



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ- REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

JESSICA DO AMARAL RODRIGUES

**OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS A BASE DA GOMA DO
CAJUEIRO ACETILADA PARA INCORPORAÇÃO DE EPIISOPILOTURINA**

**PARNAÍBA - PI
2016**



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ- REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

JESSICA DO AMARAL RODRIGUES

**OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS A BASE DA GOMA DO
CAJUEIRO ACETILADA PARA INCORPORAÇÃO DE EPIISOPILOTURINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Linha de Pesquisa: Nanotecnologia

Orientador: Durcilene Alves da Silva

**PARNAÍBA - PI
2016**

JESSICA DO AMARAL RODRIGUES

**OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS A BASE DA GOMA DO
CAJUEIRO ACETILADA PARA INCORPORAÇÃO DE EPIISOPILOTURINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr^a. Durcilene Alves da Silva – UFPI

Membro presidente

Prof. Dr^a. Luciana Rocha Faustino – UFPI

Membro avaliador

Prof. Dr. Vinicius Saura Cardoso - UFPI

Membro avaliador

“É enfrentando as dificuldades que você fica forte. É superando seus limites que você cresce. É resolvendo problemas que você desenvolve a maturidade. É desafiando o perigo que você descobre a coragem. Arrisque e descobrirá como as pessoas crescem quando exigem mais de si próprias”.

(Roberto Shinyashiki)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por iluminar meu caminho e me dar forças para prosseguir.

À minha mãe, meu amor maior, que mesmo sem entender o mundo das pesquisas científicas, sempre me dirige palavras de incentivo.

À meu pai, por todo carinho, amor e confiança depositada em mim durante toda a minha vida.

À meu irmão, companheiro de vida, que mesmo na distância, sempre se preocupou com o andamento dos meus estudos.

À meu esposo, por todo apoio, compreensão, renúncia e pelo seu incomparável amor.

À professora Durcilene por toda disposição, paciência e ao tempo que generosamente me dedicou.

Aos meus amigos do BIOTEC por todo apoio, companheirismo e entusiasmo.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia que contribuíram para a minha formação.

E a todos, colegas ou amigos, que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste estudo.

LISTA DE ABREVIATURAS

GCA	Goma do cajueiro acetilada
EPI	Epiisopiloturina
DLS	Dynamic light Scattering
AFM	Microscopia de força atômica
NTA	Análise de rastreamento de nanopartículas
PDI	Índice de polidispersão
PZ	Potencial zeta
UV-vis	Ultravioleta visível
PEG	Polietilenoglicol
PLGA	Poly (lactic-co-glycolic acid)

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO I

Figura 1. Cajueiro (<i>Anacardium occidentale</i> L.).....	19
Figura 2. (A) Exsudato obtido do cajueiro. (B) Goma do cajueiro bruta.....	20
Figura 3. Estrutura química da goma do cajueiro acetilada.....	21
Figura 4. Estrutura química da epiisopiloturina.....	22

CAPITULO II

Figura 1. Distribuição de tamanho das nanopartículas a base da goma do cajueiro acetilada (NP1) e nanopartícula a base da goma do cajueiro acetilada incorporada com epiisopiloturina (NP2).	38
Tabela 1. Distribuição de tamanho, índice de polidispersão (PDI), potencial zeta e eficiência de incorporação das nanopartículas sintetizadas.	39
Figura 2. Análise do tamanho da partícula (A) e o índice de polidispersão (B) em função do tempo para as nanopartículas formuladas.	41
Figura 3. (A) Distribuição de tamanho das nanopartículas com (NP2 e NP6) e sem EPI (NP1 e NP5) obtidos por DLS e NTA. (B) Concentração de nanopartículas obtidas por NTA nas concentrações de polímeros (NP1 e NP5) com e sem adição de alcaloide em função do tamanho.	43
Figura 4. Análise morfológica obtida por AFM de nanopartículas a base da goma do cajueiro (NP5) e nanopartículas a base da goma do cajueiro com EPI incorporadas (NP8). (A) Nanopartículas com EPI (NP8). (B) Nanopartículas sem adição do alcaloide (NP5). (C) Versão ampliada de 4 ^a (NP8) (2 μ m).	44
Figura 5. (A) Perfil de liberação <i>in vitro</i> da EPI através de uma membrana de diálise (NP8). (B) Mecanismo de liberação <i>in vitro</i> da EPI a partir da matriz polimérica de goma do cajueiro, de acordo com o modelo de Korsmeyer-peppas.	45

RODRIGUES, Jessica do Amaral. **Obtenção de nanopartículas poliméricas a base da goma do cajueiro para incorporação de epiisopiloturina**. 2016. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, 2016.

RESUMO

Os produtos naturais estão ocupando um crescente interesse no panorama atual devido seu potencial de aplicação em uma ampla variedade de setores tradicionais e emergentes, tais como na indústria alimentícia, têxtil, cosmética, bem como a biomédica. Sua crescente utilização com fins biomédicos e farmacêutica deve-se a suas características como abundância, renovação, biodegradabilidade, biocompatibilidade, não-toxicidade, além de serem fontes de baixo custo. A goma do cajueiro é um polissacarídeo extraído da espécie *Anacardium occidentale* L., uma planta tropical extensivamente cultivada na região nordeste do Brasil. A literatura reporta vários efeitos na área biomédica, destacando a goma do cajueiro efeito gastroprotetor, antidiarreico, antitumoral, modulatório de macrófagos e no tratamento tópico de feridas. Bem como, destaca-se ainda na utilização de seus derivados na produção de nanopartículas poliméricas para a incorporação de fármacos, o que permite uma liberação controlada e sustentada. A epiisopiloturina (EPI), também um produto natural, é um metabólito secundário extraído das folhas do Jaborandi, apresenta ação contra o parasita da esquistossomose e, como demonstrado em um estudo recente, promissores efeitos anti-inflamatório e antinociceptivo. Neste contexto, buscou-se sintetizar nanopartículas a base da goma do cajueiro acetilada incorporadas com EPI, visando promover uma liberação controlada e sustentada, aumentando assim, os benefícios terapêuticos e minimizando seus possíveis efeitos secundários. As nanopartículas foram sintetizadas pela técnica de diálise, em duas concentrações de polímero e em diferentes proporções polímero:alcaloide. O tamanho médio e índice de polidispersão (PDI) foram determinados pela análise de espalhamento de luz dinâmico (espectroscopia de correlação de fótons – DLS) e o potencial zeta foi determinado a partir da mobilidade eletroforética das amostras. Foi determinado a quantidade de EPI incorporada nas nanopartículas, além de serem analisadas por Microscopia de Força Atômica (AFM) e Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA). Para compreender o mecanismo de liberação *in vitro* os dados foram tratados pelo método de Korsmeyer-Peppas. As nanopartículas sintetizadas apresentaram tamanhos médios entre 108,6 e 154,4 nm e PDI entre 0,120 e 0,212. O potencial zeta foi negativo para todas as formulações com e sem o ativo. Foi identificada uma eficiência de

incorporação variando entre 32,2 e 55% de epiisopiloturina. A análise das imagens obtidas por AFM permite afirmar que as nanopartículas apresentam formato esférico e se distribuem de forma agrupada. O tamanho das nanopartículas por NTA encontram-se em consonância com os obtidos por DLS. Além disso, a concentração de nanopartículas variou entre $(92,4) \times 10^9$ e $(136,5) \times 10^9$ partículas/mL. A liberação da epiisopiloturina nanoformulada ocorreu de forma lenta e gradual, apresentando um equilíbrio por volta de 6h de liberação. O valor de n encontrado foi de 0,37 para a liberação da EPI, sendo possível afirmar que a transferência de massa segue o modelo de difusão fickiana. Os resultados obtidos indicam que as nanopartículas a base da goma do cajueiro acetilada incorporadas com EPI apresentam características de sistemas coloidais nanométricos, que permite um perfil de liberação lento e gradual, com difusão do tipo fickiana tornando assim formas viáveis de formulações de nanopartículas.

Palavras-chaves: cajueiro, polímero, acetilação, pilocarpina, alcaloide, liberação.

RODRIGUES, Jessica do Amaral. **Obtenção de nanopartículas poliméricas a base da goma do cajueiro para incorporação de epiisopiloturina**. 2016. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, 2016.

ABSTRACT

Natural products are taking an increasing interest in the current situation due to its potential application in a wide variety of traditional and emerging sectors, such as the production of biocompatible materials for biomedical devices. Thus, we emphasize the use of natural polymers that have favorable characteristics for biomedical and pharmaceutical applications, among which we highlight abundance, renewal, biodegradability, biocompatibility, non-toxicity, besides being inexpensive sources. The cashew gum is a polysaccharide extracted from *Anacardium occidentale L.* species, a tropical plant extensively cultivated in northeastern Brazil. Biomedical gum cashew stands out for its gastroprotective effect, anti-diarrheal, anti-tumor, modulatory macrophages, effective in the topical treatment of wounds. As well, there is still the use of derivatives in the production of polymeric nanoparticles for incorporation of drugs, which enables a controlled and sustained release. The epiisopiloturine (EPP), also a natural product extracted from the leaf Jaborandi is an imidazole alkaloid, which has a proven activity in vitro against *Schistosoma mansoni* and in a more recent study has shown promising anti-inflammatory and analgesic effect. In this context, it sought to nanoformulate EPP in a polymer system of acetylated cashew gum to allow a controlled release, thus increasing the therapeutic benefit while minimizing possible side effects. The nanoparticles were synthesized by dialysis technique, two polymer concentrations and different proportions polymer: alkaloid. The average size and polydispersity index (PDI) were determined by dynamic light scattering analysis (photon correlation spectroscopy - DLS) and zeta potential was determined from the electrophoretic mobility of the samples. It was determined the amount of EPP incorporated in the nanoparticles, and they were analyzed by Atomic Force Microscopy (AFM) and Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). To understand the in vitro release mechanism the data were treated by Korsmeyer-Peppas method. The synthesized nanoparticles have average sizes between 108.6 and 154.4 nm and PDI between 0.120 and 0.212. The zeta potential was negative for all formulations with and without active. An encapsulation efficiency was identified of up to 55% of epiisopiloturine. The analysis of images obtained by atomic force microscopy to suggest that the nanoparticles have spherical shape and are distributed in an aggregated manner. The size of the nanoparticles by NTA are in line with those obtained by DLS. Furthermore, the

nanoparticle concentration is between $(92.4) \times 10^9$ and $(136.5) \times 10^9$ particles/mL. The release of nanoformulated epiisopiloturine occurred slowly and gradually, presenting a balance by around 6pm release. The value of n was found to be 0.37 for the release of EPP, it is possible to say that the mass transfer follows the Fickian diffusion model. The results showed that the acetylated cashew gum nanoparticles incorporated with EPP have nonometric colloidal systems characteristics and allowing a slow and gradual release profile, with Fickian diffusion type thus making it feasible ways of nanoparticle formulations.

Keywords: cashew tree, polymer, acetylation, pilocarpine, alkaloid, release.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
CAPÍTULO I.....	13
1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
1.1.1 Nanotecnologia e nanomedicina	14
1.1.2 Plataforma de entrega de bioativos.....	15
1.1.3 Nanopartículas poliméricas	16
1.1.4 Polissacarídeos	17
1.1.5 Goma do cajueiro	19
1. Epiisopiloturina	21
2. OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo Geral.....	23
2.2 Objetivo Específico	23
3. REFERÊNCIAS	24
CAPITULO II. Obtenção de nanopartículas poliméricas a base da goma do cajueiro acetilada para incorporação de epiisopiloturina	30
Resumo	31
1. Introdução.....	32
2. Materiais e Métodos	33
2.1 Materiais.....	33
2.2 Isolamento da goma do cajueiro.....	34
2.3 Acetilação da goma do cajueiro.....	34
2.4 Preparação das nanopartículas a base da goma do cajueiro acetilada.....	34
2.5 Determinação de tamanho e potencial zeta.	34
2.6 Estabilidade das partículas em suspensão	34
2.7 Quantificação da EPI incorporada na nanopartícula.	35
2.8 Determinação da concentração por análise de rastreamento de partículas (NTA)	35

2.9 Análise morfológica das nanopartículas por Microscopia de Força Atômica (AFM).....	36
2.9 Ensaio de liberação <i>in vitro</i> da EPI	36
2.10 Análise estatística.....	37
3. Resultados e Discussão	37
3.1 Caracterização das nanopartículas	37
3.2 Quantificação da EPI no sistema nanoformulado	40
3.3 Estabilidade das nanopartículas.....	41
3.4 Tamanho e concentração de partículas por NTA	42
3.5 Morfologia das nanopartículas.....	44
3.6 Cinética de liberação <i>in vitro</i>	45
4. Conclusão	46
5. Referências	47
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	52

INTRODUÇÃO

Um dos setores da nanotecnologia com maior potencial de aplicação se refere aos sistemas de vetorização e liberação controlada de fármacos por permitir uma liberação sítio-específica de ativos, em certos casos promovendo a redução de toxicidade destes ativos, prevenindo sua eliminação rápida pelo organismo, além de se contribuir para a melhora da estabilidade dos mesmos (KIM et al., 2008). Nesse contexto, os materiais poliméricos se destacam, pois, os polissacarídeos apresentam propriedades tais como a abundância, biodegradabilidade, biocompatibilidade e não toxicidade, que favorecem sua utilização na preparação de biomateriais (MOURA, 2009).

As nanopartículas sintetizadas com polímeros biodegradáveis modificados têm despertado grande interesse dos pesquisadores devido às suas propriedades terapêuticas e à maior estabilidade tanto nos fluídos biológicos quanto durante o armazenamento. Adicionalmente, atuam como sistemas carreadores de uma grande variedade de fármacos, servindo como plataformas de entregas de drogas, capazes de permitir a otimização da velocidade de cedência e do regime de dosagem das substâncias (SCHAFFAZICK et al., 2003).

A goma do cajueiro é um polissacarídeo extraído da espécie *Anacardium occidentale* L., uma planta tropical extensivamente cultivada na região nordeste do Brasil. É constituído majoritariamente de galactose, glicose, arabinose, ramnose e ácido glucurônico (DE PAULA; RODRIGUES, 1995).

As aplicações da goma do cajueiro incluem sua utilização como espessante para sucos e refrescos, emulsificantes para molhos e saladas e suporte para microcápsulas (MOTHÉ, 2000). Na área biológica, apresenta destaque por seu efeito antimicrobiano comprovado e no ramo farmacêutico atua como adjuvante em formulações tópicas, bem como é utilizada na preparação de nanopartículas poliméricas para sistemas de entrega de agentes terapêuticos (DE OLIVEIRA; PAULA; DE PAULA, 2014).

As plantas do gênero *Pilocarpus*, conhecida popularmente como Jaborandi, é uma espécie vegetal nativa da flora brasileira e que apresenta em sua composição quatorze alcaloides. Dentre estes, destacamos a epiisopiloturina (EPI), um alcaloide imidazólico que apresenta comprovada atividade, *in vitro*, contra *Schistosoma mansoni*, principal causa de esquistossomose em humana. Atualmente o praziquantel é o medicamento anti-helmíntico referência amplamente utilizado no tratamento contra todas as espécies de *Schistosoma* que infectam seres humanos, entretanto tem havido relatos de resistência,

bem como, ineficiência em alguns casos. Visto isso, a EPI se mostra como terapêutica alternativa no tratamento da Schistosomose humana. Adicionalmente, em um estudo mais recente, a EPI demonstrou promissores efeitos anti-inflamatório e antinociceptivo (VERAS et al., 2012; SILVA et al., 2013).

Dessa forma, buscou-se nanoformular a EPI em um sistema polimérico de goma do cajueiro acetilada, para permitir uma liberação controlada, aumentando assim o benefício terapêutico e minimizando possíveis efeitos secundários.

CAPÍTULO I

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA



1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 Nanotecnologia e nanomedicina

A nanociência e a nanotecnologia são ramos da ciência dedicados à manipulação de átomos e moléculas que conduzem à construção de estruturas na escala nanométrica (frequentemente de 100 nm ou menores), que retêm propriedades químicas, térmicas e óticas únicas (PICKUP et al., 2008; MOGHIMI; HUNTER; MURRAY, 2005).

Pesquisas em nanotecnologia estão proporcionando grandes avanços em inúmeras áreas como a agricultura (ROCHMAN, 2011), a indústria alimentícia (SANGUANSRI; AUGUSTIN, 2006; SOZER; KOKINI, 2009), a engenharia (RAKI et al., 2010; BHUSHAN, 2015) e na medicina e saúde (WICKI et al., 2015; MATTEI; REHMAN, 2015).

Quando os materiais nanométricos são utilizados como ferramentas moleculares direcionadas ao diagnóstico, tratamento e prevenção de doenças, objetivando preservar e melhorar a saúde humana, estamos nos referindo a uma subárea da nanotecnologia, a nanomedicina (OLIVEIRA; SANTA MARIA; BARRATT, 2014). Os nanomateriais têm o potencial para revolucionar a medicina devido à facilidade para afetar os órgãos e tecidos a níveis celulares e moleculares (LINKOV; SATTERSTROM; COREY, 2008).

Alguns produtos cirúrgicos já estão sendo comercializados, como lâminas e agulhas de suturas, agentes de contrastes para ressonância magnética, materiais de substituição óssea, curativos, tecidos antimicrobianos, além de microagulhas. O desenvolvimento desses instrumentos beneficia potencialmente as microcirurgias possibilitando ao cirurgião acessos muitas vezes impossíveis com uso de equipamentos tradicionais (PANDEY et al., 2008).

No campo do diagnóstico a escala nano é utilizada para a construção de sensores biológicos que apresentam a capacidade de reconhecer eventos genéticos e moleculares permitindo uma maior compreensão, caracterização e controle das células vivas (WANG et al., 2013).

Outra linha de pesquisa que tem avançado é a entrega racional e segmentada de produtos biofarmacêuticos na escala nanométrica, devido sua capacidade de potencializar o efeito terapêutico, melhorando a solubilidade de muitas moléculas bioativas, o que favorece sua biodisponibilidade e tempo de retenção no organismo (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010).

1.2 Plataforma de entrega de bioativos

Sistemas de entrega de bioativos nanoparticulados parecem representar uma estratégia viável e promissora para a indústria biofarmacêutica. Esta técnica promove a entrega de substâncias de interesse em quantidades adequadas e em locais de ação precisos (tumores, tecidos doentes, etc.) para produzir um efeito terapêutico otimizado e minimizar os efeitos indesejáveis dos medicamentos em outros tecidos (SAFARI; ZARNEGAR, 2014).

A miniaturização permite além da facilidade em atingir alvos dentro do organismo em consequência de seu tamanho reduzido, se deve em especial a modificação sofrida por alguns materiais com a redução de seu tamanho, conhecido como efeito quântico, conferindo novas propriedades térmicas, óptica, eletrônica e magnética aos materiais podendo influenciar a interação com tecidos biológicos (PICKUP et al., 2008). Essa abordagem permite incorporar agentes terapêuticos por meio de ligações covalentes ou adsorvidos aos nanotransportadores. O tamanho reduzido aumenta a área superficial e se torna uma estratégia para a distribuição mais rápida do agente terapêutico (MOGHIMI; HUNTER, 2005).

A melhora da solubilidade do fármaco, entrega em sítios específicos de ação, transporte de materiais no tecido epitelial por transcitose, entrega de materiais macromoleculares aos locais de ação, entrega de duas ou mais substâncias por meio de terapia combinatória são algumas vantagens da aplicação da nanotecnologia nas plataformas de entregas de substâncias farmacológicas ativas (SINGH; LILLARD, 2009). Adicionalmente, esse sistema de carreamento de biomoléculas apresenta versatilidade na distribuição aos tecidos, facilitando acesso aos alvos moleculares profundos. Desse modo, podem aumentar a biodisponibilidade, a solubilidade e a permeabilidade de potentes agentes terapêuticos que apresentam problemas em sua administração (PROW et al., 2011).

Um desafio no desenvolvimento de novos sistemas de veiculação de ativos é a biocompatibilidade. Isso representa a capacidade de ultrapassar os mecanismos de proteção presentes no organismo, não ser tóxico e não desencadear respostas imunológicas no organismo. Além disso, devem apresentar como características dispersão, estabilidade e boa interação com a membrana celular para serem sistemas efetivos na entrega de substâncias (OLIVEIRA; SANTA MARIA; BARRATT, 2014).

Além de seu tamanho miniaturizado, as nanopartículas podem apresentar uma superfície funcionalizada com polímeros sintéticos e ligantes, podendo ser direcionadas a alvos específicos, melhorando a eficácia terapêutica e reduzindo os efeitos colaterais (MOGHIMI; HUNTER, 2005).

1.3 Nanopartículas poliméricas

Os polímeros também funcionam como veículos e podem ser adicionados de bioativos. Esses transportadores podem ser utilizados para liberar de forma controlada uma grande quantidade de drogas, encontrando-se entre os principais excipientes utilizados para obtenção de formulações farmacêuticas (SHAIK; KORSAPATI; PANATI, 2012).

Os polímeros podem ser classificados segundo vários critérios, sendo o principal deles de acordo com sua ocorrência. Os naturais são polímeros que se encontram presentes em organismos vegetais e animais e os sintéticos são materiais poliméricos produzidos artificialmente (PELLICANO; PACHEKOSKI; AGNELLI, 2009).

Os principais polímeros empregados como carregadores de fármacos são os naturais modificados, derivados da albumina, colágeno, ácido hialurônico, gelatina, quitosana e alginato, além de polímeros sintéticos, como PVA, PEG, PLGA e poli (acrilamida) (PANYAM; LABHASETWAR, 2003).

Os sistemas nanoparticulados a base de polímeros naturais apresentam grande variabilidade e versatilidade, em consequência de apresentarem estruturas químicas complexas, estruturas essas de difícil reprodução em polímeros sintéticos (PRIDGEN; LANGER; FAROKHZAD, 2007).

Os sistemas poliméricos nanoestruturados com polímeros sintéticos podem apresentar uma variedade de desvantagens em seu uso, como o alto custo de produção e necessidade de processamento (FRANCHETTI; MARCONATO, 2006). Dessa forma, os polímeros naturais apresentam vantagem em relação aos sintéticos, tais como a biodisponibilidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade, não toxicidade e processamento livre de poluição (GOWTHAMARAJAN et al., 2012).

