



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

ESFERAS DE GOMA DO CAJUEIRO E QUITOSANA PARA LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS

Guilherme Augusto Magalhães Júnior

Orientadora: Dra Regina Célia Monteiro de Paula

Co-Orientadora: Dra Jeanny da Silva Maciel

Fortaleza-Ceará
2007



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

ESFERAS DE GOMA DO CAJUEIRO E QUITOSANA PARA LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS

Guilherme Augusto Magalhães Júnior

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

Fortaleza-Ceará
2007

M166e Magalhães Júnior, Guilherme Augusto
Esferas de goma do cajueiro e quitosana para liberação de fármacos /
Guilherme Augusto Magalhães Júnior, 2007.
96 f. ; il. color. enc.

Orientadora: Profª. Dra. Regina Célia Monteiro de Paula

Co-orientadora: Prof. Dr. Jeanny da Silva Maciel

Área de concentração: Química Inorgânica

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de
Ciências. Depto. de Química Orgânica e Inorgânica, Fortaleza, 2007.

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

CDD 546

Deus permitiu a existência da queda d'água para aprendermos quanta força de trabalho e renovação podemos extrair de nossas próprias quedas.

William Shakespeare.

Semeie um pensamento e colha uma ação; semeie uma ação e colha um hábito; semeie um hábito e colha um caráter; semeie um caráter e colha um destino.

Samuel Smiles.

À Tayana, o amor da minha vida, por toda a ajuda, compreensão e motivação em todos os momentos desta e de outras caminhadas.

Aos meus pais por todo o suporte e
confiança durante toda a minha vida.

À professora Regina pela dedicação ao longo desta pesquisa e pelos conselhos, pois sem esses nunca teria feito uma pós-graduação.

Agradecimentos

À minha segunda mãe, Zilma, por todo os carinhos e mino durante toda a minha vida, aos meus irmãos, Danielle, Rafaele e Régis, pela vivência tranqüila e amigável.

Aos meus sogros, Tânia e Expedito, sogros que todos sonham, e deveriam ter.

À Jeanny por toda a paciência para me ensinar praticamente tudo que sei dentro do laboratório.

À Clara por toda à ajuda física e motivação no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos Paulo Roberto, Ana Paula, Janaina e Érico (A Diretoria), pela ajuda e momentos de descontração.

À Marilia pelas idéias trocadas durante o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos meus amigos poliméricos Igor, Pablyana, Neto, Leônia, Marilia, Cristina, Ellen, Ellenir, Iara, Alyne, Maslândia, Célio, Nadia, Dráulio, Érico, Raquel, Sávio, Durcilene, Rafael, Karine, Fabrício, Alexandra, Roberto, Matheus, Júnior, João Vitor, J. Júnior e Samira pela convivência de amizade e companheirismo durante toda essa jornada.

As professoras Sandra, Judith e Nágila por toda a ajuda que precisei delas sempre me atenderam com muita dedicação.

Ao professor Haroldo por seu conhecimento compartilhado.

Ao Ivam, meu amigo desde a época da graduação.

Ao Professor Cardenas (Quitoquímica, Chile) pelas amostras de quitosana.

Aos companheiros da bioinorgânica, que sempre que possível me ajudaram.

À Tereza por todas as análises termogravimétricas e o mais importante sua boa vontade.

Ao Orlando por sua ajuda e seu bom humor.

A CAPES pelo apoio financeiro.

Ao CENAURENM e ao Daniel pelos RMN.

RESUMO

Esferas à base de goma do cajueiro foram produzidas utilizando como técnicas a formação de redes interpenetradas e a complexação polieletrólítica. Esferas de quitosana (QT) e quitosana/goma do cajueiro (QT/GC) sintetizadas via formação de redes interpenetradas foram reticuladas com genipina. A genipina foi isolada a partir do fruto do jenipapo e caracterizada por espectroscopia de infravermelho e RMN de ^1H e ^{13}C . As esferas de quitosana (QT) e quitosana/goma do cajueiro (QT/GC) reticuladas com genipina foram caracterizadas por: ensaio de intumescimento, ensaio de liberação, microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de absorção na região do infravermelho. Pelo método do açúcar total verificou-se que 83% da goma foi incorporada às esferas. Os ensaios de intumescimento indicam que as esferas de QT/GC reticuladas têm intumescimento máximo em pH 1,2. O aumento da concentração da genipina na reticulação das esferas faz com que ocorra uma diminuição na taxa de intumescimento devido ao aumento do grau de reticulação. O coeficiente de difusão diminui com o aumento da densidade de reticulação para as esferas de QT e QT/GC. Nos ensaios de liberação constatou-se que em tampão pH 7,4 que as esferas sem reticulação são capazes de intumescer e liberar o fármaco (diclofenaco de sódio), porém não ocorreu liberação de fármaco em esferas de QT/GC reticuladas com genipina neste meio. As esferas de QT/GC reticuladas com genipina liberam diclofenaco de sódio em solução de pH 1,2 e a liberação do fármaco é inversamente proporcional à concentração de agente reticulante. A liberação de fármaco em esferas QT/GC ocorre por um mecanismo não Fickiano. Complexos polieletrólíticos de quitosana e goma do cajueiro carboximetilada (CCM) na forma de esferas também foram estudadas avaliando-se o efeito da massa molar da quitosana e do grau de substituição (GS) da goma do cajueiro carboximetilada no grau de intumescimento e liberação de albumina sérica bovina (BSA). A massa molar da quitosana e o GS da goma carboximetilada influenciam a cinética de intumescimento e o coeficiente de difusão de água nas esferas. Entretanto, na liberação do fármaco o fator mais importante na modulação da liberação é o grau de substituição da goma carboximetilada.

ABSTRACT

Cashew gum based beads were produced through interpenetrating polymer networks and polyelectrolyte complexation techniques. Beads of chitosan (CH) and cashew gum (CG)/CH were further crosslinked with genipin obtained from "genipapo" fruits. This crosslinking agent was characterized by proton and carbon nuclear magnetic resonance and infrared spectroscopy. Beads of CH and CH/CG were doped with sodium diclofenac and characterized by Fourier Transform Infrared spectroscopy and Electron Microscopy. Beads degree of swelling and the drug release kinetics were also determined. It was found that CH/CG beads contained up to 83 % CG and maximum swelling occurred at pH 1.2. The higher the crosslinking density, the lower were the swelling degree and the diffusion coefficient. Moreover, drug release was also found to decrease with increasing crosslinking density and no drug release occurred at pH 7.4 for CH/CG beads crosslinked with genipin, although non-crosslinked bead did release the drug at that pH. CH/CG beads drug release was found to follow a non-Fickian mechanism. Polyelectrolyte complexes of chitosan and carboxymethylated cashew gum (CCM) in beads form were also investigated regarding the effects of molar mass and degree of substitution of CCM on the swelling degree and on bovine serum albumin (BSA) release. Data obtained revealed that both of molar mass and degree of substitution affect beads swelling degree and water diffusion coefficient.

ÍNDICE DE TABELA

Tabela 1. Composição da goma do cajueiro de diferentes regiões geográficas.....	6
Tabela 2. Polieletrólitos que formam complexos com quitosana.	12
Tabela 3. Sistemas formados por quitosana reticulada.	19
Tabela 4. Alguns mecanismos que acionam a liberação de fármacos no organismo.....	26
Tabela 5. Lista representativa dos polímeros usados em sistemas de liberação de fármacos.....	31
Tabela 6. Complexos polieletrólíticos de quitosana e polissacarídeos aniônicos aplicados na liberação controlada de fármaco.....	34
Tabela 7. Dados de RMN 1D e 2D de ^{13}C e ^1H para genipina obtida neste trabalho em CD_3OD	49
Tabela 8. Dados de RMN ^1H e ^{13}C em CD_3OD e CDCl_3 em comparação com dados da literatura.	50
Tabela 9. Relação de número de mmol de genipina que reagiu / g de esferas.....	51
Tabela 10. Diâmetro médio das esferas reticuladas com diferentes concentrações de genipina.	52
Tabela 11. Coeficiente de Difusão (cm^2/s) em pH 1,2 das amostras de QT e QT/GC reticuladas com genipina.	57
Tabela 12. Valores de n para as amostras de QTGC 500mM.....	61
Tabela 13. Diâmetro das esferas de QT/CCM.	62
Tabela 14. Deslocamentos correspondentes aos sinais de H-1 das unidades monoméricas de GC e QT.....	64
Tabela 15. Coeficiente de difusão dos complexos QT/CCM em tampão de pH 7,4...67	67

Tabela 16. Valores de n para as amostras de QTa/CCM1 e QTa/CCM3.....70

Tabela 17. Valores de n para as amostras de QTa/CCM1 e QTa/CCM3.....70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Unidades repetitivas da quitosana e quitina.	4
Figura 2. Representação esquemática da estrutura da goma do cajueiro.	7
Figura 3. Mecanismo de reação da carboximetilação da goma do cajueiro.....	10
Figura 4. Esquema da interação entre as cadeias de quitosana (polieletrólito catiônico) e um polieletrólito aniônico.	13
Figura 5. Propriedades essenciais de complexos polieletrólíticos contendo quitosana usada em sistemas de liberação controlada.	15
Figura 6. Estrutura e intumescimento sensível ao pH do meio de um complexo contendo quitosana.	16
Figura 7. Modelos de estruturas de géis formados por reticulação: (A) reticulação entre as próprias cadeias (B) HPN; (C) IPN; (D) reticulação iônica entre as cadeias de quitosana.....	18
Figura 8. Estrutura básica de um iridoide.	21
Figura 9. Estrutura química: (a) geniposide e (b) genipina.	22
Figura 10. Ataque nucleofílico da genipina ao carbono C3 da genipina.	23
Figura 11. Reação da genipina com quitosana para formar amida secundária.....	24
Figura 12. Representação de um sistema de liberação controlada de fármaco.....	28
Figura 13. Esquema da liberação de insulina estimulada pela mudança de pH a partir de microesferas.	29
Figura 14. Ilustração de sistema monolítico e reservatório.....	30
Figura 15. Métodos para preparação de esferas de quitosana.	32

Figura 16. Espectros na região do infravermelho: (a) genipina comercial; (b) genipina Brasil.	43
Figura 17. Espectro de RMN ^1H da genipina obtida neste trabalho em CD_3OD	44
Figura 18. Espectro de RMN ^{13}C -BB da genipina em CD_3OD	45
Figura 19. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT135 da genipina em CD_3OD a 20°C	46
Figura 20. Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C HSQC da genipina em CD_3OD a 20°C	47
Figura 21. Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H – COSY da genipina em CD_3OD a 20°C	47
Figura 22. Correlações observadas no espectro RMN 2D ^1H , ^1H – COSY para a genipina.	48
Figura 23. Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C – HMBC em CD_3OD	48
Figura 24. Espectros de FT-IR de: (A) GC; (B) QT; (C) QT/GC; (D) QT reticulada; (E) QT/GC reticulada.	53
Figura 25. Micrografias das esferas: quitosana; QT/GC não-reticulada; QT/GC reticulada 44 mM.	54
Figura 26. Gráfico de Dt/Do vs tempo de intumescimento seqüenciado em pH 1,2 e 7,4 , para esferas de QT reticuladas a 26°C	55
Figura 27. Gráfico de Dt/Do vs tempo de intumescimento seqüenciado em pH 1,2 e 7,4 , para esferas de QT/GC reticuladas a 26°C	56
Figura 28. Liberação de DCS a partir da matriz QT/GC: não-reticulada em pH 7,4 e reticulada com genipina 44 mM em pH 1,2.	59
Figura 29. Liberação de DCS a partir da matriz QT/GC reticuladas com 44 mM e 500 mM em pH 1,2.	60
Figura 30. Espectro de RMN ^1H de CPE QTa/CCM em D_2O a 70°C	64
Figura 31. Micrografias das esferas: (a) QTa/CCM; (b) QTb/CCM.	65
Figura 32. Gráfico Dt/Do x tempo em água, (a) esferas de QTa com CCM1, CCM2 e CCM3 e (b) esferas de QTb com CCM1, CCM2 e CCM3.	66

Figura 33. Gráfico D_t/D_o x tempo em tampão pH 7,4, (a) esferas de QTa com CCM1, CCM2 e CCM3 e (b) esferas de QTb com CCM1, CCM2 e CCM3.67

Figura 34. Liberação de BSA a partir da matriz QTa/CCM1 e QTa/CCM3 em tampão pH 7,4.68

Figura 35. Liberação de BSA a partir da matriz QTb/CCM1 e QTb/CCM3 em tampão pH 7,4.69

ABREVIACOES

ABS: absorvncia

BSA: Albumina do Soro Bovino

CCM: Cajueiro Carboximetilado

CCM1: Cajueiro Carboximetilado com Grau de Substituio 0,16

CCM2: Cajueiro Carboximetilado com Grau de Substituio 0,31

CCM3: Cajueiro Carboximetilado com Grau de Substituio 0,44

CD₃OD: Metanol Deuterado

CDCI₃: Clorofórmio Deuterado

CPE: complexo polieletrólítico

DCS: Diclofenaco de Sódio

GC: Goma do Cajueiro

GD: Grau de Desacetilao

GS: Grau de Substituio

HPN: Rede Polimérica Híbrida

IPN: Redes Interpenetrantes

IV: infravermelho

MEV: microscopia eletrônica de varredura

QT: Quitosana

QT/GC: Quitosana/Goma do Cajueiro

QTa: Quitosana de Maior Massa Molar

QTb: Quitosana de Menor Massa Molar

UV-VIS: ultravioleta-visível

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	3
1.1- Quitosana	3
1.2- Goma do Cajueiro	5
1.2.1- <i>Reação de Carboximetilação da Goma do Cajueiro</i>	8
1.3- Complexo Polieletrólitos	11
1.4- Reação de Reticulação	17
1.4.1- <i>Genipina</i>	20
1.5- Liberação de Fármacos	25
2 -OBJETIVOS	35
3- METODOLOGIA	36
3.1 –Materiais	36
3.2- Isolamento e Purificação da Genipina	36
3.3- Esferas de Quitosana e Goma do Cajueiro	37
3.3.1- <i>Preparação das Esferas de Quitosana/Goma do cajueiro</i>	37
3.3.2 - <i>Reticulação das Esferas com Genipina</i>	38
3.3.3- <i>Determinação da Quantidade de Goma Incorporada nas Esferas</i>	38
3.3.4- <i>Cinética de Intumescimento</i>	39
3.3.5- <i>Incorporação de Diclofenaco de Sódio às Esferas de Quitosana/Goma do Cajueiro</i>	39
3.3.6- <i>Determinação da Quantidade de Fármaco Incorporada</i>	39
3.3.7- <i>Ensaio de Liberação de Fármaco</i>	40
3.4-Esferas de Quitosana e Goma do Cajueiro Carboximetilada	40
3.4.1 - <i>Preparação das Esferas de Quitosana e Goma do Cajueiro Carboximetilada</i> ...40	
3.4.2- <i>Cinética de Intumescimento</i>	40
3.4.3- <i>Determinação da Quantidade de BSA Incorporado</i>	41
3.4.4- <i>Ensaio de Liberação de BSA</i>	41
3.5- Caracterização das Esferas	41

3.5.1- Microscopia Eletrônica de Varredura.....	41
3.5.2- Espectroscopia na Região do Infravermelho.....	41
3.5.3- Ressonância Magnética Nuclear.....	42
3.5.4- Microscopia Óptica.....	42
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.1- Isolamento e Purificação da Genipina.....	43
4.2- Esferas de Quitosana/goma do Cajueiro Via Formação de Rede Interpenetrada (IPN).....	50
4.2.1- Reticulação das Esferas.....	51
4.2.2- Caracterização por Espectroscopia na Região do Infravermelho.....	52
4.2.3- Caracterização das Esferas por Microscopia Eletrônica de Varredura.....	53
4.2.4- Ensaio de Intumescimento.....	55
4.2.5- Ensaio de Liberação	58
4.3 - Esferas de Quitosana/Goma do Cajueiro Carboximetilada Via Complexação Polieletrólítica.....	62
4.3.1- Diâmetro das Esferas.....	62
4.3.2-Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H.....	63
4.3.3-Microscopia Eletrônica de Varredura.....	65
4.3.4-Ensaio de Intumescimento.....	65
4.3.5-Ensaio de Liberação de BSA	68
5-CONCLUSÕES.....	71
6-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

1- INTRODUÇÃO

1.1- Quitosana

A pesquisa com quitina e quitosana avançou a partir da metade do século XIX. Desde então diversos trabalhos vêm sendo publicados com ambos os polissacarídeos nos quais aspectos físicos e químicos são bastante discutidos indicando que estas moléculas podem ser utilizadas em diversos tipos de aplicações tais como: na produção de microesferas para liberação controlada de fármaco [Du e col., 2004; Muzzarelli e col., 2004; Agnihotri e Aminabhavi, 2004], incluindo progesterona [Jameela e col., 1998], albumina do soro bovina (BSA) [Zhang e col., 2004] e agentes antibactericidas [Anal e col., 2006], em engenharia de tecido [Nerem, 1991], em aplicações médicas e farmacêuticas quitosana é usada como um componente em hidrogéis.

Quitosana é um copolímero de β -[1 \rightarrow 4]-2-acetoamido-2-desoxi-D-glucopiranosose e 2-amino-2-desoxi-D-glucopiranosose. A quitosana é obtida principalmente da desacetilação alcalina da quitina de exoesqueleto de crustáceos, tais como camarões e caranguejos [Muzzarelli, 1973].

A estrutura química da quitina e quitosana é bastante semelhante sendo que o fator que faz a distinção entre as duas é o número de unidades acetiladas (Figura 1). Se a estrutura é mais de 80% acetilada, o polissacarídeo será denominado de quitina. Para cadeias com porcentagem de acetilação menor que 80%, a amostra é denominada de quitosana [Abran e Higueira, 2004].

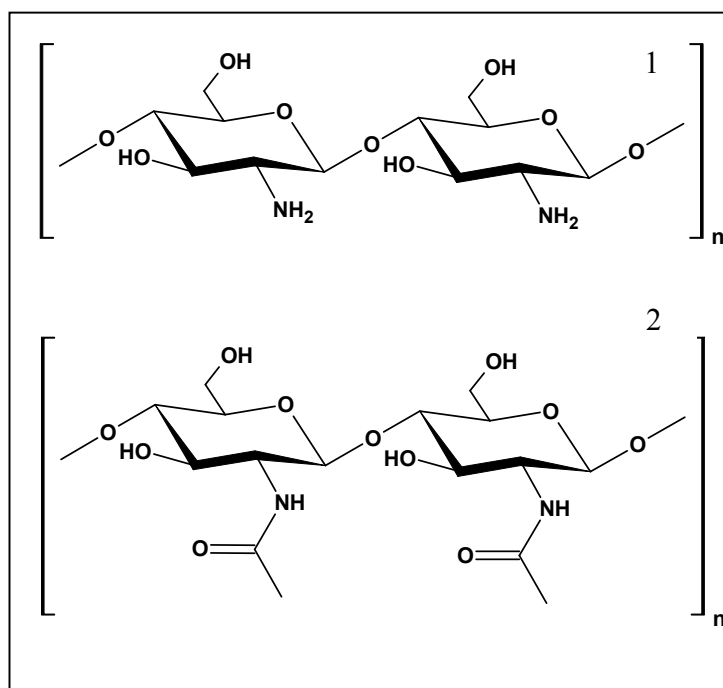


Figura 1. Unidades repetitivas da quitosana totalmente desacetilada (1) e quitina totalmente acetilada (2).

Foi relatado que quitosana seqüestra lipídios no intestino, devido a sua natureza catiônica [Kanauchi e col., 1995; Wuolijoki e col., 1999]. A conformação em solução, as propriedades físico-químicas e biológicas da quitosana dependem de parâmetros como a massa molar, grau de desacetilação (GD) e distribuição dos tipos de unidades constituintes da cadeia (acetilglucosamina e glucosamina). A massa molar e o GD podem ser estabelecidos por condições escolhidas durante a etapa de obtenção da quitosana. No entanto, podem também ser modificados em outros estágios; o grau de desacetilação pode ser diminuído por reacetilação [Sorlier e col., 2001] e a massa molar pode ser reduzida por despolicimerização ácida [Dong e col., 2001].

Os derivados obtidos por desacetilação da quitina são solúveis em meio ácido quando o grau de acetilação é menor que 60% [Sorlier e col., 2001]. Em meio ácido os grupamentos amino livres da quitosana são protonados ($-\text{NH}_3^+$), o que a torna solúvel. À medida que o pH se aproxima de 6,5 a tendência à precipitação aumenta devido ao número de grupamentos $-\text{NH}_2$ na estrutura.

O grau de acetilação da quitosana pode ser determinado por condutimetria e potenciometria [Rusu-Balaita e col., 2003], ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) [Le Dung e col., 1994; Lavertu e col., 2003] e por espectroscopia na região do infravermelho (IV) [Brugnerotto e col., 2001; Moore e Roberts 1980].

1.2- Goma do Cajueiro

As gomas são polissacarídeos solúveis em água que formam soluções viscosas a baixas concentrações. As gomas extraídas de exsudatos foram as primeiras gomas conhecidas [Whistler, 1993].

Industrialmente o termo goma é mais específico e está associado a polissacarídeos e seus derivados. O solvente ou agente de inchamento é, neste caso, a água. As gomas industriais podem ser classificadas em naturais e modificadas. As naturais podem ser obtidas de exsudatos de árvores, de sementes, de algas ou por fermentação microbológica [Rodrigues e col. 1993]. Gomas são substâncias incolores, inodoras, insípidas e não tóxicas [Miller, 1987].

O cajueiro é extensivamente cultivado no Brasil além de países como Quênia e Índia. Originário da América Tropical, sua exploração econômica restringe-se à Índia, Brasil, Moçambique, Quênia e Tanzânia. Pertence à família *Anacardiácea*, Dicotiledônea, gênero *Anacardium*, espécie *Anacardium occidentale*, L. O principal produto é sua castanha, mas existe potencial para a exploração da goma exsudada do cajueiro, a goma tem sido proposta como um substituinte para a goma arábica em aplicações farmacêuticas [Paula e col., 1998]. Dado a importância da cultura de árvores de cajueiro para algumas regiões do Brasil, especialmente o nordeste, um estudo da goma para aplicações biotecnológicas é de potencial interesse industrial [Sarubbo e col., 2000].

Rodrigues e col. [1993] e Costa e col. [1996] propuseram um método de purificação da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) utilizando várias etapas de separação. A composição da goma do cajueiro do Nordeste do Brasil foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência [Paula e Rodrigues, 1995] e por

cromatografia gás-líquido [Paula e col, 1998]. Os resultados comparativos de composição da goma do cajueiro de diferentes origens são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Composição da goma do cajueiro de diferentes regiões geográficas.

Monossacarídeo	Composição (%) da goma do cajueiro de diferentes países				
	Brasil ^{1,2}	Brasil ³	Índia ⁴	Papua ⁴	Venezuela ⁵
Galactose	72 – 73	81,7	61	63	49
Arabinose	4,6 – 5	1,9	14	16	31
Manose	0 – 1	-	2	1	4
Xilose	-	-	2	-	1
Ramnose	3,2 – 4	1,9	7	7	7
Glucose	11 - 14	9,5	8	9	-
Ácido urônico	4,5 – 6,3	5	6,2	5,7	8

¹(Paula e col., 1998)

²(Paula e Rodrigues, 1995)

³(Menestrina e col., 1998)

⁴(Anderson e col., 1970)

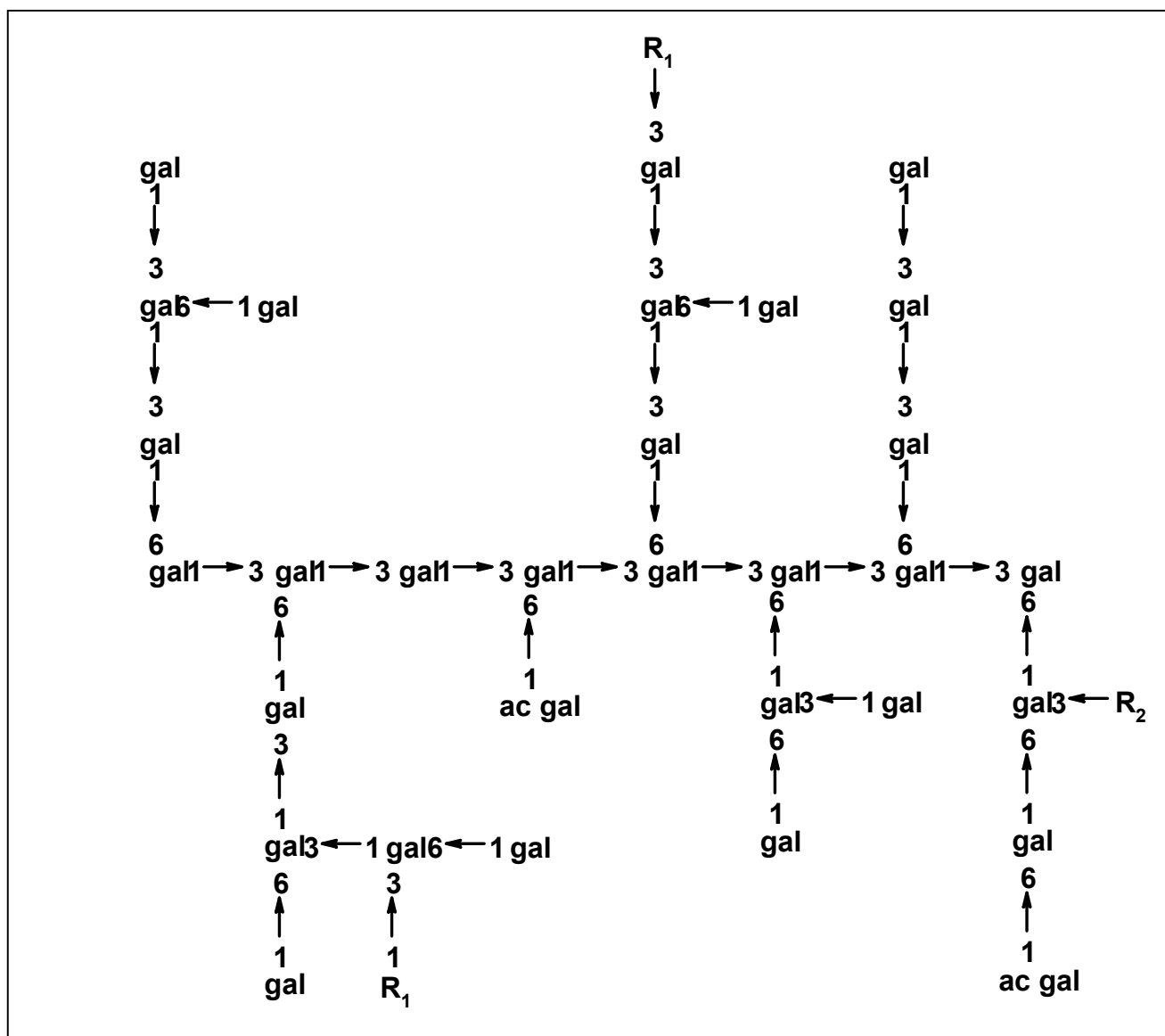
⁵(Pinto e col., 1995)

No trabalho de Menestrina e col. [1998] supõe-se que o ácido urônico não foi eliminado durante a hidrólise parcial, admitiu-se que o teor de ácido urônico no trabalho foi de 5% e, portanto a composição molar foi a dada na tabela acima.

