



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

CLÁUDIO BRENER ARRUDA PAULA

NANOPARTÍCULAS TERMORRESPONSÍVEIS DE GALACTOMANANA DE
***Delonix regia* CARBOXIMETILADA COM POLI(N-ISOPROPILACRILAMIDA)**
PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACO ANTICÂNCER

FORTALEZA

2023

CLÁUDIO BRENER ARRUDA PAULA

NANOPARTÍCULAS TERMORRESPONSÍVEIS DE GALACTOMANANA DE *Delonix*
regia CARBOXIMETILADA COM POLI(*N*-ISOPROPILACRILAMIDA) PARA
LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACO ANTICÂNCER

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

Orientador: Prof^ª. Dra. Regina Célia Monteiro 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)

- P346n Paula, Cláudio Brener Arruda.
Nanopartículas termorresponsíveis de galactomanana de Delonix regia carboximetilada com poli(N-isopropilacrilamida) para liberação controlada de fármaco anticâncer / Cláudio Brener Arruda Paula. – 2023.
70 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2023.
Orientação: Prof. Regina Célia Monteiro de Paula.
1. Galactomanana. 2. Carboximetilação. 3. N-isopropilacrilamida. 4. Copolímero. 5. Nanopartícula. I. Título.

CDD 540

CLÁUDIO BRENER ARRUDA PAULA

NANOPARTÍCULAS TERMORRESPONSÍVEIS DE GALACTOMANANA DE *Delonix regia* CARBOXIMETILADA COM POLI(*N*-ISOPROPILACRILAMIDA) PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACO ANTICÂNCER

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

Aprovado em: __/__/____.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Luiz Gonzaga de França Lopes
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª. Dr^a. Durcilene Alves da Silva
Universidade Federal do Delta do Parnaíba (UFDPAr)

A minha mãe, Vanessa.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe e meu padrasto, Vanessa e Girão, por todo amor e suporte ou longos desses anos.

A minha tia Mirtes, por todo amor e cuidado e por estar sempre torcendo pelo meu sucesso.

A minha orientadora Regina Célia Monteiro de Paula, pela oportunidade, orientação e apoio em todos os momentos de iniciação científica e mestrado. Agradeço também as demais professoras do grupo de pesquisa grupo, Judith Feitosa, Pablyana da Cunha e Jeanny Maciel pelo suporte.

Ao meu namorado, Vitor Costa, por esses anos de companheirismo, alegrias, conversas e suporte. Você é uma pessoa incrível.

Aos meus colegas de laboratório: Adison, Aline, Felipe, Irrisvan, Matheus, Nadia, Raelle, Rhamon, Ribamar Roberto, Vanessa e Venícios por todas as conversas e momentos de descontração. Em especial a Raelle, Maria e Irisvan por todo suporte e por esclarecer minhas dúvidas em diversos momentos.

A todos meus amigos e colegas de graduação e pós-graduação, por todos os momentos de estudo, brincadeiras, descontração e conversas.

Ao CENAUREM pelas análises de Ressonância Magnética Nuclear.

Ao Laboratório de Microscopia Avançada da Central Analítica da Universidade Federal do Ceará pela Microscopia de força atômica realizada.

A Universidade Federal do Ceará (UFC) e ao Programa de Pós-graduação em Química.

Aos órgãos FUNCAP e CNPq pelo aporte financeiro.

RESUMO

O câncer é uma doença que acomete milhões de pessoas todos os anos, o tratamento mais comumente utilizado, a quimioterapia, faz uso de fármacos que apresentam toxicidade tanto para células cancerosas quanto para células saudáveis, causando uma série de efeitos colaterais nos pacientes em tratamento. O uso de nanopartículas poliméricas tem sido bastante estudado como sistemas de liberação controlada e específica desses fármacos em células cancerígenas, a fim de diminuir os efeitos colaterais. Neste trabalho investigamos o efeito da adição de grupos carboxilatos na galactomanana extraída de sementes de *Delonix regia* nas propriedades dos copolímeros deste derivado com a poli(*N*-isopropilacrilamida) (PNIPAM). A reação de copolimerização foi realizada por polimerização radicalar, utilizando persulfato de potássio como iniciador. Galactomanana carboximetiladas (GMCM), com diferentes graus de substituição, foram utilizadas na síntese dos copolímeros. O aumento do grau de substituição (GS) da GMCM proporcionou uma maior inserção de PNIPAM nas cadeias do derivado. Todos os copolímeros apresentam concentração de associação crítica (CAC) a 25 e 50 °C. A 50 °C observa-se que quanto maior o GS maior é a CAC, devido ao aumento da hidrofilicidade pela inserção das cargas. A temperatura de transição fase de todos os copolímeros foi de 35 °C, com a diminuição brusca do tamanho das partículas após esta temperatura de transição de fase. Uma redução de tamanho é observada para os copolímeros utilizando a GMCM se comparado ao copolímero da galactomanana sem carga (GM). Por apresentar tamanho de nanopartícula inferior a 300 nm, o copolímero com menor grau de substituição (CP-GMCM1h, GS = 0,35) foi escolhido para a adição do fármaco anticâncer doxorrubicina (DOX) via química de carbodiimidas. O aumento da DOX no sistema reacional não afetou a quantidade de carga ligada. A conjugação de DOX promoveu a diminuição do tamanho das nanopartículas e o sistema apresenta uma liberação controlada e maior em pH 5,0 que em 7,4. Como as células cancerígenas possuem maior acidez que as células não tumorais, uma liberação maior em pH 5,0 pode indicar uma melhor liberação de fármacos em células tumorais.

Palavras-chave: galactomanana; carboximetilação; *N*-isopropilacrilamida; copolímero; nanopartícula.

ABSTRACT

Cancer is a disease that affects millions of people every year, the most commonly used treatment, chemotherapy, uses drugs that are toxic for both cancer cells and healthy cells, causing a series of side effects in patients undergoing treatment. The use of polymeric nanoparticles has been extensively studied as controlled and specific delivery systems for these drugs in cancer cells, in order to reduce side effects. In this work we investigated the effect of adding carboxylate groups to galactomannan extracted from *Delonix regia* seeds on the properties of copolymers of this derivative with poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAM). The copolymerization reaction was carried out by radical polymerization, using potassium persulfate as an initiator. Carboxymethylated galactomannans (GMCM), with different degrees of substitution, were used in the synthesis of the copolymers. Increasing the degree of substitution (DS) of GMCM promoted greater insertion of PNIPAM into the derivative chains. All copolymers show Critical Association Concentration (CAC) at 25 and 50 °C. At 50 °C, it is observed that the greater the GS, the greater the CAC, due to the increase in hydrophilicity due to the insertion of charge. The phase transition temperature of all copolymers was 35 °C, with a sharp decrease in particle size after this phase transition temperature. A size reduction is observed for the copolymers using the GMCM compared to the uncharged galactomannan (GM) copolymer. Due to its nanoparticle size of less than 300 nm, the copolymer with the lowest degree of substitution (CP-GMCM1h, GS = 0.35) was chosen for the addition of the anticancer drug doxorubicin (DOX) via carbodiimide chemistry. The increase in DOX in the reaction system did not affect the amount of connected load. The conjugation of DOX promoted the decrease in the size of the nanoparticles and the system presents a controlled and greater release at pH 5.0 than at 7.4. As cancer cells have greater acidity than non-tumor cells, a greater release at pH 5.0 may indicate better drug release in tumor cells.

Keywords: galactomannan; carboxymethylation; *N*-isopropylacrylamide; copolymer; nanoparticle.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Esquema de formação do câncer	14
Figura 2 –	Gráficos com o índice de incidência e mortalidade mundial para os 10 tipos de cânceres mais recorrentes em cada categoria no ano de 2020	15
Figura 3 –	Diferentes estruturas para nanopartículas de copolímeros anfífilicos formadas por auto-organização	17
Figura 4 –	Estrutura geral de uma galactomanana	18
Figura 5 –	Árvore flamboyant de uso ornamental	20
Figura 6 –	(A) Semente de <i>Delonix regia</i> ; (B) Endosperma; (C) Galactomanana isolada	20
Figura 7 –	Reação de carboximetilação de uma galactomanana	22
Figura 8 –	Esquemas das reações para formação de copolímeros via grafting from (I) e grafting to (II)	23
Figura 9 –	Esquema da reação de polimerização via formação de radicais livres em um polissacarídeo	25
Figura 10 –	Estrutura molecular do PNIPAM (A) e do NIPAM (B)	26
Figura 11 –	Comportamento do PNIPAM abaixo (A) e acima (B) da LCST	27
Figura 12 –	Estrutura da Doxorubicina	28
Figura 13 –	Esquema reacional da química de carbodiimidas entre polissacarídeo funcionalizado com grupos carboxílicos e fármacos com grupos amina	30
Figura 14 –	Espectros de FT-IR da galactomanana e seus derivados carboximetilados	41
Figura 15 –	Espectros de RMN ^1H (500 MHz, D_2O , 70 °C) para GM e seus derivados carboximetilados	42
Figura 16 –	Cromatogramas da GM e seus derivados carboximetilados	43
Figura 17 –	Espectros de FT-IR dos copolímeros sintetizados, da GM, GMCM e PNIPAM	45
Figura 18 –	Espectros de RMN ^1H (500 MHz, D_2O , 25 °C) do homopolímero (PNIPAM) e dos copolímeros	46

Figura 19 –	Cromatogramas de GPC dos copolímeros sintetizados e seus respectivos materiais precursores	48
Figura 20 –	Proposta de mecanismo para degradação de cadeia de polissacarídeo para reações de copolimerização tendo KPS como iniciador	49
Figura 21 –	Variação da razão I_{338}/I_{334} do espectro de excitação do pireno em função da concentração das soluções dos copolímeros sintetizados a 25 e 50 °C	50
Figura 22 –	Relação do tamanho de nanopartículas com variação da temperatura de 25 a 50 °C para os copolímeros sintetizados a partir de GM e GMCM com PNIPAM	53
Figura 23 –	Espectros de FT-IR CP-GMCM1h, CP-GMCM1h-DOX (10:1) e CP-GMCM1h-DOX (10:2)	55
Figura 24 –	Imagem de AFM das nanopartículas de CP-GMCM1h (A) e ampliação (C); imagem da altura das nanopartículas de CP-GMCM1h (B) e ampliação (D)	57
Figura 25 –	Imagem de AFM das nanopartículas de CP-GMCM1h-DOX (10:1) (A) e ampliação (C); imagem da altura das nanopartículas de CP-GMCM1h-DOX (10:1) (B) e ampliação (D)	58
Figura 26 –	Perfis de liberação de DOX das nanopartículas de CP-GMCM1h-DOX (10:1) em PBS (0,1 mol L ⁻¹) + Lauril 0,1% (m/v) com pH 7,4 e 5,0 e o modelo de Zeng para cada perfil de liberação	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Razões M/G para galactomananas de <i>Delonix regia</i>	19
Tabela 2 –	Denominação dos copolímeros obtidos	34
Tabela 3–	Rendimento e grau de substituição dos derivados carboximetilados obtidos	40
Tabela 4 –	Volume de eluição e massa molar de pico da galactomanana e seus derivados carboximetilados	44
Tabela 5 –	Rendimento das reações de copolimerização para os copolímeros obtidos a partir da galactomanana e seus derivados carboximetilados após a purificação	44
Tabela 6 –	Razão de NIPAM na estrutura dos polissacarídeos para os copolímeros sintetizados	47
Tabela 7 –	Volume de eluição e massa molar de pico dos copolímeros e seus materiais precursores	48
Tabela 8 –	Valores de CAC para os copolímeros a 25 e 50 °C	50
Tabela 9 –	Tamanho e IPD de nanopartículas a 25 e 37 °C	54
Tabela 10 –	Eficiência de encapsulamento (EE%) e Carga de fármaco (CF%) de doxorubicina nas nanopartículas de CP-GMCM1h-DOX (10:1) e CP-GMCM1h-DOX (10:2)	56
Tabela 11 –	Tamanho, IPD e potencial zeta das nanopartículas carregadas com doxorubicina	56
Tabela 12 –	Tamanho das nanopartículas de CP-GMCM1h e CP-GMCM1h- DOX (10:1) determinadas por AFM	58
Tabela 13 –	Parâmetros do modelo de Zeng para os perfis de liberação de DOX das nanopartículas em PBS (0,1 mol L ⁻¹) + Lauril 0,1% (m/v) com pH 7,4 e 5,0	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-CBS-quitosana	4-carboxibenzenosulfonamida quitosana
AFM	Microscopia força atômica
AMC	Ácido monocloraacético
CAC	Concentração de associação crítica
CAN	Nitrato cérico amoniacal
CF	Carga de fármaco
CP-GM	Copolímero com galactomanana
CP-GMCM1h	Copolímero com galactomanana carboximetilada (reação de 1 hora)
CP-GMCM1h-	Copolímero com galactomanana carboximetilada (reação de 1 hora)
DOX (10:1)	com DOX proporção 10:1
CP-GMCM1h-	Copolímero com Galactomanana carboximetilada (reação de 1 hora)
DOX (10:2).	com DOX proporção 10:2
CP-GMCM2h	Copolímero com Galactomanana carboximetilada (reação de 2 hora)
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOX	Doxorrubicina
GS	Grau de substituição
DSS	3-trimetilsililpropanosulfonato de sódio
EDC	1-etil-3-(-3-dimetilaminopropil) carbodiimida
EE	Eficiência de encapsulamento
EPR	Efeito de permeabilidade e retenção aprimorada
FT-IR	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho
GM	Galactomanana
GMCM1h	Galactomanana carboximetilada (reação de 1 hora)
GMCM2h	Galactomanana carboximetilada (reação de 2 hora)
GPC	Cromatografia de permeação em gel
IPD	Índice de polidispersão
KPS	Persulfato de potássio
LCST	Temperatura crítica de solução inferior

M/G	Ração Manose/Galactose
MES	ácido 4-morfolinoetanosulfônico
M _{pk}	Massa molar de pico
NaOH	Hidroxido de sódio
NHS	<i>N</i> -hidroxissuccinamida
NIPAM	<i>N</i> -isopropilacrilamida
NP	Nanopartículas
PNIPAM	Poli(<i>N</i> -isopropilacrilamida)
PNIPAM-NH ₂	Poli(<i>N</i> -isopropilacrilamida) amino terminada
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RPM	Rotação por minuto
Sulfo-NHS	<i>N</i> -hidroxisulfossuccinamida
TEMED	Tetrametiletenodiamina
Ve	Volume de eluição

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Câncer	14
1.2	Tratamentos contra o câncer	15
1.2.1	<i>Tratamentos convencionais</i>	15
1.2.2	<i>Nanopartículas para liberação controlada de fármacos</i>	16
1.3	Galactomanana.....	18
1.4	Reação de Carboximetilação	21
1.5	Copolímeros por enxertia	22
1.5.1	<i>Polimerização via radicais livres (Grafting from)</i>	24
1.6	Poli(N-isopropilacrilamida)	26
1.7	Doxorrubicina.....	28
1.8	Química de carbodiimidas	29
2	OBJETIVOS.....	31
2.1	Geral.....	31
2.2	Específicos.....	31
3	MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1	Materiais.....	32
3.2	Extração e rendimento da galactomanana de <i>Delonix regia</i>	32
3.3	Reação de carboximetilação da galactomanana	33
3.4	Determinação do grau de substituição (GS)	33
3.5	Reação de copolimerização de GM e GMCM com Poli(N-isopropilacrilamida) via formação de radicais livres	34
3.6	Purificação dos copolímeros e rendimento reacional	35
3.7	Síntese do homopolímero Poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAM)	35
3.8	Reação via química de carbodiimida entre copolímero e fármaco	35
3.9	Caracterização dos materiais de partida e copolímeros obtidos	36
3.9.1	<i>Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)</i>	36
3.9.2	<i>Espectroscopia de adsorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR)</i>	36
3.9.3	<i>Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H)</i>	37
3.10	Caracterização das nanopartículas obtidas	37

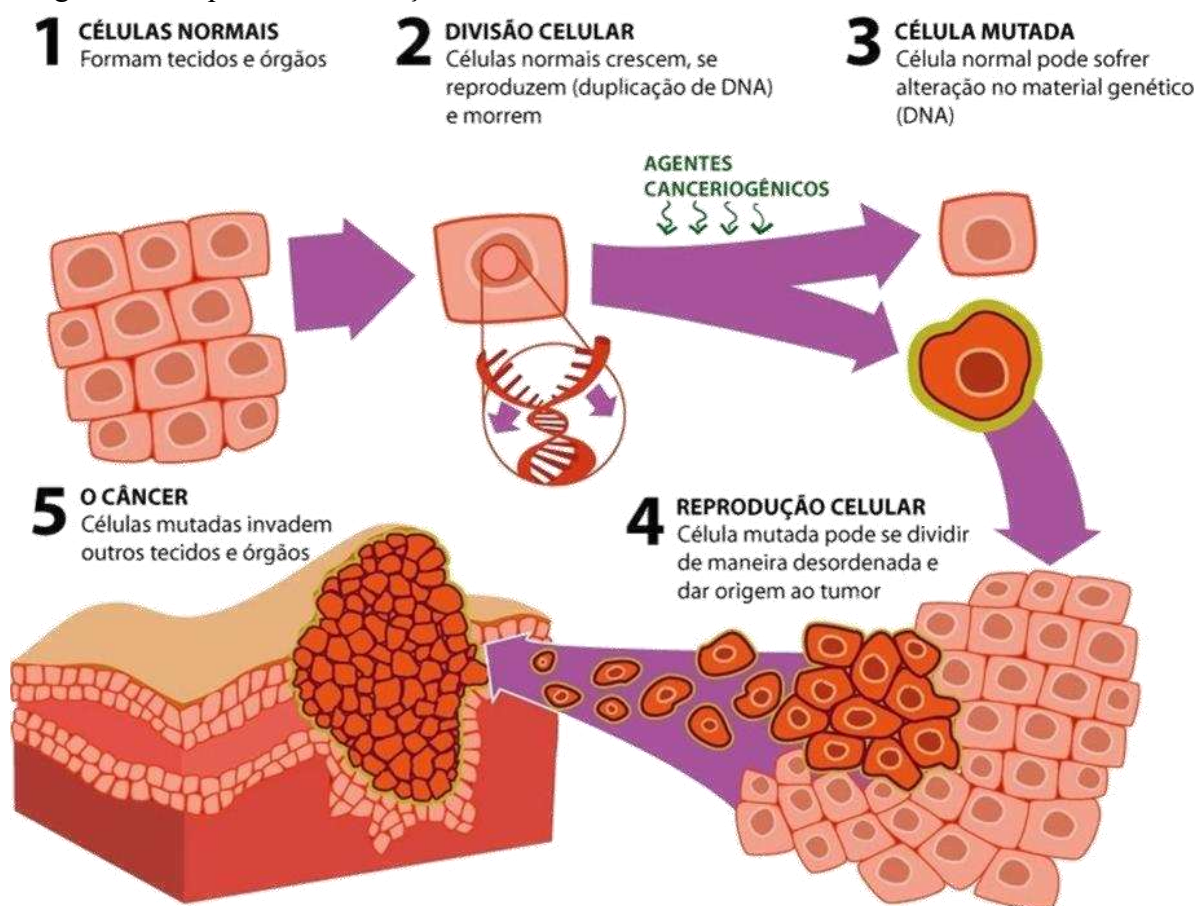
3.10.1	<i>Concentração de associação crítica (CAC)</i>	37
3.10.2	<i>Espalhamento de luz Dinâmico (DLS)</i>	37
3.10.3	<i>Eficiência de encapsulamento (EE%) e Carga de fármaco (CF%)</i>	38
3.10.4	<i>Microscopia de Força Atômica (AFM)</i>	38
3.10.5	<i>Liberção da doxorubicina in vitro</i>	39
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1	Caracterização da galactomanana e derivados carboximetilados	40
4.1.1	<i>Rendimento da extração da GM</i>	40
4.1.2	<i>Reação de carboximetilação e determinação do grau de substituição</i>	40
4.1.3	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FT-IR)</i>	40
4.1.4	<i>Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H)</i>	42
4.1.5	<i>Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)</i>	43
4.2	Caracterização dos copolímeros	44
4.2.1	<i>Rendimento da reação de copolimerização</i>	44
4.2.2	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FT-IR)</i>	45
4.2.3	<i>Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H)</i>	46
4.2.4	<i>Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)</i>	47
4.3	Caracterização das nanopartículas	49
4.3.1	<i>Concentração de associação crítica (CAC)</i>	49
4.3.2	<i>Espalhamento de luz dinâmico (DLS)</i>	51
4.4	Caracterização das nanopartículas carregadas com doxorubicina	54
4.4.1	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FT-IR)</i>	54
4.4.2	<i>Eficiência de encapsulamento (EE%) e Carga de fármaco (CF%)</i>	55
4.4.3	<i>Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)</i>	56
4.4.4	<i>Microscopia de Força Atômica (AFM)</i>	57
4.4.5	<i>Liberção in vitro de DOX das nanopartículas</i>	59
5	CONCLUSÃO	62
	REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O câncer é um termo que engloba uma gama de doenças (tumores e neoplasma) que pode afetar qualquer parte do corpo. A principal característica que define um câncer é a rápida capacidade de multiplicação de células não saudáveis, que podem crescer além de seus limites convencionais, podendo invadir regiões próximas e se espalhar por outros órgãos (Figura 1), causando interferências no bom funcionamento do organismo (World Health Organization [WHO], 2022).

