. A N-isopropilacrilamida (NIPAm) com pureza de 97%, o cloridrato de 2-aminoetanotiol (AET.HCl), o persulfato de potássio (KPS), o brometo de tetrazólio azul de tiazolil (MTT), o pireno e o cloridrato de doxorubicina (100%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. O boroidreto de sódio (NaBH₄), o etanol, a acetona e o dimetilsulfóxido (DMSO) (Synth, São Paulo, Brasil), o periodato de sódio, o etilenoglicol, o cloridrato de hidroxilamina e o hidróxido de sódio (Vetec, Brasil) também foram utilizados

4.2 Oxidação da galactomanana

A reação de oxidação parcial da galactomanana foi realizada com base em uma modificação do método descrito por Yan e colaboradores (2014). Inicialmente, 1,0 g de galactomanana (equivalente a 6×10^{-3} mol de unidades glicosídicas) foi dissolvida em 200 mL água destilada e agitada por 24 horas. Em seguida, o periodato de sódio (NaIO₄) foi adicionado de modo a obter um grau de oxidação teórico de 10%. Com o intuito de evitar a decomposição fotoinduzida do íon periodato, o sistema reacional foi protegido da luz. A mistura reacional foi mantida à temperatura ambiente por 6 horas, sendo acrescentado etilenoglicol ao final desse período para interromper a reação. A galactomanana oxidada obtida foi dialisada (14000 g mol⁻¹) contra água destilada por 72 horas, seguida por liofilização e designada como DROx10%. Esse derivado oxidado foi empregado na síntese dos copolímeros, de modo a estudar o efeito do tamanho das cadeias do PNIPAm-NH₂.

Para examinar a influência do grau de oxidação na formação dos copolímeros, a galactomanana foi oxidada para obter de graus teóricos de oxidação de 10%, 20% e 30%, conforme descrito anteriormente. Entretanto, devido à diminuição da solubilidade com o aumento do grau de oxidação, a galactomanana passou por um tratamento prévio de sonicação. Utilizando um reator ultrassônico VCX-750 com dissipação de potência nominal de 20 W, operou-se por uma hora com intervalos de pulso de 30 s na temperatura de 15 °C. Esses derivados foram denominados DRU-Ox_{10%}, DRU-Ox_{20%} e DRU-Ox_{30%}.

4.2.1 Determinação do grau de oxidação

O grau de oxidação (GO) da galactomanana foi determinado por titulação potenciométrica. Uma massa de 0,100 g de galactomanana oxidada foi dissolvida em 25 mL de cloridrato de hidroxilamina com concentração de 0,25 mol L⁻¹ e titulada com NaOH 0,096 mol L⁻¹. Como a reação produz um mol de HCl para cada mol de aldeído, o número de mol de NaOH é equivalente a quantidade de mol de aldeídos (ZHAO; HEINDEL, 1991).

O grau de oxidação foi calculado utilizando a equação 1 (YAN *et al.*, 2014):

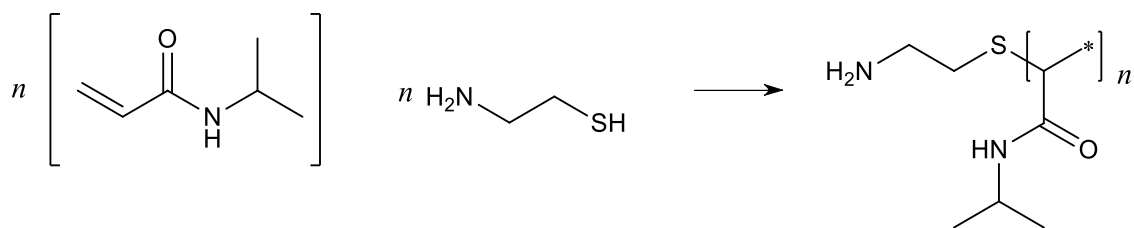
$$\text{Grau de oxidação} = \frac{162 \cdot V \cdot c \cdot 10^{-3}}{2 m} \times 100\% \quad (1)$$

em que **V** é volume (mL), **c** é concentração (mol L⁻¹) de NaOH, **m** é a massa (g) de galactomanana oxidada e 162 é a massa molar (g mol⁻¹) das unidades monossacarídicas.

4.2.2 Síntese do poli-(*N*-isopropilacrilamida) com terminação amina (PNIPAm-NH₂)

A preparação do PNIPAm-NH₂ (**Figura 10**) foi realizada por polimerização radicalar dos monômeros de NIPAm em solução aquosa, utilizando cloridrato de 2-aminoetanotiol (AET·HCl) como agente de transferência de cadeia e persulfato de potássio (KPS) como iniciador (BOKIAS *et al.*, 2001; GUPTA; GHUTE; BADIGER, 2011).

O monômero (2,83 g, 25 mmol) foi dissolvido em 40 mL de água destilada e a solução borbulhada com nitrogênio por 30 minutos a uma temperatura de 29-30°C. O iniciador, KPS (74 mg, 0,275 mmol), e o agente de transferência de cadeia, AET, foram dissolvidos separadamente em água (5 mL) e posteriormente adicionados à solução do monômero, dando continuidade à reação por 6 horas sob agitação. Foram empregadas três diferentes razões molares de AET: monômero (1:50, 1:100 e 1:250). Em seguida, a solução foi dialisada em membrana de celulose (1000 g mol⁻¹) contra água destilada por 72 horas para remover os íons Cl⁻ formados e os monômeros que não reagiram. O produto foi filtrado e solução seca por liofilização. Os PNIPAm-NH₂ foram nomeados de PNIPAm-NH₂-B (1:50), PNIPAm-NH₂-M (1:100) e PNIPAm-NH₂-A (1:250). As letras A, M e B referem-se à alta, média e baixa massa molar do PNIPAm-NH₂ obtido.

Figura 10 - Síntese do PNIPAm com terminação amina (PNIPAm-NH₂)

Fonte: Elaborada pela autora

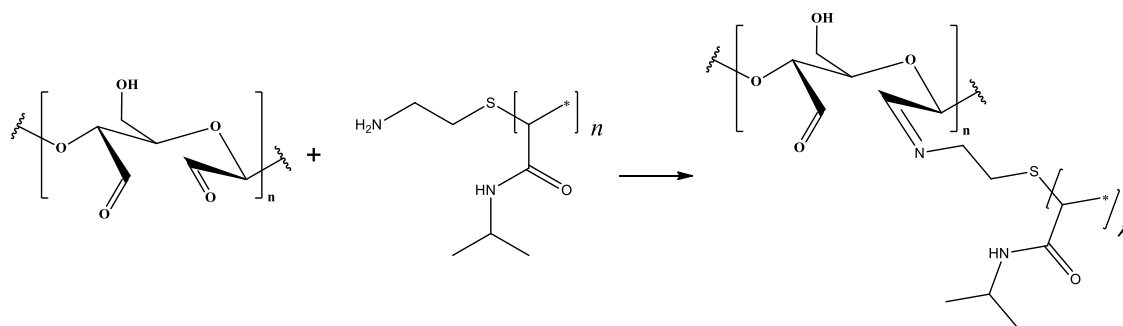
4.2.3 Determinação dos grupos NH₂

A quantidade de NH₂ por grama de material foi determinada por titulação potenciométrica ácido-base de retorno dos grupos terminais. O PNIPAm-NH₂ (0,25 g) foi dissolvido em 10 mL de água destilada, e, em seguida, foi adicionado NaOH na concentração 0,1 mol L⁻¹ até pH ≥ 11. Posteriormente, a solução foi titulada com HCl 0,0098 mol L⁻¹ (LENCINA *et al.*, 2014).

4.2.4 Reação de base de Schiff da galactomanana oxidada com poli-(N-isopropilacrilamida) com terminação amina (PNIPAm-NH₂)

Para a síntese dos copolímeros via reação de formação de base de Schiff (**Figura 11**) foram preparadas duas soluções aquosas (50 mL): uma contendo galactomanana oxidada e outra contendo PNIPAm-NH₂ na proporção 1:1 (massa/massa). Em seguida, a solução de poli-(N-isopropilacrilamida) com terminação amina foi adicionada à solução de galactomanana oxidada, sob agitação de 150 rpm, e mantida por 24 horas. A secagem foi realizada por liofilização. Os copolímeros foram denominados CP, seguidos das letras A, M ou B, referindo-se à massa molar do derivado PNIPAm-NH₂, correspondendo a alta, médio ou baixa massa molar, respectivamente.

Figura 11 - Esquema da reação de formação de base de Schiff



Fonte: Elaborada pela autora

4.2.5 Redução da ligação imina

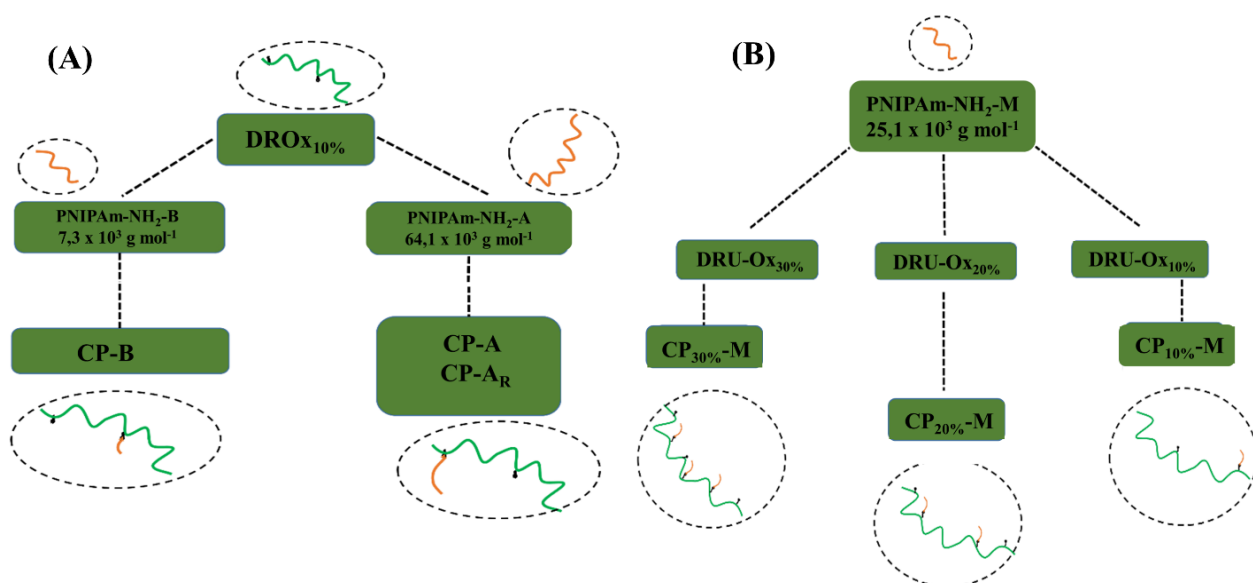
Após manter uma solução aquosa do copolímero CP-A em agitação por 24 horas, o boridreto de sódio (NaBH₄) foi adicionada na razão de 1,1:1 (mol de NaBH₄: mol de unidade monossacarídeo) para reduzir as ligações iminas a aminas. A solução do copolímero foi, então, mantida sob agitação por mais 24 horas, submetida à diálise em membrana de celulose (14000 g mol⁻¹) contra água por 48 horas e seca por liofilização. O copolímero reduzido foi denominado CP-A_R.

4.2.6 Purificação dos copolímeros

As cadeias do PNIPAM-NH₂ não enxertada foram removidas do copolímero pelo seguinte procedimento: uma massa de 100 mg de copolímero em 50 mL de acetona foi submetida a agitação constante por 48 horas. Posteriormente, o copolímero purificado (insolúvel) foi separado do homopolímero solubilizado na acetona por centrifugação a 6000 rpm. Em seguida, o copolímero foi ressuspense em água e seco por liofilização.

Para uma melhor compreensão, os copolímeros foram divididos em dois grupos: no primeiro grupo, estudou-se a influência do tamanho da cadeia do PNIPAM-NH₂ e o efeito da redução da ligação imina; no segundo grupo, estudou-se o grau de oxidação da galactomanana (**Figura 12**).

Figura 12 - Fluxograma da síntese dos copolímeros: análise da influência do tamanho da cadeia do PNIPAm-NH₂ e o efeito da redução da ligação imina (A) e estudo do grau de oxidação (B)



4.3 Estudo de estabilidade em meio ácido

Com o objetivo de estudar a estabilidade da ligação imina em meio ácido (pH 2,0), os copolímeros CP-A, CP-A_R e seus materiais de partida (PNIPAm-NH₂-A e DROx_{10%}) foram solubilizados em água na concentração de 2 mg mL⁻¹, sendo as soluções agitadas por 24 horas. Em seguida, as soluções foram diluídas com uma solução de HCl 0,02 mol L⁻¹ para a concentração de 1 mg mL⁻¹. O acompanhamento do perfil de distribuição de tamanho foi realizado utilizando espalhamento de luz dinâmico (DLS) em um equipamento Nano ZetaSizer Malvern, Modelo ZS 3600, por um período de 6 horas na temperatura de 38 °C.

4.4 Estabilidade da ligação imina

O estudo da estabilidade da ligação imina nas nanopartículas dos copolímeros CP_{10%}-M, CP_{20%}-M e CP_{30%}-M em diferentes pHs, 5,0 (tampão acetato) e 7,4 (tampão fosfato), foi realizado pelo acompanhamento do tamanho das nanopartículas por DLS (Nano ZetaSizer Malvern, Modelo ZS 3600) por 10 horas, a uma temperatura de 37 °C. O preparo das amostras foi realizado de forma semelhante ao descrito no item anterior, 4.2.

4.5 Síntese dos pró-fármacos

Pró-fármacos de DOX com galactomanana oxidada (DRU-Ox_{30%}-DOX) e com copolímero (CP_{30%}-M-DOX) foram sintetizados pela conjugação dos grupos amina da DOX com os grupos aldeído do DRU-Ox_{30%} e dos remanescentes do CP_{30%}-M, via reação de formação de base de *Schiff*. Resumidamente, 50 mg da fonte de aldeídos (DRU-Ox_{30%}/CP_{30%}-M) foram dissolvidos em 50 mL de DMSO e mantidos sob agitação por 24 horas a 50 ° C. Em seguida, foram adicionados 500 µL da solução estoque (10 mg mL⁻¹) de DOX desprotonada em DMSO. O sistema reacional foi mantido aquecido a 50 ° C e agitado por 72 horas na ausência de luz. Após a conclusão da reação, a solução foi dialisada contra água destilada em membrana de celulose (14000 g mol⁻¹) por 72 horas e seca por liofilização.

O conteúdo de DOX nos pró-fármacos foi determinado usando espectrofotometria ultravioleta- visível (UV-vis) pelo método da curva de calibração (λ_{abs} 484 nm). A eficiência de fármaco ligado (EFL) e o conteúdo de fármaco ligado (CFL) foram calculados pelas equações 2 e 3, respectivamente.

$$\text{EFL (\%)} = \frac{\text{Massa de fármaco no pró - fármaco}}{\text{Massa de fármaco inicial}} \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{CFL (\%)} = \frac{\text{Massa de fármaco no pró - fármaco}}{\text{Massa do pró - fármaco}} \times 100\% \quad (3)$$

4.6 Liberação *in vitro* da DOX em diferentes valores de pH

O perfil de liberação da DOX nos pró-fármacos foi realizado em tampão fosfato (PBS) 7,4 e 5,0, ambos a 0,1 mol L⁻¹, contendo lauril sulfato de sódio (LSS) a 0,1% (m/v), a uma temperatura de 37 °C. Resumidamente, os pró-fármacos em água (0,5 mg mL⁻¹; 3 mL) foram diluídos com solução tampão (3 mL) e depois transferidos para a membranas de diálise (14.000 g mol⁻¹), sendo dialisados contra 45 mL de solução tampão por 96 horas a 37 °C. Em tempo pré-determinados, alíquotas (3 mL) foram retiradas e o volume igual de tampão fresco foi repostado. A quantidade de DOX foi determinada usando espectrofotometria de fluorescência (λ_{ex} 480 e λ_{em} 590 nm)

4.7 Técnicas de caracterização

4.7.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)

Espectros de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) dos derivados oxidados, PNIPAm-NH₂, copolímeros e pró-fármacos foram obtidos em pastilhas de KBr no espectrofotômetro FT-IR Shimadzu 8300 entre 4000 e 400 cm⁻¹.

4.7.2 Ressonância magnética nuclear (RMN)

As análises de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (RMN ¹H, ¹³C) foram realizadas no equipamento Bruker Modelo Avance DRX500, com controle de temperatura (25 °C) com 2,2-dimetilsilapentano-5-sulfonato (DSS) como padrão interno (0,00 ppm para ¹H RMN). As amostras foram preparadas em água deuterada (D₂O).

4.7.3 Análise elementar

O percentual de nitrogênio foi obtido por análise elementar em equipamento Analisador Elementar-Perkin Elmer 2400 series ii no modo CHNS. Foram utilizadas 1-2 mg de amostras e a análise foi realizada em duplicada. Para o cálculo do percentual de NIPAm foi utilizada a equação 4:

$$\% \text{ NIPAm} = \frac{\% \text{ N}}{14,01} \times 113,16 \quad (4)$$

4.7.4 Cromatografia de permeação em gel (GPC)

A distribuição de massa molar foi determinada por cromatografia de permeação em gel em equipamento Shimadzu LC-20AD, acoplado a um detector de índice de refração (RID-10^a). Para a análise dos copolímeros e da goma oxidada utilizou-se coluna Polysep linear (300 x 7,8 mm) e NaNO₃(aq) 0,1 mol L⁻¹ como eluente. Para os homopolímeros de PNIPAm-NH₂ utilizou-se coluna Phenogel 10³ Å e THF como eluente. As medidas foram realizadas a 30 °C e com fluxo de 1,0 mL min⁻¹. O volume injetado das amostras foi de 50 µL.

4.7.5 Concentração de agregação crítica (CAC)

A determinação da CAC por fluorescência foi realizada com procedimento proposto por Patrizi e colaboradores (2009). Por ser pouco solúvel em água, o pireno (135,0 mg L⁻¹, 67,0 mmol L⁻¹) foi inicialmente dissolvido em acetona na concentração de 5,0 x10⁻⁴ mol L⁻¹. Uma alíquota de 0,5 mL dessa solução foi evaporada em balão volumétrico de 500 mL sob

fluxo de nitrogênio e o volume foi completado com água ultra-pura para preparar a solução aquosa de pireno $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.

As soluções dos copolímeros foram preparadas nesta solução nas concentrações de 0,002 a $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$. Os espectros de excitação foram obtidos a 25 e 50 °C (soluções aquecidas por 3 minutos antes das medições). As varreduras de emissão de fluorescência foram realizadas em cubeta de quartzo (aquecida por um banho termostaticado Eyella NTT SB-11) em um fluorímetro Shimadzu RF-600.

O espectro de excitação (320-360 nm) foi obtido usando comprimento de onda de emissão em $\lambda_{em} = 374 \text{ nm}$. A razão de intensidades (I_{338}/I_{334}) foi usada para determinar o deslocamento da banda com o aumento da concentração.

4.7.6 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

A temperatura em que ocorre a transição de fase dos copolímeros (LCST – *lower critical solution temperature*) e, conseqüentemente, a formação das nanopartículas foi estudada pela variação do diâmetro médio em solução aquosa em função da temperatura. As medidas foram obtidas por espalhamento de luz dinâmico com laser no comprimento de onda de 633 nm e ângulo de espalhamento de 173°, em Nano ZetaSizer Malvern Modelo ZS 3600, considerando as partículas como esféricas. As soluções foram aquecidas no próprio equipamento em cubeta de vidro e as medidas foram realizadas a cada aumento de um grau no intervalo de temperatura de 25 a 50 °C com 3 minutos de estabilização para cada temperatura.

4.7.7 Microscopia de força atômica (MFA)

A análise de MFA das nanopartículas de copolímeros CP-B e CP-A foram realizadas no Departamento de Física- UFC, utilizado microscópio de força atômica Asylum Research MFP-3D As imagens foram obtidas no modo *tapping*, usando um EconoLTESP com constante nominal de mola de 5 n/m e frequência de ressonância de 150 kHz. As amostras foram preparadas na concentração de $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$ e, em seguida, diluídas 1:1000 (v/v). As amostras foram aquecidas a 40 °C por 3 horas, em seguida, 10 μL foram depositados na superfície da mica, seguido de secagem em dessecador sob pressão. As imagens foram processadas utilizando o programa Igor Pro 6.37.

A análise de MFA das nanopartículas do copolímero CP_{30%}-M e dos pró-fármacos foi realizada na Universidade Federal do Delta do Parnaíba – UFDPAr utilizando a mesma metodologia de preparo. O equipamento utilizado para a análise foi o TT-AFM (AFM

Workshop - EUA) no modo contato intermitente, utilizando as pontas de Silício da TED PELLA (TAP300-G10) em uma frequência de amplitude aproximadamente 236 kHz. O programa Gwyddion 2.45, foi utilizado para tratar as imagens e obter o tamanho (nanômetros) das nanopartículas. A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada com o uso do programa GraphPad Prism 6, bem como obter histogramas de diâmetro das nanopartículas.

4.7.8 Cultura de células

A linhagem HEK 293T (Linhagem celular humana), originalmente derivada de células renais embrionárias humanas foi cedida pela Dra. Ana Cristina Moreira da Universidade de Fortaleza-UNIFOR. Já as HL60 (Leucemia promielocítica) foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA) e as linhagens B16F10 (melanoma) e L929 (Fibroblasto murinho) foram obtidas do Banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células foram cultivadas em meio DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, suplementado com 10 % de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂. O PNIPAm-NH₂-A, DROx_{10%} e os copolímeros (CP-A e CP-B) foram testados nas concentrações de 1000, 500 e 100 µg mL⁻¹ nas células HEK 292T. Já os pró-fármacos (DRU-Ox_{30%}-Dox e CP_{30%}-M-DOX) foram testados na concentração de 50 µg mL⁻¹ e os materiais de partida CP_{30%}-M e DRU-Ox_{30%} na concentração de 100 µg mL⁻¹.

4.7.9 Citotoxicidade in vitro

Para avaliar o potencial efeito citotóxico dos PNIPAm-NH₂-(A e B), DROx_{10%} e dos copolímeros (CP-A e CP-B) nas células renais, as células foram plaqueadas na concentração de 1 × 10⁵ céls mL⁻¹. Já para os pró-fármacos e os materiais de partida as células foram plaqueadas nas concentrações 0,3 × 10⁵ céls mL⁻¹ (HL60) e 7,0 × 10⁴ céls mL⁻¹ (B16F10 e L929). As placas foram incubadas por 72 horas com os compostos em estufa a 5% de CO₂ a 37 °C. Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante foi removido. Em seguida, foram adicionados 100 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3 horas. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 100 µL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595 nm. Essas análises foram realizadas no Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamento (NPDM) no Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) da UFC.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da galactomanana e dos derivados oxidados

5.1.1 Rendimento e grau de oxidação

A extração do polissacarídeo das sementes de *Delonix regia* por autoclave resultou em um rendimento, em relação à massa de semente, de 14,0 %. Resultados menores foram obtidos por Rodriguez-Canto e colaboradores (2019), Cheirmadulai, Thanikaivelan e Murali (2016) e por Kappor (1972), (10,0%, 10,0% e 12,3 %, respectivamente) para o polissacarídeo extraído de *Delonix regia* no México e na Índia, respectivamente. Tanaki, Teruya e Tako (2010) obtiveram um rendimento de aproximadamente 20,0 %, em relação à massa de semente, para *Delonix regia* no Japão. A variação no rendimento de polissacarídeos extraídos de sementes pode ser ocasionada pelo método de extração, idade da planta, época de coleta e clima (LIYANAGE *et al.*, 2015).

A funcionalização da galactomanana da *Delonix regia* (DR) foi realizada por oxidação com periodato de sódio (NaIO_4). Grupos de hidroxilas adjacentes das unidades monossacarídicas (C2, C3, C4) são oxidadas a dois grupos aldeído pela clivagem da ligação carbono-carbono (C-C), obtendo-se o correspondente derivado oxidado, $\text{DROx}_{10\%}$. Tendo em vista que a reação de oxidação levou à diminuição da solubilidade da $\text{DROx}_{10\%}$, o processo de sonicação foi utilizado, objetivando a diminuição da massa molar e correspondente aumento de solubilização dos derivados.

Tabela 2 – Rendimento das reações de oxidação e grau de oxidação

AMOSTRA	RENDIMENTO (%)	GRAU DE OXIDAÇÃO (%)
$\text{DROx}_{10\%}$	82,0	$9,95 \pm 0,05$
$\text{DRU-Ox}_{10\%}$	71,0	$8,96 \pm 0,14$
$\text{DRU-Ox}_{20\%}$	79,0	$17,50 \pm 0,15$
$\text{DRU-Ox}_{30\%}$	80,3	$25,60 \pm 0,11$

Com base nos dados de rendimento da **Tabela 2**, ao comparar o material oxidado 10% com ($\text{DRU-Ox}_{10\%}$) e sem tratamento de ultrassom ($\text{DROx}_{10\%}$), observa-se que o rendimento é menor com o tratamento de ultrassom; uma possível causa é a degradação do material durante o processo de sonicação. Já os materiais com diferentes graus de oxidação

apresentaram rendimentos entre 71,0-80,0 %, com um aumento do rendimento com o grau de oxidação. Farber e colaboradores (2010) oxidaram galactomanana de goma guar com grau de oxidação de 26,9 %, obtendo um rendimento de 82,0 %, próximo do obtido por esse trabalho para o material oxidado teoricamente 30,0 %.

O grau de oxidação, isto é, o número de resíduos oxidados por 100 unidades monossacarídicas, foi determinado pela titulação potenciométrica do HCl proveniente da reação do cloridrato de hidroxilamina com os derivados dialdeído. Em graus de oxidação mais baixos, o valor determinado é próximo ao valor teórico, porém, com o aumento, esses valores vão se distanciando. O aumento da concentração de grupos aldeídos nas unidades oxidadas favorece a formação de hemiacetais inter- e intracadeias, o que impede que os grupos -OH remanescentes sejam expostos ao periodato, justificando assim valores de grau de oxidação real menores que os teóricos (FERREIRA *et al.*, 2021).

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

As informações estruturais da galactomanana de *Delonix regia* e dos seus derivados oxidados foram analisadas por FT-IR (**Figura 13 e 14**). O espectro da DR apresentou bandas características desse polissacarídeo, incluindo uma banda larga e de forte intensidade em 3318 cm^{-1} , atribuída ao estiramento vibracional do grupo O-H. Também foram identificadas bandas de intensidade média na faixa de absorção de aproximadamente 2910 cm^{-1} , as quais podem ser atribuídas às vibrações simétricas e assimétricas do grupamento $-\text{CH}_2$ (BURITI *et al.*, 2014). A banda em 1646 cm^{-1} é atribuída à presença de água adsorvida na região amorfa do polissacarídeo (SILVA *et al.*, 2020; CHEIRMADURAI, THANIKAIVELAN, MURALI, 2016).

A banda em 1152 cm^{-1} é relacionada à deformação angular da ligação C-O, causada pelo alongamento do anel piranosídico, enquanto a banda em 1027 cm^{-1} corresponde ao estiramento da ligação C-O-C (GOMES *et al.*, 2020; RODRIGUEZ-CANTO *et al.*, 2019). As bandas de baixa intensidade em 815 e 872 cm^{-1} estão associadas à presença de configurações (conformadores α e β) e ligações glicosídicas, atribuída a unidades de α -D-galactopiranosose e β -D-manopiranosose, respectivamente (CERQUEIRA *et al.*, 2011; SIQUEIRA *et al.*, 2015).