A razão galactose/arabinose varia bastante com a fonte do polissacarídeo, sendo que a amostra da Venezuela possui um valor muito elevado de arabinose e não apresenta glucose na sua composição. A goma do Nordeste do Brasil apresenta a menor proporção de ácido urônico e a maior de galactose.

A goma do cajueiro do Nordeste do Brasil foi caracterizada estruturalmente indicando ser constituída de uma cadeia principal de galactose (1→3), com ramificação de galactose (1→6). Ramnose, ácido glucurônico e arabinose estão presentes como

grupos terminais, mas a glucose pode formar cadeias laterais [Paula e col.,1998]. A Figura 2 apresenta uma representação esquemática da estrutura da goma do cajueiro.



(Onde R₁ pode ser glucose, arabinose, ramnose ou ácido glucurônico e R₂ cadeias de glucose com até 6 unidades.)

Figura 2. Representação esquemática da estrutura da goma do cajueiro [Rodrigues e col., 1993].

A caracterização de polissacarídeos em solução é de fundamental importância para o entendimento de suas propriedades e possíveis aplicações. A goma do cajueiro possui viscosidade intrínseca de 8,8 mL/g em NaCl 1 M. Solução 2 % de goma possui baixa energia de ativação de fluxo quando comparada a sistemas com pouca interação inter e intramolecular [Paula e Rodrigues, 1995]. Soluções diluídas de goma do cajueiro em NaCl apresentam comportamento de fluido Newtoniano até concentrações de 20 % (m/v) [Silva, 2002]. Uma distribuição unimodal para a goma do cajueiro, com massa molar de pico de $1,86 \times 10^4$ g/mol, foi observada por Silva (2002).

Análise termogravimétrica da goma do cajueiro mostra que a decomposição do polissacarídeo ocorre em uma única etapa com uma temperatura máxima de decomposição em 296°C em atmosfera de nitrogênio [Silva e col., 2006].

Algumas aplicações para a goma do cajueiro tem sido proposta nos últimos anos, como hidrogel superabsorvente para condicionador do solo [Guilherme e col., 2005], ou complexo polieletrólítico com quitosana para liberação de fármaco [Maciel e col., 2006]. A goma do cajueiro tem demonstrado exibir potencial para aplicações reológicas [Zakaria e Rahman, 1996], proteção contra insetos [Marques e col., 1992], propriedades contra vírus [Gonçalves e col., 2005], bactérias e fungos [Marques e col., 1992]. A goma de cajueiro apresenta aplicação como espessante para sucos e refrescos, emulsificante para molhos e saladas e suporte para microcápsulas e, ainda, como agente depressor para flotação de minério [Mothé, 2000]. Foi relatado que emulsões contendo polissacarídeos de *Anacardium occidentale* L. favorecem a resolução do período inflamatório, considerando as características de sinais flogísticos menos intensos e a presença de tecido de granulação fibrovascular e fibras colágenas, em relação aos grupos controle [Schirato e col., 2006].

1.2.1- Reação de Carboximetilação da Goma do Cajueiro

A busca por materiais biodegradáveis, extraídos de fontes renováveis e que apresentem melhor desempenho e menor custo é cada vez mais presente na comunidade científica. Vários derivados de polissacarídeos têm sido preparados através de modificação química, de modo a melhorar as propriedades físico-químicas,

mecânicas ou químico-biológicas, ampliando assim as possibilidades de utilização como novos materiais.

Muitos polissacarídeos vêm sendo modificados para melhorar suas propriedades para aplicações como matrizes para liberação controlada de fármacos [Enel e McClure, 2004], reconstrução de tecidos [Kim e col., 1999], hidrogéis sensíveis ao pH e estímulos elétricos [Chen e col., 2004], matrizes para separação de lectina [Lima e col., 2002] e também para a remoção de metais pesados de efluentes [Jeon e Holl, 2003].

Vários tipos de modificações têm sido propostos via processos químicos baseados na introdução de grupos iônicos à estrutura do polissacarídeo como é o caso das reações de carboximetilação, sulfonatoalquilação, aminoetilação e carboxilação ou na introdução de grupamentos substituintes em estruturas lineares [Picton e col., 1995]. A carboximetilação é um método industrial bastante utilizado para a preparação de derivados polissacarídicos, apresentando vantagens como baixo custo e a não toxicidade dos produtos formados [Verraest e col., 1995]. Muitos derivados de polissacarídeos têm sido preparados por reações de carboximetilação usando substâncias como a quitosana [Hayes, 1986], celulose [Torul e Arslan, 2003], goma do cajueiro [Silva e col., 2004], amido [Kooijman e col., 2003], quitina [Kurita, 2001], gelana [Miyamoto e col., 1996], pululana [Picton e col., 1995], xilana [Petzolde e col., 2006] e inulina [Verraest e col., 1995], como materiais de partida.

Os grupos hidroxila dos monossacarídeos são mais ácidos que os dos álcoois comuns, pois os monossacarídeos contêm muitos átomos de oxigênio que exercem efeito indutivo nos grupos vizinhos. Bases forte como NaOH podem então ser usadas para transformar álcoois em alcóxidos como mostrado na Figura 3.

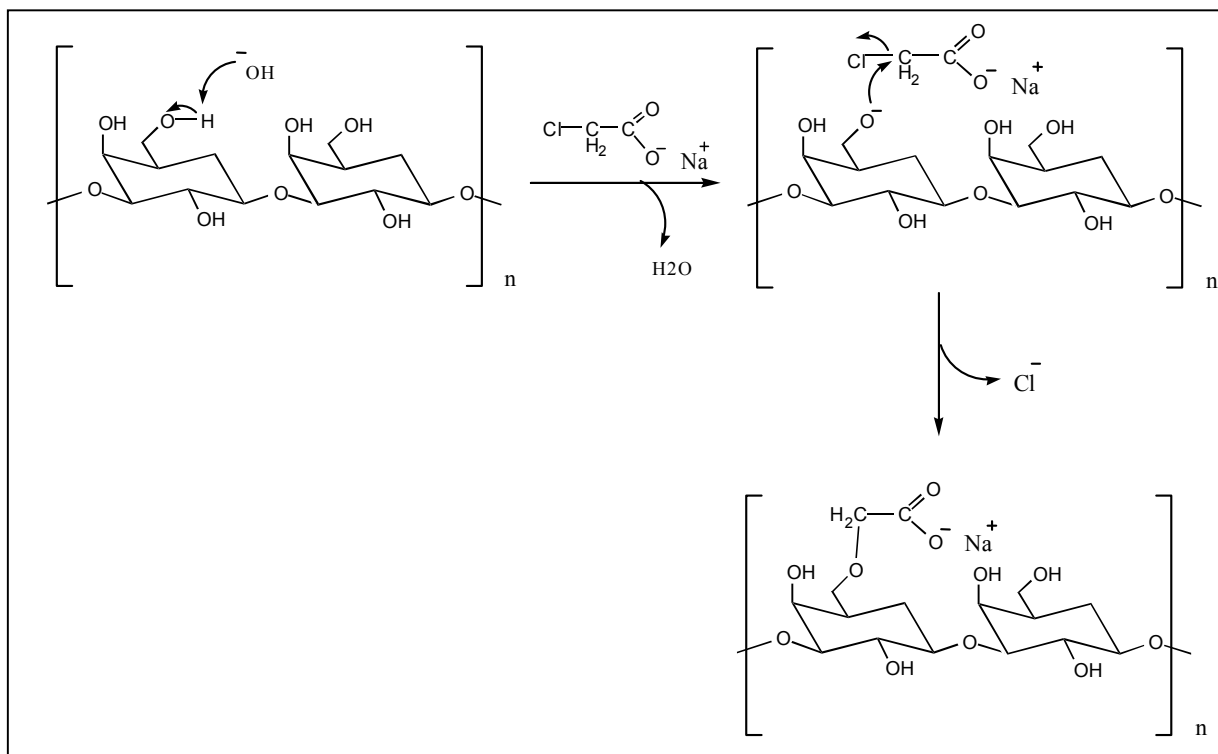


Figura 3. Mecanismo de reação da carboximetilação da goma do cajueiro adaptado de Silva e col., 2004.

Na primeira etapa da reação, existe um equilíbrio entre o hidróxido de sódio e os grupos hidroxila do polissacarídeo com a formação de íons alcóxidos que por sua vez reagem com o ácido monocloraacético via reação $\text{S}_{\text{N}}2$ com a formação de um éter. O ácido monocloraacético pode reagir com o NaOH formando glicolato de sódio. O glicolato de sódio pode ainda reagir com outra molécula de glicolato ou com uma molécula de ácido monocloraacético formando sódio diglicolato.

A quantidade de grupos carboximetil formados é indicada pelo grau de substituição (GS) (número de grupos carboximetil inseridos na cadeia do polímero por unidade monomérica). A eficiência do processo é definida como a percentagem de reagente (ácido monocloraacético) que efetivamente reagiu com o polissacarídeo. O reagente remanescente é consumido nas reações laterais [Bhattacharyya e col., 1995]. O grau de substituição (GS) para derivados carboximetilados pode ser determinado por um número de técnicas analíticas, as mais comuns utilizam potenciometria e

condutimetria. Entretanto, o resultado não fornece informações sobre a distribuição de substituintes $-\text{CH}_2\text{COONa}$ no anel glicosídico [Glinel e col., 2000].

A goma do cajueiro foi carboximetilada em solução alcalina usando ácido monocloroacético (AMC) como agente eterificante [Silva e col., 2004]. O efeito dos parâmetros reacionais como concentração de base, razão AMC/goma e temperatura foram investigados em relação ao grau de substituição e rendimento. Amostras de goma carboximetilada com grau de substituição entre 0,1 e 2,21 foram preparadas e caracterizadas por ressonância magnética nuclear, permeação em gel e viscosimetria [Silva e col., 2004]. A melhor condição de carboximetilação foi obtida utilizando concentração de base de 5,5 M, razão AMC/goma de 1:1 e tempo de reação de 3 h.

A reticulação da goma do cajueiro foi realizada com epícloridrina para viabilizar sua utilização como matriz cromatográfica na separação de lectinas. O gel reticulado é capaz de ligar-se a proteínas galactose específica como frutalina, jacalina e lectinas da semente de *Artocarpus* (Lima, 2002). O produto resultante da reação de carboximetilação é um polieletrólito que pode ter uma variedade de aplicações em vários campos tais como em química, alimentício, farmacêutica e na indústria de cosméticos. Derivados iônicos de polissacarídeos são produzidos tanto pelo seu valor como polieletrólito como por sua função como precursor para outras modificações químicas [Verraest e col., 1995].

1.3- Complexos Polieletrólíticos

Complexos polieletrólíticos (CPE) são macromoléculas formadas pela interação iônica de um polímero catiônico e um aniônico. A sua formação ocorre sem a necessidade de moléculas catalisadoras ou inibidoras e ocorrem em soluções aquosas, o que é uma grande vantagem sobre as reações de reticulação covalente [Berger e col., 2004a].

Quitosana é um polímero catiônico que pode interagir com outros polímeros que possuem cargas negativas (poliânions) por esta razão é um dos polissacarídeos mais utilizados na formação de CPEs. Os polissacarídeos mais utilizados como

polímeros aniônicos na formação de CPE de quitosana são aqueles que contêm grupos carboxilato e sulfato, como mostrados na Tabela 2.

Tabela 2. Polieletrólitos que formam complexos com quitosana adaptada de Berger e col., 2004a.

Classe	Polieletrólitos	Grupo aniônico	Aplicações	Referência
Polissacarídeos	Sulfato de dextrana	$-\text{OSO}_3^-$	Membranas	Yu e col., 2007
	Pectina	$-\text{COO}^-$	Gel	Charlton e col., 2007
	Alginato	$-\text{COO}^-$	Microesferas	Martins e col., 2006
	Ácido hialurônico	$-\text{COO}^-$	Filme	Feng e col., 2005
	Goma Arábica	$-\text{COO}^-$	Microesferas	Xing e col., 2004
	Goma do Cajueiro	$-\text{COO}^-$	Esferas	Paula e col., 2006
	κ -Carragenana	$-\text{OSO}_3^-$	Microesferas	Muzzarelli e col., 2004
	Carboximetilcelulos e	$-\text{COO}^-$	Microesferas	Muzzarelli e col., 2004
Polímero sintético	Ácido Poliacrílico	$-\text{COO}^-$	Microesferas	Wu e col., 2006
	Polifosfato	$-\text{OPO}_3^-$	Micropartículas	Gupta e Jabrail, 2006a

Complexos polieletrólíticos de quitosana com polissacarídeos são biodegradáveis e biocompatíveis, pois a quitosana é metabolizada por certas enzimas

humanas, especialmente as lisoenzimas [Muzzarelli 1997; Koga 1998]. Quitosana na forma de hidrocloreto de quitosana foi incluído na 4ª edição da Farmacopopeia Européia [George e Abrahan, 2006]. Complexos desta também exibem interessante capacidade de intumescimento [Berger e col., 2004a]. Esses complexos têm numerosas aplicações, tais como: em membranas, em sistemas para imobilização de enzimas, em sensores ambientais, e também na preparação de matrizes utilizadas em sistemas de liberação controlada de fármaco. Na complexação polieletrólítica a atração eletrostática entre os grupos catiônicos de um policátion, como a quitosana, e os grupos aniônicos de um poliânion é a principal interação que leva à formação do complexo (Figura 4).

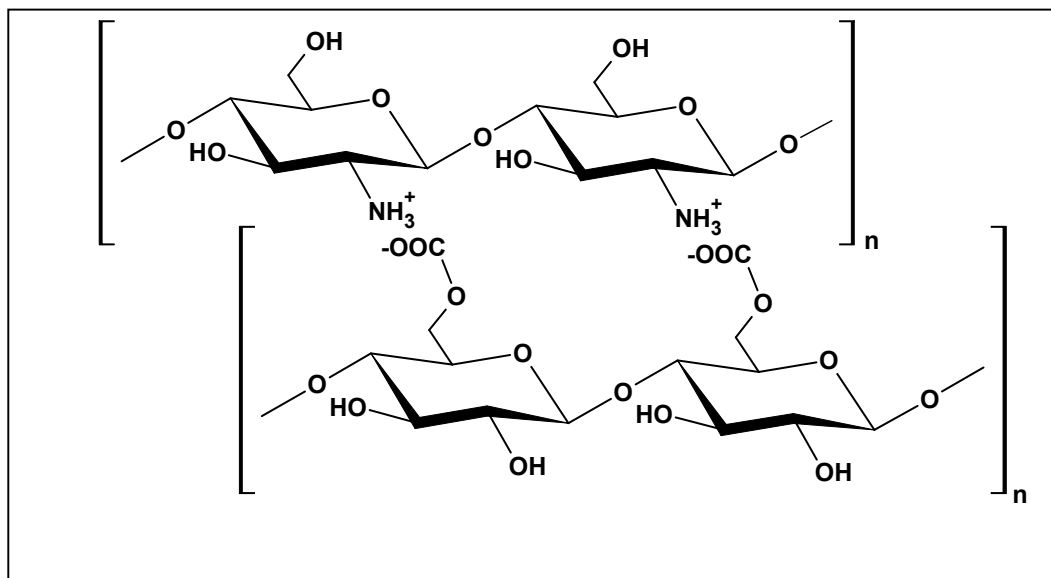


Figura 4. Esquema da interação entre as cadeias de quitosana (polieletrólito catiônico) e um polieletrólito aniônico.

Como CPEs são formados por interações iônicas, suas propriedades físico-químicas são sensíveis à variação de pH, temperatura e campo elétrico. CPE formado por quitosana/ácido hialurônico respondem a estímulos elétricos. Quando filmes intumescidos do complexo foram colocados entre um par de eletrodos, foi observado que a membrana sofria deflexão quando um campo elétrico era aplicado, o que

possibilitaria sua utilização em sensores [Kim e col., 2003a]. CPEs de quitosana com carragenana e carboximetilcelulose mostraram diferentes graus de intumescimento dependendo do pH [Mitsumata e col., 2003; Sakiyama e col., 1993].

CPEs podem ser usados para preparar sistemas de liberação de fármaco. O intumescimento e o perfil da liberação podem ser modulados por seleção apropriada das condições de preparação. Propriedades essenciais dos CPEs usados nos sistemas de liberação controlada são resumidas na Figura 5.

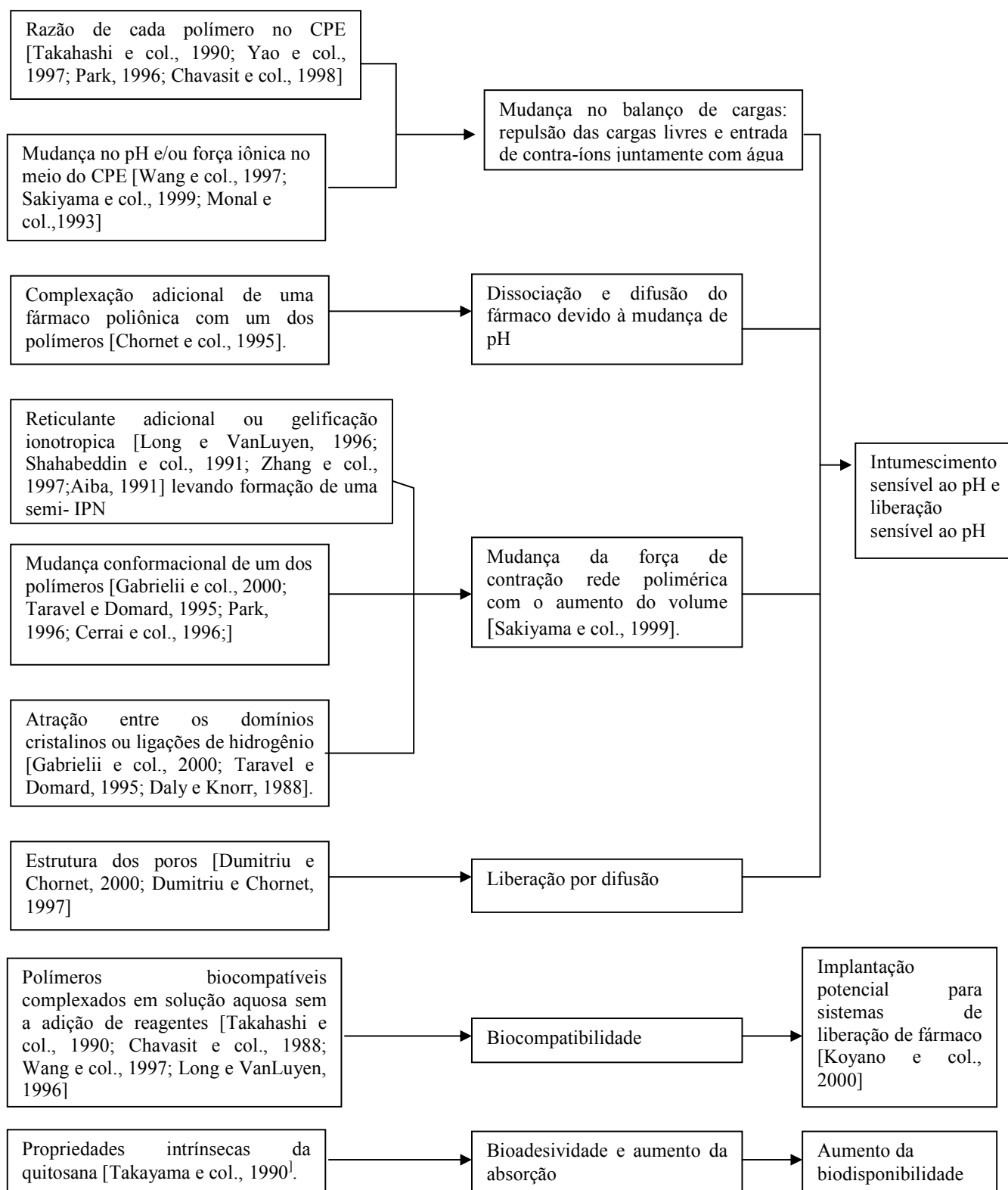


Figura 5. Propriedades essenciais de complexos polieletrólitos contendo quitosana usada em sistemas de liberação controlada adaptado de Berger e col., 2004a.

A Figura 6 mostra o efeito do pH nas cadeias dos CPE. Observa-se que em pH básico um maior número de cargas negativas devido à desprotonação de grupamentos iônicos do polieletrólito aniônico, enquanto que em pH ácido ocorre a protonação de grupamentos iônico do polieletrólito catiônico (quitosana). Assim, dependendo da estabilidade do polímero aniônico em meio ácido pode ocorrer dissolução do complexo devido à alta solubilidade de quitosana em meio ácido.

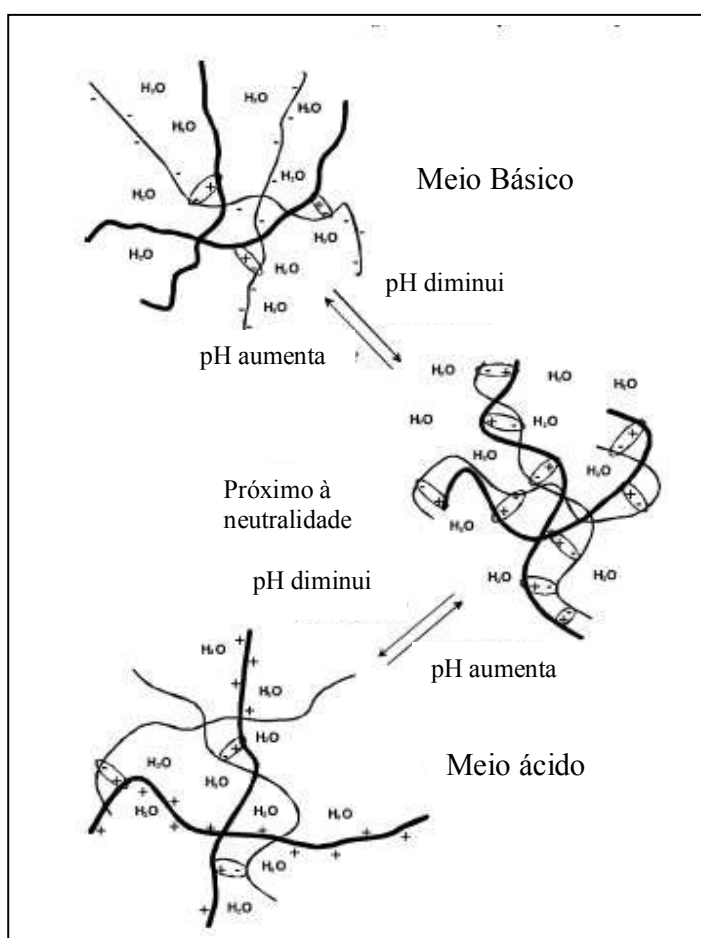


Figura 6. Estrutura e intumescimento sensível ao pH do meio de um complexo contendo quitosana; carga negativa do outro polieletrólito: carga positiva da quitosana, +, interação iônica, \ominus ; quitosana —; polieletrólito adicional, —, adaptado de Berger e col., 2004a.

Complexos polieletrólíticos de quitosana possuem limitações no uso como carreadores de fármacos via oral, devido a sua capacidade de dissolução em meio ácido como encontrado nos fluidos gástricos (FG). Com a finalidade de superar esse problema, bem como criar sistemas com maiores resistências química e física, os complexos polieletrólíticos podem ser reforçados pela adição de agentes reticulantes de quitosana. Esta metodologia leva à formação de uma rede semi-interpenetrada [Berger e col., 2004b]. No entanto, esse procedimento pode diminuir a biocompatibilidade [Berger e col., 2004b].