Figura 1 – Esquema de formação do câncer

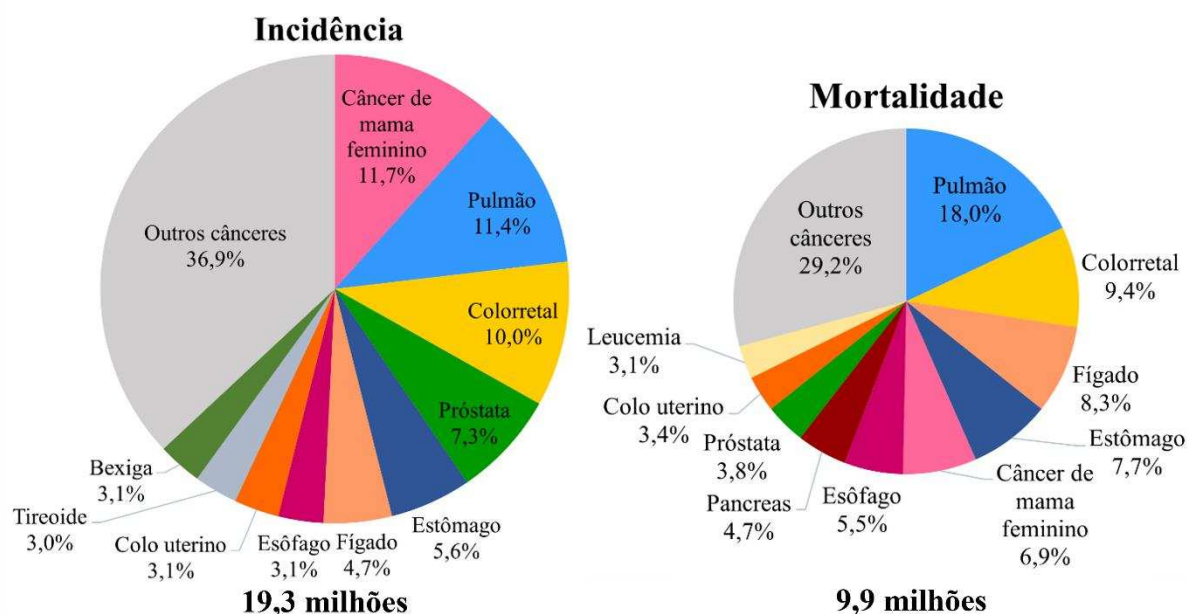


Fonte: Pinheiro, 2018.

É estimado que em 2020 o número global de novos casos de câncer foi de 19,3 milhões e o número de óbitos foi de 9,9 milhões (Sung *et al.*, 2021). A Figura 2 apresenta os índices de incidência e mortalidade dos 10 tipos de câncer que mais acometeram ambos os sexos no ano de 2020.

Figura 2 – Gráficos com o índice de incidência e mortalidade mundial para os 10 tipos de cânceres mais recorrentes em cada categoria no ano de 2020

Ambos os sexos



Fonte: Adaptado de Sung *et al.*, 2021.

O câncer é resultado das influências de fatores genéticos e de fatores exógenos ao indivíduo (ação de carcinogênicos físicos, químicos ou biológicos), além de existirem fatores de risco que podem agravar a ocorrência dessa doença, como o uso de tabaco e álcool, consumo de alimentos não saudáveis, sedentarismo, poluição, entre outros (World Health Organization [WHO], 2022). Estima-se que até 2040 os casos dessa doença aumentem em 47%, chegando a 28,4 milhões de novas ocorrências neste ano, isto levando-se em consideração apenas o crescimento populacional, esse número pode ser ainda maior devido ao aumento de fatores de risco em muitas partes do mundo (Sung *et al.*, 2021).

1.2 Tratamentos contra o câncer

1.2.1 Tratamentos convencionais

Quimioterapia, radioterapia, cirurgia ou uma combinação destes três procedimentos são os tratamentos comumente utilizados para o combate a diversos tipos de cânceres (De-Colle, 2022; George; Rockall, 2022; Salamekh *et al.*, 2022). Na quimioterapia são utilizados fármacos que apresentam toxicidade capaz de matar as células cancerosas ou impedir a sua multiplicação, contudo, essas drogas não agem apenas em células responsáveis por causar o câncer. Células

saudáveis, principalmente as que apresentam rápida proliferação, como células do folículo capilar, células da mucosa bucal e células da medula óssea, também acabam sofrendo os efeitos desses agentes quimioterápicos (Lundqvist; Fujiwara; Seoud, 2015). Esse ataque às células saudáveis pode desencadear uma série de efeitos colaterais aos pacientes, como lesões na boca, febre, fraqueza, diarreia, constipação, perda de apetite, vômito, dor, alopecia entre outros (Rico *et al.*, 2020).

Apesar de apresentar toxicidade ao organismo do paciente, a quimioterapia ainda é o tratamento mais utilizado no combate ao câncer (Bukowski; Kciuk; Kontek, 2020). Para evitar reações adversas além do necessário, a finalidade do tratamento deve estar bem elucidada antes do início da quimioterapia, pois para os casos em que a probabilidade de cura é alta, até mesmo efeitos colaterais significativos podem ser relevados. Contudo, quando a finalidade é prolongar a sobrevida, deve-se levar em consideração minuciosamente o equilíbrio entre os benefícios de tratamento e os efeitos adversos, visto que estes efeitos não devem ser piores que os sintomas da doença (Lundqvist; Fujiwara; Seoud, 2015).

Desse modo, tem-se desenvolvido novos tipos de tratamento, como a utilização de nanopartículas para a liberação controlada desses fármacos já utilizados na quimioterapia, que em estudos apresentaram uma diminuição dos efeitos colaterais pois esse tipo de material pode realizar uma liberação da droga em células alvo, evitando injúrias às células saudáveis (Ma *et al.*, 2022).

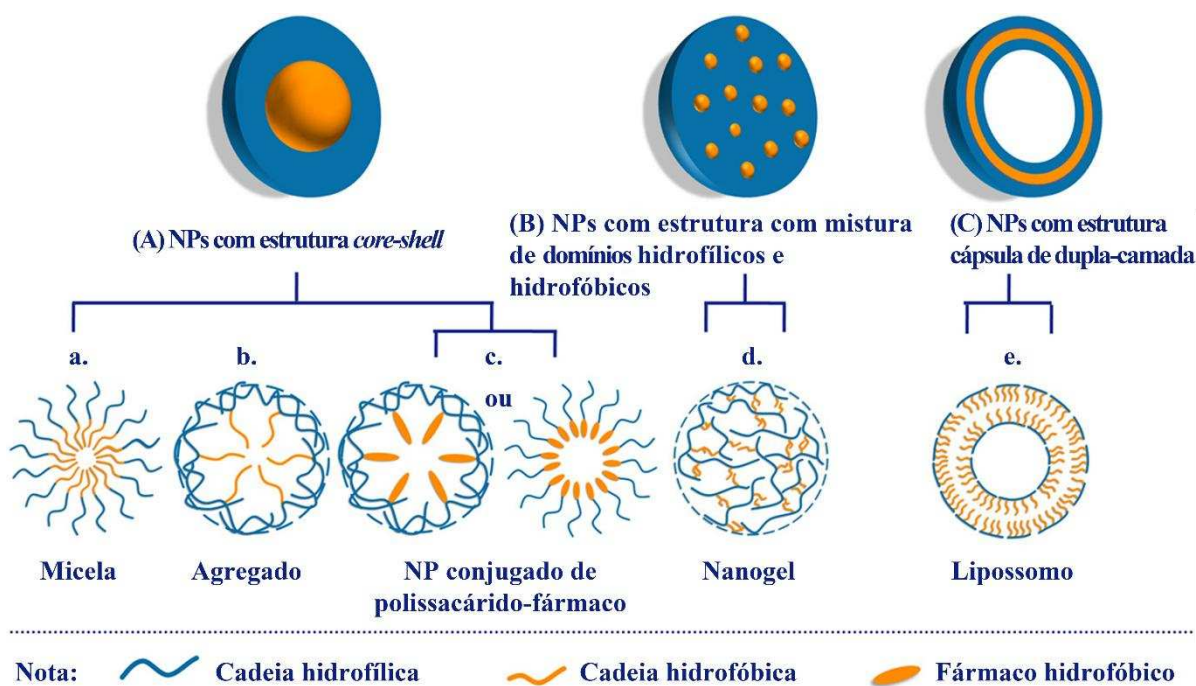
1.2.2 Nanopartículas para liberação controlada de fármacos

As nanopartículas (NPs) são estruturas que apresentam diâmetro entre 10 e 1000 nm. Nos últimos anos, esses materiais têm chamado atenção para aplicação como sistemas nanocarreadores de fármacos, uma vez que, apresentam propriedades únicas como a liberação controlada de fármacos, reversão a resistência de drogas em células tumorais e terem a capacidade de acumulação passiva em regiões tumorais, ocasionada pelo efeito de permeabilidade e retenção aprimorada (EPR) (Meng *et al.*, 2022; Reis *et al.*, 2006; Shinde *et al.*, 2022).

Para aplicações na quimioterapia, é preferido tamanhos de nanopartículas na faixa de 50-300 nm. Nessa faixa de tamanho as nanopartículas apresentam maior facilidade para atravessar as barreiras celulares, aumentando a absorção nas células e ação mais rápida (Khosa; Reddi; Saha, 2018).

Copolímeros anfifílico, possuem segmentos hidrofílicos e segmentos hidrofóbicos em sua cadeia, apresentando a capacidade de auto-organização em nanopartículas em meio aquoso. Destacam-se copolímeros anfifílicos à base de polissacarídeos (segmentos hidrofílicos) que podem ser copolimerizados com polímeros sintéticos hidrofóbicos e/ou conjugados com fármacos hidrofóbicos. Como observado na Figura 3, esses copolímeros anfifílicos podem se organizar em diferentes tipos de nanopartículas, estas podem ser classificadas em três categorias: (A) NPs com estrutura *core-shell*, (B) NPs com estrutura mistura de domínios hidrofílicos e hidrofóbicos e (C) NPs com estrutura cápsula de dupla-camada (Yang *et al.*, 2018).

Figura 3 – Diferentes estruturas para nanopartículas de copolímeros anfifílicos formadas por auto-organização



Fonte: Adaptado de Yang *et al.*, 2018.

As nanopartículas com estrutura *core-shell* podem ser formadas através de duas abordagens. A primeira consiste basicamente na dispersão do derivado de polissacarídeo anfifílico em água, às vezes necessitando de agitação mecânica, aquecimento brando ou sonicação, esse método é mais apropriado para materiais anfifílicos com alta solubilidade em água. A outra abordagem é o método da diálise, utilizado para materiais anfifílicos que apresentam baixa solubilidade em água. Esse procedimento consiste na dissolução do material em um solvente orgânico miscível em água (ex.: DMSO, DMF e metanol), seguida de diálise

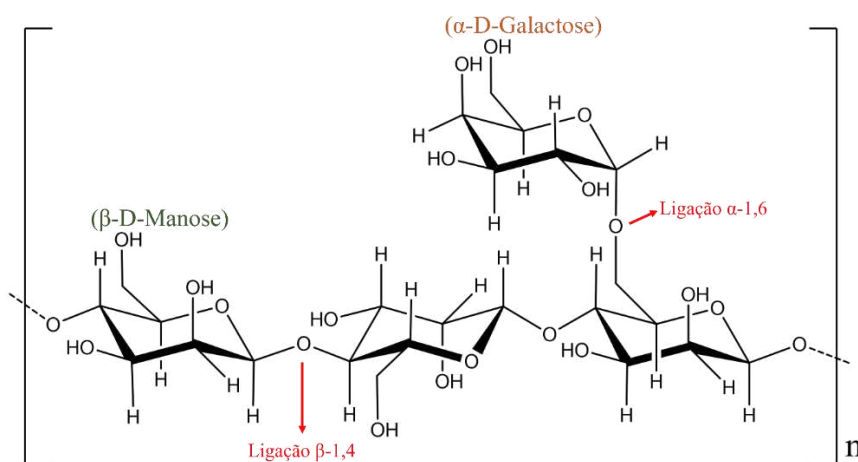
dessa solução contra água para remoção do solvente orgânico e formação das nanopartículas (Li *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2018).

As nanopartículas *core-shell* apresentam núcleo hidrofóbico que pode ser usado como “reservatório” para fármacos hidrofóbicos, isso faz com que a solubilidade e estabilidade desses fármacos sejam aumentados em solução aquosa e evite a degradação e eliminação prematuras. A utilização desses nanosistemas com fármacos encapsulados visam sua liberação controlada em sítios específicos, uma vez que podem responder a estímulos internos (pH, temperatura, potencial redox e enzimas) ou externos (luz com comprimento de onda específico ou campo magnético) (Yang *et al.*, 2018).

1.3 Galactomanana

As galactomananas são heteropolissacarídeos neutros constituídos por uma cadeia principal linear de resíduos de β -D-manose unidas por ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 4), na qual resíduos de α -D-galactose estão unidos por ligações do tipo α -(1 \rightarrow 6) (Figura 4) (Kapoor, 1972; Tamaki; Teruya; Tako, 2010).

Figura 4 – Estrutura geral de uma galactomanana



Fonte: Elaborado pelo autor.

Esses polissacarídeos são “materiais de reserva” encontrados abundantemente no endosperma de sementes de leguminosas. Esses polissacarídeos se acumulam nos períodos de crescimento e desenvolvimento, e após um período de latência são utilizados para fornecer monossacarídeos metabolizáveis para um novo ciclo de crescimento (Avigad; Dey, 1997). As galactomananas se diferenciam pela razão Manose/Galactose (M/G) que pode variar de 1:1 a 5:1. Essas variações ocorrerem para galactomananas de diferentes espécies de plantas, ou

devido a fatores ambientais quando comparando a razão M/G de uma mesma espécie, ou até mesmo ao método de isolamento (Avigad; Dey, 1997; Buckeridge; Dietrich; De Lima, 2000). A Tabela 1 apresenta algumas razões M/G para galactomananas de *Delonix regia* reportadas na literatura.

Tabela 1 – Razões M/G para galactomananas de *Delonix regia*

Trabalho	Razão M/G	País de origem	Referência
A	1,5	Índia	(Cheirmadurai; Thanikaivelan; Murali, 2016)
B	3,1	Brasil	(Lima <i>et al.</i> , 2021b)
C	3,5	México	(Rodriguez-Canto <i>et al.</i> , 2019)
D	4,0	Japão	(Tamaki; Teruya; Tako, 2010)
E	5,0	Nigéria	(Nwokocha; Williams; Yadav, 2018)

Fonte: Elaborado pelo autor.

As galactomananas são amplamente utilizadas na indústria de alimentos como espessantes, emulsificantes e estabilizantes, e nas indústrias de papel, têxtil, de explosivos e na prospecção de petróleo, as mais utilizadas industrialmente são as obtidas de *Cyamopsis tetragonolobus* (goma guar) e de *Ceratonia siliqua* (alfarroba) (Cunha; Paula; Feitosa, 2009; Thombare *et al.*, 2016). Trabalhos mais recentes reportam o uso desses materiais em aplicações biomédicas como na produção de hidrogéis injetáveis (Lima *et al.*, 2020), e na produção de nanopartículas (Ghosh *et al.*, 2018; Gomes *et al.*, 2020; Lima *et al.*, 2021b; Sarmah *et al.*, 2014).

A *Delonix regia*, comumente chamada de flamboyant (devido as suas flores vermelhas) (Figura 5), pertence à família das leguminosas e é nativa de Madagascar, contudo atualmente é encontrada em regiões tropicais e subtropicais, em países como Brasil, Índia, México, Nigéria, Egito, África do Sul, entre outros. Ela é utilizada como árvore de ornamentação de jardins, parques e estradas devido a beleza de suas flores, como árvore agroflorestal para fornecimento de sombra para determinadas plantações e como cerca viva (Kapoor, 1972; Nwokocha; Williams; Yadav, 2018).

Figura 5 – Árvore flamboyant de uso ornamental



Fonte: G1, 2012

Na época de frutificação esta planta produz uma grande quantidade de vagens e sementes, que atualmente ainda não são muito utilizadas (Bake; Yusuf; Sadiku, 2016). Desse modo, a *Delonix regia* apresenta-se como uma boa fonte de galactomanana que pode ser utilizada na biomedicina (Yadav; Maiti, 2020). A Figura 6 apresenta a semente de *Delonix regia*, o endosperma separado e a galactomanana isolada.

Figura 6 – (A) Semente de *Delonix regia*; (B) Endosperma; (C) Galactomanana isolada



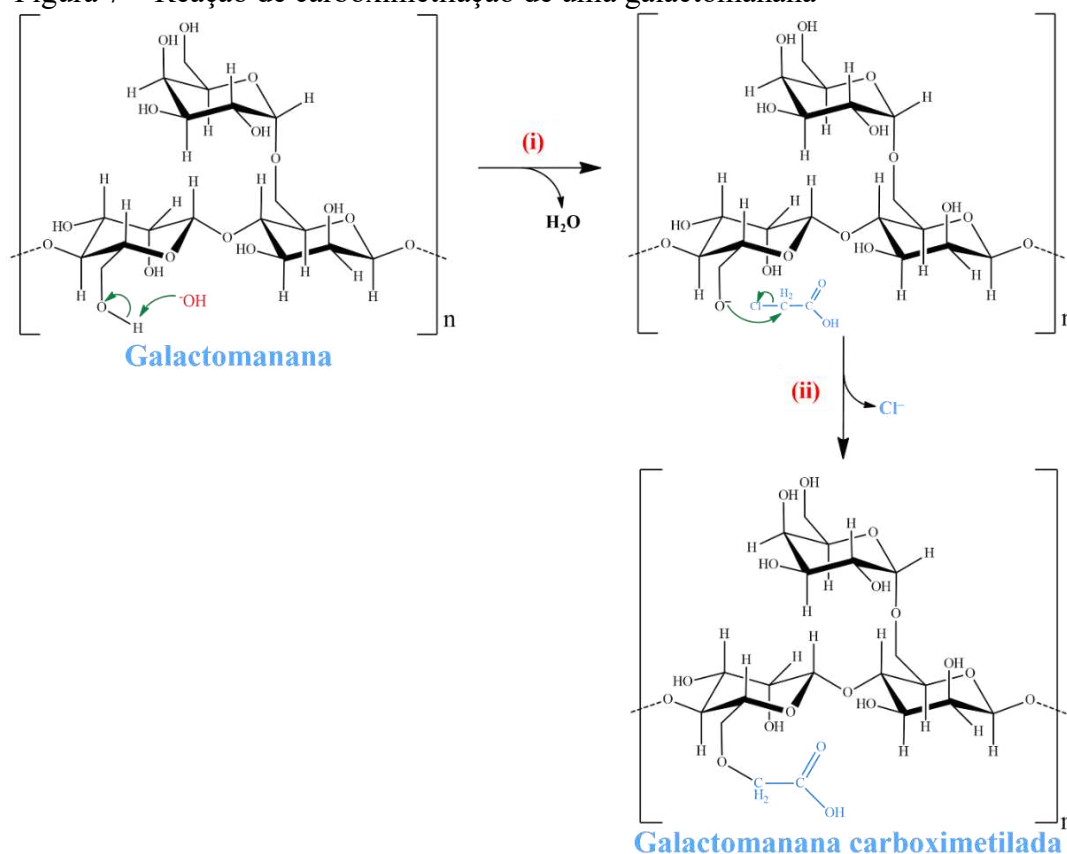
Fonte: Elaborado pelo autor.

1.4 Reação de Carboximetilação

Gomas naturais são biodegradáveis, baratas e facilmente encontradas na natureza, desse modo, nas duas últimas décadas esses polissacarídeos têm sido amplamente estudados para uso na medicina com perspectivas de aplicação em sistemas de liberação controlada de fármacos e em engenharia de tecidos (Dong *et al.*, 2022; Gong *et al.*, 2022; Prajapati *et al.*, 2013). Contudo, as gomas naturais podem apresentar algumas características que limitam suas aplicações nesses usos, como, viscosidade, taxa de hidratação não controlada, suscetibilidade de degradação enzimática e contaminação microbiana (Badwaik *et al.*, 2022). A fim de contornar esses empecilhos, pode-se realizar modificações estruturais nesses polissacarídeos para obtenção de características físico-químicas desejáveis, além de introduzir grupos funcionais que permitem a ligação de fármacos ao material (Carneiro *et al.*, 2021; Kirschning; Dibbert; Dräger, 2018).

A reação de carboximetilação é realizada pela reação do ácido monocloroacético e os álcoois primários e secundários presentes na estrutura do polissacarídeo, que podem ser esterificados com grupos carboximetil (Figura 7). Essa é a modificação química mais utilizada em polissacarídeos para aumentar solubilidade e atividade (Chakka; Zhou, 2020). As principais vantagens desse método de modificação são o baixo custo com reagentes químicos, a facilidade do processo e a não toxicidade do produto (Verraest *et al.*, 1995).

Figura 7 – Reação de carboximetilação de uma galactomanana



Fonte: Adaptado de Badwaik *et al.*, 2022.

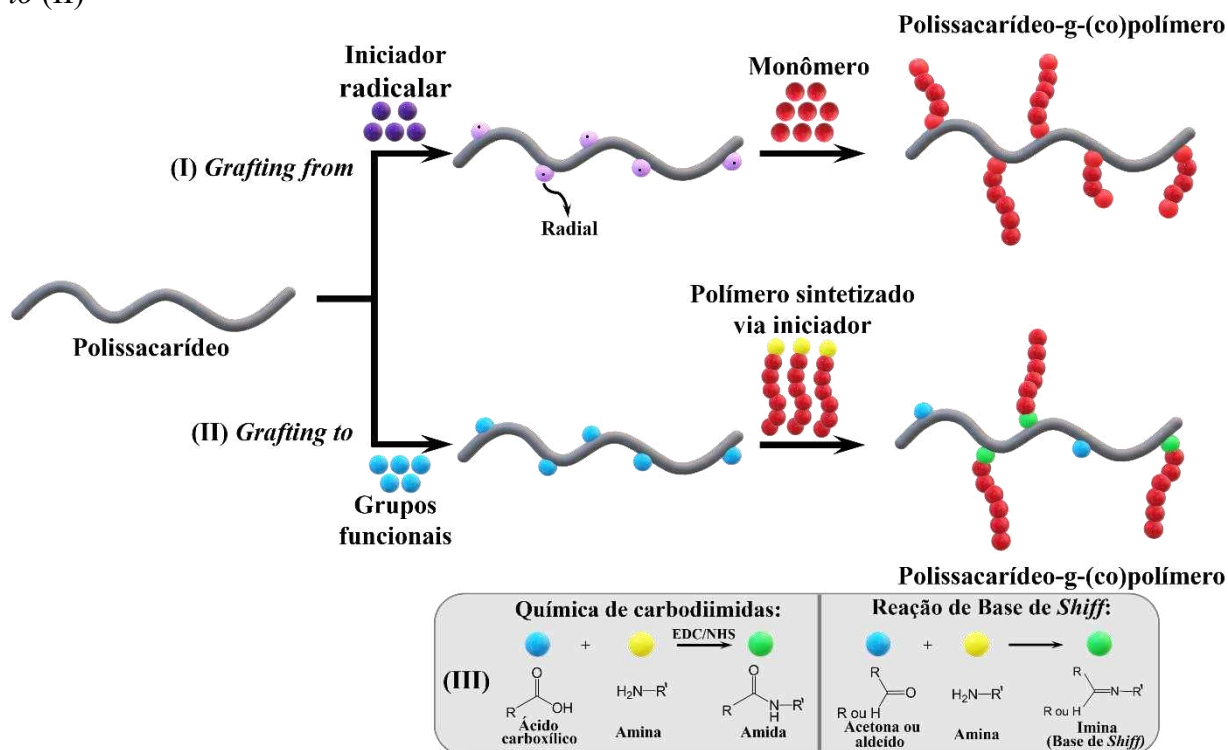
O grau de substituição (GS) é o número médio de grupos carboximetil introduzidos, por unidade monossacarídica, ao substrato, que determina parcialmente as propriedades da goma derivada. A inserção do novo grupo funcional ocorre de forma desigual ao longo da cadeia do polissacarídeo, dependendo de sua estrutura morfológica. O rendimento e GS podem ser melhorados controlando-se condições reacionais como concentração dos reagentes, tempo e temperatura. Para análise do GS vários métodos são reportados na literatura, entre eles análise potenciométrica, condutimetria, espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformata de Fourier (FT-IR) e ressonância magnética nuclear (RMN) (Badwaik *et al.*, 2022; Chakka; Zhou, 2020; Liu *et al.*, 2017b).

