



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

Desenvolvimento de Novos Materiais à base de Goma do
Cajueiro (*Anacardium Occidentale*): Derivados e Microesferas
com Gelatina

Érico de Moura Neto

Orientadora: Dra Jeanny da Silva Maciel

Co-Orientadora: Dra Regina Célia Monteiro de Paula

Julho 2008



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

Desenvolvimento de Novos Materiais à base de Goma do
Cajueiro (*Anacardium Occidentale*): Derivados e Microesferas
com Gelatina

Érico de Moura Neto

Dissertação submetida à coordenação
do programa de Pós-graduação em
Química Inorgânica, como requisito
parcial para obtenção do grau de
Mestre.

Julho 2008

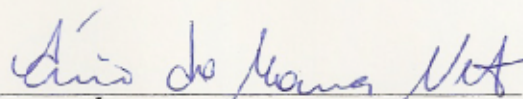
M884d Moura Neto, Érico de
Desenvolvimento de novos materiais à base de goma do cajueiro
(*Anacardium occidentale*): derivados e microsferas com gelatina / Érico de
Moura Neto, 2008.
92 f. ; il. color. enc.

Orientadora: Profa. Dra. Jeanny da Silva Maciel
Co-orientadora: Profa. Dra. Regina Célia Monteiro de Paula
Área de concentração: Química Inorgânica
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de
Ciências. Depto. de Química Orgânica e Inorgânica, Fortaleza, 2008.

1. Polissacarídeo 2. Sulfatação 3. Oxidação 4. Géis I. Maciel, Jeanny
da Silva (orient.) II. Paula, Regina Célia Monteiro de (co-orient.) III.
Universidade Federal do Ceará – Programa de Pós-Graduação em Química
Orgânica e Inorgânica IV. Título

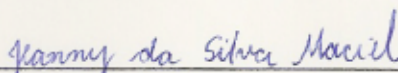
CDD 546

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

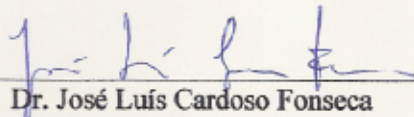


Érico de Moura Neto

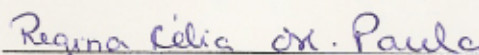
Dissertação aprovada em: 11/07/2008



Dra. Jeanny da Silva Maciel
(Orientadora - UFC)



Dr. José Luís Cardoso Fonseca
(UFRN)



Dra. Regina Célia Monteiro de Paula
(UFC)

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

Karl Marx

AGRADECIMENTOS

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

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

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

Ao Campos por me trazer a Fortaleza e propiciar momentos eternos.

A minha orientadora Jeanny da Silva Maciel por todos os momentos de orientação e dedicação que proporcionaram a realização deste trabalho.

A professora Regina de Paula pelo empurrão e discussões responsáveis pelo término do trabalho.

A professora Judith Feitosa por todas as contribuições tão fundamentais para a construção deste trabalho.

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

A Aleksandra e ao Frank pela ajuda na oxidação da goma do cajueiro e a Marília pelos MEV's tão cuidadosamente obtidos.

Ao professor Luiz Gonzaga de França Lopes, coordenador do programa de pós-graduação em Química Inorgânica da UFC pela competência e prestatividade com a qual desempenha seu cargo.

A funcionária Tereza pelas análises termogravimétricas e ao secretário da coordenação da pós-graduação em Química Inorgânica, Orlando, por ambos sempre estarem disposto a ajudar.

Ao CENAURENM pelos espectros de ressonância magnética nuclear.

À CAPES pela bolsa concedida, à FUNCAP e ao CNPQ pelo auxílio financeiro ao projeto “Desenvolvimento de microesferas de géis tipo semi-IPN e HPN de gelatina/goma do cajueiro para aplicação em sistema de liberação de fármacos.

RESUMO

Gelatina é uma proteína obtida por desnaturação do colágeno que tem gerado grande interesse na preparação de materiais para uso biomédico devido às propriedades como, biocompatibilidade e bioadesividade. No entanto, devido a solubilidade de microesferas de gelatina em meio aquoso, a interação com outros polímeros e reticulação tem sido proposta para melhorar suas propriedades físico-químicas. A goma do cajueiro foi modificada por reação de sulfatação (GCS) e oxidação (GCX), e os derivados foram utilizados no desenvolvimento de microesferas por interação com gelatina. Os derivados da goma foram caracterizados por espectroscopia na região do infravermelho, ressonância magnética nuclear, análise elementar, cromatografia de permeação em gel, viscosidade intrínseca e análise termogravimétrica. As reações foram eficientes na modificação, resultando grau de substituição de 0,02 a 0,88 para a goma sulfatada, e relação de 10:3 e 10:4 de unidades glicosídicas/unidades oxidadas. Análises de RMN ^{13}C DEPT indicam sulfatação em C-6 da galactose. Os espectros de RMN ^1H das GCX's mostraram sinal de aldeído em 8,3 ppm. As microesferas foram preparadas pelo método de emulsão óleo/água e caracterizadas por MEV, RMN ^1H e IV. Essas técnicas mostraram a presença dos dois polímeros nas esferas. Microesferas de GEGC reticuladas com genipina por 24 e 72 h (RGEGC) foram caracterizadas quanto a capacidade de intumescimento. O aumento da concentração de GC nas esferas de RGEGC e o tempo de reticulação (24 e 72h) diminuem a capacidade de intumescimento. Para as esferas de GECX, o aumento da oxidação da goma (GCX) de 10:3 para 10:4 diminui em até 12,3% a capacidade de intumescimento, o que indica maior grau de reticulação, via formação da base de Schiff, entre gelatina e GCX (10:4). As microesferas de GEGCS mostraram maior capacidade de intumescimento em relação a todos os sistemas estudados neste trabalho.

ABSTRACT

Gelatin is a protein obtained from denaturation of collagen that has been used in the preparation of biomedical materials due to its biocompatibility and bioadhesive properties. However due to gelatin solubility in aqueous solution, the interaction of gelatin with other polymers and also its cross-linking have been carried out in order to improve the gelatin physico-chemical properties. Cashew gum was modified by sulfation (CGS) and oxidation (CGX) reactions. The derivatives were characterized by infrared (IR) and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, elemental analysis and gel permeation chromatography (GPC). The degree of substitution for sulfation reaction range from 0.02 to 0.88 and the oxidation reaction produced two samples of 10:3 and 10:4 (number of anhydrogalactose units per number of oxidized units). The ^{13}C DEPT NMR experiment shows that the sulfation occurs at C-6 of galactose. ^1H -NMR spectra of CGX samples shows aldehyde proton at 8.3 ppm. Cashew gum and its derivatives were used on the preparation of microsphere with gelatin by oil/water emulsion method. Microspheres were characterized by IR, NMR and thermogravimetric analysis (TGA). That method shows modifications that indicates the presence of both polymers on the microspheres. Microspheres with cashew gum unmodified (GECG) and crosslinked with genipin for 24 and 72 h (RGECCG) were characterized in terms of the swelling behavior. The increase of CG content and crosslinking time decrease the swelling behavior in water of RGECCG sample. For microspheres of gelatin and oxidated cashew gum (GECGX), the increase of oxidation from 10:3 to 10:4 decrease the swelling ratio in 12.3% indicating an increase in crosslinking density by Schiff base formation between gelatin and CGX sample (10:4). Microsphere with sulfated cashew gum (GECGS) shows the highest swelling ratio among all systems investigated.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados experimentais da reação de oxidação da goma do cajueiro.....	25
Tabela 2. Dados experimentais da reação de sulfatação da goma do cajueiro.....	27
Tabela 3. Dados experimentais da preparação das esferas de GE e GEGC	28
Tabela 4. Dados experimentais da preparação das esferas de GEGCX.....	29
Tabela 5. Dados experimentais da preparação das esferas de GEGCS.....	29
Tabela 6. Atribuições das absorções no espectro na região do infravermelho.....	33
Tabela 7. Efeito da quantidade de matéria de periodato na porcentagem de oxidação da goma do cajueiro.	34
Tabela 8. Parâmetros obtidos do TGA para a GC e derivados oxidados em atmosfera de ar sintético.....	38
Tabela 9. Comparação entre as condições da sulfatação e as características dos derivados de polissacarídeos obtidos.....	40
Tabela 10. Efeito da concentração do ácido monoclorosulfônico na reação de sulfatação da goma do cajueiro.....	41
Tabela 11. Parâmetros obtidos do TGA para a GC e derivados sulfatados em atmosfera de ar sintético.....	49
Tabela 12. Parâmetros obtidos do TGA em atmosfera de ar sintético para as esferas.....	52
Tabela 13. Dados experimentais da reticulação para as esferas de GE e GEGC em 24 horas.....	54
Tabela 14. Dados experimentais da reticulação para as esferas de GE e GEGC em 72 horas.....	54
Tabela 15. Parâmetros obtidos do TGA em atmosfera de ar sintético para as esferas reticuladas por 24 e 72 horas.	56
Tabela 16. Dados experimentais da cinética de intumescimento das esferas reticuladas.	58
Tabela 17. Parâmetros obtidos do TGA em atmosfera de ar sintético para as esferas GEGCX's.	61
Tabela 18. Dados experimentais da cinética de intumescimento em água das esferas GEGCX's.	62

Tabela 19. Parâmetros obtidos do TGA em atmosfera de ar sintético para as esferas.....	64
Tabela 20. Dados experimentais da cinética de intumescimento em água para as esferas na proporção 10:1 de GEGC reticulada com genipina, GEGCX e GEGCS.	65

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura dos principais aminoácidos da gelatina e típica estrutura da gelatina -Ala-Gly-Pro-Arg-Gly-Glu-Hyp-Gly-Pro-.5
- Figura 2.** Estrutura do colágeno: a) Estrutura secundária do colágeno orientada à esquerda. b) modelo espaço-cheio da hélice mostrada em (a). c) Estrutura terciária do colágeno formada pelo enrolamento de três hélices em uma torção orientada à direita. d) A super-hélice (estrutura quaternária) de três elementos do colágeno mostrada a partir de uma de suas extremidades, em uma representação bola-bastão Os resíduos de Gly estão mostrados em vermelho. A Gly, devido ao seu pequeno tamanho, é necessária nas junções apertadas onde as três cadeias estão em contato [Lehninger, Nelson, Cox (2000)]......6
- Figura 3.** Estrutura de uma torção β ou curvatura β . a) Note a ligação de hidrogênio entre os grupos peptídicos do primeiro e do quarto resíduos envolvidos na volta. b) Os isômeros cis e trans de uma ligação peptídica envolvendo o nitrogênio imino da prolina [Lehninger, Nelson, Cox (2000)].7
- Figura 4.** (A) Unidades monossacarídicas da composição da goma do cajueiro do nordeste. (B) Representação da estrutura do polissacarídeo extraído do exudato do cajueiro. (R = ramnose, arabinose ou ácido glucurônico) [Cunha e col. (2007)]. 10
- Figura 5.** Sulfatação de polissacarídeo com ácido metaclorosulfônico em piridina [Mahner, Lechner, e Nordmeier (2001)]...... 12
- Figura 6.** Seletividade da reação de periodato de sódio com unidades de açúcar substituídos em diferentes posições [Aspinall (1982)] 14
- Figura 7.** Esquema da reação seletiva de oxidação de uma unidade de glucose da cadeia lateral de um polissacarídeo [Maeda e col. (2001)]...... 15
- Figura 8.** Estrutura química: A - do geniposídeo, onde Glu é glucose e B - da genipina [Butler, Ng e Pudney (2003)] 17
- Figura 9.** Mecanismo da reação de reticulação entre grupo amina e genipina: a) esquema reacional 1 e b) esquema reacional 2 [Butler, Ng e Pudney (2003)]. 18
- Figura 10.** Formação da rede tridimensional do hidrogel com o processo de intumescimento [Rudzinski e col. (2002)]. 19
- Figura 11.** Esquema ilustrativo de estruturas de géis reticulados tipo (A) Polímero reticulado com um agente reticulante de baixa massa molar; (B) Hidrogel do tipo HPN; (C) Hidrogel do tipo IPN e (D) Hidrogel do tipo PEC [Bae e Kim (1993)]. ...20
- Figura 12.** Esquema ilustrativo da reação de um polissacarídeo aldeído funcionalizado com gelatina [Fang, Takahashi e Nishinari (2005)]. A linha em zig-zag representa a cadeia principal do polissacarídeo oxidado ou da gelatina.21

Figura 13. Eletroforese em gel de poliacrilamida. Linha 1 padrões e linha 2 amostra.....	32
Figura 14. Espectro na região do infravermelho da gelatina.	33
Figura 15. Espectro de RMN ^1H a 70°C em D_2O	35
Figura 16. Espectro de RMN ^{13}C a 70°C em D_2O	36
Figura 17. Formação de um hemiacetal intra-residual [Bruneel e Schacht (1993)].	36
Figura 18. Cromatograma de GPC para soluções aquosas 0,1% m/v da Goma do Cajueiro (GC) e dos derivados oxidados (GCX).	37
Figura 19. Curva de TGA e DTG para a GC e derivados oxidados em atmosfera de ar sintético	38
Figura 20. Espectro na região do infravermelho para GC e derivados sulfatados...	43
Figura 21. Espectro de RMN ^{13}C a 70°C em D_2O	44
Figura 22. Espectro de RMN ^{13}C - DEPT 135 a 70°C em D_2O	45
Figura 23. Cromatograma de GPC para soluções aquosas 0,1% m/v da Goma do Cajueiro (GC) e dos derivados sulfatados (GCS).	46
Figura 24. Gráfico de viscosidade em função da taxa de cisalhamento para soluções aquosas 2,0% m/v de GC e derivados sulfatados.	47
Figura 25. Curvas de TGA e DTG para a GC e derivados sulfatados em atmosfera de ar sintético.	48
Figura 26. Espectro na região do infravermelho para esferas de GEGC's.....	50
Figura 27. Espectro de RMN ^1H a 70°C em D_2O	51
Figura 28. Curva de TGA e DTG para as esferas GEGC's em atmosfera de ar sintético.....	52
Figura 29. Microscopia eletrônica de varredura das microesferas: a, b - GE; c, d - GEGC1:1.	53
Figura 30. Espectro na região do infravermelho para as esferas GEGC10:1 antes e após a reticulação de 24 e 72 horas com genipina.....	55
Figura 31. Curva de TGA e DTG para as esferas GEGC's reticuladas com genipina em atmosfera de ar sintético: a) por 24 horas e b) 72 horas.	56

Figura 32. Cinética de intumescimento em água para as esferas GEGC's reticuladas com genipina: a) por 24 horas e b) por 72 horas.	57
Figura 33. Espectro na região do infravermelho para as amostra de gelatina, goma do cajueiro oxidada (GCX) e da esfera gelatina/goma do cajueiro oxidada.	59
Figura 34. Espectro de RMN ¹ H a 70°C em D ₂ O.....	60
Figura 35. Curva de TGA e DTG para as esferas GEGCX's em atmosfera de ar sintético.....	60
Figura 36. Microscopia eletrônica de varredura das microesferas GEGCX1: a,b; GE: c; GEGC1:1: d.	61
Figura 37. Curvas da cinética de intumescimento em água para as esferas GEGCX's.	62
Figura 38. Espectro na região do infravermelho para a esfera GEGCS.....	63
Figura 39. Curva de TGA e DTG para as esferas GEGCS em atmosfera de ar sintético.....	64
Figura 40. Curvas da cinética de intumescimento em água para as esferas GEGCS.	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABS:** absorvância
- AE:** análise elementar
- Ala:** alanina
- Arg:** arginina
- BSA:** albumina do soro bovino
- CPE:** complexo polieletrólítico
- Da:** Dalton
- DEPT:** *distortionless enhancement by polarization transfer*
- DMF:** dimetilformamida
- DTG:** 1ª derivada da curva de termogravimetria
- EMBRAPA:** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- gal:** galactose
- GC:** goma do cajueiro
- GCS:** goma do cajueiro sulfatada
- GCX:** goma do cajueiro oxidada
- GE:** esferas de gelatina
- GEGC:** esferas de gelatina e goma do cajueiro
- GEGCS:** esfera de gelatina e goma do cajueiro sulfatada
- GEGCX:** esfera de gelatina e goma do cajueiro oxidada
- glu:** ácido glucurônico
- Glu:** glutamato
- GLU:** glucose
- Gly:** glicina
- GPC:** cromatografia de permeação em gel (*gel permeation chromatography*)
- GS:** grau de sulfatação
- ha:** hectare
- HPN:** redes poliméricas híbridas (*hybrid polymeric networks*)
- Hyp:** hidroxiprolina
- IPN:** redes poliméricas interpenetradas (*interpenetrating polymeric networks*)
- IV:** infravermelho
- m₀:** massa da esfera seca

MEV: microscopia eletrônica de varredura

m_u : massa da esfera intumescida

M_w : massa molar ponderal média

ppm: partes por milhão

Pro: prolina

R'GE: esfera de gelatina reticulada com genipina por 72 horas

R'GEGC: esfera de gelatina e goma do cajueiro reticulada com genipina por 72 horas

RGE: esfera de gelatina reticulada com genipina por 24 horas

RGEGC: esfera de gelatina e goma do cajueiro reticulada com genipina por 24 horas

RMN: ressonância magnética nuclear

SDS: dodecilsulfato de sódio

TEMPO: N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpipiridina

TG: termogravimetria

UFC: Universidade Federal do Ceará

UV-VIS: ultravioleta-visível

V_e : volume de eluição

W: quantidade em grama de água absorvida por grama de gel

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	3
1.1- Gelatina	4
1.2- Goma do Cajueiro	8
1.3 Modificação de Biopolímeros	11
1.3.1 Reação de Sulfatação	11
1.3.2 Reação de Oxidação	12
1.3.3 Reação de Reticulação	16
1.4 Hidrogéis	19
2- OBJETIVOS	23
2.1 Objetivos Específicos	23
3. METODOLOGIA	24
3.1 Materiais	24
3.2 Caracterização da Gelatina	24
3.2.1 Eletroforese	24
3.3 Modificação da Goma do Cajueiro	25
3.3.1 Reação de Oxidação	25
3.3.2 Reação de Sulfatação	26
3.4 Preparação de Esferas de Gelatina (GE) e Gelatina/Goma do Cajueiro (GEGC)	27
3.4.1 Reticulação com Genipina	28
3.5 Preparação de Esferas de Gelatina/Goma do Cajueiro modificada	29
3.6 Métodos de Análise	30
3.6.1 Análise Elementar	30
3.6.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho	30
3.6.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	30
3.6.4 Cromatografia de Permeação em Gel	30
3.6.5 Reometria	31
3.6.6 Análise Termogravimétrica	31
3.6.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	31
3.6.8 Intumescimento	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1 Caracterização da Gelatina	32

4.1.1 Eletroforese	32
4.1.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho	32
4.2 Caracterização dos Derivados Oxidados	34
4.2.1 Determinação da Porcentagem de Oxidação	34
4.2.2 Ressonância Magnética Nuclear	34
4.2.3 Cromatografia de Permeação em Gel	37
4.2.4 Análise Termogravimétrica	37
4.3 Caracterização dos Derivados Sulfatados	38
4.3.1 Efeito da Concentração de Ácido Monoclorosulfônico no Rendimento e no Grau de Sulfatação	38
4.3.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho	42
4.3.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	44
4.3.4 Cromatografia de Permeação em Gel	45
4.3.5 Reometria	47
4.3.6 Análise Termogravimétrica	48
4.4 Caracterização das Esferas de Gelatina e Goma do Cajueiro	49
4.4.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho	49
4.4.2 Ressonância Magnética Nuclear	50
4.4.3 Análise Térmica	51
4.4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura	52
4.5 Caracterização de Esferas de Gelatina e Goma do Cajueiro Reticuladas ...	53
4.5.1 Determinação de Genipina consumida na Reação de Reticulação	53
4.5.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho	54
4.5.3 Análise Termogravimétrica	55
4.5.4 Cinética de Intumescimento	57
4.6 Caracterização das Esferas de Gelatina e Goma do Cajueiro Oxidadas	58
4.6.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho	58
4.6.2 Ressonância Magnética Nuclear	59
4.6.3 Análise Termogravimétrica	60
4.6.4 Microscopia Eletrônica de Varredura	61
4.6.5 Cinética de Intumescimento	62
4.7 Caracterização das Esferas de Gelatina e Goma do Cajueiro Sulfatada	62
4.7.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho	63
4.7.2 Análise Termogravimétrica	63
4.7.3- Cinética de Intumescimento	64
4.8- Comparação da Cinética de Intumescimento para as esferas de Gelatina e Goma do Cajueiro	65
5- CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

1- INTRODUÇÃO

A Ciência de Polímeros tem dado grande importância na preparação e aplicação de novos materiais. Sistemas poliméricos obtidos pela mistura e/ou associação de polímeros distintos na forma de redes interpenetradas, blendas poliméricas ou copolímeros em bloco ou grafitados recebem atenção dos pesquisadores nos últimos anos, sobretudo devido à vasta possibilidade de aplicação que inclui os setores farmacêutico, médico, tecnológico e agropecuário [Bucholz e Peppas (1994), Bae e Kim (1993), Xia e col. (2005), Toti e col. (2004), Rokhade, Patil e Aminabhavi (2006) e El-Rehim, Hegazy e El-Mohdy (2004)].

A associação de polissacarídeos com polímeros sintéticos é investigada na busca por materiais que apresentem suas propriedades originais reforçadas ou mesmo fornecer novas funcionalidades, que influenciem suas características físicas, químicas, mecânicas e reológicas. Propriedades de alguns polissacarídeos como abundância, biodegradabilidade, biocompatibilidade e não toxicidade têm favorecido a escolhas desses polímeros na preparação de biomateriais [Berger e col. (2004a)].

A microencapsulação de fármacos a partir da preparação de microesferas de géis (com polímeros sintéticos e/ou naturais) tem sido foco de inúmeras pesquisas na área farmacêutica nas últimas décadas, envolvendo diferentes objetivos, entre eles a obtenção de produtos de liberação modificada de fármacos, diminuição da toxicidade gastrointestinal de antiinflamatórios não-esteróides, melhoria na estabilidade ou aumento na biodisponibilidade de fármacos, liberação em regiões específicas e o tratamento das doenças inflamatórias do intestino [Beck (2005), Freiberg e Zhu (2004), Gavini e col. (2004), Giunchedi e col. (1995), Gohel e Amin (1998), Espósito e col. (2002), Lamprecht, Schafer e Lehr (2000), Sajeev e col. (2002), Saravanan e col. (2004)]. Microesferas podem ser preparadas através de inúmeros métodos descritos na literatura, entre os quais se encontra a coacervação [Madan, Luzzi e Price (1974)], emulsificação [Tanaka, Takino e Utsumi, (1963), Raymond, Degennaro e Mikeal, (1990)] e secagem por aspersão (*spray-drying*) [Bassani e col. (2001)].

As características físicas como, por exemplo, tamanho das microesferas, determinam seu desempenho para o uso em diferentes objetivos terapêuticos. Por exemplo, microesferas com diâmetros na faixa de 20-100 μm podem ser utilizadas para administração intramuscular, desde que elas estejam retidas no tecido

intersticial, micropartículas menores têm sido propostas para o tratamento de infecções, alergias e artrites, devido à capacidade de permanecer em sítios específicos [Esposito, Cortesi e Nastruzzi (1996)].

Considerando a busca por novas formulações farmacêuticas e também o potencial que o Estado do Ceará tem como fonte da goma do cajueiro, essa proposta de trabalho visa a síntese de derivados da goma do cajueiro e o desenvolvimento de novos materiais (na forma de microesferas), preparados a partir da goma do cajueiro e gelatina, com intuito de aplicá-los posteriormente em sistemas de liberação de fármacos.

1.1- Gelatina

A gelatina é um biopolímero, biocompatível, biodegradável, e solúvel em pH fisiológico à temperatura ambiente, o que a torna ideal para aplicações farmacêuticas. É um produto heterogêneo que tem uma mistura de espécies, α -, β -, e γ - peptídeos derivada do colágeno, uma proteína natural a qual é um material fibroso que ocorre na pele, ossos e tecidos de animais [Ferdinando (2000)]. A gelatina é amplamente utilizada em indústrias de alimentos, cosméticas e farmacêuticas, ganhou popularidade devido as suas propriedades multifuncionais; dentre as quais a capacidade de formar géis termoreversíveis é a mais importante. As gelatinas são comercializadas de acordo com suas propriedades físico-químicas, como o valor do *Bloom*¹ (um parâmetro que representa a rigidez do gel) e viscosidade [Segtnan e Isaksson (2004)].

Ambos, a gelatina e o colágeno, consistem de uma variação de 18 aminoácidos, dentre os quais, glicina (Gly), prolina (Pro) e hidroxiprolina (Hyp) são os mais abundantes. Estruturalmente, as moléculas de gelatina contêm seqüências de $(\text{Gly-X-Y})_n$, onde X e Y, aproximadamente 30%, são ocupadas pela Pro e Hyp, o restante por resíduos de outros aminoácidos como alanina (Ala), arginina (Arg) e glutamato (Glu) entre outros, o n é aproximadamente 330 (Figura 1) [Rose e col. (1989) e Prystupa e Donald (1996)].

¹ É a medida da força do gel da gelatina, refletindo a massa molar média de seus constituintes, quanto maior o *Bloom*, maior será a viscosidade da gelatina. O nome deriva de Oscar T. Bloom inventor do gelomêtro *Bloom*. Disponível em: <<http://www.sizes.com/units/bloom.htm>>. Acesso em: 29 de agosto de 2007.

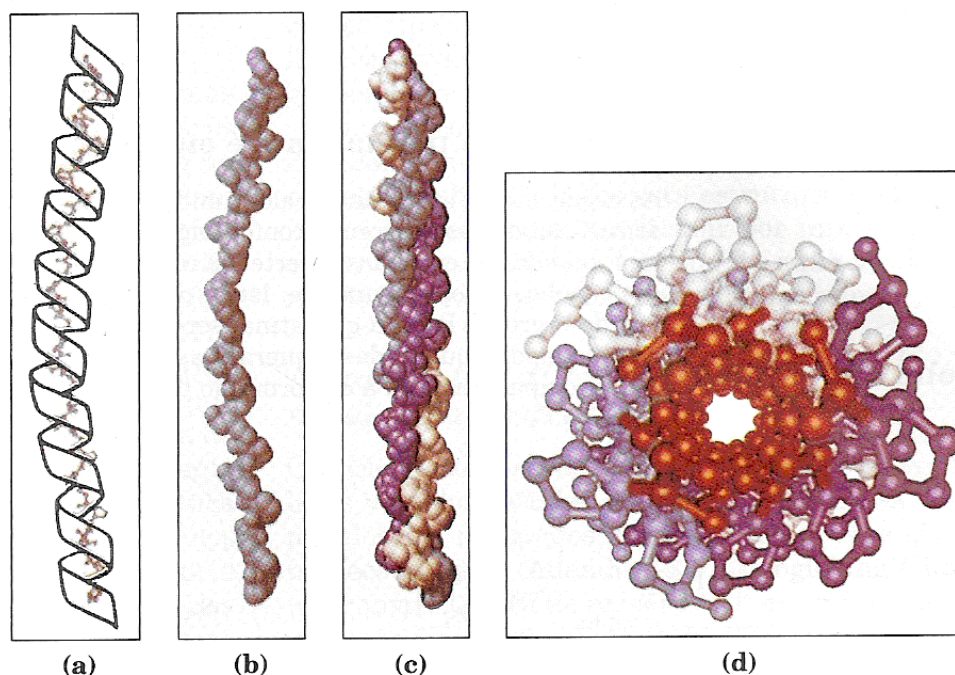


Figura 2. Estrutura do colágeno: a) Estrutura secundária do colágeno orientada à esquerda. b) modelo espaço-cheio da hélice mostrada em (a). c) Estrutura terciária do colágeno formada pelo enrolamento de três hélices em uma torção orientada à direita. d) A super-hélice (estrutura quaternária) de três elementos do colágeno mostrada a partir de uma de suas extremidades, em uma representação bola-bastão. Os resíduos de Gly estão mostrados em vermelho. A Gly, devido ao seu pequeno tamanho, é necessária nas junções apertadas onde as três cadeias estão em contato [Lehninger, Nelson, Cox (2000)].