1.4- Reação de Reticulação

A reticulação consiste na introdução de moléculas de baixa massa molar, chamadas de agentes de reticulação. Os grupos funcionais (-OH, -COOH e -NH₂) na estrutura dos polissacarídeos podem ser utilizados para a formação de ligações cruzadas com moléculas bifuncionais ou íons, os quais permitem a formação de pontes entre duas cadeias da macromolécula. Dependendo da natureza do agente de reticulação as principais interações na formação da cadeia são covalentes ou iônicas.

As reticulações por inserção de agentes reticulantes covalentes podem ocorrer de três formas diferentes. Reagentes bifuncionais de baixa massa molar formam ligações covalentes entre as cadeias de um mesmo polímero (Figura 7A). A Figura 7B mostra a reticulação de cadeias de um tipo de polímero com cadeias de outro polímero formando uma rede polimérica híbrida (HPN). Quando um polímero não reagente é adicionado ao polímero reagente antes da reação de reticulação, existe a formação de redes interpenetrantes (IPN, Figura 7C). A reticulação iônica ocorre entre as cadeias de polímeros carregados (positivamente ou negativamente) pela presença de íons (Figura. 7D) [Berger e col., 2004 b].

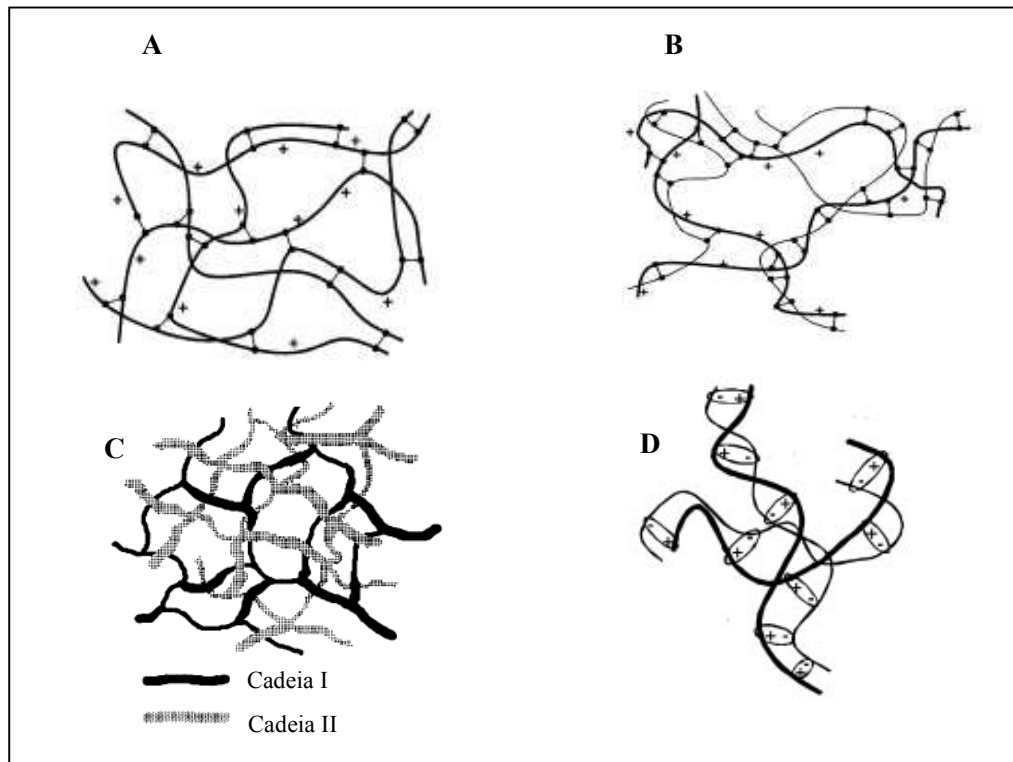


Figura 7. Modelos de estruturas de géis formados por reticulação: (A) reticulação entre as próprias cadeias (B) HPN; (C) IPN; (D) reticulação iônica entre as cadeias de quitosana. carga positiva da quitosana: +; carga negativa do reticulante iônico: - ; interação iônica: ○ ; quitosana: - - - ; polieletrólito adicional: — ; reticulante covalente: ●—●, adaptada de Berger e col., 2004b.

Os agentes reticulantes normalmente utilizados para reticulação de polissacarídeo são a epícloridrina, o glutaraldeído e o formaldeído. As propriedades de polímeros reticulados dependem principalmente da densidade de reticulação e da razão molar do agente reticulante para o número de unidades repetitivas. A dissolução devido ao alto grau de intumescimento pode ser evitada por aumento da densidade de reticulação e/ou por mudança da natureza do reticulante [Mitsumata e col., 2003].

Os agentes reticulantes são usados para deixar a matriz polimérica estável durante mudanças de pH, melhorar suas propriedades mecânicas e também para

aumentar o tempo de liberação de fármacos em carreadores. Na Tabela 3 são mostrados alguns exemplos de sistemas formados por quitosana reticulada.

Tabela 3. Sistemas formados por quitosana reticulada.

Agente Reticulante	Aplicação	Referências
Glutaraldeído	Microesferas para liberação de teofilina	Rokhade e col., 2007b
	Nanofibras para liberação controlada de fármacos	Yang e col., 2007
	Biosensor glucose	Ozoemena e Nyokong, 2006
	Biosensor urease	Maaref e col., 2007
Formaldeído	Filmes para liberação controlada de DNA	Lu e col., 2007
	Microcápsula para liberação de fármaco	Huang e col., 2007a
Epicloridrina	Membranas para filtração	Huang e col., 2007b
	Compósitos para adsorção de creatinina	Jiugao e col., 2007
	Microesferas para liberação de ampicilina	Mundargi e col., 2007
Genipina	Micelas poliméricas para liberação de fármaco	Liu e col., 2007
	Microesferas para liberação de proteína	Yuan e col., 2007
	Hidrogéis para liberação de fármaco	Lee e Lee, 2007
	Microcápsula para encapsulação de células.	Chen e col., 2007

Reticular quitosana com glutaraldeído faz com que ela fique menos susceptível à degradação por lisozimas [Jameela e col., 1994; Jameela e Jayakrishanan, 1995]. Microesferas de quitosana reticuladas por glutaraldeído apresentaram capacidade liberação de fármaco de longa duração [Jameela e col., 1994; Jameela e Jayakrishanan, 1995; Jameela e col., 1998].

Dini e col. [2003] relataram que microesferas de quitosana reticuladas com glutaraldeído contendo fármacos hidrofílicos com grau de reticulação 6, 12 e 24,5 liberaram 85%, 65% e 38%, respectivamente, depois de 300 minutos. Gupta e Jarbrail [2006b] reticularam esferas de quitosana com glutaraldeído e glioxal para a liberação de ormeloxifeno. Em seus estudos, 67,3% do fármaco foram rapidamente liberados em 30 horas a partir das esferas não reticuladas, enquanto que esferas reticuladas com 6% de glutaraldeído ou 4% de glioxal tiveram significativa redução da liberação em 30-40 horas (29,6% e 22,2%, respectivamente). Esse estudo mostrou que a taxa de liberação do fármaco pode ser modificada não apenas pelo grau de reticulação, mas também com o tipo de reticulante usado.

Os agentes reticulantes glutaraldeído e formaldeído são tóxicos e requerem uma excessiva purificação durante a preparação dos hidrogéis para eliminar resíduos que não formaram ligações cruzadas [Berger e col., 2004 b]. O uso desses agentes reticulantes pode diminuir a biocompatibilidade dos carreadores de fármacos, por isso o uso de agentes reticulantes não tóxico, como genipina, tem sido alvo de investigações.

1.4.1- Genipina

Genipina é um aglicona derivada de um iridoide glicosídeo denominado geniposídeo encontrado na fruta da *Gardenia jasminoides* ELLIS, obtido via hidrólise enzimática com β – glucosidase [Butler e col., 2003]. Os iridoídeos são monoterpenos caracterizados por possuírem em sua estrutura básica o esqueleto ciclopentano pirano (Figura 8).

O fruto da *Gardênia jasminoide* ELLIS foi incluído na medicina tradicional para o tratamento de inflamação, icterícia, dor de cabeça, edema, febre, desordens hepáticas e hipertensão [Aburada e col., 1976; Miyasita 1976; Tseng e col., 1995]. Ações farmacológicas efetivas, como ações anti-oxidativas, antiinflamatória e atividades fibrolíticas tem sido demonstradas [Tseng e col., 1995; Jagedeeswaran e col., 2000; Koo e col., 2004].

Koo e col. [2006] mostraram que o extrato da fruta possui acentuada atividade antiinflamatória e analgésica, sendo o geniposídeo e a genipina responsáveis por estas atividades. A genipina tem atividade antiinflamatória mais forte do que o geniposídeo. Genipina também inibiu apoptose de hepatócitos [Yamoto e col., 2001] e protegeu neurônios hipocampal [Yamazaki e col., 2001]. Apesar de não ter sido aprovada para alimento e uso biomédicos na América do Norte, genipina está sendo utilizada no Japão, Korea, Taiwan e no sudoeste da Ásia [Nickerson e col., 2006a].

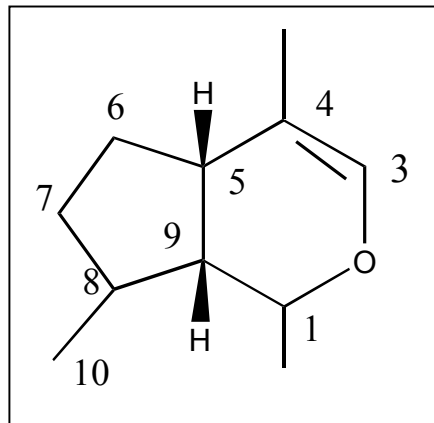


Figura 8. Estrutura básica de um iridoide.

Geralmente, a estereoquímica dos grupos substituintes em C5 e C9 é do tipo cis. O nome iridoide provem das substâncias IRIDOMIRMECINA, IRIDOLACTONA e IRIDODIAL [Sampaio e col., 1998]. A Figura 9 mostra as estruturas químicas do geniposídeo (a) e da genipina (b).

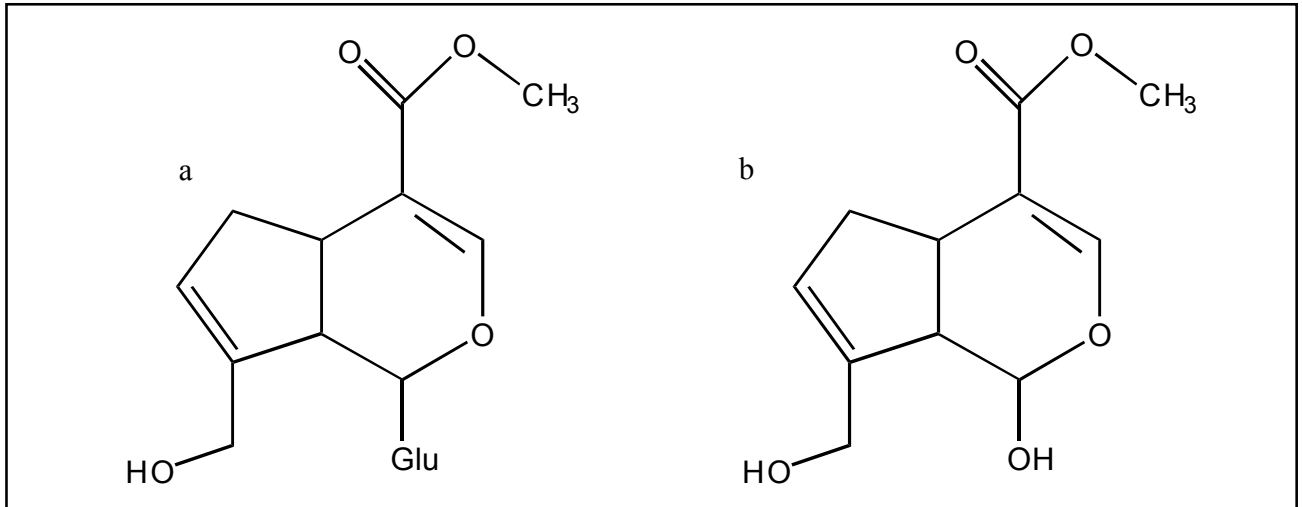


Figura 9: Estrutura química: (a) geniposideo e (b) genipina.

A citotoxicidade da genipina foi estudada *in vitro* usando fibroblastos 3T3 utilizando glutaraldeído como controle. O resultado indica que a genipina é significativamente menos tóxica do que o glutaraldeído [Akao e col. 1994]. A genotoxicidade da genipina foi testada *in vitro* usando células (CHO-K1) do ovário de hamster chineses [Tsai e col. 2000]. Os resultados mostraram que o glutaraldeído pode produzir resposta clastogênica nas células CHO-K1, enquanto que a genipina não causa. Genipina é 5.000-10.000 vezes menos tóxica do que o glutaraldeído [Jim e col. 2004] o qual, mesmo em baixas concentrações, é citotóxico.

Genipina vem sendo usada como agente reticulante da quitosana, pois pode reagir com grupamentos amino livres formando um pigmento azul [Mi e col., 2002; Mi e col., 2001]. No mecanismo da reação de reticulação da quitosana com genipina ocorre inicialmente um ataque nucleofílico do grupo amino da quitosana ao carbono olefínico C3, seguido pela abertura do anel diidropirano para formar uma amina heterocíclica (Figura 10).

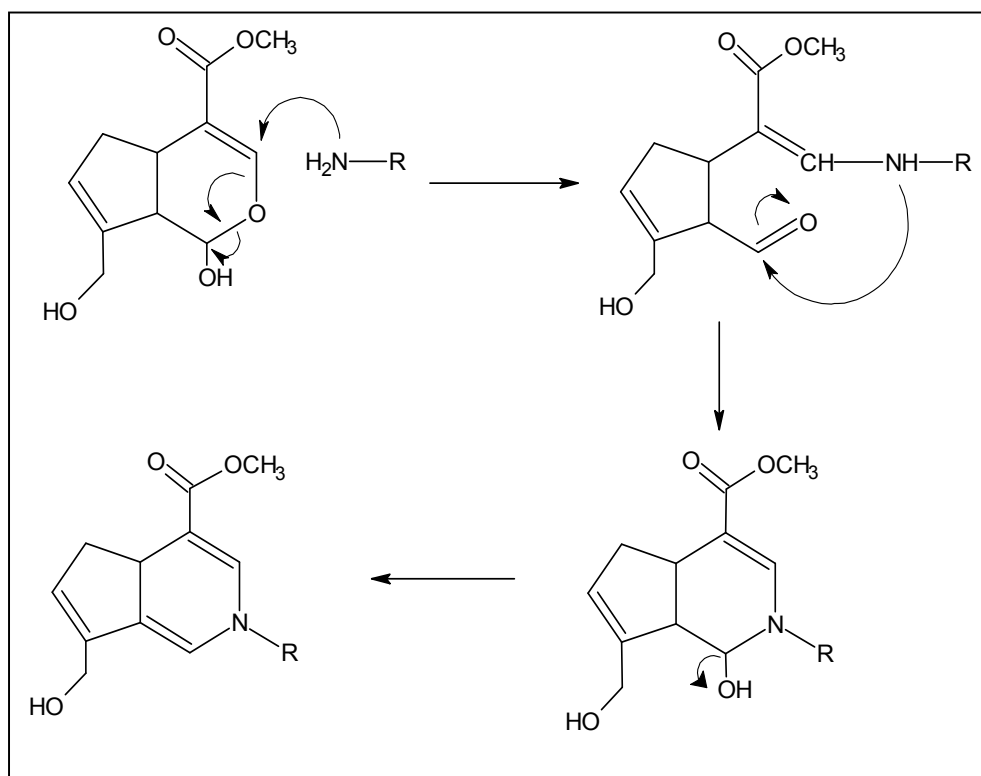


Figura 10. Ataque nucleofílico da quitosana ao carbono C3 da genipina [Butler e col., 2003].

A segunda reação, mais lenta, é uma substituição nucleofílica $\text{S}_{\text{N}}2$, a qual envolve a substituição do grupo éster da genipina por uma amida secundária com liberação de metanol (Figura 11).

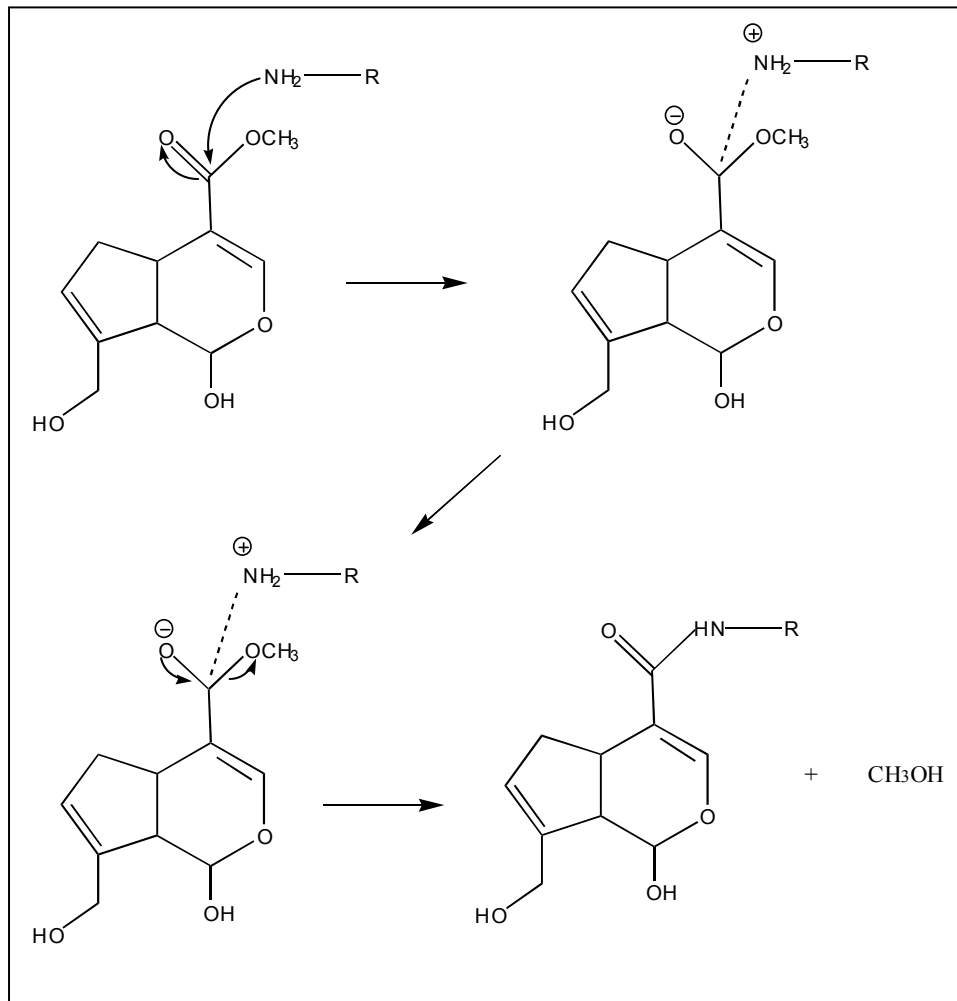


Figura 11. Reação da genipina com quitosana para formar amida secundária [Butler e col., 2003].

Hidrogéis obtidos de quitosana carboximetilada (NOCQ) e alginato reticulados com genipina para a liberação de BSA foram reportados por Chen e col. [2004]. O grau de intumescimento bem como a quantidade de proteína liberada do hidrogel foi dependente do pH. Em pH 1,2 a liberação é lenta e somente 20% da proteína é liberada, enquanto em pH 7,4 um aumento significativo na liberação da proteína é observado (80%).

Yuan e col. [2007] investigaram o efeito da reticulação de microesferas de quitosana com genipina na liberação de proteína. As esferas apresentam uma intensificação da cor azul com o aumento da concentração de genipina e tempo de reticulação. Os autores mostraram que o grau máximo de reticulação de 33-34% foi obtido com 8 h de reticulação e concentração de genipina de 0,5 mM. Esse valor

máximo de grau de reticulação não aumenta com o aumento do tempo ou concentração de genipina. A suposição dos autores é que isto se deva à reticulação da camada superficial das microesferas, o que impediria a reticulação das camadas internas. A liberação de proteína foi reduzida de 75,4 a 60% após 31 dias, se comparado com a microesferas sem reticulação.

Microcapsulas formadas por alginato revestidos com quitosana reticulada com genipina foram estudadas por Chen e col. [2006]. Os resultados obtidos mostraram que a espessura média da camada de quitosana reticulada com genipina é de 37 μ m. Aumento do tempo de reação de 5 h para 72 h e da temperatura de 4°C para 37°C aumentaram o grau de reticulação da camada externa. Butler e col. [2006] investigaram o efeito do pH no intumescimento de géis de quitosana reticulada com 5 mM de genipina. Para valores de pH > 6,5, onde os grupos amins não estão protonados, o intumescimento não é verificado. Em valores de pH < 6,5, o intumescimento ocorre com um máximo próximo a pH 3,0. Este comportamento é consistente com o comportamento padrão dos polieletrólitos.

A cinética de geleificação de gelatina reticulada com genipina por reologia mostra que com o aumento da concentração de genipina e da temperatura de reticulação a interação entre as cadeias deixa de ser governada por ponte de hidrogênio (amostra não reticulada) para ser predominantemente covalente (reticulação química) [Nickerson e col., 2006a; Bark e Butler, 2005].

1.5- Liberação de Fármacos

Nos últimos 25 anos muitas pesquisas têm sido focalizadas na preparação de microesferas de polímeros degradáveis para liberação controlada de fármacos. A administração do fármaco via tais sistemas é vantajosa porque microesferas podem ser ingeridas ou injetadas; podem ser adaptadas para o perfil de liberação desejado e em alguns casos podem até mesmo permitir a liberação em regiões específicas do organismo [Freiberg e Zhu, 2004].

O termo “liberação controlada” implica na predição e na reprodutibilidade da cinética de liberação de um fármaco. A Tabela 4 mostra alguns exemplos de sistemas que utilizam polímeros como carreadores de fármaco assim como o mecanismo da liberação.

Tabela 4. Alguns mecanismos que acionam a liberação de fármacos no organismo. (www.iq.usp.br/wwwdocentes/rtorresi/portugues/interesse/drogas.htm).

Estímulo	Polímero	Mecanismo
pH	hidrogel ácido ou básico	Mudança do pH - intumescimento – liberação do fármaco
Força Iônica	hidrogel iônico	Mudança na força iônica— alteração na carga efetiva do hidrogel— mudança na conformação – liberação do fármaco
Espécies químicas	Hidrogel contendo grupos aceptores de elétrons	Formação de complexo de transferência de carga - mudança na conformação - liberação do fármaco
Enzima-substrato	Hidrogel contendo enzimas imobilizadas	Substrato presente – conversão enzimática - produto muda a conformação do hidrogel - liberação do fármaco
Magnético	Partículas magnéticas dispersas nas microesferas	Campo magnético aplicado - mudança nos poros da microesfera – liberação do fármaco
Ultrassom	poli (etileno-vinil álcool)	Irradiação de ultrassom – aumento da temperatura - liberação do fármaco
Elétrico	Polieletrólito	Campo elétrico aplicado- carregamento da membrana– difusão do fármaco carregada - mudança na carga do polímero–liberação do fármaco

Macromoléculas têm sido utilizadas no transporte de fármacos de modo a prolongar sua ação e diminuir sua toxicidade [Takakura e Hashida, 1995; Nassute e col., 2002; Ettmayer e col., 2004]. Alguns fármacos que apresentam baixa biodisponibilidade, ou quando a substância ativa tem um efeito colateral de irritação local, podem ter esses problemas solucionados quando preparados em matriz polimérica que proporciona uma liberação controlada [Palmieri e col., 2002; Sjoblom, 2004].

A quimioterapia para tratamento do câncer é um bom exemplo desta aplicação devido à alta toxicidade dos agentes antitumorais, uma vez que são, na maioria, desprovidos de seletividade [Takakura e Hashida, 1995; Satchi-Fainaro e col., 2003]. Com o início do século 21, prevê-se que a interface entre a química de polímeros e as ciências biomédicas dê origem à “terapêutica com polímeros” [Duncan, 2003].

Sistemas de liberação controlada oferecem várias vantagens quando comparados aos sistemas convencionais de administração de fármacos. Nas formas de administração convencionais (nebulização "spray", injeção, pílulas) a concentração do fármaco na corrente sanguínea apresenta um aumento, atinge um pico máximo e então declina. Desde que cada fármaco possui uma faixa de ação terapêutica acima da qual ele é tóxico e abaixo da qual ele é ineficaz, os níveis plasmáticos são dependentes das dosagens administradas. Este fato é problemático se a dose efetiva estiver próxima à dose tóxica. O objetivo dos sistemas de liberação controlada é manter a concentração do fármaco entre estes dois níveis por um tempo prolongado, utilizando-se de uma única dosagem (Figura 12).