1.5 Copolímeros por enxertia

Copolímeros por enxertia à base de polissacarídeos têm se mostrados bastante promissores para aplicação como sistemas carreadores para liberação controlada de fármacos, isso acontece por apresentarem biocompatibilidade e serem biodegradáveis (Meng *et al.*, 2022). A estrutura desses materiais consiste em uma cadeia principal composta por um polissacarídeo,

que pode ser modificado ou não, da qual se ramificam cadeias do polímero sintético inserido por meio de uma reação. Os principais métodos para obtenção de copolímeros são *grafting from* e *grafting to*, a Figura 8 apresenta os esquemas reacionais para essas duas estratégias (De Paula *et al.*, 2015; Garcia-Valdez; Champagne; Cunningham, 2018; Kumar *et al.*, 2021).

Figura 8 – Esquemas das reações para formação de copolímeros via *grafting from* (I) e *grafting to* (II)



Fonte: Adaptado de Garcia-Valdez; Champagne; Cunningham, 2018.

Na abordagem *grafting from* (Figura 8(I)), também conhecida como polimerização iniciada na superfície, a cadeia principal do polissacarídeo deve ser funcionalizada com um iniciador, que promove a polimerização do monômero desejado, criando cadeias poliméricas a partir da superfície de substrato. Esse processo é geralmente utilizado quando se deseja densidades de enxertia mais elevadas. Já na abordagem *grafting to* (Figura 8(II)), o polímero sintético é produzido previamente, e o substrato deve apresentar grupos funcionais capazes de reagir com o grupo funcional terminal presente no polímero pré-formado, a partir de uma reação há o acoplamento entre substrato e polímero sintético (Garcia-Valdez; Champagne; Cunningham, 2018; Kedzior *et al.*, 2019). A Figura 8(III) apresenta duas reações utilizadas para produção de copolímeros pela abordagem *grafting to*, a química de carbodiimida que faz a ligação entre polímeros que apresentam ácidos carboxílicos e aminas primárias em suas estruturas, e a reação de base de *Schiff* que faz a ligação entre um polímero que apresenta

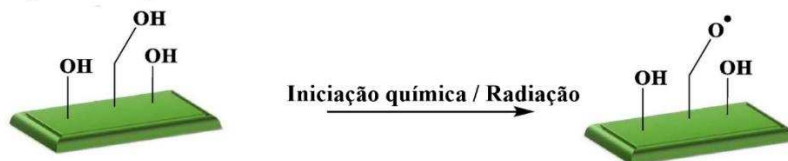
aldeídos ou cetonas em sua estrutura e outro que apresenta aminas primárias (Carneiro *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2017a).

1.5.1 Polimerização via radicais livres (*Grafting from*)

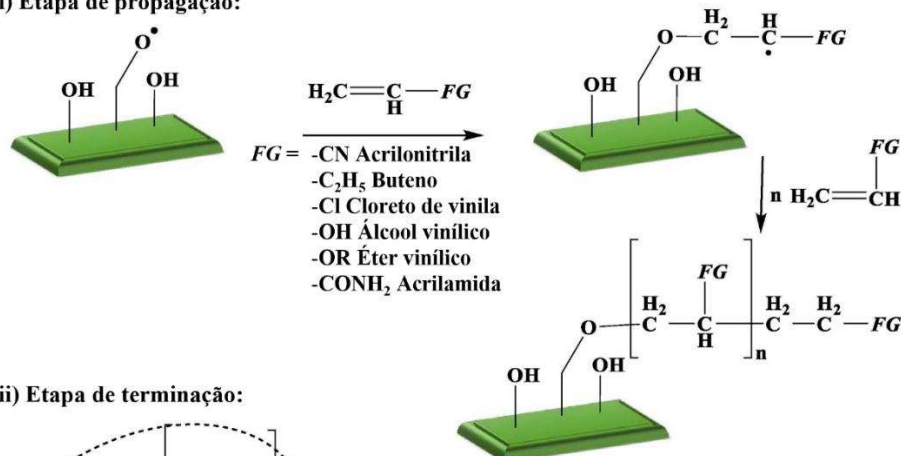
A polimerização radicalar é um processo de reação em cadeia, que envolve três etapas: iniciação, propagação e terminação. A Figura 9 apresenta o mecanismo de polimerização de monômeros vinílicos em celulose (polissacarídeo). A iniciação consiste na formação de radicais na estrutura do polissacarídeo que atacam o monômero, esse processo pode começar através do uso de iniciadores químicos ou radiação. Na etapa de propagação um número n de monômeros se liga a um radical de propagação, nesse processo há o crescimento do polímero sintético adjacente. A terminação corresponde ao processo no qual as cadeias laterais param de crescer, ocorre quando os radicais em propagação sofrem combinação, desproporção ou são inibidos pelo uso de substâncias capazes de reagir com os radicais livres formando radicais pouco reativos (Kumar *et al.*, 2021; Odian, 2004).

Figura 9 – Esquema da reação de polimerização via formação de radicais livres em um polissacarídeo

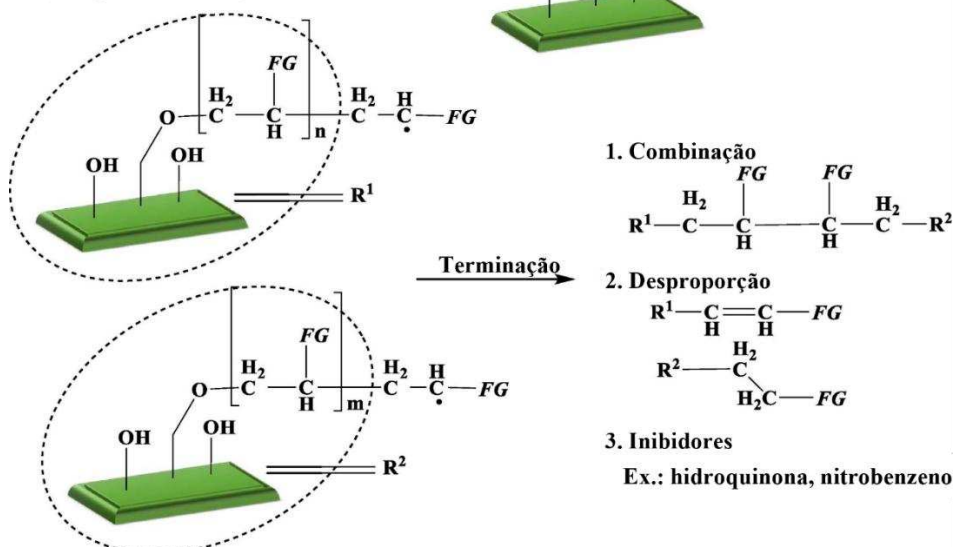
i) Etapa de iniciação:



ii) Etapa de propagação:



iii) Etapa de terminação:



Fonte: Adaptado de Kumar *et al.*, 2021.

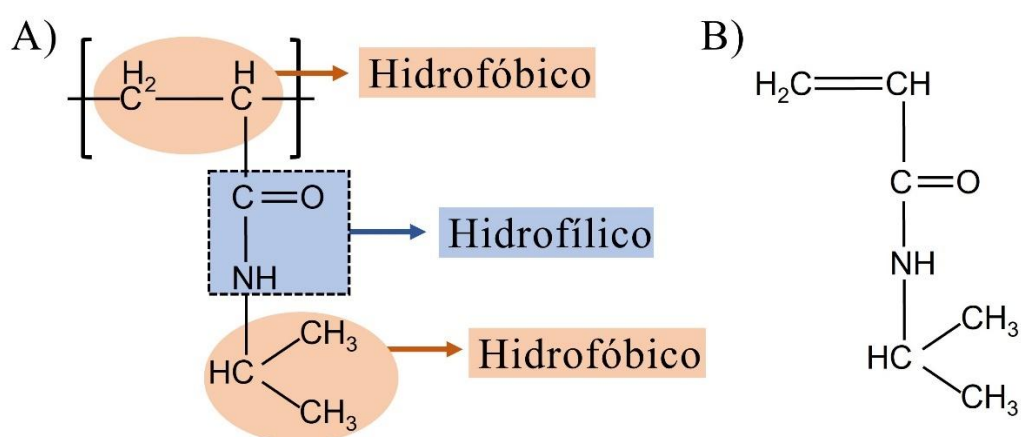
O persulfato de potássio (KPS) é um iniciador químico amplamente utilizado na síntese de copolímeros a base de polissacarídeos (Kekez *et al.*, 2016; Kumar; Sharma; Singh, 2019; Yang *et al.*, 2013a). Dentre suas vantagens destaca-se a sua solubilidade em água, baixo custo e ser o melhor iniciador radicalar para abstração de hidrogênio (Tosh; Routray, 2014).

Como o iniciador é radicalar, o KPS (K₂S₂O₈) é primeiro convertido à SO₄^{•-}, esta espécie abstrai um próton da cadeia do polissacarídeo formando um sítio radical capaz de reter o monômero, a polimerização prossegue no caminho da copolimerização (Kumar *et al.*, 2021).

1.6 Poli(*N*-isopropilacrilamida)

O Poli(*N*-isopropilacrilamida) (PNIPAM) (Figura 10(A)) é um polímero sintético termorresponsivo, obtido a partir da polimerização do monômero vinílico *N*-isopropilacrilamida (NIPAM) (Figura 10(B)). Esse polímero tem sido amplamente estudado por apresentar grande potencial para criação de nanossistemas termorresponsíveis para a liberação controlada de fármacos, visto que, tem alta biocompatibilidade, e apresenta comportamento termorresponsivo próximo a temperatura do corpo humano (Carneiro *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2017a; Zhao *et al.*, 2018).

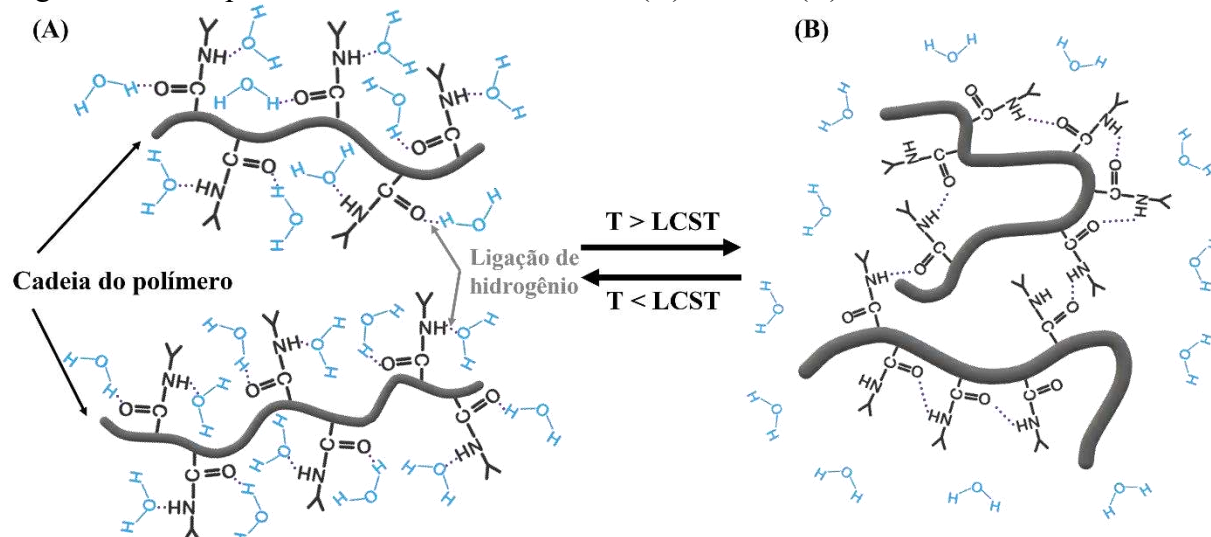
Figura 10 – Estrutura molecular do PNIPAM (A) e do NIPAM (B)



Fonte: Adaptado de Narang; Venkatesu, 2019.

O PNIPAM apresenta comportamento de transição de fase denominado Temperatura crítica de solução inferior (LCST - *Low Critical Solution Temperature*), próximo de 32°C. Ou seja, abaixo dessa temperatura o polímero encontra-se com as cadeias hidratadas (Figura 11(A)), quando a temperatura está acima da LCST do material as cadeias poliméricas desidratam e colapsam (Figura 11(B)) (Narang; Venkatesu, 2019; Schild, 1992).

Figura 11 – Comportamento do PNIPAM abaixo (A) e acima (B) da LCST



Fonte: Adaptado de Lanzalaco; Armelin, 2017.

Esse comportamento é observado, pois, as moléculas de PNIPAM apresentam porções hidrofílicas (grupos amidas) e porções hidrofóbicas (cadeia de hidrocarboneto e grupos isopropil). Abaixo da LCST a estabilidade do PNIPAM em solução aquosa é mantida pelas ligações de hidrogênio entre os grupos amidas e as moléculas de água. Nesse estado, as cadeias do polímero estão expandidas e hidratadas e o PNIPAM tem caráter hidrofílico. Com o aumento da temperatura, as ligações de hidrogênio entre o PNIPAM e a água vão se enfraquecendo e as atrações entre os grupos isopropil do polímero vão aumentando. Acima da LCST, essas ligações de hidrogênio são completamente quebradas e são formadas ligações de hidrogênio intramoleculares que leva ao colapso da estrutura. Nesse estado as cadeias do polímero encontram-se contraídas e o PNIPAM tem caráter hidrofóbico (Narang; Venkatesu, 2019; Zhao *et al.*, 2018).

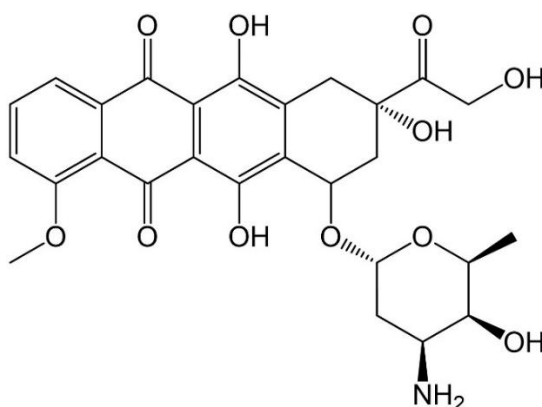
O PNIPAM tem sido enxertado em vários polissacarídeos para a produção de copolímeros termorresponsivos: celulose (Kumar *et al.*, 2019), dextrana (Yeshchenko *et al.*, 2022), 4-CBS-quitosana (Zhao *et al.*, 2018), Alginato (Liu *et al.*, 2017b), goma do cajueiro (Abreu *et al.*, 2016). Gomes *et al.* (2020) produziu copolímeros termorresponsivos de galactomanana de *Dimorphandia gardneriana* não modificada (razão M/G de 1,23) e hidrolisada com PNIPAM utilizando nitrato cérico amoniacal (CAN) como iniciador, para investigar a influência da massa molar da galactomanana no tamanho das nanopartículas. Observou-se que a galactomanana com menor massa molar produziu nanopartículas menores. Lima *et al.* (2021a) produziu copolímeros termorresponsivos de galactomanana de *Delonix regia* (razão M/G de 3,1:1) com PNIPAM utilizando reação de base de *Schiff* entre os aldeídos da GM oxidada e aminas do PNIPAM-NH₂ pré-formado, investigou-se o tamanho das

nanopartículas em função do tamanho da massa molar do PNIPAM-NH₂, observou-se que o copolímero produzido com o PNIPAM de maior cadeia, apresentou tamanho de nanopartículas menor.

1.7 Doxorubicina

A doxorubicina (DOX) (Figura 12) é um fármaco quimioterápico amplamente utilizado no tratamento de vários tipos de cânceres, como, câncer de ovário, de pulmão, de osso, de mama, de tireoide, leucemia e linfoma. A DOX apresenta a capacidade de interferir com a replicação e transcrição do DNA. Ao se intercalar com o DNA, esse fármaco impede o desenrolamento do DNA e suprime a topoisomerase II, levando a morte celular. (Almajidi *et al.*, 2023; Arshad *et al.*, 2023; Sritharan; Sivalingam, 2021).

Figura 12 – Estrutura da Doxorubicina



Fonte: Elaborado pelo autor.

Apesar de ser eficiente no tratamento de diversos tipos de cânceres, a DOX tem seu uso em aplicações terapêuticas limitado, pois, o uso prologado desse fármaco pode gerar toxicidade a tecidos saudáveis e órgãos causando danos ao coração, rins, fígado, cérebro e suprimindo células tronco. Contudo, o maior problema com o uso da DOX está relacionado com sua capacidade de promover a resistência a multidroga no organismo, pois, desse modo, a suscetibilidade das células cancerosas a DOX cai substancialmente (Almajidi *et al.*, 2023; Li *et al.*, 2018).

Visando diminuir os efeitos colaterais, pesquisas têm buscado o desenvolvimento de novos nanossistemas para transporte de DOX para células alvo. Nanopartículas poliméricas apresentam a capacidade de melhorar a permeabilidade, penetração e acumulação da DOX em

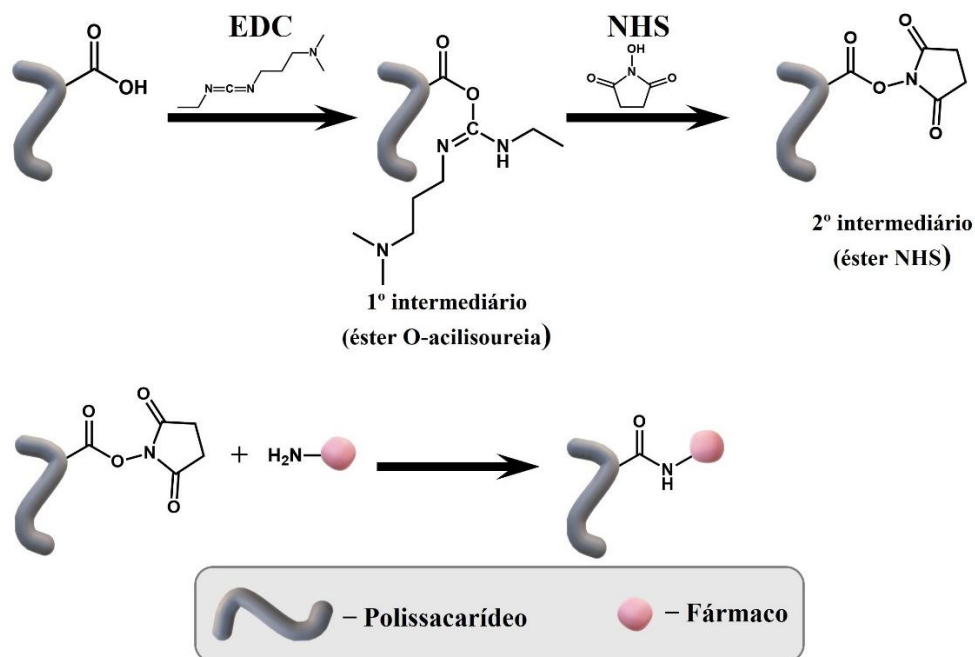
células cancerosas (Exner; Ivanova, 2022; Lee *et al.*, 2023; Miao *et al.*, 2021; Sur *et al.*, 2019).

A DOX por apresentar uma amina primária em sua estrutura pode ser conjugada a polímeros que apresentam grupos aldeído ou cetona via reação de base de *Schiff* (formada ligação imina), e a polímeros que apresentam ácido carboxílico via química de carbodiimidas (formada ligação amida). A principal vantagem dessas reações de conjugação entre carreador e fármaco é a propriedade pH-responsiva das ligações formadas. Estudos reportam maior liberação de DOX em pH próximo de 5,0 e menor liberação em pH 7,4 (Carneiro *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2019). Como células cancerosas são mais ácidas que células saudáveis, sistemas que apresentam a DOX conjugada por ligação imina ou amida podem ser utilizados para liberação desse fármaco preferencialmente em células doentes.

1.8 Química de carbodiimidas

Polissacarídeos que apresentam grupos carboxílicos (-COOH) em sua estrutura podem ser ligados covalentemente com fármacos que apresentam aminas primárias (R-NH₂), por meio da química de carbodiimidas. Nessa reação, o grupo carboxila é previamente ativado na presença de um agente de acoplamento, como o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC). O EDC é uma carbodiimida solúvel em água usada para acoplar grupos carboxila ou fosfato a aminas primárias. Embora a *N*-hidroxissuccinamida (NHS) ou a *N*-hidroxisulfossuccinamida (sulfo-NHS) não sejam necessários para a reticulação de carbodiimidas como reação de etapa única, elas geralmente são adicionadas a reação para aumentar a eficiência de acoplamento mediada por EDC. Normalmente, o EDC reage com os grupos carboxílicos formando um intermediário instável reativo à amina (éster O-acilisourea). Se não reagir com amina em solução aquosa, o éster O-acilisourea irá hidrolisar e regenerar o grupo carboxila. Então para estabilizar este intermediário, NHS ou sulfo-NHS convertem este éster reativo em um éster ativo mais estável. Os ésteres formados com NHS ou sulfo-NHS são reativos para grupos amina (nucleófilo) presente na estrutura de um fármaco, liberando o grupo NHS ou sulfo-NHS e formando uma ligação amida estável (Marques *et al.*, 2020). O esquema reacional para a química de carbodiimidas está apresentado na Figura 13.

Figura 13 – Esquema reacional da química de carbodiimidas entre polissacarídeo funcionalizado com grupos carboxílicos e fármacos com grupos amina



Fonte: Adaptado de Marques *et al.* (2020).