A desnaturação (perda total da sua estrutura tridimensional) do colágeno para obtenção da gelatina normalmente é feita a partir do colágeno de pele ou osso de boi e porco [Rokhade e col. 2006]. A reação pode ser realizada em meio ácido, originando gelatina do tipo A, e em meio básico, originando gelatina do tipo B. As proporções de peptídios e a massa molar da gelatina dependem da natureza do processo químico de desnaturação [Rokhade e col. 2006].

Após desnaturação, pode ocorrer renaturações de pequenos segmentos recuperando parcialmente a estrutura original do colágeno. Ross-Murphy (1992) relata que a cinética do processo de renaturação tem sido estudada extensivamente e recentes teorias sugerem que a estrutura secundária é mais importante que a terciária para a nucleação da hélice. As estruturas secundárias predominantes na gelatina são do tipo torção β ou curvatura β , que consiste numa curva fechada ($\sim 180^\circ\text{C}$) envolvendo quatro aminoácidos (Figura 3).

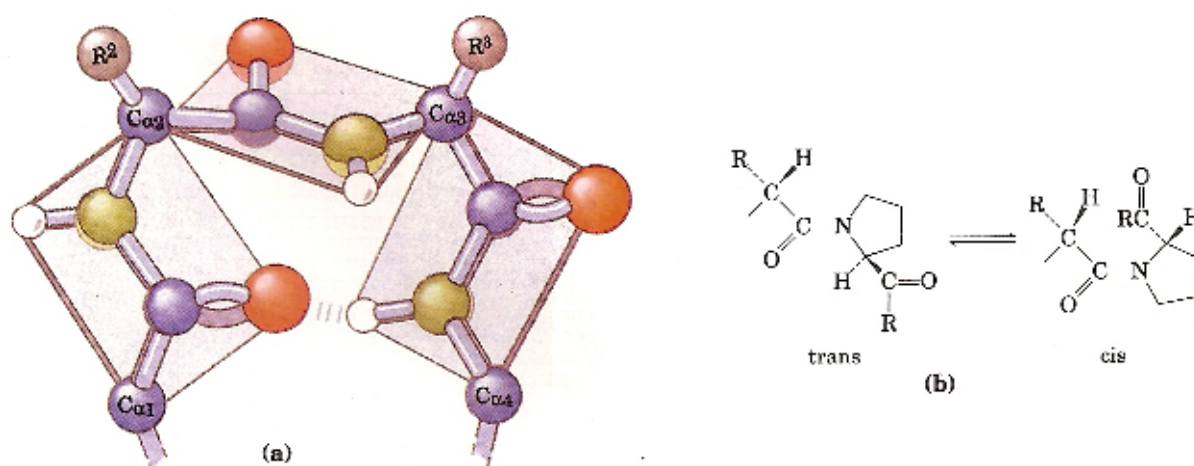


Figura 3. Estrutura de uma torção β ou curvatura β . a) Representação da ligação de hidrogênio entre os grupos peptídicos do primeiro e do quarto resíduos envolvidos na volta. b) Os isômeros cis e trans de uma ligação peptídica envolvendo o nitrogênio imino da prolina [Lehninger, Nelson, Cox (2000)].

As extensas possibilidades de conformação da gelatina estão relacionadas à sua estrutura, os resíduos de Gly e Pro são geralmente encontrados na conformação de torção β (Figura 3), o primeiro porque é pequeno e flexível e o segundo porque as ligações peptídicas envolvendo o nitrogênio do grupo imino são facilmente encontradas na forma cis, que se fecha em curva [Lehninger, Nelson, Cox (2000)]. Acredita-se que a expansão da hélice é governada pela diferença no raio da conversão dos resíduos da prolina da forma cis em trans. Essa estrutura é crucial para o entendimento da habilidade da gelatina em formar géis [Prystupa e Donald (1996) e Choi e col. (1999)].

As micropartículas de gelatina para encapsulação de fármacos têm sido preparadas por métodos de coacervação [Madan, Luzzi e Price (1974)], emulsificação [Tanaka, Takino e Utsumi, (1963), Raymond, Degennaro e Mikeal, (1990)] e métodos de adsorção [Ugwoke e Kinget, (1998)]. Apesar de o método de coacervação ser mais antigo, o método de emulsificação é o mais simples. O método de emulsão explora a termoreversibilidade da gelatina, no qual a dispersão de gelatina forma gel quando a temperatura é diminuída para valores menores que a temperatura de geleificação [Ugwoke e Kinget, (1998)]. Primeiramente a gelatina é dissolvida em temperaturas acima de 40°C e após a preparação da emulsão é resfriada para obtenção das microesferas geleificadas. A técnica de emulsão tem

grande potencial para aplicações farmacêuticas, pois pode ser usada para o encapsulamento de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos.

Segundo Ugwoke e Kinget (1998), microesferas de gelatina podem ser usadas para liberação de fármacos via nasal, bucal, vaginal e oftalmológicas devido a propriedade de mucoadesividade da gelatina.

Para a maior parte das aplicações em sistemas de liberação controlada, devido às propriedades hidrofílicas da gelatina, a reticulação se torna uma estratégia para controlar propriedades desses sistemas, como capacidade de absorção de água, dentre outras que afetam diretamente a sua cinética de liberação. A reticulação da gelatina pode ser de natureza química, formada por ligações covalentes irreversíveis, e reticulação física, formada por várias ligações reversíveis (complexos de polieletrólitos) [Berger e col. (2004a)].

1.2- Goma do Cajueiro

O termo goma na indústria está associado a polissacarídeos e seus derivados. Mas a sua definição está relacionada a um polissacarídeo solúvel em água e que forma soluções viscosas a baixas concentrações, sendo substâncias incolores, inodoras, insípidas e não tóxicas [BeMiller (1987)]. As gomas industriais podem ser classificadas em naturais e modificadas. As naturais podem ser obtidas de exudatos de árvores, de sementes, de algas ou por fermentação microbológica [Rodrigues, de Paula e Costa (1993)]. As gomas extraídas de exudatos foram as primeiras gomas conhecidas [Whistler (1973)].

A goma do cajueiro (GC) é um polissacarídeo exudato da árvore cajueiro (*Anacardium occidentale*), que é considerada um planta de porte alto (6 a 12 metros). Foi utilizada para florestamento e há registro de uso como árvore ornamental e para sombreamento. É originária da América Tropical e suas explorações comerciais restringiram-se à Índia, Brasil, Moçambique, Quênia e Tanzânia. O cultivo de caju ocupa uma área de 551842 ha e aproximadamente 98% desta área encontra-se no nordeste, abrangendo os estados do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte [Pessoa, Leite e Pimentel (2006)].

O principal produto do cajueiro é a sua castanha, mas existe potencial para a exploração da goma exudada do cajueiro [de Paula, Heatley, e Budd (1998)].

A média de produção de goma/árvore/ano é 700 g [Bandeira (1991)], com um potencial de produção anual da goma de até 38 mil toneladas.

A goma do cajueiro tem aplicações como espessantes para sucos e refrescos, emulsificante para molhos e saladas, suporte para microcápsulas e ainda como agente depressor de minério [Mothé (2000)]. Por possuir características semelhantes a goma arábica, pode substituí-la como cola líquida para papel, na indústria farmacêutica em cosméticos e como aglutinante de cápsulas e comprimidos e na indústria de alimentos como estabilizante de sucos, cervejas e sorvetes e como clarificante de sucos [Silva (2006)].

O Grupo de Polímeros – UFC tem estudado essa goma desde 1993 [Rodrigues, de Paula e Costa (1993)]. A goma extraída de árvores do nordeste brasileiro foi caracterizada como um heteropolissacarídeo contendo β -D-galactose (72-73%), α -D-glucose (11-14%), arabinose (4,6-5%), ramnose (3,2-4%) e ácido glucurônico (4,7-6,3%) em porcentagem de massa [de Paula, Heatley e Budd (1998), de Paula e Rodrigues (1995)]. A goma é composta sobretudo de uma cadeia principal de galactose ligada por C-1 e C-3, com ramificações de galactose ligada por C-1 e C-6. A glucose pode formar cadeias laterais e a arabinose, ramnose e ácido glucurônico apresentam como grupos terminais (Figura 4) [de Paula, Heatley, e Budd (1998)].

A pesquisa dentro do grupo de polímeros – UFC e colaborações com outros grupos de pesquisa no Brasil permitiram outras propostas de trabalho com a goma do cajueiro: modificação por carboximetilação com ácido monocloroacético como agente esterificante [Silva e col. (2004)] e oxidação utilizando TEMPO (N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina) como agente oxidante [Cunha e col. (2007)]; copolimerização via enxertia com acrilamida [Silva, de Paula e Feitosa (2007)]; interações com quitosana em estudos de cinética de intumescimento [Paula, Gomes e de Paula (2002)], na liberação de fármacos [Maciel e col. (2006); Magalhães Jr e col. (2008)] e de larvicidas [Paula, de Paula e Bezerra (2006)], estudo da degradação térmica de complexos polieletrólíticos [Maciel e col. (2005)], estudo da formação de filmes finos [Maciel e col. (2007)] e preparação de hidrogéis superabsorventes para o condicionamento do solo [Guilherme e col. (2005) e Silva (2006)].

1.3 Modificação de Biopolímeros

Diversos tipos de modificações de polissacarídeos com distintos interesses têm sido propostas, desde aumentar a hidrofiliabilidade à adição de caráter hidrofóbico. Na busca de aumentar o caráter hidrofílico e aumentar os sítios de interação com outros polímeros (polímeros sintéticos, polissacarídeos e proteínas) ou com metais, modificações tais como: carboximetilação, carboxilação, oxidação e sulfatação vêm sendo propostas.

1.3.1 Reação de Sulfatação

Os açúcares sulfatados têm geralmente fórmula $ROSO_3H$ onde ROH é o açúcar. O interesse corrente nesses açúcares é devido principalmente ao fato destes ésteres ácidos ocorrerem extensivamente na natureza. No reino vegetal, açúcares sulfatados são encontrados combinados com muitos polissacarídeos de algas [Mori (1953); Percival (1964)], no entanto dificilmente são encontrados em plantas terrestres. No reino animal, estes ésteres são polissacarídeos como a heparina, sulfatos de condroitina e de mucoitina, e são encontrados no cérebro [Thannhauser, Felling e Schmidt (1955)].

Muita atenção tem sido focalizada no papel fisiológico de polissacarídeos sulfatados e, associado a isto, muitos métodos de sulfatação de polissacarídeos têm sido propostos com intenção de aplicações terapêuticas comerciais. Um exame detalhado da estrutura de polissacarídeos sulfatados requer o conhecimento da posição da ligação do grupamento sulfato, e que a reatividade química desses grupamentos seja entendida. Isto é importante, visto que os grupos sulfatos exercem papel importante nas propriedades biológicas desses polissacarídeos [Shanmugam e Mody (2000)].

Sulfatação de polissacarídeos tem sido reportada para uma variedade de carboidratos, entre esses quitosana [Baumann e Faust (2001)], dextrana, pululana [Mahner, Lechmer e Nordmeier (2001)] e laminarina, polissacarídeo extraído da alga *Laminaria digitata* [O'Neill (1955)]. Os reagentes utilizados são principalmente o ácido metaclorosulfônico ($ClSO_3H$) em piridina (Figura 5) [Geresh, Mamontov e Weinstein (2002)] ou complexo de trióxido sulfúrico com piridina [Wu e col. (1998)], trietilamina [Soeda e col. (2000)] ou DMF [Alban, Schauerte e Franz (2002)]. Os

solventes utilizados são geralmente formamida, dimetilformamida, dimetilsulfóxido e piridina.

No entanto, devido à complexidade estrutural dos polissacarídeos, um mesmo método de sulfatação pode resultar em produtos previsíveis para um determinado polissacarídeo, mas imprevisíveis para outros polímeros [Yang e col. (2003)]. Assim, é importante estabelecer um método apropriado de sulfatação. O solvente deve ser escolhido adequadamente para cada polissacarídeo, já que estes podem ter solubilidade e conformação diferente em diferentes solventes, o que pode afetar a sulfatação devido às distintas forças intermoleculares.

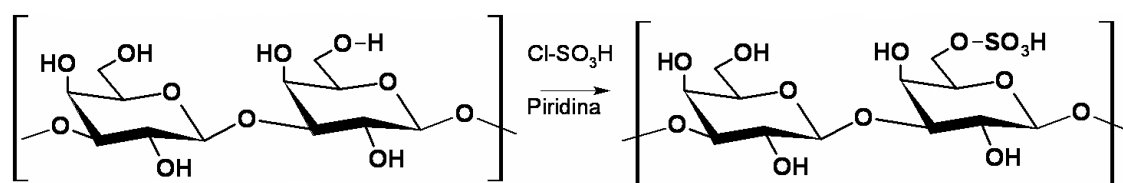


Figura 5. Sulfatação de polissacarídeo com ácido metaclorosulfônico em piridina [Mahner, Lechmer, e Nordmeier (2001)].

As propriedades de polissacarídeos sulfatados, tais como atividade anticoagulante [Alban e Franz (2001), Huynh, Chaubet e Jozefonvicz (2001)], antiviral [Amornrut e col. (1999)], antiinflamatória [Winkelhake (1991)] entre outras, pode depender fortemente de sua estrutura, como por exemplo, do grau de sulfatação (GS) [Alban, Schauerte e Franz (2002)], da massa molar [Barbucci e col. (1998)] e da ramificação da cadeia [Mulloy, Mourão e Gray (2000)].

1.3.2 Reação de Oxidação

A oxidação com periodato de sódio é uma reação simples e bastante usada como ferramenta na elucidação estrutural de carboidratos complexos [Perlin e Casu (1982)]. A oxidação de amido com periodato, até pouco tempo era um dos poucos exemplos no qual esta era empregada para obter novas propriedades com aplicações industriais [Veelaert e col. (1997)]. No entanto, a modificação por oxidação com periodato tem sido proposta para outros polissacarídeos como pullulana [Brunneel e Schacht (1993)], escleroglucana [Crescenzi e col. (1983); Stokke e col. (1995); Guo, Elgsaeter e Stokke (1998); Christensen, Aasprong e

Stokke (2001)], goma guar [Varma e col. (1997)], dextrana [Sokolsky-Papkov, Domb e Golenser (2006) e Schacht e col. (1997)], goma arábica [Nishi e Jayakrishnan (2007) e Nishi e Jayakrishnan (2004)] e goma Konjac [Yu e Xiao (2008)].

Periodato oxida seletivamente as cadeias laterais do polissacarídeo, se a cadeia principal não possuir nenhuma hidroxila vicinal. Assim, quando na cadeia principal as unidades dos monossacarídeos são ligadas (1→3) a oxidação com periodato leva a introdução de grupamentos aldeídos nas cadeias laterais, sem degradação da cadeia principal. A Figura 6 mostra diferentes unidades de açúcares reagindo com periodato de sódio. Observa-se que a única unidade não-oxidada é a B devido às ligações glicosídicas na posição 1 e 3 que não apresenta duas hidroxilas vicinais.

Polissacarídeos como a goma do cajueiro [de Paula, Heatley e Budd (1998)] e escleroglucana [Christensen, Aasprong e Stokke (2001)] apresentam esse tipo de ligação em suas estruturas. A Figura 7 mostra o mecanismo básico da reação de oxidação de uma D-glucose de cadeia lateral [Jackson e Hudson (1938)]. O mecanismo descrito assume que a ligação dos carbonos C(2) – C(3) e C(3) – C(4) do anel de glucose pode ser acessada por oxidação com periodato [Aalmo e Painter (1981)]. A reação ocorre quando a ligação C(3) – C(4) ou C(2) – C(3) é quebrada na primeira oxidação, originando grupamentos aldeídos nos respectivos carbonos (unidades S e S'). Esses intermediários podem existir em solução nas formas cíclicas e de hemiacetal [Aalmo e Painter, 1981]. Uma segunda oxidação complementar origina novos grupamentos aldeído, formando a unidade D (duplamente oxidada) com conseqüente liberação de ácido fórmico de C(3).

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

Os grupos aldeídos das unidades oxidadas podem reagir com NaBH₄ para formar o correspondente poliálcool [Schulz e Rapp (1991)] ou com NaClO₂ para formar correspondentes policarboxilatos [Crescenzi e col (1983)]. O estudo de derivados aldeídos funcionalizados é interessante devido a sua reatividade com grupamentos amina de quitosana e proteínas, como por exemplo, a gelatina para a formação da imina (-C=N-).

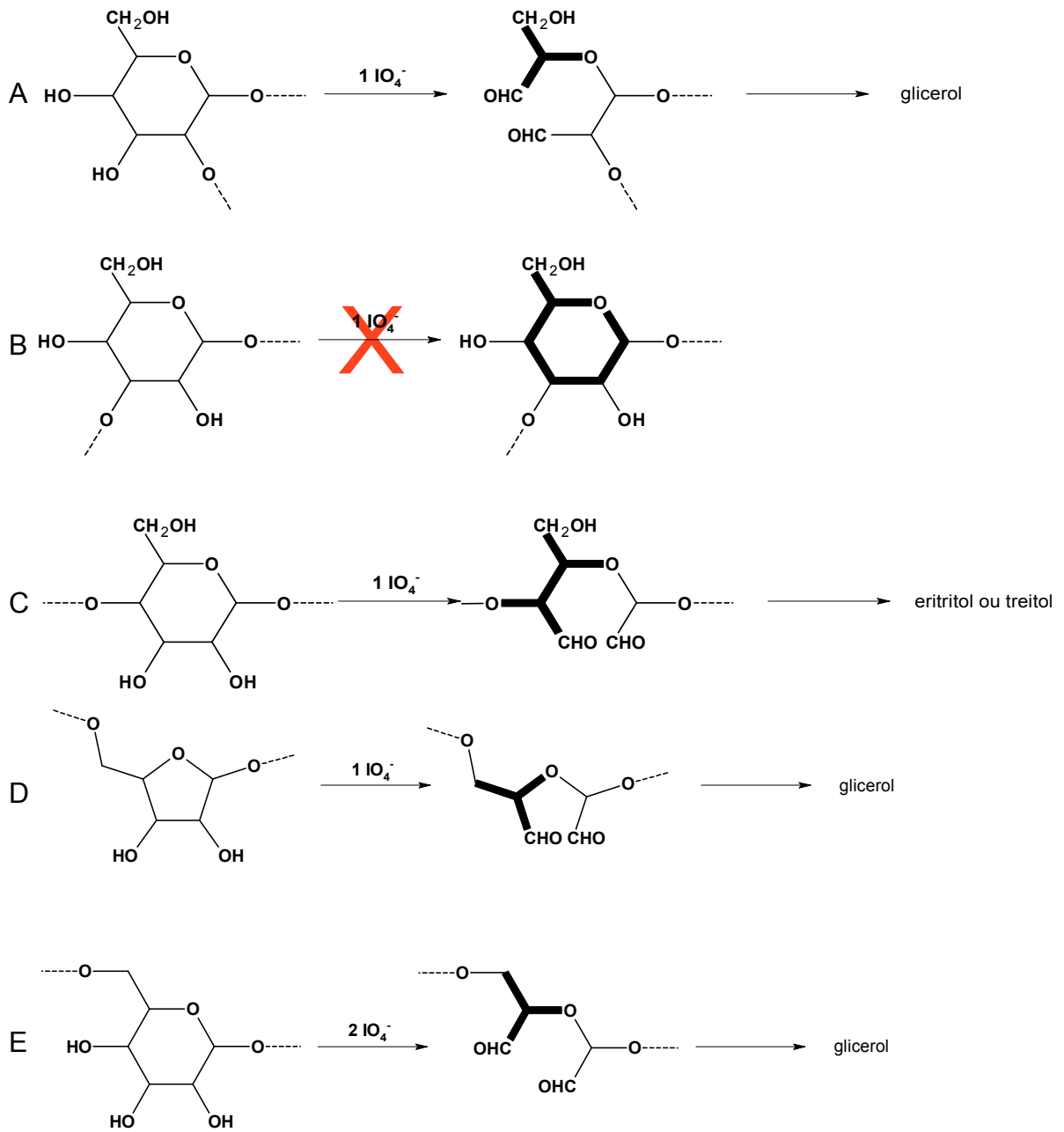


Figura 6. Seletividade da reação de periodato de sódio com unidades de açúcar substituídos em diferentes posições. [Aspinall (1982)].

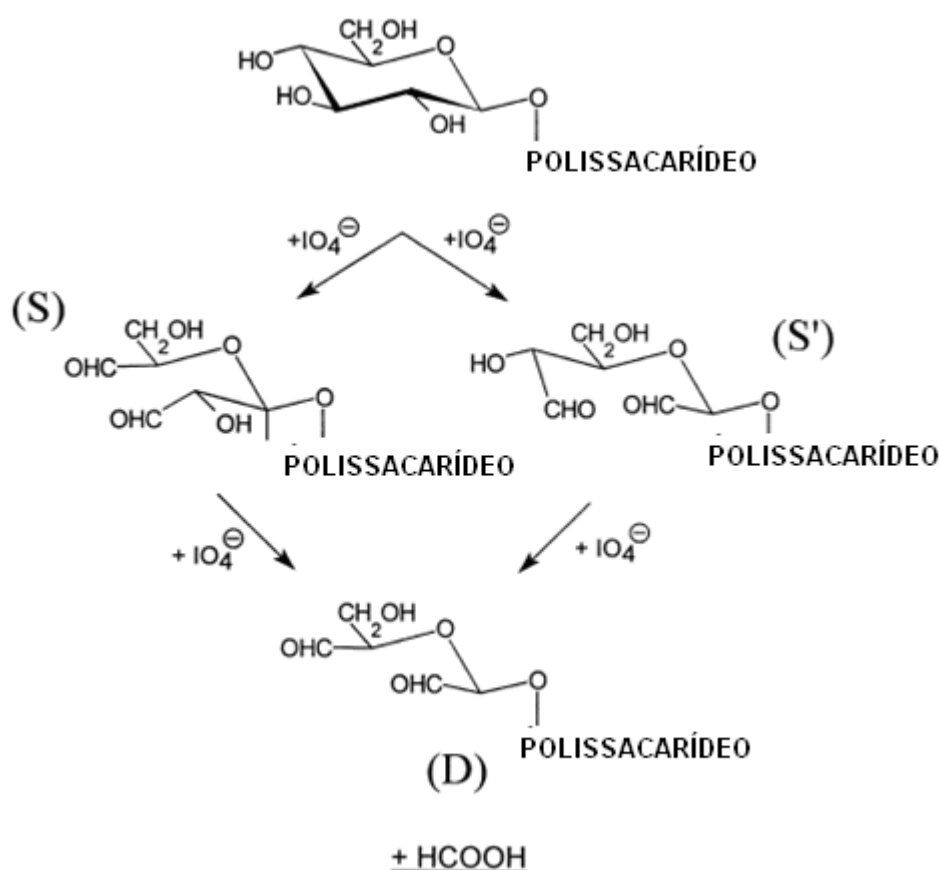


Figura 7. Esquema da reação seletiva de oxidação de uma unidade de glucose da cadeia lateral de um polissacarídeo [Maeda e col. (2001)].

A oxidação com periodato de sódio da goma arábica foi proposta recentemente na preparação de um carreador de fármaco, o qual interage diretamente com este através da formação da base de Schiff, reação entre os grupamentos amina do fármaco e os grupos aldeído da goma. Diferentes perfis de liberação do fármaco são obtidos e podem ser controlados pelo grau de oxidação da goma [Nishi e Jayakrishnan (2004) e Nishi e Jayakrishnan (2007)].

1.3.3 Reação de Reticulação

Os géis físicos são formados por ligações reversíveis, que no caso da quitosana, por exemplo, ocorrem por interação com cátions, tais como íons cálcio e alumínio ou pela formação de complexos polieletrólíticos (CPE's) [Berger e col. (2004a)]. A reticulação física da gelatina pode ser realizada por aquecimento térmico e irradiação ultravioleta [Weadock, Olson e Silver (1983)].

A estabilidade mecânica, ou resistência, em uma larga faixa de pH nem sempre é conseguida para géis físicos. Por isso, algumas vezes é necessário a introdução de ligações covalentes para fortalecer o gel formado, mantido apenas por interações eletrostáticas.

A reticulação química consiste na introdução de moléculas de baixa massa molar, chamadas de agentes reticulantes. A presença de grupos funcionais –OH, –COOH e –NH₂ na estrutura do polissacarídeo pode ser utilizada para a formação de ligações cruzadas através de reações com aldeídos ou com moléculas bifuncionais que permitem a formação de pontes entre as duas cadeias do polissacarídeo [Hennink e van Nostrum (2002)].

Para a gelatina, vários agentes reticulantes têm sido propostos, tais como formaldeído [Hazel e col. (1980)], glutaraldeído [Damink e col. (1995)], carboimida [Sheehan e Hlavka (1957)], compostos diepóxidos [Sung e col. (1996)], gliceraldeído [Kosmala, Henthorn e Brannon-Peppas (2000)] e genipina [Lien, Li e Huang (2008), Wei e col. (2007), Nickerson e col. (2006) Yao e col. (2004), Liang e col. (2003)].

Entretanto, o uso de agentes reticulantes como formaldeído e glutaraldeído podem levar a efeitos tóxicos laterais devido a resíduos dos reticulantes. Portanto, há a necessidade de uma excessiva purificação durante a preparação dos hidrogéis para eliminar excesso do agente reticulante que não formou ligações cruzadas. Eles podem ser retirados por sucessivas lavagens ou neutralizados por uso de reagentes específicos [Berger e col. (2004b)]. Esses métodos para remoção do reticulante podem, também, extrair qualquer fármaco que tenha sido incorporado na rede polimérica ou gerar reações adicionais devido a aplicações de reagentes para neutralização do reticulante.

Uma alternativa a estes reticulantes tóxicos é a utilização da genipina. A reticulação de quitosana e gelatina com genipina tem sido proposta como uma substituição dos reticulantes tóxicos, como epicloridrina e glutaraldeído, já que sua

toxicidade é mais baixa do que a do glutaraldeído, em torno de 5.000 a 10.000 vezes [Sung e col. (1999)].

A genipina é um iridóide derivado do geniposídeo (Figura 8), extraída do fruto de jenipapo (*Genipa americana*), tem sido utilizada na medicina chinesa para tratamento de doenças hepáticas e como agente antiinflamatório, sendo produzida e vendida somente em Taiwan. Na presença de oxigênio, forma um pigmento azul quando reage com grupos amina livres de aminoácidos como a glicina e lisina em pH 7 [Paik e col. (2001)].

