



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

JOSÉ GUILHERME VERAS NETO

NANOPARTÍCULAS DE GOMA DO CAJUEIRO HIDROFOBICAMENTE
MODIFICADAS PARA LIBERAÇÃO DE FÁRMACO

FORTALEZA

2013

JOSÉ GUILHERME VERAS NETO

NANOPARTÍCULAS DE GOMA DO CAJUEIRO HIDROFOBICAMENTE
MODIFICADAS PARA LIBERAÇÃO DE FÁRMACO

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

Orientadora: Profa. Dra. Regina Célia Monteiro de Paula.

Coorientadora: Profa. Dra. Judith Pessoa de Andrade Feitosa.

FORTALEZA

2013

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

- V584n Veras Neto, José Guilherme.
Nanopartículas de goma do cajueiro hidrofobicamente modificadas para liberação de fármaco / José Guilherme Veras Neto. – 2013.
70 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2013.
Orientação: Profa. Dra. Regina Célia Monteiro de Paula.
Coorientação: Prof. Dr. Judith Pessoa de Andrade Feitosa.
1. Goma do cajueiro. 2. Colesterol. 3. Esterificação. 4. Liberação controlada. I. Título.
- CDD 540
-

JOSÉ GUILHERME VERAS NETO

NANOPARTÍCULAS DE GOMA DO CAJUEIRO HIDROFOBICAMENTE
MODIFICADAS PARA LIBERAÇÃO DE FÁRMACO

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

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Regina Célia Monteiro de Paula (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profª. Dra. Judith de Andrade Pessoa Feitosa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profª. Dra. Flávia Oliveira Monteiro da Silva Abreu
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

A Deus.

Aos meus pais, Sâmia e Guilherme.

A Wanessa.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Sâmia, ao meu pai Guilherme e ao meu avô Farias, pelo apoio, carinho e conselhos durante todas as fases da minha vida.

À professora Regina Célia, pelo acolhimento quase que maternal, pelas oportunidades oferecidas desde a iniciação científica, e por todos os conselhos, broncas, ajudas e orientações.

Às professoras Jeanny, Judith e Pablyana, pelas orientações, ajudas, atenção e sempre com bastante disposição.

Ao Laboratório de Polímeros (LABPOL), e à todos os colegas lá presentes que me ajudaram durante esses anos, em especial Clara, Fabrício, Eliseu, Natália, Venícios, Durcilene, Marília e Nádia.

À Wanessa, por ter sido sempre companheira, atenciosa, prestativa e ter me dado confiança e disposição para seguir em frente e lutar pelos meus objetivos.

Às amigas cultivadas desde a graduação, Alberto, Dearlan, Erick, Frank, Jack, Lillian e Thiago, pelo companheirismo em todas as horas e pelo carinho desenvolvido ao longo desses anos.

Aos professores e funcionários dos Departamentos de Química da UFC, por todo o apoio e pela agradável convivência durante todo o curso.

Ao CNPq, CAPES e Funcap pelo apoio financeiro.

“Seu trabalho vai preencher uma parte grande da sua vida, e a única maneira de ficar realmente satisfeito é fazer o que você acredita ser um ótimo trabalho. E a única maneira de fazer um excelente trabalho é amar o que você faz.” Steve Jobs.

RESUMO

Com a finalidade de otimizar a incorporação de fármacos hidrofóbicos em matrizes nanométricas para liberação controlada realizou-se dois tipos de modificações por esterificação da goma do cajueiro: a enxertia do anidrido propiônico na GC, produzindo derivados GCP1, GCP2 e GCP3 com grau de substituição (GS) de 0,79; 1,02 e 1,33 respectivamente bem como a enxertia do colesterol formando o derivado GCC com GS = 0,029. A análise por FT-IR apresentou bandas características de GC em 1150, 2900 e 3400 cm^{-1} nos derivados esterificados além do aparecimento de nova banda em 1750 cm^{-1} para os derivados com anidrido acético e um pequeno aumento da banda em 2900 cm^{-1} para o derivado com colesterol, indicando a modificação. Os espectros de RMN ^1H de GCP apresentam novos sinais em δ 1,0 e δ 2.3 característicos de $-\text{CH}_3$ e $-\text{CH}_2$ dos grupos propiônicos inseridos nos derivados, além dos sinais devido a GC. Nos espectros de RMN ^1H do derivado modificado com colesterol novos sinais de baixa intensidade foram observados em δ 1.3 e δ 2.3 devido a prótons do colesterol. As análises de TGA mostram que a enxertia do colesterol não influenciou a estabilidade térmica da GC, enquanto o aumento do GS dos derivados obtidos por enxertia do propanoato aumentou a estabilidade térmica. A concentração de agregação crítica (CAC) para o derivado GCC foi determinada por fluorescência e apresentou valor de 0,5 mg/mL. Nanopartículas dos derivados foram obtidas via auto-organização por processo de diálise. Os tamanhos de partículas variaram para o derivado GCA de 120-350 nm dependendo da concentração e, observou-se que apesar da diferença do GS, os derivados com anidrido propiônico (GCP) tiveram tamanho médio de 67 nm e potencial Zeta variando de -20 a -25 mV. Os perfis de liberação de indometacina mostraram que para o derivado GCC o equilíbrio de liberação foi atingido em 8 horas liberando 100% do fármaco, sendo o mecanismo de liberação não-Fickiano. Para os derivados com anidrido propiônico a liberação de indometacina é inversamente proporcional ao GS. Em 48h o percentual de liberação de indometacina para GCP1, GCP2 e GCP3 são respectivamente 60, 45 e 36%. O mecanismo de liberação nos derivados propiônicos é Fickiano.

Palavras-chave: Goma do cajueiro. Colesterol. Esterificação. Liberação controlada.

ABSTRACT

In order to optimize the incorporation of hydrophobic drugs in nanometric matrices for controlled release, two types of modifications were made by esterification of cashew gum (GC): the grafting of propionic anhydride in the GC producing derivatives GCP1, GCP2 and GCP3 with a degree of substitution (GS) of 0.79; 1.02 e 1.33 respectively as well as the grafting of cholesterol forming the GCC derivative with GS = 0.029. The FT-IR analysis showed characteristic bands of GC in 1150, 2900 and 3400 cm^{-1} in the esterified derivatives in addition to the presence of a new band in 1750 cm^{-1} for derivatives with propionic anhydride and a small increase in the band in 2900 cm^{-1} for the cholesterol derivative, being an indicative that modifications have occurred. The ^1H NMR spectra of GCP present new signals in δ 1.0 and δ 2.3, characteristic of $-\text{CH}_3$ and $-\text{CH}_2$ of the propionic groups inserted into derivatives, in addition to the signals due to GC. In the ^1H NMR spectra of the cholesterol-modified derivative, new low intensity signals were observed in δ 1.3 and δ 2.3 due to cholesterol protons. TGA analyzes show that cholesterol grafting did not influence the thermal stability of GC, while the increase in GS of derivatives obtained by grafting propanoate increased termal stability. The critical aggregation concentration (CAC) for GCC derivative was determined by fluorescence and showed a value of 0.5 mg/mL. Nanoparticles of the derivatives were obtained via self-organization by dialysis process. The particle sizes range for the GCA derivative from 120-350 nm depending on the concentration and it was observed that despite the difference in the GS. Propionic anhydride derivatives (GCP) had an average size of 67 nm and potential Zeta ranging from -20 to -25 mV. The indomethacin release profiles showed that for the GCC derivative the release balance was reached in 8 hours, releasing 100% of the drug, being the non-Fickian release mechanism. For derivatives with propionic anhydride the released of indomethacin is inversely proportional to GS. In 48h, the percentage of indomethacin release for GCP1, GCP2 and GCP3 was 60, 45 and 36%, respectively. The release mechanism in propionic derivatives is Fickian.

Keywords: Cashew gum. Cholesterol. Esterification. Controlled release.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – (A) Unidades monossacarídicas presentes na goma do cajueiro do nordeste. (B) Representação da estrutura do polissacarídeo extraído do exsudato do cajueiro	18
Figura 2 – Esquema geral da esterificação de Fischer	20
Figura 3 – Esquema geral da reação de esterificação com anidrido acético	20
Figura 4 – Mecanismo da reação de esterificação de um álcool genérico ROH com anidrido propiônico	21
Figura 5 – Esquema geral da reação de esterificação de Steglich	22
Figura 6 – Mecanismo completo da esterificação de Steglich com um álcool e um ácido carboxílico genéricos	23
Figura 7 – Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas	24
Figura 8 – Formação de Nanopartículas por Auto-Organização	30
Figura 9 – Concentração plasmática efetiva de fármacos em função do tempo em: sistemas convencionais e sistemas de liberação sustentada	31
Figura 10 – Reação de esterificação com anidrido propiônico	34
Figura 11 – Espectros de Infravermelho de GC e seus derivados esterificados com anidrido propiônico GCP-A, GCP-B, GCP-C, GCP-D e GCP-E	40
Figura 12 – Reação de esterificação da goma do cajueiro (representada pela cadeia principal de galactoses ligadas 1→3) com anidrido propiônico. R = OH ou grupo OCOCH ₂ CH ₃	41
Figura 13 – Espectro de RMN ¹ H de GC em D ₂ O	42
Figura 14 – Espectro de RMN ¹ H de GCP1 em CDCl ₃	43
Figura 15 – Espectro de RMN ¹ H de GCP2 em CDCl ₃	43
Figura 16 – Espectro de RMN ¹ H de GCP3 em CDCl ₃	44
Figura 17 – Curvas termogravimétricas de TGA e DTG de GC, GCP1, GCP2 e GCP3	46

Figura 18 – Distribuição em volume dos tamanhos de partícula de soluções 0,01% de GCP1, GCP2 e GCP3	47
Figura 19 – Estrutura do colesterol	49
Figura 20 – Espectros de Infravermelho de GC e seu derivado enxertado com colesterol GCC	49
Figura 21 – Espectro de RMN ¹ H de GCC em D ₂ O	52
Figura 22 – Curvas termogravimétricas de TGA e DTG de GC e GCC	53
Figura 23 – Razões I ₁ /I ₃ (o) e I ₃₃₈ /I ₃₃₄ (●) para o pireno como uma função da concentração dos polissacarídeos: A) GC; B) GCC1 e C) GCP3	55
Figura 24 – Distribuição em volume dos tamanhos de partícula de GC (A) e GCC nas concentrações 0,01 (B); 0,05 (C) e 0,1% (D) em água deionizada	56
Figura 25 – Distribuição dos valores de potencial Zeta nas amostras de GCC nas concentrações 0,01 (A); 0,05 (B) e 0,1% (C)	57
Figura 26 – Perfil de liberação de indometacina in vitro a partir das matrizes esterificadas GCC, GCP1, GCP2 e GCP3 em tampão pH 7,4 à 37 °C	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição da goma de cajueiro de diferentes regiões geográficas	17
Tabela 2 – Relação do tamanho de partícula com o seu efeito no organismo	25
Tabela 3 – Produção de nanopartículas à base de polissacarídeos naturais e sintéticos .	25
Tabela 4 – Razões molares utilizadas na produção de GCP em relação a 1 mol de GC	34
Tabela 5 – Relação entre as alturas das bandas em 1150 e 1080 e cm^{-1} para as amostras de GC, GCP-A, GCP-B, GCP-C, GCP-D e GCP-E	41
Tabela 6 – Denominação para os derivados de GCP	41
Tabela 7 – Eventos térmicos da análise termogravimétrica para as amostras GC, GCP1, GCP2 e GCP3	46
Tabela 8 – Tamanhos de partículas e potenciais Zetas para as amostras de GC e os derivados esterificados	48
Tabela 9 – Teor de carbono, hidrogênio e nitrogênio das amostras de GC e GCC	50
Tabela 10 – Eventos térmicos da análise termogravimétrica para as amostras GC e GCC	53
Tabela 11 – Tamanhos de partículas e potenciais Zeta para as amostras de GC e os derivados esterificados	57
Tabela 12 – Eficiência de incorporação de indometacina nas matrizes hidrofóbicas GCC, GCP1, GCP2 e GCP3	58
Tabela 13 – Parâmetros cinéticos para o modelo de Korsmeyer-Peppas	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATRA	Ácido trans-retinoico
BSA	Albumina sérica bovina
CAC	Concentração de associação crítica
CMC	Catboximetil celulose
CPE	Complexo polieletrólítico
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
DHU	Diciclohexilureia
DMAP	Dimetilaminopiridina
DMEC	Dimetil-etilquitosana
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Eudragit	poli(ϵ -caprolactona) e poli(ácido acrílico)
FA	Formamida
GC	Goma do cajueiro
GCC	Goma do cajueiro com enxerto de colesterol
GCP	Goma hidrofobizada com anidrido propiônico
Gd-DTPA	Gd-ác. Acético dietilenopentatriamino
GS	Graus de substituição
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
PA	Acetato de prednisolone
PAA	Poli(ácido acrílico)
PCL	poli(ϵ -caprolactona)
PLGA	D,L-ácido lático-co-ácido glicólico
pTSA	Ácido p-toluenosulfônico
PVA	Poli Vinil Álcool
QT	Quitosana
SD	Sulfato de dextrana
TEC	Trietil quitosana
TMC	Trimetil quitosana
TPP	Tripolifosfato

LISTA DE SÍMBOLOS

λ	Comprimento de onda
t	Tempo
M_t/M_∞	Fração do fármaco liberada ao longo do tempo t
K	Constante de Korsmeyer-Peppas
n	Expoente de liberação
δ	Deslocamento químico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Gomas de exsudatos	16
<i>1.1.1</i>	<i>Goma do cajueiro</i>	16
1.2	Modificação de polissacarídeos	19
<i>1.2.1</i>	<i>Reação de esterificação com anidrido propiônico</i>	20
<i>1.2.2</i>	<i>Reação de esterificação de Steglich</i>	21
1.3	Nanopartículas poliméricas	24
<i>1.3.1</i>	<i>Formação de nanopartículas por auto-organização</i>	29
1.4	Matrizes para liberação controlada de fármacos	30
2	OBJETIVOS	32
2.1	Objetivo geral	32
2.2	Objetivos específicos	32
3	METODOLOGIA	33
3.1	Materiais	33
3.2	Modificação da goma do cajueiro	33
<i>3.2.1</i>	<i>Reação de esterificação com anidrido propiônico</i>	33
<i>3.2.2</i>	<i>Enxertia do colesterol na goma do cajueiro por esterificação de Steglich</i>	34
3.3	Preparação das nanopartículas autoestruturadas	35
3.4	Caracterização dos produtos obtidos	36
<i>3.4.1</i>	<i>Infravermelho</i>	36
<i>3.4.2</i>	<i>Análise elementar</i>	36
<i>3.4.3</i>	<i>Espectroscopia de ressonância magnética nuclear</i>	36
<i>3.4.4</i>	<i>Análise termogravimétrica</i>	36
<i>3.4.5</i>	<i>Concentração de Associação Crítica (CAC) por fluorescência</i>	36
<i>3.4.6</i>	<i>Tamanho da partícula e potencial Zeta</i>	37
<i>3.4.7</i>	<i>Ensaio de incorporação e perfil de liberação de indometacina in vitro</i>	37
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1	Goma do cajueiro esterificada com anidrido propiônico	39
<i>4.1.1</i>	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho</i>	39
<i>4.1.2</i>	<i>Espectroscopia de ressonância magnética nuclear</i>	42
<i>4.1.3</i>	<i>Análise termogravimétrica (TGA)</i>	45

4.1.4	<i>Tamanho de partícula e potencial Zeta</i>	47
4.2	Goma do cajueiro enxertada com colesterol	48
4.2.1	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho</i>	48
4.2.2	<i>Análise elementar</i>	50
4.2.3	<i>Espectroscopia de ressonância magnética nuclear</i>	51
4.2.4	<i>Análise termogravimétrica (TGA)</i>	52
4.2.5	<i>Concentração de Associação Crítica (CAC)</i>	54
4.2.6	<i>Tamanho de partícula e potencial Zeta</i>	56
4.3	Ensaio de incorporação e liberação de indometacina	58
5	CONCLUSÃO	61
	REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

A comunidade científica tem buscado de forma crescente por materiais biodegradáveis, extraídos de fontes renováveis e que apresentem melhor desempenho e menor custo. A ciência de Polímeros tem dado grande importância na preparação e aplicação desses novos materiais. Derivados de polissacarídeos têm sido preparados através de diversas formas de modificações químicas de modo a melhorar as propriedades físico-químicas, mecânicas ou químico-biológicas, ampliando as possibilidades de suas utilizações como novos materiais (WHISTLER, 1971).

Polissacarídeos naturais apresentam-se como uma opção para esta finalidade por suas origens biológicas e por suas capacidades de interagirem com outras moléculas biológicas como proteínas e lipídios, além do fato de alguns polissacarídeos naturais possuírem propriedades similares aos polímeros sintéticos (ROKHADE; PATIL; AMINABHAVI, 2006. EL-REHIM; HEGAZY; EL-MOHDY, 2004).

Um objetivo importante da indústria farmacêutica é descobrir novos agentes para serem usados na terapia medicamentosa e que possam ser seletivos para áreas específicas do corpo, obtendo-se o efeito terapêutico desejado. A aplicação de nanopartículas como veículos para liberação de fármacos apresenta vantagens especiais como: penetração em pequenos vasos possibilitando a interação em sítios específicos do corpo humano (VINOGRADOV, BRONICH e KABANOV, 2008), elevada encapsulação, liberação controlada e diminuição dos efeitos colaterais do tratamento (LEMARCHAND; RUXANDRA; COUVREUR, 2004).

Estudos de isolamento, purificação e caracterização das gomas de exsudatos do Estado do Ceará têm sido realizados nos últimos anos com o objetivo de viabilizar o uso destas como substitutas de gomas importadas nas indústrias farmacêutica e alimentícia (MOURA, 2009. OLIVEIRA, 2010. MOURA NETO, 2008). Novos materiais produzidos a partir destas gomas podem favorecer o interesse das indústrias na produção e comercialização destes produtos, diminuindo assim a dependência externa de importação de gomas e promovendo a geração de renda na indústria e no campo.

1.1 Gomas de exsudatos

As gomas são polissacarídeos solúveis em água que formam soluções viscosas dependendo da concentração da solução. A palavra goma teve origem no Egito, onde o exsudato de árvores (goma arábica) era designado de Kami, o qual era utilizado para estabilizar pigmentos (WHISTLER, 1993). As gomas são empregadas nas indústrias de alimentos e farmacêutica como espessantes e estabilizantes, entre outras aplicações.

As gomas extraídas de exsudatos foram as primeiras gomas conhecidas. As principais famílias que incluem espécies que produzem gomas na forma de exsudatos são *Leguminosae*, *Combretaceae* e *Anacardiaceae*. Estas espécies exsudam goma, principalmente no caule e galhos, como mecanismo de defesa contra predadores e como consequência de ferimentos (CUNHA; DE PAULA; FEITOSA, 2009).

Industrialmente as gomas mais utilizadas são: amido, derivados de celulose, goma guar, arábica, gatthi, caraia, tragacanto, gelana e ágar. Entretanto a busca de novas gomas com propriedades singulares tem despertado interesse da comunidade científica como a de exsudatos e sementes de árvores de clima tropical (CUNHA; DE PAULA; FEITOSA, 2009).

1.1.1 Goma do cajueiro

A goma extraída do exsudato do cajueiro é matéria prima abundante em todos os estados no nordeste do Brasil, lugar provável em que o cultivo da planta tenha se originado com a tradição de exploração pelas tribos indígenas da região. O cajueiro foi utilizado como espécie vegetal para florestamentos e existe registro do seu uso como árvore ornamental e para sombreamento. É extensivamente cultivado no Brasil, além de países como Quênia e Índia (BARROS, 1995).

A casca do tronco é adstringente, rica em tanino, própria para o curtume e contém substância tintorial vermelho-escuro utilizada para tingir roupas e redes. O principal produto do cajueiro é a sua castanha, mas existe potencial para a exploração da goma exsudada do cajueiro (DE PAULA; HEATLEY; BUDD, 1998).

A goma de cajueiro apresenta uma grande possibilidade de produção comercial. A área cultivada com cajueiro, segundo o IBGE, em 2006 era de 710.404 hectares. A produção média de goma/planta/ano é de 700 g (BANDEIRA, 1991). Tomando em consideração que o adensamento médio é de 100 plantas/hectare, a possibilidade de produção da goma/ano seria de 50.000 toneladas, quantidade muito superior à importada de goma arábica, por exemplo, em

2008 (6700 ton). A utilização da goma seria uma forma de agregar valor a caju cultura, desde que existisse mercado para ela (CUNHA; DE PAULA; FEITOSA, 2009).