Uma grande quantidade de nanopartículas poliméricas teve sua eficácia demonstrada, melhorando a biodisponibilidade e as propriedades farmacocinéticas para drogas utilizadas no tratamento de várias condições clínicas (GÓMEZ-GAETE et al., 2007; FONSECA; SIMÕES; GASPAR, 2002; YIN et al., 2007). A quitosana, a albumina

e os derivado do PEG apresentam destaque entre os polímeros naturais utilizados na formulação de nanopartículas poliméricas por serem biodegradáveis e biocompatíveis, permitindo a incorporação de uma grande quantidade de agentes terapêuticos (OLIVEIRA; SANTA MARIA; BARRATT, 2014)

A literatura descreve vários sistema formulados com sucesso baseados em polímeros naturais. Oliveira, Paula e de Paula (2014) formularam nanopartículas a base da goma do cajueiro e alginato incorporadas com óleo essencial e obtiveram um sistema com promissores potenciais de carreamento, liberação controlada e eficiência de incorporação satisfatória, além de manutenção do potencial terapêutico. Enquanto que Aumelas et al. (2007) sintetizou nanopartículas a partir de dextrano modificado de forma eficaz para o carreamento de substâncias farmacologicamente ativas.

Os sistemas nanoparticulados para entrega de substâncias farmacologicamente ativas procuram proporcionar maior seletividade com o alvo terapêutico, investigando a interação com órgãos e tecidos, além de promover a entrega através de um sistema de liberação sustentado e controlado. Esses sistemas se destacam por maximizar a efetividade da substância ativa, o que ressalta suas vantagens às formas convencionais de administração, mantendo a concentração do fármaco na faixa terapêutica (AZEVEDO, 2005).

1.4 Polissacarídeos

Quimicamente, os polissacarídeos podem ser definidos como polímeros de alta massa molecular formados de unidades repetitivas denominadas monossacarídeos ligados por ligações glicosídicas. Podem ser obtidos de exsudatos de árvores, algas, sementes, fungos e por fermentação microbológica (MOURA, 2009). As propriedades de alguns polissacarídeos como abundância, biodegradabilidade, biocompatibilidade e não toxicidade têm favorecido a escolha desses polímeros na preparação de biomateriais (LIU; JIAO; WANG, 2008).

As gomas de polissacarídeos constituem uma das matérias-primas industriais mais abundante e tem apresentando crescente interesse atualmente devido à sua sustentabilidade, biodegradabilidade e biossegurança (RANA et al., 2011). Elas são comumente utilizadas em produtos farmacêuticos com diversas propriedades e aplicações. Nas formulações sólidas são utilizadas como aglutinantes e espessantes, nas preparações dentárias apresentam boa capacidade adesiva e quando utilizadas em

suspensões atuam como agentes estabilizantes. Em relação ao seu consumo por via oral se mostram seguras sendo utilizadas sob a forma de aditivos alimentares e transportadores de fármacos e são metabolizadas pela flora intestinal resultando em seus açúcares constituintes (ALI; ZIADA; BLUNDEN, 2009).

Entretanto, existem vários problemas no manuseio das gomas, como descontrole da hidratação, solubilidade dependente de pH, redução da viscosidade durante armazenamento, além de possibilidade de contaminação microbiana. Dessa forma, a fim de facilitar seu manuseio, em especial na veiculação de fármacos, modifica-se quimicamente sua estrutura (RANA et al., 2011).

Polissacarídeos são hidrofílicos podem e ser modificados estruturalmente para se tornarem biopolímeros anfifílicos, o que favorece a auto montagem em água formando nanopartículas ou nanogéis, que são utilizados para o carreamento de bioativos (PITOMBEIRA et al., 2015).

As cadeias hidrófilas dos polissacarídeos contêm vários grupos de diferentes pesos moleculares e composição química. A natureza desses grupos pode fornecer características estruturais e levam a propriedades físico-químicas e biológicas variadas (HASSANI; HENDRA; BOUCHEMAL, 2012).

Recentemente, verificou-se um crescente interesse na utilização de polissacarídeos naturais para entrega de substâncias bioativas (SIONKOWSKA, 2011). Entretanto, a necessidade da utilização de solvente orgânicos e/ou mudanças bruscas de pH representam impecílios durante essas formulações. Como alternativa para estes problemas, os polissacarídeos podem ser modificados estruturalmente. Basicamente, a estrutura do polissacarídeo é modificada de acordo com as características do ativo que será carreado e com a via de administração (HASSANI; HENDRA; BOUCHEMAL, 2012).

Na literatura, inúmeros polímeros modificados são descritos como plataformas de carreamento de medicamentos, dentre eles podemos citar a celulose (LUCERO et al., 2013), dextrana (ZOU et al., 2013), pululana (KUMAR et al., 2012), alginato (PAWAR; EDGAR, 2012), entre outros.

1.5 Goma do Cajueiro

A *Anacardium Occidentale* é um membro da família Anacardiaceae e conhecida popularmente como cajueiro (Figura 1). É uma espécie nativa do Brasil, distribuída amplamente no norte e nordeste do país (ERRICO et al., 2009). Representa importância econômica, gerando empregos, renda e impostos em decorrência dos produtos industrializados oriundos do seu fruto e pseudofruto, principalmente para os Estados do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte (SANCHO et al., 2007).



Figura 1: Cajueiro (*Anacardium occidentale* L.). Fonte: Poder das frutas. Disponível em: <http://poderdasfrutas.com/a-historia-do-caju/cajueiro/>

O principal subproduto comercializado do cajueiro é seu fruto, a castanha, entretanto a goma apresenta grande potencial para comercialização. A goma do cajueiro é o exsudato produzido pelas células epiteliais da planta, principalmente pelo caule e galho, geralmente produzida por ataque direto durante a poda ou por ferimentos resultante do ataque direto por insetos ou microrganismos (LIMA et al., 2002).

A goma do cajueiro (Figura 2) é um heteropolissacarídeo ramificado amplamente solúvel em água, que apresenta composição variável de acordo com a região de cultivo. Contém uma cadeia principal de galactose com cadeias laterais que podem ser compostas por até seis unidades de glucose, arabinose e ácido glucurônico, presentes como grupos terminais (CARVALHO et al., 2015).

É utilizada em substituição a goma arábica, na produção da cola líquida para papel; na indústria farmacêutica e cosmética, como aglutinante para comprimidos e cápsulas e no ramo alimentício, como estabilizadores para sucos e cervejas (PORTO; CRISTIANINI, 2014). A extração da goma do cajueiro se mostra como mais uma fonte

de renda para o cultivo da planta, em especial para o cajueiro improdutivo (LIMA et al., 2002).



Figura 2: (A) Exsudato obtido do cajueiro. (B) Goma do cajueiro bruta. Fonte: Instituto Virtual de fármacos. Disponível: http://www.ivfrj.ccsdecania.ufrj.br/ivfonline/edicao_0046/cajueiro.html.

Na área biomédica, a goma do cajueiro se destaca por seu efeito gastroprotetor (CARVALHO et al., 2015), antitumoral (FLORÊNCIO et al., 2007), modulatório de macrófagos (YAMASSAKI et al., 2015) e no tratamento tópico de feridas (SCHIRATO et al., 2006). Bem como, destaca-se ainda como material formador de filme, com excelente potencial de aplicação em dispositivos nanobiomédicos como os sensores eletroquímicos (ARAÚJO et al., 2012).

A goma do cajueiro pode ser modificada por enxerto hidrofóbico. Devido apresentar grupo hidroxila e amina, pode ser funcionalizada e obter goma do cajueiro anfifílica, o que confere novas propriedades físico-químicas, incluindo a capacidade de auto adjunto na água formando diferentes tipos de plataformas de entrega de agentes terapêuticos (HASSANI; HENDRA; BOUCHEMAL, 2012).

Um interesse tem crescido na formação de nanopartículas obtidas a partir de polímeros hidrofóbicos ou hidrofobizados devido suas inúmeras aplicações biomédicas e farmacêutica. A sua utilização como plataforma de entrega de ativos proporciona melhora nas vias de administração de agentes terapêuticos que são difíceis de administrar por via oral (DING et al., 2011).

Em um estudo realizado por Pitombeira et al. (2015), nanopartículas a base da goma do cajueiro acetilada (Figura 3) foram obtidas com sucesso por método de diálise e incorporada droga antiinflamatória hidrofóbica. As partículas apresentavam tamanho em escala nanométrica, boa estabilidade coloidal, além de demonstrar uma liberação sustentada até 72 horas da indometacina.

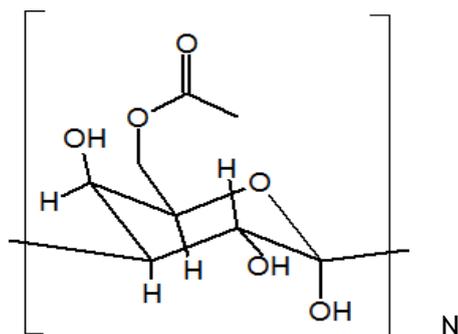


Figura 3. Estrutura química da goma do cajueiro acetilada. Fonte: autor, 2016.

Ainda sobre a utilização da goma do cajueiro acetilada, em um estudo realizado por Dias et al. (2016), foram sintetizadas nanopartículas e incorporado diclofenaco dietilamônico. Utilizou-se diálise como rota de síntese e foi obtida partícula com tamanho médio de 302 nm e perfil de liberação Fickiano. Adicionalmente, o ensaio de citotoxicidade demonstrou que as nanopartículas incorporadas com ou sem fármacos não afetam de maneira significativa a viabilidade celular garantindo sua biocompatibilidade.

1.6 Epiisopiloturina

Várias plantas da família Rutacea apresentam valor econômico representativo no ramo alimentício, ornamental e medicinal. O gênero *Pilocarpus*, que pertence a essa família, é distribuído por quase todo o continente americano e quase todas são nativas do Brasil, onde é conhecida popularmente como Jaborandi. A pilocarpina é um alcaloide imidazol encontrado nas folhas do jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*) e que apresenta efeito consolidado principalmente no tratamento de glaucoma e de xerostomia (boca seca). A epiisopiloturina (EPI) (Figura 4), alcaloide também encontrado no extrato do jaborandi é o composto mais abundante nas folhas, sendo resultante do processo de extração da pilocarpina (VERAS et al., 2013).

Um estudo realizado em 2012 mostrou efeito comprovado *in vitro* da EPI contra o *S. mansoni*, matando não somente os adultos em diferentes idades, mas também inibindo a postura de ovos do verme. Adicionalmente, não apresentou citotoxicidade às células de mamíferos (VERAS et al., 2012).

Em outra pesquisa, foi investigado os efeitos da epiisopiloturina na inflamação aguda periférica e nos processos analgésicos induzidos por injeção intraplantar e intraperitoneal de diferentes agentes flogísticos. Os resultados deste estudo revelaram que

a mesma possui uma atividade anti-inflamatória e anti nociceptiva em modelos de inflamação (edema da pata e a migração de neutrófilos) e dor (contorção induzida por ácido acético, placa quente e os testes de formalina) (SILVA et al., 2013).

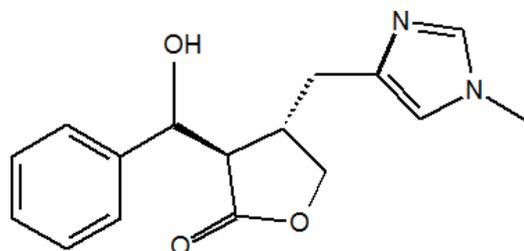


Figura 4. Estrutura química da epiisopiloturina. Fonte: autor, 2016.

Ainda em uma investigação do mesmo grupo, Guimarães et al. (2014) formulou lipossomas carregados com EPI e observou efetividade contra esquistossomos adultos, mostrando que a atividade da EPI se mantém nessa formulação além de se apresentar mais estável do que sua forma livre.

Dessa forma, surgiu o interesse em incorporar a EPI por uma nova rota de síntese utilizando a goma do cajueiro, um polissacarídeo amplamente distribuído na região, para permitir uma liberação controlada, buscando aumentar o benefício terapêutico e minimizando possíveis efeitos secundários.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Formular nanopartículas a base da goma do cajueiro acetilada para incorporação de epiisopiloturina.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar os sistemas nanoestruturados obtidos quanto ao diâmetro hidrodinâmico, polidispersibilidade e potencial zeta;
- Avaliar a estabilidade físico-química dos sistemas nanoestruturados;
- Determinar a eficiência de incorporação;
- Realizar análise morfológica por meio de Microscopia de Força Atômica (AFM) e Análise de Rastreamento de Partículas (NTA);
- Determinar o perfil de liberação *in vitro* da epiisopiloturina nanoformulada.

3. REFERÊNCIAS

ALI, B. H.; ZIADA, A.; BLUNDEN, G. Gerald. Biological effects of gum arabic: a review of some recent research. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 1, p. 1-8, jul. 2009.

ARAUJO, I. M. S.; ZAMPA, M. F.; MOURA, J. B.; DOS SANTOS, J. R.; EATON, P.; ZUCOLOTTI, V.; VERAS, L. M. C. Contribution of the cashew gum (*Anacardium occidentale* L.) for development of layer-by-layer films with potential application in nanobiomedical devices. **Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications**, v. 32, n. 6, p. 1588-1593, 2012.

AUMELAS, A.; SERRERO, A.; DURAND, A.; DELLACHERIE, E.; LEONARD, M. Nanoparticles of hydrophobically modified dextrans as potential drug carrier systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 59, n. 1, p. 74-80, mai. 2007.

AZEVEDO, M. M. M. **Sistemas poliméricos de liberação controlada utilizando micro e nanopartículas encapsulando violaceína: caracterização, atividade biológica, consequências e perspectivas**. 2005.117f. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Físico-química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

BHUSHAN, B. Governance, policy, and legislation of nanotechnology: a perspective. **Microsystem Technologies**, v. 21, n. 5, p. 1137-1155, abr. 2015.

CARVALHO, N. S.; SILVA, M. M.; SILVA, R. O.; NICOLAU, L. A. D.; SOUSA, F. B. M.; DAMASCENO, S. R. B.; SILVA, D. A.; BARBOSA, A. L. R.; LEITE, J. R. S. A.; MEDEIROS, J. V. R. Gastroprotective Properties of Cashew Gum, a Complex Heteropolysaccharide of *Anacardium occidentale*, in Naproxen-Induced Gastrointestinal Damage in Rats. **Drug Development Research**, v. 76, p. 143–151, mar. 2015.

DE OLIVEIRA, E. F.; PAULA, H. C.; DE PAULA, R. C. Alginate/cashew gum nanoparticles for essential oil encapsulation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 113, p. 146-151, set. 2014.

DE PAULA, R. C. M.; HEATLEY, F.; BUDD, P. M. Characterization of *Anacardium occidentale* Exudate Polysaccharide. **Polymer International**, v. 45, p. 27-35, jun. 1998.

DE PAULA, R. C. M.; RODRIGUES, J. F. Composition and rheological properties of cashew tree gum, the exudate polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, n. 3, p. 177-181, 1995.

DIAS, S. F. L. **Desenvolvimento de nanopartículas (NPs) a base da goma do cajueiro acetilada para a liberação controlada e permeação cutânea de anti-inflamatório não esteróide (AINE)**. 2014. 52f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, 2014.

DING, X.; RICHTER, D. L.; MATUANA, L. M.; HEIDEN, P. A. Efficient one-pot synthesis and loading of self-assembled amphiphilic chitosan nanoparticles for low-leaching wood preservation. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 1, p. 58-64, 2011.

ERRICO, C.; BARTOLI, C.; CHIELLINI, F.; CHIELLINI, E. Poly(hydroxyalkanoates)-Based Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, p. 1-10, jun. 2009.

FONSECA, C.; SIMÕES, S.; GASPAR, R. Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro anti-tumoral activity. **Journal of Controlled Release**, v.83, n. 2, p. 273-286, out. 2002.

FRANCHETTI, S. M. M.; MARCONATO, J. C. Polímeros biodegradáveis – uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 811-816, 2006.

GÓMEZ-GAETE, C.; TSAPIS N.; BESNARD, M.; BOCHOT, A.; FATTAL, A. Encapsulation of dexamethasone into biodegradable polymeric nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 331, n. 2, p. 153-159, mar 2007.

GOWTHAMARAJAN, K.; JAWAHAR, N.; WAKE, P.; JAIN, K.; SOOD, S. Development of buccal tablets for curcumin using Anacardium occidentale gum. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, p. 1177-1183, fev. 2012.

GUIMARÃES, M. A.; CAMPELO, Y. D.; VÉRAS, L. M.; COLHONE, M. C.; LIMA, D. F.; CIANCAGLINI, P.; KUCKELHAUS, S. S.; LIMA, F. C.; DE MORAES, J.; DE LEITE, J. R. Nanopharmaceutical approach of epiisopiloturine alkaloid carried in liposome system: preparation and in vitro schistosomicidal activity. **J Nanosci Nanotechnol**, v. 14, n. 6, p. 4519-28, jun. 2014.

HASSANI, L. N.; HENDRA, F.; BOUCHEMAL, K. Auto-associative amphiphilic polysaccharides as drug delivery systems. **Drug Discovery Today**, v. 17, n. 11, p. 608-614, 2012.

Instituto Virtual de fármacos. Disponível:
<http://www.ivfrj.ccsdecania.ufrj.br/ivfonline/edicao0046/cajueiro.html>. Acesso em dez. 2015.

KIM, B. S.; WON, M.; YANG, LEE; K. M.; KIM, C. S. KIM, Beom Su et al. In vitro permeation studies of nanoemulsions containing ketoprofen as a model drug. **Drug Delivery**, v. 15, n. 7, p. 465-469, mai. 2008.

KUMAR, B. S.; KUMAR, M. G.; SUGUNA, L.; SASTRY, T. P.; MANDAL, A. B. Pullulan acetate nanoparticles based delivery system for hydrophobic drug. **International Journal of Pharma Bio Sciences**, v. 3, p. 24-32, 2012.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1-18, set. 2010.

LIMA, R. S. N.; LIMA, J. R.; SALIS, C. R.; MOREIRA, R. A. Cashew-tree (*Anacardium occidentale* L.) exudate gum: a novel bioligand tool. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v. 35, p. 45-53, set. 2002.

LINKOV, I.; SATTERSTROM, F. K.; COREY, L. M. Nanotoxicology and nanomedicine: making hard decisions. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 4, p. 167-171, abr. 2008.

LIU, Z.; JIAO, Y.; WANG, Y.; ZHOU, C.; ZHANG, Z. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. **Advanced drug delivery reviews**, v. 60, n. 15, p. 1650-1662, set. 2008.

LUCERO, M. J.; CLARO, C.; CASAS, M.; JIMÉNEZ-CASTELLANOS, M. R. Drug diffusion from disperse systems with a hydrophobically modified polysaccharide: Enhancer® vs Franz cells. **Carbohydrate polymers**, v. 92, n. 1, p. 149-156, 2013.

MATTEI, T. A.; REHMAN, A. A. "Extremely minimally invasive": recent advances in nanotechnology research and future applications in neurosurgery. **Neurosurgical review**, v. 38, n. 1, p. 27-37, agos. 2015.

MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A. C.; MURRAY, J. C. Nanomedicine: current status and future prospects. **The FASEB Journal**, v. 19, p. 311-330, mar. 2005.

MOTHÉ, C. G. **Produção da goma do cajueiro**, Patente PI0004114-9, 2000.

MOURA, R. E. **Síntese de Nanopartículas à base de goma do cajueiro para aplicação em sistemas de liberação de fármacos**. 2009. 79f. Dissertação (Mestrado em Química) – Centro de Ciências, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

OLIVEIRA, R. O.; SANTA MARIA, L.C.; BARRATT, G. Nanomedicine and its applications to the treatment of prostate cancer. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v.72, p. 303-316, jun. 2014.

PANDEY, A.; SINGH, A. K.; MAURYA, S. K.; RAI, R.; SHUKLA, H. S. Nanoscience and their biological importance: human health and disease. **Digest Journal Nanomaterials Biostructures**, v. 3, n. 3, p. 141-146, jul. 2008.

PANYAM, J.; LABHASETWAR, V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, n. 3, p. 329-347, fev. 2003.

PAWAR, S. N.; EDGAR, K. J. Alginate derivatization: a review of chemistry, properties and applications. **Biomaterials**, v. 33, n. 11, p. 3279-3305, 2012.

PELLICANO, M.; PACHEKOSKI, W.; AGNELLI, J. A. M. Influência da adição de amido de mandioca na biodegradação da blenda polimérica PHBV/Ecoflex®. **Polímeros**, v. 19, n. 3, p. 212-217, 2009.

PICKUP, J. C.; ZHI, Z. L.; SAX, T.; BIRCH, D. J. S. Nanomedicine and its potential in diabetes research and practice. **Diabetes Metab Research Reviews**, v. 24, p. 604 – 610, set. 2008.

PITOMBEIRA, N. A. O.; NETO, J. G. V.; SILVA, D. A.; FEITOSA, J. P. A.; PAULA, H. C. B.; DE PAULA, R. C. M. Self-assembled nanoparticles of acetylated cashew gum: Characterization and evaluation as potential drug carrier. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 610-615, out. 2015.

PODER DAS FRUTAS. Disponível em: <http://poderdasfrutas.com/a-historia-do-caju/cajueiro/>. Acesso em jan. 2016.

PORTO, B. C.; CRISTIANINI, M. Evaluation of cashew tree gum (*Anacardium occidentale* L.) emulsifying properties. **Food Science and Technology**, v. 59, p. 1325-1331, abr. 2014.

PRIDGEN, E. M.; LANGER, R.; FAROKHZAD, O. C. Biodegradable, polymeric nanoparticle delivery systems for cancer therapy. **Future medicine**, v. 2, n. 5, p. 669-680, 2007.

PROW, T. W.; GRICE, J. E.; LIN, L. L.; FAYE, R.; BUTLER, M.; BECKER, W.; ELISABETH, M. T. W.; YOONG, C.; ROBERTSON, T. A.; SOYER, H. P.; ROBERTS, M. S. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 6, p. 470-491, mai. 2011.

RAKI, L.; BEAUDOIN, J. J.; ALIZADEH, R.; MAKAR, J. M.; SATO, T. Cement and concrete nanoscience and nanotechnology. **Materials**, v. 3, n. 3, p. 918-942, fev. 2010.