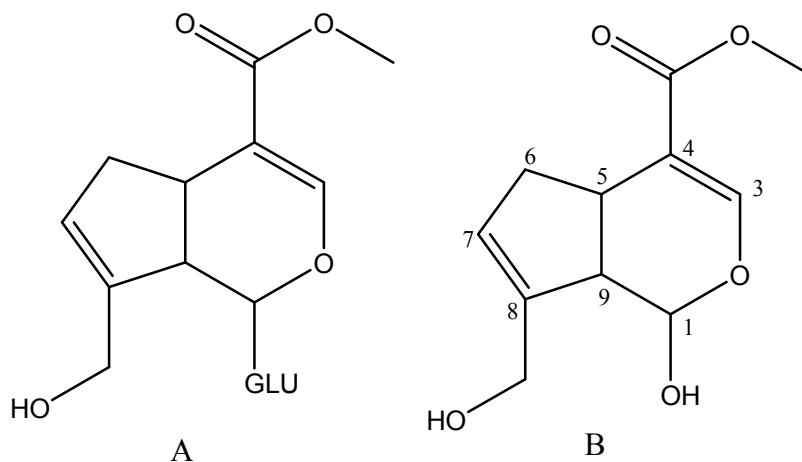


Figura 8. Estrutura química: A - do geniposídeo, onde GLU é glucose e B - da genipina [Butler, Ng e Pudney (2003)].

A genipina participa de ligações covalentes com grupos amina livres contidos em polímeros, essa reação se processa por dois mecanismos distintos. O primeiro é o ataque nucleofílico ao carbono 3 da genipina por aminas primárias formando uma amina cíclica ligada à cadeia do polímero (Figura 9a). A segunda reação é a substituição nucleofílica (S_N2) do grupo éster da genipina formando uma amida secundária ligada à cadeia polimérica com a liberação de metanol (Figura 9b) [Butler, Ng e Pudney (2003)].

Segundo Liang e col. (2003) a aplicação dessa substância como agente reticulante pode minimizar a redução da biodegradabilidade e biocompatibilidade de polissacarídeos modificados por reticulação. Microesferas de gelatina reticuladas com genipina mostraram em estudo *in vivo* menor grau de inflamação em tecidos implantados que aquelas microesferas de gelatina reticuladas com glutaraldeído.

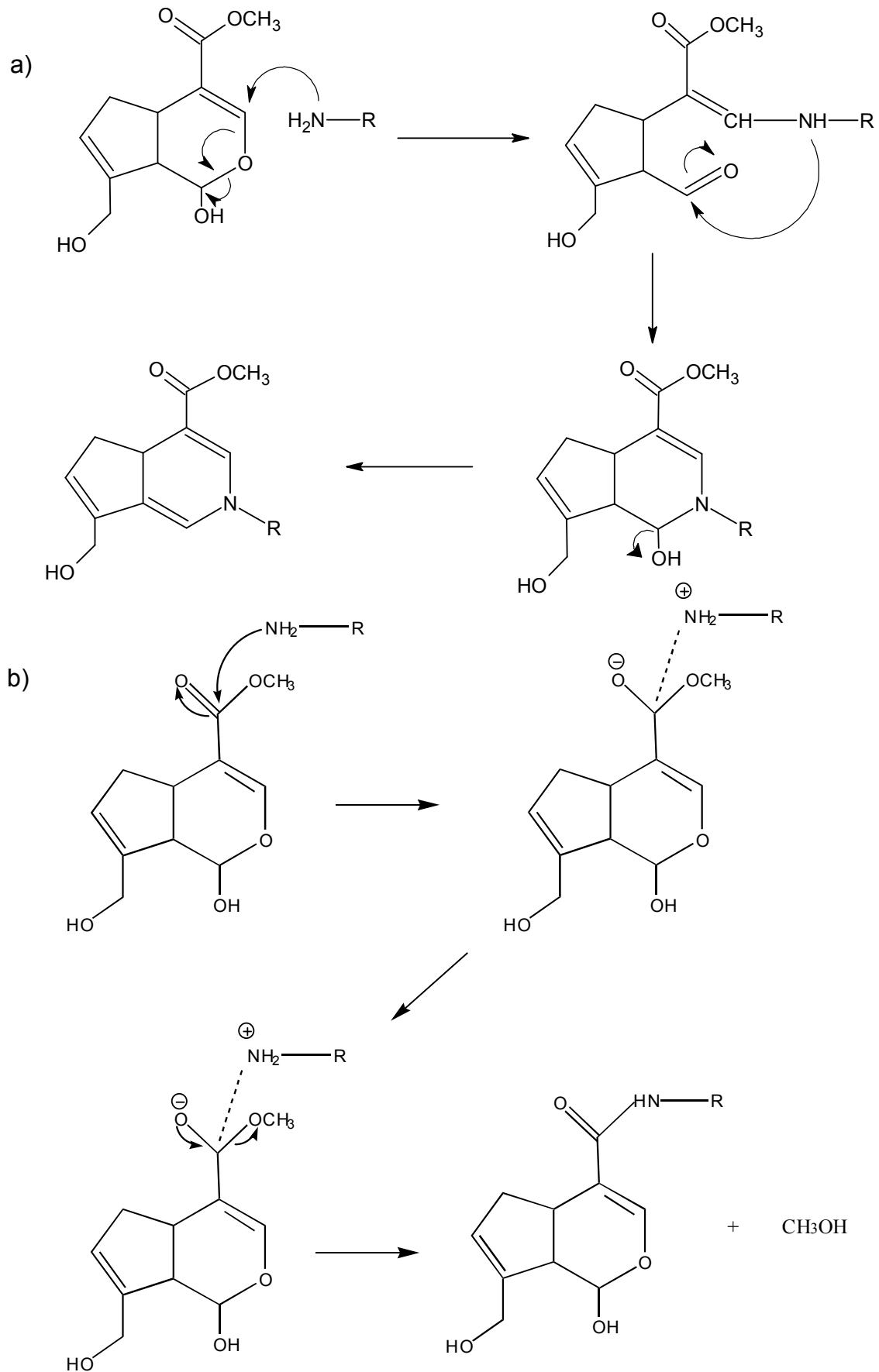


Figura 9. Mecanismo da reação de reticulação entre grupo amina e genipina: a) esquema reacional 1 e b) esquema reacional 2 [Butler, Ng e Pudney (2003)].

1.4 Hidrogéis

Hidrogéis foram definidos por Peppas (1986) como sistemas macromoleculares que intumescem em água ou fluidos biológicos, devido a sua capacidade de absorver e reter grandes volumes de água em sua estrutura sem se dissolver em função de reticulações físicas ou químicas entre as cadeias individuais do polímero (Figura 10). Este tipo de sistema polimérico tem sido amplamente investigado e explorado nos campos biomédicos e industriais [Mitsumata e col. (2003)]. Os polissacarídeos em geral são solúveis em água ou formam géis físicos que na presença de excesso de água formam soluções viscosas.

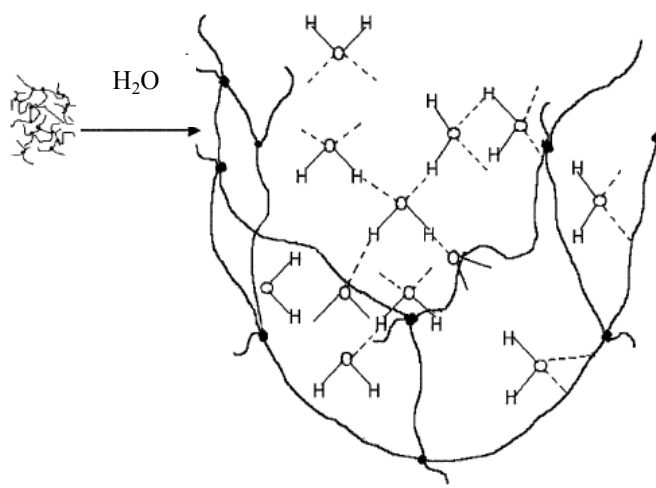


Figura 10. Formação da rede tridimensional do hidrogel com o processo de intumescimento [Rudzinski e col. (2002)].

O processo de intumescimento de um gel é governado por fatores físicos e externos. Entre os físicos, são favoráveis a presença de forças de coesão, grupos hidrofílicos, baixa densidade de reticulação e a flexibilidade do polímero [Rudzinski e col. (2002)]. A presença de grupos hidrofóbicos, alta densidade de reticulação e a presença de íons desfavorecem a absorção de água. Os fatores externos que interferem no intumescimento são mudanças de pH, força iônica, temperatura, composição do solvente e aplicação de voltagem, entre outros.

Géis com redes interpenetradas e semi-interpenetradas têm sido estudados como matrizes em sistemas de liberação utilizando diferentes combinações de polímeros para se obter materiais com propriedades físico-químicas específicas. Géis do tipo redes poliméricas interpenetradas (IPN's – *interpenetrating polymeric networks*) são formados por redes tridimensionais de polímeros

homogêneos ou heterogêneos, onde pelo menos um deve ser polimerizado na presença do outro. As redes individuais podem ou não ser quimicamente interconectadas. Géis do tipo semi-IPNs são obtidos quando apenas um dos polímeros é reticulado.

Géis do tipo semi-IPN têm sido desenvolvidos e avaliados para liberação de vários tipos de drogas [Kulkarni, Soppimath e Aminabhavi (2000); Agnihotri e Aminabhavi (2005)]. Hidrogéis do tipo IPN e semi-IPN de gelatina com polissacarídeos têm sido preparados para obtenção de esferas [Isiklan (2006); Rokhade e col. (2006)], membranas [Liu e Zhao (2006)] e esponjas [Choi e col. (1999)]. Em geral, o agente reticulante aplicado para preparação desses hidrogéis é o glutaraldeído. No entanto, géis do tipo semi-IPN têm sido preparados utilizando como reticulante o gliceraldeído [Kosmala, Henthorn e Brannon-Peppas (2000)] ou genipina [Lien, Li e Huang (2008), Liang e col. (2003)] para minimizar os efeitos tóxicos desses materiais.

Hidrogéis do tipo HPN (HPN – *hybrid polymeric network*) são obtidos quando grupos funcionais presentes nos dois polímeros reagem formando pontos de reticulação sem a necessidade da adição de um agente reticulante. A Figura 11 mostra quatro diferentes tipos de estruturas de géis.

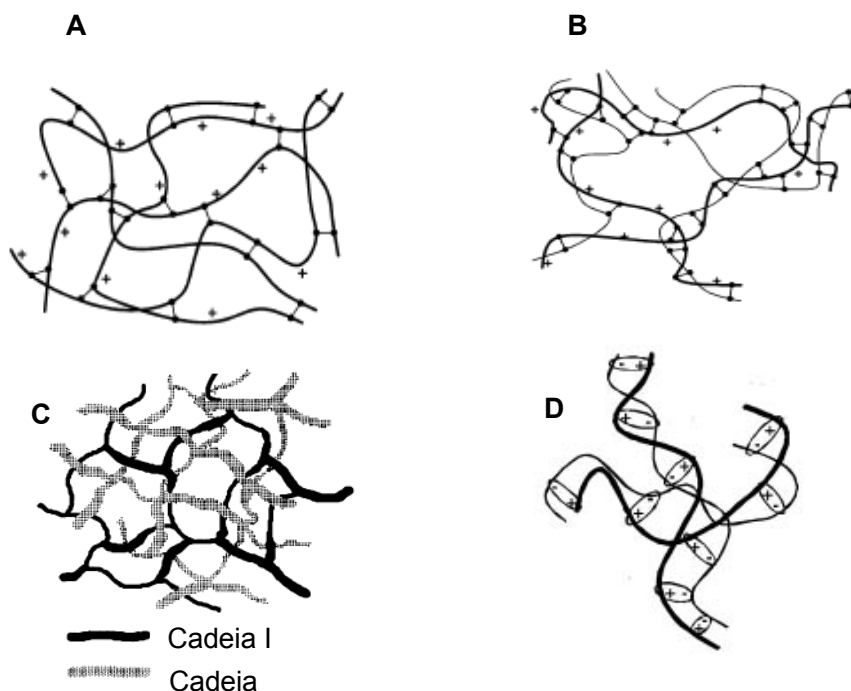


Figura 11. Esquema ilustrativo de estruturas de géis reticulados tipo (A) Polímero reticulado com um agente reticulante de baixa massa molar; (B) Hidrogel do tipo HPN; (C) Hidrogel do tipo IPN e (D) Hidrogel do tipo PEC [Bae e Kim (1993)].

Quando quitosana reage com polímeros aldeído funcionalizados forma géis com pontos de reticulação via reação base de Schiff, os quais são géis do tipo HPN [Berger e col. (2004b)]. A Figura 12 representa um esquema da interação dos grupos amina com o aldeído de outro polímero funcionalizado com grupos aldeídos.

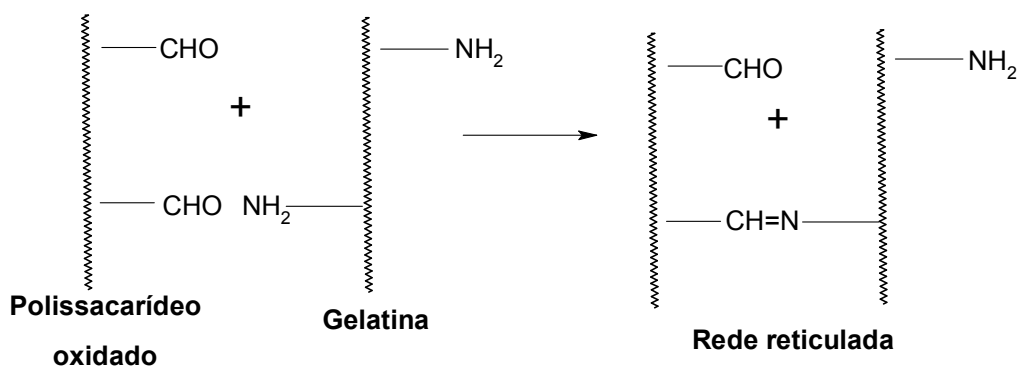


Figura 12. Esquema ilustrativo da reação de um polissacarídeo aldeído funcionalizado com gelatina. [Fang, Takahashi e Nishinari (2005)]. A linha em zig-zag representa a cadeia principal do polissacarídeo oxidado ou da gelatina.

A geleificação da gelatina com polialdeídos (ex. poliacroleína) [Himmelmann, Ulrich e Meckl (1963)] e com amido oxidado com periodato (amido aldeído funcionalizado) [Jeffreys e Tabor (1962)] é bem documentada na literatura.

Schacht e col. (1997) observaram que a velocidade de geleificação, durante a reação de dextrana dialdeídica (oxidada com periodato de sódio) com gelatina, depende da massa molar e do grau de oxidação da dextrana, da natureza da gelatina e das condições reacionais. A reticulação ocorre devido à formação da base de Schiff na reação entre o ϵ -amino da lisina ou grupos laterais da hidroxilisina e os aldeídos disponíveis [Schacht e col. (1997)]. O pH do meio reacional é um dos fatores determinantes, isso pode ser explicado em função do aumento de grupamentos amina não protonados na gelatina com o aumento do pH, o que favorece a formação da base de Schiff.

Recentemente hidrogéis preparados pela interação da gelatina com a goma oxidada Konjac foram testadas quanto à capacidade de liberação de ketoprofeno *in vitro*, e mostrou que a taxa de liberação pode ser controlada por variação da razão goma oxidada/gelatina, o que segundo os autores [Yu e Xiao (2008)] oferece uma nova janela para preparação de matrizes à base de gelatina, quando comparadas à preparação tradicional com aplicação de reticulantes de baixa massa molar. Os hidrogéis de dextrana oxidada com gelatina têm sido investigados

como um curativo para liberação de fatores de regeneração de tecidos [Schacht e col. (1997); Fang, Takahashi e Nishinari (2005)].

Outros trabalhos recentes têm investigado a preparação, propriedades físico-químicas e perfil de liberação de microesferas ou géis de gelatina com polissacarídeo aldeído funcionalizados. Microesferas de gelatina com a goma dextrana oxidada foram preparadas e estudadas quanto às características de liberação de cloridrato de Pingyangmycin (Bleomicina A5), antibiótico utilizado em tratamento de tumores [Wu e col. (2006)] e mostraram ser uma excelente alternativa para o tratamento de tumores na cabeça ou no pescoço.

Hidrogel de sulfato de condroitina oxidada com periodato de sódio e gelatina foi proposto como curativo (*wound dressing*). Géis de gelatina e do polissacarídeo oxidado extraído da *Schizophyllum* foram estudados quanto às propriedades viscoelásticas, parâmetros cinéticos de geleificação e analisados em função da concentração de gelatina e do grau de oxidação do polissacarídeo [Fang, Takahashi, Nishinari (2005)]. Hidrogéis de alginato oxidado e gelatina também têm sido avaliados como biomateriais, mostrando-se não-tóxicos e biodegradáveis [Balakrishnan e col. (2005)].

Microencapsulação de drogas, tais como cloridrato de doxorubicina, mitomicina C, e 5-fluorouacil dentro de microesferas de gelatina reticulada com aldeídos têm sido investigadas [Leo e col. (1997), Yan e col. (1991)]. Estudos mostram que microesferas de gelatina reticuladas com aldeído tem um longo período de biodegradação, propriedade importante para liberação controlada de muitos fármacos [Rao (1995), DiSilvio e col. (1994)].

2- OBJETIVOS

Preparação e caracterização de derivados de goma do cajueiro e utilização destes no desenvolvimento de microesferas com gelatina.

2.1 *Objetivos Específicos*

Para atingir este objetivo o trabalho foi dividido nas seguintes etapas:

Modificar a goma do cajueiro por reação de sulfatação para obtenção de um polieletrólito aniônico e caracterizá-la.

Modificar a goma do cajueiro por reação com periodato de sódio para obtenção de derivados polialdeídicos e caracterizá-la.

Preparar e caracterizar microesferas de géis de gelatina e goma do cajueiro não modificada reticuladas com genipina. Desenvolver microesferas de goma do cajueiro oxidada e sulfatada com gelatina.

Estudar as propriedades físico-químicas de géis de gelatina e goma do cajueiro não-modificada, sulfatada e oxidada, visando sua futura utilização como matriz em sistemas de liberação de fármacos.

3. METODOLOGIA

3.1 *Materials*

A goma do cajueiro (*Anacardium occidentale*) foi fornecida pela EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), Ceará, em 2004. A goma foi purificada pelo método descrito por Rodrigues, de Paula e Costa (1993). Os espectros de infravermelho e ressonância magnética nuclear de ^{13}C para a GC apresentaram valores similares aos obtidos por de Paula e Rodrigues (1995) e massa molar foi estimada em $2,32 \times 10^4$ g/mol.

O fruto do jenipapo (*Genipa americana* L.) foi coletado em julho de 2007, no município de Pacatuba, Ceará. A genipina foi extraída do fruto verde seguindo a metodologia descrita por Djerassi, Gray e Kincl (1960), com algumas modificações desenvolvidas dentro do Laboratório de Polímeros – UFC [Magalhães Jr. (2007)].

A gelatina (Vetec) utilizada é de origem da pele bovina com *Bloom* 170 a 190 g.

3.2 *Caracterização da Gelatina*

3.2.1 *Eletroforese*

A massa molar da gelatina foi determinada por eletroforese em gel de poli(acrilamida em presença de dodecilsulfato de sódio (SDS) e β -mercaptoetanol realizada segundo a técnica de Laemmli (1970), usando-se um gel de aplicação de 3,5% de acrilamida em tampão tris-HCl 0,5 mol/L, pH 6,8 e um gel de separação a 12,5% em tampão tris-HCl 3,0 mol/L, pH 8,8 e SDS 1%, adaptada para o uso em placas medindo 10×8 cm² (Sistema Hoefer SE250 - Pharmacia Biotech). O tampão de corrida foi preparado com tris 0,025 mol/L, glicina 0,2 mol/L e SDS 0,1% a pH 8,3. Os seguintes padrões de proteína da Dalton Mark VII-L Protein foram utilizados: albumina bovina (66000 Da), ovoalbumina (45000 Da), desidrogenase gluceraldeído-3-fosfato (36000 Da) e anidrase carbônica (29000 Da).

As amostras foram dissolvidas em tampão tris-HCl 0,0625 mol/L, pH 8,3, contendo SDS 10, azul de bromofenol 0,02% e em seguida incubadas a 110°C por 10 minutos. Para aumentar a densidade, facilitando a aplicação, foram adicionados

ainda cristais de sacarose. Alíquotas de 12 μL das amostras tratadas foram aplicadas no gel, e então submetidas a uma corrente de 40 mA durante aproximadamente uma hora.

As bandas foram visualizadas usando revelação das bandas protéicas com prata seguindo a metodologia descrita por Blum, Beier e Gross (1987).

A gelatina foi caracterizada por espectroscopia na região do infravermelho (IV), como descrito no tópico métodos de análise, item 3.6.

3.3 Modificação da Goma do Cajueiro

3.3.1 Reação de Oxidação

A reação de oxidação parcial da goma do cajueiro foi realizada por modificação do método descrito por Christensen, Aasprong e Stokke (2001) e Dawlee e col. (2005). A goma do cajueiro (1,0 g, 6×10^{-3} mol de unidades glicosídicas) foi dissolvida em água destilada por 2 horas e duas quantidades distintas de NaIO_4 foram adicionados de modo a obter razões molares de unidades glicosídicas/periodato de 10:3 e 10:4 (Tabela 1).

A mistura reacional foi deixada por 6 horas à temperatura ambiente e após este período etilenoglicol foi adicionado para parar a reação. A goma do cajueiro oxidada (GCX) obtida foi dialisada contra água destilada (4 – 5 vezes) para eliminação de excesso de reagente e então, liofilizada.

Tabela 1. Dados experimentais da reação de oxidação da goma do cajueiro.

Produto*	Mol de NaIO_4	Razão Molar
GCX10:3	$1,9 \times 10^{-3}$	10:3
GCX10:4	$2,5 \times 10^{-3}$	10:4

*A numeração refere-se à relação GC/ NaIO_4 .

O grau de oxidação da goma do cajueiro foi determinado por espectroscopia de absorção na região do UV-VIS, como descrito por Gomez, Rinaudo e Villar (2007). Neste método, utiliza-se um indicador preparado com volumes iguais de soluções de KI (20% m/v) e amido (1% m/v) dissolvidos em

tampão fosfato pH 7,4. Para determinação do teor de periodato foi retirado 2,5 mL da solução reacional (antes da introdução de etilenoglicol) e misturado com 1,5 mL do indicador, em seguida, o volume foi completado para 5,0 mL com água destilada.

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

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

$$\text{ABS} = 0,02 + 0,26 \cdot [\text{IO}_4^-] \times 10^{+5} \quad \text{Equação (1)}$$

onde ABS é a absorvância medida e $[\text{IO}_4^-]$ é a concentração do íon periodato em mol/L.

3.3.2 Reação de Sulfatação

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

O procedimento foi realizado com volume variado de ácido: 2, 6 e 8 mL, para obtenção de diferentes razões molares GC/ácido (Tabela 2). Após a adição total do ácido, manteve-se o sistema reacional em agitação por 12 horas sob refrigeração. A goma do cajueiro sulfatada (GCS) foi então neutralizada com bicarbonato de sódio, dialisada contra água destilada (acompanhado por condutância) até eliminação dos solventes e excesso de reagentes e depois

lioofilizada. O material obtido foi solubilizado em água, ajustado o pH para 7,0 e precipitado em etanol PA.

Tabela 2. Dados experimentais da reação de sulfatação da goma do cajueiro.

Produto*	Volume de SO₃HCl adicionado (mL)	Mols de SO₃HCl adicionado	Razão Molar GC/ácido
GCS2	2	0,03	1:5
GCS6	6	0,09	1:15
GCS8	8	0,12	1:20

* A numeração corresponde ao volume de ácido adicionado.

Os derivados oxidados e sulfatados da GC foram caracterizados por espectroscopia na região do infravermelho (IV), por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), por cromatografia de permeação em gel (GPC), reometria e análise termogravimétrica (TGA), como descrito do tópico métodos de análise, item 3.6.

3.4 Preparação de Esferas de Gelatina (GE) e Gelatina/Goma do Cajueiro (GEGC)

As esferas de GE e GEGC foram preparadas como descrito por Liang e col. (2003) com algumas modificações, utilizando o método de emulsão óleo/água. No caso das esferas de gelatina, a proteína foi dissolvida em tampão fosfato (pH=7,4) a 50°C, concentração de 12,5% m/v. A solução foi gotejada em 40 mL de óleo de milho comercial (gorduras totais de 0,92 g/mL) pré-aquecido a 50°C. O sistema foi mantido em agitação por 10 minutos. Subsequentemente, o sistema foi resfriado a 4°C em banho de gelo e as esferas de gelatina foram formadas na fase aquosa. As esferas foram separadas por filtração em funil de placa porosa e lavadas com acetona várias vezes para remover o óleo remanescente. Por fim, foram secas a vácuo durante a noite.

As emulsões de gelatina e goma do cajueiro foram preparadas dissolvendo gelatina em tampão fosfato (pH=7,4) a 50°C, concentração de 12,5% m/v e em outro frasco prepararam-se soluções de GC com diferentes massas de

goma (Tabela 3). Após a completa solubilização, as soluções foram misturadas e deixadas em agitação por 10 min a 50°C. As esferas GEGC foram preparadas seguindo a mesma metodologia usada para as esferas de gelatina.

Tabela 3. Dados experimentais da preparação das esferas de GE e GEGC.

Produto*	Massa de GE (g)	Massa de GC (g)	Relação GE/GC (massa/massa)
GE	6,26	-	1:0
GEGC10:1	1,25	0,13	10:1
GEGC1:1	5,02	5,01	1:1

*A numeração corresponde à relação GE/GC

3.4.1 Reticulação com Genipina

As esferas dos géis semi-IPN (GE e GEGC's) foram reticuladas com genipina conforme metodologia descrita por Wei e col. (2007) com algumas modificações. As esferas foram dispersas em uma solução de genipina 0,067 mol/L em solução de etanol 90% e deixadas por 24 horas (RGE e RGEGC's) e 72 horas (R'GE e R'GEGC's), em seguida foram filtradas em funil de placa porosa, lavadas com etanol e secas a vácuo.

A quantidade de genipina (gen) consumida na reticulação das esferas do tipo semi-IPN foi determinada utilizando a espectroscopia de absorção na região do UV-VIS acompanhando-se a variação na absorção em 240 nm, correspondente à genipina, conforme descrito por Paik e col. (2001).

O equipamento utilizado foi um espectrofotômetro Hewlett-Packard, modelo 8453 diode array, acoplado a um programa de coleta de dados. A curva de calibração foi obtida medindo-se a absorbância de soluções de genipina de concentrações conhecidas, obtendo uma relação linear, $r = 0,999$, e a equação (2) permite o cálculo da concentração da genipina (gen) que não reagiu durante a reticulação.

$$\text{ABS} = 0,014 + 0,0646.[\text{gen}] \times 10^{+5}$$

Equação (2)

As esferas antes e após a reticulação foram caracterizadas por espectroscopia na região do infravermelho (IV), análise termogravimétrica (TGA), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e cinética de intumescimento, como descrito do tópico métodos de análise, item 3.6.

