

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

Centro de Ciências da Natureza

Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Química



Dissertação de Mestrado

**NANOPARTÍCULAS DERIVADAS DA GOMA DO ANGICO BRANCO E
GLICEROL: ALTERNATIVA PARA ENTREGA DE FÁRMACOS**

Tallyta Nogueira Fernandes

Teresina – PI
2019

TALLYTA NOGUEIRA FERNANDES

**NANOPARTÍCULAS DERIVADAS DA GOMA DO ANGICO BRANCO E
GLICEROL: ALTERNATIVA PARA ENTREGA DE FÁRMACOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Piauí como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de MESTRE EM QUÍMICA – Área: Química Inorgânica

Orientadora: Carla Verônica Rodarte de Moura

Teresina – PI
2019

FICHA CATALOGRÁFICA
Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do CCN

F363n Fernandes, Tallyta Nogueira
Nanopartículas derivadas da goma do angico branco e glicerol: alternativa para entrada de fármacos / Tallyta Nogueira Fernandes. – Teresina, 2019.
65f. il. color

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências da Natureza, Pós-Graduação em Química, 2019.

Orientadora: Profa. Dra. Carla Verônica Rodarte de Moura.

1. Química Inorgânica. 2. *Anadenanthera Colubrina*. 3. Glicerol. 4. Fármacos. I. Título.

CDD 546.3

*À Deus,
Meus Pais, Maria do Socorro Nogueira
Fernandes e Jânio Soares Fernandes
Minha Filha Maria Clara Fernandes de Abreu,
À meu esposo Wiury Chaves de Abreu*

AGRADECIMENTOS

À Deus, sempre! Pela força, fé e acordar de todas as manhãs;

Aos meus pais, Maria do Socorro Nogueira Fernandes e Jânio Soares Fernandes que juntos tornam um chão seguro ao qual sei que posso me firmar! E não mediram esforços para me educar, incentivando os meus sonhos e objetivos. É aonde encontro minha força depositada por Deus;

À minha pequena Maria Clara Fernandes de Abreu... sempre... motivo de agradecimento pela sua existência... o seu sorriso, motivo pelo qual abro meus olhos todos os dias. Tão pequena, tão sábia e madura, mesmo eu tendo que várias vezes deixar de lhe dar atenção para estudar. Obrigada por me ensinar todos os dias o significado de Amor Incondicional;

Ao meu esposo Wiury Chaves de Abreu por todo o incentivo e segurar a minha mão sempre que quero desabar, sem a sua mão não teria conseguido... segurança, companheirismo, inspiração e coragem;

Aos meus irmãos, Antônio Tássio e Tacianne que são os meus dois braços, nos quais cresci pegando na mão de cada um; obrigada por todo o companheirismo e incentivos...quando eu crescer, quero ser um pouco de cada um de vocês...Determinação e coragem;

Aos meus sobrinhos Ângelo Guilherme, Sophie e Maria Isabelle...pedacinhos de gente aos quais agradeço por me deixarem ama-los mesmo à distância;

Aos meus avôs Sebastião e Delzira (*in memória*) pela linda infância que tive;

Mãe Nicinha, obrigada por me ensinar a amar a Deus sobre todas as coisas;

Vô França (*in memória*, ainda lembro dos beijos de boa noite);

Aos meus tios, tias e primos que sempre me apoiaram e me proporcionaram ensinamentos, sorrisos e diversão;

A minha Orientadora professora Dra. Carla Verônica Rodarte de Moura pela a oportunidade de aprender, os ensinamentos profissionais e de vida, amizade e paciência por todos esses anos;

Aos amigos de vida, graduação e pós-graduação presentes fisicamente ou de coração que me ajudaram a construir um pouco de quem sou hoje;

Aos professores que contribuíram de alguma forma com esse trabalho: prof. Dr. Edmilson Miranda de Moura, prof. Dr. Anderson Nogueira Mendes, prof. Dr. Cícero Alves Lopes Junior, prof. Dr. Alexandre Araújo de Souza;

Ao professor Dr. José Milton Elias de Matos pelo o acolhimento;

Aos professores de graduação e pós-graduação por não medirem esforços ao repassar os seu ensinamentos;

Aos amigos de laboratório (LBM) pelo companheirismo e perrengues diários;

Aos amigos e companheiros Bernardo Ferreira, Jefferson Magalhães e Diego Botelho pelas contribuições para a realização desse trabalho;

Ao professor Dr. Edivan Carvalho Me. Thiago Linus por gentilmente se disponibilizar a ajudar nesse trabalho, disponibilizando aparelhos essenciais para a realização do mesmo;

Aos membros da Banca (qualificação e defesa) pelas contribuições e se disponibilizarem a avaliar esse trabalho;

Aos técnicos e coordenadores dos laboratórios LIMAV, LAS da UFPI, Laboratório de RMN da UNESP, prof. Dr. Vicente Gauber e Gilvan Paz do Instituto Federal do Piauí por realizarem as análises de Potencial Zeta, DLS, RMN ¹³C e TG;

A CAPES pela bolsa de pesquisa concedida.

“Nossa maior fraqueza está em desistir. O caminho mais certo de vencer é tentar mais uma vez.”
(Thomas Edson)

“É graça Divina começar bem. Graça maior persistir na caminhada certa. Mas graças das Graças é não desistir nunca.”
(Dom Hélder Câmara)

RESUMO

A utilização de polissacarídeos derivados de gomas naturais é uma alternativa para sistemas *drug delivey*, devido as suas propriedades biocompatíveis, o que resulta em melhorias nos efeitos adversos dos fármacos. Esse trabalho estudou a utilização de nanopartículas da goma de angico branco purificada (NpAB) e do angico branco misturada com glicerol (NpAGL) como entregadores de Anfotericina B. As nanopartículas foram sintetizadas, diálisada e caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (IV), ressonância magnética nuclear (RMN), termogravimetria (TG), quanto a sua distribuição de tamanho médio e potencial zeta, quantidade de fármaco incorporado e liberado e atividade hemolítica. A goma de angico foi isolada do exsudado com rendimento de 87,54 % e as etapas de purificações com 74,67 e 78,93 %. Os espectros das nanopartículas carregadas com AmB absorveram na região do IV em 1100 e 950 cm^{-1} caracterizando a incorporação da Anfotericina B. As análises termogramimétricas auxiliaram na caracterização, ficando evidente a incorporação do fármaco, a presença de heteropolissacarídeo na goma de angico branco e total polimerização do glicerol na formação da NpAGL. As nanopartículas NpAB apresentaram tamanhos entre 45,1 e 267,6 nm e NpAGL apresentaram tamanhos variados de 49,3 nm, 176,2 nm e 828,0 nm, após a incorporação do fármaco, as NpAB-AmB apresentaram tamanho 131,7 nm e as NpAGL-AmB tiveram a formação de tamanho de 53,3 nm e 161,9 nm. As imagens de MEV mostraram nanopartículas esféricas. O estudo de liberação *in vitro* do fármaco seguiu de liberação controlada até aproximadamente 24 h, e pôde-se verificar que este se ajusta ao modelo matemático *Log-Logistic*. As nanopartículas não apresentaram característica hemolítica.

PALAVRAS-CHAVE: ANADENANTHERA COLUBRINA, GLICEROL, ENTREGA DE FÁRMACOS.

ABSTRACT

The use of polysaccharides derived from natural gums is an alternative for drug delivery systems, due to their biocompatible properties, which results in improvements in the adverse effects of the drugs. This work investigated the use of nanoparticles of purified white angico gum (NpAB) and white angico mixed with glycerol (NpAGL) as amphotericin B delivery agents. The nanoparticles were synthesized, dialyzed and characterized by scanning electron microscopy (SEM), spectroscopy in the infrared region (IR), nuclear magnetic resonance (NMR), thermogravimetry (TG), as well as their distribution of medium size and zeta potential, amount of incorporated and released drug and hemolytic activity. Angico gum was isolated from the exudate in 87,54 % yield and the purification steps were 74,67 and 78,93 %. The spectra of the nanoparticles loaded with AmB absorb in the IR region 1100 and 950 cm^{-1} featuring the incorporation of amphotericin B. Thermograms helped in the characterization, making evident the incorporation of the drug, the presence of heteropolysaccharide in the white angico gum and total polymerization of glycerol in the formation of NpAGL. The NpAB nanoparticles presented sizes between 45,1 and 267,6 nm and NpAGL presented varying sizes of 49,3 nm, 176,2 nm and 828,0 nm, after incorporation of the drug, NpAB-AmB presented a size 131,7 nm and NpAGL-AmB had the size formation of 53,3 nm and 161,9 nm. MEV images showed spherical nanoparticles. The in vitro release study of the drug followed controlled release until approximately 24 h, and it was verified that this one conforms to the Log-Logistic mathematical model. The nanoparticles did not present hemolytic characteristics.

KEYWORDS: ANADENANTHERA COLUBRIN, GLYCEROL, DRUG DELIVERY.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Esquema comparativo entre os métodos convencional e por nanoestruturas de fármacos.....	22
FIGURA 2. Tipos de nanopartículas poliméricas. Nanoesfera com o fármaco encapsulado na superfície e/ou dentro da partícula (A) e Nanocapsúla, com o fármaco encapsulado em veículo líquido dentro da partícula sólida (B).....	25
FIGURA 3. Estrutura química do poli(etilenoglicol) - PEG.	26
FIGURA 4. Exemplos de polissacarídeos, Celulose, composto apenas por glicose (A) e Representação de uma possível estrutura fragmentada da goma do angico (B)...	28
FIGURA 5. Imagens das partes da <i>Anadenanthera colubrina</i> : Arvore do angico branco (A), folhas e folhas (B), fruto do tipo vagem (C) e tronco (D).	30
FIGURA 6. Possível estrutura fragmentada da goma do angico branco proposta por Delgobo e colaboradores em 1998.....	31
FIGURA 7. Estrutura molecular do fármaco Anfotericina B.	32
FIGURA 8. Imagem de satélite da região geográfica da cidade de Rio Grande do Piauí.	35
FIGURA 9. Nódulos de exudados do angico branco coletado na cidade do Rio Grande do Piauí.	36
FIGURA 10. Espectros de Infravermelho das nanopartículas de (A) goma de angico branco (NpAB), Mistura AG (NpAGL) e do fármaco Anfotericina B (AmB); e (B) goma de angico branco incorporada com Anfotericina B (NpAB-AmB) e Mistura AG incorporada com Anfotericina B (NpAGL-AmB).	43
FIGURA 11. Espectros de RMN de ¹³ C da Goma de angico branco.	44
FIGURA 12. Análise termogravimétrica do fármaco Anfotericina B livre.....	45
FIGURA 13. Análises termogravimétricas das nanopartículas de (A) goma de angico branco (NpAB) e (B) goma do angico branco com glicerol (NpAGL).	46
FIGURA 14. Análises termogravimétricas das nanopartículas da (A) goma de angico branco incorporada com Anfotericina B (NpAB-AmB) e (B) Mistura AG incorporada com Anfotericina B (NpAGL-AmB).	48
FIGURA 15. Imagens de microscopia eletrônica de varredura das nanopartículas, NpAB (A) e NpAB-AmB (B).	50
FIGURA 16. Imagens de microscopia eletrônica de varredura das nanopartículas NpAGL (A) e NpAGL-AmB (B).	51

FIGURA 17. Curva de Calibração de Anfotericina B em DMSO.	52
FIGURA 18. Cinética de liberação in vitro das NPs de angico branco purificada carregadas com Anfotericina B (NpAB-AmB) e NPs da Mistura AG incorporada com Anfotericina B (NpAGL-AmB).	53
FIGURA 19. Curvas de cinética de liberação da AmB incorporadas nas Np's ajustadas ao modelo Logistic dose Response in Pharmacology (Log-logistic).....	55
FIGURA 20. Atividade hemolítica das NPs com e sem AmB em suspensão a 5% de glóbulos vermelhos após uma hora de incubação.....	56

LISTA DE FLUXOGRAMAS

FLUXOGRAMA 1. Fluxograma mostrando as etapas comuns aos estágios de isolamento e purificação da goma do angico branco.	37
--	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Comparação das etapas de isolamento e purificação da goma do angico branco.	41
TABELA 2. Tamanho médio (nm), índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta (mV) das nanopartículas de goma de angico branco (NpAB), Mistura AG (NpAGL), goma de angico branco incorporada com Anfotericina B (NpAB-AmB) e Mistura AG incorporada com Anfotericina B (NpAGL-AmB).	49
TABELA 3. Modelos matemáticos aplicados as curvas de liberação in vitro da AmB incorporada nas nanopartículas de NpAB e NpAGL.	54

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

DDS – Drug delivery systems;

AmB – Anfotericina B;

Nps – Nanopartículas;

NpAB – Nanopartículas derivadas do angico branco;

NpAGL – Nanopartículas derivadas do angico branco e glicerol;

NpAB-AmB – Nanopartículas derivadas do angico branco tendo o fármaco anfotericina B incorporado a elas;

NpAGL-AmB – Nanopartículas derivadas do angico branco e glicerol tendo o fármaco anfotericina B incorporado a elas;

FTIR – Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier;

RMN ¹³C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13;

TGA – Análise Termogravimétrica;

DLS – Espalhamento de Luz Dinâmica;

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura;

UV – Espectroscopia na Região do Ultravioleta;

IDP – Índice de Polidispersão.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 Nanotecnologia e Nanociência.....	20
2.1.1 Nanopartículas e Entrega de Fármacos	21
2.2 Nanopartículas Poliméricas.....	25
2.3 Goma do Angico	29
2.3.1 Angico branco.....	29
2.4 Anfoterecina B.....	32
3. OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo Geral	34
3.2 Objetivos Específicos.....	34
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	35
4.1 Isolamento e purificação da goma de angico branco.....	35
4.2 Rota de obtenção de nanopartículas.....	37
4.3 Síntese das nanopartículas.....	38
4.4 Espectroscopia de Infravermelho.....	38
4.5 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	38
4.6 Análise Termogravimétrica.....	39
4.7 Potencial Zeta e tamanho médio de partícula	39
4.8 Microscopia eletrônica de varredura	39
4.9 Teor do fármaco encapsulado.....	39
4.10 Estudo da liberação <i>in vitro</i>	40
4.11 Atividade hemolítica	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
5.1 Rendimento do processo de isolamento e purificação da goma do angico	41

5.2 Caracterização da goma de angico e das nanopartículas	41
5.2.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho	41
5.2.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN ¹³ C)	43
5.2.3 Análise Termogravimétrica (TG)	45
5.3 Tamanho médio de partícula e análise do potencial Zeta	48
5.4 Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura.....	50
5.5 Teor de encapsulamento e cinética <i>in vitro</i> das NPs com Anfotericina B	51
5.5.1 Teor de encapsulamento do fármaco	51
5.5.2 Liberação <i>in vitro</i> de Anfotericina B presente nas NPs	52
5.5.2 Estudo cinético da Liberação <i>in vitro</i> de Anfotericina B presente nas NPs	53
5.6 Atividade hemolítica	56
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1. INTRODUÇÃO

Cada vez mais a nanotecnologia vem ganhando espaço na medicina moderna, principalmente na solução de desafios dos sistemas de entregas de drogas, tais como o melhoramento da biodisponibilidade e os efeitos secundários, e ainda aumenta a segmentação de agentes terapêuticos para uma ampla variedade de doenças (DENG et al., 2014; MISRI et al., 2015). Com isso, a indústria farmacêutica está em constante busca de novos sistemas de distribuição e assim como agentes que possam ser utilizados em aplicações mais específicas (RIBEIRO et al., 2016). As nanopartículas podem proporcionar a entrega de medicamentos de forma direcionada, e ainda melhorar a sua toxicidade sistêmica (MISRI et al., 2015).

Os materiais mais utilizados para produzir essas nanopartículas são os polímeros (DENG et al., 2014). Segundo Ribeiro et al. (2016) os sistemas poliméricos obtidos por misturas e/ou combinações com diferentes polímeros sob a forma de géis, partículas e redes são os sistemas que mais tem recebido atenção dos investigadores nos últimos anos, devido principalmente a sua ampla utilização nas diversas áreas, entre elas farmacêutica, médica e tecnológica.

A biodisponibilidade e a biocompatibilidade dos polímeros naturais são as principais propriedades para a utilização desses biomateriais nos Sistemas entrega de drogas – *Drug Delivey Systems* (DDS) – e aplicações bioquímicas. Os polímeros (polissacarídeos) naturais podem ser obtidos de exsudatos de árvores, algas, sementes, líquens e por fermentação microbológica. Os polissacarídeos solúveis em água são conhecidos como gomas, e encontram ampla aplicação devido as suas propriedades reológicas (APOLINARIO et al., 2010; DE PAULA; SANTANA; RODRIGUES, 2001; OLIVEIRA, 2005).