RANA, V.; RAI, P.; TIWARYA, A. K.; SINGH, R. S.; KENNEDY, J. F.; KNILL, C. J. Modified gums: Approaches and applications in drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 1031–1047, set. 2011.

ROCHMAN, N. T. Analysis of Indonesian Agroindustry Competitiveness in Nanotechnology Development Perspective Using SWOT-AHP Method. **International Journal of Business and Management**, v. 6, n. 8, p. 235-244, agos. 2011.

SAFARI, J.; ZARNEGAR, Z. Advanced drug delivery systems: Nanotechnology of health design: A review. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 18, n. 2, p. 85-99, dez. 2014.

SANCHO, S. O.; MAIA, G. A.; FIGUEIREDO, R. W.; RODRIGUES, S.; SOUSA, P. H. M. Alterações químicas e físico-químicas no processamento de suco de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Ciência e Tecnologia do Alimento**, v. 27, n. 4, p. 878-882, out. 2007.

SANGUANSRI, P.; AUGUSTIN, M. A. Nanoscale materials development e a food industry perspective. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 10, p. 547-556, 2006.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. D. L.; POHLMANN, A. R. Scheila Rezende et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SHAIK, M. R.; KORSAPATI, M.; PANATI, D. Polymers in controlled drug delivery systems. **International Journal of Pharma Sciences**, v. 2, n. 4, p. 112-116, nov. 2012.

SHIRATO, G. V.; MONTEIRO, F. M. F.; SILVA, F. O.; FILHO, J. L. L.; LEÃO, A. M. A. C. O. O polissacarídeo do *Anacardium Occidentale* L. Na fase inflamatória do processo cicatricial de camundongos. **Ciência Rural**, v. 36, p. 149-154, 2006.

SILVA, V. G.; SILVA, R. O.; DAMASCENO, S. R. B.; CARVALHO, N. S.; PRUDÊNCIO, R. S.; ARAGÃO, K. S.; GUIMARÃES, M. A.; CAMPOS, S. A.; VÉRAS, L. M. C.; GODEJOHANN, M.; LEITE, J. R. S. A.; BARBOSA, A. L. R.; MEDEIROS, J. V. R. Anti-inflammatory and Antinociceptive Activity of Epiisopiloturine, an Imidazole Alkaloid Isolated from *Pilocarpus microphyllus*. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 6, p. 1071-1077, fev. 2013.

SINGH, R.; LILLARD, J. W. Nanoparticle-based targeted drug delivery. **Experimental and molecular pathology**, v. 86, n. 3, p. 215-223, ju. 2009.

SIONKOWSKA, A. Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials: Review. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 9, p. 1254-1276, mai. 2011.

SOZER, N.; KOKINI, J. L. Nanotechnology and its applications in the food sector. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 2, p. 82-89, jan. 2009.

VÉRAS, L. M. C.; CUNHA, V. R. R.; LIMA, F. C. D. A.; GUIMARÃES, M. A.; VIEIRA, M. M.; CAMPELO, Y. D. M.; SAKAI, V. Y.; LIMA, D. F.; CARVALHO JR, P. S.; ELLENA, J. A.; SILVA, P. R. P.; VASCONCELOS, L. C.; GODEJOHANN, M.; LEITE, J. R. S. A. Industrial Scale Isolation, Structural and Spectroscopic Characterization of Epiisopiloturine from *Pilocarpus microphyllus* Stapf Leaves: A Promising Alkaloid against Schistosomiasis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. 1-11, jun. 2013.

VERAS, L. M.; GUIMARÃES, M. A.; CAMPELO, Y. D.; VIEIRA, M. M.; NASCIMENTO, C.; LIMA, D. F.; VASCONCELOS, L.; NAKANO, E.; KUCKELHAUS, S. S.; BATISTA, M. C.; LEITE, J. R.; MORAES, J. Activity of Epiisopiloturine Against *Schistosoma mansoni*. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 13, p. 2051-1058, fev. 2012.

WANG, J.; CHEN, G.; JIANG, H.; LI, Z.; WANG, X. Advances in nano-scaled biosensors for biomedical applications. **Analyst**, v. 138, n. 16, p. 4427-4435, mai. 2013.

WICKI, A.; WITZIGMANN, B.; BALASUBRAMANIAN, V.; HUWYLER, J. Nanomedicine in cancer therapy: challenges, opportunities, and clinical applications. **Journal of Controlled Release**, v. 200, p. 138-157, dez. 2015.

YAMASSAKI, F. T.; LENZIA, R. M.; CAMPESTRINIA, L. H.; BOVO F.; SEYFRIEDA, M.; SOLDERA-SILVA, A.; STEVAN-HANCKE, F. R.; ZAWADZKI-BAGGIO, S. F.; PETTOLINOD, F. A.; BACICE, A.; MAURERA, J. B. B. Effect of the

native polysaccharide of cashew-nut tree gum exudate on murine peritoneal macrophage modulatory activities. **Carbohydrate polymers**, v. 125, p. 241-248, 2015.

YIN, Y.; CHEN, D.; QIAO, M.; WEI, X.; HU, A. Lectin-conjugated PLGA nanoparticles loaded with thymopentin: Ex vivo bioadhesion and in vivo biodistribution. **Journal of Controlled Release**, v. 123, n. 1, p. 27-38, out. 2007.

ZHOU C.; GAO, W.; LU, G.; DING, J.; WU, X.; HUANG, X.; CHEN, J.; LIU, M.; JIANG, J.; WU, H. Preparation, characterization and in vitro release of microparticles based on dextran–rosuvastatin conjugate. **Carbohydrate Polymers**, v. 96, n. 1, p. 156-162, 2013.

CAPÍTULO II

OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS A BASE DA GOMA DO CAJUEIRO ACETILADA PARA INCORPORAÇÃO DE EPIISOPILLOTURINA

OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS A BASE DA GOMA DO CAJUEIRO ACETILADA PARA INCORPORAÇÃO DE EPIISOPILOTURINA

Jessica do Amaral Rodrigues ^a, Patrick Veras Quelemes ^a, Alyne Rodrigues de Araújo ^a, Nadia Aline Pitombeira ^b, Regina Célia Monteiro de Paula ^b, Judith P. A. Feitosa ^b, Leiz Veras e Silva ^a, José Roberto S. A. Leite ^a, Durcilene Alves da Silva ^a.

^a. UFPI, Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia – BIOTEC, Campus Parnaíba, Universidade Federal do Piauí, Av. São Sebastião 2819, 64202-020, Parnaíba, Piauí, Brasil.

^b. UFC, Laboratório de Polímeros, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil.

Resumo: A Epiisopiloturina (EPI) foi incorporada em uma matriz polimérica de goma do cajueiro acetilada. As nanopartículas foram preparadas pela técnica de diálise, apresentando tamanhos nanométricos variando entre 108,6 e 154,4 nm e índice de polidispersão entre 0,120 e 0,212. O potencial zeta foi negativo para todas as formulações e os sistemas apresentaram uma eficiência de incorporação de 33,2 a 55%. A análise morfológica por Microscopia de Força Atômica (AFM) demonstrou nanopartículas com formato esférico e distribuídas de forma agrupada. Os resultados obtidos por Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA) estão em consonância com os observados pela técnica de Espalhamento de Luz Dinâmica (DLS). Além disso, a concentração de partículas variou entre $(92,4) \times 10^9$ e $(136,5) \times 10^9$ partículas por mL. A EPI nanoformulada apresentou um perfil de liberação lento e gradual, atingindo equilíbrio por volta de 6 horas de liberação e um mecanismo de liberação de difusão fickiano.

Palavras-chaves: cajueiro, polímero, acetilação, pilocarpina, alcaloide, liberação.

1. Introdução

Os produtos naturais são, e continuaram sendo, as matérias-primas mais utilizadas na produção de biomateriais (Zhu et al., 2011). A disponibilidade em abundância, menor taxa de toxicidade, maior biocompatibilidade, além de baixo custo geralmente observadas como características de produtos naturais os tornam promissores fontes de produtos de interesse terapêutico (Pinto et al., 2002).

O Brasil apresenta uma das maiores biodiversidades do planeta, contando com cerca de 20% das espécies distribuídas pelo mundo, sendo muitas dessas endêmicas (Rodrigues et al., 2004). Essa diversidade desperta grande interesse para os pesquisadores brasileiros nos aspectos científico, social, econômico, cultural e ambiental bem como justifica a potencialidade para descoberta de produtos naturais com aplicações biofarmacêuticas (Marinelli et al., 2008).

Embora muito se tenha discutido em relação a biodiversidade de todas as espécies vivas no planeta, o mundo vegetal continua sendo alvo de grande parte das pesquisas. As potencialidades de aplicações biofarmacêuticas de plantas medicinais, bem como de seus constituintes, como alcaloides, flavonoides, triterpenos e polissacarídeos são alvo de incessantes investigações, com atividades promissoras confirmadas por meio de testes pré-clínicos na literatura (Dutra, Campos, Santos & Calixto, 2016).

Entre os inúmeros constituintes oriundos dos vegetais e de importância atualmente, podemos citar os polissacarídeos, que são macromoléculas naturais, sendo um dos principais constituintes das plantas compondo principalmente sua parede celular, dessa forma fornecem suporte estrutural a essas células (Severino, Santana, Malmonge, & Souto, 2011). A goma do cajueiro é um polissacarídeo extraído da espécie *Anacardium occidentale* L., uma planta tropical extensivamente cultivada na região nordeste do Brasil. Apresenta como constituição majoritária, galactose, glicose, arabinose, ramnose e ácido glucurônico (De Paula & Rodrigues, 1995). Na área biológica apresenta destaque com efeito antimicrobiano (Torquato et al. 2004), antidiarreico (Araújo et al., 2015), anti-inflamatório (Schirato et al., 2006) e gastroprotetor (Carvalho et al., 2015). Mais recentemente, utilizando seu derivado acetilado (goma do cajueiro acetilada), foi utilizado preparação de nanopartículas poliméricas para incorporar substâncias bioativas (Pitombeira et al, 2015; Dias et al., 2016).

O alcaloide, outra molécula de origem natural, têm atraído grande atenção por sua propriedade de atuar como modificadores de respostas biológicas. Uma ampla gama de

atividade biológica dos alcaloides vem sendo relatado, tais como atividade anti-inflamatória (Barbosa-Filho et al., 2006), antioxidante (Castilhos et al., 2007), antimicrobiana (Özçelik, Kartal & Orhan, 2011), analgésica (Li et al., 2016) e antidepressiva (Pervez, Khan, & Khan, 2016). A epiisopiloturina (EPI) é um alcaloide imidazólico, obtido a partir da biomassa do resíduo da produção da pilocarpina, apresenta uma massa molecular confirmada por espectroscopia de massas molecular de 274,32 (Voigtlander et al., 1978), uma comprovada atividade, *in vitro*, contra *Schistosoma mansoni* e promissores efeitos anti-inflamatório e antinociceptivo (Veras et al., 2012; Silva et al., 2013).

Dessa forma, o objetivo desse estudo foi utilizar dois produtos naturais, a EPI e a goma do cajueiro acetilada, para formulação de nanopartículas, visando permitir melhora na solubilidade do ativo e sua liberação controlada, aumentando assim o benefício terapêutico.

2. Materiais e Métodos

2.1 Materiais

A EPI substância ativa incorporada foi fornecida por Zirkon Indústria e Comércio de Insumos Químicos Ltda. Todas as soluções aquosas foram preparadas com água ultra pura. Todos os reagentes utilizados eram de grau analítico (dimetilsulfóxido e metanol) e foram adquiridos a partir da Vetec Engenharia.

2.2 Isolamento da goma do cajueiro

O exsudato do cajueiro foi coletado de árvores nativas de Fortaleza (CE), Brasil. A goma do cajueiro foi purificada utilizando método descrito previamente (De Paula et al., 1998). O exsudato foi dissolvido em água (10% m/v) e a solução obtida foi filtrada e o pH foi ajustado para 7,0, por meio da adição de hidróxido de sódio. O polissacarídeo foi obtido por meio de precipitação em álcool etílico (proporção em volume 1:4). O precipitado foi lavado com acetona e seco sob fluxo de ar quente.

2.3 Acetilação da goma do cajueiro

A acetilação da goma do cajueiro foi realizada por método descrito previamente por Pitombeira et al. (2015). Uma grama de goma do cajueiro foi suspensa em formamida (20 mL) sob agitação vigorosa. Adicionou-se piridina (3 g) e anidrido acético (7 g) e a mistura foi agitada por 24 horas a 50° C. A goma modificada foi precipitada com 400 mL de água. Em seguida, o produto obtido (GCA) foi filtrado, lavado com água e, então, seco sob fluxo de ar quente.

2.4 Preparação das nanopartículas a base da goma do cajueiro acetilada

As nanopartículas foram sintetizadas pela técnica de diálise. O polímero e a EPI foram dissolvidos em dimetilsulfóxido na concentração (0,05% e 0,1%) e na proporção massa:massa GCA: EPI (10:1, 10:2 e 10:5) desejada e, em seguida, a solução obtida foi colocada em membrana de acetato de celulose com poros de exclusão de 12000 Da e o sistema submetido a diálise contra água deionizada. Procedimentos idênticos foram realizados para a produção da nanopartícula com e sem a EPI, totalizando 8 formulações. Medidas de condutividade foram utilizadas para monitorar a necessidade de trocas de água. Em seguida, a solução resultante foi analisada para caracterização em solução ou liofilizada.

2.5 Determinação de tamanho e potencial zeta

O tamanho médio das nanopartículas e o índice de polidispersão (PDI) foram determinados pela técnica de análise de espalhamento de luz dinâmico (espectroscopia de correlação de fótons – DLS), com laser de comprimento de onda de 633 nm em um ângulo de dispersão fixo de 90° e o potencial zeta foi determinado pela mobilidade eletroforética das amostras utilizando equipamento Malvern Zetasizer Nano, Modelo ZS 3600. As amostras foram medidas em triplicadas e descritas em média.

2.6 Estabilidade das partículas em suspensão

A estabilidade das diferentes formulações preparadas foi avaliada através da determinação dos valores de diâmetro hidrodinâmico e do PDI das nanopartículas. As

amostras foram armazenadas em eppendorfs e conservadas a uma temperatura de 4° C. As medidas foram realizadas semanalmente durante um período de 7 semanas.

2.7 Quantificação da EPI incorporada na nanopartícula

A determinação da quantidade de EPI incorporada foi avaliada por Espectroscopia do Ultravioleta-visível (UV-vis) e comprimento de onda de 258,33 nm. Utilizou-se uma curva de calibração preparada a partir de soluções de EPI dissolvidas em metanol e no intervalo de concentração de 1 a 0,05 mg/ml. Calculou-se o teor de EPI a partir da equação da reta e linearidade da equação confirmada ($R=0,9989$). Após liofilizadas, as nanopartículas foram redissolvidas em metanol sob agitação durante 1 minuto sendo então medida a absorbância a 258,33nm.

Foi determinada a quantidade teórica (QT%) de EPI incorporada, segue a Eq. 1, a quantidade experimental (QE%), segue a Eq. 2, e a eficiência de incorporação (EI%), segue Eq. 3 (Park, Park & Na, 2010):

$$\text{Quantidade Teórica (\%)} = \frac{\text{Massa de EPI adicionada} \times 100}{\text{Massa de EPI adicionada} + \text{Massa de GCA adicionada}} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$\text{Quantidade Experimental (\%)} = \frac{\text{Massa de EPI na nanopartículas} \times 100}{\text{Massa (NP GCA-EPI)}} \quad (\text{Eq. 2})$$

$$\text{Eficiência de Incorporação (\%)} = \frac{\text{Quantidade experimental} \times 100}{\text{Quantidade Teórica}} \quad (\text{Eq. 3})$$

2.8 Determinação da concentração por análise de rastreamento de partículas (NTA)

A concentração e tamanho das nanopartículas foram investigadas pela técnica de análise de rastreamento de partículas. O equipamento utilizado foi o NanoSight LM 10 com célula (laser verde, 532 nm). Foram realizadas diluições nas amostras que variaram de acordo com as suas concentrações iniciais. Assim, as amostras sem a EPI foram diluídas 60 vezes. No que se refere as amostras carregadas com o alcaloide, foi necessário diluir 50 vezes. Todas as amostras foram previamente filtradas em uma membrana com

poros de 0,45 mm. Em seguida, foi injetada 1 mL de cada amostra no compartimento de amostras e o vídeo das amostras foi ajustado manualmente para melhoramento das imagens. O vídeo das amostras foi capturado por câmara sCMOS, com ajustes manuais para melhoramento da imagem. O tamanho e a concentração de partículas foram obtidos através do software Nanosight versão 3.0, correspondendo a média aritmética dos valores calculados através do tamanho de todas as partículas analisadas. As medidas foram feitas em quintuplicata e na temperatura de 25° C.

2.9 Análise morfológica das nanopartículas por Microscopia de Força Atômica (AFM)

A morfologia das nanopartículas foi avaliada por meio da Microscopia de Força Atômica (AFM). Para a obtenção das imagens foi utilizado o aparelho TT-AFM/AFM Workshop, operado em modo “vibrating” com o uso de cantilevers NSG10 (NT-MDT) com uma frequência de ressonância de aproximadamente 280 kHz. Amostras de 5 µL da suspensão de nanopartículas foram depositadas sobre uma superfície de mica. As amostras imobilizadas foram lavadas com água e com posterior secagem em ambiente. As imagens foram analisadas por meio do Programa Gwiddion software 2.33.

2.10 Ensaio de liberação *in vitro* da EPI

O perfil de liberação foi determinado utilizando um sistema de diálise. A nanopartícula com a EPI incorporada foi colocada em membrana de acetato de celulose com poros de exclusão de 12000 Da contra 50 mL de tampão fosfato pH 7,4 a 37 °C. Alíquotas de 1 mL foram coletadas no intervalo de 30 minutos nas 4 primeiras horas e de hora em hora nas 6 horas seguintes. A mesma quantidade de tampão foi repostada para que o volume se mantivesse constante.

As amostras coletadas foram analisadas por UV-vis. As medidas de absorbância foram utilizadas para a quantificação do alcaloide liberado empregando-se a curva de calibração previamente estabelecida no mesmo meio empregado para o ensaio de liberação (equação da reta $R= 0,999$). Para compreensão o mecanismo de liberação do fármaco, os dados foram tratados pelo modelo de Korsmeyer-Peppas (1983) descrito pela Eq. 4.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = Kt^n$$

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

2.11 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas para análise de tamanho das nanopartículas utilizando ANOVA com post teste de Tukey. Todos os dados foram expressos em tabelas e figuras. A significância estatística para este estudo foi considerada $p < 0,05$. As representações gráficas foram obtidas com o software OriginPro8.

3 Resultados e Discussão

A goma do cajueiro é um heteropolissacarídeo ramificado solúvel em água e de alta massa molecular. A fim de, modificar quimicamente sua estrutura, a goma do cajueiro ($M_w = 1,8 \times 10^5$ g/mol) foi acetilada, apresentando então, característica anfifílicas, com domínios hidrófilos e hidrofóbicos, e grau de substituição de 2,8 determinado por RMN de próton (dados não mostrados) resultado este similar ao obtido por Pitombeira et al., 2015. Um crescente interesse tem sido focado em nanopartículas automontadas a partir de polímeros hidrofobizados devido suas aplicações biomédicas e biofarmacêuticas (DING et al., 2011). Dessa forma, favorecendo seu uso no processo de formação de nanopartícula para carregamento de princípios ativos pela técnica de automontagem ou diálise.

3.1 Caracterização das nanopartículas

As nanopartículas formuladas apresentaram tamanho em escala nano e distribuição monodispersas (Figura 1). A tabela 1 mostra os tamanhos das nanopartículas com e sem alcaloide formulados nas duas concentrações de polímero.

Gaumet et al. (2008) enfatizam a necessidade do conhecimento do tamanho das nanopartículas como ponto essencial na biodistribuição do princípio ativo. Para produzir o efeito terapêutico desejado as nanopartículas devem apresentar tamanho de partículas compatíveis com o órgão alvo.

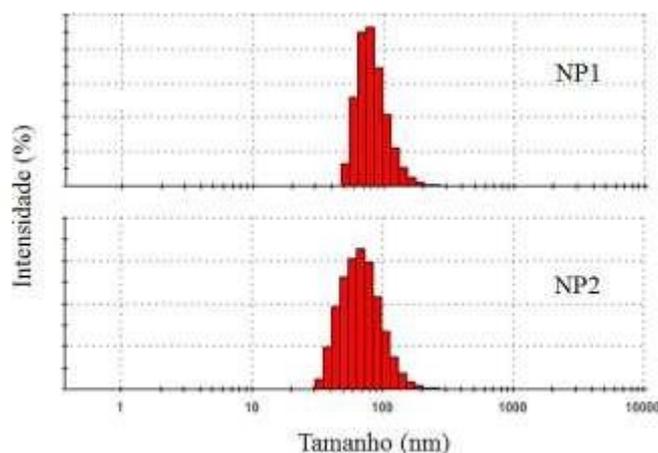


Figura 1. Distribuição de tamanho das nanopartículas a base da goma do cajueiro acetilada (NP1) e nanopartículas a base da goma do cajueiro acetilada e incorporada com Epiisopiloturina (NP2).

Partículas com tamanho ≤ 6 nm atravessam as fenestrações das membranas mucosas, tecido esquelético, cardíaco, musculatura lisa e pele, com tamanho de 20-30 nm atingem os rins e as partículas em torno de 150 nm penetram no fígado e baço. As partículas formuladas no presente estudo apresentaram distribuição de tamanho que variaram de 107,4 a 155,1 nm, valores favoráveis para administração de drogas passivas, uma vez que, nanopartículas com tamanhos inferiores a 200 nanômetros são capazes de impedir o ataque pelo sistema retículo endotelial (Na et al., 2003; Hornig & Heinze, 2008).

