



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

IRISVAN DA SILVA RIBEIRO

**DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS pH-RESPONSIVAS À BASE DE
GOMA DO CAJUEIRO E DOXORRUBICINA COM POTENCIAL DE APLICAÇÃO
CONTRA O CÂNCER**

FORTALEZA

2023

IRISVAN DA SILVA RIBEIRO

DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS pH-RESPONSIVAS À BASE DE
GOMA DO CAJUEIRO E DOXORRUBICINA COM POTENCIAL DE APLICAÇÃO
CONTRA O CÂNCER

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

Orientadora: Prof^a. Dra. Regina Célia Monteiro de Paula
Coorientador: Prof^o. Dr. Haroldo César Beserra de Paula

FORTALEZA

2023

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

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

R369d Ribeiro, Irisvan da Silva.

Desenvolvimento de nanopartículas pH-responsivas à base de goma do cajueiro e doxorrubicina com potencial de aplicação contra o câncer / Irisvan da Silva Ribeiro. – 2023.
134 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2023.

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

Coorientação: Prof. Dr. Haroldo César Beserra de Paula.

1. Polissacarídeo. 2. Pró-fármaco. 3. Base de Schiff. 4. Amida. 5. pH-responsiva. I. Título.

CDD 540

IRISVAN DA SILVA RIBEIRO

DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS pH-RESPONSIVAS À BASE DE
GOMA DO CAJUEIRO E DOXORRUBICINA COM POTENCIAL DE APLICAÇÃO
CONTRA O CÂNCER

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Química. Área de concentração: Química.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

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

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

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

Prof. Dr. José Delano Barreto Marinho Filho
Universidade Federal do Delta do Parnaíba (UFDPAr)

Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas
Universidade Federal do Paraná (UFPR)

Aos meus queridos pais, Francisco e Maria, pelo apoio e carinho.

AGRADECIMENTOS

À Instituição CNPq, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

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

À Universidade Federal do Ceará (UFC), em especial ao Programa de Pós-graduação em Química por todo o suporte.

Ao Laboratório CENAUREM pelas análises de ressonância magnética nuclear.

A central analítica da UFC pelas análises de microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal de varredura a laser.

A minha orientadora Prof^a. Dra. Regina Célia Monteiro de Paula, pela oportunidade, orientação e por sempre estar disposta a ajudar.

Ao Prof. Dr. Haroldo César Beserra de Paula pela coorientação e contribuição para o trabalho.

Ao Prof. Dr. Delano Barreto e a Prof^a. Dra. Ana Jérsia pela parceria e colaborações na realização do trabalho.

A Ma. Gisele Araújo pela realização das análises de citotoxicidade e pela sua disponibilidade em ajudar durante o desenvolvimento do trabalho.

A Dra. Rosemayre Freire pelas análises de microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal de varredura a laser.

Ao Dr. Jeanlex Soares pelas análises de microscopia de força atômica.

Às professoras do Laboratório de Polímeros Judith Feitosa, Jeanny Maciel e Pablyana da Cunha por todo o suporte e disponibilidade.

Aos professores Rilton de Freitas, Adonay Loiola e Luiz Gonzaga pelas contribuições para o trabalho durante o exame de qualificação.

Ao Laboratório de Polímeros e a todos que fazem parte desse grupo maravilhoso.

A todo o corpo docente da Química pela dedicação e esforço para ensinar os alunos.

Aos alunos de iniciação científica Joan Pontes e Adisom Lucas pela ajuda no desenvolvimento do trabalho.

Ao operador do CENAUREM Dr. Venícios Sombra pela aquisição dos espectros de ressonância magnética nuclear.

Ao Dr. Wellinson Gadelha pela ajuda com a análise de cromatografia líquida de alta eficiência.

À Ma. Nádia Aline pelas análises de espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier.

A Ma. Raelle Gomes pela ajuda com as ilustrações e figuras para o trabalho.

Ao Me. Luis Felipe pela correção do Abstract.

A Ma. Maria Magalhães por todos os ensinamentos, reflexões, críticas, sugestões e ajuda durante o desenvolvimento do trabalho.

Ao meu grande amigo e irmão Carlos Rhamon pelos conselhos e ajuda em todos os momentos.

Aos meus queridos pais, Francisco Antônio Alves Ribeiro e Maria Aprigio da Silva, por todo esforço, carinho, dedicação, amor e incentivo, que mesmo à distância sempre estiveram tão presentes.

As minhas queridas irmãs Keylha Silva, Jakline Aprigio e Irisneide Ribeiro que sempre acreditaram nos meus sonhos e me apoiaram nessa caminhada.

A Macileide Almeida minha grande amiga e companheira, por sempre estar ao meu lado, por todo o seu amor, apoio e incentivo todos os dias.

A todos os meus amigos que ajudaram de forma direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

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

“Lute pelo seu sonho e não se envergonhe
de chorar quando conseguir.”

(Autor desconhecido)

RESUMO

Pró-fármacos poliméricos obtidos a partir da conjugação polissacarídeo-fármaco via ligações covalentes pH-responsivas são uma estratégia promissora para a administração de fármacos anticancerígenos no local alvo (células cancerosas), devido ao microambiente ácido em células e tecidos tumorais. O presente trabalho propôs a síntese de pró-fármacos a partir da goma do cajueiro e da doxorubicina (DOX) via reação de formação da base de *Schiff* e reação de amidação com química de carbodiimida. Os pró-fármacos sintetizados foram caracterizados por espectroscopia na região do infravermelho, ressonância magnética nuclear de hidrogênio, cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia de exclusão por tamanho. A eficácia da síntese dos pró-fármacos foi determinada por espectroscopia UV-vis. A eficiência de fármaco ligado foi de 64%, 74% e 75% para os pró-fármacos sintetizados via formação da ligação amina, amida e imina, respectivamente. Os pró-fármacos apresentaram capacidade de auto-organização em meio aquoso com concentração de associação crítica inferior a $200 \mu\text{g mL}^{-1}$. As nanopartículas de pró-fármacos foram obtidas pelo método ultrassônico direto em tampão fosfato e/ou água deionizada e foram caracterizadas por espalhamento dinâmico de luz, microscopia eletrônica de varredura e microscopia de força atômica. A distribuição de tamanho das nanopartículas foi unimodal e o potencial zeta negativo, o diâmetro hidrodinâmico em tampão fosfato variou de 160 a 245 nm e o diâmetro das nanopartículas secas variou de 20 a 135 nm. As nanopartículas de pró-fármacos apresentaram perfil de liberação prolongada e dependente do pH. As nanopartículas de pró-fármacos apresentaram atividade citotóxica contra células do câncer colorretal humano (HCT-116) e câncer de mama humano (MCF-7) e citotoxicidade inferior à da DOX livre contra células não tumorais de fibroblastos murinos (L929). Além disso, o ensaio de absorção intracelular confirmou que as nanopartículas de pró-fármacos foram absorvidas pelas células HCT-116.

Palavras-chave: polissacarídeo; pró-fármaco; base de *Schiff*; amida; pH-responsiva.

ABSTRACT

Polymeric prodrugs obtained from polysaccharide-drug conjugation via pH-responsive covalent bonds are a promising strategy for the administration of anticancer drugs at the target site (cancer cells), due to the acidic microenvironment in tumor cells and tissues. The present work proposed the synthesis of prodrugs from cashew gum and doxorubicin (DOX) via Schiff base formation reaction and amidation reaction through the carbodiimide chemistry. The synthesized prodrugs were characterized by infrared spectroscopy, hydrogen nuclear magnetic resonance, high-performance liquid chromatography and size exclusion chromatography. The efficiency of prodrug synthesis was determined by UV-vis spectroscopy. The drug conjugation efficiency was 64%, 74% and 75% for prodrugs synthesized via amine, amide and imine bond formation, respectively. The prodrugs exhibited the ability to self-organize in aqueous media with critical association concentration lower than 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Prodrug nanoparticles were obtained by direct ultrasonic method in phosphate buffer and/or distilled water and were characterized by dynamic light scattering, scanning electron microscopy and atomic force microscopy. The size distribution of the nanoparticles was unimodal, with a negative zeta potential. The hydrodynamic diameter in phosphate buffer ranged from 160 to 245 nm, and the diameter of dry nanoparticles ranged from 20 to 135 nm. The prodrug nanoparticles showed a extended and pH-dependent release profile. The nanoparticles of the prodrugs GC-S-DOX and GCCM-D-DOX exhibited cytotoxic activity against human colorectal cancer cells (HCT-116) and human breast cancer cells (MCF-7), with lower cytotoxicity than DOX against non-tumor murine fibroblast cells (L929). Furthermore, the intracellular uptake assay confirmed that GC-S-DOX (cashew gum-Schiff base-doxorubicin) prodrug nanoparticles were absorbed by HCT-116 cells.

Keywords: polysaccharide; prodrug; Schiff base; amide; pH-responsive.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Principais abordagens terapêuticas para o tratamento contra o câncer.....	24
Figura 2	- Representação da estrutura química da doxorubicina.....	28
Figura 3	- Linha do tempo com desenvolvimento de formulações farmacêuticas convencionais e baseadas em nanotecnologia para a doxorubicina.....	29
Figura 4	- Mecanismo de oxidação da β -D-galactose com periodato de sódio.....	34
Figura 5	- Representação esquemática da seletividade da reação de oxidação com periodato de sódio para a β -D-galactose ligada (C1→C2), (C1→C3), (C1→C4), (C1→C6) e terminal.....	35
Figura 6	- Representação esquemática do mecanismo de carboximetilação da β -D-galactose com ácido cloro acético em meio básico (Y = CH ₂ COOH).....	36
Figura 7	- Monossacarídeos componentes da estrutura da goma do cajueiro do Nordeste do Brasil (A). Proposta de representação estrutural de um segmento da goma do cajueiro (R representa ramnose ou arabinose) (B).....	38
Figura 8	- Representação esquemática do mecanismo da reação de formação da base de <i>Schiff</i> entre um aldeído e uma amina primária.....	40
Figura 9	- Representação esquemática do mecanismo da reação de amidação com química de carbodiimida entre um ácido carboxílico e uma amina primária utilizando EDC e NHS.....	43
Figura 10	- Fluxograma com o passo a passo do desenvolvimento do trabalho.....	48
Figura 11	- Ilustração da síntese do derivado GCOX via reação de oxidação seletiva com periodato de sódio (o R representa a continuação da cadeia do polissacarídeo).....	60

Figura 12	- Possíveis estruturas para a unidade de galactose de derivados da GCOX: (I) aldeído livre, (II) hemiacetal intramolecular, (III) hemialdol e (IV) aldeídos hidratados.....	61
Figura 13	- Espectros de FTIR da GC e do derivado GCOX.....	62
Figura 14	- Espectros de RMN ¹ H da GC e do derivado GCOX.....	63
Figura 15	- Cromatogramas de SEC das soluções aquosas de GC e do derivado GCOX.....	64
Figura 16	- Ilustração da síntese do derivado GCCM via reação de carboximetilação com o ácido cloro acético em meio básico (R representa a continuação da cadeia do polissacarídeo e Y o grupo substituinte adicionado a estrutura do polissacarídeo).....	65
Figura 17	- Espectros de FTIR da GC H ⁺ e do derivado GCCM H ⁺	65
Figura 18	- Cromatogramas de SEC da GC e do derivado GCCM.....	67
Figura 19	- Representação dos produtos da β-eliminação para um oligossacarídeo do ácido galacturônico (o R representa a continuação da cadeia do oligossacarídeo).....	68
Figura 20	- Representação dos produtos da β-eliminação para um fragmento da GCCM (R representa a continuação da cadeia do polissacarídeo).....	69
Figura 21	- Ilustração da síntese do pró-fármaco GC-S-DOX via reação de formação da base de <i>Schiff</i> (A) e do pró-fármaco GC-A-DOX via reação de aminação redutiva com NaBH ₄ (B) (o R representa a continuação da cadeia do polissacarídeo).	70
Figura 22	- Espectros de FTIR do derivado GCOX, do DOX.HCl e dos pró-fármacos GC-S-DOX e GC-A-DOX.....	72
Figura 23	- Espectros de RMN ¹ H do derivado GCOX, do DOX.HCl e dos pró-fármacos GC-S-DOX e GC-A-DOX.....	73
Figura 24	- Cromatogramas de HPLC do derivado GCOX, do DOX.HCl e dos pró-fármacos GC-S-DOX e GC-A-DOX.....	74
Figura 25	- Cromatogramas de SEC do derivado GCOX e dos pró-fármacos GC-S-DOX e GC-A-DOX.....	75

Figura 26	- Relação entre a razão de intensidade de fluorescência do pireno (I_{372}/I_{383} ou I_{338}/I_{334}) e a concentração de pró-fármacos GC-S-DOX (A) ou GC-A-DOX (B) em tampão fosfato (pH = 7,4 a 37 °C).....	76
Figura 27	- Distribuição de tamanho das nanopartículas de pró - fármacos GC-S-DOX (A) e GC-A-DOX (B) em tampão fosfato a 37 °C (pH = 7,4; 0,1 mol L ⁻¹)	77
Figura 28	- Micrografias das nanopartículas do pró-fármaco GC-S-DOX.....	79
Figura 29	- Micrografias das nanopartículas do pró-fármaco GC-A-DOX.....	79
Figura 30	- AFM das nanopartículas de pró-fármacos obtidos via reação de formação da base de <i>Schiff</i> GC-S-DOX (A e B) e GC-A-DOX (C e D).....	80
Figura 31	- Liberação cumulativa de DOX em função do pH para as nanopartículas dos pró-fármacos GC-S-DOX (A) e GC-A-DOX (B).....	81
Figura 32	- Viabilidade celular <i>in vitro</i> do derivado GCOX contra as linhagens tumorais de células de câncer colorretal (HTC- 116), câncer de mama (MCF-7) e a linhagem não tumoral de fibroblasto murino (L929) após 72 h de incubação	84
Figura 33	- Viabilidade celular <i>in vitro</i> das nanopartículas do pró-fármaco GC-A-DOX contra as linhagens tumorais de células de câncer colorretal (HTC-116), câncer de mama (MCF-7) e a linhagem não-tumoral de fibroblasto murino (L929) após 72 h de incubação.....	85
Figura 34	- Viabilidade celular <i>in vitro</i> das nanopartículas do pró-fármaco GC-S-DOX contra as linhagens tumorais de células de câncer colorretal (HTC-116), câncer de mama (MCF-7) e a linhagem não-tumoral de fibroblasto murino (L929) após 72 h de incubação.....	86

Figura 35	- Captação celular da DOX livre e das nanopartículas do pró-fármaco GC-S-DOX após incubação em células HCT-116 por 24 h.....	88
Figura 36	- Espectros de FTIR da GC, do DOX.HCl e do pró-fármaco GC-D-DOX.....	90
Figura 37	- Espectros de RMN ¹ H da GC, do DOX.HCl e do pró-fármaco GC-D-DOX obtidos no equipamento da Bruker® advance modelo DRX500 usando DMSO-d6 como solvente a 25 °C...	91
Figura 38	- Cromatogramas de HPLC da GC pura, do DOX.HCl e do pró-fármaco GC-D-DOX.....	92
Figura 39	- Cromatogramas de SEC da GC pura e do pró-fármaco GC-D-DOX.....	93
Figura 40	- Ilustração da síntese do pró-fármaco GCCM-D-DOX via reação de amidação.....	94
Figura 41	- Espectros de FTIR do derivado GCCM, do DOX.HCl e do pró-fármaco GCCM-D-DOX.....	95
Figura 42	- Espectros de RMN ¹ H do derivado GCCM, do DOX.HCl e do pró-fármaco GCCM-D-DOX.....	96
Figura 43	- Cromatogramas de HPLC do derivado GCCM, do DOX.HCl e do pró-fármaco GCCM-D-DOX.....	97
Figura 44	- Cromatogramas de SEC do derivado GCCM e do pró-fármaco GCCM-D-DOX.....	98
Figura 45	- Relação entre a razão de intensidade de fluorescência do pireno (I ₃₇₂ /I ₃₈₃ ou I ₃₃₈ /I ₃₃₄) e a concentração de pró-fármacos GC-D-DOX.....	99
Figura 46	- Distribuição de tamanho das nanopartículas de pró-fármacos GC-D-DOX (A) e GCCM-D-DOX (B) em tampão fosfato a 37 °C (pH = 7,4; 0,1 mol L ⁻¹).....	100
Figura 47	- MEV das nanopartículas do pró-fármaco GC-D-DOX.....	102
Figura 48	- MEV das nanopartículas do pró-fármaco GCCM-D-DOX.....	102

Figura 49	- AFM das nanopartículas de pró-fármacos obtidos via reação de amidação com química de carbodiimida GC-D-DOX (A e B) e GCCM-D-DOX (C e D).....	103
Figura 50	- Liberação cumulativa de DOX em função do pH para as nanopartículas dos pró-fármacos GC-D-DOX (A) e GCCM-D-DOX (B).....	104
Figura 51	- Reação de hidrólise de uma amida em meio aquoso catalisada por ácido.....	105
Figura 52	- Liberação cumulativa de DOX em função do pH para as nanopartículas dos pró-fármacos GC-S-DOX (A) e GCCM-D-DOX (B).....	110
Figura 53	- Reação de hidrólise de uma amida em meio aquoso catalisada por ácido.....	111
Figura 54	- Reação de hidrólise de uma imina em meio aquoso catalisada por ácido.....	112
Figura 55	- Ilustração para o comportamento dos pró-fármacos em solução aquosa.....	112
Figura 56	- Ilustração do direcionamento passivo e captação celular das nanopartículas de pró-fármacos no tecido tumoral.....	113

LISTA DE TABELAS

Tabela	1	- Dados do GLOBOCAN para os tipos de câncer mais diagnosticados e com mais óbitos registrados no mundo no ano de 2020.....	22
Tabela	2	- Principais produtos de pró-fármacos para o tratamento do câncer disponíveis no mercado ou em fase de ensaios clínicos, mecanismo de ativação e objetivo terapêutico.....	31
Tabela	3	- Parâmetros reacionais e resultados para a síntese de pró-fármacos a base de polissacarídeos via reação de formação da base de <i>Schiff</i>	41
Tabela	4	- Parâmetros reacionais e resultados para a síntese de pró-fármacos a base de polissacarídeos via reação de amidação com química de carbodiimida.....	45
Tabela	5	- Dados da síntese dos pró-fármacos via reação de formação da base de <i>Schiff</i> e aminação redutiva.....	52
Tabela	6	- Dados da síntese dos pró-fármacos via reação de amidação com química de carbodiimida.....	53
Tabela	7	- Rendimento e grau de oxidação do derivado GCOX.....	61
Tabela	8	- Dados de massa molar da GC e do derivado GCOX determinados por SEC.....	64
Tabela	9	- Rendimento e teor de grupos ácido do derivado GCCM.....	66
Tabela	10	- Dados de massa molar da GC e do derivado GCCM determinados por cromatografia de exclusão por tamanho....	67
Tabela	11	- Propriedades dos pró-fármacos. Rendimento reacional (RR), carga de fármaco ligado (CFL), eficiência de fármaco ligado (EFL) e concentração de associação crítica (CAC).....	71
Tabela	12	- Dados de massa molar do derivado GCOX e dos pró-fármacos GC-S-DOX e GC-A-DOX determinados por cromatografia de exclusão por tamanho.....	75
Tabela	13	- Parâmetros físico-químicos das nanopartículas de pró-fármacos GC-S-DOX e GC-A-DOX.....	77

Tabela	14	- Parâmetros estimados pelo modelo cinético de Zeng para liberação cumulativa de DOX das nanopartículas de pró-fármacos GC-S-DOX e GC-A-DOX.....	82
Tabela	15	- Atividade citotóxica <i>in vitro</i> do derivado GCOX, da DOX e das nanopartículas dos pró-fármacos GC-S-DOX e GC-A-DOX em células L929, HCT-116 e MCF- 7 após 72 h de incubação.....	87
Tabela	16	- Propriedades do pró-fármaco GC-D-DOX. Rendimento reacional (RR), carga de fármaco ligado (CFL), eficiência de fármaco ligado (EFL) e concentração de associação crítica (CAC).....	90
Tabela	17	- Dados de massa molar da GC pura e do pró-fármaco GC-D-DOX determinados por cromatografia de exclusão por tamanho.....	93
Tabela	18	- Propriedades dos pró-fármacos. Rendimento reacional (RR), carga de fármaco ligado (CFL), eficiência de fármaco ligado (EFL) e concentração de associação crítica (CAC).....	94
Tabela	19	- Dados de massa molar do derivado GCCM e do pró-fármaco GCCM-D-DOX determinados por cromatografia de exclusão por tamanho.....	98
Tabela	20	- Parâmetros físico-químicos das nanopartículas de pró-fármacos.....	100
Tabela	21	- Parâmetros estimados pelo modelo cinético de Zeng para liberação cumulativa de DOX das nanopartículas de pró-fármacos GC-D-DOX e GCCM-D-DOX.....	106
Tabela	22	- Atividade citotóxica <i>in vitro</i> do derivado GCCM, da DOX e das nanopartículas do pró-fármaco GCCM-D-DOX em células L929, HCT-116 e MCF- 7 após 72 h de incubação....	107
Tabela	23	- Propriedades dos pró-fármacos. Rendimento reacional (RR), carga de fármaco ligado (CFL) e eficiência de fármaco ligado (EFL).....	108
Tabela	24	- Parâmetros físico-químicos das nanopartículas de pró-fármacos GC-S-DOX e GCCM-D-DOX.....	109

Tabela 25	- Atividade citotóxica <i>in vitro</i> da DOX e das nanopartículas dos pró-fármacos GC-S-DOX e GCCM-D-DOX em células L929, HCT-116 e MCF-7 após 72 h de incubação.....	113
-----------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACA	Ácido cloro acético
AFM	Microscopia de força atômica
ANOVA	Análise de variância
CAC	Concentração de associação crítica
CFL	Carga de fármaco ligado
CI ₅₀	Concentração inibitória média
Đ	Dispersão
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DCC	N,N-diciclohexilcarbodiimida
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
DMSO	Dimetil sulfóxido
DOX	Doxorrubicina
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EFL	Eficiência de fármaco ligado
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPR	Efeito de permeabilidade e retenção
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FTIR	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier
GC	Goma do cajueiro
GC H ⁺	Goma do cajueiro protonada
GC-A-DOX	Goma do cajueiro - ligação amina - doxorrubicina
GCCM	Goma do cajueiro carboximetilada
GCCM H ⁺	Goma do cajueiro carboximetilada protonada
GCCM-D-DOX	Goma do cajueiro carboximetilada - ligação amida - doxorrubicina
GC-D-DOX	Goma do cajueiro - ligação amida - doxorrubicina
GC-S-DOX	Goma do cajueiro - base de <i>Schiff</i> - doxorrubicina
GCOX	Goma do cajueiro oxidada
GO	Grau de oxidação
HPLC	Cromatografia Líquida de alta eficiência

IPD	Índice de polidispersão
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MS	Ministério da saúde
Mn	Massa molar numérica média
Mpk	Massa molar de pico
Mw	Massa molar ponderal média
MTT	3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio
NHS	N-hidroxissuccinimida
SEC	Cromatografia de exclusão por tamanho
Pζ	Potencial zeta
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
S _N 2	Substituição nucleofílica bimolecular
Sulfo-NHS	N-hidroxisulfossuccinimida
TEA	Trietilamina
TEMPO	2,2,6,6-tetrametil-1-piperidinóxi

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
1.1	Câncer	22
1.1.1	<i>Doxorrubicina</i>	27
1.2	Pró-fármacos poliméricos	30
1.3	Polissacarídeos	32
1.3.1	<i>Oxidação de polissacarídeos</i>	33
1.3.2	<i>Carboximetilação de polissacarídeos</i>	36
1.3.3	<i>Goma do Cajueiro</i>	37
1.4	Química “click”	39
1.4.1	<i>Base de Schiff</i>	39
1.4.2	<i>Química de carbodiimida</i>	42
2	OBJETIVOS	47
2.1	Objetivo geral	47
2.2	Objetivos específicos	47
3	MATERIAIS E MÉTODOS	48
3.1	Etapas do desenvolvimento do trabalho	48
3.2	Materiais	49
3.3	Reação de oxidação	49
3.4	Reação de carboximetilação	50
3.5	Síntese dos pró-fármacos via reação de formação da base de Schiff	51
3.6	Síntese de pró-fármacos via reação de amidação	52
3.7	Carga de fármaco ligado (CFL) e eficiência de fármaco ligado (EFL)	53
3.8	Preparação das nanopartículas de pró-fármacos	53
3.9	Caracterização físico-química	54
3.9.1	<i>Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)</i>	54
3.9.2	<i>Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H)</i>	54
3.9.3	<i>Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)</i>	54
3.9.4	<i>Cromatografia de exclusão por tamanho (SEC)</i>	54
3.9.5	<i>Concentração de associação crítica (CAC)</i>	55

3.9.6	<i>Espalhamento de luz dinâmico (DLS)</i>	56
3.9.7	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	56
3.9.8	<i>Microscopia de força atômica (AFM)</i>	56
3.10	Ensaio de liberação de DOX.....	57
3.11	Mecanismo de liberação da DOX.....	57
3.12	Citotoxicidade.....	58
3.13	Ensaio de captação celular.....	59
3.14	Análise estatística.....	59
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
4.1	Caracterização dos derivados da goma do cajueiro.....	60
4.1.1	<i>Caracterização da goma do cajueiro oxidada (GCOX)</i>	60
4.1.2	<i>Caracterização da goma do cajueiro carboximetilada (GCCM)</i> ...	64
4.2	Pró-fármacos de doxorubicina via reação de formação da base de Schiff.....	69
4.2.1	<i>Síntese e caracterização dos pró-fármacos de goma do cajueiro oxidada e doxorubicina</i>	69
4.2.2	<i>Caracterização físico-química das nanopartículas de goma do cajueiro oxidada e doxorubicina</i>	76
4.2.3	<i>Estudo in vitro das nanopartículas de goma do cajueiro oxidada e doxorubicina</i>	81
4.3	Pró-fármacos de doxorubicina via reação de amidação com química de carbodiimida.....	89
4.3.1	<i>Síntese e caracterização do pró-fármaco de goma do cajueiro e doxorubicina</i>	89
4.3.2	<i>Síntese e caracterização do pró-fármaco de goma do cajueiro carboximetilada e doxorubicina</i>	94
4.3.3	<i>Caracterização físico-química das nanopartículas de pró-fármacos de amidação</i>	99
4.3.4	<i>Estudo in vitro das nanopartículas de pró-fármacos de amidação</i>	104
4.4	Pró-fármaco GC-S-DOX versus pró-fármaco GCCM-D-DOX.....	108
5	CONCLUSÃO	115
	REFERÊNCIAS	116

APÊNDICE A - CURVAS DE TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA ÁCIDO-BASE DA GC (A), GCOX (B) E GCCM (C) COM HIDRÓXIDO DE SÓDIO E DA GCOX (D) PELO MÉTODO DO CLORIDRATO DE HIDROXILAMINA/HIDRÓXIDO DE SÓDIO.....	129
APÊNDICE B - ACOMPANHAMENTO DA SAÍDA DE DMSO NA ÁGUA DE DIÁLISE POR ESPECTROSCOPIA UV-VIS.....	130
APÊNDICE C - CURVA DE CALIBRAÇÃO DA DOX EM DMSO NO UV-VIS.....	131
APÊNDICE D - CROMATOGRAMAS DOS PADRÕES DE PULULANA (A) E A CURVA DE PULULANA POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO (B).....	132
APÊNDICE E - DADOS E CURVAS DE CALIBRAÇÃO DA DOX POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.....	133
APÊNDICE F - EXPANSÃO DAS BANDAS SOBREPOSTAS DOS ESPECTROS DE FTIR DA GCOX, DOX E PRÓ-FÁRMACOS GC-S-DOX E GC-A-DOX.....	134

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

Câncer é o nome dado a um conjunto de doenças caracterizadas pelo crescimento desordenado de células formando tumores que podem invadir tecidos e órgãos ou se espalhar por todo o organismo (metástase). O câncer é um grande problema de saúde pública em todo o mundo devido ao grande número de casos e óbitos, em 2020 foram registrados 19 milhões de novos casos e 9,9 milhões de óbitos (SUNG *et al.*, 2021).

Entre os tipos de câncer com maior número de casos registrados no mundo para o sexo masculino, o câncer de pulmão é o mais diagnosticado (1.435.943 novos casos em 2020) e o que causa maior número de óbitos (1.188.679 óbitos em 2020). No sexo feminino o câncer de mama é o mais diagnosticado (2.261.419 novos casos em 2020) e o que causa maior número de óbitos (684.996 óbitos em 2020) (SUNG *et al.*, 2021). Os outros tipos de câncer com grande número de casos diagnosticados e óbitos registrados no mundo em 2020 estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Dados do GLOBOCAN para os tipos de câncer mais diagnosticados e com mais óbitos registrados no mundo no ano de 2020

Tipos de câncer	Novos casos	Óbitos registrados
Mama	2.261.419	684.996
Pulmão	2.206.771	1.796.144
Colorretal	1.931.590	935.173
Próstata	1.414.259	375.304
Estômago	1.089.103	768.793
Fígado	905.677	830.180
Colo do útero	604.127	341.831
Esôfago	604.100	544.076
Tireoide	586.202	43.646
Bexiga	573.278	212.536
Linfoma não-Hodgkin	544.352	259.793
Pâncreas	495.773	466.003

Tipos de câncer	Novos casos	Óbitos registrados
Leucemia	474.519	311.594
Rim	431.288	179.368
Corpo uterino	417.367	97.370
Lábio, cavidade oral	377.713	177.757
Melanoma de pele	324.635	57.043
Ovário	313.959	207.252
Cérebro, sistema nervoso central	308.102	251.329
Laringe	184.615	99.840
Outros	3.243.940	1.318.205
Total	19.292.789	9.958.133

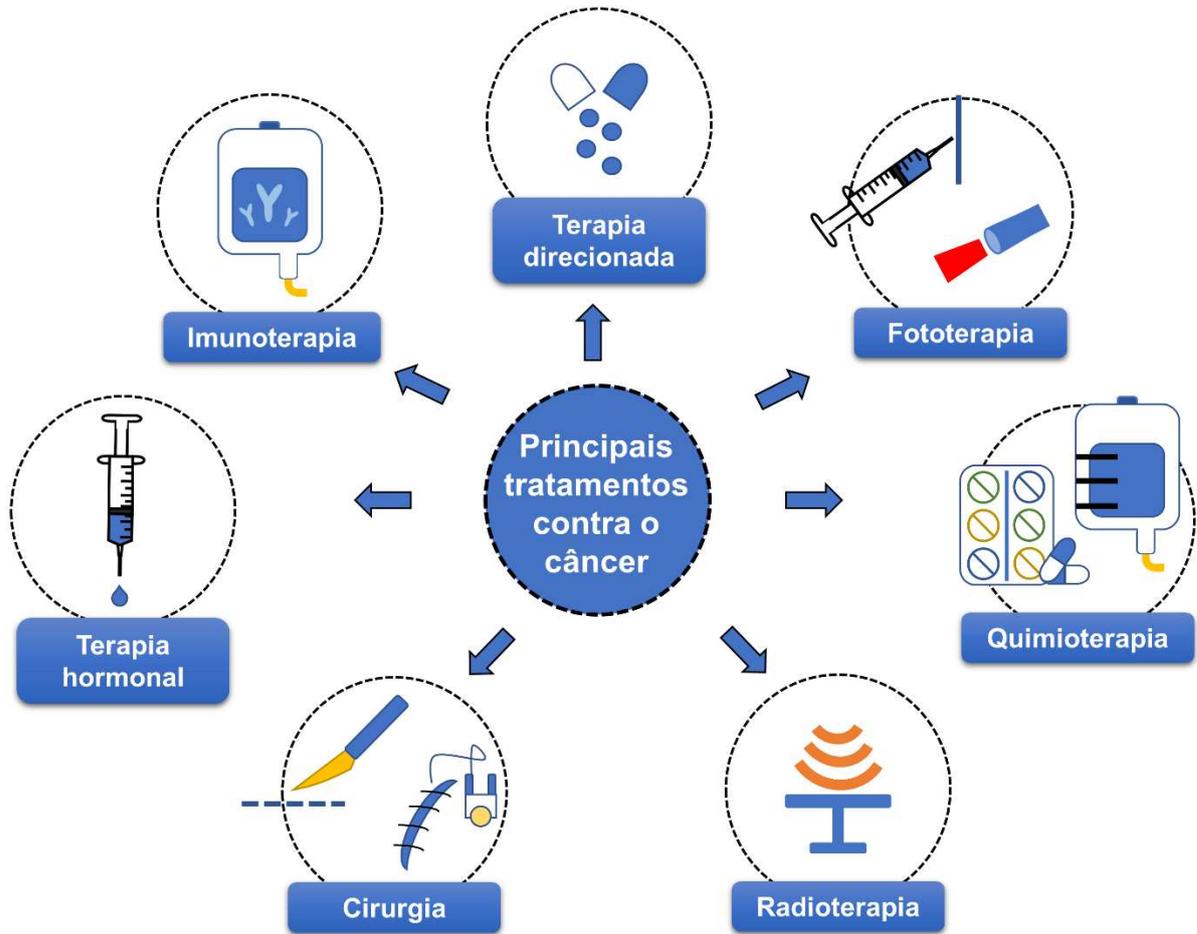
Fonte: adaptado de GLOBOCAN (2020).

No Brasil, no ano de 2023 o câncer com maior incidência e óbitos registrados no sexo masculino foi o câncer de próstata (71.730 novos casos diagnosticados em 2023 e 16.300 óbitos registrados em 2021) e no sexo feminino o câncer de mama (73.610 novos casos diagnosticados em 2023 e 18.139 óbitos registrados em 2021). Além disso, a estimativa para o triênio de 2023 a 2025 aponta que ocorrerão 704 mil casos novos de câncer no Brasil, 483 mil se excluídos os casos de câncer de pele não melanoma (MS/INCA, 2023).

Devido ao aumento dos números de casos de câncer ao longo dos anos e a redução do percentual de pessoas curadas para determinados tipos de câncer (ex.: pulmão, colorretal, fígado, estômago) têm-se buscado novas estratégias para melhorar os tratamentos existentes contra o câncer que atualmente consistem em imunoterapia, terapia hormonal, cirurgia, radioterapia, quimioterapia, fototerapia e terapia direcionada (Figura 1).

A imunoterapia é uma abordagem emergente e complementar empregada para tratar pacientes com câncer usando o próprio sistema imunológico. O objetivo é potencializar o sistema imunológico, utilizando anticorpos que se ligam e impedem a função de proteínas expressas por células cancerosas. Outras abordagens utilizam vacinas (Cervarix e Provenge), injeção de células troncos ou células imunes modificadas (DARVISHI *et al.*, 2023). A imunoterapia provoca o aumento da resposta imune do paciente, estimulando a ação das células de defesa do organismo.

Figura 1 - Principais abordagens terapêuticas para o tratamento contra o câncer



Fonte: elaborado pelo autor.

A terapia hormonal tem como objetivo impedir a ação dos hormônios em algumas células tumorais (ex.: mama e próstata) que possuem receptores específicos para hormônios, como os de estrogênio, progesterona e andrógeno. Esses hormônios são responsáveis pelo crescimento e proliferação das células cancerosas, portanto, a terapia hormonal é utilizada para impedir que o hormônio seja produzido ou destruir o receptor ao qual ele se liga ou criar análogos dos hormônios e ligá-lo ao receptor para que o hormônio real não seja capaz de se ligar (KASHIFA *et al.*, 2022). No entanto, as indicações de terapia hormonal são limitadas e há diversos efeitos colaterais importantes, incluindo anemia, disfunção cardíaca, danos nas funções hepática e renal (LI *et al.*, 2021a).

A cirurgia é o mais antigo tipo de terapia contra o câncer e o principal tratamento utilizado por ser uma opção eficaz para tumores cancerígenos pequenos e localizados. Embora a cirurgia possa ser muitas vezes a única forma de tratar

tumores sólidos que são resistentes à radiação e à quimioterapia, processos cirúrgicos apresentam alta taxa de recorrência tumoral (LIANG *et al.*, 2023).

A radioterapia é o tratamento contra o câncer que utiliza altas doses de radiação para controlar a proliferação de células cancerosas e diminuir tumores. Como a radiação representa um risco para o tecido normal, incluindo a formação de cânceres induzidos por radiação, os feixes de radiação devem ser aplicados, em um determinado intervalo de tempo, a um volume de tecido que engloba o tumor, buscando erradicar todas as células tumorais, com o menor dano possível ao tecido normal. No entanto, sempre haverá tecido saudável que será afetado pelo tratamento e a taxa de recorrência tumoral desse tratamento é alta (TAGHIZADEH-HESARY *et al.*, 2023).

A quimioterapia é a principal forma de tratamento contra o câncer, já que os quimioterápicos utilizados podem combater células cancerosas localizadas ou espalhadas por todo o organismo, sua administração pode ocorrer por via oral, intramuscular ou intravenosa. Infelizmente, não existem quimioterápicos com atividade antitumoral específica, eles não apenas inibem a proliferação descontrolada de células tumorais, mas também suprimem as células normais que possuem altas taxas de proliferação, como folículos pilosos, epitélio do trato digestivo e células-tronco da medula óssea, levando a efeitos colaterais graves e danos em células e tecidos normais (BEHRANVAND *et al.*, 2022).

A terapia fotodinâmica é um método de tratamento do câncer que minimiza os efeitos colaterais nos tecidos normais e destrói especificamente apenas os tecidos tumorais irradiando luz com um comprimento de onda que pode ativar seletivamente um fotossensibilizador capaz de gerar espécies reativas de oxigênio acumuladas em células cancerosas (ZENG *et al.*, 2023). No entanto, terapia fotodinâmica tem limitações no tratamento de tumores profundos devido à limitada profundidade de penetração da luz de ativação do fotossensibilizador, que corresponde principalmente às regiões ultravioleta e visível (CHOI; KIM, 2023).

A terapia direcionada vem se tornando uma excelente alternativa no tratamento contra o câncer ao utilizar sistemas que possam reconhecer células tumorais e/ou características específicas do tecido tumoral e propiciar uma ação mais eficiente dos quimioterápicos nos tecidos e células de interesse (tecido tumoral), minimizando a exposição dos órgãos e tecidos saudáveis (KONG *et al.*, 2023). Nanopartículas podem ser utilizadas na terapia direcionada para encapsular e

proteger porções terapêuticas (hidrofílicas e lipofílicas), atingir o tumor (via abordagem ativa ou passiva), superar a quimiorresistência (para aumentar a captação de células tumorais), controlar a liberação do fármaco e aumentar o acúmulo de fármacos nos tecidos tumorais via efeito de permeabilidade e retenção (EPR) aprimorada (ZENG *et al.*, 2023).

Produtos que fornecem uma liberação controlada de um princípio ativo foram descritos pela primeira vez como uma nova classe importante de forma farmacêutica no final dos anos 1940 e início dos anos 1950. Ao longo dos anos, muitos termos e siglas foram usados para descrever e classificar os tipos de liberação desses produtos, no entanto, o termo “liberação modificada” tornou-se de uso geral para descrever formas de dosagem com características de liberação do fármaco com base no tempo, curso e/ou local que são projetadas para atingir objetivos terapêuticos não oferecidos pelas formas convencionais (liberação imediata) (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2011). A liberação modificada pode ser subdividida em liberação prolongada, liberação retardada, liberação direcionada e ação repetida (dupla).

Produtos com liberação prolongada são projetados para liberar o princípio ativo de uma maneira controlada, numa taxa, duração e local de alcance pré-determinados, além de manter os níveis sanguíneos terapêuticos do fármaco. Permite assim, uma redução na frequência da dosagem, quando comparada com o medicamento apresentado na forma de liberação convencional (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2011).

Produtos farmacêuticos com liberação retardada possuem um revestimento entérico (ex.: aspirina), fazendo com que durante a passagem pelo estômago, o fármaco permaneça inalterado e seja liberado somente no trato intestinal. Revestimentos entéricos são utilizados para proteger a substância da destruição pelos fluidos gástricos, reduzir a irritação estomacal e facilitar o trânsito gastrintestinal de fármacos que são melhor absorvidos no intestino (SHARGEL; WU PONG; YU, 2012a).

A liberação direcionada descreve a liberação do fármaco direcionada para uma região do corpo ou tecido para maior absorção e ação do fármaco no organismo. As formas farmacêuticas de liberação direcionada podem ter características de liberação imediata ou prolongada e podem ser classificadas de acordo com o seu direcionamento como passivo ou ativo (SHARGEL; WU-PONG; YU, 2012b).

O direcionamento passivo refere-se à exploração dos perfis de disposição natural (passivo) de um carreador de fármaco, que são determinados passivamente por suas propriedades físico-químicas relativas às características anatômicas e fisiológicas do corpo. O direcionamento ativo refere-se a alterações da disposição natural de um carreador de fármaco, direcionando-o para células, tecidos ou órgãos específicos. Uma abordagem para o direcionamento ativo é o uso de ligantes ou anticorpos monoclonais que podem atingir células específicas (SHARGEL; WU-PONG; YU, 2012b).

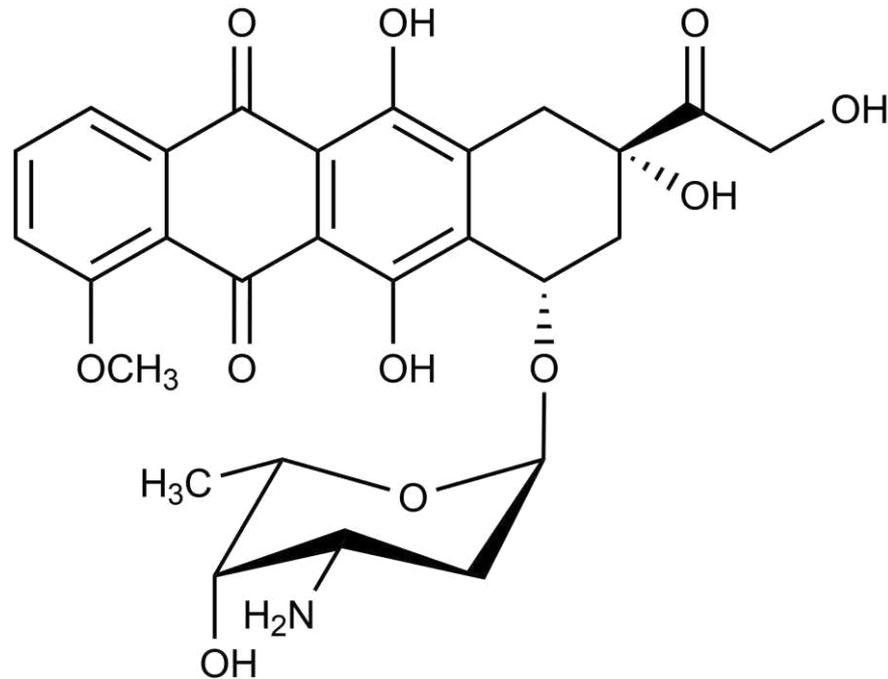
As formas de ação repetida geralmente contêm duas doses únicas de medicamento, uma para liberação imediata e a segunda para liberação retardada. Os comprimidos de duas camadas, por exemplo, podem ser preparados com uma camada de fármaco para liberação imediata com a segunda camada projetada para liberar o fármaco mais tarde, como uma segunda dose ou na forma de liberação prolongada (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2011).

1.1.1 Doxorrubicina

A doxorrubicina (DOX) é um quimioterápico da classe das antraciclinas com grande potencial terapêutico, sendo considerada um dos mais potentes quimioterápicos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA). A DOX é caracterizada por múltiplos mecanismos de ação citotóxica, tais como: (I) intercalação entre os pares de bases do DNA, formando fortes complexos e, conseqüentemente, interferindo na síntese tanto do DNA quanto do RNA; (II) inibição da enzima topoisomerase II; (III) geração de radicais livres e estresse oxidativo e (IV) dano à membrana celular devido ao metabolismo alterado dos esfingolipídios (NICOLETTO; OFNER, 2022).

A DOX é uma molécula pequena (Figura 2) que possui em sua estrutura quatro anéis condensados com grupos adjacentes quinona-hidroquinona e substituintes metoxi, álcool, cetona e um açúcar (daunosamina) ligado a um dos anéis por ligação glicosídica (NICOLETTO; OFNER, 2022; TACAR *et al.*, 2013). O açúcar apresenta o grupo funcional amina (-NH₂) que pode ser explorado para a síntese de pró-fármacos poliméricos por meio da reação de formação da base de *Schiff* e reação de amidação via química de carbodiimida, com objetivo de aumentar a absorção da DOX pelo tecido tumoral e propiciar uma redução da toxicidade induzida pela DOX.

Figura 2 - Representação da estrutura química da doxorubicina

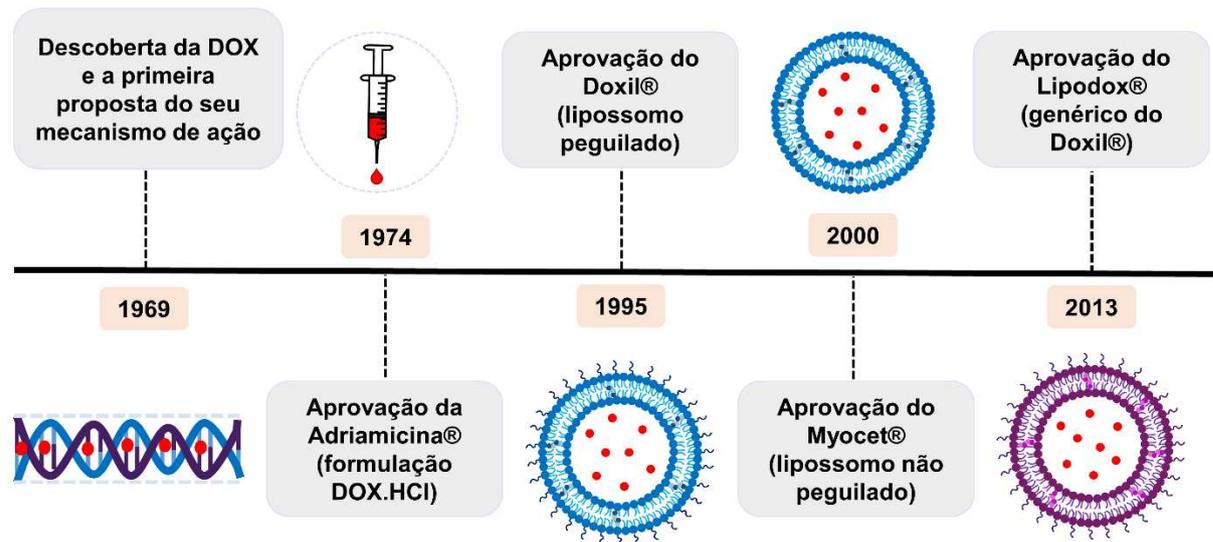


Fonte: elaborado pelo autor.

Pesquisas recentes utilizando polímeros, lipossomos e peptídeos proporcionaram o desenvolvimento de novos materiais contendo DOX com resultados promissores contra vários tipos de câncer, tais como: câncer de próstata (PANDA; JAIN, 2023; ZHAO *et al.*, 2017), melanoma (AN *et al.*, 2023; CAPANEMA *et al.*, 2018), ovário (HENRI *et al.*, 2023; HU *et al.*, 2017), bexiga (VALENBERG *et al.*, 2021; ZHONG *et al.*, 2018), pulmão (FRANCIS; JAYAKRISHNAN, 2019; WANG *et al.*, 2022a) e mama (CAO *et al.*, 2023; WANG *et al.*, 2019a). No entanto, a aplicação clínica da DOX é restrita, devido à sua alta cardiotoxicidade (DING *et al.*, 2022a; WANG *et al.*, 2022b), que pode promover insuficiência cardíaca em sobreviventes da luta contra o câncer (LIU *et al.*, 2022; WU *et al.*, 2022a). A DOX exibe cardiotoxicidade aguda, mas sua forma crônica dependente da dose é a mais preocupante. Cardiomiopatia induzida por DOX e insuficiência cardíaca congestiva podem surgir frequentemente em pacientes após 4 a 20 anos de término do tratamento (HU *et al.*, 2022). Além disso, a DOX pode causar sérios danos a outros órgãos como cérebro (IMOSEMI; OWUMI; ARUNSI, 2022), fígado (XI *et al.*, 2023) e rins (COSTA *et al.*, 2023). Dessa forma, tem-se buscado desenvolver novos materiais que possam possibilitar uma utilização mais segura da DOX e ampliar seu potencial de aplicação.