Tais gomas formam em água dispersões coloidais, soluções com viscosidade muito elevada, ou até mesmo géis. A exemplo de goma natural, tem-se a goma do angico, a qual é exsudada do tronco de uma árvore da família das *Leguminosae Mimosoideae* do gênero *Anadenanthera*. A árvore é encontrada com facilidade por todo o território brasileiro e pode pertencer a várias espécies, das quais destacam-se: angico branco, angico do campo, angico roxo, angico verdadeiro (SILVA;

RODRIGUES; PAULA, 1998). A goma do angico é um heteropolissacarídeo composto por arabinose, galactose, raminose e ácido glucorônico (OLIVEIRA, 2005).

Pesquisas veem sendo desenvolvidas utilizando a goma de cajueiro, goma gelana, goma de marmelo, goma arábica, entre outras (ABREU et al., 2012; BAJPAI et al., 2017; DHANKA; SHETTY; SRIVASTAVA, 2018; GANIE; ALI; MAZUMDAR, 2015; MATRICARDI et al., 2009; RIBEIRO et al., 2016; XIE et al., 2018). A goma de angico branco, derivada do exsudato de Angico Branco (*Anadenanthera colubrina*), revela propriedades de utilização semelhante as gomas anteriormente citadas, pois apresenta um polissacarídeo natural constituído por arabinose, galactose, ácido urônico, ramnose e manose (DELGOBO et al., 1999; GLINEL et al., 2000; SILVA; RODRIGUES; PAULA, 1998).

A goma do angico é usada popularmente como medicamento para sintomas de tosse, facilitando a expectoração; há ainda relatos desta ser um poderoso medicamento em casos de coqueluche (OLIVEIRA, 2005).

Com todas essas propriedades e facilidades de aquisição do material a goma do angico torna-se um atraente biomaterial para a síntese de nanopartículas e incorporação de fármacos, seguindo o exemplo da goma de cajueiro que já é investigada e vem mostrando-se promissora para tal uso (FRANCISCA et al., 2016).

No entanto, a incorporação de fármacos em sistemas de nanopartículas não garante que a entrega seja bem sucedida. As partículas são muitas vezes mais eficientemente eliminada do sangue pelo sistema fagócito. Toda via, a modificação química destas nanopartículas evidencia uma solução para essa desvantagem, pois algumas substâncias previnem a adsorção não específica e aumenta a circulação das nanopartículas na corrente sanguínea. Entre os poucos materiais utilizado para obter esse resultado tem-se o Polietilenoglicol que tem como vantagem sua baixa toxicidade e resistência a adsorção não específica de biomoléculas (DENG et al., 2014).

A modificação de polissacarídeos com moléculas de glicerol, tem se mostrado favorável, pois os materiais sintetizados podem ser usados para aplicações industriais, incluindo, liberação lenta de ligantes orgânicos e inorgânicos (BILANOVIC; STAROSVETSKY; ARMON, 2016). O glicerol hiper ramificado já é utilizado como plataforma para administração de medicamentos na terapia de câncer (CALDERÓN et al., 2010; MISRI et al., 2015). Misri e colaboradores (2015), estudaram a utilização

do glicerol com Docetaxel e observaram que o material sintetizado apresentou melhor sistema de entrega do fármaco associado a baixa toxicidade, maior acúmulo significativo na região tumoral, além do efeito protetor preferencial às células primárias não-cancerígenas (MISRI et al., 2015). Tendo em vista o avanço científico e a procura de melhoria no sistema de *drug delivery*, a utilização da mistura formada a partir da goma de angico com glicerol torna-se bastante promissora.

Nishi e colaboradores (2007) estudaram a conjugação da goma-arábica e Anfotericina-B, um fármaco antifúngico muito utilizado no tratamento de leishmaniose visceral e que apresenta diversos efeitos colaterais, e observaram que o conjugado era estável, não hemolítico e não tóxico para os órgãos internos dos animais, além do melhoramento na solubilidade quando comparado ao fármaco que apresenta propriedades insolúveis em água e diversos solventes orgânicos. Nos estudos de Lima e colaboradores (2018) a Anfotericina-B incorporada na goma de cajueiro acetilada proporcionaram 70% de eficiência de encapsulação e perfis de liberação prolongados, o que garantiu o excelente potencial dessa goma na liberação de princípios ativos.

Outro ponto importante no estudo de *drug delivery* é o tamanho das partículas sintetizadas, pois atualmente as ciências farmacêuticas estão usando nanopartículas para reduzir a toxicidade e os efeitos colaterais das drogas (JONG, 2008). O potencial para atravessar barreiras biológicas dentro do corpo, permitindo o acesso à célula e vários compartimentos celulares, incluindo o núcleo, o que proporciona também uma entrega mais específica de medicamentos também colabora com a preferência por esse sistema (DODI et al., 2016; JONG, 2008; PLÁCIDO et al., 2016). Com isso é de se esperar que o composto formado com o carregador e o fármaco após aprisionamento em tamanho nanométrico apresente essas características anteriormente citadas.

Em vista do que foi apresentado, esse trabalho foi realizado para examinar a utilização das nanopartículas da goma de angico branco e da mistura de angico branco e glicerol como *drug delivery* quando incorporado a elas o fármaco Anfotericina B.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Nanotecnologia e Nanociência

Não é de hoje que a nanotecnologia se destaca na ciência como uma área muito importante. Isso se dá pela sua vasta aplicação nos diversos campos de estudos como as engenharias, medicina, física, química, biologia, entre outras (PAULA et al., 2010). A nanotecnologia trouxe conceitos de que o tamanho e a forma influenciam nas funções dos materiais, diferenciando assim, a nanociência de outras tecnologias atuais (TELI; MUTALIK; RAJANIKANT, 2010).

Apesar de ser considerada uma ciência moderna a nanotecnologia já vem sendo falada desde o século XX, quando Richard Feynman em sua palestra intitulada “Há muito espaço na parte inferior”, propôs conhecer, manipular e controlar materiais em escala atômica ou molecular. A National Nanotechnology Initiative (NNI) e a National Science Foundation definem nanotecnologia como a ciência que estuda e compreende a síntese, caracterização e aplicações tecnológicas de materiais e sistemas em escala nanométrica (ALCALÁ-ALCALÁ; QUINTANAR-GUERRERO, 2014; TELI; MUTALIK; RAJANIKANT, 2010).

Alguns autores destacam classificações para a escala nanométrica. Atkins e Jones (2012), demonstram que os materiais nanométricos estão na faixa de tamanho de 1 a 100 nm. Kumar et al., (2017), definem nanopartículas como distribuição de partículas com um tamanho entre 10 e 100 nm. Entretanto, destacam e reconhecem que partículas usadas para fins médicos nem sempre estão de acordo com essa definição de tamanho e citam o exemplo da aprovação pela *Food and Drug Administration dos Estados Unidos (FDA)* da albumina carregada com paclitaxel (Abraxane™) administrada por via intravenosa para terapia de câncer, cujo o tamanho da sua nanopartículas é de 130 nm.

Dimer et al., (2013), afirmam que o conceito de nanotecnologia é constantemente aprimorado de acordo com os avanços dos estudos científicos e destaca que a *European Medicines Agency* define, na área da saúde, nanotecnologia como o uso de estruturas menores que 1.000 nm. Alguns autores, como Moreno Raja e colaboradores (2019) relatam que nanopartículas com diâmetro variando de 10 a 1.000 nm possuem propriedades únicas em relação a superfície, volume e capacidade de encapsulamento de drogas.

Para Kumar e colaboradores (2010), as propriedades químicas, físicas e biológicas dos materiais em escala nanométrica são diferentes dos átomos e moléculas individuais principalmente pelo aumento da área de superfície e os efeitos quânticos, o que leva a uma maior reatividade química. Assim, os autores afirmam que o *“principal objetivo da nanotecnologia é compreender e criar materiais, dispositivos e sistemas com características e desempenhos aprimorados”*.

Entretanto, Florence (2018) ressalta que não pode haver uma definição simples para as nanopartículas, algumas características e propriedades como a determinação de tamanho é insuficiente para tal. O mesmo defende que deve ser considerada algumas outras propriedades, como a morfologia, natureza do material, interação química, forma, etc.

O fato, é que já é sabido da importância da nanotecnologia para diversas áreas da ciência, e das suas promessas de novos materiais e revoluções, tais como biossensores, computadores microscópicos, materiais leves, ossos artificiais, melhorias nos diagnósticos e tratamentos médicos e o próprio estilo e qualidade de vida. Já é conhecida várias tipos de estruturas nanos, entre as quais se destacam os nanobastões, nanofios, nanotubos, nanobastos, nanofitas, nanofibras, e nanopartículas (ATKINS; JONES, 2012; PAULA et al., 2010).

Esta última (nanopartículas), vem ganhando cada vez mais espaço na área farmacêutica e médica, principalmente em sistemas de entregas de medicamentos. Segundo Raja et al., (2019), algumas das vantagens da tecnologia nano é poder alcançar melhorias na entrega de medicamentos pouco solúveis em água e direcionar a entrega de fármacos em locais específicos.

2.1.1 Nanopartículas e Entrega de Fármacos

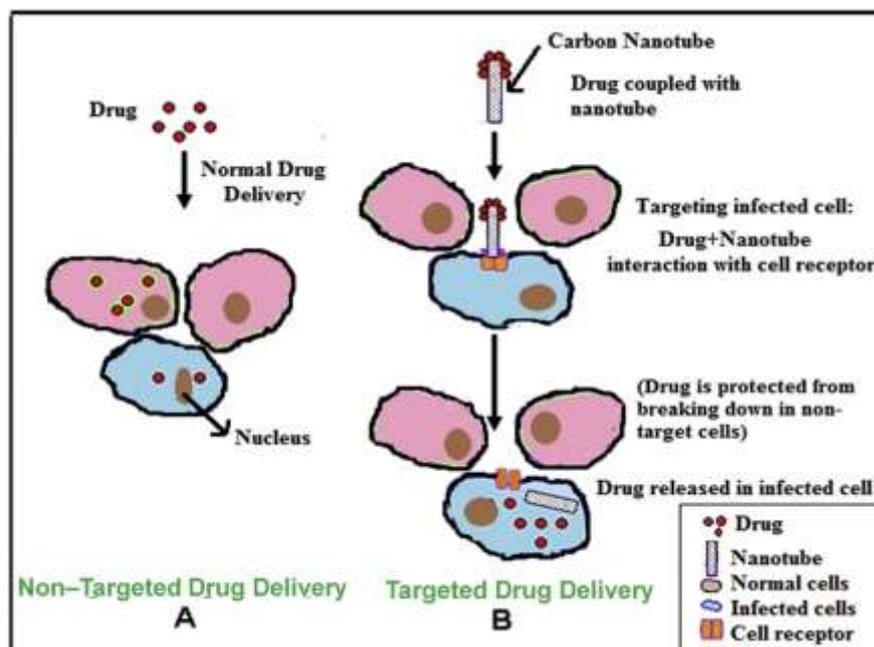
As nanopartículas são apontadas como o principal elo da nanotecnologia e a medicina, a junção das duas áreas é conhecida como nanomedicina. E uma das principais aplicações da nano, além de avanços na área de diagnóstico, é na entrega de fármacos (SWIERCZEWSKA et al., 2016).

A aplicação das nanopartículas na entrega de fármacos se tornou necessária devida algumas limitações e desvantagem na administração convencional de medicamentos, onde a baixa eficácia, baixa biodistribuição e sensibilidade, e

toxicidade elevada são alguns fatores que contribuíram para a busca por novas tecnologias; podendo melhorar, por exemplo, a sensibilidade ao composto bioativo (MENDES et al., 2017).

Kumar et al., (2017), fez uma breve comparação, mostrada esquematicamente (Figura 1) entre os sistemas de entrega de drogas convencionais e os sistemas de entrega por nanopartículas. Os autores relatam o caminho que o fármaco percorre quando ingerido até chegar no local desejado. Na administração convencional, ocorre “perda do fármaco” na corrente sanguínea, afetando as células saudáveis, e diminuindo a dose recebida pela a célula alvo. O inverso ocorre na entrega controlada por nanopartículas, no qual o fármaco integrado às nanoestruturas é levado ao local de ação, diminuindo seus efeitos colaterais.

FIGURA 1. Esquema comparativo entre os métodos convencional e por nanoestruturas de fármacos.



FONTE: KUMAR et al., (2017).

Além disso, os sistemas de distribuição de drogas tem a capacidade de melhorar o desempenho do medicamento e superar muitas das limitações já citadas. Esses sistemas podem aumentar a penetração da droga através da pele no caso de formulações tópicas antifúngicas, por exemplo. Outras vantagens das nanopartículas se dá na liberação sustentada do fármaco e melhor estabilidade deste. O direcionamento para o tecido infectado reduz os efeitos secundários; o prolongamento

do tempo na corrente sanguínea pode melhorar a eficiência do fármaco e consequentemente pode diminuir a sua dose necessária, o que acarreta na adesão e conveniência do paciente (ALCALÁ-ALCALÁ; QUINTANAR-GUERRERO, 2014; KUMAR et al., 2017; SOLIMAN, 2017).

Grande parte das drogas possui solubilidade em água limitada e isso interfere na sua eficácia. Fármacos incorporados em nanopartículas não só melhora a sua biodisponibilidade (maior quantidade de droga no local de absorção) e biocompatibilidade, como também melhora essa solubilidade, protege-os contra degradação gastrointestinal, facilita o transporte e a cinética de liberação no local alvo. Além de que, devido seu tamanho é capaz de circular no corpo e atravessar os tecidos, facilitando sua absorção pelas células específicas, tais como os tumores, por meios naturais, como a endocitose (ALCALÁ-ALCALÁ; QUINTANAR-GUERRERO, 2014; PINHEIRO, 2014; TELI; MUTALIK; RAJANIKANT, 2010).

Assim, para Alcalá-Alcalá e Quintanar-Guerrero (2014), os sistemas de “*Drug Delivery*” possui seu foco em evitar efeitos colaterais, reduzindo as doses e desenvolvendo medicamentos eficazes com direcionamento seletivo.

Teli e colaboradores (2010), abordam a melhora e eficácia de medicamentos pela nanotecnologia por argumentos tais como:

- *O tamanho minúsculo das partículas aumenta a área da superfície, aumentando a taxa de dissolução destas;*
- *Novas formulações de nanopartículas com melhor estabilidade e prazo de validade;*
- *Desenvolvimento de formulações de nanopartículas para melhorar absorção de compostos insolúveis permite melhor biodisponibilidade e taxas de liberação, potencialmente reduzindo a quantidade de dose necessária e, assim, diminuir os efeitos colaterais;*
- *Formulações de nanopartículas com perfis de liberação sustentada pode melhorar a adesão do paciente aos regimes de dosagem;*

Em resumo, Dimer et al., (2013) afirmam que em uma situação ideal as nanopartículas em sistemas de “*Drug Delivery*” são capazes de transportar o fármaco

para o local de destino específico para exercer a sua atividade medicamentosa com o máximo de segurança.

Com algumas das vantagens já mencionadas dos sistemas de entregas de fármacos controlados é importante salientar que há diversos tipos de materiais que podem ser empregados para esse fim. Dos quais os que mais se destacam são classificadas de acordo com a sua composição em, poliméricas, micelas, lipídicas, nanoemulsões, nanocapsulas e dendrímeros (ALCALÁ-ALCALÁ; QUINTANAR-GUERRERO, 2014; DIMER et al., 2013; SOLIMAN, 2017).

De maneira geral, além de serem classificados quanto a sua natureza, esses materiais devem levar em consideração alguns critérios para que sejam aplicados em sistemas de entrega de fármacos. Segundo Dimer et al., (2013), os materiais utilizados na obtenção de formulações nanotecnológicas são selecionados de acordo com suas características de biodegradabilidade, biocompatibilidade, capacidade para funcionalizar superfícies, conjugação, complexação e encapsulamento.

Sendo assim, Kumar et al., (2017) ressalta que os nanocarreadores de fármacos devem ser biocompatíveis, ou seja, devem ser capazes de se integrar com sistemas biológicos sem provocar resposta imune ou efeitos colaterais e devem ser atóxicos.