3.5 Preparação de Esferas de Gelatina/Goma do Cajueiro modificada

A produção de esferas da goma do cajueiro oxidada com gelatina foi feita como descrito para gelatina e dextrana oxidada, por Wu e col. (2006) com modificações. Dissolveu-se 0,125 g da goma do cajueiro oxidada em água, concentração de 1,25% m/v e em outro frasco dissolveu-se 1,25 g de gelatina em água a 50°C, concentração de 12,5% m/v. Após a completa solubilização, volumes iguais das soluções foram misturadas e deixadas sob agitação por 10 min a 50°C.

A solução resultante foi então gotejada em óleo de milho comercial com gorduras totais de 0,92 g/mL, previamente aquecido a 50°C. Depois de 10 min a emulsão obtida foi resfriada a 4°C em banho de gelo. Para desidratar e flocular as esferas, adicionou-se acetona pré-resfriada a 4°C. As esferas foram recuperadas pela filtração da suspensão em funil de placa porosa, lavadas em acetona previamente resfriadas a 4°C e depois secas a vácuo.

Com a finalidade de avaliar o comportamento físico-químico dos géis com a adição de goma do cajueiro oxidado (GCX), esferas de gelatina com goma oxidada com diferentes graus de oxidação foram preparadas (Tabela 4).

Tabela 4. Dados experimentais da preparação das esferas de GEGCX.

Produto*	Massa de gelatina (g)	Massa de GCX (g)	Relação GE/GCX (m/m)	Amostra de GCX
GEGCX1	1,26	0,13	10:1	GCX10:3
GEGCX2	1,26	0,13	10:1	GCX10:4

*A numeração corresponde à ordem de preparação das esferas.

As esferas de gelatina e goma do cajueiro sulfatada (GCS6) foram preparadas seguindo a mesma metodologia descrita para as esferas GEGCX. Os dados estão sumarizados na Tabela 5.

Tabela 5. Dados experimentais da preparação das esferas de GEGCS.

Produto*	Massa de GE (g)	Massa de GCS (g)	Relação GE/GCS (m/m)	Amostra de GCS
GEGCS	1,26	0,13	10:1	GCS6

As esferas foram caracterizadas por espectroscopia na região do infravermelho (IV), por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), por análise termogravimétrica (TGA), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e cinética de intumescimento, como descrito do tópico métodos de análise, item 3.6.

3.6 Métodos de Análise

3.6.1 Análise Elementar

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

3.6.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho

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

3.6.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C (Broad Band e DEPT-135) de soluções das amostras (~2,5%) em D_2O foram obtidos em equipamento Bruker Modelo Avance DRX500, com controle de temperatura, a 70°C .

3.6.4 Cromatografia de Permeação em Gel

O volume de eluição (V_e) foi determinado por cromatografia de permeação em gel (GPC) em cromatógrafo SHIMADZU LC-10AD com detector de índice de

refração RID-6A, coluna Ultrahydrogel linear 7,8 x 300 mm, com fase móvel de NaNO_3 0,1 mol/L, fluxo de 0,5 mL/min e o volume de amostra foi de 50 μL .

3.6.5 Reometria

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

3.6.6 Análise Termogravimétrica

O comportamento térmico das amostras foi analisado no equipamento Shimadzu TGA 50H em atmosfera de ar sintético, com fluxo de 50 mL/min. A taxa de aquecimento foi de 10°C/min numa célula de platina e massa em torno de 10 mg.

3.6.7 Microscopia Eletrônica de Varredura

O estudo morfológico das esferas foi realizado através do equipamento de microscopia eletrônica de varredura Philips XL 30 Holland. As amostras foram montadas com fita de carbono em suporte de aço e recobertas com ouro.

3.6.8 Intumescimento

Os parâmetros cinéticos de intumescimento das esferas foram estudados utilizando-se um procedimento gravimétrico convencional em cadinho filtrante (G0). Mede-se a massa das amostras secas e intumescidas após vários intervalos de tempo e aplica-se a equação 3.

$$W = [(m_u - m_0) / m_0] \quad \text{Equação (3)}$$

onde W é a quantidade de água por grama de gel, m_u é a massa da esfera intumescida e m_0 é a massa da esfera seca.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização da Gelatina

4.1.1 Eletroforese

Pela análise de eletroforese (Figura 13) determinou-se a massa molar aproximada para a gelatina em M_w $1,4 \times 10^5$ g/mol, por extrapolação da curva obtida pela regressão linear da curva padrão de $\ln(M_w)$ em função do R_f .

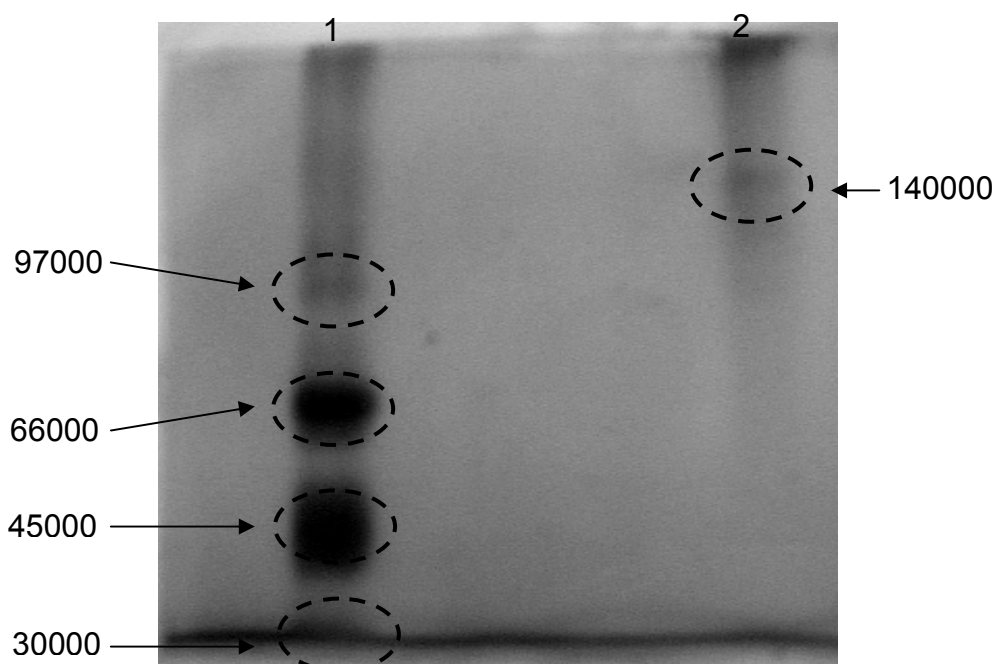


Figura 13. Eletroforese em gel de poliacrilamida. Linha 1 padrões e linha 2 amostra.

4.1.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho

As absorções observadas no espectro da gelatina (Figura 14) foram comparadas às atribuídas segundo Wang e col. (2007) e Bachmann, Gomes e Zezell (2005) para o colágeno e resumidas na Tabela 6. Muyonga, Cole e Duodu (2004) afirmam que após a desnaturação (gelatina) observa-se uma redução na intensidade dos picos das amida A, I, II e III.

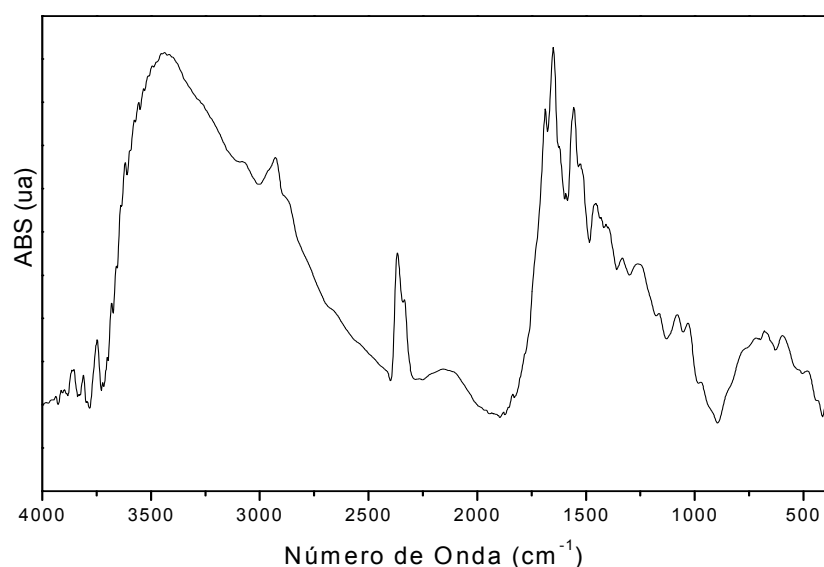


Figura 14. Espectro na região do infravermelho da gelatina.

Tabela 6. Atribuições das absorções no espectro na região do infravermelho.

Região	Número de Onda (cm ⁻¹)		Atribuição
	Colágeno	Gelatina	
Amida A	3425	3439	Estiramento N–H, acoplado com ligação de H
Amida B	2935	2927	Estiramento assimétrico de CH ₂
Amida I	1658	1651	Estiramento C=O/ligação de H acoplado com COO ⁻
Amida II	1552	1556	Deformação N–H acoplada com estiramento C–N
–	1454	1456	Deformação C–H (CH ₂)
–	1406	1408	Estiramento COO ⁻
–	1338	1332	Deformação C–H (CH ₂)
Amida III	1281 -	1263	Deformação N–H acoplada com estiramento
	1240		C–N
–	1083	1082	Estiramento C–O
–	568	596	Estiramento do esqueleto

– Não há nome comum para região espectral.

4.2 Caracterização dos Derivados Oxidados

4.2.1 Determinação da Porcentagem de Oxidação da Goma do Cajueiro

A porcentagem de unidades glicosídicas oxidadas corresponde à diferença entre a quantidade adicionada e a concentração final de periodato. Os resultados obtidos estão sumarizados na Tabela 7. Para as duas reações observou-se o consumo quase completo de periodato de sódio. Resultado similar foi obtido com a oxidação de alginato de sódio [Gomez, Rinaudo e Villar (2007)].

Tabela 7. Efeito da quantidade de matéria de periodato na porcentagem de oxidação da goma do cajueiro.

Produto	% de NaIO₄ consumido	Relação GC (mol de unidades glicosídicas)/ mol de unidades oxidadas
GCX10:3	99,9	10:3
GCX10:4	99,0	10:4

4.2.2 Ressonância Magnética Nuclear

Com a finalidade de verificar a modificação estrutural dos derivados oxidados da goma do cajueiro fez-se o espectro de ressonância magnética nuclear de ¹H e ¹³C (Figuras 15 e 16).

A Figura 15 mostra o espectro de RMN ¹H para a goma do cajueiro e os derivados oxidados. No espectro da goma do cajueiro os sinais em δ 4,69; δ 4,87 e δ 4,5 (δ 104,2; δ 104,0 e δ 103,3) são atribuídos a H-1 da galactose (1→3) por correlação no espectro bidimensional ¹H-¹³C HSQC com sinais de carbono atribuídos segundo de Paula, Heatley e Budd (1998). Os sinais de anoméricos da glucose e ramnose foram observados em δ 4,95 (δ 100,7) e δ 4,81 (δ 101,3), respectivamente. Observa-se que os derivados modificados também apresentam esses sinais, com apenas uma diferença de intensidade relativa aos sinais das unidades de galactose (1→3), o que mostra que a cadeia principal não sofre degradação com a oxidação.

Novos sinais em δ 5,6 e δ 5,7 podem ser devidos à formação de um hemiacetal intra-residual entre um grupo aldeído e grupos hidroxilas (como

exemplificado na Figura 17). O surgimento de novos sinais na região de deslocamento químico maior do que os característicos de próton anomérico (δ 4,5-5,0) foram observados na oxidação de alginato de sódio com periodato de sódio [Gomez, Rinaudo e Villar (2007)]. No espectro de RMN ^1H das amostras oxidadas pode-se observar também uma diminuição da intensidade do sinal de CH_3 da ramnose (δ 1,3) e um desdobramento deste sinal, o que pode sugerir que a oxidação pode ter acontecido também neste monossacarídeo. Sinais relativos a prótons de aldeído estão presentes nas amostras de goma oxidada em δ 8,30 e δ 8,34 para a GCX10:3 e GCX10:4, respectivamente.

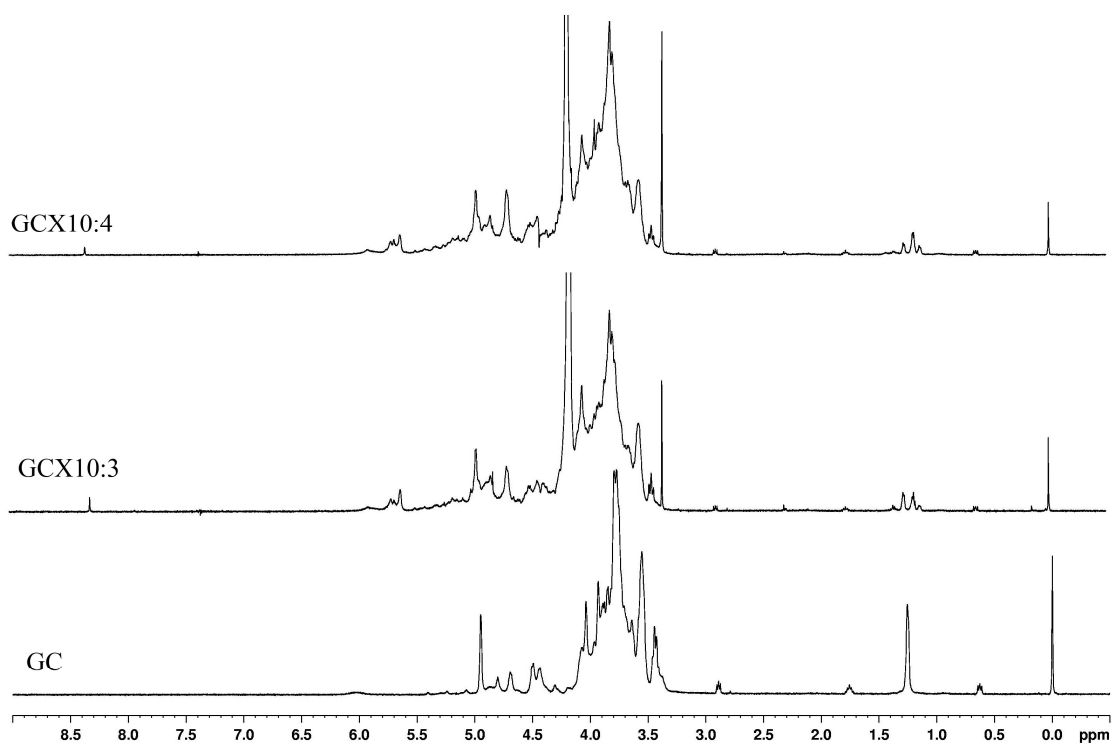


Figura 15. Espectros de RMN ^1H a 70°C em D_2O .

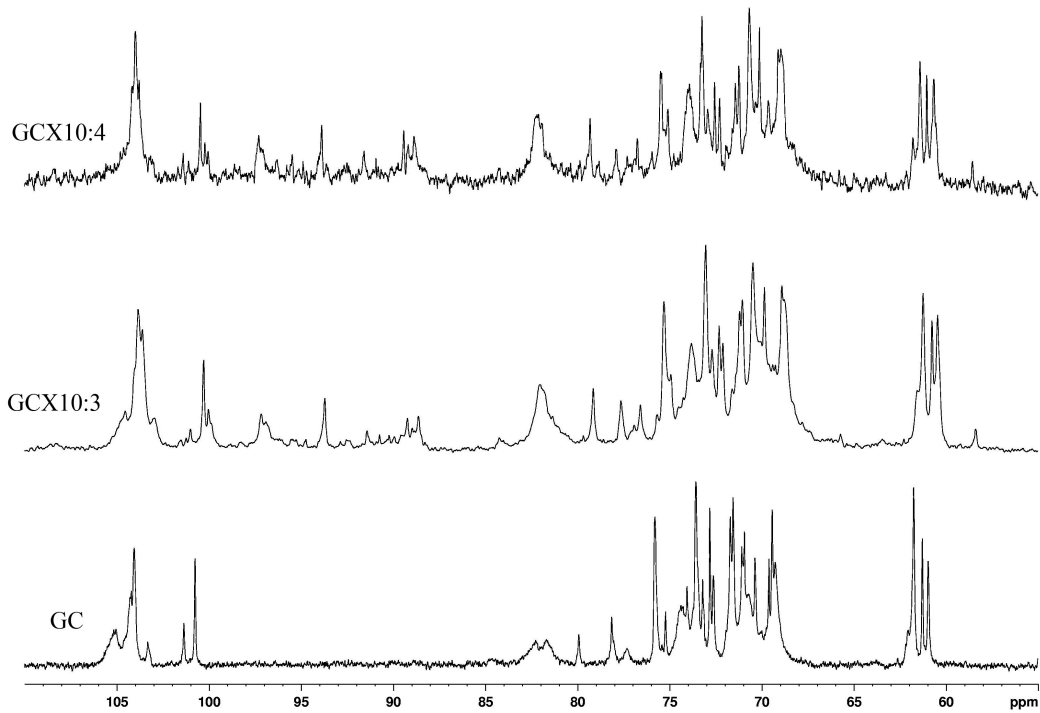


Figura 16. Espectro de RMN ^{13}C a 70°C em D_2O .

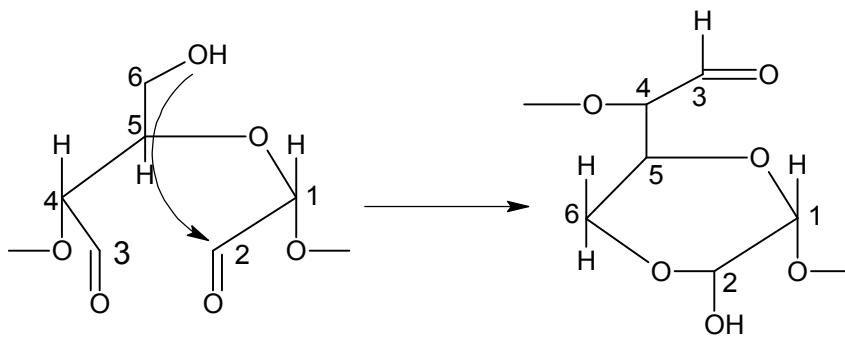


Figura 17. Formação de um hemiacetal intra-residual [Bruneel e Schacht (1993)].

Os espectros de RMN ^{13}C da goma do cajueiro e amostras oxidadas são mostrados na Figura 16. O espectro da GC é similar ao obtido por de Paula, Heatley e Budd (1998), com sinais de carbonos anoméricos de β -D-galactose (1 \rightarrow 3) (δ 104,2), β -D-galactose (1 \rightarrow 6) (δ 105,3), α -D-glucose (δ 100,7), α -L-arabinose (δ 105,0); α -L-ramnose (δ 101,3) e β -D-ácido glucurônico (δ 103,5). As amostras oxidadas apresentam um aumento significativo no número de sinais na região entre δ 87-98, além da diminuição dos sinais de C-1 da ramnose (δ 101,3) e glucose (δ 100,7). Os novos sinais podem ser atribuídos a carbonos formando hemiacetais

intra-residuais após a oxidação (Figura 17). O aparecimento de novos sinais entre δ 90-95 também foi observado no espectro de RMN ^{13}C do alginato oxidado com periodato de sódio [Gomez, Rinaudo e Villar (2007)].

4.2.3 Cromatografia de Permeação em Gel

A Figura 18 mostra os cromatogramas de GPC para a GC e os derivados oxidados. Os valores obtidos para o volume de eluição (V_e) foram: 8,74; 8,83; 9,17 mL para GC, GCX10:3 e GCX10:4, respectivamente. Não ocorreu uma variação significativa no V_e para a GC e GCX10:3 (1%), mas com o aumento da oxidação, ocorre um aumento de 3,9% entre a GCX10:3 e a GCX10:4, o que pode ser atribuído à degradação do polissacarídeo durante a reação. Resultados semelhantes foram observados para derivados oxidados de alginato de sódio [Gomez, Rinaudo e Villar (2007)].

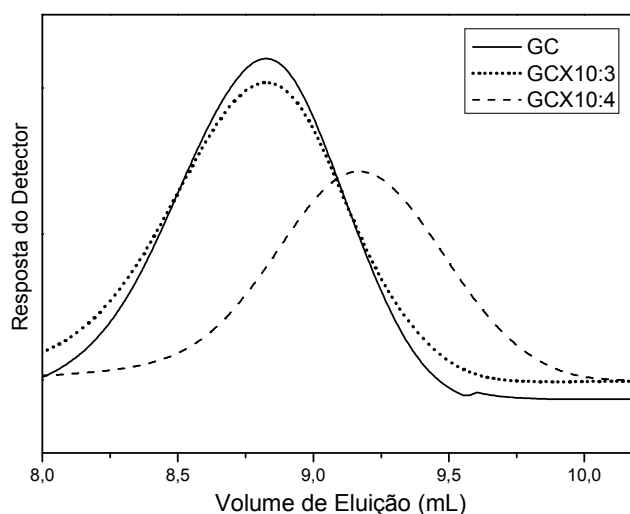


Figura 18. Cromatograma de GPC para soluções aquosas 0,1% m/v da Goma do Cajueiro (GC) e dos derivados oxidados (GCX).

4.2.4 Análise Termogravimétrica

As curvas termogravimétricas da goma do cajueiro e derivados oxidados encontram-se na Figura 19. De um modo geral, a decomposição de polissacarídeos inicia-se em temperaturas superiores a 200°C. A GC apresenta 4 eventos de perda de massa em atmosfera de ar sintético (Tabela 8). O primeiro refere-se à perda de água e à decomposição da goma ocorre em três estágios, a temperatura máxima

dos eventos são similares aos obtidos por Silva e col. (2006). As GCX's apresentaram comportamento diferente à GC, com somente um evento de decomposição que ocorrem em torno de 300°C e uma diminuição na porcentagem residual. Essa diferença de comportamento para os derivados oxidados pode ser atribuído à facilitação no processo de decomposição em atmosfera oxidativa devido aos grupos aldeídos (mais reativos).

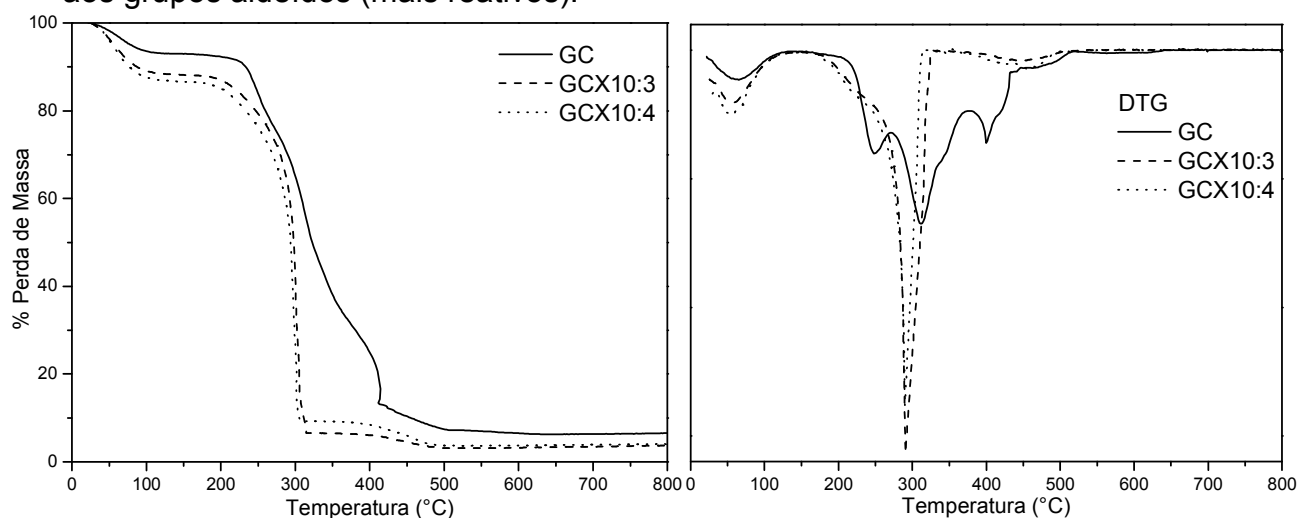


Figura 19. Curva de TGA e DTG para a GC e derivados oxidados em atmosfera de ar sintético.

Tabela 8. Parâmetros obtidos do TGA para a GC e derivados oxidados em atmosfera de ar sintético.

Amostra	Temperatura Máxima do Evento (°C)				Resíduo (%) em 800°C
	1	2	3	4	
GC	55	248	311	400	6,4
GCX10:3	56	—	299-305	—	3,7
GCX10:4	57	—	300	—	4,1

4.3 Caracterização dos Derivados Sulfatados

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

O rendimento da reação para as diferentes concentrações de ácido está listado na Tabela 9. O aumento do volume de ácido promove uma diminuição

significativa no rendimento. Comparar a sulfatação da goma do cajueiro com a de outras gomas obtidas por metodologia semelhante, não foi possível, uma vez que esta informação não está disponível tanto em O'Neill (1955) quanto em Ono e col. (2003).

Aparentemente, rendimentos de mais de 100% foram apresentados por Geresh, Mamontov e Weinstein (2002) para a sulfatação de polissacarídeos extraídos de microalgas vermelhas. Neste caso, embora não especificados, os rendimentos foram calculados a partir da massa do produto sulfatado obtido em relação à massa inicial de polissacarídeo. No entanto, os rendimentos são mais corretos se calculados levando em conta que a introdução de cada grupo SO_3Na provoca um aumento na massa de 102 g/mol.

No caso da goma de cajueiro, sendo a galactose o seu principal constituinte [de Paula e Rodrigues (1995)], espera-se que a massa molar final dos derivados sulfatados seja de $162 + \text{GS} \times 102$ g/mol, onde 162 g/mol é a massa molar da unidade glicosídica na cadeia polimérica. A equação (4) expressa o modo mais adequado de se calcular o rendimento.

$$\text{Rendimento (\%)} = 100 m_{\text{final}} (1 + \text{DS} \times 102/162) / m_{\text{inicial}} \quad \text{Equação 4}$$

onde m_{final} e m_{inicial} são as massas dos derivados sulfatados e do polissacarídeo, respectivamente.

Existem muitos métodos para a sulfatação de polissacarídeos utilizando diferentes reagentes e solventes, como o ácido sulfúrico (H_2SO_4), o trióxido de enxofre com piridina ($\text{SO}_3\text{-py}$), o trióxido de enxofre em dimetilformamida ($\text{SO}_3\text{-DMF}$), ácido monoclorosulfônico com piridina (ACS-py), ácido monoclorosulfônico com piridina em formamida (ACS-py-FA) e assim por diante.

Tabela 9. Comparação entre as condições da sulfatação e as características dos derivados de polissacarídeos obtidos.

Amostra	Concentração (%m/v)	Reagente da sulfatação	RS/UG ^a	Temperatura (°C)	Rendimento ^b (%)	GS	Referência
Pululana	20	SO ₃ -py	4	60	91	1,50	Mihai,
	20	SO ₃ -py	4	80	90	1,22	Mocanu e
	20	SO ₃ -DMF	4	60	42	1,32	Carpov
	20	SO ₃ -DMF	4	80	6	1,22	(2001)
Polissacarídeo do epimedium ^c	2	ACS-py	0.86	60	20	1.12	Lu e col.
	2	ACS-py	0.86	80	16	0.83	(2008)
	2	ACS-py	0.86	95	39	0.35	
Goma do Cajueiro	0.7	ACS-py-FA	4.9	4	53	0.02 ^d	Neste
	0.7	ACS-py-FA	14.6	4	26	0.24 ^d	trabalho
	0.7	ACS-py-FA	19.4	4	15	0.88 ^d	

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

^b calculado pela equação (4)

^c foram escolhidos os maiores GS entre as diferentes razões ACS-py

^d calculado pela equação (5)

Uma comparação entre o rendimento dos diferentes métodos aplicados a polissacarídeos também está mostrado na Tabela 9. As condições das reações são muito diversificadas, incluindo polissacarídeo, concentração, razão molar do reagente / polissacarídeo, tempo e temperatura da reação, além do tipo de reagente e solvente.