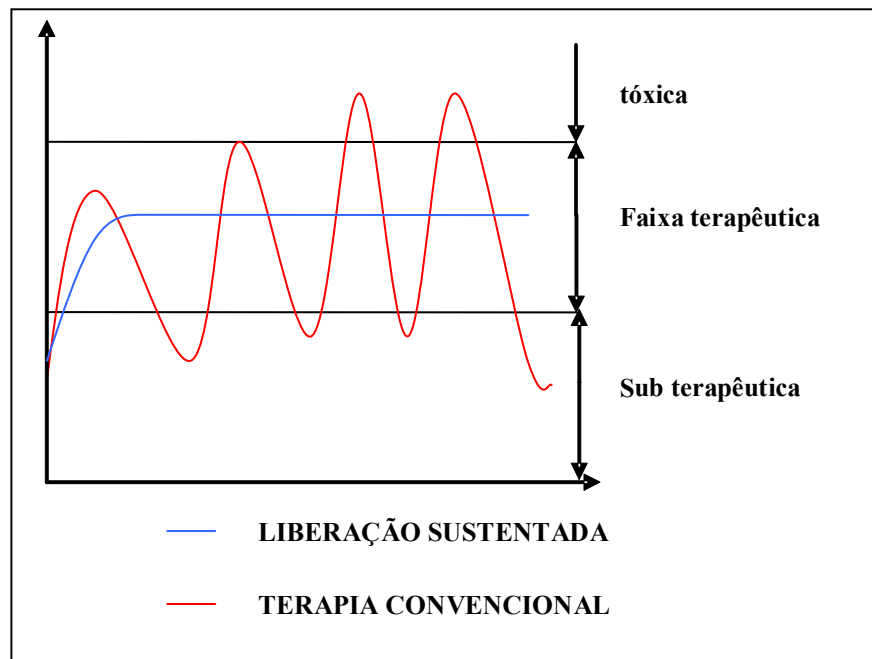


Figura 12. Representação de um sistema de liberação controlada de fármaco (www.drugdel.com/polymer.htm).

Outra vantagem é que esses produtos diminuem a frequência de administração do fármaco, o que é muito conveniente no tratamento de condições crônicas [Verma e col, 2002; Jacobs e col., 1993]. Medicamentos à base de proteínas, como insulina, possuem elevada especificidade e atividade em concentrações bem baixas, em comparação com fármacos de baixa massa molar. Devido à instabilidade química das proteínas, tratamento com base nessa substância normalmente deve ser administrado via injetável em vez de via oral devido à degradação das proteínas em meio muito ácido como nos fluidos estomacais [George e Abraham, 2006].

Pessoas que sofrem de diabetes precisam tomar injeções periódicas de insulina, dependendo do nível de glicose no sangue. Um esquecimento pode causar uma hipo ou uma hiperglicemia. Muitos sistemas para liberação controlada de insulina no organismo baseiam-se na reação da glicose, no sangue, com a enzima glicose oxidase. Esta enzima pode ser imobilizada pelos polímeros que formam a microesfera

do fármaco. A reação da enzima com a glucose causa uma diminuição do pH no ambiente da microesfera.

A repulsão eletrostática entre as cadeias do polímero aumenta, levando a um inchaço do mesmo e conseqüente liberação da insulina (Figura 13). O sistema só libera insulina na presença de açúcar no sangue. O polímero mais utilizado para este fim é a N,N-dimetilaminoetil metacrilato ou poliacrilamida (www.drug.delivery://liberandoinsulina).

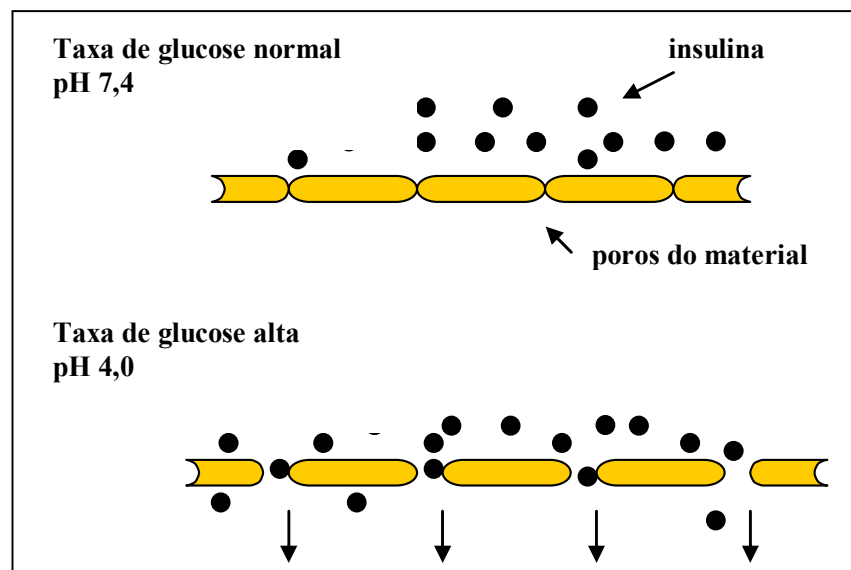


Figura 13: Esquema da liberação de insulina estimulada pela mudança de pH a partir de microesferas.

O mecanismo pelo qual um medicamento pode ser liberado no organismo pode ser classificado como: difusão, erosão ou expansão [Verma e col, 2002; Jacobs e col., 1993].

Dois tipos de sistemas controlados por difusão foram desenvolvidos. O primeiro é um reservatório no qual o agente ativo forma um núcleo cercado por uma barreira difusional inerte. A taxa de liberação nesses sistemas é constante. A velocidade de liberação é dependente da espessura, da área superficial e da permeabilidade da membrana.

O segundo tipo de sistema controlado por difusão é o sistema monolítico, no qual o agente é disperso uniformemente na matriz polimérica, onde não é possível

identificar um núcleo diferenciado. O perfil de liberação é controlado pela carga do agente, pela natureza dos componentes e pela geometria do sistema. O sistema monolítico e o reservatório estão esquematizados na Figura 14.

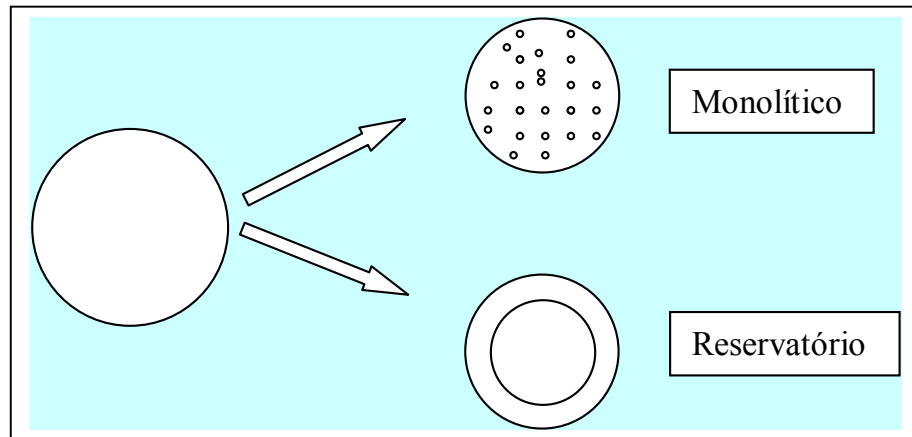


Figura 14. Ilustração de sistema monolítico e reservatório (www5.bae.ncsu.edu/bae/research).

Em um sistema controlado por um mecanismo de erosão, o fármaco é geralmente imobilizado em um polímero e liberado à medida que esse é consumido no organismo [Jacobs e col., 1993]. No controle por expansão, o fármaco é inicialmente incapaz de se difundir através de um material polimérico no qual se encontra armazenado. Porém, à medida que o polímero, sob condições específicas, se expande em contato com o meio biológico, o fármaco permeia por este e é liberado.

A liberação controlada de fármaco tem sido testada *in vitro* com alguns CPE e apresenta grande potencial para implantação de novos sistemas de liberação [Berger e col., 2004a]. Alguns desses complexos são alginato-quitosana [Lee e Ha, 1997], quitosana-carragenana [Tapia e col., 2004], quitosana-pectina [Macleode col, 1999]; quitosana-goma arábica [Meshali e Gabr, 1993], quitosana-metilcelulose [Rokhade e col. 2007a], quitosana-polietileno glicol [Wang e col, 2007] e quitosana-ácido hialurônico [Lim e col, 2002]. A Tabela 5 mostra alguns exemplos dos transportadores mais utilizados na liberação de fármacos com propósito de prolongar a ação e diminuir a toxicidade.

Tabela 5 - Lista representativa dos polímeros usados em sistemas de liberação de fármacos adaptado de Chung e col., 2005.

	Classificação	Polímeros
Polímeros naturais	• Polímeros a base de proteínas	albumina, globulina, colágeno, gelatina
	• Polissacarídeos	Dextrana, quitina, quitosana, ácido hialurônico, alginato, ciclodextrinas
Polímeros sintéticos biodegradáveis	• Poliéster	Poli (ácido láctico), poli (ácido glicólico), poli (hidroxibutirato), poli (ϵ -caprolactona), poli (ácido β -málico), poli (dioxanonas)
	• Polianidrido	Poli (ácido sebácico), poli (ácido adípico), poli (ácido terftálico) e vários copolímeros
	• Poliamidas	Poli (imino carbonatos), poliaminoácidos
	• Polímeros fosforosos	Polifosfatos, polifosfonatos, polifosfazenos
	• Outros	Poli (ciano acrilatos), poliuretanos, éster poliorto, Polidihidropirans, poliacetais
Polímeros sintéticos não biodegradáveis	• Derivados de celulose	Carboximetil celulose, etilcelulose, celulose acetato, celulose acetato propionato, hidroxipropil metilcelulose
	• Silicones	Polidimetilsiloxano, sílica coloidal
	• Polímeros Acrílicos	Polimetacrilatos, poli(metilmetacrilato), poli hidro(etilmetacrilato)
	• Outros	Polivinilpirrolidona, etilvinilacetato, poloxameros, poloxaminas

Microesferas de quitosana obtidas pelo processo de reacetilação foram utilizadas na liberação de antibióticos na mucosa gástrica. O sistema é estável em pH ácido e permite a liberação gradativa do antibiótico na mucosa gástrica [Portero e col.,

2002]. Paula e col. [2002] sintetizaram géis de quitosana/goma do cajueiro e esses foram testados na liberação controlada de pilocarpina. O gel é resistente ao pH do estômago e é capaz de controlar a liberação do fármaco [Paula e col., 2002; Maciel e col., 2006].

Paula e col. [2006] sintetizaram esferas de quitosana e goma do cajueiro para a liberação de larvicida. Na primeira hora, a liberação é similar para as esferas de QT e QT/GC. Uma liberação mais rápida começa a ser observada após 5 h para as esferas de QT/GC. No equilíbrio, esferas de QT liberam cerca de 55% de larvicida e as esferas de QT/GC liberam cerca de 66%. Os processos que tem sido usado na preparação de esferas de quitosana são mostrados na Figura 15.

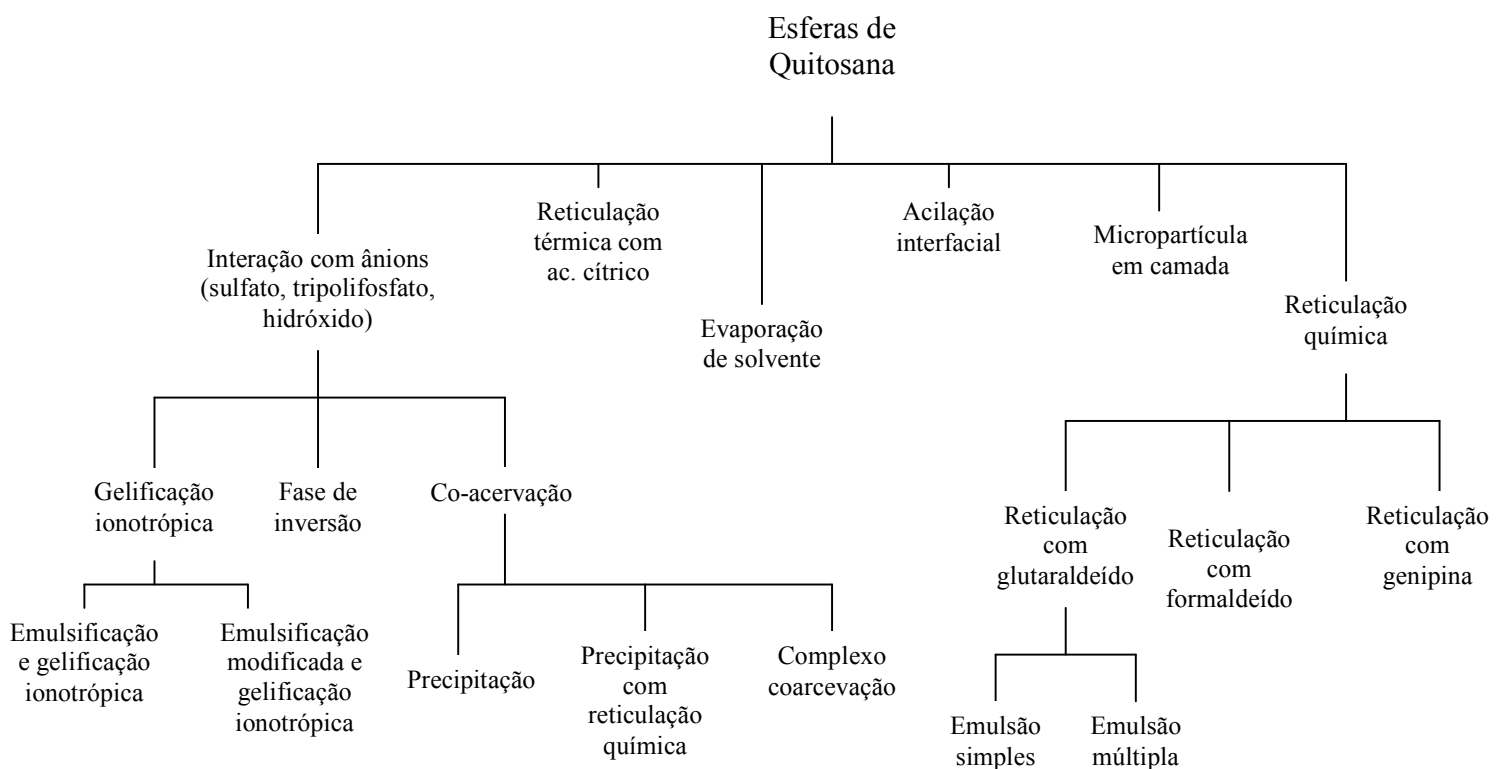


Figura 15. Métodos para preparação de esferas de quitosana adaptada de Sinha e col., [2004].

Liberação controlada de proteínas por nanopartículas de carboximetilglucomanana com quitosana exibe resposta à variação de pH e força iônica e mostra ter potencial para liberação pulsativa de proteínas [Du e col., 2005].

Nanopartículas de quitosana obtidas por gelificação iônica tem sido utilizada na liberação de proteína [Zhang e col., 2005] em mucosas e ciclosporina em superfície oculares.

Microesferas de quitosana reacetilada contendo 5-fluorouracila (5-FU), “tegafur” (FT), doxifluridina (DFUR) foram testadas em sistema de liberação controlada. Observou-se que a incorporação da droga fica em torno de 4-22% m/m. O estudo *in vivo* de liberação de DFUR mostrou liberação inicial rápida, a qual parece ser suprimida pela reacetilação da quitosana. No entanto o sistema não pareceu viável para liberação controlada [Sinha e col., 2004].

Portero e col. [2002] também descreveram o procedimento de preparação de esferas de quitosana reacetiladas para liberação controlada de amoxicilina e metaimidazol. As esferas mostraram capacidade de intumescer e gelificar em meio ácido, resultando em prolongada liberação de antibióticos. A Tabela 6 relaciona alguns CPEs de quitosana com polissacarídeos aniônicos, utilizados em sistemas de liberação controlada.

Tabela 6. Complexos polieletrólíticos de quitosana e polissacarídeos aniônicos aplicados na liberação controlada de fármaco.

Polissacarídeo	Substância utilizada na liberação	Referência
Goma Gelana	Paracetamol	Ike-Nor e col., 2006
	Proteínas	Ohkawa e col., 2004
Ácido Hialurônico	Fluticasone	Rouse e col., 2007
	Insulina	Martins e col., 2007
Alginato	Metronidazol	Ishak e col., 2007
	Vitamina B ₂	Bajpai e Tankhiwale, 2006
	Paracetamol	Chatchawaslsaisin e col., 2004
	Albumina Bovina	Chen e col., 2004
	Fármaco para a tuberculose	Pandley e Khuller, 2004
	Albumina Bovina	Zhang e col., 2004
	Metoclopramida	Hasan e col., 2003
	Ketoprofen	Tan e col., 2003
	Diclofenaco de sódio	Gonzações-Rodrigues e col., 2002
	Carragenana	Ketoprofen
Oximetazoline		Bertram e Bodmeier, 2006
Dipropilin		Bertram e Bodmeier, 2006
Paracetamol		Bertram e Bodmeier, 2006
Goma do Cajueiro	Pilocarpina	Maciel e col., 2006

2 – OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é sintetizar e caracterizar esferas de quitosana e quitosana/ goma do cajueiro

Objetivos específicos:

Isolar e caracterizar a genipina.

Preparar e caracterizar esferas de quitosana (QT) e quitosana/ goma do cajueiro (QT/GC) reticuladas com genipina e sem reticulação.

Testar a incorporação e liberação de diclofenaco de sódio nas esferas de QT/GC.

Preparar e caracterizar esferas de quitosana e goma do cajueiro carboximetilada (CCM).

Avaliar o efeito da massa molar da quitosana e do grau de substituição da goma do cajueiro carboximetilada na formação e propriedades das esferas.

Testar a incorporação e liberação de BSA nas esferas de quitosana e goma do cajueiro carboximetilada.

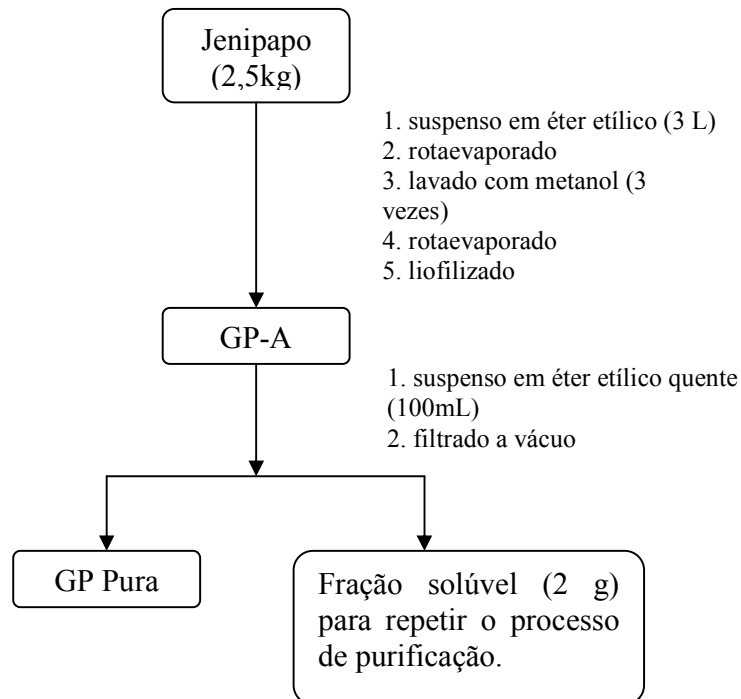
3- METODOLOGIA

3.1 – *Materiais*

As amostras de quitosana (QT) com massa molar $2,35 \times 10^5$ g/mol com grau de desacetilação de 83% (determinado por RMN ^1H) [Lavertu e col., 2003] (QTa) e $7,82 \times 10^4$ g/mol e com grau de desacetilação de 81% (determinado por RMN ^1H) (QTb) utilizadas no desenvolvimento do trabalho foram cedidas pela Quitoquímica (obtida pela desacetilação da quitina extraída de cascas de camarão). A goma do cajueiro, cedida pela EMBRAPA, foi purificada pelo método descrito por Rodrigues e col. [1993]. A genipina foi extraída do fruto da Gardênia coletado em junho de 2005, no município de Pacatuba Ceará, como descrito por Djerassi e col., [1960]., com algumas modificações. Éter etílico (Synth ou VETEC), metanol (Synth ou Dinâmica), hidróxido de sódio (Synth), ácido acético (CROMOLINE ou VETEC), fenol (MERCK), ácido sulfúrico (MERCK), ácido clorídrico (Synth ou CROMOLINE), etanol (Synth), diclofenaco de sódio (Dermo Clínica), BSA (Sigma).

3.2- *Isolamento e Purificação da Genipina*

A extração da genipina foi feita do fruto verde. Casca e semente foram retiradas e todo o resto foi pesado (2,5 kg) e colocado em frasco para extração com éter etílico (V= 3 L). A cada 24 h o solvente era evaporado em repouso na capela a temperatura ambiente e a mesma quantidade de solvente adicionada novamente ao frasco de extração (três vezes). As etapas utilizadas são descritas pelo fluxograma abaixo (Esquema 1).



Esquema 1. Fluxograma da obtenção da genipina a partir do fruto do jenipapo.

3.3- Esferas de Quitosana e Quitosana/ Goma do Cajueiro

3.3.1- Preparação das Esferas de Quitosana e Quitosana/Goma do cajueiro

A solução de quitosana (30 g/L) foi preparada em ácido acético 2% (v/v), sob agitação durante 24 h. Para a formação das esferas de QT, a solução de QTa (30 g/L) foi gotejada com um sistema acoplado a um compressor e uma seringa sobre uma solução de NaOH 1M.

Para a formação das esferas de QT/GC o seguinte procedimento foi adotado: a goma do cajueiro foi dissolvida em ácido acético 2% (v/v) e deixada sob agitação durante 24 h. Depois, QTa foi adicionada de modo a encerrar uma solução 3% (m/v) de QT e uma razão de 1:4 (m/m) de QT/GC. A solução final foi gotejada, com um sistema acoplado a um compressor e uma seringa em NaOH 1 M. As esferas foram lavadas com água destilada e secas a temperatura ambiente.

3.3.2 - Reticulação das Esferas com Genipina

A reticulação das esferas de QT e QT/GC com genipina foi realizada segundo metodologia discutida por Barck e Butler [2005] e Mi e col. [2005] com modificações. As esferas de QT foram imersas em soluções de genipina 500, 44 e 22 mM e as esferas de QT/GC foram imersas em soluções de genipina 500, 100, 80, 60, 44, 22, 10, 1 e 0,5 mM (tampão fosfato 7,4) por 96 horas em uma relação de 1g de esfera em 50 mL de solução de genipina.

Depois as esferas foram lavadas com excesso água destilada para retirar resíduos do agente reticulante. Para mensurar o grau de reticulação das esferas, a solução de genipina residual foi analisada, na diluição apropriada, por espectroscopia na região do UV-Vis em 246 nm [Mi, 2005] a partir da curva de calibração em tampão fosfato 7,4:

$$ABS = 0,0848 + 3805,96 C \quad \text{Equação 1}$$

$$R = 0,993$$

Onde ABS é a absorbância, C é a concentração em mol/L e R o coeficiente de correlação.

3.3.3- Determinação da Quantidade de Goma Incorporada nas Esferas

A quantidade de goma presente na esfera foi determinada pelo método de Dubois [1956]. Uma alíquota de NaOH 1 M, utilizado para precipitar as esferas, foi retirada, em seguida essa alíquota foi neutralizada e dialisada em uma membrana de diálise. Desta alíquota dentro da membrana dialisada, foi pipetada 0,2 mL para um tubo de ensaio e a amostra diluída para 2 mL com água destilada.

Adicionou-se ao tubo 24 µL de fenol 80% + 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. Depois a solução foi deixada em repouso por 10 minutos em seguida agitou-se em Vortex por 12 segundos. Após esse procedimento, o tubo foi deixado a 25°C durante 10 minutos. A solução foi analisada no VIS em 490 nm.

3.3.4- Cinética de Intumescimento

O estudo da cinética de intumescimento das esferas foi realizado utilizando microscópio óptico Olympus CH30. Os diâmetros das esferas foram determinados no intervalo de 10 minutos na primeira hora e de 20 minutos na segunda hora com seis amostras, em solução com pH 1,2 e tampão com pH 7,4.

A taxa de intumescimento (T.I.) é dada por:

$$T.I. = Dt/ Do; \quad \text{Equação 2}$$

Onde Dt é o diâmetro em um determinado instante e Do é o diâmetro inicial.

3.3.5- Incorporação de Diclofenaco de Sódio às Esferas de Quitosana/Goma do Cajueiro

As soluções foram preparadas na mesma proporção descrita no item 3.3.1 e a solução final foi gotejada em uma solução de NaOH/etanol contendo 1% de diclofenaco de sódio.

3.3.6- Determinação da Quantidade de Fármaco Incorporado

Para quantificar a incorporação de diclofenaco de sódio fez-se uma extração em metanol durante 24 horas sob agitação, pois o fármaco é muito solúvel neste álcool. A quantificação foi feita a partir de uma curva de calibração em metanol:

$$ABS = 0,0186 + 38643,24 C \quad \text{Equação 3}$$

$$R = 0,994$$

Onde ABS é a absorvância, C é a concentração em g/ml e R é o coeficiente de correlação.

3.3.7- Ensaio de Liberação de Fármaco

As esferas com diclofenaco de sódio (massa de aproximadamente 0,2 g) incorporado foram colocadas em 40 mL de solução de fluido gástrico simulado (FGS) de pH 1,2 ou tampão fosfato pH 7,4, com a temperatura de 37°C. Alíquotas de 3 mL foram recolhidas para análise no UV a 276 nm. As alíquotas foram retiradas no intervalo de 10 min na primeira hora, de 20 min na segunda hora, e de 30 min nas últimas 2 horas.