Figura 13 - Espectros na região do infravermelho do derivado oxidado sem pré-tratamento de ultrassom na região de 4000-400 cm^{-1} (A) e zoom da região de 1850 a 1550 cm^{-1}

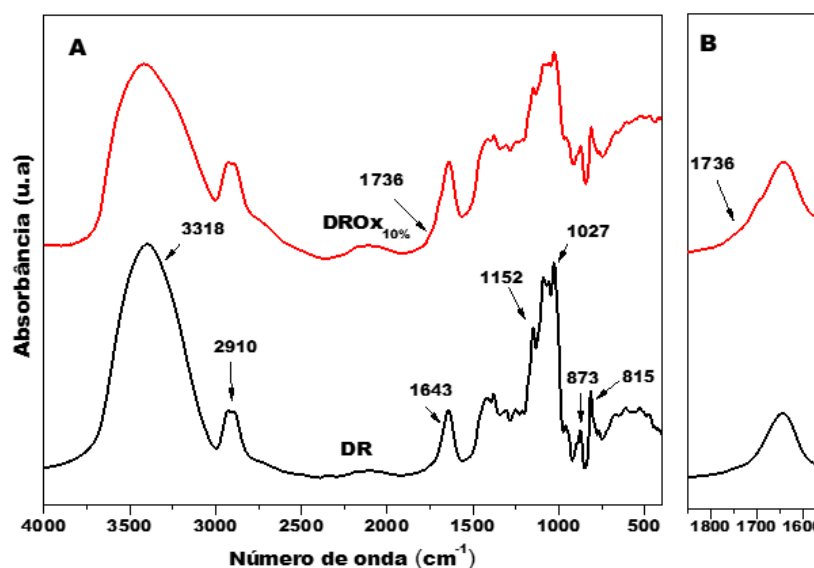
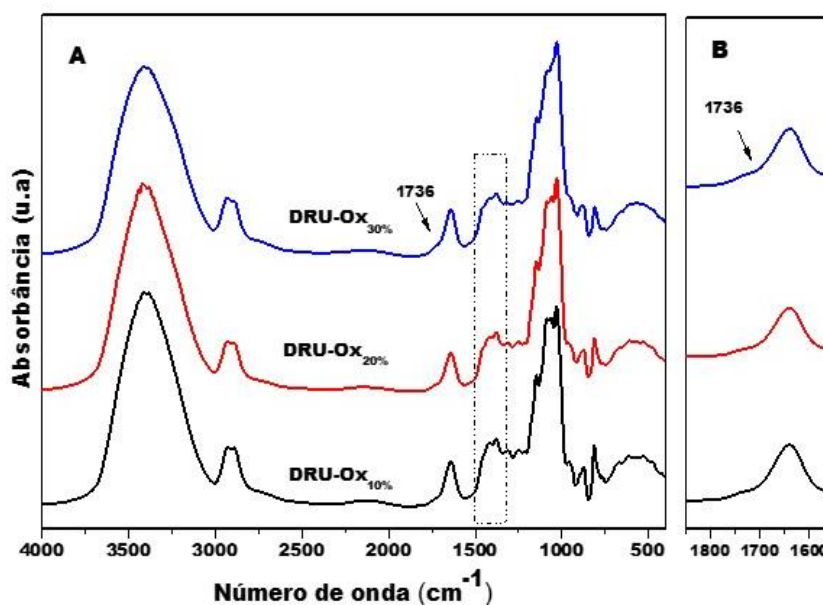


Figura 14 - Espectros na região do infravermelho dos derivados oxidados com pré-tratamento de ultrassom na região de 4000-400 cm^{-1} (A) e zoom da região de 1850 a 1550 cm^{-1}



Nos espectros dos derivados oxidados com e sem tratamento de ultrassom, além das bandas citadas anteriormente, surge um ombro referente à carbonila de aldeído em 1736 cm^{-1} . A baixa intensidade está relacionada ao baixo grau de oxidação e à formação de hemiacetais que ocorrem pela interação dos grupos aldeídos com as hidroxilas adjacentes (FERREIRA *et al.*, 2021; SILVA *et al.*, 2020).

A quebra das ligações C-C do anel no processo de oxidação pode enfraquecer a vibração do estiramento no FT-IR, que pode ser demonstrada pela menor intensidade das bandas entre $1465\text{-}1310\text{ cm}^{-1}$ (SU; JIA; SHAN, 2016). Resultados similares foram obtidos para a oxidação de dextrana com graus de oxidação análogos, utilizando NaOI_4 como agente oxidante (FENG *et al.*, 2017). Com relação aos derivados com tratamento de ultrassom, pode-se concluir, a partir dos espectros, que as estruturas químicas são semelhantes.

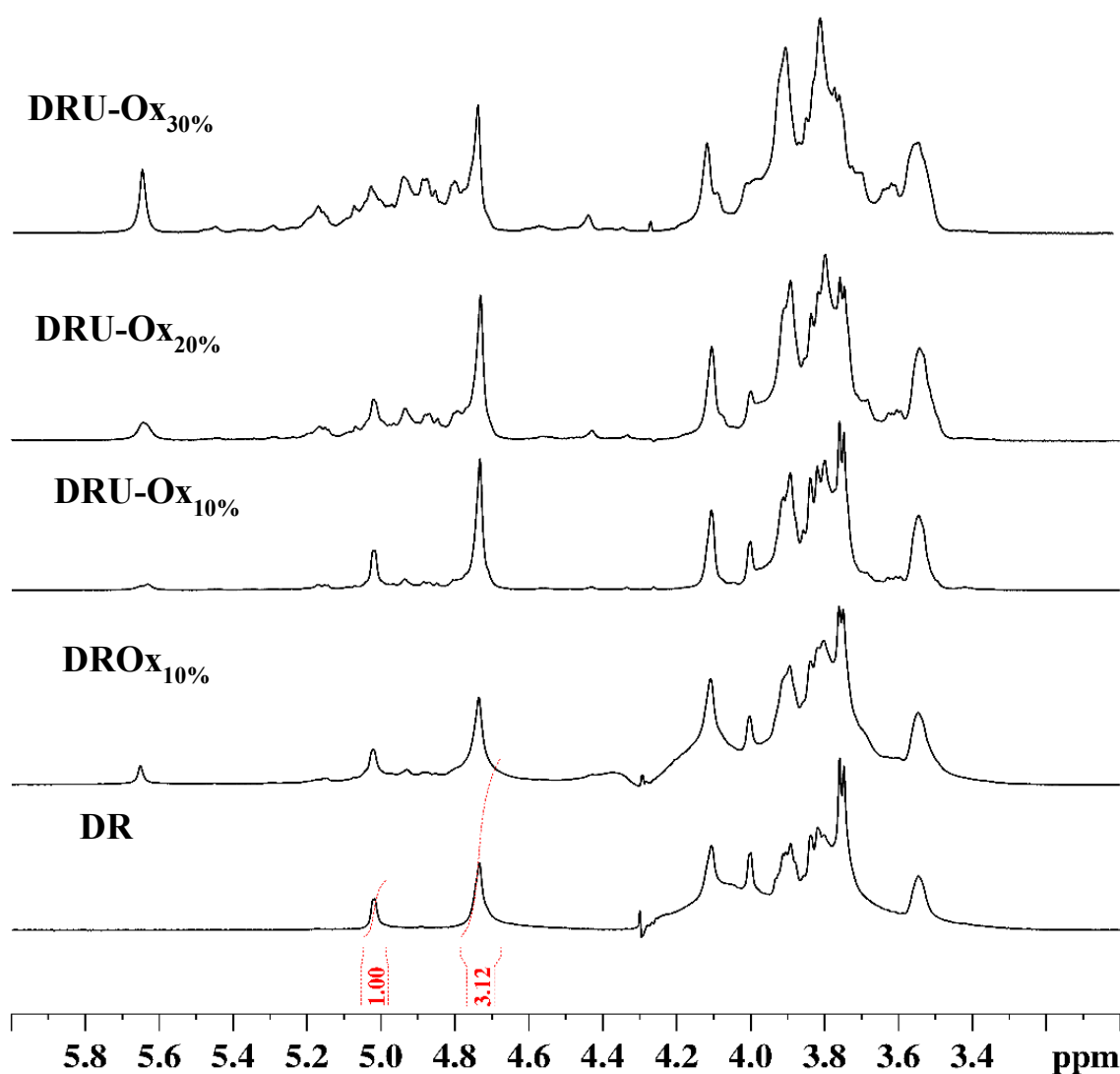
5.1.3 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de RMN ^1H da galactomanana e dos seus derivados oxidados são mostrados na **Figura 15**. No espectro da DR, os hidrogênios com deslocamento químico entre 3,4 e 4,2 ppm referem-se aos hidrogênios H2 a H6 das unidades de manose e galactose. Na região mais desprotegida, encontram-se os hidrogênios anoméricos da galactose em 5,02 ppm e da manose em 4,73 ppm (GOMES *et al.*, 2020; LIMA *et al.*, 2020; BURITI *et al.*, 2014). A razão molar manose/galactose (M/G) foi obtida da razão das áreas dos picos em 4,73 e 5,02 ppm, o valor foi 3,1/1.

O resultado obtido é similar ao reportado por Siqueira e colaboradores (2015) (3/1), porém bem diferente do citado por Cheirmadurai, Thanikaivelan, Murali (2016) (1,54/1) e Nwokocha, Williams e Yadav (2018) (5,1/1) para a mesma galactomanana. A razão M/G apresenta valores diferentes dentro de uma mesma espécie devido a vários fatores, entre eles: localização geográfica, condição de crescimento, método de extração e outros (SUN *et al.*, 2018).

Ao correlacionar o espectro da DR com os dos derivados oxidados, pode-se observar o surgimento de novos sinais na região dos hidrogênios anoméricos (δ 4,7-5, 2 ppm) e um sinal em δ 5,6 ppm. Esses sinais estão relacionados a várias estruturas hemiacetálicas ou aldeídos hidratados. Resultado similar foi reportado por Silva e colaboradores (2020) para oxidação de galactomanana de *Cassia fistula* (M/G: 3,1/1) com periodato de sódio com grau de oxidação de 10, 20, 50 e 80%.

Figura 15 - Espectros de RMN ^1H (500 MHz, D_2O , 70°C) da galactomanana e dos derivados oxidados



5.1.4 Cromatografia de permeação em gel (GPC)

A galactomanana de DR e os derivados oxidados, sem e com pré-tratamento com ultrassom, também foram caracterizados quanto à massa molar (M_p , M_n , M_w e IPD) por GPC. Os resultados estão apresentados na **Figura 16** e na **Tabela 3**. A DR apresentou uma M_w de $9,12 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$. Valores próximos foram obtidos para a mesma galactomanana por Nwokocha, Williams e Yadav (2018) (M_w : $7,22 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$) e por Siqueira e colaboradores (2015) ($1,51 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$).

Ao correlacionar a massa molar da DR com o derivado oxidado 10% (DROx_{10%}), constata-se que ocorreu uma diminuição da massa molar de aproximadamente 80%. A

diminuição pode ter sido causada pela degradação durante a oxidação e pode indicar formação de ligações entre cadeias (hemiacetais), levando a uma considerável diminuição do volume hidrodinâmico do material. Amer e colaboradores (2016) observaram comportamento análogo para oxidação de xilana com periodato de sódio.

Figura 16 - Cromatogramas de distribuição da massa molar por GPC da galactomanana e dos derivados oxidados

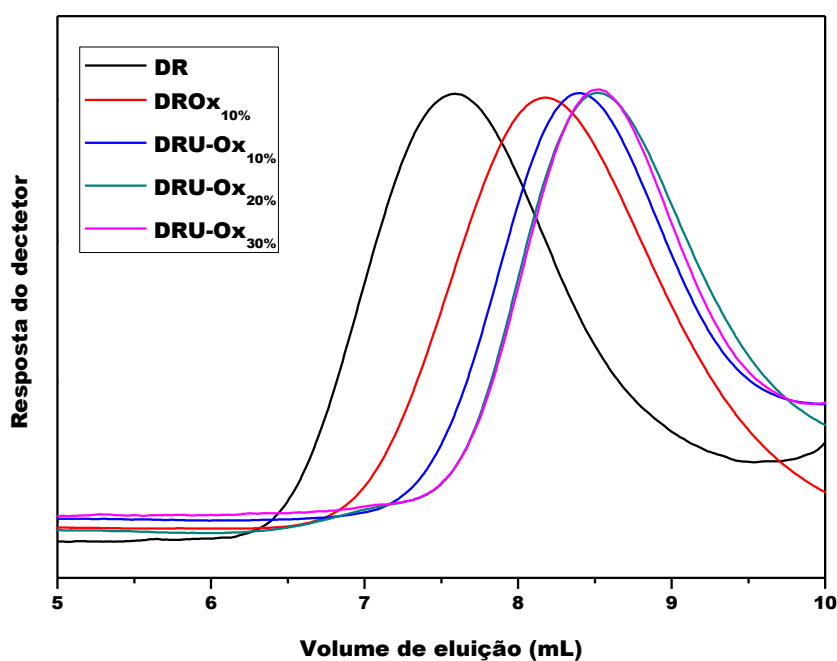


Tabela 3 – Dados de massas molares das galactomanana e seus derivados oxidados determinadas por GPC

AMOSTRA	Mpk (g mol ⁻¹)	Mn (g mol ⁻¹)	Mw (g mol ⁻¹)	IPD
DR	5,9 x 10 ⁵	7,4 x 10 ⁴	9,1 x 10 ⁵	1,2 x 10 ¹
DROx _{10%}	1,2 x 10 ⁵	1,5 x 10 ⁴	2,5 x 10 ⁵	1,6 x 10 ¹
DRU-Ox _{10%}	7,1 x 10 ⁴	5,6 x 10 ³	1,5 x 10 ⁵	2,1 x 10 ¹
DRU-Ox _{20%}	5,1 x 10 ⁴	5,4 x 10 ³	9,2 x 10 ⁴	1,8 x 10 ¹
DRU-Ox _{30%}	5,0 x 10 ⁴	5,3 x 10 ³	7,7 x 10 ⁴	1,4 x 10 ¹

O derivado com pré-tratamento de ultrassom e oxidado 10% (DRU-Ox_{10%}), apresentou uma redução de massa molar de 60% em relação ao sem tratamento de ultrassom (DROx_{10%}). Acredita-se que o principal responsável pela degradação das cadeias do polissacarídeo durante o pré-tratamento com ultrassom seja o efeito de cavitação, onde as ondas de ultrassom são produzidas (18 kHz a 1GHz) (LI; LI; ZHU, 2018; PU *et al.*, 2017). A degradação ocorre devido ao efeito mecânico causado pelo rápido crescimento e colapso de microbolhas quando a solução do polissacarídeo é exposta ao ultrassom. As cadeias do polissacarídeo que ficam perto das microbolhas colapsantes são presas em um campo de cisalhamento de alto gradiente, em que os segmentos mais próximos se movem em velocidade mais alta do que os que estão mais distantes. A diferença de velocidade dos segmentos no solvente causa a ruptura da cadeia (PU *et al.*, 2017; MADRAS; MCCOY, 2001).

Outro dado importante dessa comparação é o IPD, que aumenta quando o material é submetido ao pré-tratamento com ultrassom. De acordo com PU e colaboradores (2017), existem dois tipos de modelos para a ruptura da cadeia; o do ponto médio, onde a quebra da cadeia ocorre no centro da mesma, e o outro é o aleatório, onde qualquer parte da cadeia tem igual probabilidade de sofrer ruptura. O aumento do IPD é um indicativo de que a ruptura das cadeias ocorreu aleatoriamente, já que após o tratamento tem-se uma maior variação dos tamanhos das cadeias.

Nos derivados com diferentes graus de oxidação, a diminuição da massa molar e do IPD ocorre com o aumento do grau de oxidação. Com o aumento do grau de oxidação, uma maior degradação do material é observada, e a clivagem das cadeias poliméricas ocorre em uma maior proporção, levando as mesmas a adotarem comprimentos mais semelhantes (IPD diminuindo). Resultado similar foi encontrado por Gómez-Mascaraque e colaboradores (2014).

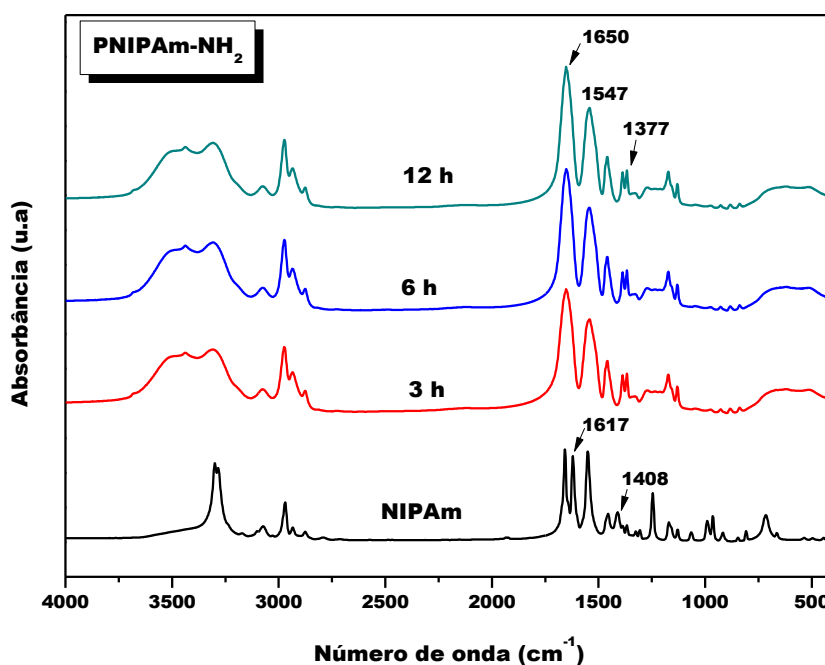
5.2 Caracterização dos poli-(N-isopropilacrilamida) aminados

5.2.1 Efeito do tempo de reação sobre as características do PNIPAm-NH₂

O PNIPAm-NH₂ foi preparado por polimerização radicalar dos monômeros em meio aquoso, utilizando o persulfato de potássio (KPS) como iniciador e cloridrato de 2-aminoetanotiol como agente de transferência de cadeia (AET-Cl). Quanto ao tempo de reação, a variação de 3 até 24 horas foi reportada na literatura. Com objetivo de estudar o melhor tempo para a síntese do PNIPAm-NH₂, três diferentes tempos foram avaliados (3, 6, 12 horas) utilizando uma razão em mol de 1:50 de AET:NIPAm.

O espectro de FT-IR do monômero apresentou duas bandas característica em 1617 e em 1408 cm^{-1} , correspondente à vibração de estiramentos do C=C e CH₂= (**Figura 17**). Após a reação de polimerização essas duas bandas não são mais observadas, e três novas bandas surgem; em 3436 e 3310 cm^{-1} , correspondentes à amina primária, e em 634 cm^{-1} , do estiramento C-S. As demais bandas referentes à estrutura do PNIPAm são as bandas de amina I (1650 cm^{-1}), II (1547 cm^{-1}) e deformação simétrica do -CH₃ (1377 cm^{-1}) do grupo isopropil (CH (CH₃)₂) (CHEABURU-YILMAZ, 2020; LÜ; LIU; NI, 2011). Confirmando assim a polimerização e a funcionalização do polímero, porém não é possível ver diferenças estruturais significativas com o tempo de reação.

Figura 17 - Espectros na região do infravermelho dos PNIPAm-NH₂ sintetizados em diferentes tempos de reação na região de 4000-400 cm^{-1}



A influência do tempo de reação é observada na massa molar dos polímeros determinada por GPC. Ocorreu um aumento da massa molar de pico (Mpk) até a reação de seis horas e em seguida uma diminuição (**Tabela 4**).

Tabela 4 – Dados de massas molares de pico (M_{pk}) dos PNIPAm-NH₂ em diferentes tempos de reação

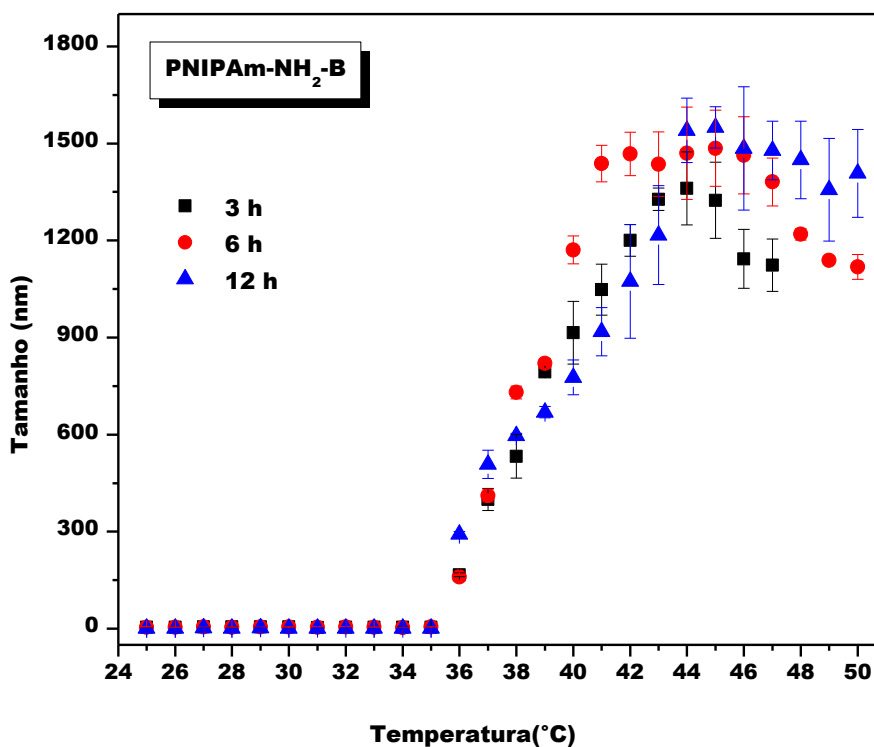
Tempo de reação(h)	M_{pk} (g mol ⁻¹)
3	6,3 x 10 ³
6	7,3 x 10 ³
12	6,7 x 10 ³

Durand e Hourdet (1999), um dos primeiros autores a propor a funcionalização do PNIPAm com o AET, obtiveram, utilizando a mesma razão de AET:NIPAm, um polímero com massa molar maior que a obtida nesse trabalho ($13,2 \times 10^3$ g mol⁻¹), no entanto, o tempo de reação utilizado foi de 18 horas. Também com 18 horas de reação, Gupta e colaboradores (2011) obtiveram um polímero de massa molar próxima ao citado anteriormente (10×10^3 g mol⁻¹), e Lencina e colaboradores (2014), utilizado 24 horas de reação, obtiveram um PNIPAm-NH₂ com massa molar menor do que a obtida nesse trabalho, $4,2 \times 10^3$ g mol⁻¹.

Uma das características do PNIPAm que tem atraído a comunidade científica é a sua termoresponsividade, com temperatura crítica de solução inferior (LCST) em torno de 32 °C. Essa temperatura pode ser modificada pela massa molar, concentração, entre outros fatores (KANO; KOKUFUTA, 2009). A LCST dos polímeros sintetizados nesse estudo não foi afetada pela variação de tempo ou de massa molar. Como a variação da massa molar é relativamente pequena entre os tempos reacionais estudados, não foi possível observar uma influência na temperatura de transição. Todos os PNIPAm-NH₂ apresentaram LCST de 36 °C (**Figura 18**). A temperatura de transição dos polímeros funcionalizados nesse estudo foi maior que a citada na literatura (32°C) devido a menor massa molar

Com base no discutido acima, o tempo escolhido para a sínteses dos PNIPAm-NH₂ nesse trabalho foi de 6 horas, pois apresentou uma maior massa dentre os tempos estudados.

Figura 18- Distribuição do diâmetro médio em função da temperatura (25-50 °C) para os PNIPAm-NH₂ em diferentes tempos de reação



5.2.2 Efeito da variação da razão de AET: NIPAm sobre as características do PNIPAm-NH₂

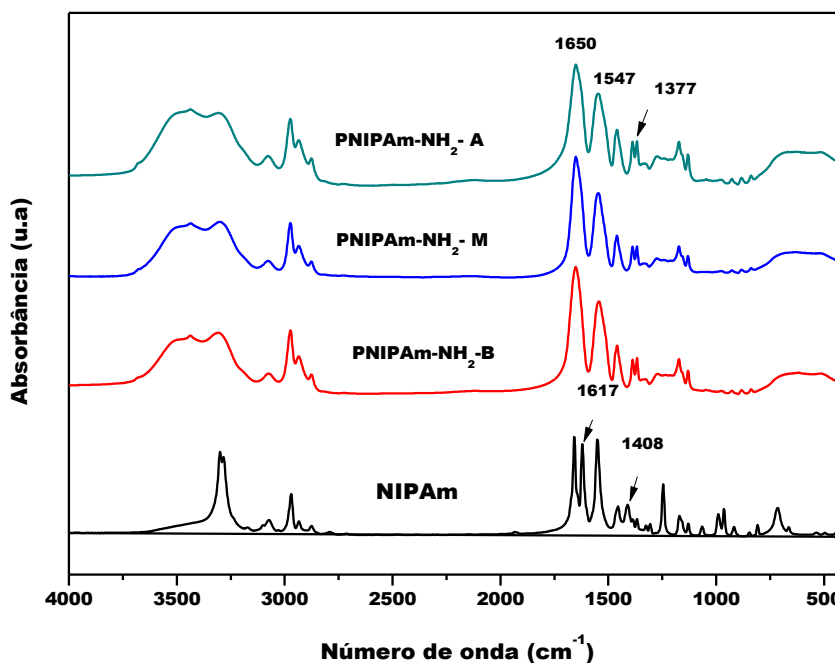
Com a finalidade de obter PNIPAm-NH₂ com massas molares variadas, foram utilizadas três diferentes razões molares de AET:NIPAm foram utilizadas (1:50 (B), 1:100 (M) e 1:250 (A)). As reações apresentaram um rendimento reacional maior que 75,0 %, e ocorreu um aumento gradual com a diminuição da quantidade de AET utilizada. Houve também uma diminuição da quantidade de grupos NH₂ com o aumento da razão, isso já era esperado, uma vez que menos AET é adicionado no sistema (**Tabela 5**).

Tabela 5 – Rendimento e quantidade de NH₂ dos PNIPAm-NH₂ sintetizados com diferentes proporções de AET:NIPAm

PNIPAm-NH ₂	Razão AET:NIPAm	RENDIMENTO (%)	QUANTIDADE DE NH ₂ (mol g ⁻¹)
B	1:50	75,3	1,09 x 10 ⁻⁴
M	1:100	82,8	9,18 x 10 ⁻⁵
A	1:250	83,6	8,52 x 10 ⁻⁵

Os espectros de FT-IR dos polímeros (**Figura 19**) confirmaram a polimerização com o aparecimento de bandas característica de PNIPAm, entre elas as bandas de amina I e II (1650 cm⁻¹ e 1547 cm⁻¹), deformação simétrica do -CH₃ (1377 cm⁻¹) do grupo isopropil, como discutido anteriormente no item 5.2.1.