A composição dos polissacarídeos extraídos de fontes vegetais sofre pequenas variações em função de fatores naturais como: origem da planta, tipo de solo, clima, época do ano, entre outros fatores (Tabela 1). Na análise da goma do cajueiro do Nordeste do Brasil (DE PAULA; RODRIGUES, 1995. DE PAULA; HEATLEY; BUDD, 1998) foi encontrado β -D-galactose (72%), α -D-glucose (14%), arabinose (4,6%), ramnose (3,2%) e ácido glucurônico (4,7%).

Tabela 1 - Composição da goma de cajueiro de diferentes regiões geográficas

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

Fonte: ¹(DE PAULA; HEATLEY; BUDD, 1998), (DE PAULA; RODRIGUES, 1995)

²(ANDERSON; HENDRIE, 1970)

³(PINTO *et al.*, 1995)

A caracterização estrutural da goma do nordeste do Brasil indica que esta é basicamente constituída de uma cadeia principal de galactose (1 \rightarrow 3), com ramificação de galactose (1 \rightarrow 6), tendo unidades de ramnose, ácido glucurônico e arabinose como grupos terminais (Figura 1).

1.2 Modificação de polissacarídeos

Diversas formas de modificações de polissacarídeos têm sido propostas via modificações químicas baseadas na introdução de grupos iônicos à estrutura do polissacarídeo, como é o caso das reações de carboximetilação, carboxilação, acetilação ou na introdução de grupamentos substituintes em estruturas lineares (PICTON *et al.*, 1995). A remoção de ramificações ou sítios de hidratação, a introdução de substituintes hidrofóbicos e a formação de ligações cruzadas são exemplos clássicos de modificações químicas a que os polissacarídeos podem ser submetidos (GAMAL-ELDEEN *et al.*, 2007).

Silva *et al.* (2004) submeteram a goma do cajueiro a modificações por introdução de grupos funcionais (carboximetilação e oxidação) para a obtenção de produtos com caráter de polieletrólito. Maciel *et al.* (2005) sintetizaram hidrogéis de goma de cajueiro com quitosana por três diferentes rotas: complexação polieletrólítica (onde o polication e o poliânion utilizados foram, respectivamente, a quitosana e a goma de cajueiro modificada por carboximetilação). Moura Neto (2008) obteve hidrogéis através do mecanismo de formação de base de Schiff da gelatina e goma de cajueiro oxidada.

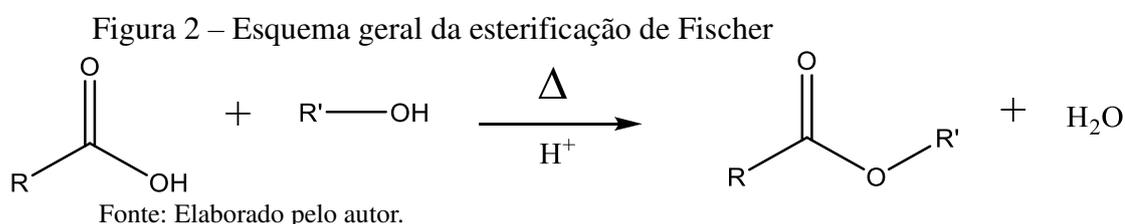
Modificações hidrofóbicas de polissacarídeos têm sido realizadas para a obtenção de derivados anfífilicos. Acetato de pululana foi obtido por Zhang *et al.* (2009) utilizando anidrido acético na presença de piridina. Jung, Jeong e Kim (2003) também utilizaram anidrido acético para obter acetato de pululana. Chi *et al.* (2008) obtiveram amido hidrofobicamente modificado, utilizando anidrido acético. Moura (2009) realizou reação de enxertia de poli(acrilamida) em goma do cajueiro e a reação com anidrido acético para inserção de grupamentos acetatos na cadeia da goma do cajueiro. Materiais com caráter anfífilico despertam vasto interesse para a utilização em áreas farmacêuticas, biológicas e biotecnológicas, para a encapsulação de fármacos pouco solúveis em água e por possuírem maior afinidade a células específicas com parede celular lipídica.

Gomas de exsudato são em sua maioria solúveis em água, ou formam géis físicos na presença de água. Para determinadas aplicações é necessário tornar esses materiais hidrofóbicos. Alguns dos processos utilizados para esse fim resultam na obtenção de um derivado com características de gel. A estrutura do gel químico é caracterizada pela presença de ligações cruzadas entre as cadeias do polímero denominadas reticulações, as quais evitam a dissolução do polímero hidrofílico. Reticulação da goma de cajueiro com epícloridrina foi realizada 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

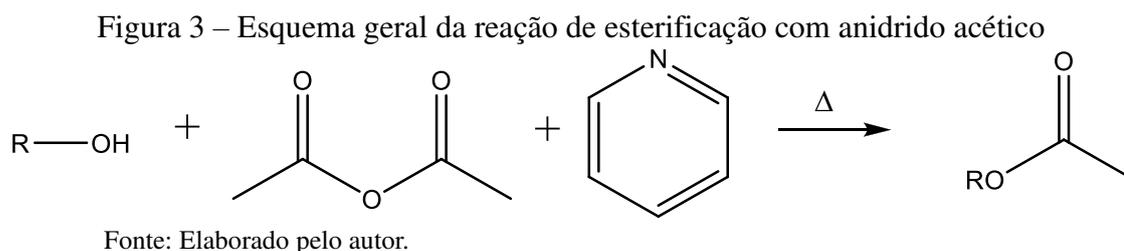
lectinas da semente de *Artocarpus* (LIMA *et al.*, 2002). Hidrogéis foram obtidos por meio de insolubilização por reação de reticulação (SILVA *et al.*, 2006).

1.2.1 Reação de esterificação com anidrido propiônico

A reação de obtenção de ésteres através do aquecimento de um ácido carboxílico e um álcool na presença de catalisador é conhecida como esterificação de Fischer (Figura 2), sendo um dos principais métodos utilizados na produção de ésteres. Industrialmente, a reação de esterificação de Fischer é um dos principais métodos para a síntese dos ésteres.



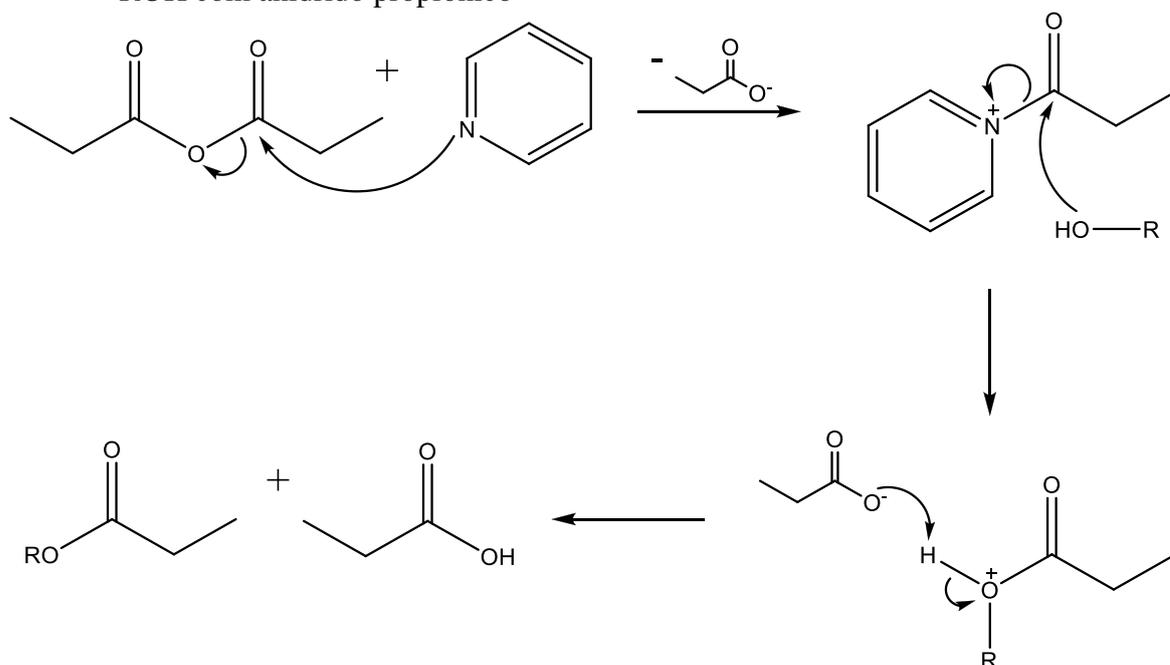
Ao contrário da esterificação de Fischer que produz água como subproduto a esterificação com anidrido é bastante usada na síntese orgânica quando não se deseja a presença de água no meio reacional. A esterificação com anidridos é realizada com piridina para a formação do eletrófilo, quebrando a molécula do anidrido em duas, resultando no éster desejado e no ácido carboxílico correspondente ao anidrido (Figura 3). Para a reação com polissacarídeos, a ausência de água é essencial, já que por ser mais nucleofílica, ela atacaria o complexo piridina-anidrido em preferência a hidroxila do anel glicosídico e impediria a formação do produto esterificado (MOTOZATO *et al.*, 1986). Modificações hidrofóbicas de polissacarídeos têm sido realizadas para a obtenção de derivados anfifílicos. A reação de esterificação com anidridos vem sendo bastante utilizada em polissacarídeos como pululana (JUNG; JEONG; KIM, 2003) e dextrana (DAOUD-MAHAMMED *et al.*, 2007).



A Figura 4 mostra o mecanismo completo da reação de esterificação de um álcool genérico utilizando anidrido propiônico. A piridina ataca o anidrido, quebrando-o em dois e torna a carbonila mais eletrofílica, possibilitando assim o ataque de qualquer hidroxila dos álcoois do anel glicosídico. A reação pode ocorrer até em mais de uma hidroxila do mesmo anel, levando a diferentes graus de substituições ao longo do polissacarídeo. Ao final da reação o polissacarídeo tem suas hidroxilas transformadas em ésteres, tornando o caráter mais hidrofóbico.

O grau de substituição das hidroxilas pode variar dependendo das condições reacionais como concentração de anidrido, temperatura e tempo de reação (SONG *et al.*, 2013. ZHANG *et al.*, 2014).

Figura 4 – Mecanismo da reação de esterificação de um álcool genérico ROH com anidrido propiônico

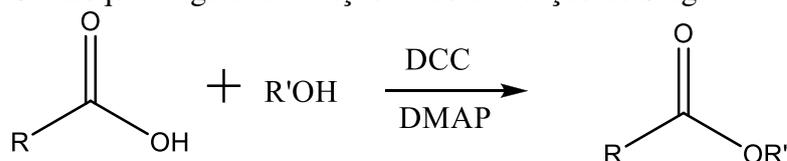


Fonte: Elaborado pelo autor.

1.2.2 Reação de esterificação de Steglich

A esterificação Steglich (Figura 5) é uma reação leve, que permite a conversão estérica de substratos ácidos lábeis. É um dos métodos convenientes para a formação de t-butil ésteres, já que o t-BuOH tende a formar carbocátions e isobuteno após uma subsequente eliminação nas condições empregadas na esterificação Fischer (NEISES; STEGLICH, 1978).

Figura 5 – Esquema geral da reação de esterificação de Steglich



Fonte: Elaborado pelo autor.

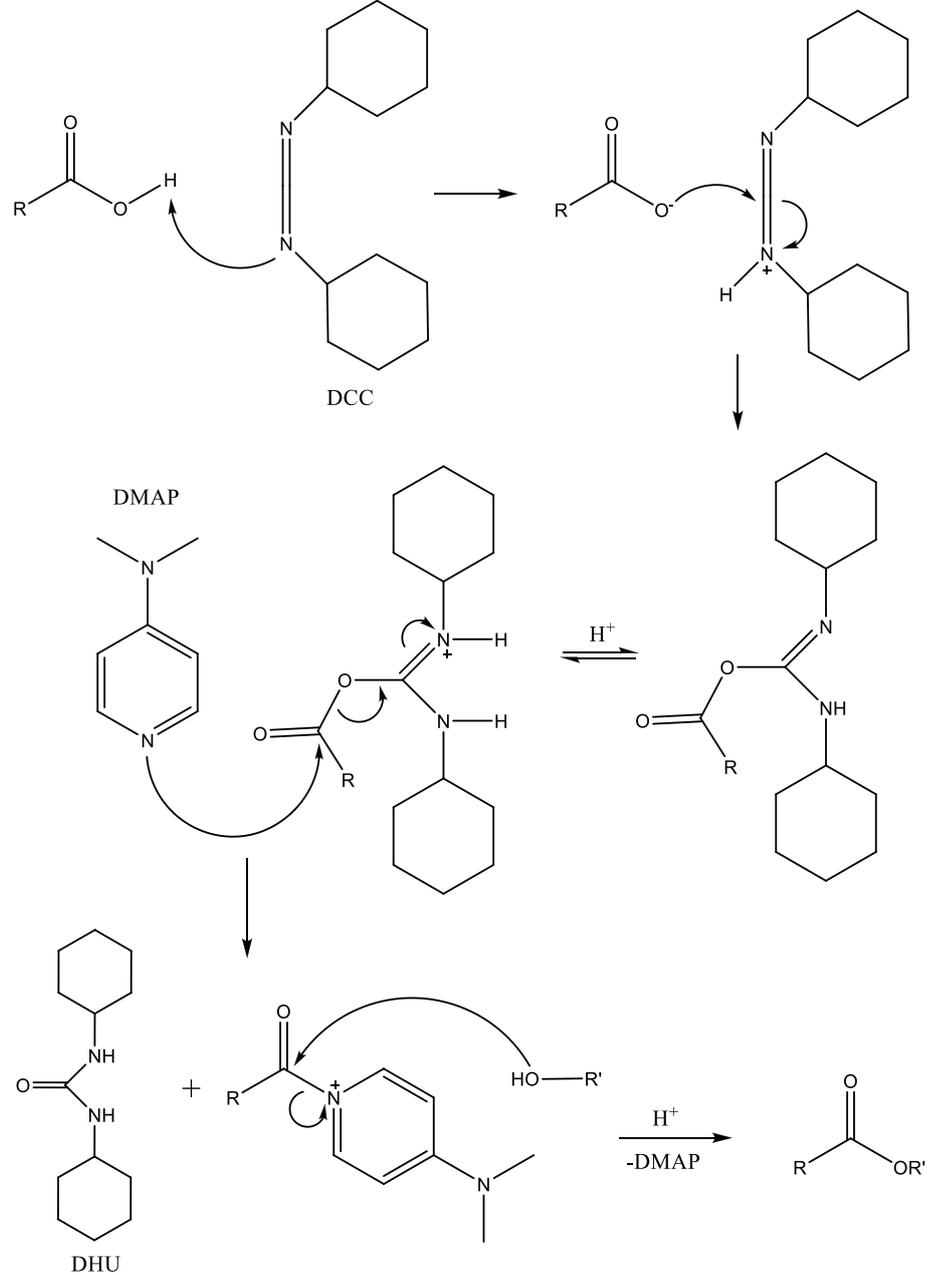
O mecanismo da esterificação Steglich (Figura 6) envolve na primeira etapa a reação da dicitlohexilcarbodiimida (DCC) e o ácido carboxílico formando um intermediário O-acilisourea, que oferece reatividade semelhante ao anidrido de ácido carboxílico correspondente. O álcool então ataca o ácido carboxílico ativado para formar o dicitlohexilureia estável (DHU) e o éster.

Na prática, a reação com ácidos carboxílicos, DCC e amina leva a amidas sem problemas, enquanto a adição de cerca de 5% em mol de dimetilaminopiridina (DMAP) é crucial para a formação eficiente de ésteres.

Uma explicação comum para a aceleração da reação sugere que DMAP é um nucleófilo mais forte que o álcool e reage com o O-acilisourea levando a formação de uma amida secundária ("éster ativo"). Este intermediário não pode formar produtos secundários intramolecular, mas reage rapidamente com álcoois. DMAP atua como um reagente de transferência de acila, desta forma, a reação subsequente com o álcool gera o éster. (STEGLICH..., 2011)

A modificação por esterificação de Steglich tem sido amplamente utilizada para enxertar colesterol em polissacarídeos que possuem ácidos carboxílicos em sua estrutura. A associação do colesterol com polissacarídeos naturais aumenta a biocompatibilidade do material devido ao colesterol possuir elevado potencial de interação com os receptores de colesterol na superfície das células e grande capacidade de conduzir a auto-organização das nanopartículas. Yang *et al.* estudaram a auto-organização e o comportamento reológico de soluções de alginato enxertado com colesterol (2007), soluções de carboximetilcelulose enxertada com colesterol (2008a) e também a liberação controlada de indometacina nessa matriz (2008b). Nanopartículas de quitosana modificada enxertada com colesterol foram produzidas por Chen *et al.* (2011) para liberação de fármaco.

Figura 6 – Mecanismo completo de esterificação de Steglich com um álcool e um ácido carboxílico genéricos



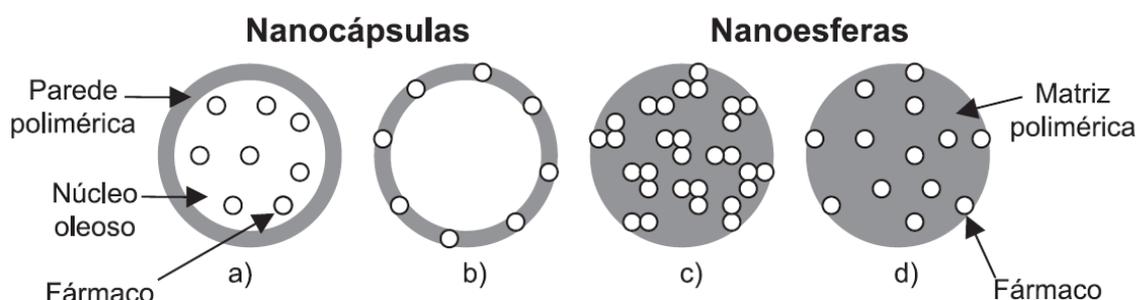
Fonte: (STEGlich..., 2011).

1.3 Nanopartículas poliméricas

Avanços significativos em nanotecnologia não foram notados até o início da década de 80, devido à ausência de instrumentos que permitissem a sua manipulação e visualização. Somente em 1981, quando foi criado o microscópio de varredura por tunelamento o primeiro artigo científico sobre nanotecnologia escrito por K. Eric Drexler foi publicado (FISHBINE, 2002).

A partir de então, o interesse dos pesquisadores por essas nanoestruturas aumentou exponencialmente devido, entre outras possibilidades, a aplicação terapêutica. Na incorporação de fármacos, a composição, formulações e a técnica empregada na sua preparação determinam o tipo de nanopartícula desejada que pode ser nanoesferas ou nanocápsulas as quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003), como mostra a Figura 7.

Figura 7 – Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: (a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; (b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; (c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; (d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas.



Fonte: SCHAFFAZICK *et al.*, 2003.

Muitos polímeros têm sido examinados para produção de nanopartículas, inclusive polímeros naturais (VAUTHIER *et al.*, 2003). A diversidade desses polímeros permite a escolha do melhor carreador para a incorporação do fármaco mais apropriado para o fim desejado. Vários parâmetros devem ser considerados, tais como: grau de toxicidade da matriz polimérica, sua estabilidade coloidal, biocompatibilidade e biodisponibilidade. Os parâmetros físico-químicos que influenciam na eliminação da matriz polimérica da corrente sanguínea são o tamanho da partícula, a hidrofiliicidade e o reconhecimento pelos macrófagos (AUMELAS *et al.*, 2007).

Tabela 2 - Relação do tamanho de partícula com o seu efeito no organismo

Tamanho (nm)	Efeito
5 – 10	As partículas podem ser removidas rapidamente pelos rins
10 – 70	As partículas não são removidas pelo sistema renal, mas são pequenas o suficiente para penetrar em capilares muito pequenos
70 – 200	Nesta faixa as partículas possuem maior tempo de circulação
> 200	São usualmente removidas por fagocitose

Fonte: VINOGRADOV *et al.*, 2002.

Nanopartículas de polissacarídeos podem ser obtidas por diversos métodos, os quais incluem nanoprecipitação, formação de emulsão (com ou sem utilização de surfactantes), reticulação com agentes covalentes e iônicos, além de técnicas de polimerização e copolimerização (por emulsão, radical), complexação polieletrólítica, por auto-agregação, dentre outros (LIU *et al.*, 2009). A Tabela 3 apresenta nanopartículas de polímeros naturais recentemente estudadas para incorporação de fármacos juntamente com sua respectiva aplicação e via de administração.