Ainda segundo Kumar e colaboradores (2017), as características do uso de nanopartículas como sistemas “*Drug Delivery*” inclui a fácil manipulação do tamanho das partículas e suas características superficiais para alcançar o direcionamento ativo e passivo de drogas. A liberação do fármaco deve ser controlado e sustentado tanto durante o transporte, quanto ao local a que se destina, aumentando assim, sua eficácia terapêutica e reduzindo os efeitos colaterais.

Kumar et al., (2017) também destaca a capacidade de encapsular o fármaco, a variedade nas vias de administração tais como parental, intraocular, oral e nasal como características importantes dos nanocarreadores de fármacos.

Essas e outras características são essenciais para o desenvolvimento de sistemas de entrega de fármacos cada vez melhores. E depende estritamente da seleção de um bom material capaz de liberar o fármaco de forma sustentada ao longo do tempo. Dentre as várias opções disponíveis citadas anteriormente, as

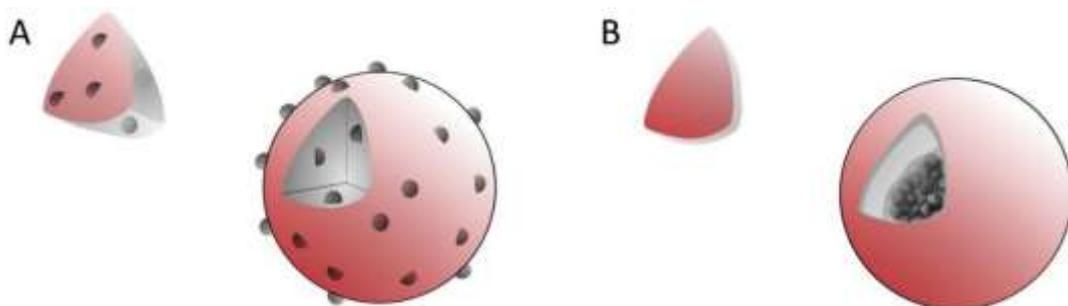
nanopartículas poliméricas se destacam por serem versáteis e promissoras nesse sentido (LOPES; LOBO; COSTA, 2005).

2.2 Nanopartículas Poliméricas

Nanopartículas a base de polímeros são alternativas promissoras para os sistemas de entrega de fármacos. Possuem qualidades únicas, como tamanho pequeno e alta relação entre a superfície e o volume, capacidade de encapsular drogas diversas e química superficial ajustáveis; podem ser definidas como partículas sólidas, as quais possuem propriedades coloidais na faixa de 10 a 1000 nm. Geralmente apresentam-se como nanoesferas e nanocapsulas, sendo esses os principais tipos, porém existem outros, tais como micelas, dímeros etc (ALCALÁ-ALCALÁ; QUINTANAR-GUERRERO, 2014; RAJA et al., 2019; RAO; GECKELER, 2011; SINGH; JOSHI; MALVIYA, 2018).

Nas nanoesferas o fármaco pode ser encapsulado e distribuído no interior da matriz polimérica, quimicamente ligado ou adsorvido à superfície da nanopartícula. Figura 2A (ALCALÁ-ALCALÁ; QUINTANAR-GUERRERO, 2014; RAO; GECKELER, 2011).

FIGURA 2. Tipos de nanopartículas poliméricas. Nanoesfera com o fármaco encapsulado na superfície e/ou dentro da partícula (A) e Nanocapsúla, com o fármaco encapsulado em veículo líquido dentro da partícula sólida (B).



FONTE: EL-SAY; EL-SAWY, (2017)

De acordo com Rao e Geckeler (2011), assim como para El-Say e El-Sawy (2017) concordam ao definirem nanocapsula (Figura 2B) como um tipo de reservatório de fármacos, ou seja, são sistemas vesiculares. Soliman (2017) colabora com a definição ao afirmar que elas têm um núcleo que é líquido ou semi-sólido à temperatura ambiente rodeado por um invólucro polimérico sólido. O núcleo é um

solvente lipofílico, geralmente um óleo e é usado como um reservatório para encapsulação de drogas hidrofóbicas.

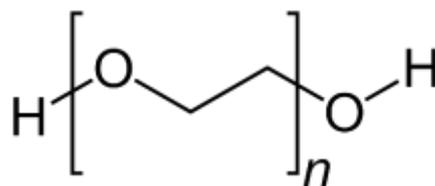
Soliman (2017), ainda relata que nanoesferas e nanocápsulas podem ser administradas por entre outras vias, as parenteral, oral e tópica. E que comparando essas estruturas com as fosfolipídicas, as poliméricas são mais estáveis, de fácil preparo e armazenamento.

Em relação ao seu material químico, as nanopartículas para a entrega de fármacos podem ser formadas a partir de polímeros sintéticos e/ou de polímeros naturais. Os sintéticos são das classes dos poliésteres alifáticos, os quais são derivados de ácidos, como o acrílico e metacrílico, além de cianoacrilato de alquila. Uma variedade de polímeros são sintetizados com o intuito de serem usados em sistemas “*Drug Delivery*”, entre eles o copolímero poli(ácido lático-co-glicólico) – PLGA e o poli(etilenoglicol) ou poli(óxido de etileno) – PEG que estão entre os mais utilizados (CALDERÓN et al., 2010; DIMER et al., 2013; RAJA et al., 2019; SHARMA et al., 2016).

Sharma e colaboradores (2016) colocam o PLGA como um polímero biodegradável, biocompatível e de administração fácil, além de que é aprovado pela FDA dos Estados Unidos e pela Agencia Europeia de Medicina (EMA).

De acordo com Raja (2019) o PEG é o polímero mais amplamente utilizado em sistemas de entrega de fármacos, é relativamente barato e comercialmente disponível em uma ampla variedade de pesos moleculares, Figura 3.

FIGURA 3. Estrutura química do poli(etilenoglicol) - PEG.



FONTE: Google Imagens.

Apesar de já existirem muitos polímeros sintetizados, outras variedades ainda estão sendo estudados com o intuito de melhorar cada vez mais a entrega de fármacos. Mendes et al., (2017) sintetizaram e estudaram o poli(metilmetacrilato) – PMMA e verificaram que pode ser uma alternativa como sistema de “*Drug Delivery*”,

aumentando a atividade antitumoral de extrato vegetais de *Piper cabralanum* (PCA-HEX) em vinte ou mais vezes.

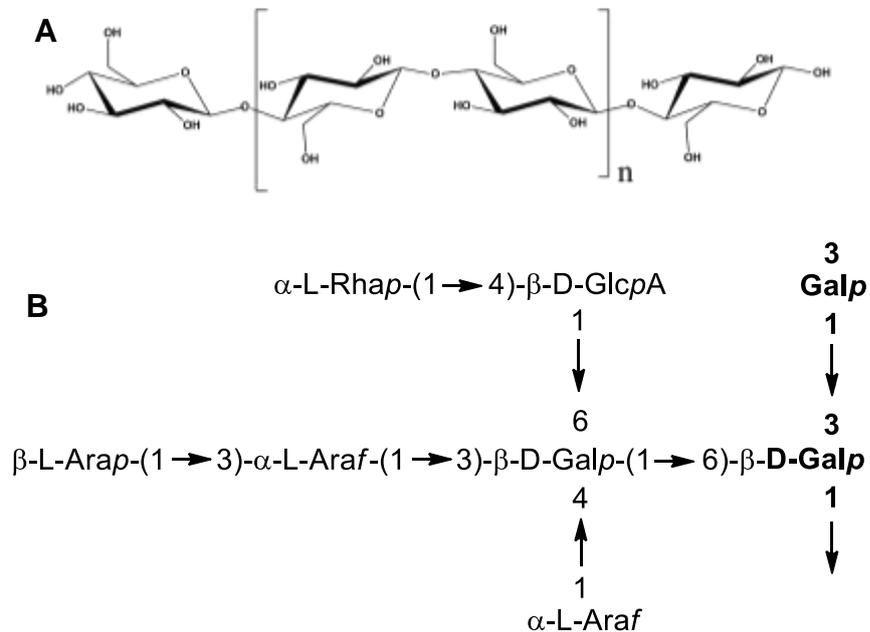
Embora vários polímeros biodegradáveis sintéticos tenham sido desenvolvidos para aplicações biomédicas, o uso de polímeros naturais permanece atraente devido à sua abundância na natureza, boa biocompatibilidade e capacidade de ser facilmente modificado. Os polímeros de origem natural podem ser classificados como polissacarídeos, proteínas e polinucleotídeos. Estes são considerados inofensivos *in vivo*, são enzimaticamente degradáveis, possuem propriedades bioativas e interações atóxicas com as células (CHIELLINI et al., 2009; RAJA et al., 2019).

Entre as vantagens dos polímeros naturais, podemos citar além da sua elevada abundancia natural, ser facilmente purificados e tendem a aumentar a solubilidade e permeabilidade de muitos medicamentos devido à natureza multifuncional. Diversos estudos mostram que fármacos encapsulados com polissacarídeos exibiram aumento em sua eficácia atribuído a sua melhor penetração nos tecidos e melhor biocompatibilidade (RAJA et al., 2019; SINGH; JOSHI; MALVIYA, 2018).

Os polissacarídeos são apontados como materiais favoráveis na preparação de nanopartículas para entregas de fármacos devido as suas propriedades vantajosas, das quais destacam-se a biodegradabilidade, biocompatibilidade e abundancia, o que os tornam menos dispendioso quando comparado a outros materiais, além do mais, estes ainda podem ser modificados quimicamente (REIS et al., 2017)

De acordo com Oliveria (2005), os polissacarídeos são polímeros naturais de elevado peso molecular formados por unidades monossacarídeos unidos quimicamente por ligações glicosídicas. Estes ainda podem ser classificados em homossacarídeos ou heteropolissacarídeos, quando só possuem um único tipo de monossacarídeo em sua composição (a celulose por exemplo, é composta apenas de glicose), ou quando possuem duas ou mais unidades diferentes de monossacarídeos (como a goma do caju), respectivamente, Figura 4.

FIGURA 4. Exemplos de polissacarídeos, Celulose, composto apenas por glicose (A) e Representação de uma possível estrutura fragmentada da goma do angico (B).



FONTES: Google Imagens (A) e DELGOBO et al., (1998).

Tais materiais podem ser obtidos naturalmente através das algas, sementes, líquens ou fermentação microbianas, além dos exsudados de árvores. Nesse contexto eles também podem ser chamados e/ou conhecidos como gomas naturais (OLIVEIRA, 2005; REIS et al., 2017).

Dentre as maneiras de serem obtidos, os polissacarídeos dos exsudados de árvores são produzidos como mecanismo de defesa das plantas contra ataques físicos ou microbiano. Quando esses polissacarídeos são solúveis em água são conhecidos como gomas (MENDES, 2013; OLIVEIRA, 2005).

Silva, Rodrigues e Paula (1998), definiram gomas naturais como “*polissacarídeos obtidos de exsudatos de troncos de árvore, de sementes, de algas ou por fermentação microbiológica, que sofrem hidratação em água fria ou quente, formando dispersões coloidais, soluções altamente viscosas ou, até mesmo, géis.*”

As gomas dos exsudados de árvores são heteropolissacarídeos ramificados de elevados pesos moleculares, dentre as inúmeras aplicações possíveis destacam-se o

uso como agentes espessantes, gelificantes, emulsificantes, flocculantes, clarificantes, adesivos, filmes, estabilizantes e protetores coloidais. Estudos veem mostrando aplicabilidades promissoras na área de entrega de fármacos, tal como a gomas do caju no qual Lima et al., (2018) hidrofobizado nanopartículas a base da goma do caju para a entrega controlada da Anfoterecina B (SILVA; RODRIGUES; PAULA, 1998).

2.3 Goma do Angico

A goma do angico é um exsudado dos troncos de árvores pertencentes a família das leguminosas (Leguminosae Mimosoideae) e ao gênero *Anadenanthera*. É uma árvore nativa e abundante nas florestas tropicais da América do Sul. No Brasil vai da região Norte ao sul do estado do Paraná. Conhecida como árvore de Angico, pode apresentar variadas espécies tais como angico branco, angico vermelho e angico roxo (MORETÃO et al., 2004; SANTOS et al., 2013; SILVA; RODRIGUES; PAULA, 1998).

2.3.1 Angico branco

O angico branco pertence a espécie *Anadenanthera colubrina*, é uma árvore de porte médio a alto variando de 12 a 15 metros e tronco com 30 a 50 centímetros de diâmetro. Sua casca é espessa e de coloração acinzentada com aspecto liso ou espiculado. As folhas são miúdas, as flores são brancas e o seu fruto é do tipo vagem com sementes achatadas, Figura 5 (MORETÃO et al., 2004; WEBER et al., 2011).

Segundo Moretão e colaboradores (2004) o angico branco ocorre no Brasil desde o Maranhão até o Paraná, passando por Goiás. A madeira é utilizada na construção civil, obras hidráulicas, carpintaria e carvão.

De acordo com Santos et al. (2013), o angico é uma das espécies botânicas com propriedades medicinais mais citada pela população residente em áreas onde a espécie ocorre. A casca é a mais utilizada, preparada por infusão ou maceração é utilizada por via oral no tratamento de processos inflamatórios do corpo, tais como bronquite e gastrite. As sementes do fruto são utilizadas no preparo de bebidas indígenas do tipo alucinógenas em rituais religiosos na Argentina, Bolívia e Venezuela (WEBER et al., 2011).

A casca da árvore também pode ser utilizada na indústria de curtume por conter tanino e o seu exsudado é conhecida como uma remédio para problemas respiratórios (DELGOBO et al., 1998).

Cientistas estão estudando as propriedades e aplicabilidades da goma e já existem evidências sobre efeitos no sistema imunológico de camundongos, aumentando a quantidade de macrófagos (MORETÃO et al., 2004).

FIGURA 5. Imagens das partes da *Anadenanthera colubrina*: Arvore do angico branco (A), folhas e folhas (B), fruto do tipo vagem (C) e tronco (D).



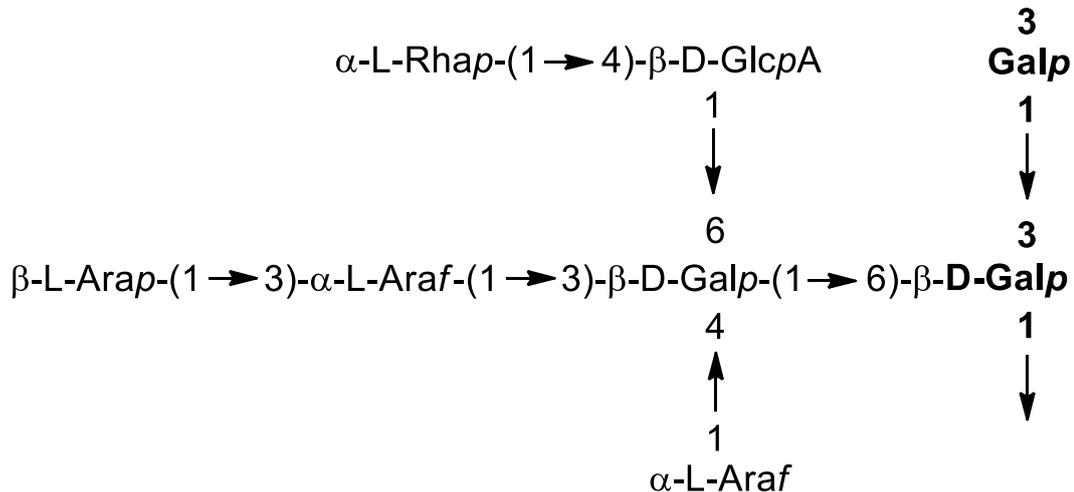
Fonte: Google Imagens.

Estudos já mostraram que a goma do angico branco é um heteropolissacarídeo complexo e ramificado rico em arabinose e seguido de ramnose, manose, galactose e oligossacarídeos com a maioria contendo arabinose (DELGOBO et al., 1998, 1999).

Delgobo e colaboradores (1998) propuseram a estrutura para a goma do angico (Figura 6) na qual identificaram $(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-D-Galp}$ como a cadeia principal e cadeias

laterais diferentes constituídas por grupos de oligossacarídeos de duas, três, cinco ou sete unidades tal como β -D-Galp-(1→6)- β -D-Galp (MORETÃO et al., 2003).

FIGURA 6. Possível estrutura fragmentada da goma do angico branco proposta por Delgobo e colaborades em 1998.



Fonte: DELGOBO et al., (1998).

Com base nas propriedades já conhecidas de polissacarídeos naturais e das evidências antiinflamatórias da goma do angico, a aplicação desta em áreas médicas. Oliveira e colaboradores (2009) estudaram a liberação de proteínas encapsuladas em nanopartículas derivadas do angico e ácido acrílico.

