

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO

1.1 Nanopartículas e liberação de fármacos	4
1.2 Nanopartículas à base de polissacarídeos.....	11
1.2.1 Nanopartículas de polissacarídeo por reticulação iônica	14
1.2.2 Nanopartículas de polissacarídeo por reticulação covalente.....	15
1.2.3 Copolimerização por Enxertia	16
1.2.4 Nanopartículas por autoformação ou autoagregação.....	19
1.2.5 Polimerização por emulsão	20
1.2.6 Complexação polieletrólítica (CPEs)	22
1.3 Caracterização de nanopartículas	24
1.3.1 Microscopia de força atômica (AFM)	26
1.3.2 Caracterização por tamanho de partícula.....	29
1.3.2.1 Distribuição por intensidade, volume e número.....	36
1.3.3 O Potencial Zeta.....	40
1.4 A malária.....	43
1.4.1 Cloroquina.....	46
1.5 Polímeros naturais.....	47
1.5.1 Angico.....	47
1.5.2 Quitosana.....	48

2 OBJETIVOS E METAS

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Síntese de nanopartículas por complexação polieletrólítica.....	51
3.1.2 Incorporação de cloroquina.....	51
3.1.3 Ensaio de liberação <i>in vitro</i>	52
3.2 Síntese de nanopartículas por enxertia de ácido acrílico	52
3.2.1 Incorporação de albumina sérica bovina.....	54
3.2.2 Teste de liberação <i>in vitro</i>	55
3.3 Caracterização dos produtos formados.....	55
3.3.1 Infravermelho.....	55
3.3.2 Análise do tamanho da partícula e potencial zeta.....	55
3.3.3 Análise morfológica por AFM.....	56

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Formação de nanopartículas de goma do angico e quitosana por CPE	57
4.1.1 Análise de Infravermelho.....	58
4.1.2 Avaliação dos parâmetros que influenciam o tamanho das nanopartículas GAQT	59
4.1.2.1 Efeito da concentração	59
4.1.2.2 Efeito da massa molar de quitosana e ordem de adição.....	63
4.1.2.3 Estudo de Polidispersividade (PDI)	65
4.1.2.4 Estudo da estabilidade dos CPEs com o tempo.....	66
4.1.3 Potencial Zeta	68
4.1.4 Análise morfológica dos CPEs de GAQT	70
4.2 Formação de nanopartículas por CPE entre QT e CMA.....	72
4.2.1 Análise de Infravermelho.....	73
4.2.2 Avaliação dos parâmetros que influenciam o tamanho das nanopartículas de CMAQT	76
4.2.2.1 Efeito da massa molar de quitosana nos complexos de CMAQT	76
4.2.2.2 Efeito do grau de substituição.....	77
4.2.2.3 Efeito da ordem de adição.....	78
4.2.2.4 Estudo de polidispersividade.....	81
4.2.2.5 Estudo de estabilidade com o tempo.....	83
4.2.2.6 Estudo de potencial zeta.....	86
4.2.2.7 Mecanismos de formação do CPE de CMAQT.....	88
4.2.2.8 Liberação de cloroquina.....	90
4.3 Síntese de nanopartículas à base de angico enxertado com ácido acrílico.....	93
4.3.1 Caracterização por Infravermelho.....	93

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

4.3.2 Caracterização por tamanho de partícula	95
4.3.3 Efeito do pH.....	97
4.3.4 Efeito de secagem.....	99
4.3.5 Estudo de liberação de BSA	100
CONCLUSÃO	103
REFERÊNCIAS.....	105