Em relação ao incremento de polímero ao sistema, foi observado um aumento no diâmetro da partícula. Galindo-Rodriguez et al. (2004) descrevem duas justificativas para esse comportamento: 1) a medida que se aumenta a quantidade de polímero, ocorre a formação de um número maior de cadeias poliméricas por volume de solvente, dessa forma, as interações polímero-polímero são favorecidas e mais cadeias poliméricas são formadas, o que leva a formação de partículas com tamanhos maiores; 2) o acréscimo na concentração de polímero promove aumento da viscosidade da fase orgânica, propiciando maior resistência para transferência de massa, dessa maneira, a difusão do polímero da fase orgânica para a fase aquosa é reduzida e nanopartículas maiores são formadas.

Quando se analisa a adição de EPI ao sistema, apenas a proporção, polímero:alcaloide, 10:1 das duas concentrações de polímero estudada (NP2 e NP6) não apresentaram diferença significativa de tamanho quando comparadas às nanopartículas sem alcaloide (NP1 e NP5) (Tabela 1). A incorporação do alcaloide em todas as proporções de polímero:EPI promoveu uma redução significativa ($p > 0,001$) no tamanho das nanopartículas.

Tabela 1. Distribuição de tamanho, índice de polidispersão (PDI), potencial zeta e eficiência de incorporação das nanopartículas sintetizadas.

Amostras	Concentração Polímero (%)	GCA:EPI ^a	Tamanho (nm) ^b	PDI ^c	PZ ^d (mv)	QE ^e (%)	EI ^f (%)
NP 1	0,05	-	133,7	0,148	-32,6	-	-
NP 2	0,05	10:1	132,0	0,140	-26,7	5,4	59,8
NP 3	0,05	10:2	107,4	0,320*	-20,0	8,8	52,9
NP 4	0,05	10:5	108,6	0,226*	-17,4	16,0	48,1
NP 5	0,10	-	155,1	0,153	-26,9	-	-
NP 6	0,10	10:1	154,4	0,120	-30,6	6,9	76,6
NP 7	0,10	10:2	142,7	0,175*	-23,1	10,2	61,2
NP 8	0,10	10:5	126,2	0,212*	-25,1	10,7	32,2

^a Proporção massa/massa goma do cajueiro acetilada:epiisopiloturina

^b Tamanho das nanopartículas obtidos pelo DLS

^c PDI: índice de polidispersão

^d PZ: Potencial zeta

^e QE = Quantidade experimental incorporada

^f EI = Eficiência de incorporação

- nanopartículas sem alcaloide

* $p < 0,001$

Pitombeira et al. (2015) sintetizaram nanopartículas a base da goma do cajueiro acetilada incorporadas com indometacina e observou comportamento similar ao encontrado nesse estudo. O tamanho médio das nanopartículas não carregadas foi de 179 nm e no que se refere a adição do ativo foi encontrado tamanho de 140 nm. Ainda utilizando a mesma matriz polimérica, Dias et al. (2016) nanoformularam diclofenaco dietilamônio também encontrando redução no diâmetro das nanopartículas incorporadas quando comparadas com as nanopartículas sem a adição do princípio ativo.

Na construção de nanopartículas poliméricas como plataformas de entrega de drogas, muito se enfatiza a necessidade da afinidade entre o polímero utilizado e o agente incorporado (Bilati, Allémann, & Doelker, 2004). O comportamento de redução de tamanho das nanopartículas com o incremento da EPI sugere afinidade e interação entre as duas moléculas utilizadas na formulação realizada nessa investigação.

O PDI variou aproximadamente entre 0,1 e 0,3 considerando as duas concentrações em todas as proporções de alcaloide. O potencial zeta das nanopartículas avaliadas, com e sem alcaloide, foram todos negativos variando entre -17,4 a -31,6 (Tabela 1). Segundo a literatura, valores em torno de 0,2 para PDI e acima de 30 mV em módulo para PZ indicam boa estabilidade em suspensão, com essa carga de superfície prevenindo agregação das partículas (Mohanraj & Chen, 2006; Alvarado et al., 2015).

O potencial zeta das nanopartículas é influenciado principalmente pela natureza dos constituintes da partícula (Huertas, Fessi & Elaissari, 2010). Como pode ser observado nos resultados, neste caso, o potencial zeta negativo se deve provavelmente a presença de grupamentos carboxila presentes na estrutura da goma do cajueiro. Com a adição do alcaloide ao sistema, foi observado modificações nos valores encontrados, sugerindo interação entre o polímero e a substância incorporada.

3.2 Quantificação da EPI no sistema nanoformulado

Em relação a quantidade de alcaloide incorporado a menor concentração de EPI (NP2 e NP6) proporcionou eficiência de incorporação superior a 55% para ambas as concentrações. No entanto, foi observada redução na EI% a medida que foi aumentada a quantidade de ativo na formulação. Esse comportamento também observado por Dias et al., (2016), quando a quantidade de droga adicionada durante a síntese foi aumentada. Este resultado, sugere o aumento da quantidade do alcaloide na nanopartícula até que ocorra a saturação da matriz polimérica, reduzindo assim a quantidade de fármaco encapsulado (Gaete et al., 2007).

Diversos são os fatores que podem influenciar a taxa de fármaco associado a matriz polimérica em sistemas nanoestruturados, dentre os quais, podemos citar as características físico-químicas, como o pH da formulação, características do polímero e do ativo, superfície da partícula e quantidade de fármaco adicionado ao sistema (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Em um estudo realizado por Hornig, Bunjes & Heinze (2009) utilizando diálise como técnica de síntese de nanopartículas poliméricas, os autores nanoformularam anti-inflamatórios não esteroides (ibuprofeno e naproxeno) e avaliaram a influência do grau de substituição do polímero utilizado (dextrana) na quantidade de droga incorporada. Ao final, observaram que ocorreu uma variação de 37 a 68,3% de eficiência no sistema de acordo com os derivados utilizados.

3.3 Estabilidade das nanopartículas

A figura 2 mostra os gráficos de acompanhamento de tamanho (Figura 2A) e PDI (Figura 2B) em função do tempo. A estabilidade das soluções coloidais nanoparticuladas podem ser afetadas por inúmeros fatores como a adsorção de moléculas ativas à superfície da nanopartícula, a utilização de tensoativo na síntese, agregação das partículas, composição química do polímero e do fármaco, e ainda, liberação prematura do ativo. Sendo importante avaliar ainda o aspecto visual em busca de alterações físicas que podem representar mudanças de tamanho das nanopartículas e efeitos como agregação (Huertas, Fessi & Elaissari, 2010).

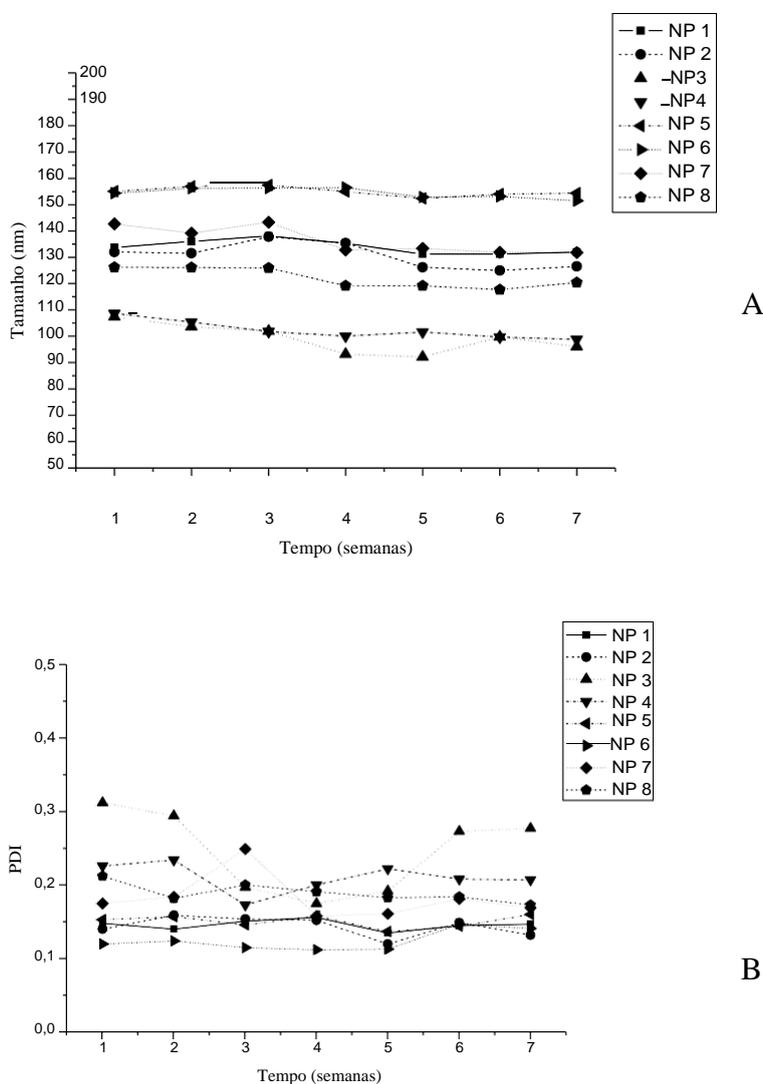


Figura 2. Análise do tamanho da partícula (A) e do índice de polidispersão (B) em função do tempo para as nanopartículas formuladas.

As preparações sintetizadas apresentaram boa estabilidade físico-química e nenhuma alteração macroscópica (cremagem, sedimentação ou floculação) foi observada durante o período avaliado. Como mostrado na Figura 2A houve apenas uma leve variação de tamanho da partícula em função do tempo de armazenamento indicando uma boa estabilidade das formulações no período de acompanhamento. Em relação ao acompanhamento do PDI em função do tempo pode ser observado maiores variações nas proporções 10:2 para ambas as concentrações, entretanto se mantiveram dentro dos valores recomendados pela literatura (Mohanraj & Chen, 2006). As demais proporções apresentaram discretas alterações em função do tempo, indicando boa estabilidade coloidal dos sistemas analisados.

3.4 Tamanho e concentração de partículas por NTA

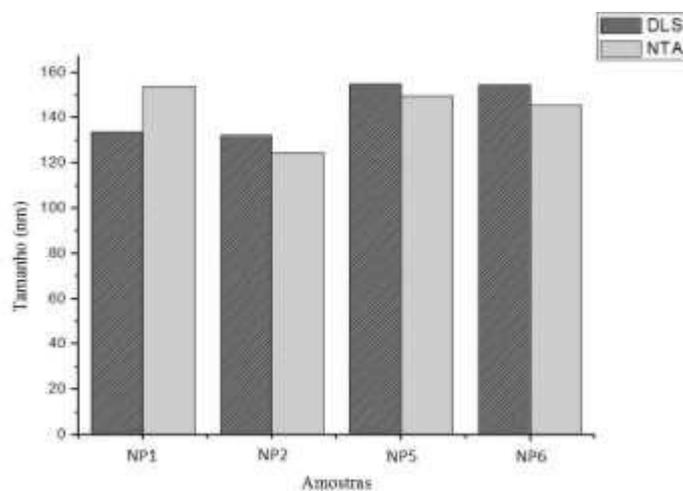
O NTA é um sistema que permite a análise de partículas de 30 a 1000 nm. A técnica combina microscopia de espalhamento de luz com um dispositivo com câmera acoplada que permite a visualização e gravação das nanopartículas em solução. Utiliza um software que é capaz de identificar e rastrear nanopartículas individuais por meio do seu movimento browniano. Essa técnica permite a visualização da amostra, fornecendo valores referentes a concentração de partículas aproximada e informações sobre tamanho médio das partículas.

As amostras NP2 e NP6 também foram caracterizadas por NTA, bem como seus respectivos controles (NP1 e NP4), devido compreenderem os sistemas com maiores eficiências de incorporação. O histograma apresentado na figura 3B apresenta padrão de distribuição monodisperso e unimodal, corroborando com os dados obtidos por DLS. Adicionalmente, foi observado que a quantidade de polímero na formulação não interfere na concentração de partículas. Entretanto, a EPI quando presente na nanopartícula forneceu aumento na concentração. Enquanto que Oliveira et al. (2012) ao sintetizarem nanopartículas de quitosana não verificou interferência na concentração com a adição do bioativo.

Dessa forma, a figura 3A apresenta os tamanhos médios das nanopartículas com e sem EPI obtidos por DLS e por NTA. Foi observada diferença percentual variando entre 3,4 a 14,8% nos tamanhos obtidos pelas duas técnicas. A técnica de DLS fornece o tamanho médio das partículas por meio de medições de flutuações na intensidade de espalhamento, sendo afetado comumente pela presença de um pequeno número de grandes partículas.

Dessa forma, a análise de rastreamento de nanopartículas tem sido comumente recomendada, pois fornece informações adicionais sobre a distribuição de tamanho das amostras (Talelli et al., 2010; Filipe, Hawe & Jiskoot, 2010).

A



B

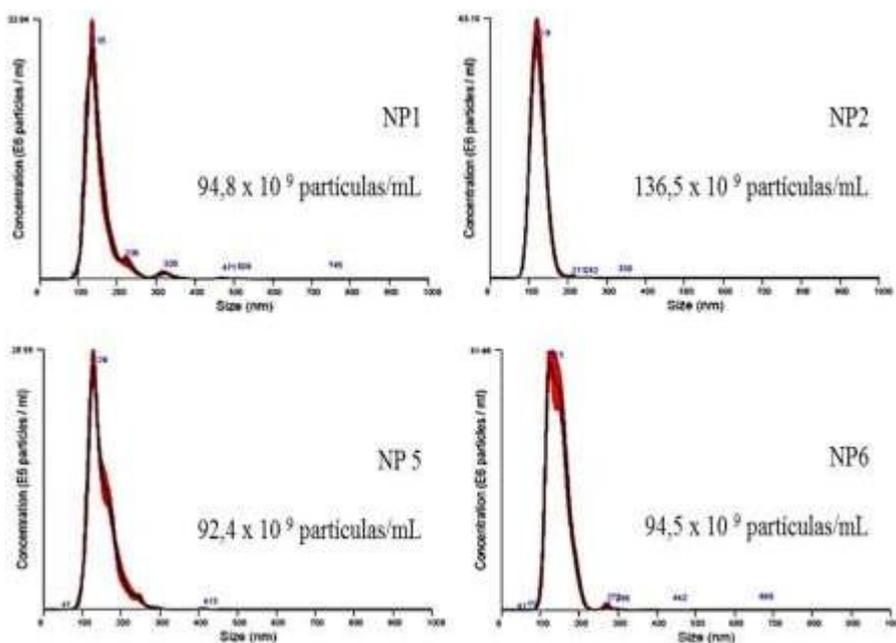


Figura 3. (A) Distribuição de tamanho das nanopartículas com (NP2 e NP6) e sem EPI (NP1 e NP5) obtidos DLS e por NTA. (B) Concentração de nanopartículas obtidas por NTA nas concentrações de polímeros (NP1 e NP5) com e sem adição de alcaloide em função do tamanho.

3.5 Morfologia das nanopartículas

A microscopia de Força Atômica tem sido empregada para caracterizar a morfologia de superfície das nanopartículas, o que fornece informações com alta resolução em três dimensões, em escala nanométrica, sendo capaz ainda de permitir a visualização de detalhes superficiais em nível atômico (Hoo et al., 2008).

A análise das imagens obtidas por microscopia de força atômica (Figura 4) permite afirmar que as nanopartículas apresentam formato esférico e se distribuem de forma agrupada, corroborando com os resultados encontrados por DLS. A superfície das nanopartículas se mostram lisas e sem rugosidades. Kumar & Verma (2015) justificam a ausência de rugosidade pela natureza elástica do polímero, que se adapta as diferentes condições e se molda reduzindo possíveis imperfeições superficiais.

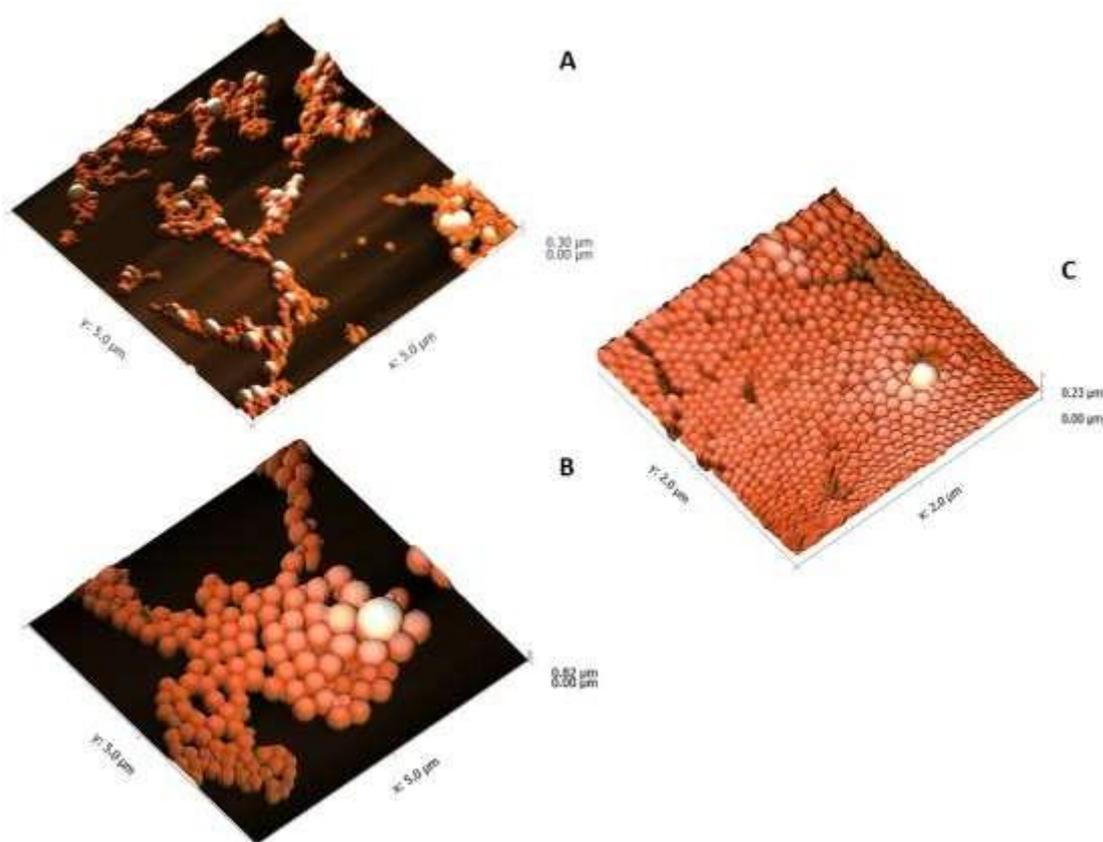


Figura 4. Análise morfologia obtida por AFM de nanopartículas a base da goma do cajueiro (NP5) e nanopartículas a base da goma do cajueiro com EPI incorporada (NP8). (A) Nanopartículas incorporadas com EPI (NP8). (B) Nanopartículas sem adição do alcaloide (NP5). (C) Versão ampliada de 4A (NP8) (2μm).

3.6 Cinética de liberação *in vitro*

O perfil de liberação do fármaco foi analisado por difusão em membrana de diálise em solução tampão fosfato. A figura 5 A apresenta a quantidade do alcaloide liberado em função do tempo, na qual pode-se observar que a EPI apresenta um perfil de liberação lento e gradual, com equilíbrio ocorrendo por volta de 6h de liberação.

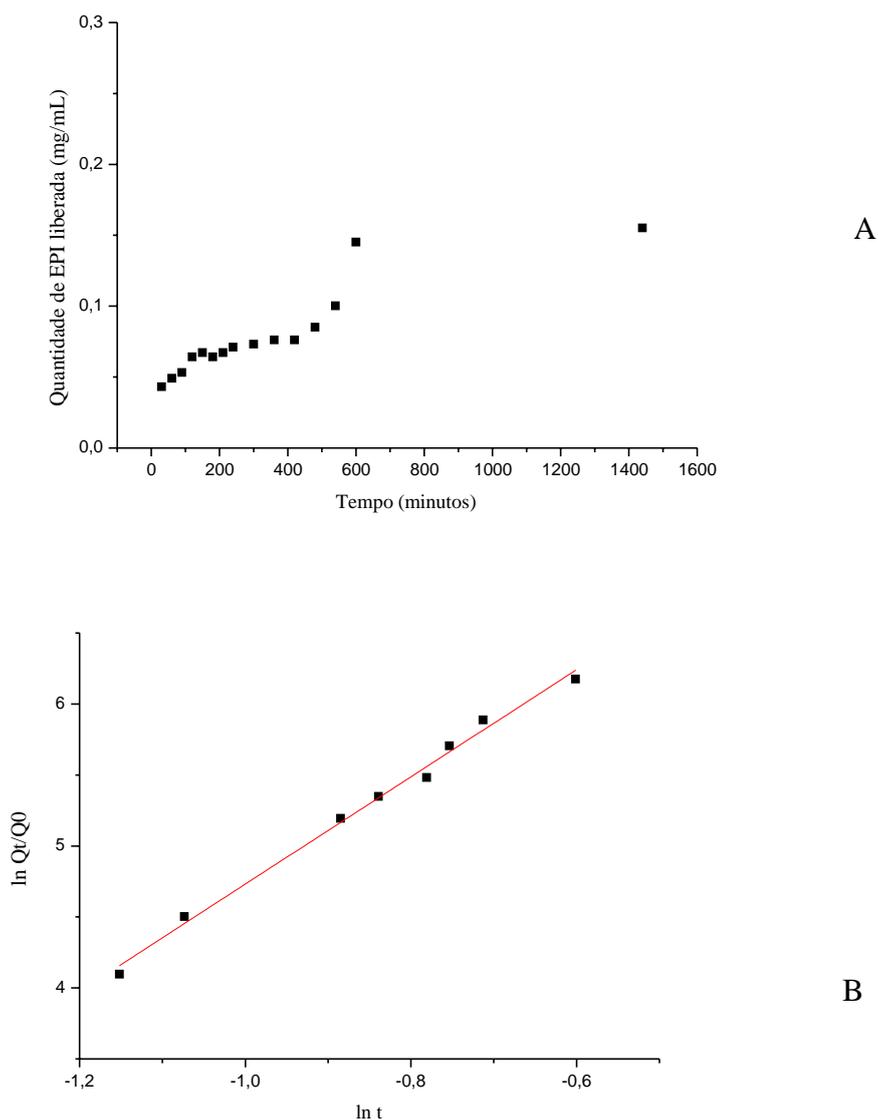


Figura. 5. Perfil de liberação *in vitro* da EPI através de uma membrana de diálise (NP8) (A). Mecanismo de liberação *in vitro* da EPI a partir da matriz polimérica de goma do cajueiro, de acordo com o modelo de Korsmeyer-Peppas (B).