Paula et al., (2010), utilizaram nanopartículas de angico e quitosana para encapsular óleo essencial de *Lippia sidoides* e estas mostram-se eficazes para o uso.

Oliveira et al., (2009) avaliaram a formação de nanopartículas da goma do angico e quitosana e concluíram que o sistema é um bom candidato a entrega de fármacos. Sendo assim, pesquisas com esse heteropolissacarídeo se tornam cada vez mais interessantes e necessárias.

É muito comum as gomas naturais passarem por modificações químicas ou serem misturadas com outros polímeros ou materiais para que possam obter melhorias em algumas de suas propriedades. Ma et al., (2017) estudaram o efeito do glicerol em membranas de quitosana na entrega de fármacos antibacterianos para cicatrização de feridas e notaram que com o aumento do teor de glicerol que propriedades tais como resistência a tração, a taxa de inchamento, a permeabilidade

ao vapor de água e a molhabilidade das membranas foram significativamente melhoradas.

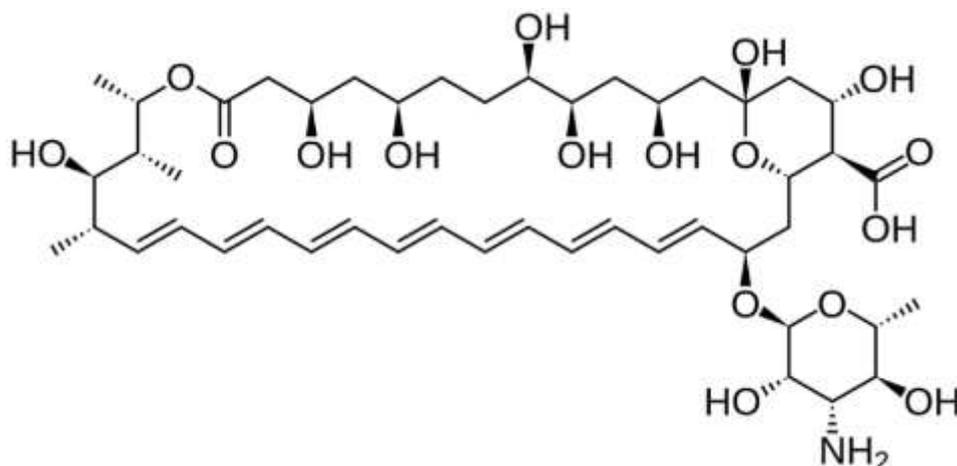
Em 2016 Qi e seus colaboradores estudaram os efeitos do glicerol e da argila sobre as propriedades físico-químicas de filmes a base de goma de camelina e obtiveram melhorias em relação a propriedade mecânica do filme o qual foi atribuído a nanoargila e observaram que o glicerol atuou como plastificante melhorando o número de alongamento na quebra do filme.

2.4 Anfoterecina B

A anfoterecina B (AmB) é um antibiótico antifúngico poliênico macrocíclico produzido naturalmente pelo actinomiceto *Streptomyces nodus*. É usada em aplicações clínicas intravenosas para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas tais como Aspergilose, Candidíase, Blastomicose, Coccidioidomicose, Criptococosis e Histoplasmose. Apesar da sua elevada toxicidade, aguda e crônica continua ser a droga mais utilizada para tratar infecções micóticas profundas. Recentemente vem sendo aplicada no tratamento de algumas infecções causadas por protozoários, como a leishmaniose (FILIPPIN; SOUZA, 2006; GABORIAU et al., 1997; JOHNSON, 2015; LIMA et al., 2018).

Devido a sua característica estrutural anfifílica é um fármaco pouco solúvel em água o que leva suas moléculas se agregarem em meio aquoso (GABORIAU et al., 1997). Sua estrutura foi proposta em 1971 por Ganis e colaboradores e pode ser vista na Figura 7 (FILIPPIN; SOUZA, 2006).

FIGURA 7. Estrutura molecular do fármaco Anfoterecina B.



Fonte: Google Imagens.

O tratamento com a AmB leva a variados efeitos colaterais devido a sua elevada toxicidade, tais como febre, calafrio, tremores, náuseas e dor de cabeça são frequentes. Há ainda alterações cardiovasculares, hipocalemia, aumento de diurese e disfunção renal entre outros sintomas veem impulsionando o desenvolvimento e procura por alternativas na administração desse fármaco (FILIPPIN; SOUZA, 2006).

Estudos já mostram que os sistemas de entrega de fármacos vem melhorando a eficácia da anfotericina B e supera muitos desses efeitos colaterais. Soliman (2017) em uma revisão sobre nanopartículas eficazes na entrega de agentes antifúngicos relatou que formulações a base de lipídios mostraram grande redução na nefroxicidade da AmB e mantiveram a ampla faixa de atividade antifúngica da droga.

Resultados como estes motivam a pesquisa de novos sistemas de administração de fármacos afim de melhorar sua segurança, diminuir os efeitos colaterais sem perder a sua eficácia ou até mesmo aumenta-la.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo principal deste trabalho foi a síntese e caracterização de nanopartículas pelo o método de dialise, a base de exsudados do angico branco e do glicerol para a entrega de fármacos, utilizando a Anfotericina B como medicamento modelo.

3.2 Objetivos Específicos

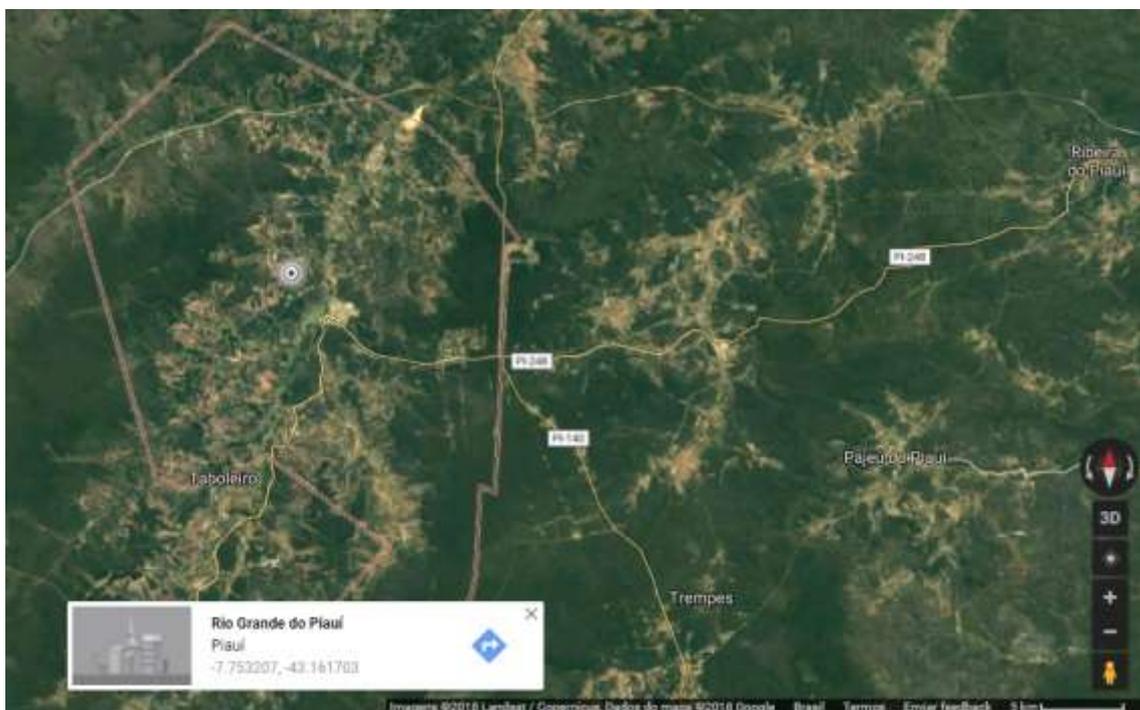
- ✓ Obter polímeros derivados da resina de angico e glicerol em escala nanométrica;
- ✓ Obter a incorporação de nanopartículas derivadas dos polímeros com o medicamento Anfotericina B;
- ✓ Caracterizar os polímeros e nanopolímeros, através das análises de IV, RMN, TGA, Espalhamento de luz Dinâmica e potencial zeta, UV-Vis e MEV;
- ✓ Estudar a liberação *in vitro* do fármaco;
- ✓ Verificar o efeito hemolítico do fármaco incorporado nos nanopolímeros.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Isolamento e purificação da goma de angico branco

Os exsudados do Angico Branco (*Anadenanthera colubrina*) foram coletadas em árvores nativas da cidade de Rio Grande do Piauí, Piauí, Brasil (-7.753207, -43.161703), no período de março de 2016. A Figura 8, mostra a localização geográfica da região aonde as amostras foram coletadas.

FIGURA 8. Imagem de satélite da região geográfica da cidade de Rio Grande do Piauí.



Fonte: Google Maps

Após a coleta e seleção dos nódulos da casca do angico branco (Figura 9), a goma foi triturada para dar sequência aos processos de isolamento e purificação, cuja metodologia adotada foi adaptada da descrita por Costa; Rodrigues; Paula (1996), Rodrigues; Paula; Costa (1993) e Silva; Rodrigues; Paula, (1998).

FIGURA 9. Nódulos de exudados do angico branco coletado na cidade do Rio Grande do Piauí.

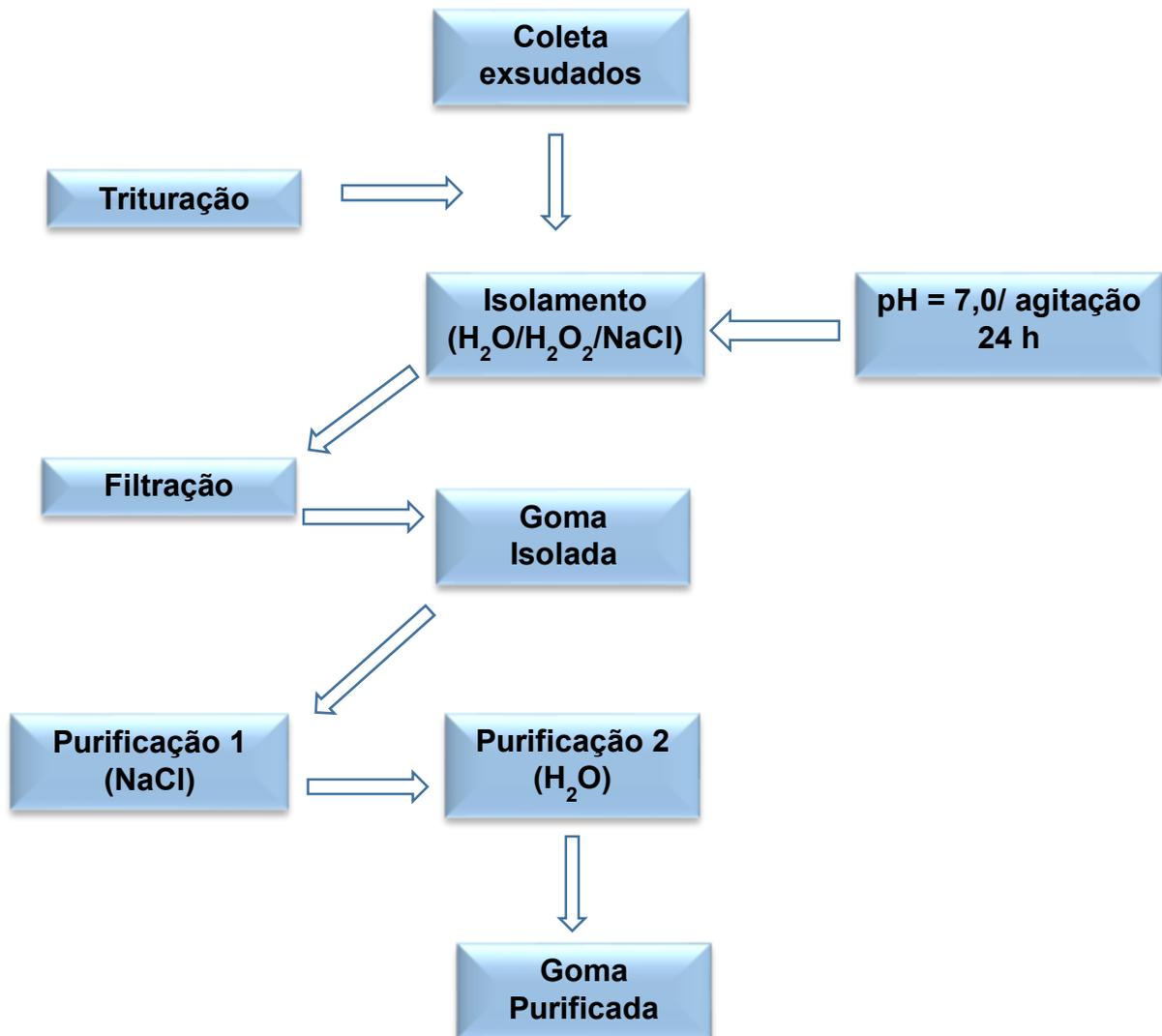


Fonte: Arquivo do autor.

No processo de isolamento a goma foi dissolvida em água destilada, na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para descolorir a solução, e cloreto de sódio (NaCl) para facilitar uma posterior precipitação. A solução ficou sob agitação magnética por um período de 24 h, formando uma solução a 5% (p/v). O pH foi ajustado para aproximadamente 7,0 por adição de NaCl a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Ao final da agitação, a solução foi filtrada em funil de vidro sinterizado. A goma isolada foi precipitada pelo uso de etanol, e seca em dessecador (RODRIGUES; PAULA; COSTA, 1993).

Após o isolamento, a goma passou por dois processos de purificação, como descrito (Fluxograma 1). Na primeira purificação, a goma isolada foi tratada com solução de NaCl em excesso, para retirada de possíveis cátions presentes na goma. Posteriormente, o NaCl excedente das etapas anteriores (isolamento e 1ª purificação) foi removido em meio aquoso na etapa da 2ª purificação. Ao final das etapas, obteve-se a goma de angico branco purificada (COSTA; RODRIGUES; PAULA, 1996).

FLUXOGRAMA 1. Fluxograma mostrando as etapas comuns aos estágios de isolamento e purificação da goma do angico branco.



4.2 Rota de obtenção de nanopartículas

Afim de avaliar possíveis melhorias nas propriedades da goma do angico branco, esta foi combinada ao glicerol, na proporção de 1:1 (p/p), dissolvidos em meio aquoso e posteriormente misturados sob agitação e temperatura de aproximadamente 100 °C durante 30 min (BILANOVIC; STAROSVETSKY; ARMON, 2016). O material obtido que será chamado de Mistura AG foi seco a temperatura ambiente em dessecador.

4.3 Síntese das nanopartículas

As nanopartículas foram sintetizadas pelo o método proposto por Pitombeira et al., (2015) com adaptações, utilizando o fármaco Anfotericina B ($C_{47}H_{73}NO_{17}$) como droga modelo. O qual foi adquirida da Pharmanostra (Anápolis, Goiás, Brasil), lote HAO1506202U.

A síntese das nanopartículas à base da goma do angico com anfotericina B (NpAB-AmB) e da Mistura AG com Anfotericina B (NpAGL-AmB) seguiu da seguinte forma: 100 mg de goma do angico ou da Mistura AG foram misturadas a 10 mg de Anfotericina B e posteriormente dissolvidos em 10 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida, a solução foi dialisada contra a água (peso molecular de corte da membrana 14 kD) durante 24 horas, congelada por 12 horas e liofilizada durante 48 horas em liofilizador modelo L101 (Liotop, São Paulo – Brasil).

Com a finalidade de estudar apenas o efeito dos polímeros, foram sintetizadas NPs a partir da metodologia citada anteriormente, porém sem adição do fármaco, das quais, nanopartículas advindas da goma do angico branco (NpAB) e nanopartículas da Mistura AG (NpAGL) (PITOMBEIRA et al., 2015).

4.4 Espectroscopia de Infravermelho

As nanopartículas foram caracterizadas por Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). Os espectros foram adquiridos em um Spectrum 100 GX FTIR Perkin Elmer, configurado para medir 16 varreduras cumulativas a 2 cm^{-1} no intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} . As amostras foram preparadas em partilhas de KBr.

4.5 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

As nanopartículas foram caracterizadas por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C (RMN ^{13}C) no estado sólido CP/MAS (Cross-polarization/Magic Angle Spinning) em um aparelho Espectrômetro RMN Ascend 400WB com tempo de pulsação de 5 segundos e rotações de 5 Hz.