A Figura 3 ilustra uma linha do tempo com as principais descobertas sobre a DOX, desde a proposta do primeiro mecanismo de ação antitumoral até as novas formulações comerciais de DOX baseadas em nanotecnologia.

Figura 3 - Linha do tempo com desenvolvimento de formulações farmacêuticas convencionais e baseadas em nanotecnologia para a doxorubicina



Fonte: elaborado pelo autor.

Em 1974, a FDA aprovou a primeira formulação convencional de DOX, Adriamicina®, que consiste em solução de cloridrato de doxorubicina (DOX.HCl) para aplicação intravenosa. Essa formulação foi capaz de tratar uma grande variedade de leucemias, linfomas, tumores metastáticos sólidos e foi usada como um agente quimioterapêutico auxiliar no tratamento do câncer de mama. Entretanto, essa formulação promoveu cardiotoxicidade aos pacientes por meio do efeito cumulativo dose-dependente, fazendo com que a FDA determinasse uma dose cumulativa máxima de 300-500 mg m⁻² de Adriamicina® como recomendação para reduzir o risco de cardiotoxicidade (MIGUEL *et al.*, 2022).

O Doxil® foi a primeira nanoformulação de DOX (desenvolvido pela *Johnson & Johnson*) e o primeiro nanossistema aprovado pela FDA, em 1995. Um ano depois, também foi aprovado pela *European Medicines Agency* (EMA) com o nome Caelyx®. Atualmente, Doxil® é aprovado para tratamento de sarcoma de Kaposi relacionado à AIDS, mieloma múltiplo e câncer de ovário, enquanto Caelyx® tem indicação adicional para câncer de mama. O Doxil® é baseado em lipossomas peguilados carregados com DOX (100 nm) e compostos de

fosfoetanolamina de sódio, fosfatidilcolina de soja totalmente hidrogenada e colesterol (MIGUEL *et al.*, 2022).

Myocet® foi o segundo produto à base de lipossomos contendo DOX. Diferentemente do Doxil®, esta formulação é um lipossomo não peguilado (150-250 nm) que foi aprovado pela EMA no ano 2000 como tratamento de primeira linha para o câncer de mama metastático em combinação com ciclofosfamida (MIGUEL *et al.*, 2022).

Lipossomos são vesículas formadas por uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas, na maioria das vezes constituídas por glicerofosfolípidos e/ou colesterol. Os lipossomos não peguilados, contendo DOX, têm afinidade pelo sistema reticuloendotelial e são facilmente removidos da circulação devido a um processo chamado opsonização (aumento da fagocitose). Os lipossomos peguilados podem minimizar sua afinidade ao sistema reticuloendotelial e, portanto, diminuir significativamente a captação de lipossomos pelos macrófagos (HALWANI, 2022).

A patente do Doxil® expirou em 2010 e uma versão genérica chamada de Lipodox® foi desenvolvida pela *Sun Pharmaceutical Industries Ltd.* (Mumbai, Índia) e aprovada pela FDA em 2013. Estudos pré-clínicos com Lipodox® apresentaram propriedades físico-químicas equivalentes às do Doxil®, como morfologias e concentrações semelhantes de drogas, lipídios e excipientes (MAITI *et al.*, 2018). Além disso, essa formulação apresentou atividade antitumoral *in vivo*, toxicidade e perfis farmacocinéticos similares à formulação original (BURADE *et al.*, 2017).

1.2 Pró-fármacos poliméricos

Pró-fármacos são moléculas de fármacos que são administrados no organismo na forma inativa, sendo ativados ou convertidos na molécula ativa somente após a administração por substâncias/processos endógenos (ex.: enzimas, espécies reativas de oxigênio, ambiente redutor, acidez e hipóxia) ou estímulos exógenos (ex.: luz e ultrassom) (DING *et al.*, 2022b). O desenvolvimento de pró-fármacos para aplicação oncológica tem propiciado uma série de benefícios, incluindo propriedades farmacológicas aprimoradas, melhor eficácia clínica e redução dos efeitos colaterais (DING *et al.*, 2022b). Na Tabela 2 estão reportados alguns produtos de pró-fármacos desenvolvidos que estão no mercado em fase de ensaios clínicos.

Tabela 2 - Principais produtos de pró-fármacos para o tratamento do câncer disponíveis no mercado ou em fase de ensaios clínicos, mecanismo de ativação e objetivo terapêutico

Produto de pró-fármaco	Mecanismo de ativação	Objetivo terapêutico	Status	Referência
Citrato de ixazomibe	Hidrólise da ligação éster	Linfoma e câncer de mama triplo negativo	Disponível no mercado	Skorepova <i>et al.</i> (2017)
Fosaprepitanto dimeglumina	Ativação induzida por Fosfatase	Câncer de pulmão	Disponível no mercado	Lu <i>et al.</i> (2020)
Triacetato de uridina	Ativação induzida por Esterase	Câncer de colo	Disponível no mercado	Leung; Rogers; Shureiqi (2021)
Aldoxorrubicina	Clivagem da ligação hidrazona em meio ácido	Sarcomas de partes moles	Fase III	Gong <i>et al.</i> (2018)
TH-302	Ativação por hipoxia	Câncer de pâncreas e carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço	Fase III	Li; Zhao; Li (2021)
AST-3424	Ativação por aldo-ceto redutase	Câncer de fígado, pulmão e câncer gástrico	Fase II	Zhang <i>et al.</i> (2022)

Fonte: adaptado de Ding *et al.* (2022b).

Os pró-fármacos poliméricos (conjugado polímero-fármaco) sintetizados via formação de ligações covalentes pH-responsivas têm sido investigados para a liberação de fármaco no local alvo (células cancerosas), devido ao microambiente ácido das células e tecidos tumorais (HAN *et al.*, 2021; KALVA *et al.*, 2021; LUO *et al.*, 2022; YAN *et al.*, 2020). O microambiente tumoral extracelular (pH 6,5 - 6,8) é mais ácido que o tecido normal (pH 7,2 - 7,4), devido ao efeito *Warburg* (glicólise aeróbica em células tumorais), as células cancerosas produzem alta

concentração de ácido láctico a partir da glicose (CARMONA-FONTAINE *et al.*, 2013). Além disso, o microambiente tumoral intracelular (endossomo inicial: pH 5,9 - 6,2; endossomo tardio e lisossomo: pH 5,0 - 5,5) tem pH mais baixo que o microambiente tumoral extracelular (ZHAO *et al.*, 2017).

A conjugação entre um polímero hidrofílico e um fármaco hidrofóbico possui diversas vantagens, tais como: (I) formar nanopartículas espontaneamente via auto-organização em água (LI *et al.*, 2021b); (II) melhorar a solubilidade em água dos fármacos hidrofóbicos (WANG *et al.*, 2017); (III) prolongar o tempo de circulação do fármaco no plasma sanguíneo (ZHANG *et al.*, 2019); (IV) liberar de forma controlada os fármacos em células cancerosas (controlada por pH, potencial redox e/ou temperatura) (CARNEIRO *et al.*, 2021; CURCIO *et al.*, 2020); (V) maximizar os efeitos terapêuticos enquanto reduz a toxicidade dos fármacos contra células, tecidos e órgãos saudáveis (GAO *et al.*, 2017) e (VI) ampliar a absorção dos fármacos pelos tecidos tumorais através do efeito de permeabilidade e retenção aprimorado (EPR) (XIONG *et al.*, 2018). Em outras palavras, os pró-fármacos poliméricos são estáveis durante o transporte extracelular e respondem a mudanças no microambiente tumoral, permitindo uma liberação controlada do fármaco no local alvo.

Polissacarídeos têm sido estudados como matrizes de conjugados polissacarídeo-fármaco por serem biocompatíveis e biodegradáveis. Devido aos seus grupos funcionais (hidroxila, amino e carboxila), eles podem ser explorados na síntese de pró-fármacos via ligações covalentes sensíveis ao microambiente tumoral, tais como: ligação amida (MANSUR *et al.*, 2018), éster (DUAN *et al.*, 2020), hidrazona (YIN *et al.*, 2018) e imina (LI *et al.*, 2020).

1.3 Polissacarídeos

Polissacarídeos são polímeros naturais constituídos por unidades repetidas de monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas (C-O-C). Eles podem ser obtidos de animais (ácido hialurônico, quitina), algas (alginato), plantas (celulose, goma arábica) e microrganismos (dextrana, pululana, xantana) (MOHAMMED *et al.*, 2021). Os polissacarídeos têm sido amplamente estudados devido sua ampla gama de atividades biológicas e farmacológicas, tais como atividade antitumoral, imunorreguladora, antidiabética, anticoagulante e antiviral (YU *et al.*, 2018), tornando-os materiais mais promissores nas áreas biomédica e farmacêutica.

Os polissacarídeos são suscetíveis a modificações químicas que podem melhorar suas propriedades e ampliar seu potencial de aplicação. Modificações químicas como sulfatação, fosforilação, acetilação, oxidação seletiva e carboximetilação têm sido eficientes para melhorar suas propriedades físico-químicas e biológicas (LIU *et al.*, 2021), além de ampliar seu potencial no desenvolvimento de novos biomateriais para aplicação biomédica.

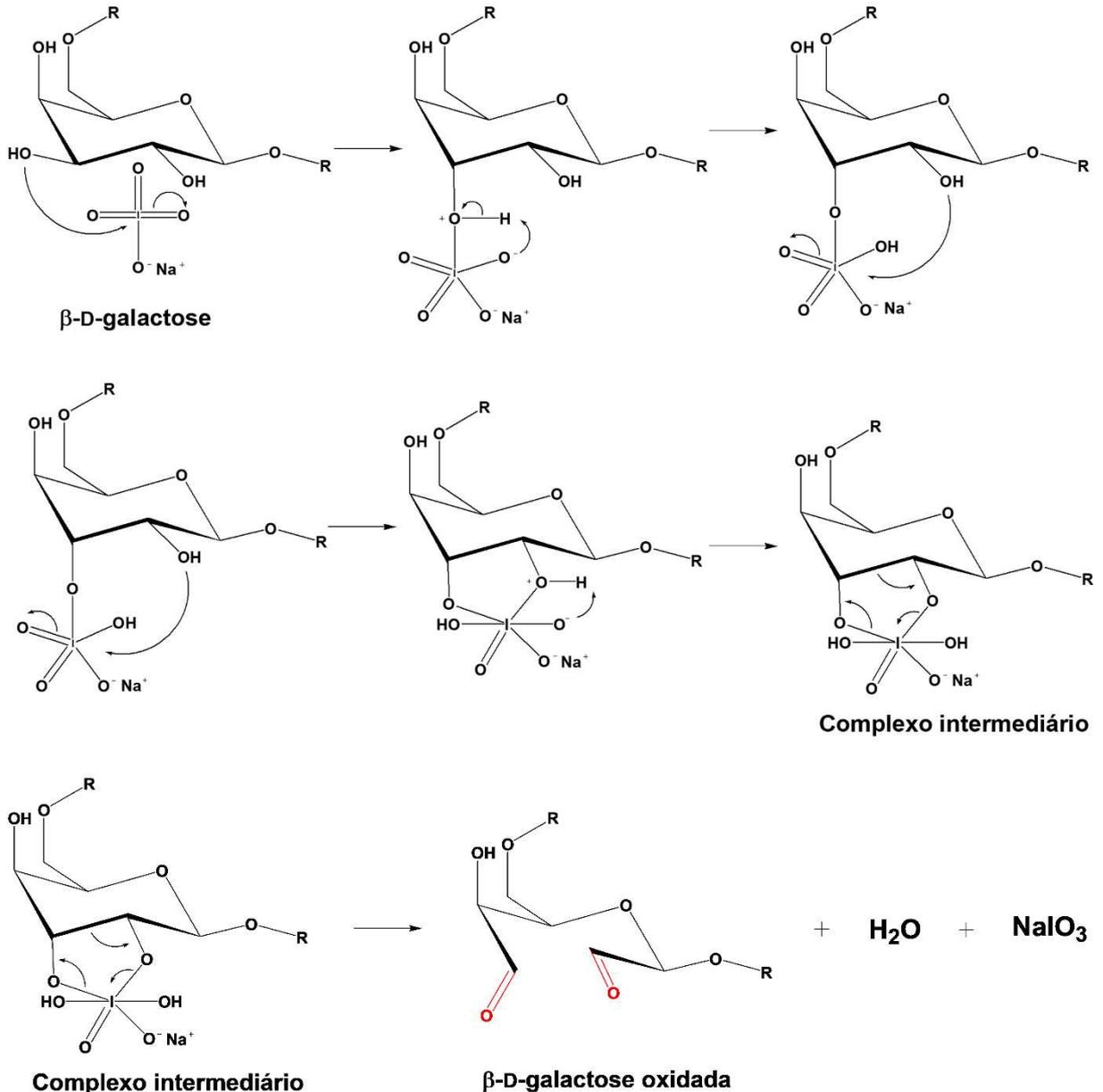
1.3.1 Oxidação de polissacarídeos

A oxidação de polissacarídeos pode ser dividida em dois tipos de reação de acordo com os produtos formados. Polissacarídeos podem ter seus grupos hidroxila ($-OH$) oxidados até a função orgânica ácido carboxílico ($-COOH$) ou oxidados seletivamente a função orgânica aldeído ($-CHO$) (LIU *et al.*, 2021).

A oxidação de polissacarídeos catalisada pelo radical TEMPO (2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxila) permite a conversão eficiente de hidroxilas primárias de polissacarídeos a grupos carboxilato ($-COO^-$) em meio aquoso ($pH = 10$). Essa rota sintética é vantajosa para obter altos graus de oxidação e taxa de reação, na qual o TEMPO e o NaBr (brometo de sódio) atuam como catalisadores e NaClO (hipoclorito de sódio) atua como o oxidante primário. No entanto, a despolimerização oxidativa causada pela presença de NaBr, NaClO e a ocorrência de reações paralelas nos polissacarídeos são inevitáveis durante a oxidação e ocasionam baixo rendimento reacional (ISOGAI, 2022). As pesquisas com esse tipo de reação tem-se concentrado em melhorar essa rota sintética e seu rendimento reacional (LIU *et al.*, 2021).

Polissacarídeos com a função orgânica dialdeído podem ser sintetizados por reação de oxidação seletiva com o periodato de sódio, na qual os grupos OH vicinais (hidroxilas vizinhas) podem ser oxidados seletivamente a grupos dialdeídos (KRISTIANSEN *et al.*, 2010) (Figura 4). O acetato de chumbo IV $[Pb(C_2H_3O_2)_4]$ realiza a mesma oxidação seletiva que o periodato de sódio, levando à formação dos mesmos produtos de oxidação. No entanto, nessa rota sintética usa-se solventes orgânicos, o que impossibilita a oxidação de polissacarídeos que possuem baixa solubilidade em solventes orgânicos, além disso, o acetato de chumbo IV é tóxico (KRISTIANSEN *et al.*, 2010).

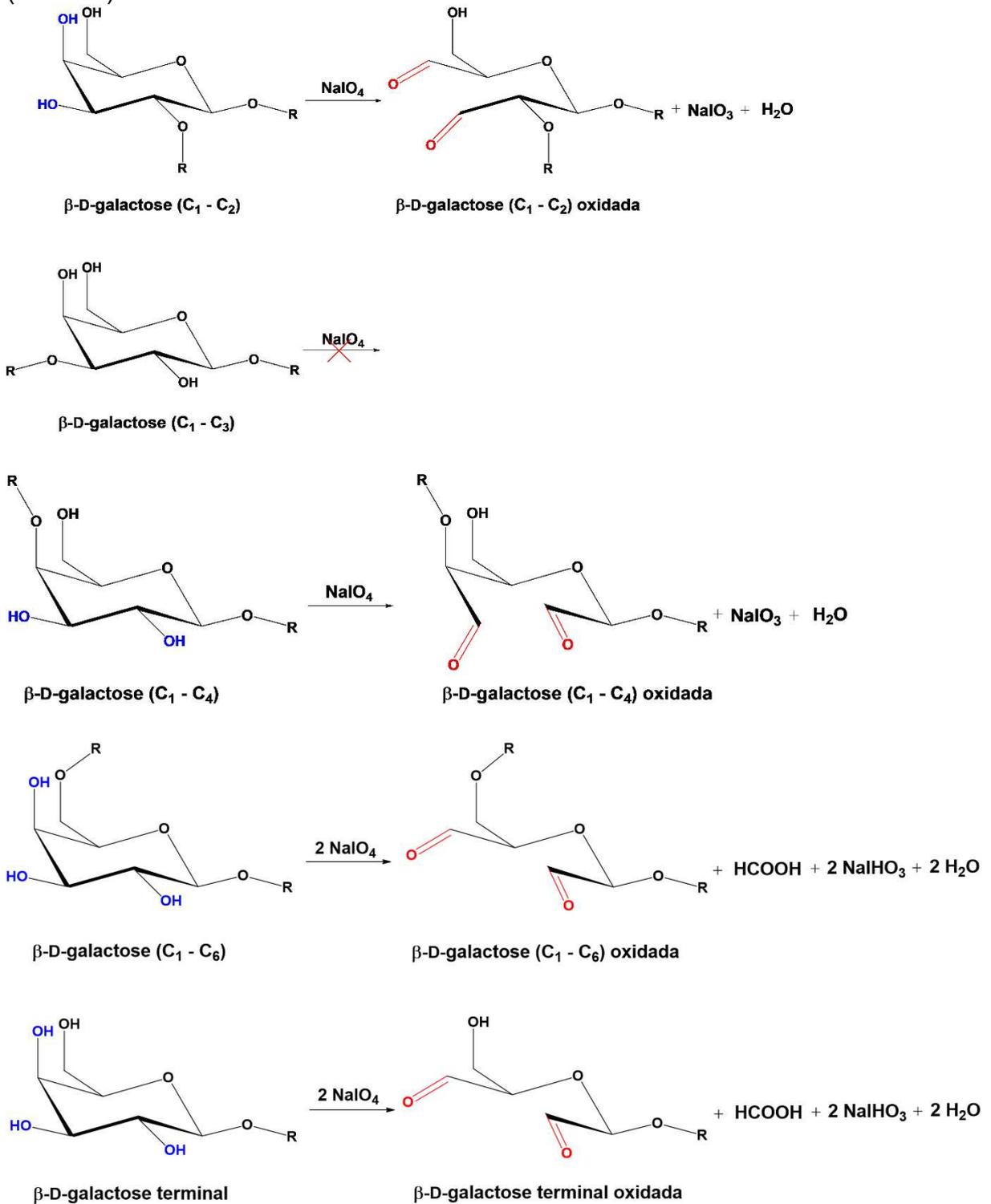
Figura 4 - Mecanismo de oxidação da β -D-galactose com periodato de sódio



Fonte: elaborado pelo autor.

Dada a especificidade dos íons periodato para dióis vicinais, é necessário que os grupos OH estejam orientados em uma posição equatorial-equatorial ou axial-equatorial. Grupos OH vicinais em uma posição axial-axial não podem reagir porque a formação do complexo intermediário não pode ocorrer. Na Figura 5, tem-se os principais produtos (dialdeídos) obtidos para a β -D-galactose ligada (C1→C2), (C1→C3), (C1→C4), (C1→C6) e terminal. A oxidação de polissacarídeos geralmente gera estruturas esperadas desde que o grau de oxidação seja relativamente baixo (1 - 20%) (KRISTIANSEN *et al.*, 2010).

Figura 5 - Representação esquemática da seletividade da reação de oxidação com periodato de sódio para a β -D-galactose ligada (C1→C2), (C1→C3), (C1→C4), (C1→C6) e terminal



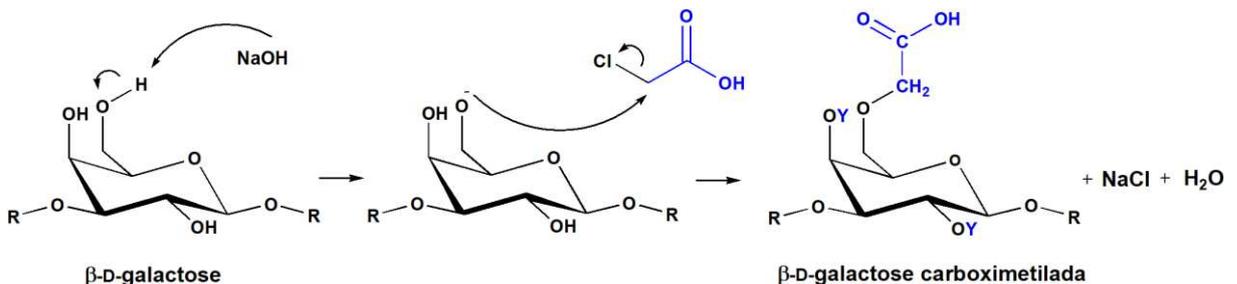
Fonte: adaptado de Kristiansen *et al.* (2010).

A reação de oxidação utilizando periodato de sódio vem sendo extensivamente estudada por introduzir grupos dialdeídos na estrutura dos polissacarídeos que podem reagir com o grupo amino de outros polissacarídeos, proteínas, polímeros sintéticos e fármacos via reação de formação da base de *Schiff*, possibilitando o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos que respondem a variação do pH e/ou temperatura (CARNEIRO *et al.*, 2021; LIMA *et al.*, 2021), hidrogéis com potencial para a reconstrução de tecidos (LYU *et al.*, 2020; WU *et al.*, 2022b), filmes e hidrogéis com potencial para aplicação como curativos (GUO *et al.*, 2022; OLIVEIRA *et al.*, 2023).

1.3.2 Carboximetilação de polissacarídeos

A reação de carboximetilação em polissacarídeos ocorre pela formação de alcóxidos nas hidroxilas presentes na estrutura dos polissacarídeos (álcoois primários e secundários), em meio básico. O alcóxido formado reage com ácido cloro acético (ACA) levando à formação de um éter com grupos ácido terminais (Figura 6).

Figura 6 - Representação esquemática do mecanismo de carboximetilação da β -D-galactose com ácido cloro acético em meio básico (Y = CH₂COOH)



Fonte: elaborado pelo autor.

A reação de carboximetilação de polissacarídeos é uma forma simples de aumentar a bioatividade e a solubilidade em água de polissacarídeos, como celulose (KONO *et al.*, 2021; XIE *et al.*, 2022), quitina (LIAO *et al.*, 2021), quitosana (MOTAMEDI-SEDEH *et al.*, 2022) e goma guar (KOYYADA; ORSU, 2021).

Polissacarídeos carboximetilados são polieletrólitos utilizados na produção de complexos polieletrólíticos para liberação controlada de fármacos (GUARNIZO-HERRERO *et al.*, 2021), microencapsulação por gelificação iônica (VERMA; RIMPY; AHUJA, 2020), desenvolvimento de *scaffolds*, géis antibacteriano e hidrogéis para a

cicatrização de feridas (KOYYADA; ORSU, 2021; XIE *et al.*, 2022; XUE *et al.*, 2022) e são empregados para a síntese de pró-fármacos via reação de amidação com química de carbodiimida (LI, *et al.*, 2016a; MANSUR *et al.*, 2018).

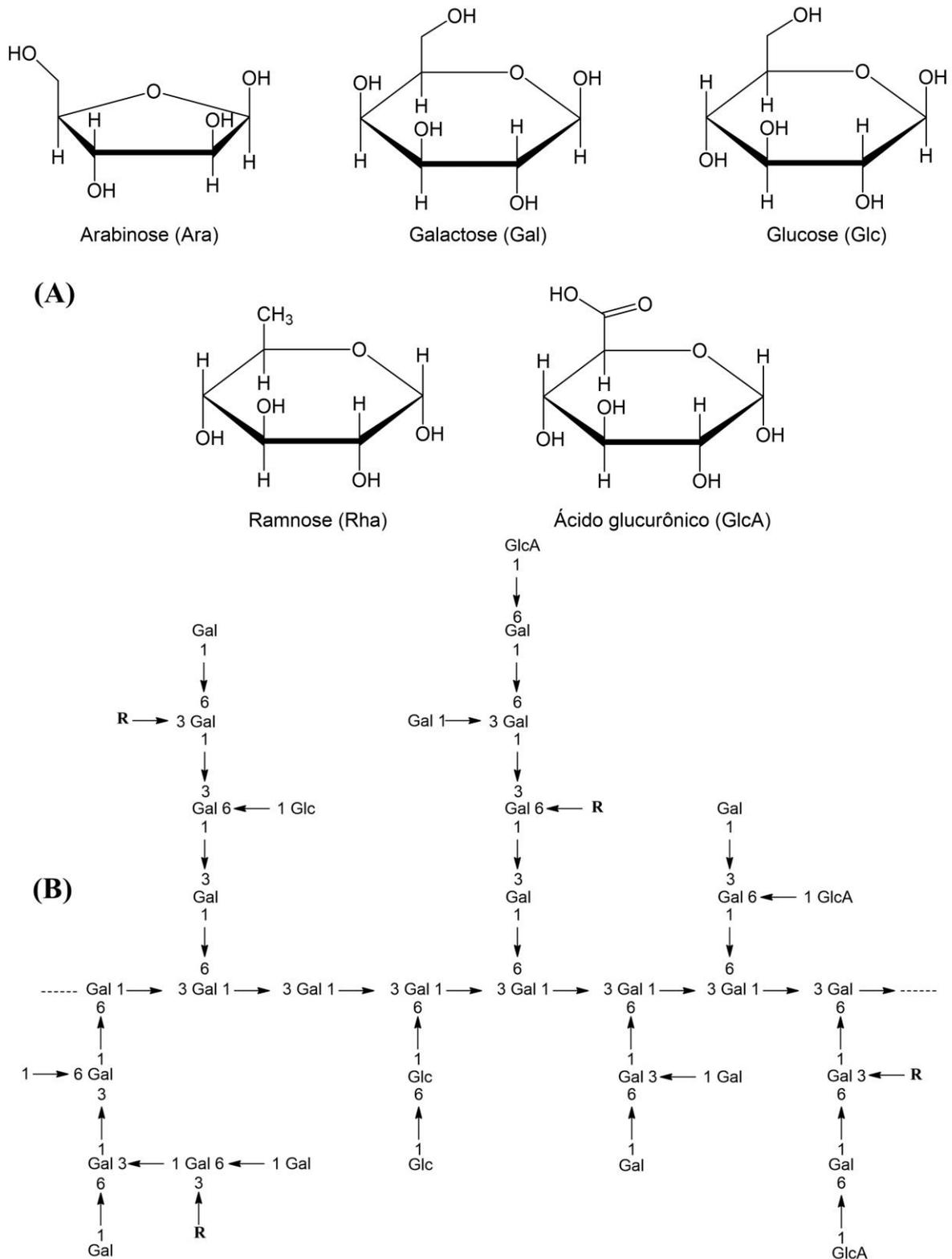
1.3.3 Goma do Cajueiro

A goma de cajueiro (GC) é um polissacarídeo natural e biocompatível extraído do exsudato do caule do cajueiro (*Anacardium occidentale*), uma planta nativa cultivada principalmente na região Nordeste do Brasil, principalmente no Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte.

A GC extraída do exsudato de árvores do Nordeste do Brasil é composta por β -D-galactose (72 - 73%), α -D-glucose (11 - 14%), arabinose (4,6 - 5%), ramnose (3,2 - 4%) e ácido glucurônico (4,7 - 6,3%) em percentagem de massa. Possui uma estrutura ramificada (Figura 7) com uma cadeia principal de galactose ligada por C-1 e C-3 e ramificações de galactose ligada por C-1 e C-6. As cadeias laterais podem ser formadas por unidades de glucose, além de arabinose, ramnose e ácido glucurônico, como grupos terminais (DE PAULA; RODRIGUES, 1995; DE PAULA *et al.*, 1998).

A GC tem sido bastante investigada para potencial aplicação em formulações alimentícias (GONÇALVES *et al.*, 2021; SILVA *et al.*, 2022), filmes bioativos para aplicação como curativos (MOREIRA *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2016), excipiente farmacêutico para a produção de comprimidos (DE SÁ PINTO *et al.*, 2018; FERREIRA *et al.*, 2019) e no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos com resultados promissores contra o câncer (RIBEIRO *et al.*, 2021), doenças negligenciadas (OLIVEIRA *et al.*, 2021; RICHTER *et al.*, 2020), doenças inflamatórias intestinais (LIMA *et al.*, 2023) e doença de chagas (OLIVEIRA *et al.*, 2023). Além disso, modificações químicas na estrutura da GC podem ampliar seu potencial de aplicação. A adição da função orgânica aldeído ($-CHO$) na estrutura da GC foi utilizada no desenvolvimento de *scaffolds* para engenharia de tecidos (FERREIRA *et al.*, 2021; MACIEL *et al.*, 2019). A adição do grupo carboxila ($-COOH$) possibilitou a utilização da GC como uma plataforma para imobilização de anticorpos, que pode então ser usada como um biossensor na detecção de bactérias (MELO *et al.*, 2020).

Figura 7 - Monossacarídeos componentes da estrutura da goma do cajueiro do Nordeste do Brasil (A). Proposta de representação estrutural de um segmento da goma do cajueiro (R representa ramnose ou arabinose) (B)



Fonte: adaptado de Cunha *et al.* (2007).

A introdução da função orgânica aldeído e o aumento do teor de ácido carboxílico na estrutura da GC possibilita a sua utilização na síntese de pró-fármacos de doxorubicina via reação de formação da base de *Schiff* e via reação de amidação com química de carbodiimida.

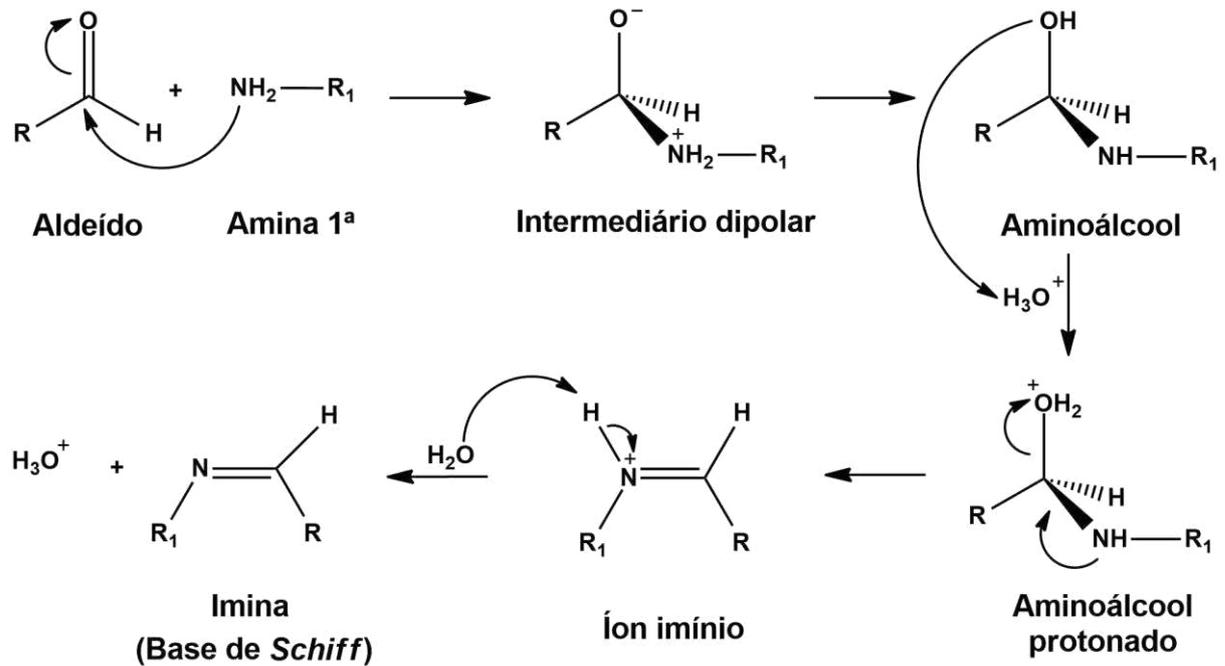
1.4 Química “click”

A Química “click” refere-se a um conjunto de reações químicas simples, estereoespecíficas (mas não necessariamente enantiosseletivas), com alto rendimento reacional e que gerem apenas subprodutos inofensivos e de fácil remoção (KOLB *et al.*, 2001). A Química “click” tem sido bastante explorada para aplicações biomédicas na engenharia de biomateriais e na síntese de pró-fármacos para a indústria farmacêutica, dentre as quais podemos destacar a base de *Schiff* (CURCIO *et al.*, 2020; FERREIRA *et al.*, 2021) e a química de carbodiimida (CAPANEMA *et al.*, 2018; MANSUR *et al.*, 2018).

1.4.1 Base de *Schiff*

A reação de formação da base de *Schiff* ocorre pela adição nucleofílica de uma amina primária (-NH₂) à carbonila (C=O) de um aldeído ou cetona em meio aquoso (Figura 8), formando a ligação covalente imina (C=N) que é reversível em meio ácido, ou seja, é sensível ao pH do meio. A ligação imina/base de *Schiff* forma-se em faixa de pH entre 5 e 7, é estável em pH superior a 7 e pode sofrer hidrólise com facilidade em pH inferior a 5 (SAHAJPAL *et al.*, 2022). A reação de formação da base de *Schiff* é reversível em meio ácido (pH < 5,0). Entretanto, pode-se contornar essa reversibilidade da formação da base de *Schiff* realizando a reação em meio básico (pH > 10) (FRANCIS; JAYAKRISHNAN, 2019) ou em solvente orgânico como o DMSO (CURCIO *et al.*, 2020).

Figura 8 - Representação esquemática do mecanismo da reação de formação da base de *Schiff* entre um aldeído e uma amina primária



Fonte: adaptado de Alavarse *et al.* (2022).

A reação de formação da base de *Schiff* tem sido bastante explorada na síntese de pró-fármacos poliméricos à base de polissacarídeos oxidados e a DOX por ser processada em meio aquoso ou orgânico sob condições suaves e sem uso de catalisadores metálicos (Tabela 3). Além disso, essa reação tem água como subproduto e a ligação imina/base de *Schiff* (C=N) pode ser reduzida a uma ligação amina (C-N) pela ação de um agente redutor (ex.: NaBH₄) (aminação redutiva). Essas características têm promovido desenvolvimento de diversos biomateriais para aplicações biomédicas (MALIK *et al.*, 2022; SAHAJPAL *et al.*, 2022).

Tabela 3 - Parâmetros reacionais e resultados para a síntese de pró-fármacos a base de polissacarídeos via reação de formação da base de *Schiff*

Polissacarídeo	Grau de oxidação (%)		Razão molar (CHO:NH ₂)	Solvente	Temperatura (°C)	Tempo (h)	CFL (%)	EFL (%)	Referência
	Teórico	Experimental							
Dextrana	10	6,6 8,6	1:1	T. A. (pH 5,0)	50	72	9,6 10	24 19	Li <i>et al.</i> (2017)
Dextrana	-	-	2:1 (m/m)	DMSO	60	24	-	45,7	Li <i>et al.</i> (2020)
Dextrana	25	22	1:1	H ₂ O	25	72	12,6	18,9	Zhang <i>et al.</i> (2019)
Alginato	100	48	1:1 (m/m)	H ₂ O:DMSO (5:1)	25	6	21,1	80,4	Gao <i>et al.</i> (2017)
Ác. Hialurônico	40	33	3:1 (m/m)	H ₂ O	25	24	29,4	26	Wang <i>et al.</i> (2019a)
Hidroxietilamido	5,0	2,5	4:1, 2:1 e 1:1	T. A. (pH 5,0)	50	72	5,4 9,9 16,5	68 66 59	Li <i>et al.</i> (2016b)
<i>Lycium barbarum</i>	-	15	1:1 (m/m)	T. A. (pH 5,0)	50	72	3,5	-	Francis <i>et al.</i> (2019)
<i>Goma do cajueiro</i>	10	8,5	1:1	DMSO	50	72	28	75	O presente trabalho

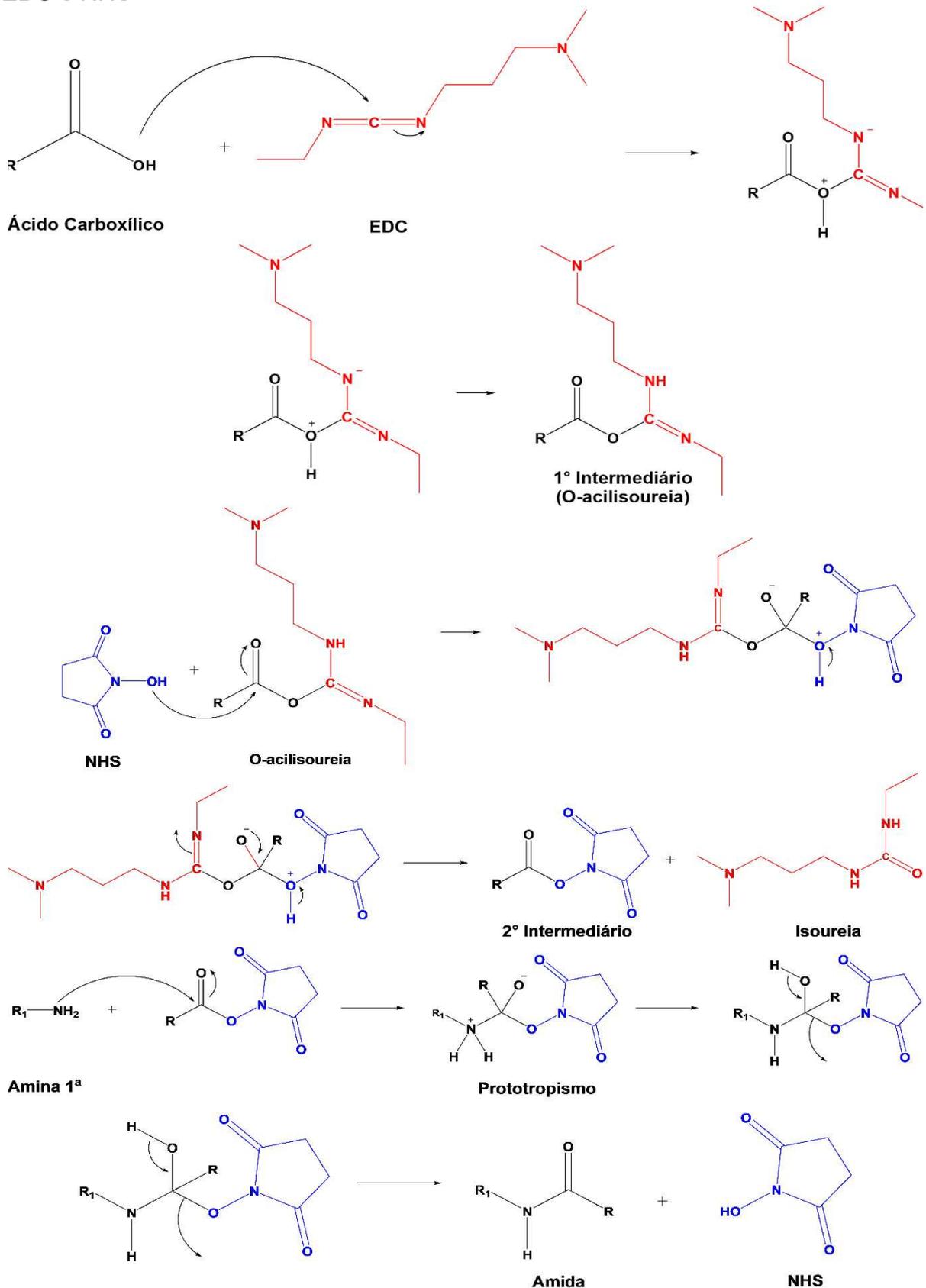
T. A. = tampão acetato; CFL = carga de fármaco ligado; EFL = eficiência de fármaco ligado.

Fonte: elaborado pelo autor

1.4.2 Química de carbodiimida

Os compostos de carbodiimida fornecem a formação de ligações amida ou éster entre um ácido carboxílico ($-\text{COOH}$) e aminas ou hidroxilas. As carbodiimidas mais utilizadas são o EDC [1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida] e o DCC (N,N-diciclohexilcarbodiimida). O EDC atua na ativação do ácido carboxílico em meio aquoso formando o intermediário O-acilisourea que pode sofrer ataques nucleofílicos de aminas e/ou hidroxilas produzindo ligações covalentes (amidas e/ou ésteres). O DCC atua da mesma forma que o EDC, no entanto, o DCC é insolúvel em água, podendo ser utilizado apenas em reações com solventes orgânicos. O intermediário O-acilisourea é instável e pode sofrer hidrólise, regenerando o ácido carboxílico e formado ureia como subproduto, entretanto, o NHS (N-hidroxissuccinimida) ou o Sulfo-NHS (N-hidroxissulfossuccinimida) podem ser adicionados ao EDC para melhorar o rendimento e a eficiência da reação e evitar reações paralelas indesejadas, já que produz um intermediário mais estável que o O-acilisourea (ALAVARSE *et al.*, 2022). O uso de EDC/NHS ou EDC/Sulfo-NHS torna viável a realização de reações via química de carbodiimida (Figura 9).

Figura 9 - Representação esquemática do mecanismo da reação de amidação com química de carbodiimida entre um ácido carboxílico e uma amina primária utilizando EDC e NHS



Fonte: adaptado de Alvarse *et al.* (2022).

Reações via química de carbodiimida utilizando EDC/NHS devem ser processadas em meio tamponado devido à forte influência do pH na eficiência da reação. Em condições levemente ácidas a ativação do ácido carboxílico com EDC é favorecida, porque ocorre a protonação do nitrogênio da molécula de EDC o que reduz a densidade eletrônica do carbono e facilita o ataque nucleofílico do ácido carboxílico. Já a etapa com NHS é favorecida em condições neutra ou ligeiramente alcalinas, pois em meio ácido as aminas primárias são protonadas e não podem atacar a carbonila ativada. Devido a essa incompatibilidade para definir uma condição de pH ideal para reações via química de carbodiimida com EDC/NHS, recomenda-se a utilização de um tampão com faixa de pH entre 5 e 8 (MADISON; CARNALI, 2013).

A síntese de pró-fármacos poliméricos à base de polissacarídeos ácido e da DOX tem sido estudada via química de carbodiimida variando a proporção molar COOH:EDC:NHS:NH₂ e solvente reacional para a formação da ligação amida entre o grupo ácido do polissacarídeo e o grupo amina da DOX (Tabela 4). O tampão MES (ácido 4-morfolinoetanossulfônico) é o mais utilizado em reações com EDC/NHS, porque a reação é rápida e eficiente. Tampão fosfato, água e DMSO também podem ser usados, mas a reação tem menor eficiência.

A reação de amidação utilizando química de carbodiimida é uma estratégia promissora para o desenvolvimento de pró-fármacos. A ligação amida pode ser clivada em meio ácido e por meio de reações mediadas por proteases (catepsina B), enzimas presentes no microambiente celular (externo e interno) que catalisam a hidrólise (clivagem da ligação covalente com a participação de uma molécula de água) (ZHANG *et al.*, 2017).

Tabela 4 - Parâmetros reacionais e resultados para a síntese de pró-fármacos a base de polissacarídeos via reação de amidação com química de carbodiimida

Polissacarídeo	GSC	Razão molar (COOH:EDC:NHS:NH ₂)	Solvente	Temperatura (°C)	Tempo (h)	CFL (%)	EFL (%)	Referência
Ac. Hialurônico	-	1:3,5:2,8:0,1	H ₂ O	25	12	8,3	83	Kim <i>et al.</i> (2012)
Inulina	0,9	1:10:12:1	H ₂ O	25	2	0,5	-	Schoener <i>et al.</i> (2013)
Inulina	-	1:1:1:1	H ₂ O:DMF (6:4)	25	15	8,6	-	Mauro <i>et al.</i> (2015)
Inulina	-	1:10:5:5	T. F. (pH 7,4)	25	3	2,5	-	Wang <i>et al.</i> (2019b)
Celulose	0,77 e 1,22	1:1:0:0,001	MES (pH 5,5)	6	2	-	98	Capanema <i>et al.</i> (2018)
Celulose	0,7	1:1:0:0,001	MES (pH 5,5)	6	2	0,3	98	Mansur <i>et al.</i> (2018)
Dextrana	-	-	DMSO	25	72	12	78	Li <i>et al.</i> (2016a)
Goma do Cajueiro	0,5	1:1:1:1:0,1	MES (pH 6,0)	25	24	9,6	74	O presente trabalho

T. F. = tampão fosfato; GSC = grau de substituição da carboximetilação; CFL = carga de fármaco ligado; EFL = eficiência de fármaco ligado.

Fonte: elaborado pelo autor.

No presente trabalho foram sintetizados novos pró-fármacos poliméricos pH-responsivos utilizando derivados da goma do cajueiro e o fármaco doxorubicina. Esses pró-fármacos foram sintetizados utilizando duas rotas sintéticas diferentes (reação de formação da base de *Schiff* e reação de amidação com química de carbodiimida) com rendimento de síntese superior a 80% e eficiência de fármaco ligado superior a 70%. Os pró-fármacos poliméricos formaram nanopartículas em meio aquoso com diâmetro médio (160 - 240 nm) adequado para potencial aplicação contra o câncer. As nanopartículas desenvolvidas promoveram uma liberação da doxorubicina responsiva ao pH do meio e uma diminuição da toxicidade da doxorubicina frente as células não-tumorais. Além disso, as nanopartículas dos pró-fármacos poliméricos apresentam resultados promissores contra o câncer de mama e colorretal.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver nanopartículas de pró-fármacos pH-responsivos à base de goma do cajueiro e doxorrubicina com potencial aplicação no tratamento contra células de câncer.

2.2 Objetivos específicos

Modificar a estrutura da goma do cajueiro via reação de oxidação seletiva ou reação de carboximetilação;

Analisar a eficácia da síntese de pró-fármacos poliméricos via reação de formação da base de *Schiff* e reação de amidação utilizando química de carbodiimida;

Estudar o efeito do tipo de ligação química dos pró-fármacos (imina, amina e amida) nas propriedades físico-químicas das nanopartículas formadas;

Avaliar a influência do tipo de ligação química dos pró-fármacos (imina, amina e amida) na liberação da doxorrubicina;

Avaliar a citotoxicidade das nanopartículas de pró-fármacos em células tumorais e não-tumorais;

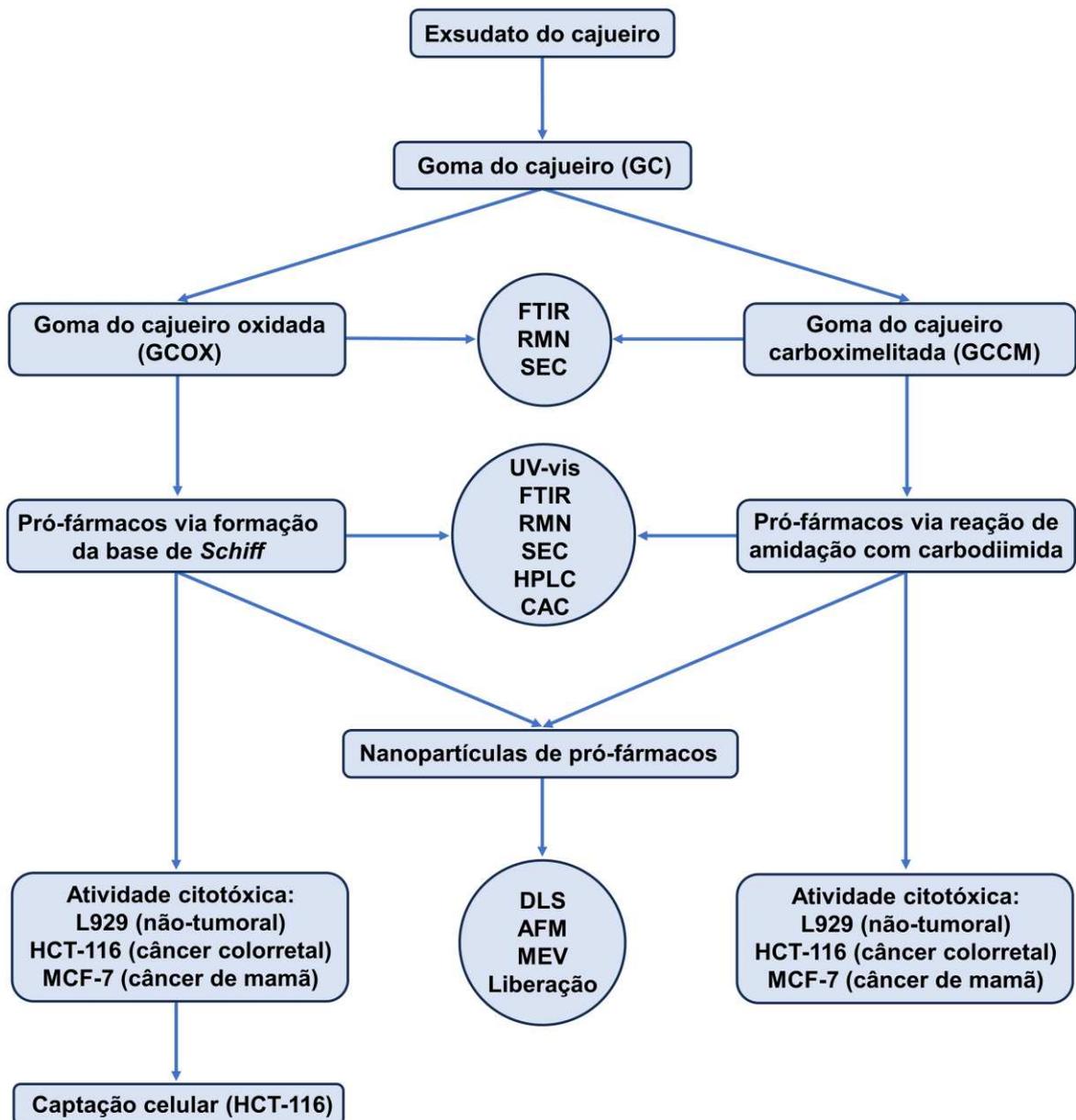
Demonstrar a capacidade de internalização celular das nanopartículas de pró-fármacos em células tumorais;

Contribuir para pesquisas relacionadas a terapia com pró-fármacos poliméricos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Etapas do desenvolvimento do trabalho

Figura 10 - Fluxograma com o passo a passo do desenvolvimento do trabalho



Fonte: elaborado pelo autor.