A literatura descreve inúmeros modelos matemáticos para tratar os dados de liberação (Ahuja, Katare & Singh, 2007; Brazel & Peppas, 2000, Mestres et al., 2016). Entretanto, aplicou-se o modelo de Korsmeyer-Peppas, que se baseia na Lei das

Potências, e que relaciona exponencialmente a liberação com o tempo em sistemas poliméricos (Dash et al., 2010). O “n” é um parâmetro que varia de acordo com a forma geométrica e determina o mecanismo de liberação. Se o “n” é igual ou menor a 0,5 o mecanismo de liberação segue a difusão fickiana, se está entre 0,5 e 1, então, segue uma transferência de massa anômala ou não fickiana (Korsmeyer et al., 1983).

O expoente de difusão (n) foi obtido a partir do coeficiente linear do gráfico plotado (Fig. 5 B) de $\ln M_t/M_\infty$ versus $\ln t$ nos primeiros 600 minutos de liberação do alcaloide. O valor de “n” encontrado foi de 0,37 para a liberação da EPI, sendo possível afirmar que a transferência de massa segue o modelo de difusão Fickiana. Segundo Melo et al. (2010), os sistemas porosos de liberação podem apresentar valores <0,5 devido a combinação do processo de difusão da matriz polimérica e difusão parcial através dos poros preenchidos com água na matriz polimérica. Pitombeira et al. (2015) e Dias et al. (2016) utilizando a mesma matriz polimérica encontraram “n” de 0,43 e 0,27, respectivamente, apresentando o mesmo perfil de liberação, corroborando com os resultados encontrados no presente estudo.

4 Conclusão

As nanopartículas formuladas com goma do cajueiro acetilada se mostraram como fontes viáveis de carreamento de drogas, uma vez que a incorporação de EPI ocorreu de forma efetiva e com características de sistema nanométrico, monodispersos e estável; além de proporcionar um perfil de liberação lento e gradual, seguindo modelo de difusão fickiana. Dessa forma, as nanopartículas obtida com a matriz polimérica é uma forma viável de veicular de forma efetiva.

Agradecimentos

Este trabalho foi realizado em parceria com o Laboratório de Polímeros da Universidade Federal do Ceará para a modificação do polímero, e com o Laboratório de Biomembranas da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP)/Campus Sorocaba para as análises das nanopartículas pela técnica de Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA).

5 Referências

- Ahuja, N., Katare, O. P., & Singh, B. (2007). Studies on dissolution enhancement and mathematical modeling of drug release of a poorly water-soluble drug using water-soluble carriers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 65(1), 26-38.
- Alvarado, H. L., Abrego, G., Garduño-Ramirez, M. L., Clares, B., Calpena, A. C., & García, M. L. (2015). Design and optimization of oleanolic/ursolic acid-loaded nanoplateforms for ocular anti-inflammatory applications. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 11(3), 521-530.
- Araújo, T. S., Costa, D. S., Sousa, N. A., Souza, L. K., de Araújo, S., Oliveira, A. P., Oliveira, A. O., Sousa, F. B. M., Silva, D. A., Barbosa, A. L. R., Leite, J. R. S. A. & Medeiros, J. V. R. (2015). Antidiarrheal activity of cashew GUM, a complex heteropolysaccharide extracted from exudate of *Anacardium occidentale* L. in rodents. *Journal of ethnopharmacology*, 174, 299-307.
- Barbosa-Filho, J. M., Piuvezam, M. R., Moura, M. D., Silva, M. S., Lima, K. V. B., da-Cunha, E. V. L., Fachine, I. M., & Takemura, O. S. (2006). Anti-inflammatory activity of alkaloids: A twenty-century review. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16(1), 109-139.
- Bilati, U., Allémann, E., & Doelker, E. (2005). Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 24(1), 67-75.
- Brazel, C. S., & Peppas, N. A. (2000). Modeling of drug release from swellable polymers. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 49(1), 47-58.
- Carvalho, N. S., Silva, M. M., Silva, R. O., Nicolau, L. A., Sousa, F. B. M., Damasceno, S. R., Silva, D. A., Barbosa, A. L. R., Leite, J. R. S. A. & Medeiros, J. V. R. (2015). Gastroprotective Properties of Cashew Gum, a Complex Heteropolysaccharide of *Anacardium occidentale*, in Naproxen-Induced Gastrointestinal Damage in Rats. *Drug development research*, 76(3), 143-151.
- Castilhos, T. S., Giordani, R. B., Henriques, A. T., Menezes, F. S., & Zuanazzi, J. Â. S. (2007). In vitro evaluation of the antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial activities of the montanine alkaloid. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17(2), 209-214.
- Dash, S., Murthy, P. N., Nath, L., & Chowdhury, P. (2010). Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol Pharm*, 67(3), 217-23.
- De Paula, R. C. M., & Rodrigues, J. F. (1995). Composition and rheological properties of cashew tree gum, the exudate polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. *Carbohydrate Polymers*, 26(3), 177-181.
- Dias, S. F. L., Nogueira, S. S., de França Dourado, F., Guimarães, M. A., de Oliveira Pitombeira, N. A., Gobbo, G. G., Primo, F. L., De Paula, R. C. M., Feitosa, J. P. A.,

- (2016). Acetylated Cashew Gum-based Nanoparticles for Transdermal Delivery of Diclofenac Diethyl Amine. *Carbohydrate Polymers*, 143(5), 254–261.
- Ding, X., Richter, D. L., Matuana, L. M., & Heiden, P. A. (2011). Efficient one-pot synthesis and loading of self-assembled amphiphilic chitosan nanoparticles for low-leaching wood preservation. *Carbohydrate Polymers*, 86(1), 58-64.
- Dutra, R. C., Campos, M. M., Santos, A. R. S., Calixto, J. B. (2016). Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacological Research*.
- Filipe, V., Hawe, A., & Jiskoot, W. (2010). Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. *Pharmaceutical research*, 27(5), 796-810.
- Gaete, C. G., Tsapis, N., Besnard, M., Bochot, A., & Fattal, E. (2007). Encapsulation of dexamethasone into biodegradable polymeric nanoparticles. *International journal of pharmaceutics*, 331(2), 153-159.
- Galindo-Rodriguez, S., Allémann, E., Fessi, H., & Doelker, E. (2004). Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods. *Pharmaceutical research*, 21(8), 1428-1439.
- Gaumet, M., Vargas, A., Gurny, R., & Delie, F. (2008). Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 69(1), 1-9.
- Hoo, C. M., Starostin, N., West, P., & Mecartney, M. L. (2008). A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions. *Journal of Nanoparticle Research*, 10(1), 89-96.
- Hornig, S., & Heinze, T. (2008). Efficient approach to design stable water-dispersible nanoparticles of hydrophobic cellulose esters. *Biomacromolecules*, 9(5), 1487-1492.
- Hornig, S., Bunjes, H., & Heinze, T. (2009). Preparation and characterization of nanoparticles based on dextran–drug conjugates. *Journal of colloid and interface science*, 338(1), 56-62.
- Huertas, M., C. E., Fessi, H., & Elaissari, A. (2010). Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International journal of pharmaceutics*, 385(1), 113-142.
- Hwang, H. Y., Kim, I. S., Kwon, I. C., Kim, Y. H. (2008). Tumor targetability and antitumor effect of docetaxel-loaded hydrophobically modified glycol chitosan nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 128, 23–31.
- Korsmeyer, R. W., Gurny, R., Doelker, E., Buri, P., & Peppas, N. A. (1983). Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *International journal of pharmaceutics*, 15(1), 25-35.

- Kumar, B. S., Kumar, M. G., Suguna, L., Sastry, T. P., & Mandal, A. B. (2012). Pullulan acetate nanoparticles based delivery system for hydrophobic drug. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 3, 24-32.
- Li, Q., Yang, K. X., Zhao, Y. L., Qin, X. J., Yang, X. W., Liu, L., Liu, Y. P., & Luo, X. D. (2016). Potent anti-inflammatory and analgesic steroidal alkaloids from *Veratrum taliense*. *Journal of ethnopharmacology*, 179, 274-279.
- Lima, R. S. N., Lima, J. R., Salis, C. R., & Moreira, R. A. (2002). Cashew-tree (*Anacardium occidentale* L.) exudate gum: a novel bioligand tool. *Biotechnology and applied biochemistry*, 35(1), 45-53.
- Marinelli, A. L., Monteiro, M. R., Ambrósio, J. D., Branciforti, M. C., Kobayashi, M. & Nobre, A. D. (2008). Desenvolvimento de compósitos poliméricos com fibras vegetais Naturais da biodiversidade: uma contribuição para a sustentabilidade Amazônica. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 18(2), 92-99.
- Melo, N. F. S. D., Grillo, R., Fraceto, L. F., Dias Filho, N. L., Paula, E. D., Araújo, D. R. D., & Rosa, A. H. (2010). Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas de poli (L-lactídeo) contendo benzocaína. *Química Nova*, 33(1), 65-69.
- Mestres, G., Kugiejko, K., Pastorino, D., Unosson, J., Öhman, C., Ott, M. K., Ginebra, M. P., & Persson, C. (2016). Changes in the drug release pattern of fresh and set simvastatin-loaded brushite cement. *Materials Science and Engineering: C*, 58, 88-96.
- Min, K. H., Park, K., Kim, Y. S., Bae, S. M., Lee, S., Jo, H. G., Park, R. W., Kim, I. S., Jeong, S. Y., Kim, K., & Kwon, I. C. (2008). Hydrophobically modified glycol chitosan nanoparticles-encapsulated camptothecin enhance the drug stability and tumor targeting in cancer therapy. *Journal of Controlled Release*, 127(3), 208-218.
- Mohanraj, V. J., & Chen, Y. (2007). Nanoparticles-a review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5(1), 561-573.
- Mora-Huertas, C. E., Fessi, H., & Elaissari, A. (2010). Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International journal of pharmaceutics*, 385(1), 113-142.
- Mothé, C. G., De Souza, I. A., & Calazans, G. M. (2008). Antitumor activity of cashew gum from *Anacardium occidentale* L. *Agro Food Industry Hi-Tech*, 19(6), 50-52.
- Na, K., Lee, T. B., Park, K. H., Shin, E. K., Lee, Y. B., & Choi, H. K. (2003). Self-assembled nanoparticles of hydrophobically-modified polysaccharide bearing vitamin H as a targeted anti-cancer drug delivery system. *European journal of pharmaceutical sciences*, 18(2), 165-173.
- Özçelik, B., Kartal, M., & Orhan, I. (2011). Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. *Pharmaceutical biology*, 49(4), 396-402.

Park, W., Park, S. J., Na, K. (2010). Potential of self-organizing nanogel with acetylated chondroitin sulfate as an anti-cancer drug carrier. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 79(2), 501-508.

Pervez, S., Khan, H., & Khan, A. (2016). Plant alkaloids as an emerging therapeutic alternative for the treatment of depression. *Frontiers in Pharmacology*, 7, 28.

Pinto, A. C., Silva, D. H. S., Bolzani, V. S., Lopes, N. P & Epifanio, R. A. (2002). Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Quimica Nova*, 25(1), 45-61.

Pitombeira, N. A., Neto, J. G. V., Silva, D. A., Feitosa, J. P., Paula, H. C., & de Paula, R. C. (2015). Self-assembled nanoparticles of acetylated cashew gum: Characterization and evaluation as potential drug carrier. *Carbohydrate polymers*, 117, 610-615.

Rodrigues, A. S., Andelman, S. J., Bakarr, M. I., Boitani, L., Brooks, T. M., Cowling, R. M., Fishpool, L. D. C., Fonseca, G. A. B., Gaston, K. J., Hoffmann, M., Long, J. S., Marquet, P. A., Pilgrim, J. D., Pressey, R. L., Schipper, J., Sechrest, W., Stuart, S. N., Underfill, L. G., Waller, R. W., Watts, M. E. J & Yan, X. (2004). Effectiveness of the global protected area network in representing species diversity. *Nature*, 428(6983), 640-643.

Schirato, G. V., Monteiro, F. M. F., Silva, F. D. O., Lima Filho, J. L. D., Leão, A. M. D. A. C., & Porto, A. L. F. (2006). The polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. in the inflammatory phase of the cutaneous wound healing. *Ciencia Rural*, 36(1), 149-154.

Severino, P., Santana, M. H. A., Malmonge, S. M., & Souto, E. B. (2011). Polímeros usados como sistemas de transporte de princípios ativos. *Polímeros*, 21(5), 361-368.

Shima, F., Schulte, B., Keul, H., Moeller, M., & Akashi, M. (2014). Preparation of microparticles composed of amphiphilic poly (γ -glutamic acid) through hydrophobic interactions. *Polymer journal*, 46(3), 184-188.

Silva, V. G., Silva, R. O., Damasceno, S. R., Carvalho, N. S., Prudêncio, R. S., Aragão, K. S., Guimarães, M. A., Campos, S. A., Veras, L. M., Godejohann, M., Leite, J. R. S. A., Barbosa, A. L. R. & Medeiros, J. V. R. (2013). Anti-inflammatory and antinociceptive activity of epiisopiloturine, an imidazole alkaloid isolated from *Pilocarpus microphyllus*. *Journal of natural products*, 76(6), 1071-1077.

Talelli, M., Iman, M., Varkouhi, A. K., Rijcken, C. J., Schiffelers, R. M., Etrych, Ulbrich, K., Nostrum, C. F. V., Lammers, T., Storm, G., & Hennink, W. E. (2010). Core-crosslinked polymeric micelles with controlled release of covalently entrapped doxorubicin. *Biomaterials*, 31(30), 7797-7804.

Tedesco, A. C., Nunes, L. C. C., Leite, J. R. S. A. & Silva, D. A. (2016). Acetylated Cashew Gum-based Nanoparticles for Transdermal Delivery of Diclofenac Diethyl Amine. *Carbohydrate Polymers*, 143(1), 254-261.

Torquato, D. S., Ferreira, M. L., Sá, G. C., Brito, E. S., Pinto, G. A. S., & Azevedo, E. H. F. (2004). Evaluation of antimicrobial activity of cashew tree gum. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(5), 505-507.

Veras, M. L., Guimaraes, A. M., Campelo, D. Y., Vieira, M. M., Nascimento, C., Lima, Vasconcelos, L., Nakano, E., Kuckelhaus, S., Batista, M., Leite, J. & Moraes, J. (2012). Activity of epiisopiloturine against *Schistosoma mansoni*. *Current medicinal chemistry*, 19(13), 2051-2058.

Voigtländer, H. W., Balsam, G., Engelhardt, M., & Pohl, L. (1978). Epiisopiloturin, ein neues Pilocarpus-Alkaloid. *Archiv der Pharmazie*, 311(11), 927-935.

Zhu, F., Qin, C., Tao, L., Liu, X., Shi, Z., Ma, X., Jia, J., Tan, T., Cui, C., Lin, J., Tan, C., Jiang, Y. & Chen. (2011). Clustered patterns of species origins of nature-derived drugs and clues for future bioprospecting. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(31), 12943-12948.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Foi possível concluir que a matriz polimérica de goma do cajueiro acetilada incorporou de forma eficaz a EPI o que promoveu um perfil de liberação sustentado e controlado. No entanto, alguns fatores ficaram ainda por estudar, como a interação polímero alcaloide, bem como a realização de ensaios *in vivo* comparativos com sua formulação livre já descritos na literatura.

1 **ACETYLATED CASHEW GUM-BASED NANOPARTICLES FOR THE**
2 **INCORPORATION OF ALKALOID EPIISOPILLOTURINE**

3
4 Jessica do Amaral Rodrigues ^a, Alyne Rodrigues de Araújo ^a, Nadia Aline Pitombeira ^b,
5 Alexandra Plácido ^c, Miguel Peixoto de Almeida ^d, Leiz Maria Costa Veras ^a, Cristina
6 Delerue-Matos ^c, Regina Célia Monteiro de Paula ^b, Judith Pessoa Andrade Feitosa ^b,
7 Peter Eaton ^{a,d}, José Roberto Souza Almeida Leite ^{a,d,e}, Durcilene Alves da Silva ^{*a}

8
9 ^aNúcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia, Biotec, Universidade Federal
10 do Piauí, UFPI, 64202020, Parnaíba, PI, Brasil.

11 ^bLaboratório de Polímeros, LabPol Departamento de Química Orgânica e inorgânica,
12 Universidade Federal do Ceará, UFC, *Campus* do Pici, 60455-760, Fortaleza, CE,
13 Brasil.

14 ^cREQUIMTE/LAQV, Instituto Superior de Engenharia do Porto, Instituto Politécnico
15 do Porto, Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 431, 4200-072 Porto, Portugal

16 ^dUCIBIO, REQUIMTE, Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de
17 Ciências, Universidade do Porto, 4169-007, Porto, Portugal.

18 ^eÁrea de Morfologia, Faculdade de Medicina, FM, Universidade de Brasília, UnB,
19 *Campus* Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, Brasília, Distrito Federal, DF, Brasil
20 70910-900.

21
22
23 **Mailing address of author: Center for Biodiversity Research and Biotechnology*
24 *(BIOTEC), Federal University of Piauí, Campus Ministro Reis Velloso, Parnaíba, Piauí.*

25 *Avenida São Sebastião 64202020*

26 *Phone number: +558633235433*

27 *E-mail: durcileneas@yahoo.com.br*

28
29
30
31
32
33
34

35 **Highlights**

36

- 37 • Polymer Nanoparticles were prepared using the modified polysaccharide from
- 38 cashew gum
- 39 • The Nanoparticles were characterized using NTA and dynamic light scattering
- 40 • Nanoparticles were loaded with epiisopiloturine and the efficiency of
- 41 incorporation of the drug and In vitro release assay were evaluated

42

43 **Abstract**

44 The incorporation of active molecules in natural polymeric matrices has
45 garnered increasing interest during recent decades. A new derivate of cashew gum
46 successfully obtained by gum acetylation has shown great potential as a carrier in
47 controlled drug release systems. The natural alkaloid epiisopiloturine has recently
48 become the focus of study for various medicinal properties, particularly for its anti-
49 inflammatory and antischistosomal effect. In this work, epiisopiloturine was
50 encapsulated in acetylated cashew gum nanoparticles in order to increase solubility and
51 allow slow release. The particles were produced under a variety of conditions, and
52 thoroughly characterized using light scattering and microscopic techniques. The
53 particles were spherical and highly stable in solution, and showed drug incorporation at
54 high levels, up to 55% efficiency. Using a dialysis-based *in vitro* assay, these particles
55 were shown to release the drug via a Fickian diffusion mechanism, leading to gradual
56 drug release over approximately 6 hours.

57

58 **Keywords:** cashew gum, polysaccharide, acetylation, epiisopiloturine, alkaloid, release.

59

60 **Chemical compounds studied in this article:**

61 Sodium hydroxide (CID: 14798); formamide (CID: 713); pyridine (CID: 1049); acetic
62 anhydride (CID: 7918); acetone (CID: 180); Hydrochloric acid (PubChem CID: 313).

63

64

65

66

67

1. Introduction

Natural products are widely used in the production of biomaterials. The abundant availability, lower toxicity rate, greater biocompatibility, and low costs of natural product characteristics make them promising sources of products of therapeutic interest (Pinto et al., 2002).

Brazil has one of the largest biodiversities on the planet, with about 20% of species distributed around the world, many of which are endemic to the country (Rodrigues et al., 2004). This great biodiversity indicates great potential for discovery of natural products with biopharmaceutical applications (Marinelli et al., 2008). Although much has been discussed in relation to biodiversity of all living species on the planet, the potential of many plants around the world to produce useful and unique natural products is as yet underexplored. The potential for biopharmaceutical applications of medicinal plants including their constituent compounds such as alkaloids, flavonoids, triterpenes and polysaccharides are the target of much research with several promising activities confirmed through pre-clinical trials reported in the literature (Dutra, Campos, Santos & Calixto, 2016).

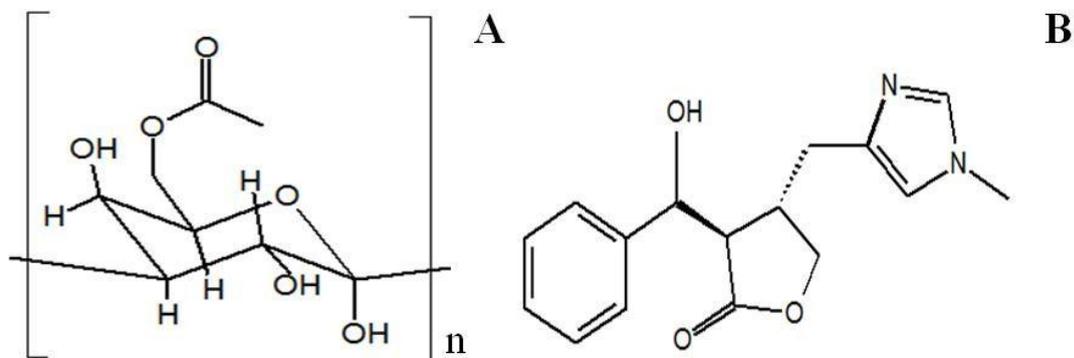
Polysaccharides are natural macromolecules, one of the main constituents of plants composing the majority of the cell wall, providing structural support to these plants (Severino, Santana, Malmonge & Souto, 2011). Cashew gum is a polysaccharide extracted from the *Anacardium occidentale* L. species, which are tropical plants extensively cultivated in Northeast Brazil. Cashew gum's structure is mainly composed of galactose, glucose, arabinose, and rhamnose groups, as well as glucuronic acid (De Paula & Rodrigues, 1995). Some biological activities have been reported, including antimicrobial effects (Torquato et al., 2004), antidiarrheal (Araújo et al., 2015) and gastroprotective effects (Carvalho et al., 2015). More recently, its acetylated derivative (acetylated cashew gum) was used for preparation of polymeric nanoparticles to incorporate bioactive substances (Pitombeira et al., 2015; Dias et al., 2016).