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Região do domínio da nanotecnologia	4
Figura 2. Curva de concentração plasmática em função do tempo.....	7
Figura 3. Representação física de nanocápsulas e nanoesferas	9
Figura 4. Formas de liberação do ativo.....	10
Figura 5. Estrutura esquemática da molécula do tripolifosfato.....	14
Figura 6. Representação molecular do glutaraldeído e demais agentes de condensação.	15
Figura 7. Mecanismo da reação de enxertia.	17
Figura 8. Esquema da preparação PAA-PS.....	18
Figura 9. Encapsulamento de partículas pelo mecanismo de polimerização por emulsão.....	20
Figura 10. Tipos de agregação de um CEP.....	23
Figura 11. Representação molecular de polímeros aniônicos.....	24
Figura 12. Diagrama representativo de funcionamento do AFM.....	27
Figura 13. Gráfico do potencial Lennard-Jones que descreve o modo intermitente.....	29
Figura 14. Esfera equivalente de um cilindro de altura de 100 microns	30
Figura 15. Diferentes medidas de tamanho de partícula um grão de areia.....	31
Figura 16. Esquema da luz espalhada pelas partículas do zeta sizer	32
Figura 17. Sinais de correlação que o equipamento zetasizer.....	35
Figura 18. Gráficos da distribuição por número, volume e intensidade	37
Figura 19. Esquema de uma partícula coloidal.....	42
Figura 20. Ciclo de vida do parasita da malária humana	44
Figura 21. Representação estrutural da molécula de cloroquina.....	46
Figura 22. Estutura representacional de Haword da quitosana totalmente desacetilada (1) e quitina (2) ..	49
Figura 23. Espectro de infravermelho para GA, Qta e do CEP de GAQTa.....	58
Figura 24. Diâmetro hidrodinâmico em função da concentração de GA e QTa.....	61
Figura 25. Efeito da MM de QT e ordem de adição para CPEs.....	64
Figura 26. Valores de IPD para CPEs de QTa e QTb.	65
Figura 27. Estabilidade dos CPEs com o tempo de armazenamento	67
Figura 28. Potencial zeta para os CPEs de GAQT e QTGA.....	68
Figura 29. Valores de potencial zeta para os CPEs formados.....	69
Figura 30. AFM do CPE de GAQT.....	71
Figura 31. Espectros de IV para QTa, CMA0,63, CQ e CPE	73
Figura 32. Representação estrutural de Haword para os polissacarídeos e CQ.....	74
Figura 33. Efeito da massa molar de quitosana para complexos CMAQT.....	76
Figura 34. Grau de substituição na formação dos CPEs.....	77
Figura 35. Inversão da ordem de adição na formação dos CPEs de CMAQT.....	79
Figura 36. Índice de polidispersão para os complexos polieletrólíticos.	81
Figura 37. Estudo de estabilidade com o tempo,MM de QT e GS0,20.....	83
Figura 38. Estudo de estabilidade com o tempo, MM de QT e GS0,63.	84
Figura 39. Curvas de potencial zeta	86
Figura 40. Mecanismos de formação da nanopartícula.	88
Figura 41. Curvas de liberação de cloroquina em água e tampão fosfato	90
Figura 42. Gráfico de $\log M_t/M_\infty$ versus $\log t$ para liberação da cloroquina.....	92
Figura 43. Espectros de Infravermelho do angico e nanopartículas.....	94
Figura 44. Diâmetro dos polímeros precursores e da nanopartícula NPGA1b.....	95
Figura 45. Diâmetro das nanopartículas após secas e dispersadas em água.	95
Figura 46. Influência do pH nos diâmetros das nanopartículas de NPGA1b.....	98
Figura 47. Ensaio de liberação <i>in vitro</i> de BSA em tampão 7,4.	100
Figura 48. Gráfico de $\log (M_t/M_\infty)$ versus $\log t$ para liberação de BSA.....	101

1.1 Nanopartículas e liberação de fármacos

Nanociência é o estudo e o conhecimento das técnicas para produção de nanopartículas e a nanotecnologia consiste na aplicação desses conhecimentos para construção de novos materiais em escala industrial. Ela está relacionada a diversas áreas do conhecimento humano (física, medicina, engenharia, eletrônica e informática). O domínio da nanotecnologia encontra-se compreendido entre 1 a 100 nanômetros ("Nano" é um prefixo grego "nânos" que significa "anão") [WILSON *et al.*, 2004; CNPq, 2002]. A Figura 1 apresenta uma escala que abrange desde macroestruturas até dimensões subatômicas.