3.2 Materiais

O exsudato do cajueiro foi fornecido pela EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), Fortaleza, Ceará, Brasil. A GC foi isolada e purificada de acordo com o protocolo desenvolvido por nosso grupo de pesquisa (RODRIGUES *et al.*, 1993). O cloridrato de doxorubicina (DOX.HCl), o cloridrato de N'-etilcarbodiimida (EDC) e a N-hidroxissuccinimida (NHS) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Brasil). O ácido cloroacético (ACA), o periodato de sódio (NaIO₄), o borohidreto de sódio (NaBH₄), o hidróxido de sódio (NaOH) e a trietilamina (TEA) foram obtidos da Merck (Brasil). O dimetilsulfóxido (DMSO), cloridrato de hidroxilamina (NH₂OH.HCl), o etileno glicol, o etanol P.A. e a acetona P.A. foram obtidos da Synth (Brasil). O DMSO foi seco em uma peneira molecular antes da síntese.

3.3 Reação de oxidação

A oxidação da goma de cajueiro foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Maciel *et al.* (2019). A GC (5,0 g ou $3,08 \times 10^{-2}$ mol de unidades glicosídicas) foi dissolvida em água pura (100 mL) sob agitação magnética a temperatura ambiente (25 °C) por 24 h. Posteriormente, 0,66 g de NaIO₄ ($3,08 \times 10^{-3}$ mol) foi adicionado para obter a GC com 10% das unidades oxidadas. A mistura reacional foi agitada a temperatura ambiente (25 °C) durante 24 h protegida da luz. A reação foi finalizada pela adição de etileno glicol (170 µL). A solução resultante foi dialisada em membrana de celulose ($14.000 \text{ g mol}^{-1}$) contra água purificada por destilação até que a condutividade da água de diálise fosse igual à condutividade da água pura (4 dias). O material foi recuperado por liofilização na forma de um sólido branco, denominado de GCOX.

O grau de oxidação foi determinado pelo método de titulação com cloridrato de hidroxilamina/hidróxido de sódio (NH₂OH·HCl/NaOH), descrito por Zhao e Heindel (1991). Resumidamente, o derivado GCOX (50 mg) foi dissolvido em 25 mL de uma solução de NH₂OH·HCl ($0,25 \text{ mol L}^{-1}$) para a conversão dos aldeídos (–CHO) em oximas (C=N–OH) e liberação do HCl, titulado com NaOH padronizado. A variação do pH com a adição de NaOH foi acompanhada em um pHmetro e registrada (Apêndice A). As equações químicas 1 (oxidação da GC com NaIO₄), 2 (reação da

GCOX com $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ e 3 (neutralização do HCl liberado) representam as reações envolvidas no processo de oxidação da GC e determinação do grau de oxidação.



O número de mols de NaOH é equivalente ao número de mols de aldeídos presentes na amostra, logo pode-se calcular o grau de oxidação das unidades monossacarídeas utilizando a equação 4:

$$\text{Grau de oxidação} = \frac{C_{\text{NaOH}} \times V_{\text{NaOH}} \times 162}{2m} \times 100\% \quad (4)$$

onde C é a concentração de NaOH padronizado (mol L^{-1}), V o volume de NaOH (L), m é a massa de amostra (GCOX) pesada (g), 162 é a massa molar (g mol^{-1}) da unidade monossacarídea predominante na estrutura da GC (galactose) e 2 é o número de aldeído por unidade monossacarídea oxidada.

3.4 Reação de carboximetilação

A reação de carboximetilação da goma do cajueiro foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Silva *et al.* (2004). A GC (5,0 g ou $3,08 \times 10^{-2}$ mol de unidades glicosídicas) foi misturada com 5,0 mL de água pura até a formação de uma pasta homogênea. Em seguida, 6,2 mL de NaOH 10 mol L^{-1} ($6,2 \times 10^{-2}$ mol) e 2,91 g de ACA ($3,08 \times 10^{-2}$ mol) foram adicionados à pasta homogênea. A reação foi realizada a $55 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 3 h. Posteriormente, o sistema reacional foi neutralizado com HCl (1 mol L^{-1}) e dialisado em membrana de celulose ($14.000 \text{ g mol}^{-1}$) contra água purificada por destilação até que a condutividade da água de diálise fosse igual à condutividade da água pura (5 dias). O material foi coletado por liofilização na forma de um sólido branco, denominado de GCCM.

O teor de grupos ácido da GC e da GCCM foi determinado por titulação potenciométrica ácido/base. Resumidamente, 100 mg de polissacarídeo foram dissolvidos em 20 mL de água pura e a solução resultante eluída em uma coluna de troca iônica Amberlite IR-120H⁺ para a protonação dos grupos carboxilato (–COO⁻). Após a protonação, a solução foi congelada e liofilizada para recuperação do polissacarídeo protonado. Posteriormente, 50 mg do polissacarídeo protonado foram dissolvidos em 20 mL de água pura e a solução titulada com NaOH padronizado. A variação do pH com a adição de NaOH foi acompanhada em um pHmetro e registrada (Apêndice A). Como o número de mols de ácido na estrutura do polissacarídeo é equivalente ao número de NaOH (equação 5), o teor de grupos ácido na estrutura do polissacarídeo foi calculado utilizando a equação 6:



$$\text{Teor de grupos ácidos} = \frac{\text{mol de } -COOH}{\text{mol de unidade monossacarídea}} \times 100\% \quad (6)$$

3.5 Síntese dos pró-fármacos via reação de formação da base de *Schiff*

Os pró-fármacos foram sintetizadas via reação de formação da base de *Schiff* entre o grupo aldeído da GCOX e o grupo amino da DOX, conforme metodologia descrita por Xu *et al.* (2015), com algumas modificações. Em resumo, 10 mg de GCOX ($1,05 \times 10^{-5}$ mol de –CHO) foram dissolvidos durante a noite (14 h) em 5 mL de DMSO a 70 °C em um balão de fundo redondo sob agitação magnética (300 rpm). Após completa dissolução, o balão de fundo redondo foi colocado em banho de glicerina a 50 °C. Em experimento paralelo, o DOX.HCl foi dissolvido em DMSO e a TEA foi adicionada para remover o ácido clorídrico (5 mols de TEA para 1 mol de DOX.HCl). Posteriormente, 6 mg de DOX ($1,05 \times 10^{-5}$ mol de NH₂) foram adicionados a solução de GCOX e o sistema mantido em agitação por 72 h a 50 °C em ausência de luz. Em seguida, o sistema reacional foi colocado em diálise contra água pura em uma membrana de celulose ($14.000 \text{ g mol}^{-1}$) para remover o DMSO. A saída do DMSO foi monitorada por espectrofotometria ultravioleta-visível ($\lambda = 190 - 300 \text{ nm}$) usando um espectrofotômetro da Shimadizu® UV-1800 para determinar o final da diálise (3 dias, Apêndice B). A solução resultante foi liofilizada e o pró-fármaco coletado como um sólido vermelho, denominado de GC-S-DOX.

O pró-fármaco GC-A-DOX foi sintetizado em um experimento semelhante à síntese do pró-fármaco GC-S-DOX. Após as 72 h de reação, adicionou-se NaBH₄ na razão molar 1:5 (1 mol –CHO: 5 mol NaBH₄) para reduzir a ligação imina (C=N) à ligação amina (C-N). Na prática, 2 mg de NaBH₄ foram dissolvidos em 5 mL de água pura e a solução resultante adicionada ao sistema reacional, que foi mantido sob agitação por mais 24 h a 50 °C. Posteriormente, o sistema reacional foi colocado em diálise contra água pura em uma membrana de celulose (14.000 g mol⁻¹) e o pró-fármaco GC-A-DOX coletado por liofilização na forma de um sólido vermelho. Os pró-fármacos foram sintetizados mantendo constante a proporção molar 1:1 (1 mol de –CHO: 1 mol de -NH₂) e os dados estão reportados na Tabela 5.

Tabela 5 - Dados da síntese dos pró-fármacos via reação de formação da base de *Schiff* e aminação redutiva

Pró-fármaco	GCOX (mg)	DMSO (mL)	DOX (mg)	NaBH ₄ (mg)
GC-S-DOX	10,0	5,0	6,0	-
GC-A-DOX	10,0	5,0	6,0	2,0

Fonte: dados da pesquisa.

3.6 Síntese de pró-fármacos via reação de amidação

Pró-fármacos foram sintetizados via química de carbodiimida utilizando EDC e NHS para acoplar covalentemente os grupos amina da DOX aos grupos carboxílico (R–COOH) presentes na estrutura da GC ou da GCCM via formação de ligação amida (KIM *et al.*, 2012; MANSUR *et al.*, 2018). Em resumo, 20 mg de GCCM ($5,24 \times 10^{-5}$ mol –COOH) ou 20 mg de GC ($5,24 \times 10^{-6}$ mol –COOH) foram dissolvidos durante a noite (14 h) em 10 mL de tampão MES (pH = 6,0; 0,1 mol L⁻¹) em um balão de fundo redondo. Posteriormente, EDC e NHS foram adicionados ao sistema reacional para ativar os grupos ácido do polissacarídeo durante 30 min e 3 mg de DOX.HCl ($5,24 \times 10^{-6}$ mol) foram adicionados ao balão de fundo redondo e agitado por 24 h à temperatura ambiente (25 °C) em ausência de luz. Em seguida, o sistema reacional foi colocado em diálise contra água pura em uma membrana de celulose (14.000 g mol⁻¹) e a condutividade da água de diálise foi monitorada para determinar o término da diálise (3 dias). A solução resultante foi liofilizada e o pró-fármaco coletado como um sólido rosa, denominado de GC-D-DOX ou GCCM-D-DOX.

Os pró-fármacos foram sintetizados na proporção molar 1:1:1:1 (COOH:EDC:NHS:NH₂) para a GC e na proporção molar 1:1:1:0,1 (COOH:EDC:NHS:NH₂) para a GCCM. Os dados estão reportados na Tabela 6.

Tabela 6 - Dados da síntese dos pró-fármacos via reação de amidação com química de carbodiimida

Pró-fármaco	Goma (mg)	MES (mL)	EDC (mg)	NHS (mg)	DOX (mg)
GC-D-DOX	20,0	10,0	10,2	6,1	3,0
GCCM-D-DOX	20,0	10,0	1,0	0,6	3,0

Fonte: dados da pesquisa.

3.7 Carga de fármaco ligado (CFL) e eficiência de fármaco ligado (EFL)

A quantidade de DOX ligada aos pró-fármacos foi determinada usando espectrofotometria ultravioleta-visível (UV-vis) ($\lambda_{\text{abs}} = 480 \text{ nm}$, Shimadzu UV-1800) e quantificada usando uma curva de calibração de DOX em DMSO (Apêndice C). Na prática, 1 mg de pró-fármaco foi dissolvido em 3 mL de DMSO e a absorbância medida a 480 nm. A CFL e a EFL foram calculados de acordo com as equações (7) e (8), respectivamente.

$$CFL = \frac{\text{massa de DOX ligada}}{\text{massa de material}} \times 100\% \quad (7)$$

$$EFL = \frac{\text{massa de DOX ligada}}{\text{massa total de DOX adicionada}} \times 100\% \quad (8)$$

3.8 Preparação das nanopartículas de pró-fármacos

As nanopartículas de pró-fármacos foram obtidas usando o método de ultrassom direto (ZHANG *et al.*, 2019). O pró-fármaco (1,0 mg) foi disperso em 5 mL de tampão fosfato (pH = 7,4; 0,1 mol L⁻¹) ou água deionizada e submetido a tratamento ultrassônico com sonda (20 W, 6 ciclos com 10 s ativo e 10 s desligado).

3.9 Caracterização físico-química

3.9.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As amostras de GC, GCOX, GCCM, DOX.HCl e pró-fármacos foram analisadas em pastilhas de brometo de potássio (KBr) no espectrofotômetro Shimadzu IR-Trace 100 na região entre 4000 e 400 cm^{-1} , com 64 aquisições e resolução 4 para cada amostra.

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

As amostras de GC, GCOX, GCCM, DOX.HCl e pró-fármacos foram caracterizados por RMN ^1H . As análises foram realizadas a 25 °C no equipamento da Bruker® Advance modelo DRX500 usando DMSO- d_6 como solvente. Os espectros foram ajustados a partir do sinal do solvente.

3.9.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

As amostras de GC, GCOX, GCCM e pró-fármacos foram analisadas por HPLC em um equipamento da Shimadzu equipado com uma bomba modelo LC-20AD acoplado a um detector de fotodiodo UV-visível SPD-M20A e uma coluna Supelco C18 (10 μm , 15 $\text{cm} \times 4,6 \text{ mm}$) a 25 °C. A fase móvel consistia em 30% (v/v) de fase orgânica (acetonitrila) e 70% (v/v) de fase aquosa (30 mmol L^{-1} KH_2PO_4 , 1% (v/v) de ácido trifluoroacético) a uma taxa de fluxo de 1,0 mL min^{-1} .

3.9.4 Cromatografia de exclusão por tamanho (SEC)

As amostras de GC, GCOX, GCCM e pró-fármacos foram caracterizadas por SEC em um equipamento da Shimadzu equipado com uma bomba modelo LC-20AD acoplado a um detector de índice de refração (RID-10A) utilizando uma coluna linear PolySep-SEC GFC-P (300 \times 7,8 mm). O eluente foi NaNO_3 (0,1 mol L^{-1}) a um fluxo de 1,0 mL min^{-1} a 30 °C. O volume injetado das amostras foi de 50 μL . A massa molar foi calculada utilizando uma curva de calibração para padrões de pululana (equação 9, Apêndice D):

$$\text{Log}M = 14,88194 - 1,23456V_e \quad (9)$$

onde M é a massa molar do material e V_e o volume de eluição (mL).

3.9.5 Concentração de associação crítica (CAC)

A CAC dos pró-fármacos foi determinada por espectroscopia de fluorescência usando pireno como uma sonda fluorescente em um espectrômetro de fluorescência (RF-6000 Shimadzu®). A influência da polaridade para várias bandas na intensidade de fluorescência do pireno pode ser aplicada para determinar com precisão a CAC em sistemas micelares (KALYANASUNDARAM; THOMAS, 1977). A razão de intensidade I_{372}/I_{383} no espectro de emissão de fluorescência do pireno corresponde aos valores abaixo da CAC (ambiente polar) e diminui quando atinge a CAC, indicando que o pireno está detectando a formação de domínios hidrofóbicos. O espectro de excitação de fluorescência do pireno também pode ser usado para determinar a CAC. Neste caso o aumento da razão de intensidade I_{338}/I_{334} indica que o pireno identifica um ambiente mais hidrofóbico.

Experimentalmente, 10 mg de pró-fármacos foram dispersos em 25 mL de tampão fosfato (pH = 7,4; $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e submetido a tratamento ultrassônico com sonda (20 W, 6 ciclos com 10 s ativo e 10 s desligado). Em experimento paralelo, 40 μL de pireno em acetona ($5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) foram adicionados aos vários frascos de vidro e a acetona foi evaporada com nitrogênio. Posteriormente, o pró-fármaco disperso em tampão fosfato foi diluído para obter várias concentrações de pró-fármaco e adicionados aos frascos de vidro com pireno, obtendo-se uma concentração de pireno de $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. As soluções resultantes foram mantidas durante a noite à temperatura ambiente ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) para atingir o equilíbrio de solubilização do pireno nos domínios hidrofóbicos dos pró-fármacos.

O espectro de emissão de fluorescência de pireno ($\lambda = 350 - 500 \text{ nm}$) foi medido usando um comprimento de onda de excitação de 334 nm. A razão de intensidade (I_{372}/I_{383}) *versus* a concentração de pró-fármaco foi usada para determinar a CAC. O espectro de excitação de fluorescência de pireno ($\lambda = 320 - 350 \text{ nm}$) foi obtido usando um comprimento de onda de emissão de 374 nm. A razão de intensidade (I_{338}/I_{334}) *versus* a concentração de pró-fármacos foi usada para determinar a CAC.

3.9.6 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

O diâmetro hidrodinâmico, o índice de polidispersão (IPD) e o potencial zeta das nanopartículas de pró-fármacos foram determinados por espalhamento de luz dinâmico (DLS) no equipamento Nano Zetasizer da Malvern® modelo ZS 3600. O diâmetro hidrodinâmico e o IPD foram medidos no comprimento de onda de 633 nm e ângulo de propagação fixa de 173° em tampão fosfato (pH = 7,4; 0,1 mol L⁻¹) a 37 °C na concentração de 200 µg mL⁻¹. O potencial zeta das nanopartículas de pró-fármacos foi medido a 25 °C em água deionizada na concentração de 200 µg mL⁻¹. Cada medida foi realizada em triplicata e sem processo de filtração.

3.9.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As nanopartículas de pró-fármaco foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) usando o microscópio de emissão Quanta FEG 450-FEI a uma voltagem de 30 kV. As amostras foram dispersas em água deionizada, submetidas a tratamento ultrassônico tipo sonda (20 W, 6 ciclos com 10 s ativo e 10 s desligado) e diluídas na proporção de 1:200 (v/v). Posteriormente, uma alíquota de 10 µL foi retirada e depositada em stubs com fita de carbono, secas à temperatura ambiente (25 °C), metalizadas com ouro (QuorumQT150ES) e analisadas.

3.9.8 Microscopia de força atômica (AFM)

As nanopartículas de pró-fármacos foram analisadas por microscopia de força atômica (AFM) no equipamento Asylum MFP-3D-Bio. As imagens foram obtidas no modo de contato intermitente, utilizando as pontas micro cantilevers (240AC-NA) com constante de mola nominal de 2 N/m e frequência de amplitude de 70 kHz. As amostras foram dispersas em água deionizada, submetidas a tratamento ultrassônico tipo sonda (20 W, 6 ciclos com 10 s ativo e 10 s desligado) e diluídas na proporção de 1:200 (v/v). Posteriormente, uma alíquota de 10 µL foi retirada e depositada sobre uma superfície de mica, seca a vácuo e analisada.

3.10 Ensaio de liberação de DOX

A liberação de DOX para as nanopartículas de pró-fármacos foi avaliada em tampão acetato (pH = 5,0; 0,1 mol L⁻¹) e tampão fosfato (pH = 6,0 e pH = 7,4; 0,1 mol L⁻¹) a 37 °C, pelo método de diálise. Resumidamente, 1,0 mg de pró-fármaco foi disperso em 5 mL de tampão acetato ou fosfato usando tratamento ultrassônico de sonda (20 W, 6 ciclos com 10 s ativo e 10 s desligado) e transferido para uma membrana de celulose (1.000 g mol⁻¹), em seguida, submerso em 50 mL de tampão acetato ou fosfato com agitação constante (75 rpm) e temperatura de 37 °C. Periodicamente, 3 mL do meio de liberação foram coletados e substituídos imediatamente por igual volume de tampão fresco. A quantidade de DOX liberada foi determinada por espectroscopia de fluorescência ($\lambda_{ex} = 480$ nm e $\lambda_{em} = 590$ nm, Apêndice E) e convertida em porcentagem de fármaco liberado de acordo com a equação 10:

$$\text{Porcentagem de fármaco liberado} = \frac{M_t}{M_0} \times 100\% \quad (10)$$

onde M_t é a quantidade de fármaco liberado no tempo t e M_0 é a quantidade inicial de fármaco no pró-fármaco.

3.11 Mecanismo de liberação da DOX

O mecanismo de liberação da DOX pelas nanopartículas de pró-fármacos foi estudado utilizando o modelo cinético de Zeng, An e Wu (2011). Esse modelo descreve sistemas de liberação onde dois mecanismos (difusão rápida e associação/dissociação lenta) são observados em função do tempo. O modelo assume uma exponencial de segunda ordem de acordo com a equação 11:

$$\frac{M_t}{M_0} = \frac{k_{off}}{k_{on} + k_{off}} (1 - e^{-k_s t}) + \frac{k_{on}}{k_{on} + k_{off}} (1 - e^{-k_{off} t}) \quad (11)$$

onde k_s corresponde a taxa de difusão, k_{on} a taxa de associação do fármaco e k_{off} a taxa de dissociação do fármaco.

A diferença de energia livre (ΔG) entre os estados do fármaco livre e ligado (equação 12) pode ser usada para determinar a quantidade de fármaco inicialmente livre e ligado a matriz:

$$\Delta G = -k_B T \ln \left(\frac{k_{on}}{k_{off}} \right) \quad (12)$$

onde k_B é a constante de *Boltzmann* e T é a temperatura absoluta (310 K).

Neste estudo, portanto, três parâmetros, ΔG (em vez de k_{on}), k_s , k_{off} , são usados para descrever o mecanismo de liberação cumulativa da DOX.

3.12 Citotoxicidade

A citotoxicidade dos derivados da goma do cajueiro (GCOX e GCCM), dos pró-fármacos (GC-S-DOX, GC-A-DOX e GCCM-D-DOX) e da DOX livre foi avaliada contra as linhagens tumorais de células de câncer colorretal (HTC-116), câncer de mama (MCF-7) e a linhagem não-tumoral de fibroblasto murino (L929) através do ensaio de redução do brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio (MTT). As linhagens utilizadas foram cultivadas em meio Dulbecco MEM (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

As células das linhagens HCT-116 (6×10^4 cel mL⁻¹), MCF-7 ($0,1 \times 10^6$ cel mL⁻¹) e L929 ($0,1 \times 10^6$ cel mL⁻¹) foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h. Após o processo de incubação, as linhagens HCT-116 e MCF-7 foram tratadas com as amostras (GCOX, GCCM, GC-S-DOX, GC-A-DOX e GCCM-D-DOX). A DOX livre foi utilizada como controle positivo. As placas foram incubadas por 69 h em estufa a 5% de CO₂ a 37 °C. Ao término deste tempo, o sobrenadante foi removido. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de MTT ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) e as placas foram incubadas por 3 h. O precipitado formado foi dissolvido em 150 µL de DMSO e a absorbância medida em 595 nm utilizando espectrofotômetro de placa (Molecular Devices, Spectramax 190). Posteriormente, as amostras que apresentaram potencial citotóxico contra as linhagens HCT-116 e MCF-7 foram testadas em concentrações seriadas ($0,48 - 250 \mu\text{g mL}^{-1}$) utilizando o ensaio de MTT. A concentração inibitória média (CI₅₀) com os respectivos intervalos de

confiança (IC 95%) foi obtida por regressão não-linear utilizando o programa GraphPadPrism versão 8.0. Esses ensaios foram realizados no Laboratório de Cultura de Células do Delta (LCCDelta) da Universidade Federal do Delta do Parnaíba (UFDPAr).

3.13 Ensaio de captação celular

A captação celular da DOX livre e das nanopartículas do pró-fármaco GC-S-DOX foi investigada qualitativamente em células HCT-116 por meio de microscopia confocal de varredura a laser. As células HCT-116 foram semeadas em placas de 12 poços (5×10^4 células mL^{-1}) em meio Dulbecco MEM (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina e estreptomicina) sobre lamínula estéril. As células foram incubadas a 37 °C com DOX livre ($0,12 \mu\text{g mL}^{-1}$) ou nanopartículas do pró-fármaco GC-S-DOX ($4,7 \mu\text{g mL}^{-1}$, equivalente a $1,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ de DOX) por 24 h. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS, fixadas com 4% (m/v) de paraformaldeído tamponado com PBS e os núcleos celulares foram corados com 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). O comprimento de onda de excitação foi de 405 e 488 nm e a faixa de comprimento de onda de emissão foi de 425 – 475 nm e 500 – 580 nm para DAPI (azul) e DOX (vermelho), respectivamente. Esse estudo foi realizado na Central Analítica da Universidade Federal do Ceará (UFC).

3.14 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os dados foram obtidos como média \pm desvio padrão ($n = 3$). A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA) de fator único, seguida do teste Tukey ($p < 0,05$) ou teste de Bonferroni ($*p < 0,05$; $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$), utilizando o software OriginPro 8.5.

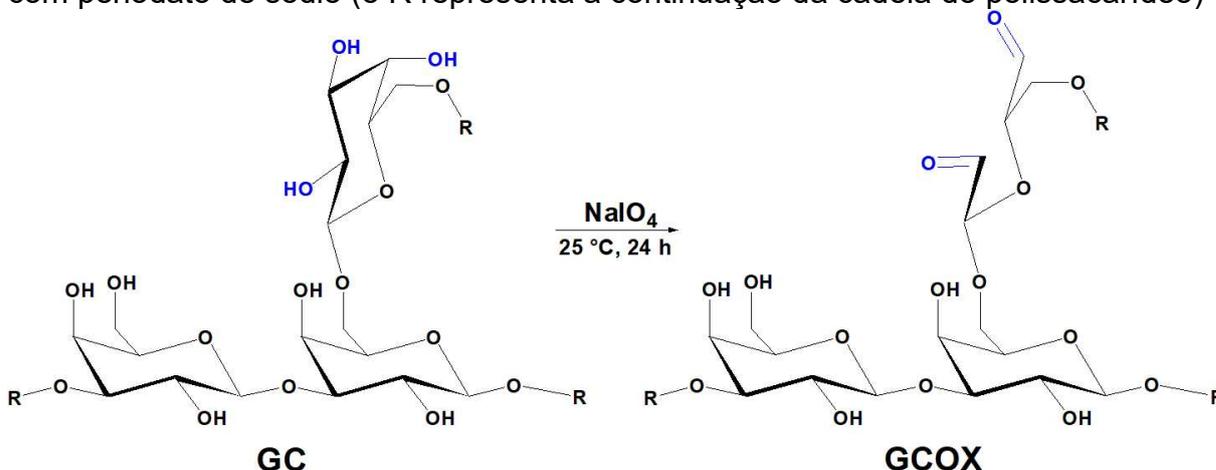
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização dos derivados da goma do cajueiro

4.1.1 Caracterização da goma do cajueiro oxidada (GCOX)

A goma do cajueiro foi obtida a partir do exsudato do cajueiro e modificada via reação de oxidação seletiva com periodato de sódio (Figura 11). A introdução da função orgânica aldeído na estrutura da goma do cajueiro foi confirmada por titulação potenciométrica, FTIR e RMN ^1H .

Figura 11 - Ilustração da síntese do derivado GCOX via reação de oxidação seletiva com periodato de sódio (o R representa a continuação da cadeia do polissacarídeo)



Fonte: elaborado pelo autor.

Os dados de rendimento da síntese do derivado GCOX e seu grau de oxidação determinado pelo método de titulação cloridrato de hidroxilamina/hidróxido de sódio ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}/\text{NaOH}$) foram apresentados na Tabela 7. A síntese do derivado GCOX apresentou um alto rendimento reacional (88%) e grau de oxidação experimental (8,5%), inferior ao grau de oxidação teórico (10%).

O grau de oxidação experimental menor que o grau de oxidação teórico da GCOX está relacionado à formação de estruturas hemiacetálicas (FERREIRA *et al.*, 2021). Grupos aldeído podem reagir com grupos hidroxila da goma do cajueiro para formar ligações hemiacetais inter e intramoleculares e com água para formar hemialdol ou aldeídos hidratados. Maciel *et al.* (2019) propuseram a representação de possíveis estruturas para a

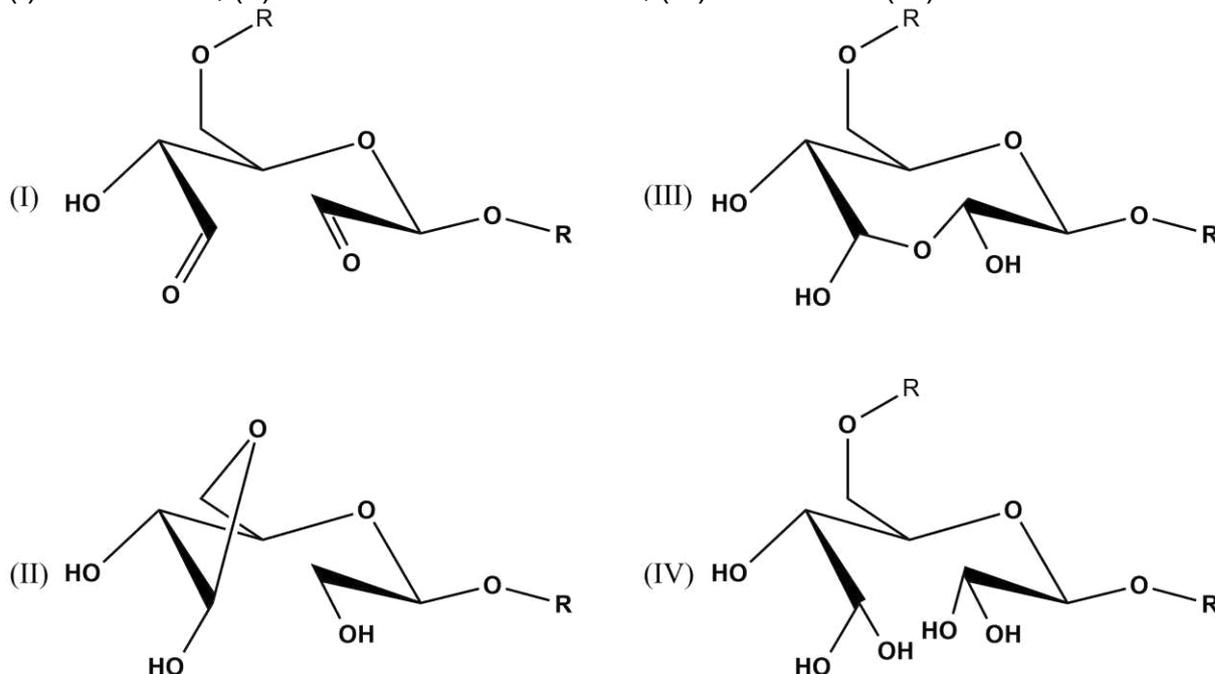
unidade de galactose de derivados da GCOX (Figura 12). A formação de hemiacetais, hemialdol ou aldeídos hidratados em polissacarídeos oxidados foi relatada e confirmada anteriormente por Sirviö *et al.* (2014) em derivados de celulose oxidada, por Salem, Sallam e Youssef (2019) para derivados de alginato oxidado e por Maciel *et al.* (2019) em derivados da goma do cajueiro oxidada.

Tabela 7 – Rendimento e grau de oxidação do derivado GCOX

Polissacarídeo	Rendimento (%)	Grau de oxidação	
		Teórico (%)	Experimental (%)
GC	67,0 ± 3,0*	-	-
GCOX	88,0 ± 2,0	10	8,5 ± 0,1

*Rendimento de extração do polissacarídeo a partir do exsudato.
 Dados reportados com média e desvio padrão (n = 3).
 Fonte: dados da pesquisa.

Figura 12 - Possíveis estruturas para a unidade de galactose de derivados da GCOX: (I) aldeído livre, (II) hemiacetal intramolecular, (III) hemialdol e (IV) aldeídos hidratados

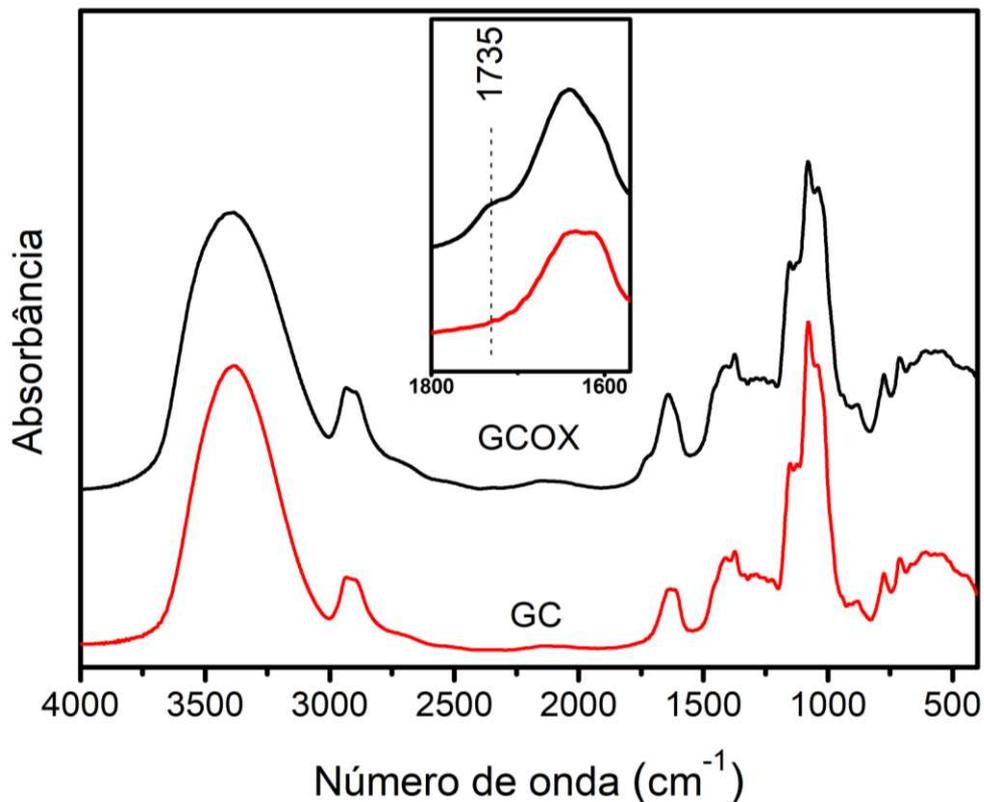


Fonte: adaptado de Maciel *et al.* (2019).

Os espectros de FTIR da GC pura e derivado GCOX (Figura 13) mostram bandas semelhantes, em 3700 - 3000 cm^{-1} atribuídas à vibração de estiramento OH, em 2930 e 2893 cm^{-1} correspondentes à vibração de alongamento CH simétrica e assimétrica, em 1640 cm^{-1} relacionado à vibração de estiramento assimétrico do

grupo carboxilato (COO^-) e vibrações em tesoura OH de moléculas de água ligadas, em 1415 cm^{-1} referente a vibração de estiramento simétrica do grupo carboxilato (COO^-), em 1150 , 1080 e 1030 cm^{-1} características da vibração de estiramento C-O-C das ligações glicosídicas e deformação OH de álcoois. Diferenças espectrais podem ser observadas em 1735 cm^{-1} para o espectro da GCOX com o aparecimento de uma nova banda correspondente à vibração do estiramento C=O da função orgânica aldeído ($-\text{CHO}$) (FERREIRA *et al.*, 2021; MACIEL *et al.*, 2019), confirmando a efetividade da reação de oxidação.

Figura 13 - Espectros de FTIR da GC e do derivado GCOX

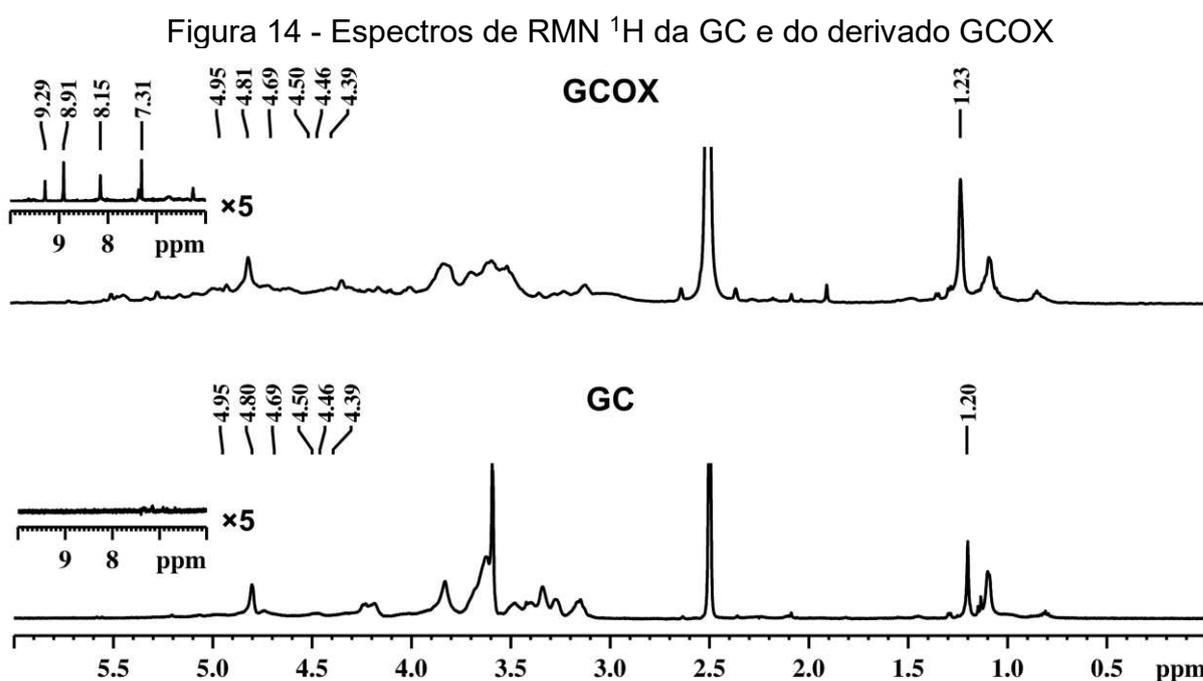


Espectros obtidos em pastilhas de brometo de potássio (KBr) no espectrofotômetro Shimadzu IR-Trace 100 com 64 aquisições e resolução 4 para cada amostra.
Fonte: dados da pesquisa.

De acordo com Maciel *et al.* (2019), os deslocamentos característicos dos hidrogênios anoméricos da goma do cajueiro são observados na região entre 4,35 e 4,95 ppm (Figura 14) devido à presença de α -D-glucose (4,95 ppm), α -L-ramnose (4,81 ppm), β -D-galactose (1 \rightarrow 3) (4,69 e 4,44 ppm), ácido β -D-glucurônico (4,50 ppm) e β -D-galactose (1 \rightarrow 6) (4,39 ppm). Os sinais de H-2 a H-5 estão sobrepostos nas regiões de 3,40 - 4,00 ppm, o sinal em 1,20 ppm é

atribuído aos hidrogênios do grupo metila (CH_3) da ramnose (MACIEL *et al.*, 2019) e o sinal intenso em 2,50 ppm é correspondente ao DMSO utilizado como solvente para análise.

Comparando-se o espectro de RMN ^1H do derivado GCOX com o espectro de RMN ^1H da GC pura (Figura 14), observa-se o aparecimento de novos deslocamentos químicos entre 6,0 e 9,5 ppm que podem ser atribuídos aos aldeídos livres das diferentes unidades de monossacarídeos da GCOX (MACIEL *et al.*, 2019), confirmando a introdução da função orgânica aldeído na estrutura da GC.



Espectros obtidos no equipamento da Bruker® advance modelo DRX500 usando DMSO- d_6 como solvente a 25 °C.

Fonte: dados da pesquisa.

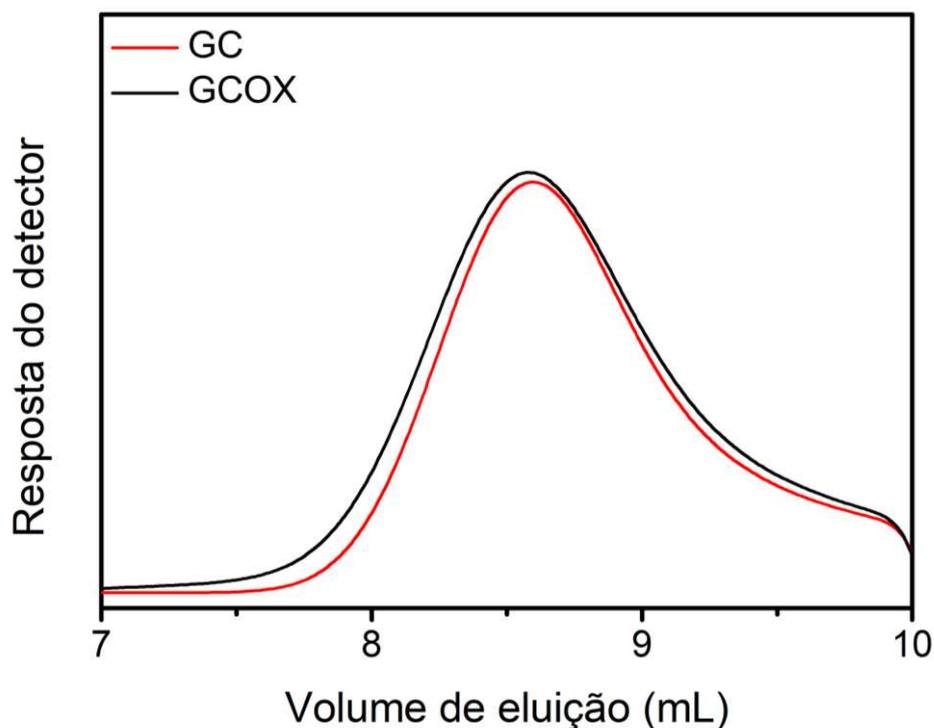
A massa molar de pico (Mpk), a massa molar numérica média (Mn) e a massa molar ponderal média (Mw) da GC e do derivado GCOX foram determinadas por cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) e os dados foram apresentados na Tabela 8. Os dados de massa molar determinados para a GC e o derivado GCOX não diferem significativamente ($p > 0,05$), ou seja, a GC e o derivado GCOX possuem distribuição de massa molar semelhante. O que já era indicado pelos cromatogramas de SEC da GC e do derivado GCOX (Figura 15). A não observação de redução da massa molar do derivado GCOX em comparação com a GC ocorre devido ao baixo grau de oxidação proposto para a síntese do derivado GCOX.

Tabela 8 - Dados de massa molar da GC e do derivado GCOX determinados por SEC

Amostras	Mpk / 10 ⁴ (g mol ⁻¹)	Mn / 10 ³ (g mol ⁻¹)	Mw / 10 ⁴ (g mol ⁻¹)	Dispersão (Đ)
GC	2,87 ± 0,70 ^a	6,97 ± 0,27 ^a	3,23 ± 0,17 ^a	4,64 ± 0,23 ^a
GCOX	3,04 ± 0,40 ^a	6,91 ± 0,31 ^a	3,61 ± 0,98 ^a	5,18 ± 0,56 ^a

Dados reportados com média e desvio padrão (n = 3). A análise estatística foi realizada usando ANOVA de fator único, seguida do teste Tukey. Letras iguais na mesma coluna não são significativamente diferentes (p>0,05) e letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes (p<0,05). Mpk: massa molar de pico; Mn: massa molar numérica média; Mw: massa molar ponderal média. Fonte: dados da pesquisa.

Figura 15 - Cromatogramas de SEC das soluções aquosas de GC e do derivado GCOX

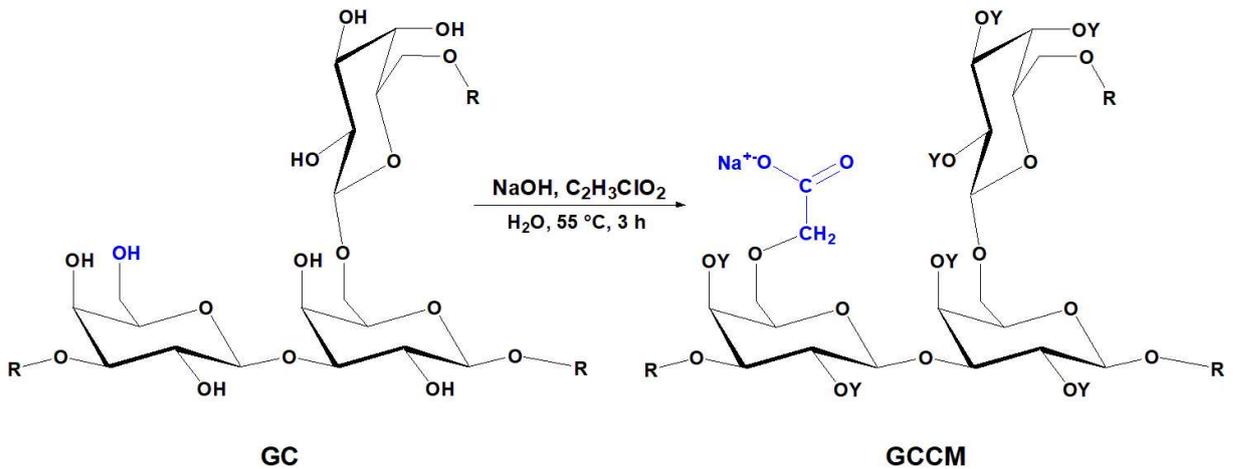


As análises foram realizadas utilizando um detector de índice de refração (RID-10A), uma coluna linear PolySep-SEC GFC-P (300×7,8 mm) e NaNO₃ (0,1 mol L⁻¹) como eluente com fluxo de 1,0 mL min⁻¹ a 30 °C. Fonte: dados da pesquisa.

4.1.2 Caracterização da goma do cajueiro carboximetilada (GCCM)

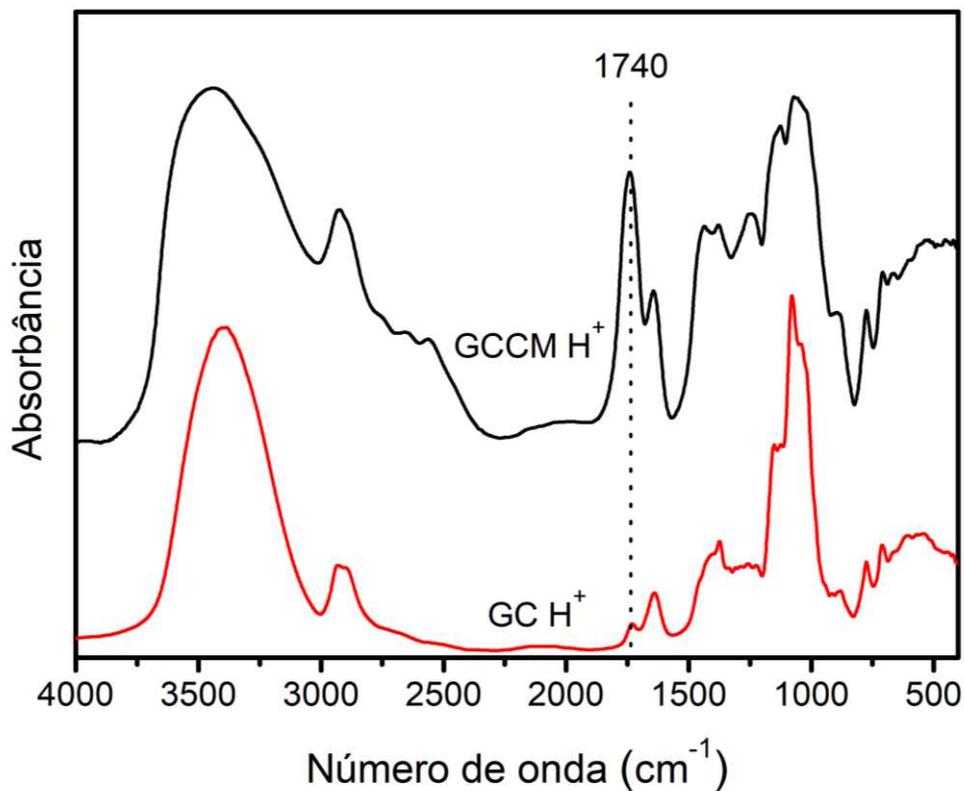
A GCCM foi obtida por reação de carboximetilação com o ácido cloro acético em meio básico (Figura 16). O aumento do teor de grupos ácido na estrutura da goma do cajueiro foi confirmado por FTIR (Figura 17) e titulação potenciométrica.