Alkaloids have attracted great attention for their ability to act as biological response modifiers. A wide range of biological activities of alkaloids have been reported, such as anti-inflammatory activity (Barbosa-Filho et al., 2006), antioxidant effects (Castilhos et al., 2007), antimicrobial action, (Özçelik, Kartal & Orhan, 2011), analgesic effects (Li et al., 2016) and as an antidepressant (Pervez, Khan & Khan, 2016).

102 Epiisopiloturine (EPI) is an imidazole alkaloid extracted from *Pilocarpus*
 103 *microphyllus*, with *in vitro* and *in vivo* activity against *S. mansoni* (Veras et al., 2012;
 104 Veras et al., 2013). Moreover, this alkaloid showed potent anti-inflammatory and
 105 antinociceptive activity, which might help combat the granuloma and inflammatory
 106 reaction caused by *S. mansoni* eggs (Silva et al., 2013). However, this promising
 107 alkaloid has low solubility in water, which can cause problems for its pharmaceutical
 108 bioavailability in biological systems. A first attempt at nanotechnological formulation
 109 was performed with liposomes, although there was a decrease in the cytotoxic effects in
 110 mammalian cells. The anthelmintic activity was slightly decreased when the drug was
 111 encapsulated in this way (Guimarães et al., 2014). Furthermore, liposome formulations
 112 have a high cost.

113 Incorporation of active molecules in polymeric nanoparticles has become the
 114 subject of increasing interest during recent decades (Miladi et al., 2015). The aim of this
 115 study was to use two natural products, EPI and acetylated cashew gum (Fig. 1) for
 116 nanoparticle formulation in order to improve the solubility of the alkaloid and enable
 117 controlled release, thus increasing the therapeutic benefit.

118



119

120 **Fig 1.** Generalized chemical structure of acetylated cashew gum represented by the main constituent ,
 121 galactoseE (A) and epiisopiloturine (B).

122

123 2. Material and methods

124 2.1 Materials

125

EPI incorporated active substance was provided by Zirkon Industry and Trade
 126 Petrochemicals Chemicals Ltda, and was used as received. Cashew gum used in the
 127 acetylation reaction has molar mass, obtained by size exclusion chromatography of 6.9
 128 $\times 10^4$ g/mol and the molar sugar content (%) for galactose; glucose; arabinose; rhamnose

129 and glucuronic acid of 71.9; 14.4; 5.8; 3.6 and 4.3% respectively. The acetylated
130 cashew gum (ACG) was synthesized as described by Pitombeira et al. (2014) with a
131 degree of substitution of 2.8. All other reagents were of analytical grade.

132

133 ***2.2 Nanoparticle Preparation***

134 Nanoparticles were synthesized by a dialysis technique (Letchford & Burt,
135 2007). The gum was dissolved in dimethylsulfoxide at two different concentrations
136 (0.05% and 0.1% w/w) and three gum/EPI proportions (by weight) were studied (10:1,
137 5:1 and 2:1). A solution of GCA (20 mL) was dialyzed against deionized water using a
138 cellulose acetate membrane (molecular weight 12 kDa) for 24 h. Identical procedures
139 were conducted for the synthesis of NPs with and without the EPI, totaling eight
140 formulations. The conductivity was used to monitor the water exchange. The resulting
141 solutions were then lyophilized and weighted. .

142

143 ***2.3 Nanoparticle Characterization***

144 The average nanoparticle size and polydispersity index (PDI) were determined
145 by means of dynamic light scattering analysis spectroscopy (photon correlation - DLS)
146 and nanoparticle tracking analysis (NTA). The DLS used a laser wavelength of 633 nm
147 at a fixed scattering angle 90 and the zeta potential was determined by electrophoretic
148 mobility of the samples using Malvern Zetasizer Nano equipment, ZS Model 3600.
149 Samples were measured in triplicate and the mean average is reported here. The stability
150 of the various EPI-ACG formulations was evaluated by determining the hydrodynamic
151 diameter and PDI values of the nanoparticles with storage time. The samples were
152 stored in Eppendorf tubes and kept at a temperature of 4 °C. The measurements were
153 performed weekly for a period of 7 weeks.

154 Nanoparticle tracking analysis (NTA) was carried out using a NanoSight NS300
155 instrument with a 642 nm laser module and NTA 3.2 software, to obtain the diameter
156 and concentration of particles suspended in the feed. An aliquot was taken using a
157 plastic syringe and injected slowly into the sample chamber (approximately 1 mL). Five
158 videos of 1 minute length each were captured advancing the sample enough so that a
159 previously unmeasured set of nanoparticles could be captured by the camera before
160 starting each video. This allowed the measurement of a larger number of different
161 particles across the aliquot. The analysis, namely the detection threshold, were set
162 depending on the scattered light intensity observed in the captured videos. Each one of

163 the videos was analyzed independently and the results are automatically merged into
164 one particle size distribution chart.

165 The morphology of the nanoparticles was measured by Atomic Force
166 Microscopy (AFM). To obtain the images a TT-AFM from AFM Workshop
167 microscope, operated in vibrating mode was used. We used NSG10 (NT-MDT)
168 cantilevers with a resonant frequency of approximately 280 kHz. Samples of 5 μ L of
169 nanoparticle suspension were deposited on freshly cleaved mica. The immobilized
170 samples were rinsed with water and then thoroughly dried before analysis. The images
171 were analyzed using the software program Gwyddion 2.33.

172

173 ***2.4 Amount of drug incorporated and the incorporation efficiency (%IE)***

174 The amount of EPI in the nanoparticles was determined by UV-Vis
175 spectroscopy, measuring the absorbance at 258.3 nm. Amount of incorporated drug was
176 calculated using a calibration curve to determine the relationship between the
177 absorbance and the concentration using the concentration range of 0.05 to 1 mg/mL.
178 After lyophilization the nanoparticles were dissolved in methanol with stirring for 1
179 minute and then the absorbance at 258.3 nm was measured. The incorporated quantity
180 (IQ) was determined following Eq. 1, and then the incorporation efficiency (IE)
181 determined by Eq. 2 (Park, Park & Na, 2010):

182

$$183 \quad \text{Incorporated quantity (\%)} = \frac{\text{in nanoparticle} \times 00}{\text{ass}} \quad (\text{Eq. 1})$$

184

$$185 \quad \text{Incorporation efficiency (\%)} = \frac{\text{ } \times 00}{\text{ } } \quad (\text{Eq. 2})$$

186

187 *The ACG mass in nanoparticle was calculated by NP mass minus EPI loaded mass.

188

189 ***2.5 In vitro Release of EPI***

190 The release profile was determined using a dialysis system. The nanoparticle
191 solution was placed in a cellulose acetate membrane with 12 kDa exclusion pores
192 against 50 mL phosphate buffer pH 7.4 at 37°C. Aliquots of 1 mL were collected at 30-
193 minute intervals in the first 4 hours and hourly in the next 6 hours. The same amount of
194 buffer was replaced upon each aliquot removal so that the volume remained constant.
195 The samples were analyzed by UV-visible spectroscopy. Absorbance measurements

196 were used to quantify the alkaloid released using a calibration curve previously
197 established in the same medium used for the release test.

198

199 **2.6 Statistical Analysis**

200 Statistical analyses were performed by using one-way ANOVA and Tukey's
201 test using Graphpad Prism. All data were expressed as the mean \pm SD (standard
202 deviation) of three independent experiments in the tables and figures. Statistical
203 significance for this study was considered at $p < 0.05$.

204

205 **3. Results and discussion**

206

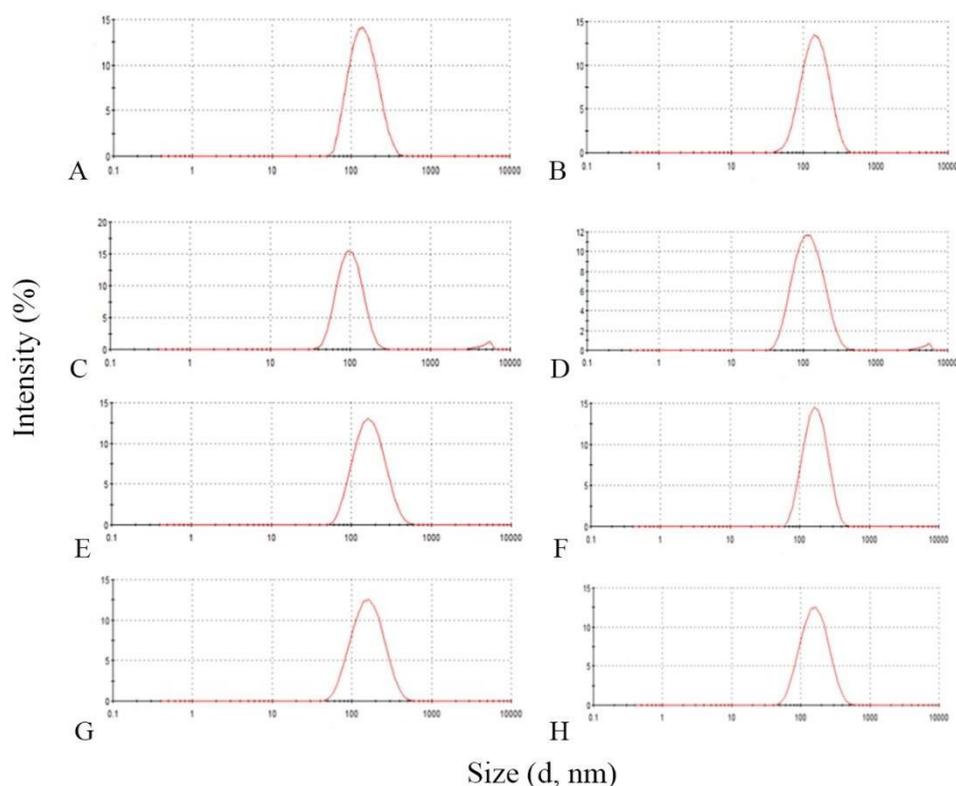
207 Nanoparticles made from natural polymers have been used extensively for the
208 controlled release of bioactive substances. Growing interest has been focused on
209 nanoparticles obtained by self-assembly from hydrophobic polymers due to possible
210 biomedical applications in many areas in the medical and pharmaceutical fields.

211 EPI was incorporated into a polymeric matrix and polymeric nanoparticles
212 obtained using acetylated cashew gum. The formation of nanoparticles was monitored
213 by DLS and moderate polydispersity was found for all the samples (Fig. 2). Table 1
214 shows the sizes of nanoparticle samples with and without EPI for two gum
215 concentrations. Gaumet, Vargas, Gurny & Delie (2008) emphasize the size of the
216 nanoparticles as an essential feature in the biodistribution of the active ingredient. To
217 produce the desired therapeutic effect nanoparticles should exhibit a particle size
218 consistent with the target organ.

219

220

221



222

223 **Fig 2.** Size distribution data (intensity) from light scattering (DLS). (A) NP 1, (B) NP 2, (C) NP 3, (D)
 224 NP 4, (E) NP 5, (F) NP 6, (G) NP 7, and (H) NP 8.

225

226 **Table 1.** Size, particle concentration as prepared, polydispersity index (PDI), zeta potential (ZP) (mean),
 227 incorporated quantity drug load (IQ), and incorporation efficiency (IE), of nanoparticles prepared using
 228 different polysaccharide concentrations and polysaccharide to drug ratios.

Sample	ACG (%)	ACG:EPI	Size ^a (nm)	Size ^b (nm)	PDI	ξ potential (mv)	IQ (%)	IE (%)
NP 1	0.05	-	126.0	133.7	0.148	-32.6	-	-
NP 2		10:1	127.1	132.0	0.140	-26.7	5.4	59.8
NP 3		5:1	148.6	107.4	0.320*	-20.0	8.8	52.9
NP 4		2:1	129.1	108.6	0.226*	-17.4	16.0	48.1
NP 5	0.10	-	135.5	155.1	0.153	-26.9	-	-
NP 6		10:1	132.6	154.4	0.120	-30.6	6.9	76.6
NP 7		5:1	101.6	142.7	0.175*	-23.1	10.2	61.2
NP 8		2:1	165.6	126.2	0.212*	-25.1	10.7	32.2

229

230 Nanoparticles with size below 6 nm can pass through the fenestrations of the
 231 mucous membranes, tissue skeletal, cardiac, smooth muscle, and skin, while
 232 nanoparticles of 20 to 30 nm in size can reach the kidneys. Nanoparticles around 150
 233 nm are able to penetrate the liver and spleen. The nanoparticles prepared in this study
 234 had a size distribution between 107 and 156 nm (hydrodynamic diameter obtained by

235 DLS), which are favorable for administration of passive drugs, whereas nanoparticles
236 with sizes less than 200 nanometers are able to resist attack by the reticulum endothelial
237 system (Na et al., 2003; Hornig & Heinze, 2008). As EPI acts as a potent agent against
238 schistosomiasis, the nanoparticles developed in this work may be very interesting for
239 this alkaloid application in order to improve its biodistribution to the liver.

240 In polymeric nanoparticles that have been described in the literature, it is seen
241 that with increasing polymer concentration in the preparation, there's generally an
242 increase in particle diameter. Galindo-Rodriguez et al. (2004) describe two reasons for
243 this behavior. Firstly, upon increasing the amount of polymer, there is a greater number
244 of polymer chains per volume of solvent, polymer-polymer interactions are favored and
245 more polymeric interactions are formed, which leads to the formation of particles with
246 larger sizes. Secondly, the increase in polymer concentration causes an increase in
247 viscosity of the organic phase, providing greater resistance to mass transfer, such that
248 the diffusion of the polymer from the organic phase to the aqueous phase is reduced and
249 larger nanoparticles are formed. The incorporation of the alkaloid in polymer
250 nanoparticles produced a significant reduction ($p < 0.001$) in the nanoparticle size. In
251 this work, only for the ratio polymer to alkaloid of 10:1 (*i.e.*, samples NP 2 and NP 6)
252 was there no statistically significant change (Table 1).

253 Pitombeira et al. (2015) describe synthesis of nanoparticles using acetylated
254 cashew gum to incorporate indomethacin, and observed similar behavior to that found
255 in this study. The average diameter of the drug-free nanoparticles was 179 nm while for
256 those with the addition of the active ingredient 140 nm was found. Using the same
257 polymeric matrix, Dias et al. (2016) incorporated diclofenac diethylammonium and also
258 noted a reduction in the diameter of the incorporated nanoparticles compared to
259 nanoparticles without the addition of the active ingredient. In obtaining polymeric
260 nanoparticles as drug delivery platforms, the need for affinity between the polymer used
261 and the incorporated agent has been recognized as an important factor (Bilati,
262 Allémann, & Doelker, 2005).

263 The PDI, which is a measure of the polydispersity in sizes, was found to be
264 between 0.1 and 0.3 for all alkaloid proportions tested in this work. The zeta potential of
265 the nanoparticles with and without EPI were all negative, ranging from -17.4 to -31.6
266 mV (Table 1). According to the literature, 30 mV in modulus or greater suggest good
267 stability in suspension, since the surface charge reduces particle aggregation (Alvarado
268 et al., 2015.). The zeta potential of nanoparticles is influenced mainly by the nature of

269 the particle constituents (Huertas, Fessi & Elaissari, 2010). In this case, the negative
270 zeta potential is probably due to carboxyl groups present in cashew gum structure.

271 For four formulations (NP 2, NP 3, NP 6 and NP 7) the incorporation efficiency
272 (IE) exceeds 50%. A reduction in incorporation efficiency was observed, with
273 increasing amount of the active component in the formulation. This behavior was also
274 observed by Dias et al., (2016), when the amount of drug added during the synthesis
275 was increased. This result suggests that upon increasing the amount of alkaloid in the
276 nanoparticle, a saturation concentration of the drug in the polymeric matrix was
277 reached, reducing the amount of encapsulated drug (Gaete et al., 2007).

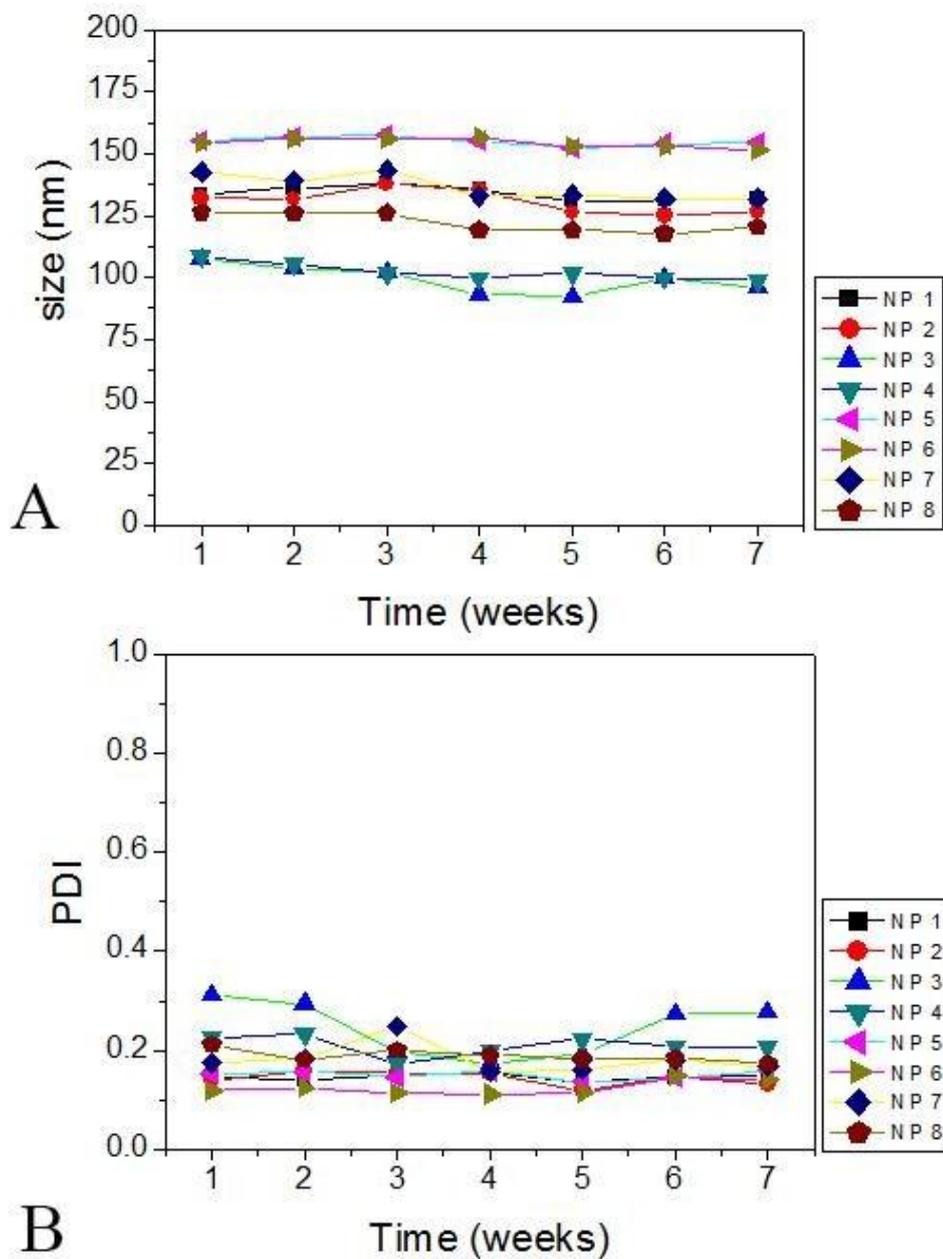
278 There are several factors that can influence the proportion of drug associated with
279 the polymer matrix in nanostructured systems, including the physical and chemical
280 characteristics of the formulation, such as pH, viscosity, etc., polymer structure, active
281 characteristics of the particle surface and the amount of drug added to the system
282 (Schaffazick et al., 2003).

283 Hornig, Bunjes & Heinze (2009), using dialysis for the synthesis of polymeric
284 nanoparticles, incorporated nonsteroidal anti-inflammatory drugs (ibuprofen and
285 naproxen), and evaluated the influence of the degree of substitution of the polymer used
286 (dextran) on the amount of drug incorporated. A 37 to 68.3% variation in the efficiency
287 of the system was observed depending on the degree of substitution achieved.

288 Fig. 3 shows data on size (Fig. 3A) and PDI (Fig. 3B) as a function of storage
289 time. The colloidal stability of the solutions can be affected by numerous factors such as
290 the adsorption of surface active molecules on the nanoparticle, the use of surfactant in
291 the synthesis of particle aggregation, chemical composition of the polymer and the drug,
292 and also premature release of the active component. Is it also important to assess the
293 visual aspect of the solutions that could indicate that advanced aggregation has occurred
294 (Huertas, Fessi & Elaissari, 2010). The nanoparticles showed good physical and
295 chemical stability and no macroscopic changes (creaming, sedimentation or
296 flocculation) were observed during the study period.