Figura 19- Espectros na região do infravermelho dos PNIPAm-NH₂ sintetizados com diferentes proporções de AET:NIPAm na região de 4000-400 cm⁻¹

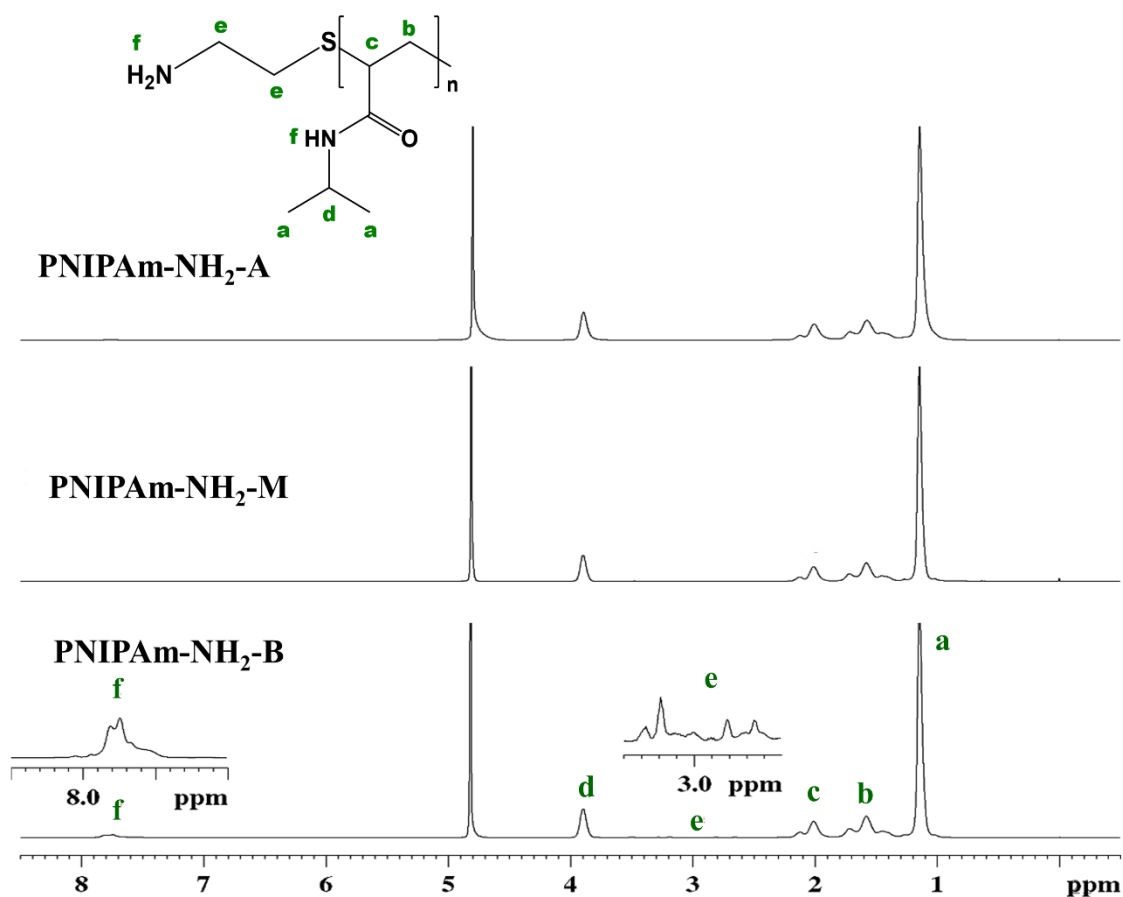


Os espectros de RMN ¹H dos três homopolímeros (PNIPAm-NH₂) aminados são mostrados na **Figura 20**. Com um sinal de baixa intensidade na região entre 7,7-7,8 ppm correspondente ao próton N-H (NH e NH₂) (f); um sinal em 3,82 ppm, atribuído ao próton do

H-C do grupo isopropil ligado a função amida (CH-NH) (**d**) (LEAL *et al.*, 2013). Os sinais entre 2,5-3,2 são atribuídos aos prótons do grupo etileno (CH₂-CH₂) (**e**) do agente de transferência de cadeia.

Os sinais de baixa intensidade em 2,01 e 1,57 ppm correspondem aos prótons metínico (**c**) e metileno (**b**), respectivamente, e o sinal intenso em 1,14 ppm foi atribuído aos seis prótons do metil do grupo isopropil (**a**) (**Figura 20**). A presença dos sinais b e c são indicativos da polimerização nas ligações dupla dos monômeros de N-isopropilacrilamida. Além disso, a ausência de sinais entre 5,0 e 6,0 ppm indica a ausência de monômero vinílico nas amostras (LUO *et al.*, 2012; LEAL *et al.*, 2013; GE *et al.*, 2007; BOYER *et al.*, 2004; KRASZNAI *et al.*, 2012).

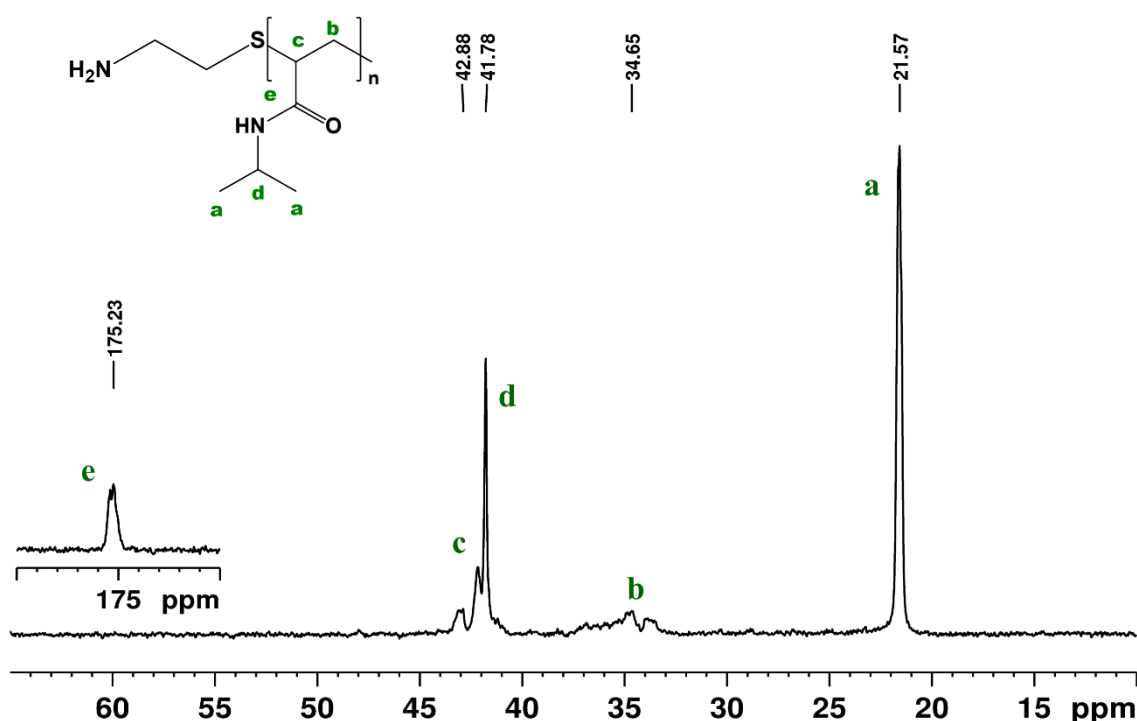
Figura 20- Espectros de RMN ¹H (500 MHz, D₂O, 25 °C) dos PNIPAm-NH₂ sintetizados com diferentes proporções de AET:NIPAm



No espectro de RMN ¹³C (**Figura 21**), o sinal em 175,23 ppm corresponde ao carbono carbonílico (CO) dos grupos amida. Os outros quatro sinais em 42,9, 41,8, 34,6 e 21,6

ppm são atribuídos aos carbonos metínicos da cadeia polimérica regular (-CH-CH₂) e ao ligado à função amida (-CH-NH₂), ao carbono do grupo metileno (-CH₂-CH) da cadeia e o carbono metil do grupo isopropil (-CH (CH₃)₂), respectivamente (KAMETANI *et al.*, 2017). Não foram observados sinais de carbonos relacionados com AET, possivelmente devido à baixa quantidade no material. Com base nesses dados, pode-se confirmar a polimerização do material.

Figura 21- Espectro de RMN ¹³C (500 MHz, D₂O, 25 °C) do PNIPAm-NH₂-B



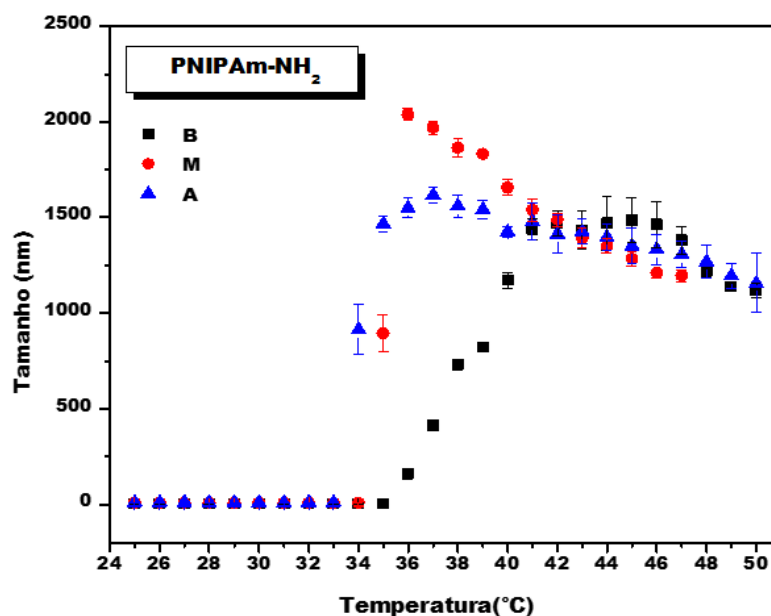
A influência da razão de EAT:NIPAm sobre a massa molar dos polímeros foi estudada por GPC. A partir dos dados da **Tabela 6**, foi possível verificar que há uma correlação: quando maior a quantidade de AET, menor é a massa molar dos polímeros. Esse resultado já era esperado, devido à alta eficiência dos tióis como agentes de transferência de cadeias. Liu e colaboradores (2019) também sintetizaram PNIPAm-NH₂ em duas razões diferentes de AET:NIPAm (1:100 e 1:200) e obtiveram polímeros com massas molares distintas, $1,2 \times 10^4$ e $2,5 \times 10^4$ g mol⁻¹, respectivamente. Ao comparar com PNIPAm-NH₂-M ($2,3 \times 10^4$ g mol⁻¹) sintetizado na mesma razão, 1:100, a massa obtida foi aproximadamente 50 % menor ($1,2 \times 10^4$ g mol⁻¹), uma possível justificativa seria utilização de parâmetros reacionais diferentes (70 °C, 24 horas e azo-bis(butironitrila) (AIBN)).

Tabela 6 – Dados de massas molares e LCST dos PNIPAm-NH₂ sintetizados com diferentes proporções de AET:NIPAm

PNIPAm-NH ₂	RAZÃO AET:NIPAM	MASSA MOLAR (g mol ⁻¹)	LCST (°C)
B	1:50	7,4 x 10 ³	36
M	1:100	2,3 x 10 ⁴	35
A	1:250	6,4 x 10 ⁴	34

Ao correlacionar os dados de massa molar com os dados LCST, verifica-se que a mesma é influenciada pela massa molar, como citado anteriormente. A LCST diminui com o aumento da massa molar, sendo que para o PNIPAm-NH₂-A a LCST é 34 °C, enquanto para o PNIPAm-NH₂-B é dois graus maior (36 °C). Com o aumento da massa molar, as interações hidrofóbicas e a entropia do sistema aumentam, favorecendo assim a transição em temperaturas menores (**Figura 22**). Lencina e colaboradores (2014) sintetizaram dois PNIPAm-NH₂ com massas molares diferentes (4200 e 15800 g mol⁻¹) para a síntese de copolímeros com alginato, os mesmos apresentaram resultados similares ao obtidos nesse trabalho (36 e 35 °C).

Figura 22- Distribuição do diâmetro médio em função da temperatura (25-50 °C) para os PNIPAm-NH₂ sintetizados com diferentes proporções de AET:NIPAm



5.3 Caracterização dos copolímeros: influência do tamanho da cadeia do PNIPAm- NH₂ e o efeito da redução da ligação imina

Os copolímeros de DROx_{10%} e PNIPAm-NH₂ foram sintetizados por “*grafting to*” via reação de formação de base de *Schiff*. Essa reação ocorreu entre os grupos aldeído da galactomanana oxidada e os grupos amina do PNIPAm-NH₂ com o propósito de formar uma ligação imina (C=N). Com o derivado DROx_{10%} foram sintetizados três copolímeros com o objetivo de estudar a influência do comprimento da cadeia de PNIPAm-NH₂-(A e B) (CP-B e CP-A) e o efeito da redução da ligação imina para amina, utilizado NaBH₄ (CP-A_R).

5.3.1 *Rendimento e percentual de NIPAm*

Os rendimentos dos copolímeros são mostrados na **Tabela 7**. Com base nesses dados, o rendimento reacional é mais afetado pela reação de redução que pela massa molar das cadeias laterais. Essa diminuição do rendimento após a reação de redução foi causada, provavelmente, pela degradação das cadeias do copolímero e pela maior quantidade de etapas. Geralmente, as reações de enxertia pelo método “*grafting to*” apresentam baixos rendimento de enxertia, pois as primeiras cadeias poliméricas enxertadas impedem a entrada de outras (CHEN *et al.*, 2013).

Tabela 7 – Rendimento reacional e percentual de NIPAm dos copolímeros CP-A, CP- A_R e CP-B

COPOLÍMEROS	RENDIMENTO (%) ^a	NIPAm (%)
CP-A	51,5±0,4	4,19 ± 0,08
CP-A _R	49,3±1,0	3,99 ± 0,04
CP-B	52,9±0,5	8,14 ± 0,56

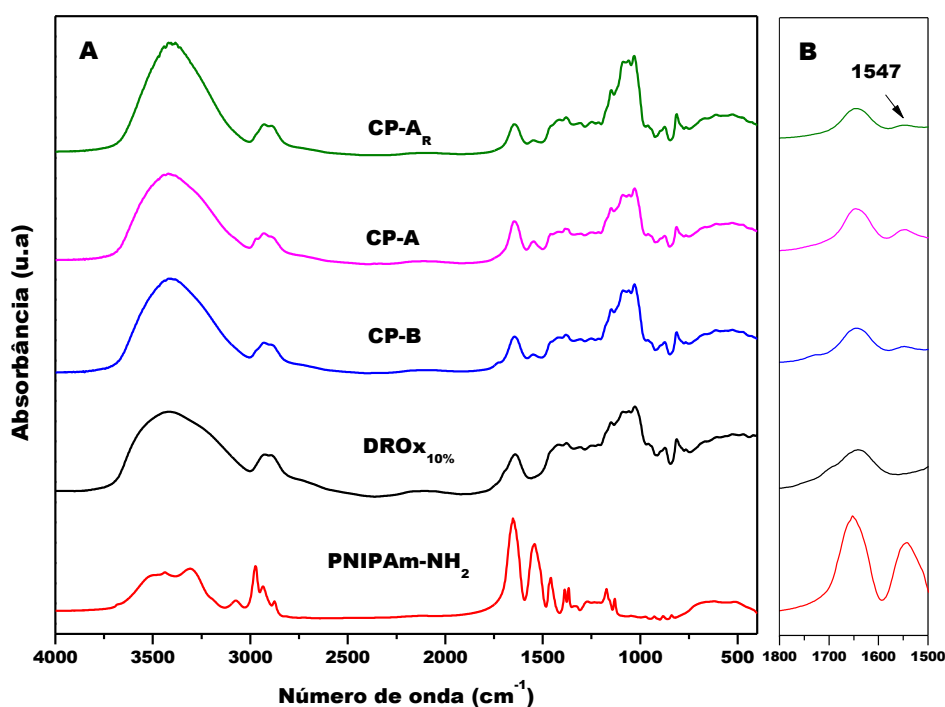
^a Em relação a massa inicial de DROx_{10%} + PNIPAm-NH₂.

O percentual de NIPAm (NIPAm (%)) foi calculado por análise elementar. O CP-B apresentou o maior percentual de NIPAm, pois o PNIPAm-NH₂-B enxertado apresentou menor massa molar, o que promoveu menor impedimento estérico à entrada das cadeias laterais nas cadeias de galactomanana.

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

A **Figura 23** mostra os espectros de FT-IR dos copolímeros sintetizados. Os espectros apresentaram bandas características da galactomanana oxidada em $3000\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$ (ν OH), 2910 cm^{-1} (ν CH) e 1154 cm^{-1} (ν C-O-C), como citado anteriormente. Além disso, os espectros dos copolímeros também apresentaram absorção em 1650 cm^{-1} (banda amida I), correspondente à vibração da ligação C=O, 1547 cm^{-1} (banda amida II), resultante principalmente da vibração da ligação N-H do grupo amida, e a banda em 2920 cm^{-1} , associada ao estiramento do grupo metila do isopropil – $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, característico do poli-(N- isopropilacrilamida); o que confirma a reação de enxertia dos PNIPAm-NH₂ nas cadeias da DROx_{10%} (LUO *et al.*, 2012).

Figura 23- Espectros na região do infravermelho dos copolímeros CP-A, CP-A_R e CP- B na região de $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ (A) e zoom da região de $1800\text{ a }1500\text{ cm}^{-1}$ (B)



Gupta e colaboradores (2011) sintetizaram o copolímero de carboximetil guar e PNIPAm por reação de carbodiimina e obtiveram espectros com bandas características de PNIPAm similares às obtidas nesse trabalho. Li e colaboradores (2016) obtiveram espectros do copolímero de alginato e PNIPAm em que foi possível observar, além das bandas citadas, as bandas entre $1388\text{--}1368\text{ cm}^{-1}$ correspondentes à deformação simétrica do dimetil ($-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$).

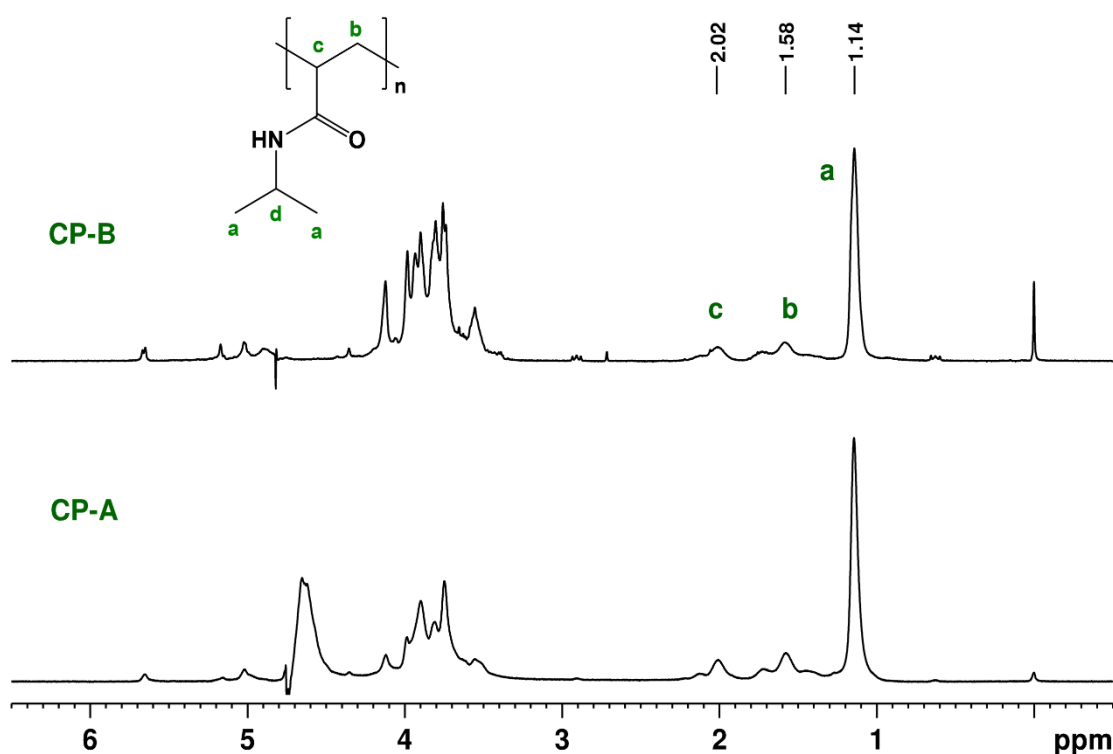
Apesar dos copolímeros terem sido sintetizados por bases de *Schiff*, a banda corresponde ao estiramento C=N ($1690\text{--}1590\text{ cm}^{-1}$) não foi observada, o que ocorre devido à

sobreposição com a banda de amida I e água (-OH). Resultado similar foi reportado por Su, Jia e Shan (2016) para a reação entre dextrana oxidada e etilenodiamina por base de *Schiff* para a formação de microemulsão.

5.3.3 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os copolímeros CP-A e CP-B foram caracterizados por RMN ^1H (**Figura 24**). Nos espectros dos copolímeros a 25 °C, observam-se tanto os sinais referentes ao polissacarídeo, entre 3,4 e 5,1 ppm, quanto os sinais referentes ao PNIPAm-NH₂ em 2,02 ppm (-CH-CH₂), 1,58 ppm (-CH-CH₂), 1,14 ppm (-CH (CH₃)₂) indicando a formação do copolímero.

Figura 24 - Espectros de RMN ^1H (500 MHz, D₂O, 25°C) dos copolímeros CP-A e CP-B



5.3.4 Concentração de agregação crítica (CAC)

A concentração de associação crítica dos copolímeros, ou seja, a concentração mínima para a formação das nanopartículas em solução aquosa, foi determinada por espectroscopia de fluorescência usando pireno como sonda. A razão das intensidades (I_{338}/I_{334}) do espectro de excitação do pireno foi obtida em várias concentrações dos copolímeros. No espectro de excitação, a banda em 334 nm se desloca com o aumento da concentração,

resultando em um aumento na razão das intensidades (I_{338}/I_{334}). Esse deslocamento indica que o pireno, por ser pouco solúvel em água ($2-3 \text{ mmol L}^{-1}$), tende a se dissolver preferencialmente em um microambiente hidrofóbico formado em meio aquoso. É possível utilizar a variação da razão das intensidades (I_{338}/I_{334}) do espectro de excitação do pireno para acompanhar a formação dos agregados (WANG *et al.*, 2007). Os valores de CAC foram determinados pela interseção entre as linhas mostradas na **Figura 25** e estão reportados na **Tabela 8**

Todos os copolímeros formam agregados mesmo a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Isso ocorreu devido às cadeias de PNIPAm-NH₂ enxertadas na galactomanana oxidada terem a tendência de formar agregados por auto-organização mesmo abaixo da LCST. Comportamento similar já foi citado na literatura por Abreu e colaboradores (2016) para copolímero de goma do cajueiro-g-PNIPAm e Gomes e colaboradores (2020) para copolímeros de galactomanana-g-PNIPAm via polimerização radicalar livre.

A $50 \text{ }^\circ\text{C}$, a CAC de todos os copolímeros é menor que à 25°C . Isso se deve ao fato que essa temperatura está acima da LCST dos copolímeros, ou seja, a mudança do estado de hidratada (hidrofílica) para desidratada (hidrofóbica) das cadeias do PNIPAm-NH₂ já ocorreu. Nessa temperatura, tem-se um copolímero anfifílico que se auto-organiza em nanopartículas.

Os valores de CAC dos copolímeros sintetizados com o PNIPAm-NH₂-A, CP-A e CP-A_R, são influenciados pelo percentual de NIPAm. O CP-A apresenta menor CAC devido ao maior percentual, que favorece a formação de agregados em concentrações mais baixas.

Ao comparar os valores de CAC dos copolímeros de cadeias de PNIPAm-NH₂ com massas molares distintas (CP-A e CP-B), a maior CAC a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ foi obtida pelo CP-B. A diminuição do tamanho das cadeias laterais levou a formação de menores núcleos hidrofóbicos, ou seja, o copolímero tem um maior caráter hidrofílico, o que leva a uma maior resistência à agregação. Patrizi e colaboradores (2009) reportaram resultados similares quanto à influência do tamanho da cadeia no valor da CAC nos copolímeros de PNIPAm enxertado em dextrana via polimerização radicalar por transferência de átomo (ATRP).

Figura 25 - Razão das intensidades (I_{338}/I_{334}) do espectro de excitação do pireno em função da concentração dos copolímeros CP-A, CP-A_R e CP-B a 25 e 50 °C.

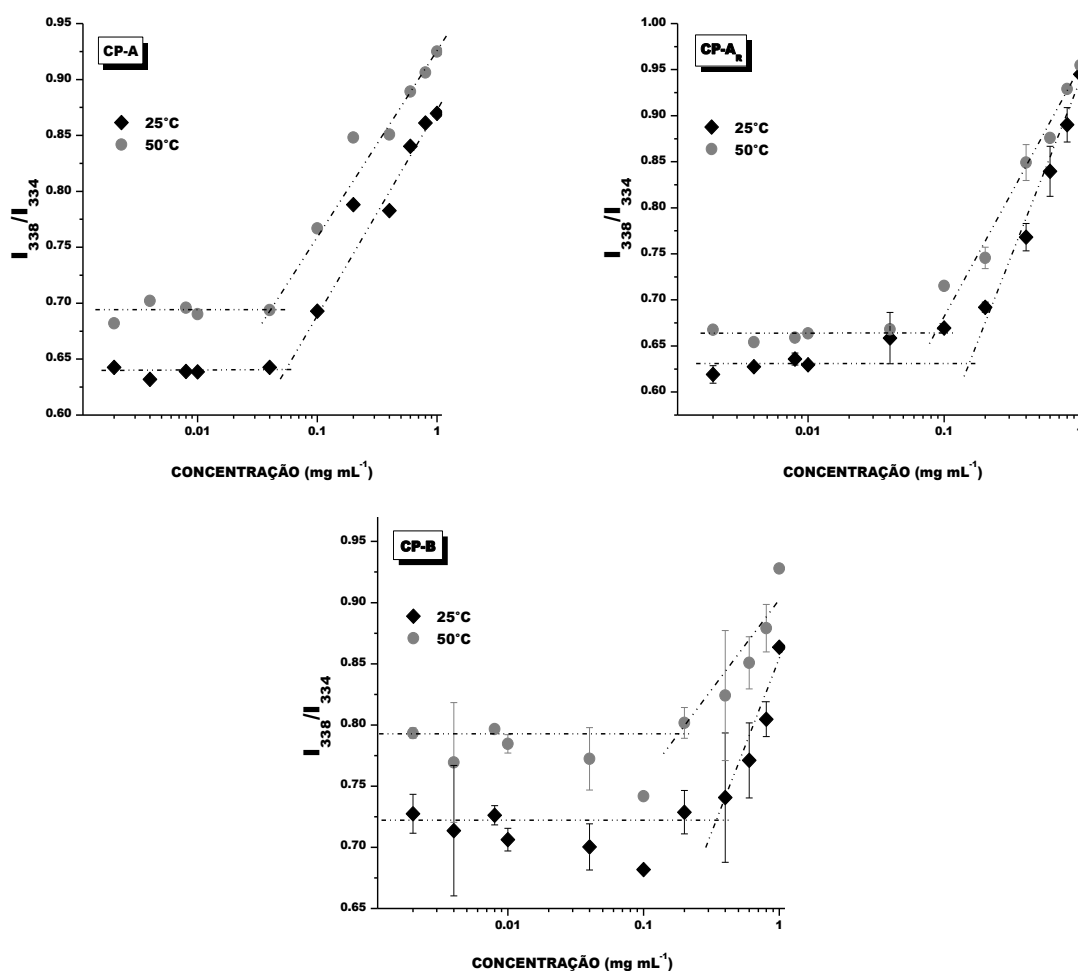


Tabela 8 – Valores de CAC dos copolímeros CP-A, CP-A_R e CP-B a 25 e 50 °C

COPOLÍMEROS	CAC (mg mL ⁻¹)	
	25 °C	50 °C
CP-A	0,056	0,039
CP-A _R	0,154	0,085
CP-B	0,340	0,180

Copolímeros de pululana-g-PNIPAm (PL-g-PNIPAm), sintetizados por polimerização radicalar livre, com cadeias laterais com massas molares diferentes ($0,61 \times 10^4$ e $1,01 \times 10^4$ g mol⁻¹) também apresentaram tendência similar à obtida nesse trabalho, porém

com valores de CAC a 25 °C consideravelmente maiores, 3,71 e 3,36 mg mL⁻¹ (CONSTANTIN *et al*, 2017). Uma possível justificativa para o menor valor de CAC do CP-B (0,72 x 10⁴ g mol⁻¹) quando comparado ao PL-g-PNIPAm seria a flexibilidade adquirida pelas cadeias da galactomanana após a oxidação, o que permite maior empacotamento das cadeias do polissacarídeo.