Essa reação precisa ocorrer em meio tamponado, com pH entre 5 e 8, preferivelmente. Em pH levemente ácido o nitrogênio na molécula do EDC estará protonado, tornando essa molécula mais suscetível ao ataque nucleofílico dos grupos carboxilatos. Em contrapartida, o NHS é efetivo em meio neutro ou levemente alcalino, visto que, em meio ácido, amins primárias podem ser protonadas e não reagir por ataque nucleofílico. O tampão utilizado na reação não pode conter amins primárias ou grupos carboxílicos, pois, eles podem interferir na reação do EDC. Desse modo, o tampão mais favorável para utilizar nessa reação é o MES (ácido 4-morfolinoetanosulfônico) com pH entre 5 e 6, enquanto tampões fosfato e acetato podem promover uma diminuição da reatividade da carbodiimida (Alavarse *et al.*, 2022; Marques *et al.*, 2020).

Neste trabalho, pretende-se produzir copolímeros termorresponsivos de galactomanana carboximetilada com PNIPAM, e por meio da química de carbodiimidas conjugar o fármaco doxorrubicina na estrutura do copolímero, para a formação de nanopartículas carregadas com DOX, com potencial para tratamento oncológico.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o efeito da presença dos grupos carboximetilados no polissacarídeo sobre síntese e propriedades de sistemas nanoparticulados de galactomanana carboximetilada com PNIPAM, para incorporação de doxorubicina e liberação controlada deste fármaco.

2.2 Específicos

- Sintetizar e caracterizar derivados carboximetilados de galactomanana de *Delonix regia* com diferentes graus de substituição;
- Sintetizar copolímeros de galactomanana e galactomanana carboximetilada com PNIPAM via copolimerização radicalar utilizando KPS como iniciador;
- Avaliar o efeito da carga (grau de substituição) da galactomanana nas propriedades dos copolímeros: grau de enxertia de PNIPAM, concentração de associação crítica (CAC), temperatura de transição de fase (LCST), tamanho de nanopartículas, índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta;
- Produzir e caracterizar copolímeros conjugados com doxorubicina, e avaliar os efeitos da DOX nas propriedades das nanopartículas: tamanho de nanopartículas, índice de polidispersão e potencial zeta;
- Avaliar a morfologia das nanopartículas com e sem DOX por microscopia de força atômica (AFM);
- Avaliar o efeito do pH na cinética de liberação *in vitro* da DOX das nanopartículas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

As sementes de *Delonix regia* foram coletadas em Senador Pompeu-CE em 2020.

A *N*-isopropilacrilamida (NIPAM) 97%, o persulfato de potássio (KPS), o *N,N,N',N'*-tetrametileno-diamino (TEMED), o metanol, o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), o *N*-hidroxissuccinamida (NHS), cloridrato de 2-aminoetanotiol (AET·HCl) o ácido 4-morfolinoetanosulfônico (Tampão MES), o ácido acético, o acetato de sódio, e o cloridrato de doxorubicina (DOX) foram adquiridos da Merck. A acetona, o ácido monocloroacético e o dimetilsulfóxido (DMSO) foram adquiridos da Synth. O lauril sulfato de sódio foi adquirido da Dinâmica.

A membrana de diálise com limite de exclusão de massa molar de 14.000 g mol⁻¹ foi adquirida da Sigma-Adrich, e a membrana de diálise com limite de exclusão de massa molar de 1.000 g mol⁻¹ foi adquirida da Spectra/Por.

3.2 Extração e rendimento da galactomanana de *Delonix regia*

O processo de extração da galactomanana seguiu o procedimento descrito por Lima *et al.* (2020). Pesou-se 100,0 g de sementes de *Delonix regia* que foram lavadas e acomodadas em placa de petri coberta com algodão embebido com água destilada. A placa de petri foi levada à autoclave por uma hora e trinta minutos para intumescimento das sementes. As sementes intumescidas foram descascadas manualmente e separou-se os endospermas, estes foram mantidos em água destilada por 12 h. Para o processo de trituração dos endospermas em liquidificador, foi-se adicionado 1,5 L de água destilada e triturou-se por 20 min esse material. A solução resultante foi centrifugada a 6000 rpm por 30 min, recolheu-se o sobrenadante que foi precipitado em etanol 2:1 v/v (etanol:solução de galactomanana). O precipitado foi filtrado em funil de placa sinterizada nº 3, lavado três vezes com etanol PA e duas vezes com acetona. Transferiu-se essa galactomanana lavada para um almofariz, esse material foi seco e macerado sob jato de ar quente. Essa galactomanana foi denominada de GM.

O rendimento da extração foi determinado utilizando-se a Equação 1.

$$\text{Rendimento}(\%) = \frac{m_{GM}}{m_{Semente}} \times 100\% \quad (1)$$

onde: m_{GM} é a massa de galactomanana obtida após o processo de extração (g) e $m_{Semente}$ é a massa de semente utilizada (g).

3.3 Reação de carboximetilação da galactomanana

A metodologia utilizada para a reação de carboximetilação da galactomanana foi baseada na metodologia descrita por Gupta *et al.* (2004). Colocou-se em um balão de fundo redondo 2,0 g (0,01 mol) de galactomanana, 2,0 g (0,02 mol) de ácido monocloroacético (AMC), 4 mL (0,04 mol) de NaOH (10 mol L⁻¹) e 16 mL de metanol. A reação procedeu-se sob agitação magnética a 60 °C e sob refluxo, utilizou-se dois tempos reacionais (1 h e 2 h). Ao final do tempo de cada reação, transferiu-se o material obtido para um funil de placa sinterizada nº 3, onde foi lavado com uma solução de metanol/água (80 % v/v) e posteriormente com acetona. Solubilizou-se o polissacarídeo modificado em água destilada e neutralizou-se essa solução com HCl (1 mol L⁻¹). Essa solução foi dialisada contra água destilada para a remoção de sais e subprodutos. Acompanhou-se a condutividade da água para determinar o fim da diálise. Os derivados carboximetilados foram secos por liofilização e denominados de GMCM1h e GMCM2h.

O rendimento da reação de carboximetilação foi determinado utilizando-se a Equação 2.

$$\text{Rendimento}(\%) = \frac{m_{GMCM}}{m_{GM} + m_{AMC}} \times 100\% \quad (2)$$

onde m_{GMCM} é a massa de galactomanana carboximetilada (g), m_{GM} é a massa de galactomanana utilizada (g) e m_{AMC} é a massa de ácido monocloroacético utilizado (g).

3.4 Determinação do grau de substituição (GS)

Para determinar o grau de substituição, 100 mg dos derivados carboximetilados foram solubilizados em 25 mL de água destilada. As soluções foram percoladas em coluna com resina Amberlite IRA-120 H⁺ para a protonação do ácido carboxílico. As soluções com os materiais protonados foram liofilizadas, e toda a massa dos materiais secos foi redispersa em

25 mL de água destilada. Determinou-se a quantidade de grupos ácidos nos derivados carboximetilados através de titulação potenciométrica com NaOH 0,1 mol L⁻¹ padronizado.

A Equação 3 foi utilizada para calcular o GS.

$$GS = \frac{n^{\circ} \text{ de mols de grupos ácidos}}{n^{\circ} \text{ de mol de unidade monossacarídica}} \quad (3)$$

Utilizou-se o método de aproximação sucessiva para levar em consideração a adição do grupo carboximetil na estrutura do polissacarídeo.

3.5 Reação de copolimerização de GM e GMCM com Poli(*N*-isopropilacrilamida) via formação de radicais livres

A metodologia utilizada para a reação de copolimerização baseou-se na descrita por Shi e Zhang (2007). Dissolveu-se o 100 mg polissacarídeo (GM ou GMCM) em 20 mL de água destilada, que ficou sob agitação magnética por 24 h. Antes de iniciar a reação, borbulhou-se nitrogênio na solução por 30 min. Adicionou-se ao sistema reacional o iniciador KPS (dissolvido em 1 mL de água) com razão molar 7:1 (polissacarídeo:KPS), após 10 min adicionou-se o TEMED (dissolvido em 1 mL de água) com razão molar 1:1 (KPS:TEMED), após 10 min adicionou-se o NIPAM com razão molar 1:1 (polissacarídeo:NIPAM). A reação de copolimerização procedeu-se por 4 h a, aproximadamente, 28 °C e sob atmosfera de nitrogênio. Ao final do tempo de reação, a solução resultante foi dialisada contra água destilada, para remoção de materiais que não reagiram. Acompanhou-se a condutividade da água para determinar o fim da diálise. Essas soluções foram secas por liofilização e os copolímeros (CP) obtidos foram denominados como listado na Tabela 2.

Tabela 2 – Denominação dos copolímeros obtidos

Polissacarídeo	Copolímero
GM	CP-GM
GMCM1h	CP-GMCM1h
GMCM2h	CP-GMCM2h

Fonte: Dados da pesquisa.

3.6 Purificação dos copolímeros e rendimento reacional

Para remover o homopolímero que tenha se formado durante a reação, dispersou-se os copolímeros em acetona sob agitação magnética por 48 h, nesse processo ocorre a dissolução dos homopolímeros, enquanto o copolímero permanece precipitado. Centrifugou-se essa solução a 6000 rpm por 40 min. Após a centrifugação adicionou-se 30 mL para dispersar o precipitado e realizou-se outra centrifugação, esse processo foi repetido duas vezes. Por fim recolheu-se o precipitado, que foi redissolvido em água destilada e, posteriormente, liofilizado.

Determinou-se o rendimento da reação de copolimerização após a purificação através da Equação 4.

$$RE(\%) = \frac{m_{CPp}}{m_{GM} + m_{NIPAM}} \times 100\% \quad (4)$$

onde m_{CPp} é a massa do copolímero purificado(mg); m_{GM} é a massa de galactomanana utilizada (mg); e m_{NIPAM} é a massa do monômero utilizada (mg).

3.7 Síntese do homopolímero Poli(*N*-isopropilacrilamida) (PNIPAM)

O homopolímero PNIPAM foi sintetizado para auxiliar caracterização dos copolímeros por FTIR e RMN, este material foi sintetizado em meio aquoso via reação radicalar, utilizando KPS como iniciador e AET·HCl como agente de transferência de cadeia, de acordo com o procedimento descrito por Gupta, Ghute e Badiger (2011), com modificações. Foram dissolvidas 5,66 g de NIPAM em água destilada e nessa solução foi borbulhado gás nitrogênio (N_2) por 30 min, após esse período adicionou-se o KPS (0,148g) e o AET·HCl (0,057 g), ambos com relação molar 1:1 com o NIPAM, a reação foi realizada por 6 h sob atmosfera de N_2 . A solução resultante foi dialisada e o posteriormente o liofilizado.

3.8 Reação via química de carbodiimida entre copolímero e fármaco

A reação de conjugação entre copolímero e doxorrubicina foi realizada entre os grupos carboxílicos presentes na estrutura do copolímero e as aminas primárias presentes no fármaco, utilizando EDC e NHS como intermediários. Em um balão de fundo redondo dissolveu-se 10 mg do CP-GMCM1h em 8 mL de tampão MES (pH = 6,00; $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) sob agitação magnética, dissolveu-se o EDC e NHS em 1 mL do mesmo tampão MES,

separadamente, e adicionou-se ao balão. Utilizou-se a razão molar $\text{COO}^-:\text{EDC}:\text{NHS}$ de 1:1:1. Após 30 min, adicionou-se a reação um volume de uma solução 10 mg mL^{-1} de doxorubicina em tampão MES ($\text{pH} = 6,00$; $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), utilizou-se as razões mássicas CP:DOX de 10:1 e 10:2, essa reação procedeu-se por 24h sob agitação e protegida da luz. Ao final do tempo de reação a solução resultante foi dialisada contra água destilada, acompanhou-se a condutividade da água para determinar o fim da diálise. Essas soluções foram secas por liofilização e os materiais foram denominados CP-GMCM1h-DOX (10:1) e CP-GMCM1h-DOX (10:2).

3.9 Caracterização dos materiais de partida e copolímeros obtidos

3.9.1 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

Determinou-se a distribuição de massa molar da galactomanana e de seus derivados carboximetilados por cromatografia de permeação em gel em equipamento Shimadzu LC-20AD acoplado a um detector de índice de refração (RID-10A). Para a análise dos materiais foi utilizada coluna PolySep Linear (300 mm x 7,8 mm) com pré-coluna PolySep Linear (35 mm x 7,8 mm). O eluente utilizado foi $\text{NaNO}_3(\text{aq})$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, a 30°C , fluxo de 1 mL min^{-1} e volume de injeção de $50 \mu\text{L}$ de amostra ($1,0 \text{ mg mL}^{-1}$). Para calibração foram utilizados padrões de pululana P-82 (Shodex).

A massa molar de pico (M_{pk}) foi determinada utilizando-se a Equação 5.

$$\text{Log}(M_{pk}) = 14,4084 - 1,1571V_e \quad (R^2) = 0,98 \quad (5)$$

onde M_{pk} é a massa molar de pico (g mol^{-1}) e V_e é o volume de eluição (mL).

3.9.2 Espectroscopia de adsorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Obteve-se os espectros da galactomanana, seus derivados carboximetilados, do homopolímero PNIPAM, dos copolímeros e do copolímero carregado com doxorubicina em equipamento IR Tracer 100 da Shimadzu, utilizando pastilhas de KBr, com varredura de número de onda de 4000 a 400 cm^{-1} .

3.9.3 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H)

Os espectros de Ressonância magnética nuclear foram obtidos usando espectrômetro Brucker Avance DRX500. A análise da galactomanana e seus derivados carboximetilados foi realizada em D_2O a $70\text{ }^\circ\text{C}$, e dos copolímeros em D_2O a $25\text{ }^\circ\text{C}$. O 3-trimetilsililpropanosulfonato de sódio (DSS) foi usado como um padrão interno para referência de deslocamento químico (0 ppm).

3.10 Caracterização das nanopartículas obtidas

3.10.1 Concentração de associação crítica (CAC)

Determinou-se a concentração de associação crítica por espectrofluorimetria utilizando o pireno como sonda fluorescente, conforme realizado por Patrizi *et al.* (2009). A partir de uma solução estoque de pireno em acetona na concentração $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, preparou-se uma solução de pireno com concentração $5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ em água. Em um balão volumétrico adicionou-se a solução de pireno em acetona, a acetona foi evaporada sob fluxo de gás nitrogênio depois adicionou-se água deionizada até o volume do balão.

Preparou-se soluções dos copolímeros nas concentrações de 0,01 a $0,8 \text{ mg mL}^{-1}$ utilizando a solução de pireno $5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Os espectros de excitação (310 – 360 nm) das soluções, a 25 e $50\text{ }^\circ\text{C}$ foram obtidos utilizando um espectrofluorímetro Shimadzu RF 600 e comprimento de onda de emissão (λ_{em}) de 374 nm. A razão das intensidades (I_{338}/I_{334}) pela concentração logarítmica dos copolímeros foi usada para determinar a CAC.

3.10.2 Espalhamento de luz Dinâmico (DLS)

Avaliou-se a variação do tamanho das nanopartículas e do índice de polidispersão (IPD) em função do aumento de temperatura, e o potencial zeta em água destilada utilizando o equipamento ZetaSizer Nano ZS da Malvern, modelo ZEN3600 com laser de comprimento de onda de 633 nm e ângulo de espalhamento de 173° . A temperatura de transição de fase (LCST), ou seja, temperatura na qual há a formação de nanopartículas por auto-organização, foi determinada para soluções dos copolímeros com concentração de 1 mg mL^{-1} . Aqueceu-se as soluções no equipamento no intervalo de 25 a $50\text{ }^\circ\text{C}$, com as medidas sendo realizadas a cada acréscimo de $1\text{ }^\circ\text{C}$ e tempo de equilíbrio térmico de 4 min.

Avaliou-se o tamanho, IPD e potencial zeta das nanopartículas carregadas com doxorubicina utilizando o equipamento ZetaSizer Nano ZS da Malvern, modelo ZEN3600 com laser de comprimento de onda de 633 nm e ângulo de espalhamento de 173°. Preparou-se soluções de CP-GMCM1h-DOX (10:1) e CP-GMCM1h-DOX (10:2) 1 mg mL⁻¹, essas soluções foram analisadas a 37 °C com tempo de equilíbrio térmico de 10 min.

3.10.3 Eficiência de encapsulamento (EE%) e Carga de fármaco (CF%)

A quantidade de doxorubicina presente nas nanopartículas foi determinada utilizando um espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu UV-1800 ($\lambda_{\text{abs}} = 502$ nm), a partir da análise de uma solução de DOX em DMSO (1 mg de DOX em 3 mL de DMSO). A Equação 6 apresenta a curva de calibração para converter o valor de absorvância em quantidade de DOX.

$$\text{Abs} = -0,02994 + 0,0216[\text{DOX}] \quad (R^2 = 0,9997) \quad (6)$$

onde: Abs é a absorvância medida e [DOX] é a concentração de DOX.

A eficiência de encapsulamento (EE%) e carga de fármaco (CF%) foram determinadas pelas Equações 7 e 8, respectivamente.

$$EE (\%) = \frac{\text{Massa de fármaco nas nanopartículas}}{\text{Massa total de fármaco utilizada}} \times 100 \quad (7)$$

$$CF (\%) = \frac{\text{Massa de fármaco nas nanopartículas}}{\text{Massa de nanopartículas}} \times 100 \quad (8)$$

3.10.4 Microscopia de Força Atômica (AFM)

As morfologias das nanopartículas CP-GMCM1h e CP-GMCM1h-DOX foram observadas no equipamento MFP-3D-Bio da Asylum Research em modo de contato, utilizando um cantilever retangular do tipo Econo - TESP, da Asylum Research, com frequência de ressonância 260 kHz e constante de mola nominal de $k = 40$ N m⁻¹. Preparou-se soluções de nanopartículas que foram colocadas em banho ultrassônico por 30 min, depois depositou-se 10 µL dessas soluções sobre superfície de mica e esperou-se a água das soluções evaporar por 30 min.

3.10.5 Liberação da doxorubicina *in vitro*

O perfil de liberação *in vitro* da DOX das nanopartículas de CP-GMCM1h-DOX (10:1), foi determinado utilizando sistema de diálise. Dissolveu-se 3 mg de CP-GMCM1h-DOX (10:1) em 3 mL de solução tampão fosfato (PBS) + lauril sulfato de sódio 0,1% (m/v), realizou-se liberações em pH 7,4 e 5,0. Colocou-se a solução em membrana de celulose (com limite de exclusão de 1000 g mol⁻¹) e realizou-se a diálise desse material contra 30 mL de tampão fosfato + lauril 0,1% utilizada para preparar a solução da membrana. Recolheu-se alíquotas de 3 mL em intervalos de tempo pré-determinados para a determinação da quantidade de DOX liberada, por espectroscopia de fluorescência (λ_{ex} = 480 nm; λ_{em} = 590 nm) utilizando curvas de calibração de PBS (pH 7,4 e 5,0) com lauril 0,1% (m/v). As curvas de calibração estão apresentadas nas Equações 9 e 10 para os pH 7,4 e 5,0, respectivamente.

$$\text{I.F.} = 3470,43[\text{DOX}] + 82,98 \quad (R^2=0,9999) \quad (9)$$

$$\text{I.F.} = 3692,71[\text{DOX}] + 65,78 \quad (R^2=0,9996) \quad (10)$$

onde: I.F. é a intensidade de fluorescência da [DOX] é a concentração de doxorubicina liberada.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização da galactomanana e derivados carboximetilados

4.1.1 Rendimento da extração da GM

O rendimento de extração de galactomanana de *Delonix regia* obtido foi de 17,8% \pm 0,6%, esse valor foi maior que os rendimentos de 10% reportados por Rodriguez-Canto *et al.* (2019) e Cheirmadurai, Thanikaivelan e Murali (2016), as sementes desses trabalhos tinham origem no México e Índia, respectivamente. Para sementes do Brasil, Ramos (2016) reporta valores de rendimento de 14,5%. No trabalho de Tamaki, Teruya e Tako (2010), para sementes do Japão observou-se rendimento de galactomanana de aproximadamente 20%.

Variações nos rendimentos de extração de galactomanana podem estar relacionadas intrinsecamente as sementes, visto que, fatores como variedade genética, clima da região e composição do solo podem alterar a quantidade de endosperma presente nas sementes, e/ou esses rendimentos podem variar devido ao método de extração utilizado (Vilaró *et al.*, 2018).

4.1.2 Reação de carboximetilação e determinação do grau de substituição

Os rendimentos e graus de substituição obtidos estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Rendimento e grau de substituição dos derivados carboximetilados obtidos

Derivado	Rendimento (%)	GS
GMCM1h	33,9 \pm 0,8	0,35 \pm 0,01
GMCM2h	22,1 \pm 4,8	0,60 \pm 0,02

Fonte: Dados da pesquisa.

O GS da GMCM1h está próximo dos valores obtidos por Gupta *et al.* (2004) para condições reacionais similares, contudo, a GMCM2h apresentou valor superior a todos os GS obtidos no trabalho supracitado que foi de 0,46 para a melhor condição reacional utilizada.