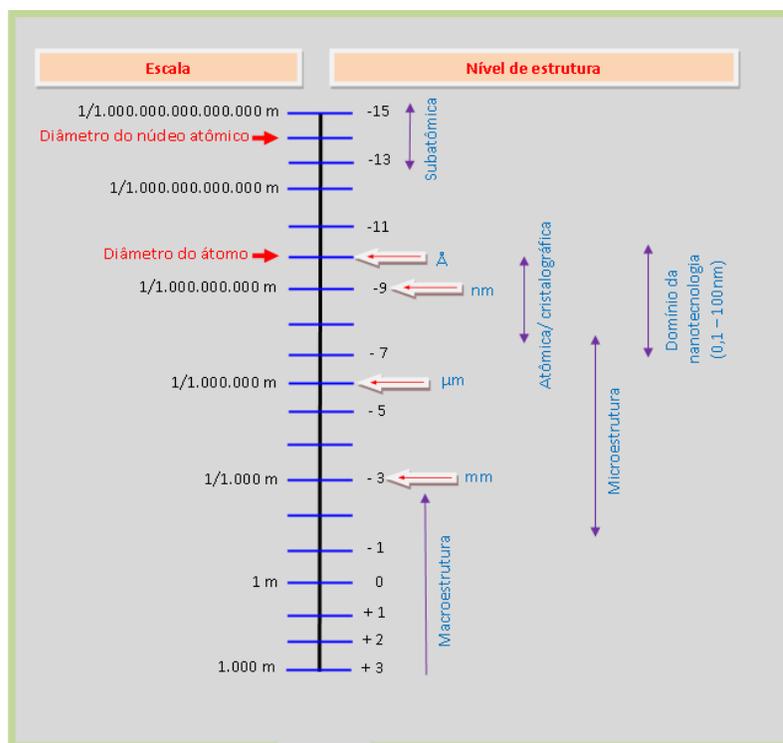


Figura 1. Região do domínio da nanotecnologia comparada com uma faixa que compreende desde macroestruturas até dimensões subatômicas (escala logarítmica) [MEDEIROS, PATERNO e MATTOSO, 2005].

A nanociência não é nova, pois os químicos já sintetizavam polímeros a partir dos monômeros (unidades nanoescalares) há décadas, porém o ano de referência para o nascimento da nanociência e da nanotecnologia é o de 1959, ano

em que o físico Richard Feynman proferiu, na Reunião Anual da *American Physical Society*, a palestra "Há mais espaços lá embaixo". Feynman anunciava ser possível condensar, na cabeça de um alfinete, as páginas dos 24 volumes da Enciclopédia Britânica para afirmar que muitas descobertas se fariam com a fabricação de materiais em escala atômica e molecular. Só em 1974, o cientista Norio Taniguchi atribui o termo nanotecnologia ao campo da engenharia em escala submicrométrica [LANE, CRAIG e BABCOCK, 2002].

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

A partir de então, o interesse dos pesquisadores por essas nanoestruturas aumentou exponencialmente devido à possibilidade de aplicação na área da saúde. Na indústria farmacêutica, no que se refere à nanopartículas, o grande objetivo é utilizá-las como carreadores de fármacos. Muitos polímeros têm sido examinados para produção de nanopartículas, inclusive polímeros naturais [SOPPIMATH *et al.*, 2001; VAUTHIER *et al.*, 2003; SANKALIA *et al.*, 2007; YINSONG *et al.*, 2007; CHAYED e WINNIK, 2007; THOREK e TSOURKAS, 2008; TIRAFFERRI *et al.*, 2008; GAO *et al.*, 2008; HU *et al.*, 2008; KHOEE *et al.*, 2009; NAIDU *et al.*, 2009; AVADI *et al.*, 2010].

O estudo de liberação de fármacos consiste em delinear um sistema de liberação ideal, onde a concentração terapêutica do fármaco requerida seja atingida de modo imediato, no local de ação e depois mantida constante durante o tempo previsto de tratamento, reduzindo o número de doses e os efeitos colaterais. Com isso surgiram várias definições [ALLEN e POPOVICH, 2007]:

•**Liberação retardada:** indica que o fármaco não é liberado imediatamente após a administração, mas um tempo depois, por exemplo, comprimidos com revestimento entérico e cápsulas de liberação pulsátil.

•**Liberação repetida:** indica que uma dose individual é liberada regularmente logo após a administração, e uma segunda ou terceira doses são subsequentemente liberadas, em intervalos intermitentes.

•**Liberação prolongada:** indica que o fármaco é disponibilizado para absorção por um período de tempo mais prolongado do que a partir de uma forma farmacêutica convencional. Entretanto, fica implícito que o início da ação é retardado, por causa da velocidade de liberação global mais lenta a partir da forma farmacêutica.

•**Liberação controlada:** refere-se a formas farmacêuticas que liberam o fármaco em uma velocidade constante e fornecem concentrações plasmáticas que permanecem invariáveis com o tempo.