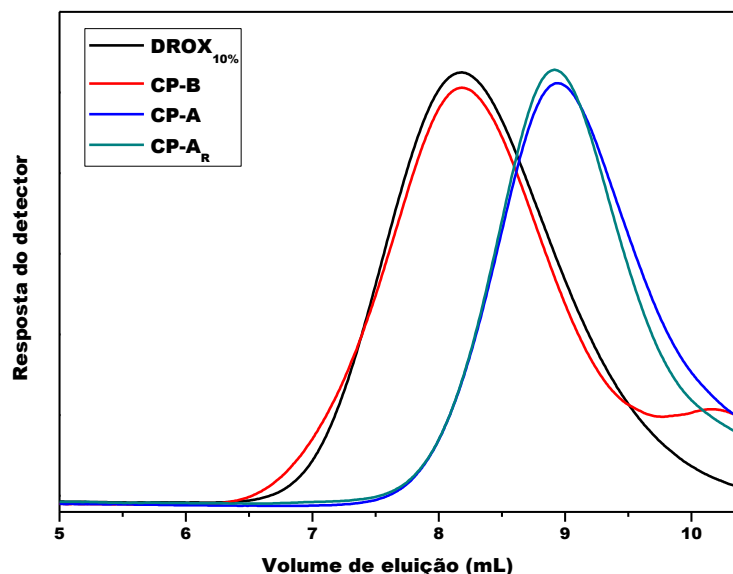
Gupta e colaboradores (2011) obtiveram valor de CAC maior que os obtidos nesse trabalho (1,038 mg mL⁻¹, 25°C) para o copolímero de PNIPAm enxertado em goma guar carboximetilada por reação de química das carbodiimina (EDC). Gomes e seus colaboradores (2020), utilizando galactomanana de maior massa molar, reportaram valores de CAC superiores aos do copolímero CP-A e inferiores aos do CP-B (0,16 mg mL⁻¹ a 25 °C e 0,09 mg mL⁻¹ a 50 °C) para o copolímero de galactomanana-g-PNIPAm sintetizado por polimerização radicalar livre.

5.3.5 Cromatografia de permeação em gel

A análise de GPC da DROx_{10%} e dos copolímeros foi realizada em uma solução de nitrato de sódio 0,1 mol L⁻¹ como eluente a 30 °C, abaixo da LCST dos copolímeros. Os cromatogramas dos copolímeros e da DROx_{10%} são mostrados na **Figura 26**. Mesmo após a reação de enxertia, na qual cadeias são adicionadas à cadeia principal da DROx_{10%}, os agregados dos copolímeros apresentaram volumes hidrodinâmicos iguais ou menores do que os da galactomanana oxidada.

O copolímero CP-B apresentou volume de eluição semelhante ao da DROx_{10%}. Isso ocorreu porque o CP-B tem cadeias laterais menores que não influenciam no volume hidrodinâmico do agregado. Para os demais copolímeros que possuem cadeias de PNIPAm-NH₂ maiores, os picos se deslocam para volume de eluição maior que o da DROx_{10%}. Esse comportamento pode ser justificado pela agregação dos copolímeros, que resultam em volumes hidrodinâmicos menores. Resultados análogos foram obtidos para copolímeros de celulose-g-PNIPAm com três proporções em massas molares diferentes de PNIPAm (YANG *et al.*, 2015).

Figura 26 - Cromatogramas de distribuição da massa molar por GPC da DROx_{10%} e dos copolímeros (CP-A, CP-A_R e CP-B)



Uma outra justificativa seria a distância entre as cadeias enxertadas. Copolímeros com cadeias mais distantes apresentam volumes hidrodinâmicos menores do que aqueles com cadeias mais próximas. Esse comportamento foi observado para copolímeros de dextrana enxertada com PNIPAm com massas molares iguais, mas apresentaram volumes hidrodinâmicos diferentes quando a distância das cadeias era distinta (CHUMACHEMKO *et al.*, 2017).

Esse resultado confirma os dados obtidos por CAC, indicando que mesmo abaixo da LCST há formação de agregados. Como consequência da estrutura ramificada dos copolímeros, não foi feita nenhuma tentativa de calcular a massa molar.

5.3.6 Caracterização das nanopartículas

5.3.6.1 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

A caracterização por DLS foi utilizada para determinar a LCST e estudar o efeito da temperatura nas propriedades de auto-organização dos copolímeros. O ponto onde ocorre um aumento ou diminuição brusca do diâmetro médio é conhecido como a LCST do copolímero (LV *et al.*, 2011). A **Figura 27** mostra a variação do diâmetro médio com a temperatura para copolímeros e na **Tabela 9** o diâmetro médio a 45 °C e a LCST.

Figura 27 - Distribuição do diâmetro médio em função da temperatura (25-50 °C) para os copolímeros CP-A, CP-A_R e CP-B

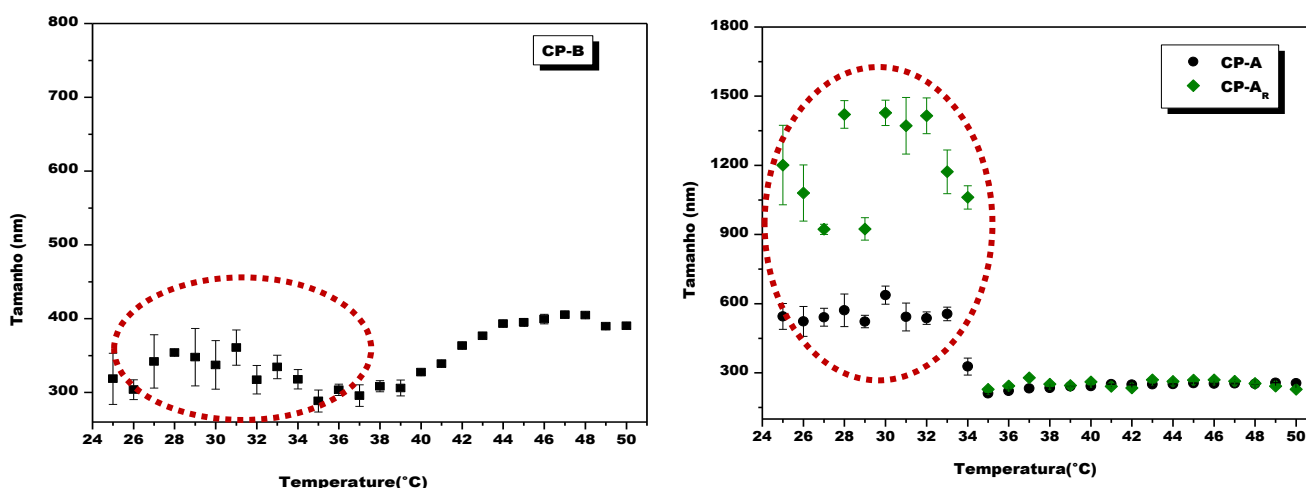


Tabela 9 – Temperatura de transição (LCST) e diâmetro médio a 45°C das nanopartículas dos copolímeros CP-A, CP-A_R e CP-B

COPOLÍMEROS	LCST (°C)	DIÂMETRO MÉDIO A 45 °C (nm)
CP-A	34	255 ± 2
CP-A _R	35	268 ± 1
CP-B	40	395 ± 5

O perfil de distribuição do diâmetro médio em função da temperatura das nanopartículas formadas pelos copolímeros CP-A e CP-A_R são diferentes do CP-B. Sendo que o tamanho das nanopartículas sintetizadas com PNIPAM-NH₂-B, cadeias menores, aumenta após a LCST e o com PNIPAM-NH₂-A, cadeias maiores, diminui. De acordo com Yang e colaboradores (2013) a diminuição do tamanho é frequentemente encontrada em copolímeros com ramificações de cadeias longas e lineares, onde o copolímero transita de espiral para um glóbulo, ou seja, ocorre um colapso das cadeias. Enquanto o aumento de tamanho ocorre em copolímeros com cadeias mais curtas onde o mesmo exibe uma conversão de segmentos para agregado. Mesmo que haja duas formas opostas, tanto o colapso quanto a agregação são causados pela perda das ligações de hidrogênio do copolímero com a água. Perfil similar foi observado para os copolímeros de Alginato-g-PNIPAm com percentual de 25 e 43% em massa de PNIPAm (VASILE; NITA, 2011).

Ao correlacionar o CP-B e CP-A, é possível pontuar a influência da massa molar da cadeia lateral na temperatura de transição. O copolímero CP-B apresentou uma temperatura de transição de 40 °C, enquanto o CP-A a LCST é similar ao do PNIPAm-NH₂-A (34 °C) que lhe deu origem. Isso ocorre porque a LCST depende do balanço entre os domínios hidrofílicos/hidrofóbicos. Quando o PNIPAm é enxertado na cadeia da galactomanana oxidada, dependendo da massa molar dessa cadeia lateral é possível se ter maiores ou menores interações hidrofóbicas. Quanto maior a massa molar das cadeias de PNIPAm mais intensas são as interações hidrofóbicas, resultando em valores de LCST menores MENDELEY CITATION PLACEHOLDER 6. Chuang e colaboradores (2011) sintetizaram copolímeros de quitosana-g-PNIPAm (4725 g mol⁻¹) com LCST igual a CP-B.

Já o copolímero que passou pela reação de redução teve sua LCST aumentada em um grau em relação ao CP-A. As possíveis justificativas são os grupos amina que proporcionaram um aumento das ligações de hidrogênio entre o copolímero e o meio aquoso causaram uma maior resistência a agregação ou/e devido a hidrólise as cadeias de PNIPAm durante o processo de redução.

Os copolímeros CP-A e CP-A_R a 45 °C apresentaram tamanhos de partículas de 255 e 268 nm, respectivamente, valores inferiores ao observado para CP-B (395 nm). Yang e colaboradores (2015) sintetizaram copolímero de celulose-g-PNIPAm com uma razão molar de 18:1 (NIPAm:unidade de anidroglicose) (2034 g mol⁻¹) utilizando polimerização radicalar por transferência de átomo (ATRP), acima da LCST o tamanho das nanopartículas é similar aos apresentados nesse trabalho (200 nm). Porém Patrizi e colaboradores (2009) sintetizaram copolímero enxertado de dextrana e PNIPAm com massa molar de 11500 g mol⁻¹ por ATRP com tamanho de nanopartículas bem inferior aos citados nesse estudo (81 nm). Cheaburu-Yilmaz (2020) enxertou PNIPAm (7399 g mol⁻¹) com massa molar similar ao do CP-B em quitosana, porém o copolímero apresentou tamanho de partículas de 3500 nm, após a LCST.

O processo de redução do copolímero CP-A causou um aumento no tamanho das nanopartículas, comportamento similar foi obtido por Xu e colaboradores (2017) para conjugados de dextrana oxidada e doxorrubicina via reação de formação de base de *Schiff* reduzido e não-reduzido.

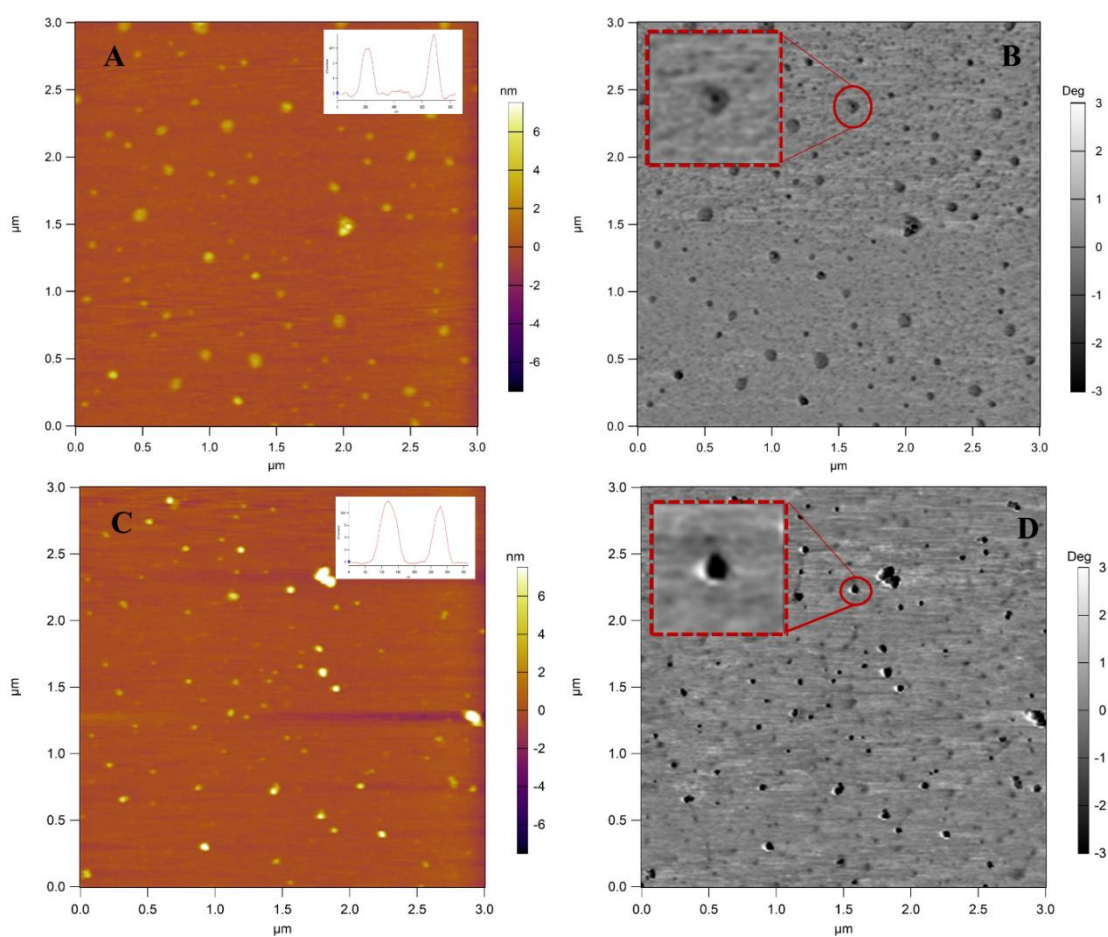
Gomes e colaboradores (2020) sintetizaram copolímeros de PNIPAm e galactomanana extraída de *D. gardneriana* (DG) por polimerização radicalar. A galactomanana de DG tem massa molar de 3,17 x 10⁶ g mol⁻¹ e razão manose/galactose 1,23. O copolímero

DG-g-PNIPAm apresentou tamanho de partícula de 695,0 nm a 50 °C, um valor quase o dobro do CP-B, material com maior tamanho. Outra diferença é que a 25 °C, abaixo da LCST, o copolímero de DG-g-PNIPAm apresentou tamanho de 3251 nm, ou seja, maior que a 50 °C, enquanto o CP-B apresentou um comportamento inverso, menor a 25 °C maior a 50 °C. Essas diferenças podem ser devido às diferenças no método de síntese, mas também devido às diferenças na massa molar da galactomanana e na razão molar de manose/galactose.

5.3.6.2 Microscopia de força atômica (MFA)

A morfologia das nanopartículas do CP-B e CP-A foi analisada por microscopia de força atômica (MFA). As imagens de altura e fase são mostradas na **Figura 28**.

Figura 28 - Imagens de MFA de altura para as nanopartículas de CP-A(A) e CP-B(C) e de fase para CP- A(B) e de CP- B (D)



As nanopartículas apresentaram-se esféricas, com diâmetro médio de $57,37 \pm 19,50$ nm para CP-A e $47,13 \pm 10,79$ nm para o CP-B (**Figura 28A e C**). A tendência de tamanho dos copolímeros observada nessa análise é diferente da obtida em meio aquoso, DLS, isso ocorre devido à desidratação provocada durante a secagem.

O gráfico de fase do CP-A (**Figura 28B**) apresentou uma textura em fase, em que se observa uma organização da nanopartícula em núcleo-coroa. No CP-B (**Figura 28D**), não se observa uma diferença de fase. Isso pode ser explicado pelo tamanho da cadeia lateral, sendo que o CP-A possui uma cadeia de PNIPAm maior do que o CP-B, resultando em uma região hidrofóbica mais extensa acima da LCST.

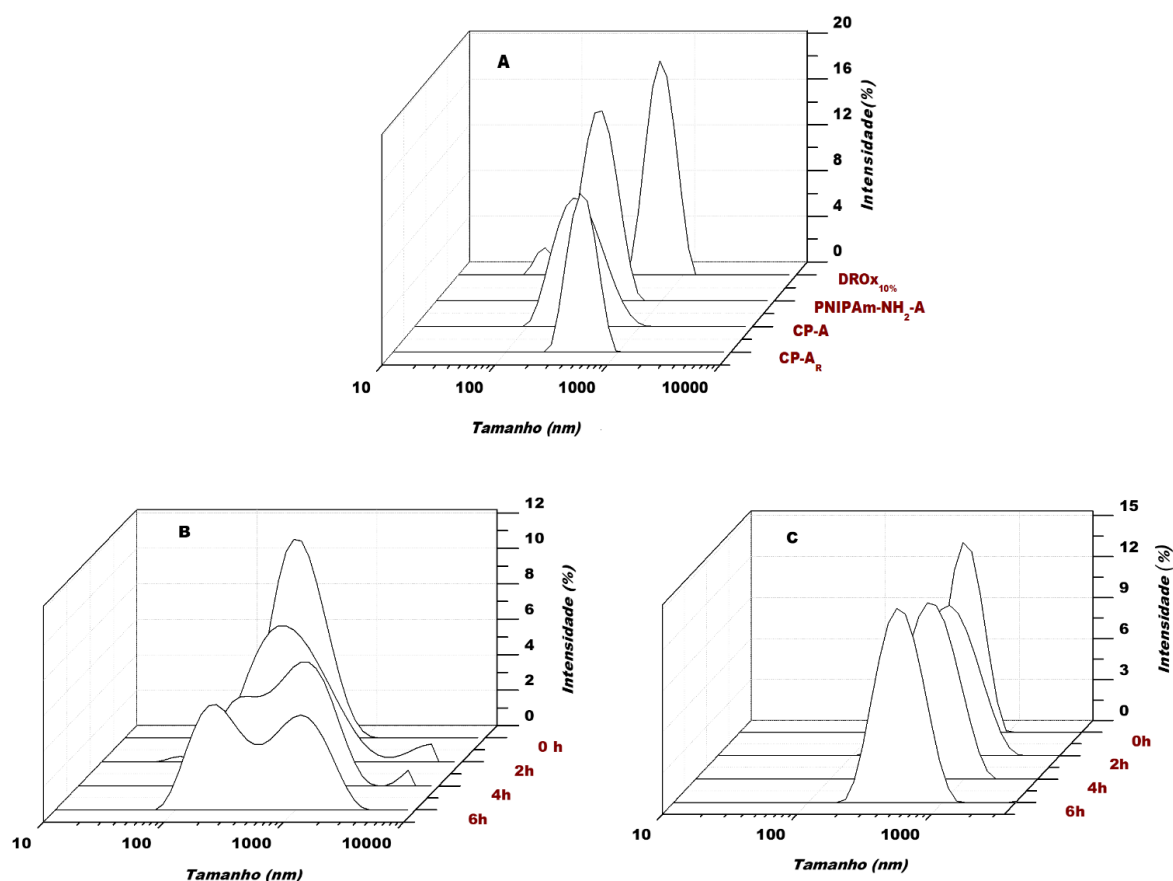
5.3.6.3 Estudo da estabilidade da ligação imina em pH 2,0

A ligação $-C=N$ da imina (base de Schiff) é um exemplo de ligação covalente dinâmica. As ligações imina apresentam reversibilidade com alteração do valor do pH, diferente das ligações tradicionais (MOULIN; CORMOSW; GIUSEPPONE, 2012).

Com o objetivo de analisar parte desse processo dinâmico, um estudo de hidrólise da ligação imina do copolímero foi realizado em pH 2,0 a 38°C , ou seja, acima da temperatura LCST. A distribuição de tamanho dos copolímeros CP-A e CP-A_R foi acompanhada por DLS por um período de seis horas. Pode-se observar na **Figura 29A** a distribuição de tamanho do PNIPAm-NH₂, DRO_{X10%}, CP-A e CP-A_R no $t = 0$. Como o PNIPAm-NH₂ e DRO_{X10%} apresentaram distribuições distintas, se existisse uma mistura física desses materiais a distribuição deveria ser bimodal para os copolímeros, porém o CP-A apresentou uma distribuição monomodal indicando a formação da base de Schiff.

As **Figuras 29B e C** apresentam a distribuição de tamanho dos CP-A e CP-A_R em função do tempo em solução aquosa pH 2,0. O copolímero CP-A, após 2 horas, apresentou um alargamento da banda e em 4 e 6 horas pode-se observar o início da separação das cadeias do homopolímero e do polissacarídeo, confirmando assim que os copolímeros são formados por ligação imina, que é lábil a pH 2,0. Enquanto a redução da ligação imina produziu um copolímero mais estável, CP-A_R, pois mantém a distribuição monomodal mesmo após 6 horas em pH 2,0.

Figura 29 - Distribuição de tamanhos de partícula dos copolímeros em pH 2,0. DRO_{x10%}, PNIPAm-NH₂-A, CP-A e CP-A_R no t= 0 (A), CP-A (B) e CP-A_R (C)

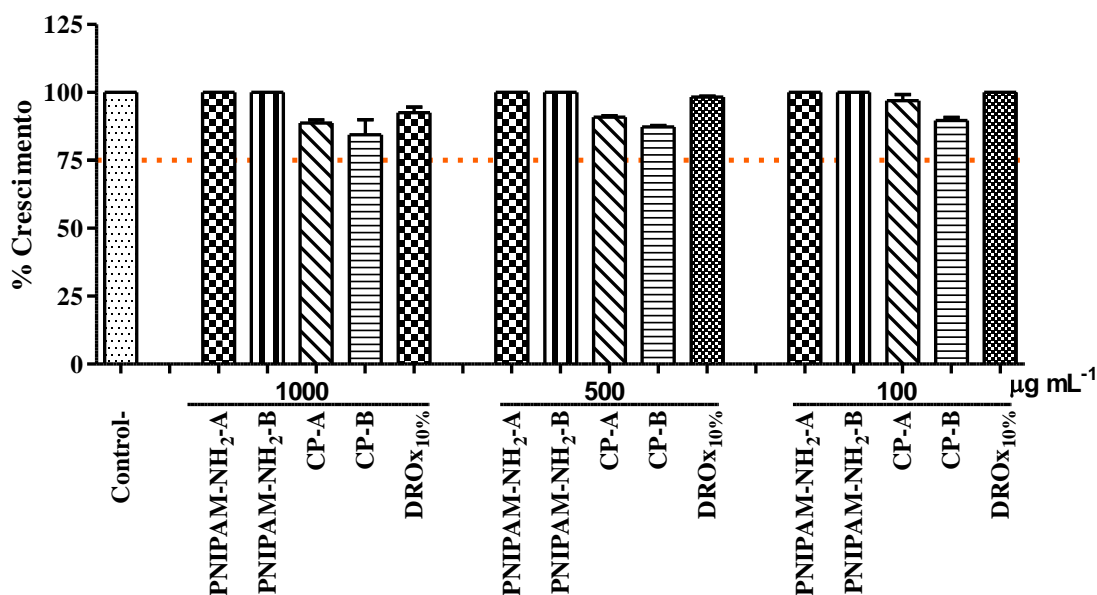


A ligação imina formada por amina primária e aldeído é a menos estável das ligações iminas formadas por base de *Schiff*, e, segundo a literatura, em pH menor que 6,5 essas ligações são completamente desfeitas (XIN; YUAN, 2012). No entanto, os resultados apresentados mostraram uma estabilidade das nanopartículas, onde apenas depois de 2 horas em pH 2,0 foi possível visualizar a separação dos dois componentes que constituem as nanopartículas. Uma possível justificativa seria as grandes massas molares do polissacarídeo e do PNIPAm e o enovelamento formado por eles na formação das nanopartículas. Esse resultado confirma que os copolímeros são realmente formados por reação de formação de base de *Schiff*, e que as nanopartículas apresentaram uma certa estabilidade em meio ácido mesmo formados por ligação imina e que a redução foi eficiente com NaBH₄.

5.3.7 Ensaio de citotoxicidade *in vitro*

O resultado da citotoxicidade dos PNIPAm-NH₂ (A e B), DROx_{10%} e dos copolímeros (CP-A e CP-B) é mostrado na **Figura 30**. As análises de viabilidade celular *in vitro* foram realizadas utilizando células renais (HEK 293T). A citotoxicidade associada aos aldeídos de baixa massa molar, como por exemplo, o glutaraldeído, e ao de grande massa molar como polissacarídeos oxidados, tem sido mostrada em algumas publicações (RAVICHANDRAN, JAYAKRISHNAN, 2018; LOPACHIN, GAVIN, 2014). No entanto, a DROx_{10%} não demonstrou potencial citotóxico frente à linhagem HEK 293T em nenhuma das concentrações analisadas. Uma possível justificativa seria o baixo grau de oxidação utilizado (10%).

Figura 30- Viabilidade celular em células renais (HEK 293T) na presença da galactomanana oxidada (DROx_{10%}), homopolímeros (PNIPAm-NH₂-A, PNIPAm-NH₂-B) e copolímeros (CP-A e CP-B)



Mellati e colaboradores (2016) estudaram a influência da massa molar na citotoxicidade do PNIPAm em células HEK 293T e concluíram que PNIPAm de baixa massa molar, grau de polimerização (DP) de 35 (DP-35), mostrou-se citotóxico. O de massa molar muito grande, DP-400, também apresentou o mesmo comportamento. Os PNIPAm-NH₂ sintetizados nesse trabalho não apresentaram citotoxicidade. Como PNIPAm-NH₂-B apresentou um DP maior que 35 (DP-64), pode ser um dos motivos da sua não citotoxicidade. Já o PNIPAm-NH₂-A, apesar de apresentar um DP > 400, também não se mostrou citotóxico. Uma possível justificativa seria que a concentração (1000 µg mL⁻¹) usada nesse trabalho,

concentração usada na formação das nanopartículas, é cinco vezes menor que a estudada por Mellati e colaboradores (2016), que foi de 5 mg mL⁻¹.

Os copolímeros promoveram uma diminuição do crescimento celular (> 15%) comparados aos materiais de partidas. Isso resulta do fato da ligação imina apresentar uma certa toxicidade (SOKOLSKY-PAPKOV, DOMB, GOLLENSER, 2006). Todos os materiais apresentaram excelente viabilidade celular, sendo esse um resultado importante para potenciais aplicações nas áreas biomédica e de liberação de fármacos.

5.4 Caracterização dos copolímeros: estudo do efeito do grau de oxidação

Os copolímeros de DRU-Ox e PNIPAm-NH₂ foram sintetizados por “*grafting to*” via base de *Schiff*. Com o derivado PNIPAm-NH₂-M (2,3 x 10⁴ g mol⁻¹) e DRU-Ox_{10%}, DRU-Ox_{20%} e DRU-Ox_{30%} foram sintetizados três copolímeros com objetivo de estudar a influência do grau de oxidação, CP_{10%}-M, CP_{20%}-M e CP_{30%}-M.