297 As shown in Fig. 3A there was very little particle size variation as a function of
298 storage time (over 7 weeks) indicating good stability of the formulations. Regarding the
299 PDI over time some greater variations in the proportions 5:1 (NP 3 and NP 7) for both
300 polymer concentrations. However they did not increase significantly, nor did they show
301 any specific trend in PDI value. This could be due to some dynamic
302 aggregation/deaggregation behaviour, i.e. a reversible process, unlikely to affect

303 medium-term storage. For the other drug to polymer ratios only mild changes in
 304 function of time was observed indicating good colloidal stability of these systems.
 305



306
 307 **Figure 3.** Hydrodynamic diameter (A) and polydispersity index (PDI; B), both measured by DLS,
 308 measured as a function of storage time after synthesis

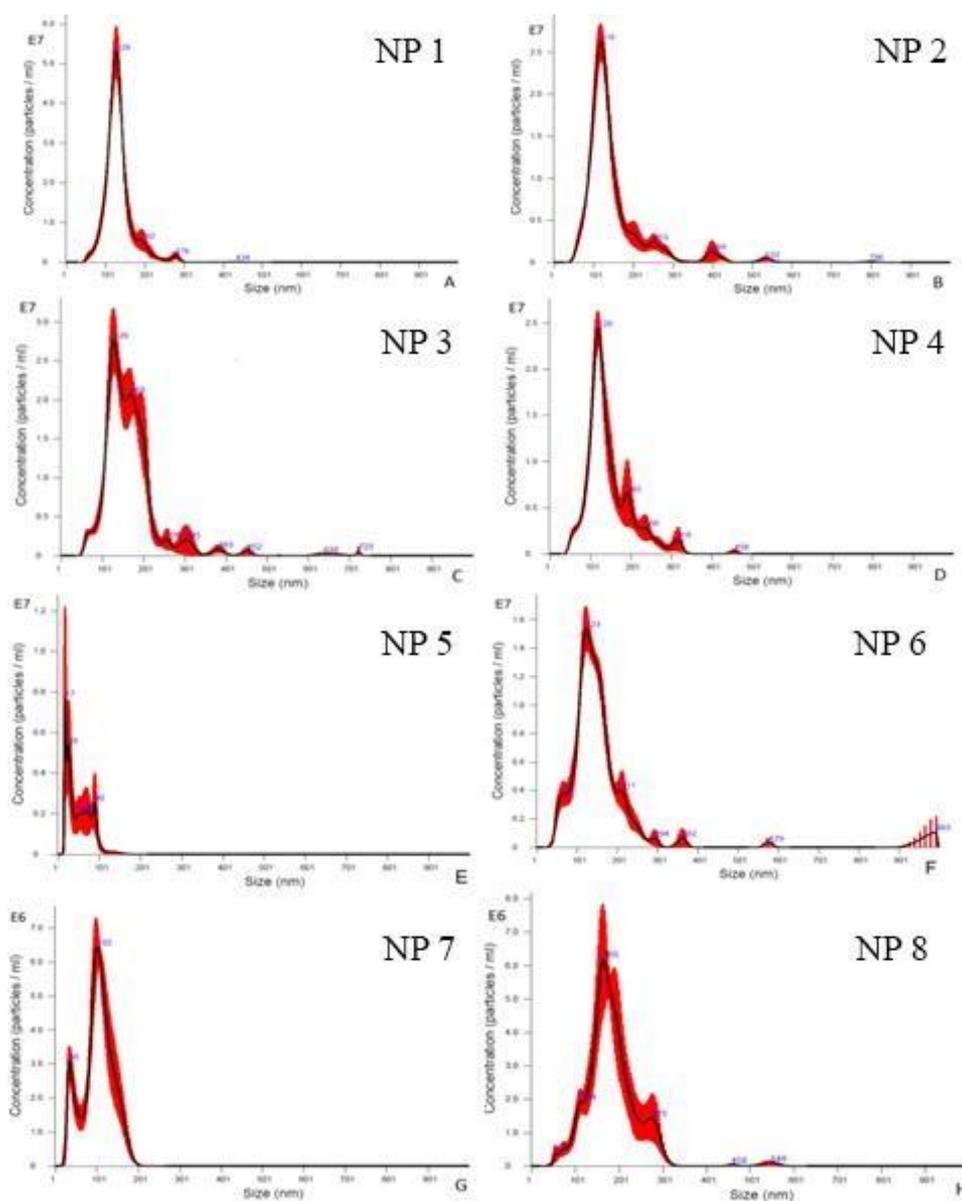
309

310 The samples were also characterized by NTA. The histogram in Fig. 4 shows a
 311 moderately polydisperse distribution, confirming the data obtained by DLS. In
 312 particular, the NTA seems to indicate that some of the polydispersity could be due to

313 small aggregates in solution, while the main size peak for each sample was quite
 314 narrow. Additionally, it was observed that the amount of polymer in the formulation
 315 could alter the particle concentration obtained. Oliveira et al. (2014) synthesize
 316 nanoparticles of chitosan and note that interference does not occur in the concentration
 317 with the addition of the bioactive.

318

319



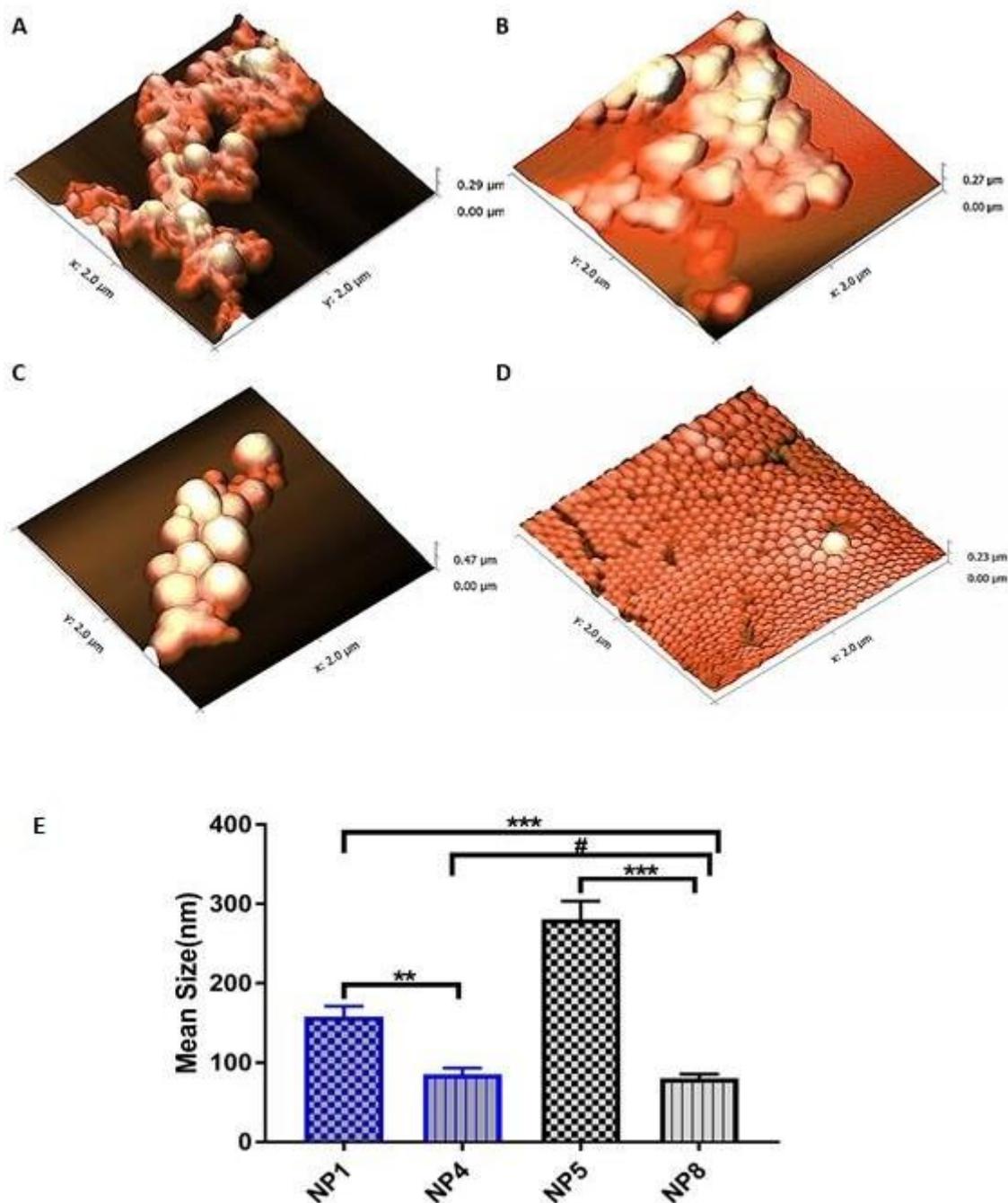
320

321 **Fig 4.** Quantitative particle size analysis by nanoparticle tracking analysis (NTA). Merged results for
 322 samples (A) NP 1 (Mode: 128.0 nm) (B) NP 2 (Mode: 118.9 nm), (C) NP 3 (Mode: 128.3 nm), (D) NP 4
 (Mode: 119.8 nm). (E) NP 5 (Mode: 17.3 nm;), (F) NP 6 (Mode: 123.4 nm;), (G) NP 7 (Mode: 101.6 nm), 324 (H)
 NP 8 (Mode: 165.3 nm)

325

326 Comparing the results obtained by DLS and NTA, differences ranging from 3.8 to
327 38.8% in the particle sizes were observed. The DLS technique provides the average
328 particle size by measuring fluctuations in the intensity of scattering and is commonly
329 affected by the presence of a small number of large particles. Combination of DLS the
330 nanoparticle tracking analysis has been recommended as it provides additional
331 information about the distribution of sizes in the samples (Talelli et al., 2010; Filipe
332 Hawe & Jiskoot, 2010).

333 The morphology aspects of representative nanoparticles (with and without EPI)
334 obtained with AFM measurements are shown in Fig. 5. As representative samples, NP
335 1, NP 4, NP 5 and NP 8 were chosen. These represent the nanoparticles with no drug,
336 and those with the most drug, in the two gum concentrations tested. The nanoparticles
337 surfaces were in general smooth, with no ridges. Kumar & Verma (2015) explain the
338 lack of surface roughness in polymeric nanoparticles by the elastic nature of the
339 polymer, which adapts to different shapes reducing conditions and possible surface
340 imperfections. In general, the nanoparticles were globular, approximately spherical in
341 shape. Those produced with the lower concentration had less spherical shape.



342

343 **Figure 5.** AFM height images of nanoparticles prepared by dialysis. (A) NP 1;(B) NP 4; (C) NP 5; (D)
 344 NP 8.

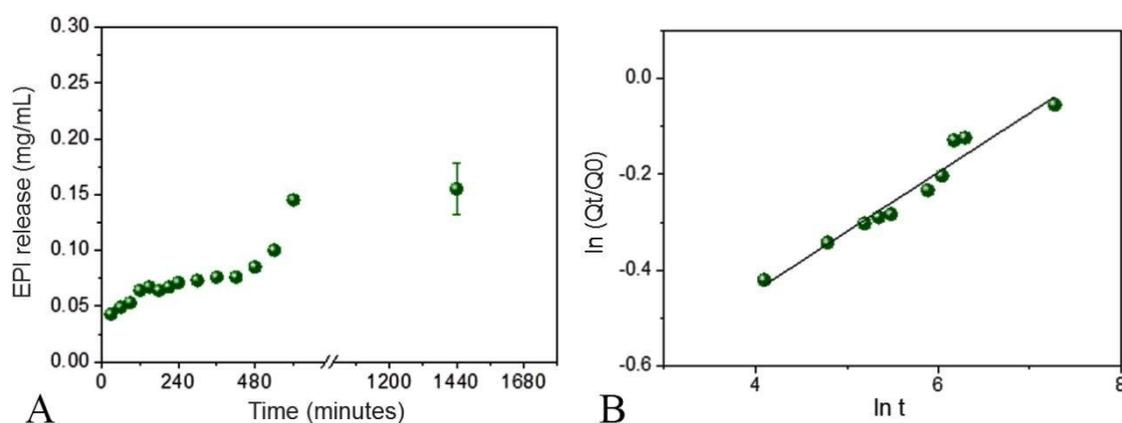
345

346 The drug-loaded particles produced with 0.1% acetylated cashew gum are the
 347 most irregular. While this result was seen in all the images obtained, it is not possible to
 348 rule out that this was an effect of the drying of the nanoparticles before imaging. The
 349 mean size of the nanoparticles was 158.1±13.0, 85.5±7.5, 280.7±22.7 and 80.4±5.0 for
 350 NP 1, NP 4, NP 5 and NP 8, respectively. Nanoparticles with EPI (NP 4 and NP 8) have

351 similar size and are smaller than the NPs without EPI (NP1 and NP5). The smaller
 352 particles in the latter case may be due to the formation of a more hydrophobic core
 353 leading to particle contraction (Pitombeira et al., 2015).

354 The drug release profile was analyzed by diffusion through a dialysis membrane
 355 in phosphate buffer. Fig. 6 shows the amount of alkaloid released versus time, wherein
 356 it can be seen that EPI has a slow and gradual release profile, with equilibration
 357 occurring after around 6 hours release. Numerous mathematical models of drug release
 358 were described in literature (Ahuja, Katare & Singh, 2007; Brazel & Peppas, 2000;
 359 Dash et al., 2010). The Korsmeyer-Peppas model (Dash et al., 2010) was applied to the
 360 ACG-EPI systems. The model is based on the power law. In the equation, the exponent
 361 “n” is a parameter that varies according to the system geometry and determines the
 362 release mechanism. If "n" is less than or equal to 0.5 the mechanism is said to be
 363 Fickian diffusion, while if it is between 0.5 and 1, non-Fickian diffusion is taking place
 364 (Korsmeyer et al., 1983).

365



366

367 **Figure 6.** *In vitro* drug release profile data from dialysis experiments for EPI from NP 8 nanoparticles.
 368 Data represents mean value of 3–4 replicates \pm standard deviation (A) Mechanism associated with *in vitro*
 369 release from NP 8, according to the Korsmeyer-Peppas model (B).

370

371 The diffusion exponent (n) was obtained from the linear coefficient of the graph
 372 plotted in Fig. 6, showing $\ln Mt / M_{\infty}$ versus $\ln t$ in the first 600 minutes of the release
 373 alkaloid. The value of "n" was found to be 0.37 for the release of EPI, suggesting that
 374 the mass transfer follows the Fickian diffusion model. According to Melo et al. (2010),
 375 porous release systems may have values < 0.5 because the process is a combination of
 376 the diffusion from the polymer matrix and the diffusion through the pores partially filled
 377 with water. This could corroborate the AFM results, where in some cases, collapse upon

378 drying occurred for drug-containing particles. Pitombeira et al. (2015) and Dias et al.
379 (2016) using the same polymeric matrix found "n" of 0.43 and 0.27, respectively, with
380 the same release profile, corroborating the results found in this study.

381

382

383 **4. Conclusion**

384

385 Nanoparticles made with acetylated cashew gum were shown to be viable drug
386 delivery vehicles. The incorporation of EPI was highly efficient. The nanoparticles
387 produced showed moderate polydispersity, and were found to be stable over time. The
388 release of this alkaloid drug took place of a period of hours, following a typically
389 Fickian diffusion mechanism. These nanoparticles show potential for the use as drug
390 delivery system, while studies on their potential anti-inflammatory action, as well as
391 toxicity and efficacy assays would need to be performed in the future to confirm their
392 suitability as drug delivery candidates.

393

394 **Acknowledgements**

395

396 This work was conducted in partnership with the Polymer Laboratory of the
397 Federal University of Ceará for polymer modification. The authors are grateful to
398 Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) for the fellowships
399 SFRH/BD/97995/2013 (AP) and SFRH/BD/95983/2013 (MPA), in the context of the
400 POCH program. The work at UCIBIO/REQUIMTE was supported by FCT through
401 project UID/MULTI/04378/2013 – POCI/01/0145/FEDER/007728 with financial
402 support from FCT/MCTES through national funds and co-financed by FEDER, under
403 the Partnership Agreement PT2020. The work at REQUIMTE/LAQV received financial
404 support from the European Union (FEDER funds through COMPETE) and National
405 Funds (FCT) through project UID/QUI/50006/2013. The authors also acknowledge
406 CNPq and CAPES for a scholarship and financial aid.

407

408 **References**

409

410 Ahuja, N., Katare, O. P., & Singh, B. 2007. Studies on dissolution enhancement and
411 mathematical modeling of drug release of a poorly water-soluble drug using water-

- 412 soluble carriers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 65(1), 26-
413 38.
- 414
- 415 Alvarado, H. L., Abrego, G., Garduño-Ramirez, M. L., Clares, B., Calpena, A. C., &
416 García, M. L., 2015. Design and optimization of oleanolic/ursolic acid-loaded
417 nanoplateforms for ocular anti-inflammatory applications. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 11(3), 521-530.
- 419
- 420 Araújo, T. S., Costa, D. S., Sousa, N. A., Souza, L. K., de Araújo, S., Oliveira, A. P.,
421 Oliveira, A. O., Sousa, F. B. M., Silva, D. A., Barbosa, A. L. R, Leite, J. R. S. A. &
422 Medeiros, J. V. R., 2015. Antidiarrheal activity of cashew gum, a complex
423 heteropolysaccharide extracted from exudate of *Anacardium occidentale* L. in rodents.
424 *Journal of Ethnopharmacology*, 174, 299-307.
- 425
- 426 Barbosa-Filho, J. M., Piuvezam, M. R., Moura, M. D., Silva, M. S., Lima, K. V. B., da-
427 Cunha, E. V. L., Fachine, I. M., & Takemura, O. S. 2006. Anti-inflammatory activity of
428 alkaloids: A twenty-century review. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16(1), 109-
429 139.
- 430
- 431 Bilati, U., Allémann, E., & Doelker, E., 2005. Development of a nanoprecipitation
432 method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *European*
433 *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 24(1), 67-75.
- 434
- 435 Brazel, C. S., & Peppas, N. A., 2000. Modeling of drug release from swellable
436 polymers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 49(1), 47-58.
- 437
- 438 Carvalho, N. S., Silva, M. M., Silva, R. O., Nicolau, L. A., Sousa, F. B. M., Damasceno,
439 S. R., Silva, D. A., Barbosa, A. L. R, Leite, J. R. S. A. & Medeiros, J. V. R., 2015.
440 Gastroprotective Properties of Cashew Gum, a Complex Heteropolysaccharide of
441 *Anacardium occidentale*, in Naproxen-Induced Gastrointestinal Damage in Rats. *Drug*
442 *Development Research*, 76(3), 143-151.
- 443
- 444 Castilhos, T. S., Giordani, R. B., Henriques, A. T., Menezes, F. S., & Zuanazzi, J. Â. S.,
445 2007. In vitro evaluation of the antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial

- 446 activities of the montanine alkaloid. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17(2), 209-
447 214.
- 448
- 449 Dash, S., Murthy, P. N., Nath, L., & Chowdhury, P., 2010. Kinetic modeling on drug
450 release from controlled drug delivery systems. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 67(3),
451 217-23.
- 452
- 453 De Paula, R. C. M., & Rodrigues, J. F., 1995. Composition and rheological properties of
454 cashew tree gum, the exudate polysaccharide from *Anacardium occidentale* L.
455 *Carbohydrate Polymers*, 26(3), 177-181.
- 456
- 457 Dias, S. F. L., Nogueira, S. S., de França Dourado, F., Guimarães, M. A., de Oliveira
458 Pitombeira, N. A., Gobbo, G. G., Primo, F. L., De Paula, R. C. M., Feitosa, J. P. A.,
459 2016. Acetylated Cashew Gum-based Nanoparticles for Transdermal Delivery of
460 Diclofenac Diethyl Amine. *Carbohydrate Polymers*, 143(5), 254–261.
- 461
- 462 Dutra, R. C., Campos, M. M., Santos, A. R. S., Calixto, J. B., 2016. Medicinal plants in
463 Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives.
464 *Pharmacological Research*, 112, 4-29. .
- 465
- 466 Filipe, V., Hawe, A., & Jiskoot, W., 2010. Critical evaluation of Nanoparticle Tracking
467 Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein
468 aggregates. *Pharmaceutical Research*, 27(5), 796-810.
- 469
- 470 Gaete, C. G, Tsapis, N., Besnard, M., Bochot, A., & Fattal, E., 2007. Encapsulation of
471 dexamethasone into biodegradable polymeric nanoparticles. *International Journal of*
472 *Pharmaceutics*, 331(2), 153-159.
- 473
- 474 Galindo-Rodriguez, S., Allémann, E., Fessi, H., & Doelker, E., 2004. Physicochemical
475 parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-
476 diffusion, and nanoprecipitation methods. *Pharmaceutical Research*, 21(8), 1428-1439.
- 477

- 478 Gaumet, M., Vargas, A., Gurny, R., & Delie, F., 2008. Nanoparticles for drug delivery:
479 the need for precision in reporting particle size parameters. *European Journal of*
480 *Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 69(1), 1-9.
481
- 482 Guimarães, M. A., Campelo, Y. D. M., Veras, L. M. C., Colhone, M. C., Lima, D. F.,
483 Ciancaglini, P., Kuckelhaus, S. A. S., Lima, F. C. A., Moraes, J., Leite, J. R. S. A.,
484 2014. Nanopharmaceutical Approach of Epiisopiloturine Alkaloid Carried in Liposome
485 System: Preparation and In Vitro Schistosomicidal Activity. *Journal of Nanoscience and*
486 *Nanotechnology (Print)*, 14, 4519-4528
487
- 488 Hornig, S., & Heinze, T., 2008. Efficient approach to design stable water-dispersible
489 nanoparticles of hydrophobic cellulose esters. *Biomacromolecules*, 9(5), 1487-1492.
490
- 491 Hornig, S., Bunjes, H., & Heinze, T., 2009. Preparation and characterization of
492 nanoparticles based on dextran–drug conjugates. *Journal of Colloid and Interface*
493 *Science*, 338(1), 56-62.
494
- 495 Huertas, C. E., Fessi, H., & Elaissari, A., 2010. Polymer-based nanocapsules for drug
496 delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 385(1), 113-142.
497
- 498 Letchford, K., Burt, H., 2007. A review of the formation and classification of
499 amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres,
500 nanocapsules and polymersomes. *European journal of pharmaceutics and*
501 *biopharmaceutics*, 65(3), 259-269.
502
- 503 Korsmeyer, R. W., Gurny, R., Doelker, E., Buri, P., & Peppas, N. A., 1983.
504 Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *International Journal*
505 *of Pharmaceutics*, 15(1), 25-35.
506
- 507 Kumar, B. S., Kumar, M. G., Suguna, L., Sastry, T. P., & Mandal, A. B., 2012. Pullulan
508 acetate nanoparticles based delivery system for hydrophobic drug. *Int. J. Pharma Biol.*
509 *Sci*, 3, 24-32.
510