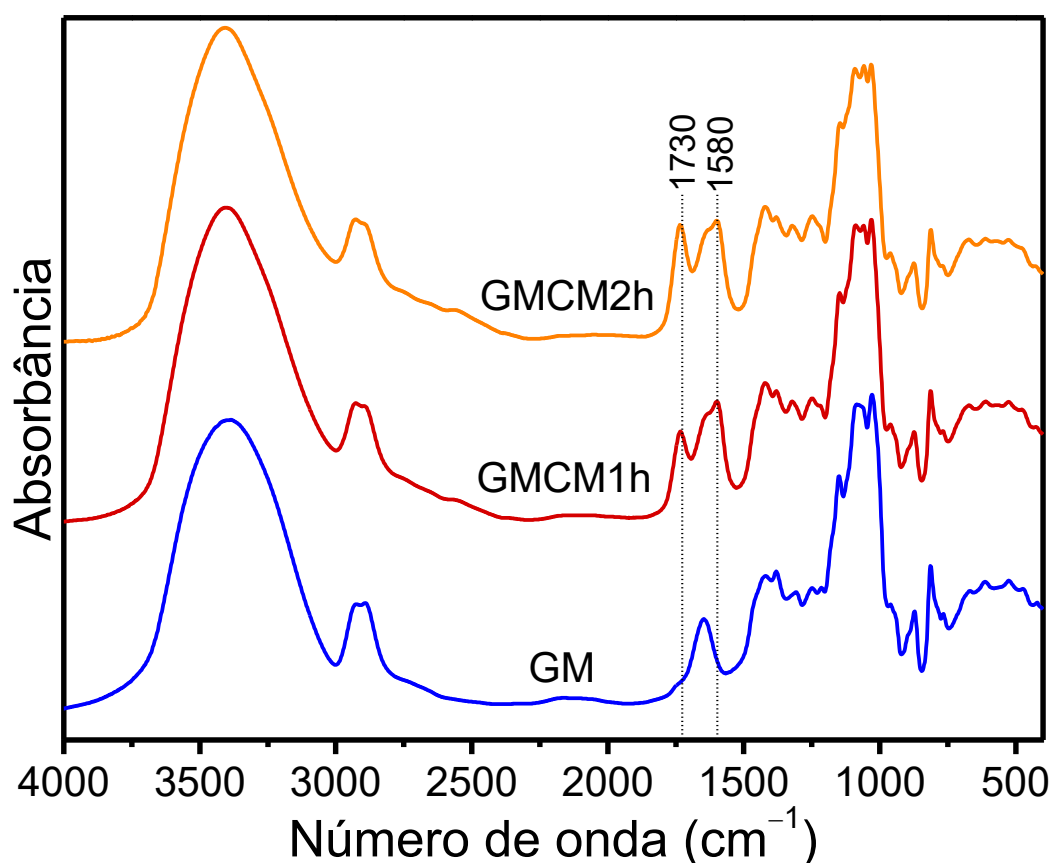
4.1.3 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FT-IR)

Na Figura 14 são apresentados os espectros de FT-IR da GM e das GMCM (1h e 2h). Os espectros apresentam bandas características da galactomanana, como a banda em 3410

cm^{-1} , referente ao estiramento vibracional O-H de grupos álcool, e a banda em 2910 cm^{-1} atribuída ao estiramento C-H da estrutura do polissacarídeo. As bandas em 1645 e 1395 cm^{-1} são referentes a água adsorvida e as deformações CH_2 , respectivamente. As bandas de absorção em 1150 , 1089 e 1029 cm^{-1} estão relacionadas aos estiramentos vibracionais acoplados de C-C, C-O-H e C-O-C respectivamente. As bandas características da galactomanana que evidenciam a presença de β -D-manopirranose e α -D-galactopirranose são observadas em 872 e 810 cm^{-1} , respectivamente (Cheirmadurai; Thanikaivelan; Murali, 2016; Rodriguez-Canto *et al.*, 2019).

Nos espectros dos materiais carboximetilados observa-se o surgimento de bandas em 1730 e 1580 cm^{-1} referentes ao estiramento C=O de ácido carboxílico e estiramento assimétrico C=O de carboxilato, respectivamente (Silva *et al.*, 2004).

Figura 14 – Espectros de FT-IR da galactomanana e seus derivados carboximetilados

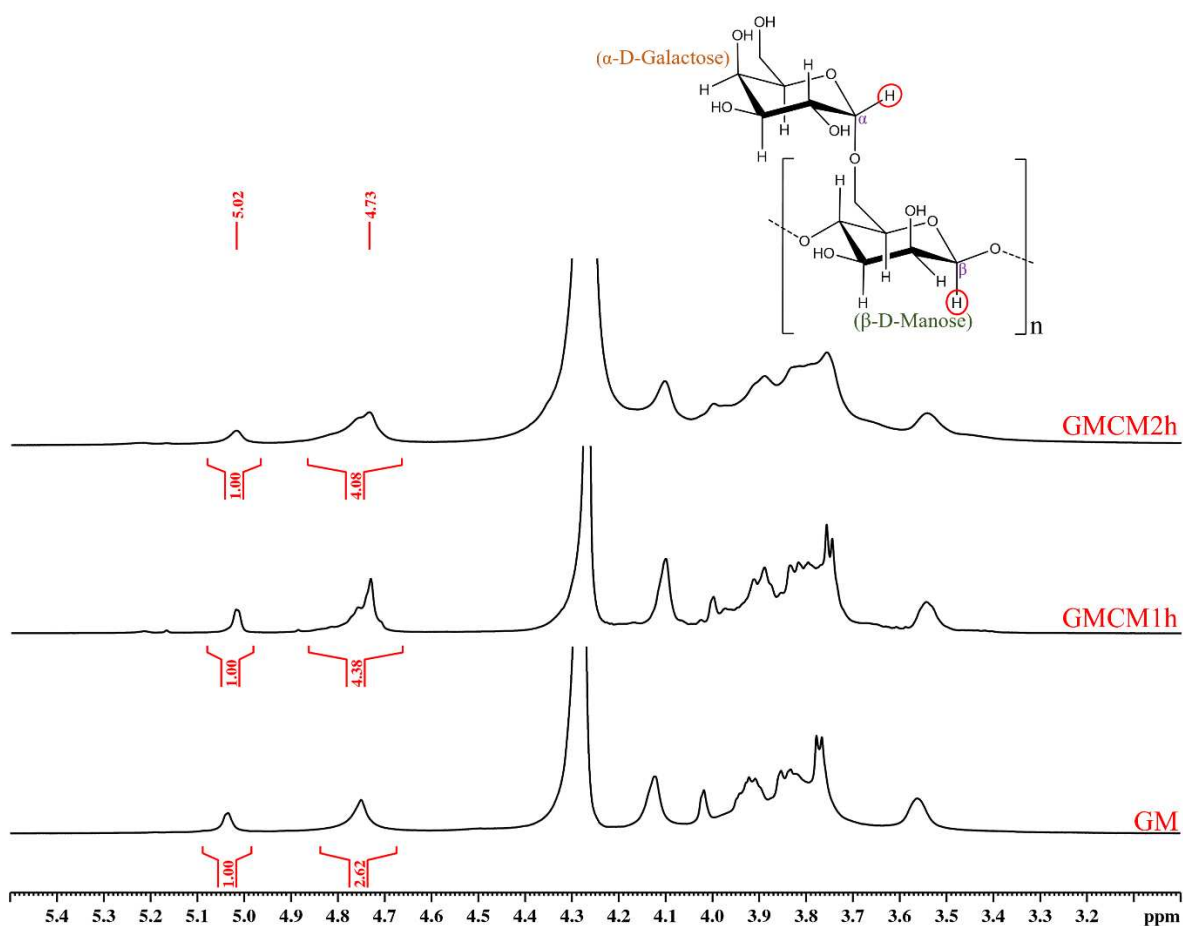


Fonte: Dados da pesquisa.

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

Nos espectros de RMN ^1H (Figura 15) da galactomanana e seus derivados carboximetilados observa-se a presença do sinal em δ_{DSS} 5,02 ppm referente ao próton anomérico da α -D-galactose e do sinal em δ_{DSS} 4,73 ppm referente ao próton anomérico da β -D-manose. Os demais prótons (H_2 , H_3 , H_4 , H_5 e H_6) de ambas as unidades monossacarídicas aparecem nos sinais presentes na faixa δ 3,5-4,2 ppm (Verma; Rimpay; Ahuja, 2020).

Figura 15 – Espectros de RMN ^1H (500 MHz, D_2O , 70 °C) para GM e seus derivados carboximetilados



Fonte: Dados da pesquisa.

A razão M/G foi determinada pela razão das áreas dos picos em 4,73 ppm referente a manose e em 5,02 referente a galactose (Figura 15) (Tamaki; Teruya; Tako, 2010). Para a galactomanana não modificada a razão M/G obtida foi de 2,6. Lima *et al.* (2020) e Lima *et al.* (2021b) reportaram valores de razão M/G de 2,7 e 3,1, respectivamente, para galactomananas de *Delonix regia* nativas do Brasil. Essas variações entre as razões podem ser causadas pela

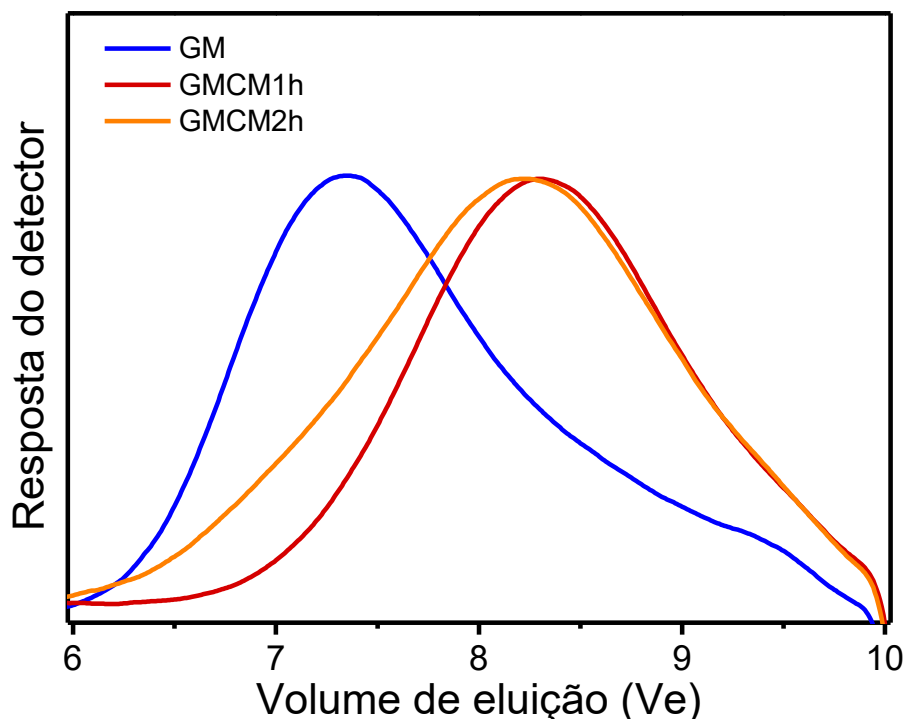
diferente localização geográfica e por condições de crescimento das respectivas árvores de onde as sementes foram coletadas (Sun *et al.*, 2018).

Para os derivados carboximetilados a razão M/G foi de 4,4 e 4,1 para GMCM1h e GMCM2h, respectivamente. Esse aumento na razão M/G está relacionado com a hidrólise sofrida pela galactomanana durante a reação de carboximetilação, indicando que houve quebra da ligação α -glicosídica, o que ocasiona a perda de galactose na estrutura da galactomanana. Comportamento similar é reportado na literatura para derivados de galactomanana que passaram por processos de hidrólise (Gomes *et al.*, 2020; Rodriguez-Canto *et al.*, 2019).

4.1.5 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

Os cromatogramas da GM e seus derivados carboximetilados estão apresentados na Figura 16. A partir dos volumes de eluição máximo de pico de cada material, pode-se estimar as massas molares aplicando a Equação 5.

Figura 16 – Cromatogramas da GM e seus derivados carboximetilados



Fonte: Dados da pesquisa.

A Tabela 4 apresenta os valores V_e e M_{pk} da GM e seus derivados carboximetilados (GMCM).

Tabela 4 – Volume de eluição e massa molar de pico da galactomanana e seus derivados carboximetilados

Amostra	Volume de eluição V_e (mL)	Massa molar de pico $M_{pk} \times 10^{-5}$ (g mol ⁻¹)
GM	7,34	8,19
GMCM1h	8,30	0,63
GMCM2h	8,22	0,79

Fonte: Dados da pesquisa.

A galactomanana apresentou valor de massa molar de $8,19 \times 10^5$ g mol⁻¹, valor superior aos reportados por Tamaki, Teruya e Tako (2010) que foi de $2,50 \times 10^5$ g mol⁻¹ e por Lima *et al.* (2022) que foi de $5,80 \times 10^5$ g mol⁻¹. A diferença no valor de massa molar para galactomananas de mesma espécie pode estar relacionada como local de origem das sementes ou método de extração.

Observa-se que os derivados carboximetilados apresentam volumes de eluição maiores que a galactomanana não modificada, isso indica que a massa molar desses materiais é menor que a massa molar do polissacarídeo não modificado. Essa diminuição de massa molar dos derivados carboximetilados está relacionada com a hidrólise sofrida pela galactomanana durante a reação de carboximetilação.

4.2 Caracterização dos copolímeros

4.2.1 Rendimento da reação de copolimerização

A Tabela 5 apresenta os rendimentos para as reações de copolimerização do PNIPAM na galactomanana e seus derivados carboximetilados.

Tabela 5 – Rendimento das reações de copolimerização para os copolímeros obtidos a partir da galactomanana e seus derivados carboximetilados após a purificação

Copolímero	Rendimento (%)
CP-GM	62 ± 5
CP-GMCM1h	57 ± 2
CP-GMCM2h	60 ± 4

Fonte: Dados da pesquisa.

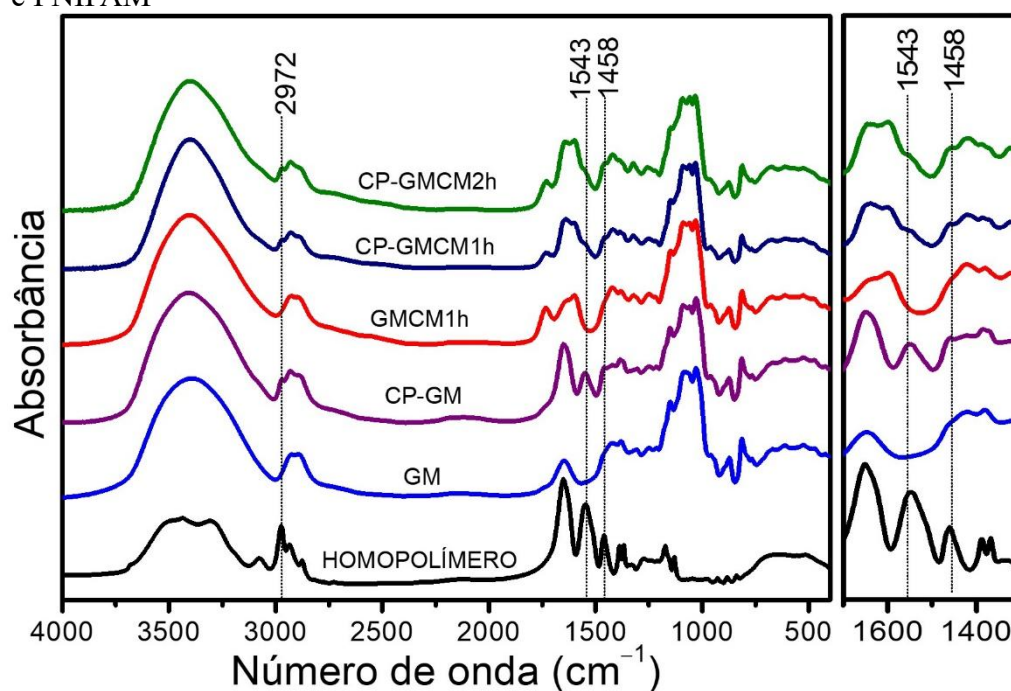
Os rendimentos observados apresentam valores próximos, indicando que a mudança de substrato não interfere de forma relevante no rendimento da reação de copolimerização. Estudos realizados por Dos Santos *et al.* (2023) indicam a perda de massa

durante o processo de diálise, além da massa de homopolímero (PNIPAM não ligado ao polissacarídeo) formada durante a reação de copolimerização que é retirada no processo de purificação.

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

A Figura 17 apresenta os espectros de FT-IR dos copolímeros e de seus precursores. Os espectros dos copolímeros foram avaliados para determinar a ocorrência da reação de copolimerização. Os copolímeros apresentaram bandas características da galactomanana em 3410 e 2910 cm^{-1} referentes aos estiramentos O-H e C-H, respectivamente, em 872 cm^{-1} atribuída ao estiramento C-O-C (1 \rightarrow 4) de β -D-manopirranose e em 810 cm^{-1} do estiramento C-O-C (1 \rightarrow 6) de α -D-galactopirranose. Também se observa no espectro do copolímero bandas referentes ao PNIPAM, a banda em 2972 cm^{-1} atribuída ao estiramento C-H do grupo isopropil (-CH(CH₃)₂) e a banda em 1543 cm^{-1} e 1458 cm^{-1} são devidas ao dobramento N-H (amida II) e C-N, respectivamente. O homopolímero apresenta uma banda em 1649 cm^{-1} referente ao estiramento C=O (amida I), contudo no copolímero ela está sobreposta à banda de água adsorvida que está na mesma região (Abreu *et al.*, 2016).

Figura 17 – Espectros de FT-IR dos copolímeros sintetizados, da GM, GMCM e PNIPAM



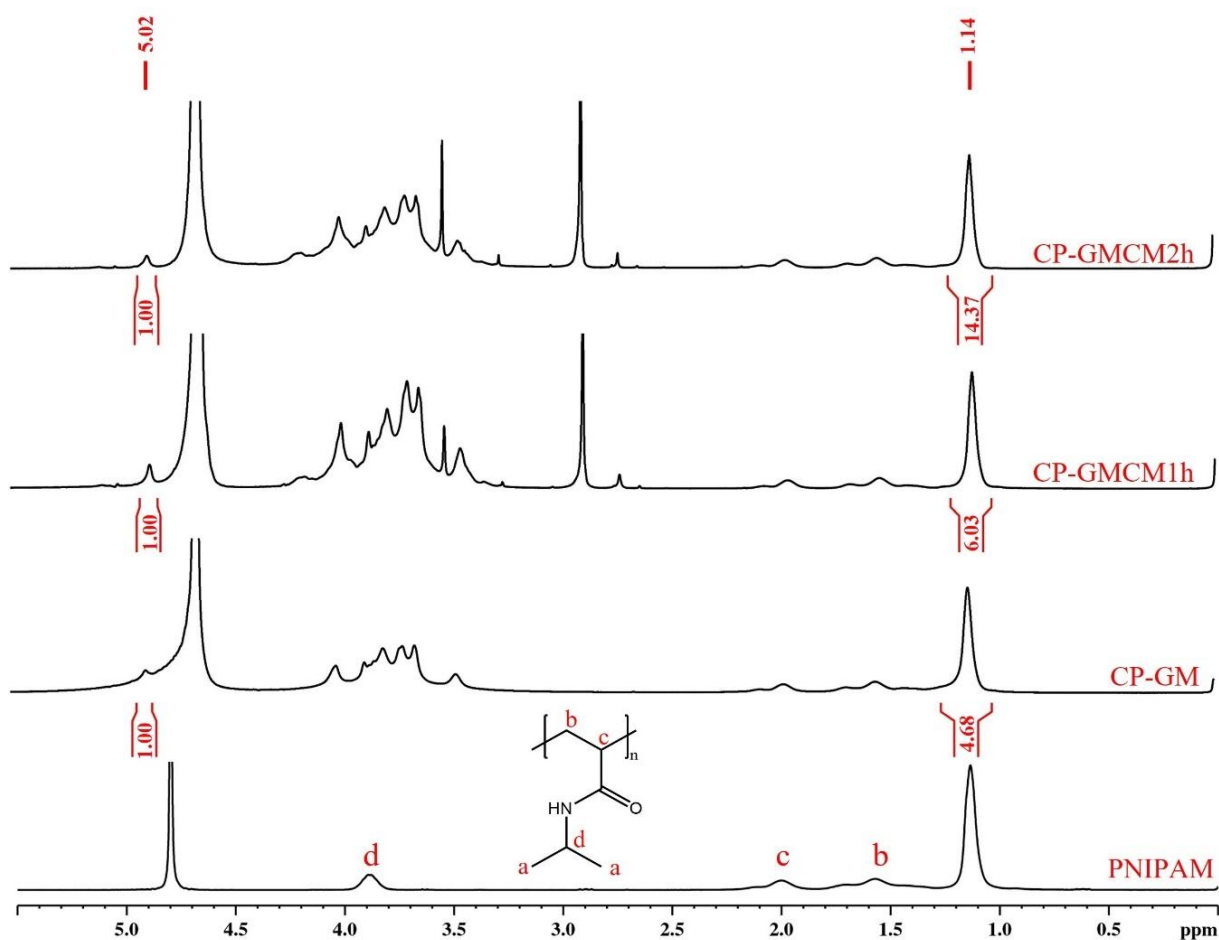
Fonte: Dados da pesquisa.

Os espectros dos copolímeros indicam que houve a inserção de cadeias de PNIPAM na estrutura da galactomanana e de seus derivados carboximetilados.

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

A análise dos espectros de RMN foi realizada para confirmação da enxertia de PNIPAM nas cadeias dos polissacarídeos e o teor de NIPAM dos copolímeros. A Figura 18 apresenta o RMN ^1H do PNIPAM e dos copolímeros. No espectro do PNIPAM, com base nos dados reportados na literatura, os seguintes deslocamentos químicos (δ_{DSS} ppm) foram observados: 1,14 ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$) (a), 1,55 ($-\text{CH}-\text{CH}_2$) (b), 2,00 ($-\text{CH}-\text{CH}_2$) (c) e 3,89 ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$) (d) (Luo *et al.*, 2012).

Figura 18 – Espectros de RMN ^1H (500 MHz, D_2O , 25 °C) do homopolímero (PNIPAM) e dos copolímeros



Fonte: Dados da pesquisa.

Os espectros dos copolímeros, apresentam sinais em δ 5,02, referentes ao próton anomérico da galactose da galactomanana, e os sinais em δ_{DSS} 1,14, δ_{DSS} 1,55 e δ_{DSS} 2,00 característicos do PNIPAM, confirmando a ocorrência da reação de enxertia. O sinal referente ao hidrogênio d ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$) do PNIPAM encontra-se sobreposto aos sinais dos prótons (H_2 - H_6) das unidades monossacarídicas da galactomanana observados na faixa δ_{DSS} 3,5-4,2 ppm.

Para determinar a razão de NIPAM, ou seja, a razão molar de unidades desses monômeros enxertadas no polissacarídeo, realizou-se a divisão de 1/6 da área do sinal dos prótons metílicos do grupo isopropil (δ_{DSS} 1,14 ppm) pela área do sinal do próton anomérico da galactose (δ_{DSS} 5,02 ppm) (Ghimici; Constantin, 2011). A Tabela 6 apresenta os valores de razão de NIPAM em cada um dos copolímeros.