Tabela 3 - Produção de nanopartículas à base de polissacarídeos naturais e sintéticos

Aplicação	Administração	Material	Método	Tamanho (nm)	Referência
Trato gastrointestinal	Oral	Enxoparina + QT	CPE	200-500	SUN <i>et al.</i> , 2008
Trato gastrointestinal	Oral	Insulina + QT	CPE/ autoformação	104-443	JINTAPATTANAKIT <i>et al.</i> , 2007
Câncer	Intravenosa	Paquimana carboximetilada	Polimerização por enxertia	93-158	HU <i>et al.</i> , 2008
Trato gastrointestinal	Oral	QT + goma arábica + insulina	Geleificação ionotópica	150-200	AVADI <i>et al.</i> , 2010
Câncer	-	Colesterol + QT + BSA	Autoformação	338-472	WANG <i>et al.</i> , 2007
Trato gastrointestinal	Oral	QT + Colesterol	Autoformação	102-238	CHEN <i>et al.</i> , 2011

Trato gastrointestinal	Oral	Alginato + SD + QT	CPE	394-588	WOITISKI <i>et al.</i> , 2009
Contraste	Intravenosa	QT-Gd-DTPA + SD	CPE	350	HUANG <i>et al.</i> , 2008
Oftálmico	Ocular	Goma cordia + PVA	Emulsão	315-394	YADAVA; AHUJA, 2010
Contraste	Intravenosa	Óxido de Ferro	Coprecipitação	207-289	THOREK; TSOURKAS, 2008
Intestino	Oral	Alginato + QT	Geleificação ionotrópica	200	GEORGE; ABRAHAM, 2006
Trato gastrointestinal	Oral	Alginato + QT + insulina	Geleificação ionotrópica / CPE com QT	750	SARMENTO <i>et al.</i> , 2007 ^a
Trato gastrointestinal	Oral	TMC + insulina	Autoformação	100-200	YIN <i>et al.</i> , 2009
Pulmão	Intravenosa	QT + ácido hialurônico	Geleificação ionotrópica e PEC	173-233	AL-QADI <i>et al.</i> , 2011
Câncer	-	Ácido deoxicólico + curdiana carboximetilada	Autoformação	192-347	GAO <i>et al.</i> , 2008
Câncer	-	Dextrana	Autoformação	90-520	HORNING; HEINZE, 2007
Câncer	-	QT carboximetilada + ácido linoleico	Autoformação	417	TAN; LIU, 2009
Trato gastrointestinal	Oral	Alginato + QT +insulina	Geleificação ionotrópica/ CPE	850	SARMENTO <i>et al.</i> , 2007b
Câncer	Oral	Alginato + QT	CPE	766	CHEN <i>et al.</i> , 2009

Trato gastrointestinal	Oral	SD + QT + insulina	CPE	500	SARMENTO <i>et al.</i> , 2007c
Pele	Tópico	QT + CMC	CPE	169-652	CUI; MUMPER, 2001
Trato gastrointestinal	Oral	Goma Kondagogu + QT + SD	CPE	152-175	NAIDU <i>et al.</i> , 2009
Fígado	-	TPP + QT + SD	Reticulação iônica	100-250	GAN <i>et al.</i> , 2007
Trato gastrointestinal	Oral	Vitamina E + succinato de octanila	Emulsão	100	CHEN; WAGNER, 2004
Câncer de mama	Intravenosa	PLGA + docetaxel	Emulsão	200	YAN <i>et al.</i> , 2010
Trato gastrointestinal	Oral	TEC + insulina	CPE	185	BAYAT <i>et al.</i> , 2008
		DMEC + insulina		180	
		QT + insulina		267	
Pele	Tópico	Sílica + cafeína	Emulsão	100-200	FRELICHOWSKA <i>et al.</i> , 2009
Olhos	Tópico	Flubiprofen Eudragir® RS	Emulsão por difusão de solvente	14-96	PIGNATELLO <i>et al.</i> , 2002
Pulmão	Intravenosa	DNA + PLGA	Troca de solvente	207-231	BIVAS-BENITA <i>et al.</i> , 2004
Câncer	Intravenosa	Tamoxifen + PCL	Troca de solvente	200-300	KHOEE <i>et al.</i> , 2009
Trato gastrointestinal	Oral	QT + dextrana	Polimerização por enxertia	14-50	CHAYED; WINNIK, 2007

Olhos	Tópico	PA + Pluronic F68	Emulsão	460	IBRAHIM <i>et al.</i> , 2009
-------	--------	-------------------	---------	-----	---------------------------------

BSA - Albumina sérica bovina

CMC - Carboximetil celulose

CPE - Complexo polieletrólítico

DMEC - Dimetil-etilquitosana

Eudragit - poli(ε-caprolactona) e poli(ácido acrílico)

Gd-DTPA - Gd-ác. acético dietilenopentatriamino

PA - Acetato de prednisolone

PAA - Poli(ácido acrílico)

PCL - poli(ε-caprolactona)

PLGA - D,L – ácido lático – co – ácido glicólico

PVA – Poli Vinil Álcool

QT - Quitosana

SD - Sulfato de dextrana

TEC - Trietil quitosana

TMC - Trimetil quitosana

TPP - Tripolifosfato

Fonte: Adaptado de OLIVEIRA, 2010.

A utilização de nanopartículas para sistemas de liberação controlada abrange um amplo leque de possibilidades. A aplicação de nanopartículas ao transporte de fármacos através de barreira hemato-encefálica é bastante promissora, pois essa barreira representa um obstáculo para muitos fármacos, incluindo antimicrobianos, fármacos anticancerígenos e neuropeptídeos (KREUTER, 2007). O primeiro produto comercial apareceu no mercado em 2005 sob o nome de Abraxane[®], e o mesmo consiste em nanopartículas à base de albumina contendo paclitaxel como fármaco. Esses sistemas poliméricos têm sido propostos como vetores de fármacos no sentido de modificar a sua farmacocinética, incluindo alteração no seu perfil tissular, podendo ainda aumentar a biodisponibilidade de muitas substâncias ativas (KINGSLEY; DOU; MOREHAD, 2006).

Os polissacarídeos de um modo geral podem ser apropriados para a obtenção de nanopartículas aplicáveis na área médica, principalmente em função de suas propriedades físico-químicas, baixo custo, disponibilidade e características biodegradáveis. Uma das principais vantagens da utilização de polissacarídeos como componentes para a síntese de nanopartículas é o seu reconhecimento molecular natural, uma vez que eles têm receptores específicos em certas células (LIU; JIAO; WANG, 2008).

Esses sistemas poliméricos têm atraído grande atenção dos pesquisadores devido às suas potencialidades terapêuticas (SOPPIMATH; AMINABHAVI; KULKARNI, 2001), tais como: (1) manutenção do nível terapêutico do fármaco no sangue; (2) controle otimizado da concentração plasmática terapêutica de fármacos; (3) melhor tratamento de muitas doenças crônicas nas quais ocorre um desencadeamento de sintomas se a concentração plasmática de fármaco cai abaixo da concentração mínima eficaz; (4) manutenção da ação terapêutica de um

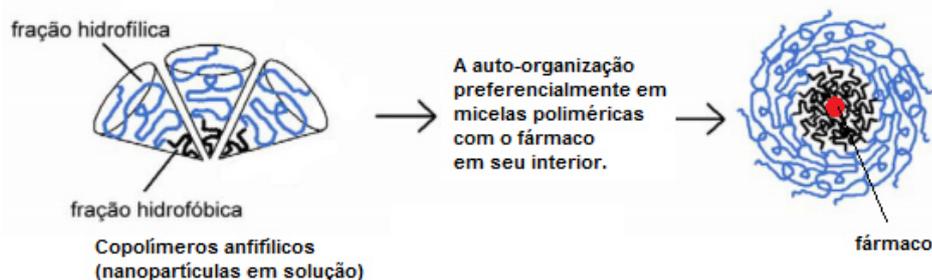
fármaco durante os períodos noturnos sem administração. (5) diminuição das reações adversas; (6) melhora do esquema posológico através da diminuição do número de doses, levando a uma maior aceitação e colaboração do paciente (LANGER; TIRREL, 2004).

1.3.1 Formação de nanopartículas por auto-organização

A anfifilicidade é um parâmetro importante para a autoestruturação em meio aquoso. Copolímeros anfifílicos são constituídos de segmentos hidrofílicos e hidrofóbicos, sendo materiais capazes de automontagem e de associações poliméricas em soluções aquosas. As nanopartículas autoestruturadas são compostas de interior hidrofóbico e cobertura hidrofílica. O interior dessa estrutura pode conter agentes bioativos hidrofóbicos. Características predominantes desses sistemas têm sido reportadas como redução do efeito tóxico de agentes antineoplásicos, solubilização de fármacos hidrofóbicos, longo tempo de circulação e menor interação com o sistema imune. O processo é realizado por diálise e ocorre de maneira espontânea aonde as moléculas vão sofrendo agregação até atingirem o equilíbrio mantendo o tamanho e formas desejadas (HORNIG; HEINZE, 2007). Entretanto, inicialmente o polissacarídeo deve passar por um processo de modificação química.

A literatura tem reportado muitos trabalhos importantes com a introdução de grupos hidrofóbicos em polissacarídeos. Zhang *et al.* (2009) obtiveram nanopartículas de acetato de pululana com epirrubicina, apresentando o tamanho de 185,7 a 423 nm e distribuição unimodal, com potencial para serem utilizadas no tratamento com antineoplásicos. Chen *et al.* (2011) prepararam nanopartículas através de quitosana modificada hidrofobicamente apresentando tamanho de 102-238 nm e distribuição unimodal, com perfil para serem usadas no tratamento oftalmológico. Moura (2009) preparou nanopartículas a base de goma do cajueiro enxertada com acrilamida obtendo tamanhos menores, na faixa de 20-40 nm e 50-140 nm para nanopartículas de goma do cajueiro enxertadas com acetato. Além disso, observou-se que modificando as condições da síntese do polímero e da preparação das nanopartículas, é possível controlar a cinética de liberação de fármaco (SANTANDER-ORTEGA *et al.*, 2010).

Figura 8 – Formação de nanopartículas por auto-organização



Fonte: Adaptado de CHEN *et al.*, 2011.

1.4 Matrizes para liberação controlada de fármacos

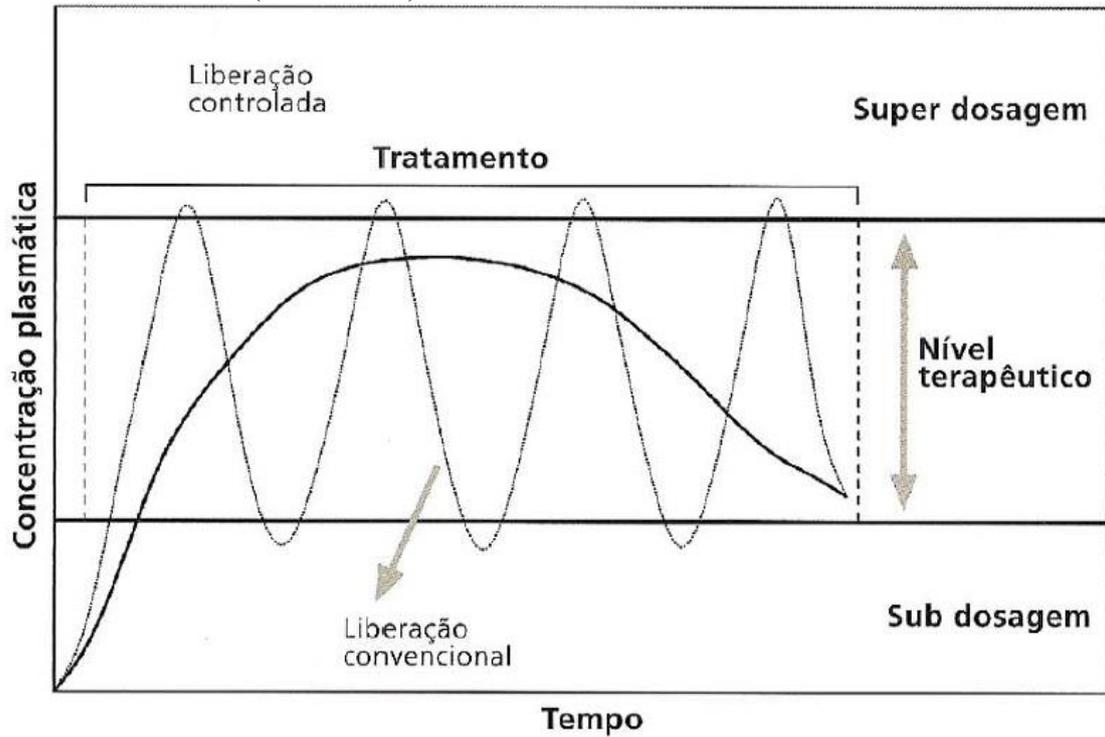
O principal objetivo terapêutico de muitos fármacos consiste em atingir concentrações plasmáticas ou níveis de concentrações adequados nos tecidos, que sejam efetivos e não tóxicos, por um período prolongado. A concepção de regimes terapêuticos apropriados constitui um fator fundamental para atingir esse objetivo. Uma meta importante na concepção de fórmulas farmacêuticas consiste em aperfeiçoar a administração do medicamento, de modo a conseguir uma forma farmacêutica para controlar o efeito do fármaco. Nesse sentido, os sistemas de liberação controlada se destacam, atingindo um efeito terapêutico prolongado (KINGSLEY; DOU; MOREHAD, 2006).

Pesquisas têm sido dedicadas ao desenvolvimento de tecnologias para sistemas de liberação controlada. Espécies coloidais como lipossomas, micro e nanopartículas têm sido extensivamente estudadas para esse sistema que, em geral, pode ser utilizado para melhorar a biodisponibilidade, manter o efeito do fármaco no tecido alvo, solubilizar fármacos, melhorar a estabilidade física e química de agentes terapêuticos, minimizar os efeitos colaterais e reduzir a toxicidade (PANYAM *et al.*, 2003a. YAMASHITA *et al.*, 2011).

No sistema de liberação controlada, o princípio ativo é encapsulado em uma matriz que deve apresentar as seguintes características: permitir a modelagem para a forma desejada e a liberação da substância ativa, ter estabilidade adequada e ser atóxica (PANYAM; LABHASETWAR, 2003b). Através deste sistema é possível manter a concentração do fármaco no plasma na faixa terapêutica por um tempo prolongado, utilizando-se de um menor número de doses. Isto é uma vantagem em relação às formas convencionais de administrações (spray, injeção, pílulas) nas quais, a concentração de fármaco na corrente sanguínea aumenta, atinge um pico máximo e então declina. Uma vez que cada fármaco possui uma faixa de ação terapêutica acima da qual é tóxica e abaixo da qual é ineficaz, os níveis plasmáticos são

dependentes das dosagens administradas, fato que pode ser problemático se a dose efetiva do fármaco estiver próxima da dose tóxica (Figura 9), (ELZOGHBHY; SAMY; ELGINDY, 2011. QURRAT-UL-AIN *et al.*, 2003; PICOS *et al.*, 2000).

Figura 9 – Concentração plasmática efetiva de fármacos em função do tempo em: sistemas convencionais (curva preta) e sistemas de liberação sustentada (curva cinza).



Fonte: (NANOTECNOLOGIA..., 2012).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Sintetizar e caracterizar nanopartículas de goma do cajueiro modificada hidrofobicamente para aplicação como matrizes para liberação de fármacos.

2.1 Objetivos específicos

- a) Esterificar a goma do cajueiro com anidrido propiônico;
- b) Modificar a goma do cajueiro com colesterol via esterificação de Steglich em diferentes proporções de reagentes;
- c) Caracterizar os derivados hidrofóbicos obtidos por meio de análise elementar, espectroscopia de absorção na região do infravermelho, ressonância magnética nuclear e análise termogravimétrica;
- d) Caracterizar as nanopartículas através de tamanho de partícula, potencial Zeta e determinação da concentração de agregação crítica por fluorescência;
- e) Verificar o efeito de fatores como: razão piridina/anidrido, tempo de estabilidade e pH sobre no tamanho das nanopartículas e o potencial Zeta;
- f) Avaliar o grau de incorporação e liberação de indometacina nas nanopartículas obtidas.

3 METODOLOGIA

3.1 Materiais

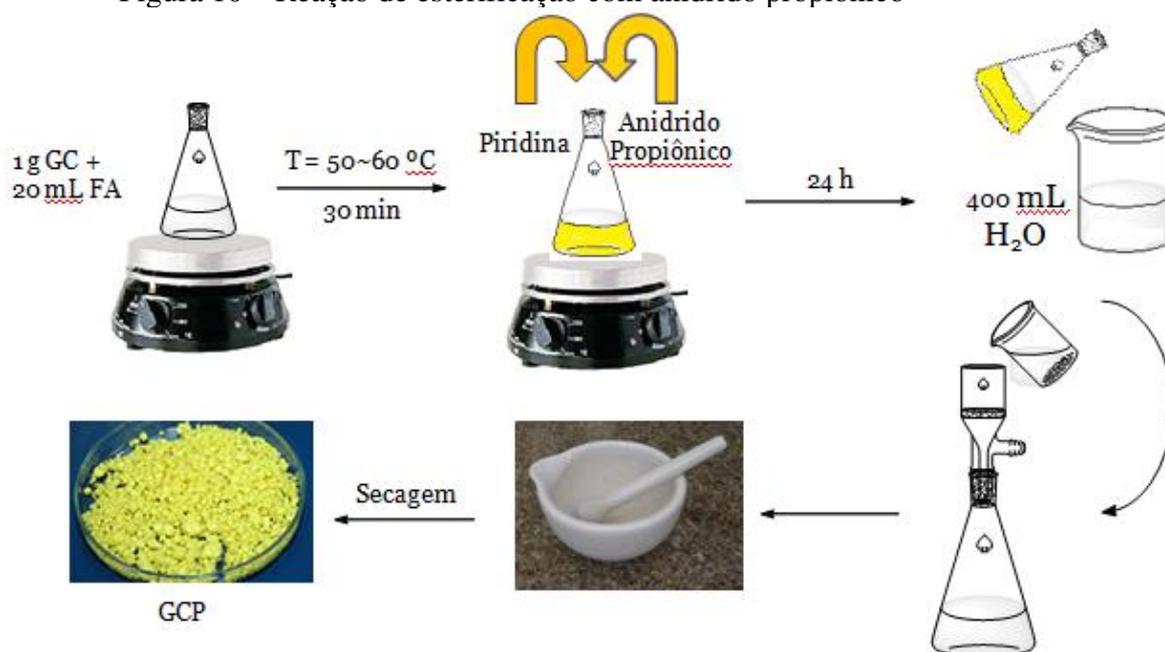
O exsudato bruto do cajueiro (*Anacardium occidentale*) foi fornecido pela EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), Ceará, em 2004. A goma do cajueiro (GC) foi obtida purificando o exsudato pelo método descrito por Rodrigues, de Paula e Costa (1993). Os espectros de infravermelho e ressonância magnética nuclear de ^{13}C para a GC apresentaram valores similares aos obtidos por de Paula e Rodrigues (1995) e massa molar estimada em $2,32 \times 10^4$ g/mol por cromatografia de permeação em gel. Formamida (FA) e dimetilformamida (DMF) foram previamente secas em peneira molecular e destiladas a vácuo. Ácido p-toluenosulfônico (pTSA) foi seco em estufa a vácuo a 90 °C por 24 horas. Piridina, anidrido propiônico, dicitclohexilcarbodiimida (DCC), 4,-*N,N'*-dimetilaminopiridina (DMAP) e colesterol foram usados sem tratamento prévio. Todos os reagentes foram oriundos da Sigma-Aldrich.

3.2 Modificação da goma do cajueiro

3.2.1 Reação de esterificação com anidrido propiônico

A hidrofobização da goma de cajueiro foi conduzida segundo o método de Motozato *et al.* (1986) com adaptações de Moura (2009) (Figura 10). 1 g de GC foi suspensa em 20 mL de formamida sob agitação à 50°C por 1h. Em seguida, piridina e anidrido propiônico foram adicionados em variadas proporções para cada síntese (Tabela 3). A mistura foi mantida sob agitação à 50 °C durante 24 h. Ao final deste período a goma hidrofobizada com anidrido propiônico (GCP) foi precipitada pela adição de 400 mL de água destilada e seca por jato de ar quente e estufa. As amostras foram nomeadas em ordem crescente de razão molar de piridina:anidrido em relação a goma do cajueiro como mostra a Tabela 4.

Figura 10 – Reação de esterificação com anidrido propiônico



Fonte: Adaptado de MOTOZATO *et al.*, 1986 e MOURA, 2009.