3.4-Esferas de Quitosana e Goma do Cajueiro Carboximetilada

3.4.1 - Preparação das Esferas de Quitosana e Goma do Cajueiro Carboximetilada

Quitosana (QT) de diferentes massas molares, QTa (maior massa molar) e QTb (menor massa molar) foram dissolvidas em ácido acético 2%. Uma solução de QTa 3% ou uma solução de QTb 5% foi gotejada em uma solução de goma do cajueiro carboximetilado 3% em NaOH 1M/etanol (2:1). A goma do cajueiro carboximetilado com diferentes graus de substituição foi utilizada: CCM1 (GS = 0,16), CCM2 (GS = 0,31) e CCM3 (GS = 0,44).

3.4.2- Cinética de Intumescimento

A cinética de intumescimento em solução tampão 7,4 e em água destilada foi realizada segundo metodologia descrita no item 3.3.4. As medidas do diâmetro das esferas foram feitas com seis esferas no intervalo de 10 minutos na primeira hora e de 20 minutos na segunda hora. A taxa de intumescimento foi calculada pela Equação 2.

3.4.3- Determinação da Quantidade de BSA Incorporada

Para quantificar a incorporação de BSA fez-se uma extração em água durante 24 horas sob agitação, devido à proteína ser muito solúvel em água. A quantificação foi feita a partir de uma curva de calibração no UV a 280 nm:

$$ABS = 0,00402 + 625,46584C \quad \text{Equação 4}$$

$$R=0,996$$

Onde ABS é a absorvância, C é a concentração em g/ml e R o coeficiente de correlação.

3.4.4-Ensaio de Liberação de BSA

As esferas com BSA (massa de aproximadamente 0,15g) incorporado foram colocadas em 20 mL de tampão fosfato 7,4 à temperatura da solução constante a 37°C. Alíquotas de 3 mL foram recolhidas para análise no UV a 280 nm. As alíquotas foram retiradas no intervalo de 10 minutos na primeira hora, de 20 min na segunda hora.

3.5- Caracterização das Esferas

3.5.1- Microscopia Eletrônica de Varredura

A observação da superfície das esferas de QT, QT/GC e QT/CCM após secagem, foi realizada utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura (MEV) PHILIPS HOLANDA XL30, com as esferas montadas em suporte de metal e revestidas com carbono.

3.5.2- Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho

As esferas de QT, QT/GC, QT reticuladas e QT/GC reticuladas foram analisadas por espectroscopia na região do Infravermelho, utilizando equipamento SHIMADZU 8300 em pastilhas de KBr.

3.5.3 - Ressonância Magnética Nuclear

Para a obtenção dos espectros da genipina a mesma foi dissolvida em CH_3OD e em CDCl_3 . Os espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C obtido em equipamento Bruker DRX-500 a 20°C .

Para obtenção dos espectros em solução, as esferas QT/CCM foram dissolvidas em HCl 0,1 M e em seguida liofilizadas. O material sólido obtido foi dissolvido em D_2O e o espectro de RMN ^1H obtido em equipamento Bruker DRX-500 a 70°C .

3.5.4- Microscopia Óptica

Os diâmetros das esferas foram medidos através de um microscópio óptico Olympus CH30.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Isolamento e Purificação da Genipina

O interesse no isolamento e purificação da genipina veio do fato de que este produto não é produzido e comercializado no Brasil. Tendo em vista que na região Nordeste existem plantações de jenipapo, a extração da genipina a partir deste poderia ser o meio de diminuir custos e facilitar sua obtenção. O rendimento de 0,52% do produto puro (genipina), obtido neste trabalho, está um pouco abaixo do encontrado na literatura, em torno de 1% [Djarassi e col., 1960]. No entanto, o produto é facilmente obtido com as três extrações sem a necessidade de separações cromatográficas.

A Figura 16 mostra os espectros de infravermelho da genipina comercial (Figura 16a) e da genipina extraída no laboratório de Polímeros da UFC (Figura 16b). Observa-se que os espectros são similares apresentando bandas características dos grupos funcionais da estrutura da genipina (Figura 9b) como: deformação axial de OH em 3402 cm^{-1} (OH livre) e em 3246 cm^{-1} (OH em ligação de hidrogênio intermolecular); absorção de deformação axiais de éster conjugados em 1683 cm^{-1} (C=O) e 1203 cm^{-1} (C-O de C-(=O)-O); deformação axial de C=C de olefinas (ciclo alqueno em 1109 cm^{-1}) [Silverstein e Webster, 2000; Butler e col., 2003].

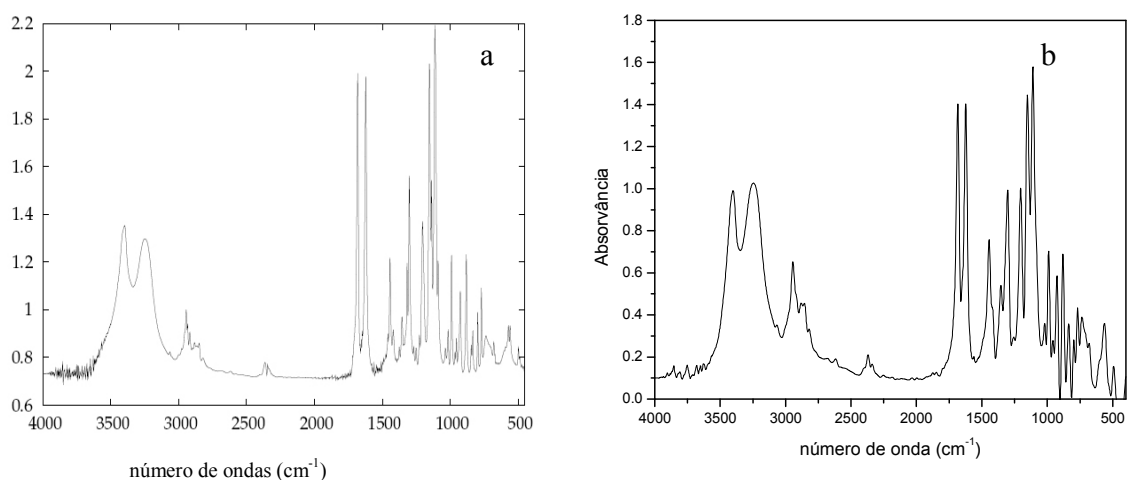


Figura 16. Espectros na região do infravermelho: (a) genipina comercial ; (b) genipina Brasil.

O espectro de RMN ^1H da genipina em metanol deuterado (CD_3OD) apresentou 2 sinais correspondentes a hidrogênios olefínicos em δ_{H} 7,52 (1H, s) e 5,83 (1H, s). Além disso, observou-se um sinal de metila ligada a oxigênio ($-\text{OCH}_3$) em δ_{H} 3,71 (3H, s), três sinais de hidrogênios metilênicos em δ_{H} 2,83 (1H, m), 2,05 (1H, m) e 4,21 (2H, dd). Outros sinais observados foram: δ_{H} 3,15 (1H, q), 2,49 (1H, t) e 4,78 (1H, d). O espectro de RMN ^{13}C -BB (Figura 18) da genipina apresentou 11 sinais. Observou-se a existência de 4 carbonos olefínicos em δ 154,4; 111,8; 128,3 e 145,7.

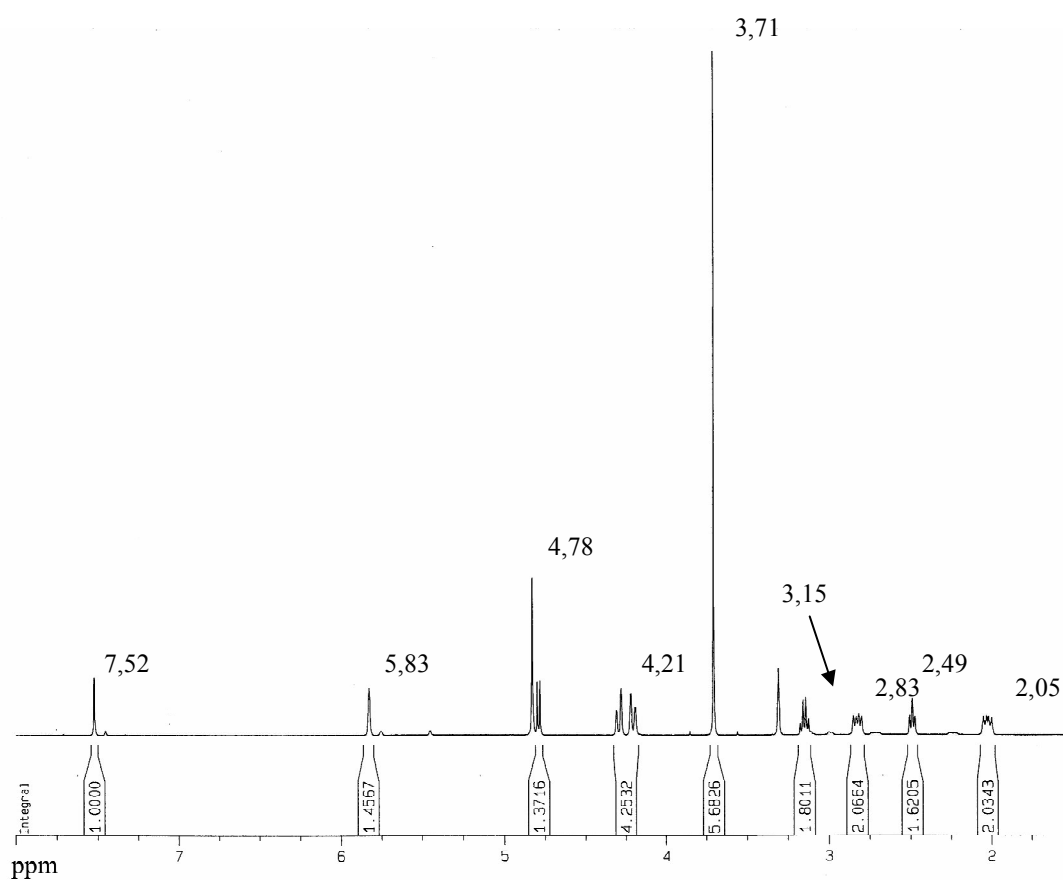


Figura 17. Espectro de RMN ^1H da genipina obtida neste trabalho em CD_3OD .

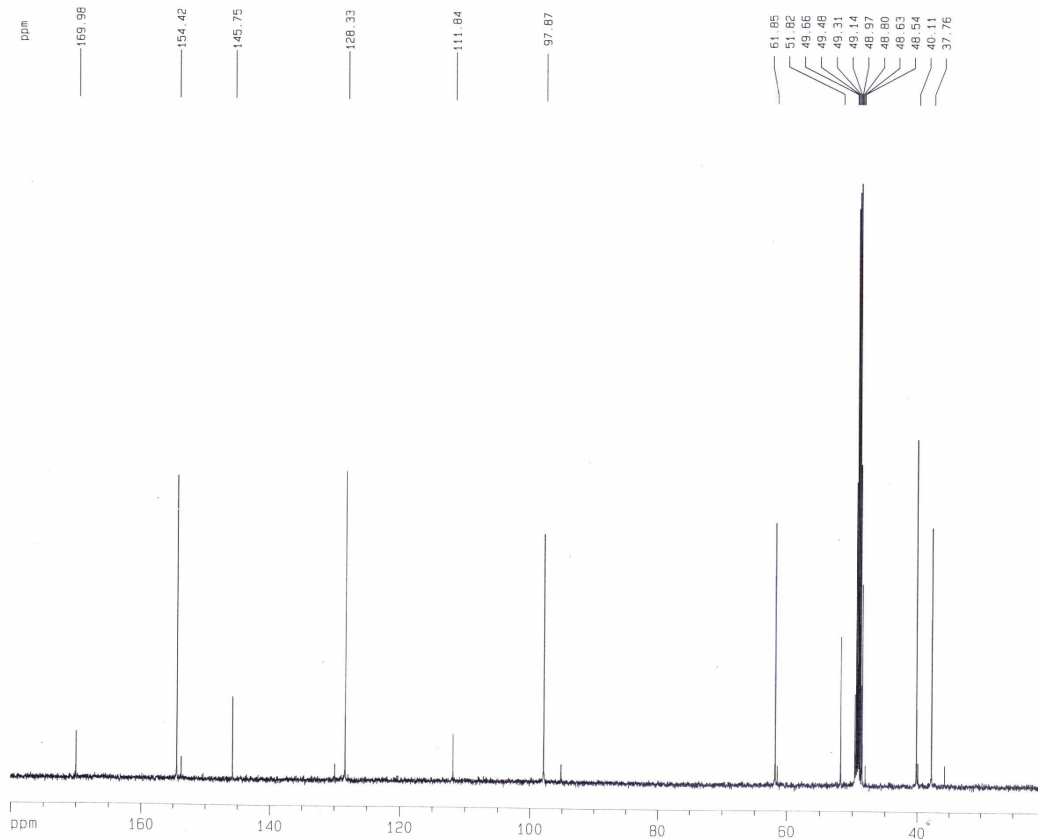


Figura 18. Espectro de RMN ^{13}C -BB da genipina em CD_3OD .

A partir do espectro de RMN ^{13}C -DEPT135 (Figura 19) observou-se a presença de apenas 7 sinais, indicando que 3 carbonos são não hidrogenados. Dentre os sinais de carbonos observados dois são metilênicos em δ 40,1 e 61,84. Os espectros de RMN 2D ^1H , ^{13}C HSQC (Figura 20) e do RMN ^{13}C -DEPT135 (Figura 19) mostram que os carbonos não hidrogenados são δ 111,8; δ 145,7 e 169,9 ppm. Observou-se também através do RMN 2D HSQC que o carbono metilênico em δ 40,1 apresentou correlação com dois hidrogênios em δ 2,83 e 2,05, indicando que são diastereotópicos.

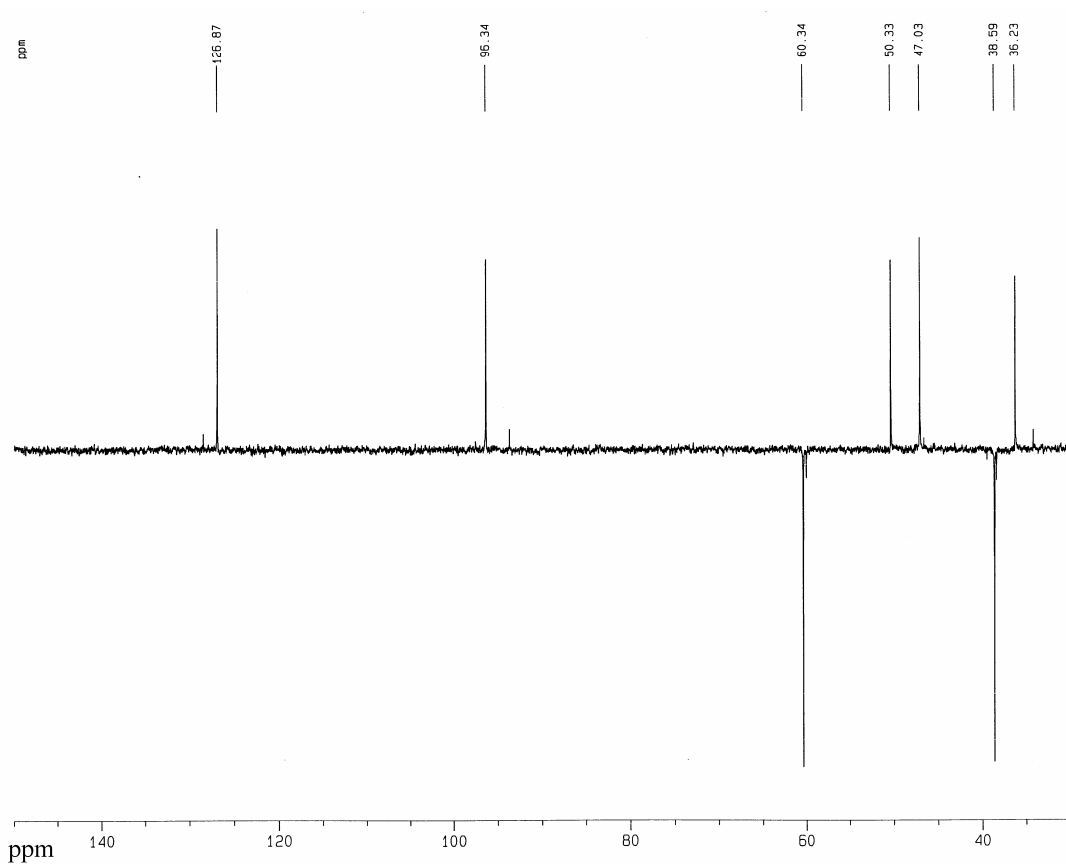


Figura 19. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT135 da genipina em CD_3OD a 20°C .

O espectro de RMN 2D ^1H , ^1H – COSY (Figura 21) apresentou sete correlações, identificando acoplamentos geminais, vicinais e a mais de duas ligações, o que permitiu propor a seqüência completa do anel furânico. A Figura 22 mostra a estrutura da genipina com as correlações observadas no espectro de RMN 2D ^1H , ^1H – COSY.

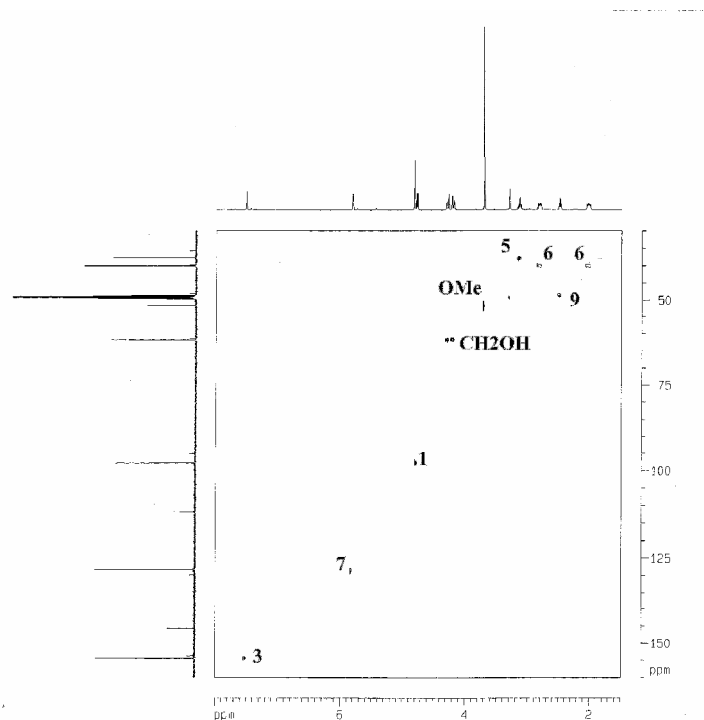


Figura 20. Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C HSQC da genipina em CD_3OD a 20°C .

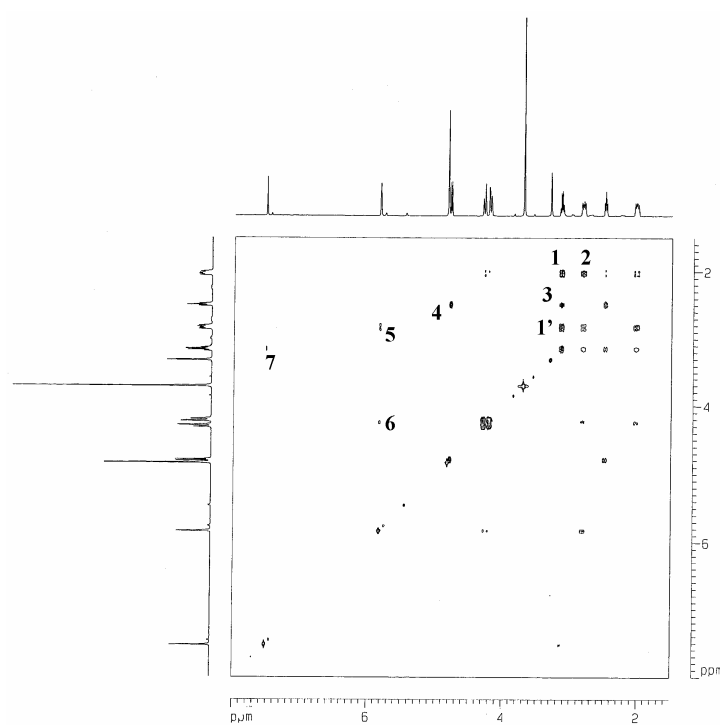


Figura 21. Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H – COSY da genipina em CD_3OD a 20°C .

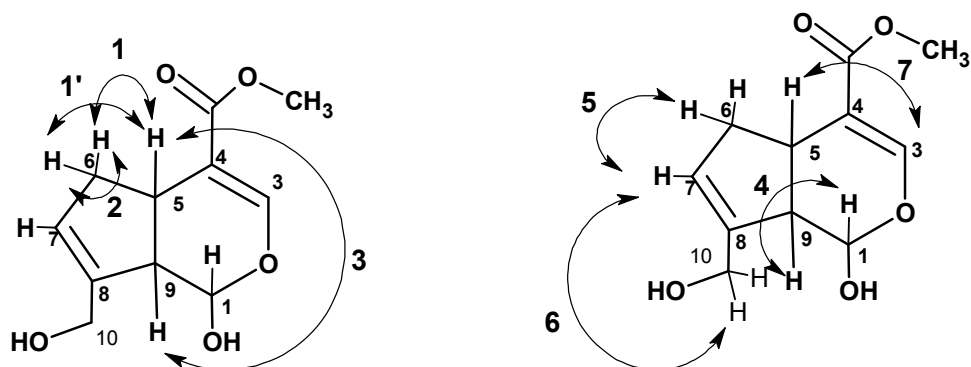


Figura 22. Correlações observadas no espectro RMN 2D ^1H , ^1H – COSY (Figura 21) para a genipina.

O espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C – HMBC (Figura 23a) permitiu a atribuição inequívoca da seqüência dos carbonos e hidrogênios da estrutura mostrada na Figura 23b e 23c.

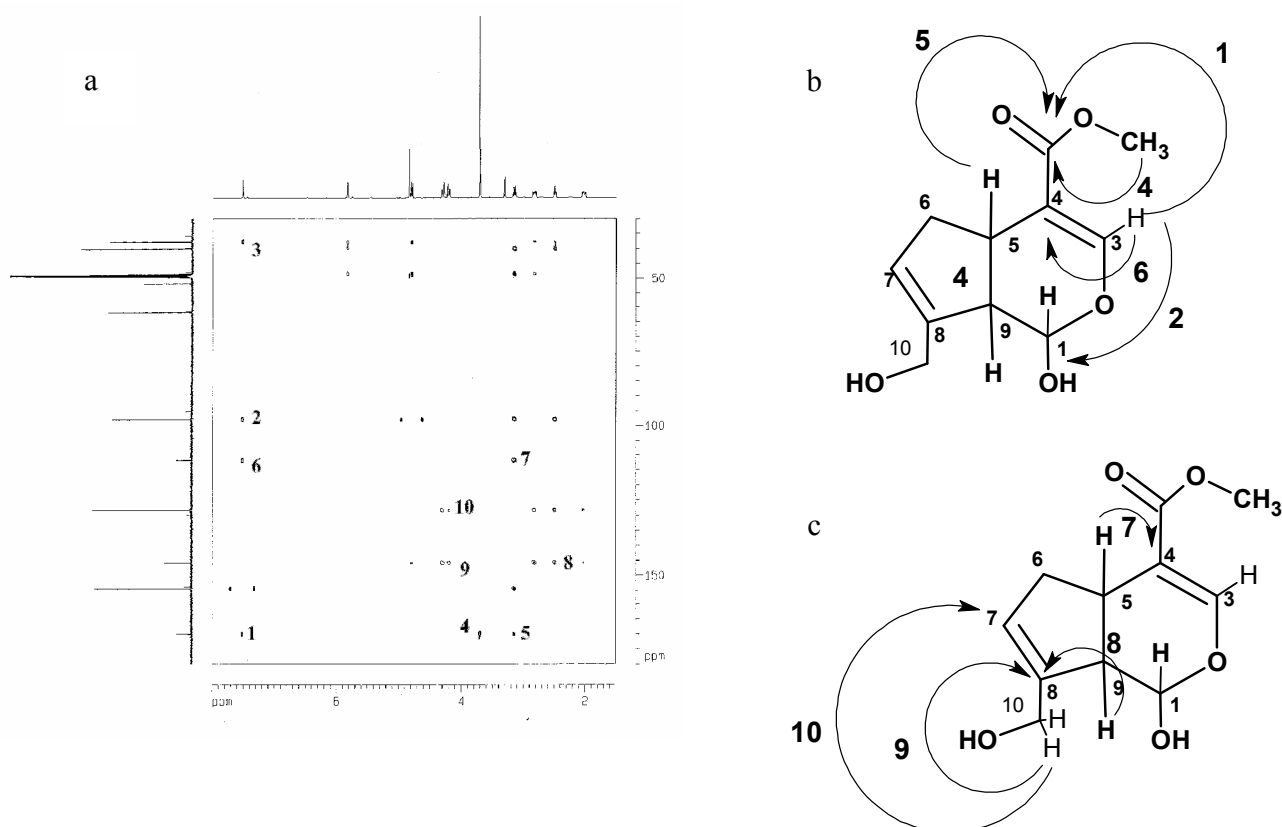


Figura 23. Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C – HMBC em CD_3OD .

A Tabela 7 apresenta os dados de RMN 1D e 2D de ^1H e ^{13}C para a substância obtida neste trabalho em CD_3OD .

Tabela 7. Dados de RMN 1D e 2D de ^{13}C e ^1H para genipina obtida neste trabalho em CD_3OD .