A sulfatação da goma de cajueiro foi realizada com menor concentração de goma, maior RS/UG e em temperatura mais baixa. O rendimento obtido está na faixa dos relatados para o polissacarídeo do epidemium, utilizando o ACS como reagente (16-39%) [Lu e col. (2008)]. Maiores rendimentos foram registrados para os derivados da pululana, utilizando SO₃-py, utilizando uma solução muito concentrada do polissacarídeo [Mihai, Mocanu e Carpov (2001)]. O menor rendimento foi observado para a maior concentração de ácido monoclorosulfônico para goma de cajueiro e pode ser atribuído à degradação da cadeia do polissacarídeo.

O grau de sulfatação (GS) foi determinado utilizando o teor de S (%) e C (%) obtido por microanálise (Tabela 10) e utilizando a equação (5). A equação proposta é baseada na estrutura do polissacarídeo, considerando que o GS é definido como o número de grupos SO₃⁻ por unidade monossacarídica. Como na goma do cajueiro os constituintes principais são hexoses [de Paula e Rodrigues (1995); Silva e col. (2004)] podemos considerar então que o GS como o número de grupos SO₃⁻ por 6 carbonos da unidade glicosídica (Equação 5) [Melo e col. (2002)].

$$GS = (\%S / \text{massa atômica de S}) / (\%C / \text{massa atômica do C} \times 6) \quad \text{Equação 5}$$

Tabela 10. Efeito da concentração do ácido monoclorosulfônico na reação de sulfatação da goma do cajueiro.

Produto	RS/UG	%S	% C	GS
GCS2	4.9	0,29	38,8	0,02
GCS6	14.6	3,40	33,2	0,24
GCS8	19.4	9,33	23,8	0,88

Diferentes valores de GS foram obtidos para os derivados sulfatados da goma através da variação do valor de ácido monoclorosulfônico (Tabela 10). Aumentar a razão RS/UG aumentou o GS para a GC. Resultados semelhantes foram obtidos

para a sulfatação de polissacarídeos a partir das sementes de *Lupinus polyphyllus* para razão de até 2,6; para razões maiores foram observados GS menores [Vogl, Paper e Fanz (2000)]. Mihai, Mocanu e Carpov (2001) observaram um aumento no GS até uma razão RS/UG igual a 3,0, mas um aumento não significativo quando RS/UG foi aumentada para 4,0 para a sulfatação de pululana utilizando $\text{SO}_3\text{-py}$.

Comparando o GS de diferentes polissacarídeos com semelhantes RS/UG (Tabela 9) é possível concluir que a reação utilizada neste trabalho conduziu a uma sulfatação menos eficiente do que a relatada a partir de outros autores [Lu e col. (2008); Mihai, Mocanu e Carpov (2001)]. Esse resultado pode ser atribuído à baixa temperatura e concentração da solução de polissacarídeo que as aplicadas pelos outros autores (temperatura superior a 30°C , e concentração superior a 5%), apesar dos diferentes agentes de sulfatação.

A temperatura de 4°C foi utilizada para a goma de cajueiro a fim de evitar alta degradação do polissacarídeo (O'Neill, 1955). Quando a mesma temperatura, concentração e solventes foram utilizados, um GS de 0,50 e 0,62 foram obtidos por Ono e col. (2003), mesmo com maior concentração de reagente (RS / UG = 31,6) que a aplicada para a goma do cajueiro.

4.3.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho

A presença de grupos sulfato na GCS foi identificada por comparação dos espectros na região do infravermelho para a GC e os derivados GCS (Figura 20). Os espectros dos derivados apresentam uma nova absorção em 1259 cm^{-1} , atribuído à vibração de estiramento assimétrico do S=O [Mahner, Lechner, e Nordmeier (2001)].

Esta nova absorção aparece em todas as amostras sulfatadas e se torna mais intensa à medida que o GS aumenta, a partir de GCS2 para GCS8. Outras absorções que podem ser atribuídas a vibrações do estiramento simétrico dos grupos C-O-S e C-O-SO₃ podem aparecer em $800\text{-}820\text{ cm}^{-1}$ e em $840\text{-}860\text{ cm}^{-1}$ nas gomas sulfatadas, relacionadas à substituição do grupo sulfato em C-6 e C-4, respectivamente [Yang e col. (2003)]. Porém, no espectro das GC sulfatados não há absorções nestas regiões, apesar disso, o perfil na região dos $600\text{ - }900\text{ cm}^{-1}$ nos derivados GCS6 e, especialmente, no GCS8, diferenciam-se da GC.

Na goma do cajueiro, as absorções em 775 , 711 e 603 cm^{-1} podem ser atribuídas à deformação axial assimétrica do anel na ligação C-O-C [Mahner,

Lechner, e Nordmeier (2001)]. Para os derivados, a absorção em 711 cm^{-1} desaparece e as outras duas foram transferidas para número de onda maiores, 781 e 638 cm^{-1} . A mudança para valores maiores, na ordem de 10 a 40 cm^{-1} , também foi observado por Mahner, Lechner e Nordmeier (2001) após a sulfatação da pululana. Isto indica que, embora não atribuído diretamente a vibrações do grupo sulfato, as absorções na região $600\text{-}800\text{ cm}^{-1}$ estão correlacionados a sulfatação.

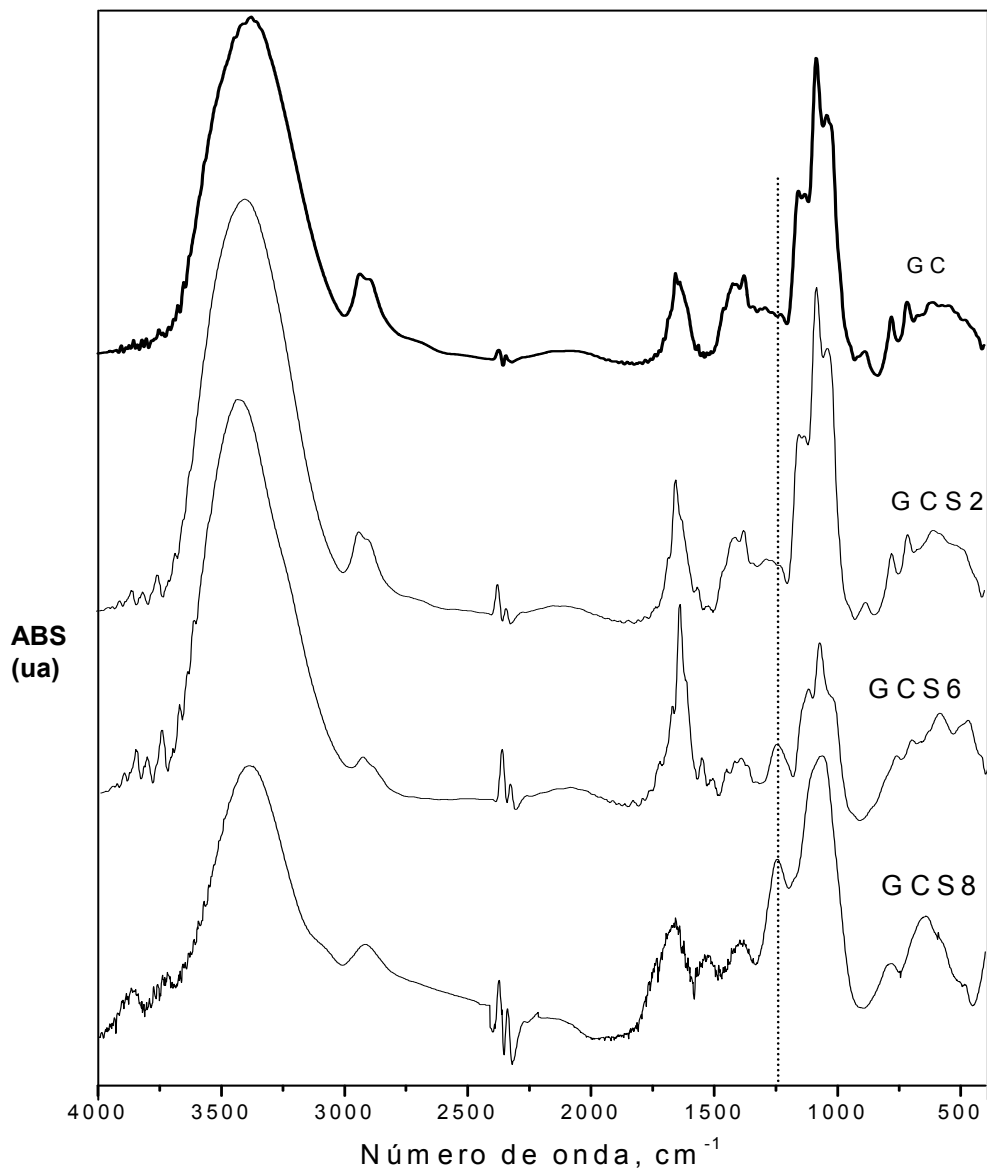


Figura 20. Espectro na região do infravermelho para GC e derivados sulfatados.

4.3.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

O espectro de ^{13}C BB (Figura 21) da amostra sulfatada GCS6 mostra algumas diferenças em relação ao espectro da goma não modificada. Observa-se que o sinal do anomérico da ramnose não aparece, no entanto, é possível observar a correlação no espectro bidimensional na região de ^1H - ^{13}C HSQC (δ 4,81/101,3) (espectro não mostrado). A diminuição relativa do sinal atribuído a glucose indica possível degradação das cadeias laterais. Os sinais referentes aos anoméricos da galactose 1 \rightarrow 3 são ainda observados claramente tanto no espectro unidimensional como no HSQC. Outra notável mudança é observada na região de δ 64-61, em que os sinais apresentam intensidades relativas menores que aquelas observadas para a GC.

Um novo sinal é observado para a GCS6 no espectro de ^{13}C BB (Figura 21) com intensidade muito baixa, e o mesmo é ligeiramente observado no espectro de ^{13}C DEPT 135 com amplitude oposta a CH e CH_3 (Figura 22). A confirmação da hidrogenação desse sinal pode ser feita no espectro bidimensional ^1H - ^{13}C HSQC, a partir do qual, foi possível observar a correlação do sinal em δ 68,7 com o do próton δ 4,2. A substituição por grupos sulfatos desloca os sinais do carbono α em cerca de δ 6 a 8 para região de maior deslocamento químico e os sinais dos prótons em cerca de δ 0,4 a 0,7 [Rashid e col. (1990)]. Esses dados sugerem que CH_2 livre, que mostram sinais de carbono na região de δ 61 a 64 e dos prótons em torno de δ 3,6 a 3,9, são substituídos por grupos sulfatos.

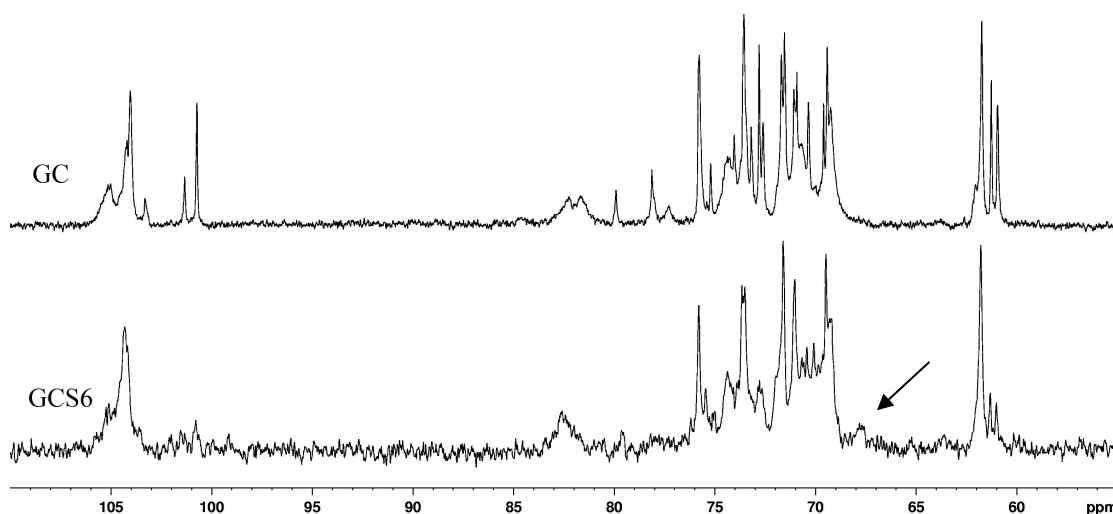


Figura 21. Espectro de RMN ^{13}C a 70°C em D_2O .

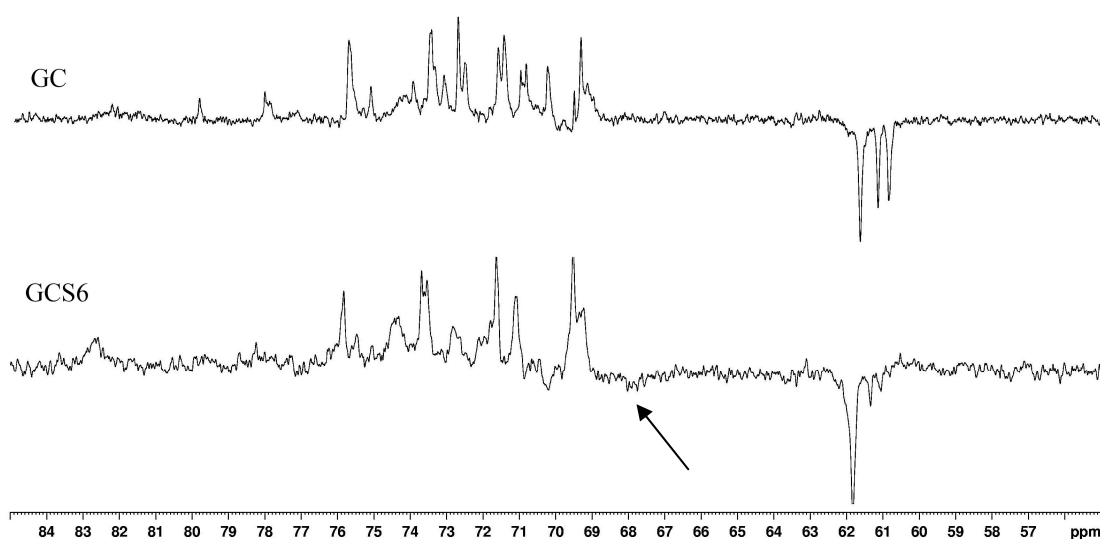


Figura 22. Espectro de RMN ¹³C - DEPT 135 a 70 °C em D₂O.

4.3.4 Cromatografia de Permeação em Gel

A massa molar e o grau de sulfatação são importantes parâmetros que influenciam as atividades biológicas [Yang e col. (2003)]. A goma de cajueiro tem massa molar viscosimétrica de $1,8 \times 10^5$ g/mol [Silva e col. (2004)]. O valor absoluto da massa molar média dos derivados sulfatados só pode ser determinada por GPC se o cromatógrafo for acoplado a um detector *multiangle laser light scattering (MALLS)*, que não necessita de padrões para calibrar a coluna. Quando outros detectores são utilizados, como índice de refração, é necessário padrões de diferentes massas molares na calibração. Pululana é freqüentemente utilizada para polissacarídeos. Infelizmente, esse padrão não é suficiente para polissacarídeos carregados devido à rigidez da cadeia e extensão, como consequência da repulsão eletrostática.

Os cromatogramas de GPC para o GC e derivados sulfatados podem ser visto na Figura 23. Observa-se uma diminuição no volume de eluição comparando as curvas de GC ($V_e = 8,84$ mL) com CGS6 ($V_e = 8,74$ mL). Se nenhuma degradação ocorre na cadeia, era esperado que as amostras sulfatadas eluissem em um volume menor do que ao do polissacarídeo não-modificado, devido ao aumento da massa molar e da repulsão entre as cargas dos novos grupos. A massa molar aumentará cerca de 15% em GCS6 (GS = 0,24) e uma mudança de 0,10 mL é baixo se considerarmos o efeito do aumento da massa molar e da repulsão,

portanto, provavelmente a cadeia está degradada. O ombro em 9,6 mL está de acordo com esta hipótese.

O cromatograma da GCS8 apresentou um volume de eluição semelhante ao da GCS6, mesmo com maior GS (0,88). Como a massa molar e, também, a carga da cadeia aumentam de CGS6 para CGS8, um menor volume de eluição era esperado. Portanto, a degradação da cadeia GCS8 é superior do que em GCS6. O aumento na degradação com o aumento do GS também foi observado na sulfatação da galactomanana [Vogl, Paper e Fanz (2000)] e polissacarídeo Lacker [Yang e col. (2003)]. Aumento da degradação com o aumento do grau de substituição foi descrito para a carboximetilação [Silva e col. (2004)] e para a oxidação de goma de cajueiro [Cunha e col. (2007)].

Considerando que nenhum pico ou ombro no cromatograma da goma do cajueiro é comparável com os dos cromatogramas da GCS6 ou GCS8, observa-se que não permanece goma não modificada nos derivados. Resultado diferente foi relatado por Mihai, Mocanu e Carpov (2001) que constataram que 40% de pululana não sulfatada continua no complexo a 80°C durante 4 horas. Estes resultados estão de acordo com os observados para o rendimento e para RMN.

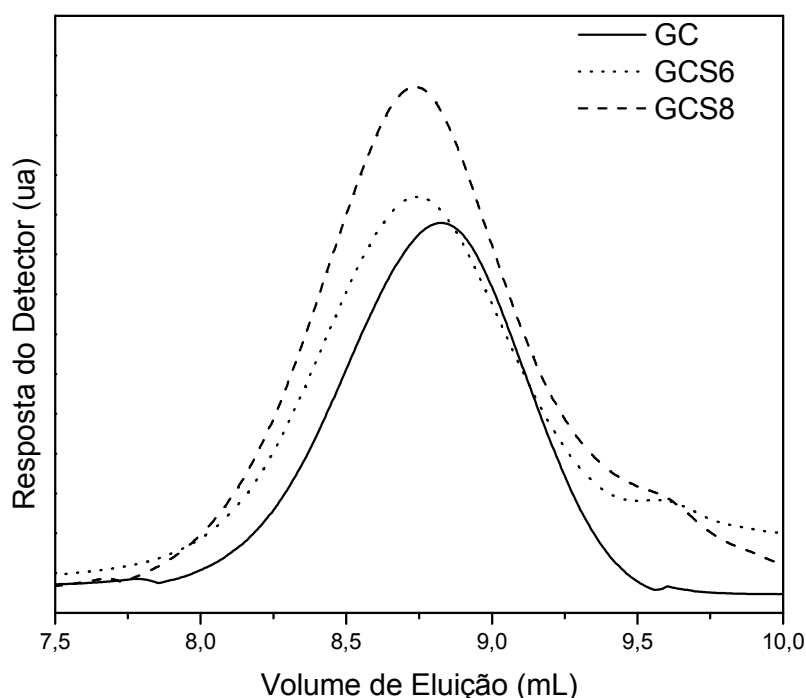


Figura 23. Cromatograma de GPC para soluções aquosas 0,1% m/v da Goma do Cajueiro (GC) e dos derivados sulfatados (GCS).

4.3.5 Reometria

Soluções aquosas (2,0% m/v) das amostras de GC e GCS apresentam baixa viscosidade (Figura 24). A taxa de cisalhamento da curva da GCS6 é muito semelhante à goma em todo intervalo. No entanto, a amostra com maior GS (GCS8) mostra um comportamento distinto até a taxa de cisalhamento de 80 s^{-1} . Aos 30 s^{-1} , por exemplo, o aumento da viscosidade do CGS8 é de cerca de 30% do valor original da goma. Em taxas de cisalhamento acima de 80 s^{-1} a sulfatação promove um aumento na viscosidade de apenas 4% em comparação com a GC não modificada.

A maior carga negativa induz a maior repulsão entre as cadeias e uma conformação macromolecular mais expandida. A viscosidade de todos os produtos finais dos polissacarídeos sulfatados foi semelhante ao da goma não modificada, mesmo sem evidência de degradação [Geresh, Mamontov e Weinstein (2002)].

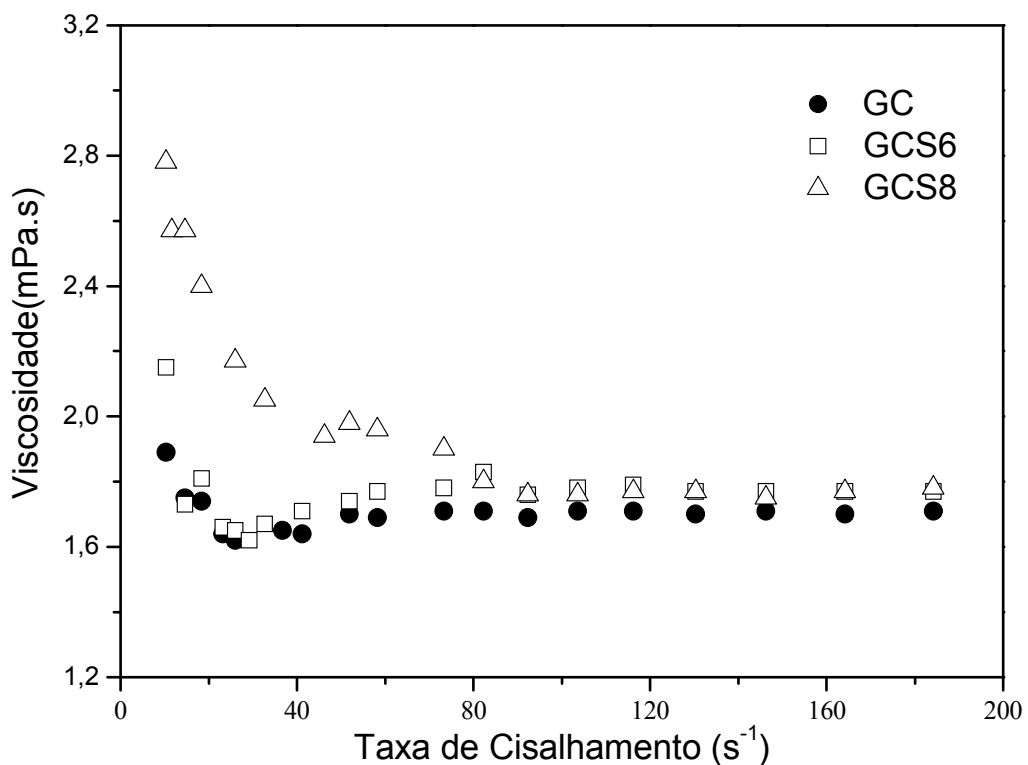


Figura 24. Gráfico de viscosidade em função da taxa de cisalhamento para soluções aquosas 2,0% m/v de GC e derivados sulfatados.

4.3.6 Análise Termogravimétrica

As curvas termogravimétricas da goma do cajueiro e dos derivados sulfatados encontram-se na Figura 25. A degradação das GCS's apresentaram 4 eventos de perda de massa como a goma não modificada (Tabela 11). O primeiro evento (T_1 em torno de 50°C) está relacionado à perda da água e está presente em todas as curvas. A goma do cajueiro mostra um evento em T_4 400°C , inexistente nos derivados sulfatados. As gomas GCS mostram um novo evento em T_5 $500\text{-}520^\circ\text{C}$, não presente na TGA do GC. Este evento está provavelmente relacionado à degradação térmica dos segmentos carboidratos contendo o grupo sulfato, porém a perda de massa não é proporcional ao grau de sulfatação.

O mecanismo de degradação de polissacarídeos sulfatados é desconhecido. A decomposição térmica da goma de cajueiro, como um polissacarídeo aniônico, envolve a desidratação, despolimerização, descarbonilação e decomposição pirolítica, com a evolução de H_2O , CO , CO_2 e CH_4 [Zohuriaan e Shokrolahi (2004)]. As diferenças na estrutura e nos grupos funcionais causam alterações nas rotas de degradação e/ou fragmentos resultantes.

O resíduo dos derivados GCS6 e GCS8 a 700°C são 15,8 e 23,9%, respectivamente, sendo maiores que o observado para a goma do cajueiro (6,4%). O resíduo nas gomas sulfatadas aumenta com o aumento do GS, isto indica que o último fragmento de resíduo contém grupos sulfatos.

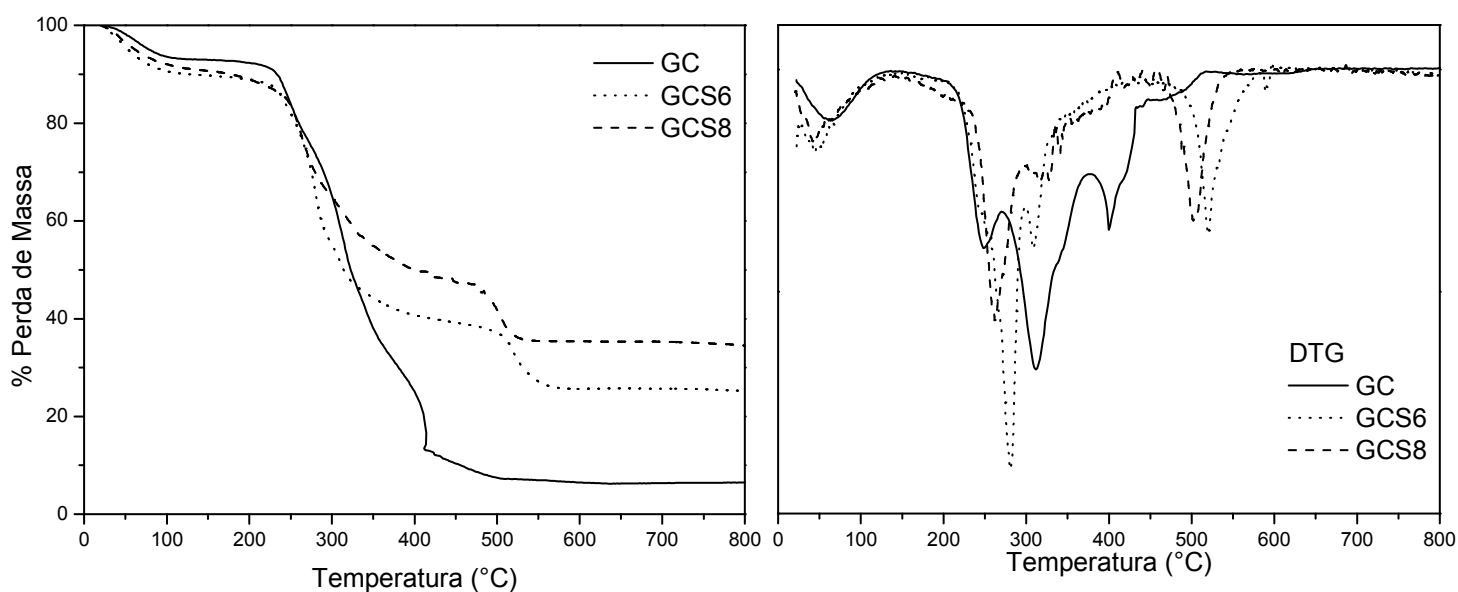


Figura 25. Curvas de TGA e DTG para a GC e derivados sulfatados em atmosfera de ar sintético.