Outras denominações como liberação sustentada, estendida e modificada é encontrada na literatura, contudo todas elas possuem o mesmo objetivo, fazer com que o fármaco liberado fique em concentrações plasmáticas dentro da faixa terapêutica [AULTON, 2008].

Outros motivos para o uso da liberação modificada de fármacos é que a maioria deles tem um perfil de solubilização, degradação dependente do pH. O procedimento de síntese e incorporação deve ser rigorosamente controlado de maneira que minimize esta degradação. OPPENHEIM *et al.*, [1981] observaram que se o fármaco degrada em meio aquoso, o tempo de contato com a água influenciará na quantidade de fármaco incorporado. Certos fármacos citotóxicos são sensíveis à luz, então o procedimento deve ser conduzido com o mínimo de luz possível. Como o sistema de liberação controlada envolve fármaco e matriz polimérica, o mesmo cuidado deve ser dado na produção dos carreadores, como estabilidade global dessas preparações, e também a eventual saída do fármaco incorporado durante o armazenamento das nanopartículas [MAGNEHEIM e BENITA, 1991; SOPPIMATH *et al.*,

2001; MÜLLER *et al.*, 2000; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003b; GUTERRES *et al.*, 1995]. Observa-se na Figura 2 que na forma farmacêutica por liberação controlada, o paciente recebe uma quantidade menor de fármaco, como também reduzindo os efeitos colaterais.

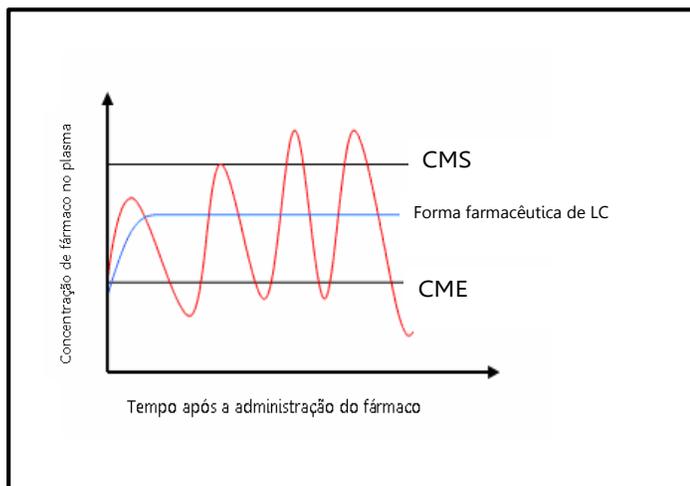


Figura 2. Curva de concentração plasmática em função do tempo, obtida após a administração peroral de (a) uma forma farmacêutica convencional contendo quatro doses e (b) uma forma farmacêutica de liberação controlada (LC) contendo o mesmo fármaco. CMS = concentração máxima segura, CME = concentração mínima eficaz [AMIDON *et al.*, 1995].

Há várias vias de administração e formas farmacêuticas (Tabela 1) que podem ser escolhidas quanto à liberação controlada, porém a fração de fármaco administrada deve chegar de forma inalterada à circulação sistêmica permanecendo por um tempo determinado, denominada de dose biodisponível. Isto é muito importante no sentido de determinar se o fármaco alcançou o sítio de ação em uma concentração terapêutica eficaz (com exceção dos pró-fármacos) [ALLEN, POPOVICH e ANSEL, 2007].

Tabela 1. Formas farmacêuticas existentes para as diferentes vias de administração [MARTIN e BUSTAMANTA, 1993].

Via de administração	Formas farmacêuticas
Oral	Soluções, xaropes, suspensões, emulsões, géis, pós, grânulos, cápsulas, comprimidos
Retal	Supositórios, unguentos, cremes, pós, soluções
Tópica	Unguentos, cremes, pastas, loções, aerossóis de uso tópico
Parenteral (intravenosa, intramuscular, subcutânea)	Soluções, suspensões, emulsões injetáveis, implantes, soluções de diálise
Ocular	Soluções, unguentos, cremes
Auricular	Soluções, suspensões, unguentos, cremes
Nasal	Soluções, inalações
Respiratória	Aerossóis na forma de solução, suspensão, emulsão, e pó, inalação, nebulizadores e gases

A diversidade desses polímeros permite gerar o carreador mais adequado para a incorporação dos fármacos em terapias específicas. Vários parâmetros devem ser considerados, tais como: grau de toxicidade (grau de virulência nociva) da matriz polimérica, sua estabilidade coloidal, biocompatibilidade (tolerância biológica) e biodisponibilidade. Os parâmetros físico-químicos que influenciam a eliminação da matriz polimérica da corrente sanguínea são o tamanho da partícula, a hidrofiliabilidade e o reconhecimento pelos macrófagos [AUMELAS *et al.*, 2007].