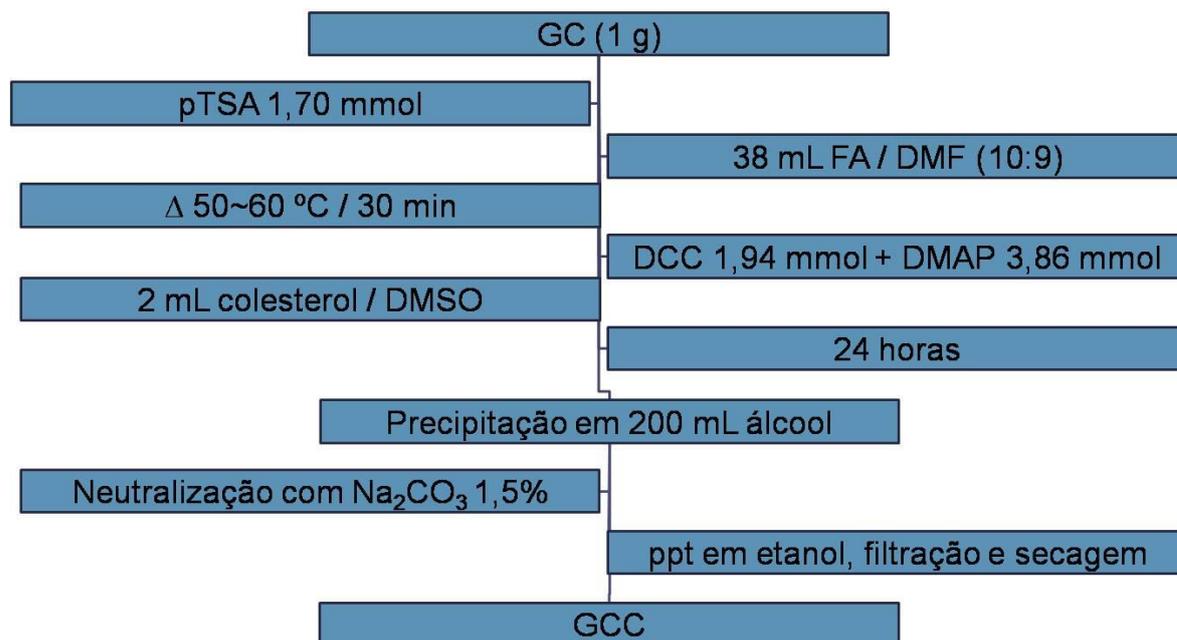
Tabela 4 – Razões molares utilizadas na produção de GCP em relação a 1 mol de GC

Amostras	Piridina:Anidrido
GCP-A	1,5:6
GCP-B	3:12
GCP-C	6:12
GCP-D	12:24
GCP-E	18:24

3.2.2 Enxertia do colesterol na goma do cajueiro por esterificação de Steglich

A enxertia do polissacarídeo foi realizada seguindo metodologia de Yang *et al.* (2008b) com algumas modificações (Diagrama 1). pTSA seco (0,324 g, 1,70 mmol) foi adicionado à suspensão de goma do cajueiro (1,00 g, 5,05 mmol de resíduos de hexoses) em 38 mL de FA/DMF (10/9, v/v). A goma do cajueiro foi parcialmente protonada por aquecimento a 50-60 °C por 30 minutos na suspensão. Em seguida, foram adicionados DCC (0,400 g, 1,94 mmol), DMAP (0,475 g, 3,89 mmol) e 2 mL de solução de clorofórmio contendo colesterol (0,66 g, 1,70 mmol). A reação procedeu por 24 h. O produto foi purificado com a adição de 200 mL de etanol e o precipitado foi seco a vácuo em funil de placa sinterizada. O produto sólido obtido foi dissolvido em DMSO e neutralizado com solução 1,5% de Na₂CO₃. A solução foi dialisada contra água destilada durante 3 dias com uma troca de água por dia e liofilizada. A proporção molar de colesterol:DCC:DMAP para 1 g de goma do cajueiro foi de 1:1:0,5 e 1:0,5:0,25 respectivamente para os derivados GCC1 e GCC2.

Diagrama 1 – Enxertia do colesterol na goma do cajueiro



Fonte: Adaptado de YANG *et al.*, 2008b.

3.3 Preparação das nanopartículas autoestruturadas

A amostra de GC foi dissolvida em água e as de GCP e GCC em DMSO, nas concentrações de 0,1; 0,05 e 0,01% e dialisadas contra água destilada por 3 dias. A água de diálise foi trocada uma vez ao dia. Utilizou-se espectroscopia de absorção molecular na região do UV para monitorar a concentração de DMSO durante as trocas de água da diálise e verificar que ao final dos 3 dias todo o DMSO havia sido trocado por água.

3.4 Caracterização dos produtos obtidos

3.4.1 Infravermelho

Os espectros de infravermelho por transformada de Fourier foram obtidos em pastilhas de KBr no espectrofotômetro modelo 8300 da Shimadzu entre 400 e 4000 cm^{-1} .

3.4.2 Análise elementar

A análise dos teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio das amostras foram realizadas em um Analisador Elementar Perkin-Elmer CHN 2400 da Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

3.4.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H em D_2O da goma de cajueiro e dos derivados hidrofobizados foram obtidos em equipamento Bruker Modelo Avance DRX500, com controle de temperatura, a 70 °C e padrão interno ácido 2,2-dimetilsilapentano-5-sulfônico (DSS).

3.4.4 Análise termogravimétrica

O comportamento térmico das amostras foi analisado no equipamento Shimadzu TGA 50H em atmosfera de ar sintético, utilizando 10 mg de amostra com fluxo de 50 mL/min com taxa de aquecimento de 10 °C/min em célula de platina entre 25 a 800 °C.

3.4.5 Concentração de associação crítica (CAC) por fluorescência

CAC é a concentração máxima em que a solução ainda forma agregados. A determinação da CAC por fluorescência foi realizada baseada no procedimento proposto por Patrizi *et al.* (2009).

Uma solução aquosa estoque de pireno (5×10^{-7} mol/L), usada para as medidas, foi preparada pela adição de 50 μL de uma solução 5×10^{-4} M de pireno em acetona em um balão

volumétrico de 50 mL. Acetona foi evaporada sob fluxo de nitrogênio e o volume foi completado com água mili-q. Soluções nas concentrações de 10^{-4} a 1,3 mg/mL dos polissacarídeos foram preparadas com solução aquosa de pireno de 5×10^{-7} mol/L. As soluções foram mantidas à 25 °C. As medidas foram realizadas em triplicata. Os espectros de fluorescência foram obtidos usando espectômetro Hitachi f-4500, equipado com um banho termostaticado Cole Parmer Polystat atrelado ao compartimento da célula. O espectro de emissão da fluorescência (350-400 nm) do pireno foi medido usando um comprimento de onda de excitação em $\lambda_{ex} = 334$ nm. A razão de intensidades (I_1/I_3), da primeira I_1 sobre a terceira I_3 banda vibrônica do pireno, em 373 e 384 nm, respectivamente, foi usada para detectar a formação de microdomínios hidrofóbicos. O espectro de excitação (310-360 nm) foi medido usando um comprimento de onda de emissão em $\lambda_{em} = 374$ nm. A razão de intensidades (I_{338}/I_{334}) foi usada para determinar a concentração de associação crítica (CAC). A largura da fenda utilizada para todas as medidas foi de 1 mm.

3.4.6 Tamanho da partícula e potencial Zeta

Os diâmetros hidrodinâmicos, os perfis de distribuição de tamanhos e os potenciais Zeta das soluções foram analisadas em um Zeta Sizer modelo Malvern 3600 com feixe de luz vermelha, comprimento de onda de 633 nm e ângulo de espalhamento de 173°. O tamanho de partícula em suspensão coloidal foi monitorado em intervalos de tempo pré-determinados. As medidas das amostras foram realizadas em triplicatas.

3.4.7 Ensaio de incorporação e perfil de liberação de indometacina in vitro

Foi realizada a incorporação da indometacina (solução 10 % m/m) às nanopartículas de GCC1, GCP1, GCP2 e GCP3 durante a etapa de diálise na formação das nanopartículas. Após a diálise, centrifugou-se por 2 h em 20.000 rpm e o precipitado foi redisperso em água deionizada sob agitação, e em seguida liofilizado, obtendo-se as nanopartículas com indometacina incorporada. Para determinar o teor de indometacina incorporada pelas matrizes, dissolveu-se completamente 5 mg de cada matriz em DMSO e analisou-se por UV-Vis, em triplicata, comparando as absorvâncias em $\lambda = 321$ nm com a curva de calibração de indometacina neste solvente.

A liberação de indometacina foi acompanhada por espectroscopia de absorção na região do UV-Vis, onde 50 mg da amostra foi colocada em uma membrana de diálise SIGMA

(tamanho do poro: 14 kDa) em triplicatas e imersas em 150 mL de tampão fosfato pH 7,4, e, mantendo a temperatura controlada em 37 °C sob agitação constante. Alíquotas foram retiradas e analisadas por espectroscopia na região do UV-Vis. Foram calculados os parâmetros cinéticos a fim de caracterizar os vários tipos de liberação. Utilizou-se o modelo de Korsmeyer-Peppas (Equação 1) (DASH *et al.*, 2010).

$$M_t/M_\infty = Kt^n \quad (\text{Equação 1})$$

Onde M_t/M_∞ é a fração de fármaco liberada em um tempo t , K é uma constante e n o expoente de liberação.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Goma do cajueiro esterificada com anidrido propiônico

4.1.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Os espectros da goma do cajueiro e dos produtos esterificados com anidrido propiônico (GCP), são mostrados (Figura 11). O espectro da goma apresenta banda larga em 3400 e banda em 2900 cm^{-1} atribuídas às vibrações de estiramento O-H e C-H, respectivamente. A absorção em 1649 cm^{-1} é devida a vibração de O-H de moléculas de água da umidade do polissacarídeo (BUENO, 1990). As bandas em 1150, 1080 e 1030 cm^{-1} são referentes ao estiramento de C-O-C e deformação dos grupos O-H das unidades glicosídicas.

Nos espectros dos derivados hidrofóbicos de GCP é observado o aparecimento de uma nova banda em 1750 cm^{-1} atribuída a vibração de estiramento da ligação C=O de éster não-conjugado. Também é observada a diminuição da absorbância em 3500 cm^{-1} de O-H em relação à absorbância de 2900 e 1150 cm^{-1} de C-H do anel glicosídico, indicando a substituição das hidroxilas do anel por ésteres (Figura 12).

Pode-se perceber a tendência no aumento da absorbância da banda em 1150 cm^{-1} (C-O) em relação à banda de 1080 cm^{-1} (C-O-C do anel glicosídico) desde a amostra de GCP-A até a GCP-E. Indicando que quanto maior a quantidade de reagente (piridina e anidrido propiônico) utilizado para a mesma quantidade de GC, maior será o aumento relativo da banda em 1080 cm^{-1} , conseqüentemente, maior o grau de substituição das hidroxilas por propanoatos.

Figura 11 – Espectros de infravermelho de GC e seus derivados esterificados com anidrido propiônico GCP-A, GCP-B, GCP-C, GCP-D e GCP-E

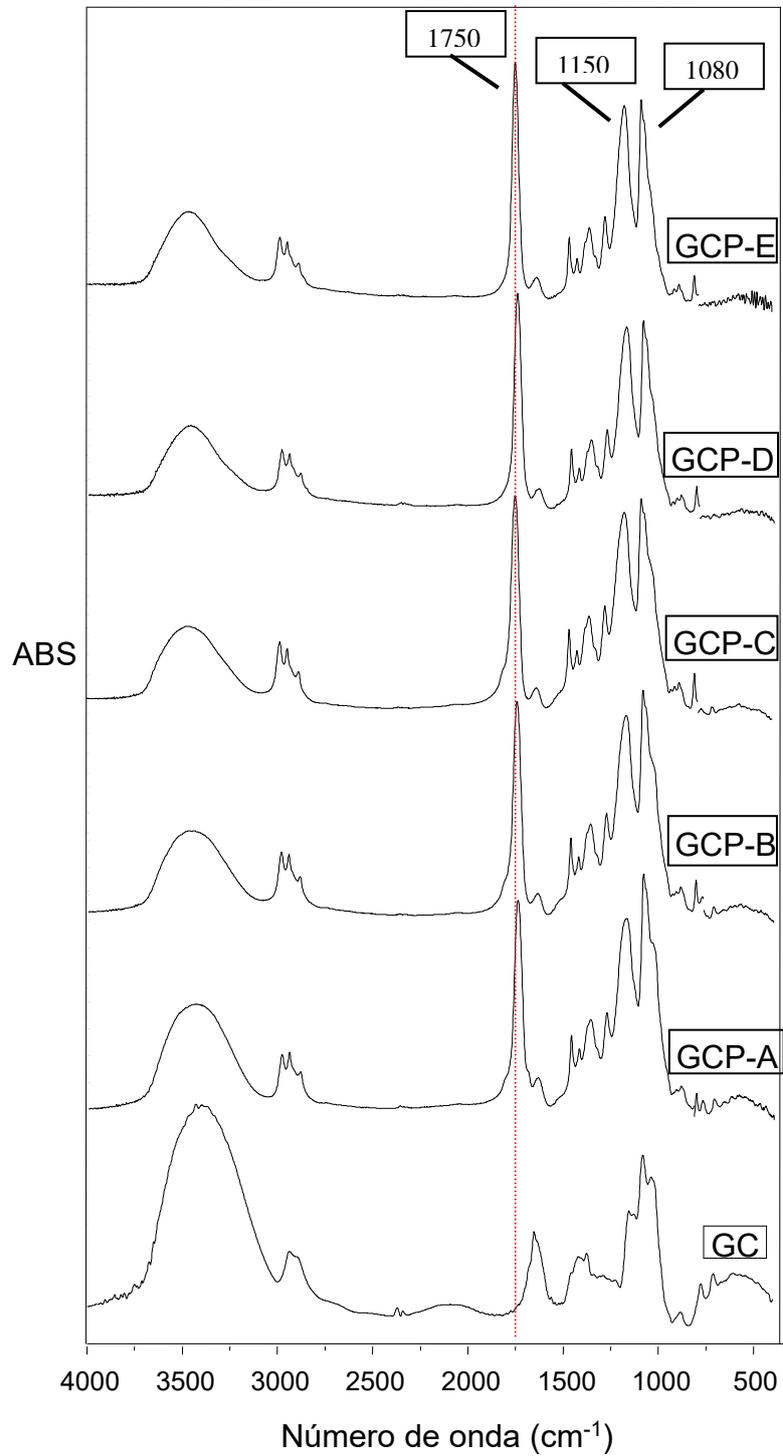
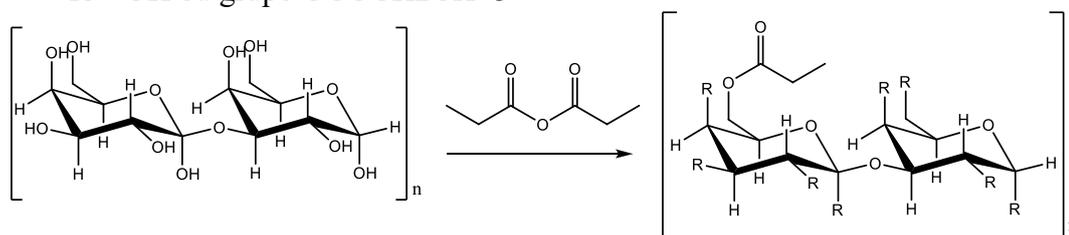


Figura 12 – Reação de esterificação da goma do cajueiro (representada pela cadeia principal de galactoses ligadas 1→3) com anidrido propiônico. R = OH ou grupo OCOCH₂CH₃



Entretanto, não deveria haver aumento significativo para os sistemas que utilizam a mesma quantidade de piridina, pois, segundo mecanismo apresentado na Figura 4, a piridina atua como catalisador da reação, tornando o carbono da carbonila do anidrido mais eletrofílico. Para verificar se houve variação significativa entre as modificações, utilizou-se a análise estatística do valor-p. Inicialmente fez-se uma hipótese (H_0) e depois se aplicou o teste para saber se esta hipótese é verdadeira ou falsa a um determinado nível de confiança.

Tabela 5 – Relação entre as alturas das bandas em 1150 e 1080 cm^{-1} para as amostras de GC, GCP-A, GCP-B, GCP-C, GCP-D e GCP-E

Amostras	$h_{1150\text{cm}^{-1}}/h_{1080\text{cm}^{-1}}$
GC	0,49
GCP-A	0,58
GCP-B	0,63
GCP-C	0,65
GCP-D	0,71
GCP-E	0,73

Como os pares de reações [GCP-B e GCP-C] e [GCP-D e GCP-E] utilizam entre si diferentes quantidades de piridina, mas a mesma quantidade de anidrido acético (Tabela 4), teoricamente não deveria haver diferença de rendimento nas reações de substituição. Com base nos dados acima, fez-se a hipótese (H_0) de que não há diferença entre as alturas relativas dos pares mencionados a um nível de confiança de $\alpha = 95\%$. O resultado do teste é que $P < 0,05$ em ambos os casos. Portanto, a hipótese (H_0) é verdadeira e pode-se concluir que GCP-B = GCP-C e GCP-D = GCP-E a um nível de confiança de 95%. A partir de então, trabalhou-se apenas com as amostras que apresentaram diferenças significativas nas reações, seguindo a denominação para os derivados (Tabela 6):

Tabela 6 – Denominação para os derivados de GCP

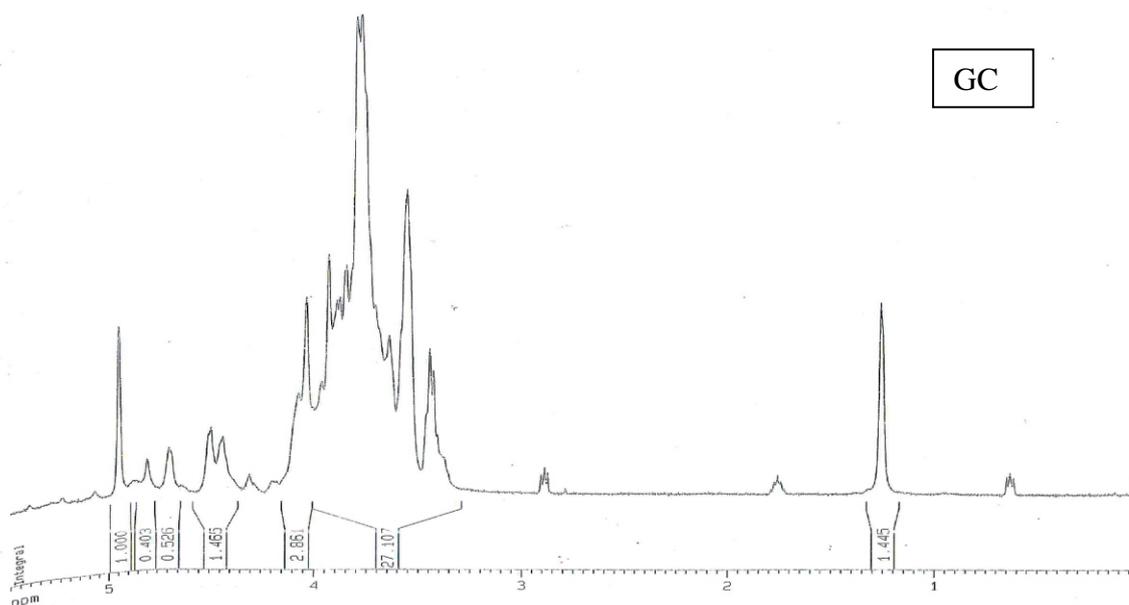
Antiga nomenclatura	GCP-A	GCP-C	GCP-E
Nova nomenclatura	GCP1	GCP2	GCP3

4.1.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Com a finalidade de verificar a modificação estrutural dos derivados esterificados da goma do cajueiro fez-se o espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H de amostras de GC e dos derivados esterificados.

A Figura 13 mostra o espectro de RMN ^1H para a GC em D_2O . Nesse espectro os sinais em δ 4,69 e δ 4,43 são atribuídos a H-1 da galactose (1 \rightarrow 3) por correlação no espectro de bi-dimensional $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC com sinais de carbono atribuídos segundo Moura Neto *et al.* (2011). Os sinais de anoméricos da glucose e ramnose foram observados em δ 4,95 e δ 4,81, respectivamente. Nas Figuras 13 a 16, observa-se que os derivados enxertados com propanoato também apresentam os picos supracitados, sem grandes diferenças de intensidade relativa dos sinais das unidades de galactose (1 \rightarrow 3), o que mostra que a cadeia principal não sofre degradação com a esterificação, como era de se esperar.

Figura 13 – Espectro de RMN ^1H de GC em D_2O



As amostras de GCP tiveram que ser analisadas por RMN ^1H em CDCl_3 ao invés de D_2O para obter-se uma boa resolução dos espectros, mostrando o caráter hidrofóbico do polissacarídeo obtido. Os espectros das amostras de goma do cajueiro modificadas com anidrido propiônico (Figuras 14, 15 e 16) apresentaram picos característicos de hidrogênios de grupos metila em torno de δ 1,0 ppm. O grupo metila, ausente na GC, encontra-se nas amostras

de GCP na extremidade do propanoato enxertado na esterificação. A presença desse sinal torna clara a modificação da goma com o propanoato.