4.6 Análise Termogravimétrica

As análises Termogravimétricas (TGA) foram realizadas em um aparelho SHIMADZU modelo TGA-50 simultaneous DTA-TG apparatus usando um fluxo de nitrogênio de 50 mL min⁻¹ e uma faixa de temperatura entre 30 e 800 °C.

4.7 Potencial Zeta e tamanho médio de partícula

As medidas do tamanho médio de partícula foram feitas por espalhamento de luz dinâmica (DLS) em um aparelho Zetasizer Nano ZS 90 da Malvern Instruments. No mesmo aparelho foi ainda medido valores de potencial zeta das nanopartículas.

4.8 Microscopia eletrônica de varredura

Para estudar a morfologia e forma das nanopartículas, foram realizadas análises em um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) com canhão a emissão por campo, da marca FEI e modelo Quanta FEG 250, com tensão de aceleração de 1 a 30 kv. As condições de análises, como escala e magnificação estão registrada em cada foto obtida.

Para as análises, as amostras foram fixadas em fita adesiva dupla face de carbono e recobertas com ouro (Au) em uma metalizadora da marca Quorum, modelo Q150R, em um tempo de 40 segundos, a 20 mA, por plasma gerado em atmosfera de argônio.

4.9 Teor do fármaco encapsulado

Inicialmente 5 mg das amostras de nanopartículas contendo o fármaco (NpAB-AmB e NpAGL-AmB) foram dissolvidas em 50 mL de DMSO e agitadas durante 1 hora. O teor do fármaco (TF) incorporado foi determinado por absorção na região do ultravioleta visível (UV-Vis) com comprimento de onda de 385 nm e calculado utilizando uma curva de calibração previamente estabelecida e seguindo a Equação 1 (PITOMBEIRA et al., 2015).

$$TF = \frac{\text{Massa de Anfotericina B}}{\text{Massa de NPs}} \times 100\% \quad (\text{Equação 1})$$

4.10 Estudo da liberação *in vitro*

Os estudos de liberação *in vitro* do fármaco foram realizados de acordo com Pitombeira et al., (2015), 20 mg das NPs incorporadas com Anfotericina B foram inseridas em sacos de diálise (peso molecular de corte da membrana 14 kD) e posteriormente imersos em solução tampão fosfato (STF), pH 7,4, temperatura de 37 °C e agitação constante. Alíquotas foram retiradas periodicamente, ao passo que eram substituídas por quantidades iguais de STF. As medidas de absorbância foram realizadas a 385 nm até os valores de absorbância ficarem estáveis que se deu por volta de 24 h, assumindo a maior absorbância como 100 % de liberação do fármaco.

4.11 Atividade hemolítica

A atividade hemolítica foi investigada pela incubação de uma suspensão de glóbulos vermelho de ovelha (GVOs) e NPs de NpAB, NpAGL, NpAB-AmB e NpAGL-AmB, como descrito na literatura por Mendes et al., (2017) e Sperandio et al., (2010). Os GVOs foram lavadas três vezes em tampão fosfato salino (STF) e ressuspenso em STF a uma densidade de 5×10^8 células mL⁻¹ a 4 °C. Os ensaios de hemólise foram realizados misturando 100 µL de hemácias e 100 µL das NPs de NpAB, NpAGL com as nanopartículas (NpAB-AmB e NpAGL-AmB) incorporadas com o fármaco (1500 µg mL⁻¹) em STF e incubado a 37 °C por 1 hora. Após a centrifugação, a liberação de hemoglobina foi medida em 100 µL de sobrenadante celular a 540 nm. A ausência de hemólise (controle em branco) ou hemólise total (controle positivo) foi determinada substituindo-se por 100 µL de STF ou água deionizada, respectivamente. Os resultados foram determinados pela porcentagem de hemólise na amostra em comparação ao controle positivo (100% hemólise), e os experimentos foram realizados em triplicata.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Rendimento do processo de isolamento e purificação da goma do angico

Após a otimização dos processos de isolamento e purificação da Goma de Angico Branco, obtivemos através de pesagem das amostras rendimentos de 87,54% na etapa de isolamento, 74,67% e 78,93% após a primeira e segunda etapa de purificação, respectivamente, como pode ser observado na Tabela 1.

TABELA 1. Comparação das etapas de isolamento e purificação da goma do angico branco.

ETAPAS DO PROCESSO	RENDIMENTOS (%)	REFERÊNCIA ^a (%)
ISOLAMENTO	87,54 ± 3,59	68
1ª PURIFICAÇÃO	74,67 ± 6,10	78
2ª PURIFICAÇÃO	78,93 ± 0,36	72

^a(SILVA; RODRIGUES; PAULA, 1998)

Os rendimentos obtidos são considerados satisfatórios quando comparado aos resultados de isolamento e purificação de inúmeras gomas naturais publicados na literatura (COSTA; RODRIGUES; PAULA, 1996; RIBEIRO et al., 2016; RODRIGUES; PAULA; COSTA, 1993). Na Tabela 1, pode-se observar também que os rendimentos encontrados nesse estudo estão acima ou próximos dos resultados da goma do angico encontrados por Silva, Rodrigues e Paula (1998) (68% na etapa de isolamento, 78% e 72% nas etapas de purificação, respectivamente). Esses resultados mostram eficácia na metodologia utilizada.

5.2 Caracterização da goma de angico e das nanopartículas

5.2.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho

O espectro de infravermelho das amostras podem ser observados na Figura 10. Analisando as principais bandas da NpAB (Figura 10 A, linha preta) pode ser observado pequenas bandas de estiramentos em 1630 associado a ligações C=O e

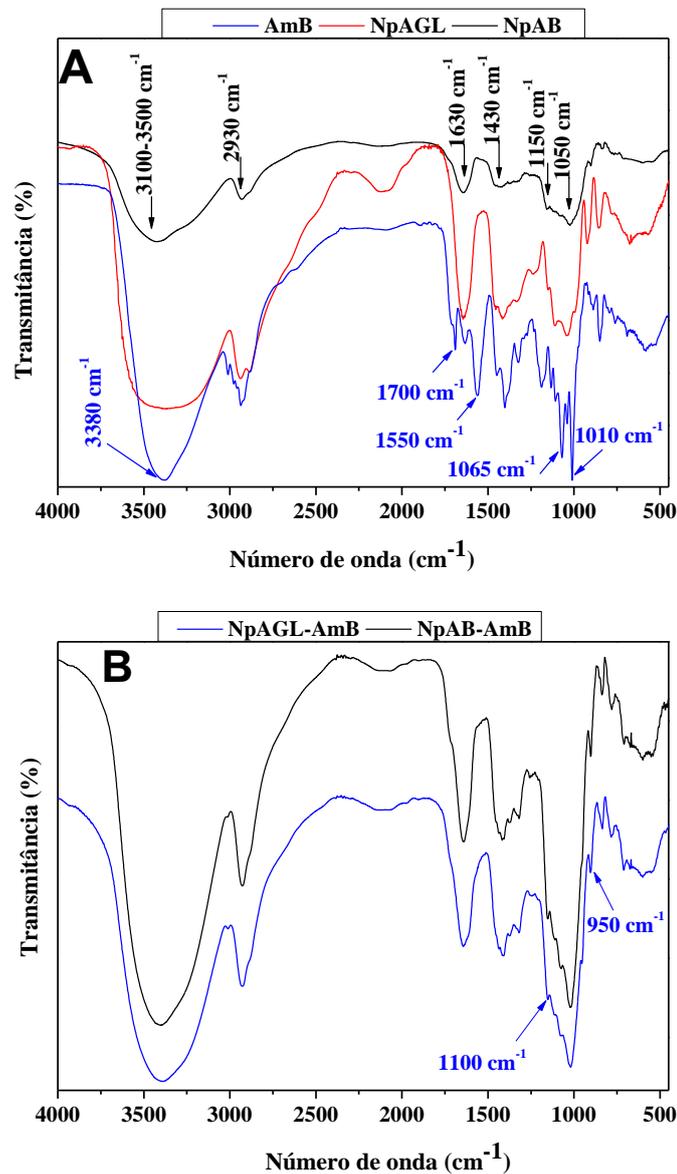
em 1430 cm^{-1} que pode ser referente a dobramentos C-H₂ de ligações do grupo carboxilato, picos de deformação em 1150 e 1050 cm^{-1} característicos de ligações glicosídicas C-O-C a qual é presente no anel piranosídico, um estiramento em 2930 cm^{-1} é associado a padrões típicos de ligações do tipo C-H que podem estar presente na estrutura do heteropolissacarídeo e uma banda larga entre 3100 a 3500 cm^{-1} é característica a estiramentos referente ao grupo -OH com ligações de hidrogênio (LEAL, 2014; LIMA et al., 2018; PAVIA et al., 2016; ROBERVAL et al., 2007).

Analisando o espectro de infravermelho da NpAGL (Figura 10 A, linha vermelha) é notório uma maior intensidade na banda de estiramento referente ao grupo -OH, isso pode estar relacionado as três hidroxilas presentes na molécula de glicerol que formam ligações de hidrogênios intermoleculares com as moléculas do polissacarídeo, deslocando os elétrons da ligação O-H na região de 3100 a 3500 cm^{-1} , sendo observado pelo alargamento do pico característico para menores comprimentos de onda (MOREIRA; MACHADO, 2016; WANG; JING, 2017). Com a presença do glicerol na composição os picos de deformação assimétrica C-O-C apresentam um aumento de intensidade característico (WANG; JING, 2017).

No espectro do fármaco AmB (Figura 10 A, linha azul), é possível identificar picos característicos de deformações O-H na região de 3380 cm^{-1} . Picos de estiramentos de ligações COOH são observados em 1700 cm^{-1} . Em 1500 cm^{-1} é característico de dobramentos de grupos NH₂, além de picos em 1065 e 1010 cm^{-1} os quais podem ser atribuídos a estiramentos C-O e C-H, respectivamente, característicos de políenos (GAGÓŚ; ARCZEWSKA, 2012).

Os espectros das amostras de nanopartículas incorporadas ao fármaco são observados na Figura 10 B (NpAB-AmB – linha preta, e NpAGL-AmB – linha azul) onde é possível observar deslocamentos de bandas, principalmente as atribuídas aos estiramentos em de C-O e C-H de deformação assimétrica em 1100 e 950 cm^{-1} o que sugere a incorporação da Anfotericina B com os polímeros (APARNA et al., 2018). Comparando as NpAB-AmB e NpAGL-AmB entre si observa-se uma menor intensidade da banda características de ligações O-H na amostra NpAGL-AmB sugerindo que pode ter tido uma maior interação do fármaco com o polímero NpAGL ocasionado pela presença do glicerol na amostra (MOREIRA; VICTOR; MACHADO, 2016).

FIGURA 10. Espectros de Infravermelho das nanopartículas de **(A)** goma de angico branco (NpAB), Mistura AG (NpAGL) e do fármaco Anfotericina B (AmB); e **(B)** goma de angico branco incorporada com Anfotericina B (NpAB-AmB) e Mistura AG incorporada com Anfotericina B (NpAGL-AmB).

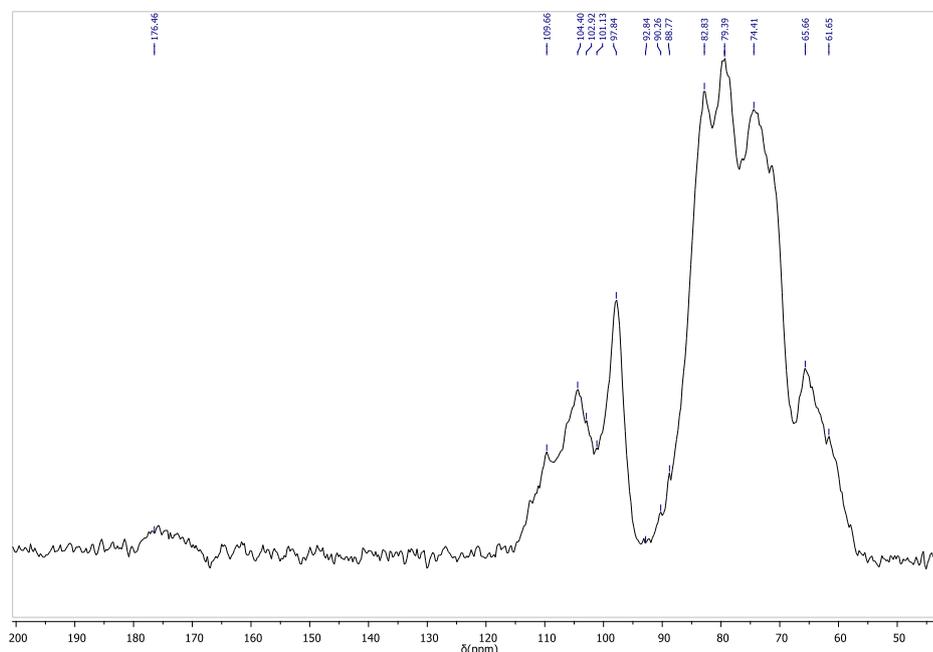


5.2.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN ^{13}C)

A Figura 11 mostra o espectro de RMN ^{13}C da goma de angico branco *in natura*. O espectro do polissacarídeo é muito complexo. Foram observados picos na região de carbono anomérico (90 – 110 ppm), onde sinais em torno de δ 109,46 ppm são

característicos dos carbonos C-1 da arabinose. Um sinal em δ 104,39 ppm pode ser atribuído a galactose com ligações do tipo (1 \rightarrow 3) β -galactopirranose, onde o sinal δ 79,39 ppm sugere uma O-substituição. Ainda pode ser evidenciado um resíduo interno em δ 102,92 de β -galactopirranose. A ramnose é observada em δ 101,13 ppm com ligações em (1 \rightarrow) α -ramnopirranose. Sinais em torno de δ 61,65 são característicos de carbonos primários, os quais podem ser atribuídos ao C-6 das hexanoses presentes na manose (DELGOBO et al., 1999; MARSON-ASCÊNCIO; ASCÊNCIO; BAGGIO, 2012; OLIVEIRA; LIMA, 2006).

FIGURA 11. Espectros de RMN de ^{13}C da Goma de angico branco.



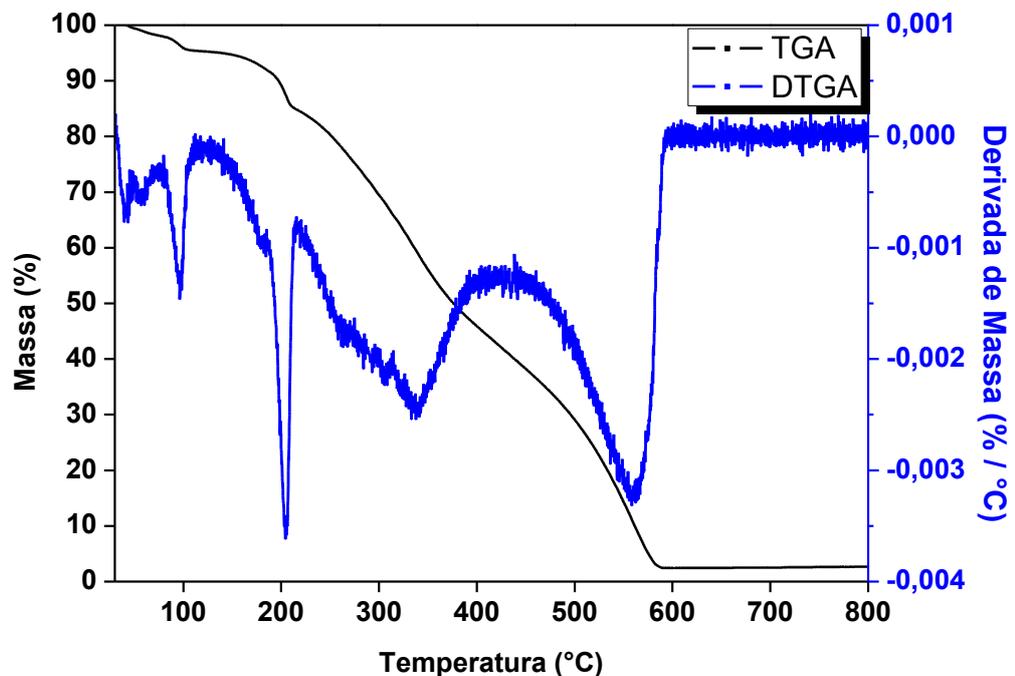
A presença de um fraco sinal em δ 176,46 originado de uma O-substituição (δ 79,39) poderia ser atribuído a resíduos de ácido glucorônico, porém a ausência de sinais que evidencie a presença de grupos O-Me seriam evidenciados em torno de δ 60,7 com isso é descartado a presença de resíduo 4-O-metil-ácido glucorônico. A ausência do ácido sugere a utilização da goma do angico branco (*A. Colubrina*) neste trabalho, pois segundo Oliveira et al. (2006), a presença deste pode ser usada para identificar as espécies de goma de angico *A. Colubrina* e *A. macrocarpa* encontradas no Brasil. Os dados descritos corroboram com os resultados apresentados nos espectros de infravermelho deste trabalho e com dados já reportados na literatura por

Delgobo et al., (1998) e (1999) e Oliveira e Lima (2006). Tais informações obtidas das caracterizações através das espectroscopias do Infravermelho e do RMN¹³C podem ser relacionadas com informações reportadas na literatura referente a goma de angico pode-se pressupor que os polissacarídeos presentes na estrutura da NpAB são compostos principalmente de arabinose, galactose, ramnose e manose (DELGOBO et al., 1998, 1999; GLINEL et al., 2000).