Figura 16 - Ilustração da síntese do derivado GCCM via reação de carboximetilação com o ácido cloroacético em meio básico (R representa a continuação da cadeia do polissacarídeo e Y o grupo substituinte adicionado a estrutura do polissacarídeo)



Fonte: dados da pesquisa.

Figura 17 - Espectros de FTIR da GC H⁺ e do derivado GCCM H⁺



Espectros obtidos em pastilhas de brometo de potássio (KBr) no espectrofotômetro Shimadzu IR-Trace 100 com 64 aquisições e resolução 4 para cada amostra.
Fonte: dados da pesquisa.

Os espectros de FTIR da GC H⁺ e do derivado GCCM H⁺ (Figura 17) mostram bandas semelhantes. A banda de baixa intensidade em 1740 cm⁻¹ no

espectro da GC H⁺ é característica da vibração do estiramento C=O de ácido carboxílico do ácido glucurônico da estrutura da GC pura (DE PAULA *et al.*, 1998). Um aumento substancial na intensidade desta banda foi observado após a reação de carboximetilação (GCCM), causado pela introdução de novos grupos carboxílicos na estrutura do polissacarídeo (MELO *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2004). O aumento de intensidade na banda de 1740 cm⁻¹ e não na banda em 1640 cm⁻¹ [atribuída à vibração de estiramento assimétrico do grupo carboxilato (COO⁻)] indica que o derivado GCCM H⁺ está predominantemente na forma ácida.

O teor de ácido da GC e do derivado GCCM foram determinados por titulação potenciométrica e foram apresentados na Tabela 9. A síntese do derivado GCCM apresentou teor de grupos ácido de 50% (mol/mol) e rendimento reacional de 45% (m/m). O baixo rendimento reacional da síntese do derivado GCCM já era esperado, visto que a síntese do derivado é processada em meio básico concentrado (NaOH 10 mol L⁻¹), o qual pode degradar a cadeia do polissacarídeo durante a reação de carboximetilação. No entanto, apesar de o rendimento da reação de carboximetilação ser baixo, essa reação é muito eficiente para introduzir grupos ácido na estrutura da GC, já que o teor de grupos ácido no derivado GCCM (50%) é 10 vezes maior que o teor de grupos ácido da GC (5%).

Tabela 9 - Rendimento e teor de grupos ácido do derivado GCCM

Polissacarídeos	Rendimento (%)	Teor de grupos ácido (%)
GC	67,0 ± 3,0 ^a	5,0 ± 0,5 ^a
GCCM	45,0 ± 3,0 ^b	50,0 ± 2,0 ^b

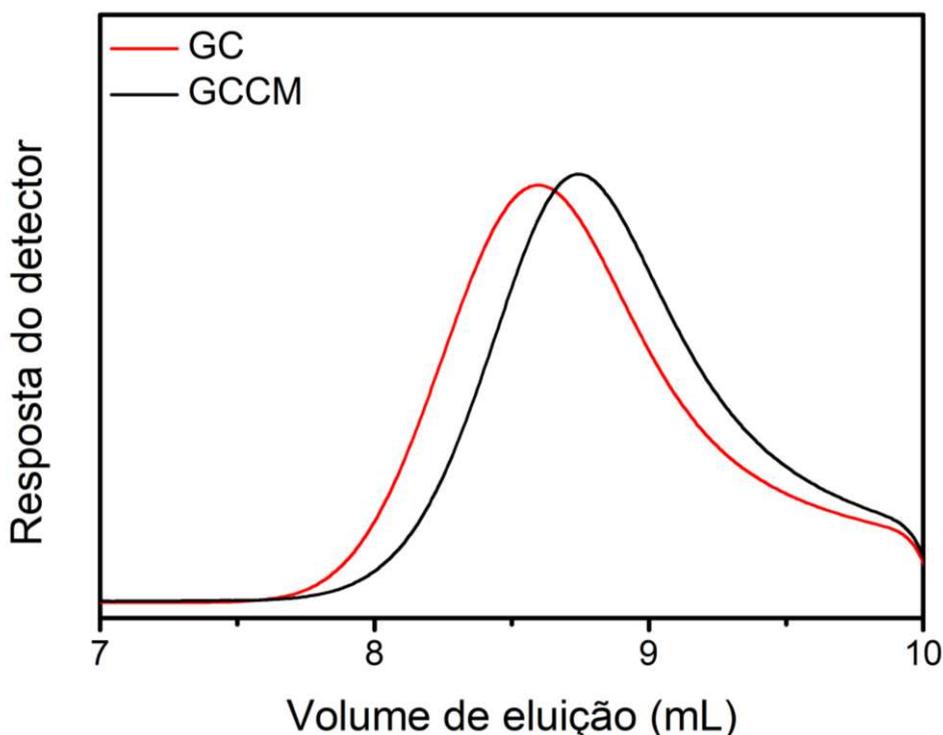
*Rendimento de extração do polissacarídeo a partir do exsudato.

Dados reportados com média e desvio padrão (n = 3). A análise estatística foi realizada usando ANOVA de fator único, seguida do teste Tukey. Letras iguais na mesma coluna não são significativamente diferentes (p>0,05) e letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes (p<0,05).

Fonte: dados da pesquisa.

O baixo rendimento da reação de carboximetilação pode ser explicado por cromatografia de exclusão por tamanho (Figura 18). Comparando-se os cromatogramas da GC e do derivado GCCM, pode-se observar um aumento do volume de eluição para cromatograma do derivado GCCM, indicando uma redução da massa molar desse derivado em comparação com a GC (Tabela 10).

Figura 18 - Cromatogramas de SEC da GC e do derivado GCCM



As análises foram realizadas utilizando um detector de índice de refração (RID-10A), uma coluna linear PolySep-SEC GFC-P (300×7,8 mm) e NaNO_3 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) como eluente com fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$.
Fonte: dados da pesquisa.

Tabela 10 - Dados de massa molar da GC e do derivado GCCM determinados por cromatografia de exclusão por tamanho

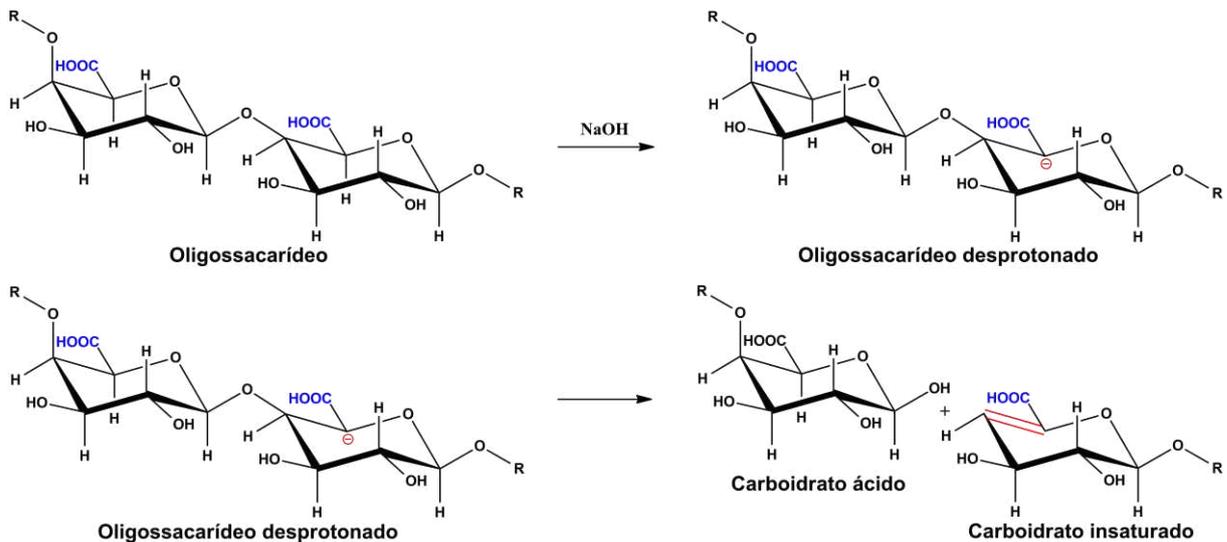
Amostras	Mpk / 10^4 (g mol^{-1})	Mn / 10^3 (g mol^{-1})	Mw / 10^4 (g mol^{-1})	Dispersão (Đ)
GC	$2,87 \pm 0,70^a$	$6,97 \pm 0,07^a$	$3,23 \pm 0,17^a$	$4,64 \pm 0,23^a$
GCCM	$1,87 \pm 0,14^b$	$5,09 \pm 0,15^b$	$2,02 \pm 0,43^b$	$4,02 \pm 0,37^a$

Dados reportados com média e desvio padrão ($n = 3$). A análise estatística foi realizada usando ANOVA de fator único, seguida do teste Tukey. Letras iguais na mesma coluna não são significativamente diferentes ($p > 0,05$) e letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ($p < 0,05$). Mpk: massa molar de pico; Mn: massa molar numérica média; Mw: massa molar ponderal média.
Fonte: dados da pesquisa.

O deslocamento para um maior volume de eluição observado no cromatograma do derivado GCCM ocorre porque na reação de carboximetilação utiliza-se uma base forte (NaOH), que pode promover a quebra da ligação glicosídica entre os monossacarídeos da GC, promovendo a redução da massa molar do derivado GCCM (SILVA *et al.*, 2004).

A degradação/despolimerização de polissacarídeos em meio alcalino ocorre principalmente via processo de β -eliminação. Tal reação ocorre preferencialmente em condições alcalinas e na presença de grupos aldeído, ácido carboxílico ou éster no C-6 da unidade do polissacarídeo. A presença de um desses grupos aumenta a acidez do hidrogênio no C-5, que é desprotonado durante a reação em meio alcalino. Formando-se uma ligação dupla entre o C-4 e o C-5 da unidade do polissacarídeo seguido da clivagem da ligação entre o oxigênio glicosídico e o C-4 (STONE *et al.*, 2008). Os produtos finais são um carboidrato ácido e um carboidrato insaturado (Figura 19). Diante disso, pode-se concluir que a reação de carboximetilação da GC promove a degradação/despolimerização do polissacarídeo via β -eliminação produzindo o derivado GCCM (produto principal) e o carboidrato insaturado como subproduto que acaba sendo eliminado no processo de diálise.

Figura 19 - Representação dos produtos da β -eliminação para um oligossacarídeo do ácido galacturônico (o R representa a continuação da cadeia do oligossacarídeo)

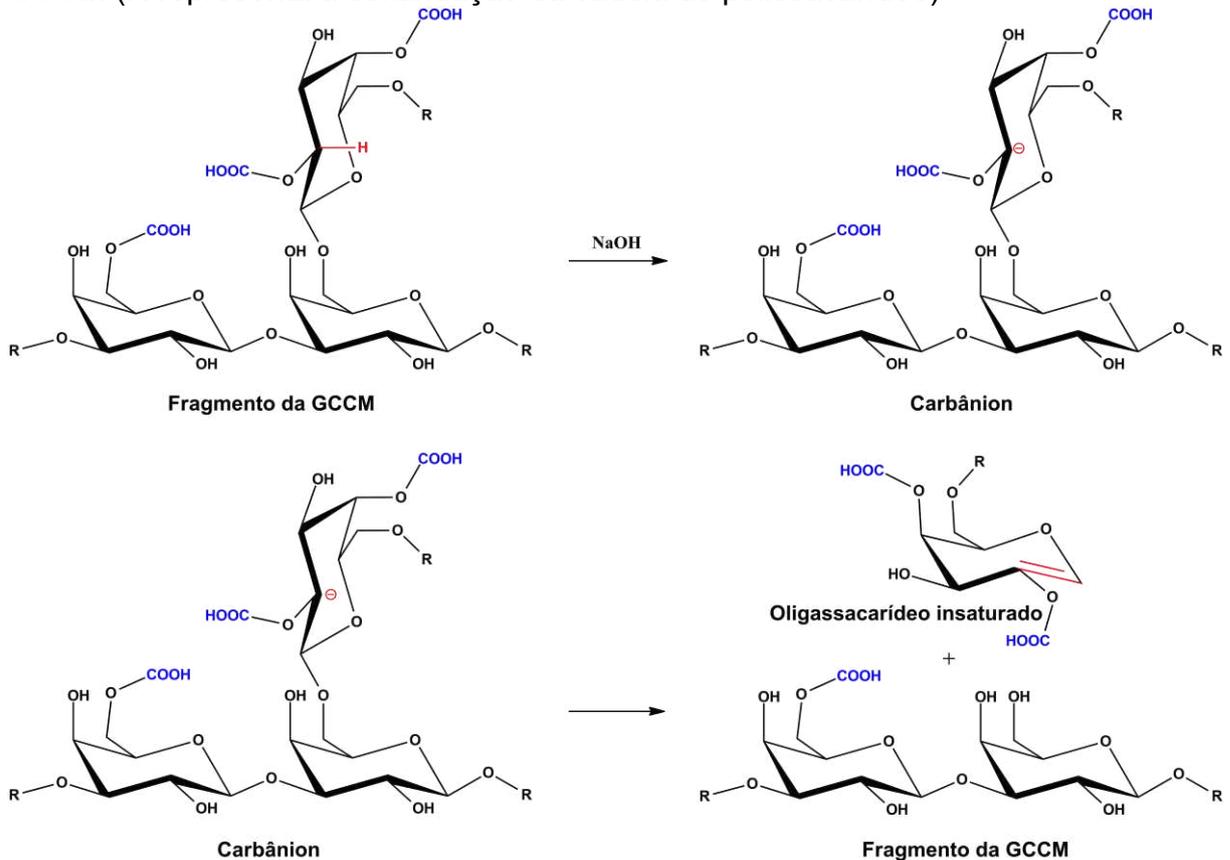


Fonte: adaptado de Stone *et al.* (2008).

O processo de β -eliminação para a reação de carboximetilação da GC pode ocorrer tanto na cadeia principal de galactose ligada por C-1 e C-3, quanto nas ramificações de galactose ligada por C-1 e C-6. No entanto, devido a reação de carboximetilação com o ácido cloro acético (ACA) ocorrer via substituição nucleofílica bimolecular (S_N2), a hidroxila do C-2 da unidade de galactose (cadeia principal) não reage com o ACA devido ao impedimento estérico promovido pelas cadeias laterais na estrutura da GC. Desta forma, pode-se inferir que o processo de β -eliminação na reação de carboximetilação da GC ocorre preferencialmente nas ramificações de

galactose, visto que a introdução do grupo ácido na hidroxila do C-2 aumenta a acidez do hidrogênio no C-2 que pode ser desprotonado durante a reação em meio alcalino formando um carbânion, que, em seguida, forma uma ligação dupla entre o C-2 e o C-1 da unidade de galactose seguido da clivagem da ligação entre o C-1 e o oxigênio glicosídico (Figura 20).

Figura 20 - Representação dos produtos da β -eliminação para um fragmento da GCCM (R representa a continuação da cadeia do polissacarídeo)



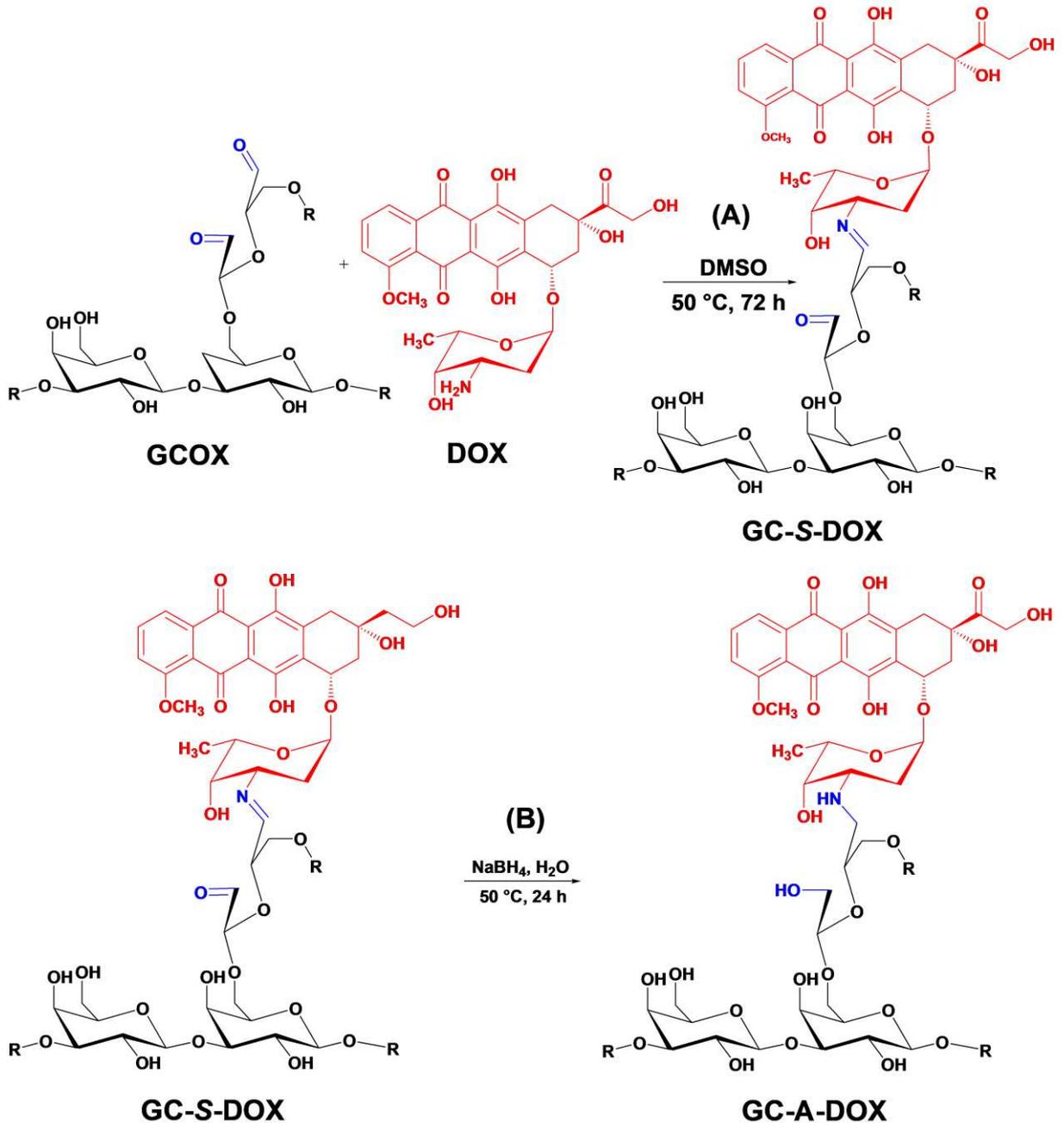
Fonte: elaborado pelo autor.

4.2 Pró-fármacos de doxorrubicina via reação de formação da base de Schiff

4.2.1 Síntese e caracterização dos pró-fármacos de goma do cajueiro oxidada e doxorrubicina

A síntese dos pró-fármacos via reação de formação da base de Schiff e aminação redutiva está ilustrada na Figura 21, a reação ocorre entre o grupo aldeído da GCOX e o grupo amina da DOX, formando o pró-fármaco GC-S-DOX que apresenta a ligação imina/base de Schiff (C=N). A Figura 21 também ilustra a síntese do pró-fármaco GC-A-DOX, na qual a ligação imina é reduzida a ligação amina (C-N).

Figura 21 - Ilustração da síntese do pró-fármaco GC-S-DOX via reação de formação da base de *Schiff* (A) e do pró-fármaco GC-A-DOX via reação de aminação redutiva com NaBH_4 (B) (o R representa a continuação da cadeia do polissacarídeo)



Fonte: elaborado pelo autor.

Os dados de rendimento reacional (RR), carga de fármaco ligado (CFL) e eficiência de fármaco ligado (EFL) estão reportados na Tabela 11. Os dados de RR e EFL, confirmam a eficiência da síntese dos pró-fármacos via reação de formação da base de *Schiff* (GC-S-DOX) e aminação redutiva (GC-A-DOX).

Tabela 11 - Propriedades dos pró-fármacos. Rendimento reacional (RR), carga de fármaco ligado (CFL), eficiência de fármaco ligado (EFL) e concentração de associação crítica (CAC)

Pró-fármacos	RR (%)	CFL (%)	EFL (%)	CAC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
GC-S-DOX	81,0 \pm 1,0 ^a	28,0 \pm 1,0 ^a	75,0 \pm 1,0 ^a	27,0 \pm 1,0 ^a
GC-A-DOX	80,0 \pm 1,0 ^a	24,0 \pm 1,0 ^b	64,0 \pm 2,0 ^b	32,0 \pm 2,0 ^b

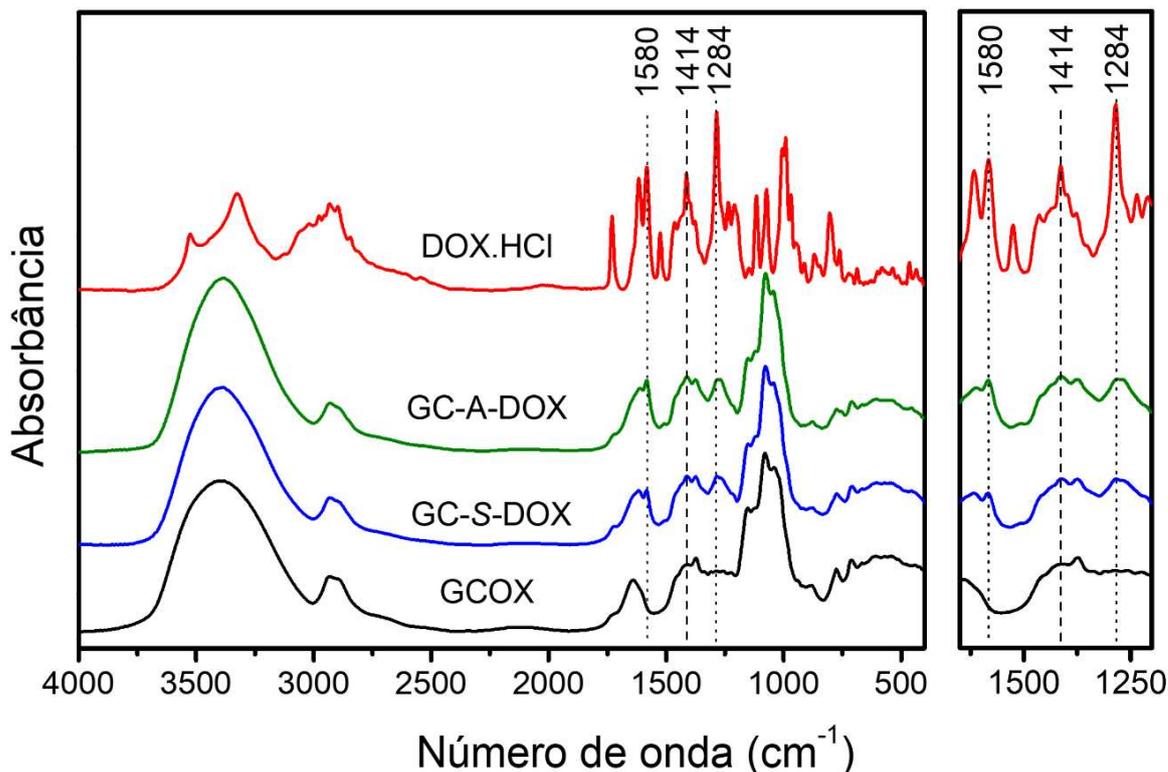
Dados reportados com média e desvio padrão (n = 3). A análise estatística foi realizada usando ANOVA de fator único, seguida do teste Tukey. Letras iguais na mesma coluna não são significativamente diferentes ($p > 0,05$) e letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Fonte: dados da pesquisa.

Os valores de EFL para as pró-fármacos GC-S-DOX (75%) e GC-A-DOX (64%) são maiores do que para os pró-fármacos de dextrana-doxorrubicina (19% e 24%) (LI *et al.*, 2017) e amido-doxorrubicina (59%) (LI *et al.*, 2016b), usando as mesmas condições de síntese (1 mol de -CHO: 1 mol de DOX, 72 h de reação a 50 °C). Além disso, os valores de EFL dos pró-fármacos GC-S-DOX e GC-A-DOX foram maiores do que para pró-fármacos de ácido hialurônico-doxorrubicina (26%) sintetizado a 25 °C (WANG *et al.*, 2019a) e dextrana-doxorrubicina (46%) sintetizado a 60 °C (LI *et al.*, 2020) via reação de formação base de *Schiff*. Esses resultados confirmam que as condições de síntese utilizadas no presente trabalho são ideais na síntese de pró-fármacos via reação de formação da base de *Schiff*.

As estruturas químicas do derivado GCOX, do DOX.HCl e dos pró-fármacos GC-S-DOX e GC-A-DOX foram analisadas por FTIR para confirmar a conjugação entre o grupo aldeído da GCOX e o grupo amina da DOX (Figura 22). O espectro de FTIR do DOX.HCl mostra bandas múltiplas, em 3525 cm^{-1} , atribuídas a vibração de alongamento simétrico NH, em 3325 cm^{-1} referente à vibração de alongamento OH, em 3100 - 2800 cm^{-1} correspondente à vibração de alongamento CH, em 1730 cm^{-1} e 1615 cm^{-1} características da vibração de estiramento C=O de cetona e quinona, em 1580 cm^{-1} atribuída a vibração de estiramento C=C de anel aromático, em 1414 cm^{-1} característica da vibração de flexão simétrica CH relacionada ao grupo metila (CH₃), em 1284 cm^{-1} referente à vibração de alongamento C-O-C e em 1116, 1072 e 1006 cm^{-1} relativo a vibração de estiramento OH para álcool terciário, secundário e primário, respectivamente (FRANCIS; JAYAKRISHNAN, 2019; NEACŞU, 2018; WANG *et al.*, 2019c).

Figura 22 - Espectros de FTIR do derivado GCOX, do DOX.HCl e dos pró-fármacos GC-S-DOX e GC-A-DOX



Espectros obtidos em pastilhas de brometo de potássio (KBr) no espectrofotômetro Shimadzu IR-Trace 100 com 64 aquisições e resolução 4 para cada amostra.
Fonte: dados da pesquisa.

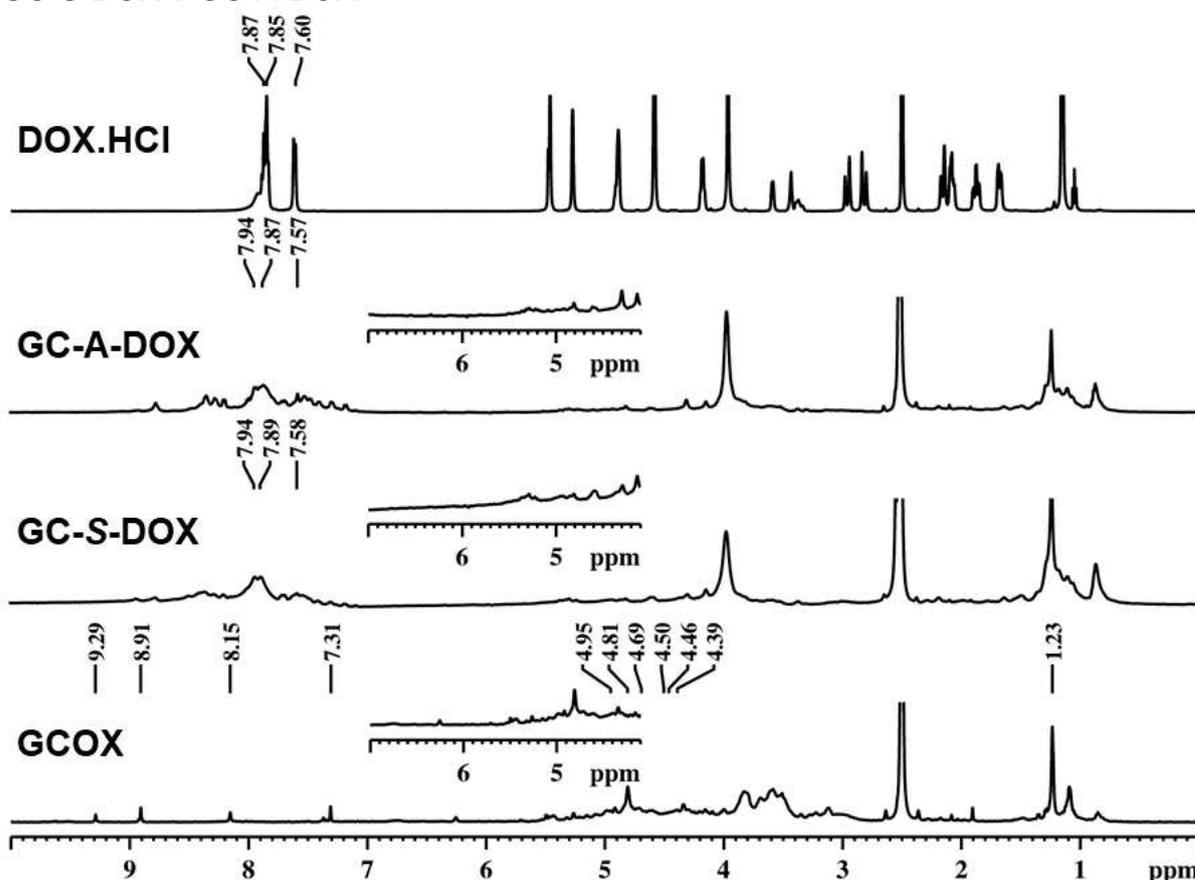
A presença de três novas bandas foi observada nos espectros dos pró-fármacos GC-S-DOX e GC-A-DOX quando comparados ao espectro do derivado GCOX (Figura 22). Em 1580 cm^{-1} atribuída a vibração de estiramento C=C de anel aromático, em 1414 cm^{-1} característica da vibração de flexão simétrica CH relacionada ao grupo metila (CH_3) e em 1284 cm^{-1} referente à vibração de alongamento C-O-C da DOX. Esses resultados indicam a conjugação da DOX ao polissacarídeo (GAO *et al.*, 2017; NIU *et al.*, 2018). As bandas de absorção referentes à ligação imina/base de *Schiff* ($\text{C}=\text{N}$, $1690 - 1640\text{ cm}^{-1}$) e ligação amina ($\text{C}-\text{N}$, $1230 - 1030\text{ cm}^{-1}$) podem estar ocultas devido à sobreposição de bandas.

As vibrações de estiramento da ligação imina ($\text{C}=\text{N}$) podem estar sobrepostas pela banda em 1640 cm^{-1} , característica da vibração de estiramento assimétrico do grupo carboxilato (COO^-) do derivado GCOX e pelas bandas em 1730 cm^{-1} e 1615 cm^{-1} referentes à vibração de estiramento $\text{C}=\text{O}$ de cetona e quinona da DOX. As vibrações de estiramento da ligação amina ($\text{C}-\text{N}$) podem ser sobrepostas pelas bandas em 1150 , 1080 e 1030 cm^{-1} , características da vibração de alongamento

COC das ligações glicosídicas e deformação OH de álcoois do derivado GCOX e pelas bandas em 1116, 1072 e 1006 cm^{-1} correspondentes à vibração de estiramento OH dos álcoois terciário, secundário e primário da DOX, respectivamente (Apêndice F).

A Figura 23 mostra os espectros de RMN ^1H da GCOX, DOX.HCl, pró-fármacos GC-S-DOX e GC-A-DOX em DMSO deuterado. Observa-se o aparecimento de novos picos na região de 7,5 a 8,5 ppm referentes aos hidrogênios aromáticos da DOX e o desaparecimento dos picos entre 6,0 e 9,5 ppm atribuídos aos aldeídos livres das diferentes unidades de monossacarídeos da GCOX, confirmando a conjugação da DOX a GC.

Figura 23 - Espectros de RMN ^1H do derivado GCOX, do DOX.HCl e dos pró-fármacos GC-S-DOX e GC-A-DOX



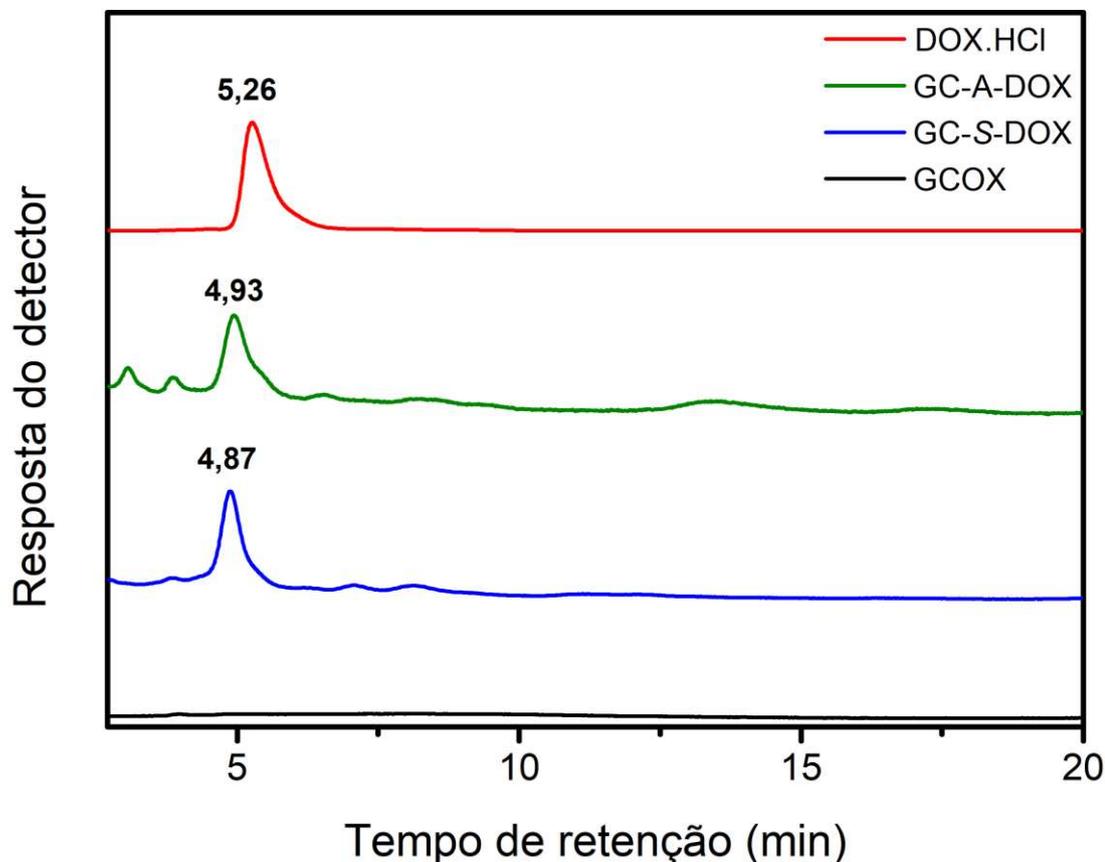
Espectros obtidos no equipamento da Bruker® advance modelo DRX500 usando DMSO- d_6 como solvente a 25 °C.

Fonte: dados da pesquisa.

A análise de HPLC mostrou diferentes tempo de retenção para DOX livre (5,26 min) e para a DOX conjugada aos pró-fármacos GC-S-DOX (4,87 min) e GC-A-DOX (4,93 min) (Figura 24). Os diferentes tempos de retenção indicam que a

estrutura da DOX foi alterada (SONG *et al.*, 2019), ou seja, indicam que a DOX está ligada covalentemente ao derivado GCOX.

Figura 24 - Cromatogramas de HPLC do derivado GCOX, do DOX.HCl e dos pró-fármacos GC-S-DOX e GC-A-DOX



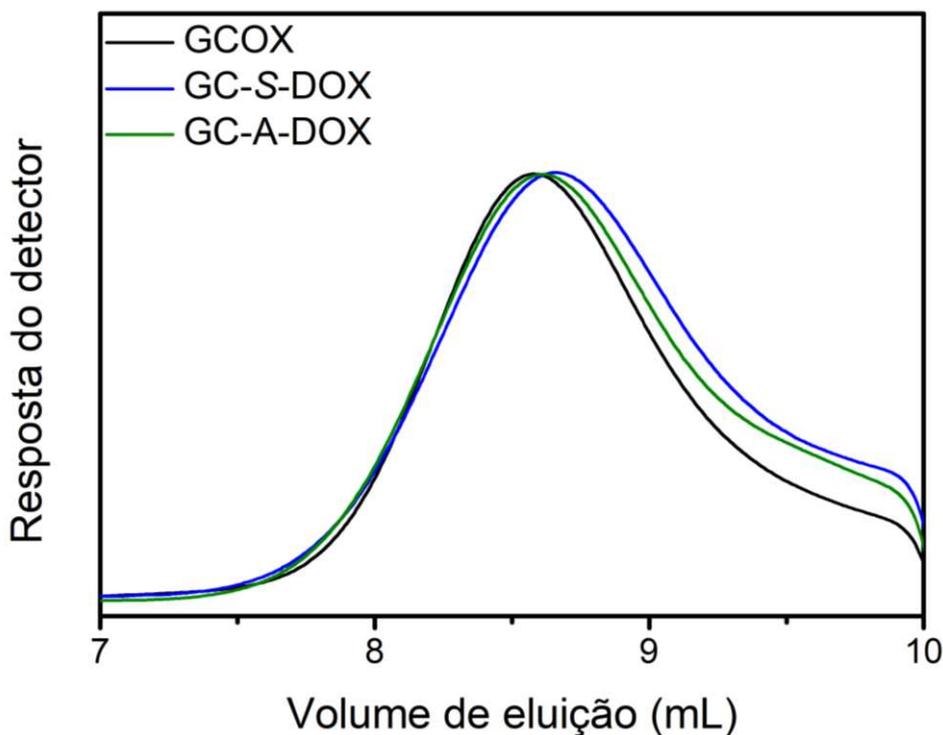
Análises realizadas utilizando um detector de fotodiodo UV-visível SPD-M20A, uma coluna C18 (10 μm , 15 $\text{cm} \times 4,6 \text{ mm}$) e acetonitrila: água (30: 70 v/v) como eluente a uma taxa de fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Fonte: dados da pesquisa.

Os resultados obtidos por FTIR, RMN ^1H e HPLC para os pró-fármacos GC-S-DOX e GC-A-DOX indicam que a DOX está ligada covalentemente ao polissacarídeo.

A distribuição de massa molar dos pró-fármacos GC-S-DOX e GC-A-DOX foi determinada por cromatografia de exclusão por tamanho (Figura 25) e não foi possível observar deslocamento do volume de eluição dos cromatogramas dos pró-fármacos quando comparado ao cromatograma do derivado GCOX.

Figura 25 - Cromatogramas de SEC do derivado GCOX e dos pró-fármacos GC-S-DOX e GC-A-DOX



As análises foram realizadas utilizando um detector de índice de refração (RID-10A), uma coluna linear PolySep-SEC GFC-P (300×7,8 mm) e NaNO_3 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) como eluente com fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$.
Fonte: dados da pesquisa.

Os dados de massa molar da Tabela 12 confirmam que não se tem uma diferença significativa de massa molar entre os pró-fármacos ou entre os pró-fármacos e o derivado GCOX. Esse comportamento já era esperado pelo fato da DOX ser uma molécula pequena e de baixa massa molar ($543,46 \text{ g mol}^{-1}$).

Tabela 12 - Dados de massa molar do derivado GCOX e dos pró-fármacos GC-S-DOX e GC-A-DOX determinados por cromatografia de exclusão por tamanho

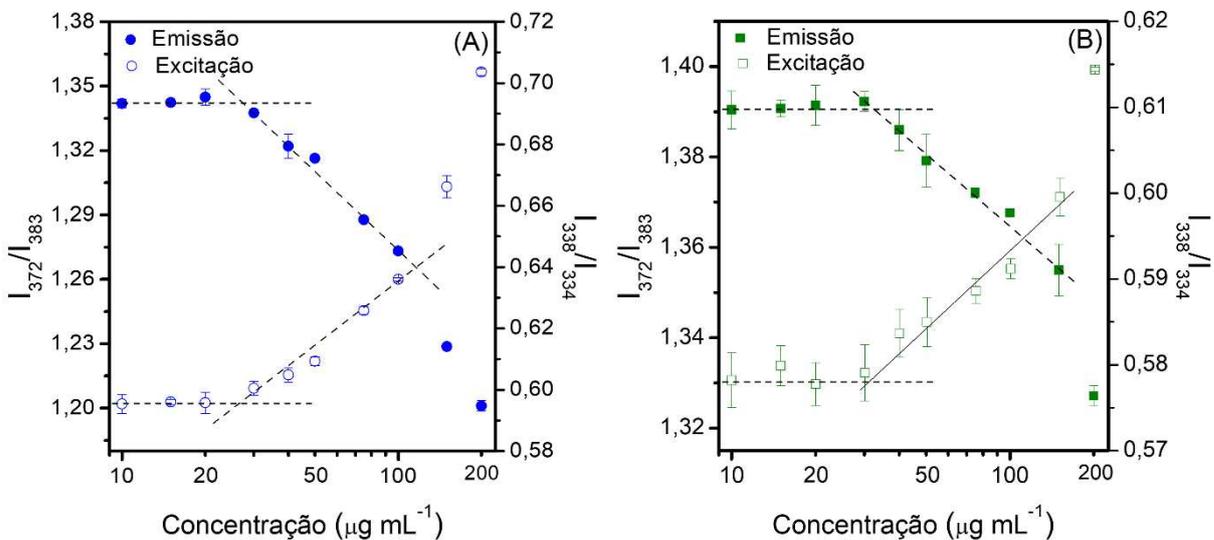
Amostras	Mpk / 10^4 (g mol^{-1})	Mn / 10^3 (g mol^{-1})	Mw / 10^4 (g mol^{-1})	Dispersão (\bar{D})
GCOX	$3,04 \pm 0,40^a$	$6,91 \pm 0,31^a$	$3,61 \pm 0,98^a$	$5,18 \pm 0,56^a$
GC-S-DOX	$2,51 \pm 0,35^a$	$6,08 \pm 0,61^a$	$3,78 \pm 0,27^a$	$6,20 \pm 0,54^a$
GC-A-DOX	$2,68 \pm 0,20^a$	$6,26 \pm 0,44^a$	$3,54 \pm 0,67^a$	$5,64 \pm 0,68^a$

Dados reportados com média e desvio padrão ($n = 3$). A análise estatística foi realizada usando ANOVA de fator único, seguida do teste Tukey. Letras iguais na mesma coluna não são significativamente diferentes ($p > 0,05$) e letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ($p < 0,05$).
Mpk: massa molar de pico; Mn: massa molar numérica média; Mw: massa molar ponderal média.
Fonte: dados da pesquisa.

4.2.2 Caracterização físico-química das nanopartículas de goma do cajueiro oxidada e doxorubicina

O comportamento dos pró-fármacos GC-S-DOX e GC-A-DOX foi estudado em solução aquosa por espectroscopia de fluorescência utilizando o pireno como sonda fluorescente. A mudança na razão de intensidade I_{372}/I_{383} e/ou I_{338}/I_{334} nos espectros de emissão e/ou excitação de fluorescência do pireno corresponde a CAC (Figura 26), ou seja, a concentração mínima de pró-fármacos para a formação de nanopartículas. Os valores de CAC foram determinados pela interseção entre as retas (horizontal e diagonal) na Figura 26 e foram apresentados na Tabela 11.

Figura 26 - Relação entre a razão de intensidade de fluorescência do pireno (I_{372}/I_{383} ou I_{338}/I_{334}) e a concentração de pró-fármacos GC-S-DOX (A) ou GC-A-DOX (B) em tampão fosfato (pH = 7,4 a 37 °C)



Fonte: dados da pesquisa.

Analisando-se os dados da CAC e da CFL (Tabela 11), observa-se uma relação inversa entre a CAC e CFL. O aumento da CFL diminui a CAC devido ao aumento da hidrofobicidade do pró-fármaco propiciar uma redução da concentração de pró-fármacos necessários para a formação das nanopartículas.

As nanopartículas dos pró-fármacos GC-S-DOX e GC-A-DOX foram obtidas usando o método de ultrassom direto e caracterizadas por DLS, MEV e AFM. Os dados obtidos por DLS, MEV e AFM estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 - Parâmetros físico-químicos das nanopartículas dos pró-fármacos GC-S-DOX e GC-A-DOX

Amostras	DLS			MEV	AFM
	Tamanho (nm)*	IPD*	Zeta (mV)#	Tamanho (nm)	Tamanho (nm)
GCOX	223 ± 8 ^a	0,36 ± 0,07 ^a	-19 ± 3 ^a	-	-
GC-S-DOX	159 ± 11 ^b	0,29 ± 0,06 ^b	-18 ± 2 ^a	74 ± 16 ^a	~20
GC-A-DOX	193 ± 8 ^c	0,28 ± 0,03 ^b	-20 ± 2 ^a	75 ± 10 ^a	~62

Dados reportados com média e desvio padrão (n = 3). A análise estatística foi realizada usando ANOVA de fator único, seguida do teste Tukey. Letras iguais na mesma coluna não são significativamente diferentes ($p > 0,05$) e letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

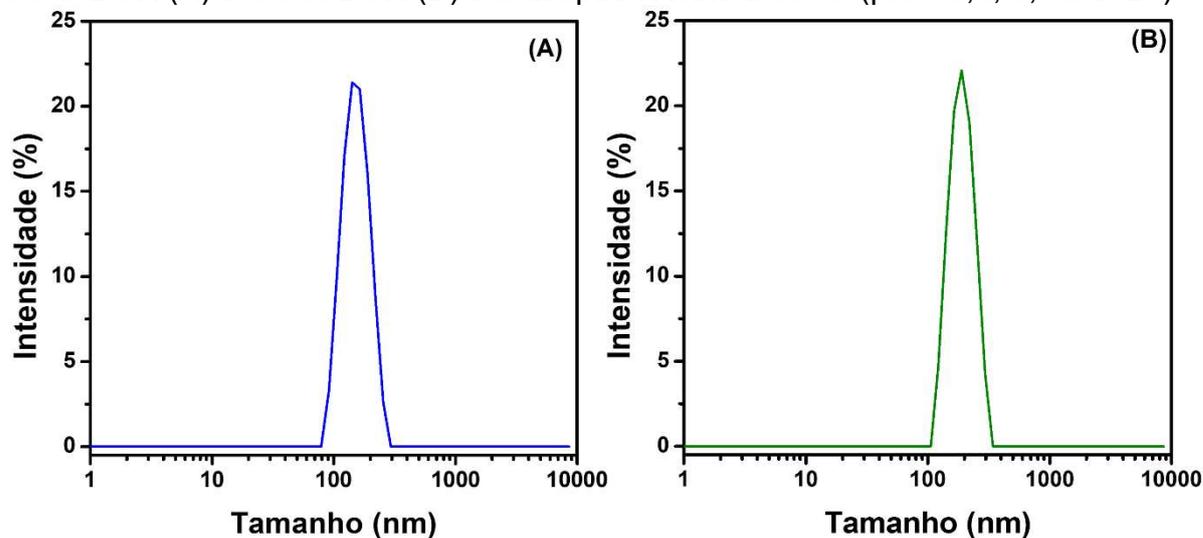
*tampão fosfato (pH = 7,4; 0,1 mol L⁻¹) a 37 °C.