Tabela 6 – Razão de NIPAM na estrutura dos polissacarídeos para os copolímeros sintetizados

Copolímero	$(A_{1,14}/6)/A_{5,02}$
CP-GM	0,78
CP-GMCM1h	1,00
CP-GMCM2h	2,40

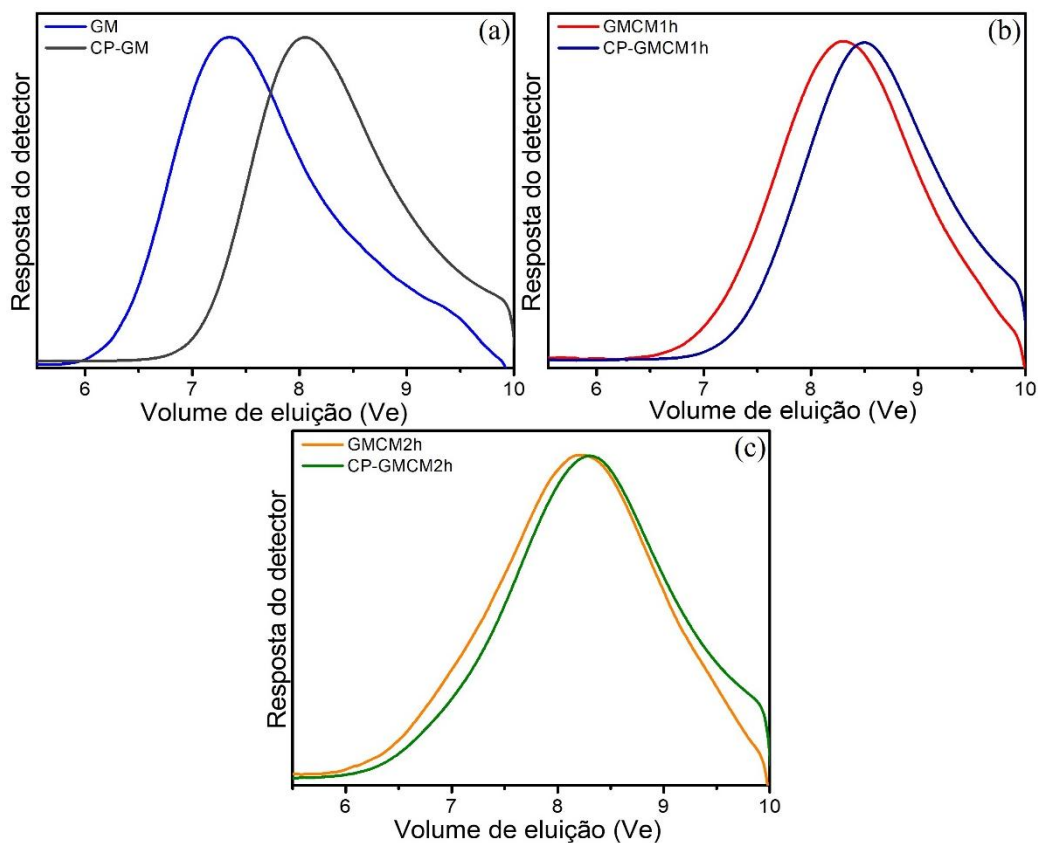
Fonte: Dados da pesquisa.

Observa-se que quanto maior o grau de substituição de grupos carboximetil da galactomanana precursora, o copolímero sintetizado apresenta maior teor de NIPAM. Na enxertia de PNIPAM em sulfato de dextrana, nas mesmas condições reacionais utilizadas neste trabalho, Dos Santos *et al.* (2023) que também calculou a razão de NIPAM pelo espectro de RMN, reporta valor de razão de NIPAM de 0,46, valor inferior aos obtidos neste trabalho. Lima *et al.* (2021b) que produziu copolímeros de galactomanana de *Delonix regia* não modificada com PNIPAM utilizando CAN como iniciador, reporta valores de razão de NIPAM em seus materiais de 12,1 e 5,4, valores também determinados pelos espectros de RMN.

4.2.4 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

A Figura 19 apresenta os cromatogramas de GPC dos copolímeros sintetizados e dos polissacarídeos precursores, observa-se que houve aumento no V_e para todos os copolímeros quando comparados com seus respectivos materiais de partida. A Tabela 7 apresenta os valores de V_e e M_{pk} de todos os materiais.

Figura 19 – Cromatogramas de GPC dos copolímeros sintetizados e seus respectivos materiais precursores



Fonte: Dados da pesquisa.

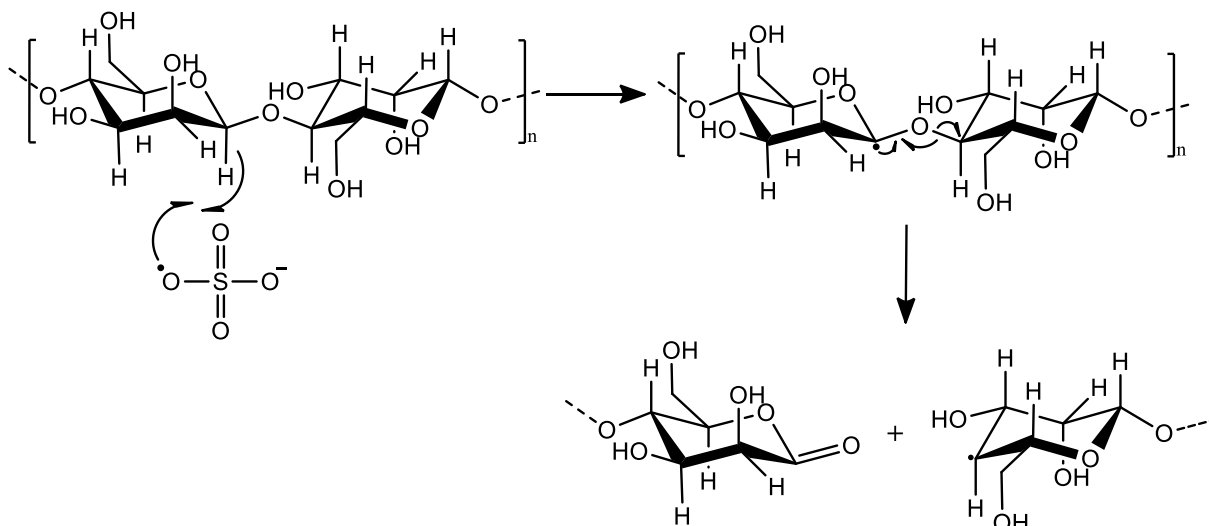
Tabela 7 – Volume de eluição e massa molar de pico dos copolímeros e seus materiais precursores

Amostra	Volume de eluição V_e (mL)	Massa molar de pico $M_{pk} \times 10^{-5}$ (g mol ⁻¹)
GM	7,34	8,19
CP-GM	8,04	1,27
GMCM1h	8,30	0,64
CP-GMCM1h	8,50	0,37
GMCM2h	8,22	0,79
SCP-GMCM2h	8,31	0,66

Fonte: Dados da pesquisa.

Essa diminuição de massa molar para os copolímeros pode estar associada a degradação da cadeia do polissacarídeo. Liu e Sun (2008) propõe um mecanismo para a degradação de polissacarídeo em reação de copolimerização utilizando KPS, onde há a cisão da ligação glicosídica devido a abstração do hidrogênio anomérico pelo radical sulfato (Figura 20).

Figura 20 – Proposta de mecanismo para degradação de cadeia de polissacarídeo para reações de copolimerização tendo KPS como iniciador



Fonte: Adaptado de Liu e Sun (2008).

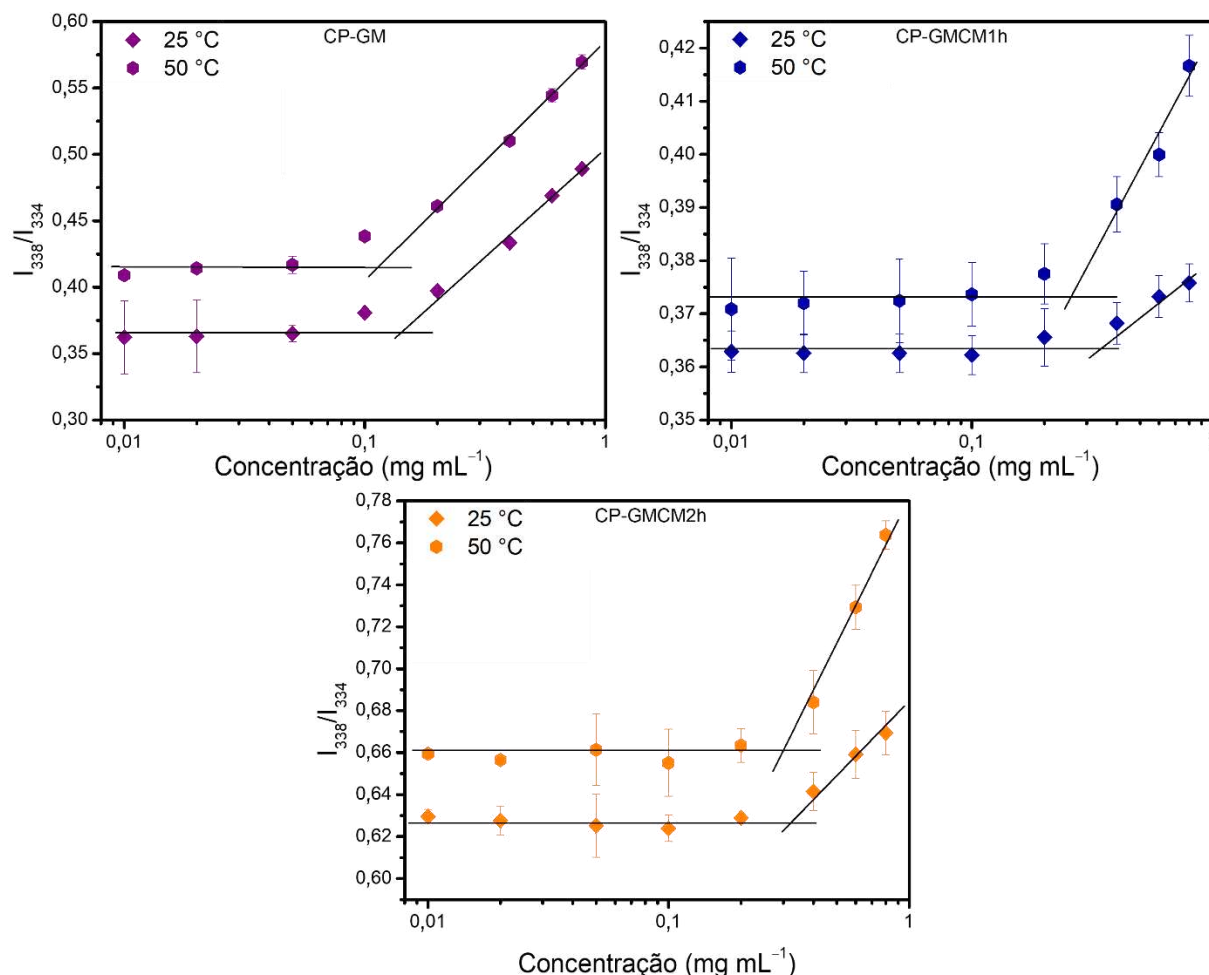
4.3 Caracterização das nanopartículas

4.3.1 Concentração de associação crítica (CAC)

A concentração de associação crítica do copolímero corresponde a concentração mínima necessária para a formação de nanopartículas por auto-organização. Essa análise foi realizada por espectrometria de fluorescência utilizando o pireno como sonda. O pireno por ser bastante hidrofóbico é muito suscetível a variações da polaridade do meio (Patrizi *et al.*, 2009). Nas soluções de copolímeros conforme há o aumento da concentração, há o surgimento de domínios hidrofóbicos, para os quais o pireno em solução vai transferir-se preferencialmente. Essa mudança de um domínio hidrofílico para um hidrofóbico gera uma variação brusca na razão de intensidade (I_{338}/I_{334}) no espectro de excitação do pireno. Para ambientes hidrofílicos a razão I_{338}/I_{334} apresenta valores baixos, enquanto em ambientes hidrofóbicos apresentam valores altos (Constantin *et al.*, 2017; Patrizi *et al.*, 2009).

A Figura 21 apresenta a variação da razão de intensidade (I_{338}/I_{334}) do espectro da excitação do pireno pela concentração das soluções de copolímeros a 25 e 50 °C. Os valores de CAC (Tabela 8) para cada um dos copolímeros foi determinado no ponto de interseção entre as retas traçadas antes e depois do ponto de inflexão.

Figura 21 – Variação da razão I_{338}/I_{334} do espectro de excitação do pireno em função da concentração das soluções dos copolímeros sintetizados a 25 e 50 °C



Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 8 – Valores de CAC para os copolímeros a 25 e 50 °C

Copolímeros	CAC (mg mL^{-1}) a 25 °C	CAC (mg mL^{-1}) a 50 °C
CP-GM	$0,16 \pm 0,02$	$0,11 \pm 0,01$
CP-GMCM1h	$0,33 \pm 0,01$	$0,22 \pm 0,02$
CP-GMCM2h	$0,33 \pm 0,03$	$0,27 \pm 0,02$

Fonte: Dados da pesquisa.

Todos os copolímeros apresentaram CAC em ambas as temperaturas. A 50 °C os copolímeros sofrem desidratação por estarem a uma temperatura acima da LCST, apresentando valores CAC inferiores aos observados a 25 °C. A CAC observada para os materiais a 25 °C, pode ser explicada pela tendência das cadeias de PNIPAM de se agregarem por auto-organização produzindo nanoestruturas, mesmo estando abaixo da LCST (Abreu *et al.*, 2016).

Os valores de CAC maiores para os copolímeros produzidos a partir das galactomananas carboximetiladas, estão relacionados com a maior dificuldade de formação de nanopartículas por auto-organização, visto que, por apresentarem grupos carboximetil na cadeia principal são materiais mais hidrofílicos. É necessária uma concentração mais elevada de copolímero em solução para que as interações hidrofóbicas entre as cadeias de PNIPAM prevaleçam sobre as interações hidrofílicas dos materiais com o meio aquoso.

Gupta, Ghute e Badiger (2011) sintetizaram copolímero de carboximetil guar com PNIPAM e reportam CAC a 25 °C de 1,38 mg mL⁻¹, valor superior ao encontrado neste trabalho para os copolímeros de galactomanana carboximetilada com PNIPAM.

Gomes *et al.* (2020) reporta valores de CAC para copolímeros de galactomanana de *Dimorphanda gardneriana* não modificada e hidrolisada com PNIPAM, utilizando CAN como iniciador, variando entre 0,09 e 0,21 mg mL⁻¹, valores próximos ao encontrados neste trabalho.

Lima *et al.* (2021b) produziu copolímeros de galactomanana de *Delonix regia* com PNIPAM, utilizando CAN como iniciador, com razões de NIPAM de 12,1 (CP-1) e 5,4 (CP-2). A 25 °C CP-1 e CP-2 apresentaram CAC de 1,65 e 1,81 mg mL⁻¹, respectivamente. A 50 °C CP-1 e CP-2 apresentaram CAC de 0,27 e 0,52 mg mL⁻¹, respectivamente. Mesmo apresentando menor razão de NIPAM, o CP-GM sintetizado neste trabalho apresenta CAC em ambas as temperaturas muito mais baixo do que os encontrados por Lima *et al.* (2021b), isto pode ser devido ao método de síntese ser diferente.

4.3.2 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

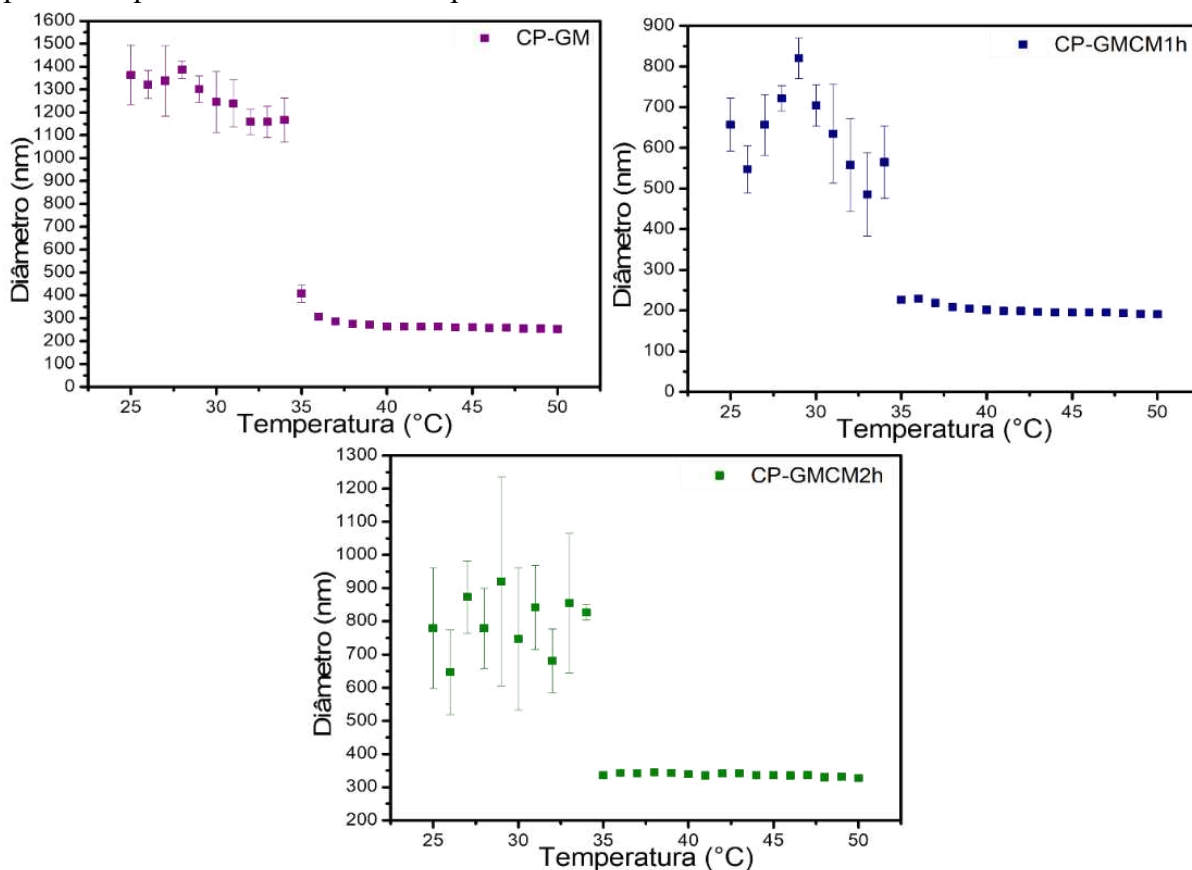
O diâmetro das nanopartículas e o índice de polidispersão (IPD) foram analisados por DLS, a fim de compreender o comportamento termorresponsível dos copolímeros. Soluções aquosas (1 mg mL⁻¹) dos copolímeros foram aquecidas de 25 a 50 °C, determinando-se a temperatura de transição de fase (LCST) como a temperatura em que houve uma mudança brusca no tamanho das partículas analisadas.

A partir da LCST as interações hidrofóbicas entre a estrutura do copolímero se sobressaem às interações do copolímero com o meio aquoso, nesse ponto as ligações de hidrogênio entre água e grupos polares do copolímero são desfeitas, ocorrendo a formação de nanopartículas, onde o PNIPAM encontra-se no núcleo (Zhao *et al.*, 2018). A temperatura de transição para o PNIPAM (homopolímero) é de 32 °C, já para os copolímeros sintetizados neste trabalho observou-se que a LCST foi de 35 °C (Figura 22), isso ocorre pois, para os copolímeros

a temperatura de transição de fase varia com a proporção entre segmentos hidrofílicos (polissacarídeo) e hidrofóbicos (PNIPAM). Quanto maior for a razão hidrofóbica no material, mais próximo de 32 °C será a LCST do copolímero. Em contrapartida, quanto maior a razão hidrofílica no material maior e mais distante de 32 °C será a LCST (Almeida; Amaral; Lobão, 2012; Khimani *et al.*, 2019). Todos os copolímeros apresentarem a mesma LCST indicando que o efeito hidrofílico da quantidade de cargas dos polissacarídeos, que tornaria a LCST maior para os materiais com mais carga, foi balanceado pelo efeito hidrofóbico da quantidade de PNIPAM que foi enxertada, visto que, conforme houve o aumento de carga do polissacarídeo maior foi a enxertia de PNIPAM observada.

A Tabela 9 apresenta o tamanho das nanopartículas, o IPD e o potencial zeta a 25 e 37 °C. Observa-se que para os três copolímeros houve uma significativa diminuição de tamanho com o aumento da temperatura. A diminuição do IPD a 37 °C aponta para uma distribuição de tamanho mais homogênea. O potencial zeta está relacionado com a estabilidade das nanopartículas, comumente, quanto maior o valor (em módulo) maior será a quantidade de cargas na superfície das nanopartículas, fazendo com que haja maior repulsão entre as nanopartículas, aumentando a estabilidade. As nanopartículas dos três copolímeros apresentaram valores de potencial zeta negativo, indicando que a suas superfícies apresentam cargas negativas. As nanopartículas dos materiais carboximetilados apresentam potencial zeta maior (em módulo) indicando que são mais estáveis em solução (Du *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2018).

Figura 22 – Relação do tamanho de nanopartículas com variação da temperatura de 25 a 50 °C para os copolímeros sintetizados a partir de GM e GMCM com PNIPAM



Fonte: Dados da pesquisa.

Copolímeros com PNIPAM podem apresentar dois tipos de comportamento de transição de fase. O primeiro comportamento é o observado para os copolímeros sintetizados neste trabalho, no qual há uma diminuição do tamanho das nanopartículas após a LCST, indicando uma transição de estado “bobina desdobrada” para globular, esse comportamento é observado para copolímeros com cadeias laterais longas. O segundo comportamento, quando são obtidas cadeias laterais curtas, é observado um aumento no tamanho das nanopartículas acima da LCST, as partículas passam de um estado segmentado (baixo tamanho) para partículas agregadas (alto tamanho) (Yang *et al.*, 2013b), Lima *et al.* (2021b) observou o segundo comportamento para copolímeros de galactomanana de *Delonix regia* com PNIPAM, que apresentam razões de NIPAM de 12,1 e 5,4, indicando que apesar de apresentar maior grau de enxertia, seus copolímeros apresentaram cadeias de PNIPAM mais curtas do que as obtidas para os copolímeros sintetizados neste trabalho.