5.2.3 Análise Termogravimétrica (TG)

Com a finalidade de verificar a estabilidade térmica do fármaco para posteriores aplicações, foi realizada medida termogravimétrica e o gráfico resultante apresentado na Figura 12. É possível observar ao menos três eventos, o primeiro em aproximadamente 100 °C é característico de perda de água adsorvido da superfície. Os eventos seguintes (200, 340 e 550 °C) são responsáveis pela decomposição e degradação completa da molécula presente na Anfotericina B (FRANZINI, 2010; PITOMBEIRA et al., 2015).

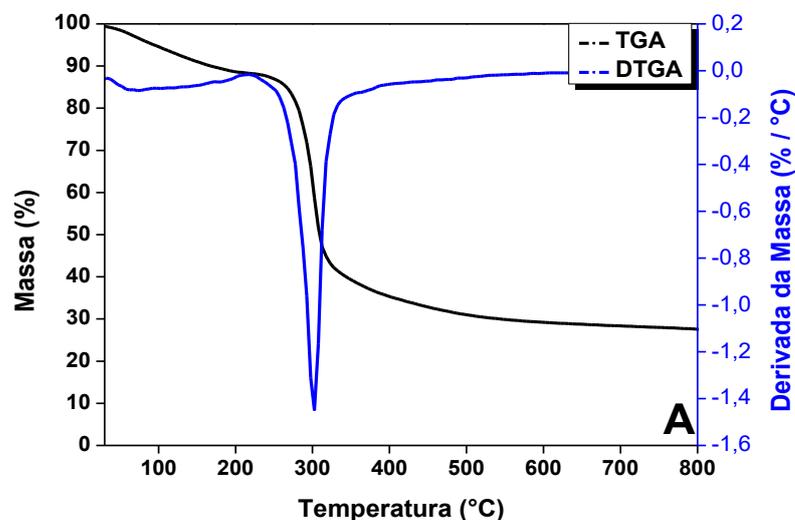
FIGURA 12. Análise termogravimétrica do fármaco Anfotericina B livre.

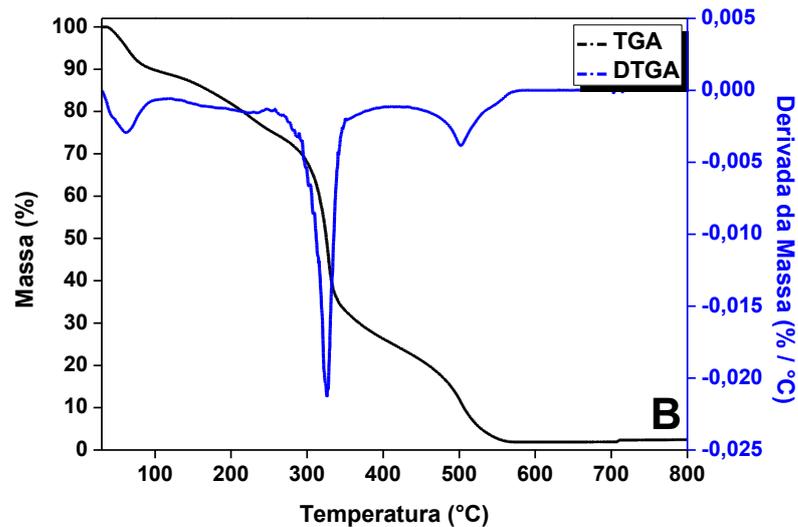


Na Figura 13 A temos o gráfico resultante da análise termogravimétrica das nanopartículas de NpAB, onde podemos observar dois eventos térmicos

característicos, o primeiro em aproximadamente 70 °C que foi atribuído a umidade residual presente na superfície das nanopartículas e o segundo evento em cerca de 300 °C que de acordo com a literatura está relacionado a despolimerização do polissacarídeo, com a formação de água, CO e CH₄, constituintes de gomas naturais (ROBERVAL et al., 2007; ZOHURIAAN; SHOKROLAHI, 2004). Quando observamos o resultado obtido para NpAGL (Figura 13 B) temos a presença de 3 eventos térmicos o primeiro em aproximadamente 65 °C característico da perda de umidade residual presente na superfície das nanopartículas proveniente da Mistura AG, o segundo evento térmico em aproximadamente 315 °C, assim como observado na Figura 13 A, foi atribuído a despolimerização do polissacarídeo (ZOHURIAAN; SHOKROLAHI, 2004). (ZOHURIAAN; SHOKROLAHI, 2004) Para o terceiro evento, aproximadamente 502 °C, de acordo com a literatura está associada a clivagem da ligação C-O-C formada a partir da polimerização do glicerol e o polissacarídeo da goma de angico (BRIOUDE et al., 2007). É importante também relatar que o glicerol utilizado para formação das nanopartícula proveniente da Mistura AG (NpAGL) foi totalmente polimerizado, pois a literatura indica que moléculas de glicerol livres sofrem degradação térmica em aproximadamente 200 °C, o que não foi evidenciado na Figura 13 B (ÍTAVO et al., 2017).

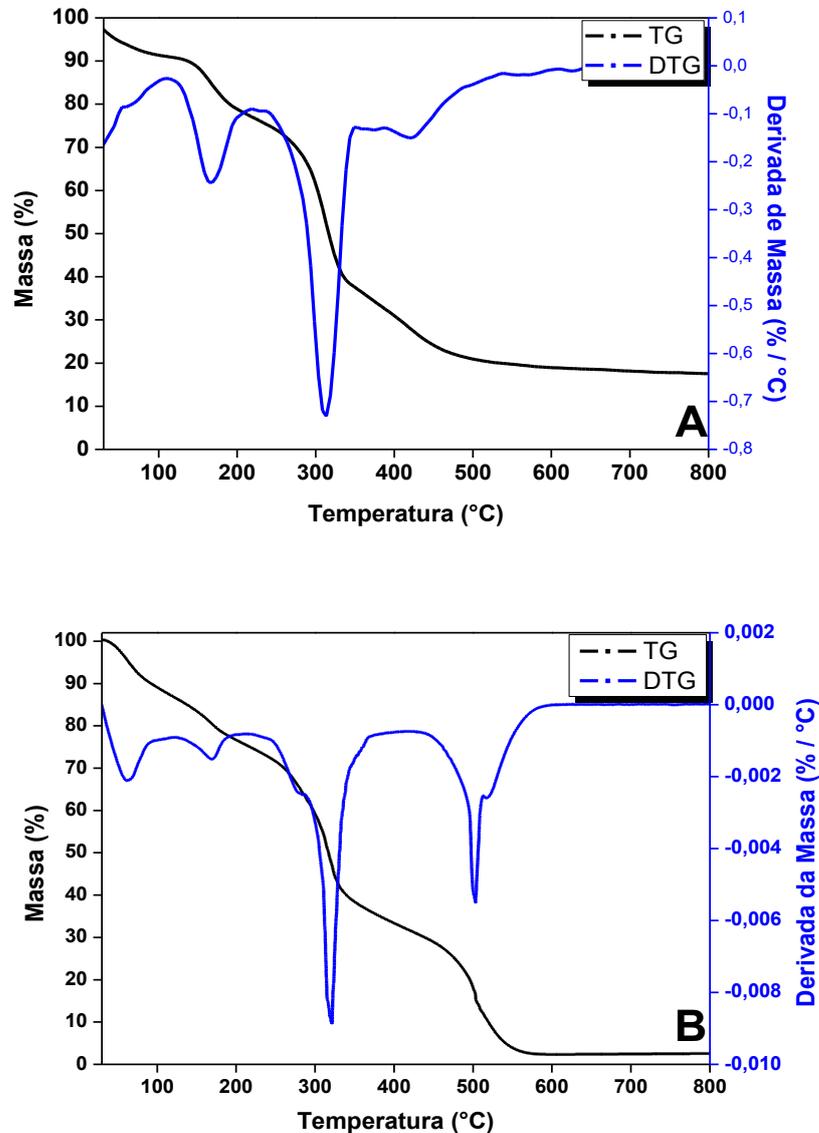
FIGURA 13. Análises termogravimétricas das nanopartículas de **(A)** goma de angico branco (NpAB) e **(B)** goma do angico branco com glicerol (NpAGL).





Amostras das nanopartículas incorporadas com o fármaco (NpAB-AmB e NpAGL-AmB) também foram analisadas por termogravimetria (Figura 14 A e 14 B, respectivamente). Ao analisarmos ambos os gráficos obtidos pode-se observar o surgimento de dois novos eventos térmicos, característico da decomposição da interação das nanopartículas (NpAB-AmB e NpAGL-AmB) com a Anfotericina B, quando comparados com os termogramas das NPs de angico e da Mistura AG obtidos anteriormente (Figura 13). O primeiro evento térmico ocorre em aproximadamente 170 °C e está relacionado a decomposição inicial do fármaco (NISHI et al., 2007). O segundo evento de decomposição do fármaco ocorre em 425 °C para a NpAB-AmB e 520 °C para a NpAGL-AmB, as duas temperaturas estão de acordo com o intervalo de temperatura de decomposição apresentado na literatura e observados na Figura 12 (389 a 550 °C), (FRANZINI, 2010; ŁUBKOWSKI et al., 1989) porém é possível evidenciar que o processo de incorporação da Anfotericina B às NPs da Mistura AG melhorou a estabilidade térmica quando comparado a composição do fármaco e NPs somente de angico. Esse aumento na estabilidade térmica pode estar associado a forte interação da Mistura AG formado entre o glicerol e o heteropolissacarídeo quando comparado apenas a estrutura do heteropolissacarídeo presente na goma de angico.

FIGURA 14. Análises termogravimétricas das nanopartículas da (A) goma de angico branco incorporada com Anfotericina B (NpAB-AmB) e (B) Mistura AG incorporada com Anfotericina B (NpAGL-AmB).



5.3 Tamanho médio de partícula e análise do potencial Zeta

A distribuição do tamanho de partícula foi analisada para as nanopartículas da goma de angico branco e goma de angico branco com glicerol (Mistura AG) livres e incorporadas com fármaco Anfotericina B. Na Tabela 2 pode-se observar o tamanho médio de partícula e o índice de polidispersão (IPD) para cada amostra. As nanopartículas de angico branco purificada (NpAB) apresentaram dois grupos de tamanho $45,1 \pm 2,7$ nm (11,18%) e $267,6 \pm 12,2$ nm (88,82%), as NPs da Mistura AG

(NpAGL) apresentaram grupamentos de tamanhos variados de $49,3 \pm 5,0$ nm (4,83%), $176,2 \pm 28,4$ nm (40,49%) e $828,0 \pm 266,7$ (54,68%) nm, após a incorporação do fármaco as nanopartículas de NpAB-AmB apresentaram único grupo de tamanho $131,7 \pm 53,8$ nm e as nanopartículas de NpAGL-AmB tiveram a formação de apenas dois grupos de tamanho $53,3 \pm 11,5$ nm (18,72%) e $161,9 \pm 32,0$ nm (81,28%). De acordo com a literatura, se após o carregamento com o fármaco as nanopartículas apresentarem tamanhos semelhantes ao estado inicial, ou seja, sem a incorporação do fármaco, a molécula hospede provavelmente foi incorporada no núcleo da partícula (PAULA et al., 2010). A partir dessa informação e levando em consideração a formação de um núcleo mais hidrofóbico, pode-se supor que em ambas NPs o fármaco foi incorporado no núcleo.

TABELA 2. Tamanho médio (nm), índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta (mV) das nanopartículas de goma de angico branco (NpAB), Mistura AG (NpAGL), goma de angico branco incorporada com Anfotericina B (NpAB-AmB) e Mistura AG incorporada com Anfotericina B (NpAGL-AmB).

Amostra	Tamanho de partícula (nm)	IPD	Potencial zeta (mV)
NpAB	$45,1 \pm 2,7$ (11,18%) $267,6 \pm 12,2$ (88,82%)	0,535	-33,8 ($\pm 4,67$)
NpAGL	$49,3 \pm 5,0$ (4,83%) $176,2 \pm 28,4$ (40,49%) $828,0 \pm 266,7$ (54,68%)	0,585	-32,2 ($\pm 3,31$)
NPAB-AmB	$131,7 \pm 53,8$ (100 %)	0,141	-37,6 ($\pm 5,56$)
NPAGL-AmB	$53,3 \pm 11,5$ (18,72 %) $161,9 \pm 32,0$ (81,28 %)	0,428	-41,3 ($\pm 4,39$)

O IPD para as NPs (Tabela 2) indicam que há uma distribuição de partículas heterogêneas (SOUZA et al., 2012), isto é devido à presença, em menor quantidade de NPs com tamanho parcialmente diferente ao tamanho médio apresentado. É possível observar também que após a incorporação do fármaco as NPs apresentam

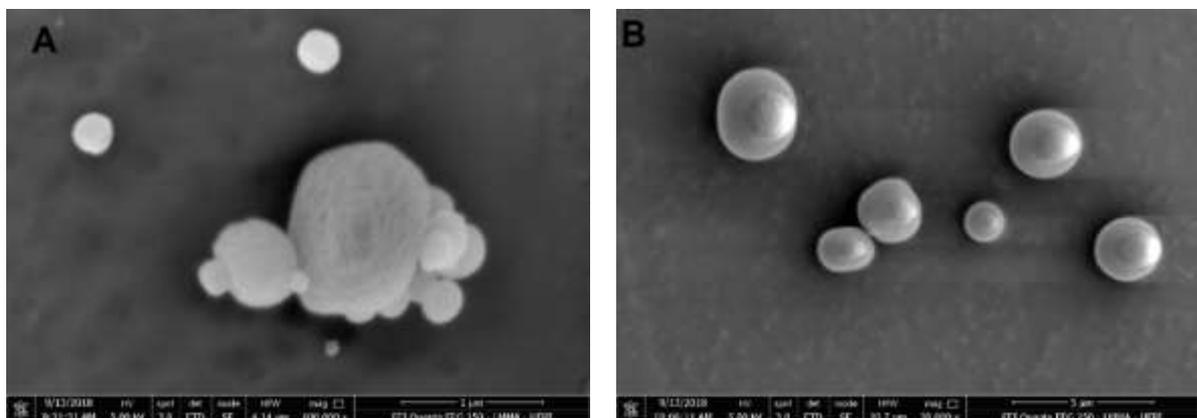
o IPD menor, quando comparado a NPs sem o fármaco, isso pode indicar que as NPs incorporadas com a AmB estão relativamente mais homogêneas quando comparado as NPs livres.

De acordo com a literatura o potencial zeta em módulo deverá apresentar valor superior a 30 mV, pois grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação em função das colisões ocasionadas por nanopartículas adjacentes, o que se torna também um bom indicativo de estabilidade físico-química da suspensão coloidal (FRANCISCA et al., 2016). Para as NPs da goma de angico e da Mistura AG observa-se o potencial zeta (Tabela 2) em módulo superior a 30 mV e que aumenta após incorporação do fármaco, $|37,6|$ e $|41,3|$ para a NpAB-AmB e NpAGL-AmB, respectivamente, que provavelmente resulta de uma boa estabilidade coloidal das NPs da goma do angico branco e da Mistura AG quando incorporadas com o fármaco Anfotericina B.

5.4 Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura

Afim de verificar a morfologia das nanopartículas foram realizadas análises de microscopia eletrônica de varredura. Na Figura 15 tem-se imagens das nanopartículas da goma do angico branco, NpAB (Figura 15 A) e das nanopartículas do angico branco incorporadas com o fármaco Anfotericina B, NpAB-AmB (Figura 15 B) aonde é possível observar partículas esféricas com superfícies lisas e tamanhos variados.