Tabela 11. Parâmetros obtidos do TGA para a GC e derivados sulfatados em atmosfera de ar sintético.

Amostra	Temperatura Máxima do Evento (°C)					Resíduo (%) em 800°C
	1	2	3	4	5	
GC	55	248	311	400	–	6,4
GCS6	46	291	309	–	520	22,2
GCS8	43	262	316	–	502	30,3

4.4 Caracterização das Esferas de Gelatina e Goma do Cajueiro

4.4.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho

A Figura 26 apresenta os espectros de infravermelho para as esferas de gelatina e goma do cajueiro (1:10 e 1:1). A goma apresenta absorções características em 3379 e 2933 cm^{-1} , atribuídas, respectivamente, aos estiramentos de –OH, -CH; as absorções em 1150, 1080 e 1030 cm^{-1} são devido à deformação de C-O-C da ligação glicosídica e estiramentos de O-H de álcool. O espectro na região do IV para as esferas GEGC1:1 e GEGC10:1 apresentam absorções em 1080 e 1550 cm^{-1} , também observadas nos polímeros, no entanto com intensidades relativas distintas, o que indica que as esferas apresentam os dois polímeros.

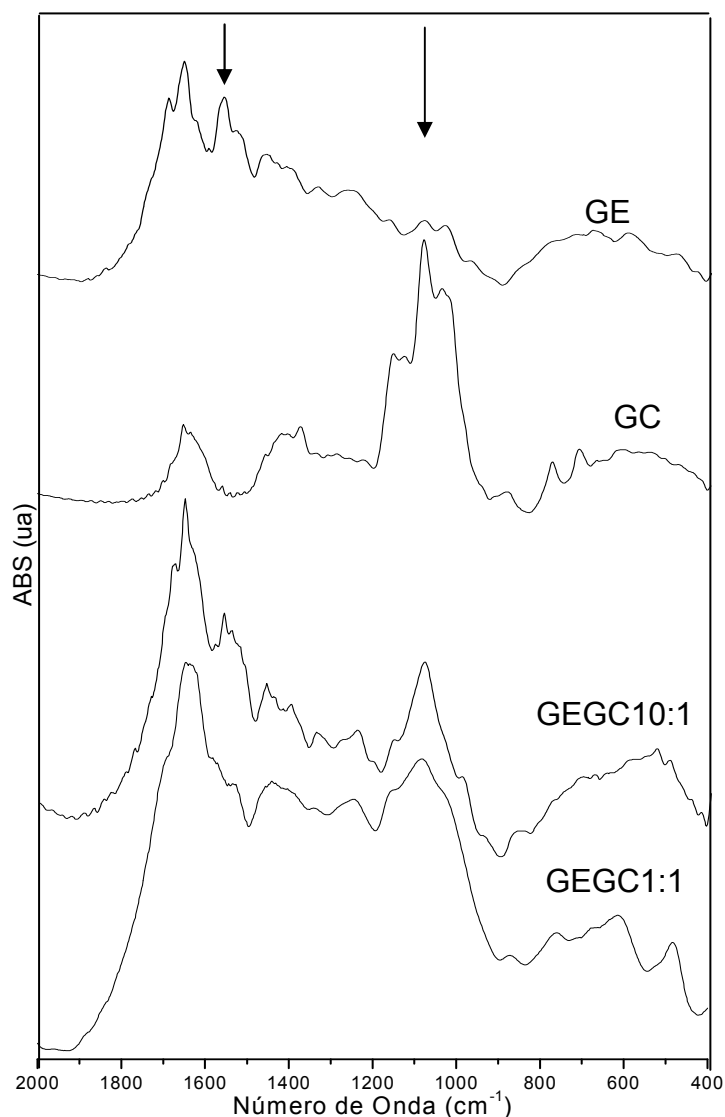


Figura 26. Espectro na região do infravermelho para esferas de GEGC's.

4.4.2 Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN ^1H da goma do cajueiro, gelatina e das esferas são mostrados na Figura 27. Observa-se no espectro da gelatina um grande número de sinais, dentro os quais é possível destacar regiões que apresentam os mais característicos, como na região de δ 3,9 a 4,7, comum de prótons α em relação à carbonila. No espectro observa-se um sinal em δ 3,94 atribuído ao αH da glicina, o qual é observado claramente no espectro da esfera GEGC1:1 e ainda o sinais entre δ 7,34 – 7,26 atribuídos a aromáticos e γNH_3 . Nas esferas observa-se a presença de sinais característicos da goma (δ 4,95 – anomérico da glucose) e da gelatina,

confirmando a presença de ambos os polímeros nas esferas como observado na análise de IV.

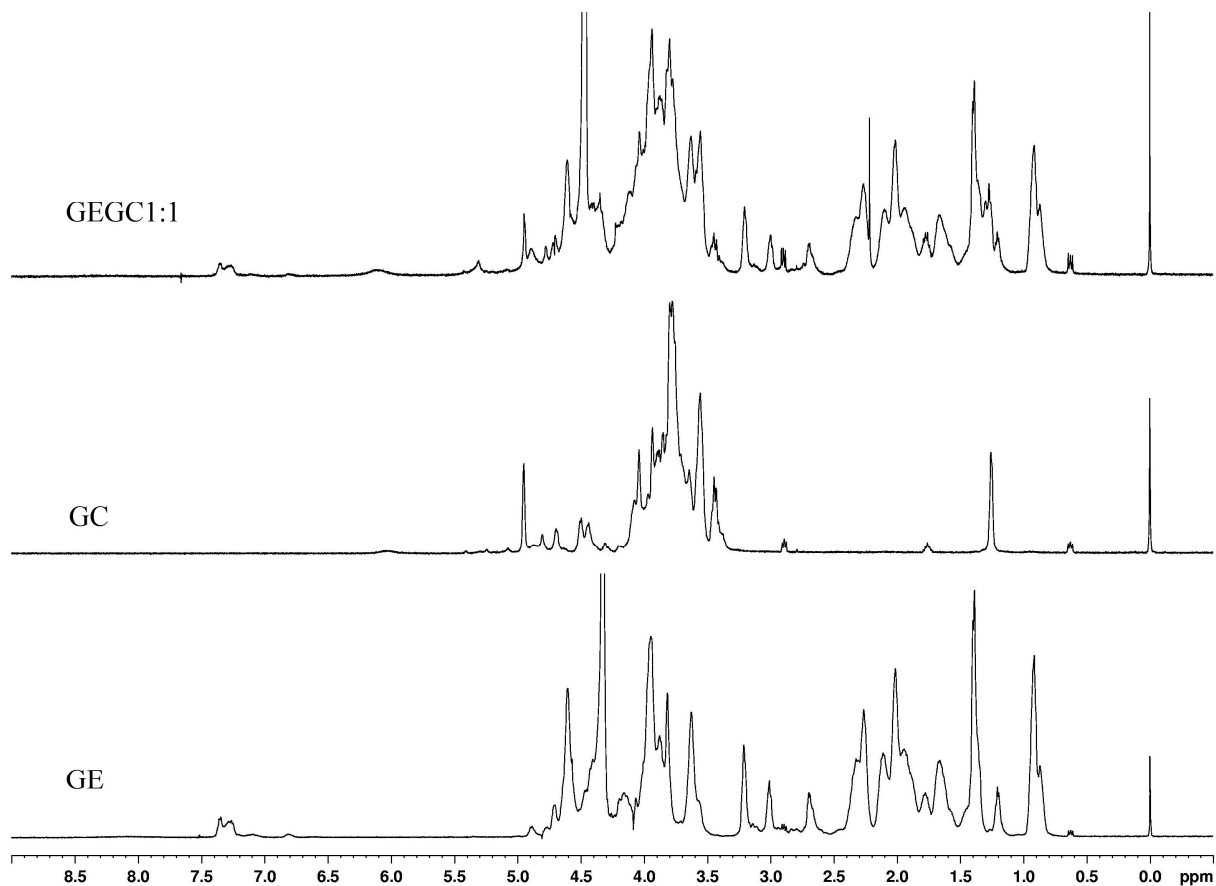


Figura 27. Espectro de RMN ^1H a 70°C em D_2O .

4.4.3 Análise Termogravimétrica

A curva termogravimétrica das esferas encontra-se na Figura 28 e apresenta um comportamento semelhante aos polímeros de origem. A gelatina apresenta três eventos de perda de massa. O primeiro e o segundo em 58°C e 322°C que são próximos aos eventos da goma do cajueiro, entretanto o último evento ocorre à temperatura bem superior (679°C) a verificada para a GC (400°C). Microesferas com elevada razão de gelatina (GEGC10:1) apresentam o mesmo número eventos das curvas termogravimétricas da gelatina, mas com temperaturas máximas dos eventos levemente superiores a da gelatina.

Para microesferas de GEGC na proporção de 1:1 pode-se observar a mudança no comportamento de degradação térmica. Na amostra GEGC1:1 os eventos de decomposição à 400°C para a GC e de 679°C para a GE não aparecem, entretanto é intensificado um evento em 552°C. As temperaturas máximas dos eventos estão sumarizadas na Tabela 12.

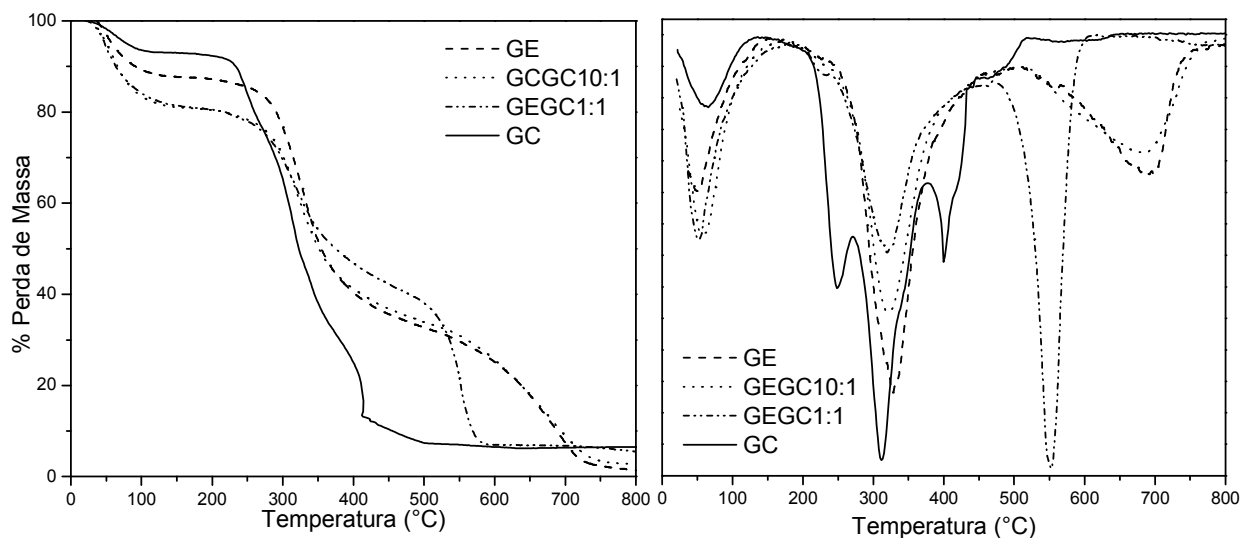


Figura 28. Curva de TGA e DTG para as esferas GEGC's em atmosfera de ar sintético.

Tabela 12. Parâmetros obtidos do TGA em atmosfera de ar sintético para as esferas.

Amostra	Temperatura Máxima do Evento (°C)						Resíduo (%) em 800°C
	1	2	3	4	5	6	
GC	55	248	311	400	–	–	6,4
GE	58	–	322	–	–	679	1,4
GEGC10:1	52	–	327	–	–	692	2,7
GEGC1:1	51	234	319	–	552	–	5,5

4.4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

O estudo morfológico das amostras (Figura 29) mostra que os géis formaram microesferas irregulares com diâmetros variando de 15 a 150 μm . Outra constatação é que as esferas têm superfícies rugosas e quanto maior a quantidade de GC em relação à quantidade de gelatina, maiores são as deformações, chegando

até a apresentar rachaduras. Rokhade e col (2006) também observaram superfícies rugosas de microesferas de gelatina e carboximetilcelulose.

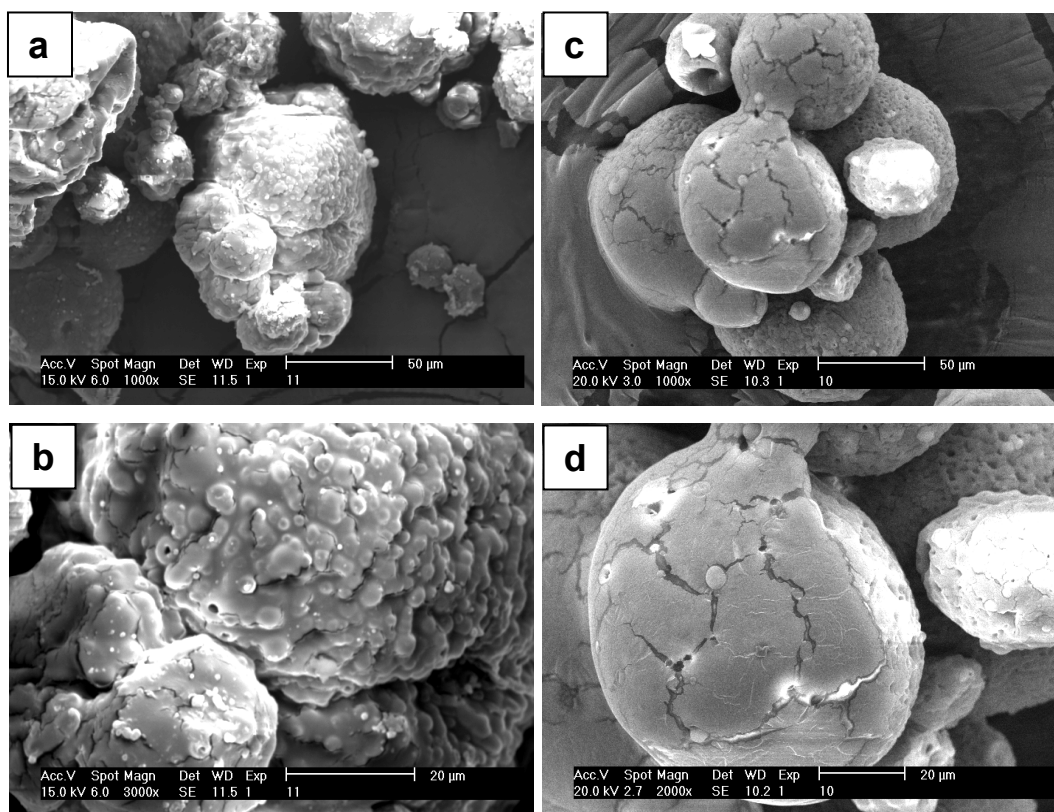


Figura 29. Microscopia eletrônica de varredura das microesferas: a, b - GE; c, d - GEGC1:1.

4.5 Caracterização de Esferas de Gelatina e Goma do Cajueiro Reticuladas

As esferas de gelatina/goma do cajueiro foram reticuladas com genipina para obtenção de microesferas de tipo semi-IPN (semi-interpenetradas).

4.5.1 Determinação de Genipina consumida na Reação de Reticulação

A Tabela 13 resume a quantidade de genipina que reagiu durante o processo de reticulação das esferas dos géis tipo IPN para formação das semi-IPN. Observa-se uma diminuição do rendimento e do consumo de genipina com o aumento da concentração de GC no gel. Esses dados indicam que como a reticulação ocorre nas aminas livres da gelatina, a adição de GC diminui esses pontos de reticulação e conseqüentemente o rendimento de produto insolúvel.

Tabela 13. Dados experimentais da reticulação para as esferas de GE e GEGC em 24 horas.

Produto	Massa de esfera (g)	Mol de genipina consumida	Mol de genipina / massa de esfera	Rendimento (%)
RGE	1,0	$1,90 \times 10^{-4}$	$1,90 \times 10^{-4}$	84,2
RGEGC10:1	1,0	$1,61 \times 10^{-4}$	$1,61 \times 10^{-4}$	79,7
RGEGC1:1	1,0	$1,01 \times 10^{-4}$	$1,01 \times 10^{-4}$	41,4

Para aumentar o consumo de genipina, adicionando assim mais pontos de reticulação, repetiu-se o procedimento anterior com um tempo de reticulação de 72 horas. A Tabela 14 resume os resultados obtidos, observa-se que o aumento do tempo de reticulação levou a um consumo praticamente idêntico de genipina para os distintos tipos de esferas, mesmo com o aumento na quantidade de goma. Esse resultado revela que a cinética da reação de reticulação nas primeiras 24 horas é diferenciado para as esferas, decrescendo com o aumento da quantidade de GC (Tabela 13), entretanto após 72 horas a quantidade em mol de genipina consumida por grama de esfera é praticamente a mesma não importando a quantidade de goma do cajueiro na esfera.

Tabela 14. Dados experimentais da reticulação para as esferas de GE e GEGC em 72 horas.

Produto	Massa de esfera (g)	Mol de genipina consumida	Mol de genipina / massa de esfera	Rendimento (%)
R'GE	1,0	$1,34 \times 10^{-3}$	$1,34 \times 10^{-3}$	87,5
R'GEGC10:1	1,0	$1,36 \times 10^{-3}$	$1,36 \times 10^{-3}$	90,4
R'GEGC1:1	1,0	$1,31 \times 10^{-3}$	$1,31 \times 10^{-3}$	85,3

4.5.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho

No espectro de infravermelho (Figura 30) para as esferas reticuladas com genipina observa-se o aparecimento de um pico em 1630 cm^{-1} que é atribuído ao estiramento do anel da molécula de genipina, indicando que a reticulação ocorre preferencialmente com o ataque nucleofílico das aminas livres ao carbono 3 da

genipina e também o decréscimo na intensidade da absorção em 1550 cm^{-1} referente ao grupo amins da gelatina, que também foi observado por Butler, Ng e Pudney (2003) para hidrogéis de quitosana reticulados com genipina.

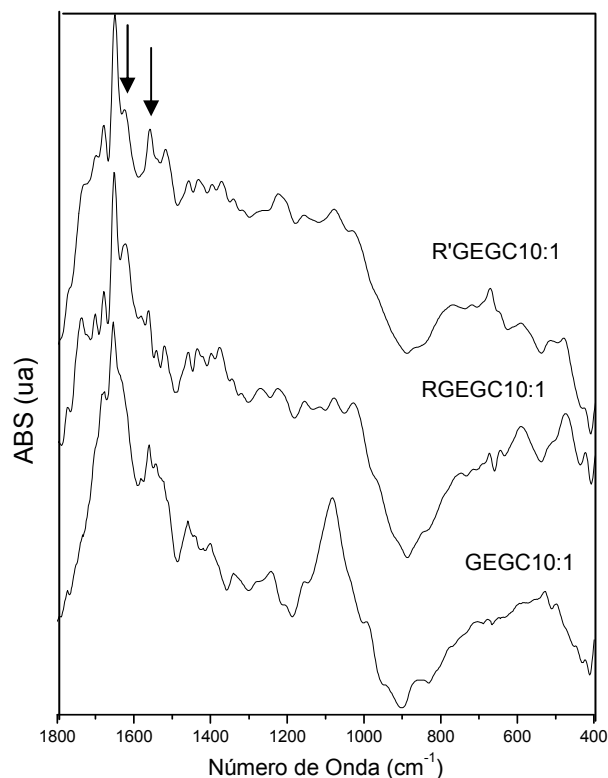


Figura 30. Espectro na região do infravermelho para as esferas GEGC's antes e após a reticulação de 24 e 72 horas com genipina.

4.5.3 Análise Termogravimétrica

A curva termogravimétrica das esferas reticuladas encontra-se na Figura 31 e apresenta um comportamento semelhante às esferas não reticuladas discutido no tópico 4.4.2, no entanto, o aumento no tempo de reticulação leva a um aumento do evento de decomposição em torno de 500°C e para as esferas R'GEGC1:1 há o aparecimento de um ombro em 244°C . Observa-se também um aumento do resíduo com o aumento da quantidade de GC, mas esse aumento é menor para as esferas reticuladas por 72 horas. As temperaturas máximas dos eventos estão sumarizadas na Tabela 15.

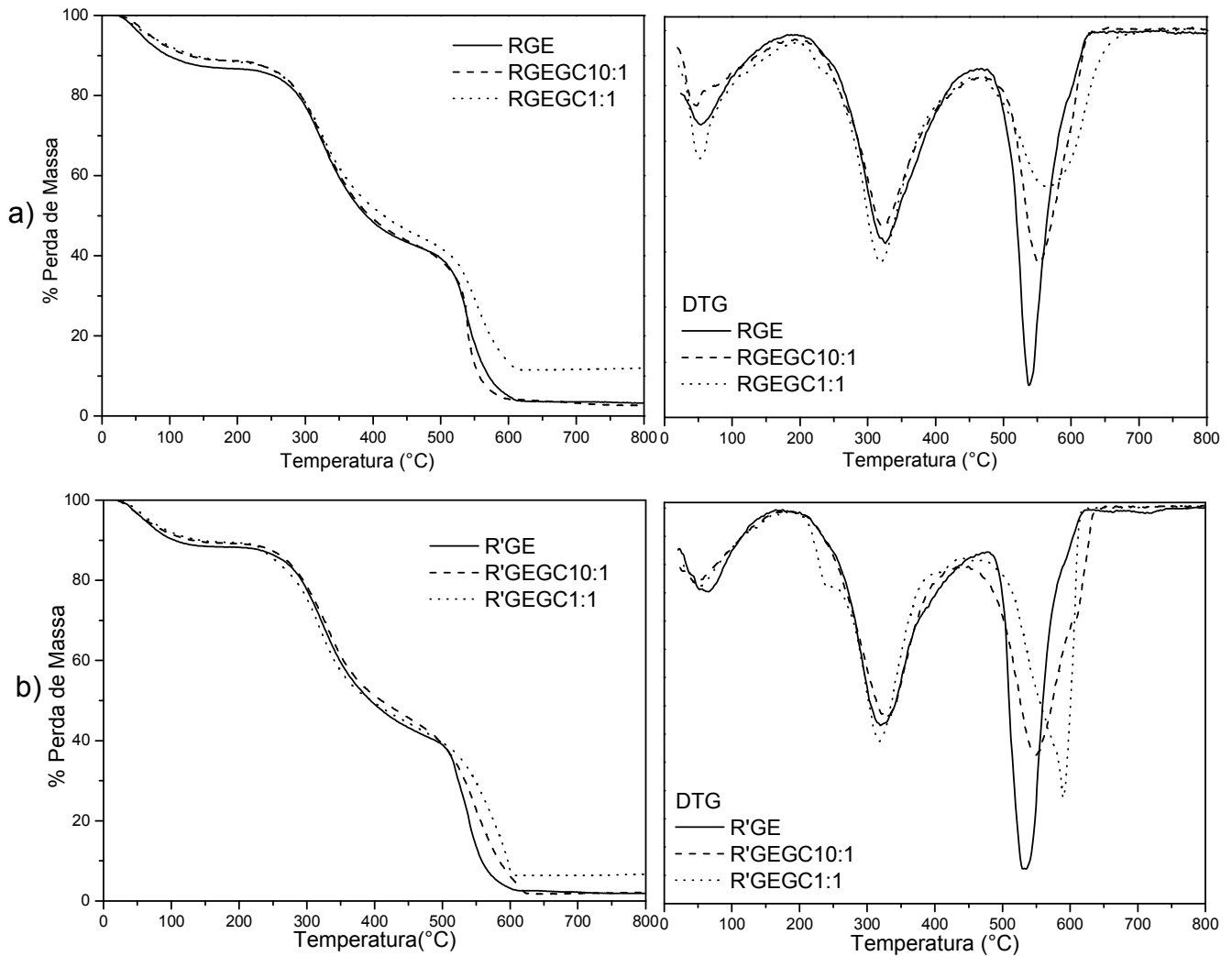


Figura 31. Curva de TGA e DTG para as esferas GEGC's reticuladas com genipina em atmosfera de ar sintético: a) por 24 horas e b) 72 horas.

Tabela 15. Parâmetros obtidos do TGA em atmosfera de ar sintético para as esferas reticuladas por 24 e 72 horas.

Tempo (horas)	Amostra	Temperatura Máxima do Evento (°C)			Resíduo(%) em 800°C
		1	2	3	
24	RGE	54	326	538	3,2
	RGEGC10:1	63	323	540	2,7
	RGEGC1:1	48	322	552	11,9
72	R'GE	65	320	538	1,9
	R'GEGC10:1	48	328	548	2,1
	R'GEGC1:1	54	318	591	6,6

4.5.4 Cinética de Intumescimento

O processo de intumescimento deve-se primariamente a penetração de água na matriz polimérica por capilaridade e difusão. A água interage com os grupos hidrofílicos, como hidroxilas, carboxilatos e amino, por ligação de hidrogênio. O processo de intumescimento por um gel pode ser controlado pela variação na sua composição, quantidade de reticulante consumido ou pelo método de síntese [Flory (1953)].

A Figura 32 apresenta a cinética de intumescimento para as esferas reticuladas.

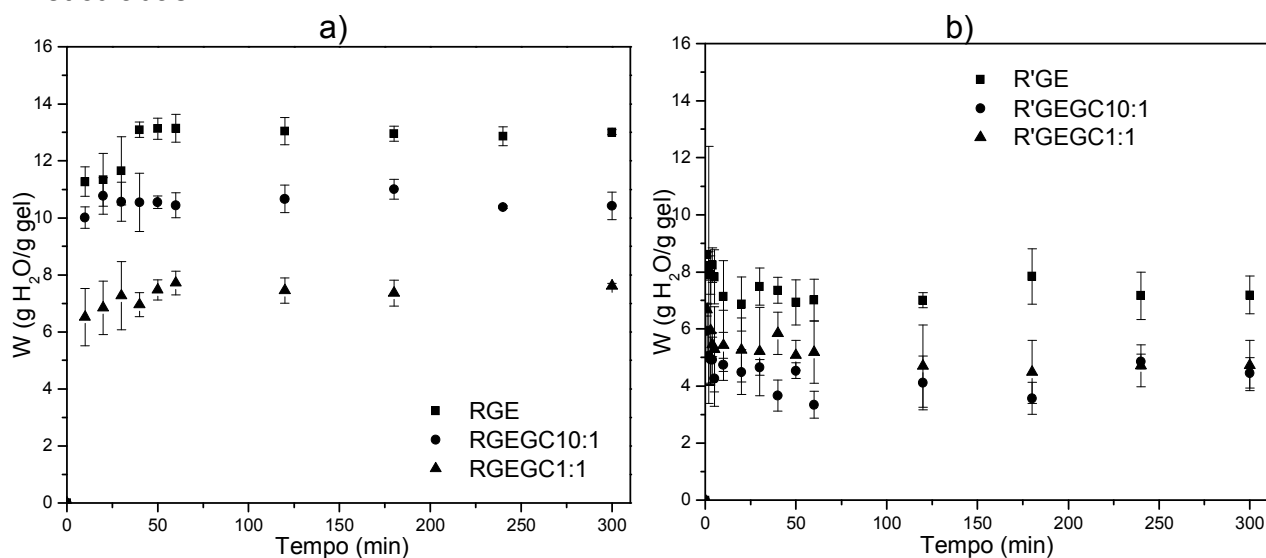


Figura 32. Cinética de intumescimento em água para as esferas GEGC's reticuladas com genipina: a) por 24 horas e b) por 72 horas.