Pode-se fazer uma estimativa do grau de substituição (GS), obtido para cada condição reacional, tomando-se a soma da área do pico referente aos hidrogênios do propanoato enxertado em torno de δ 1,0 ppm, e dividindo-se pela soma das áreas dos hidrogênios anoméricos, de δ 4,4 – 5,0 ppm.

Figura 14 – Espectro de RMN ^1H de GCP1 em CDCl_3

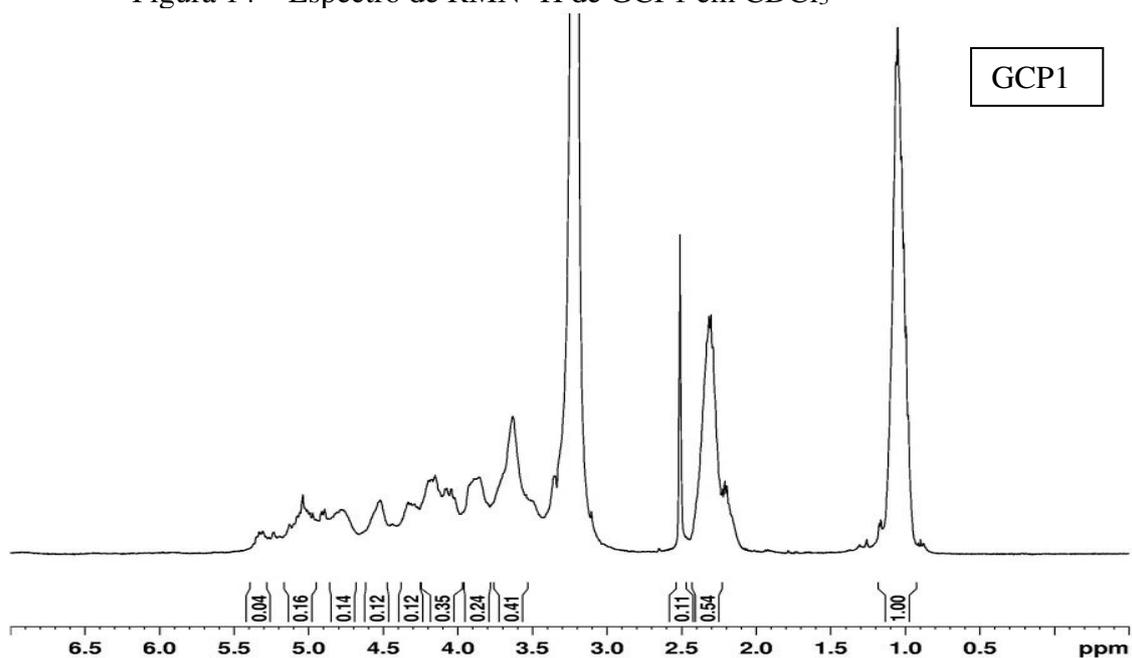


Figura 15 – Espectro de RMN ^1H de GCP2 em CDCl_3

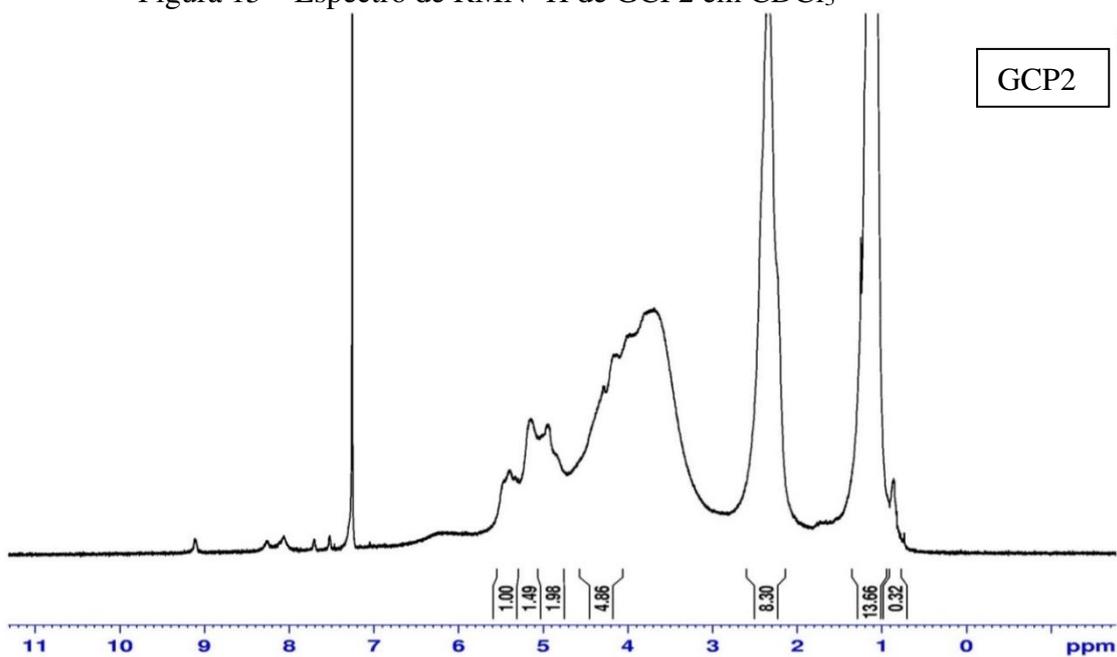
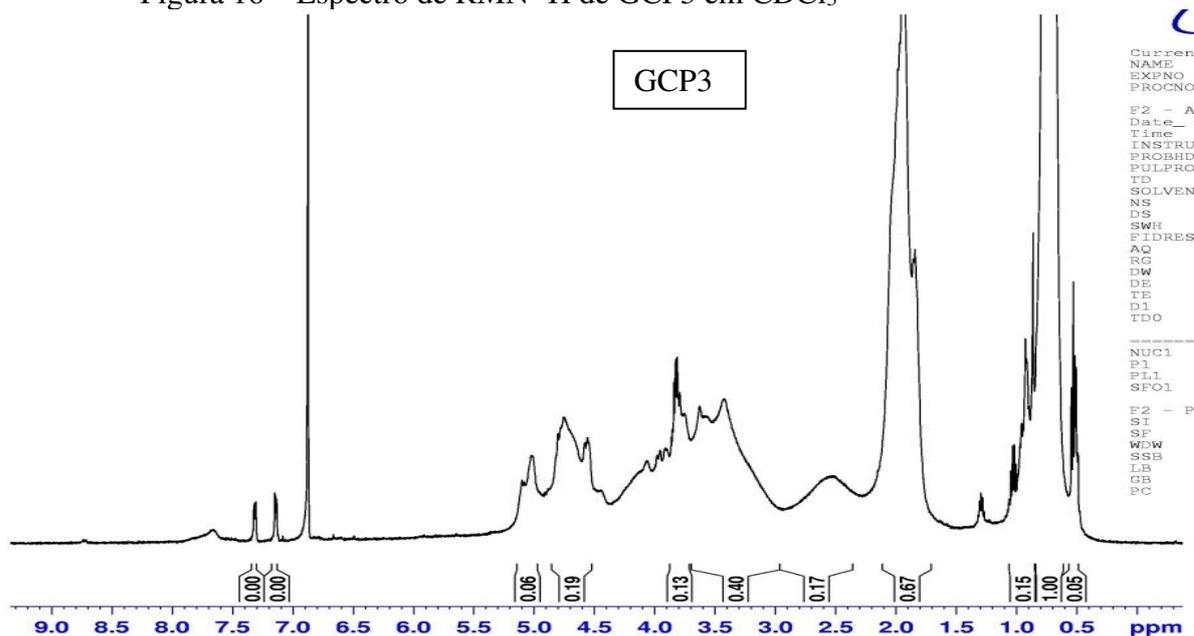


Figura 16 – Espectro de RMN ^1H de GCP3 em CDCl_3 

Cálculo para estimativa dos GS:

Para a GCP1 têm-se que a área do pico em torno de δ 1,0 ppm = 1,0, e a soma das áreas dos hidrogênios referentes aos carbonos anoméricos é 0,42. Logo:

$$GS = \frac{1,0/3 \text{ hidrogênios}}{0,42} \rightarrow GS (GCP1) = 0,79 \quad (\text{Equação 2})$$

Seguindo o mesmo raciocínio para GCP2 tem-se que a soma das áreas dos hidrogênios anoméricos é igual a 4,47, logo:

$$GS = \frac{13,66/3 \text{ hidrogênios}}{4,47} \rightarrow GS(GCP2) = 1,02 \quad (\text{Equação 3})$$

E para GCP3, tem-se que os hidrogênios anoméricos somam 0,25:

$$GS = \frac{1,0/3 \text{ hidrogênios}}{0,25} \rightarrow GS = 1,33 \quad (\text{Equação 4})$$

Logo, percebe-se que há uma tendência a um aumento gradativo no GS conforme aumenta-se a proporção de anidrido em relação à goma do cajueiro.

4.1.3 Análise termogravimétrica (TGA)

A Figura 17 mostra as curvas obtidas por TGA em atmosfera de ar sintético nas amostras de goma do cajueiro (GC) e seus derivados hidrofobizados (GCP1, GCP2 e GCP3). Os dados de perda de massa e as temperaturas de pico de cada evento térmico estão compilados na Tabela 7.

Observou-se três eventos de perda de massa para a amostra de GC. O primeiro evento, em $T_1 = 50$ °C, é atribuído à perda de água com 10% de perda de massa. Segundo Silva *et al.* (2009) a decomposição da cadeia glicosídica da GC ocorre em dois estágios. O primeiro (75% de perda) em $T_2 = 300$ °C e o segundo (14% de perda) em $T_3 = 415$ °C. Estes eventos de perda de massa são atribuídos à despolimerização e quebra do anel glicosídico com a formação de H_2O , CO e CH_4 (ZOHURIAAN; SHOKROLAHI, 2004). De 500 até 900 °C a GC apresentou 0,75% de resíduo. Este pequeno valor de massa pode ser atribuído a resquícios de minerais como NaCl remanescentes do processo de purificação da goma.

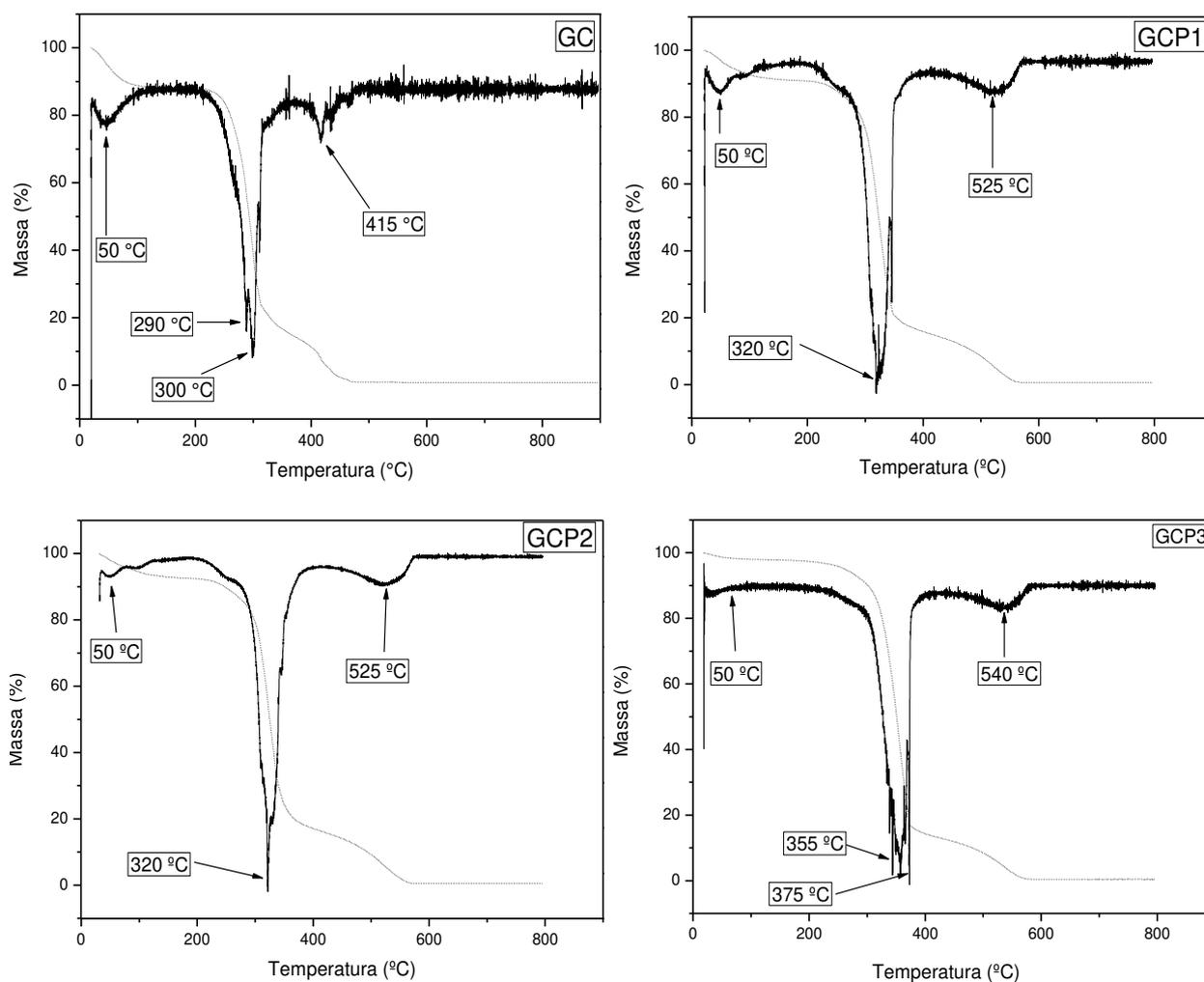
As curvas termogravimétricas dos derivados com anidrido propiônico apresentaram mudança em relação à GC no comportamento do evento de perda de água $T_1 = 50$ °C, com GCP1 (7% de perda), GCP2 (6% de perda) e GCP3 (2% de perda). Isto indica que o aumento na hidrofobicidade do polissacarídeo diminui a absorção de umidade do ambiente.

A análise do segundo evento de decomposição da estrutura dos polissacarídeos modificados (T_2) indica que para as amostras GCP1, GCP2 a temperatura de degradação é próxima à observada na GC, variando de 295 a 320 °C. E a perda de massa nessas amostras ficou entre 75 e 77%. Já para a amostra com maior grau de substituição, GCP3, observou-se este evento em maior temperatura, 355 °C e maior perda de massa, 85%. No último evento térmico de perda (T_3), observou-se o evento de degradação em maiores temperaturas, passando de 415 °C para 525 a 540 °C. Pode-se inferir que a substituição do grupo álcool do anel glicosídico pelo grupo propanoato gerada pela esterificação com anidrido propiônico aumenta a estabilidade térmica do polissacarídeo.

Tabela 7 – Eventos térmicos de análise termogravimétrica para as amostras de GC, GCP1, GCP2 e GCP3

Amostras	T1 (°C)	Perda de massa (%)	T2 (°C)	Perda de massa (%)	T3 (°C)	Perda de massa (%)	Resíduo (%)
GC	50	10	300	75	415	14	0,75
GCP1	50	7	320	77	525	15	0,60
GCP2	50	6	320	76	525	17	0,50
GCP3	50	2	355	85	540	13	0,40

Figura 17 – Curvas termogravimétricas de TGA e DTG de GC, GCP1, GCP2 e GCP3



4.1.4 Tamanho de partícula e potencial Zeta

A Figura 18 apresenta os perfis de distribuição de tamanho de partícula por volume hidrodinâmico. Os dados obtidos foram compilados na Tabela 8. Observa-se um aumento no tamanho das nanopartículas de GC para GCP devido à reação de hidrofobização. As curvas de distribuição de tamanho apresentaram perfis unimodais em todas as amostras na concentração de 0,01%. Obteve-se tamanhos na faixa de 65-68 nm, e estes não apresentaram nenhuma variação expressiva conforme o aumento da proporção do reagente anidrido em relação à goma. Porém, o perfil das curvas de distribuição de tamanho por volume tende a deslocar-se para a direita quanto menor a proporção de anidrido propiônico em relação à goma.

Figura 18 – Distribuição em volume dos tamanhos de partícula de soluções 0,01% de GCP1, GCP2 e GCP3

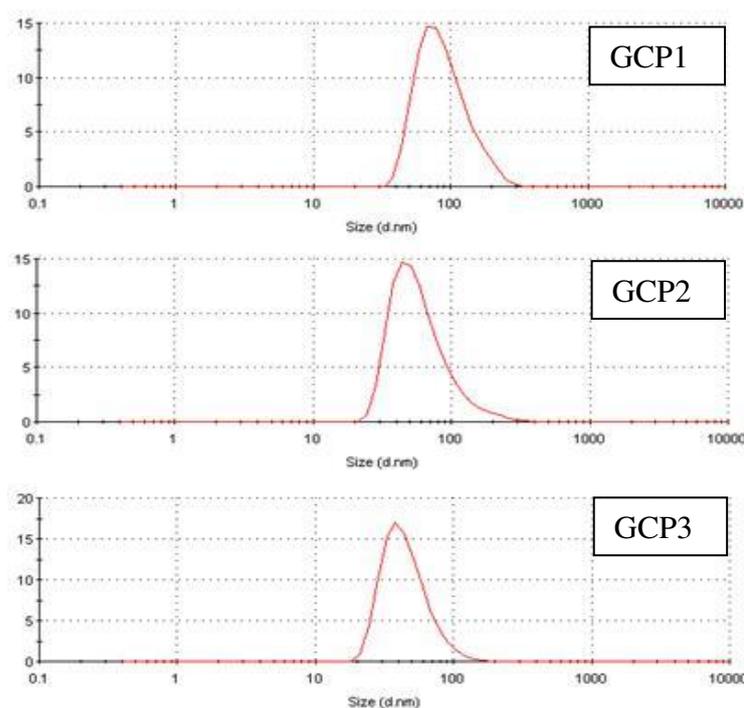


Tabela 8 – Tamanhos de partículas e potenciais Zeta para as amostras de GC e os derivados esterificados

Amostras	Tamanho de partícula (nm)	Potencial Zeta (mV)
GC	1,11 ± 0,4	-19 ± 1,6
GCP1	68,5 ± 6,8	-21 ± 1,3
GCP2	67,8 ± 11,2	-20 ± 1,2
GCP3	64,9 ± 10,8	-20 ± 2,0

Os valores de potencial Zeta das nanopartículas foram negativos, e não variaram significativamente em relação à amostra de GC não modificada.

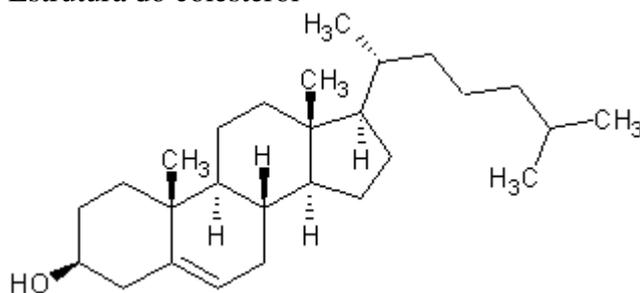
Os resultados do potencial Zeta mostram que as superfícies das nanopartículas de GCP têm carga superficial negativa, e isto é comum devido à natureza aniônica do polissacarídeo GC. Não foi observada nenhuma variação nos valores de potencial Zeta com o aumento da concentração da proporção de reagentes na esterificação com anidrido propiônico. Portanto, pode-se inferir que o grau de substituição para esta reação não influencia o valor da carga superficial das nanopartículas em solução.