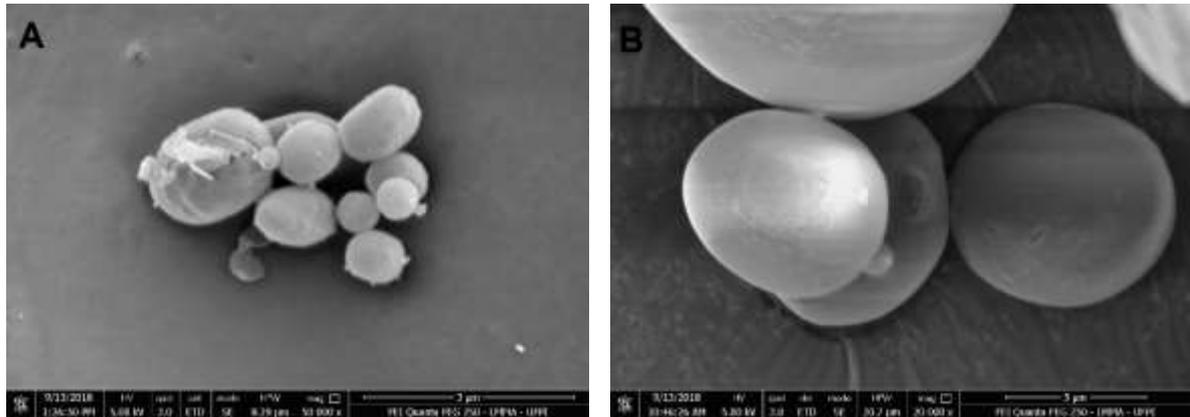
FIGURA 15. Imagens de microscopia eletrônica de varredura das nanopartículas, NpAB (A) e NpAB-AmB (B).



Na Figura 16, observa-se as imagens das nanopartículas da Mistura AG, NpAGL (Figura 16 A) e da Mistura AG incorporada com o fármaco, NpAGL-AmB

(Figura 16 B), das quais é possível a percepção também de partículas esféricas com certa rugosidade para as NpAGL e lisas em NpAGL-AmB.

FIGURA 16. Imagens de microscopia eletrônica de varredura das nanoparticulas NpAGL (A) e NpAGL-AmB (B).



5.5 Teor de encapsulamento e cinética *in vitro* das NPs com Anfotericina B

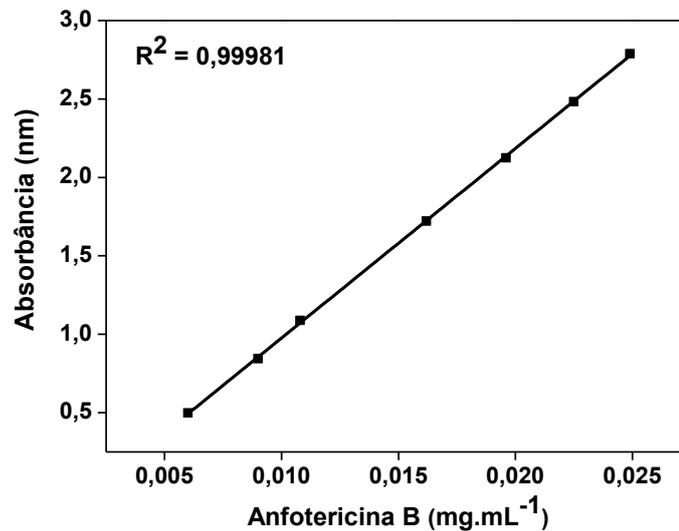
5.5.1 Teor de encapsulamento do fármaco

O teor de fármaco carregado nas amostras de NpAB-AmB e NpAGL-AmB foram determinados por UV-Vis utilizando uma curva de calibração estabelecida previamente (Figura 17), na qual obteve-se um fator de correlação linear de 0,99981, com isso os teores obtidos foram de 7,2 e 20,2%, respectivamente, isso mostra que a adição de glicerol ao heteropolissacarídeo da goma de angico pode ter provocado uma maior impregnação do fármaco as NPs, ocasionando assim, um maior teor de fármaco disponível para posterior liberação.

Esses resultados confirmam as previsões na espectroscopia de infravermelho ao haver uma diminuição na intensidade nas bandas de hidroxila das amostras NpAGL-AmB (Figura 10 B). É comum o uso de aditivos as gomas a fim de proporcionar melhorias físico e químicas nas aplicações a que estas se destinam. O glicerol está ganhando espaço em pesquisas “*Drug Delivery*” e resultados semelhantes ao deste trabalho foi publicado por PAOLICELLI et. al. (2018), no qual obtiveram melhorias nas propriedades físicas e mecânicas de filmes finos da goma gelana utilizado para a

liberação de fármacos. O glicerol foi associado a alta eficiência de incorporação do fármaco ao filme.

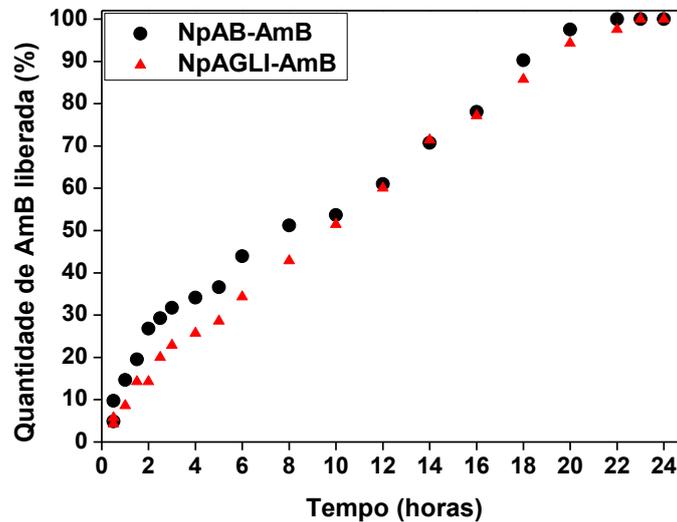
FIGURA 17. Curva de Calibração de Anfotericina B em DMSO.



5.5.2 Liberação *in vitro* de Anfotericina B presente nas NPs

Os resultados dos estudos de liberação *in vitro* das amostras NpAB-AmB e NpAGL-AmB estão apresentados na Figura 18. Os perfis de liberação das NPs indicam que a incorporação da Anfotericina-B foi bem sucedida e o sistema pode efetivamente sustentar a liberação do fármaco sob as condições testadas. Nas primeiras 3 horas foi observado 31,70 % e 22,86 % de liberação para a NpAB-AmB e NpAGL-AmB, respectivamente. Isso sugere que o fármaco incorporado na Mistura AG pode ter apresentado uma melhor interação, promovendo uma liberação levemente mais morosa quando comparado a incorporação com goma de angico pura. Resultado semelhante foi obtido por (APARNA et al., 2018), utilizando gelatina A carboximetilada e incorporada com Anfotericina B, após 3 horas apresentou uma liberação de 32%.

FIGURA 18. Cinética de liberação *in vitro* das NPs de angico branco purificada carregadas com Anfotericina B (NpAB-AmB) e NPs da Mistura AG incorporada com Anfotericina B (NpAGL-AmB).



A literatura indica que essa liberação consideravelmente rápida (superior a 30%) na etapa inicial é devido à presença de fármaco adsorvido na superfície da nanopartícula ou mantida próxima a ela (FRANCISCA et al., 2016). A liberação convertida em porcentagem máxima de fármaco ocorreu em 22 horas para NpAB-AmB e 23 horas para NpAGL-AmB, ambos resultados são satisfatórios pois foi observado um período de aproximadamente 24 horas para liberação máxima do fármaco, na qual obteve estabilização nos valores de absorvância.

5.5.2 Estudo cinético da Liberação *in vitro* de Anfotericina B presente nas NPs

O modelo matemático mais adequado para descrever o perfil cinético de liberação da Anfotericina B para as formulações propostas nesse trabalho foi selecionado após análise de regressão linear, utilizando o coeficiente de determinação, R^2 para avaliar o ajuste de um modelo (COSTA, 2002). Sendo o modelo escolhido aquele que obteve o valor de R^2 mais próximo de 1. Os modelos aplicados nesse estudo estão expostos na Tabela 3. Esses modelos são os mais usados na literatura para descrever perfil de dissolução (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002).

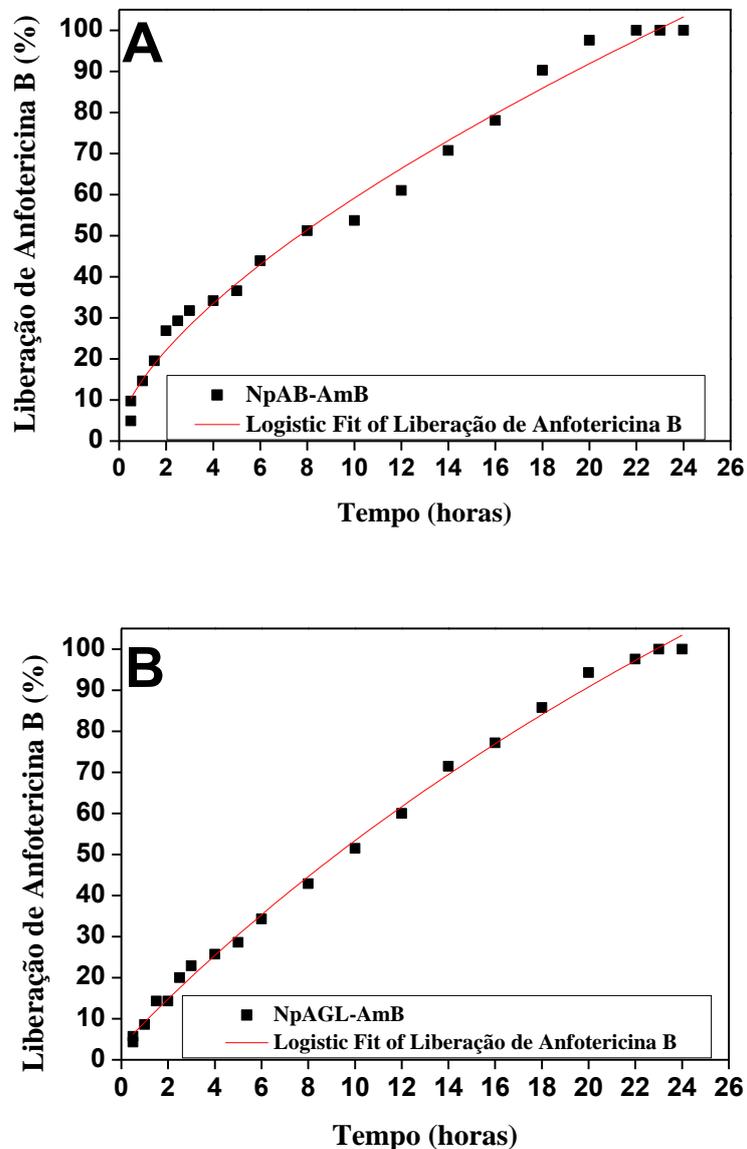
TABELA 3. Modelos matemáticos aplicados as curvas de liberação in vitro da AmB incorporada nas nanopartículas de NpAB e NpAGL.

Amostras	Valores de R ²			
	Log-Logistic	Exponencial	Extreme	Gauss Amp
NpAB-AmB	0,9869	0,9835	0,9819	0,9819
NpAGL-AmB	0,9965	0,9964	0,9963	0,9964

Como pode ser observado na Tabela 3 o modelo que mais se ajustou ao estudo foi *Logistic dose Response in Pharmacology* (Log-logistic), com valores de R² de 0,9869 para NpAB-AmB e 0,9965 para NpAGL-AmB. As curvas de liberação da AmB ajustadas ao modelo podem ser observadas na Figura 19.

Costa (2002) diz em seu artigo que “o transporte dos fármacos no interior dos sistemas farmacêuticos e a sua liberação podem envolver muitas etapas ocasionadas por alguns fenômenos físicos ou químicos, tornando-se a tarefa de arranjar um modelo matemático para descrever esses conjuntos de fenômenos por vezes, difícil.” Contudo o processo de dissolução é de fundamental importância para a biodisponibilidade e eficácia terapêutica de vários fármacos (SIEPMANN; SIEPMANN, 2013).

FIGURA 19. Curvas de cinética de liberação da AmB incorporadas nas Np's ajustadas ao modelo *Logistic dose Response in Pharmacology* (Log-logistic).

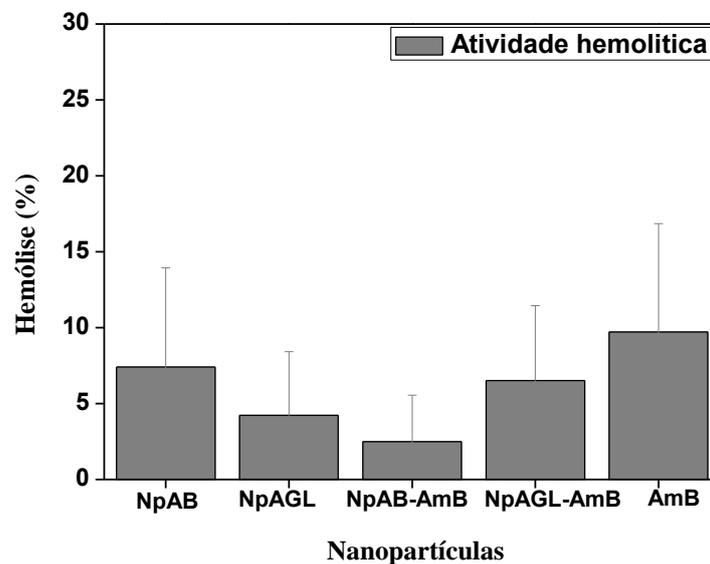


Segundo Nweke e Ogbonna (2017) a curva dose-resposta pode ser ajustada a vários modelos dose-resposta monofásicos, como os modelos logísticos, Weibull, Logit, Probit, Gompertz e suas modificações. No caso do modelo Log-logistic, este produz curvas que são estritamente decrescentes de uma resposta máxima em dose zero (controle) para um limite inferior em dose infinita ou estão aumentando estritamente de resposta nula (também controle) a resposta máxima em dose infinita dependendo se a resposta ou resposta relativa (efeito) está sendo analisada, esse último se aplica a liberação da AmB estudada nesse trabalho.

5.6 Atividade hemolítica

Ao propor um material para possível utilização em dispositivos biomédicos, como é o caso de sistemas para entregas de fármacos, deve-se levar em consideração que estes materiais podem entrar em contato com o sangue, e conseqüentemente afetar negativamente as células do sangue, causando hemólise. Para Jeswani e colaboradores (2015), hemólise indica a quebra da membrana eritrocitária com liberação de hemoglobina no plasma. Dentre os vários causadores de hemólise pode-se citar as drogas farmacológicas, pois a interação da membrana eritrocitária com o fármaco, resulta em efeitos colaterais, como por exemplo, a anemia hemolítica. Com isso, a determinação da atividade hemolítica das NPs da goma de angico e da Mistura AG com e sem o fármaco foram estudadas e os dados obtidos estão representados na Figura 20.

FIGURA 20. Atividade hemolítica das NPs com e sem AmB em suspensão a 5% de glóbulos vermelhos após uma hora de incubação.