As nanopartículas podem ser denominadas de nanoesferas (sistema monolítico) e nanocápsulas (sistema de reservatório) dependendo da composição e

formulações e/ou da técnica empregada na sua preparação. Elas diferem entre si segundo a composição e organização estrutural, e segundo a literatura, podem ter diâmetros menores que 1 μm desde que tenham pelo menos uma das dimensões entre 1 a 100 nm [CUI e MUMPER, 2001; HU *et al.*, 2002; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003a; BERGER *et al.*, 2004; GAN *et al.*, 2005; KOCBEK, BAUMGARTNER e KRISTL, 2006; TIYABOONCHAI e LIMPEANCHOB, 2007; SÆTHER *et al.*, 2008; AVADI *et al.*, 2010].

A Figura 3 apresenta os dois sistemas de nanopartículas: As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. Por outro lado, as nanoesferas, que não apresentam óleo em sua composição, são formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido [SCHAFFAZICK *et al.*, 2003b].

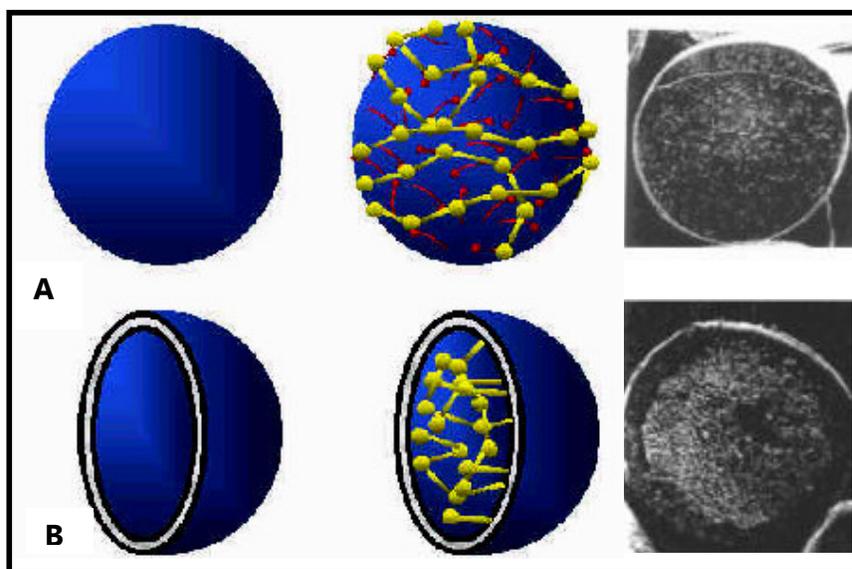


Figura 3. Exemplos das diferentes formas farmacêuticas: (A) nanoesfera (sistema matricial) e (B) nanocápsula (sistema reservatório) [BETTINI, COLOMBO e PEPAS, 1987].

Os mecanismos de liberação do fármaco dependem do grau de intumescimento da matriz polimérica, difusão do fármaco pela matriz e a erosão do polímero intumescido. Inicialmente, as matrizes, quando em contato com o meio de dissolução, absorvem água através dos poros do sistema matricial. Após a hidratação do sistema, com consequente liberação imediata do fármaco existente à superfície da

matriz, ocorre o intumescimento/relaxamento das cadeias poliméricas, formando uma estrutura maleável em volta do núcleo. Quando a água penetra cada vez mais na matriz, as cadeias poliméricas começam a se separar, alargando os espaços onde a difusão do fármaco ocorre. As cadeias poliméricas dispersam-se na camada mais externa, resultando em aumento da taxa de erosão [BETTINI, PEPPAS e COLOMBO, 1998], como está representado pela Figura 4.