4.2 Goma do cajueiro enxertada com colesterol

4.2.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

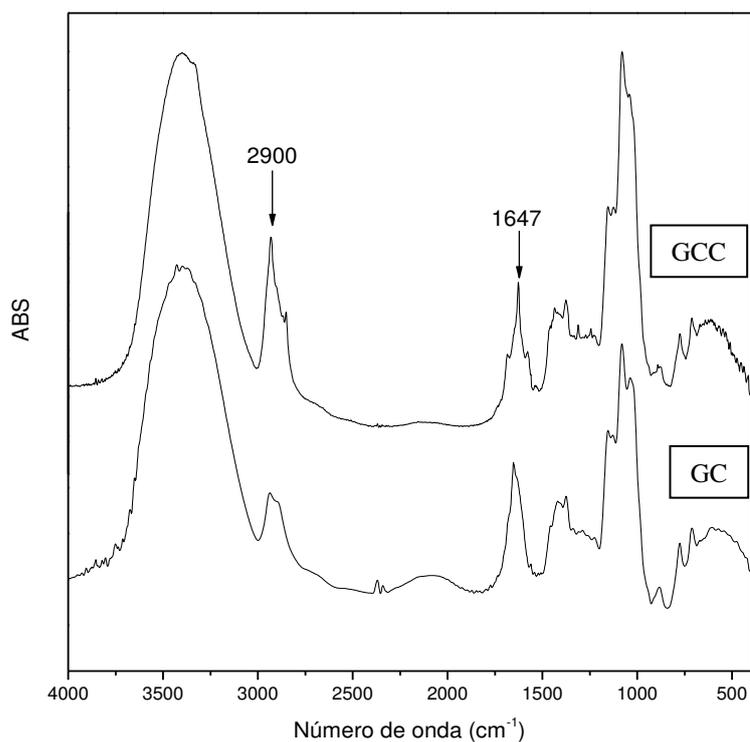
Na estrutura do colesterol predominam ligações simples C-C e C-H (Figura 19). A molécula possui apenas uma hidroxila e uma olefina trissubstituída ($\text{HRC}=\text{CR}_2$) que aparece no infravermelho em torno de 1670 cm^{-1} como uma banda de intensidade fraca. A absorção em 1647 cm^{-1} pode ser relacionada tanto para o estiramento da ligação C=O de ésteres e amidas (LI *et al.*, 2008). Ambas podem também ser atribuídas para a vibração da O-H da molécula de água (ZOHURIAAN; SHOKROLAHI, 2004). Portanto, não há nenhuma banda exclusiva característica do colesterol que seja ausente na goma do cajueiro para a identificação direta nos espectros. A literatura considera o aparecimento de novas bandas oriundas da formação do éster depois da reação de enxertia em alginato (YANG *et al.*, 2007) e quitosana modificada (CHEN *et al.*, 2011) e utiliza o valor de 1770 cm^{-1} . Porém essa é uma banda de intensidade muito fraca e há apenas uma ligação C=O de éster por molécula de colesterol enxertada, o que não contribui para a intensificação do sinal.

Figura 19 – Estrutura do colesterol



Entretanto, é possível observar no espectro obtido para o derivado GCC (Figura 20) que há um aumento significativo da banda de 2900 cm^{-1} em relação a banda de O-H em 3500 cm^{-1} , que indica um aumento no número de carbonos sp^3 hidrogenados na estrutura do produto, podendo-se atribuir esse aumento à enxertia do colesterol no polissacarídeo.

Figura 20 – Espectros de infravermelho de GC e seu derivado enxertado com colesterol GCC



4.2.2 Análise elementar

Os teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio, obtidos através da análise elementar para as amostras de GC e GCC, estão sumarizados na Tabela 9. Na composição monossacarídica da goma do cajueiro e de seus derivados não deveria haver a presença de nitrogênio (DE PAULA; HEATLEY; BUDD, 1998). Porém, a pequena quantidade de nitrogênio mensurada na análise a GC pode ser atribuída à traços de proteínas remanescentes do processo de isolamento e purificação da goma (NAYAK; SINGH, 2001). O maior teor de nitrogênio (porém ainda pequeno) encontrado nos derivados GCC pode ser atribuído a resquícios do reagente DCC, usado na esterificação de Steglich.

Tabela 9 – Teor de Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio das amostras de GC e GCC

Amostras	% Carbono	% Hidrogênio	% Nitrogênio
GC	38,4	6,58	0,11
GCC	43,42	7,46	0,97

Os teores de carbono obtidos podem ser usados para determinar os graus de substituição (GS) dos derivados. Pode-se considerar que todo o carbono presente na GC é proveniente dos anéis de galactose ($M = 162 \text{ g/mol}$) da cadeia do polissacarídeo. Embora a galactose represente cerca de 70% da composição da GC, essa aproximação é válida para facilitar os cálculos, pois os outros monossacarídeos que compõe a GC são isômeros da galactose (possuem a mesma massa molar de 162 g/mol), exceto a arabinose que é uma pentose e os ácidos urônicos que são hexoses ácidas. Aproximando as massas molares para fins de cálculo:

Cálculo do GS de GCC:

Em 100 g de GC têm-se 38,4 g de carbono, então:

$$n(C) = \frac{38,4 \text{ g}}{12 \text{ g/mol}} = 3,2 \text{ mol de C} \quad (\text{Equação 5})$$

Conforme a Tabela 9 determina-se o número de mols de C presentes em 100 g de GCC:

$$n(C) = \frac{43,42 \text{ g}}{12 \text{ g/mol}} = 3,62 \text{ mol de C} \quad (\text{Equação 6})$$

$$\text{Excesso} = 3,62 - 3,2 = 0,42 \text{ mol de C}$$

Logo, houve o acréscimo de 0,42 mol de C oriundos dos 27 Carbonos do colesterol (Figura 19). Portanto, o GS estimado para a GCC é:

$$GS (GCC) = \frac{\frac{n(C) \text{ excesso}}{27 \text{ carbonos}}}{\frac{n(C) GC}{6 \text{ carbonos}}} = \frac{\frac{0,42}{27}}{\frac{3,2}{6}} = 0,029 = 2,9\%$$

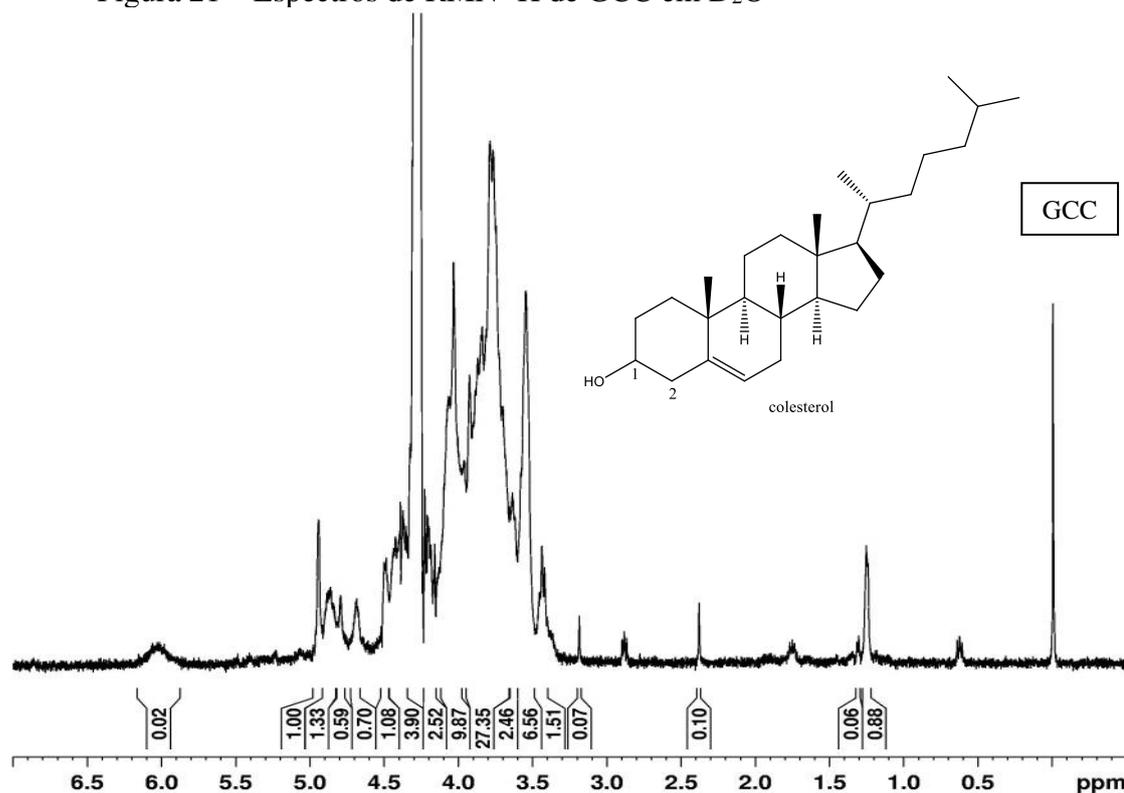
(Equação 7)

O valor de GS obtido para a GCC é atribuído à pouca quantidade de ácidos urônicos presentes na estrutura da GC, entre 4,5 – 6,3% de composição monossacarídica. Em um caso ideal, quando todos os ácidos urônicos da cadeia polimérica reagissem, seria obtido um GS máximo de 0,063. Logo, o rendimento da reação para o derivado GCC foi de 40 - 60%, considerando a faixa de 4,5 – 6,3% de ácidos urônicos. Este rendimento pode ser considerado elevado, levando-se em conta diversos fatores adversos como impedimento estérico devido ao tamanho da molécula de colesterol, enovelamento da estrutura da GC, dificultando a aproximação dos sítios ativos. Isso mostra a alta seletividade da reação de esterificação de Steglich (NEISES; STEGLICH, 1978).

4.2.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

A Figura 13 mostra o espectro de RMN ^1H para a GC em D_2O . Também observou-se no espectro de GC, os sinais relativos aos hidrogênios anoméricos presentes em GC, como em δ 4,69 e δ 4,43 da H-1 da galactose (1 \rightarrow 3) por correlação no espectro de bi-dimensional $^1\text{H}/^{13}\text{C}$.

Novos sinais na Figura 13 em δ 2,3 e 3,1 podem ser devidos aos hidrogênios 1 e 2 do grupamento colesterol enxertado na GCC. Não foi possível observar o surgimento de novos picos na região entre 0,8-2,0 ppm características da sobreposição dos sinais dos hidrogênios alquílicos do colesterol conforme reportado por Yang *et al* (2008b) para carboximetilcelulose enxertada com colesterol. A intensidade do pico obtido foi baixa em relação aos outros picos característicos da carboximetilcelulose, mesmo tendo obtido valores de DS na faixa de 2,7 a 7,4. Tal fato justifica a inobservância desse sinal no derivado de GCC que apresentou DS = 0,029 conforme análise elementar.

Figura 21 – Espectros de RMN ^1H de GCC em D_2O 

4.2.4 Análise termogravimétrica (TGA)

A Figura 22 mostra as curvas obtidas por TGA em atmosfera de ar sintético nas amostras de goma do cajueiro (GC) e seus derivados enxertados com colesterol. Os dados de perda de massa e as temperaturas de pico de cada evento térmico foram compilados na Tabela 10.

A curva termogravimétrica de GCC apresentou evento de perda de água similar à GC em $T_1 = 50\text{ }^\circ\text{C}$, com perda de massa de 10%. O baixo valor no grau de substituição (DS) do colesterol na goma do cajueiro explica o porquê das amostras de GCC não apresentarem comportamento hidrofóbico.

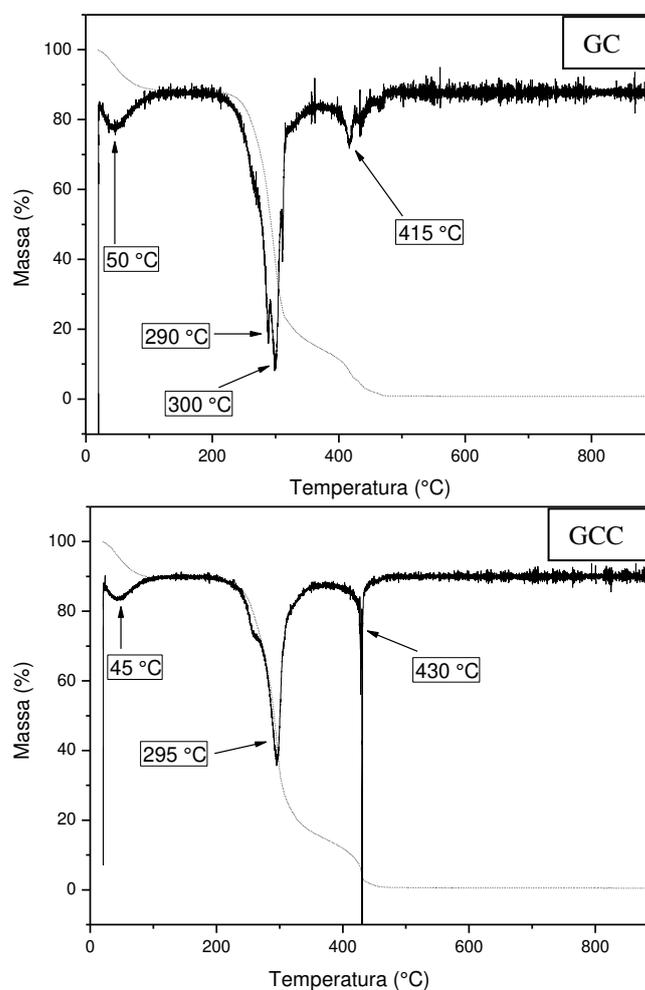
A análise do segundo evento de decomposição dos polissacarídeos modificados (T_2) indica que para GCC a temperatura de degradação é próxima à observada na GC, $295\text{ }^\circ\text{C}$. A perda de massa nessa amostra (74%) também é similar a GC (75%), assim como no último evento térmico de perda (T_3), a similaridade se manteve perdendo 15% de massa, em temperaturas de $430\text{ }^\circ\text{C}$, e apresentando resíduo de 0,6%. Portanto, pode-se concluir que a

pequena quantidade de colesterol enxertado na GCC não ocasionou mudanças significativas em sua estabilidade térmica.

Tabela 10 – Eventos térmicos de análise termogravimétrica para as amostras de GC e GCC

Amostras	T1 (°C)	Perda de massa (%)	T2 (°C)	Perda de massa (%)	T3 (°C)	Perda de massa (%)	Resíduo (%) a 800°C
GC	50	10	300	75	415	14	0,75
GCC	45	10	295	74	430	15	0,45

Figura 22 – Curvas termogravimétricas de TGA e DTG de GC e GCC



4.2.5 Concentração de Associação Crítica (CAC)

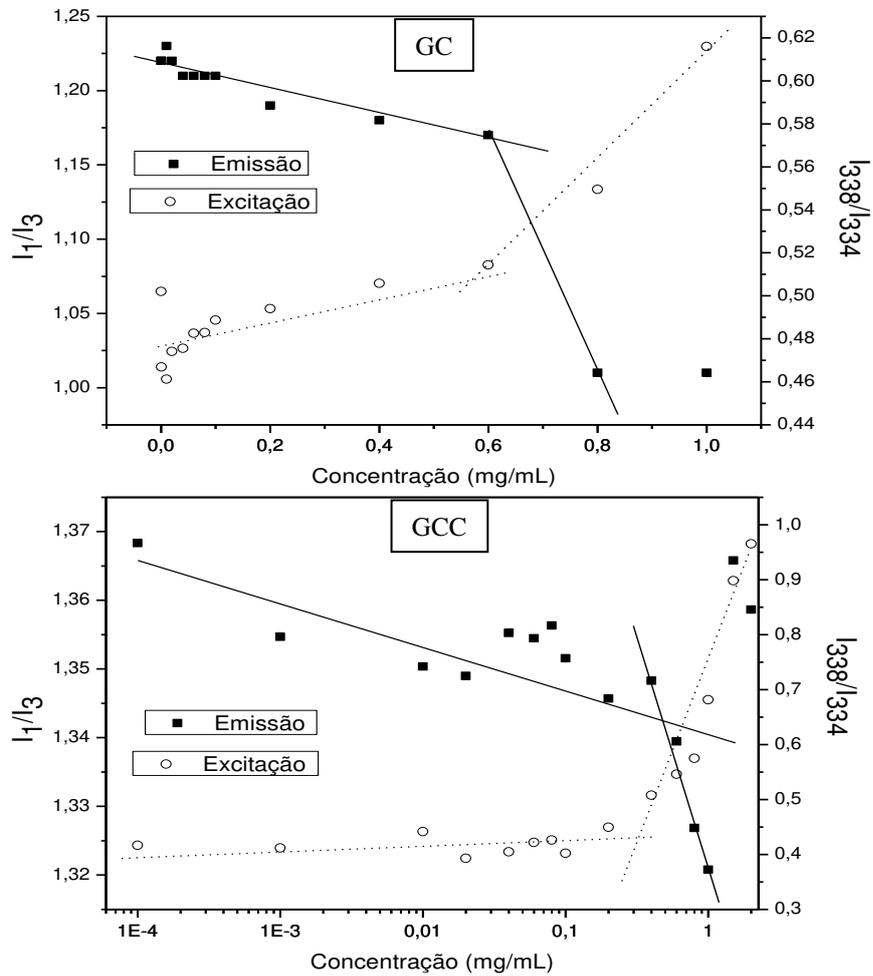
Utilizou-se a técnica de fluorescência com o intuito de determinar a concentração de associação crítica (CAC) das nanopartículas em suspensão formadas pela agregação dos polissacarídeos. Através dos espectros de excitação e emissão do pireno e pela alteração da razão das bandas I_{338}/I_{334} em relação ao aumento da concentração do polímero, é possível mensurar quando ocorre esta associação. Em geral, essas mudanças nos espectros de emissão e excitação são indicativas da compartimentação do pireno entre fase aquosa e ambiente de interação hidrofóbica (PATRIZI *et al.*, 2009).

A relação I_1/I_3 , (bandas de emissão do pireno, 373 e 384 nm, respectivamente) utilizada para caracterizar a polaridade do ambiente pireno, foi medida em solução aquosa à 25 °C nas concentrações dos polissacarídeos GC e GCC de 10^{-4} a 2 mg/mL. A dependência da concentração do polímero com a razão I_1/I_3 é apresentada na Figura 23.

Para a amostra de GC a razão I_1/I_3 encontrada foi 1,23 em baixas concentrações, valor representativo de pireno livre (LYSENKO *et al.*, 2002). Com o aumento da concentração do polímero depois da CAC, a progressiva incorporação do pireno nos núcleos hidrofóbicos das nanopartículas resulta em mudanças nas suas propriedades fluorescentes. Quando a concentração de GC aumenta, o valor de I_1/I_3 decresce até 1,0, sugerindo a incorporação do pireno em quantidade representativa no meio hidrofóbico. Em termos de comparação, o valor de I_1/I_3 para pireno em hexano é 0,6 (LYSENKO *et al.*, 2002).

A Figura 23 mostra a relação de intensidade (I_{338}/I_{334}) dos espectros de excitação do pireno *versus* a concentração de GC e seu derivado esterificado GCC. Não foram encontradas alterações significativas na intensidade de fluorescência no intervalo de baixas concentrações. Com o aumento da concentração, contudo, a intensidade de fluorescência aumenta acentuadamente, ocasionando o aprisionamento do pireno nos microdomínios hidrofóbicos das nanopartículas.

Figura 23 – Razões I_1/I_3 (o) e I_{338}/I_{334} (●) para o pireno como uma função da concentração dos polissacarídeos: A) GC, B) GCC1 e C) GCP3



A CAC foi determinada pela interseção entre as tangentes das curvas antes e depois do ponto de inflexão e os valores encontrados para as amostras GC e GCC foram, respectivamente, 0,6 e 0,5 mg/mL.

Observa-se uma pequena diminuição na concentração de agregado de GC para GCC, que pode ser explicada pela pouca quantidade de colesterol enxertado, tornando o polissacarídeo com um pequeno caráter hidrofóbico. Yang *et al.* (2007) determinaram a CAC para alginato enxertado com colesterol utilizando o mesmo método e obtiveram valores na faixa de 0,22 e 0,33 mg/mL para os polissacarídeos modificados em relação ao alginato puro que apresentou CAC em 3,2 mg/mL. Tal diferença pode estar relacionada com a quantidade de colesterol enxertado em cada polímero, pois quanto maior a quantidade de enxertado, mais hidrofóbico torna-se o polímero e a agregação das partículas ocorrerá em concentrações menores, resultando em menores valores de CAC.

4.2.6 Tamanho de partícula e potencial Zeta

A Figura 24 mostra os perfis de distribuição no tamanho de partícula das amostras de GC, GCC nas concentrações de 0,01; 0,05 e 0,1%. Os valores médios do tamanho de partícula aumentam com a concentração de GCC. Os tamanhos obtidos variaram de 120 a 350 nm e foram obtidos com perfil unimodal, com tamanho médio de 130 nm para 0,01% e 309 nm para 0,05%. A grande variação entre o tamanho de GCC em relação à GC (Tabela 11) indica a formação de nanopartículas hidrofóbicas em suspensão. A concentração de 0,1% mostrou um perfil bimodal em todas as análises, com o primeiro pico situado na faixa de 158 nm e o segundo pico em 1850 nm. A coexistência desses dois tamanhos de partícula bem distintos indica que há um fluxo entre as nanopartículas que se aglomeram e formam essas micropartículas (ZETASIZER, 2008).