O aumento da concentração de goma nas esferas aumenta a densidade da cadeia, o que a torna mais rígida, e em consequência a difusão das moléculas do solvente e o tempo de relaxação da cadeia das macromoléculas são reduzidos. Comportamento similar foi observado por Li e col. (2006) para hidrogéis de goma guar com poli(ácido acrílico). Yao e col. (2004) observaram uma diminuição na capacidade de intumescimento para géis de gelatina reticulados com diferentes concentrações de genipina.

A Tabela 16 resume o valor médio da absorção de água quando o sistema atingiu o equilíbrio.

Tabela 16. Dados experimentais da cinética de intumescimento das esferas reticuladas.

Tempo (horas)	Produto	W_{eq} (g H ₂ O/g)
24	RGE	13,0 ± 0,3
	RGEGC10:1	10,6 ± 0,3
	RGEGC1:1	7,5 ± 0,4
72	R'GE	7,2 ± 0,7
	R'GEGC10:1	4,1 ± 0,5
	R'GEGC1:1	4,8 ± 0,9

4.6 Caracterização das Esferas de Gelatina e Goma do Cajueiro Oxidadas

As esferas produzidas por géis formados pela reação de reticulação entre os grupos funcionais dos polímeros que os constituem são denominados redes poliméricas híbridas, nesse caso a reação ocorre entre os grupos amina livres da gelatina com os grupos aldeído da goma do cajueiro oxidada via formação de uma base de Schiff.

4.6.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho

A Figura 33 apresenta o espectro das esferas de gelatina e goma do cajueiro oxidada e dos polímeros utilizados. De acordo com Rokhade e col. (2006) era esperado o aparecimento de um novo pico em 1647 cm⁻¹ do estiramento da C=N do grupo imina da base de Schiff, mas ocorre a sobreposição com o estiramento C=O da amida I da gelatina, como também do estiramento C=O do grupo aldeído da goma do cajueiro oxidada. O espectro da esfera de gelatina e goma do cajueiro oxidada apresenta contribuição de ambos os polímeros formadores.

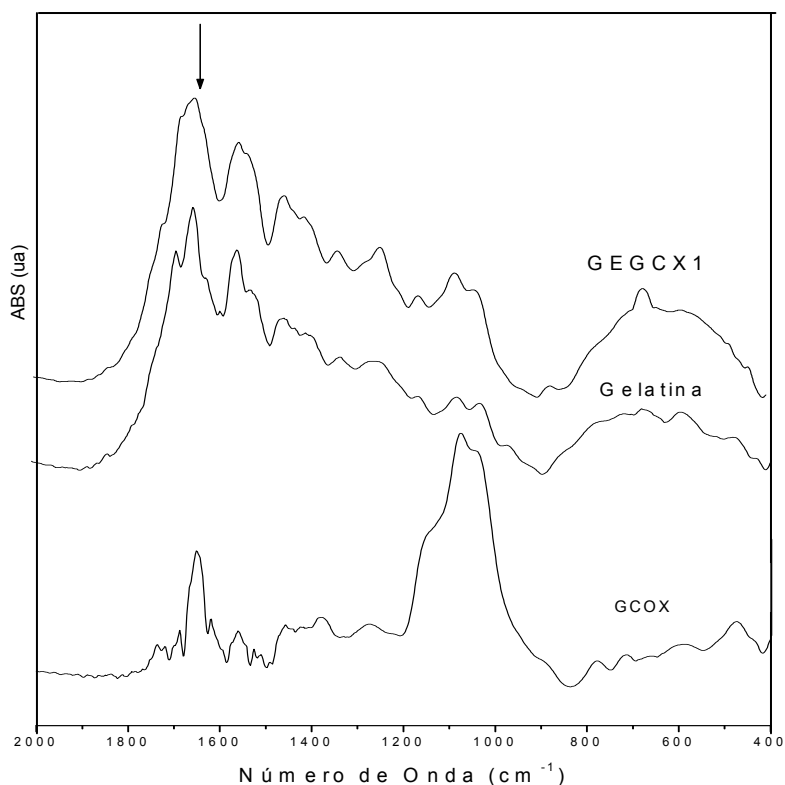


Figura 33. Espectro na região do infravermelho para as amostra de gelatina, goma do cajueiro oxidada (GCX) e da esfera gelatina/goma do cajueiro oxidada.

4.6.2 Ressonância Magnética Nuclear

A formação da base de Schiff pela reação de um grupo aldeído com o grupo amina livre da gelatina leva à formação de uma ligação covalente entre estes grupos ($R-CH=N-R$) (ver Figura 12 na página 19).

No espectro de RMN 1H (Figura 34) das esferas de goma oxidada e gelatina observamos além dos sinais presentes em ambos os polímeros, o desaparecimento do sinal em δ 5,7 presente na goma oxidada, o qual foi atribuído ao carbono aldeídico formando uma ligação hemiacetal intra-residual. Na formação da base de Schiff com a gelatina existe mudança na vizinhança do carbono, o que provocaria um deslocamento deste sinal para uma região de menor deslocamento químico.

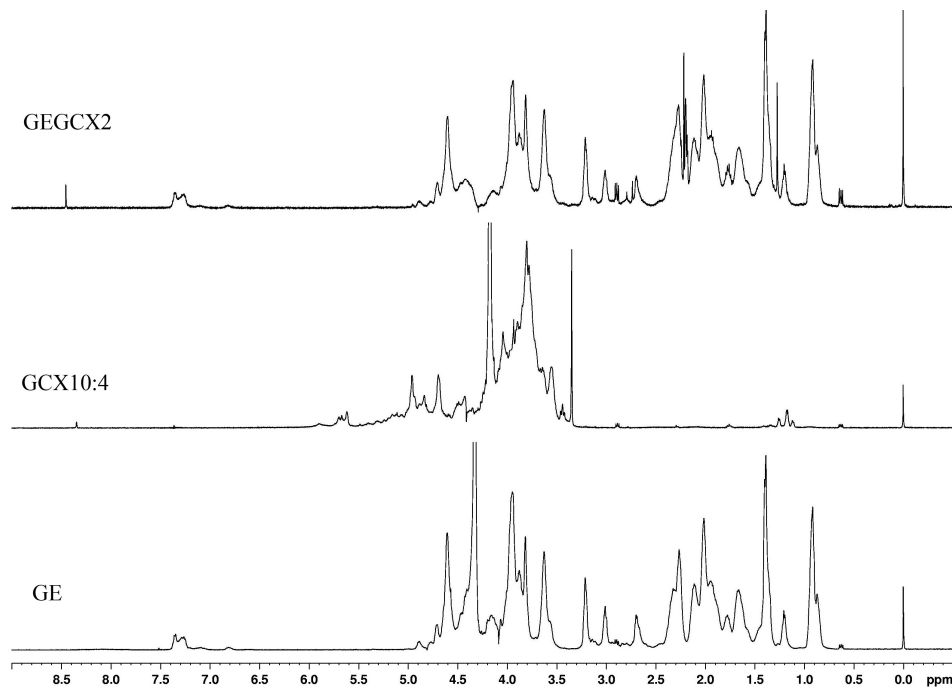


Figura 34. Espectro de RMN ^1H a 70°C em D_2O .

4.6.3 Análise Termogravimétrica

A Figura 35 mostra as curvas de degradação térmica para as esferas de GEGCX's em ar sintético. As esferas apresentaram o mesmo comportamento das esferas de GEGC, três eventos de perda de massa, sendo o primeiro de perda de água e os outros dois de degradação, no entanto o aumento do grau de oxidação leva a uma redução significativa da temperatura do último evento. A Tabela 17 apresenta a temperatura máxima para os eventos.

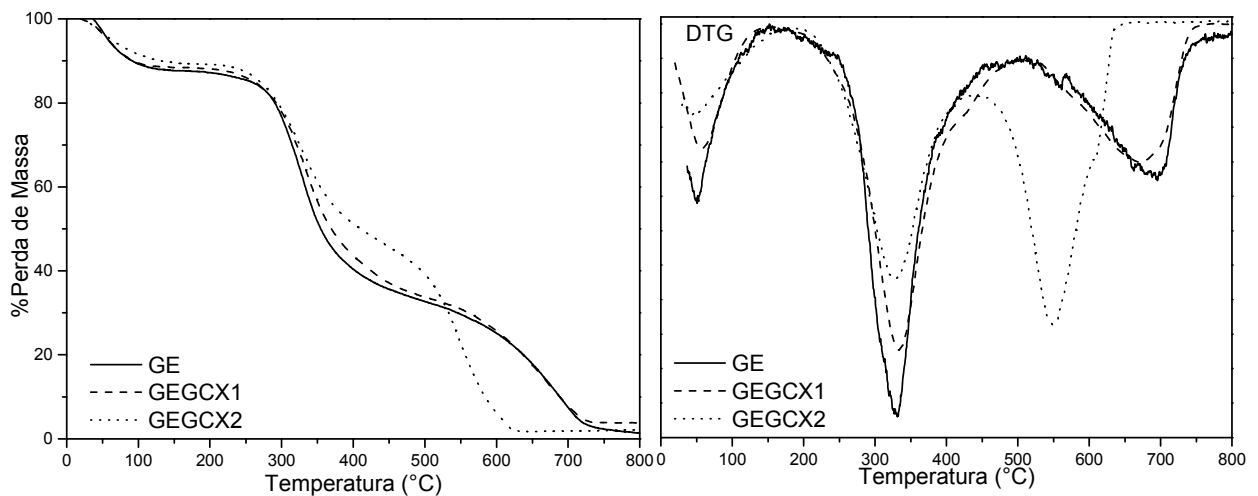


Figura 35. Curva de TGA e DTG para as esferas de GEGCX's em atmosfera de ar sintético.

Tabela 17. Parâmetros obtidos do TGA em atmosfera de ar sintético para as esferas GEGCX's.

Amostra	Temperatura máxima do evento (°C)				Resíduo (%) em 800°C
	1	2	3	4	
GE	58	322	–	679	1,4
GEGCX1	60	334	–	669	3,8
GEGCX2	51	328	550	–	2,1

4.6.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

As esferas de gelatina com goma do cajueiro oxidada apresentaram a mesma estrutura morfológica das esferas GE e GEGC, microesferas com diâmetro entre 15 a 150 μm , irregulares e com superfícies rugosas (Figura 36).

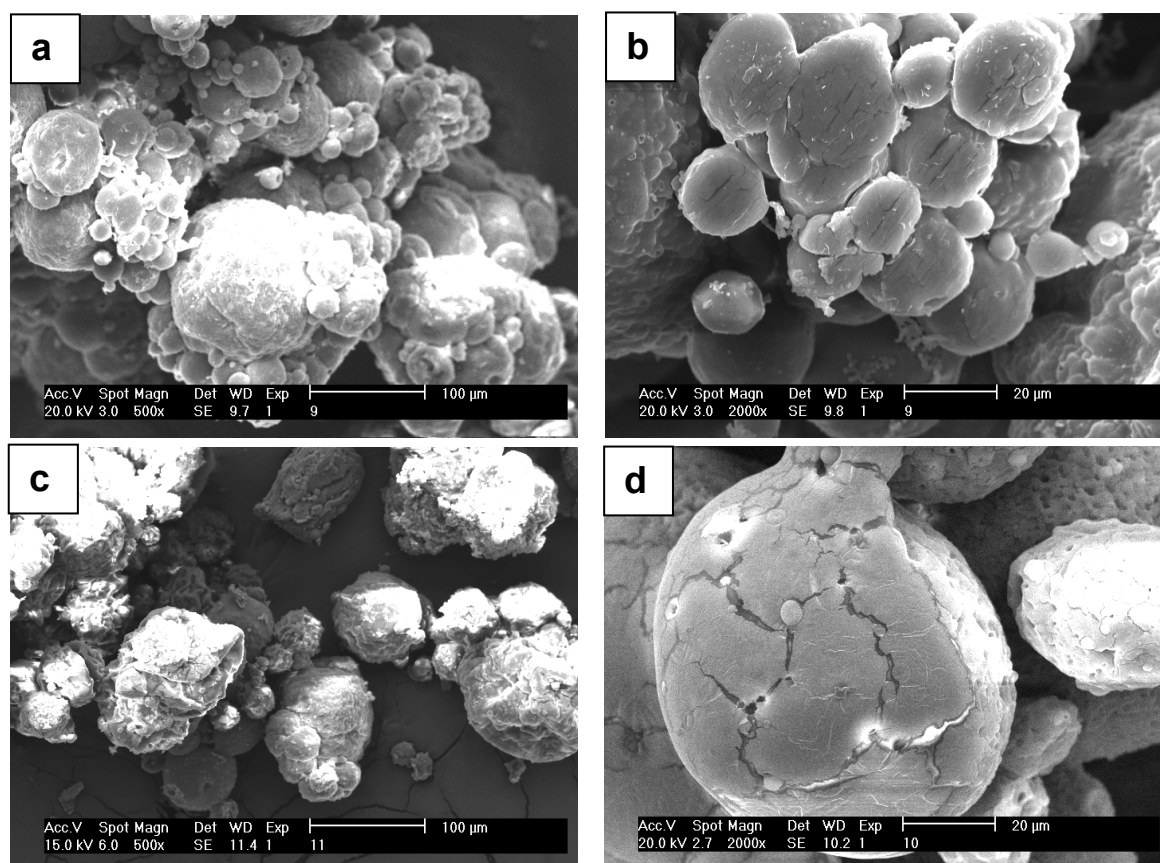


Figura 36. Microscopia eletrônica de varredura das microesferas GEGCX1: a,b; GE: c; GEGC1:1: d.

4.6.5 Cinética de Intumescimento

A Figura 37 apresenta as curvas da cinética de intumescimento para as esferas de GEGCX's e a Tabela 18 resume os valores médios de absorção de água após o sistema atingir o equilíbrio. Observa-se que as GEGCX's apresentaram uma absorção máxima de água no equilíbrio menor que as esferas RGEGC's e superiores as R'GEGC's. Além disso, não houve uma variação no intumescimento das esferas com o aumento de unidades oxidadas na goma, o que poderia permitir um aumento dos pontos de reticulação via base de Schiff.

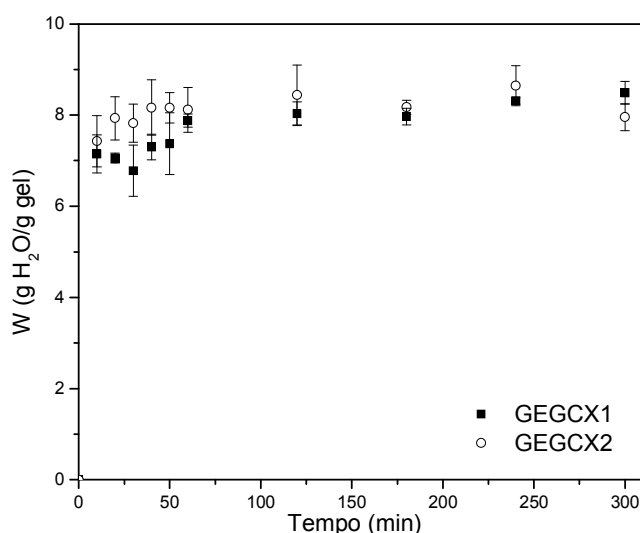


Figura 37. Curvas da cinética de intumescimento em água para as esferas GEGCX's.

Tabela 18. Dados experimentais da cinética de intumescimento em água das esferas GEGCX's.

Produto	W_{eq} (g H ₂ O/g)
GEGCX1	8,0 ± 0,3
GEGCX2	8,2 ± 0,4

4.7 Caracterização das Esferas de Gelatina e Goma do Cajueiro Sulfatada

As esferas formadas por gelatina/goma sulfatada são definidas como complexos polieletrólitos (CPE), pois são formadas pela interação eletrostática de um policátion (gelatina) e de um poliânion (goma sulfatada).

4.7.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho

A sulfatação da goma foi caracterizada pelo aparecimento de uma absorção em 1259 cm^{-1} , devido ao estiramento assimétrico da ligação S=O. Na esfera de GEGCS a identificação dessa região é dificultada uma vez que ocorre sobreposição com a amida III da gelatina, que absorve entre $1280 - 1240\text{ cm}^{-1}$ (Figura 38). No entanto, observa-se claramente a presença de polissacarídeo pela absorção em 1080 cm^{-1} (estiramento C–O–C) na GEGCS.

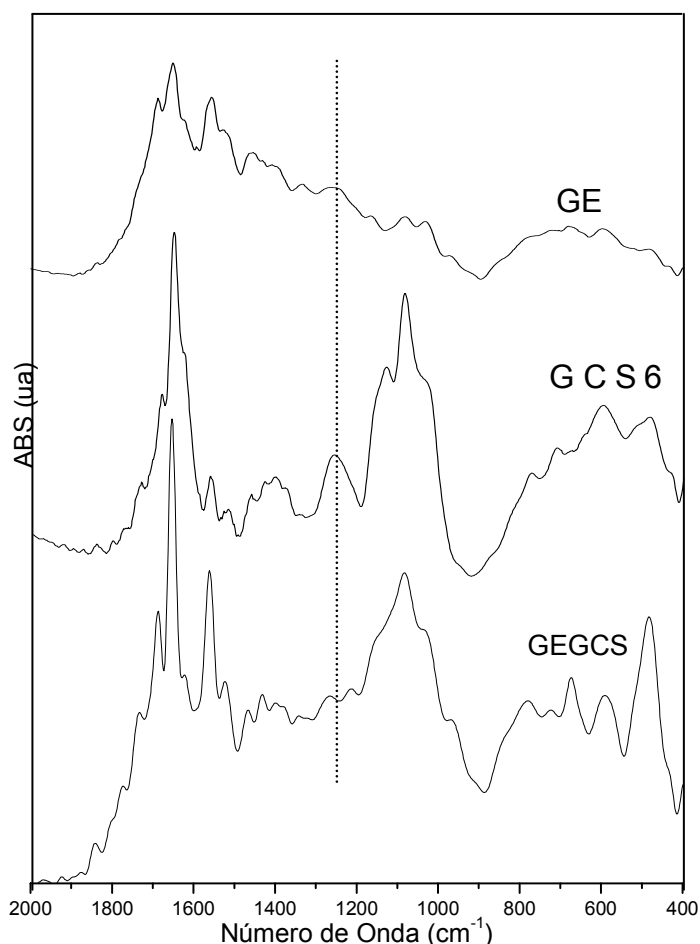


Figura 38. Espectro na região do infravermelho para a esfera GEGCS.

4.7.2 Análise Termogravimétrica

A curva termogravimétrica das esferas de gelatina e goma do cajueiro sulfatada encontra-se na Figura 39. Não se observa para as esferas o evento em 291°C da goma sulfatada e em 679°C da gelatina. Em relação ao início da decomposição, as esferas GEGCS começam a se decompor a temperaturas mais elevadas que a da goma sulfatada. Entretanto, os eventos em torno de 300°C e

500°C, possuem temperaturas próximas, mas superiores a da goma sulfatada. As temperaturas máximas dos eventos estão sumarizadas na Tabela 19.

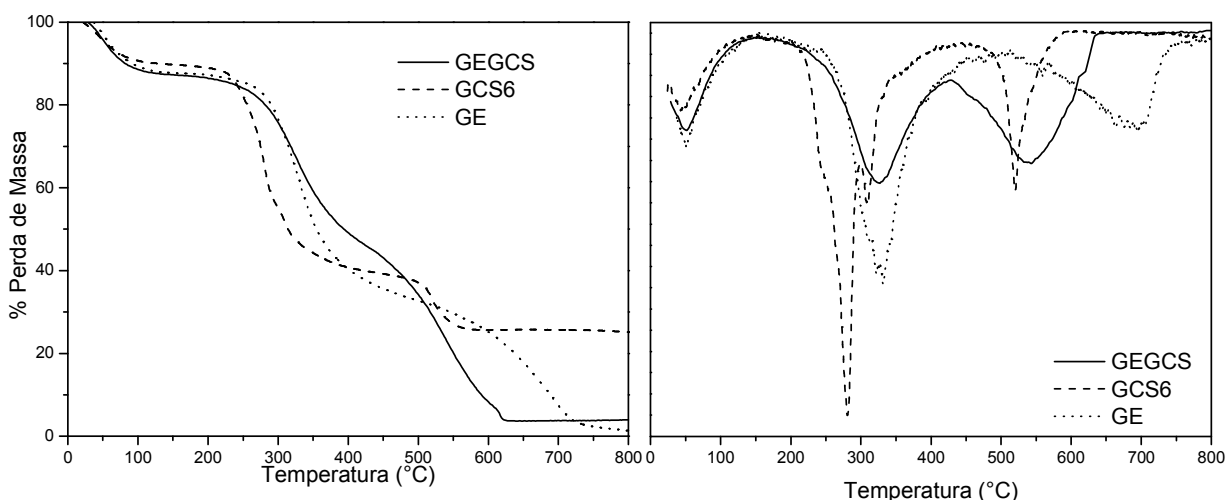


Figura 39. Curva de TGA e DTG para as esferas GEGCS em atmosfera de ar sintético.

Tabela 19. Parâmetros obtidos do TGA em atmosfera de ar sintético para as esferas.

Amostra	Temperatura máxima do evento (°C)					Resíduo (%) em 800°C
	1	2	3	4	5	
GE	58	–	322	–	679	1,4
GEGCS	52	–	327	542	–	4,0
GCS6	46	291	309	520	–	22,2

4.7.3- Cinética de Intumescimento

A Figura 40 apresenta as curvas de intumescimento para as esferas de GEGCS. Um máximo de absorção ocorre em 150 min (45 ± 4 g H₂O/g gel), seguida de uma pequena diminuição do intumescimento. Isto pode ter ocorrido devido a grande quantidade de água absorvida pelas esferas de GEGCS levando ao rompimento e solubilização das mesmas esferas durante o experimento. Este comportamento pode estar relacionado ao tipo de reticulação envolvida na formação das microesferas GEGCS, as quais são do tipo física, sendo reversíveis, diferentemente das presentes nas esferas de gelatina/goma reticulada com genipina e de gelatina/goma oxidada.

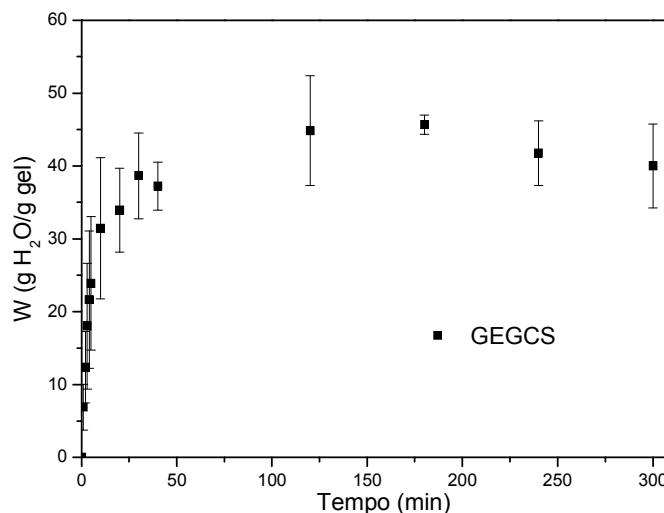


Figura 40. Curvas da cinética de intumescimento em água para as esferas GEGCS.

4.8- Comparação da Cinética de Intumescimento para as esferas de Gelatina e Goma do Cajueiro

A Tabela 20 apresenta um sumário dos valores de absorção de água para os diferentes tipos de esferas obtidas na razão de 10:1 de gelatina/goma do cajueiro ou gelatina/goma do cajueiro modificada. Observa-se que com o aumento no tempo de reticulação com genipina para as esferas de GEGC ocorreu uma perda de 56,3% na capacidade da absorção de água, no entanto, o aumento no grau de oxidação da goma presente nas esferas variou em somente 12,3% a capacidade de intumescimento. Já para as esferas com goma sulfatada, o W foi significativamente superior a todos os outros tipos de materiais, o que pode estar relacionado a interações mais fracas entre as redes poliméricas (do tipo física) levando a dissolução da microesfera após 150min de intumescimento.

Tabela 20. Dados experimentais da cinética de intumescimento em água para as esferas na proporção 10:1 de GEGC reticulada com genipina, GEGCX e GEGCS.

Produto	W _{eq} (g H ₂ O/g)
RGEGC10:1	10,3
R'GEGC10:1	4,5
GEGCX1	8,1
GEGCX2	7,1
GEGCS	45,0

5- CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método utilizado para sulfatação da goma do cajueiro foi eficiente para introdução de grupos sulfato, obtendo-se derivados com grau de substituição entre 0,02 a 0,88. A sulfatação aumenta a viscosidade em relação à GC em taxas de cisalhamento acima de 80 s^{-1} em apenas 4%.

A oxidação da goma do cajueiro com periodato de sódio foi eficiente para introdução de grupos aldeídos, obtendo-se derivados com razão de unidades glicosídicas/unidades oxidadas 10:3 e 10:4.

Microesferas de géis do tipo semi-IPN (gelatina e gelatina/GC reticuladas com genipina), do tipo HPN (gelatina/GCX) e do tipo CPE (gelatina/GCS) foram obtidas pelo método da emulsão água/óleo com tamanho variando de 15 a 150 μm .

A adição de GC não-modificada na formação das microesferas de gelatina diminui o rendimento de produtos insolúveis quando a reticulação com genipina é realizada por um período de 24 h. Com o aumento do tempo de reticulação a adição de goma praticamente não influencia no rendimento.

A modificação da goma do cajueiro introduz grupos aldeídos que podem interagir covalentemente com a gelatina produzindo microesferas de géis com capacidade de absorção dependente do grau de oxidação da goma. O aumento do número de unidades oxidadas da goma de 10:3 para 10:4 diminui a capacidade de intumescimento de até 12,3%.

As microesferas obtidas com maior tempo de reticulação com genipina (72 h) absorvem menor quantidade de água que as esferas gelatina/GCX e de gelatina/GCS.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aalmo, K. M., Painter, T. J., Periodate-oxidation of methyl glycopyranosides - rate coefficients and relative stabilities of intermediate hemiacetals. *Carbohydrate Research* **1981**, 89(1), 73.
- [Agnihotri, S. A.](#), [Aminabhavi, T. M.](#), Development of novel interpenetrating network gellan gum-poly(vinyl alcohol) hydrogel microspheres for the controlled release of carvedilol. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **2005**, 31(6), 491.
- Alban, S., Franz, G., partial synthetic glucan sulfates as potential new antithrombotics: a review. *Biomacromolecules* **2001**, 2(2), 354.
- Alban, S., Schauerte, A., Franz, G., Anticoagulant sulfated polysaccharides: Part I. Synthesis and structure-activity relationships of new pullulan sulfates. *Carbohydrate Polymers* **2002**, 47(3), 267.
- Amornrut, C., Toida, T., Imanari, T., Woo, E. R., Park, H., Linhardt, R., Wu, S. J., Kim, Y. S., A new sulfated beta-galactan from clams with anti-HIV activity. *Carbohydrate Research* **1999**, 321(1-2), 121.
- Aspinal, G. O., The polysaccharides. *Academic Press*, New York, **1982**, vol1, cap2.
- Bachmann, L., Gomes, A. S. L., Zezell, D. M., Collagen absorption bands in heated and rehydrated dentine. *Spectrochimica Acta Part A* **2005**, 62, 1045.
- Bae, Y. H., Kim, S. W., Hydrogel delivery systems based on polymer blend, blockco-polymers or interpenetrating networks. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **1993**, 11, 109.
- Balakrishnan, B., Mohanty, M., Umashankar, P. R., Jayakrishnan, A., Evaluation of an in situ forming hydrogel wound dressing based on oxidized alginate and gelatin. *Biomaterials* **2005**, 26(32), 6335.
- Bandeira, C.T., *Relatório Técnico da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA-CNPq*, **1991**, 6,1.
- Barbucci, R., Lamponi, S., Magnani, A., Renier, D., The influence of molecular weight on the biological activity of heparin like sulphated hyaluronic acids. *Biomaterials* **1998**, 19(7-9), 801.