5.4.1 Rendimento e percentual de NIPAm

O rendimento das sínteses após a purificação é mostrado na **Tabela 10**. O rendimento diminui com o aumento do grau de oxidação; uma possível justificativa seria que o aumento dos grupos aldeído tenha levado a formação de copolímeros hiperenxertados que foram eliminados pelo processo de purificação.

Tabela 10 – Rendimento reacional e percentual de NIPAm (%) dos copolímeros CP_{10%}-M, CP_{20%}-M e CP_{30%}-M

COPOLÍMERO	RENDIMENTO (%)	NIPAm (%)
CP _{10%} -M	48,1±1,4	2,7 ± 0,6
CP _{20%} -M	46,6±1,2	2,7 ± 1,2%
CP _{30%} -M	43,3±2,0	4,1 ± 0,6

O percentual de NIPAm enxertado (NIPAm %) foi obtido por análise elementar utilizando o percentual de nitrogênio. Os copolímeros CP_{10%}-M e CP_{20%}-M apresentaram valores similares; porém, o CP_{30%}-M exibiu valor de 32,0% maior do que os dos outros dois

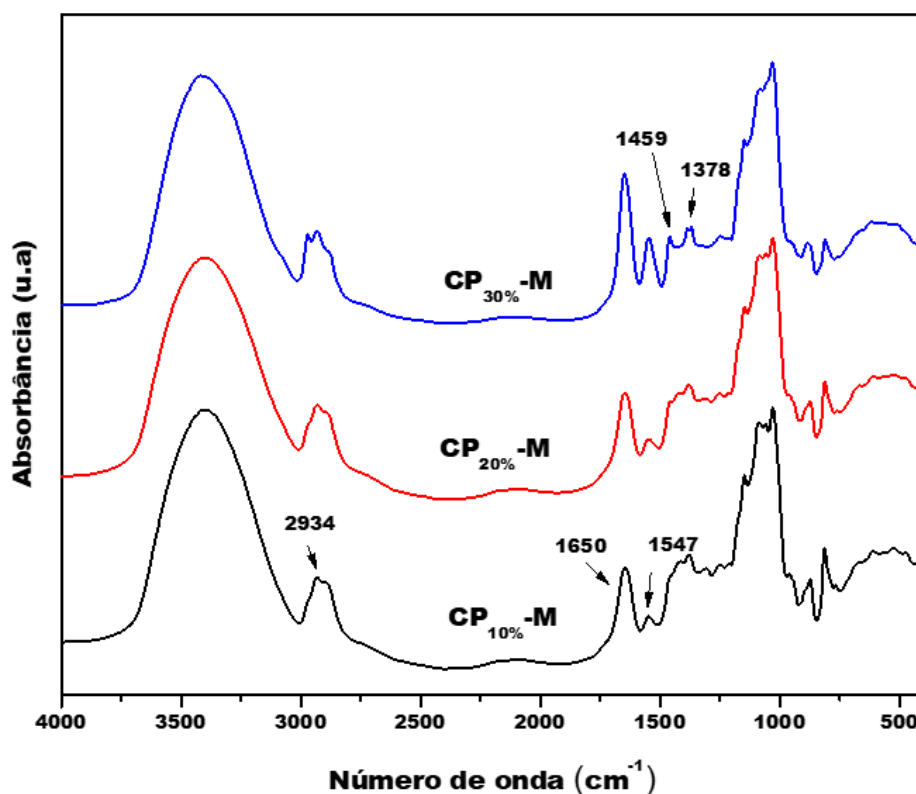
copolímeros (**Tabela 10**). Esse resultado corrobora com a hipótese de que quando maior a quantidade de centros reativos, maior é a quantidade de cadeias enxertadas.

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

Os copolímeros foram caracterizados quanto à estrutura química por FT-IR (**Figura 31**). Todos os copolímeros apresentaram bandas características da galactomanana oxidada em $3000\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ (ν OH), 2910 cm^{-1} (ν CH), 1152 cm^{-1} (ν C-O) e 1027 cm^{-1} (ν C-O-C). A presença do PNIPAm pode ser verificada nos copolímeros através da intensificação das bandas em 2934 cm^{-1} (ν CH) e 1650 cm^{-1} (ν =C-O), além da banda em 1547 cm^{-1} (ν N-H).

O espectro do copolímero CP_{30%}-M, além de apresentar as bandas já citadas anteriormente, revela novas bandas em 1459 e 1377 cm^{-1} , correspondentes às deformações simétrica e assimétrica do C-H da metila do grupo isopropil do PNIPAm. Bandas similares foram observadas no polímero estrela de β -ciclodextrina-poli(N-isopropilacrilamida) para a formação de micelas (ZHOU *et al.*, 2018).

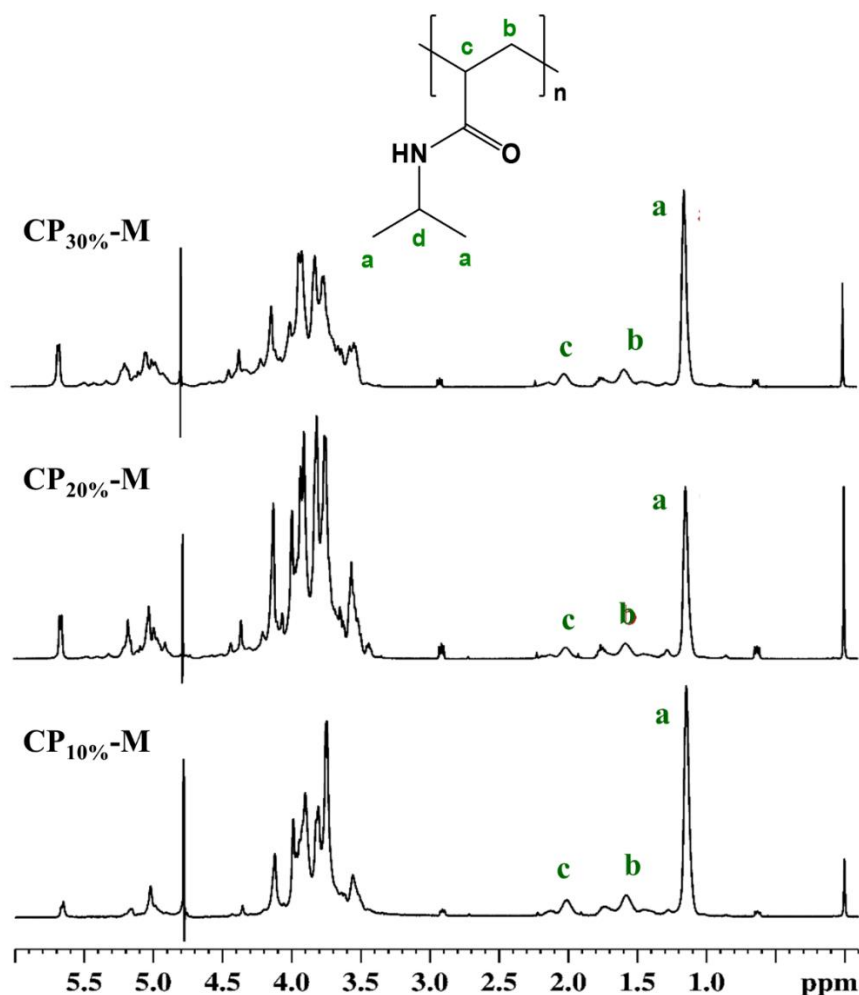
Figura 31 - Espectros na região do infravermelho dos copolímeros CP_{10%}-M, CP_{20%}-M e CP_{30%}-M na região de $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$



5.4.3 Ressonância magnética nuclear (RMN)

A estrutura química dos copolímeros também foi analisada por RMN ^1H em D_2O à temperatura de 25°C (**Figura 32**). Os sinais atribuídos aos prótons dos anéis glicosídicos da galactomanana oxidada são observados na faixa de 3,4 a 5,8 ppm.

Figura 32 - Espectros de RMN ^1H (500 MHz, D_2O , 25°C) dos copolímeros $\text{CP}_{10\%}\text{-M}$, $\text{CP}_{20\%}\text{-M}$ e $\text{CP}_{30\%}\text{-M}$



Os sinais característicos do PNIPAm em 1,14 ppm (os dois grupos metil) e em 1,58 – 2,01 ppm (os grupos CH_2 e CH da cadeia) também são observados nos espectros dos copolímeros. O sinal em 3,9 ppm, que corresponde ao próton metínico do grupo isopropil, não aparece devido à sobreposição com os sinais da galactomanana. Nos espectros na região dos hidrogênios anoméricos (δ 4,7-5,3 ppm), mesmo após a reação, algumas estruturas

hemiacetálicas permanecem, indicando que nem todos os grupos funcionais foram utilizados na reação.

5.4.4 Concentração de agregação crítica (CAC)

Os valores de CAC dos copolímeros foram determinados utilizando a técnica espectrofluorimétrica, com pireno como sonda fluorescente. A CAC foi determinada como a concentração no ponto de interseção de duas retas traçadas antes e depois da inflexão no gráfico, onde a razão I_{338}/I_{334} começa a aumentar (**Figura 33** e **Tabela 11**).

Em todos os copolímeros e em ambas as temperaturas, não foram observadas alterações significativas no deslocamento das bandas no intervalo de baixas concentrações. Entretanto, com o aumento da concentração, houve um aumento acentuado no deslocamento, indicando a imersão de pireno nos microdomínios hidrofóbicos dos agregados.

Figura 33 - Razão das intensidades (I_{338}/I_{334}) do espectro de excitação do pireno em função da concentração dos copolímeros CP_{10%}-M, CP_{20%}-M e CP_{30%}-M a 25 e 50 °C.

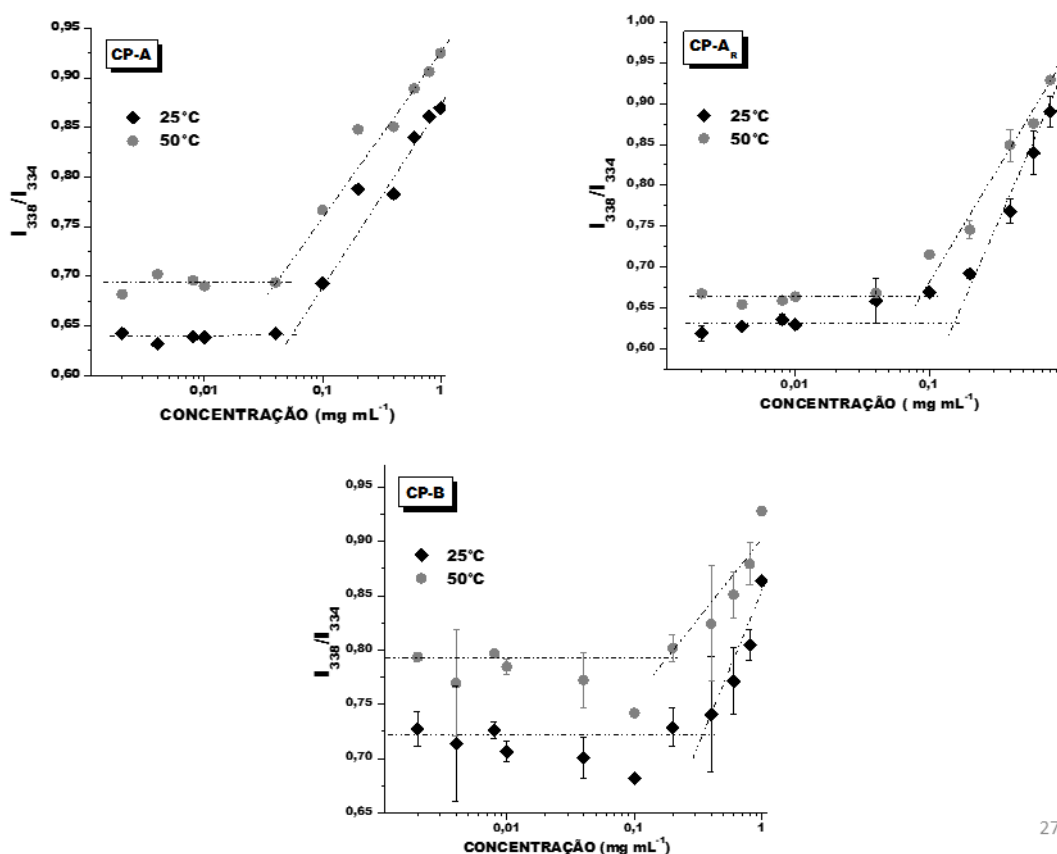


Tabela 11 - Valores de CAC dos copolímeros CP_{10%}-M, CP_{20%}-M e CP_{30%}-M a 25 e 50 °C

COPOLÍMEROS	CAC (mg mL ⁻¹)	
	25 °C	50 °C
CP _{10%} -M	0,213	0,154
CP _{20%} -M	0,204	0,142
CP _{30%} -M	0,158	0,115

A 25 °C, todos os copolímeros apresentaram CAC, embora com valores maiores que a 50 °C. A formação de agregados a 25 °C pode ser justificada pela tendência das cadeias enxertadas de PNIPAm de se agregarem por auto-organização abaixo da LCST. Esse comportamento foi citado pela primeira vez na literatura por Abreu e colaboradores (2016) para copolímeros de polissacarídeo (goma do cajueiro) e poli-(N-isopropilacrilamida). A 50 °C, era esperado CAC menores devido à desidratação das cadeias de PNIPAm, levando à formação de nanopartícula do tipo *core-shell* com coroa hidrofílica e núcleo hidrofóbico.

Os copolímeros CP_{10%}-M e CP_{20%}-M apresentaram CAC próximas tanto a 25 °C (0,213 e 0,204 mg mL⁻¹) quanto a 50 °C (0,154 e 0,142 mg mL⁻¹), indicando que ambos têm balanço hidrofílico/hidrofóbico semelhante. O CP_{30%}-M apresentou CAC bem menor que os demais em ambas as temperaturas (25 °C: 0,158 mg mL⁻¹ e 50 °C: 0,115 mg mL⁻¹). Esse comportamento se deve à maior quantidade de PNIPAM, que favorece a formação dos domínios hidrofóbicos em concentrações mais baixas.

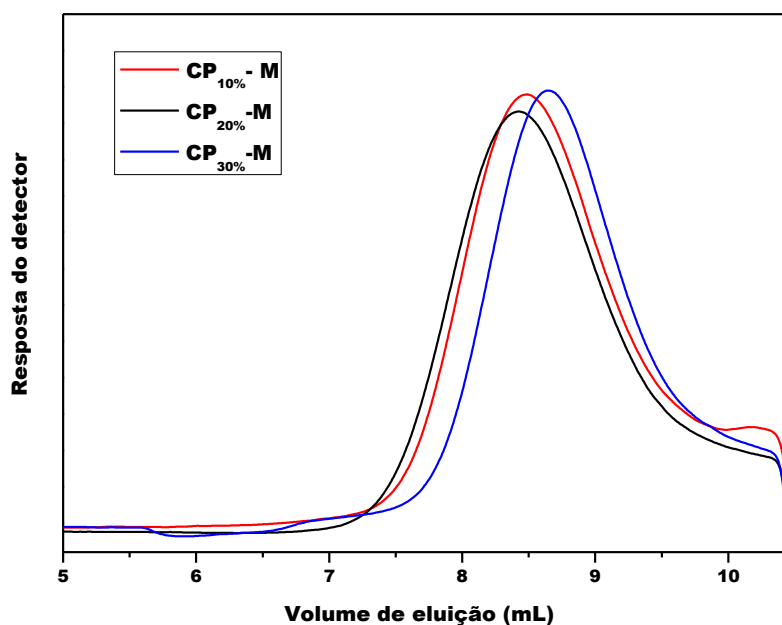
Constantin e colaboradores (2017) sintetizaram copolímeros de pululana (Mw: 2,0 x 10⁵ g mol⁻¹) e PNIPAm com massas molares de 0,6 e 1,01 x 10⁴ g mol⁻¹. Os copolímeros apresentaram CAC a 25 °C maiores do que as obtidas nesse trabalho (3,7 e 3,3 mg mL⁻¹). Gupta e colaboradores (2011) sintetizaram copolímero de guar carboximetilada e PNIPAm-NH₂ (M: 1,05 x 10⁴ g mol⁻¹) por reação de acoplamento utilizado EDC. A CAC do copolímero a 25 °C foi 5 vezes maior (1,013 g mL⁻¹) que as obtidas nesse trabalho.

Monteiro (2016) sintetizou copolímeros de galactomanana de *Delonix regia* e PNIPAm por polimerização radicalar livre, onde na melhor condição, o copolímero apresentou CAC a 25 °C de 1,65 mg mL⁻¹ e a 50 °C de 0,27 mg mL⁻¹. Mesmo utilizando a mesma galactomanana e PNIPAm, a escolha do método de enxertia influenciou, pois os valores obtidos nesse trabalho foram muito menores

5.4.5 Cromatografia de permeação em gel (GPC)

A análise de GPC dos copolímeros foi realizada utilizando como fase móvel nitrato de sódio a 30 °C. Como já citado na caracterização das galactomananas oxidadas o aumento do grau de oxidação é acompanhado pela diminuição da massa molar. Essa diferença é refletida nos copolímeros. Os picos dos copolímeros se descolam para volumes de eluição maiores do que os das galactomanana oxidadas (DRU-Ox_{10%} e DRU-Ox_{20%}, DRU-Ox_{30%}) que os originaram. O volume de eluição aumenta progressivamente com o grau de oxidação, sendo que os copolímeros CP_{10%}-M e CP_{20%}-M apresentaram deslocamento mais próximo que do copolímero CP_{30%}-M (**Figura 34**). Esse resultado indica que os agregados formados pelo copolímero CP_{30%}-M apresentam um volume hidrodinâmico menor que os demais, corroborando com os resultados de CAC e NIPAm (%).

Figura 34 - Cromatogramas de distribuição da massa molar por GPC dos copolímeros CP_{10%}-M, CP_{20%}-M e CP_{30%}-M



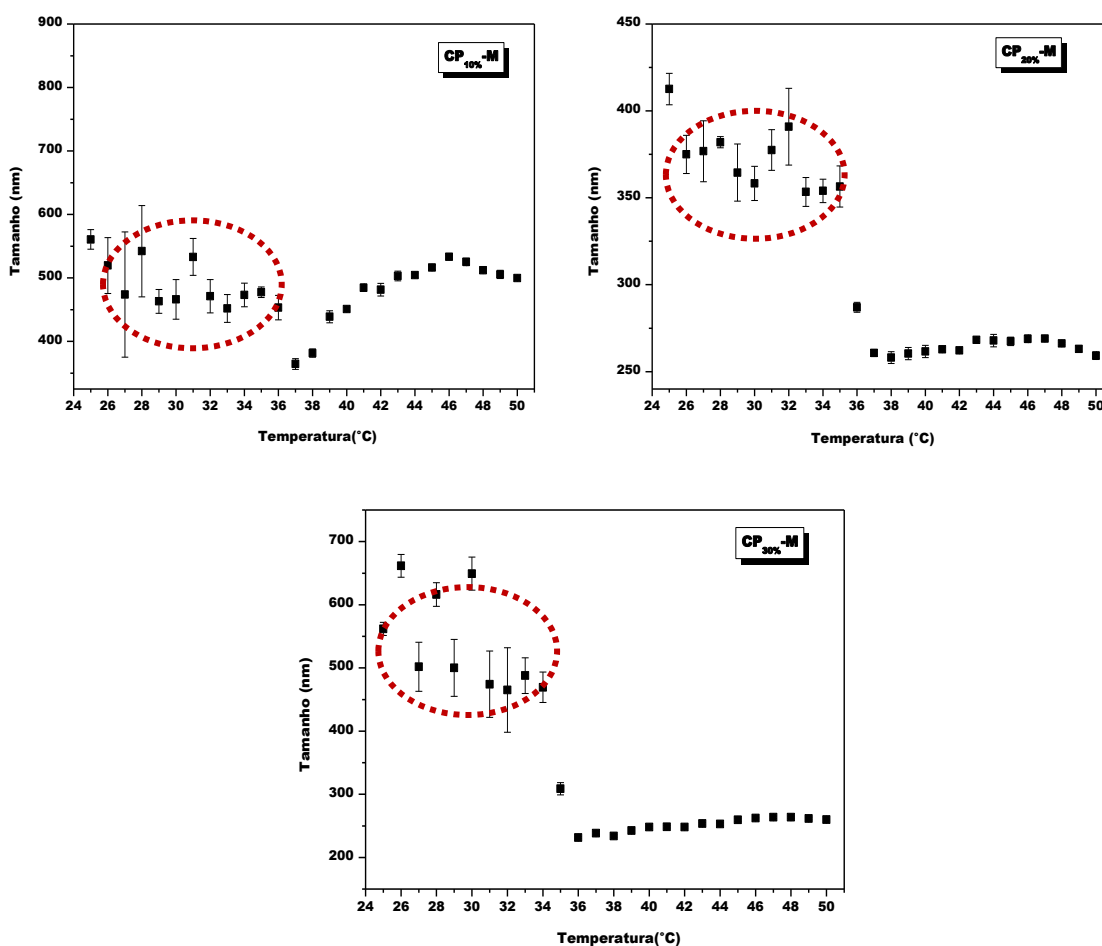
Yang e colaboradores (2015) obtiveram resultados similares para os copolímeros de celulose-g-PNIPAm. No entanto, Patrizi e colaboradores (2009) obtiveram o oposto, todos os copolímeros apresentaram volumes de eluição menores que o do polissacarídeo de partida. Apesar das análises terem sido feitas por GPC, a coluna, eluente e temperatura eram diferentes, e a massa molar das cadeias laterais era menor do que as utilizadas nesse trabalho.

5.4.6 Caracterização das nanopartículas

5.4.6.1 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

As propriedades de auto-organização termoinduzidas dos copolímeros foram investigadas por análise de DLS, utilizando soluções de 1 mg mL^{-1} . A **Figura 35** mostra a relação da temperatura com o diâmetro médio, e a **Tabela 12** mostra o diâmetro médio a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ e a LCST dos copolímeros.

Figura 35- Distribuição do diâmetro médio em função da temperatura ($25\text{-}50\text{ }^{\circ}\text{C}$) para os copolímeros CP_{10%}-M, CP_{20%}-M e CP_{30%}-M em meio aquoso.



Todos os copolímeros apresentaram perfis de distribuição de tamanho análogos, com partículas maiores antes da temperatura de transição e menores depois. Esse comportamento é esperado para copolímeros com cadeias laterais grandes. Vasile e Nita (2011) obtiveram perfil similar para o copolímero com alto conteúdo de PNIPAm (43% m/m) enxertado em alginato.

Os copolímeros CP_{10%}-M e CP_{20%}-M apresentaram LCST maiores (37 e 36 °C) do que o PNIPAm-NH₂ utilizado na síntese (35 °C). Este fenômeno é comumente observado para copolímeros de PNIPAm e polissacarídeos (LAI; HSIEH, 2012), já que a transição de fase é guiada por um balanço entre os segmentos hidrofílicos/hidrofóbicos. O aumento do caráter hidrofílico (galactomanana) levou ao aumento da temperatura de transição. O copolímero CP_{30%}-M apresentou LCST de 35 °C, ou seja, igual ao PNIPAm- M. De acordo com a literatura e com base nos resultados, quando se tem uma maior quantidade de PNIPAm, os segmentos hidrofílicos não influenciam mais na LCST.

Tabela 12 – Temperatura de transição (LCST) e diâmetro médio das nanopartículas a 37 °C dos copolímeros CP_{10%}-M, CP_{20%}-M e CP_{30%}- M

COPOLÍMERO	LCST (°C)	DIÂMETRO MÉDIO A 37 °C (nm)
CP_{10%}-M	37	365 ± 9
CP_{20%}-M	36	261 ± 2
CP_{30%}-M	35	236 ± 3

Os diâmetros médios das nanopartículas a 37 °C apresentaram uma tendência de diminuição com o aumento do grau de oxidação do material. O aumento do grau de oxidação é acompanhado de uma diminuição da massa molar dos derivados oxidados. Gomes e colaboradores (2020) reportaram que para copolímeros formados por galactomanana e PNIPAm, a diminuição da massa molar do polissacarídeo levou à redução do diâmetro médio das nanopartículas formadas. O CP_{10%}-M e CP_{20%}-M apresentaram percentual de NIPAm similares, porém as massas molares dos derivados oxidados que lhes deram origem diminuem com o aumento do grau de oxidação. Isso justifica o tamanho das nanopartículas formadas por CP_{20%}-M ser menor devido a menor massa molar da galactomanana oxidada (DRU-Ox_{20%}).

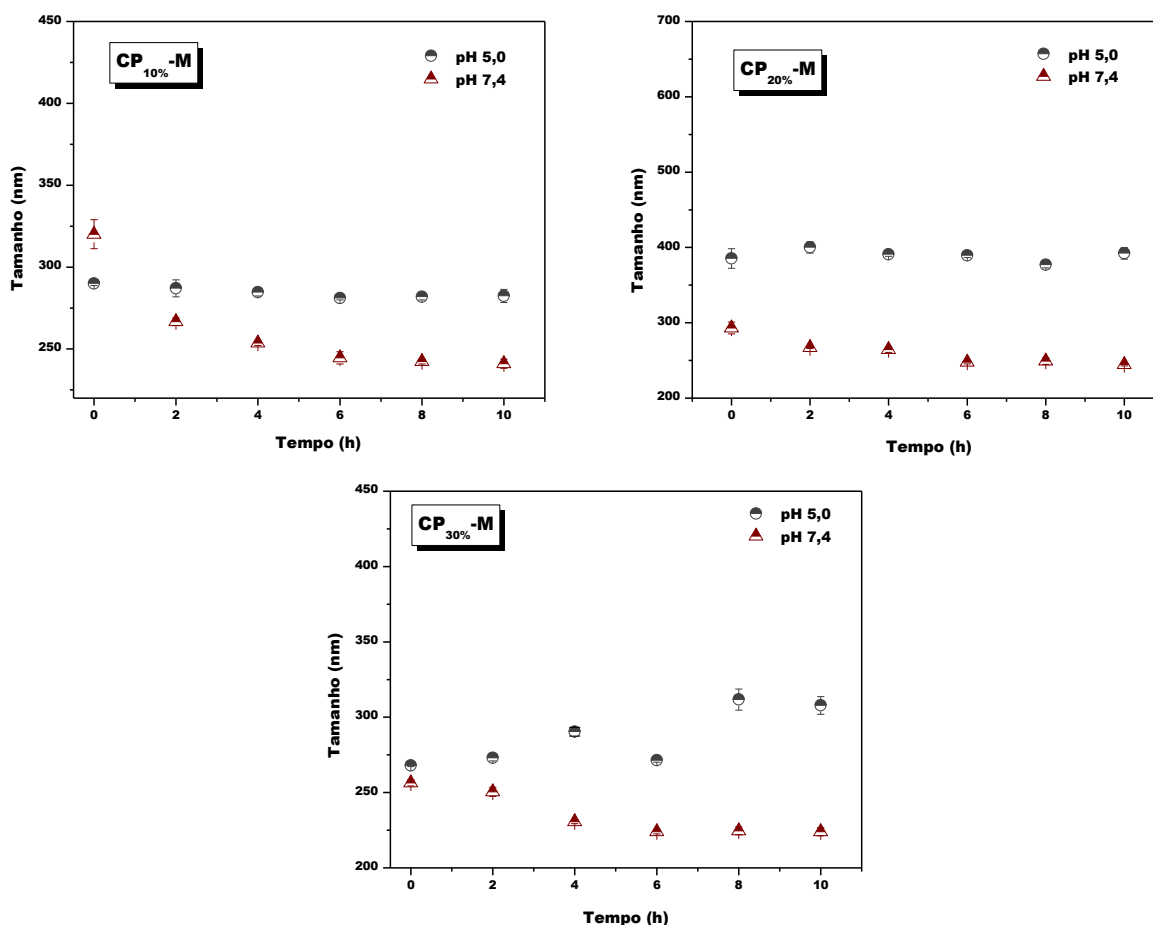
As galactomananas oxidadas utilizadas para a sínteses dos copolímeros CP_{30%}-M e CP_{20%}-M apresentaram massas molares similares, porém o CP_{30%}-M apresentou um maior percentual de NIPAm (NIPAm (%)). Com mais cadeias enxertadas, maior é a contração do núcleo hidrofóbico e menores são as nanopartículas produzidas por esse copolímero. Essa

tendência foi reportada por Abreu e colaboradores (2016) para copolímeros de goma do cajueiro enxertado com PNIPAm por reação de polimerização radicalar livre e por Patrizi e colaboradores (2009) para os copolímeros de dextrana-g-PNIPAm por polimerização radicalar por transferência de átomo (ATRP).