Figura 24 – Distribuição em volume dos tamanhos de partícula de GC (a) e GCC nas concentrações 0,01 (b); 0,05 (c) e 0,1% (d) em água deionizada

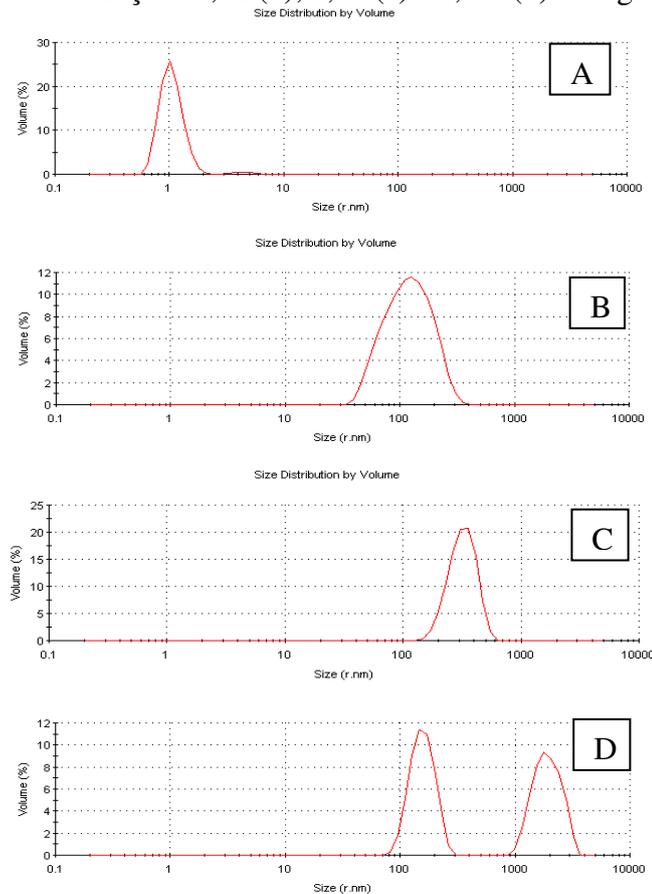
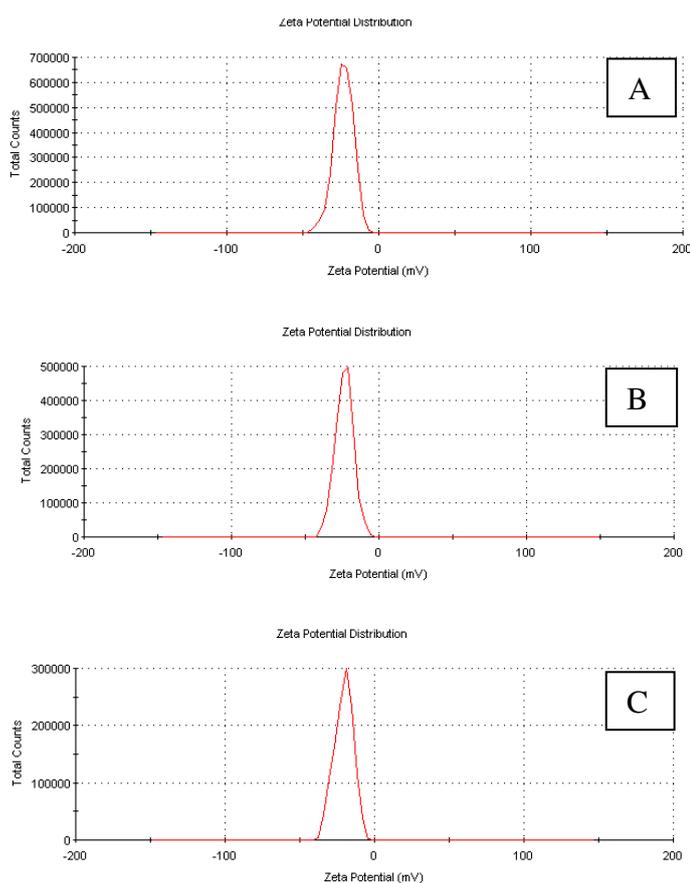


Tabela 11 – Tamanhos de partículas e potenciais Zeta para as amostras de GC e os derivados esterificados

Amostras	Tamanho de partícula (nm)	Potencial Zeta (mV)
GC	$1,11 \pm 0,4$	$-19 \pm 1,6$
GCC	120 ± 18	$-25 \pm 0,9$

Os resultados do potencial Zeta (Figura 25) mostram que as superfícies das nanopartículas GCC têm carga superficial negativa, e isto é comum devido à natureza aniônica do polímero. Apesar de a concentração ter mostrado grande influência no tamanho e na agregação das partículas, não foi observada nenhuma variação nos valores de potencial Zeta com o aumento da concentração.

Figura 25 – Distribuição dos valores de potencial Zeta nas amostras de GCC nas concentrações 0,01 (a); 0,05 (b) e 0,1% (c)



4.3 Ensaio de incorporação e liberação de indometacina

Após a liofilização das matrizes com indometacina incorporadas, realizou-se a dissolução em DMSO de cada matriz, em triplicata para determinar a concentração de indometacina presente na matriz, para cálculo de eficiência de incorporação através de espectroscopia na região UV-Vis. Os resultados obtidos foram compilados na Tabela 12:

Tabela 12 – Eficiência de incorporação de indometacina nas matrizes hidrofóbicas GCC, GCP1, GCP2 e GCP3

Amostras	Teor de incorporação (%m/m)
GCC	11 ± 2,1
GCP1	21 ± 3,7
GCP2	27 ± 4,4
GCP3	32 ± 4,2

Percebe-se claramente uma tendência à maior incorporação do fármaco hidrofóbico nas matrizes que possuem também maior caráter hidrofóbico. Para a amostra mais hidrofílica, GCC, obteve-se um pequeno teor de incorporação de 11%, a matriz de maior GS apresentou a maior eficiência na incorporação da indometacina.

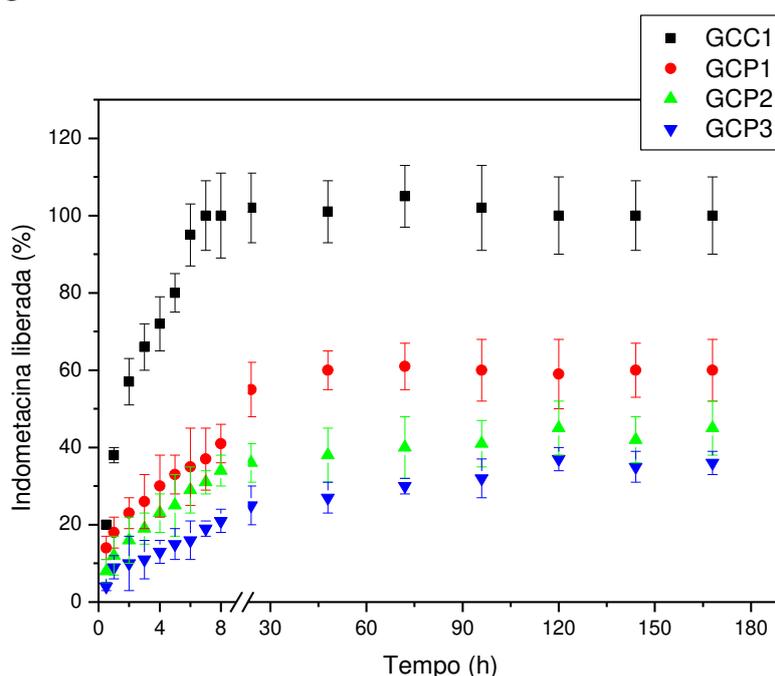
Os perfis de liberação para os derivados esterificados de GC estão expressos na Figura 26. Através do perfil de liberação para as nanopartículas, pode-se analisar o efeito da razão de reagentes na liberação da indometacina. O aumento na quantidade de anidrido propiônico, para as GCP, resulta em menor e mais lenta liberação do fármaco em um período de 180 horas. Após 48 horas (2 dias), a amostra com menor razão de anidrido, GCP1, atinge 60% de liberação e permanece constante durante o passar dos dias. A amostra intermediária, GCP2, e a com maior razão de anidrido, GCP3, liberam cerca de 45% e 36%, respectivamente da indometacina presente na matriz, atingindo o patamar de equilíbrio em 120 horas (5 dias).

O perfil de liberação da indometacina nas nanopartículas de GCC mostra que o teor de liberação atinge 100% em 8 horas. Esse fenômeno resulta da menor hidrofobicidade da GCC em relação aos demais derivados. A incorporação de um fármaco hidrofóbico em uma matriz hidrofóbica, como as de GCP, gera uma atração intermolecular muito mais intensa que em relação a uma matriz mais hidrofílica como GCC. O menor teor de sítios esterificados na goma permite uma maior penetração da água, ocasionando em um maior intumescimento das cadeias poliméricas, o que faz com que uma maior quantidade de fármaco seja liberada, resultando em uma liberação mais rápida.

Chen *et al.* (2011), em um trabalho semelhante, preparam matrizes de quitosana enxertadas com colesterol e incorporaram ácido trans-retinoico (ATRA) para liberação em tampão pH 7,4, onde o teor de ATRA liberada variou entre 25 e 60% em um intervalo de 70 horas.

Um estudo mais detalhado sobre o modelo de Korsmeyer-Peppas foi realizado e seus parâmetros cinéticos calculados, sendo expressos na Tabela 13. De acordo com a teoria cinética do modelo para geometria esférica (RITGER; PEPPAS, 1987), quando o coeficiente “n” for menor ou igual a 0,43, tem-se uma liberação devida a um fenômeno fickiano, onde a liberação é governada por um processo de difusão. Quando o valor de “n” for entre 0,43 e 0,89, tem-se um comportamento não-fickiano, onde a liberação ocorre por mecanismos conjuntos de difusão e relaxação da cadeia da matriz.

Figura 26 – Perfil de liberação de indometacina *in vitro* a partir das matrizes esterificadas GCC, GCP1, GCP2 e GCP3 em tampão pH 7,4 à 37°C



De acordo com essa classificação podemos observar que a matriz de GCC apresentou comportamento de liberação não-fickiana ($0,43 < n < 0,89$). Enquanto as matrizes de GCP são caracterizadas por liberações fickianas. Esse fenômeno pode ser explicado pela predominância do caráter de difusão nas matrizes GCP: a cadeia polimérica possui maior atração pelo fármaco do que pela solução aquosa, então o caráter difusional predomina sobre a relaxação exercida pelo solvente na cadeia polimérica. Já a matriz de GCC, que possui maior

caráter hidrofílico, sofrerá maior influência do solvente ocasionando em maiores efeitos de relaxação da cadeia.

Tabela 13 – Parâmetros cinéticos para o modelo de Korsmeyer-Peppas

Matriz	n	r²	Classificação
GCC	0,57	0,97	Não-fickiano
GCP1	0,33	0,99	Fickiano
GCP2	0,31	0,84	Fickiano
GCP3	0,33	0,90	Fickiano

5 CONCLUSÃO

Nanopartículas autoestruturadas à base de polissacarídeos modificados a partir da goma do cajueiro foram produzidas, nas quais a indometacina foi incorporada e testada sua liberação controlada *in vitro* com sucesso.

A análise por FT-IR e RMN ¹H mostrou as principais bandas de absorção dos polissacarídeos, evidenciando as modificações ocorridas decorrentes das esterificações. Através de análise estatística, pôde-se confirmar que a quantidade de piridina não altera o rendimento da reação. Quantificou-se os GS da amostra GCC através da análise elementar resultando em 0,029 e estimou-se o GS para GCP1 (0,79), GCP2 (1,02) e GCP3 (1,33) por RMN ¹H. A análise térmica revelou que a modificação do polissacarídeo com anidrido propiônico confere ao produto uma maior estabilidade térmica em temperaturas de até 525 °C.

Através da análise de fluorescência por pireno, percebeu-se que a enxertia de grupamentos éster na goma do cajueiro diminui a concentração de agregação crítica de 0,6 mg/mL para 0,5 mg/mL. A autoformação das nanopartículas hidrofóbicas apresentou tamanhos na faixa nano, na ordem de 60-360 nm e em sua maioria, distribuições unimodais e estáveis, na faixa de -20 mV.

A incorporação de indometacina mostrou-se mais eficiente nas matrizes mais hidrofóbicas. A liberação da indometacina em condições que simulavam a corrente sanguínea, pH 7,4 e temperatura de 37 °C, pelas matrizes GCC e GCP1, GCP2 e GCP3 mostrou-se relativamente controlada, onde teores do fármaco entre 36 e 100% foram liberados entre 8 e 120 horas. O estudo cinético sugere que a liberação do antibiótico a partir do GCC segue o modelo de Korsmeyer-Peppas e a partir dos derivados GCP segue o modelo Fickiano. Por fim, pode-se concluir que as matrizes de goma do cajueiro esterificadas com anidrido propiônico e enxertada com colesterol podem ser consideradas promissoras como proposta de matriz para liberação controlada de fármacos.

REFERÊNCIAS

- AL-QADI, Sonia; GRENHA, Ana; REMUÑÁN-LÓPEZ, Carmen. Microspheres loaded with polysaccharides nanoparticles for pulmonary delivery: Preparation, structure and surface analysis. **Carbohydrate Polymers**. [s.l.]: Elsevier, 2011. v. 86, p. 25-34.
- ANDERSON, Douglas; HENDRIE, A. An analytical study of gum exudates from some species of the genus *Lannea* A. Rich. **Phytochemistry**. Edinburgh: Elsevier, 1970. v. 9, p. 1585-1588.
- AUMELAS, André; SERRERO, Aurélie; DURAND, Alain; DELLACHÉRIE, Édith; LÉONARD, Michèle. Nanoparticles of hydrophobically modified dextrans as potential drug carrier systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. Nancy: Elsevier, 2007. v. 59, p. 74-80.
- AVADI, Mohammad Reza; SADEGUI, Assal Mir Mohammad; MOHAMMADPOUR, Nasser; ABEDIN, Saideh; ATYABI, Fatemeh; DINARVAND, Rassoul; RAFIEE-TEHRANI, Morteza. Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**. Iran: Elsevier, 2010. v. 6, p. 58-63.
- AZEVEDO, M. M. M. **Nanoesferas e a liberação controlada de fármacos**. Monografia (Faculdade de Química). Campinas: Unicamp, 2002.
- BANDEIRA, Clodion Torres. **Métodos de extração da goma de cajueiro**. Fortaleza: EMBRAPA, 1991.
- BARROS, Levi de Moura. **Botânica, origem e distribuição geográfica**. Fortaleza: EMBRAPA / CNPAT, 1995. p. 55-71.
- BAYAT, Akbar; LARIJANI, Bagher; AHMADIAN, Shahin; JUNGINGER, Hans; RAFIEE-TEHRANI, Morteza. Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and its quaternized derivatives. **Nanomaterials**. [s.l.]: Elsevier, 2008. v. 4, p. 115-120.
- BIVAS-BENITA, Maytal; ROMELJIN, Stefan; JUNINGER, Hans; BORCHARD, Gerrit. PLGA-PEG nanoparticles for gene delivery to pulmonary epithelium. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. Leiden: Elsevier, 2004. v. 58, p. 1-6.
- BUENO, Willie Alves. **Manual de Espectroscopia Vibracional**. São Paulo: McGraw-Hill, 1990.
- CHAYED, Siwar; WINNIK, Françoise. In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of polysaccharide-based nanoparticulate oral drug delivery systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Montreal: Elsevier, 2007. v. 65, p. 363-370.
- CHEN, Chyi-Cheng; WAGNER, Gerhard. Vitamin E nanoparticle for beverage applications. **Chemical Engineering Research and Design**. Basel: Elsevier, 2004. v. 82, p. 1432-1437.

CHEN, Mingmao; LIU, Yan; YANG, Wenzhi; LI, Xuemin; LIU, Lingrong; ZHOU, Zhimin; WANG, Yinsong; LI, Ruifeng; ZHANG, Qiqing. Preparation and characterization of self-assembled nanoparticles of 6-*O*-cholesterol- modified chitosan for drug delivery. **Carbohydrate Polymers**. China: Elsevier, 2011. v. 84, p. 1244-1251.

CHEN, Youfang; LIN, Xianfu; PARK, Hyunjin; GREEVER, Richard. Study of artemisinin nanocapsules as anticancer drug delivery systems. **Nanomedicine**. [s.l.]: Elsevier, 2009. v. 5, p. 316-322.

CHI, Hui; XU, Kun; WU, Xiuli; CHEN, Qiang; XUE, Donghua; SONG, Chunlei; ZHANG, Wende; WANG, Pixin. Effect of acetylation on the properties of corn starch. **Food Chemistry**. Jilin: Elsevier, 2008. v. 106, p. 923-928.

CUI, Zhengrong; MUMPER, Russell. Chitosan-based nanoparticles for topical genetic immunization. **Journal of Controlled Release**. Lexington: Elsevier, 2001. v. 75, p. 409-419.

CUNHA, Pablyana Leila; DE PAULA, Regina Célia; FEITOSA, Judith. Polissacarídeos na biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. **Química Nova**. Fortaleza: SciELO, 2009. v. 32, p. 649-660.

DAOUD-MAHAMMED, Samia; RINGARD-LEFEBVRE, Catherine; RAZZOUK, Nisryn; ROSILIO, Veronique; GILLET, Brigitte; COUVREUR, Patrick; AMIEL, Catherine; GREF, Ruxandra. Spontaneous association of hydrophobized dextran and poly- β -cyclodextrin into nanoassemblies: Formation and interaction with a hydrophobic drug. **Journal of colloid and interface science**. France: Elsevier, 2007. v. 307, p. 83-93.

DE PAULA, Regina; HEATLEY, Frank; BUDD, Peter. Characterization of *Anacardium occidentale* exudate polysaccharide. **Polymer International**. Chichester: Wiley InterScience, 1998. v. 45, p. 27-35.

DE PAULA, Regina; RODRIGUES, Judith, Composition and rheological properties of cashew tree gum, the exudate polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. **Carbohydrate Polymers**. Fortaleza: Elsevier, 1995. v. 26, p. 177-181.

EL-REHIM, Abd; HEGAZY, El-Sayed Ahmed; EL-MOHDY, Abd. Radiation synthesis of hydrogels to enhance sandy soils water retention and increase plant performance. **Journal of Applied Chemistry**. Cairo: Wiley InterScience, 2004. v. 93, p. 1660-1671.

ELZOGHBY, Ahmed; SAMY, Wael; ELGINDY, Nazik. Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. **Journal of controlled release**. Alexandria: Elsevier, 2011. v. 157. p. 168-182.

FRELICHOWSKA, Justyna; BOLZINGER, Marie-Alexandrine; VALOUR, Jean-Pierre; MOUAZIZ, Hanna; PELLETIER, Jocelyne; CHEVALIER, Yves. Pickering w/o emulsions: Drug release and topical delivery. **International Journal of Pharmaceutics**. France: Elsevier, 2009. v. 368, p. 7-15.

FISHBINE, Glenn. **The investor's guide to nanotechnology & micromechanics**. 1ed. New York: John Wiley & Sons Inc., 2002.

GAMAL-ELDEEN, Amira; AMER, Hassan; HELMY, Wafaa; TALAAT, Roba; RAGAB, Halla. Chemically-modified polysaccharide extract derived from *Leucaena leucocephala* alters Raw 264.7 murine macrophage functions. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**. Egito: Elsevier, 2007. v. 7, p. 871-878.

GAN, Quan; WANG, Tao. Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier – systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. **Colloids Surface B: Biointerfaces**. Belfast: Elsevier, 2007. v. 59, p. 24-34.

GAO, Fu-Ping; ZHANG, Hui-Zhu; LIU, Ling-Rong; WANG, Yin-Song; JIANG, Qian; YANG, Xin-Du; ZHANG, Qi-Qing. Preparation and physicochemical characteristics of self-assembled nanoparticles of deoxycholic acid modified-carboxymethyl curdlan conjugates. **Carbohydrate Polymers**. China: Elsevier, 2009. v. 71, p. 606-613.

GEORGE, Meera; ABRAHAM, Emilia. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan – a review. **Journal of Controlled Release**. Trivandrum: Elsevier, 2006. v. 114, p. 1-14.

HORNIG, Stephanie; HEINZE, Thomas. Nanoscale structures of dextran esters. **Carbohydrate Polymers**. Jena: Elsevier, 2007. v. 68, p. 280-286.

HU, Yan; HE, Xianran; LEI, Lei; LIANG, Shucui; QIU, Guofu; HU, Xianming. Preparation and characterization on self-assembled nanoparticles of the novel carboxymethyl pachyman-deoxycholic acid conjugates. **Carbohydrate Polymers**. Wuhan: Elsevier, 2008. v. 74, p. 220-227.