#água a 25 °C.

Fonte: dados da pesquisa.

As nanopartículas dos pró-fármacos GC-S-DOX e GC-A-DOX apresentaram distribuição de tamanho unimodal (Figura 27) em tampão fosfato (pH = 7,4; 0,1 mol L⁻¹) com tamanho médio de 159 e 193 nm, respectivamente. O menor tamanho de partícula em solução obtido para as nanopartículas do pró-fármaco GC-S-DOX pode ser atribuído a sua maior CFL (28%) em comparação com a CFL (24%) do pró-fármaco GC-A-DOX. O aumento da CFL aumenta as porções hidrofóbicas do pró-fármaco, propiciando interações hidrofóbicas mais fortes que levam à contração do tamanho das nanopartículas.

Figura 27 - Distribuição de tamanho das nanopartículas dos pró-fármacos GC-S-DOX (A) e GC-A-DOX (B) em tampão fosfato a 37 °C (pH = 7,4; 0,1 mol L⁻¹)



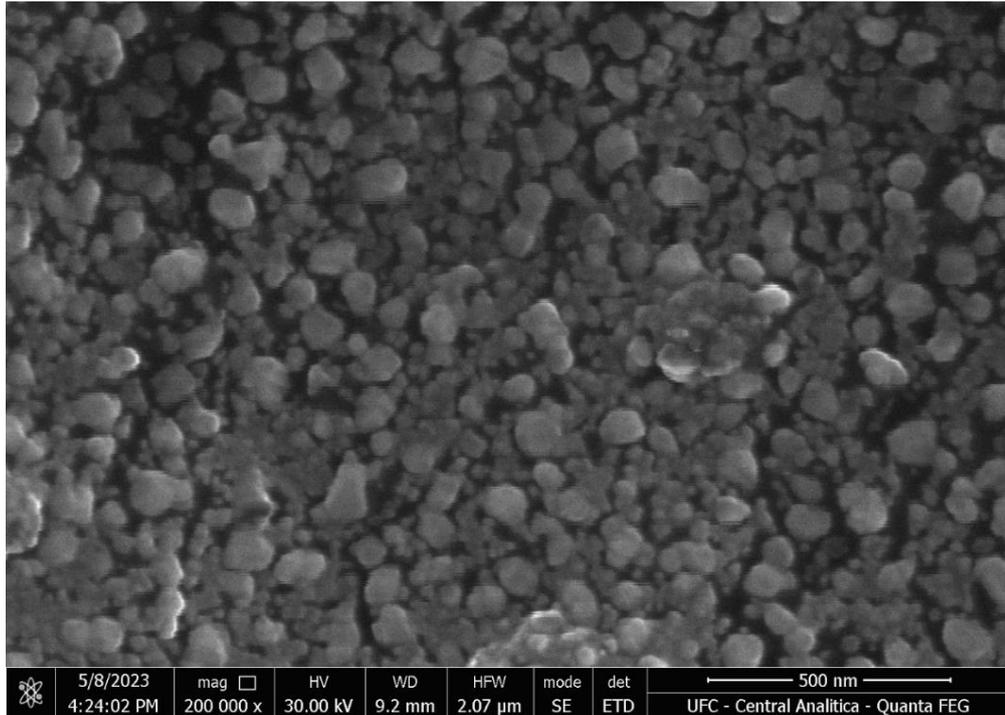
Fonte: dados da pesquisa.

Sistemas de liberação de fármacos para aplicação intravenosa devem ser projetados com tamanho médio variando de 30 a 300 nm para garantir um maior tempo de circulação das nanopartículas. Tamanhos superiores a 300 nm devem ser evitados, pois podem causar trombose ou serem rapidamente eliminados pelo fígado e baço. Partículas menores que 10 nm podem ser excretadas diretamente pelos rins (FERRARI *et al.*, 2018). Em relação a sistemas de liberação de fármacos para o tratamento contra o câncer tem-se explorado o efeito de permeabilidade e retenção aprimorada, devido à diferença do número e tamanho de poros entre o tecido tumoral (500 - 1000 nm) e os vasos normais (6 - 12 nm). Isso promove o acúmulo seletivo das nanopartículas nos tumores, aumentando o tempo de retenção dos quimioterápicos dentro do tumor, a biodisponibilidade e absorção vascular de fármacos pouco solúveis (ALAVI; WEBSTER, 2021; ALI *et al.*, 2021). Logo, as nanopartículas dos pró-fármacos GC-S-DOX e GC-A-DOX possuem tamanho apropriado para aplicação intravenosa e para promover o acúmulo de DOX dentro de tumores por meio do direcionamento passivo via efeito de permeabilidade e retenção (EPR) aprimorada.

As nanopartículas dos pró-fármacos GC-S-DOX e GC-A-DOX apresentam uma redução do tamanho e do IPD em relação ao derivado GCOX. O potencial zeta negativo é devido aos grupos ácidos da estrutura do polissacarídeo (Tabela 13). A redução confirma a natureza anfifílica dos pró-fármacos, que tendem a se organizar formando uma estrutura núcleo-casca. O segmento hidrofóbico (DOX) compõe o núcleo que é envolvido por uma camada externa (invólucro), composta pelo segmento hidrofílico (polissacarídeo).

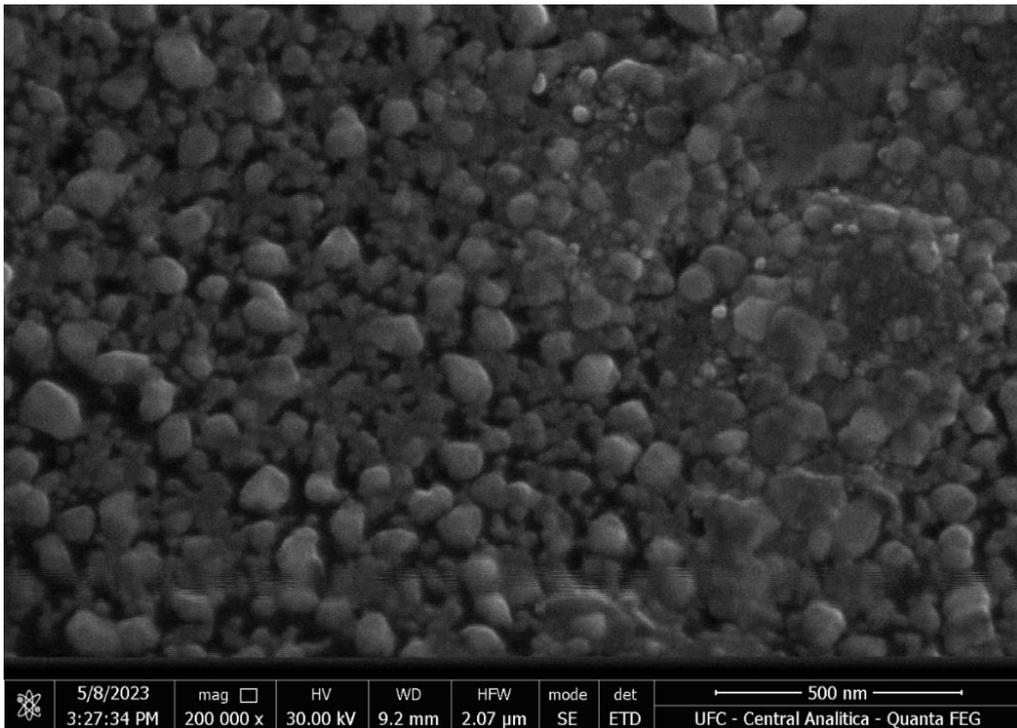
As imagens de MEV e AFM mostram que as nanopartículas de pró-fármacos GC-S-DOX e GC-A-DOX apresentam formato esférico e superfície lisa (Figuras 28 - 30). O tamanho médio de partícula determinado por MEV foi igual para as nanopartículas de pró-fármacos GC-S-DOX e GC-A-DOX (75 nm). Nas imagens de MEV (Figuras 28 e 29) pode-se observar regiões nas quais as nanopartículas de pró-fármacos estão agregadas. Essa agregação pode estar relacionada ao processo de secagem dessas amostras.

Figura 28 - Micrografias das nanopartículas do pró-fármaco GC-S-DOX



Fonte: dados da pesquisa.

Figura 29 - Micrografias das nanopartículas do pró-fármaco GC-A-DOX

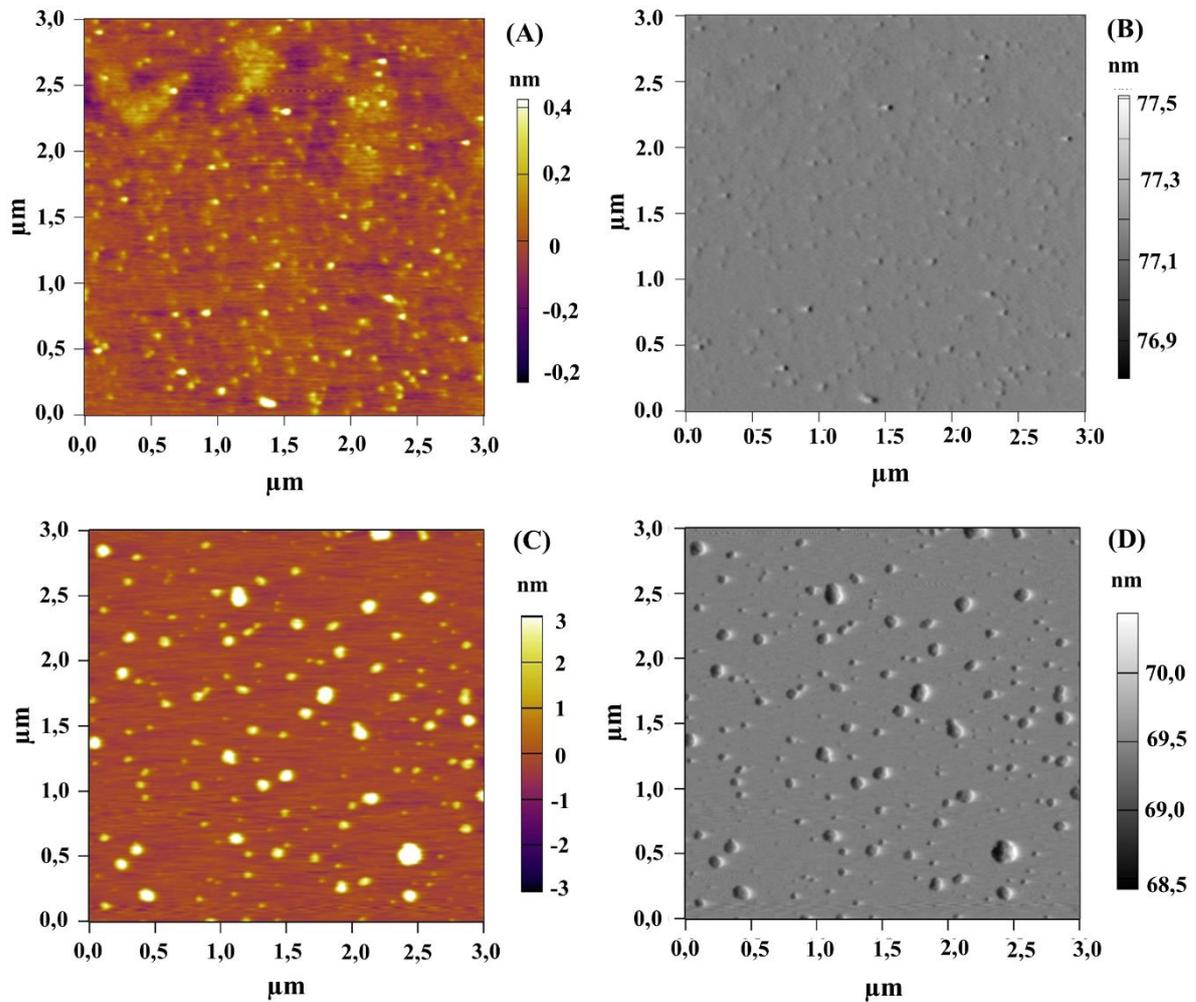


Fonte: dados da pesquisa.

O tamanho de partícula determinado por AFM para nanopartículas de pró-fármacos GC-S-DOX e GC-A-DOX foi de 20 e 62 nm, respectivamente.

Nas imagens de AFM (Figura 30D) pode-se observar que as nanopartículas do pró-fármacos GC-A-DOX foram achatadas durante o processo de secagem a vácuo.

Figura 30 - Micrografias obtidas por AFM das nanopartículas dos pró-fármacos GC-S-DOX (A e B) e GC-A-DOX (C e D)



Imagens A e C são de altura e imagens B e D são de amplitude.

Fonte: dados da pesquisa.

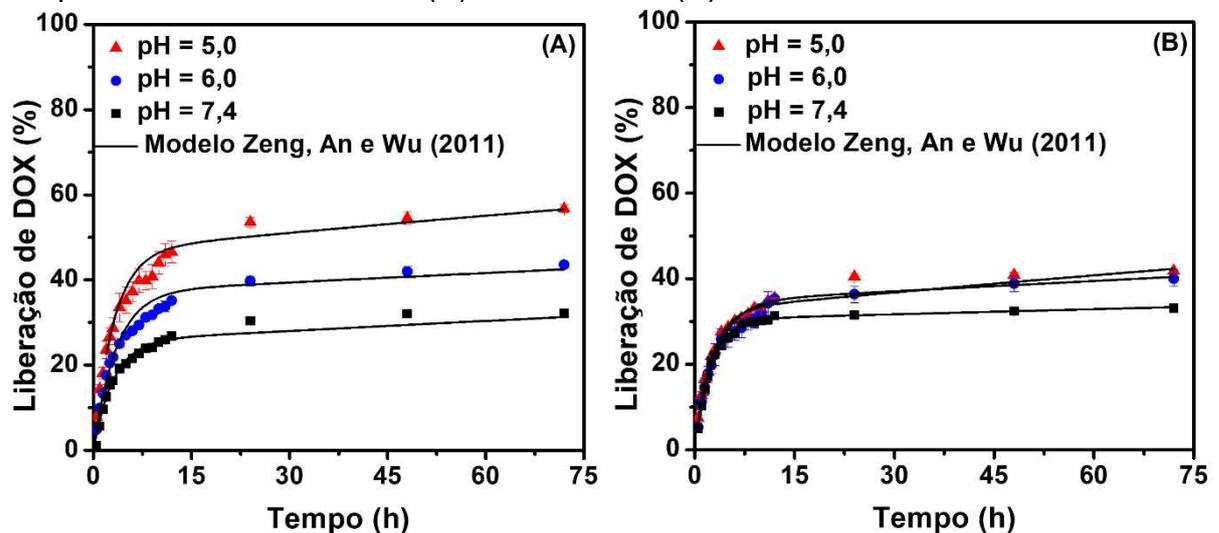
O tamanho de partícula determinados por DLS, MEV e AFM (Tabela 13) apresentaram uma grande diferença entre o tamanho das nanopartículas de pró-fármacos GC-S-DOX e GC-A-DOX determinado por DLS e determinado por MEV e AFM. Os tamanhos das nanopartículas determinado por MEV (75 nm) e AFM (20 e 62 nm) são menores do que os tamanhos das nanopartículas de pró-fármaco determinado por DLS (159 e 193 nm). Isso ocorre porque por MEV, AFM e TEM mede-se o tamanho das nanopartículas secas e por DLS mede-se o diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas em solução, o que inclui as camadas iônicas e os

solventes associados às nanopartículas em solução (EATON *et al.*, 2017). Além disso, as nanopartículas em meio aquoso estão intumescidas. Comportamento semelhante foi observado por Li *et al.* (2018) sobre o tamanho das nanopartículas de pró-fármacos determinadas por TEM (25 - 31 nm) e DLS (52 - 73 nm).

4.2.3 Estudo *in vitro* das nanopartículas de goma do cajueiro oxidada e doxorubicina

O potencial de liberação das nanopartículas dos pró-fármacos GC-S-DOX e GC-A-DOX foi avaliado em tampão acetato (pH = 5,0; 0,1 mol L⁻¹) e tampão fosfato (pH = 6,0 e pH = 7,4; 0,1 mol L⁻¹). Todos os sistemas apresentaram uma liberação de explosão inicial da DOX nas primeiras horas de experimento, devido a DOX encapsulada durante o processo de formação das nanopartículas. Em seguida ocorre uma liberação lenta da DOX ligada covalentemente ao polissacarídeo (Figura 31). As nanopartículas de pró-fármacos apresentaram liberação modificada pelo pH do meio (nanopartículas pH-responsivas), ou seja, o percentual de DOX liberado aumenta com a redução do pH do meio, devido à clivagem da ligação imina entre o polissacarídeo e a DOX.

Figura 31 - Liberação cumulativa de DOX em função do pH para as nanopartículas dos pró-fármacos GC-S-DOX (A) e GC-A-DOX (B)



Dados reportados com média e desvio padrão (n=3).
Fonte: dados da pesquisa.

As nanopartículas do pró-fármaco GC-S-DOX (Figura 31A) apresentaram maior percentual de liberação de DOX em tampão acetato (pH = 5,0; 0,1 mol L⁻¹) e tampão fosfato (pH = 6,0; 0,1 mol L⁻¹) do que às do pró-fármaco GC-A-DOX (Figura 31B). Isso ocorre por que a ligação imina/base de *Schiff* (C=N) é mais suscetível a clivagem em meio ácido do que a ligação amina (C-N) (XU *et al.*, 2015).

O percentual de liberação de DOX após 72 h das nanopartículas de pró-fármacos GC-S-DOX e GG-A-DOX foi de 30% e 32% em pH 7,4 (tecido normal), de 38% e 35% em pH 6,0 (microambiente tumoral extracelular) e de 54% e 40% em pH 5,0 (microambiente tumoral intracelular), respectivamente. Resultados semelhantes foram observados para nanopartículas de pró-fármaco à base de dextrana-doxorrubicina (pH 7,4 = 32%, pH 6,5 = 39% e pH 5,0 = 57%) (NIU *et al.*, 2018) e amido-doxorrubicina (pH 7,4 = 38% e pH 5,5 = 60%) (LI *et al.*, 2018) sintetizados via formação da base de *Schiff*.

O modelo cinético de Zeng, An e Wu (2011) foi aplicado aos dados experimentais de liberação da DOX pelas nanopartículas dos pró-fármacos GC-S-DOX e GC-A-DOX. Os parâmetros do modelo foram calculados e estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 - Parâmetros estimados pelo modelo cinético de Zeng para liberação cumulativa de DOX das nanopartículas dos pró-fármacos GC-S-DOX e GC-A-DOX

Nanopartículas	pH	Parâmetros do modelo de Zeng				
		k_s (h ⁻¹)	k_{on} (h ⁻¹)	k_{off} (h ⁻¹)	ΔG (10 ⁻²² J)	R^2
GC-S-DOX	7,4	0,329	0,0032	0,0011	-46	0,998
	6,0	0,290	0,0021	0,0012	-24	0,994
	5,0	0,325	0,0033	0,0029	-5,5	0,993
GC-A-DOX	7,4	0,405	0,0013	0,0006	-34	0,995
	6,0	0,325	0,0025	0,0013	-27	0,990
	5,0	0,411	0,0045	0,0022	-31	0,985

k_s : taxa de difusão do fármaco; k_{on} : taxa de associação do fármaco; k_{off} : taxa de dissociação do fármaco; ΔG : diferença de energia livre entre os estados do fármaco livre e ligado.

Fonte: dados da pesquisa.

As nanopartículas dos pró-fármacos GC-S-DOX e GC-A-DOX apresentaram valores $k_s \gg k_{on}$ e $k_s \gg k_{off}$ (Tabela 14), descrevendo uma liberação rápida do fármaco livre via difusão, seguida de uma liberação lenta do fármaco ligado à matriz, que é ditada pelo processo de dissociação (ZENG; AN; WU, 2011). Os valores de $\Delta G < 0$ indicam uma forte interação entre o fármaco (DOX) e a matriz (polissacarídeo) (RICHTER *et al.*, 2022). Além disso, observa-se um aumento dos valores de ΔG em função da redução do pH do meio, indicando que a redução do pH enfraquece a interação/ligação do fármaco com a matriz e, conseqüentemente, aumenta a liberação ditada pelo processo de dissociação. Os dados de k_{off} corroboram com essa observação, visto que, os dados de k_{off} para a liberação de DOX em pH 5,0 são bem maiores do que os dados dessa constante para a liberação em pH 7,4 (Tabela 14).

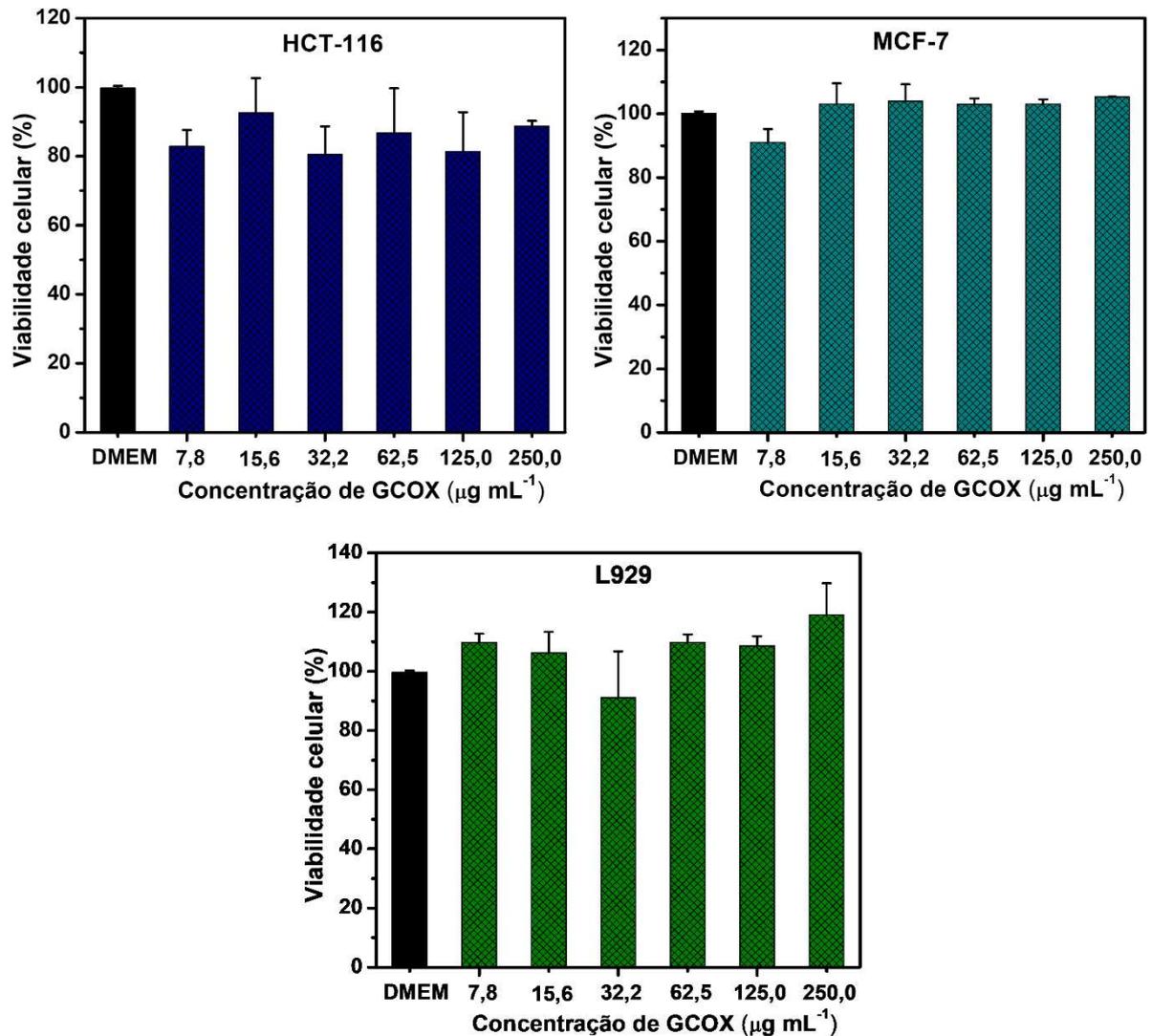
A atividade citotóxica do derivado GCOX, da DOX livre e das nanopartículas dos pró-fármacos GC-S-DOX e GC-A-DOX foi avaliada contra a linhagem celular L929 (fibroblasto murino não tumoral), HCT-116 (câncer colorretal humano) e MCF-7 (câncer de mama humano) usando o ensaio MTT, após 72 h de incubação.

O derivado GCOX não apresentou atividade citotóxica contra as linhagens tumorais HCT-116 e MCF-7 e não-tumorais L929 na concentração testada ($250 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Figura 32).

As nanopartículas do pró-fármaco GC-A-DOX não apresentaram atividade citotóxica contra nenhuma das células testadas (HCT-116, MCF-7 e L929) na concentração de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ (equivalente a $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ de DOX) (Figura 33). Esse comportamento pode ser justificado pelo fato de a DOX estar fortemente ligada ao polissacarídeo via ligação amina, que não é sensível ao pH, como foi observado no ensaio de liberação de DOX em função do pH do meio (Figura 31B).

As nanopartículas do pró-fármaco GC-S-DOX mostraram ser o único sistema capaz de inibir a proliferação de células cancerosas (Figura 32). As nanopartículas do pró-fármaco GC-S-DOX apresentaram atividade citotóxica contra as linhagens tumorais testadas do câncer de colorretal e câncer de mama, com valores de CI_{50} de 1,31 e $2,74 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 15), respectivamente.

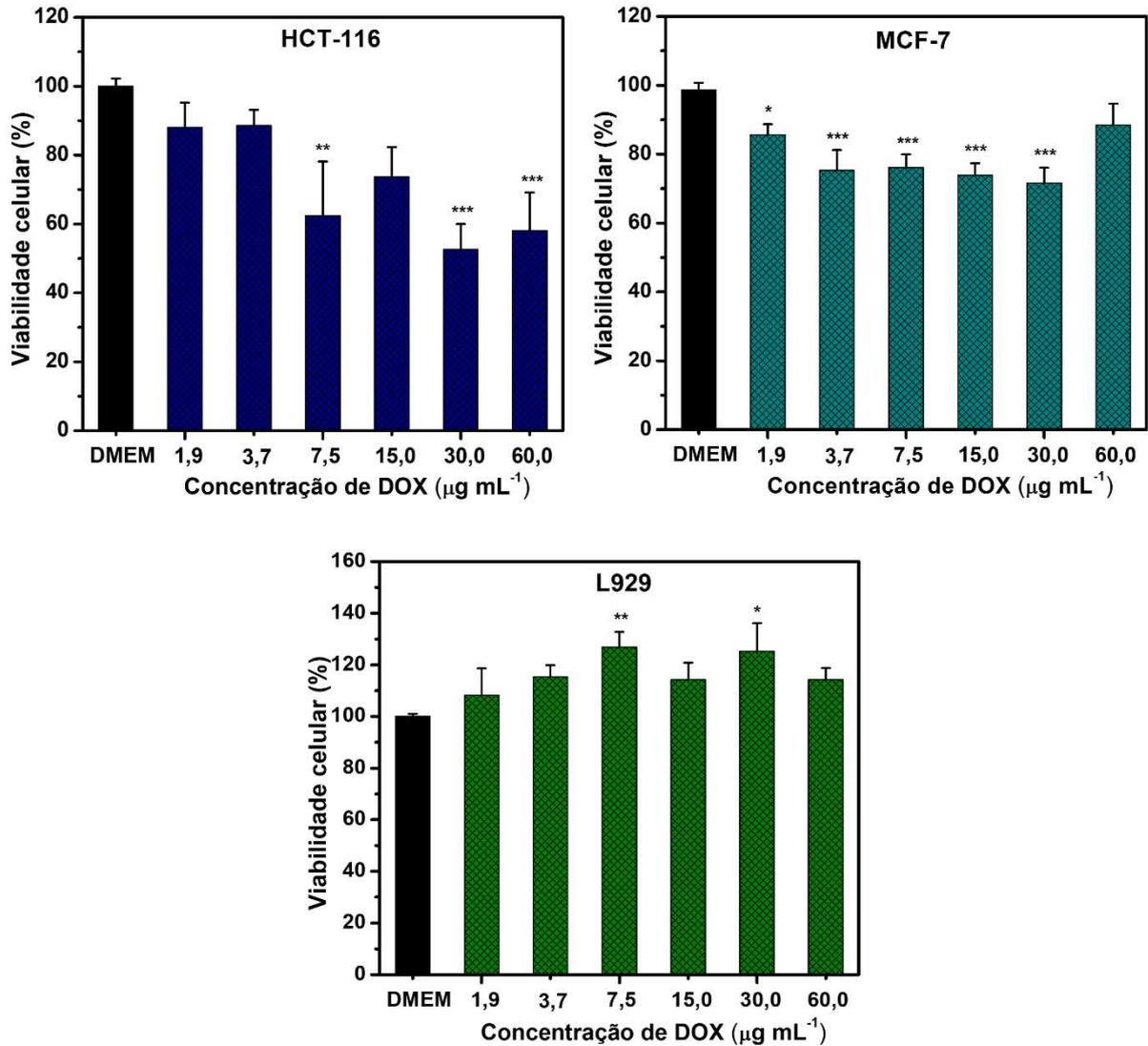
Figura 32 - Viabilidade celular *in vitro* do derivado GCOX contra as linhagens tumorais de células de câncer colorretal (HTC-116), câncer de mama (MCF-7) e a linhagem não tumoral de fibroblasto murino (L929) após 72 h de incubação



Dados reportados com média e desvio padrão (n = 3). A viabilidade celular em cada concentração do derivado GCOX foi comparada estatisticamente com o controle negativo (DMEM) usando ANOVA de fator único, seguida do teste de Bonferroni (*p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001).

Fonte: dados da pesquisa.

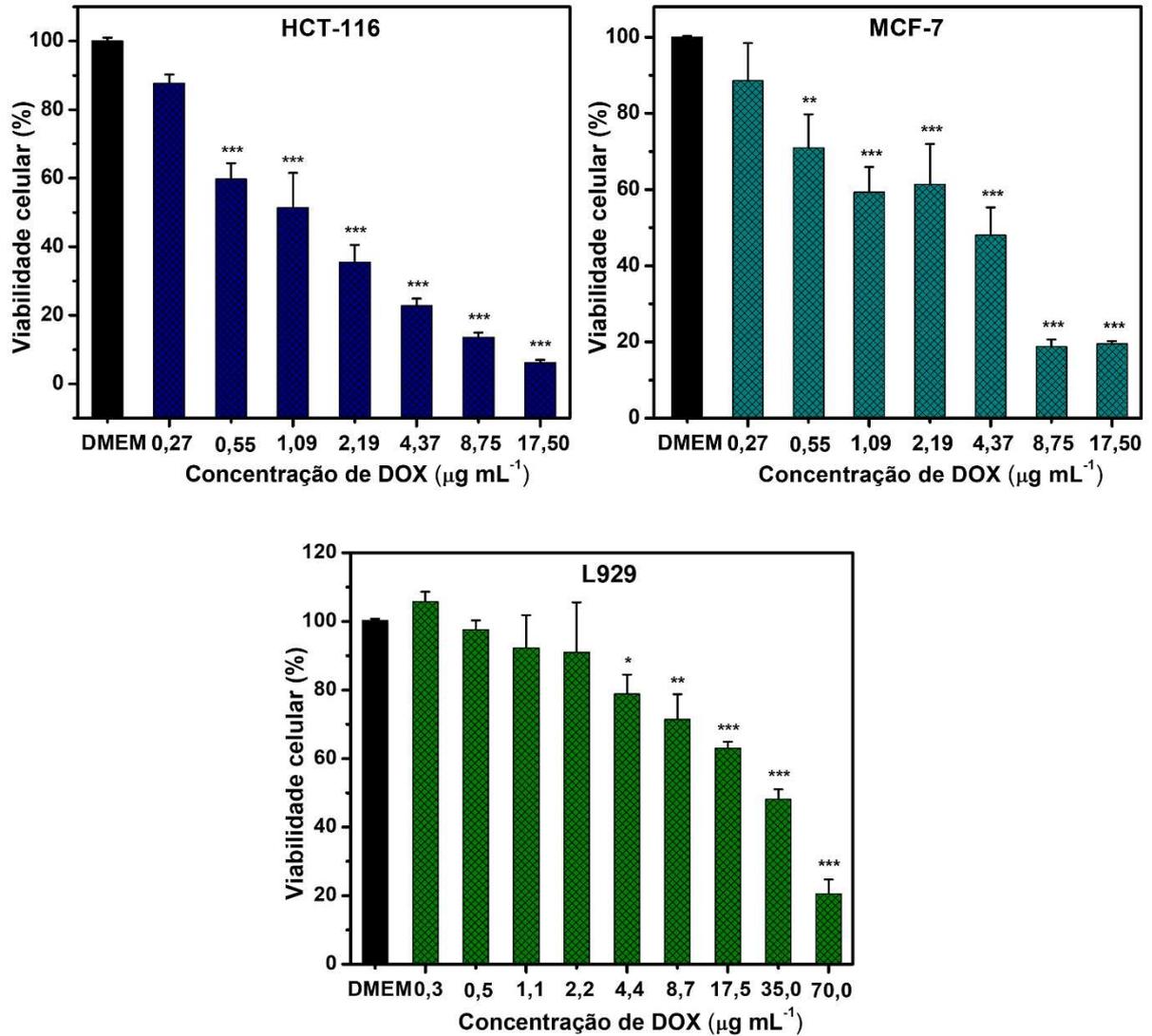
Figura 33 - Viabilidade celular *in vitro* das nanopartículas do pró-fármaco GC-A-DOX contra as linhagens tumorais de células de câncer colorretal (HTC-116), câncer de mama (MCF-7) e a linhagem não-tumoral de fibroblasto murino (L929) após 72 h de incubação



Dados reportados com média e desvio padrão (n = 3). A viabilidade celular em cada concentração de DOX foi comparada estatisticamente com o controle negativo (DMEM) usando ANOVA de fator único, seguida do teste de Bonferroni (*p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001).

Fonte: dados da pesquisa.

Figura 34 - Viabilidade celular *in vitro* das nanopartículas do pró-fármaco GC-S-DOX contra as linhagens tumorais de células de câncer colorretal (HTC-116), câncer de mama (MCF-7) e a linhagem não-tumoral de fibroblasto murino (L929) após 72 h de incubação



Dados reportados com média e desvio padrão ($n = 3$). A viabilidade celular em cada concentração de DOX foi comparada estatisticamente com o controle negativo (DMEM) usando ANOVA de fator único, seguida do teste de Bonferroni (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$).

Fonte: dados da pesquisa.

Tabela 15 - Atividade citotóxica *in vitro* do derivado GCOX, da DOX e das nanopartículas dos pró-fármacos GC-S-DOX e GC-A-DOX em células L929, HCT-116 e MCF-7 após 72 h de incubação

Amostras	CI ₅₀ (µg mL ⁻¹)		
	Intervalo de confiança (95%)		
	L929	HCT-116	MCF-7
GC-S-DOX*	28,20 (24,10 – 32,90)	1,31 (1,09 – 1,59)	2,74 (1,84 – 4,00)
GC-A-DOX*	>60	>60	>60
GCOX	>250	>250	>250
DOX	0,42 (0,30 – 0,62)	0,12 (0,09 – 0,16)	0,29 (0,22 – 0,38)

Dados reportados com valores de CI₅₀ e intervalo de confiança de 95%.

CI₅₀: concentração inibitória média; L929: fibroblasto murino não tumoral; HCT-116: câncer colorretal humano; MCF-7: câncer de mama humano.

*concentração de DOX.

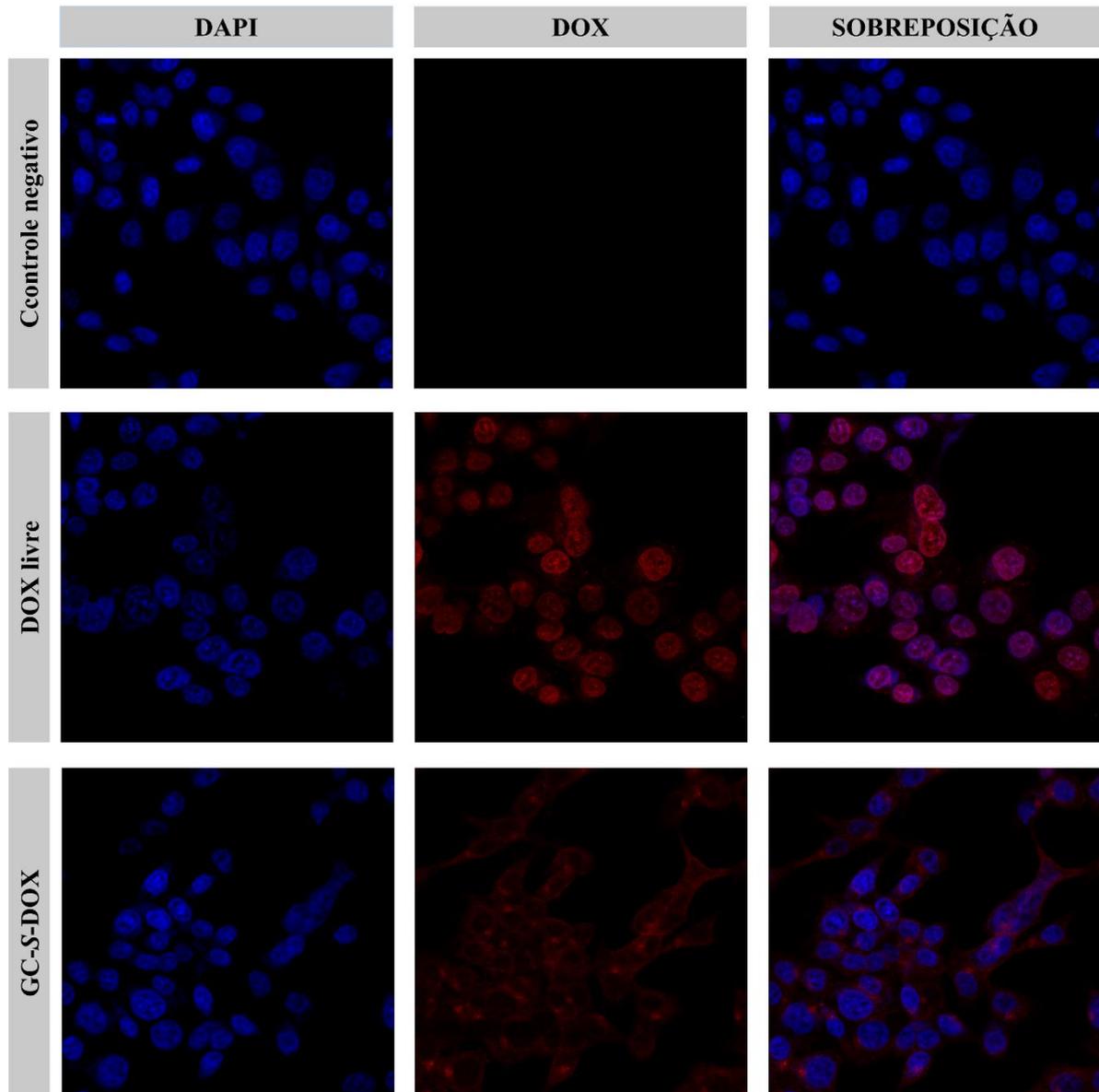
Fonte: dados da pesquisa.

As nanopartículas do pró-fármaco GC-S-DOX apresentam valores de CI₅₀ 11 e 9 vezes maiores do que a DOX livre contra as linhagens HCT-116 e MCF-7 (Tabela 15), respectivamente. Entretanto, a concentração de DOX para matar 50% dessas células L929 (CI₅₀ = 28,2 µg mL⁻¹) é 67 vezes maior do que a concentração de DOX livre (CI₅₀ = 0,42 µg mL⁻¹) para matar os mesmos 50% da linhagem L929. Logo, pode-se inferir que as nanopartículas do pró-fármaco GC-S-DOX promovem uma grande redução da citotoxicidade da DOX frente a linhagem não tumoral L929 e são eficientes contra as linhagens HCT-116 e MCF-7.

A CI₅₀ das nanopartículas do pró-fármaco GC-S-DOX (CI₅₀ = 2,74 µg mL⁻¹) foi menor do que a CI₅₀ das nanopartículas do pró-fármaco alginato-doxorrubicina (CI₅₀ = 6,70 µg mL⁻¹) (GAO *et al.*, 2017), nanopartículas à base de poliéster para liberação de doxorrubicina e curcumina (CI₅₀ = 11,46 µg mL⁻¹) (GUO *et al.*, 2021) contra células MCF-7 e nanopartículas de dextrana-g-poli (N-isopropilacrilamida)/doxorrubicina (CI₅₀ = 9,03 µg mL⁻¹) (CARNEIRO *et al.*, 2021) contra células HCT -116. Esses dados indicam que as nanopartículas do pró-fármaco GC-S-DOX têm melhor atividade anticancerígena do que os sistemas de liberação de DOX relatados. Além disso, as nanopartículas de pró-fármaco GC-S-DOX apresentaram um perfil de liberação prolongada e direcionada, tamanho ideal para promover o acúmulo de DOX no interior dos tumores via efeito EPR e baixa toxicidade contra células não-tumorais.

A internalização intracelular das nanopartículas do pró-fármaco GC-S-DOX e da DOX livre foi estudada qualitativamente em células HCT-116 e os resultados mostram que as nanopartículas do pró-fármaco GC-S-DOX e a DOX livre foram captadas por células tumorais após 24 h de incubação, atingindo tanto o citoplasma quanto o núcleo (Figura 35).

Figura 35 - Captação celular da DOX livre e das nanopartículas do pró-fármaco GC-S-DOX após incubação em células HCT-116 por 24 h



Imagens obtidas por microscopia confocal de varredura a laser. Os núcleos celulares foram corados com DAPI (azul) e a fluorescência vermelha representa a DOX.

Fonte: dados da pesquisa.

A DOX livre pode ser observada predominante acumulada no núcleo das células, enquanto as nanopartículas do pró-fármaco GC-S-DOX foram observadas distribuídas no citoplasma e núcleo (Figura 35), com maior concentração (fluorescência vermelha) de nanopartículas do pró-fármaco GC-S-DOX no citoplasma. Esse comportamento pode ser atribuído a diferentes vias de captação celular, ou seja, difusão para DOX livre e endocitose para nanopartículas do pró-fármaco GC-S-DOX (CARNEIRO *et al.*, 2021; NIU *et al.*, 2018). Comportamentos semelhantes foram observados para nanopartículas de dextrana-*g*-poli (N-isopropilacrilamida)/doxorubicina em células HCT-116 (CARNEIRO *et al.*, 2021) e nanopartículas de pró-fármaco de dextrana-doxorubicina em células SW1353 (condrossarcoma humano) (NIU *et al.*, 2018). Estes resultados, juntamente com os resultados de liberação e citotoxicidade, confirmam o potencial das nanopartículas do pró-fármaco GC-S-DOX como um sistema confiável e eficiente para liberação seletiva de doxorubicina em células tumorais.

4.3 Pró-fármacos de doxorubicina via reação de amidação com química de carbodiimida

4.3.1 Síntese e caracterização do pró-fármaco de goma do cajueiro e doxorubicina

A síntese do pró-fármaco de goma do cajueiro e doxorubicina via reação de amidação utilizando química de carbodiimida foi realizada utilizando o ácido carboxílico do ácido glucurônico da estrutura da goma do cajueiro pura e o grupo amina da DOX, formando o pró-fármaco denominado de GC-D-DOX que apresenta a ligação amida (O=C-N) entre o polissacarídeo e o fármaco.

O rendimento reacional (RR), a carga de fármaco ligado (CFL) e a eficiência de fármaco ligado (EFL) estão reportados na Tabela 16. A baixa CFL (2,2%) e EFL (19,0%) para a síntese do pró-fármaco GC-D-DOX ocorre devido ao baixo teor de grupos ácido da GC (Tabela 9) para reagir com o grupo amina da DOX. Esse dado justifica a importância da reação de carboximetilação para introduzir grupos ácido na estrutura da GC e potencializar a síntese do pró-fármaco GCCM-D-DOX via reação de amidação com química de carbodiimida.

Tabela 16 - Propriedades do pró-fármaco GC-D-DOX. Rendimento reacional (RR), carga de fármaco ligado (CFL), eficiência de fármaco ligado (EFL) e concentração de associação crítica (CAC)

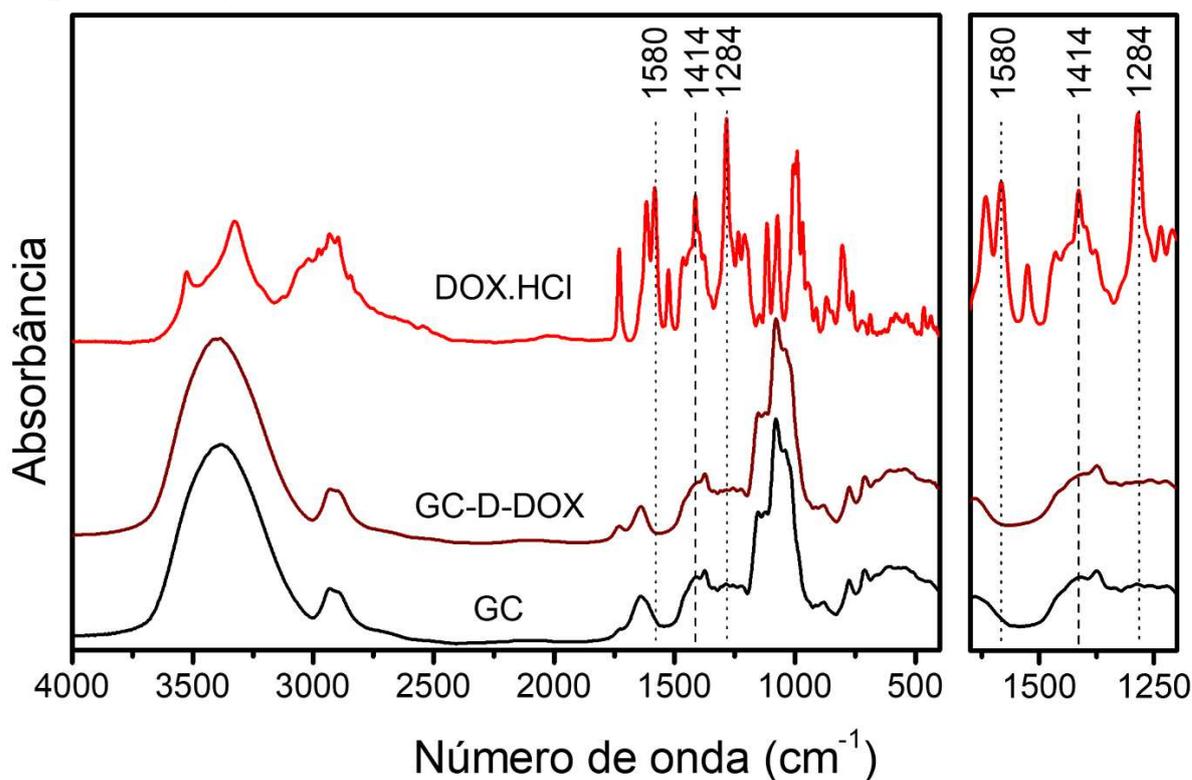
Pró-fármaco	RR (%)	CFL (%)	EFL (%)	CAC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
GC-D-DOX	$76,0 \pm 3,0$	$2,2 \pm 0,3$	$19,0 \pm 3,0$	$140,0 \pm 3,0$

Dados apresentados com média e desvio padrão (n = 3).

Fonte: dados da pesquisa.

As estruturas químicas da GC, do DOX.HCl e do pró-fármaco GC-D-DOX foram analisadas por FTIR (Figura 36) para confirmar a conjugação entre o grupo ácido da GC com o grupo amina da DOX. No entanto, não foi possível observar o aparecimento de bandas características da estrutura da DOX no espectro de FTIR do pró-fármaco GC-D-DOX ou da banda de absorção referente à ligação amida ($\text{O}=\text{C}-\text{N}$, $1680 - 1640 \text{ cm}^{-1}$). A não observação dessas bandas pode ser atribuída a baixa carga de fármaco ligado do pró-fármaco GC-D-DOX (2,2%).