Tabela 9 – Tamanho e IPD de nanopartículas a 25 e 37 °C

Nanopartículas	Tamanho a 25 °C	IPD a 25 °C	Potencial zeta (mV) a 25 °C	Tamanho a 37 °C	IPD a 37 °C	Potencial zeta (mV) a 37 °C
CP-GM	1364 ± 130	0,82 ± 0,07	-8,14 ± 0,9	356 ± 10	0,44 ± 0,05	-10,5 ± 0,7
CP-GMCM1h	656 ± 65	0,62 ± 0,06	-17,7 ± 0,4	219 ± 1	0,18 ± 0,01	-19,5 ± 0,7
CP-GMCM2h	783 ± 181	0,78 ± 0,04	-23,6 ± 1,8	341 ± 3	0,25 ± 0,01	-24,6 ± 0,9

Fonte: Dados da pesquisa.

Gomes *et al.* (2020) e Carneiro *et al.* (2021), que produziram copolímeros de galactomanana (*Dimorphandia gardneriana*) e PNIPAM e dextrana com PNIPAM, respectivamente, reportam a diminuição do tamanho de nanopartículas em função da massa molar do polissacarídeo utilizado na síntese de copolímeros termorresponsíveis, polissacarídeos com menor massa molar produzem copolímeros que formam nanopartículas menores. Os copolímeros CP-GMCM1h e CP-GMCM2h foram sintetizados com galactomananas carboximetiladas com massas molares de $6,4 \times 10^4$ e $7,9 \times 10^4$ g mol⁻¹, respectivamente, enquanto o CP-GM foi sintetizado com galactomanana de $8,2 \times 10^5$ g mol⁻¹, portanto, espera-se que os copolímeros produzidos a partir das galactomananas carboximetiladas apresentassem tamanho de nanopartículas menores que o CP-GM, contudo, esse comportamento só foi observado para o CP-GMCM1h. O CP-GMCM2h por ter uma maior quantidade de carga na estrutura da galactomanana, pode apresentar maior repulsão intercadeias, levando a nanopartículas muito maiores do que as formadas pelo CP-GMCM1h.

Como as nanopartículas do copolímero CP-GMCM1h apresentaram tamanho inferior a 300 nm e boa homogeneidade, elas foram escolhidas para incorporar o fármaco anticâncer doxorrubicina.

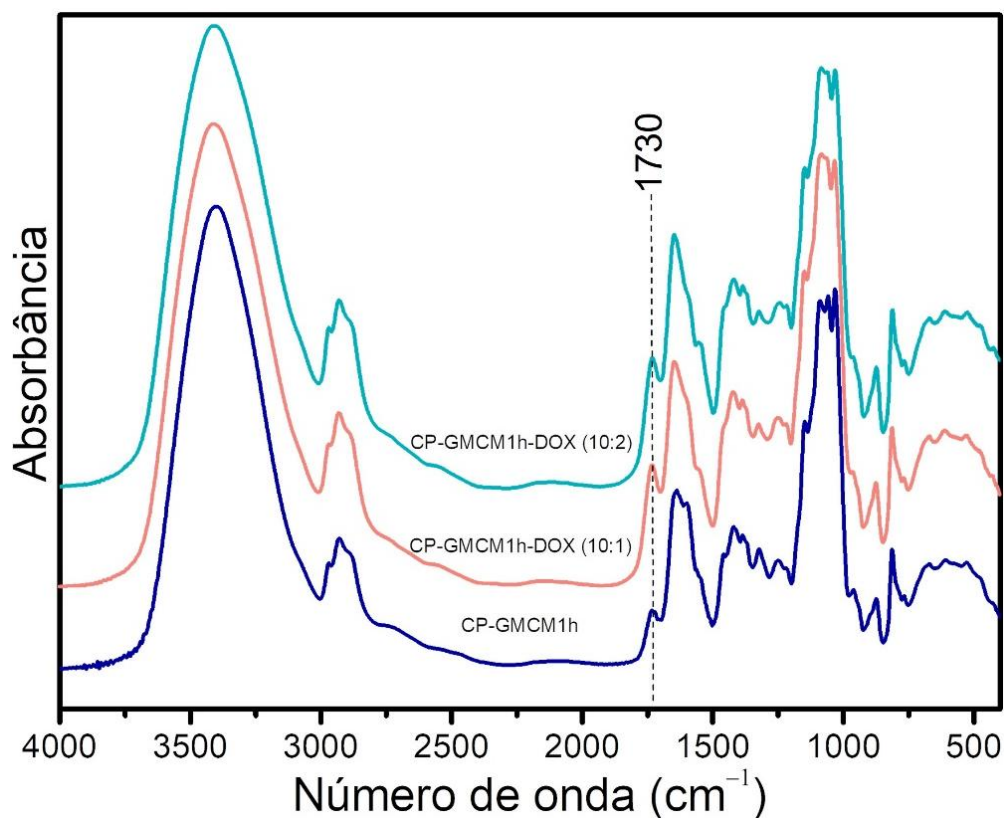
4.4 Caracterização das nanopartículas carregadas com doxorrubicina

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

A Figura 23 apresenta os espectros de FT-IR de CP-GMCM1h, CP-GMCM1h-DOX (10:1) e CP-GMCM1h-DOX (10:2). Nos espectros dos copolímeros carregados com fármacos

observa-se um aumento na intensidade da banda em 1730 cm^{-1} atribuído a $\text{C}=\text{O}$ de cetonas presentes na estrutura da doxorubicina (Gao *et al.*, 2017). Indicando a ocorrência da reação e confirmando a presença de DOX na estrutura do material.

Figura 23 – Espectros de FT-IR CP-GMCM1h, CP-GMCM1h-DOX (10:1) e CP-GMCM1h-DOX (10:2)



Fonte: Dados da pesquisa.

4.4.2 Eficiência de encapsulamento (EE%) e Carga de fármaco (CF%)

A presença de DOX nos conjugados de copolímeros-DOX também foi confirmada pela espectroscopia UV-Vis, devido a presença da banda de absorção em 502 nm referente a DOX. A Tabela 10 apresenta a eficiência de encapsulamento (EE%) e carga de fármaco (CF%) de doxorubicina nas nanopartículas determinadas por espectroscopia UV-Vis.

Tabela 10 – Eficiência de encapsulamento (EE%) e Carga de fármaco (CF%) de doxorubicina nas nanopartículas de CP-GMCM1h-DOX (10:1) e CP-GMCM1h-DOX (10:2)

Nanopartículas	EE (% m/m)	CF (% m/m)
CP-GMCM1h-DOX (10:1)	36 ± 4	3,2 ± 0,4
CP-GMCM1h-DOX (10:2)	19 ± 4	3,4 ± 0,7

Fonte: Dados da pesquisa.

A reação para produção do CP-GMCM1h-DOX (10:2) utilizou o dobro de DOX do que o utilizado para a reação de CP-GMCM1h-DOX (10:1), contudo, ambos os materiais apresentam a mesma carga de fármaco, indicando que a reação que utilizou a maior quantidade de DOX apresentou uma menor eficiência de encapsulamento. O fato de ambas as nanopartículas apresentarem a mesma carga de fármaco, mesmo tendo utilizado quantidades de DOX diferentes, indica que o CP-GMCM1h atingiu sua capacidade máxima de reagir com DOX já na reação do CP-GMCM1h-DOX (10:1).

Nos estudos realizados por Carneiro *et al.* (2021) que produziu copolímeros de dextrana com PNIPAM para encapsulamento de DOX, material parecidos com o deste trabalho, ou seja, polissacarídeo+PNIPAM, por meio de uma reação de base de *Schiff* que forma uma ligação covalente entre copolímero e fármaco, foram encontrados valores de eficiência de encapsulamento variando de 39,9 a 41,7 %, e cargas de fármaco variando entre 3,6 e 3,8%. Esses valores de EE e CF foram próximos dos encontrados neste trabalho para o CP-GMCM1h-DOX (10:1). Kim *et al.* 2012 reporta eficiência de encapsulamento de 83% e carga de fármaco de 8,3% de DOX em micelas de ácido hialurônico-DOX (197 nm).

4.4.3 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

O tamanho, o IPD e o potencial zeta das nanopartículas carregadas com DOX a 37 °C foram avaliados por DLS, os dados estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 – Tamanho, IPD e potencial zeta das nanopartículas carregadas com doxorubicina

Nanopartícula	Tamanho (nm) a 37 °C	IPD	Potencial zeta (mV)
CP-GMCM1h-DOX (10:1)	209 ± 3	0,24 ± 0,01	-19,5 ± 0,03
CP-GMCM1h-DOX (10:2)	209 ± 1	0,25 ± 0,01	-19,5 ± 0,03

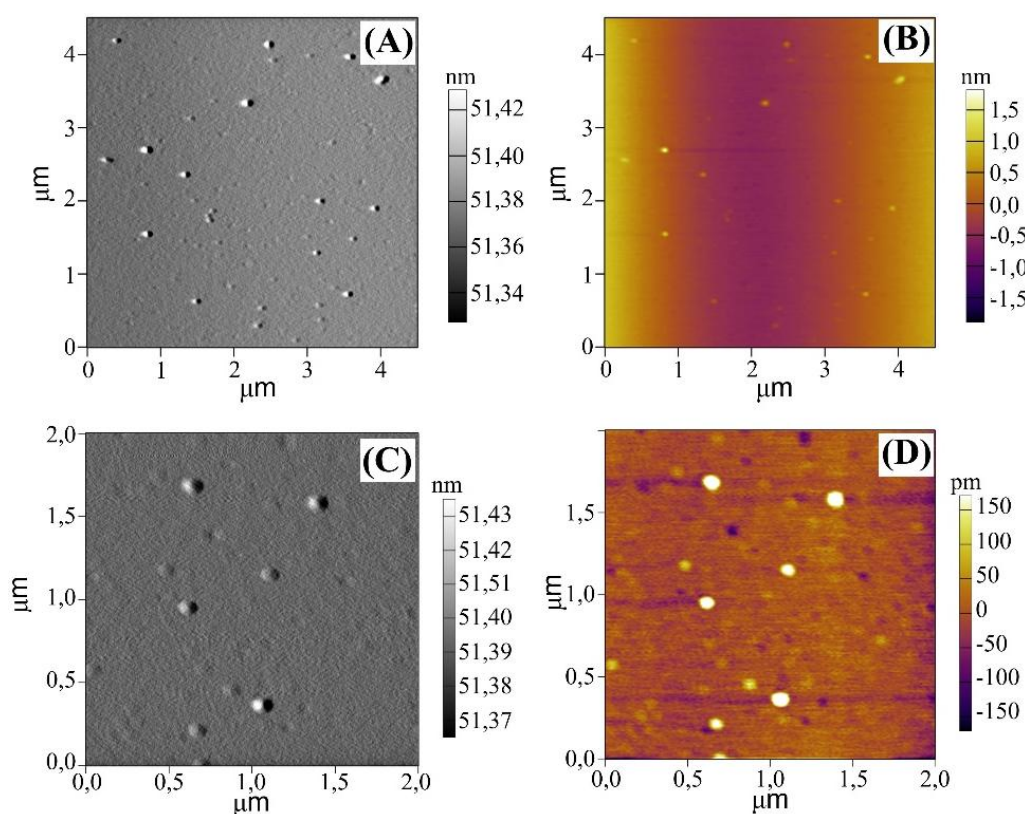
Fonte: Dados da pesquisa.

As nanopartículas carregadas com DOX apresentaram tamanho inferior ao observado para as nanopartículas de CP-GMCM1h sem fármaco (219 ± 1), isso provavelmente ocorre devido um aumento das interações hidrofóbicas intramoleculares devido a presença de DOX no núcleo das nanopartículas, levando a contração das nanopartículas (Huang *et al.*, 2018). As nanopartículas carregas também apresentaram baixo valor de IPD, indicando que essas nanopartículas apresentam distribuição de tamanho homogêneo. O potencial zeta das nanopartículas carregadas com DOX é o mesmo que o das nanopartículas CP-GMCM1h sem fármaco.

4.4.4 Microscopia de Força Atômica (AFM)

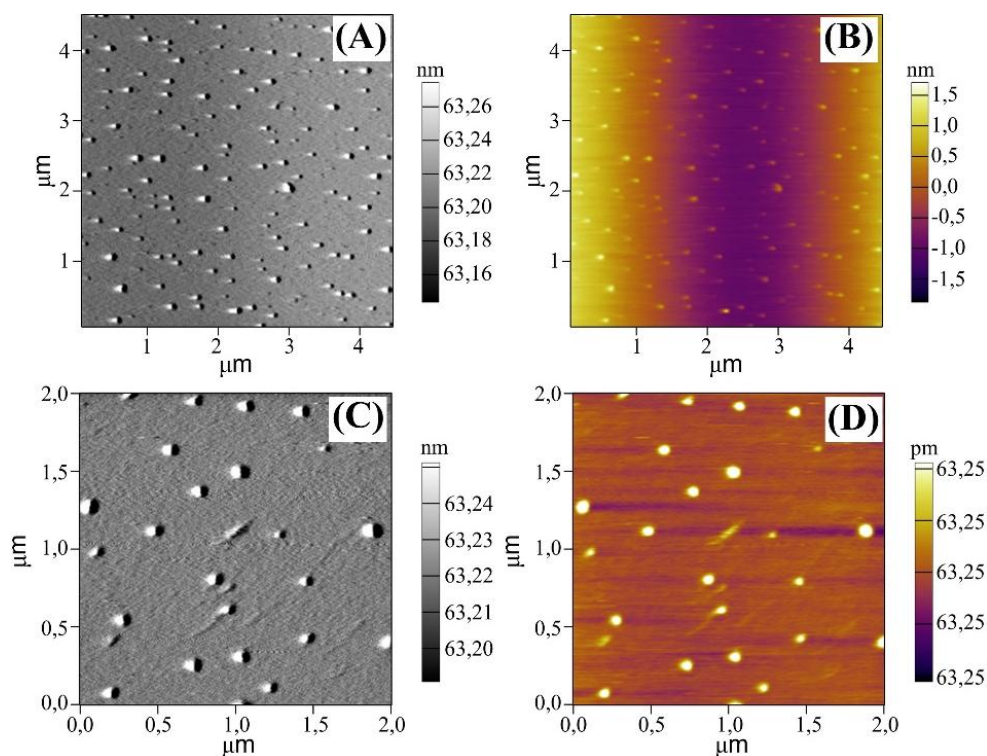
A morfologia das nanopartículas de CP-GMCM1h (Figura 24) e CP-GMCM1h-DOX (10:1) (Figura 25) foi determinada por microscopia de força atômica, observa-se que as nanopartículas são esféricas.

Figura 24 – Imagem de AFM das nanopartículas de CP-GMCM1h (A) e ampliação (C); imagem da altura das nanopartículas de CP-GMCM1h (B) e ampliação (D)



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 25 – Imagem de AFM das nanopartículas de CP-GMCM1h-DOX (10:1) (A) e ampliação (C); imagem da altura das nanopartículas de CP-GMCM1h-DOX (10:1) (B) e ampliação (D)



Fonte: Dados da pesquisa.

A Tabela 12 apresenta os tamanhos das nanopartículas de CP-GMCM1h e CP-GMCM1h-DOX (10:1) determinadas por AFM.

Tabela 12 – Tamanho das nanopartículas de CP-GMCM1h e CP-GMCM1h-DOX (10:1) determinadas por AFM

Nanopartícula	Tamanho (nm)
CP-GMCM1h	91 ± 9
CP-GMCM1h-DOX (10:1)	78 ± 8

Fonte: Dados da pesquisa.

As nanopartículas apresentaram tamanho menor do que o observado para esses mesmos materiais por DLS, essa diferença ocorre, pois, a análise por AFM é realizada com a mostra seca, em quando que por DLS é analisado o diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas. Observa-se que as nanopartículas carregadas com DOX são menores que as nanopartículas sem DOX em ambas nas técnicas de análise.

4.4.5 Liberação *in vitro* de DOX das nanopartículas

A liberação *in vitro* da DOX das nanopartículas de CP-GMCM1h-DOX (10:1) foi realizada em tampão PBS com pH 7,4 e 5,0 (Figura 26). Para interpretar o mecanismo de liberação de DOX das nanopartículas, utilizou-se o modelo de Zeng (Zeng; Na; Wu. 2011). As Equações 11 e 12 são as equações para o modelo de Zeng.

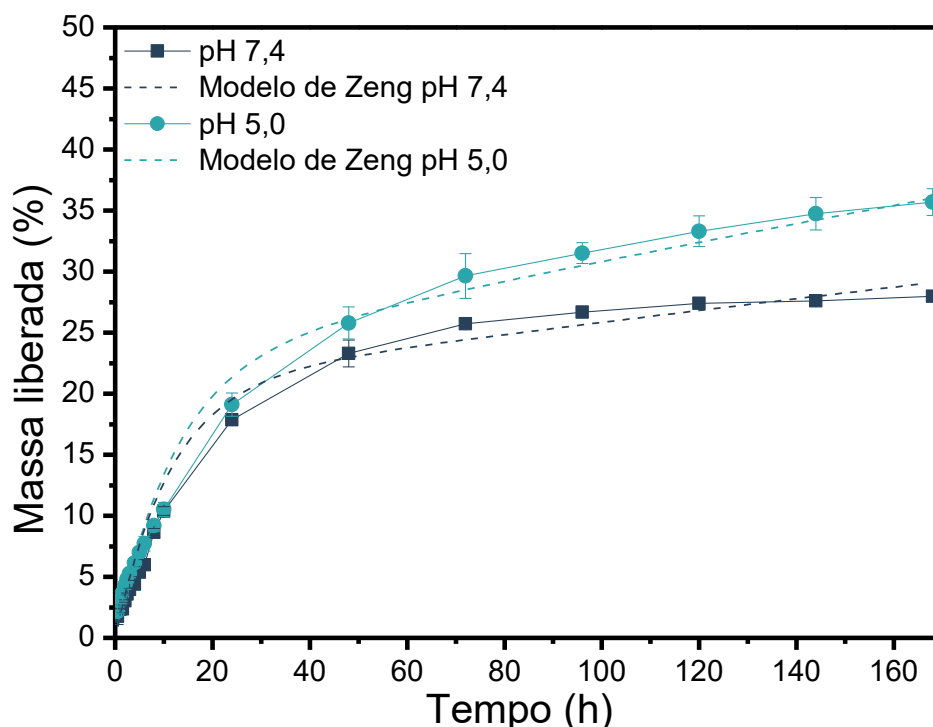
$$\frac{M_t}{M_\infty} = \frac{K_{off}}{K_{on} + K_{off}} \left(1 - e^{-K_s t}\right) + \frac{K_{on}}{K_{on} + K_{off}} \left(1 - e^{-K_{off} t}\right) \quad (11)$$

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

onde K_{on} e K_{off} são as taxas de associação e dissociação do fármaco, respectivamente; K_s é a taxa constante de difusão/convecção; ΔG é a diferença entre as energias livres entre os estados livre e ligado; k_B é a constante de Boltzmann; T é a temperatura.

A Figura 26 apresenta os perfis de liberação de DOX das nanopartículas de CP-GMCM1h-DOX (10:1) em PBS (0,1 mol L⁻¹) + Lauril 0,1% (m/v) com pH 7,4 e 5,0 e o modelo de Zeng para cada perfil de liberação. A Tabela 13 apresenta os valores dos parâmetros do modelo de Zeng para cada perfil de liberação.

Figura 26 – Perfis de liberação de DOX das nanopartículas de CP-GMCM1h-DOX (10:1) em PBS (0,1 mol L⁻¹) + Lauril 0,1% (m/v) com pH 7,4 e 5,0 e o modelo de Zeng para cada perfil de liberação



Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 13 – Parâmetros do modelo de Zeng para os perfis de liberação de DOX das nanopartículas em PBS (0,1 mol L⁻¹) + Lauril 0,1% (m/v) com pH 7,4 e 5,0

pH	K _{off}	K _{on}	K _s	ΔG (x10 ²⁰ J)	R ²
7,4	0,0066	0,0025	0,0886	-1,65	0,9910
5,0	0,0010	0,0033	0,0769	-1,44	0,9401

Fonte: Dados da pesquisa.

Observa-se que tanto no pH 7,4 quanto no pH 5,0 o parâmetro K_s é maior que os parâmetros K_{on} e K_{off}, isso indica que ocorre uma liberação mais rápida inicial por difusão do fármaco que está interagindo mais fracamente com a matriz, seguido de uma liberação mais lenta do fármaco que está interagindo mais fortemente com a matriz. Desse modo, a DOX adsorvida na estrutura da nanopartícula é liberar primeiro, seguida da liberação da DOX que está ligada à nanopartícula. O maior valor de ΔG observado para a liberação em pH 5,0 indica um enfraquecimento na ligação entre o fármaco e a matriz, isso pode ser explicado pela maior facilidade de hidrólise da ligação amida que existe entre fármaco e matriz.

A liberação de DOX após 168 h em pH 7,4 (pH de células saudáveis) foi de 27,9 % ± 0,1%, enquanto para pH 5,0 (pH de tecidos com células cancerosas) a liberação foi de 36,0% ± 1,1%, comportamento similar foi observado no trabalho de Wang *et al.* (2019), para a

liberação de DOX conjugada a microesferas de inulina por química de carbodiimidas, após 168 h em pH 7,4 havia sido liberado 24 % do fármaco, enquanto em pH 5,2, a quantidade de fármaco liberada foi de 36 %.

5 CONCLUSÃO

Observou-se a influência da carga da galactomanana caboximetilada na reação de copolimerização radicalar do PNIPAM utilizando KPS, com o aumento do GS da galactomanana precursora, ou seja, quanto maior a carga, verificou-se o aumento no teor de PNIPAM enxertado ao polissacarídeo.

A concentração de associação crítica dos copolímeros também sofreu influência da carga das galactomananas precursoras, observou-se que quanto maior o GS do material, maior é a CAC, devido ao aumento da hidrofilicidade pela presença de mais cargas.

Apenas o CP-GMCM1h apresentou tamanho de nanopartícula adequado para a liberação de fármacos em células. O menor tamanho de nanopartícula para este material é devido sua massa molar menor que o CP-GM e por apresentar menos carga que o CP-GMCM2h, que lhe confere menor repulsão entre as cadeias do polissacarídeo.

A maior liberação de DOX do CP-GMCM1h-DOX (10:1) em pH mais ácido (pH 5,0), indica que esse material pode liberar o fármaco de modo mais específico em células cancerígenas, visto que, essas células são mais ácidas quando comparadas com células não tumorais.