HUANG, Min; HUANG, Zhixin; BILGEN, Mehmet; BERKLAND, Cory. Magnetic resonance imaging of contrast-enhanced polyelectrolyte complexes. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**. Kansas: Elsevier, 2008. v. 4, p. 30-40.

IBRAHIM, Shaimaa; AWAD, Gehanne; GENEIDI, Ahmed; MORTADA, Nahed. Comparative effects of different cosurfactants on sterile prednisolone acetate ocular submicron emulsions stability and release. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. Cairo: Elsevier, 2009. v. 69, p. 225-231.

JINTAPATTANAKIT, Anchalee; JUNYAPRASERT, Varaporn; MAO, Shirui; SITTERBERG, Johannes; BAKOWSKY, Udo; KISSEL, Thomas. Peroral delivery of insulin using chitosan derivatives: A comparative study of polyelectrolyte nanocomplexes and nanoparticles. **Pharmaceutical Nanotechnology**. [s.l.]: Elsevier, 2007. v. 324, p. 240-249.

JUNG, Sun-Woong; JEONG, Young-II; KIM, Sung-Ho. Characterization of hydrophobized pullulan with various hydrophobicities. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**. Gwangju: Elsevier, 2003. v. 254, p. 109-121.

KINGSLEY, Jeffrey; DOU, Huanyu; MOREHEAD, Justin; RABINOW, Barrett; GENDELMAN, Howard; DESTACHE, Christopher. Nanotechnology: A Focus on Nanoparticles as a Drug Delivery System. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**. Omaha: SpringerLink, 2006. v. 1, p. 340-350.

KHOEE, Sepideh; YAGHOUBIAN, Morteza. An investigation into the role of surfactants in controlling particle size of polymeric nanocapsules containing penicillin-G in double emulsion. **European Journal of Medicinal Chemistry**. Tehran: Elsevier, 2009. v. 44, p. 2392-2399.

KREUTER, Jörg. Nanoparticles- a historical perspective. **International Journal of Pharmaceutics**. Frankfurt: Elsevier, 2007. v. 331, p. 1-10.

LANGER, Robert; TIRRELL, David. Designing materials for biology and medicine. **Nature**. Cambridge: Nature, 2004. v. 428, p. 487-492.

LEE, Dong-Won; POWERS, Kevin; BANEY, Ronald. Physicochemical properties and blood compatibility of acylated chitosan nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**. Gainesville: Elsevier, 2004. v. 58, p. 371-377.

LEMARCHAND, Caroline; RUXANDRA, Gref; COUVREUR, Patrick. Polysaccharide-decorated nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. Paris: Elsevier, 2004. v. 58, p. 327-341.

LI, Ping; DAI, Ya-Ni; ZHANG, Jun-Ping; WANG, Ai-Qin; WEI, Qin. Chitosan-alginate nanoparticles as a novel drug delivery system for nifedipine. **International Journal of Biomedical Science**. Lanzhou: PMC, 2008. v. 4, p. 221-228.

LIMA, Nogueira; LIMA, Rabelo; SALIS, Ribeiro; MOREIRA, Azevedo. Cashew-tree (*Anacardium occidentale L.*) exudate gum: a novel bioligand tool. **Biotechnology and Applied Biochemistry**. Fortaleza: Wiley InterScience, 2002. v. 35, p. 45-53.

LIU, Zonghua; JIAO, Yanpeng; WANG, Yifei; ZHOU, Changren; ZHANG, Ziyong. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery**. Guangzhou: Elsevier, 2008. v. 60, p. 1650-1662.

LIU, Li; XU, Xian; GUO, Shengrong; HAN, Wei. Synthesis and self-assembly of chitosan-based copolymer with a pair of hydrophobic/hydrophilic grafts of polycaprolactone and poly(ethylene glycol). **Carbohydrate Polymers**. Shanghai: Elsevier, 2009. v. 75, p. 401-407.

LYSENKO, Eugene; BRONICH, Tatiana; SLONKINA, Elena; EISENBERG, Adi; KABANOV, Victor; KABANOV, Alexander. Block ionomer complexes with polystyrene core-forming block in selective solvents of various polarities: 1. Solution behavior and self-assembly in aqueous media. **Macromolecules**. [s.l.]: ACS Publications, 2002. v. 35, p. 6351-6361.

MACIEL, Jeanny; SILVA, Durcilene; PAULA, Haroldo; DE PAULA, Regina. Chitosan/carboxymethyl cashew gum polyelectrolyte complex: synthesis and thermal stability. **European Polymer Journal**. Fortaleza: Elsevier, 2005. v. 41, p. 2726-2733.

MALVERN. Disponível em: <www.malvern.com>. Acesso em: 29 nov. 2011.

MOTOZATO, Yoshiaki; IHARA, Hirotaka; TOMODA, Takashi; HIRAYAMA, Chuichi. Preparation and gel permeation chromatographic properties of pullulan spheres. **Journal of Chromatography A**. Kumamoto: Elsevier, 1986. v. 355, p. 434-437.

MOURA NETO, Érico. **Desenvolvimento de Novos Materiais à base de Goma do Cajueiro (*Anacardium Occidentale*): Derivados e Microesferas com Gelatina**. Dissertação (Mestrado em Química Inorgânica) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Brasil, 2008.

MOURA NETO, Érico; MACIEL, Jeanny; CUNHA, Pablyana; DE PAULA, Regina Célia; FEITOSA, Judith. Preparation and characterization of chemically sulfated cashew gum polysaccharide. **Journal of Brazilian Chemical Society**. Fortaleza: SciELO, 2011. v. 22, p. 1953-1960.

MOURA, Raquel Evangelista. **Síntese de nanopartículas à base de goma de cajueiro para aplicação em sistemas de liberação de fármacos**. Dissertação (Mestrado em Química Inorgânica) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

NA, Kun; PARK, Keun-Hong; KIM, Sung Won; BAE, You Han. Self-assembled hydrogel nanoparticles from curdlan derivatives: characterization, anti-cancer drug release and interaction with a hepatoma cell line (HepG2). **Journal of Controlled Release**. Kwangju: Elsevier, 2000. v. 69, p. 225-236.

NAIDU, Vegi Ganga Modi; MADHUSUDHANA, Kuncha; SASHIDHAR, Rao Beedu; RAMAKRISHNA, Sistla; KHAR, Roop Krishen; AHMED, Farhan Jalees; DIWAN, Prakash Vamanrao. Polyelectrolyte complexes of gum kondagogu and chitosan, as diclofenac carriers. **Carbohydrate Polymers**. India: Elsevier, 2009. v. 76, p. 464-471.

NANOTECNOLOGIA e progresso na entrega de fármacos. **Teorias do envelhecimento**. Brasil: 2012. Disponível em: <http://teoriasdoenvelhecimento.blogspot.com.br/2012/08/nanotecnologiae-o-progresso-na-entrega.html>>. Acesso em: 05 fev. 2013.

NAYAK, Bishwa Ranjan; SINGH, Raghuwansh. Synthesis and characterization of grafted hydroxypropyl guar gum by ceric ion induced initiation. **European Polymer Journal**. Kharapur: Elsevier, 2001. v. 37, p. 1655-1666.

NEISES, Bernhard; STEGLICH, Wolfgang. Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids, **Angewandte Chemie International Edition**. German: [s.n.], 1978. v. 17, p. 522-524.

OLIVEIRA, Marilia de Albuquerque. **Síntese de nanopartículas a base do polissacarídeo *Anadenanthera macrocarpa* (Angico) como matriz para incorporação de fármacos**. Tese (Doutorado em Química Inorgânica) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

OLIVEIRA, Marilia de Albuquerque; CIARLINI, Priscila; FEITOSA, Judith; DE PAULA, Regina; PAULA, Haroldo. Chitosan/"angico" gum nanoparticles: Synthesis and characterization. **Materials Science and Engineering: C**. Fortaleza: Elsevier, 2009. v. 29, p. 448-451.

PANYAM, Jayanth; DALI, Manisha; SAHOO, Sanjeeb; MA, Wenxue; CHAKRAVARTHI, Sudhir; AMIDON, Gordon; LEVY, Robert; LABHASETWAR, Vinod. Polymer degradation and in vitro release of a model protein from poly(D,L-lactide-co-glycolide) nano- and microparticles. **Journal of Controlled Release**. USA: Elsevier, 2003a. v. 92, p. 173-187.

PANYAM, Jayanth; LABHASETWAR, Vinod. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. **Advanced Drug Delivery**. Omaha: Elsevier, 2003b. v. 55, p. 329-347.

PATEL, Shailesh; PATEL, Ranjan; PATEL, Vithal. Kinetics study of thermal degradation of guar gum esters. **Thermochimica Acta**. Gujarat: Elsevier, 1988. v. 128, p. 141-148.

PATRIZI, Maria Loreta; PIANTANIDA, Giovanna; COLUZZA, Carlo; MASCI, Giancarlo. ATRP synthesis and association properties of temperature responsive dextran copolymers grafted with poly(N-isopropylacrylamide). **European Polymer Journal**. [s.l.]: Elsevier, 2009. v. 45, p. 2779-2787.

PENICH-COVAS, Carlos; ARGÜELLES-MONAL, Waldo; ROMÁN, Julio San. A kinetic study of the thermal degradation of chitosan and a mercaptan derivative of chitosan. **Polymer Degradation and Stability**. [s.l.]: Elsevier, 1999. v. 39, p. 21-28.

PICOS, Diana Ramos; CARRIL, Martha Gomez; MENA, Dianelis Fernandez; DE LA FUENTE, Leopoldo Nunes. Microspheres biodegradables de liberación controlada para administración parenteral. **Revista Cubana de Farmacia**. Cuba: SciELO, 2000. v. 34, p. 70-76.

PICTON, Luc; MOCANU, Georgeta; MIHAI, Doina; CARPOV, Adrian; MULLERA, G. Chemically modified exopolysaccharide pullulans: physico-chemical characteristics of ionic derivatives. **Carbohydrate Polymers**. [s.l.]: Elsevier, 1995. v. 28, p. 131-136.

PINGNATELLO, Rosario; BUCOLO, Claudio; SPEDALIERI, Giancarlo; MALTESE, Adriana; PUGLISI, Giovanni. Flurbiprofen-loaded acrylate polymer nanosuspensions for ophthalmic application. **Biomaterials**. Catania: Elsevier, 2002. v. 23, p. 3247-3255.

PINTO, Gladys León de; MARTINEZ, Maritza; MENDONZA, Julián Alberto; OCANDO, Edgar; RIVAS, Carlos. Comparison of three anacardiaceae gum exudates. **Biochemical Systematics and Ecology**. Venezuela: Elsevier, 1995. v. 23, p. 151-156.

QURRAT-UL-AIN; SHARMA, Sadhna; KHULLER, Gopal; GARG, S.K. Alginate-based oral drug delivery system for tuberculosis: pharmacokinetics and therapeutic effects. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. Chandigarh: Oxford Academic, 2003. v. 51, p. 931-938.

RITGER, Philip; PEPPAS, Nikolaos. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. **Journal of Controlled Release**. West Lafayette: Elsevier, 1987. v. 5, p. 37-42.

RODRIGUES, Judith Feitosa; DE PAULA, Regina Célia; COSTA, Sônia. Métodos de isolamento de gomas naturais: comparação através de goma de cajueiro (*Anacardium occidentale* L). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. Fortaleza: [s.n.], 1993. v. 3, p. 31-36.

ROKHADE, Ajit; PATIL, Sangamesh; AMINABHAVI, Tejraj. Synthesis and Characterization of semi-interpenetrating polymer network microspheres of acrylamide grafted dextran and chitosan for controlled release of acyclovir. **Carbohydrate Polymers**. Dharwad: Elsevier, 2007. v. 67, p. 605-613.

SANTANDER-ORTEGA, Manuel; STAUNER, T.; LORETZ, Brigitta; ORTEGA-VINUESA, J. L.; BASTOS-GONZALEZ, Delfi; WENZ, G.; SCHAEFER, Ulrich; LEHR, Claus-Michael. Nanoparticles made from novel starch derivatives for transdermal drug delivery, **Journal of controlled release**. [s.l.]: Elsevier, 2010. v. 141, p. 85-92.

SARMENTO, Bruno; FERREIRA, Domingos; JORGENSEN, Lene; VAN de WEERT, Marco. Probing insulin's secondary structure after entrapment into alginate/chitosan nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. Porto: Elsevier, 2007a. v. 65, p. 10-17.

SARMENTO, Bruno; RIBEIRO, Aj; VEIGA, Francisco; SAMPAIO, Paula; NEUFELD, R; FERREIRA, Domingos. Alginate/Chitosan nanoparticles are effective for oral insulin delivery. **Pharmaceutical Research**. Porto: SpringerLink, 2007b. v. 24, p. 2198-2206.

SARMENTO, Bruno; RIBEIRO, Aj; VEIGA, Francisco; FERREIRA, Domingos; NEUFELD, R. Oral bioavailability of insulin contained in polysaccharide nanoparticles. **Biomacromolecules**. Porto: ACS Publications, 2007c. v. 8, p. 3054-3060.

SCHAFFAZICK, Scheila Rezende; GUTERRES, Sílvia Stanisçuaski; FREITAS, Liane de Lucca; POHLMANN, Adriana Raffin. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**. Porto Alegre: SciELO, 2003. v. 26, p. 726-737.

SILVA, Durcilene; DE PAULA, Regina; FEITOSA, Judith; DE BRITO, Ana Cristina Facundo; MACIEL, Jeanny; PAULA, Haroldo. Carboxymethylation of cashew tree exudate polysaccharide. **Carbohydrate Polymers**. Fortaleza: Elsevier, 2004. v. 58, p. 163-171.

SILVA, Durcilene; FEITOSA, Judith; MACIEL, Jeanny; PAULA, Haroldo; DE PAULA, Regina. Characterization of crosslinked cashew gum derivatives. **Carbohydrate Polymers**. Fortaleza: Elsevier, 2006. v. 66, p. 16-26.

SILVA, Durcilene; FEITOSA, Judith; PAULA, Haroldo; DE PAULA, Regina. Synthesis and characterization of cashew gum/acrylic acid nanoparticles. **Materials Science and Engineering**. Fortaleza: Elsevier, 2009. v. 29, p. 437-441.

SONG, Yi; YANG, Yang; ZHANG, Yuyu; DUAN, Liusheng; ZHOU, Chunli; NI, Yuanying; LIAO, Xiaojun; LI, Quanhong; HU, Xiaosong. Effect of acetylation on antioxidant and cytoprotective activity of polysaccharides isolated from pumpkin (*Cucurbita pepo*, lady godiva). **Carbohydrate polymers**. Beijing: Elsevier, 2013. v. 98, p. 686-691.

SOPPIMATH, Kumaresh; AMINABHAVI, Tejraj; KULKARNI, Anandrao. Chemically modified polyacrylamide-g-guar gum-based crosslinked anionic microgels as pH-sensitive drug delivery systems: preparation and characterization. **Journal of Controlled Release**. Dharwad: Elsevier, 2001. v. 75, p. 331-345.

STEGLICH esterification. **Organic Chemistry Portal**. [s.l.]: 2011. Disponível em: <<http://www.organic-chemistry.org/namedreactions/steglich-esterification.shtm>>. Acesso em: 13 nov. de 2011.

SUN, Wei; MAO, Shiri; MEI, Dan; KISSEL, Thomas. Self-assembled polyelectrolyte nanocomplexes between chitosan derivatives and enoxaparin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. [s.l.]: Elsevier, 2008. v. 69, p. 417-425.

TAN, Yu-Long; LIU, Chen-Guang. Self-aggregated nanoparticles from linoleic acid modified carboxymethyl chitosan: Synthesis, characterization and application in vitro. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. China: [s.n.], 2009. v. 69, p. 178-182.

THOREK, Daniel; TSOURKAS, Andrew. Size, charge and concentration dependent uptake of iron oxide particles by non-phagocytic cells. **Biomaterials**. Philadelphia: [s.n.], 2008. v. 29, p. 3583- 3590.

VAUTHIER, Christine; DUBERNET, Catherine; FATTAL, Elias; PINTO-ALPHANDARY, Huguette; COUVREY, Patrick. Poly(alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**. Paris: [s.n.], 2003. v. 55, p. 519-548.

VINOGRADOV, Serguei; BRONICH, Tatiana; KABANOV, Alexander. Nanosize cationic hydrogels for drug delivery: preparation, properties and interaction with cells. **Advanced Drug Delivery Reviews**. Omaha: Elsevier, 2002. v. 54, p. 135-147.

WANG, Yinsong; JIANG, Qian; LIU, Ling Rong; ZHANG, Qiqing. The interaction between bovine serum albumin and the self-aggregated nanoparticles of cholesterol-modified O-carboxymethyl chitosan. **Polymer**. Tianjin: Elsevier, 2007. v. 48, p. 4135-4142.

WHISTLER, Roy. Carbohydrates in solution. **Advances in Chemistry**. Washington D.C.: Gould, 1971. p. 242-245.

WHISTLER, Roy; BEMILLER, James. Industrial gums: polysaccharides and their derivatives. **Acta Polymerica**. 3ed. New York: Academic press, 1993. v. 44. p. 172.

WOITISKI, Camile Baldin; VEIGA, Francisco; RIBEIRO, António; NEUFELD, Ronald. Design for optimization of nanoparticles integrating biomaterials for orally dosed insulin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. Coimbra: Elsevier, 2009. v. 73, p. 25-33.

YADAV, Monika; AHUJA, Munish. Preparation and evaluation of nanoparticles of gum cordial, an anionic polysaccharide for ophthalmic delivery, **Carbohydrate Polymers**. Índia: [s.n.], 2010. v. 81, p. 871-877.

YAMASHITA, Shuji; HIROMITSU, Fukushima; AKIYAMA, Yasuyuki; NIIDOME, Yasuro; MORI, Takeshi; KARAYAMA, Yoshiki; NIIDOME, Takuro. Controlled-release system of single-stranded DNA triggered by the photothermal effect of gold nanorods and its in vivo application, **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. Fukuoka: Elsevier, 2011. v. 19, p. 2130-3135.

YAN, Fei; ZHANG, Chao; ZHENG, Yi; MEI, Lin; TANG, Lina; SONG, Cunxian; SUN, Hongfan; HUANG, Laiqiang. The effect of Poloxamer 188 on nanoparticle morphology, size, cancer cell uptake and cytotoxicity. **Nanomedicine: Nanotechnology, biology and medicine**. China: Elsevier, 2010. v. 6, p. 170-178.

YANG, Liqun; KUANG, Jianliang; LI Zhiquan; ZHANG, Bifang; CAI, Xiang; ZHANG Li-Ming. Amphiphilic cholesteryl-bearing carboxymethylcellulose derivatives: self-assembly and rheological behavior in aqueous solution, **Cellulose**. China: [s.n.], 2008a. v. 15, p. 659-669.

YANG, Liqun; KUANG, Jianliang; WANG, Jun; LI, Zhiquan; ZHANG, Li-Ming. Loading and in vitro Controlled Release of Indomethacin Using Amphiphilic Cholesteryl- Bearing Carboxymethylcellulose Derivatives, **Macromolecules Bioscience**. China: [s.n.], 2008b. v. 8, p. 279-286.

YANG, Liqun; ZHANG, Bifang; WEN, Liqun; LIANG, Qiuyi; ZHANG, Li-Ming. Amphiphilic cholesteryl grafted sodium alginate derivative: Synthesis and self-assembly in aqueous solution, **Carbohydrate Polymers**. China: Elsevier, 2007. v. 68, p. 218-225.

YIN, Lichen; DING, Jieying; HE, Chunbai; CUI, Liming; TANG, Cui. YIN, Chunhua. Drug permeability and mucoadhesion properties of thiolated trimethyl chitosan nanoparticles in oral insulin delivery. **Biomaterials**. China: Elsevier, 2009. v. 30, p. 5691-5700.

Zetasizer Nano User Manual, Issue 4.0. **Malvern Instruments Ltd.**; United Kingdom (2008).

ZHANG, Hui-zhu; GAO, Fu-Ping; LIU, Ling-Rong; LI, Xue-Min; ZHOU, Zhimin; YANG, Xin-Du; ZHANG, Qi-Qing. Pullulan acetate nanoparticles prepared by solvent diffusion method for epirubicin chemotherapy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. China: Elsevier, 2009. v. 71, p. 19-26.

ZHANG, Zhongshan; WANG, Xiaomei; ZHAO, Mingxing; QI, Huimin. O-acetylation of low-molecular-weight polysaccharide from *Enteromorpha linza* with antioxidant activity. **International journal of biological macromolecules**. China: Elsevier, 2014. v. 69, p. 39-45.

ZOHURIAAN, Mohammad Jalal, SHOKROLAHI, Fatemeh. Thermal studies on natural and modified gums. **Polymer Testing**. Tehran: Elsevier, 2004. v. 23, p. 575-579.