5.4.6.2 Estabilidade da ligação imina

A estabilidade das ligações iminas nos copolímeros foi acompanhada por DLS em diferentes pHs (5,0 e 7,4) por 10 horas. A partir dos dados dessa análise, pode-se entender como a ligação imina, e consequentemente, o tamanho das nanopartículas depende do pH no decorrer longo de 10 horas. A **Figura 36** apresenta a distribuição do diâmetro médio das nanopartículas em razão do tempo em diferentes pHs.

Figura 36 - Variação do diâmetro médio em função do tempo para os copolímeros CP_{10%}-M, CP_{20%}-M e CP_{30%}-M em tampão PBS pH 7,4 e 5,0 a 37 °C



Os gráficos mostram tendências distintas na distribuição do tamanho de nanopartícula para cada pH. Em pH 7,4, ocorreu a contração do tamanho das nanopartículas nas primeiras horas e se manteve sem modificação significativa a partir de 6 horas. Essas diminuições do tamanho das nanopartículas foram de aproximadamente 80, 50 e 30 nm para os copolímeros CP_{10%}-M, CP_{20%}-M e CP_{30%}-M, respectivamente. A redução do diâmetro médio pode ter mais de uma justificativa: a primeira seria a desidratação progressiva do núcleo hidrofóbico com o decorrer do tempo, e a outra, o amadurecimento anti-Ostwald, em que a energia do sistema é minimizada pelo aumento da área superficial (diminuição do tamanho das partículas). O amadurecimento anti-Ostwald foi mencionado na literatura para as nanopartículas do copolímero em bloco de poli-estireno e poli-etileno (KUMAR *et al.*, 2010). Essa estabilidade é um indicativo de que as estruturas das nanopartículas formadas por base de *Schiff* se mantêm estáveis em pH 7,4.

Os copolímeros foram sintetizados por reação de formação de base de *Schiff*, em que a ligação imina formada pela reação entre o grupo aldeído e amina é um exemplo de ligação reversível com a variação do pH do meio. A diminuição do pH do meio favorece a ruptura da ligação. Observou-se que em pH 5,0, o tamanho das nanopartículas é maior do que em pH 7,4. Esse aumento pode ser justificado pela ruptura da ligação imina entre as cadeias de galactomanana oxidada e as cadeias de PNIPAm. A desconexão das cadeias laterais aumentou a hidrofiliabilidade, levando ao intumescimento das nanopartículas.

Kong e colaboradores (2020) relataram comportamento similar para derivados anfífilos de celulose oxidada e compostos aminados (hexilamina, oleilamina e rodamina) formados por reação de base de *Schiff*. Em pH 7,4, as nanopartículas eram estáveis, contudo, em pH 4,0, as ligações iminas são clivadas e as cadeias laterais são desconectadas das cadeias do polissacarídeo, levando ao intumescimento das nanopartículas. Os autores observaram que a clivagem da base de *Schiff* inicia na superfície da nanopartícula e prossegue lentamente em direção ao interior da mesma. Para derivados com cadeias laterais com massa molar maior era mais difícil a difusão dos íons H⁺ e, conseqüentemente, o desmonte da nanopartícula.

5.5 Sínteses e caracterização dos pró-fármacos

Para a síntese dos pró-fármacos utilizou-se o copolímero CP_{30%}-M e a galactomanana oxidada (DRU- O_{x30%}) como fonte de aldeídos e a doxorubicina (DOX) como

fonte de amina primária, para a formação dos conjugados via reação de formação de base de *Schiff*. O copolímero CP_{30%}-M foi selecionado para a síntese do conjugado com a DOX, pois apresentou aldeídos remanescentes e maior percentual de NIPAm.

5.5.1 Eficiência de fármaco ligado (%) e carga de fármaco ligado (%)

A reação de síntese dos pró-fármacos foi avaliada quando à sua eficiência por meio de dois parâmetros: eficiência de fármaco ligado (EFL) e carga de fármaco ligado (CFL). Os valores estão apresentados na **Tabela 13**.

Tabela 13- Eficiência de fármaco ligado (EFL) e carga de fármaco ligado (CFL) dos pró-fármaco CP_{30%}-M-DOX e DRU-Ox_{30%}-DOX

PRÓ-FÁRMACO	EFL (%)	CFL (%)
CP _{30%} -M-DOX	59±6	5,9±0,6
DRU-Ox _{30%} -DOX	71±5	7,1±0,5

O pró-fármaco CP_{30%}-M-DOX apresentou os menores valores de eficiência e carga de fármaco ligado (EFL). Isso pode ser atribuído ao fato de que o pró-fármaco CP_{30%}-M-DOX foi sintetizado utilizando os grupos aldeído remanescentes da reação de formação do copolímero, resultando em menor disponibilidade de grupos aldeído livres para a reação. Além disso, as cadeias laterais de PNIPAm podem causar um maior impedimento estérico para a reação de formação de base de *Schiff* entre os grupos aldeído livres e os grupos amina da DOX.

Sagnella e colaboradores (2014) sintetizaram pró-fármacos de dextrana e DOX via reação de formação de base de *Schiff*, utilizando DMSO como solvente e um percentual de 10% (M/M) de DOX em relação ao material funcionalizado com aldeído, ou seja, as mesmas condições de síntese utilizadas nesse trabalho. A carga de fármaco ligado (CFL) foi de 4,5%, o que representa um valor de 23 e 36% menor do que os obtidos por esse trabalho para o CP_{30%}-M-DOX e DRU-Ox_{30%}-DOX, respectivamente.

5.5.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FT-IR) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os pró-fármacos foram caracterizados quanto à sua estrutura por FT-IR e RMN ¹H (Figura 37 e 38).

Figura 37 - Espectro na região do infravermelho do pró-fármaco CP_{30%}-M-DOX na região de 4000-400 cm⁻¹ (A) e zoom da região de 1800 a 1500 cm⁻¹ (B)

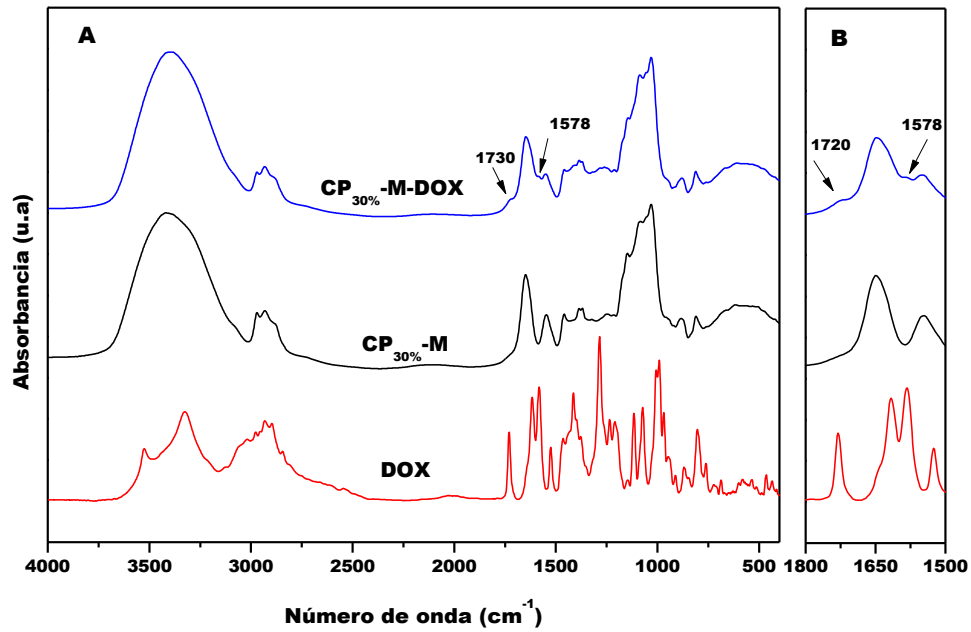
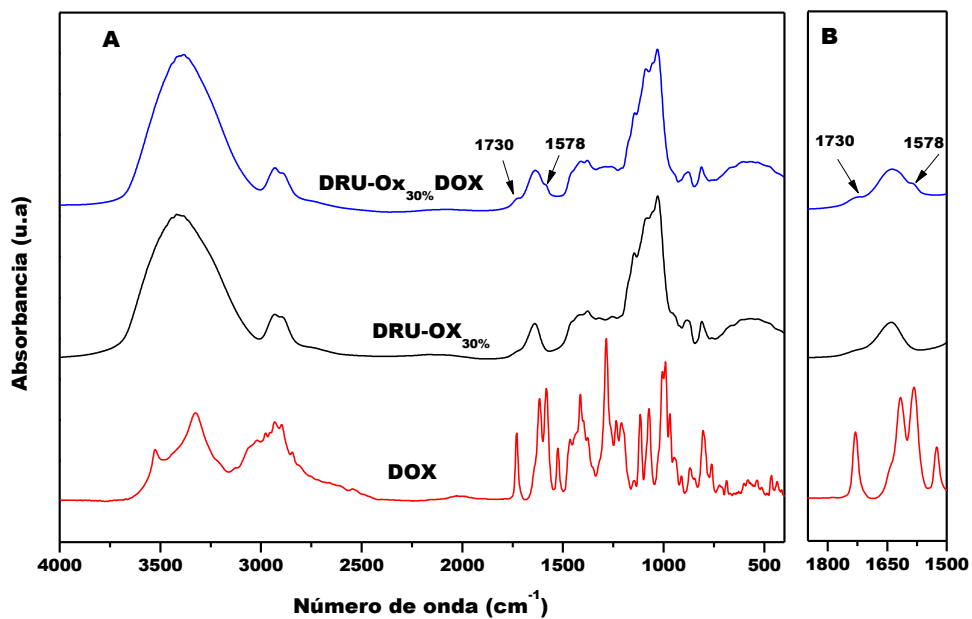
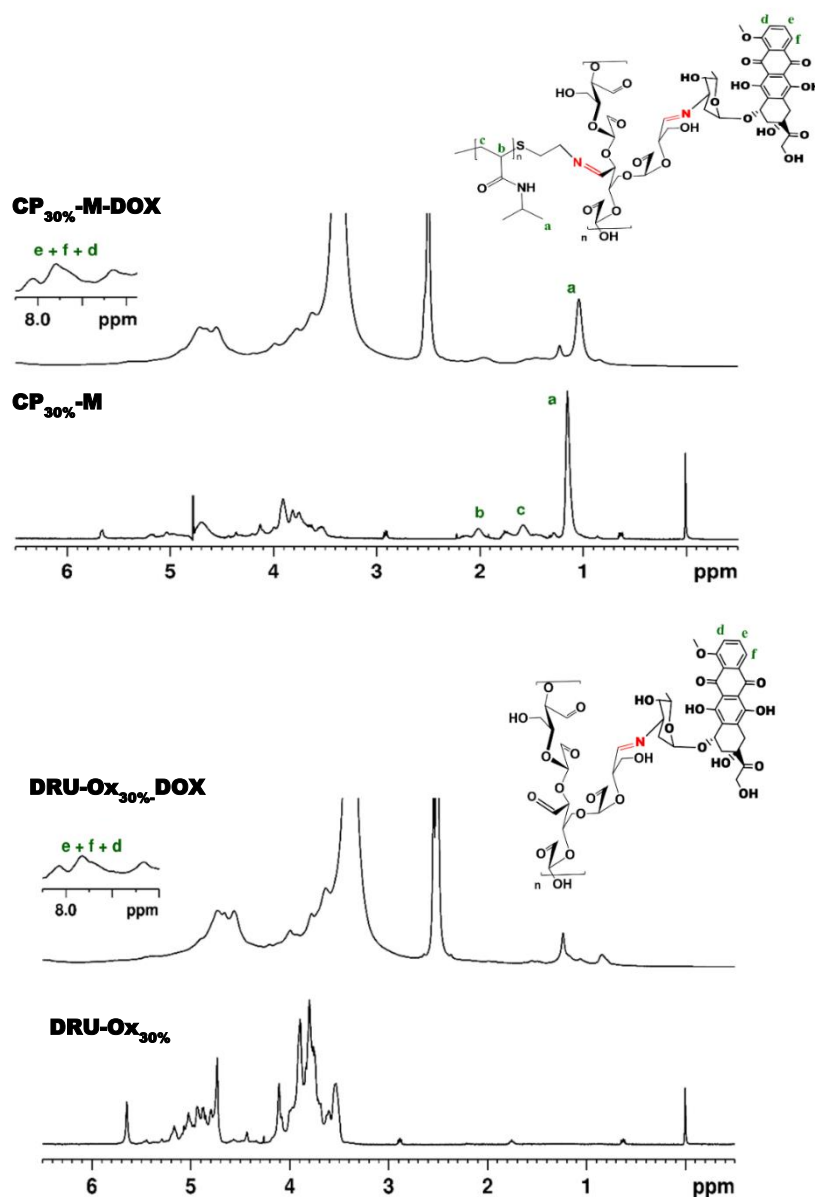


Figura 38 - Espectro na região do infravermelho do pró-fármaco DRU-Ox_{30%}-DOX na região de 4000-400 cm⁻¹ (A) e zoom da região de 1850 a 1500 cm⁻¹ (B)



Nos espectros de RMN ^1H (**Figura 39**) dos pró-fármacos, a inserção da DOX nas cadeias do copolímero e da galactomanana oxidada é confirmada pelo surgimento de novos picos entre 7,5-8,0 ppm, referentes aos hidrogênios do anel aromático (CURCIO et al., 2020).

Figura 39- Espectros de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6 , 25 °C) dos pró-fármacos CP_{30%}-M-DOX e DRU-Ox_{30%}-DOX

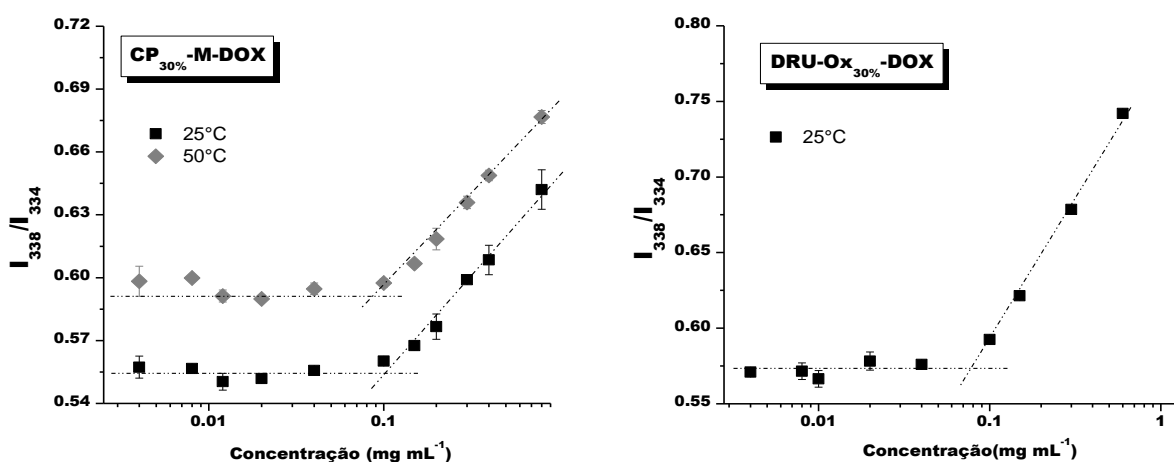


5.5.3 Concentração de agregação crítica (CAC)

A concentração de agregação crítica (CAC) dos pró-fármacos foi determinada utilizando o pireno como sonda fluorescente (**Figura 40**). Para o pró-fármaco DRU-Ox_{30%}-DOX, a análise foi realizada apenas a 25 °C, enquanto a do CP_{30%}-M-DOX, tanto a 25 quanto a 50 °C.

A CAC obtida pela interseção das retas para DRU-Ox_{30%}-DOX foi de 0,077 mg mL⁻¹ (77,0 µg mL⁻¹). Poucos artigos na literatura citam a determinação de CAC para pró-fármaco de polissacarídeos e DOX formados por reação de formação de base de *Schiff*. Yin e colaboradores (2018) determinaram a CAC do pró-fármaco de ácido hialurônico e DOX (HA-DOX), (CFL: 8,67%) pelo mesmo método usado nesse trabalho, e o valor obtido foi similar, 71,45 µg mL⁻¹. Um valor de CAC menor (26,80 µg mL⁻¹) foi obtido por Li e colaboradores (2017) para o pró-fármaco de dextrana e DOX, Dex_{500k}-DOX, (CFL: 9,99%), porém utilizando um método diferente, tensão superficial.

Figura 40 - Razão das intensidades (I_{338}/I_{334}) do espectro de excitação do pireno em função da concentração dos pró-fármacos CP_{30%}-M-DOX e DRU-Ox_{30%}-DOX a 25 e 50 °C.



O pró-fármaco CP_{30%}-M-DOX, assim como o copolímero utilizado para sua síntese, apresentou CAC a 25°C (0,115 mg mL⁻¹) e 50 °C (0,086 mg/mL⁻¹), porém menor (CP_{30%}-M - 0,158 mg mL⁻¹ (25 °C) e 0,115 mg mL⁻¹ (50 °C)). A conjugação da DOX nos grupos aldeídos remanescentes aumentou o caráter hidrofóbico do material, proporcionando a agregação do pró-fármaco em uma concentração menor. Os valores de CAC dos conjugados foram próximos, sugerindo que o balanço entre as porções hidrofílica/hidrofóbica é semelhante.

5.5.4 Caracterização das nanopartículas

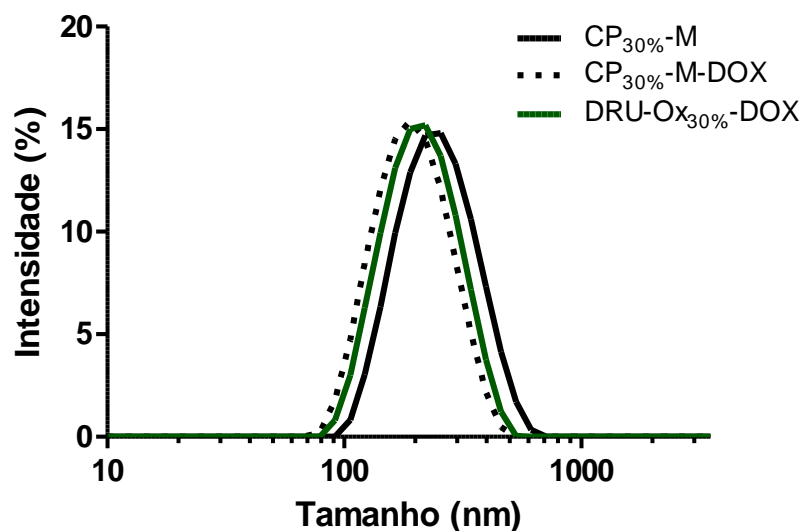
5.5.4.1 Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e Microscopia de força atômica (MFA)

Uma das características dos pró-fármaco é sua capacidade de formar nanopartículas em meio aquoso. O diâmetro médio das nanopartículas formadas pelos pró-fármacos, CP_{30%}-M-DOX e DRU-Ox_{30%}-DOX, foi analisado por DLS (**Figura 41**).

Apesar do CP_{30%}-M já formar nanopartículas a 37 °C devido à característica termoresponsiva adquirida pelo enxerto de PNIPAm, pode-se observar mudanças no diâmetro médio após a inserção da DOX. Ocorreu uma redução do diâmetro das nanopartículas de 236 ± 3 do copolímero (CP_{30%}-M) para 180 ± 3 nm no pró-fármaco (CP_{30%}-M-DOX). O aumento da porção hidrofóbica, devido à inserção da DOX, pode ter levado a uma maior contração do núcleo, e conseqüentemente, à uma diminuição do diâmetro.

As nanopartículas formadas apenas pela galactomanana oxidada e a DOX também se auto-organizam em meio aquoso, porém com diâmetro um pouco maior, $191 \pm 0,9$ nm.

Figura 41 – Distribuição de tamanhos por DLS dos pró-fármacos CP_{30%}-M-DOX e DRU-Ox_{30%}-DOX a 37 °C



Sagnella e colaboradores (2014) obtiveram pró-fármaco de dextrana e doxorrubicina formado por reação de formação de base de *Schiff* com CFL de 4,5% m/m, com tamanho muito maior (300 ± 50 nm) que o obtido para o CP_{30%}-M-DOX que apresenta CFL similar. Yin e colaboradores (2018) obtiveram nanopartículas com diâmetro de $188,4 \pm 3,2$ nm

para pró-fármaco formado de ácido hialurônico e doxorrubicina sintetizado por reação de formação de base de *Schiff* com $8,67 \pm 0,98$ % (m/m) de CFL. Ao comparar com os pró-fármacos sintetizados nesse trabalho foi possível obter tamanho similar, apesar de possuírem valores de CFL menores. Nanopartículas menores ($164 \pm 2,6$ nm) foram obtidas por Gao e colaboradores (2017) para pró-fármaco de alginato com doxorrubicina, porém com um conteúdo de fármaco ligado três vezes maior que o obtido nesse trabalho ($21,14 \pm 2,64$ % (m/m)).

A morfologia e distribuição de tamanho das nanopartículas do CP_{30%}-M e dos pró-fármacos, CP_{30%}-M-DOX e DRU-Ox_{30%}-DOX, foram analisadas por MFA (**Figura 42**).

Todos as nanopartículas apresentaram morfologia esférica com diâmetros médios de $45,6 \pm 16,4$, $43,3 \pm 18,1$ e $23,3 \pm 11,3$ nm para CP_{30%}-M, CP_{30%}-M-DOX e DRU- Ox_{30%}-DOX, respectivamente (**Figura 42A, D e G**). Os tamanhos são menores que os obtidos por DLS. A análise do tamanho por DLS é uma medida indireta, pois as dimensões das nanopartículas são medidas a partir do espalhamento de luz produzido pelo raio hidrodinâmico dessas nanopartículas, onde a camada de solvatação influencia no valor do tamanho das partículas. Enquanto por MFA a análise foi realizada com a amostra seca, não tendo a influência da camada de solvatação, sendo assim uma análise direta (OLIVEIRA *et al*, 2021).

A **Figura 42** apresenta os gráficos de fase para o CP_{30%}-M, CP_{30%}-M-DOX e DRU-Ox_{30%}-DOX (**B, E e H**, respectivamente). Devido ao tamanho da cadeia do PNIPAm- NH₂-M e da massa molecular da DOX, não foi possível visualizar uma estrutura núcleo-coroa como aconteceu com o copolímero CP-A, formado com cadeias laterais maiores.

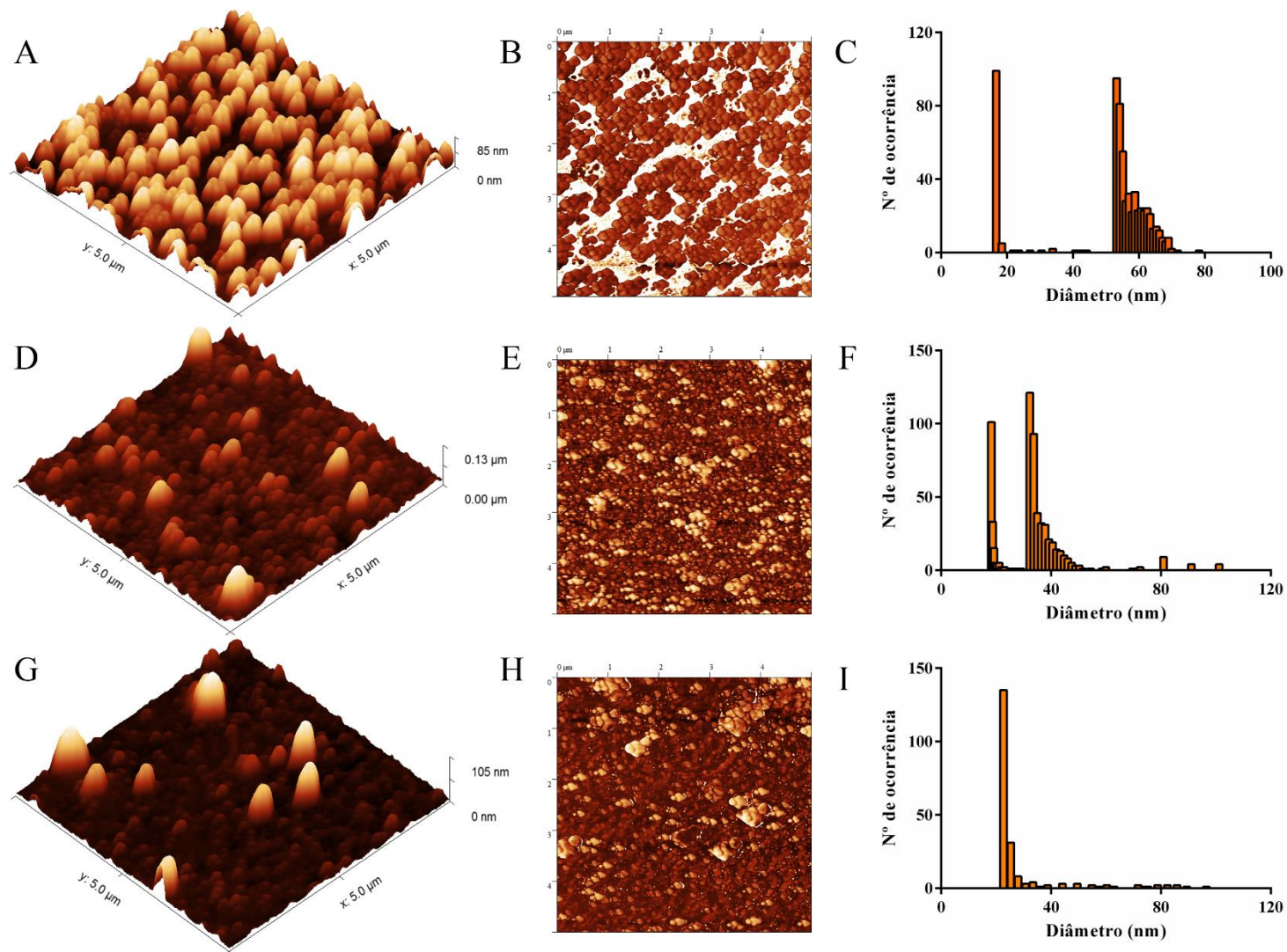


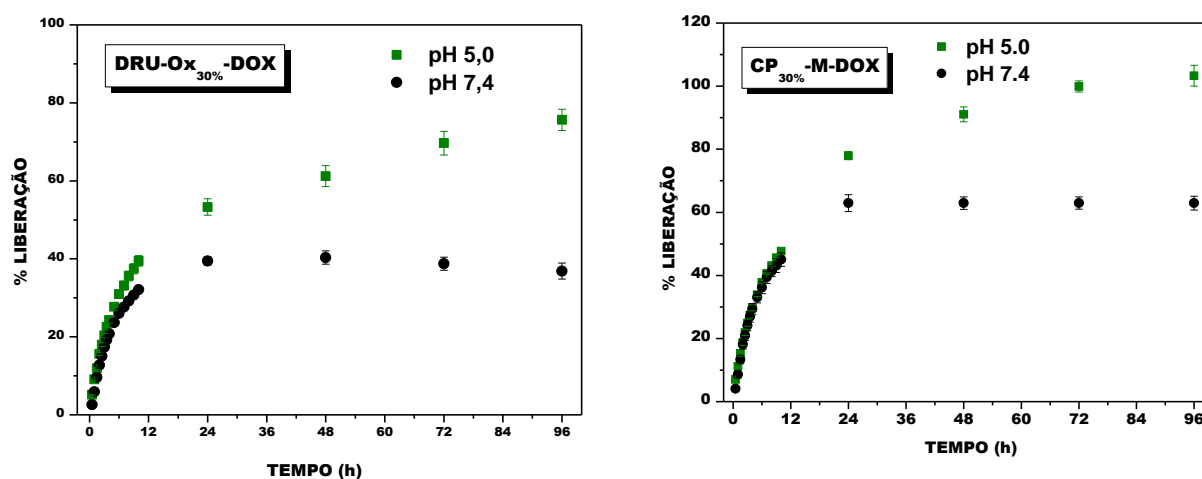
Figura 42 - MFA das amostras: CP_{30%}-M em (A) imagem 3D, (B) imagem 2D – Z-PHASE e gráfico de distribuição por diâmetro de partícula em (C); CP_{30%}-M-DOX em (D) imagem 3D, (E) imagem 2D – Z-PHASE e gráfico de distribuição por diâmetro de partícula em (F); DRU-OX_{30%}-DOX em (G) imagem 3D, (H) imagem 2D – Z-PHASE e gráfico de distribuição por diâmetro de partícula em (I).