REFERÊNCIAS

- ABREU, C. M.; PAULA, H. C.; SEABRA, V.; FEITOSA, J. P.; SARMENTO, B.; DE PAULA, R. C. Synthesis and characterization of non-toxic and thermo-sensitive poly(*N*-isopropylacrylamide)-grafted cashew gum nanoparticles as a potential epirubicin delivery matrix. **Carbohydrate Polymers**, v. 154, p. 77-85, 2016.
- 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. 558-596, 2022.
- ALMAJIDI, Y. Q.; KADHIM, M. M.; ALSAIKHAN, F.; JALIL, A. T.; SAYYID, N. H.; RAMÍREZ-CORONEL, A. A.; JAWHAR, Z. H.; GUPTA, J.; NABAVI, N.; YU, W. ERTAS, Y. N. Doxorubicin-loaded micelles in tumor cell-specific chemotherapy. **Environmental Research**, v. 227, p. 115722, 2023.
- ALMEIDA, H.; AMARAL, M. H.; LOBÃO, P. Temperature and pH stimuli-responsive polymers and their applications in controlled and selfregulated drug delivery. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 2, p. 01-10, 2012.
- ARSHAD, R.; ARSHAD, M. S.; RAHDAR, A.; HASSAN, D.; BEHZADMEHR, R.; GHOTEKAR, S.; MEDINA, D. I.; PANDEY, S. Nanomaterials as an advanced nano-tool for the doxorubicin delivery/Co-Delivery—A comprehensive review. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 83, p. 104432, 2023.
- AVIGAD, G.; DEY, P. M. Carbohydrates metabolism: Storage carbohydrates. **Plant Biochemistry**, v. 1, p. 143-204, 1997.
- BADWAIK, H. R.; KUMARI, L.; MAITI, S.; SAKURE, K.; NAKHATE, K. T.; TIWARI, V.; GIRI, T. K. A review on challenges and issues with carboxymethylation of natural gums: The widely used excipients for conventional and novel dosage forms. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 209, p. 2197-2212, 2022.
- BAKE, G.; YUSUF, I.; SADIKU, S. Evaluation and Nutrient Quality of Toasted Flamboyant Seed (*Delonix regia*) Meal in the Diet of *Clarias gariepinus* Fingerlings. **Journal of Agriculture and Ecology Research International**, v. 5, n. 2, p. 1-9, 2016.
- BUCKERIDGE, M. S.; DIETRICH, S. M. C.; LIMA, D. U. Galactomannans as the reserve carbohydrate in legume seeds. **Developments in crop science**. Elsevier, v. 26, p. 283-316, 2000.
- BUKOWSKI, K.; KCIUK, M.; KONTEK, R. Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. **International Journal of Molecular Science**, v. 21, p. 3233, 2020.
- CARNEIRO, M. J.; PAULA, C. B.; RIBEIRO, I. S.; DE LIMA, L. R.; RIBEIRO, F. O.; SILVA, D. A.; SILVA, D. U.; ARAÚJO, G. S.; FILHO, J. D. B. M.; FREIRE, R. S.; FEITOSA, J. P. A.; DE PAULA, R. C. Dual responsive dextran-graft-poly (*N*-isopropylacrylamide)/doxorubicin prodrug via Schiff base reaction. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 185, p. 390-402, 2021.

CHAKKA, V. P.; ZHOU, T. Carboxymethylation of polysaccharides: Synthesis and bioactivities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 165, p. 2425-2431, 2020.

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

CONSTANTIN, M.; BUCĂȚARIU, S.; STOICA, I.; FUNDUEANU, G. Smart nanoparticles based on pullulan-g-poly(*N*-isopropylacrylamide) for controlled delivery of indomethacin: Paper dedicated to the 150th anniversary of the Romanian Academy. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 94, p. 698-708, 2017.

CUNHA, P. L. R.; PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. **Química Nova**, v. 32, p. 649-660, 2009.

DE PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A.; PAULA, H. C. B. Polysaccharide based copolymers as supramolecular systems in biomedical applications. **Current drug targets**, v. 16, n. 14, p. 1591-1605, 2015.

DE-COLLE, C.; KIRBY, A.; RUSSEL, N.; SHAITELMAN, S. F.; CURREY, A.; DONOVAN, E.; HAHN, E.; HAN, K.; ANANDADAS, C. N.; MAHMOOD, F.; LORRENZEN, E. L.; BONGARD, D.; KOERKAMP, M. L. G.; NACHBAR, M.; THORWARTH, D. Adaptive radiotherapy for breast cancer. **Clinical and Translational Radiation Oncology**, v. 39, p. 100564, 2022.

DONG, Q.; WU, D.; LI, M.; DONG, W. Polysaccharides, as biological macromolecule-based scaffolding biomaterials in cornea tissue engineering: A review. **Tissue and Cell**, v. 76, p. 101782, 2022.

DOS SANTOS, A. T.; DA SILVA, E. L.; MONTENEGRO, R. C.; DE SOUSA, J. S.; DE PAULA, R. C.; FEITOSA, J. P. Stable and Thermo-Responsive Dextran Sulfate-Graft-PNIPAm Amphiphilic Nanoparticles for Potential Target Methotrexate Delivery. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.00, p. 1-11, 2023.

DU, J.; SUN, R.; ZHANG, S.; ZHANG, L. F.; XIONG, C. D.; PENG, Y. X. Novel polyelectrolyte carboxymethyl konjac glucomannan-chitosan nanoparticles for drug delivery. I. Physicochemical characterization of the carboxymethyl konjac glucomannan-chitosan nanoparticles. **Biopolymers**, v. 78, n. 1, p. 1-8, 2005.

EXNER, K. S.; IVANOVA, A. A doxorubicin-peptide-gold nanoparticle conjugate as a functionalized drug delivery system: exploring the limits. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 24, n. 24, p. 14985-14992, 2022.

G1. **Primavera ‘pinta’ Brasília de flores e cores**. Brasília, 2012. Disponível em: <https://g1.globo.com/distrito-federal/fotos/2012/11/primavera-pinta-brasilia-de-flores-e-cores-veja-fotos.html>. Acesso em: 14 dez. 2022.

GARCIA-VALDEZ, O.; CHAMPAGNE, P.; CUNNINGHAM, M. F. Graft modification of natural polysaccharides via reversible deactivation radical polymerization. **Progress in Polymer Science**, v. 76, p. 151-173, 2018.

GAO, C., TANG, F., GONG, G., ZHANG, J., HOI, M. P., LEE, S. M., & WANG, R. pH-responsive prodrug nanoparticles based on a sodium alginate derivative for selective co-release of doxorubicin and curcumin into tumor cells. **Nanoscale**, v. 9, p. 12533-12542, 2017.

GEORGE, J.; ROCKALL, T. Surgery for colorectal cancer. **Surgery (Oxford)**, v. 41, p. 35-40, 2022.

GHIMICI, L.; CONSTANTIN, M. Novel thermosensitive flocculating agent based on pullulan. **Journal of Hazardous Materials**, v. 192, p. 1009-1016, 2011.

GHOSH, N.; MITRA, S.; BISWAS, S.; BANERJEE, E. R. Mannose-rich guar gum nanoparticles as a novel therapeutic drug against inflammatory diseases. **Journal of Molecular Biochemistry**, v. 7, p. 14-27, 2018.

GOMES, R. F.; LIMA, L. R.; FEITOSA, J. P.; PAULA, H. C.; DE PAULA, R. C. Influence of galactomannan molar mass on particle size galactomannan-grafted-poly-*N*-isopropylacrylamide copolymers. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 156, p. 446-453, 2020.

GONG, H.; LI, W.; SUN, J.; JIA, L.; GUAN, Q.; GUO, Y.; WANG, Y. A review on plant polysaccharide based on drug delivery system for construction and application, with emphasis on traditional Chinese medicine polysaccharide. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 211, p. 711-728, 2022.

GUPTA, N. R.; GHUTE, P. P.; BADIGER, M. V. Synthesis and characterization of thermo-sensitive graft copolymer of carboxymethyl guar and poly (*N*-isopropylacrylamide). **Carbohydrate polymers**, v. 83, p. 74-80, 2011.

GUPTA, S.; SHARMA, P.; SONI, P. L. Carboxymethylation of Cassia occidentalis seed gum. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 94, p. 1606-1611, 2004.

HUANG, D.; ZHOU, Y.; XIANG, Y.; SHU, M.; CHEN, H.; YANG, B.; LIAO, X. Polyurethane/doxorubicin nanoparticles based on electrostatic interactions as pH-sensitive drug delivery carriers. **Polymer International**, v. 67, p. 1186–1193, 2018.

KAPOOR, V. P. A galactomannan from the seeds of *Delonix regia*. **Phytochemistry**, v. 11, p. 1129-1132, 1972.

KEDZIOR, S. A.; ZOPPE, J. O.; BERRY, R. M.; CRANSTON, E. D. Recent advances and an industrial perspective of cellulose nanocrystal functionalization through polymer grafting. **Current Opinion in Solid State and Materials**, v. 23, p. 74-91, 2019.

KEKEZ, B.; GOJGIĆ-CVIJOVIĆ, G.; JAKOVLJEVIĆ, D.; PAVLOVIĆ, V.; BEŠKOSKI, V.; POPOVIĆ, A.; VRVIĆ, M. M.; NIKOLIĆ, V. Synthesis and characterization of a new type of levan-graft-polystyrene copolymer. **Carbohydrate Polymers**, v. 154, p. 20-29, 2016.

KHIMANI, M.; YUSA, S. I.; ASWAL, V. K.; BAHADUR, P. Aggregation behavior of double hydrophilic block copolymers in aqueous media. **Journal of Molecular Liquids**, v. 276, p. 47-56, 2019.

KHOSA, A.; REDDI, S.; SAHA, R. N. Nanostructured lipid carriers for site-specific drug delivery. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 103, p. 598-613, 2018.

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. 277-282, 2012.

KIRSCHNING, A.; DIBBERT, N.; DRÄGER, G. Chemical Functionalization of Polysaccharides-Towards Biocompatible Hydrogels for Biomedical Applications. **Chemistry-A European Journal**, v. 24, p. 1231-1240, 2018.

KUMAR, M.; GEHLOT, P. S.; PARIHAR, D.; SUROLIA, P. K.; PRASAD, G. Promising grafting strategies on cellulosic backbone through radical polymerization processes – A review. **European polymer journal**, v. 152, p. 110448, 2021.

KUMAR, R.; SHARMA, R. K.; SINGH, A. P. Grafting of cellulose with *N*-isopropylacrylamide and glycidyl methacrylate for efficient removal of Ni(II), Cu(II) and Pd(II) ions from aqueous solution. **Separation and Purification Technology**, v. 219, p. 249-259, 2019.

LANZALACO, S.; ARMELIN, E. Poly(*N*-isopropylacrylamide) and copolymers: A review on recent progresses in biomedical applications. **Gels**, v. 3, p. 36-67, 2017.

LEE, J. H.; YANG, S. B.; LEE, J. H.; LIM, H.; LEE, S.; KANG, T. B.; LIM, J. B.; KIM, Y. J.; PARK, J. Doxorubicin covalently conjugated heparin displays anti-cancer activity as a self-assembled nanoparticle with a low-anticoagulant effect. **Carbohydrate Polymers**, v. 314, p. 120930, 2023.

LI, J.; ZHANG, B.; YUE, C.; WU, J.; ZHAO, L.; SUN, D.; WANG, R. Strategies to release doxorubicin from doxorubicin delivery vehicles. **Journal of Drug**. V. 26, p. 9-26, 2018.

LI, M.; ZHAO, Y.; ZHANG, W.; ZHANG, S.; ZHANG, S. Multiple-therapy strategies via polysaccharides-based nano-systems in fighting cancer. **Carbohydrate Polymers**, v. 269, p. 118323, 2021.

LIMA, E. L.; VASCONCELOS, N. F.; MACIEL, J. S.; ANDRADE, F. K.; VIEIRA, R. S.; FEITOSA, J. P. A. Injectable hydrogel based on dialdehyde galactomannan and *N*-succinyl chitosan: a suitable platform for cell culture. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 31, p. 1-13, 2020.

LIMA, I. C.; CASTRO, R. R.; ADJAFRE, B. L.; SOUSA, S. H.; DE PAULA, D. S.; ALVES, A. P. N.; SILVA, P. G. B.; ASSREUY, A. M. S.; MOTA, M. R. Galactomannan of *Delonix regia* seeds modulates cytokine expression and oxidative stress eliciting anti-inflammatory and healing effects in mice cutaneous wound. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 203, p. 342-349, 2022.

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. 144-154, 2021a.

LIMA, L. R.; CAVALCANTE, C. M. A.; CARNEIRO, M. J.; MENDES, J. F.; SOUSA, N. A.; FREIRE, R. S.; PINTO, V. P. T.; FONTENELLE, R. O. S.; FEITOSA, J. P. A.; DE PAULA, R. C. M. Thermal responsive poly-*N*-isopropylacrylamide/galactomannan copolymer nanoparticles as a potential amphotericin delivery carrier. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**, v. 2, p. 100126, 2021b.

LIU, M.; SONG, X.; WEN, Y.; ZHU, J. L.; LI, J. Injectable Thermoresponsive Hydrogel Formed by Alginate-g-Poly(*N*-isopropylacrylamide) That Releases Doxorubicin-Encapsulated Micelles as a Smart Drug Delivery System. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 9, p. 35673–35682, 2017a.

LIU, S.; SUN, G. Radical graft functional modification of cellulose with allyl monomers: Chemistry and structure characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, p. 614–625, 2008.

LIU, Y.; YOU, Y.; LI, Y.; ZHANG, L.; TANG, T.; DUAN, X.; CHENG, X.; LIU, A.; HU, B.; CHEN, D. Characterization of carboxymethylated polysaccharides from *Catathelasma ventricosum* and their antioxidant and antibacterial activities. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 355–362, 2017b.

LUNDQVIST, E. Å.; FUJIWARA, K.; SEOUD, M. Principles of chemotherapy. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 131, p. 146-149, 2015.

LUO, Y. L.; YU, W.; XU, F.; ZHANG, L. L. Novel thermo-responsive self-assembly micelles from a double brush-shaped PNIPAM-g-(PA-b-PEG-b-PA)-g-PNIPAM block copolymer with PNIPAM polymers as side chains. **Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry**, v. 50, p. 2053-2067, 2012.

MA, X.; YANG, S.; ZHANG, T.; WANG, S.; YANG, Q.; XIAO, Y.; SHI, X.; XUE, P.; KANG, Y.; LIU, G.; SUN, Z. J.; XU, Z. Bioresponsive immune-booster-based prodrug nanogel for cancer immunotherapy. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 12, p. 451-466, 2022.

MARQUES, A. C.; COSTA, P. J.; VELHO, S.; AMARAL, M. H. Functionalizing nanoparticles with cancer-targeting antibodies: A comparison of strategies. **Journal of Controlled**, v. 320, p. 180-200, 2020.

MENG, Q.; ZHONG, S.; GAO, Y.; CUI, X. Advances in polysaccharide-based nano/microcapsules for biomedical applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 220, p. 878-891, 2022.

MIAO, Y.; FENG, Y.; BAI, J.; LIU, Z.; ZHAO, X. Optimized mesoporous silica nanoparticle-based drug delivery system with removable manganese oxide gatekeeper for controlled delivery of doxorubicin. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 592, p. 227–236, 2021.

- NARANG, P.; VENKATESU, P. Efficacy of several additives to modulate the phase behavior of biomedical polymers: A comprehensive and comparative outlook. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 274, p. 102042, 2019.
- NWOKOCHA, L. M.; WILLIAMS, P. A.; YADAV, M. P. Physicochemical characterisation of the galactomannan from *Delonix regia* seed. **Food Hydrocolloids**, v. 78, p. 132-139, 2018.
- ODIAN, G. **Principles of polymerization**. 4 ed. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 2004.
- PATRIZI, M. L.; PIANTANIDA, G.; COLUZZA, C.; MASCI, G. ATRP synthesis and association properties of temperature responsive dextran copolymers grafted with poly(*N*-isopropylacrylamide). **European Polymer Journal**, v. 45, p. 2779-2787, 2009.
- PINHEIRO, M. **O que é câncer, como surge e diagnóstico**. 2018. Disponível em: <https://www.tuasaude.com/como-surge-o-cancer/>. Acesso em: 14 dez. 2022.
- PRAJAPATI, V. D.; JANI, G. K.; MORADIYA, N. G.; RANDERIA, N. P. Pharmaceutical applications of various natural gums, mucilages and their modified forms. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 1685-1699, 2013.
- RAMOS, E. L. L. **Preparo e caracterização de hidrogéis injetáveis de galactomanana de *Delonix regia* oxidada e gelatina**. 2016. 63f. Dissertação (Mestrado em química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.
- REIS, C. P.; NEUFELD, R. J.; RIBEIRO, A. J.; VEIGA, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 2, p. 8-21, 2006.
- RICO, T. M.; MACHADO, K. S.; FERNANDES, V. P.; MADRUGA, S. W.; SANTIN, M. M.; PETRARCA, C. R.; DUMITH, S. C. Use of Text Messaging (SMS) for the Management of Side Effects in Cancer Patients Undergoing Chemotherapy Treatment: a Randomized Controlled Trial. **Journal of Medical Systems**, v. 44, p. 1-12, 2020.
- RODRIGUEZ-CANTO, W.; CHEL-GUERRERO, L.; FERNANDEZ, V. V. A.; AGUILAR-VEGA, M. *Delonix regia* galactomannan hydrolysates: Rheological behavior and physicochemical characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 206, p. 573-582, 2019.
- SALAMEKH, S.; YAN, J.; D'CUNHA, P.; HOANG, A. Q.; ZHU, H.; ALBUQUERQUE, K. Addition of postoperative radiation therapy after preoperative chemotherapy and surgery in patients with locally advanced endometrial cancer is associated with improved outcomes. **Advances in Radiation Oncology**, v. 8, p. 101126, 2022.
- SARMAH, J. K.; BHATTACHARJEE, S. K.; ROY, S.; MAHANTA, R.; MAHANTA, R. Biodegradable Guar Gum Nanoparticles as Carrier for Tamoxifen Citrate in Treatment of Breast Cancer. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 05, p. 220-228, 2014.
- SCHILD, H. G. Poly(*N*-isopropylacrylamide): experiment, theory and application. **Progress in Polymer Science**, v. 17, p. 163-249, 1992.

SHI, H. Y.; ZHANG, L. M. New grafted polysaccharides based on O-carboxymethyl-O-hydroxypropyl guar gum and *N*-isopropylacrylamide: Synthesis and phase transition behavior in aqueous media. **Carbohydrate polymers**, v. 67, p. 337-342, 2007.

SHINDE, V. R.; REVI, N.; MURUGAPPAN, S.; SINGH, S. P.; RENGAN, A. K. Enhanced permeability and retention effect: A key facilitator for solid tumor targeting by nanoparticles. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 39, p. 102915, 2022.

SILVA, D. A.; DE PAULA, R. C.; FEITOSA, J. P.; DE BRITO, A. C.; MACIEL, J. S.; PAULA, H. C. Carboxymethylation of cashew tree exudate polysaccharide. **Carbohydrate Polymers**, v. 58, p. 163-171, 2004.

SRITHARAN, S.; SIVALINGAM, N. A comprehensive review on time-tested anticancer drug doxorubicin. **Life sciences**, v. 278, p. 119527, 2021.

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. 209-249, 2021.

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

SUR, S.; RATHORE, A.; DAVE, V.; REDDY, K. R.; CHOUHAN, R. S.; SADHU, V. Recent developments in functionalized polymer nanoparticles for efficient drug delivery system. **Nano-Structures & Nano-Objects**, v. 20, p. 100397, 2019.

TAMAKI, Y.; TERUYA, T.; TAKO, M. The chemical structure of galactomannan isolated from seeds of *Delonix regia*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 74, p. 1110-1112, 2010.

THOMBARE, N.; JHA, U.; MISHRA, S.; SIDDIQUI, M. Z. Guar gum as a promising starting material for diverse applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 88, p. 361-372, 2016.

TOSH, B.; ROUTRAY, C. R. Chemical Science Review and Letters Grafting of Cellulose Based Materials: A Review. **Chemical Science Review and Letters**, v. 3, p. 74-92, 2014.

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. 3823-3834, 2020.

VERRAEEST, D. L.; PETERS, J. A.; BATELAAN, J. G.; VAN BEKKUM, H. Carboxymethylation of inulin. **Carbohydrate Research**, v. 271, p. 101-102, 1995.

VILARÓ, P.; BENNADJI, Z.; BUDELLI, E.; MOYNA, G.; PANIZZOLO, L.; FERREIRA, F. Isolation and characterization of galactomannans from *Prosopis affinis* as potential gum substitutes. **Food Hydrocolloids**, v. 77, p. 711-719, 2018.

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, 2019.

WORLD Health Organization [WHO]. **Cancer**. 2022. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Acesso em: 26 nov. 2022.

YADAV, H.; MAITI, S. Research progress in galactomannan-based nanomaterials: Synthesis and application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 136, p. 2113-2126, 2020.

YANG, J.; HAN, C. R.; DUAN, J. F.; MA, M. G.; ZHANG, X. M.; XU, F.; SUN, R. C. Synthesis and characterization of mechanically flexible and tough cellulose nanocrystals-polyacrylamide nanocomposite hydrogels. **Cellulose**, v. 20, p. 227-237, 2013a.

YANG, L.; LIU, T.; SONG, K.; WU, S.; FAN, X. Effect of intermolecular and intramolecular forces on hydrodynamic diameters of poly(*N*-isopropylacrylamide) copolymers in aqueous solutions. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 127, n. 6, p. 4280-4287, 2013b.

YANG, X.; SHI, X.; D'ARCY, R.; TIRELLI, N.; ZHAI, G. Amphiphilic polysaccharides as building blocks for self-assembled nanosystems: molecular design and application in cancer and inflammatory diseases. **Journal of Controlled Release**, v. 272, p. 114-144, 2018.

YESHCENKO, O. A.; KUTSEVOL, N. V.; TOMCHUK, A. V.; KHORT, P. S.; KUZIV, Y. I.; HUDHOMME, P.; KRUPKA, O. M. Dextran-graft-PNIPAM / Au nanoparticles / perylenediimide hybrid system as thermosensitive optical switches and fluorescent labels for potential use in nanophotonics and biomedical applications. **Optical Materials**, v. 131, p.112753, 2022.

ZENG, L.; AN, L.; WU, X. Modeling Drug-Carrier Interaction in the Drug Release from Nanocarriers. **Journal of Drug Delivery**, v. 2011, p. 1–15, 2011.

ZHAO, H.; SUN, D.; TANG, Y.; YAO, J.; YUAN, X.; ZHANG, M. Thermo/pH dual-responsive core-shell particles for apatinib/doxorubicin controlled release: Preparation, characterization and biodistribution. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 6, p. 7621-7633, 2018.