Átomo	δ_{C}	δ_{H}	COSY
1	97,9	4,78	2,49
3	154,4	7,52	3,15
4	118,8	---	---
5	37,8	3,15	7,52; 2,83; 2,49; 2,05
6	40,1	2,83; 2,05	2,05; 3,15; 5,83
7	128,3	5,83	2,83; 4,21
8	145,7	---	---
9	48,5	2,49	4,78; 3,15
CO₂Me	51,8	3,71	---
CH₂OH	61,8	4,21	5,83
CO₂Me	169,9	---	---

O espectro da mesma amostra foi obtido em clorofórmio deuterado (CDCl_3) para melhor comparação dos dados com a literatura, apesar da baixa solubilidade da genipina neste solvente. Os dados de RMN ^1H em CDCl_3 e CD_3OD são mostrados na Tabela 8. Observa-se que para o hidrogênio o efeito do solvente é bem reduzido, ou seja, não se percebe variação no deslocamento químico maior que 0,2 ppm.

O solvente afeta também os deslocamentos químicos dos carbonos. Na Tabela 8 observa-se que os deslocamentos dos carbonos de 7 a 9 possuem variações maiores que 1 ppm quando o solvente passa de metanol para clorofórmio deuterado.

Os dados obtidos em clorofórmio são bastante similares aos reportados na literatura para genipina, o que juntamente com as correlações obtidas nos espectros bidimensionais confirmam a estrutura do iridoide.

Tabela 8. Dados de RMN ^1H e ^{13}C em CD_3OD e CDCl_3 em comparação com dados da literatura.

Átomos	Solvente					
	CD_3OD (δ 49,15)		CDCl_3 (δ 77,0)		CDCl_3 [Drewes e Kayonga, 1996].	
	δ ^1H	δ ^{13}C	δ ^1H	δ ^{13}C	δ ^1H	δ ^{13}C
1	4,78	96,3	4,79	96,5	4,79	96,3
3	7,52	152,8	7,50	152,4	7,53	152,5
4	-	110,3	-	111,1		110,7
5	3,15	36,2	3,19	36,8	3,17	36,7
6	2,83	38,6	2,86	39,2	2,91	39,0
7	5,83	127,0	5,86	131,1	5,95	131,0
8	-	144,2		142,2		141,9
9	2,49	46,6	2,52	48,3	2,52	48,1
CO₂Me	3,71	50,3	3,70	51,3	3,77	51,4
CH₂OH	4,21	60,3	4,27	61,5	4,28	61,3
CO₂Me	-	168,4	-	168,0	-	168,0

4.2- Esferas de Quitosana/Goma do Cajueiro Via Formação de Rede Interpenetrada (IPN)

A formação das esferas foi realizada por gotejamento de uma solução de QT/GC na proporção em massa de 1:4 em NaOH 1M seguido de reticulação com solução de genipina em diferentes concentrações. O teor de goma incorporada (83%) foi obtido pelo método de Dubois [Dubois e col., 1956]. Proporções de massa de QT/GC diferentes foram testadas tais como 1:2 e 1:10, mas a melhor relação em massa foi de 1:4.

4.2.1- Reticulação das Esferas

A mudança para cor azul escura nas esferas é um indicativo da reticulação, devido à reação entre a genipina e o grupo amino da quitosana [Chen e col., 2004; Yuan e col., 2007]. Em geral, utiliza-se concentrações de genipina variando de 0,5 a 22 mM na reticulação de géis e microesferas de quitosana [Yuan e col., 2007; Chen e col., 2004, 2006; Nickerson e col., 2006a,2006b; Butler e col., 2006; Mi e col., 2002b]. Esferas de QT e QT/GC reticuladas com 0,5 e 1mM de genipina dissolviam em pH 1,2 (fluido gástrico simulado) e não foram utilizadas neste trabalho.

A Tabela 9 mostra o número de mol de genipina que reagiu por grama de esferas. De um modo geral existe um aumento do consumo de genipina/ g de esferas com o aumento da concentração da solução de genipina, entretanto este aumento não é linear. Concentrações de genipina entre 44 e 100 mM promoveram um consumo aproximadamente similar de genipina por grama de esferas de QT/GC.

Tabela 9. Relação de número de mmol de genipina que reagiu / g de esferas.

Amostras	Concentração de Genipina (mM)	mmol de genipina que reagiu / g de esferas
QT	500	17,25
	44	2,64
	22	0,90
QT/GC	500	17,00
	100	3,20
	80	3,40
	60	2,94
	44	3,34
	22	0,84
	10	0,37

O diâmetro médio das esferas, determinados por microscopia óptica, de QT e QT/GC não reticuladas foi de $520 \pm 4,1$ e 510 ± 5 μm , respectivamente. O diâmetro médio das esferas de QT/GC reticuladas com diferentes concentrações de genipina é mostrado na Tabela 10. As esferas reticuladas não apresentam variações significativas

de diâmetro com o aumento da concentração de genipina. Os valores médios das esferas de QT e QT/GC reticuladas são similares a não reticuladas.

Tabela 10. Diâmetro médio das esferas reticuladas com diferentes concentrações de genipina.

Amostra	Diâmetro médio (μm)						
	Concentração de genipina (mM)						
	500	100	80	60	44	22	10
QT/ GC	509 \pm 3,2	510 \pm 3,0	500 \pm 5,0	490 \pm 5,0	505 \pm 4,2	495 \pm 3,6	500 \pm 3,0
QT	515 \pm 2,5	-	-	-	520 \pm 3,0	510 \pm 3,5	-

4.2.2- Caracterização por Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho

O espectro do material de QT na forma de esferas pulverizadas (Figura 24) mostra bandas em torno de 1080 – 1162 cm^{-1} , atribuídos à vibração de deformação axial C-O-C dos anéis glicosídicos e uma absorção em 1651 cm^{-1} característico de vibrações de deformação axial de C=O de amidas, assim como uma absorção em 1558 cm^{-1} , característico da deformação angular N-H do grupo amino [Mi, 2005].

O espectro na região do infravermelho das esferas de QT/GC é similar ao das esferas de QT. Após a reticulação a absorbância na banda em 1651 cm^{-1} aumenta para as esferas de QT e QT/GC reticuladas assim como a diminuição na banda em 1558 cm^{-1} . Isto sugere o aumento de grupos amidas, evidenciando a reação de reticulação.

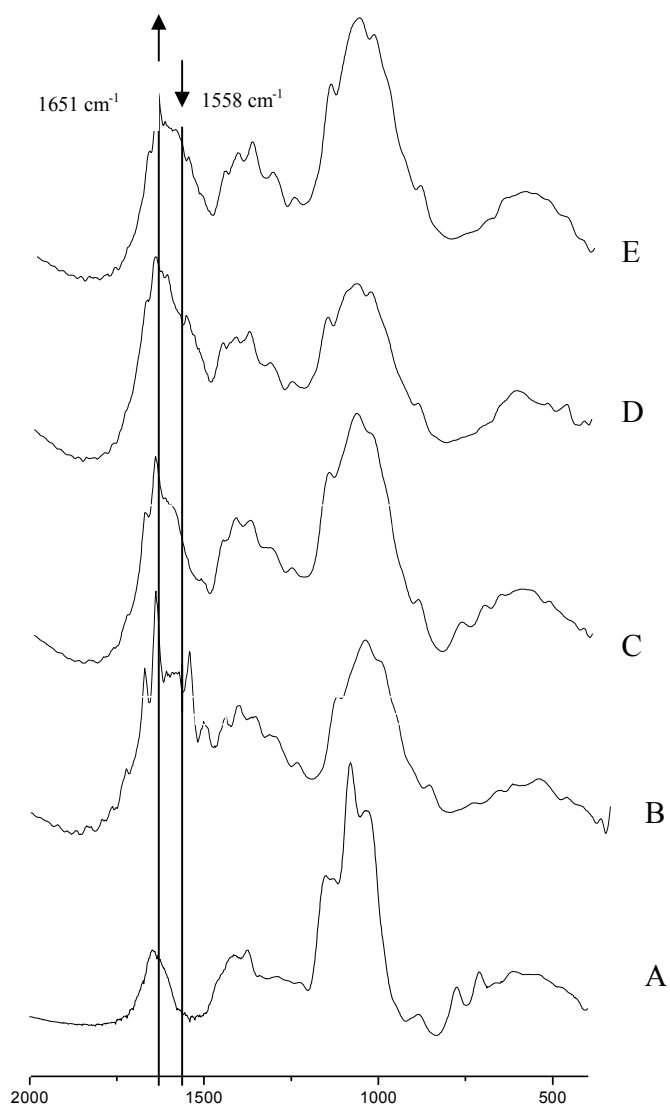


Figura 24. Espectros de FT-IR de: (A) GC; (B) QT; (C) QT/GC; (D) QT reticulada; (E) QT/GC reticulada.

4.2.3- Caracterização das Esferas por Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura das esferas (Figura 25) revelou que ocorreu um aumento da rugosidade das esferas de QT/GC 44 mM (Figura 25b) em relação às esferas de QT 44 mM (Figura 25a). Porém não houve mudanças

significativas na superfície das esferas reticuladas (Figura 25c). Comportamento similar foi observado em microcápsulas de alginato/quitosana, onde a reticulação com genipina não mudou a morfologia das cápsulas (Chen e col., 2006).

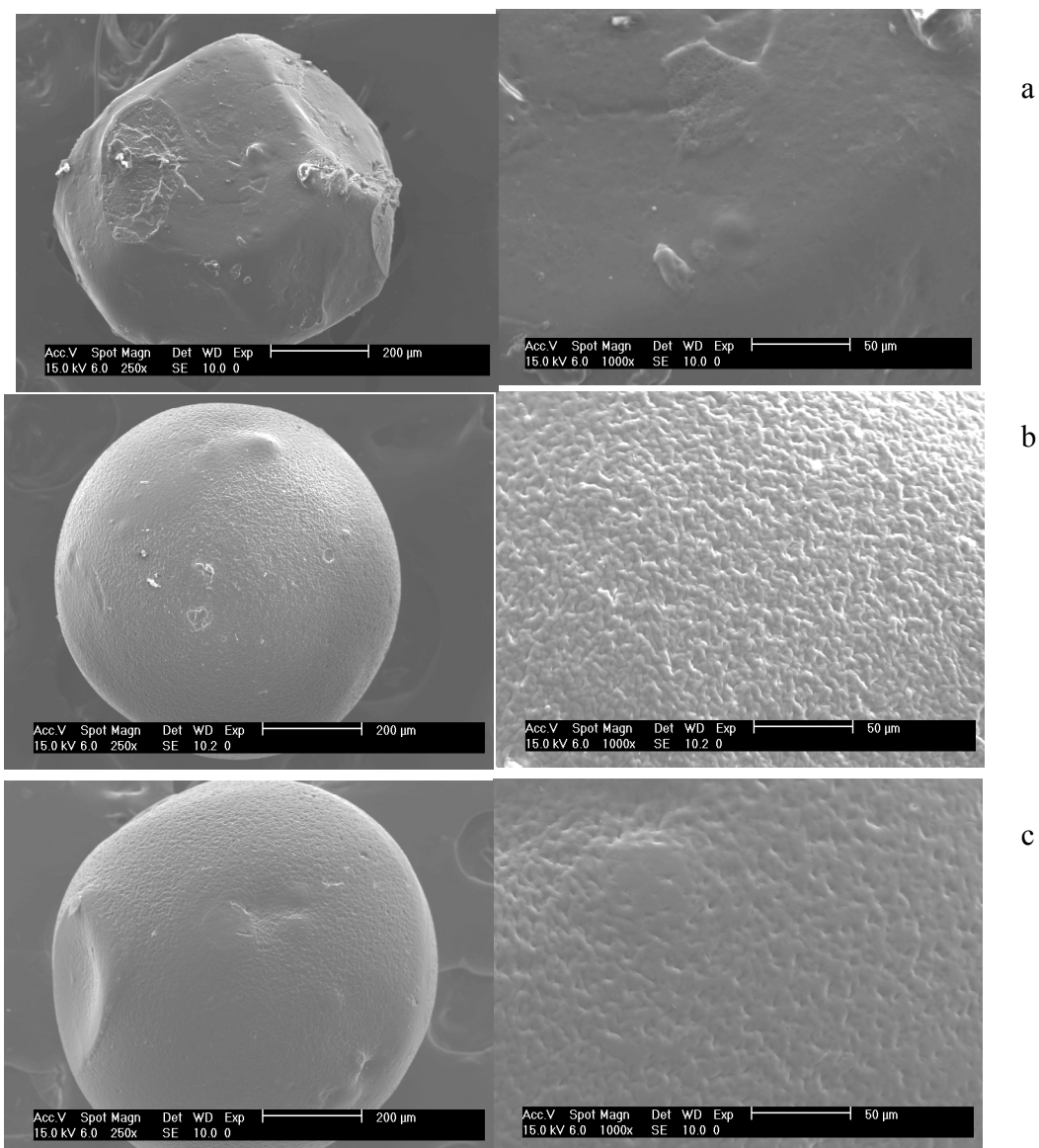


Figura 25. Micrografias das esferas: (a) quitosana; (b) QT/GC não-reticulada; (c) QT/GC reticulada 44 mM.

4.2.4- Ensaio de Intumescimento

As Figuras 26 e 27 apresentam os gráficos de intumescimento em função do tempo para as esferas de QT e QT/GC reticuladas com diferentes concentrações de genipina. Observa-se que as esferas de QT e QT/GC intumescem em pH 1,2 devido à protonação do grupo amino ($-\text{NH}_3^+$) da quitosana em meio ácido; ocorre repulsão desses grupos ionizados como consequência a expansão da cadeia polimérica. Em pH 7,4 os grupos COO^- da goma do cajueiro são ionizados e ocorre uma repulsão entre esse grupos, ocorrendo também a expansão da cadeia neste meio.

Observa-se que para ambas o intumescimento diminui com o aumento da concentração da solução de reticulante (genipina). Essa diminuição deve-se ao aumento da densidade de reticulação. As esferas de QT/GC reticuladas com soluções de genipina variando de 44 mM e 100 mM possuem intumescimentos similares.

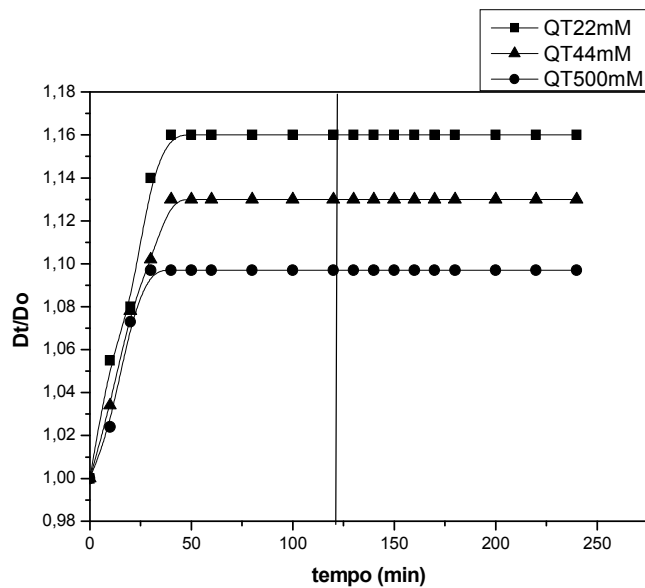


Figura 26. Gráfico de Dt/Do vs tempo de intumescimento seqüenciado em pH 1,2 e 7,4 , para esferas de QT reticuladas a 26°C.

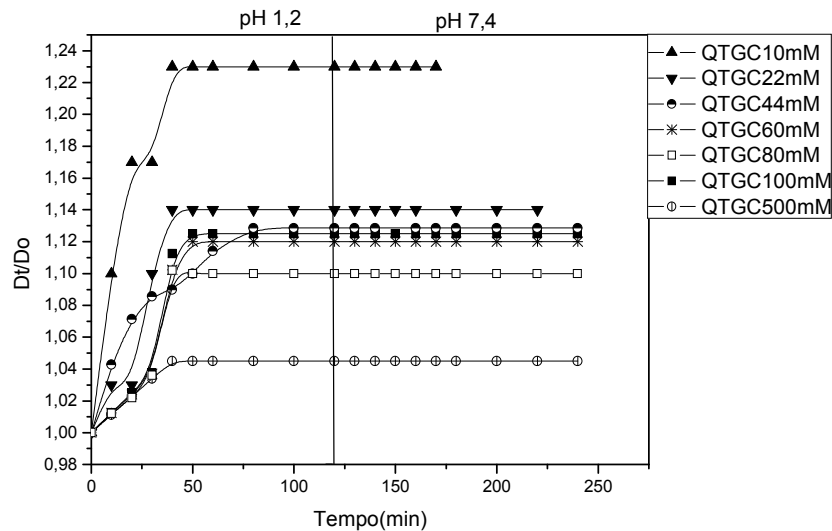


Figura 27. Gráfico de D_t/D_o vs tempo de intumescimento sequenciado em pH 1,2 e 7,4 , para esferas de QT/GC reticuladas a 26°C.

A adição de goma do cajueiro provoca uma diminuição na capacidade de absorção em relação às esferas de QT reticuladas na mesma concentração de genipina.

As esferas reticuladas com genipina (QT e QT/GC) apresentam uma elevada taxa de intumescimento em pH 1,2 devido à repulsão entre os grupamentos protonados ($-\text{NH}_3^+$) em meio ácido. A mudança de pH da solução de 1,2 para 7,4 não apresenta o efeito de desintumescer. Este comportamento é diferente das esferas de QT co-reticuladas com tripolifosfato (TPP) e genipina, relatadas por Mi e col. [2003] onde a mudança de pH de 1,2 para 7,4 provoca uma diminuição da capacidade de intumescimento.

Nickerson e col. (2006b) mostraram que hidrogéis de gelatina-maltodextrina reticulados com glutaraldeído intumesciam mais do que hidrogéis reticulados com genipina, tanto em pH 3 quanto em pH 5, com grande diferença em pH 3.

Khurma e col.(2005) relataram que hidrogéis de quitosana e poli (vinil pirolidona) reticulados com genipina tinham um equilíbrio de intumescimento em aproximadamente 30 minutos. O intumescimento aumentava com o aumento da temperatura, e a taxa de intumescimento era maior em pH baixo, comparado com meio neutro e alcalino. A extensão do intumescimento de filmes de quitosana e poli (óxido

de etileno) pode ser diminuída com o aumento da quantidade de genipina [Jin e col. 2004].

O coeficiente de difusão (D_v) de moléculas de água foi analisado seguindo a metodologia descrita por Harogogopad e Aminabhavi [1992]. Os autores mostram que o coeficiente de difusão pode ser calculado verificando-se a variação de volume das esferas em função do tempo pela equação:

$$\frac{\Delta V}{V_0} = 4 \cdot \left(\frac{\Delta V_{\infty}}{V_0 \cdot D_0} \right) \cdot \left(\frac{D_v}{\Pi} \right)^{1/2} \cdot t^{1/2} \quad \text{Equação 5}$$

Onde $\frac{\Delta V_t}{V_0}$ representa variação de volume com o tempo em relação ao volume inicial, ΔV é a variação de volume no equilíbrio. A inclinação do gráfico de $\frac{\Delta V_t}{V_0}$ versus $t^{1/2}$ permite o cálculo do coeficiente de difusão (D_v) utilizando a equação:

$$D_v = \left((1,773 \cdot \text{inclinação}) \frac{V_0 D_0}{4 \Delta V_{\infty}} \right)^2 \quad \text{Equação 6}$$

O coeficiente de difusão em pH 1,2 para as esferas de QT e QT/GC em função da concentração de genipina é mostrado na Tabela 11.

Tabela 11. Coeficiente de Difusão (cm^2/s) em pH 1,2 das amostras de QT e QT/GC reticuladas com genipina.

Amostras/ conc. da genipina	22 mM	44mM	500mM
QT (D_v)	$2,02 \times 10^{-6}$	$1,94 \times 10^{-6}$	$2,78 \times 10^{-7}$
QT/GC (D_v)	$1,18 \times 10^{-7}$	$9,39 \times 10^{-8}$	$2,01 \times 10^{-8}$

Os coeficientes de difusão diminuem com o aumento da densidade de reticulação para as esferas de QT e QT/GC. Como discutido anteriormente as esferas

de QT possuem maior capacidade de absorção que as esferas de QT /GC, isso pode ser comprovado pelo maior valor de D_v para as amostras de QT reticuladas.

Rao e col. [2006] obtiveram valores de coeficiente de difusão em pH 1,2 de microesferas de quitosana com diâmetro de 42 a 182 μm contendo poli (vinil álcool) (PVA) reticulado com glutaraldeído que variavam de $1,29 \times 10^{-5}$ a $3,47 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ dependendo da quantidade de reticulante utilizado, quanto maior a quantidade de glutaraldeído adicionada às amostras menor o coeficiente de difusão.

Mundargi e col. [2008] sintetizaram microesferas de amido que variavam de 96 a 158 μm reticuladas com epícloridrina para a liberação de ampicilina. O estudo mostrou que os coeficientes de difusão em pH 1,2 variavam de $3,1 \times 10^{-6}$ a $4,72 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$, e que um aumento na quantidade do reticulante diminuía o coeficiente de difusão nas microesferas.

4.2.5.- Ensaio de Liberação

Os efeitos da reticulação das esferas de QT/GC na liberação de um fármaco modelo (diclofenaco de sódio) é mostrado na Figura 28. Em tampão pH 7,4 aproximadamente 40% do fármaco é liberado das esferas de QT/GC não reticulada. Não ocorre liberação do fármaco em esferas de QT/GC reticuladas com 44 mM de genipina em tampão pH 7,4. Isto é devido ao não intumescimento das esferas nesse pH. Em pH 1,2 as esferas de QT/GC reticuladas com 44 mM de genipina liberam rapidamente todo o fármaco nos primeiros 20 minutos.

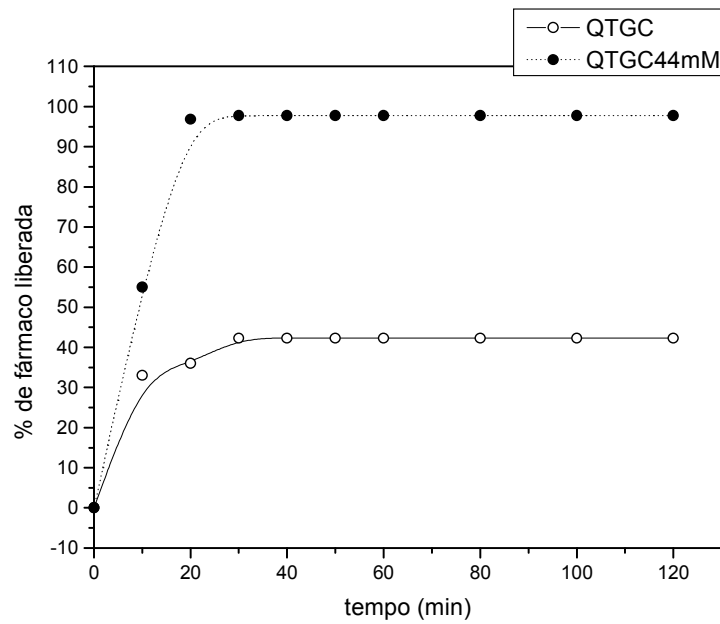


Figura 28. Liberação de DCS a partir da matriz QT/GC: (○) não-reticulada em pH 7,4 e (●) reticulada com genipina 44mM em pH 1,2.

O efeito do aumento do grau de reticulação na liberação do fármaco em esferas de QT/GC é mostrado na Figura 29. O aumento do grau de reticulação provoca uma liberação mais lenta do fármaco. O teor de fármaco liberado no equilíbrio também diminui com o aumento da concentração de genipina (grau de reticulação).

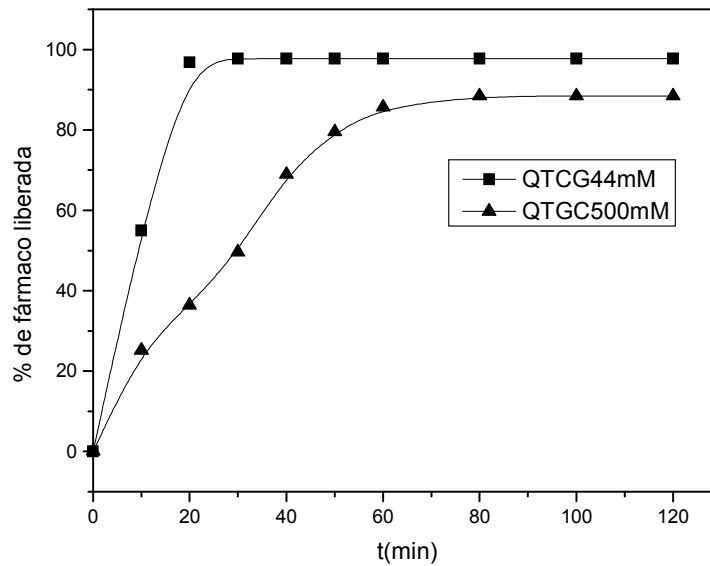


Figura 29. Liberação de DCS a partir da matriz QT/GC reticulada com 44 mM e 500 mM em pH 1,2.

Yuan e col. (2007) mostraram que a liberação de albumina a partir das esferas de quitosana reticulada com genipina variava com o tempo de reticulação e a concentração de genipina usada. A liberação era inversamente proporcional ao tempo de reticulação e a concentração de genipina.

Xu e col. [2007] relataram que géis de quitosana/alginato com proporções em massa de 5:5 e 4:6 intumesciam consideravelmente em pH 1, devido à protonação do grupo amino em pH baixo. Em pH 5 o intumescimento era mínimo. A liberação de BSA em pH 1 a partir da matriz de quitosana/alginato (5:5) foi de mais de 80% em 5 horas.