Figura 36 - Espectros de FTIR da GC, do DOX.HCl e do pró-fármaco GC-D-DOX

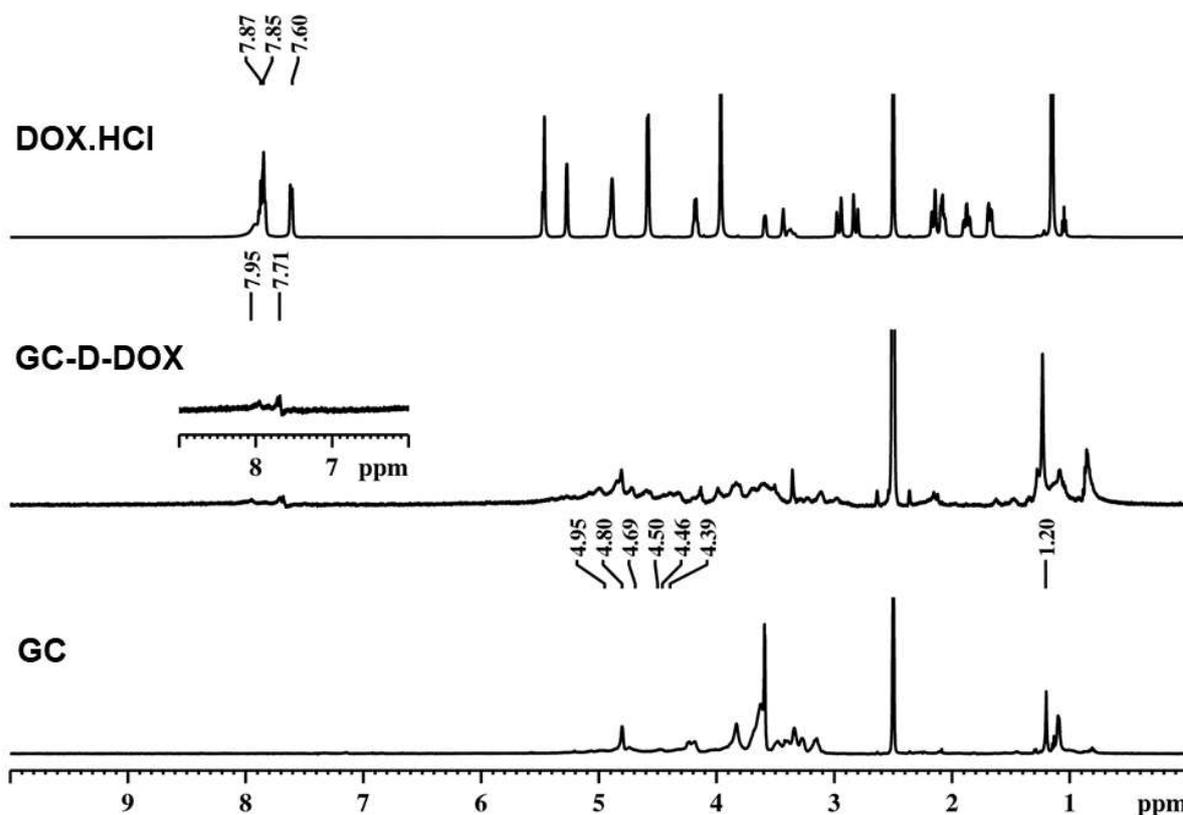


Espectros obtidos em pastilhas de brometo de potássio (KBr) no espectrofotômetro Shimadzu IR-Trace 100 com 64 aquisições e resolução 4 para cada amostra.

Fonte: dados da pesquisa.

A GC, o DOX.HCl e o pró-fármaco GC-D-DOX foram caracterizados por RMN ^1H (Figura 37) com intuito de observar a presença da DOX na estrutura do pró-fármaco GC-D-DOX. Analisando-se os espectros de RMN ^1H da GC, do DOX.HCl e do pró-fármaco GCCM-D-DOX, pode-se observar o aparecimento de novos picos de baixa intensidade em 7,71 e 7,95 ppm no espectro de RMN ^1H do pró-fármaco GC-D-DOX. Esses novos picos são referentes aos hidrogênios aromáticos da DOX (KIM *et al.*, 2012). O aparecimento dos picos em 7,71 e 7,95 ppm no espectro de RMN ^1H do pró-fármaco confirma a presença da DOX no pró-fármaco GC-D-DOX. Entretanto, não foi possível evidenciar se a DOX está ligada covalentemente à estrutura do polissacarídeo.

Figura 37 - Espectros de RMN ^1H da GC, do DOX.HCl e do pró-fármaco GC-D-DOX obtidos no equipamento da Bruker® advance modelo DRX500 usando DMSO-d6 como solvente a 25 °C

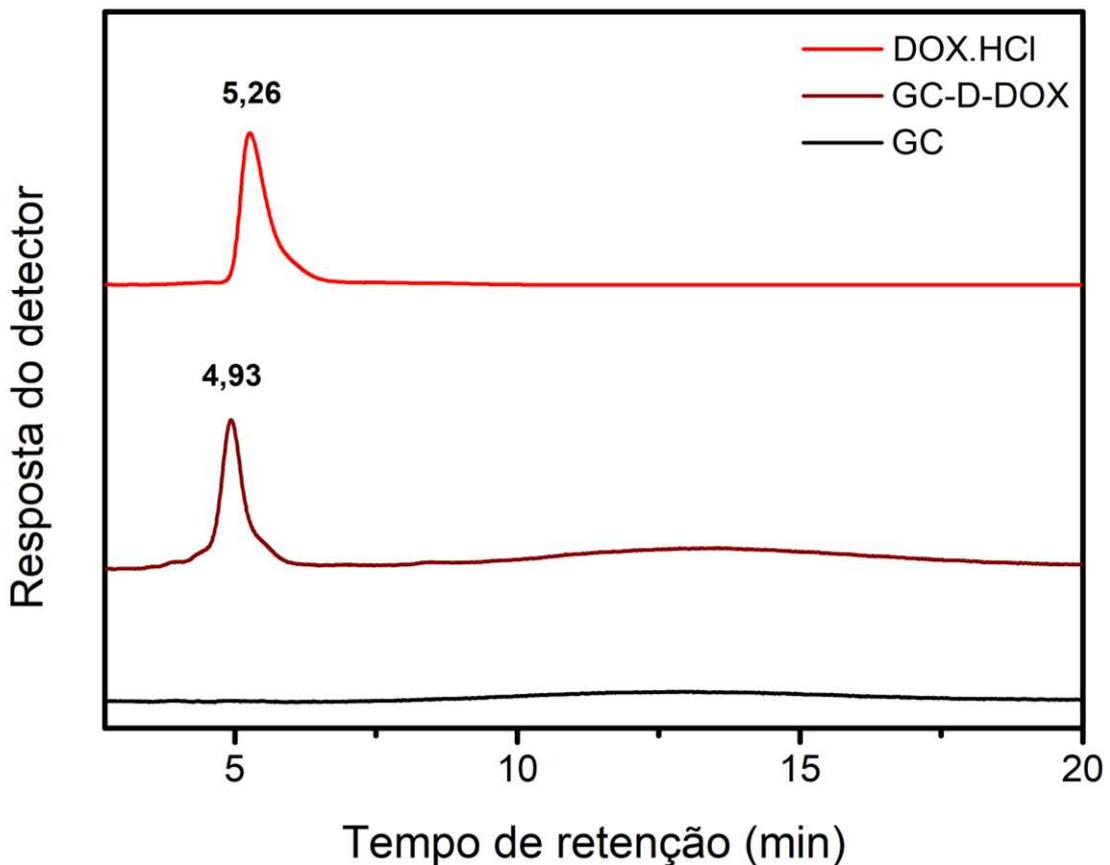


Espectros obtidos no equipamento da Bruker® advance modelo DRX500 usando DMSO-d6 como solvente a 25 °C.

Fonte: dados da pesquisa.

A análise de HPLC mostrou a presença da DOX no pró-fármaco GC-D-DOX e diferentes tempos de retenção para a DOX livre (5,26 min) e para a DOX conjugada ao pró-fármaco GC-D-DOX (4,93 min) (Figura 38). Os diferentes tempos de retenção indicam que a estrutura da DOX foi alterada (SONG *et al.*, 2019), ou seja, indica que a DOX está ligada covalentemente a GC pura.

Figura 38 - Cromatogramas de HPLC da GC pura, do DOX.HCl e do pró-fármaco GC-D-DOX

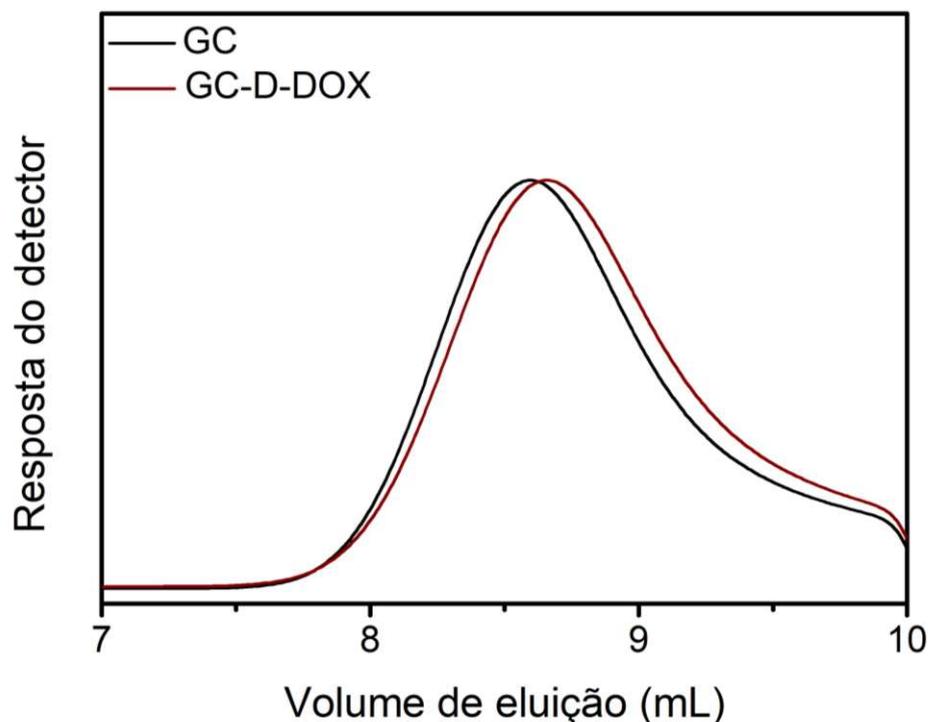


As análises foram realizadas utilizando um detector de fotodiodo UV-visível SPD-M20A, uma coluna C18 (10 μm , 15 cm \times 4,6 mm) e acetonitrila: água (30: 70 v/v) como eluente a uma taxa de fluxo de 1,0 mL min⁻¹ a 25 °C.

Fonte: dados da pesquisa.

Os cromatogramas de SEC da GC pura e do pró-fármaco GC-D-DOX (Figura 39) não apresentam deslocamento do volume de eluição, indicando que esses materiais apresentam distribuição de massa molar semelhante.

Figura 39 - Cromatogramas de SEC da GC pura e do pró-fármaco GC-D-DOX



As análises foram realizadas utilizando um detector de índice de refração (RID-10A), uma coluna linear PolySep-SEC GFC-P (300×7,8 mm) e NaNO_3 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) como eluente com fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

Fonte: dados da pesquisa.

Os dados de massa molar da Tabela 17 confirmam que a GC pura e o pró-fármaco GC-D-DOX possuem distribuição de massa molar semelhante. Esse comportamento já era esperado devido ao fato da DOX ser uma molécula pequena e de baixa massa molar ($543,46 \text{ g mol}^{-1}$).

Tabela 17 - Dados de massa molar da GC pura e do pró-fármaco GC-D-DOX determinados por cromatografia de exclusão por tamanho

Amostras	Mpk / 10^4 (g mol^{-1})	Mn / 10^3 (g mol^{-1})	Mw / 10^4 (g mol^{-1})	Dispersão (Đ)
GC	$2,87 \pm 0,70^a$	$6,97 \pm 0,27^a$	$3,23 \pm 0,17^a$	$4,64 \pm 0,23^a$
GC-D-DOX	$2,60 \pm 0,40^a$	$6,57 \pm 0,26^a$	$2,94 \pm 0,42^a$	$4,47 \pm 0,91^a$

Dados reportados com média e desvio padrão ($n = 3$). A análise estatística foi realizada usando ANOVA de fator único, seguida do teste Tukey. Letras iguais na mesma coluna não são significativamente diferentes ($p > 0,05$) e letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

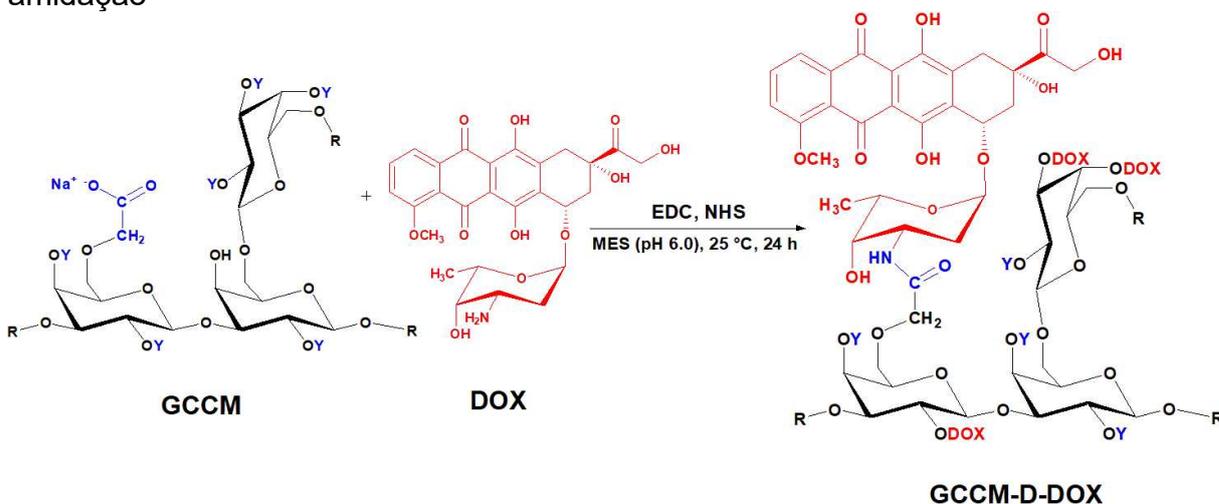
Mpk: massa molar de pico; Mn: massa molar numérica média; Mw: massa molar ponderal média.

Fonte: dados da pesquisa.

4.3.2 Síntese e caracterização do pró-fármaco de goma do cajueiro carboximetilada e doxorrubicina

A síntese do pró-fármaco de goma do cajueiro carboximetilada e doxorrubicina via reação de amidação utilizando química de carbodiimida está ilustrada na Figura 40. A reação ocorre entre grupo ácido do derivado GCCM e o grupo amina da DOX, formando o pró-fármaco denominado de GCCM-D-DOX, que apresenta a ligação amida (O=C-N) entre o polissacarídeo e o fármaco.

Figura 40 - Ilustração da síntese do pró-fármaco GCCM-D-DOX via reação de amidação



A letra R representa a continuação da cadeia do polissacarídeo, a letra Y o grupo ácido da estrutura do polissacarídeo e a sigla DOX a molécula de doxorrubicina adicionada a estrutura.

Fonte: elaborado pelo autor.

Os dados de rendimento reacional (RR), carga de fármaco ligado (CFL) e eficiência de fármaco ligado (EFL) estão reportados na Tabela 18.

Tabela 18 - Propriedades dos pró-fármacos. Rendimento reacional (RR), carga de fármaco ligado (CFL), eficiência de fármaco ligado (EFL) e concentração de associação crítica (CAC)

Pró-fármacos	RR (%)	CFL (%)	EFL (%)	CAC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
GC-D-DOX	76,0 \pm 3,0 ^a	2,2 \pm 0,3 ^a	19,0 \pm 3,0 ^a	140,0 \pm 3,0 ^a
GCCM-D-DOX	89,0 \pm 2,0 ^b	9,6 \pm 0,3 ^b	74,0 \pm 2,0 ^b	98,0 \pm 4,0 ^b

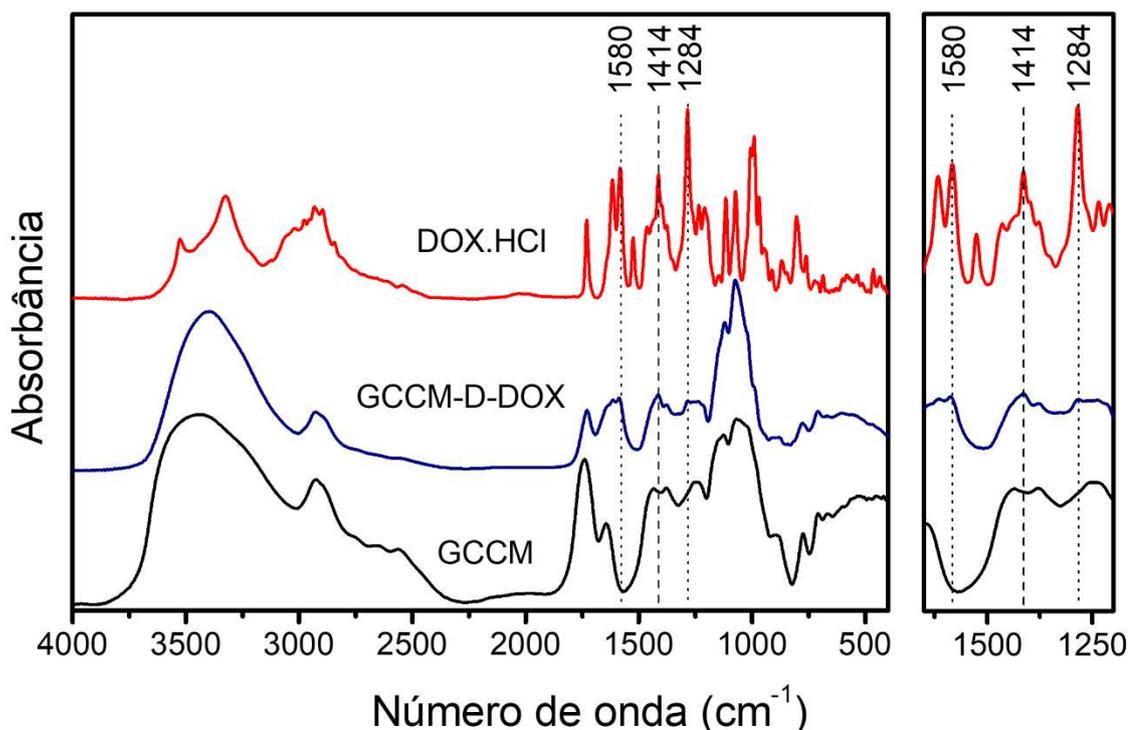
Dados apresentados com média e desvio padrão (n = 3). A análise estatística foi realizada usando ANOVA de fator único, seguida do teste Tukey. Letras iguais na mesma coluna não são significativamente diferentes ($p > 0,05$) e letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Fonte: dados da pesquisa.

Os dados de RR (89,0%), CFL (9,6%) e EFL (74,0%) para a síntese do pró-fármaco GCCM-D-DOX (80 e 64%) (Tabela 18) justificam a importância da síntese do derivado GCCM para a síntese do pró-fármaco GCCM-D-DOX via reação de amidação com química de carbodiimida. O valor de EFL obtido na síntese do pró-fármaco GCCM-D-DOX (74%) foi inferior ao obtido por Mansur *et al.* (2018) na síntese de pró-fármacos de carboximetilcelulose-doxorrubicina (98%) e por Kim *et al.* (2012) na síntese de pró-fármacos de ácido hialurônico-doxorrubicina (83%) via reação de amidação com química de carbodiimida. No entanto, a CFL desses pró-fármacos (0,3% e 8,3%) (MANSUR *et al.*, 2018; KIM *et al.*, 2012) é menor do que a obtida para o pró-fármaco GCCM-D-DOX (9,6%).

As estruturas químicas da GCCM, do DOX.HCl e do pró-fármaco GCCM-D-DOX foram analisadas por FTIR (Figura 41) para confirmar a conjugação entre o grupo ácido da GCCM com grupo amina da DOX.

Figura 41 - Espectros de FTIR do derivado GCCM, do DOX.HCl e do pró-fármaco GCCM-D-DOX



Espectros obtidos em pastilhas de brometo de potássio (KBr) no espectrofotômetro Shimadzu IR-Trace 100 com 64 aquisições e resolução 4 para cada amostra.
Fonte: dados da pesquisa.

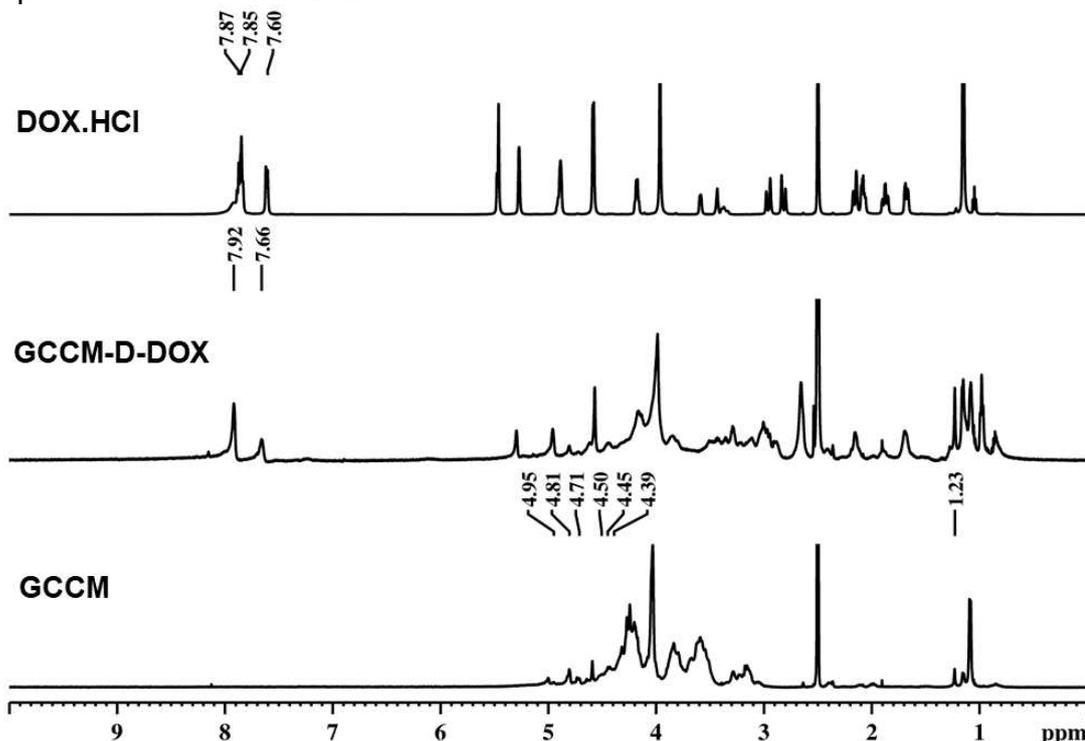
Na Figura 41, observa-se a presença de três novas bandas para o espectro do pró-fármaco GCCM-D-DOX em comparação com o da GCCM.

Em 1580 cm^{-1} atribuída à vibração de estiramento C=C do anel aromático, em 1414 cm^{-1} característica da vibração de flexão simétrica CH relacionada ao grupo metila (CH_3) e em 1284 cm^{-1} referente à vibração de alongamento C-O-C da DOX. Esses resultados sugerem a conjugação da DOX com o polissacarídeo (CAPANEMA *et al.*, 2018; MANSUR *et al.*, 2018). A banda de absorção referente à ligação amida ($\text{O}=\text{C}-\text{N}$, $1680 - 1640\text{ cm}^{-1}$) pode estar oculta devido à sobreposição com a banda de alta intensidade em 1740 cm^{-1} , característica da vibração de estiramento C=O de ácido carboxílico do derivado GCCM.

A diminuição considerável da intensidade relativa da banda em 1740 cm^{-1} no espectro de FTIR do pró-fármaco GCCM-D-DOX em comparação com a do derivado GCCM indica que o ácido carboxílico do derivado GCCM foi consumido durante a síntese do pró-fármaco GCCM-D-DOX, ou seja, esse resultado sugere a existência de uma ligação covalente entre o polissacarídeo e a DOX.

As estruturas químicas da GCCM, do DOX.HCl e do pró-fármaco GCCM-D-DOX foram analisadas por RMN ^1H (Figura 42) para confirmar a conjugação entre o grupo ácido da GCCM com grupo amina da DOX.

Figura 42 - Espectros de RMN ^1H do derivado GCCM, do DOX.HCl e do pró-fármaco GCCM-D-DOX

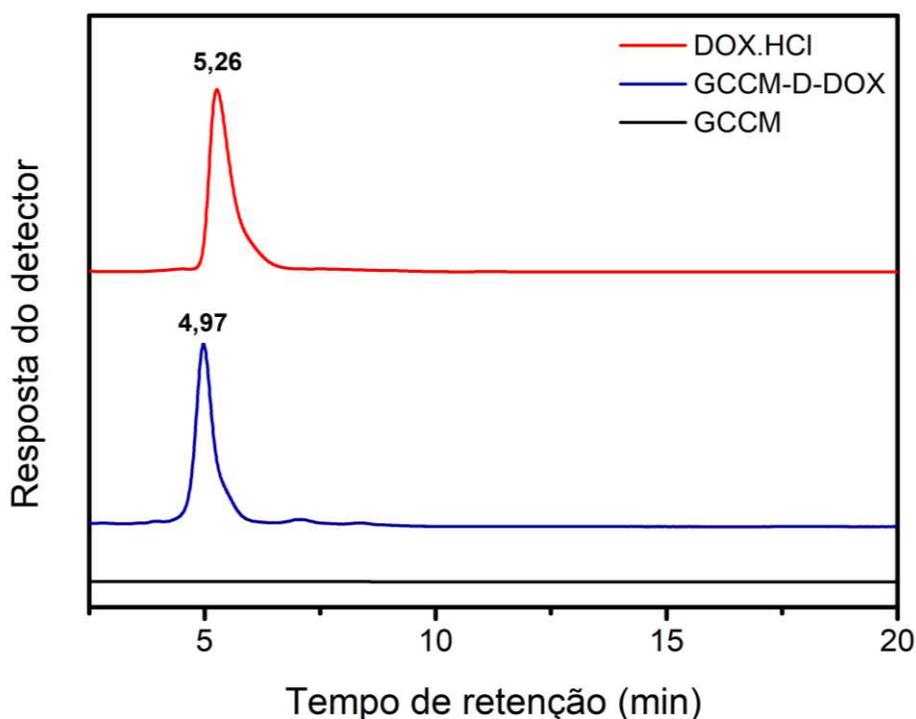


Espectros obtidos no equipamento da Bruker® advance modelo DRX500 usando DMSO- d_6 como solvente a $25\text{ }^\circ\text{C}$.

Fonte: dados da pesquisa.

A análise de HPLC mostrou diferentes tempos de retenção para DOX livre (5,26 min) e para a DOX conjugada ao pró-fármaco GCCM-D-DOX (4,97 min) (Figura 43). Os diferentes tempos de retenção indicam que a estrutura da DOX foi alterada (SONG *et al.*, 2019), ou seja, que a DOX está ligada covalentemente ao derivado GCCM.

Figura 43 - Cromatogramas de HPLC do derivado GCCM, do DOX.HCl e do pró-fármaco GCCM-D-DOX

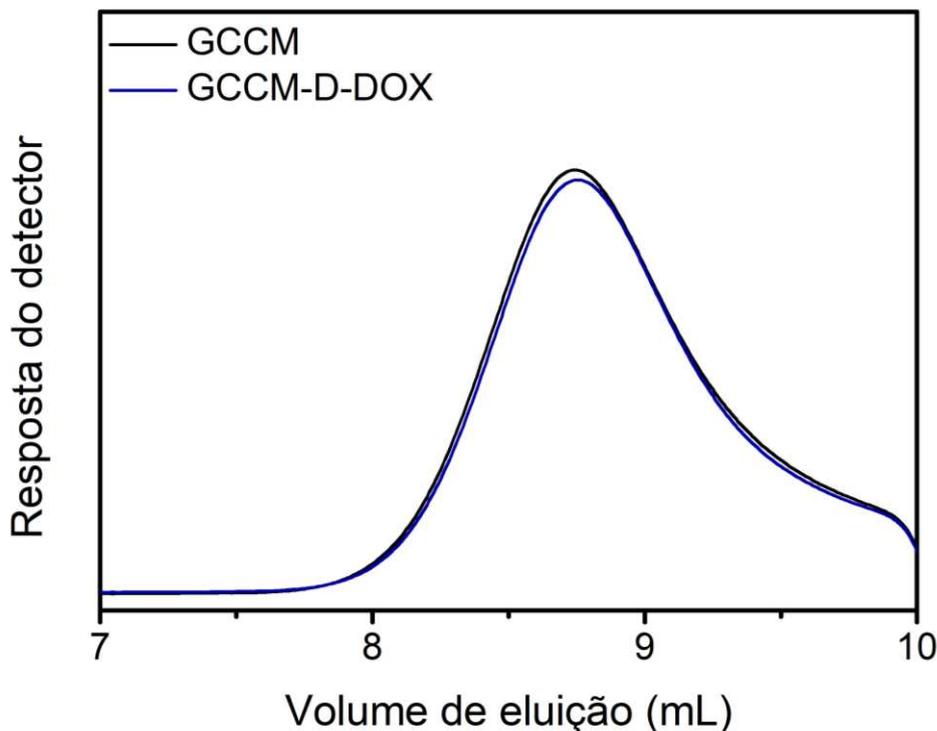


As análises foram realizadas utilizando um detector de fotodiodo UV-visível SPD-M20A, uma coluna C18 (10 μ m, 15 cm \times 4,6 mm) e acetonitrila: água (30:70 v/v) como eluente a uma taxa de fluxo de 1,0 mL min⁻¹ a 25 °C.
Fonte: dados da pesquisa.

Os resultados obtidos por FTIR, RMN ¹H e HPLC para a síntese do pró-fármacos GCCM-D-DOX não comprovam a formação da ligação amida entre o derivado GCCM e a DOX, mas sugerem a existência de uma ligação entre eles.

Os cromatogramas de SEC do derivado GCCM e do pró-fármaco GCCM-D-DOX (Figura 44) não apresentam deslocamento do volume de eluição. Os dados de massa molar da Tabela 19 confirmam que o derivado GCCM e o pró-fármaco GCCM-D-DOX possuem a mesma distribuição de massa molar. Esse comportamento já era esperado devido ao fato de a DOX ser uma molécula pequena e de baixa massa molar (543,46 g mol⁻¹).

Figura 44 - Cromatogramas de SEC do derivado GCCM e do pró-fármaco GCCM-D-DOX



As análises foram realizadas utilizando um detector de índice de refração (RID-10A), uma coluna linear PolySep-SEC GFC-P (300×7,8 mm) e NaNO_3 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) como eluente com fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$.
Fonte: dados da pesquisa.

Tabela 19 - Dados de massa molar do derivado GCCM e do pró-fármaco GCCM-D-DOX determinados por cromatografia de exclusão por tamanho

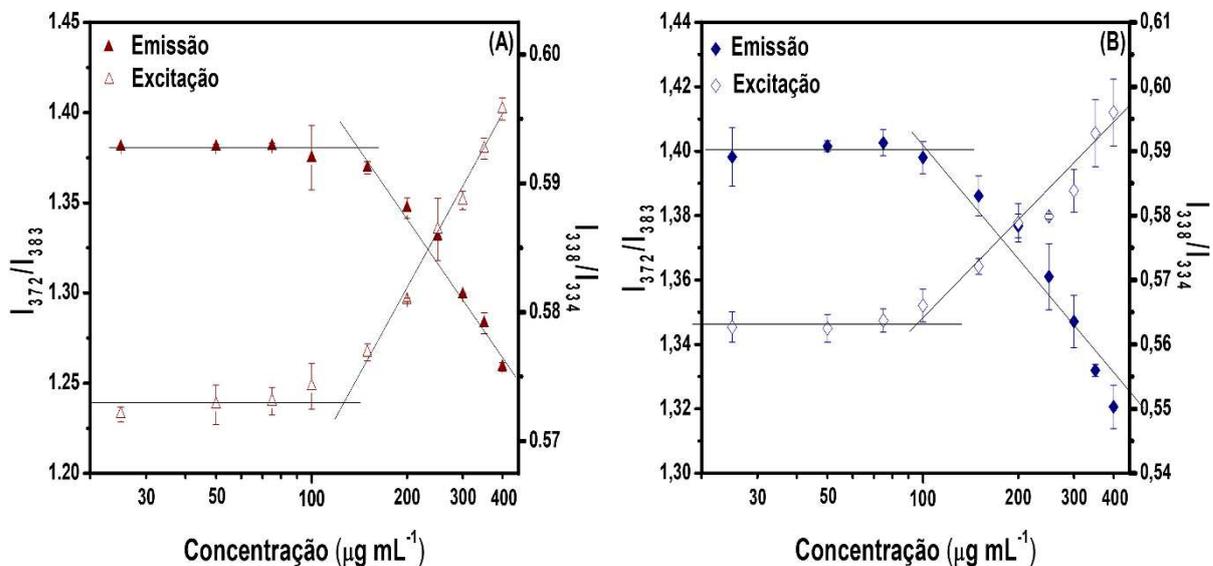
Amostras	Mpk / 10^4 (g mol^{-1})	Mn / 10^3 (g mol^{-1})	Mw / 10^4 (g mol^{-1})	Dispersão (\bar{D})
GCCM	$1,87 \pm 0,14^a$	$5,09 \pm 0,15^a$	$2,02 \pm 0,43^a$	$4,02 \pm 0,37^a$
GCCM-D-DOX	$2,12 \pm 0,51^a$	$4,81 \pm 0,20^a$	$2,11 \pm 0,42^a$	$4,47 \pm 0,94^a$

Dados reportados com média e desvio padrão ($n = 3$). A análise estatística foi realizada usando ANOVA de fator único, seguida do teste Tukey. Letras iguais na mesma coluna não são significativamente diferentes ($p > 0,05$) e letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ($p < 0,05$).
Mpk: massa molar de pico; Mn: massa molar numérica média; Mw: massa molar ponderal média.
Fonte: dados da pesquisa.

4.3.3 Caracterização físico-química das nanopartículas dos pró-fármacos de amidação

O comportamento dos pró-fármacos GC-D-DOX e GCCM-D-DOX foi estudado em solução aquosa por espectroscopia de fluorescência utilizando o pireno como sonda fluorescente, para determinar a CAC dos pró-fármacos, ou seja, a concentração mínima de pró-fármacos para a formação das nanopartículas (Figura 45). Os valores de CAC foram de $140 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o pró-fármaco GC-D-DOX e $98 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o pró-fármaco GCCM-D-DOX

Figura 45 - Relação entre a razão de intensidade de fluorescência do pireno (I_{372}/I_{383} ou I_{338}/I_{334}) e a concentração de pró-fármacos GC-D-DOX (A) e GCCM-D-DOX (B) em tampão fosfato (pH = 7,4 a 37°C)



Dados reportados com média e desvio padrão (n=3).
Fonte: dados da pesquisa.

O pró-fármaco GCCM-D-DOX apresenta CAC menor do que o pró-fármaco GC-D-DOX devido a sua maior carga de fármaco ligado (Tabela 18). O aumento da CFL diminui a CAC devido ao aumento da hidrofobicidade do pró-fármaco propiciar uma redução da concentração de pró-fármaco necessário para a formação das nanopartículas.

As nanopartículas dos pró-fármacos GC-D-DOX e GCCM-D-DOX foram obtidas usando o método de ultrassom direto e caracterizadas por DLS, MEV e AFM. Os dados obtidos por DLS, MEV e AFM estão apresentados na Tabela 20.

Tabela 20 - Parâmetros físico-químicos das nanopartículas de pró-fármacos

Amostras	DLS			MEV	AFM
	Tamanho (nm)*	IPD*	Zeta (mV)#	Tamanho (nm)	Tamanho (nm)
GC	269 ± 21 ^{a, b}	0,69 ± 0,02 ^a	-22 ± 3 ^a	-	-
GCCM	294 ± 17 ^a	0,69 ± 0,07 ^a	-37 ± 6 ^b	-	-
GC-D-DOX	245 ± 5 ^b	0,48 ± 0,08 ^b	-13 ± 2 ^c	82 ± 19 ^a	~27
GCCM-D-DOX	240 ± 8 ^b	0,38 ± 0,03 ^c	-26 ± 2 ^d	68 ± 15 ^a	~135

Dados reportados com média e desvio padrão (n = 3). A análise estatística foi realizada usando ANOVA de fator único, seguida do teste Tukey. Letras iguais na mesma coluna não são significativamente diferentes ($p > 0,05$) e letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

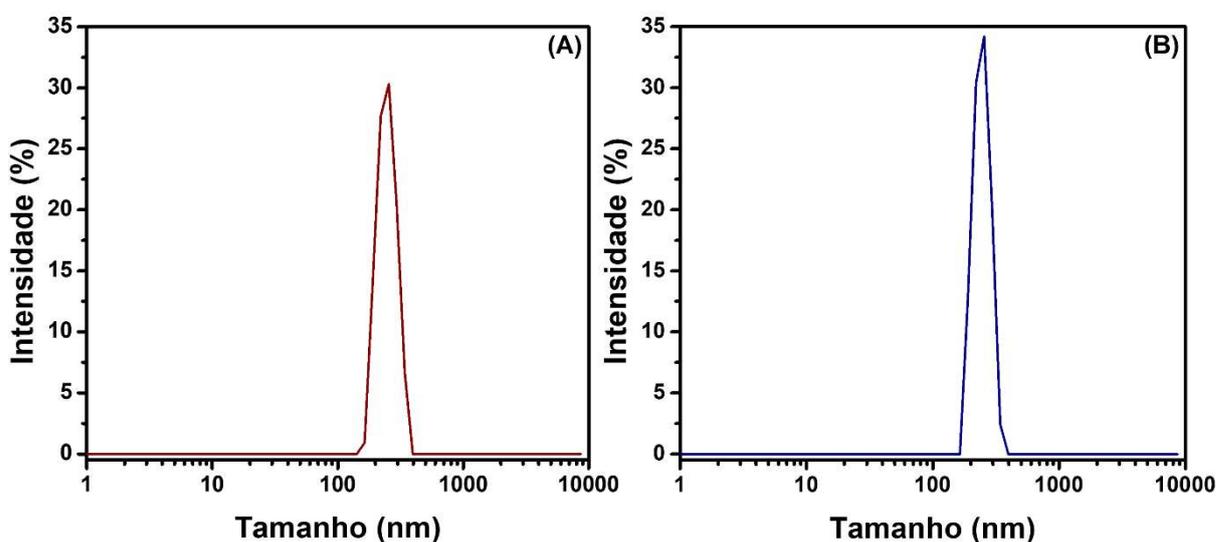
*tampão fosfato (pH = 7,4; 0,1 mol L⁻¹) a 37 °C.

#água a 25 °C.

Fonte: dados da pesquisa.

As nanopartículas dos pró-fármacos GC-D-DOX e GCCM-D-DOX apresentaram distribuição de tamanho unimodal (Figura 46) em tampão fosfato (pH = 7,4; 0,1 mol L⁻¹), com tamanho médio similares de 245 e 240 nm, respectivamente. A similaridade dos tamanhos pode ser atribuída a maior CFL (9,6%) no pró-fármaco GCCM-D-DOX na redução do tamanho médio das nanopartículas do pró-fármaco GCCM-D-DOX ser anulada pelo maior intumescimento em água dessas nanopartículas, devido ao maior teor de grupos ácido do derivado GCCM e maior potencial zeta em modulo (-26 mV) das nanopartículas do pró-fármaco GCCM-D-DOX.

Figura 46 - Distribuição de tamanho das nanopartículas dos pró-fármacos GC-D-DOX (A) e GCCM-D-DOX (B) em tampão fosfato a 37 °C (pH = 7,4; 0,1 mol L⁻¹)



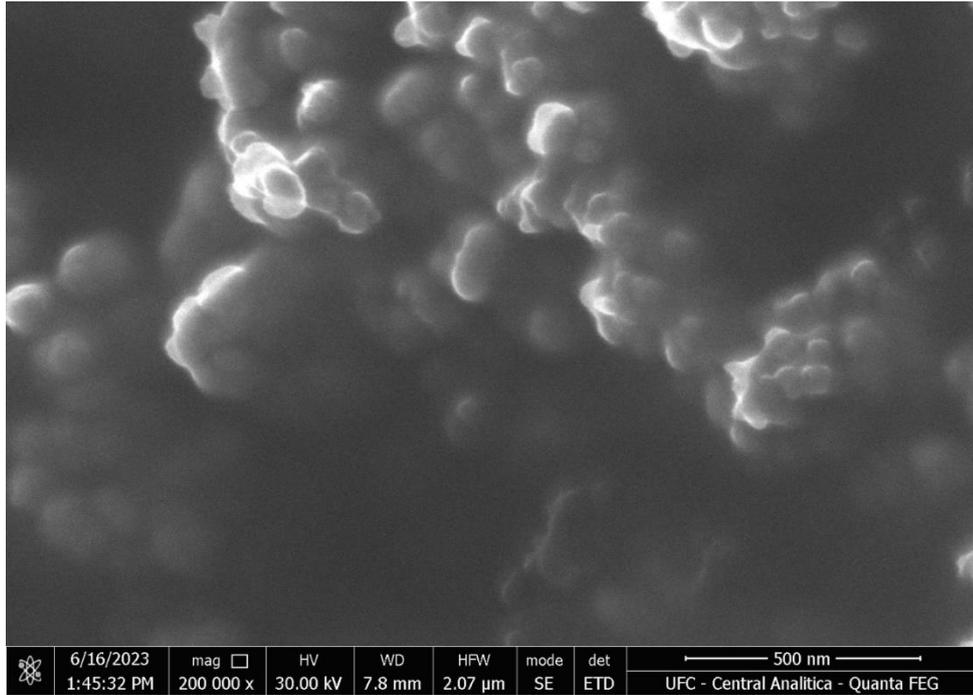
Fonte: dados da pesquisa.

As nanopartículas dos pró-fármacos GC-D-DOX e GCCM-D-DOX apresentam uma redução do tamanho e do IPD em relação aos polissacarídeos utilizados na síntese dos pró-fármacos. Essa redução confirma a natureza anfifílica dos pró-fármacos que tendem a se organizar formando nanopartículas em meio aquoso. Os tamanhos obtidos por DLS para as nanopartículas dos pró-fármacos GC-D-DOX e GCCM-D-DOX são inferiores a 300 nm, o que possibilita a utilização dessas nanopartículas como sistemas de liberação modificada para o acúmulo de DOX dentro de tumores via efeito de permeabilidade e retenção (EPR) aprimorada.

Comparando-se os dados de potencial zeta das nanopartículas de pró-fármacos GC-D-DOX e GCCM-D-DOX com o potencial zeta da GC pura e do derivado GCCM (Tabela 20), verifica-se uma redução em módulo do potencial zeta das nanopartículas desses pró-fármacos. Essa redução indica a conjugação da DOX a GC pura ou ao derivado GCCM, visto que na síntese dos pró-fármacos GC-D-DOX e GCCM-D-DOX utiliza-se os grupos ácido presentes na estrutura da GC e da GCCM na formação da ligação amida entre o polissacarídeo e a DOX.

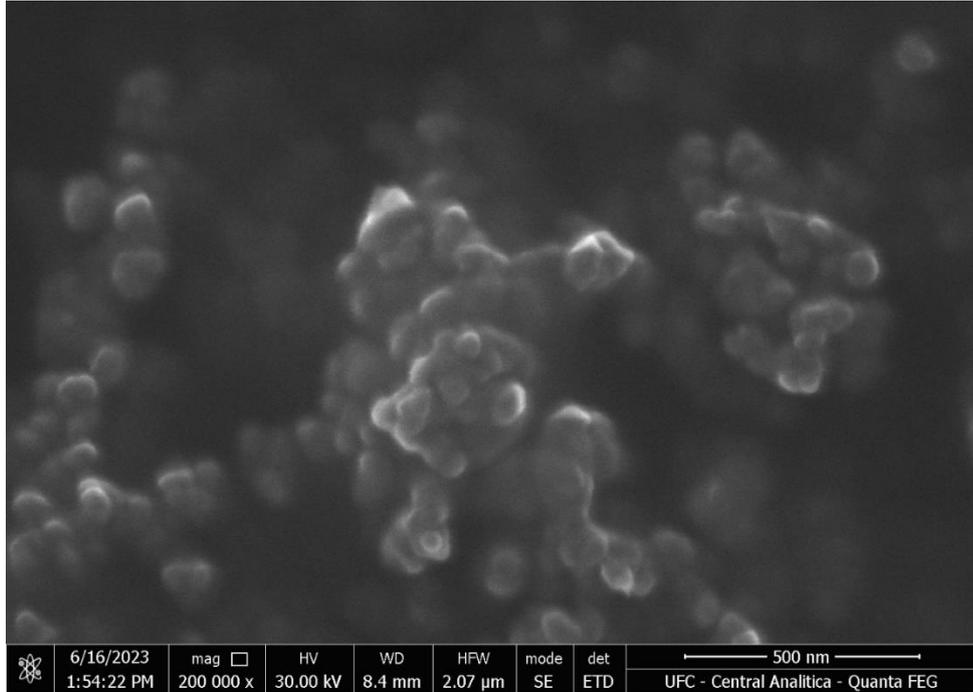
As imagens de MEV e AFM mostram que as nanopartículas de pró-fármacos GC-D-DOX e GCCM-D-DOX apresentam formato esférico e superfície lisa (Figuras 47 - 49). O tamanho médio de partícula determinado por MEV foi de 82 e 68 nm para as nanopartículas de pró-fármacos GC-D-DOX e GCCM-D-DOX, respectivamente. Nas imagens de MEV as nanopartículas de pró-fármacos estão agregadas. Essa agregação pode estar relacionada ao processo de preparo de cada amostra, a concentração utilizada ou o processo de secagem que acabam promovendo a agregação das nanopartículas.

Figura 47 - MEV das nanopartículas do pró-fármaco GC-D-DOX



Fonte: dados da pesquisa.

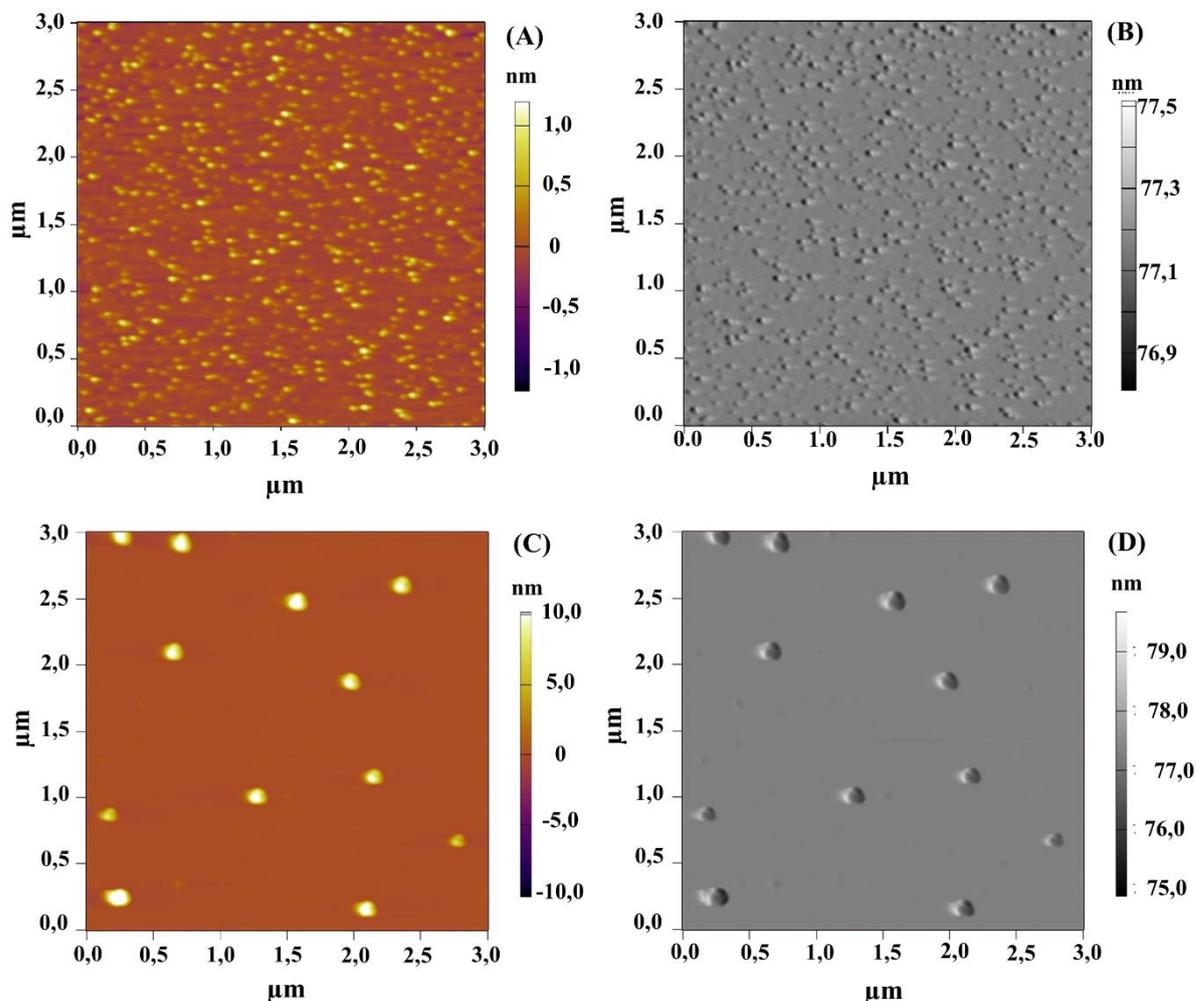
Figura 48 - MEV das nanopartículas do pró-fármaco GCCM-D-DOX



Fonte: dados da pesquisa.