A **Figura 42** também mostra a distribuição do diâmetro das nanopartículas do CP_{30%}-M, CP_{30%}-M-DOX e DRU-Ox_{30%}-DOX (C, F e I), respectivamente. O CP_{30%}-M e CP_{30%}-M-DOX apresentaram distribuições bimodais (C e F), sendo que ocorreu uma diminuição do tamanho das nanopartículas com adição da DOX no CP_{30%}-M por reação de formação de base de *Schiff*. Esse comportamento possivelmente ocorreu devido á contração do núcleo, pelo aumento das interações entre os segmentos hidrofóbicos. Já o DRU-Ox_{30%}-DOX apresentou um perfil homogêneo e com partículas menores (I). Pode-se supor que no DRU-Ox_{30%}-DOX o volume hidrodinâmico do núcleo, composto de DOX, é menor que o volume hidrodinâmico no CP_{30%}-M-DOX, pois além da DOX, também tem as cadeias de PNIPAm. Essa é uma justificativa para o menor diâmetro das nanopartículas secas do DRU-Ox_{30%}-DOX.

5.5.4.2 Análise da liberação da DOX *in vitro*

O ensaio de liberação da DOX *in vitro* foi realizado em tampões fosfato (PBS) pH 7,4 e 5,0, a fim de mimetizar condições fisiológicas normais de tecidos/sangue e o microambiente ácido intracelular endo/lisossomal de células tumorais. Conforme representado na **Figura 43**, os pró-fármacos apresentaram um perfil de liberação controlada, indicando uma distribuição homogênea do fármaco na nanopartícula. Outro perfil observado é o pH-responsivo, onde ocorre um aumento significativo da liberação do fármaco com a diminuição do pH.

Figura 43- Perfil de liberação *in vitro* da DOX das nanopartículas dos pró-fármacos CP_{30%}-M-DOX e DRU-Ox_{30%}-DOX em PBS 7,4 e 5,0 a 37 °C



Em pH 7,4, o DRU-Ox_{30%}-DOX liberou menos que 40%, enquanto o CP_{30%}-M-DOX liberou aproximadamente 60%. Essa diferença no percentual de liberação pode estar associada com a carga de fármaco ligado. Li e colaboradores (2016 (a)) realizaram um estudo com pró-fármaco formado por hidroxietilamido e doxorubicina, via reação formação de base de *Schiff*, com diferentes cargas de fármaco. Os resultados da liberação indicaram que o aumento na carga de fármaco levou a uma menor liberação. O pró-fármaco com CFL de 9,9% liberou em pH 7,4 aproximadamente 40%, enquanto o derivado com CFL de 5,5 liberou 60% no mesmo pH. Essa diminuição da liberação do fármaco ocorreu devido a uma maior compactação do núcleo da micela. Uma outra justificativa para a maior liberação do CP_{30%}-M-DOX seria que a DOX pode estar tanto ligada quanto encapsulada.

Quando diminuimos o pH para 5,0, ocorreu um aumento da liberação da DOX dos pró-fármacos para 75% (DRU-Ox_{30%}-DOX) e 100% (CP_{30%}-M-DOX). Esse aumento resulta da rápida hidrólise da ligação imina sob condições ácidas. Um pró-fármaco similar ao CP_{30%}-M-DOX foi sintetizado por Sagnella e colaboradores (2014), formado por dextrana oxidada, polietileno glicol aminado e DOX via reação de formação de base de *Schiff*. O percentual de liberação de DOX para esse pró-fármaco foi menor que a obtida nesse trabalho, aproximadamente 80% em 120 horas.

Com base nos dados da liberação, pode-se concluir que DRU-Ox_{30%}-DOX e CP_{30%}-M-DOX são estáveis em condições fisiológicas normais e altamente eficientes para liberação em microambiente ácido intracelular. Essa característica pH-responsivo dos pró-fármacos aumenta a entrega do fármaco em um ponto alvo, aumentando assim a eficácia terapêutica e reduzindo os efeitos colaterais *in vivo*.

5.5.5 Citotoxicidade *in vitro*

A citotoxicidade dos pró-fármacos e dos materiais de partida, CP_{30%}-M e DRU-Ox_{30%}, foram analisadas frente a células tumorais (B16F10- melanoma e SNB-19-Astrocitoma) e não tumorais (L929- fibroblasto murinho) (**Tabela 14**).

Os percussores dos pró-fármacos, CP_{30%}-M e DRU-Ox_{30%}, não apresentaram atividade citotóxica frente às linhagens testadas até a concentrações de 100 µg mL⁻¹. Os pró-fármacos não demonstraram atividade frente às células não tumorais (L929), porém, apresentaram atividade frente às células cancerígenas estudadas, o que corrobora com os resultados do ensaio de liberação *in vitro* que mostram um maior percentual de liberação de DOX em meio ácido devido à clivagem da base de *Schiff*.

O conjugado DRU-Ox_{30%}-DOX apresentou atividade frente as duas linhagens tumorais estudadas. Nas linhagens, B16F10 e SNB-19, o mesmo exibiu uma atividade melhor que à da DOX livre, com uma IC₅₀ de 0,50 e 1,18 µg mL⁻¹, respectivamente. O CP_{30%}-M-DOX apresentou atividade na linhagem B16F10 com excelente resultado, em que para inibição de 50% das células tumorais foi preciso só 19,23% (IC₅₀ 0,15 µg mL⁻¹) do que é necessário de DOX livre (IC₅₀ 0,78 µg mL⁻¹). Todavia, não apresentou atividade frente a linhagem SNB-19 até a concentração estudada.

Tabela 14 – Avaliação da concentração inibitória média (CI₅₀) das amostras frente as linhagens tumorais e não tumorais

AMOSTRAS	CI ₅₀ µg mL ⁻¹ (Intervalo)		
	SNB-19	B16F10	L929
DRU-Ox_{30%}-DOX	1,18 (0,74-1,86)	0,50 (0,37 – 0,68)	>50
DRU-Ox_{30%}	>100	>100	>100
CP_{30%}-M-DOX	>50	0,15 (0,09 – 0,26)	>50
CP_{30%}-M	>100	>100	>100
Doxorrubicina	1,20 (1,03-1,39)	0,78 (0,66 – 0,92)	0,99 (0,92 - 1,08)

Os conjugados de hidroetilamido-DOX tiveram sua viabilidade celular avaliada na linhagem de célula B16F10 (LI *et al*, 2016(a)). Para o conjugado com carga de fármaco 5,4% a IC₅₀ foi de 0,29 µg mL⁻¹. Esse valor é aproximadamente o dobro do obtido para o CP_{30%}-M-DOX com CFL 5,9%, para a mesma linhagem de célula, ou seja, o CP_{30%}-M-DOX é mais eficiente na inibição dessas células que o pró-fármaco hidroetilamido-DOX. Esses resultados potencializam o uso destas nanopartículas como carreadores de fármacos anticâncer, visto que

é necessária uma menor quantidade de DOX para tratar as células cancerígenas e ainda poderiam minimizar os efeitos colaterais causados pela quimioterapia às células saudáveis.

5.6 Panorama geral dos copolímeros

Os copolímeros CP-A e CP-A_R apresentaram tamanhos de 234 e 274 nm, respectivamente. Com esses tamanhos, essas nanopartículas podem ser candidatas promissoras como carreadoras de fármacos intravenosos (**Tabela 15**). Nanocarreadores para aplicação intravenosa devem apresentar uma faixa de tamanhos variando de 30 a 300 nm para garantir um tempo de circulação prolongado do transportador e ocorrer o acúmulo em tumores através do efeito de permeabilidade e retenção aprimorada (EPR) (FERRARI *et al.*, 2018). As nanopartículas formadas pelo copolímero CP-A_R também podem ser utilizadas em carreadores de fármacos orais, pois as mesmas se mantêm estáveis em meio ácido, podendo assim proteger o princípio ativo na passagem pelo estômago. Muitos autores têm atribuído às nanopartículas poliméricas utilizadas com carreadores de fármacos oral um papel efetivo no aumento da biodisponibilidade do fármaco e na internalização celular (BRAZ *et al.*, 2018).

Os copolímeros CP_{10%}-M, CP_{20%}-M e CP_{30%}-M podem ser utilizados como carreadores de fármacos intravenoso em pH fisiológico, pois as nanopartículas formadas por esses materiais poderiam expelir o fármaco devido a contração do tamanho associada à desidratação progressiva no núcleo. Esses copolímeros, como foi observado nesse trabalho, também podem ser utilizados na formação de pró-fármacos com antitumorais, pois promovem uma liberação direcionada através da hidrólise da ligação imina em baixos pH, como os encontrados nos tecidos tumorais (pH~6,5-4,0).

Todas as nanopartículas desse trabalho podem ser utilizadas em liberação de fármacos intranasal, pois são formadas por um polissacarídeo com propriedades mucoadesivo e com tamanhos capazes de atravessar os poros do muco (380-470 nm) (DAVKAR *et al.*, 2014).

Tabela 15- Panorama geral dos copolímeros e pró-fármacos

COPOLÍMEROS	RENDIMENTO (%)	CAC (mg mL⁻¹) 25°C	CAC (mg mL⁻¹) 50°C	TAMANHO (nm) (37°C)	LCST (°C)
CP-B	52,9±0,5	0,340	0,180		40
CP-A	51,5±0,4	0,055	0,039	234 ± 0,9	34
CP-A_R	49,3±1,0	0,154	0,084	274 ± 5,1	35
CP_{10%}-M	48,1±1,4	0,213	0,154	365 ± 9,0	37
CP_{20%}-M	46,6±1,2	0,204	0,142	261 ± 2,0	36
CP_{30%}-M	43,3±2,1	0,158	0,115	236 ± 3,0	35
CP_{30%}-M-DOX	81,6±0,2	0,115	0,086	180 ± 2,6	-
DRU-O_{x30%}-DOX	94,1±1,8	0,077	-	191 ± 0,9	-

6 CONCLUSÃO

Galactomanana oxidada com diferentes graus (10%, 20% e 30%) com/sem pré-tratamento de ultrassom foram obtidas e caracterizadas. O derivado oxidado sem pré-tratamento com ultrassom (DRO_{x10%}) apresentou o maior rendimento reacional, enquanto nos derivados com pré-tratamento, o rendimento aumentou com o grau de oxidação. Nos derivados DRO_{x10%} e DRU-Ox_{20%} o valor experimental do grau de oxidação é próximo ao valor teórico, porém no DRU-OX_{30%} esse valor é bem menor.

A reação de síntese do PNIPAm-NH₂ por polimerização radicalar com iniciador KPS e agente de transferência de cadeia AET-Cl se mostrou eficaz. O melhor tempo de reação foi seis horas e a variação da quantidade de AET produziu PNIPAm-NH₂ com massas molares diferentes.

Copolímeros foram sintetizados a partir da enxertia de PNIPAm-NH₂ (A e B) na DRO_{x10%} por reação de formação de base de *Schiff*. Todos apresentaram CAC a 25 e 50 °C, termossensibilidade e LCST entre 34-40°C. O tamanho das cadeias de PNIPAm-NH₂ e a reação de redução foram fatores determinante no tamanho das nanopartículas formadas. A morfologia obtida por MFA mostrou nanopartículas esféricas e com tamanho bem menores que os obtidos pelo DLS. A estudo em pH 2,0 das nanopartículas formadas pelos copolímeros CP-A e CP-A_R confirmou que os mesmos são formados por reação de formação de base de *Schiff*. No ensaio de viabilidade celular *in vitro*, os copolímeros e seus materiais de partida não apresentaram citotoxicidade frente a células renais (HEK 293T).

Os copolímeros formados por enxertia de PNIPAm-NH₂-M nas cadeias das galactomananas com diferentes graus de oxidação (CP_{10%}-M, CP_{20%}-M e CP_{30%}-M) apresentaram CAC a 25 e 50°C, termossensibilidade e LCST entre 35-37°C. O tamanho das nanopartículas sofreu influência da massa molar da galactomanana oxidada e do percentual de NIPAm. Todos os copolímeros apresentaram resposta ao pH, onde em pH 5,0 ocorreu aumento do tamanho das nanopartículas, enquanto em pH 7,4 ocorreu uma diminuição.

A rota de síntese escolhida para a enxertia de PNIPAm-NH₂ em galactomanana se mostrou eficaz, sendo um método simples, rápido e sem a necessidade da utilização de solventes orgânicos.

Os pró-fármacos (CP_{30%}-M-DOX e DRU-Ox_{30%}-DOX) sintetizados por reação de formação de base de *Schiff* entre a DOX e os aldeídos remanescentes do copolímero CP_{30%}-M e da galactomanana oxidada (DRU-Ox_{30%}) apresentaram tamanhos de nanopartículas dependentes dos segmentos hidrofóbicos, sendo que CP_{30%}-M-DOX apresentou o menor

tamanho. Os pró-fármacos apresentaram perfil de liberação pH-responsivo, em que ocorreu um aumento significativo do percentual de fármaco liberado com a diminuição do pH. Os pró-fármacos mostraram-se eficientes para a tratamento de células tumorais (B16F10- melanoma e SNB-19-Astrocitoma) sem afetar as células normais (L929- fibroblasto murinho).

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 Polymer**, v. 154, p.77-85, 2016.
- ADETOGUN, G. E.; ALEBIOWU, G. Properties of Delonix regia seed gum as a novel tablet binder. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 66, p. 433–438, 2009.
- ALAM, M. M.; JACK, K. S.; HILL, D. J. T.; WHITTAKER, A. K.; PENG, H. Gradient copolymers- Preparation, properties and practice. **European Polymer Journal**, v. 115, p. 394-414, 2019.
- ALSUBAIE, F.; LIAROU, E.; NIKOLAOU, V.; WILSON, P., HADDLETON, D. M. Thermoresponsive viscosity of polyacrylamide block copolymers synthesised via aqueous Cu-RDRP. **European Polymer Journal**, v. 114, p. 326-331, 2019.
- ALMEIDA, H.; AMARAL, M. H.; LOBÃO, P. Temperature and pH stimuli-responsive polymers and their applications in controlled and selfregulated drug delivery. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 2, n. 6, p. 01–10, 2012.
- ANASTASE-RAVION, S.; DING, Z.; PELLÉ, A.; HOFFMAN, S. A.; LETOURMEUR, D. New antibody purification procedure using a thermally responsive poly(*N*-isopropylacrylamide)–dextran derivative conjugate. **Journal of Chromatography B**, v. 761, p. 247–254, 2001.
- ANTONY, R.; ARUN, T.; MANICKAM, S. T. D. A review on applications of chitosan-based *Schiff* base. **International journal of biological macromolecules**, v. 129, p. 615-633, 2019.
- AMER, H.; NYPELÖ, T.; SULAEVA, I.; BACHER, M.; HENNIGES, U.; POTTHAST, A.; ROSENAU, T. Synthesis and characterixation of periodate-oxidized polysaccharides: Dialdehyde Xylan (DAX). **Biomacromolecules**, v. 17, p. 2972-2980, 2016.
- ARRUDA, F. S.; TOMÉ, F. D.; MIGUEL, M. P.; MENEZES, L. B.; NAGIB, P. R. A.; CAMPOS, E. C.; SOAVE, D. F.; CELES, M. R. N. Doxorubicin-induced Cardiotoxicity and Cardioprotective Agents: Classic and New Players in the Game. **Current Pharmaceutical Design**, v. 25, p. 109–118, 2019.
- ATANASE, I. L.; DESBRIERES, J.; RIESS, G. Micellization of synthetic and polysaccharides-based graft copolymers in aqueous media. **Progress in Polymer Science**, v. 73, p. 32-60, 2017.
- BANKS, S. R.; ENCK, K.; WRIGHT, M.; OPARA, E. C.; WELKER, M. E. Chemical Modification of Alginate for Controlled Oral Drug Delivery. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 37, p. 10481–10488, 2019.
- BAM, P.; BHATTA, A.; KRISHNAMOORTHY, G. Design of biostable scaffold based on collagen crosslinked by dialdehyde chitosan with presence of gallic acid. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 130, p. 836–844, 2019.

- BAO, H., LI, L.; GAN, H. L.; PING, Y., LI, J.; RAVI, P. Thermo- and pH-Responsive Association Behavior of Dual Hydrophilic Graft Chitosan Terpolymer Synthesized via ATRP and Click Chemistry. **Macromolecules**, v. 43, p. 5679-5687, 2010.
- BETANCUR-ANCONA, D.; PACHECO-AGUIRRE, J.; CASTELLANOS-RUELAS, A.; CHEL-GUERRERO, L. Microencapsulation of papain using carboxymethylated flamboyant (*Delonix regia*) seed gum. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 12, p. 67–72, 2011.
- BLANCO-FERNANDEZ, B.; CONCHEIRO, A.; MAKWANA, H.; TRILLO-FERNANDEZ, F.; ALEXANDER, C.; ALVAREZ-LORENZO, C. Dually sensitive dextran-based micelles for methotrexate delivery. **RSC Advances**, v. 7, p. 14448–14460, 2017.
- BRADY, N. G.; QIAN, S.; BRUCE, B. D. Analysis of styrene maleic acid alternating copolymer supramolecular assemblies in solution by small angle X-ray scattering. **European Polymer Journal**, v. 111, p. 178–184, 2019.
- BRAZ, L.; GRENHA, A.; CORVO, M.C.; LOURENÇO, J. P.; FERREIRA, D.; SARMENTO, B.; DA COSTA, A. M. R. Synthesis and characterization of Locust Bean Gum derivatives and their application in the production of nanoparticles. **Carbohydrate Polymer**, v. 181 p. 973-985, 2018.
- BORDALLO, E.; RIEUMONT, J.; TIERA, M. J.; GÓMEZ, M.; LAZZARI, M. Self-assembly in aqueous solution of amphiphilic graft copolymers from oxidized carboxymethylcellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 124, p. 43–49, 2015.
- BOYER, C.; LOUBAT, C.; ROBIN, J. J.; BOUTEVIN, B. Synthesis of functionalized amide oligomers by free-radical telomerization of methyl methacrylate with a peculiar telogen: 2 aminoethanethiol hydrochloride. **Journal of polymer Science: Polymer Chemistry**, v.42, p.5146-5160, 2004.
- BOKIAS, G.; MYLONAS, Y.; STAIKOS, G.; BUMBU, G. G.; VASILE, C. Synthesis and aqueous solution properties of novel thermoresponsive graft copolymers based on a carboxymethylcellulose backbone. **Macromolecules**, v. 34, p. 4958–4964, 2001.
- BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, H. P.; TINÉ, M. A. S. Mobilisation of storage cellwall polysaccharides in seeds. **Plant. Physiology and biochemistry**, v. 38, p. 141-156, 2000.
- BUI, R.; BROOK, M. A. Dynamic covalent *Schiff*-base silicone polymers and elastomers. **Polymer**, v. 160, p. 282-290, 2019.
- BURITI, F. C. A.; SANTOS, K. M. O.; SOMBRA, V. G.; MARCIEL, J. S.; TEIXEIRA, D. M.A.; SALLES, H.O.; OLIVEIRA, G.; DE PAULA, R. C.M.; FEITOSA, J. P.A.; MONTEIRO MOREIRA, A. C.O.; MOREIRA, R.A.; EGITO, A.S. (2014). Characterisation of partially hydrolysed galactomannan from *Caesalpinia pulcherrima* seeds as a potential dietary fibre. **Food hydrocolloids**, v. 35, p. 512-521.
- CAI, X.; YANG, Q.; WENG, Q.; WANG, S. pH sensitive doxorubicin-loaded nanoparticle based on *Radix pseudostellariae* protein-polysaccharide conjugate and its improvement on HepG2 cellular uptake of doxorubicin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 136, p. 111099, 2020.

CERQUEIRA, M. A.; SOUZA, B. W. S.; SIMÕES, J.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, M. R. M.; COIMBRA, M. A.; VICENTE, A. A. Structural and thermal characterization of galactomannans from non-conventional sources. **Carbohydrate Polymer**, v.83, p. 179-185, 2011.

CHEABURU-YILMAZ, C. N. On the development of: Chitosan-graft-poly(N-isopropylacrylamide) by raft polymerization technique. **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 54, p. 1–10, 2020.

CHEIRMADURAI, K.; THANIKAIVELAN, P.; MURALI, R. Highly biocompatible collagen-Delonix regia seed polysaccharide hybrid scaffolds for antimicrobial wound dressing. **Carbohydrate Polymers**, v. 137, p. 584–593, 2016.

CHEMIN, M., RAKOTOVELO, A.; HAM-PICHAVANT, F.; CHOLLET, G.; PEREZ, D. S.; PETIL-CONIL, M.; CRAMAIL, H.; GRELIER, S. Periodate oxidation of 4-O-methylglucuronoxylans: Influence of the reaction conditions. **Carbohydrate polymer**, v. 142, p. 45-50, 2016.

CHEN, C.; LIU, M.; GAO, C.; LÜ, 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 Polymer**, v. 92, p. 621-628, 2013.

CHEN, H.; SHARMA, S. K.; SHARMA, P. R.; YEH, H.; JOHSON, K.; HSIAO, B. S. Arsenic(III) Removal by Nanostructured Dialdehyde Cellulose-Cysteine Microscale and Nanoscale Fibers. **ACS Omega**, v. 4, p. 22008–22020, 2019.

CHUANG, C. Y.; DON, T. M.; CHIU, W. Y. Preparation of environmental-responsive chitosan-based nanoparticles by self-assembly method. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 765–769, 2011.

CHUMACHENKO, V.; KUTSEVOL, N.; HARAHUTS, Y.; RAWISO, M.; MARININ, A.; BULAVIN, L. Star-like dextran-g-graft-pnlpam copolymers. Effect of internal molecular structure on the phase transition. **Journal of molecular liquids**, v.235, p.77-82, 2017.

COELHO, G. O.; BATISTA, M. J. A.; ÁVILA, A. F.; FRANCA, A. S.; OLIVEIRA, L. S. Development and characterization of biopolymeric films of galactomannans recovered from spent coffee grounds. **Journal of Food Engineering**, v. 289, p.110083, 2020.

COLLINS, J.; XIAO, Z.; MÜLLNER, M.; CONNALL, L. A. The emergence of oxime click chemistry and its utility in polymer science. **Polymer Chemistry**, v. 7, p. 3812–3826, 2016.

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.

CURCIO, M.; CIRILLO, G.; PAOLÌ, A.; NAIMO, G. D.; MAURO, L.; AMANTEA, D.; LEGGIO, A.; NICOLETTA, F. P.; LEMMA, F. Self-assembling Dextran prodrug for redox- and pH-responsive co-delivery of therapeutics in cancer cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 185, p. 110537, 2020.

DEVKAR, T. B.; TEKADE, A. R.; KHANDELWAL, K. R. Surface engineered nanostructured lipid carries for efficient nose to brain delivery of ondansetron HCl using

- Delonix regia gum as a natural mucoadhesive polymer. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 122, p. 1443-150, 2014.
- DING, W.; WU, Y. Sustainable dialdehyde polysaccharides as versatile building blocks for fabricating functional materials: An overview. **Carbohydrate Polymers**, v. 248, p. 116801, 2020.
- DOBERENZ, F.; ZENG, K.; WILLEMS, C.; ZHANG, K.; GROTH, T. Thermoresponsive polymers and their biomedical application in tissue engineering-A review. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 8, p. 607–628, 2020.
- DONG, F.; LI, S. Wound dressings based on chitosan-dialdehyde cellulose nanocrystals-silver nanoparticles: Mechanical strength, antibacterial activity and cytotoxicity. **Polymers**, v. 10, 2018.
- DOMINGUES, R.M.; SILVA, M.; GERSHOVICH, P.; BETTA, S.; BABO, P.; CARIDADE, S. G.; MANO, J. F.; MOTTA, A.; REIS, R.L.; GOMES, M.E. Development of injectable hyaluronic acid/cellulose nanocrystals bionanocomposite hydrogels for tissue engineering applications. **Bioconjugate Chemistry**, v. 26, p. 1571-1581, 2015.
- DURAND, A., HOURDET, D. Synthesis and thermoassociative properties in aqueous solution of graft copolymers containing poly(N-isopropylacrylamide) side chains. **Polymer**, v. 40, p.4941-4951, 1999.
- FARBER, S., ICKOWICZ, D., SIONOV, E., KAGAN, S., POLACHECH, I., DOMB, A. J. Galactomannan-amphotericin B conjugate: synthesis and biological activity. **Polymer advanced technologies**, v.22, p. 119-125, 2010.
- FERREIRA, C. R. N.; RAMOS, E. L. DE L.; ARAUJO, L. F. S.; et al. Synthesis and characterization of scaffolds produced under mild conditions based on oxidized cashew gums and carboxyethyl chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 176, p. 26–36, 2021
- FERRARI, R.; SPONCHIONI, M.; MORBIDELLI, M.; MOSCATELLI, D. Polymer nanoparticles for the intravenous delivery of anticancer drugs: The checkpoints on the road from the synthesis to clinical translation. **Nanoscale**, v. 10, p. 22701–22719, 2018.
- FENG, X., LI, D., HAN, J., DING, J. Schiff base bond-linked polysaccharide-doxorubicin conjugate for upregulated cancer therapy. **Materials Science and Engineering C**, v.76 p.1121-1128, 2017.
- FIGUEIRÓ, S. D., GÓES, J. C., MOREIRA, R. A., SOMBRA, A. S. B. On the physico-chemical and dielectric properties of glutaraldehyde crosslinked galactomannan- collagen films. **Carbohydrate polymer**, v. 56, p. 313-320, 2004.
- GARCIA-VALDEZ, O., CHAMPAGNE, P., CUNNINGHAM, M. F. Graft modification of natural polysaccharides via reversible deactivation radical polymerization. **Progress in polymer science**, v.76, p. 151-173, 2018.
- GAO, C., TANG, F., GONG, G., ZHANG, J., HOI, M. P.M., LEE, S. M. Y., WANG, R. pH-responsive prodrug nanoparticles based on a sodium alginate derivative for selective co-release of doxorubicin and curcumin into tumor cells. **Nanoscale**, v. 9, p. 12533-12542, 2017.