Maciel e col. [2006] sintetizaram géis de QT e QT/GC reacetilados para a liberação de pilocarpina. A liberação é similar para os géis nos primeiros 100 min, onde aproximadamente 60% do fármaco foi liberado. Após esse tempo, a presença de GC no gel diminui a taxa de liberação de pilocarpina. O estudo também mostrou que a taxa de liberação do fármaco era maior em pH 1,2 em relação à liberação em pH 7,4 e 9,8.

A liberação dinâmica de fármacos pode ser analisada por uma equação empírica proposta por Ritger e Pepas [1987]:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad \text{Equação 7}$$

Onde M_t é a porcentagem do fármaco liberado em um determinado instante e M_∞ é a porcentagem do fármaco liberado no equilíbrio, k é a constante de velocidade e n é um parâmetro que representa o tipo de transporte.

Um mecanismo de transporte Fickiano do tipo I é descrito por um fenômeno de difusão, enquanto que um mecanismo Fickiano do tipo II é caracterizado por um fenômeno de relaxação constante. Estes dois fenômenos possuem valores de n para sistemas esféricos de 0,43 e 0,85, respectivamente. Um fenômeno de transporte não Fickiano é descrito por um fenômeno de relaxação e difusão e para sistemas esféricos possuem valores de n entre 0,43 e 0,85 (Ritger e Pepas, 1987).

Os valores de n , assim como o coeficiente de correlação (R), para as amostras das esferas reticuladas com 500mM são mostrados na tabela 12.

Tabela 12. Valores de n para as amostras de QTGC 500mM.

Liberações	n	R
1 ^a	0,76	0,997
2 ^a	0,73	0,993
3 ^a	0,71	0,992
4 ^a	0,68	0,998

Pode-se verificar que em todas as liberações o tipo do transporte é do tipo não Fickiano, isto é, a velocidade de relaxação da cadeia polimérica é equivalente a velocidade de difusão.

Mecanismos Fickianos foram observados para géis de QT/GC reacetiladas [Maciel e col, 2006]. A liberação de endometacina em sistemas de liberação compostos

por poliacrilamida/quitosana seguem uma liberação não Fickiana [Kumbar e col, 2003]. A liberação de aciclovir em microesferas de acrilamida/dextrana/quitosana também apresentou mecanismo não Fickiano [Rokhade e col, 2007a].

4.3 - Esferas de Quitosana/Goma do Cajueiro Carboximetilada Via Complexação Polieletrólítica

4.3.1- Diâmetro das Esferas

Para a preparação de uma matriz que liberasse droga em meio alcalino foi utilizado goma do cajueiro carboximetilada, visto que esta possui uma maior quantidade de grupamentos ácidos, como consequência um maior intumescimento em meio alcalino.

A formação e propriedades dos complexos polieletrólíticos dependem da razão de cargas entre os polímeros carregados negativamente e positivamente. Quando a solução de quitosana é gotejada em uma solução de goma do cajueiro carboximetilada em presença de NaOH 1 M, os grupos amino da QT interagem com os grupos carboximetilados da goma, levando à formação de um complexo sólido, como já mostrado por Maciel e col. [2006].

Neste estudo, esferas de QT/CCM foram produzidas utilizando QT com diferentes massas molares e goma do cajueiro carboximetilada com diferentes graus de substituição (GS). Os diâmetros médios das esferas foram obtidos por microscopia óptica e são mostrados na Tabela 13.

Tabela 13. Diâmetro das esferas de QT/CCM.

CCM	(GS)	Diâmetro das Esferas (μm)	
		QTa ($2,35 \times 10^5 \text{ g/mol}$)	QTb ($7,82 \times 10^4 \text{ g/mol}$)
1	0,16	$530 \pm 4,0$	$500 \pm 3,0$
2	0,31	$510 \pm 5,0$	$570 \pm 5,0$
3	0,44	$580 \pm 6,0$	$550 \pm 5,0$

Valores similares de tamanho de partículas foram obtidos independentemente da massa molar de QT e do GS da goma carboximetilada. Os tamanhos médios das esferas obtidas são menores do que os obtidos na complexação polieletrólítica de QT com carboximetil glucomanas (Goma Konjac) (1,2 – 1,6 mm) [Du e col., 2006]. Na complexação de ácido hialurônico com quitosana Vasiliu e col. [2005] obtiveram esferas de diâmetro médio de 720 a 1150 μm dependendo da metodologia empregada na preparação.

4.3.2-Ressonância Magnética Nuclear de ^1H

O espectro de RMN de ^1H (Figura 30) foi obtido após dissolução das esferas de quitosana/goma do cajueiro carboximetilada em HCl, depois liofilizada e dissolvida em D_2O . O espectro mostra sinais intensos correspondentes à unidade glucosamina e acetilglucosamina da quitosana, com anomérico da acetilglucosamina (H-1A) em 4,50 ppm e hidrogênio do grupamento acetil em 2,1 ppm (H-1Ac) da unidade acetilglucosamina e sinais pouco intensos atribuídos às unidades de monossacarídicas presentes na goma do cajueiro. Os deslocamentos correspondentes aos sinais de H-1 das unidades méricas de GC e QT são dados na Tabela 14. Além dos prótons anoméricos observa-se claramente o sinal em 1,25 ppm correspondente ao grupo metila (H-6) da ramnose presente na GC. Espectroscopia de RMN de ^1H confirma a presença de quitosana e de goma do cajueiro carboximetilada nas esferas.

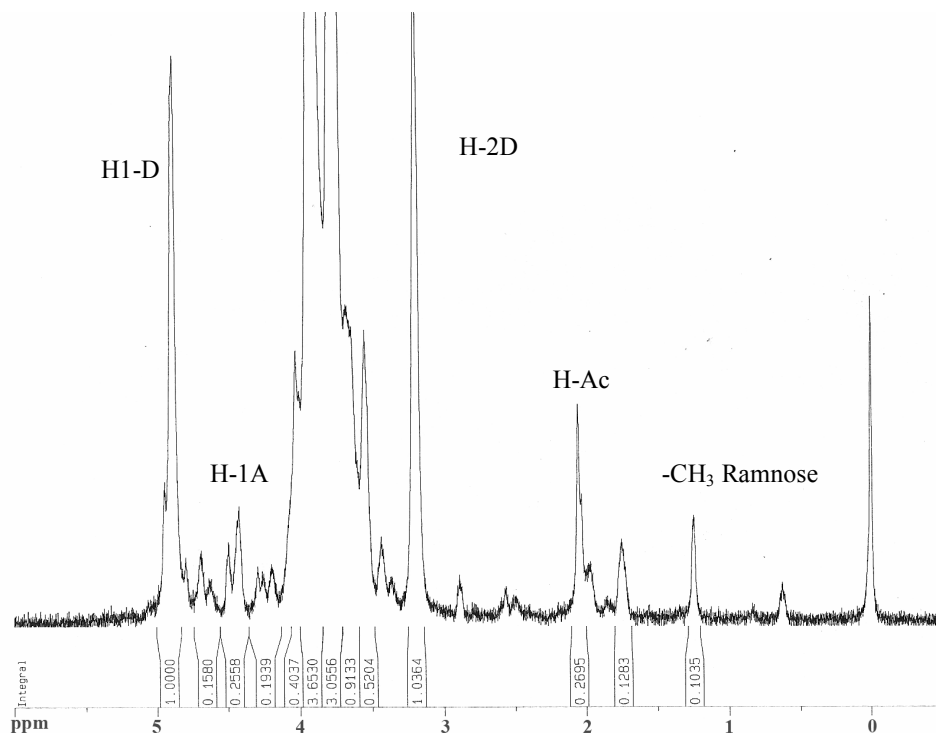


Figura 30. Espectro de RMN ^1H das esferas de QTa/CCM em D_2O a 70°C .

Tabela 14. Deslocamentos correspondentes aos sinais de H-1 das unidades monoméricas de GC e QT.

Unidade de açúcar	δ H-1 (ppm)	
	QT	GC
Galactose	-	4,44
Ramnose	-	4,80
Glucose	-	4,94
Glucosamina	4,90	-
Acetilglucosamina	4,50	-

4.3.3-Microscopia Eletrônica de Varredura

A morfologia da superfície das esferas foi investigada por microscopia eletrônica de varredura (Figura 31). As esferas de quitosana de mais alta massa molar ($2,35 \times 10^5$ g/mol) com goma carboximetilada com DS = 0,35 (QTa/CCM2) possuem superfície mais rugosa do que as das esferas de quitosana com menor massa molar ($7,82 \times 10^4$ g/mol).

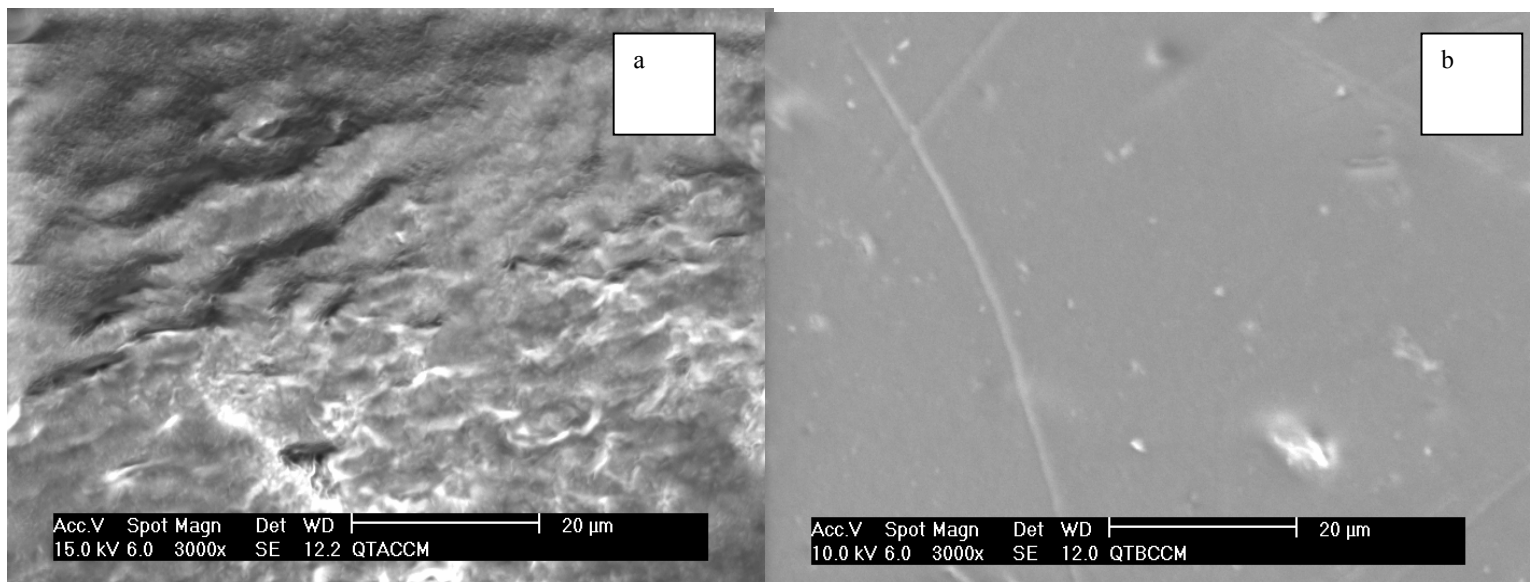


Figura 31. Micrografias das esferas: (a) QTa/CCM2; (b) QTb/CCM2.

4.3.4-Ensaio de Intumescimento

Os ensaios de intumescimento em água para as esferas de QT/CCM são apresentados na Figura 32. Observa-se que para esferas formadas com quitosana de mais alta massa molar (QTa) uma quantidade mínima de carga negativa da goma do cajueiro carboximetilada é necessária para que o intumescimento ocorra (Figura 32a), nas amostras em estudo o valor do GS da goma carboximetilada deve ser maior que 0,31. Com o aumento do GS para 0,44 (QTaCCM3) da goma carboximetilada é observado um aumento de 6% no diâmetro das esferas.

Com a quitosana de menor massa molar (QTb) o intumescimento ocorre com as três amostras de goma do cajueiro carboximetilada de diferentes GS (Figura 32b). O aumento da taxa de intumescimento é proporcional ao GS da goma carboximetilada.

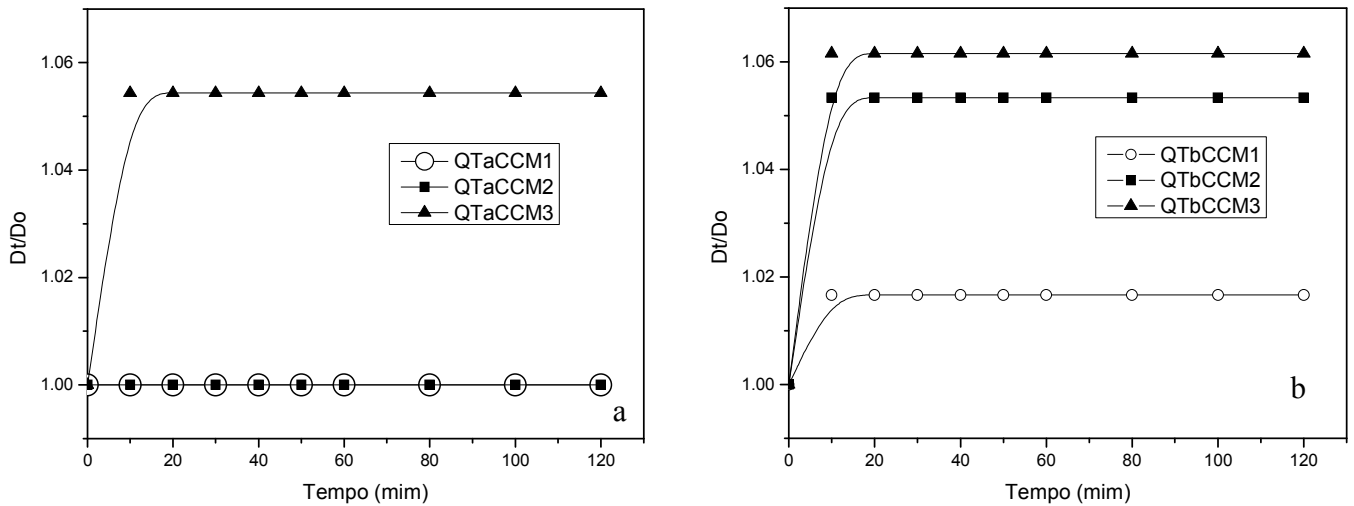


Figura 32: Gráfico D_t/D_0 x tempo em água, (a) esferas de QTa com CCM1, CCM2 e CCM3 e (b) esferas de QTb com CCM1, CCM2 e CCM3.

Em solução tampão pH 7,4 (Figura 33) todas as esferas intumescem. Neste pH, os grupos COO^- da goma do cajueiro carboximetilada estão ionizados, ocorrendo uma repulsão entre estes grupos ionizados e como consequência a expansão da cadeia polimérica. As esferas de QT/CCM com quitosana de maior massa molar (Figura 33a) formam estruturas mais compactas e um menor intumescimento é observado quando comparado com as esferas de quitosana de menor massa molar (Figura 34b). Em pH 7,4, amostras com baixo GS intumescem menos devido a um menor número de grupos ionizados nas amostras.

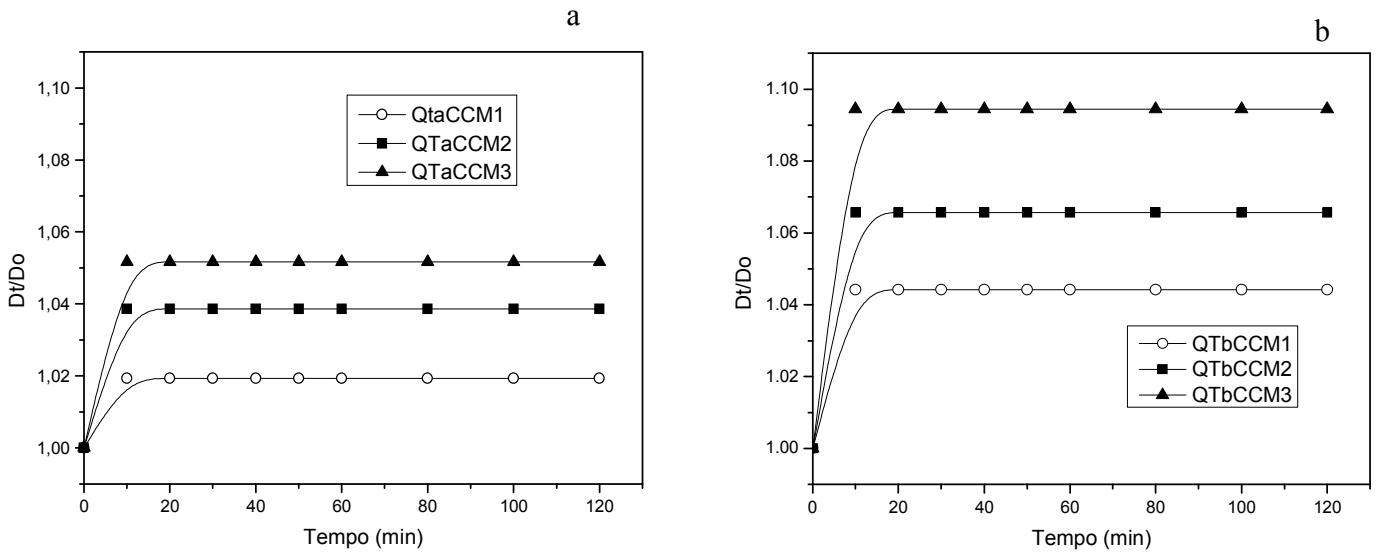


Figura 33. Gráfico D_t/D_o x tempo em tampão pH 7,4, (a) esferas de QTa com CCM1, CCM2 e CCM3 e (b) esferas de QTb com CCM1, CCM2 e CCM3.

Os coeficientes de difusão para as esferas de QT/CCM foram calculados utilizando as equações 5 e 6 da página 48 (Tabela 15).

Tabela 15. Coeficiente de difusão nos complexos QT/CCM em tampão pH 7,4.

CCM	GS	Coeficiente de difusão (cm^2/s)	
		QTa ($2,35 \times 10^5 \text{ g/mol}$)	QTb ($7,82 \times 10^4 \text{ g/mol}$)
1	0,16	$3,86 \times 10^{-7}$	$7,30 \times 10^{-7}$
2	0,31	$8,41 \times 10^{-7}$	$1,83 \times 10^{-6}$
3	0,44	$9,17 \times 10^{-7}$	$2,15 \times 10^{-6}$

O aumento do GS da goma do cajueiro promove um aumento do coeficiente de difusão, provavelmente devido ao aumento do teor de cargas negativas no complexo provocando uma expansão da rede e conseqüentemente maior difusão de água.

Lin e col. [2005] estudaram o efeito da adição de sulfato de dextrana na cinética de intumescimento de microesferas de quitosana reticuladas com tripolifosfato.

Os autores obtiveram valores de coeficiente de difusão variando de $2,8 \times 10^{-7}$ a $8,1 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ em pH 6,8. O aumento da concentração de sulfato de dextrana acarretou um aumento do coeficiente de difusão.

Os coeficientes de difusão de água em microesferas de quitosana e metilcelulose variaram de $1,4 \times 10^{-5}$ a $6,21 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ dependendo da composição das microesferas [Rokhade e col., 2007a]. Os valores de coeficiente de difusão são compatíveis com valores publicados para esferas de quitosana/dextrana sulfatada [Lin e col., 2005], mas são inferiores aos obtidas por Rokhade e col. [2007a] para microesferas obtidas via rede interpenetrada de quitosana e metilcelulose.

4.3.5 - Ensaio de Liberação de BSA

A liberação de BSA em solução tampão de pH 7,4 é mostrada nas Figuras 34 e 35 em matrizes diferentes. Na Figura 34 as liberações são feitas a partir de esferas de QTa/CCM1 e QTa/CCM3. As esferas de QTa/CCM3 liberam mais rapidamente o BSA, pois elas possuem uma taxa de intumescimento maior do que as esferas de QTa/CCM1.

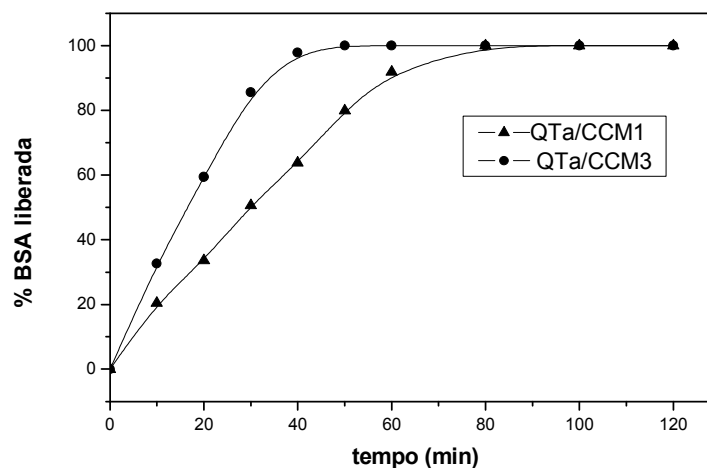


Figura 34. Liberação de BSA a partir da matriz QTa/CCM1 e QTa/CCM3 em tampão pH 7,4.

Comportamento semelhante é visto nas esferas de QTb/CCM1 e QTb/CCM3: quanto maior o intumescimento mais rápida é a liberação do BSA (Figura 35).

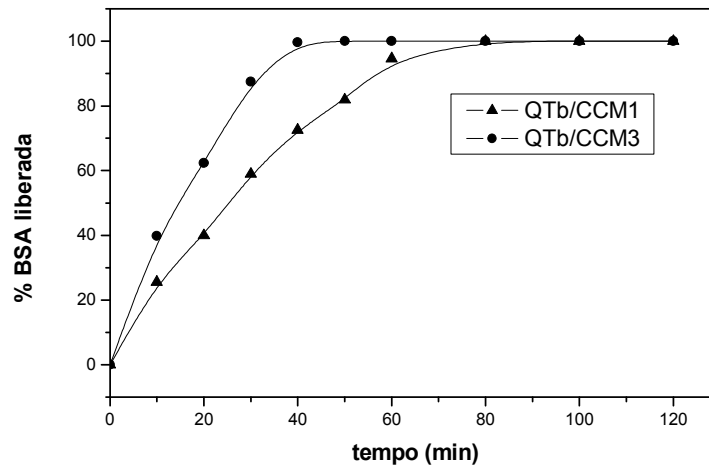


Figura 35. Liberação de BSA a partir da matriz QTb/CCM1 e QTb/CCM3 em tampão pH 7,4.

Apesar da massa molar da quitosana influenciar no intumescimento, o mesmo não acontece na liberação de BSA. Os tempos de equilíbrio de liberação de BSA em esferas de quitosana com diferentes massas molares com a goma de mesma GS são idênticos. Aumentando-se o GS da goma do cajueiro carboximetilada o tempo de equilíbrio da liberação diminui.

Esferas de alginato e quitosana foram usadas na liberação de BSA em pH 7,4 com razão de massa alginato: quitosana de 9:1, 7:3 e 5:5 e tiveram uma porcentagem de BSA liberada de 97,84; 96,81 e 87,26 %, respectivamente [Xu e col.,2007]. Du e col. [2006] sintetizaram esferas de quitosana e carboximetil Konjac para liberação de BSA. Em 5h aproximadamente 90% do BSA foi liberado em solução de pH 7,4.

González-Rodríguez e col. [2002] estudaram a liberação de diclofenaco de sódio a partir de partículas de alginato e quitosana. Eles verificaram que 100% do DCS foi liberado em solução de pH 7,4 para partículas de massa 1:1 de alginato/quitosana.

Os valores de n para as amostras de QTa/CCM1 e QTa/CCM3, QTb/CCM1 e QTb/CCM3 são mostrados nas tabelas 16, 17 respectivamente. Pode-se verificar que em todas as liberações são fenômenos não Fickianos, isto é, a velocidade de difusão e relaxação é comparável.

Peng e col. [2006] sintetizaram esferas de quitosana N-metiladas, onde observaram mecanismos não Fickianos com valores de n variando de 0,46 a 0,64 em pH 7,4. Esferas compostas de quitosana/ tripolifosfato de sódio/sulfato de dextrana usadas na liberação de ibuprofeno mostraram valores de n variando de 0,53 a 0,91, indicando que em algumas esferas a liberação era via mecanismo Fickiano (transporte do tipo II, controlado por relaxação) e em outras por mecanismos não Fickiano [Lin e col., 2005]. Rokhade e col. [2006] observaram que os valores de n para esferas de gelatina e carboximetil celulose variavam de 0,2 a 0,43 indicando mecanismos não Fickiano e mecanismo Fickiano (transporte do tipo I, controlado por difusão).

Tabela 16. Valores de n para as amostras de QTa/CCM1 e QTa/CCM3.

QTa/CCM1	n	R	QTa/CCM3	n	R
1 ^a	0,82	0,997	1 ^a	0,84	0,995
2 ^a	0,80	0,997	2 ^a	0,78	0,994
3 ^o	0,81	0,999	3 ^a	0,81	0,997

Tabela 17. Valores de n para as amostras de QTb/CCM1 e QTb/CCM3.