Analisando os resultados obtidos (Figura 20) para os materiais a 1500 mg mL^{-1} e comparando com a classificação descrita na literatura (FAROOQ et al., 2017) (0-2 % material não hemolítico, 2-5 % material ligeiramente hemolítico, acima de 5% material hemolítico), porém Amin e Dannenfelser (2006) defendem que em geral hemólise de 10% a 25% são os limites relativos. Isso quer dizer que valores de hemólise abaixo de 10% é considerado não hemolítico, e valores acima de 25% são

hemolíticos. Vale também observar que os limites de hemólise se alteram a depender da espécie, por exemplo, para humanos o limite é de 10%, e animais como coelhos os limites são entre 0% e 37% (AMIN; DANNENFELSER, 2006). Assim, pode-se observar que as nanopartículas apresentam características menos hemolíticas que a Anfotericina B obtida comercialmente, levando-se em consideração os desvios de cada amostra. E que a Anfotericina B incorporada as nanopartículas de angico e glicerol obtiveram melhora na sua biocompatibilidade, o que pode estar associado as interações ocorridas entre as nanopartículas e a Anfotericina B durante o procedimento de incorporação. Com isso, fortifica a teoria que as NPs, como mostrado anteriormente, apresentam efeito *drug delivery* e pode estar associada a um melhorando dos efeitos colaterais causados pelo fármaco quando administrado de forma pura (vendido comercialmente).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com tudo o que foi estudado neste trabalho, pode-se concluir que o procedimento utilizado para isolamento e purificação da goma do angico a partir do exsudato, foi eficiente e rentável ao apresentar valores de rendimento de 87,54%, 74,67% e 78,93% para o isolamento, primeira e segunda etapa de purificação, respectivamente. A Mistura AG propiciou a melhora no teor de incorporação do fármaco quando comparado a utilização apenas da goma de angico purificada. As análises de infravermelho e termogravimetria foram relacionadas com os dados reportados na literatura e auxiliaram na caracterização da composição dos materiais obtidos, ficando evidente a incorporação do fármaco, a presença de heteropolissacarídeo na goma de angico branco e total polimerização do glicerol na formação da Mistura AG. Os estudos dos tamanhos médios dos materiais indicam a obtenção de partículas em escala nanométrica, o que evidencia a eficácia da metodologia utilizada para obtenção das nanopartículas NpAB, NpAGL, NpAB-AmB e NpAGL-AmB. Foi possível propor a partir da comparação dos tamanhos médios das nanopartículas que a incorporação do fármaco nas NPs ocorreu no núcleo. As NPs derivadas do Angico Branco apresentaram estabilidade coloidal satisfatória levando-se em consideração seus valores de potencial zeta. O estudo de liberação *in vitro* do fármaco nas primeiras três horas exibiram teores de 31,70 % e 22,86 % para as nanopartículas de angico e Mistura AG incorporadas, respectivamente, seguido de liberação controlada até aproximadamente 24 horas e tendo o modelo Log-logistic como modelo matemático. O teste hemolítico mostrou que após a incorporação das nanopartículas os valores de hemólise foram menor quando comparado ao fármaco obtido comercialmente, o que torna esse estudo uma rota viável para o sistema *drug delivery*.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, F. O. M. S. et al. Chitosan/cashew gum nanogels for essential oil encapsulation. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 4, p. 1277–1282, 2012.

ALCALÁ-ALCALÁ, S.; QUINTANAR-GUERRERO, D. La terapia a nanoescala: ensamblaje de estructuras liberadoras de fármacos. **Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología**, v. 7, n. 12, p. 32–48, 2014.

AMIN, K.; DANNENFELSER, R.-M. In Vitro Hemolysis: Guidance for the Pharmaceutical Scientist. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 95, n. 6, p. 1173–1176, 2006.

APARNA, V. et al. Carboxymethylated ι-carrageenan conjugated amphotericin B loaded gelatin nanoparticles for treating intracellular *Candida glabrata* infections. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 110, p. 140–149, 2018.

APOLINARIO, A. . et al. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Revista de ciencias farmaceuticas basica e aplicada**, v. 31, n. 3, p. 225–231, 2010.

ATKINS, P. W. .; JONES, L. L. **Princípios de Química: Questionando a vida moderna e o ambiente**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2012.

BAJPAI, S. K. et al. Controlled release of Doxycycline from gum acacia/poly(sodium acrylate) microparticles for oral drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 1064–1071, 2017.

BILANOVIC, D.; STAROSVETSKY, J.; ARMON, R. H. Preparation of biodegradable xanthan-glycerol hydrogel, foam, film, aerogel and xerogel at room temperature. **Carbohydrate Polymers**, v. 148, p. 243–250, 2016.

BRIOUDE, M. D. M. et al. Synthesis and characterization of aliphatic polyesters from glycerol, by-product of biodiesel production, and adipic acid. **Materials Research**, v. 10, n. 4, p. 335–339, 2007.

CALDERÓN, M. et al. Dendritic polyglycerols for biomedical applications. **Advanced Materials**, v. 22, n. 2, p. 190–218, 2010.

CHIELLINI, E. et al. Poly(hydroxyalkanoates)-based polymeric nanoparticles for drug delivery. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2009, 2009.

COSTA, P. J. C. DA. Avaliação in vitro da bioequivalência de formulações farmacêuticas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 2, p. 141–153, 2002.

COSTA, S. M. O.; RODRIGUES, J. F.; PAULA, R. C. M. DE. Monitorização do processo de purificação de gomas naturais: Goma do Cajueiro. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, p. 49–55, 1996.

DE PAULA, R. C. M.; SANTANA, S. A.; RODRIGUES, J. F. Composition and rheological properties of *Albizia lebbek* gum exudate. **Carbohydrate Polymers**, v.

44, n. 2, p. 133–139, 2001.

DELGOBO, C. L. et al. Gum heteropolysaccharide and free reducing mono-and oligosaccharides of *Anadenanthera colubrina*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 7, p. 1207–1214, 1998.

DELGOBO, C. L. et al. The free reducing oligosaccharides of angico branco (*Anadenanthera colubrina*) gum exudate: An aid for structural assignments in the heteropolysaccharide. **Carbohydrate Research**, v. 320, n. 3–4, p. 167–175, 1999.

DENG, Y. et al. The effect of hyperbranched polyglycerol coatings on drug delivery using degradable polymer nanoparticles. **Biomaterials**, v. 35, n. 24, p. 6595–6602, 2014.

DHANKA, M.; SHETTY, C.; SRIVASTAVA, R. Methotrexate loaded gellan gum microparticles for drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 110, p. 346–356, 2018.

DIMER, F. A. et al. Quim. Nova,. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1520–1526, 2013.

DODI, G. et al. Carboxymethyl guar gum nanoparticles for drug delivery applications: Preparation and preliminary in-vitro investigations. **Materials Science and Engineering C**, v. 63, p. 628–636, 2016.

EL-SAY, K. M.; EL-SAWY, H. S. Polymeric nanoparticles: Promising platform for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 528, n. 1–2, p. 675–691, 2017.

FAROOQ, M. et al. Synthesis, characterization and modification of Gum Arabic microgels for hemocompatibility and antimicrobial studies. **Carbohydrate Polymers**, v. 156, p. 380–389, 2017.

FILIPPIN, F. B.; SOUZA, L. C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 167–194, 2006.

FLORENCE, A. T. Nanotechnologies for site specific drug delivery: Changing the narrative. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 551, n. 1–2, p. 1–7, 2018.

FRANCISCA, S. et al. Acetylated cashew gum-based nanoparticles for transdermal delivery of diclofenac diethyl amine. **Carbohydrate Polymers**, v. 143, p. 254–261, 2016.

FRANZINI, C. M. **Complexos de Inclusão de Anfotericina B com derivados de ciclodextrinas e sua incorporação em microemulsões lipídicas biocompatíveis.** [s.l.] Universidade Estadual Paulista, 2010.

GABORIAU, F. et al. Heat-induced superaggregation of amphotericin B reduces its in vitro toxicity: a new way to improve its therapeutic index. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 11, p. 2345–2351, 1997.

GAGÓS, M.; ARCZEWSKA, M. **FTIR spectroscopic study of molecular organization of the antibiotic amphotericin B in aqueous solution and in DPPC**

lipid monolayers containing the sterols cholesterol and ergosterol *European Biophysics Journal*, 2012.

GANIE, S. A.; ALI, A.; MAZUMDAR, N. Iodine derivatives of chemically modified gum Arabic microspheres. **Carbohydrate Polymers**, v. 129, p. 224–231, 2015.

GLINEL, K. et al. Determination of substituents distribution in carboxymethylpullulans by NMR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 328, n. 3, p. 343–354, 2000.

ÍTAVO, L. C. V. et al. Kinetics of thermal decomposition processes and kinetics of degradation in rumen liquor of glycerin derived from biodiesel production. **Industrial Crops and Products**, v. 104, n. January, p. 1–6, 2017.

JESWANI, G. et al. Recent approaches for reducing hemolytic activity of chemotherapeutic agents. **Journal of Controlled Release**, v. 211, p. 10–21, 2015.

JOHNSON, R. Amphotericin B Nano-Formulations: Development, characterisation and suitability for oral administration. 2015.

JONG, W. H. DE. Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. **International Journal of Nanomedicine**, v. 3, n. 2, p. 133–149, 2008.

KUMAR, B. et al. Recent advances in nanoparticle-mediated drug delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 41, p. 260–268, 2017.

LEAL, M. C. B. DE M. **Extração, caracterização e modificação química da goma da “Anadenathera macrocarpa”**. [s.l.] Universidade Federal de Goiás, 2014.

LIMA, M. R. et al. Hydrophobization of cashew gum by acetylation mechanism and amphotericin B encapsulation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 523–530, 2018.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Modified release pharmaceutical forms: hydrophilic polymers. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**, v. 41, n. 2, p. 143–154, 2005.

ŁUBKOWSKI, J. et al. Thermal behaviour and stability of amphotericin B. **Thermochimica Acta**, v. 155, n. C, p. 29–37, 1989.

MA, Y. et al. Chitosan membrane dressings toughened by glycerol to load antibacterial drugs for wound healing. **Materials Science and Engineering C**, v. 81, n. May, p. 522–531, 2017.

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, n. 4, 2002.

MARSON-ASCÊNCIO, P. G.; ASCÊNCIO, S. D.; BAGGIO, S. F. Z. ISOLAMENTO E ANÁLISE QUÍMICA PARCIAL DE EXOPOLISSACARÍDEOS DA DIATOMÁCEA MARINHA CULTIVADA *Coscinodiscus wailesii* (Coscinodiscales, Bacillariophyta). **Química Nova**, v. 35, n. 8, p. 1542–1548, 2012.

MATRICARDI, P. et al. Preparation and characterization of novel Gellan gum hydrogels suitable for modified drug release. **Molecules**, v. 14, n. 9, p. 3376–3391, 2009.

MENDES, A. N. et al. Encapsulation of Piper cabralanum (Piperaceae) nonpolar extract in poly(methyl methacrylate) by miniemulsion and evaluation of increase in the effectiveness of antileukemic activity in K562 cells. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 8363–8373, 2017.

MENDES, R. M. B. **Obtenção e caracterização de biofilmes à base dos polímeros naturais: pectina e goma do cajueiro com perspectivas de uso em processos de cicatrização**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ CAMPUS, 2013.

MISRI, R. et al. Investigation of hydrophobically derivatized hyperbranched polyglycerol with PEGylated shell as a nanocarrier for systemic delivery of chemotherapeutics. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 11, n. 7, p. 1785–1795, 2015.

MOREIRA, C. A.; MACHADO, P. V. F. **Síntese de hidrogel a partir do glicerol**. Congresso Brasileiro de Engenharia Química. **Anais...**2016

MORETÃO, M. P. et al. Effect of an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco) on peritoneal macrophage functions. **Immunology Letters**, v. 89, n. 2–3, p. 175–185, 2003.

MORETÃO, M. P. et al. Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages activated by an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco). **Immunology Letters**, v. 93, n. 2–3, p. 189–197, 2004.

NISHI, K. K. et al. Amphotericin B-Gum Arabic Conjugates: Synthesis, Toxicity, Bioavailability, and Activities Against *Leishmania* and Fungi. **Pharmaceutical Research**, v. 24, n. 5, p. 971–980, 2007.

NWEKE, C. O.; OGBONNA, C. J. Statistical models for biphasic dose-response relationships (hormesis) in toxicological studies. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 12, n. 1, p. 39–55, 2017.

OLIVEIRA, M. A. et al. Chitosan/"angico" gum nanoparticles: Synthesis and characterization. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, n. 2, p. 448–451, 2009.

OLIVEIRA, M. DE A. Modificação Química da Goma do angico (*Anadenanthera macrocarpa* Benth): utilização como adsorvente de metais pesados. **Dissertação. Pós-Graduação de Química Orgânica e Inorgânica. Universidade Federal do Ceará**, p. 1–89, 2005.

OLIVEIRA, R. B.; LIMA, E. M. Polímeros Na Obtenção De Sistemas De Liberação De Fármacos Polymers in Drug Delivery Systems. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 1, p. 29–35, 2006.

PAOLICELLI, P.; PETRALITO, S.; VARANI, G.; NARDONI, M.; PACELLI, S.; MUZIO,

L. D.; TIRILLÒ, J.; BARTULI, S. C.; CASADEI, M. A.; ADROVER, A. Effect of glycerol on the physical and mechanical properties of thin gellan gum films for oral drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 547, n. 1-2, p. 226-234, 2018.

PAULA, H. C. B. et al. Lippia sidoides essential oil encapsulation by angico gum/chitosan nanoparticles. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 12, p. 2359–2366, 2010.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à Espectroscopia**. 5ª ed. São Paulo: Cengage Learning, 2016, p. 716.

PINHEIRO, I. M. **Desenvolvimento tecnológico de emulgel de anfotericina B: estudo de formulação e tratamento da leishmaniose cutânea em modelo experimental**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ CAMPUS, 2014.

PITOMBEIRA, N. A. O. et al. Self-assembled nanoparticles of acetylated cashew gum : Characterization and evaluation as potential drug carrier. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 610–615, 2015.

PLÁCIDO, A. et al. **Acetylated Cashew Gum- Based Nanoparticles : Drug Delivery of the Alkaloid**. nanoPT2017. **Anais...2016**

QI, G. et al. Effects of glycerol and nanoclay on physiochemical properties of camelina gum-based films. **Carbohydrate Polymers**, v. 152, p. 747–754, 2016.

RAJA, M. M. et al. **Polymeric Nanomaterials**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019.

RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 36, n. 7, p. 887–913, 2011.

REIS, C. E. et al. **ESTUDO DA INCORPORAÇÃO DE ANFOTERICINA B EM MEMBRANAS DE LÁTEX**. 6º Congresso de Inicianção Científica e Tecnológica. **Anais...São Paulo: 2017**

RIBEIRO, A. J. et al. Gums' based delivery systems: Review on cashew gum and its derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 147, p. 188–200, 2016.

ROBERVAL, J. et al. **Blendas De Alcool Polivinilivo (Pva) E Goma Do Angico (Ga)**. Anais do 9º Congresso Brasileiro de Polímeros. **Anais...2007**

RODRIGUES, J. F.; PAULA, R. C. M. DE; COSTA, S. M. O. Métodos de Isolamento de Gomas Naturais: Comparação Através da Goma do Cajueiro (Anacardium occidentale L). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, p. 31–36, 1993.

SANTOS, J. S. et al. Beneficial effects of Anadenanthera colubrina (Vell.) Brenan extract on the inflammatory and nociceptive responses in rodent models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, n. 1, p. 218–222, 2013.

SHARMA, S. et al. Trends in Analytical Chemistry PLGA-based nanoparticles : A new paradigm in biomedical applications. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 80, p. 30–40, 2016.

SIEPMANN, J.; SIEPMANN, F. Mathematical modeling of drug dissolution. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, n. 1, p. 12–24, 2013.

SILVA, A. G. DA; RODRIGUES, J. F.; PAULA, R. C. M. DE. Composição e propriedades reológicas da goma do Angico (*Anadenanthera Macrocarpa* Benth). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, p. 34–40, 1998.

SINGH, V.; JOSHI, S.; MALVIYA, T. International Journal of Biological Macromolecules Carboxymethyl cellulose-rosin gum hybrid nanoparticles: An efficient drug carrier. v. 112, p. 390–398, 2018.

SOLIMAN, G. M. Nanoparticles as safe and effective delivery systems of antifungal agents: Achievements and challenges. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 523, n. 1, p. 15–32, 2017.

SOUZA, P. M. S. et al. **Desenvolvimento de nanocápsulas de poli- ϵ -caprolactona contendo o herbicida atrazina** *Quimica Nova*, 2012.

SPERANDIO, D. et al. Cell-associated hemolysis activity in the clinical strain of *Pseudomonas fluorescens* MFN1032. **BMC microbiology**, v. 10, p. 124, 2010.

SWIERCZEWSKA, M. et al. Polysaccharide-based nanoparticles for theranostic nanomedicine. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 99, p. 70–84, 2016.

TELI, M. K.; MUTALIK, S.; RAJANIKANT, G. K. Nanotechnology and Nanomedicine: Going Small Means Aiming Big. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, n. 16, p. 1882–1892, 2010.

WANG, S.; JING, Y. Study on the barrier properties of glycerol to chitosan coating layer. **Materials Letters**, v. 209, p. 345–348, 2017.

WEBER, C. R. et al. *Anadenanthera colubrina*: um estudo do potencial terapêutico. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 92, n. 4, p. 235–244, 2011.

XIE, A. J. et al. Chinese quince seed gum and poly (N,N-diethylacryl amide-co-methacrylic acid) based pH-sensitive hydrogel for use in drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 185, n. December 2017, p. 96–104, 2018.

ZOHURIAAN, M. J.; SHOKROLAHI, F. Thermal studies on natural and modified gums. **Polymer Testing**, v. 23, n. 5, p. 575–579, 2004.