- GAWEŁ, K.; KAREWICZ, A.; BIELSKA, D.; SZCZUBIALKA, K.; RYSAK, K.; BONAREK, P.; NOWAKOWSKA, M.. A thermosensitive carrageenan-based polymer: Synthesis, characterization and interactions with a cationic surfactant. **Carbohydrate Polymers**, v. 96, p. 211–217, 2013.
- GE, L.; LI, X.; ZHANG, R.; YANG, T.; YE, X.; LI, D.; MU, C.. Development and characterization of dialdehyde xanthan gum crosslinked gelatin based edible films incorporated with amino-functionalized montmorillonite. **Food Hydrocolloids**, v. 51, p. 129–135, 2015.
- GE, Z.; CAI, Y.; YIN, J.; ZHU, Z.; RAO, J.; LIU, S. Synthesis and “Schizophrenic” Micellization os double Hydrophilic AB₄ mikroarm star and AB diblock copolymers: Struture and kinetics of micellization. **Langmuir**, v. 23, p. 1114-1122, 2007.
- GONZATTI, G., AYADI, F., CAVALIE, S., CARRÈRE, N., TOURRETTE, A. Thermosensitive PNIPAM grafted alginate/chitosan PEC. **Applied surface science**, v. 467-468 p. 940-948, 2019.
- GOMES, R. F.; LIMA, L. R. M.; FEITOSA, J. P. A.; PAULA, H. C. B.; DE PAULA, R. C. M. Influence of galactomannan molar mass on particle size galactomannan-grafted-poly-N-isopropylacrylamide copolymers. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 156, p. 446–453, 2020
- GÓMEZ-MASCARAQUE, L. G.; MÉNDEZ, J. A., FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, M., VÁZQUEZ, B., ROMÁN, J. S. Oxidized dextrans as alternative crosslinking agents for polysaccharides: Application to hydrogels of agarose–chitosan. **Acta Biomaterialia**, v. 10, p.798–811, 2014.
- GUO, J., GE, L., LI, X., MU, C., LI, D. Periodate oxidation of xanthan gum and its crosslinking effects on gelatin-based edible films. **Food hydrocolloids**, v.39, p. 243-250, 2014.
- 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.
- HESKINS, M.; GUILLET, J. E. Solution Properties of Poly(N-isopropylacrylamide), **Journal of Macromolecular Science: Part A – Chemistry**,v. 2, p.1441-1455, 1968.
- HUANG, J., TURNER, TURNER, S. R. Recent advances in alternating copolymers: The synthesis, modification and application of precision polymers. **Polymer**, v. 116, p. 572-586, 2017.
- ISIKLAN, N., KÜÇÜKBALCI, G. Microwave-induced synthesis of alginate-graft-poly(N-isopropylacrylamide) and drug release properties of dual pH- and temperature-responsive beads. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 82, p.316-331, 2012.
- JUNDI, A. E.; BUWALDA, S. J.; BAKKOUR, Y.; GARRIC, X.; NOTTELET, B. Double hydrophilic block copolymers self-assemblies in biomedical applications. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 283, p. 102213, 2020.

- KANO, M.; KOKUFUTA, E. On the temperature-responsive polymers and gels based on N-propylacrylamides and N-propylmethacrylamides. **Langmuir**, v. 25, n. 15, p. 8649–8655, 2009.
- KAMETANI, S., SEKEI, S., OHKUBO, T., HIRANO, T., UTE, K., CHENG, H. N., ASAKURA, T. NMR studies of water dynamics during sol-to-gel transition of poly(N-isopropylacrylamide) in concentrated aqueous solution. **Polymer**, v.109, p.287-296, 2017.
- KAPOOR, V. P. A galactomannan from the seeds of *Delonix regia*. **Phytochemistry**, v. 11, p. 1129-1132, 1972.
- KESHK, S. M. A. S.; EL-ZAHHAR, A. A.; HAIJA, M. A.; BONDOCK, S. Synthesis of a Magnetic Nanoparticles/Dialdehyde Starch-Based Composite Film for Food Packaging. **Starch/Staerke**, v. 71, p. 1–7, 2019.
- KESHK, S. M. A. S., RAMADAN, A. M., AL-SEHEMI, A. G., IRFAN, A., BONDOCK, S. An unexpected reactivity during periodate oxidation of chitosan and the affinity os its 2, 3-dialdehyde toward sulfa drugs. **Carbohydrate Polymer**, v. 175, p.565-574, 2017.
- KHANLARI, T.; BAYAT, Y.; BAYAT, M.; SHEIBANI, N. Synthesis, characterization, and curing of propylene oxide and glycidyl nitrate random copolymer (GN-ran-PO) and investigation of its compatibility with different energetic plasticizers. **Journal of Molecular Structure**, v. 1231, p. 130008, 2021.
- KHIMANI, M., YUSA, S-I., ASWAL, V. K., BAHADUR, P. Aggregation behavior of double hydrophilic block copolymer in aqueous media. **Journal of molecular liquids**, v.276, p. 47-56, 2019.
- KHOLIYA, F.; CHAUDHARY, J. P.; VADODARIYA, N.; MEENA, R. Synthesis of bio-based aldehyde from seaweed polysaccharide and its interaction with bovine serum albumin. **Carbohydrate Polymers**, v. 150, p. 278–285, 2016.
- KODIRALIEVA, F. A.; RAKHMANBERDYEVA, R. K.; SHEVCHENKO, L. I.; SHADYBEKOVA, O. B. Structure and Biological Activity of Galactomannans from Seed Pods of Two Crotalaria Species. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 56, p. 849–853, 2020.
- KONG, M.; PENG, X.; CUI, H.; et al. PH-responsive polymeric nanoparticles with tunable sizes for targeted drug delivery. **RSC Advances**, v. 10, p. 4860–4868, 2020.
- KRASZNAI, J. D., MCKENNA, F. L. T., CUNNINGHAM, F. M., CHAMPAGNE, P., SMEETS, M. B. N. Polysaccharide-stabilized core cross-linked polymer micelle analogues. **Polymer Chemistry**, v. 3, p. 992, 2012.
- KRISHNARAJ, K.; CHANDRASEKAR, M. J. N.; NANJAN, M. J.; MURALIDHARAN, S.; MANIKANDAN, D. Development of sustained release antipsychotic tablets using novel polysaccharide isolated from *Delonix regia* seeds and its pharmacokinetic studies. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 20, n. 3, p. 239–248, 2012.
- KRISTIANSEN, K. A., POTTHAST, A., CHRISTENSEN, B. E. Periodate oxidation of polysaccharides for modification of chemical and physical properties. **Carbohydrate research**, v. 345, p.1264-1271, 2010.

- KUMAR, V., ADAMSON, D. H., PRUD'HOMME, R. K. Fluorescent polymeric nanoparticles: Aggregation and phase behavior of pyrene and amphotericin B molecules in nanoparticles cores. **Small**, v.24, p.2907-2914, 2010
- LAI, J. Y., HSIEH, A. C. A gelatin-g-poly(N-isopropylacrylamide) biodegradable in situ gelling delivery system for the intracameral administration of pilocarpine. **Biomaterials**, v. 33, p. 2372–2387, 2012.
- LAI, J-Y., LUO, L-J. Chitosan-g-poly(N-isopropylacrylamide) copolymers as delivery carriers for intracameral pilocarpine administration. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 113, p.140-148, 2017.
- LEAL, D., BORGGRAEVE, W., ENCINAS, M. V., MATSUHIRO, B., MÜLLER, R. Preparação and characterization of hydrogels based on homopolymeric fractions of sodium alginate and PNIPAAm. **Carbohydrate Polymer**, v. 92, p. 157-166, 2013.
- LENCINA, S. M. M.; IATRIDI, Z.; VILLAR, M. A.; TSITSILIANIS, C. Thermoresponsive hydrogels from alginate-based graft copolymers. **European Polymer Journal**, v. 61, p. 33–44, 2014.
- LI, D.; HAN, J.; DING, J.; CHEN, L.; CHEN, X. Acid-sensitive dextran prodrug: A higher molecular weight makes a better efficacy. **Carbohydrate Polymers**, v. 161, p. 33–41, 2017.
- LI, D., DING, J., ZHUANG, X., CHEN, L. CHEN, X. Drug binding rate regulates the properties of polysaccharide prodrugs. **Journal Materials Chemistry B**, v.4, p. 5167-5177, 2016 (a).
- LI, D.; FENG, X.; CHEN, L.; DING, J.; CHEN, X. One-Step Synthesis of Targeted Acid-Labile Polysaccharide Prodrug for Efficiently Intracellular Drug Delivery. **ACS Biomaterials Science and Engineering**, v. 4, p. 539–546, 2018.
- 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.
- LIU, M.; WEN, Y.; SONG, X.; ZHU, J. L.; LI, J. A smart thermoresponsive adsorption system for efficient copper ion removal based on alginate-g-poly(N-isopropylacrylamide) graft copolymer. **Carbohydrate Polymers**, v. 219, p. 280–289, 2019
- LIMA, E. L.; VASCONCELOS, N. F.; MACIEL, J. S.; ANDRADE, F. K.; VIEIRA, R. S.. 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, 2020.
- LIYANAGE, S.; ABIDI, N.; AULD, D.; MOUSSA, H. Chemical and physical characterization of galactomannan extracted from guar cultivars (*Cyamopsis tetragonolobus* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 388–396, 2015.
- LOPACHIN, R. M., GAVIN, T. Molecular mechanisms of aldehyde toxicity: a chemical perspective. **Chemical Research in Toxicology**, v.27, p. 1081-1091, 2014.
- LUO, Y.; YU, W.; XU, F.; ZHANG, L. Novel Thermo-Responsive Self-Assembly Micelles from a Double Brush-Shaped PNIPAM- g - (PA- b -PEG- b -PA) - g -PNIPAM Block

Copolymer with PNIPAM Polymers as Side Chains. **Polymer Chemistry**, v.50, p. 2053–2067, 2012.

LÜ, S., LIU, M., NI, B. Degradable, injectable poly(N-isopropylacrylamide)-based hydrogels with low gelation concentrations for protein delivery application. **Chemical Engineering Journal**, v.173, p.241-250, 2011.

LV, W., LIU, S., FENG, W., QI, J., ZHANG, G., ZHANG, F., & FAN, X. Temperature- and redox-directed multiple self-assembly of poly(N-isopropylacrylamide) grafted dextran nanogels. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 32, p.1101–1107, 2011.

MACIEL, J. S.; AZEVEDO, S.; CORREIA, C. R.; et al. Oxidized Cashew Gum Scaffolds for Tissue Engineering. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 304, p. 1–11, 2019.

MADRAS, G., MCCOY, B. J. Molecular-weight distribution kinetics for ultrasonic reactions of polymers. **AIChE Journal**, v.47, p. 2341-2348, 2001.

MELLATI, A.; FAN, C. M.; TAMAYOL, A.; ANNABI, N.; DAI, S.; BI, J.; JIN, B.; XIAN, C.; KHADEMHOSEINI, A.; ZHANG, H.. Microengineered 3D cell-laden thermoresponsive hydrogels for mimicking cell morphology and orientation in cartilage tissue engineering. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 114, n. 1, p. 217–231, 2017.

MELLATI, A., KIAMAHALLEH, M. V., DAI, S., BI, J., JIN, B., ZHANG, H. Influence of polymer molecular weight on the in vitro cytotoxicity of poly (N-isopropylacrylamide). **Materials Science and Engineering C**, v. 59, p. 509-513, 2016.

MICHAILOVA, V. I.; MOMEKOVA, D. B.; VELICHKOVA, H. A.; IVANOV, E. H., KOTSILKOVA, R. K., KARASHANOVA, D. B., MILEVA, E. D., DIMITROV., I. V., RANGELOV, S. M. Self-Assembly of a Thermally Responsive Double-Hydrophilic Copolymer in Ethanol-Water Mixtures: The Effect of Preferential Adsorption and Co-Nonsolvency. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 122, p. 6072–6078, 2018..

MONTEIRO, Laís Ramos. **Síntese e caracterização de nanopartículas termossensíveis de galactomanana de Delonix regia enxertada com n-isopropilacrilamida**. 2016. 75f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

MOULIN, E., CORMOSW, G., GIUSEPPONE, N. Dynamic combinatorial chemistry as a tool for the design of functional materials and devices. **Chem. Soc. Rev.**, v.41, p.1031–1049, 2012.

MU, C., GUO, J., LI, X., LIN, W., LI, D. Preparation and properties of dialdehyde carboxymethyl cellulose crosslinked gelatin edible films. **Food hydrocolloids**, v. 27, p. 22-29, 2012.

NAGASE, K.; OKANO, T.; KANAZAWA, H. Poly(N-isopropylacrylamide) based thermoresponsive polymer brushes for bioseparation, cellular tissue fabrication, and nano actuators. **Nano-Structures and Nano-Objects**, v. 16, p. 9–23, 2018.

NASCIMENTO, F. G. S.; BRINGEL, P. H. S. F.; MAIA, F. W. S.; LIMA, C. P. C.; ALVES, R. C.; FEITOSA, J. P. A.; MOTA, M. R. L.; ASSREUY, A. M. S.; CASTRO, R. R.. Galactomannan of Delonix regia seeds reduces nociception and morphological damage in the rat model of osteoarthritis induced by sodium monoiodoacetate. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, 2020.

- NOREEN, A.; ZIA, K. M.; TABASUM, S.; KHALID, S.; SHAREEF, R. A review on grafting of hydroxyethylcellulose for versatile applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 150, p. 289–303, 2020.
- NTOUKAM, D. H. S.; MUTLU, H.; THEATO, P. Post-polymerization modification of Poly(vinylcyclopropanes): A potential route to periodic copolymers. **European Polymer Journal**, v. 122, 2020.
- NWOKOCHA, L. M., WILLIAMS, P. A., YADAV, M. P. Physicochemical characterization of the galactomannan from *Delonix regia* seed. **Food Hydrocolloids**, v.78, p.132-139, 2018.
- OGUNJIMI, A. T.; MELO, S. M. G.; VARGAS-RECHIA, C. G.; EMERY, F. S.; LOPEZ, R. F. V. Hydrophilic polymeric nanoparticles prepared from Delonix galactomannan with low cytotoxicity for ocular drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 1065–1075, 2017.
- OLIVEIRA, A. C. DE J.; CHAVES, L. L.; RIBEIRO, F. DE O. S.; et al. Microwave-initiated rapid synthesis of phthalated cashew gum for drug delivery systems. **Carbohydrate Polymers**, v. 254, p.117226, 2021
- OKOYE, E. I.; EDOCHIE, C.; ADEGBEMI, J. O. Preliminary Evaluation of Delonix regia Seed Gum as a Suspending Agent in a Liquid Oral Dosage Form. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**, v. 6, p. 114–119, 2014.
- OLSON, R. A.; KORPUSIK, A. B.; SUMERLIN, B. S. Enlightening advances in polymer bioconjugate chemistry: light-based techniques for grafting to and from biomacromolecules. **Chemical Science**, v. 11, p. 5142-5156, 2020.
- PANG, B.; ZHANG, H.; SCHILLING, M.; LUI, H.; WANG, X.; REHFELDT, F.; ZHANG, K. High-Internal-Phase Pickering Emulsions Stabilized by Polymeric Dialdehyde Cellulose-Based Nanoparticles. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 8, p. 7371–7379, 2020.
- 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, n. 10, p. 2779–2787, 2009.
- PILIPENKO, I. M.; KORZHIKOV-VLAKH, V. A.; ZAKHAROVA, N. V.; URTTI, A.; TENNIKOVA, T. B. Thermo- and pH-sensitive glycosaminoglycans derivatives obtained by controlled grafting of poly(N-isopropylacrylamide). **Carbohydrate Polymers**, v. 248, p. 116764, 2020.
- PONZINI, E., NATALELLO, A., USAI, F., BECHAMANN, M., PERI, F., MÜLLER, N., GRANDORI, R. Structural characterization of aerogels derived from enzymatically oxidized galactomannans of fenugreek, sesbania and guar gums, **Carbohydrate polymer**, v. 207, p. 510-520, 2019.
- PU, Y., ZOU, Q., HOU, D., ZHANG, Y., CHEN, S. Molecular weight kinetic and chain scission models for dextran polymers during ultrasonic degradation. **Carbohydrate polymer**, v. 156, p. 71-76, 2017.
- RAVICHANDRAN, V., JAYAKRISHNAN, A. Synthesis and evaluation of anti-fungal activities of sodium alginate-amphotericin B conjugates. **International Journal of biological macromolecules**, v. 108, p.1101-1109, 2018.

RINGS DORF, H. Structure and properties of pharmacologically active polymers. **Journal of Polymer Science: Polymer Symposia**, v. 51, p. 135-153, 1975.

RODRIGUEZ-CANTO, W., CHEL-GUERRERO, L., FERNANDEZ, V. V. A., AGUILAR-VEGAS, M. Delonix regia galactomannan hydrolysates: Rheological behavior and physicochemical characterization. **Carbohydrate Polymer**, v.206, p. 573-582, 2019.

RODRIGUEZ-CANTO, W.; CERQUEIRA, M. A.; CHEL-GUERRERO, L.; PASTRANA, L. M.; AGUILAR-VEGA, M. Delonix regia galactomannan-based edible films: Effect of molecular weight and k-carrageenan on physicochemical properties. **Food Hydrocolloids**, v. 103, p. 105632, 2020.

SAGNELLA, S. M., DUONG, H., MacMILLAN, A., BOYER, C., WHAN, R., McCARROLL, J. A., DAVIS, T. P., KAVALLARIS, M. Dextran-based doxorubicin nanocarriers with improved tumor penetration. **Biomacromolecules**, v.15, p. 262-275, 2014.

SCHILD, H. G.; TIRRELL, D. A. Microcalorimetric detection of lower critical solution temperatures in aqueous polymer solutions. **Journal of Physical Chemistry®**, v. 94, n. 10, p. 4352–4356, 1990.

SEELBACH, R. J.; D'ESTE, M.; ALINI, M.; MATA, A.; EGLIN, D. Copper catalyst efficiency for the CuAAC synthesis of a poly(N-isopropylacrylamide) conjugated hyaluronan. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v. 60, p. 25–37, 2015.

SEIDI, F.; SALIMI, H.; SHAMSABADI, A. A.; SHABANIAN, M. Synthesis of hybrid materials using graft copolymerization on non-cellulosic polysaccharides via homogenous ATRP. **Progress in Polymer Science**, v. 78, p. 1-39, 2018.

SHARMA, P.; SHARMA, S.; RAMAKRISHNA, G.; SRIVASTAVA, H.; GAIKWAD, K. A comprehensive review on leguminous galactomannans: structural analysis, functional properties, biosynthesis process and industrial applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 0, p. 1–23, 2020.

SHAVANDI, A., ALI, M.A. Graft polymerization onto wool fibre for improved functionality. **Progress in organic coatings**, v. 130, p. 182-199, 2019.

SIQUEIRA, N. M., PAIVA, B., CAMASSOLA, M., ROSENTHAL-KIM, E. Q., GARCIA, K. C., DOS SANTOS, F. P., SOARES, R. M. D. Gelatin and galactomannan-based scaffolds: characterization and potential for tissue engineering applications. **Carbohydrate Polymer**, v.133, p. 8-18, 2015.

SILVA, L. M.; ARAÚJO, L. F. S.; ALVEZ, R. C.; ONO, L.; SÁ, D. A. T.; CUNHA, P. L. R.; DE PAULA, R. C. M.; MACIEL, J. S. Promising alternative gum : Extraction , characterization , and oxidation of the galactomannan of Cassia fistula. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 165, p. 436–444, 2020.

SOKOLSKY-PAPKOV, M., DOMB, A. J., GOLENSER, L. Impact of aldehyde content on amphotericin B-dextran imine conjugate toxicity. **Biomacromolecules**, v.7, p. 1529-1535, 2006.

SONG, K.; QIAN, X.; LI, X.; ZHAO, Y.; YU, Z. Fabrication of a novel functional CNC cross-linked and reinforced adsorbent from feather biomass for efficient metal removal. **Carbohydrate Polymers**, v. 222, p. 115016, 2019.

SOUZA, C. A. G.; SIQUEIRA, S. M. C.; AMORIM, A. F. V.; MORAIS, S. M.; GONÇALVES, T.; GOME, R.N.; CUNHA, A.P.; RICARDO, N. M. O. S. Encapsulação do ácido l-ascórbico no biopolímero natural galactomanana por spray-drying: preparação, caracterização e atividade antioxidante. **QUÍMICA NOVA**, v. 38, n. 7, p. 877–883, 2015.

SUN, M., LI, Y., WANG, T., SUN, Y., XU, X., ZHANG, Z. Isolation, fine structure and morphology studies of galactomannan from endosperm of *Gleditsis japonica var. delavayi*. **Carbohydrate Polymer**, v.184, p. 127-134, 2018.

SU, H., JIA, Q., SHAN, S. Synthesis and characterization of *Schiff* base contained dextran microgels in water-in-oil inverse microemulsion. **Carbohydrate polymer**, v. 152, p.156-162, 2016.

STUCKI, M.; STÖCKLI, M.; STARK, W. J. Thermoresponsive Microspheres as Smart Pore Plugs: Self-Venting Clothing Membranes for Smart Outdoor Textiles. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 303, p. 1–8, 2018.

TAN, R.; SHE, Z.; WANG, M.; FANG, Z.; LIU, Y.; FEAG, Q. Thermo-sensitive alginate-based injectable hydrogel for tissue engineering. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 1515–1521, 2012

TANG, L.; WANG, L.; YANG, X.; FENG, Y.; LI, Y.; FEAG, W. Poly(N-isopropylacrylamide)-based smart hydrogels: Design, properties and applications. **Progress in Materials Science**, v. 115, 2021.

TAMAKI, Y.; TERUYA, T.; TAKO, M. The chemical structure of galactomannan isolated from seeds of *Delonix regia*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 75, n. 5, p.90935-1-3, 2010.

TU, L-Y., WANG, C-C., CHEN, Y-C. Preparation of shell crosslinked nanoencapsulate for drug carriers by using poly(N-isopropyl acrylamide)-co-poly(L-lysine) grafted copolymer. **Journal of Polymer Research**, v. 25, p.134, 2018.

VARELA-LÓPEZ, A.; BATTINO, M.; NAVARRO-HORTAL, M. D.; GIAMPIERI, F.; FORBES-HERNÁNDEZ, T. Y.; ROMERO-MÁRQUEZ, J. M.; COLLADO, R.; QUILES, J. L. An update on the mechanisms related to cell death and toxicity of doxorubicin and the protective role of nutrients. **Food and Chemical Toxicology**, v. 134, p. 110834, 2019.

VASILE, C., NITA, E. L. Novel multi-stimuli responsive sodium alginate-grafted-poly(N-isopropylacrylamide) copolymers: II. Dilute solution properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p.77-84, 2011.

WANG, D., PENG, Z., LIU, X., TONG, Z., WANG, C., REN, B. Synthesis and micelle formation of triblock copolymers of poly(methyl methacrylate)-*b*-poly(ethylene oxide)-*b*-poly(methyl methacrylate) in aqueous solution. **European Polymer Journal**, v.43 p. 2799-2808, 2007.

WANG, Y., ZHU, P., LI, G., ZHU, S., LIU, K., LIU, Y., HE, J. Amphiphilic carboxylated cellulose-g-poly(L-lactide) copolymer nanoparticles for oleanolic acid delivery. **Carbohydrate Polymer**, v. 214, p. 100-109, 2019.

- WANG, Q., TANG, H., WU, P. Aqueous Solutions of Poly(ethylene oxide)-Poly (N-isopropylacrylamide): Thermosensitive Behavior and Distinct Multiple Assembly Processes. **Langmuir**, v. 31, p.6497-6506, 2015.
- WEI, H.; CHENG, S. X.; ZHANG, X. Z.; ZHUO, R. X. Thermo-sensitive polymeric micelles based on poly(N-isopropylacrylamide) as drug carriers. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 34, p. 893–910, 2009.
- XU, W., DING, J., XIAO, C., ZHUANG, X., CHEN, X. Versatile preparation of intracellular-acidity-sensitive oxime-linked polysaccharide-doxorubicin conjugate for malignancy therapeutic. **Biomaterials**, v. 54 p. 72-86, 2017.
- XU, W.; LIU, Y.; ZHANG, F.; LEI, F.; WANG, K.; JIANG, J Physicochemical characterization of Gleditsia triacanthos galactomannan during deposition and maturation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 144, p. 821–828, 2020
- YADAV, H.; MAITI, S. Reserch progress in galactomannan-based nanomaterials: Synthesis and application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 163, p. 2113-2126, 2020.
- YANG, F.; XU, J.; FU, M.; JI, J.; CHI, L.; ZHAI, G. Development of stimuli-responsive intelligent polymer micelles for the delivery of doxorubicin. **Journal of Drug Targeting**, v. 28, p. 993–1011, 2020.
- YANG, L., ZHANG, J., HE, J., ZHANG, J., GAN, Z. Synthesis characterization of temperature-sensitive cellulose-graft-poly(N-isopropylacrylamide) copolymers. **Chinese journal of polymer science**, v. 12, p.1640-1649, 2015.
- 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 solution. **Journal of applied polymer science**, p. 4280-4287, 2013.
- YANG, X., BAKAIC, E., HOARE, T., CRANSTON, E. D. Injectable polysaccharide hydrogels reinforced with cellulose nanocrystals: morphology, rheology, degradation, and cytotoxicity. **Biomacromolecules**, v. 14, p. 4447-4455, 2013.
- YAN, S., WANG, T., FENG, L., ZHU, J.M., ZHANG, K., CHEN, X., CUI, L., YIN, J. Injectable in situ self-cross-linking hydrogels based on poly(L-glutamic acid) and alginate for cartilage tissue engineering. **Biomacromolecules**, v. 15, p.4495-4508, 2014.
- YAO, R. S.; LIU, L.; DENG, S. S.; XU, J. J. Synthesis and characterization of PEGylated carboxymethylchitosan nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, p. 809–816, 2011.
- YIN, T., WANG, Y., CHU, X., FU, Y., WANG, L., ZHOU, J., TANG, X., LIU, J., HUO, M. Free Adriamycin-loaded pH/reduction dual-responsive hyaluronic acid-adriamycin prodrug micelles for efficient cancer therapy. **Applied Materials & Interfaces**, v. 10, p. 35693-35704, 2018.
- ZHANG, X., LI, D., HUANG, J., OU, K., YAN, B., SHI, F., ZHANG, J., ZHANG, J., PANG, J., KANG, Y., WU, J. Screening of Ph-responsive long-circulating polysaccharide-drug conjugate nanocarriers for antitumor applications. **Journal Materials Chemistry B**, v. 7, p. 251-264, 2019.

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.65 p. 346-364.

ZHAO, H., HEINDEL, N. D. Determination of degree of substitution of formyl groups in polyaldehyde dextran by the hydroxylamine hydrochloride method. **Pharmaceutical Research**, v.8, p. 400-402, 1991.

ZHOU, Z; LI, G; WANG, N; GUO, F; GUO, L; LIU, X. Synthesis of temperature/pH dual-sensitive supramolecular micelles from B-cyclodextrin-poly(N-isopropylacrylamide) star polymer for drug delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.172, p.136-142, 2018.