QTb/CCM1	n	R	QTb/CCM3	n	R
1 ^a	0,77	0,997	1 ^a	0,72	0,997
2 ^a	0,69	0,998	2 ^a	0,66	0,996
3 ^o	0,75	0,997	3 ^a	0,66	0,997

5-CONCLUSÕES

Genipina, um agente reticulante natural, foi obtido em uma forma pura a partir da fruta do jenipapo.

Esferas de quitosana e quitosana/ goma do cajueiro reticuladas com genipina foram produzidas e avaliadas quanto ao intumescimento e liberação de diclofenaco de sódio. Esferas reticuladas com concentração de genipina maior do que 10 mM não dissolvem em pH 1,2 e podem ser propostas na liberação de fármaco via oral. O intumescimento e a liberação do fármaco diminuem com o aumento da concentração de agente reticulante.

Esferas obtidas via complexação polieletrólítica de quitosana e goma do cajueiro carboximetilada mostraram que a massa molar da quitosana e o GS da goma carboximetilada influenciam a cinética de intumescimento e o coeficiente de difusão de água nas esferas. Entretanto na liberação do fármaco o fator mais importante na modulação da liberação é o grau de substituição da goma carboximetilada.

6-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abran M. S., Hilguera I. em *Quitina y Quitosano*, Ed. Ana Pastor de Abram, Peru (2004), Cap. 1 Generalidades.
- Aburada M., Sasaki H., Harada M., *Yakugaku Zasshi* 96 (1976) 147.
- Agnihotri S. A., Aminabhavi T. M., *Journal Controlled Release* 96 (2004) 245
- Aiba S., *International Journal Biologic Macromolecules* 13 (1991) 40.
- Akao T., Kobashi K., Aburada M., *Biologic Pharmaceutics Bulletin* 17 (1994) 1573.
- Anal A. K., Stevens W. F., Remunan C., *Internetalional Journal of Pharm.* 312 (2006) 166.
- Anderson D.M., Bell P. C., Millar J. R., *Photochemistry* 9 (1970) 1595.
- Arguelles-Monal W., Hechavarria O. L., Rodríguez L., Peniche C., *Polymer Bulletin* 31 (1993) 471.
- Bae_site, disponível em: www5.bae.ncsu.edu/bae/research, acessado em 4 de julho de 2007.
- Bajpai S. K., Tankhiwale R., *Reactive and Functional Polymers* 66 (2006) 1565.
- Bark K., Butler M., *Journal of Applied of Polymer Science* 92 (2005) 1581.
- Berger J., Reist M., Mayer J. M, Felt O., Gurny R., *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 57 (2004a) 35.
- Berger J., Reist M., Mayer J. M, Felt O., Pepas N. A., Gurny R., *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 57 (2004b) 19.
- Bertram U., Bodmeier R., *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 63 (2006) 310.
- Bhattacharyya D., Singhal R. S., Kulkarni P. R., *Carbohydrate Polymers* 27 (1995) 247.
- Brugnerotto J., Lizardi J., Goycoolea F. M., Argüelles-Monal M., Desbrieres J., Rinaudo M., *Polymer* 42 (2001) 3569.
- Butler M. F., Clark A., Adams S., *Biomacromolecules* 7 (2006) 2961.
- Butler M. F., Ng Y-F., Pudney P. D. A., *Journal of Polymer Science Part A:*

- Polymer Chemistry* 441 (2003) 3941.
- Cerrai P., Guerra G. D., Tricoli M., *Macromolecular Chemistry and Physics* 197 (1996) 3567.
- Charlton S.T., Davis S.S., Illum L., *Journal of Controlled Release* 118 (2007) 225.
- Chatchawaslsaisin, J, Podezeck F., Newton J.M., *International Journal of Pharmaceutics* 275 (2004) 41.
- Chavasit V., Kienzle-Sterzer C. A., Torres J. A., *Polymer Bulletin* 19 (1988) 223.
- Chen H., Ouyang W., Lawuyi B., Prakash S., *Biomacromolecules* 7 (2006) 2091.
- Chen HM, Wei OY, Jones M, Metz T, Martoni C, Haque T, Cohen R, Lawuyi B, Prakash S, *Cell Biochemistry and Biophysics* 47 (2007) 159.
- Chen S-C., Wu Y-C., Mi F-L., Lin Y-H., Yu L-C., Spng H-W. *Journal of Controlled Release* 96 (2004) 285
- Chornet E., Dumitriu S., Vidal P., Patent CA 2146192, 1995.
- Chung M. C., Silva A. T., Castro L., Carvalho R. V., Nassute J. C., Ferreira E. I., *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 41 (2005) 2.
- Costa, S. M. O., Rodrigues J. F., Paula R. C. M., *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 2 (1996) 49.
- Daly M. M., Knorr D., *Biotechnology Programmer* 4 (1988) 76.
- Dini E., Alexandridou S., Kiparissides C., *Journal of Microencapsulation* 20 (2003) 375.
- Djarassi C., Gray J. D., Kincl F. A., *Journal of Organic Chemistry* 25 (1960) 2174.
- Dong Y. M., Qiu W. B., Ruan Y., Wu Y. S., Wang M. A., Xu C. Y., *Polymer Journal* 33 (2001) 387.
- Drewes S., Kayonga L., *Journal of Natural Products* 59 (1996)1169.
- Drug delivery site, disponível em: www.drug.delivery://liberandoinsulina, acessado em 13 de julho de 2007.
- Drugdel site, disponível em: www.drugdel.com/polymer.htm , acessado em 4 de julho de 2007.
- Du J., Dai J., Liu J-L., Dankorvich T., *Reactive and Functional Polymers* 45 (2006) 1985
- Du J., Sun R., Zhang S., Govender T., Zhang L., Xiong C., Peng T.,

- Macromolecular Rapid Communications* 25 (2004) 954.
- Du J., Zhang S., Sun R., Zhang L. F., Xiong C. D., Peng Y. X., *Journal of Biomedical Materials Research Part B- Applied Biomaterials* 72 (2005) 299.
- Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F., *Analytical Chemistry* 28 (1956) 350.
- Dumitriu S., Chornet E., *Biotechnology Programmers* 13 (1997) 539.
- Dumitriu S., Chornet E., *Chitin Enzymologist* 2 (2000) 527.
- Duncan R., *Natural Reviews Drug Discovery* 2 (2003) 347.
- Enel S., McClure S. J., *Medicine Advanced Drug Delivery Review* 56 (2004) 1467.
- Ettmayer P., Amidon G. L., Clement B., Testa B., *Journal of Medical Chemistry* 47(2004) 2393.
- Feng O., Zeng G., Yang P., Wang C., Cai J., *Colloids and Surfaces A: Physicochemistry Engineer Aspects* 257 (2005) 85.
- Freiberg S., Zhu X. X., *International Journal of Pharmaceutics* 282 (2004) 1.
- Gabrielii I., Gatenholm P., Glasser W. G., Jain R. K., Kenne L., *Carbohydrate Polymer* 43 (2000) 367
- George M., Abraham E., *Journal of Controlled released* 114 (2006) 1.
- Glinel K., Sauvage J. P., Oulyadi H., Huguet J., *Carbohydrate Research* 328 (2000) 343.
- Gonçalves J.L.S., Lopes R.C., Oliveira D.B., Costa S.S., Miranda M.M.F.S., Romanos M.T.V., Santos N.S.O., Wigg M.D., *Journal of Ethnopharmacology* 99 (2005) 403.
- Gonzales-Rodrigues M. L., Holgado M. A, Sanchez-Lafluyente C., Rabasco A. M, Fini A., *International Journal of Pharmaceutics* 232 (2002) 225.
- Guilherme M. R., Reis A. V., Takahashi S. H., Rubira A. F., Feitosa J. P. A., Muniz E. C., *Carbohydrate Polymers* 61 (2005) 464.
- Gupta K., Jarbrail F., *Carbohydrate Research* 341 (2006b) 744.
- Gupta KC, Jabrail FH, *International Journal of Biological Macromolecules* 38 (2006a) 272.
- Harogoppad S. B., Aminabhavi T. M., *Journal of Applied Polymer Science* 46 (1992) 725.

- Hasan E.I., Amor B.I., Arafat T., Badwan A. A., *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 55 (2003) 339.
- Hayes F. R., N,O-carboxymethyl chitosan and preparative method therefor. U. S. Patent 4.619.995, October 28, 1986
- Hejazi R, Amiji M., *Journal of Controlled Release* 2003;89(2):151–65.
- Huang R., Chen G., Sun M., Hu Y., Gao C., *Carbohydrate Polymers* 70 (2007b) 318.
- Huang Y., Cheng Y., Yu C., Tsai T., Cham T., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 58 (2007a) 290.
- Ike-Nor U. O., Ofoefule SI, Chukwu A, *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 16 (2006) 397.
- Iqusp site, disponível em:
www.iq.usp.br/wwwdocentes/rtorresi/portugues/interesse/drogas.htm,
 acessado em 4 de junho de 2007.
- Ishak A.H. , Awad A.S., Mortada D., Nour A.K., *Journal of Controlled Release* 119 (2007) 207.
- Jacobs C., Mason N. S., El-Nokaly M. A., Piatt D. A., Charpentier B. A., *ACS Symposium Series* 520 (1993) 1.
- Jagedeeswaran R., Thirumavukkarasu C., Gunasekaran P., Ramamurty N., *Fisioterapia* 71 (2000) 395.
- Jameela S. R., Jayakrishanan A., *Biomaterials* 16 (1995) 769.
- Jameela S. R., Kumary Y. V., Lal A. V., Jayakrishanan A., *Journal of Controlled Release* 52 (1998) 17.
- Jameela S. R., Misra A., Jayakrishanan A., *Journal of Biomater Science Polymer* 6 (1994) 621.
- Jeon C., Holl W. H., *Water Research* 37 (2003) 4770.
- Jim J., Song M., Houston D. J., *Biomacromolecules* 5 (2004) 162.
- Jiugao Y., Ying W., Shaomin W., Xiaofei M., *Carbohydrate Polymers* 70 (2007) 8.
- Kanauchi O., Deuchi K., Imasaio Y., Shizukuishi M., Kobaiashi E., *Bioscience and Biotechnology* 59 (1995) 786.
- Khurma J. R., Rohindra D. R., Nand A., *Polymer Bulletin* 54 (2005) 195.

- Kim H. J., Lee H. C., Oh J., Shin B. A., Oh C. S., Park R. D., *Journal of Biomaterial Science Polymers* 10 (1999) 543.
- Kim T. H, Park Y. H, Kim K. J, Cho C. S. *International Journal of Pharmaceutics* 250 (2003) 371.
- Koga D., *Advances Chitin Science* 3 (1998) 237
- Koo H.-J., Song Y. S., Kim H.-J., Lee Y.-H., Hong S.-M., Kim S.-J., Kim B.-C., Jin C., Lim C.-J., Park E.-H., *European Journal of Pharmacology* 495 (2004) 201.
- Koo H.-J., Lim K.-H., Jung H.-J., Park E.-H., *Journal of Ethnopharmacology* 103(2006) 496
- Kooijman L. M., Ganzeveld K. J., Manurung R. M., Heeres H. J., *Starch-Starke* 55 (2003) 495.
- Koyano T., Koshizaki N., Umehara H., Nagura M., Minoura N., *Polymer* 41 (2000) 4461.
- Kumbar S. G., Soppimath K. S., Aminabhavi T. M., *Journal of Applied Polymer Science* 87 (2003) 1525.
- Kurita K., *Progress in Polymer Science* 26 (2001) 1921.
- Lavertu M., Xia Z., Serregi A. N., Berrada M., Rodrigues A., Wang D., Buscham M., Gupta A., *Journal of Pharmaceutcs on biomedical Analysis* 32 (2003) 1149.
- Le Dung P., Milas M., Rinaudo M., Desbrières J., *Carbohydrate Polymers* 24 (1994) 209.
- Lee K.Y., Ha W.S., *Journal of Applied Polymer Science* 63 (1997) 425.
- Lee WF, Lee SC, *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 18 (2007) 1089.
- Lim S. T, Forbes B., Berry D. J, Martin G. P, Brown M. B., *International Journal of Pharmaceutics* 231 (2002) 73.
- Lima R. S. N., Lima J. R., de Salis C. R., Moreira, R. A., *Journal of Biotechnology Applied Biochemistry* 35 (2002) 45.
- Lima, R. S. N., Lima, J. R., Salis, C. R., Moreira, R. A., *Biotechnology and Applied Biochemistry* 35 (2002) 45-53.
- Lin W. C., Yu D. G., Yang M. C., *Colloids and Surface B: Biointerfaces* 44 (2005)

- 143.
- Liu D., Hsieh J., Fan X., Yang J., Chung T., *Carbohydrate Polymers* 68 (2007) 544.
- Long D. D., VanLuyen D., *Journal of Macromolecular Science Pure and Applied Chemistry* A3 (1996) 1875.
- Lu Z., Li C. M., Zhou Q., Bao Q., Cui X., *Journal of Colloid and Interface Science* 73 (2007) 1980.
- Maaref A., Barhoumi H. , Rammah M., Martelet C., Jaffrezic-Renault N., Mousty C., Cosnier S., *Sensors and Actuators B: Chemical* 123 (2007) 671.
- Maciel J. S., Géis de Goma do Cajueiro e Derivados Com Quitosana: Síntese, Caracterização e Ensaio Preliminares em Sistemas de Liberação de Fármacos, Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Química Inorgânica - UFC, Fortaleza (2005).
- Maciel J. S., Paula R. C. M., Paula H. C. B., Miranda M. A. R.; Sasaki J. M., *Journal of Applied Polymer Science* 99 (2006) 326.
- MacLaughlin FC, Mumper RJ, Wang J, Tagliaferri JM, Gill I, Hinchcliffe M., *Journal Controlled Release* 56 (1998) 259.
- Macleod S.G., Collet J.H., Fell J.T., *Journal of Controlled Release* 58 (1999) 303.
- Mangione M. R., Giacomazza D., Cavallaro G, Bulone D., Martorana V., San Biagio P. L., *Biophysical Chemistry* 129 (2007) 18.
- Marques M. R., Albuquerque L.M.B., Xavier-Filho J., *Annals Applied Biological* 121.
- Martins S., Sarmiento B., Souto E. B., Ferreira C. D., *Carbohydrate Polymers* 69 (2007) 725.
- Menestrina J. M., Iacomini M., Jones C. Gorin P. A., *Phytochemistry* 47 (1998) 721.
- Meshali M. M; Gabr K. E., *International Journal of Pharmaceutics* 89 (1993) 177.
- Mi F. L., Sung H. W., Shyu S. S., *Carbohydrate Polymer* 48 (2002 b) 61.
- Mi F. L., Tan Y. C., Liang H. C., Huang R. N., Sung H. W., *Journal Biomater Science Polymer* 12 (2001) 835
- Mi F.-L., Shyu S.-S., Peng C.-K., *Journal of Polymer Science Part A: Polymer*

- Chemistry* 43 (2005) 1985.
- Mi F.-L., Spng H-W., Shyu S.-S., Su C.-C., Peng C.-K., *Polymer* 44 (2003) 6521.
- Mi F.L., Tan H. F. Spng H. W., *Biomaterials* 23 (2002 a) 181.
- Mi F-L., *Biomacromolecules* 6 (2005) 975.
- Millar J. N. B., *Industrial Gums, Enciclopedia of Polymer Science and Engineering, John Wiley e Sons* 7 (1987) 589.
- Mitsumata, T., Suemitsu, Y., Fujii, K., Fujii, T., Taniguchi, T., Koyama, K., *Polymer* 44 (2003) 7103.
- Miyamoto K., Tsuji K., Nakamura T., Tokita M., Komai T., *Carbohydrate Polymers* 30 (1996) 161.
- Miyasita S., *American Journal of Clinical Medicine* 4 (1976) 239.
- Monthé, C.G., (2000) Produção de goma de cajueiro, patente n° PI0004114.
- Moore G. K., Roberts A. F., *International Journal of Biological. Macromolecules* 2 (1980) 115.
- Mundargi R. C., Shelke N. B., Rokhade A. P., Patil S. A., Aminabhavi T. M., *Carbohydrate Polymers* 71 (2008) 42.
- Muzzarelli R. A. A., *Cellular Mol. Life Science* 53 (1997) 131.
- Muzzarelli C., Stanic V., Gobbi L., Tosi G., Muzzarelli R. A., *Carbohydrate Polymers* 57 (2004) 73.
- Muzzarelli R., Chitosan, em: Muzzarelli (Ed.), *Natural Chelating Polymers, Pergamon Press, Oxford, 1973, pp. 144.*
- Nassute J. C., Longo M. C., Menegon R. F., Ribeiro Y. A., Chung M. C., *Revista Ciência Farmaceutica*, 23 (2002) 200.
- Nerem RM., *Cellular engineering. Ann Biomed Eng* 19 (1991) 529.
- Nickerson M. T., Patel J., Heyd D. V., Rousseau D., Paulson A. T., *International Journal Biological Macromolecules* 39 (2006a) 298.
- Nickerson M. T., Paulson A. T., Wagar E., Farnworth R., Hodger S. M., Rousseau D., *Food Hydrocolloids* 20 (2006b) 1072.
- Ohkawa K., Kitagawa T., Yamamoto H., *Macromolecular Materials and Engeneering* 289 (2004) 33.
- Ozoemena K. I., Nyokong T., *Electrochimica Acta* 51(2006) 5131.

- Palmieri G. F., Bonacucina G., Di Martino P., Martelli S., *International Journal of Pharmaceutics* 242 (2002) 175.
- Pandley R., Khuller G. K., *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 53 (2004) 635.
- Park W. H., *Macromolecular Chemistry and Physics* 197 (1996) 2175.
- Paula H. C. B., Gomes F. S., Paula R. C. M., *Carbohydrate Polymers* 48 (2002) 313.
- Paula H. C. B., Paula R. C. M., Bezerra S. K. F., *Journal of Applied Polymer Science*, 102 (2006) 395.
- Paula R. C. M., Heatley F., Budd P. M., *Polymer International* 45 (1998) 27.
- Paula R.C.M., Rodrigues J.F., *Carbohydrate Polymers* 26 (1995) 177.
- Peng X., Zhang L., Kennedy J., *Carbohydrate Polymers* 65 (2006) 288.
- Petzold K., Schwikal K., Heinze T., *Carbohydrate Polymers* 64 (2006) 292.
- Picton L., Mocanu G., Mihai D., Carpov A., Muller G., *Carbohydrate Polymers* 28 (1995) 131.
- Pinto G. L., Martinez M., Mendonza J. A., Ocando E., Rivas C., *Biochemical Systematic and Ecology*, 23, (1995) 151.
- Portero A., Remunan-Lopez C., Criado M. T., *Journal of Microencapsulation* 19 (2002) 797.
- Rao K.S.V. , Naidu V. K. , Subha M.C.S., Saíram M., Aminabhavi T.M., *Carbohydrate Polymers* 66 (2006) 333.
- Ritger P. L., Pepas N. A., *Journal of Controlled Release* 5 (1987) 37.
- Rodrigues J. F., Paula R. C. M., Costa S. M. O., *Polímeros: Ciência e Tecnologia* 1 (1993) 31.
- Rokhade A. , Agnihotri S., Patil S., Mallikarjuna N., Kulkarni P., Aminabhavi T., *Carbohydrate Polymer* 65 (2006) 243.
- Rokhade A., Patil S., Aminabhavi T., *Carbohydrate Polymers* 67 (2007b) 605
- Rokhade P., Shelke N., Patil S., Aminabhavi T., *Carbohydrate Polymers* 69 (2007a) 678
- Rouse J. J., Whateley T. L., Thomas M., Eccleston G. M., *International Journal of Pharmaceutics* 330 (2007) 175.

- Rusu-Balaita L, Desbrières J., Rinaudo M., *Polymer Bulletin* 50 (2003) 91.
- Sakiyama T., Chu C., Fujji T, Yano T., *Journal of Applied Polymer Science* 50 (1993) 2021.
- Sakiyama T., Takata H., Kikuchi M., Nakanishi K., *Journal of Applied Polymer Science* 73 (1999) 2227.
- Sampaio M. I., Santos T. C., Kaplan M. A. *Revista Brasileira de Farmácia* 79 (1998) 72.
- Sarubbo L.A., Oliveira L.A., Porto A.L.F., Duarte H.S., Carneiro-Leão A.M.A., Lima-Filho J.L., Campos-Takaki G.M., Tambourgi E.B., *Journal of Chromatography B* 743 (2000) 79.
- Satchi-Fainaro R., Hailu H., Davies J. W., Summerford C., Duncan R., *Bioconjug. Chemistry* 14 (2003) 797.
- Schirato G. V., Monteiro F. M., Silva F. O., Lima J. L., Leão A. M. A., Porto A. L. F., *Ciência Rural*, 36 (2006) 1.
- Shahabeddin L., Damour O., Berthod F., Rousselle P., Saintigny G., Collombel C., *Journal of Materials Science Materials Medicine* 2 (1991) 222.
- Silva D.A., de Paula R.C.M., Feitosa J.P.A., de Brito A.C.F., Maciel J.S., Paula H.C.B., *Carbohydrate Polymer* 58 (2004) 163.
- Silva D.A., Feitosa J. P. A., Maciel J.S., Paula R.C.M., Paula H.C.B., *Carbohydrate Polymer* 66 (2006) 16.
- Silva D.A., Modificação Química da Goma do Cajueiro (*Anacardium occidentale*): Carboximetilação e Reticulação, Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Química Inorgânica-UFC, Fortaleza (2002).
- Silverstein R. M., Webster F. X. em *Identificação espectrométrica de Compostos Orgânicos*, Ed. LTC, Rio de Janeiro (2000).
- Sinha V. R., Singla A. K., Wadhawan S., Kaushik R., Kumria R., *International Journal of Pharmaceutics* 274 (2004) 1.
- Sjoblom B. Method to obtain microparticles. /US Patent n. 20046753014/ (22 de junho de 2004).
- Sorlier P., Denuziere A., Viton C., Domard A., *Biomacromolecule* 2 (2001) 765.
- Takahashi T., Takayama K., Machida Y., Nagai T., *International Journal of*

- Pharmaceutics* 61 (1990) 35.
- Takayama K., Hirata M., Machida Y., Masad T., Sannan T., Nagai T., *Chemistry. Pharmaceutics Bulletin* 387 (1990) 1993.
- Takura Y., Hashida M., *Critical Reviews Oncol. Hematol.* 18 (1995) 207.
- Tan T.W, Hu B., Jin X.H., Zhang M., *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* 18 (2003) 207.
- Tapia C., Escobar Z., E., Costa E., Sapag-Hagar J., Valenzuela F., Basualto C., Gai M. N., Yazdani-Pedram M., *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 57 (2004) 65.
- Taravel M. N., Domard A., *Biomaterials* 16 (1995) 865.
- Torul H., Arslan N., *Carbohydrate Polymers* 54 (2003) 73.
- Tsai C. C., Huang R., Sung H., Liang H., *Journal of Biomedical Materials* 52 (2000) 58.
- Tseng T. H., Chu C. Y., Huang J. M., Shioh S. J., Wang C. J., *Cancer Letters* 97 (1995) 61.
- Vasiliu S., Popa M., Rinaudo M., *European Polymer Journal* 41 (2005) 923.
- Verma R. K., Crisma M. D., Garg S. *Journal of Controlled Release* 79 (2002) 7.
- Verraest D. L., Peters J. A., Kuzee H. C., Batelaan J. G., Van Bekkum H., *Carbohydrate Research* 271 (1995) 101.
- Wang H. F., Li W. J., Lu Y. H., Wang Z. L., *Journal of Applied Polymer Science* 65 (1997) 1445.
- Wang Q., Dong Z., Du Y., Kennedy J., *Carbohydrate Polymers* 69 (2007) 336.
- Whistler, R.L., *Industrial Gums: Polysaccharides and their derivatives*, 3^o ed., eds, Whistler, R.L., Bemiller, J.N., Academic press, cap.12, 1993.
- Wu Y., Guo J., Yang W., Wang C., Fu S., *Polymer* 47 (2006) 5287.
- Wuolijoki E., Hirvelä T., Yliato P., *Clin Pharmacologic* 21 (1999) 357.
- Xing FB, Cheng GX, Yang BX, Ma LR, *Journal of Applied Polymer Science* 91 (2004) 2669.
- Xu Y., Zhan C., Fan L., Wang L., Zheng H., *International Journal of Pharmaceutics* 336 (2007) 329.
- Yamamoto M., Mitura N., Ohtake N., Amagaya S. Ishibe A., Sasaki H., Komatsu

- Y., Fukuda K., Ito T., Terasawa K., *Gastroenterology* 118 (2001) 380.
- Yamazaki M., Sakura N., Chiba K., Mohri K., *Biologics Pharmaceutcs Bulletin* 24 (2001) 1454.
- Yang D., Li Y., Nie J., *Carbohydrate Polymers* 69 (2007) 538.
- Yao K. D., Tu H., Cheng F., Zhang J. W., Liu J., *Macromolecular Chemistry* 245 (1997) 63.
- Yu D. G., Jou C. H., Lin W. C., Yang M. C., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 54 (2007) 222.
- Yuan Y., Chesnutt, Uttukar G. Haggard W. O., Yang Y., Ong J., Bumggardner L., *Carbohydrate Polymer* 68 (2007) 561.
- Zakaria M. B., Rahman Z., *Carbohydrate Polymers* 29 (1996) 25.
- Zhang L., Guo J., Peng X.H, Jin Y., *Journal of Applied Polymer Science* 92 (2004) 878.
- Zhang Q., Liu L., Ren L., Wang F., *Journal Applied Polymer Science* 64 (1997) 2127.
- Zhang X-Z., Lewis P. J., Chu C-C., *Biomaterials* 26 (2005) 3299.