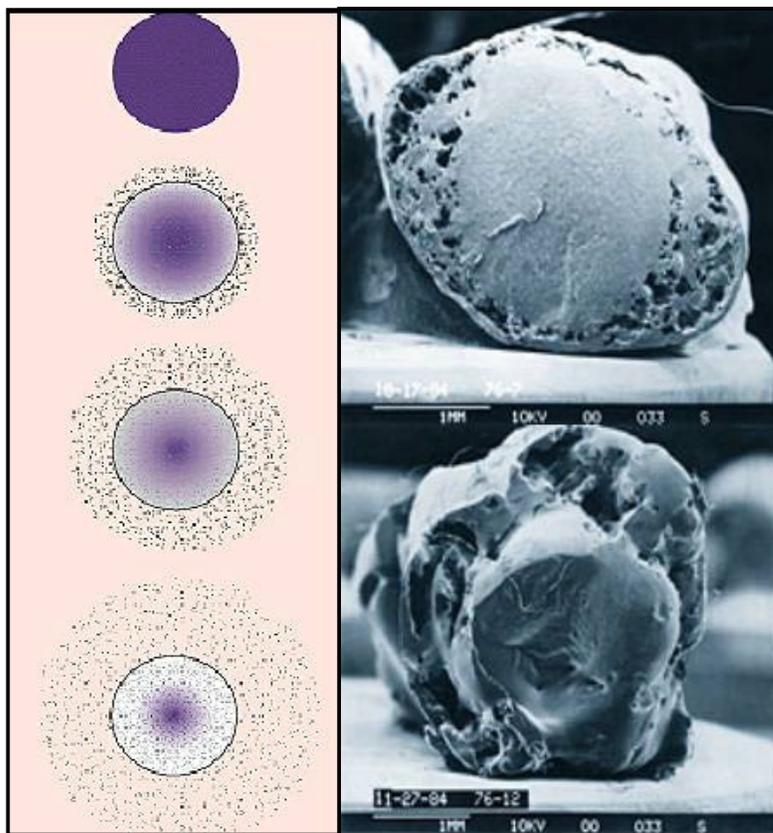


Figura 4. Formas de liberação do ativo: nanoesferas e nanocápsulas [BETTINI, COLOMBO e PEPPAS, 1997].

A cinética de liberação dinâmica de fármacos pode ser analisada por uma equação empírica proposta por RITGER e PEPAS, [1987a]:

$$M_t/M_\infty = Kt^n$$

Equação 1

Onde M_t/M_∞ representa a fração do fármaco liberado em função do tempo, k é a constante de velocidade e n é o parâmetro que representa o tipo de transporte.

Um mecanismo de transporte Fickiano do tipo I é descrito por um fenômeno de difusão, enquanto que um mecanismo Fickiano tipo II é caracterizado por um fenômeno de relaxação constante. Estes dois fenômenos possuem valores de n para sistemas esféricos de 0,43 e 0,85 respectivamente. Um fenômeno de transporte não Fickiano é descrito por um fenômeno de relaxação e difusão e para sistemas esféricos possuem valores $0,43 < n < 0,85$ [RIGTER e PEPAS, 1987b].

1.2 Nanopartículas à base de polissacarídeos

Nanopartículas de polissacarídeos podem ser obtidas por diversos métodos, os quais incluem nanoprecipitação, formação de emulsão (com ou sem utilização de surfactantes), reticulação com agentes covalentes e iônicos, além de técnicas de polimerização e copolimerização (por emulsão, por radical), complexação polieletrólítica, por autoagregação, dentre outros [HORNING e HEINZE, 2007; JINTAPATTANAKIT *et al.*, 2007; ZHENG *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2009; WOITISKI *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2009; DODOV *et al.*, 2009; FRELICHOWSKA *et al.*, 2009; ESPINOSA-ANDREWS *et al.*, 2010; ANH *et al.*, 2010; BODDOHI *et al.*, 2010; JONES, DECKER e McCLEMENTS, 2010; KUMARI, YADAV e YADAV, 2010; ŞENYİĞİT *et al.*, 2010; SHALVIRI *et al.*, 2010; SOUGUIR *et al.*, 2010; SOUMYA, GHOSH e ABRAHAM, 2010; YADAV e AHUJA, 2010; YAN *et al.*, 2010]. A Tabela 2 apresenta nanopartículas de polímeros naturais recentemente estudadas para incorporação de fármacos, juntamente com sua respectiva aplicação e via de administração.

Tabela 2. Produção de nanopartículas à base de polissacarídeos naturais.