O tamanho de partícula determinado por AFM para nanopartículas de pró-fármacos GC-D-DOX e GCCM-D-DOX foi de 27 e 135 nm, respectivamente.

Figura 49 - AFM das nanopartículas de pró-fármacos obtidos via reação de amidação com química de carbodiimida GC-D-DOX (A e B) e GCCM-D-DOX (C e D)



Imagens A e C são de altura e imagens B e D são de amplitude.

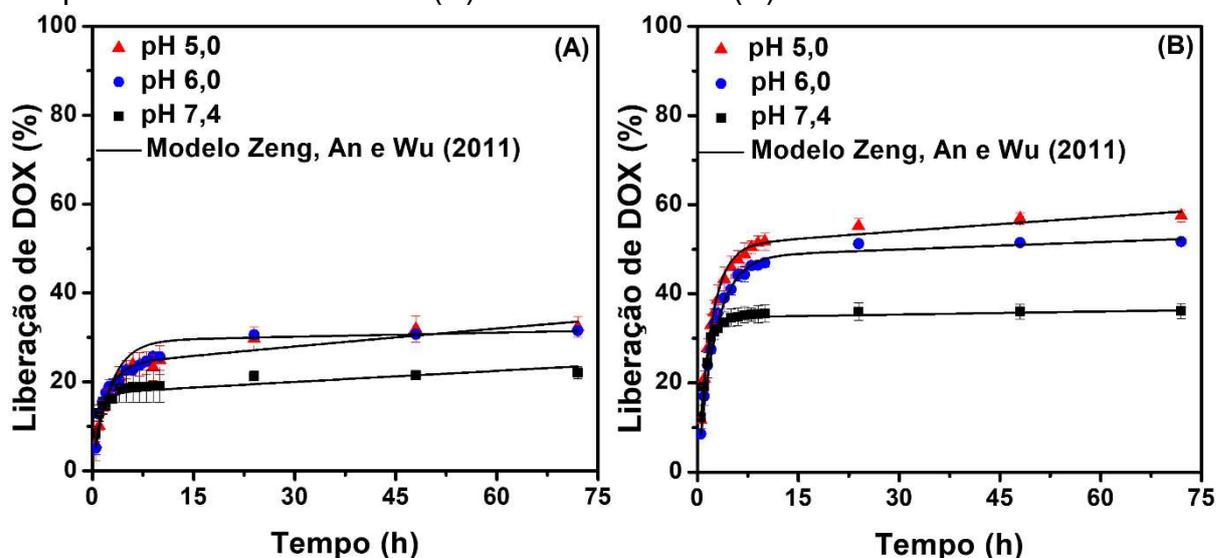
Fonte: dados da pesquisa.

A diferença entre o tamanho das nanopartículas dos pró-fármacos GC-D-DOX e GCCM-D-DOX determinado por DLS e determinado por MEV e AFM (Tabela 20) já era esperado. Visto que o tamanho médio de partículas poliméricas determinado por DLS é sempre maior do que o tamanho médio dessa mesma partículas determinado por MEV, AFM e TEM (EATON *et al.*, 2017). Isso ocorre porque por MEV, AFM e TEM medem-se o tamanho médio das partículas secas e por DLS mede-se o diâmetro hidrodinâmico das partículas em solução, o que inclui as camadas iônicas e os solventes associados às nanopartículas em solução, além disso, as nanopartículas podem estar intumescidas.

4.3.4 Estudo *in vitro* das nanopartículas dos pró-fármacos de amidação

O potencial de liberação das nanopartículas dos pró-fármacos GC-D-DOX e GCCM-D-DOX foi avaliado em tampão acetato (pH = 5,0; 0,1 mol L⁻¹) e tampão fosfato (pH = 6,0 e pH = 7,4; 0,1 mol L⁻¹) e os sistemas apresentaram uma liberação de explosão inicial da DOX nas primeiras horas de experimento seguida de uma liberação lenta. A liberação de explosão inicial ocorre devido a DOX encapsulada durante o processo de formação das nanopartículas de pró-fármaco via auto-organização e a liberação lenta da DOX está associada a clivagem da ligação amida entre o polissacarídeo e a DOX (Figura 50).

Figura 50 - Liberação cumulativa de DOX em função do pH para as nanopartículas dos pró-fármacos GC-D-DOX (A) e GCCM-D-DOX (B)



Dados reportados com média e desvio padrão (n=3).

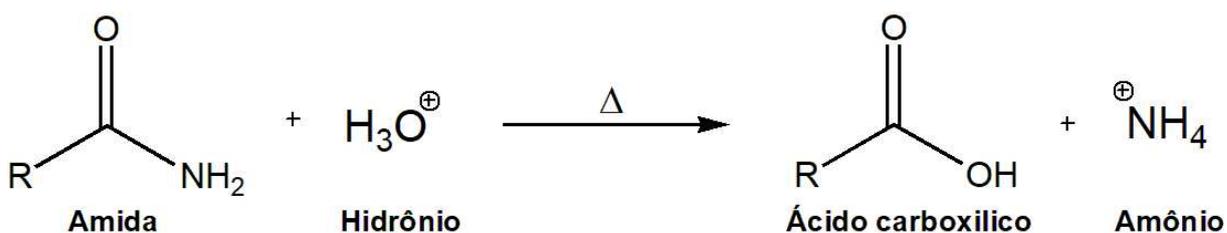
Fonte: dados da pesquisa.

O percentual de DOX liberado após 72 h pelas nanopartículas de pró-fármacos GC-D-DOX e GCCM-D-DOX em pH 7,4 (tecido normal) foi de 22% e 36%, em pH 6,0 (microambiente tumoral extracelular) foi de 31% e 52% e em pH 5,0 (microambiente tumoral intracelular) foi de 32% e 57%, respectivamente. As nanopartículas do pró-fármaco GCCM-D-DOX (Figura 50B) apresentaram maior percentual de liberação de DOX do que as nanopartículas do pró-fármaco GC-D-DOX (Figura 50A) em todos os valores de pH, esse comportamento pode ser explicado pelo menor potencial zeta das nanopartículas do pró-fármaco GC-D-DOX (-13 mV) em comparação com as nanopartículas do pró-fármaco

GCCM-D-DOX (-26 mV), visto que nanopartículas com baixa carga superficial têm uma tendência de aglomerar formando partículas maiores, o que acarreta uma diminuição do percentual de fármaco liberado (DAI *et al.*, 2017).

A hidrólise de amidas em solução aquosa ácida é um processo lento e requer a utilização de aquecimento para aumentar a velocidade da reação (KLEIN, 2016), mas é uma reação produto favorecida, uma vez que o íon amônio (pKa = 9,2) é um ácido muito mais fraco do que o íon hidrônio (pKa = -1,7) (Figura 51). Nanopartículas de pró-fármaco à base de dextrana-doxorrubicina (pH 7,4 = 49%, pH 6,8 = 60% e pH 5,0 = 72%) (LI *et al.*, 2016a) e inulina-doxorrubicina (pH 7,4 = 11%, pH 6,0 = 24%; pH 5,2 = 38% e pH 4,5 = 60%) (WANG *et al.*, 2019b) sintetizados via reação de amidação com química de carbodiimida conseguiram evidenciar o aumento do percentual de DOX liberada em função da redução do pH do meio, ou seja, a hidrólise da ligação amida ocorre com o aumento da acidez do meio a 37 °C como foi observado para as nanopartículas do pró-fármaco GCCM-D-DOX (Figura 50B).

Figura 51 - Reação de hidrólise de uma amida em meio aquoso catalisada por ácido



Fonte: adaptado de Klein (2016).

O modelo cinético de Zeng, An e Wu (2011) foi aplicado aos dados experimentais da liberação de DOX pelas nanopartículas dos pró-fármacos GC-D-DOX e GCCM-D-DOX. Os parâmetros do modelo foram calculados e apresentados na Tabela 21.

Tabela 21 - Parâmetros estimados pelo modelo cinético de Zeng para liberação cumulativa de DOX das nanopartículas dos pró-fármacos GC-D-DOX e GCCM-D-DOX

Nanopartículas	pH	Parâmetros do modelo de Zeng				
		k_s (h^{-1})	k_{on} (h^{-1})	k_{off} (h^{-1})	ΔG ($10^{-22}J$)	R^2
GC-D-DOX	7,4	0,925	0,005	0,001	-69	0,882
	6,0	0,390	0,0011	0,00045	-38	0,915
	5,0	0,544	0,0062	0,0019	-51	0,987
GCCM-D-DOX	7,4	0,923	0,00067	0,00036	-27	0,932
	6,0	0,387	0,0012	0,0011	-3,7	0,994
	5,0	0,512	0,0024	0,0023	-1,8	0,998

k_s : taxa de difusão do fármaco; k_{on} : taxa de associação do fármaco; k_{off} : taxa de dissociação do fármaco; ΔG : diferença de energia livre entre os estados do fármaco livre e ligado.

Fonte: dados da pesquisa.

Os valores de $k_s \gg k_{on}$ e $k_s \gg k_{off}$ (Tabela 21) para as nanopartículas dos pró-fármacos GC-D-DOX e GCCM-D-DOX indicam uma liberação rápida do fármaco livre via difusão seguida de uma liberação lenta do fármaco ligado a matriz que é ditada pelo processo de dissociação (ZENG; AN; WU, 2011). Os valores de $\Delta G < 0$ sugerem uma forte interação entre o fármaco (DOX) e a matriz (polissacarídeo) (RICHTER *et al.*, 2022) e aumento dos valores de ΔG em função da redução do pH do meio, indica que a redução do pH enfraquece a interação/ligação do fármaco com a matriz e conseqüentemente aumenta a liberação ditada pelo processo de dissociação. Os dados de k_{off} corroboram com o aumento do ΔG , visto que os dados de k_{off} para a liberação de DOX em pH 5,0 são maiores que os dados de k_{off} do mesmo sistema para a liberação em pH 7,4 (Tabela 21).

De acordo com os dados de RR (89,0%), CFL (9,6%) e EFL (74%) obtidos para a síntese do pró-fármaco GCCM-D-DOX e o perfil de liberação de DOX responsiva ao pH das nanopartículas do pró-fármaco GCCM-D-DOX. Esse sistema foi selecionado para estudos preliminares de citotoxicidade.

A citotoxicidade do derivado GCCM, da DOX livre e das nanopartículas do GCCM-D-DOX foi avaliada contra a linhagem celular L929 (fibroblasto murino não tumoral), HCT-116 (câncer colorretal humano) e MCF-7 (câncer de mama humano) usando o ensaio MTT, após 72 h de incubação. Os resultados obtidos em termos de CI_{50} foram apresentados na Tabela 22.

Tabela 22 - Atividade citotóxica *in vitro* do derivado GCCM, da DOX e das nanopartículas do pró-fármaco GCCM-D-DOX em células L929, HCT-116 e MCF-7 após 72 h de incubação

Amostras	CI_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
	Intervalo de confiança (95%)		
	L929	HCT-116	MCF-7
GCCM-D-DOX*	0,61 (0,37 – 0,79)	0,03 (0,02 – 0,04)	0,06 (0,05 – 0,07)
GCCM	>250	>250	>250
DOX	0,42 (0,30 – 0,62)	0,12 (0,09 – 0,16)	0,29 (0,22 – 0,38)

Dados reportados com valores de CI_{50} e intervalo de confiança de 95%.

CI_{50} : concentração inibitória média; L929: fibroblasto murino não tumoral; HCT-116 = câncer colorretal humano; MCF-7: câncer de mama humano.

*concentração de DOX.

Fonte: dados da pesquisa.

O derivado GCCM não apresentou atividade citotóxica contra nenhuma das linhagens de células testadas na concentração $250 \mu\text{g mL}^{-1}$, mas as nanopartículas do pró-fármaco GCCM-D-DOX mostraram ser promissoras no combate as células do câncer colorretal e mama. As nanopartículas do pró-fármaco GCCM-D-DOX apresentam CI_{50} contra as linhagens HCT-116 ($0,03 \mu\text{g mL}^{-1}$) e MCF-7 ($0,03 \mu\text{g mL}^{-1}$) inferior a CI_{50} da DOX livre (HCT-116 = $0,12$ e MCF-7 = $0,29 \mu\text{g mL}^{-1}$) e menor do que a CI_{50} reportada por Mansur *et al.* (2018) para nanopartículas do pró-fármaco de carboximetilcelulose-doxorrubicina contra a linhagem MCF-7 ($2,80 \mu\text{g mL}^{-1}$). Além disso, observa-se que as nanopartículas do pró-fármaco GCCM-D-DOX provocam uma diminuição da citotoxicidade da DOX contra as células não tumorais L929.

Os valores de CI_{50} para as nanopartículas do pró-fármaco GCCM-D-DOX são 4 e 5 vezes menores do que os valores de CI_{50} para DOX livre contra as linhagens tumorais HCT-116 e MCF-7 (Tabela 22), respectivamente. Enquanto a CI_{50} contra a linhagem não tumoral é 1,4 vezes maior do que para a DOX livre. Diante desse resultado, pode-se inferir que as nanopartículas do pró-fármaco GCCM-D-DOX são

excelentes candidatas para inibirem a proliferação de células do câncer de colorretal e mama. Entretanto, faz-se necessário a realização de mais estudos para verificar a ação desse sistema em células tumorais.

4.4 Pró-fármaco GC-S-DOX versus pró-fármaco GCCM-D-DOX

O pró-fármaco GC-S-DOX sintetizado via reação de formação da base de *Schiff* e o pró-fármaco GCCM-D-DOX sintetizado via reação de amidação com química de carbodiimida apresentaram os melhores resultados em termos de eficiência de síntese, tamanho de partícula, liberação de DOX responsiva ao pH e atividade citotóxica.

Ao comparar-se os dados de síntese para os pró-fármacos GC-S-DOX e GCCM-D-DOX (Tabela 23), observa-se que as duas rotas sintéticas apresentam resultados excelentes para a síntese de pró-fármacos com RR maior que 80% e EFL superior a 70%. A rota sintética do pró-fármaco GCCM-D-DOX (RR = 89%) apresenta RR maior do que a rota sintética do pró-fármaco GC-S-DOX (RR = 81%) e EFL semelhante (74 e 75%). Diante desses dados, pode-se concluir que as duas rotas sintéticas são eficientes para a síntese de pró-fármacos com alto RR e CFL, sendo que a rota sintética via reação de amidação com química de carbodiimida apresenta uma pequena vantagem em comparação a reação de formação da base de *Schiff*.

Tabela 23 - Propriedades dos pró-fármacos. Rendimento reacional (RR), carga de fármaco ligado (CFL) e eficiência de fármaco ligado (EFL)

Pró-fármacos	RR (%)	CFL (%)	EFL (%)
GC-S-DOX	81,0 ± 1,0 ^a	28,0 ± 1,0 ^a	75,0 ± 1,0 ^a
GCCM-D-DOX	89,0 ± 1,0 ^b	9,6 ± 1,0 ^b	74,0 ± 2,0 ^a

Dados reportados com média e desvio padrão (n = 3). A análise estatística foi realizada usando ANOVA de fator único, seguida do teste Tukey. Letras iguais na mesma coluna não são significativamente diferentes (p>0,05) e letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes (p<0,05).

Fonte: dados da pesquisa.

Ao comparar-se os dados de tamanho de partícula das nanopartículas formadas pelos pró-fármacos GC-S-DOX e GCCM-D-DOX (Tabela 24), tem-se que as nanopartículas do pró-fármaco GC-S-DOX (159 nm) em solução são menores que as nanopartículas do pró-fármaco GCCM-D-DOX (240 nm), o que já era esperado, visto

que a CFL é inversamente proporcional ao tamanho das nanopartículas em solução e o pró-fármaco GC-S-DOX (CFL = 28%) possui uma CFL 3 vezes maior que a do pró-fármaco GCCM-D-DOX (CFL = 9,6%).

Tabela 24 - Parâmetros físico-químicos das nanopartículas dos pró-fármacos GC-S-DOX e GCCM-D-DOX

Amostras	DLS		
	Tamanho (nm)*	IPD*	Zeta (mV)#
GC-S-DOX	159 ± 11 ^a	0,29 ± 0,06 ^a	-18 ± 2 ^a
GCCM-D-DOX	240 ± 8 ^b	0,38 ± 0,03 ^b	-26 ± 2 ^b

Dados reportados com média e desvio padrão (n = 3). A análise estatística foi realizada usando ANOVA de fator único, seguida do teste Tukey. Letras iguais na mesma coluna não são significativamente diferentes (p>0,05) e letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes (p<0,05).

*tampão fosfato (pH = 7,4; 0,1 mol L⁻¹) a 37 °C.

#água a 25 °C.

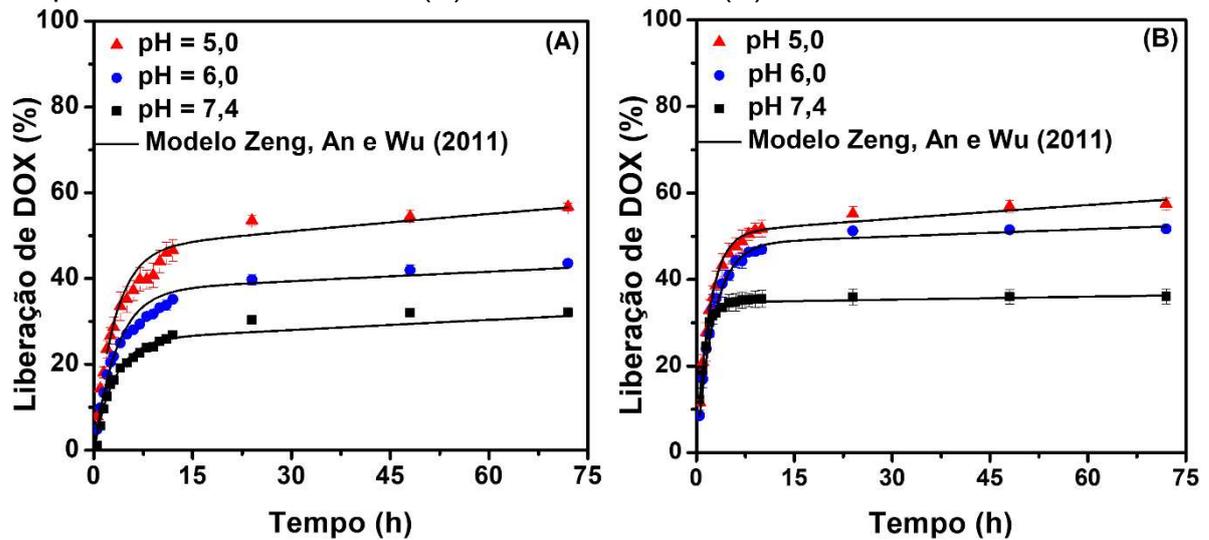
Fonte: dados da pesquisa.

O tamanho das nanopartículas dos pró-fármacos GC-S-DOX e GCCM-D-DOX estão dentro da faixa de tamanho (30 – 300 nm) recomendada para atuarem como sistemas de liberação contra o câncer por meio do direcionamento passivo via efeito de permeabilidade e retenção (EPR) aprimorada.

As nanopartículas dos pró-fármacos GC-S-DOX e GCCM-D-DOX apresentam potencial zeta negativo devido aos grupos ácido presentes na estrutura da GC pura e do derivado GCCM, respectivamente. O maior potencial zeta em módulo para as nanopartículas do pró-fármaco GCCM-D-DOX é justificado pelo maior teor de grupos ácido do derivado GCCM (50%) em comparação com a GC pura (5%).

Como discutido nas seções 4.2.3 e 4.3.4, as nanopartículas dos pró-fármacos GC-S-DOX e GCCM-D-DOX apresentam uma liberação de explosão inicial da DOX nas primeiras horas de experimento, seguida de uma liberação lenta da DOX ligada covalentemente ao polissacarídeo (Figura 52). Além disso, os dois sistemas possuem uma liberação modificada pelo pH do meio (nanopartículas pH-responsiva), ou seja, o percentual de DOX liberado aumenta com a redução do pH do meio, devido a clivagem da ligação imina/base de *Schiff* para o pró-fármaco GC-S-DOX e amida para o pró-fármaco GCCM-D-DOX.

Figura 52 - Liberação cumulativa de DOX em função do pH para as nanopartículas dos pró-fármacos GC-S-DOX (A) e GCCM-D-DOX (B)

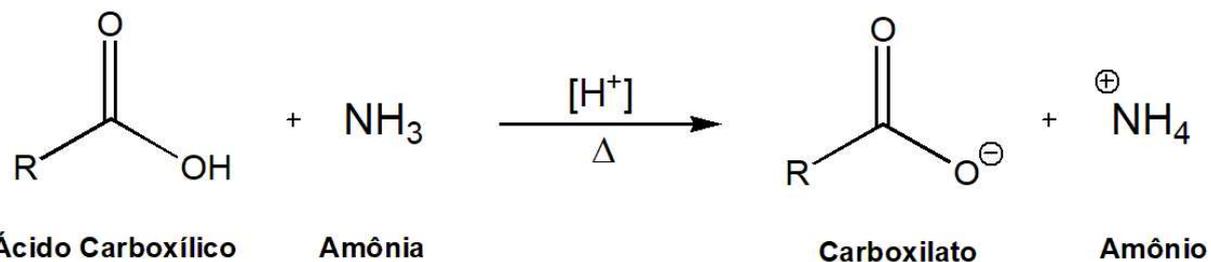
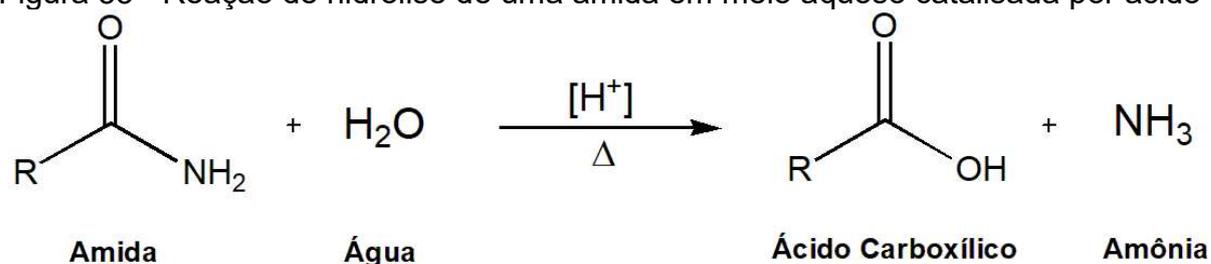


Dados reportados com média e desvio padrão (n=3).
Fonte: dados da pesquisa.

O percentual de DOX liberado após 72 h de experimento para as nanopartículas do pró-fármaco GCCM-D-DOX foi maior do que para as nanopartículas do pró-fármaco GC-S-DOX em pH 7,4 (36% contra 30%), pH 6,0 (52% contra 38%) e pH 5,0 (57% contra 54%). Esse comportamento não era esperado visto que a ligação imina/base de *Schiff* é mais suscetível a hidrólise em meio ácido do que a ligação amida (KLEIN, 2016).

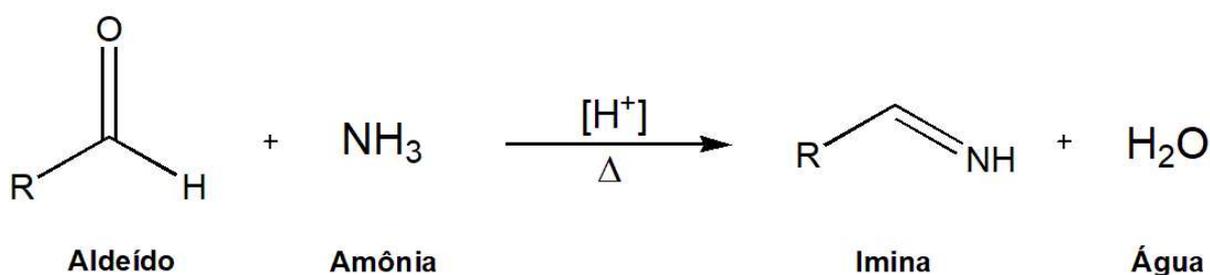
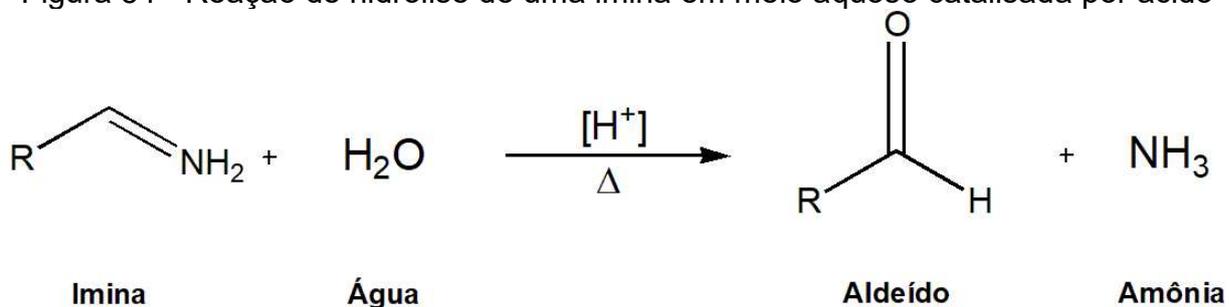
A maior liberação de DOX em 72 h pelas nanopartículas do pró-fármaco GCCM-D-DOX pode ser explicada pelo fato da hidrólise da ligação amida não ser reversível em meio ácido, enquanto a hidrólise da ligação imina/base de *Schiff* é reversível (KLEIN, 2016). A hidrólise de uma amida em meio ácido converte a amida no ácido carboxílico e na amina de partida, em seguida, a amina desprotona o ácido carboxílico tornando a hidrólise da amida um processo irreversível (Figura 53). Já a hidrólise de uma imina em meio ácido é uma reação reversível, já que a amina formada após a hidrólise da imina pode atacar a carbonila do aldeído e formar novamente a imina (Figura 54).

Figura 53 - Reação de hidrólise de uma amida em meio aquoso catalisada por ácido



Fonte: adaptado de Klein (2016).

Figura 54 - Reação de hidrólise de uma imina em meio aquoso catalisada por ácido

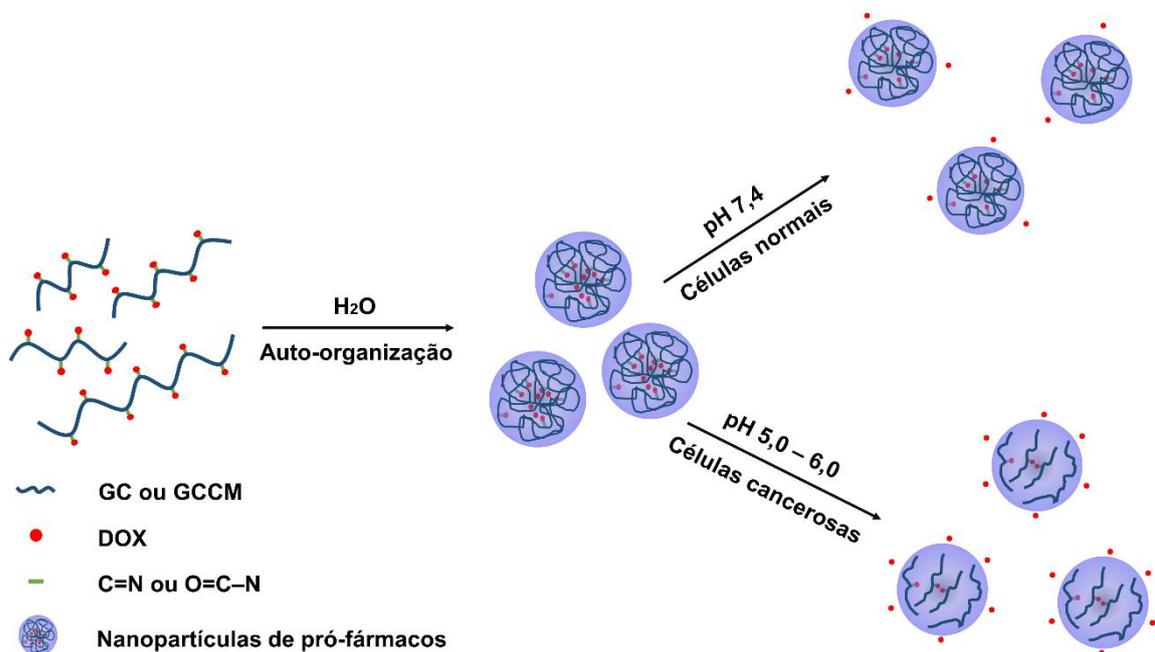


Fonte: adaptado de Klein (2016).

Os resultados do estudo de liberação e tamanho de partícula sugerem que as nanopartículas de pró-fármacos GC-S-DOX e GCCM-D-DOX possuem um perfil de liberação de DOX adequado para aplicação contra o câncer, ao promover uma liberação prolongada da DOX com uma taxa de liberação controlada pelo pH do meio (Figura 55). Além disso, os dois sistemas podem se acumular no tecido tumoral

por meio do direcionamento passivo via efeito de permeabilidade e retenção (EPR) aprimorada e promover a liberação da DOX no microambiente tumoral, aumentando sua eficácia quimioterápica e reduzindo sua citotoxicidade contra células saudáveis.

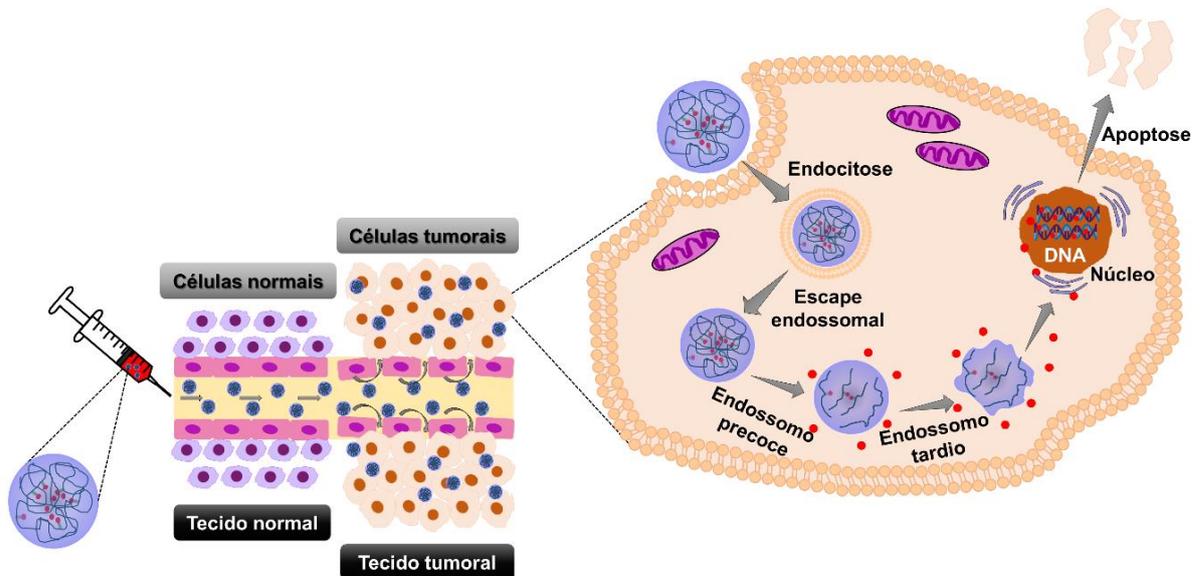
Figura 55 - Ilustração para o comportamento dos pró-fármacos em solução aquosa



Fonte: elaborado pelo autor.

As nanopartículas do pró-fármaco GC-S-DOX e GCCM-D-DOX podem se acumular no tecido tumoral via direcionamento passivo e serem captadas pelas células tumorais via endocitose (Figura 56) para entrega intracelular de DOX desencadeada pela acidez do microambiente tumoral intracelular (endossomo inicial: pH 5,9 - 6,2; endossomo tardio e lisossomo: pH 5,0 - 5,5) (ZHAO *et al.*, 2017). A DOX liberada intercala-se entre os pares de bases da dupla hélice do DNA e inibi a topoisomerase II, interrompendo a função mitocondrial e potencializando a geração de radicais livres e danos oxidativos (KCIUK *et al.*, 2023). O dano ao DNA causado pela inibição da topoisomerase II leva a uma parada do ciclo celular G1 e G2 e eventual indução do processo de apoptose (morte celular programada) (KCIUK *et al.*, 2023; TACAR *et al.*, 2013)

Figura 56 - Ilustração do direcionamento passivo e captação celular das nanopartículas de pró-fármacos no tecido tumoral



Fonte: elaborado pelo autor.

A atividade citotóxica das nanopartículas dos pró-fármacos GC-S-DOX e GCCM-D-DOX em comparação com a da DOX livre (Tabela 25) indica que esses sistemas são candidatos em potencial para atuarem no combate as células do câncer de colorretal e mama.

Tabela 25 - Atividade citotóxica *in vitro* da DOX e das nanopartículas dos pró-fármacos GC-S-DOX e GCCM-D-DOX em células L929, HCT-116 e MCF-7 após 72 h de incubação

Amostras	CI ₅₀ (µg mL ⁻¹) Intervalo de confiança (95%)		
	L929	HCT-116	MCF-7
GC-S-DOX*	28,20 (24,10 – 32,90)	1,31 (1,09 – 1,59)	2,74 (1,84 – 4,00)
GCCM-D-DOX*	0,61 (0,37 – 0,79)	0,03 (0,02 – 0,04)	0,06 (0,06 – 0,07)
DOX	0,42 (0,30 – 0,62)	0,12 (0,09 – 0,16)	0,29 (0,22 – 0,38)

Dados reportados com valores de CI₅₀ e intervalo de confiança de 95%.

CI₅₀: concentração inibitória média; L929: fibroblasto murino não tumoral; HCT-116: câncer colorretal humano; MCF-7: câncer de mama humano.

*concentração de DOX.

Fonte: dados da pesquisa.

Os valores de CI_{50} para as nanopartículas do pró-fármaco GCCM-D-DOX contra as linhagens HCT-116 e MCF-7 são menores do que os valores de CI_{50} determinados para as nanopartículas do pró-fármaco GC-S-DOX e menor do que os valores reportados para a DOX livre. Entretanto, esses estudos estão em fases iniciais e esse sistema apresentou atividade citotóxica próxima a CI_{50} da DOX livre contra as células não tumorais L929, enquanto, as nanopartículas do pró-fármaco GC-S-DOX apresentou CI_{50} 67 vezes maior que a DOX livre e 46 vezes maior que as nanopartículas do pró-fármaco GCCM-D-DOX frente essa mesma linhagem, ou seja, as nanopartículas do pró-fármaco GC-S-DOX apresentam maior viabilidade celular do que as nanopartículas do pró-fármaco GCCM-D-DOX em células não tumorais L929. Dessa forma, pode-se concluir que as nanopartículas do pró-fármaco GC-S-DOX são as mais seguras e promissoras para potencial aplicação no tratamento contra o câncer.

5 CONCLUSÃO

Os derivados de goma do cajueiro foram sintetizados com sucesso via reação de oxidação seletiva e reação de carboximetilação, adicionando a função orgânica aldeído à estrutura da goma do cajueiro e aumentando o teor de grupos ácido desse polissacarídeo. A síntese dos pró-fármacos via reação de formação da base de *Schiff* e reação de amidação utilizando química de carbodiimida foi bem-sucedida.

Os pró-fármacos apresentaram capacidade de auto-organização em meio aquoso, formando nanopartículas com diâmetro médio (160 - 250 nm), adequado para aplicação contra o câncer por meio do direcionamento passivo via efeito de permeabilidade e retenção aprimorada. As nanopartículas de pró-fármacos produzidos apresentaram perfil de liberação de doxorubicina prolongada e dependente do pH do meio. O tipo de ligação entre o polissacarídeo e a doxorubicina influenciou no perfil de liberação.

As nanopartículas do pró-fármaco GCCM-D-DOX mostrou-se ser o sistema com maior potencial citotóxico contra as células do câncer de mama e colorretal. No entanto, as nanopartículas do pró-fármaco GC-S-DOX são mais seletivas e seguras para potencial aplicação contra o câncer

REFERÊNCIAS

ALAVARSE, A. C.; FRACHINI, E. C. G.; DA SILVA, R. L. C. G.; LIMA, V. H.; SHAVANDI, A.; PETRI, D. F. S. Crosslinkers for polysaccharides and proteins: synthesis conditions, mechanisms, and crosslinking efficiency, a review.

International Journal of Biological Macromolecules, v. 202, p. 558, 2022.

ALAVI, M.; WEBSTER, T. J. Recent progress and challenges for polymeric microsphere compared to nanosphere drug release systems: is there a real difference? **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 33, p. 116028, 2021.

ALI, E. S.; SHARKER, S. M.; ISLAM, M. T.; KHAN, I. N.; SHAW, S.; RAHMAN, M. A.; UDDIN, S. J.; SHILL, M. C.; REHMAN, S.; DAS, N.; AHMAD, S.; SHILPI, J. A.; TRIPATHI, S.; MISHRA, S. K.; MUBARAK, M. S. Targeting cancer cells with nanotherapeutics and nanodiagnostics: current status and future perspectives.

Seminars in Cancer Biology, v. 69, p. 52, 2021.

ALLEN, L. V.; POPOVICH, N. V.; ANSEL, H. C. Ansel's pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems. Chapter 9 - Solid oral modified-release dosage forms.

Wolters Kluwer, 9^o Edition, 2011.

AN, L.; JIA, Y.; LI, J.; XIAO, C. Reduction-responsive dextran-based Pt(IV) nano-prodrug showed a synergistic effect with doxorubicin for effective melanoma treatment. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 233, p. 123277, 2023.

BEHRANVAND, N.; NASRI, F.; EMAMEH, R. Z.; KHANI, P.; HOSSEINI, A.; GARSSSEN, J.; FALAK, R. Chemotherapy: a double-edged sword in cancer treatment. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 71, p. 507-526, 2022.

BURADE, V.; BHOWMICK, S.; MAITI, K.; ZALAWADIA, R.; RUAN, H.; THENNATI, R. Lipodox® (generic doxorubicin hydrochloride liposome injection): *in vivo* efficacy and bioequivalence versus Caelyx® (doxorubicin hydrochloride liposome injection) in human mammary carcinoma (MX-1) xenograft and syngeneic fibrosarcoma (WEHI 164) mouse models. **BMC Cancer**, v. 17, p. 405, 2017.

CAO, Z.; LIU, R.; LI, Y.; LUO, X.; HUA, Z.; WANG, X.; XUE, Z.; ZHANG, Z.; LU, C.; LU, A.; LIU, Y. MTX-PEG-modified CG/DMMA polymeric micelles for targeted delivery of doxorubicin to induce synergistic autophagic death against triple-negative breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 25 p. 1, 2023.

CAPANEMA, N. S. V.; MANSUR, A. A. P.; CARVALHO, S. M.; CARVALHO, I. C.; CHAGAS, P.; DE OLIVEIRA, L. C. A.; MANSUR, H. S. Bioengineered carboxymethyl cellulose-doxorubicin prodrug hydrogels for topical chemotherapy of melanoma skin cancer. **Carbohydrate Polymers**, v. 195, p. 401, 2018.

CARMONA-FONTAINE, C.; BUCCI, V.; AKKARI, L.; DEFORET, M.; JOYCE, J. A.; XAVIER, J. B. Emergence of spatial structure in the tumor microenvironment due to the warburg effect. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, p. 19402, 2013.

CARNEIRO, M. J. M.; PAULA, C. B. A.; RIBEIRO, I. S.; DE LIMA, L. R. M.; RIBEIRO, F. O. S.; SILVA, D. A.; ARAÚJO, G. S.; MARINHO FILHO, J. D. B.; ARAÚJO, A. J.; FREIRE, R. S.; FEITOSA, J. P. A.; DE PAULA, R. C. M. Dual responsive dextran-graft-poly (N-isopropylacrylamide)/doxorubicin prodrug via Schiff base reaction. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 185, p. 390, 2021.

CHOI, J.; KIM, S. Y. Multi-shell structured nanocarriers with enhanced multiphoton upconversion luminescence efficiency for NIR-mediated targeted photodynamic therapy. **Applied Materials Today**, v. 31, p. 101755, 2023.

COSTA, W. C.; CAMPOLINA-SILVA, G. H.; QUEIROZ-JUNIOR, C. M.; FLORENTINO, R. M.; MACHADO, J. R.; MARTINS, D. G.; GONÇALVES, W. A.; BARROSO, L. C.; FREITAS, K. M.; SOUZA-NETO, F. P.; FÉLIX, F. B.; SILVA, R. F.; OLIVEIRA, C. A.; CÂMARA, N. O. S.; RACHID, M. A.; TEIXEIRA, M. M.; REZENDE, B. M.; PINHO, V. Therapeutic treatment with phosphodiesterase-4 inhibitors alleviates kidney injury and renal fibrosis by increasing MMP-9 in a doxorubicin-induced nephrotoxicity mouse model. **International Immunopharmacology**, v. 115, p. 109583, 2023.

CUNHA, P. L. R.; MACIEL, J. S.; SIERAKOWSKI, M. R.; DE PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A. Oxidation of cashew tree gum exudate polysaccharide with TEMPO reagent. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, p. 85, 2007.

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

DAI, Y.; WANG, S.; SHI, W.; LANG, M. pH-responsive carboxymethyl chitosan-derived micelles as apatinib carriers for effective anti-angiogenesis activity: preparation and *in vitro* evaluation. **Carbohydrate Polymers**, v. 176, p. 107, 2017.

DARVISHI, M.; TOSAN, F.; NAKHAEI, P.; MANJILI, D. A.; KHARKOUEI, S. A.; ALIZADEH, A.; ILKHANI, S.; KHALAF, F.; ZADEH, F. A.; SHAFAGH, S. G. Recent progress in cancer immunotherapy: overview of current status and challenges. **Pathology Research and Practice**, v. 241, p. 154241, 2023.

DE PAULA, R. C. M.; RODRIGUES, J. F. Composition and rheological properties of cashew tree gum, the exudate polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, p. 177, 1995.

DE PAULA, REGINA C. M.; HEATLEY, F.; BUDD, P. M. Characterization of *Anacardium occidentale* exudate polysaccharide. **Polymer International**, v. 45, p. 27, 1998.

DE SÁ PINTO, A. P.; DE HOLANDA E SILVA, K. G.; MANSUR, C. R. E. Evaluation of the application of cashew gum as an excipient to produce tablets. **Polimeros**, v. 28, p. 302, 2018.

DING, C.; CHEN, C.; ZENG, X.; CHEN, H.; ZHAO, Y. Emerging strategies in stimuli-responsive prodrug nanosystems for cancer therapy. **ACS Nano**, v. 16, p. 13513, 2022b.

DING, M.; SHI, R.; CHENG, S.; LI, M.; DE, D.; LIU, C.; GU, X.; LI, J.; ZHANG, S.; JIA, M.; FAN, R.; PEI, J.; FU, F. Mfn2-mediated mitochondrial fusion alleviates doxorubicin-induced cardiotoxicity with enhancing its anticancer activity through metabolic switch. **Redox Biology**, v. 52, p. 102311, 2022a.

DUAN, Y.; LI, K.; WANG, H.; WU, T.; ZHAO, Y.; LI, H.; TANG, H.; YANG, W. Preparation and evaluation of curcumin grafted hyaluronic acid modified pullulan polymers as a functional wound dressing material. **Carbohydrate Polymers**, v. 238, p. 116195, 2020.

EATON, P.; QUARESMA, P.; SOARES, C.; NEVES, C.; DE ALMEIDA, M. P.; PEREIRA, E.; WEST, P. A direct comparison of experimental methods to measure dimensions of synthetic nanoparticles. **Ultramicroscopy**, v. 182, p. 179, 2017.

FERRARI, R.; SPONCHIONI, M.; MORBIDELLI, M.; MOSCATELLI, D. Polymer nanoparticles for the intravenous delivery of anticancer drugs: the checkpoints on the road from the synthesis to clinical translation. **Nanoscale**, v. 10, p. 22701–, 2018.

FERREIRA, C. R. N.; RAMOS, E. L. L.; ARAUJO, L. F. S.; SOUSA, L. M. S.; FEITOSA, J. P. A.; CUNHA, A. F.; OLIVEIRA, M.; MANO, J. F.; MACIEL, J. S.; Synthesis and characterization of scaffolds produced under mild conditions based on oxidized cashew gums and carboxyethyl chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 176, p. 26, 2021.

FERREIRA, S. R. S.; MESQUITA, M. V. N.; SÁ, L. L. F.; NOGUEIRA, N. C.; RIZZO, M. S.; SILVA-FILHO, E. C.; COSTA, M. P.; RIBEIRO, A. B. Sustainable natural gums for industrial application: physicochemical and texturometric evaluation. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 54, p. 101306, 2019.

FRANCIS, A. P.; JAYAKRISHNAN, A. Conjugating doxorubicin to polymannose: a new strategy for target specific delivery to lung cancer cells. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 30, p. 1471, 2019.

GAO, C.; TANG, F.; GONG, G.; ZHANG, J.; HOI, M. P. M.; LEE, S. M. Y.; WANG, R. pH-responsive prodrug nanoparticles based on a sodium alginate derivative for selective co-release of doxorubicin and curcumin into tumor cells. **Nanoscale**, v. 9, p. 12533, 2017.

GLOBAL CANCER (GLOBOCAN). Cancer today. **International Agency for Research on Cancer/World Health Organization**, 2020. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/>. Acessado em: 20 de maio de 2023.

GONÇALVES, N. D.; DUARTE, M. C. T.; PRATA, A. S.; RODNEY, R. A. Antimicrobial activity of cashew gum–gelatin coacervates as a food ingredient. **ACS Agricultural Science and Technology**, v. 1, p. 597, 2021.

GONG, J.; YAN, J.; FORSCHER, C.; HENDIFAR, A. Aldoxorubicin: a tumor-targeted doxorubicin conjugate for relapsed or refractory soft tissue sarcomas. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 12, p. 777, 2018.

GUARNIZO-HERRERO, V.; TORRADO-SALMERÓN, C.; PABÓN, N. S. T.; DURÁN, G. T.; MORALES, J.; TORRADO-SANTIAGO, S. Study of different chitosan/sodium carboxymethyl cellulose proportions in the development of polyelectrolyte complexes for the sustained release of clarithromycin from matrix tablets. **Polymers**, v. 13, p. 2813, 2021.

GUO, H.; HUANG, S.; XU, A.; XUE, W. Injectable adhesive self-healing multiple-dynamic-bond crosslinked hydrogel with photothermal antibacterial activity for infected wound healing. **Chemistry of Materials**, v. 34, p. 2655, 2022.