- Bassani, L., Muller, K., Pohlmann, C. R., Guterres, S., Tavares Dalla Costa, T. C., Linck, B. V., Raffin, P. A., Stanikuaski, G. S., Tavares da Costa, T. C., Spray-drying colloidal suspensions of polymer nanocapsules or nanospheres, e.g. containing drug such as diclofenac, including addition of silicon dioxide before drying to improve suspensions stability. **2001**, PIBr9906081-A.
- Baumann, H., Faust, V., Concepts for improved regioselective placement of o-sulfo, n-sulfo, n-acetyl, and n-carboxymethyl groups in chitosan derivatives. *Carbohydrate Research* **2001**, 331(1), 43.
- Beck, R. C. R., Desenvolvimento tecnológico de micropartículas nanorevestidas: caracterização físico-química e biológica. Tese de Doutorado defendida na Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (2005).
- BeMiller, J. N., Industrial Gums. *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering* **1987** John Wiley e Sons, ed 7, 589.
- Berger, J., Reist, M., Mayer, J. M., Felt, O., Gurny, R., Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2004a**, 57(1), 35.
- Berger, J., Reist, M., Mayer, J. M., Felt, O., Peppas, N. A.; Gurny, R., Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2004b**, 57(1), 19.
- Blum, H., Beier, H., Gross, H. J., Improved silver staining of plant-proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **1987**, 8(2), 93.
- Bruneel, D., Schacht, E., Chemical modification of pululan .1. periodate-oxidation. *Polymer* **1993**, 34(12), 2628.
- Buchholz, F. L., Pepas, N. A. *Superabsorbent polymers science and technology*. Oxford Universit Press: ACS Symposium Series, **1994**.
- Butler, M. F., Ng, Y.-F., Pudney, P. D. A., Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* **2003**, 41, 3941.

- Choi, Y. S., Hong, S. R., Lee, Y. M., Song, K. W., Park, M. H., Nam Y. S., Study on gelatin-containing artificial skin: I. Preparation and characteristics of novel gelatin-alginate sponge. *Biomaterials* **1999**, *20*(5), 409.
- Christensen, B. E., Aasprong, E., Stokke, B. T., Gelation of periodate oxidised scleroglucan (scleraldehyde). *Carbohydrate Polymers* **2001**, *46*(3), 241.
- Crescenzi, V., Gamini, A., Paradossi, G., Torri, G., Solution properties of a new polyelectrolyte derived from the polysaccharide scleroglucan. *Carbohydrate Polymers* **1983**, *3*(4), 273.
- Cunha, P. L. R., Maciel, J. S., Sierakowski, M. R., de Paula, R. C. M., Feitosa, J. P. A., Oxidation of cashew tree gum exudate polysaccharide with TEMPO reagent. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2007**, *18*(1), 85.
- Damink, L. H. H. O., Dijkstra, P. J., Vanluyn, M. J. A., Vanwachem, P. B., Nieuwenhuis, P., Feijen, J., Glutaraldehyde as a cross-linking agent for collagen-based biomaterials. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **1995**, *6*(8), 460.
- Dawlee, S., Sugandhi, A., Balakrishnan, B., Labarre, D., Jayakrishnan, A., Oxidized chondroitin sulfate-cross-linked gelatin matrixes: A new class of hydrogels. *Biomacromolecules* **2005**, *6*(4), 2040.
- de Paula, R. C. M., Heatley, F., Budd, P. M., Characterization of Anacardium occidentale exudate polysaccharide. *Polymer International* **1998**, *45*(1), 27.
- de Paula, R.C.M., Rodrigues, J.F., Composition and rheological properties of cashew tree gum, the exudate polysaccharide from Anacardium-occidentale L. *Carbohydrate Polymer* **1995**, *26*(3), 177.
- DiSilvio, L., Gurav, N., Kayser, M. V., Braden, M., [Downes, S.](#), Biodegradable microspheres: A new delivery system for growth hormone. *Biomaterials* **1994**, *15*(11), 931.
- Djerassi, C., Gray, J. D., Kincl, F. A., Naturally occurring oxygen heterocyclics .9. isolation and characterization of genipin. *Journal of Organic Chemistry*. **1960**, *25*(12), 2174.

- El-Rehim, H. A. A., Hegazy, E. A., El-Mohdy, H. L. A., Radiation synthesis of hydrogels to enhance sandy soils water retention and increase plant performance. *Journal of Applied Polymer Science* **2004**, 93, 1660.
- Esposito, E., Cortesi, R., Nastruzzi, C., Gelatin microspheres: influence of preparation parameters and thermal treatment on chemico-physical and biopharmaceutical properties. *Biomaterials* **1996**, 17, 2009.
- Esposito, E., Cervellati, F., Menegatti, E., Nastruzzi, C., Cortesi, R., Spray dried eudragit microparticles as encapsulation devices for vitamin C. *International Journal of Pharmacy* **2002**, 242, 329.
- Fang, Y. P., Takahashi, R., Nishinari, K., Protein/polysaccharide cogel formation based on gelatin and chemically modified schizophyllan. *Biomacromolecules* **2005**, 6(6), 3202.
- Ferdinando, J. C., Formulations solutions. *Pharmaceutics Manufactures and Packing*, Março, **2000**, 69.
- Flory, P. J., In: Principles of Polymer Chemistry. *Corner University Press* **1953**, New York.
- Freiberg, S., Zhu, X., Polymer microspheres for controlled drug release. *International Journal of Pharmaceutics* **2004**, 282, 1.
- Gavini, E., Chetoni, P., Cossu, M., Alvarez, M. G., Saettone, M. F., Giunchedi, P., PLGA microspheres for the ocular delivery of a peptide drug, vancomycin using emulsification/spray-drying as the preparation method: in vitro/in vivo studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2004**, 57(2), 207.
- Geresh, S., Mamontov, A., Weinstein, J., Sulfation of extracellular polysaccharides of red microalgae: preparation, characterization and properties. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **2002**, 50(3), 179.
- Giunchedi, P., Torre, M. L., Maggi, L., Conti, B., Conte, U., Cellulose-acetate trimellitate microspheres containing NSAIDS. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **1995**, 21(3), 315.
- Gohel, M. C., Amin, A. F., Formulation optimization of controlled release diclofenac sodium microspheres using factorial design. *Journal of Controlled Release* **1998**, 51, 115.

- Gomez, C. G., Rinaudo, M., Villar, M. A., Oxidation of sodium alginate and characterization of the oxidized derivatives. *Carbohydrate Polymers* **2007**, 67, 296.
- Guilherme, M. R., Reis, A. V., Takahashi, S. H., Rubira, A. F., Feitosa, J. P. A., Muniz, E. C., Synthesis of a novel superabsorbent hydrogel by copolymerization of acrylamide and cashew gum modified with glycidyl methacrylate. *Carbohydrate Polymers* **2005**, 61(4), 464.
- Guo, L., Colby, R. H., Lusignan, C. P., Whitesides, T. H., Kinetics of triple helix formation in semidilute gelatin solutions. *Macromolecules* **2003**, 36(26), 9999.
- Guo, B., Elgsaeter, A., Stokke, B.T., Gelation kinetics of scleraldehyde-chitosan co-gels. *Polymer Gels and Networks* **1998**, 6(2), 113.
- Hazel, B., Roy, O., Roy, G., Stephen, L., Formaldehyde as a pre-treatment for dermal collagen heterografts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **1980**, 632(4), 589.
- Hennink, W. E., van Nostrum, C. F., Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, 54(1), 13.
- Himmelmann, W., Ulrich, H., Meckl, H., German Patent n° 1, 156, 649, 1963.
- Huynh, R., Chaubet, F., Jozefonvicz, J., Anticoagulant properties of dextranmethylcarboxylate benzylamide sulfate (DMCBSu); a new generation of bioactive functionalized dextran. *Carbohydrate Research* **2001**, 332(1), 75.
- Isiklan, N., Controlled release of insecticide carbaryl from sodium alginate, sodium alginate/gelatin, and sodium alginate/sodium carboxymethyl cellulose blend beads crosslinked with glutaraldehyde. *Journal of Applied Polymer Science* **2006**, 99(4), 1310.
- Jackson, E. L., Hudson, C. S., The Structure of the Products of the Periodic Acid Oxidation of Starch and Cellulose. *Journal of America Chemical Society* **1938**, 60(5), 989.
- Jeffreys, R. A. e Tabor B. E. U.S. Patent n° 3, 057, 723, 1962
- Kosmala, J. D., Henthorn, D. B., Brannon-Peppas, L., Preparation of interpenetrating networks of gelatin and dextran as degradable biomaterials. *Biomaterials* **2000**, 21(20), 2019.

- Kulkarni, A. R., Soppimath, K. S., Aminabhavi, T. M., Urea-formaldehyde nanocapsules for the controlled release of diclofenac sodium. *Journal of Microencapsulation* **2000**, 17(4), 449.
- Laemmli, U. K., Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature* **1970**, 227(5259), 680.
- Lamprecht, A., Schafer, U. F., Lehr, C. M., Characterization of microcapsules by confocal laser scanning microscopy: structure, capsule wall composition and encapsulation rate. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2000**, 49(1), 1.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., Cox, M. M., Princípios de Bioquímica. *Sarvier* **2000**, ed 2, 79-146
- Leo, E., Vandelli, M. A., Cameroni, R., Forni, F., Doxorubicin-loaded gelatin nanoparticles stabilized by glutaraldehyde: Involvement of the drug in the cross-linking process. *International Journal of Pharmaceutics* **1997**, 155(1), 75.
- Li, X., Wu, W., Wang, J., Duan Y., The swelling behaviour and network parameters of guar gum/poly(acrylic acid) semi-interpenetrating polymer network hydrogels. *Carbohydrate Polymers* **2006**, 66(4), 473.
- Liang, H. C., Chang, W. H., Lin, K. J., Sung, H. W., Genipin-crosslinked gelatin microspheres as a drug carrier for intramuscular administration: In vitro and in vivo studies. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2003**, 65 A(2), 271.
- Lien, S.-M., Li, W.-T., Huang, T.-J., Genipin-crosslinked gelatin scaffolds for articular cartilage tissue engineering with a novel crosslinking method. *Materials Science e Engineering C* **2008**, 28, 36.
- Liu, G. Q, Zhao, X. P., Electroresponsive behavior of gelatin/alginate semi-interpenetrating polymer network membranes under direct-current electric field. *Journal of Macromolecular Science – Pure and Applied Chemistry* **2006**, A43(2), 345.
- Lu, Y., Wang, D., Hu, Y., Huang, X., Wang, J., Sulfated modification of epimedium polysaccharide and effects of modifiers on cellular infectivity of IBDV. *Carbohydrate Polymers* **2008**, 71, 180.
- Maciel, J. S., Kosaka, P. M., de Paula, R. C.M., Feitosa, J. P.A., Petri, D.

- F.S., Formation of cashew gum thin films onto silicon wafers or amino-terminated surfaces and the immobilization of Concanavalin A on them. *Carbohydrate Polymers* **2007**, 69, 522.
- Maciel, J. S., Paula, H. C. B., Miranda, M. A. R., Sasaki, J. M., de Paula, R. C. M., Reacetylated chitosan/cashew gum gel: Preliminary study for potential utilization as drug release matrix. *Journal of Applied Polymer Science* **2006**, 99(1), 326.
- Maciel, J. S., Silva, D. A., Paula, H. C. B., de Paula, R. C. M. Chitosan/carboxymethyl cashew gum polyelectrolyte complex: synthesis and thermal stability. *European Polymer Journal* **2005**, 41, 2726.
- Madan, P. L., Luzzi, L. A., Price, C. J., Microencapsulation of a waxy solid: wall thickness and surface appearance studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1974**, 63, 280.
- Maeda, H., Rambone, G., Coviello, T., Yuguchi, Y., Urakawa, H., Alhaique, F., Kajiwara, K., Low-degree oxidized scleroglucan and its hydrogel. *International Journal of Biological Macromolecules* **2001**, 28(5), 351.
- Magalhães Jr., G. A., Santos, C. M. W., Silva, D. A., Maciel, J. S., Feitosa, J. P. A., Paula, H. C. B., de Paula, R. C. M., Microspheres of chitosan/carboxymethyl cashew gum (CH/CMCG): effect of chitosan molar mass and CMCG degree of substitution on the swelling and BSA release *Carbohydrate Polymers* **2008** (artigo submetido).
- Magalhães Jr., G. A., Esferas de Goma do Cajueiro e Quitosana para Liberação de Fármacos. Dissertação apresentada ao Departamento de Química Orgânica e Inorgânica/UFC **2007**.
- Mahner, C., Lechner, M. D., Nordmeier, E., Synthesis and characterisation of dextran and pullulan sulphate. *Carbohydrate Research* **2001**, 331(2), 203.
- Melo, M. R. S., Feitosa, J. P. A., Freitas, A. L. P., de Paula, R. C. M., Isolation and characterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cornea*. *Carbohydrate Polymers* **2002**, 49, 491.
- Mihai, D., Mocanu, G., Carpov, A., Chemical reactions on polysaccharides I. Pullulan sulfation. *European Polymer Journal* **2001**, 37, 541.
- Mitsumata, T., Suemitsu, Y., Fujii, K., Fujii, T., Taniguchi, T., Koyama, K., pH-

- response of chitosan, kappa-carrageenan, carboxymethyl cellulose sodium salt complex hydrogels. *Polymer* **2003**, 44(23), 7103.
- Mori, T., Seaweed polysaccharides. *Advances in Carbohydrate Chemistry* **1953**, 8, 315.
- Mothé, C. G., Produção de goma de cajueiro **2000**, patente n°PI0004114-9.
- Mulloy, B., Mourao, P. A. S., Gray, E., Structure/function studies of anticoagulant sulphated polysaccharides using NMR. *Journal of Biotechnology* **2000**, 77(1), 123.
- Muyonga, J. H., Cole, C. G. B., Duodu, K. G., [Fourier transform infrared \(FTIR\) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch \(*Lates niloticus*\)](#). *Food Chemistry* **2004**, 86(3), 325.
- Nickerson, M. T., Patel, J., Heyd, D. V., Rousseau, D., Paulson, A. T., Kinetic and mechanistic considerations in the gelation of genipin-crosslinked gelatin. *Biological Macromolecules* **2006**, 39, 298.
- Nishi, K. K., Jayakrishnan, A., Self-gelling primaquine-gum arabic conjugate: an injectable controlled delivery system for primaquine. *Biomacromolecules* **2007**, 8, 84.
- Nishi, K. K., Jayakrishnan, A., Preparation and in vitro evaluation of primaquine-conjugated gum arabic microspheres. *Biomacromolecules* **2004**, 5, 1489.
- O'Neill, A. N., Sulfated derivatives of laminarin. *Canadian Journal of Chemistry* **1955**, 33, 1097.
- Ono, L., Wollinger, W., Rocco, I. M., Coimbra, T. L. M., Gorin, P. A. J., Sierakowski, M. R., In vitro and in vivo antiviral properties of sulfated galactomannans against yellow fever virus (BeH111 strain) and dengue 1 virus (Hawaii strain). *Antiviral Research* **2003**, 60(3), 201.
- Paik, Y. S., Lee, C. M., Cho, M. H., Hahn, T. R., Physical stability of the blue pigments formed from geniposide of gardenia fruits: Effects of pH, temperature, and light. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001**, 49(1), 430.
- Paula, H. C. B., de Paula, R. C. M., Bezerra, S. K. F., Swelling and release kinetics of larvicide-containing chitosan/cashew gum beads. *Journal of*

- Applied Polymer Science* **2006**, 102, 395.
- Paula, H. C. B., Gomes, F. J. S., de Paula, R. C. M., Swelling studies of chitosan/cashew nut gum physical gels. *Carbohydrate Polymers* **2002**, 48, 313.
- Pessoa, P. F. A. P., Leite, L. A. S., Pimentel, C. R. M., Situação atual e perspectiva da agroindústria do caju. In: Araujo, J. P., Silva, P. P. (Org.) *Cajacultura: modernas técnicas de produção* **1995**, Fortaleza, EMBRAPA-CNPAT, 23-42.
- Peppas, N. A., In: Hydrogels in medicine and Pharmacy, Vol 1, *CRC Press*, **1986**.
- Percival, E. E., *Proc. Intern. Seaweed Symp.*, Fourth, Paris 18 (1964).
- Perlin, A. S., Casu, B., The Polysaccharide, ed. Aspinall G. O., *Academic Press I* **1982**, 131.
- Prystupa, D. A., Donald, A. M., Infrared study of gelatin conformations in the gel and sol states. *Polymer Gels and Networks* **1996**, 4(2), 87.
- Rao, K. P., Recent developments of collagen-based materials for medical applications and drug delivery systems. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition* **1995**, 7(7), 623.
- Raymond, G., Degennaro, M., Mikeal, R., Preparation of gelatin: phenytoin sodium microspheres: na *in vitro* and *in vivo* evaluation. *Drug Developmen and Industrial Pharmacy* **1990**, 16, 1025.
- Rashid, A., Mackie, W., Colquhoun, I. J., Lamba, D. (1990). Novel synthesis of monosulphated methyl- α -D-galactopyranosides. *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne de Chimie* **1990**, 68(7), 1122.
- Rodrigues, J. F., de Paula, R. C. M., Costa, S. M. O., Métodos de isolamento de gomas naturais: comparação através da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale L.*). *Polímeros: Ciência e Tecnologia* **1993**, jan-mar, 31.
- Rokhade, A. P., Patil, S. A., Aminabhavi, T. M., Synthesis and characterization of semi-interpenetrating polymer network microspheres of acrylamide grafted dextran and chitosan for controlled release of acyclovir. *Carbohydrate Polymers* **2006**, 67, 605.
- Rokhade, A. P., Agnihotri, S. A., Patil, S. A., Mallikarjuna, N. N., Kulkarni, P.

- V., Aminabhavi, T. M., Semi-interpenetrating polymer network microspheres of gelatin and sodium carboxymethyl cellulose for controlled release of ketorolac tromethamine. *Carbohydrate Polymers* **2006**, 65(3), 243.
- Rose, P. J., Mark, H. F., Bikales, N. M., Overberger, C. G., Mendes, G., Kroschwitz, J. I., editores. Encyclopedia of polymer science and engineering, vol. 7, 2ª edição,: Wiley, New York, USA **1989**, 488.
- Ross-Murphy, S. B., Structure and Rheology of Gelatin Gels: Recent Progress. *Polymer* **1992**, 33, 2622.
- Rudzinski, W. E., Dave, A. M., Vaishnav, U. H., Kumbar, S. G., Kulkarni, A. R., Aminabhavi, T. M., Hydrogels as controlled release devices in agriculture. *Designed Monomers e Polymers* **2002**, 5, 39.
- Sajeev, C., Vinay, G., Archana, R., Saha, R. N., Oral controlled release formulation of diclofenac sodium by microencapsulation with ethyl cellulose. *Journal of Microencapsulation* **2002**, 19(6), 753.
- Saravanan, M., Bhaskar, K., Maharajan, G., Pillai, K. S., Ultrasonically controlled release and targeted delivery of diclofenac sodium via gelatin magnetic microspheres. *International Journal of Pharmaceutics* **2004**, 283, 71.
- Schacht, E., Bogdanov, B., VandenBulcke, A., DeRooze, N., Hydrogels prepared by crosslinking of gelatin with dextran dialdehyde. *Reactive and Functional Polymers* **1997**, 33, 109.
- Schulz, D., Rapp, P., Properties of the polyalcohol prepared from the beta-d-glucan schizophyllan by periodate-oxidation and borohydride reduction. *Carbohydrate Research* **1991**, 222, 223.
- Shanmugam, M., Mody, K. H., Heparinoid-active sulphated polysaccharides from marine algae as potential blood anticoagulant agents. *Current Science* **2000**, 79(12), 1672.
- Sheehan, J. C., Hlavka, J. J., The cross-linking of gelatin using a water-soluble carbodiimide. *Journal of American Chemical Society* **1957**, 79(16), 4528.
- Segtnan, V., Isaksson T., Temperature, sample and time dependent structural characteristics of gelatin gels studied by near infrared

- spectroscopy. *Food Hydrocolloids* **2004**, 18, 1.
- Silva, D. A., de Paula, R. C. M., Feitosa, J. P. A., Graft copolymerisation of acrylamide onto cashew gum. *European Polymer Journal* **2007**, 43, 2620.
- Silva, D. A., Hidrogéis e copolímeros de Goma do Cajueiro e Poliacrilamida. Tese apresentada ao Departamento de Química Orgânica e Inorgânica/UFC **2006**.
- Silva, D. A., de Paula, R. C. M., Feitosa, J. P. A., de Brito, A. C. F., Maciel, J. S., Paula, H. C. B., Carboxymethylation of cashew tree exudate polysaccharide. *Carbohydrate Polymers* **2004**, 58(2), 163.
- Sizes *site*, disponível em: <http://www.sizes.com/units/bloom.htm>, acessado em: agosto **2007**.
- Soeda, S., Kozako, T., Iwata, K., Shimeno, H., Oversulfated fucoidan inhibits the basic fibroblast growth factor-induced tube formation by human umbilical vein endothelial cells: its possible mechanism of action. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* **2000**, 1497(1), 127.
- Sokolsky-Papkov, M., Domb, A. J., Golenser, J., Impact of Aldehyde content on amphotericin B-dextran imine conjugate toxicity. *Biomacromolecules* **2006**, 7, 1529.
- Stokke, B. T., Elgsaeter, A., Smidsrod, O., Christensen, B. E., Carboxylation of scleroglucan for controlled cross-linking by heavy-metal ions. *Carbohydrate Polymers* **1995**, 27(1), 5.
- Sung, H. W., Hunag, R. N., Huang, L. L. H., Tsai, C. C., In vitro evaluation of cytotoxicity of a naturally occurring cross-linking reagent for biological tissue fixation. *Journal of Biomaterials Science - Polymer Edition* **1999**, 10(1), 63.
- Sung, H. W., Hsu, H. L., Shih, C. C., Lin, D. S., Cross-linking characteristics of biological tissues fixed with monofunctional or multifunctional epoxy compounds. *Biomaterials* **1996**, 17(14), 1405.
- Tanaka, N., Takino, S., Utsumi, I., A new oral gelatinized sustained-release dosage form. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1963**, 52, 674.
- Thannhauser, S. J., Fellig, J., Schmidt, G., The structure of cerebroside

- sulfuric ester of beef brain. *The Journal of Biological Chemistry* **1955**, 215(1), 211.
- Toti, U. S., Soppimath, K. S., Mallikarjuna, N. N., Aminabhavi, T. M., Acrylamide grafted acacia gum polymer matrix tablets as erosion-controlled drug delivery systems. *Journal of Applied Polymer Science* **2004**, 93, 2245.
- Ugwoke, M. I., Kinget, R., Influence of processing variables on the properties of gelatin microspheres prepared by the emulsification solvent extraction technique. *Journal of Microencapsulation* **1998**, 15(3), 273.
- Varma, A. J., Kokane, S. P., Pathak, G., Pradhan, S. D., Thermal behavior of galactomannan guar gum and its periodate oxidation products. *Carbohydrate Polymers* **1997**, 32(2), 111.
- Veelaert, S., de Wit, D., Gotlieb, K. F., Verhé, R., The gelation of dialdehyde starch. *Carbohydrate Polymers* **1997**, 32(2), 131.
- Vogl, H., Paper, D. H., Franz G., Preparation of sulfated linear (1→4)- β -galactan with variable degrees of sulfation. *Carbohydrate Polymers*, **2000**, 41, 185-190.
- Xia, Y. Q., Guo, T. Y., Zhang, B. H., Zhang, B. L., Hemoglobin recognition by imprinting in semi-interpenetrating polymer network hydrogel based on polyacrylamide and chitosan. *Biomacromolecules* **2005**, 6, 2601.
- Wang, L., An, X., Xin, Z., Zhao, L., Hu, Q., Isolation and characterization of collagen from the skin of deep-sea redfish (*Sebastes mentella*). *Journal of Food Science* **2007**, 72(8), E450.
- Weadock, K., Olson, R. M., Silver, F. H., Evaluation of collagen crosslinking techniques. *Biomaterials Medical Devices and Artificial Organs* **1983**, 11(4), 293.
- Wei, H.-J., Yang, H.-H., Chen, C.-H., Lin, W.-W., Chen, S.-C., Lai, P.-H., Chang, Y., Sung, H.-W., Gelatin microspheres encapsulated with a nonpeptide angiogenic agent, ginsenoside Rg₁, for intramyocardial injection in a rat model with infarcted myocardium. *Journal of Controlled Release* **2007**, 120, 27.
- Whistler, R.L., *Industrial Gums: Polysaccharides and their derivatives* **1973** 2^o ed., eds, Whistler, R.L., BeMiller, J.N., Academic press, Londres, cap.1.

- Winkelhake, J. L., Will complex carbohydrate ligands of vascular selectins be the next generation of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Glycoconjugate Journal* **1991**, *8(5)*, 381.
- Wu, H., Zhang, Z. X., Wu, D. C., Zhao, H. P., Yu, K. T., Hou, Z. Q., Preparation and drug release characteristics of pingyangmycin-loaded dextran cross-linked gelatin microspheres for embolization therapy. *Journal of Biomedical Materials Research Part B - Applied Biomaterials* **2006**, *78B(1)*, 56.
- Wu, S. J., Chun, M. W., Shin, K. H., Toida, T., Park, Y., Linhardt, R. J., Kim, Y. S., Chemical sulfonation and anticoagulant activity of acharan sulfate. *Thrombosis Research* **1998**, *92(6)*, 273.
- Zohuriaan, M. J., Shokrolahi, F., Thermal studies on natural and modified gums. *Polymer Testing*, **2004**, *23*, 575.
- Yao, C.-H., Liu, B.-S., Chang, C.-J., Hsu, S.-H., Chen, Y.-S., Preparation of networks of gelatin and genipin as degradable biomaterials. *Materials Chemistry and Physics* **2004**, *83*, 204.
- Yan, C. H., Li, X. W., Chen, X. L., Wang, D. Q., Zhong, D. C., Tan, T. Z., Kitano, H., Anticancer gelatin microspheres with multiple functions. *Biomaterials* **1991**, *12(7)*, 640.
- Yang, J., Du, Y., Wen, Y., Li, T., Hu, L., Sulfation of chinese lacquer polysaccharides in different solvents. *Carbohydrate Polymers* **2003**, *52*, 397.
- Yu, H., Xiao, C., Synthesis and properties of novel hydrogels from oxidized konjac glucomannan crosslinked for in vitro drug delivery. *Carbohydrate Polymers* **2008**, *72*, 479.