- 511 Li, Q., Yang, K. X., Zhao, Y. L., Qin, X. J., Yang, X. W., Liu, L., Liu, Y. P., & Luo, X.
512 D., 2016. Potent anti-inflammatory and analgesic steroidal alkaloids from *Veratrum*
513 *taliense*. *Journal of Ethnopharmacology*, 179, 274-279.
- 514
- 515 Marinelli, A. L., Monteiro, M. R., Ambrósio, J. D., Branciforti, M. C., Kobayashi, M. &
516 Nobre, A. D., 2008. Desenvolvimento de compósitos poliméricos com fibras vegetais
517 Naturais da biodiversidade: uma contribuição para a sustentabilidade Amazônica.
518 *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 18(2), 92-99.
- 519
- 520 Melo, N. F. S. D., Grillo, R., Fraceto, L. F., Dias Filho, N. L., Paula, E. D., Araújo, D.
521 R. D., & Rosa, A. H., 2010. Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas de poli
522 (L-lactídeo) contendo benzocaína. *Química Nova*, 33(1), 65-69.
- 523
- 524 Mestres, G., Kugiejko, K., Pastorino, D., Unosson, J., Öhman, C., Ott, M. K., Ginebra,
525 M. P., & Persson, C., 2016. Changes in the drug release pattern of fresh and set
526 simvastatin-loaded brushite cement. *Materials Science and Engineering: C*, 58, 88-96.
- 527
- 528 Miladi K., Sfar S., Fessi H., Elaissari A., 2015. Enhancement of alendronate
529 encapsulation in chitosan nanoparticles, *Journal of Drug Delivery Science and*
530 *Technology* 30, 391-396.
- 531
- 532 Mothé, C. G., De Souza, I. A., & Calazans, G. M., 2008. Antitumor activity of cashew
533 gum from *Anacardium occidentale* L. *Agro Food Industry Hi-Tech*, 19(6), 50-52.
- 534
- 535 Na, K., Lee, T. B., Park, K. H., Shin, E. K., Lee, Y. B., & Choi, H. K., 2003. Self-
536 assembled nanoparticles of hydrophobically-modified polysaccharide bearing vitamin H
537 as a targeted anti-cancer drug delivery system. *European Journal of Pharmaceutical*
538 *Sciences*, 18(2), 165-173.
- 539 nanoparticles
- 540 Oliveira, J. L.; Campos, E. V. R.; da Silva, C. M. G.; Pasquoto, T.; Lima, R and Fraceto,
541 L. F., 2014. Solid lipid nanoparticles Co-loaded with Simazine and Atrazine:
542 Preparation, Characterization, and Evaluation of Herbicidal Activit. *Journal of*
543 *Agricultural and Food Chemistry*, 63, 422-432.
- 544

- 545 Özçelik, B., Kartal, M., & Orhan, I., 2011. Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial
546 activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. *Pharmaceutical Biology*, 49(4),
547 396-402.
548
- 549 Park, W., Park, S. J., Na, K., 2010. Potential of self-organizing nanogel with acetylated
550 chondroitin sulfate as an anti-cancer drug carrier. *Colloids and Surfaces B:
551 Biointerfaces*, 79(2), 501-508.
552
- 553 Pervez, S., Khan, H., & Khan, A., 2016. Plant alkaloids as an emerging therapeutic
554 alternative for the treatment of depression. *Frontiers in Pharmacology*, 7, 28.
555
- 556 Pinto, A. C., Silva, D. H. S., Bolzani, V. S., Lopes, N. P & Epifanio, R. A., 2002.
557 Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Quimica Nova*, 25(1), 45-61.
558
- 559 Pitombeira, N. A., Neto, J. G. V., Silva, D. A., Feitosa, J. P., Paula, H. C., & de Paula,
560 R. C., 2015. Self-assembled nanoparticles of acetylated cashew gum: Characterization
561 and evaluation as potential drug carrier. *Carbohydrate Polymers*, 117, 610-615.
562
- 563 Rodrigues, A. S., Andelman, S. J., Bakarr, M. I., Boitani, L., Brooks, T. M., Cowling,
564 R. M., Fishpool, L. D. C., Fonseca, G. A. B., Gaston, K. J., Hoffmann, M., Long, J. S,
565 Marquet, P. A., Pilgrim, J. D., Pressey, R. L., Schipper, J., Sechrest, W., Stuart, S. N.,
566 Underfill, L. G., Waller, R. W., Watts, M. E. J & Yan, X., 2004. Effectiveness of the
567 global protected area network in representing species diversity. *Nature*, 428(6983), 640-
568 643.
569
- 570 Severino, P., Santana, M. H. A., Malmonge, S. M., & Souto, E. B., 2011. Polímeros
571 usados como sistemas de transporte de princípios ativos. *Polímeros*, 21(5), 361-368.
572
- 573 Schaffazick, S. R., Guterres, S. S., Freitas, L. D. L., & Pohlmann, A. R., 2003.
574 Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados
575 para administração de fármacos. *Química Nova*, 26(5), 726-737.
576
- 577 Silva, V. G., Silva, R. O., Amasceno, S., Carvalho, N. S., Rodrigues, S., Aragão,
578 K. S., Guimarães, M. A., Campos, S. A., Veras, L. M., Godejohann, M., Leite, J. R. S.

579 A, Barbosa, A. L. R. & Medeiros, J. V. R., 2013. Anti-inflammatory and
580 antinociceptive activity of epiisopiloturine, an imidazole alkaloid isolated from
581 *Pilocarpus microphyllus*. *Journal of Natural Products*, 76(6), 1071-1077.

582

583 Talelli, M., Iman, M., Varkouhi, A. K., Rijcken, C. J., Schiffelers, R. M., Etrych,
584 Ulbrich, K., Nostrum, C. F. V., Lammers, T., Storm, G., & Hennink, W. E., 2010. Core-
585 crosslinked polymeric micelles with controlled release of covalently entrapped
586 doxorubicin. *Biomaterials*, 31(30), 7797-7804.

587

588 Torquato, D. S., Ferreira, M. L., Sá, G. C., Brito, E. S., Pinto, G. A. S., & Azevedo, E.
589 H. F., 2004. Evaluation of antimicrobial activity of cashew tree gum. *World Journal of*
590 *Microbiology and Biotechnology*, 20(5), 505-507.

591

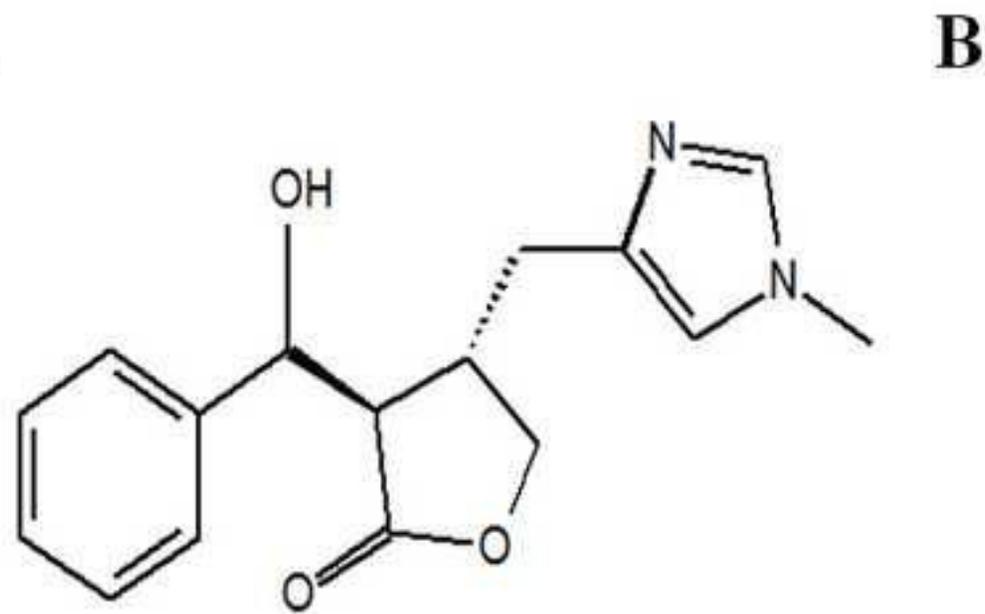
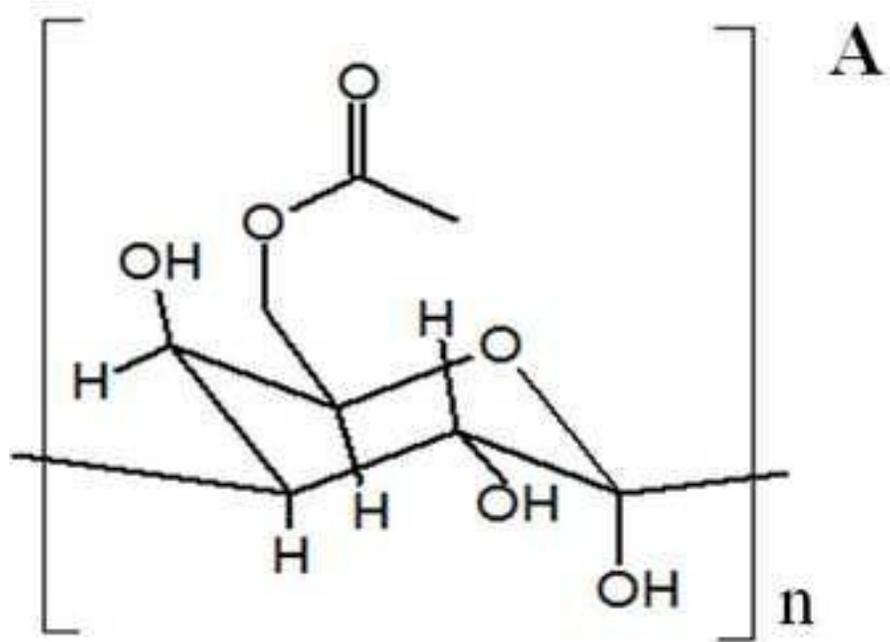
592 Veras, M. L., Guimaraes, A. M., Campelo, D. Y., Vieira, M. M., Nascimento, C., Lima,
593 Vasconcelos, L., Nakano, E., Kuckelhaus, S., Batista, M., Leite, J. & Moraes, J., 2012.
594 Activity of epiisopiloturine against *Schistosoma mansoni*. *Current Medicinal*
595 *Chemistry*, 19(13), 2051-2058.

596

597 Veras, L. M. C., Cunha, V. R. R., Lima, F. C. D. A., Guimarães, M. A., Vieira, M. M.,
598 Campelo, Y. D. M., Sakai, V.Y., Lima, D. F., Carvalho-Jr, P.S., Ellena, J.A., Silva, P.
599 R. P., Vasconcelos, L., Godejohann, M., Petrilli, H.M., Constantino, V. R. L., 600
601 Mascarenhas, Y. P., Leite, J.R.S.A.. 2013. Industrial Scale Isolation, Structural and
602 Spectroscopic Characterization of Epiisopiloturine from *Pilocarpus microphyllus* Stapf
Leaves: A Promising Alkaloid against Schistosomiasis. *Plos One*, 8, e66702.

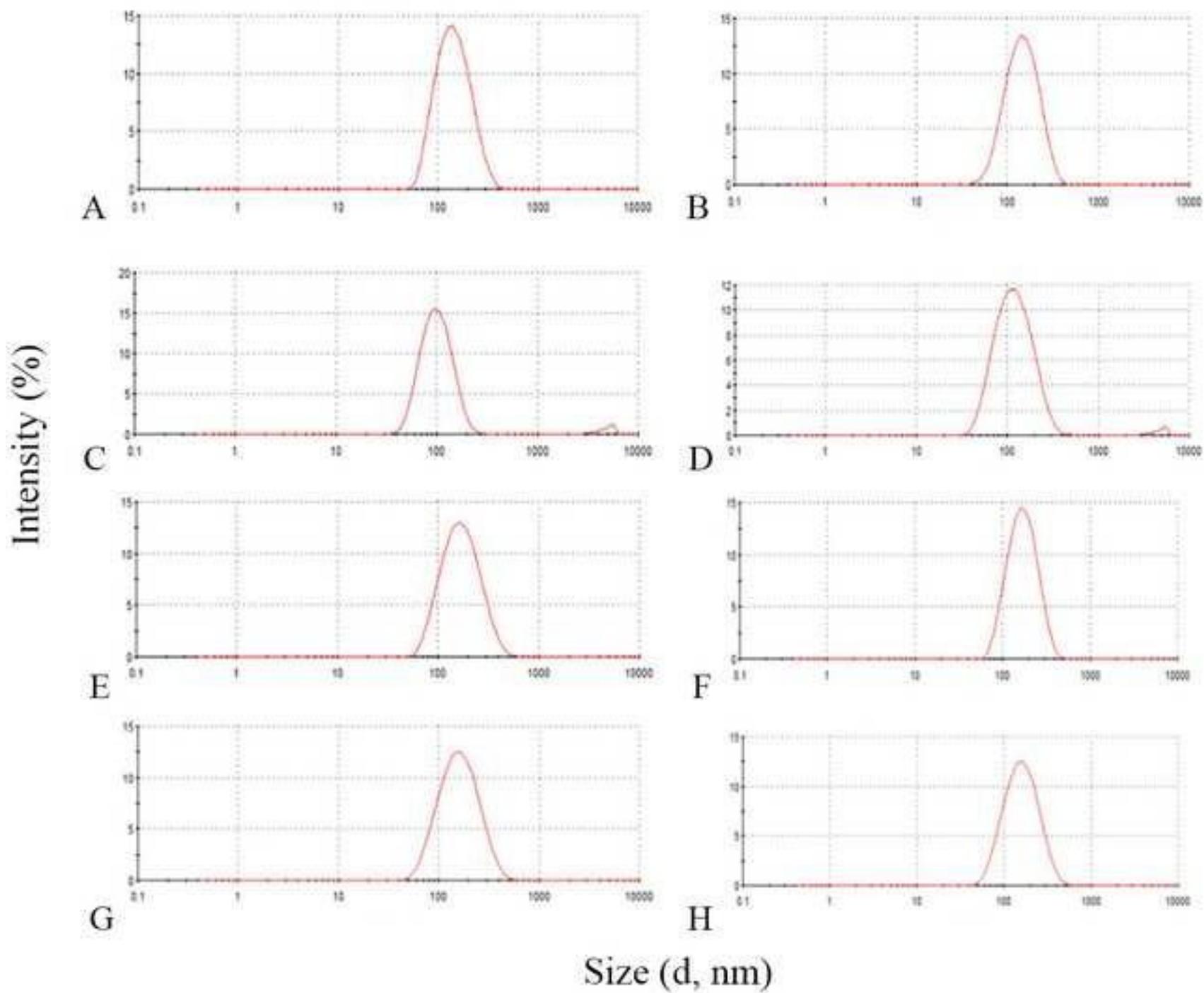
Table 1. Size, particle concentration as prepared, polydispersity index (PDI), zeta potential (ZP) (mean), incorporated quantity drug load (IQ), and incorporation efficiency (IE), of nanoparticles prepared using different polysaccharide concentrations and polysaccharide to drug ratios.

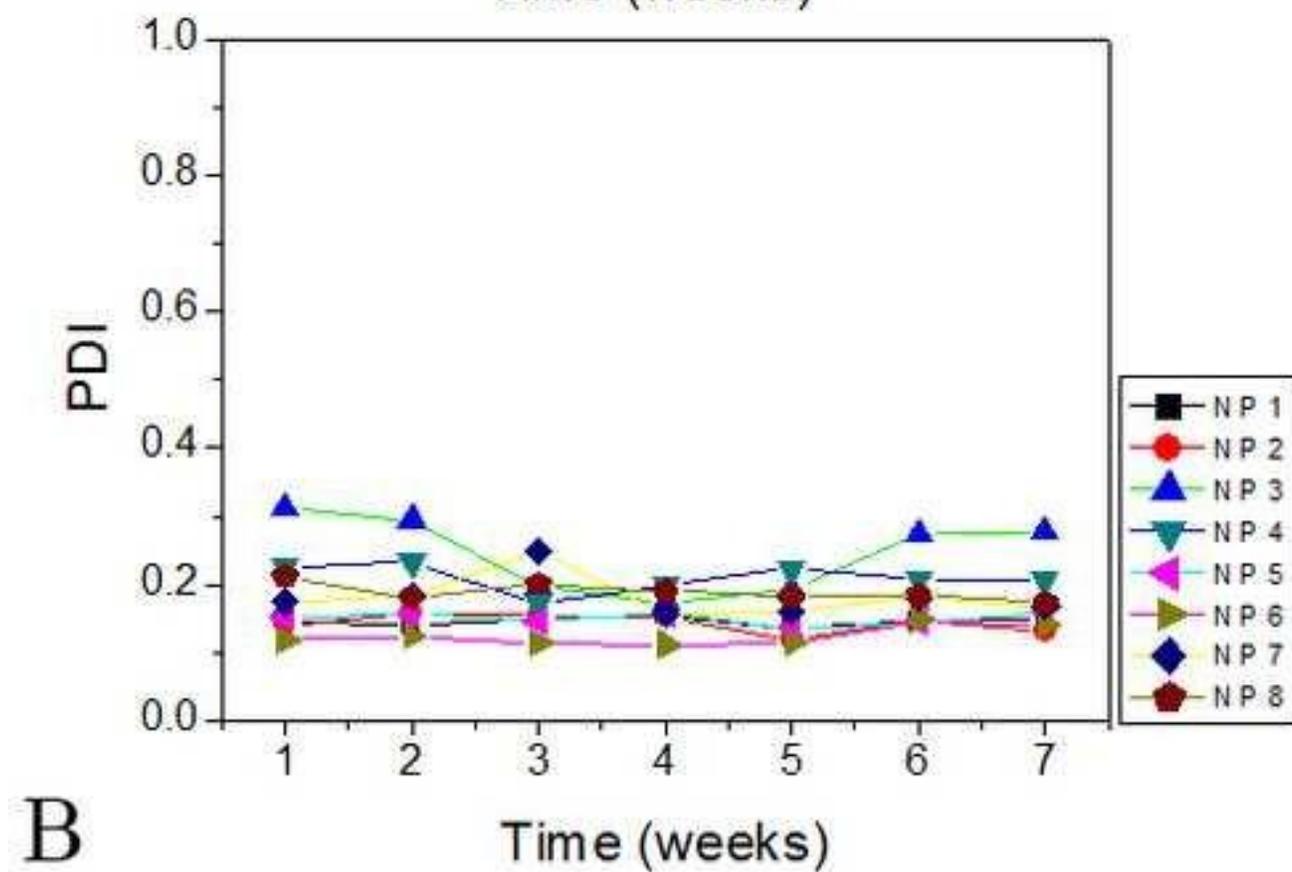
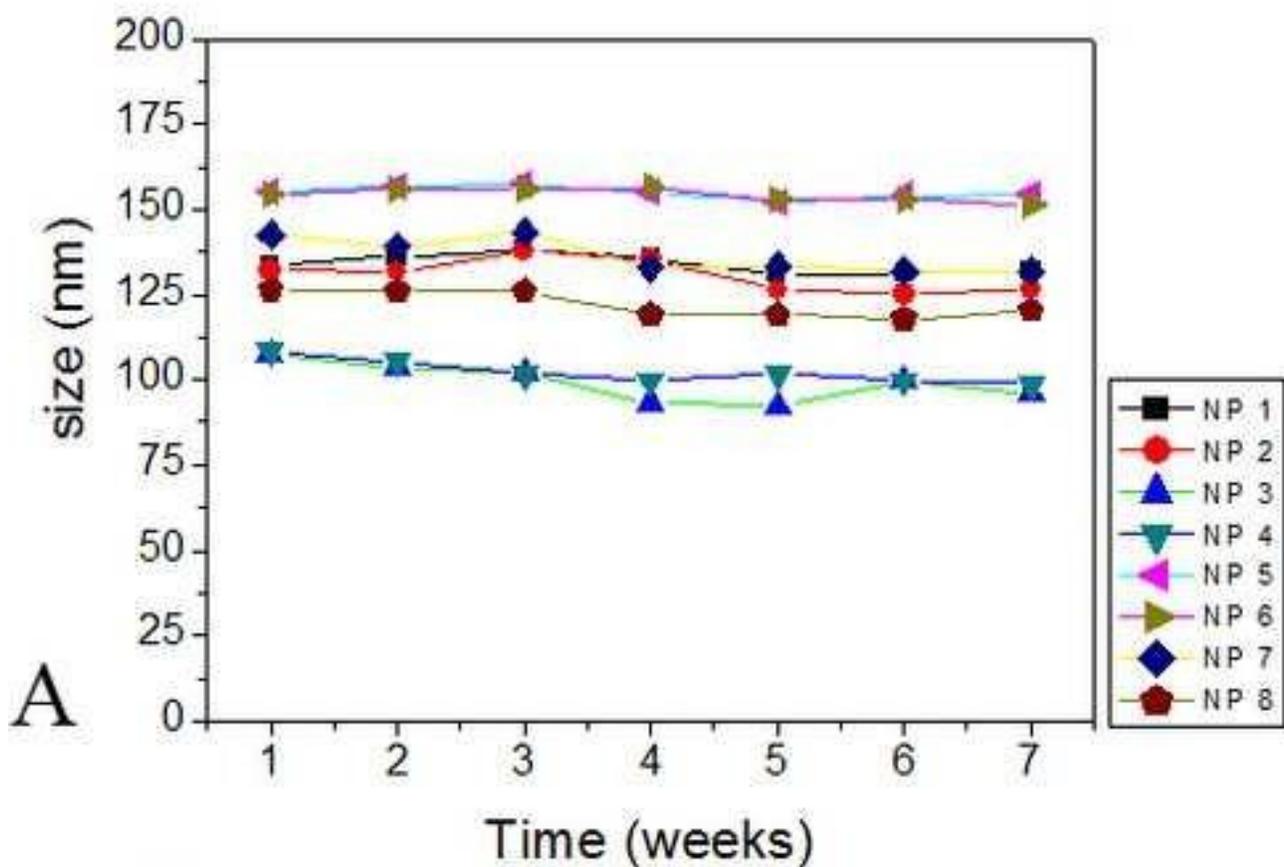
Sample	ACG (%)	ACG:EPI	Size ^a (nm)	Size ^b (nm)	PDI	ξ potential (mv)	IQ (%)	IE (%)
NP 1	0.05	-	126.0	133.7	0.148	-32.6	-	-
NP 2		10:1	127.1	132.0	0.140	-26.7	5.4	59.8
NP 3		5:1	148.6	107.4	0.320*	-20.0	8.8	52.9
NP 4		2:1	129.1	108.6	0.226*	-17.4	16.0	48.1
NP 5	0.10	-	135.5	155.1	0.153	-26.9	-	-
NP 6		10:1	132.6	154.4	0.120	-30.6	6.9	76.6
NP 7		5:1	101.6	142.7	0.175*	-23.1	10.2	61.2
NP 8		2:1	165.6	126.2	0.212*	-25.1	10.7	32.2



Figure(s)

[Click here to download high resolution image](#)





Figure(s)
[Click here to download high resolution image](#)