HALWANI, A. A. Development of pharmaceutical nanomedicines: from the bench to the market. **Pharmaceutics**, v. 14, p. 106, 2022.

HAN, S.; LEE, J.; JUNG, E.; PARK, S.; SAGAWA, A.; SHIBASAKI, Y.; LEE, D.; KIM, B. S. Mechanochemical drug conjugation via pH-responsive imine linkage for polyether prodrug micelles. **ACS Applied Bio Materials**, v. 4, p. 2465, 2021.

HENRI, J. L.; NAKHJAVANI, M.; COOMBE, S.; SHIGDAR, S. Cytotoxic effects of aptamer-doxorubicin conjugates in an ovarian cancer cell line. **Biochimie**, v. 204, p. 108, 2023.

HU, Q.; YAMMANI, R. D.; BROWN-HARDING, H.; SOTO-PANTOJA, D. R.; POOLE, L. B.; LUKESH, J. C. Mitigation of doxorubicin-induced cardiotoxicity with an H₂O₂-activated, H₂S-donating hybrid prodrug. **Redox Biology**, v. 53, p. 102338, 2022.

HU, R.; ZHENG, H.; CAO, J.; DAVOUDI, Z.; WANG, Q. Synthesis and *in vitro* characterization of carboxymethyl chitosan-CBA-doxorubicin conjugate nanoparticles as pH-sensitive drug delivery systems. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 13, p. 1097, 2017.

IMOSEMI, I. O.; OWUMI, S. E.; ARUNSI, U. O. Biochemical and histological alterations of doxorubicin-induced neurotoxicity in rats: protective role of luteolin. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 36, p. 1, 2022.

ISOGAI, A. TEMPO-catalyzed oxidation of polysaccharides. **Polymer Journal**, v. 54, p. 387, 2022.

KALVA, N.; UTHAMAN, S.; LEE, S. J.; LIM, Y. J.; AUGUSTINE, R.; HUH, K. M.; PARK, I. K.; KIM, I. Degradable pH-responsive polymer prodrug micelles with aggregation-induced emission for cellular imaging and cancer therapy. **Reactive and Functional Polymers**, v. 166, p. 104966, 2021.

KALYANASUNDARAM, K.; THOMAS, J. K. Environmental effects on vibronic band intensities in pyrene monomer fluorescence and their application in studies of micellar systems. **Journal of the American Chemical Society**, v. 99, p. 2039, 1977.

KASHIFA FATHIMA, J. LAVANYA, V.; JAMAL, S.; AHMED, N. The effectiveness of various chemotherapeutic agents in cancer treatment. **Current Pharmacology Reports**, v. 8, p. 236, 2022.

KCIUK, M.; GIELECIŃSKA, A.; MUJWAR, S.; KOŁAT, D.; KAŁUZIŃSKA-KOŁAT, Ż.; CELIK, I.; KONTEK, R. Doxorubicin—an agent with multiple mechanisms of anticancer activity. **Cells**, v. 12 p. 26, 2023.

KIM, K. S.; PARK, S. J.; LEE, M. Y.; LIM, K. G.; HAHN, S. K. Gold half-shell coated hyaluronic acid-doxorubicin conjugate micelles for theranostic applications. **Macromolecular Research**, v. 20, p. 277, 2012.

KLEIN, D. Química Orgânica. 2° ed. Rio de Janeiro: **LTC**, v. 2, capítulo 18, 2016.

KOLB, H. C.; FINN, M. G.; SHARPLESS, K. B. Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 40, p. 2004, 2001.

KONG, X.; QI, Y.; WANG, X.; JIANG, R.; WANG, J.; FANG, Y.; GAO, J.; HWANG, K. C. Nanoparticle drug delivery systems and their applications as targeted therapies for triple negative breast cancer. **Progress in Materials Science**, v. 134, p. 101070, 2023.

KONO, H.; TSUKAMOTO, E.; TAJIMA, K. Facile post-carboxymethylation of cellulose nanofiber surfaces for enhanced water dispersibility. **ACS Omega**, v. 6, p. 34107, 2021.

KOYYADA, A.; ORSU, P. Nanofibrous scaffolds of carboxymethyl guar gum potentiated with reduced graphene oxide for *in vitro* and *in vivo* wound healing applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 607, p. 121035, 2021.

KRISTIANSEN, K. A.; POTTHAST, A.; CHRISTENSEN, B. E. Periodate oxidation of polysaccharides for modification of chemical and physical properties. **Carbohydrate Research**, v. 345, p. 1264, 2010.

LEUNG, M.; ROGERS, J. E.; SHUREIQI, I. Use of uridine triacetate to reverse severe persistent myelosuppression following 5-fluorouracil exposure in a patient with a c.557A>G heterozygous DPYD variant. **Clinical Colorectal Cancer**, v. 20, p. 273, 2021.

LI, D.; DING, J.; ZHUANG, X.; CHEN, L.; CHEN, X. Drug binding rate regulates the properties of polysaccharide prodrugs. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 4, p. 5167, 2016b.

LI, D.; FENG, X.; CHEN, L.; DING, J.; CHEN, X. One-step synthesis of targeted acid-labile polysaccharide prodrug for efficiently intracellular drug delivery. **ACS Biomaterials Science and Engineering**, v. 4, p. 539, 2018.

LI, D.; HAN, J.; DING, J.; CHEN, L.; CHEN, X. Acid-sensitive dextran prodrug: A higher molecular weight makes a better efficacy. **Carbohydrate Polymers**, v. 161, p. 33, 2017.

LI, D.; SU, T.; MA, L.; YIN, F.; XU, W.; DING, J.; LI, Z. Dual-acidity-labile polysaccharide-di-drugs conjugate for targeted cancer chemotherapy. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 199, p. 112367, 2020.

LI, D.; XU, W.; LI, P.; DING, J.; CHENG, Z.; CHEN, L.; YAN, L.; CHEN, X. Self-targeted polysaccharide prodrug suppresses orthotopic hepatoma. **Molecular Pharmaceutics**, v. 13, p. 4231, 2016a.

LI, M.; SUN, J.; ZHANG, W.; ZHAO, Y.; ZHANG, S.; ZHANG, S. Drug delivery systems based on CD44-targeted glycosaminoglycans for cancer therapy. **Carbohydrate Polymers**, v. 251, p. 117103, 2021b.

LI, X.; LI, W.; WANG, M.; LIAO, Z. Magnetic nanoparticles for cancer theranostics: advances and prospects. **Journal of Controlled Release**, v. 335, p. 437, 2021a.

LI, Y.; ZHAO, L.; LI, X. F. The hypoxia-activated prodrug TH-302: exploiting hypoxia in cancer therapy. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 636892, 2021.

LIANG, W.; LI, L.; WANG, M.; LIU, Y.; ZHANG, B.; WU, Q.; WEI, Y. Non-inferior efficacy of non-surgical treatment to surgical treatment in patients with nonmetastatic head and neck rhabdomyosarcoma: a SEER-based study. **Clinical and Translational Oncology**, v. 14, p. 1, 2023.

LIAO, J.; DAI, H.; HUANG, H. Construction of hydrogels based on the homogeneous carboxymethylated chitin from hericium erinaceus residue: role of carboxymethylation degree. **Carbohydrate Polymers**, v. 262, p. 117953, 2021.

LIMA, L. R. M.; RAMOS, E. L. L.; SILVA, M. F. S.; RIBEIRO, F. O. S.; SOUSA, J. S.; PESSOA, C.; SILVA, D. A.; FEITOSA, J. P. A.; PAULA, H. C. B.; DE PAULA, R. C. M. Poly(N-isopropylacrylamide)/galactomannan from *Delonix regia* seed thermal responsive graft copolymer via Schiff base reaction. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 166, p. 144, 2021.

LIMA, I.; MORENO, L.; DIAS, S.; SILVA, D.; OLIVEIRA, A. C.; SOARES, L.; SOUSA, R.; DITZ, D.; ROLIM, H.; NUNES, L. Acetylated cashew gum nanoparticles for mesalazine delivery. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**, v. 5, p. 100265, 2023.

LIU, F.; LIU, X.; CHEN, F.; FU, Q. Mussel-inspired chemistry: a promising strategy for natural polysaccharides in biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 123, p. 101472, 2021.

LIU, Y.; WU, M.; ZHONG, C.; XU, B.; KANG, L. M2-like macrophages transplantation protects against the doxorubicin-induced heart failure via mitochondrial transfer. **Biomaterials Research**, v. 26, p. 14, 2022.

LU, K.; LIN, S.; WANG, Y.; HAO, R.; FANG, L.; ZHU, J.; ZHAO, D.; YU, J.; TONG, S.; WU, Y.; SI, Y.; YE, T.; YANG, Q.; WANG, Y. Pharmacokinetics and safety of fosaprepitant dimeglumine in healthy chinese volunteers: bioequivalence study. **Clinical Pharmacology in Drug Development**, v. 10, p. 748, 2020.

LUO, Q.; LIN, L.; HUANG, Q.; DUAN, Z.; GU, L.; ZHANG, H.; GU, Z.; GONG, Q.; LUO, K. Dual stimuli-responsive dendronized prodrug derived from poly(oligo-(ethylene glycol) methacrylate)-based copolymers for enhanced anti-cancer therapeutic effect. **Acta Biomaterialia**, v. 143, p. 320, 2022.

LYU, Y.; XIE, J.; LIU, Y.; XIAO, M.; LI, Y.; YANG, J.; YANG, J.; LIU, W. Injectable hyaluronic acid hydrogel loaded with functionalized human mesenchymal stem cell aggregates for repairing infarcted myocardium. **ACS Biomaterials Science and Engineering**, v. 6, p. 6926, 2020.

MACIEL, J. S.; AZEVEDO, S.; CORREIA, C. R.; COSTA, A. M. S.; COSTA, R. R.; MAGALHÃES, F. A.; DE SOUSA MONTEIRO, A. A.; COSTA, J. F. G.; DE PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A.; MANO, J. F. Oxidized cashew gum scaffolds for tissue engineering. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 304, p. 1800574, 2019.

MADISON, S. A.; CARNALI, J. O. pH optimization of amidation via carbodiimides. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 52, p. 13547, 2013.

MAITI, K.; BHOWMICK, S.; JAIN, P.; ZOPE, M.; DOSHI, K.; RAJAMANNAR, T. Comparison of physicochemical properties of generic doxorubicin HCl liposome injection with the reference listed drug. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 597, 2018.

MALIK, U. S.; NIAZI, M. B. K.; JAHAN, Z.; ZAFAR, M. I.; VO, D. V. N.; SHER, F. Nano-structured dynamic Schiff base cues as robust self-healing polymers for biomedical and tissue engineering applications: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 20, p. 495, 2022.

MANSUR, A. A. P.; CARVALHO, S. M.; LOBATO, Z. I. P.; LEITE, M. D. F.; CUNHA, A. D. S.; MANSUR, H. S. Design and development of polysaccharide-doxorubicin-peptide bioconjugates for dual synergistic effects of integrin-targeted and cell-penetrating peptides for cancer chemotherapy. **Bioconjugate Chemistry**, v. 29, p. 1973, 2018.

MAURO, N.; CAMPORA, S.; SCIALABBA, C.; ADAMO, G.; LICCIARDI, M.; GHERSI, G.; GIAMMONA, G. Self-organized environment-sensitive inulin-doxorubicin conjugate with a selective cytotoxic effect towards cancer cells. **RSC Advances**, v. 5, p. 32421, 2015.

MELO, A. M. A.; OLIVEIRA, M. R. F.; FURTADO, R. F.; BORGES, F. M.; BISWAS, A.; CHENG, H. N.; ALVES, C. R. Preparation and characterization of carboxymethyl cashew gum grafted with immobilized antibody for potential biosensor application. **Carbohydrate Polymers**, v. 228, p. 115408, 2020.

MIGUEL, R. A.; HIRATA, A. S.; JIMENEZ, P. C.; LOPES, L. B.; COSTA-LOTUFO, L. V. Beyond formulation: contributions of nanotechnology for translation of anticancer natural products into new drugs. **Pharmaceutics**, v. 14, p. 1722, 2022.

MS/INCA. **Estatísticas de câncer**, 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros>. Acessado em 23 de maio de 2023.

MOHAMMED, A. S. A.; NAVEED, M.; JOST, N. Polysaccharides; classification, chemical properties, and future perspective applications in fields of pharmacology and biological medicine (a review of current applications and upcoming potentialities). **Journal of Polymers and the Environment**, v. 29, p. 2359, 2021.

MOREIRA, B. R.; BATISTA, K. A.; CASTRO, E. G.; LIMA, E. M.; FERNANDES, K. F. A bioactive film based on cashew gum polysaccharide for wound dressing applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 122, p. 69, 2015.

MOTAMEDI-SEDEH, F.; SABOORIZADEH, A.; KHALILI, I.; SHARBATDARAN, M.; WIJEWARDANA, V.; ARBABI, A. Carboxymethyl chitosan bounded iron oxide nanoparticles and gamma-irradiated avian influenza subtype H9N2 vaccine to development of immunity on mouse and chicken. **Veterinary Medicine and Science**, v. 8, p. 626, 2022.

NEACŞU, A. Physicochemical investigation of the complexation between γ -cyclodextrin and doxorubicin in solution and in solid state. **Thermochimica Acta**, v. 661, p. 51, 2018.

NIU, L.; ZHU, F.; LI, B.; ZHAO, L.; LIANG, H.; YAN, Y.; TAN, H. Folate-conjugated and pH-triggered doxorubicin and paclitaxel co-delivery micellar system for targeted anticancer drug delivery. **Materials Chemistry Frontiers**, v. 2, p. 1529, 2018.

NICOLETTO, R. E.; OFNER, C. M. Cytotoxic mechanisms of doxorubicin at clinically relevant concentrations in breast cancer cells. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 89, p. 285, 2022.

OLIVEIRA, A. C. J.; CHAVES, L. L.; RIBEIRO, F. O. S.; DE LIMA, L. R. M.; OLIVEIRA, T. C.; GARCÍA-VILLÉN, F.; VISERAS, C.; DE PAULA, R. C. M.; ROLIM-NETO, P. J.; HALLWASS, F.; SILVA-FILHO, E. C.; ALVES DA SILVA, D.; SOARES-SOBRINHO, J. L.; SOARES, M. F. L. R. Microwave-initiated rapid synthesis of phthalated cashew gum for drug delivery systems. **Carbohydrate Polymers**, v. 254, p. 117226, 2021.

OLIVEIRA, A. C. J.; SILVA, E. B.; OLIVEIRA, T. C.; RIBEIRO, F. O. S.; NADVORNY, D.; OLIVEIRA, J. W. F.; BORREGO-SÁNCHEZ, A.; RODRIGUES, K. A. F.; SILVA, M. S.; ROLIM-NETO, P. J.; VISERAS, C.; SILVA-FILHO, E. C.; SILVA, D. A.; CHAVES, L. L.; SOARES, M. F. L. R.; SOARES-SOBRINHO, J. L. pH-responsive phthalate cashew gum nanoparticles for improving drugs delivery and anti-trypanosoma cruzi efficacy. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 230, p. 123272, 2023.

OLIVEIRA, M. X.; CANAFÍSTULA, F. V. C.; FERREIRA, C. R. N.; FERNANDES, L. V. O.; ARAÚJO, A. R.; RIBEIRO, F. O. S.; SOUZA, J. M. T.; LIMA, I. C.; ASSREUY, A. M. S.; SILVA, D. A.; MARINHO FILHO, J. D. B.; ARAÚJO, A. J.; MACIEL, J. S.; FEITOSA, J. P. A. Hydrogels dressings based on guar gum and chitosan: Inherent action against resistant bacteria and fast wound closure. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 253, p. 127281, 2023.

PANDA, P. K.; JAIN, S. K. Polymeric nanocarrier system bearing anticancer agent for the treatment of prostate cancer: systematic development and *in vitro* characterization. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 13, p. 87, 2023.

RIBEIRO, I. S.; PONTES, F. J. G.; CARNEIRO, M. J. M.; SOUSA, N. A.; PINTO, V. P. T.; RIBEIRO, F. O. S.; SILVA, D. A.; ARAÚJO, G. S.; MARINHO, J. D. B.; ARAÚJO, A. J.; PAULA, H. C. B.; FEITOSA, J. P. A.; DE PAULA, R. C. M. Poly(ϵ -caprolactone) grafted cashew gum nanoparticles as an epirubicin delivery system. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 179, p. 314, 2021.

RICHTER, A. R.; CARNEIRO, M. J.; SOUSA, N. A.; PINTO, V. P. T.; FREIRE, R. S.; SOUSA, J. S.; MENDES, J. F. S.; FONTENELLE, R. O. S.; FEITOSA, J. P. A.; PAULA, H. C. B.; GOYCOOLEA, F. M.; DE PAULA, R. C. M. Self-assembling cashew gum-graft-poly lactide copolymer nanoparticles as a potential amphotericin B delivery matrix. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 152, p. 492, 2020.

RICHTER, A. R.; VERAS-NETO, J. G.; SOUSA, J. S.; MENDES, J. F. S.; FONTENELLE, R. O. S.; SILVA, S. A. N. M.; MARINHO-FILHO, J. D. B.; ARAÚJO, A. J.; FEITOSA, J. P. A.; PAULA, H. C. B.; GOYCOOLEA, F. M.; DE PAULA, R. C. M. Effect of acyl chain length on hydrophobized cashew gum self-assembling nanoparticles: colloidal properties and amphotericin B delivery. **Colloids and Interfaces**, v. 6, p. 65, 2022.

RODRIGUES, J. F.; DE PAULA, R. C. M.; COSTA, S. M. O. Métodos de isolamento de gomas naturais: comparação através da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 16, p. 31, 1993.

SAHAJPAL, K.; SHEKHAR, S.; KUMAR, A.; SHARMA, B.; MEENA, M. K.; BHAGI, A. K.; SHARMA, S. Dynamic protein and polypeptide hydrogels based on Schiff base co-assembly for biomedicine. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 10, p. 3173, 2022.

SALEM, D. M. S. A.; SALLAM, M. A. E.; YOUSSEF, T. N. M. A. Synthesis of compounds having antimicrobial activity from alginate. **Bioorganic Chemistry**, v. 87, p. 103, 2019.

SCHOENER, C. A.; CARILLO-CONDE, B.; HUTSON, H. N.; PEPPAS, N. A. An inulin and doxorubicin conjugate for improving cancer therapy. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 23, p. 111, 2013.

SHARGEL, L.; WU-PONG, S.; YU, A. Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics. Chapter 17 - Modified-release drug products. **McGraw Hill**, 6° Edition, 2012a.

SHARGEL, L.; WU-PONG, S.; YU, A. Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics. Chapter 18 - Targeted drug delivery systems and biotechnological products. **McGraw Hill**, 6° Edition, 2012b.

SILVA, D. A.; DE PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A.; BRITO, A. C. F.; MACIEL, J. S.; PAULA, H. C. B. Carboxymethylation of cashew tree exudate polysaccharide. **Carbohydrate Polymers**, v. 58, p. 163, 2004.

SILVA, L. C.; CASTELO, R. M.; MAGALHÃES, H. C. R.; FURTADO, R. F.; CHENG, H. N.; BISWAS, A.; ALVES, C. R. Characterization and controlled release of pequi oil microcapsules for yogurt application. **LWT - Food Science and Technology**, v. 157, p. 113105, 2022.

SILVA, F. E. F.; BATISTA, K. A.; DI-MEDEIROS, M. C. B.; SILVA, C. N. S.; MOREIRA, B. R.; FERNANDES, K. F. A stimuli-responsive and bioactive film based on blended polyvinyl alcohol and cashew gum polysaccharide. **Materials Science and Engineering C**, v. 58, p. 927, 2016.

SIRVIÖ, J. A. LIIMATAINEN, H.; VISANKO, M.; NIINIMÄKI, J. Optimization of dicarboxylic acid cellulose synthesis: reaction stoichiometry and role of hypochlorite scavengers. **Carbohydrate Polymers**, v. 114, p. 73, 2014.

SKOREPOVA, E.; CERNA, I.; VLASÁKOVÁ, R.; ZVONÍČEK, V.; TKADLECOVÁ, M.; DUSEK, M. Spirocyclic character of ixazomib citrate revealed by comprehensive XRD, NMR and DFT study. **Journal of Molecular Structure**, v. 1148, p. 22, 2017.

SONG, Y.; LI, D.; HE, J.; ZHANG, M.; NI, P. Facile preparation of pH-responsive PEGylated prodrugs for activated intracellular drug delivery. **Chinese Chemical Letters**, p. 2027, v. 30, 2019.

STONE, B.; SVENSSON, B.; COLLINS, M.; RASTALL, R. Polysaccharide Degradation. In: Fraser-Reid, B. O.; Tatsuta, K.; Thiem, J. (eds) *Glycoscience*. Springer, Berlin, Heidelberg. 2° ed., p. 2325, 2008.

SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R. L.; LAVERSANNE, M.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A.; BRAY, F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, p. 209, 2021.

TACAR, O.; SRIAMORNSAK, P.; DASS, C. R. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, p. 157, 2013.

TAGHIZADEH-HESARY, F.; HOUSHYARI, M.; FARHADI, M. Mitochondrial metabolism: a predictive biomarker of radiotherapy efficacy and toxicity. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 31, p. 1, 2023.

VALENBERG, F. J. P.; BRUMMELHUIS, I. S. G.; LINDNER, L. H.; KUHNLE, F.; WEDMANN, B.; SCHWEIZER, P.; HOSSANN, M.; ALFRED WITJES, J.; OOSTERWIJK, E. Dppg2-based thermosensitive liposomes with encapsulated doxorubicin combined with hyperthermia lead to higher doxorubicin concentrations in the bladder compared to conventional application in pigs: a rationale for the treatment of muscle-invasive bladder. **International Journal of Nanomedicine**, v. 16, p. 75, 2021.

VERMA, S.; RIMPY; AHUJA, M. Carboxymethyl modification of *Cassia obtusifolia* galactomannan and its evaluation as sustained release carrier. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 3823, 2020.

WANG, L.; SONG, Y.; PARIKH, A.; JOYCE, P.; CHUNG, R.; LIU, L.; AFINJUOMO, F.; HAYBALL, J. D.; PETROVSKY, N.; BARCLAY, T. G.; GARG, S. Doxorubicin-loaded delta inulin conjugates for controlled and targeted drug delivery: development, characterization, and *in vitro* evaluation. **Pharmaceutics**, v. 11, p. 581, 2019b.

WANG, S.; ZHU, T.; WANG, C.; WANG, L.; HE, B.; GAO, F. Identifying early stages of doxorubicin-induced cardiotoxicity in rat model by 7.0 tesla cardiovascular magnetic resonance combining hematological and pathological parameters. **Magnetic Resonance Imaging**, v. 90, p. 17, 2022b.

WANG, W.; LI, M.; ZHANG, Z.; CUI, C.; ZHOU, J.; YIN, L.; LV, H. Design, synthesis and evaluation of multi-functional tLyP-1-hyaluronic acid-paclitaxel conjugate endowed with broad anticancer scope. **Carbohydrate Polymers**, v. 156, p. 97, 2017.

WANG, Y.; YANG, M.; QIAN, J.; XU, W.; WANG, J.; HOU, G.; JI, L.; SUO, A. Sequentially self-assembled polysaccharide-based nanocomplexes for combined chemotherapy and photodynamic therapy of breast cancer. **Carbohydrate Polymers**, v. 203, p. 203–, 2019a.

WANG, Y.; BAI, F.; LUO, Q.; WU, M.; SONG, G.; ZHANG, H.; CAO, J.; WANG, Y. Lycium barbarum polysaccharides grafted with doxorubicin: an efficient pH-responsive anticancer drug delivery system. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 121, p. 964, 2019c.

WANG, Z.; SUN, C.; WU, H.; XIE, J.; ZHANG, T.; LI, Y.; XU, X.; WANG, P.; WANG, C. Cascade targeting codelivery of ingenol-3-angelate and doxorubicin for enhancing cancer chemoimmunotherapy through synergistic effects in prostate cancer. **Materials Today Bio**, 13, p. 100189, 2022a.

WU, S.; ZHANG, Z.; XU, R.; WEI, S.; XIONG, F.; CUI, W.; LI, B.; XUE, Y.; XUAN, H.; YUANRITING, H. A spray-filming, tissue-adhesive, and bioactive polysaccharide self-healing hydrogel for skin regeneration. **Materials & Design**, v. 217, p. 110669, 2022b.

WU, X.; ZHANG, N.; KAN, J.; TANG, S.; SUN, R.; WANG, Z.; CHEN, M.; LIU, J.; JIN, C. Polyphenols from arctium lappa L ameliorate doxorubicin-induced heart failure and improve gut microbiota composition in mice. **Journal of Food Biochemistry**, v. 46, p. 13731, 2022a.

XIE, Y.; QIAO, K.; YUE, L.; TANG, T.; ZHENG, Y.; ZHU, S.; YANG, H.; FANG, Z. A self-crosslinking, double-functional group modified bacterial cellulose gel used for antibacterial and healing of infected wound. **Bioactive Materials**, v. 17, p. 248, 2022.

XI, Y.; CHI, Z.; TAO, X.; ZHAI, X.; ZHAO, Z.; REN, J.; YANG, S.; DONG, D. Naringin against doxorubicin-induced hepatotoxicity in mice through reducing oxidative stress, inflammation, and apoptosis via the up-regulation of SIRT1. **Environmental Toxicology**, v. 38, p. 1153, 2023.

XIONG, H.; NI, J.; JIANG, Z.; TIAN, F.; ZHOU, J.; YAO, J. Intracellular self-disassemble polysaccharide nanoassembly for multi-factors tumor drug resistance modulation of doxorubicin. **Biomaterials Science**, v. 6, p. 2527, 2018.

XU, W.; DING, J.; XIAO, C.; LI, L.; ZHUANG, X.; CHEN, X. Versatile preparation of intracellular-acidity-sensitive oxime-linked polysaccharide-doxorubicin conjugate for malignancy therapeutic. **Biomaterials**, v. 54, p. 72, 2015.

XUE, H.; SUN, M.; ZHAO, X. Preparation and characterization of polysaccharide-based hydrogels for cutaneous wound healing. **Polymers**, v. 14, p. 1716, 2022.

YAN, T.; ZHU, S.; HUI, W.; HE, J.; LIU, Z.; CHENG, J. Chitosan based pH-responsive polymeric prodrug vector for enhanced tumor targeted co-delivery of doxorubicin and siRNA. **Carbohydrate Polymers**, v. 250, p. 116781, 2020.

YIN, T.; WANG, Y.; CHU, X.; FU, Y.; WANG, L.; ZHOU, J.; TANG, X.; LIU, J.; HUO, M. Free adriamycin-loaded pH/reduction dual-responsive hyaluronic acid-adriamycin prodrug micelles for efficient cancer therapy. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 10, p. 35693, 2018.

YU, Y.; SHEN, M.; SONG, Q.; XIE, J. Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 183, p. 91, 2018.

ZENG, L.; AN, L.; WU, X. Modeling drug-carrier interaction in the drug release from nanocarriers. **Journal of Drug Delivery**, v. 2011, p. 262, 2011.

ZENG, L.; GOWDA, B. H. J.; AHMED, M. G.; ABOUREHAB, M. A. S.; CHEN, Z. S.; ZHANG, C.; LI, J.; KESHARWANI, P. Advancements in nanoparticle-based treatment approaches for skin cancer therapy. **Molecular Cancer**, v. 22, p. 1, 2023.

ZHANG, X.; LI, D.; HUANG, J.; OU, K.; YAN, B.; SHI, F.; ZHANG, J.; ZHANG, J.; PANG, J.; KANG, Y.; WU, J. Screening of pH-responsive long-circulating polysaccharide-drug conjugate nanocarriers for antitumor applications. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 7, p. 251, 2019.

ZHANG, X.; LI, X.; YOU, Q.; ZHANG, X. Prodrug strategy for cancer cell-specific targeting: a recent overview. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 139, p. 542, 2017.

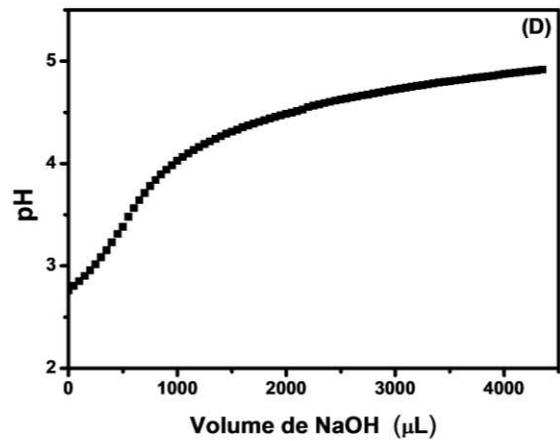
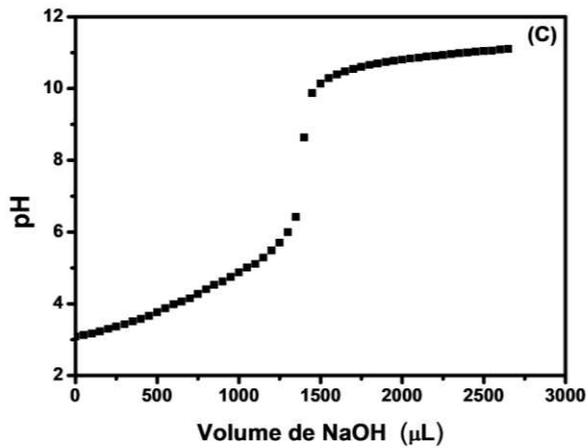
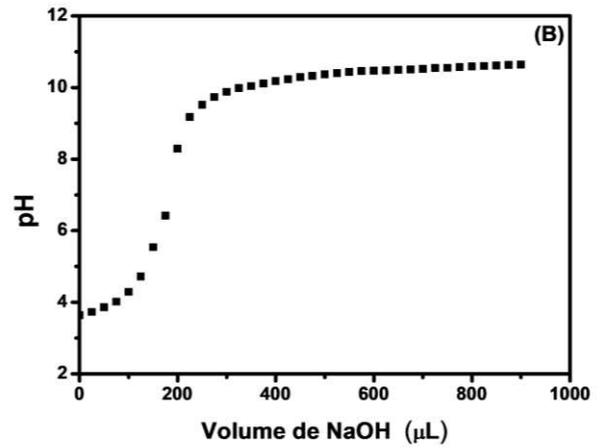
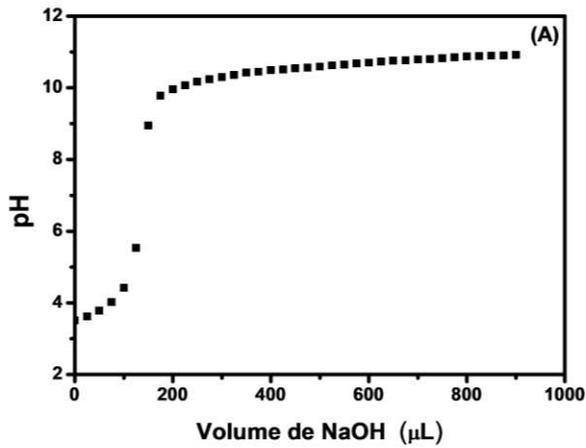
ZHANG, Y.; QIN, S.; CHAO, J.; LUO, Y.; SUN, Y.; DUAN, J. The in-vitro antitumor effects of AST-3424 monotherapy and combination therapy with oxaliplatin or 5-fluorouracil in primary liver cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 12, p. 885139, 2022.

ZHAO, H.; HEINDEL, N. D. Determination of degree of substitution of formyl groups in polyaldehyde dextran by the hydroxylamine hydrochloride method. **Pharmaceutical Research: An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 8, p. 400, 1991.

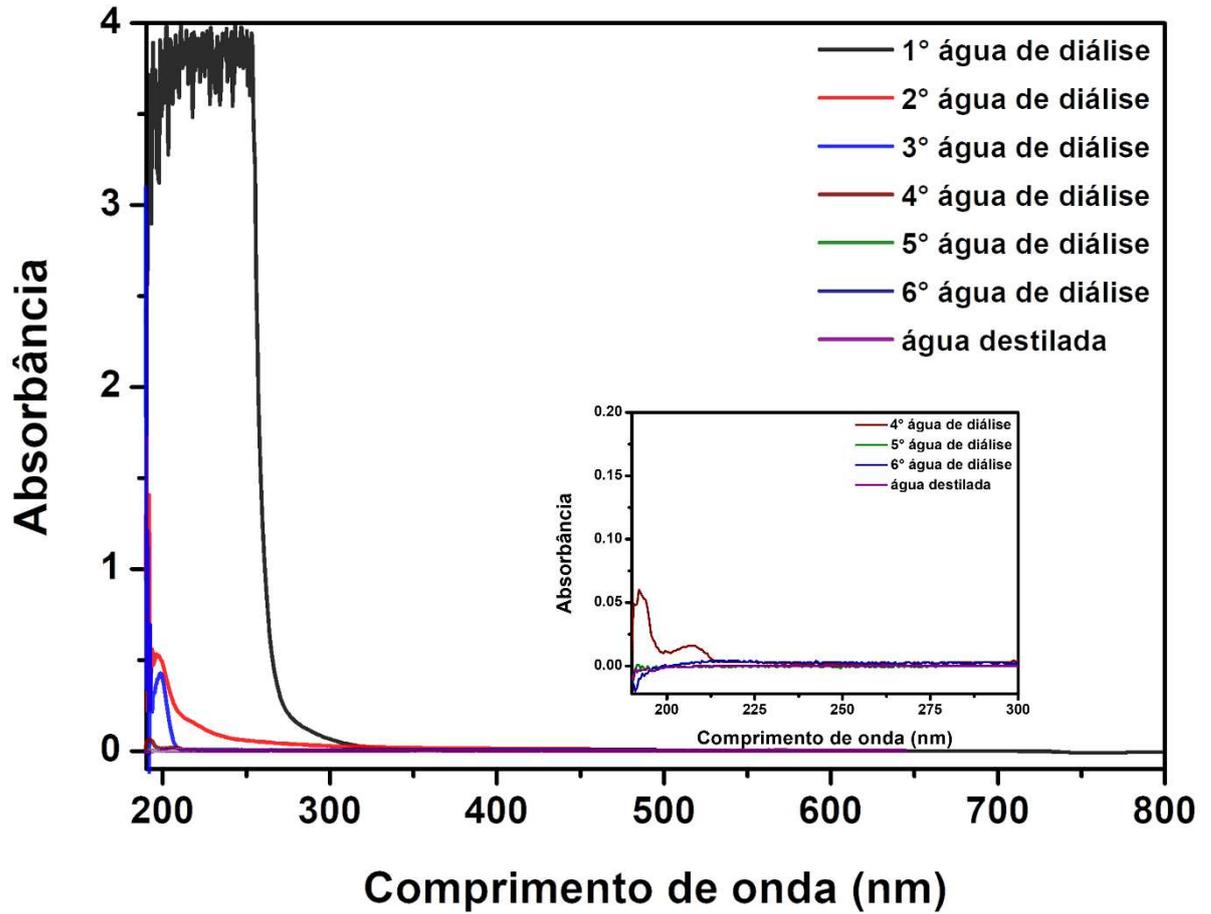
ZHAO, K.; LI, D.; XU, W.; DING, J.; JIANG, W.; LI, M.; WANG, C.; CHEN, X. Targeted hydroxyethyl starch prodrug for inhibiting the growth and metastasis of prostate cancer. **Biomaterials**, v. 116, p. 82, 2017.

ZHONG, Z.; CHENG, Z.; SU, D.; XU, T.; LI, X.; WU, F. Synthesis, antitumor activity and molecular mechanism of doxorubicin conjugated trimethyl-chitosan polymeric micelle loading Beclin1 siRNA for drug-resisted bladder cancer therapy. **RSC Advances**, v. 8, p. 35395, 2018.

APÊNDICE A – CURVAS DE TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA ÁCIDO-BASE DA GC (A), GCOX (B) E GCCM (C) COM HIDRÓXIDO DE SÓDIO E DA GCOX (D) PELO MÉTODO DO CLORIDRATO DE HIDROXILAMINA/HIDRÓXIDO DE SÓDIO

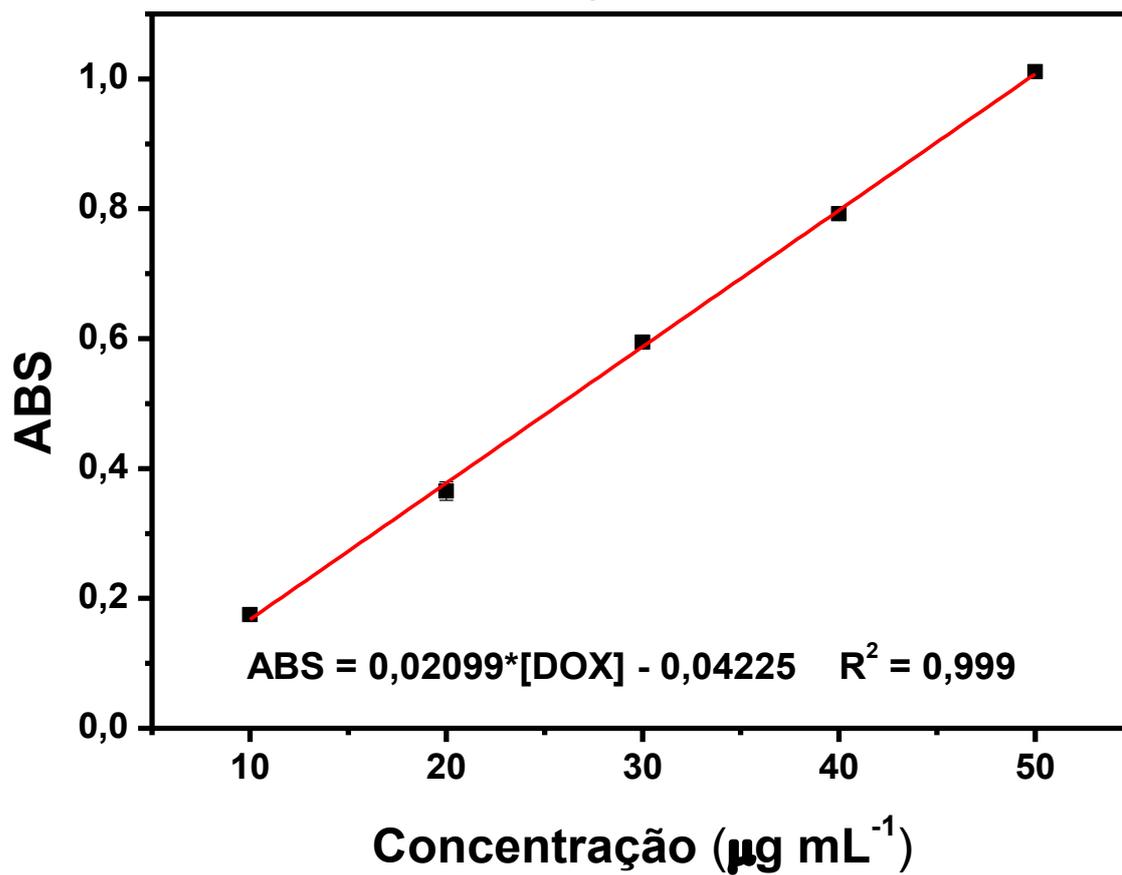


Fonte: dados da pesquisa.

APÊNDICE B – ACOMPANHAMENTO DA SAÍDA DE DMSO NA ÁGUA DE DIÁLISE POR ESPECTROSCOPIA UV-VIS

Fonte: dados da pesquisa.

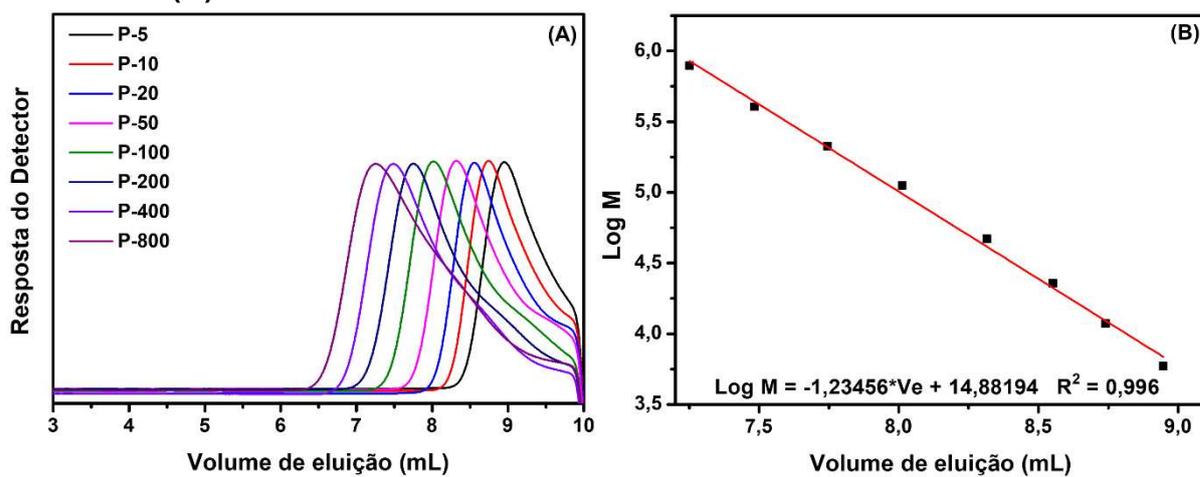
APÊNDICE C – CURVA DE CALIBRAÇÃO DA DOX EM DMSO NO UV-VIS



($\lambda = 480 \text{ nm}$)

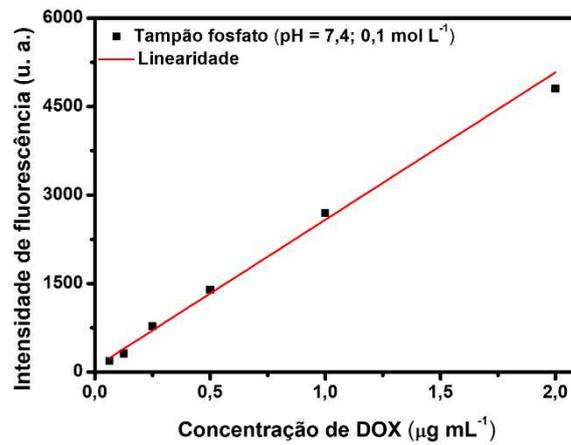
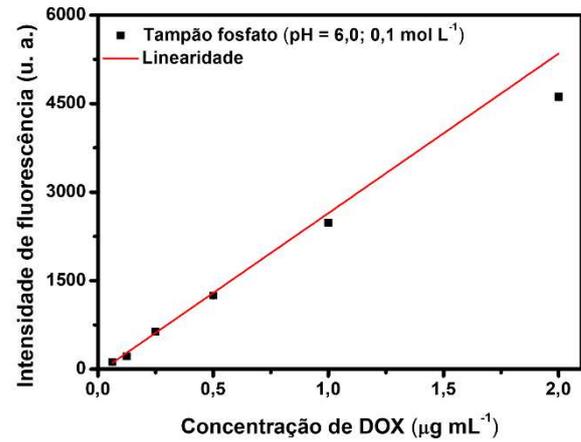
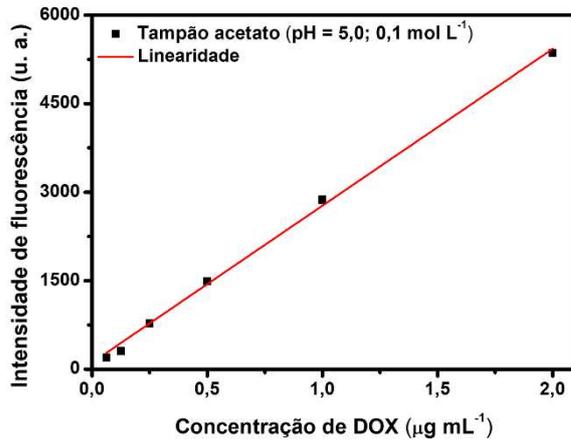
Fonte: dados da pesquisa.

APÊNDICE D – CROMATOGRAMAS DOS PADRÕES DE PULULANA (A) E A CURVA DE PULULANA POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO (B)



Fonte: dados da pesquisa.

APÊNDICE E – DADOS E CURVAS DE CALIBRAÇÃO DA DOX POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA



Linearidade

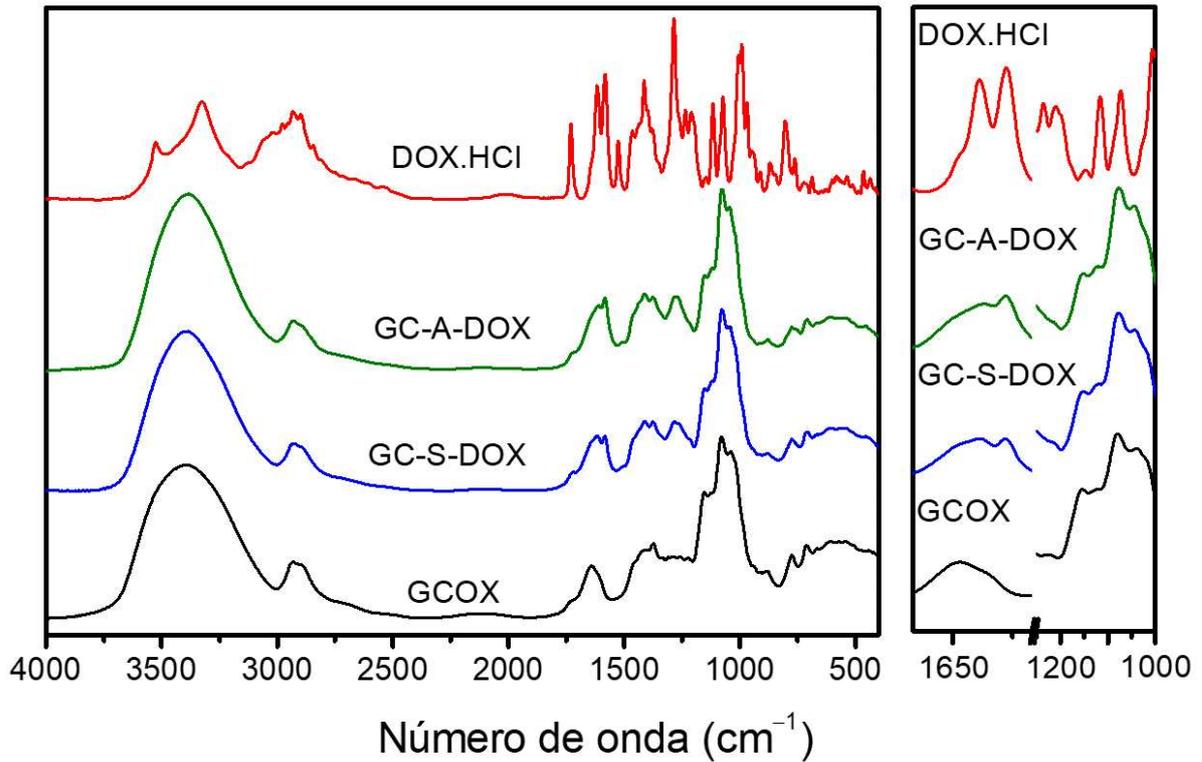
<i>pH</i>	<i>Coefficiente angular ± DP</i>	<i>Coefficiente linear ± DP</i>	<i>R²</i>
5,0	2659 ± 62	112 ± 44	0,997
6,0	2705 ± 214	62 ± 51	0,990
7,4	2500 ± 100	81 ± 60	0,992

Equação ($Y = aX + b$)

pH 5,0	I.F. = 2659*[DOX] + 112
pH 6,0	I.F. = 2705*[DOX] + 62
pH 7,4	I.F. = 2500*[DOX] + 60

Fonte: dados da pesquisa.

APÊNDICE F – EXPANSÃO DAS BANDAS SOBREPSTAS DOS ESPECTROS DE FTIR DA GCOX, DOX E PRÓ-FÁRMACOS GC-S-DOX E GC-A-DOX



Espectros obtidos em pastilhas de brometo de potássio (KBr) no espectrofotômetro Shimadzu IR-Trace 100 com 64 aquisições e resolução 4 para cada amostra. (C=N, 1690 - 1640 cm^{-1} ; C-N, 1230 - 1030 cm^{-1})
Fonte: dados da pesquisa.