Aplicação	Administração	Material	Método	Diâmetro (nm)	Referência
Trato gastrointestinal	Oral	Enoxaparina + Quitosana	CPE	200-500	SUN <i>et al.</i> , 2008
Pele	Tópico	Lectina + Quitosana	CPE	250	ŞENYİĞİT <i>et al.</i> , 2010
Câncer	Intravenosa	Paquimana carboximetilada	CE	93-158	HU <i>et al.</i> , 2008
-	Oral	Goma arábica + quitosana + insulina	GI	150-200	AVADI <i>et al.</i> , 2010
Pele	Tópico	Goma guar	Reticulação covalente	20-50	SOUMYA <i>et al.</i> , 2010
Trato gastrointestinal	Oral	Alginato + Sulfato de dextrana + QT	CPE	394-588	WOITISKI <i>et al.</i> , 2009
-	-	Pululana alquilada	Autoformação	100-400	SOUGUIR <i>et al.</i> , 2010
Contraste	Intravenosa	QT-Gd-DTPA + sulfato de dextrana	CPE	350	HUANG <i>et al.</i> , 2008
Intestino	Oral	Alginato + Quitosana	GI	200	GEORGE e ABRAHAM, 2006
-	-	Goma arábica + Quitosana	CPE	80-250	BODDHIA <i>et al.</i> , 2010
Trato gastrointestinal	Oral	TMC + Insulina	Autoformação	100-200	YIN <i>et al.</i> , 2009
Câncer	-	Goma curdlana carboximetilada + AD	Autoformação	192-347	GAO <i>et al.</i> , 2008
Córnea	Tópico	Goma cordia + fluconazol	Emulsão	315-394	YADAV <i>et al.</i> , 2010

Câncer	-	Dextrana	Autoformação	90-520	HORNING e HEINZE, 2007
Células HeLa	-	QT carboximetilada + ácido linoléico	Autoformação	417	TAN e LIU, 2009
Células HeLa	Oral	Alginato + Quitosana	CPE	766	CHEN <i>et al.</i> , 2009
-	Oral	Sulfato de dextrana + QT + insulina	CPE	500	SARMENTO <i>et al.</i> , 2007c
Estômago	Oral	Alginato + quitosana	Reticulação iônica	6-15	DODOV <i>et al.</i> , 2009
-	-	Goma do cajueiro + PAA	CE	61-603	SILVA <i>et al.</i> , 2009
Trato gastrointestinal	Oral	Goma Kondagogu + QT + Sulfato de dextrana	CPE	152-175	NAIDU <i>et al.</i> , 2009
Fígado	-	TPP + Quitosana + DNA	Reticulação iônica	100-250	GAN e WANG, 2007
-	Oral	TEC + insulina		185	
		DMEC + insulina	CPE	180	BAYAT <i>et al.</i> , 2008
		Quitosana + insulina		267	
-	Oral	Quitosana + dextrana	CE	14-50	CHAYED e WINNIK, 2007

AD	Ácido deoxólico	CE	Copolimerização por enxertia
CPE	Complexação polieletrólítica	TEC	Trietil quitosana
CM	Carboximetilada	TMC	Trimetil quitosana
DMEC	Dimetil-etilquitosana	TPP	Tripolifosfato
Gd-DTPA	Gd-ác. acético dietilenopentatriamino	QT	Quitosana
GI	Geleificação ionotrópica	PAA	Poli(ácido acrílico)

JANES, CALVO e ALONSO, [2001] e PRABAHARAN e MANO, [2005] fizeram observações a respeito de nanopartículas baseadas em polissacarídeos, com enfoque na preparação e aplicação de carreadores à base de quitosana para liberação de fármacos. Essas metodologias de preparação são discutidas a seguir:

1.2.1 Nanopartículas de polissacarídeo por reticulação iônica

A reticulação iônica representa muitas vantagens, pois a reticulação ocorre em condições de preparação brandas e procedimentos simples. O poliânion mais utilizado como reticulante é o TPP (tripolifosfato). CALVO *et al.* [1997] reportaram esse agente reticulante para nanopartículas de quitosana. O TPP, como mostrado na Figura 5, não é tóxico e possui ânions multivalentes. Ele pode formar um gel por interação iônica entre cargas positivas dos grupos amino da quitosana e os de cargas negativas do TPP, como descrito por JAIN e BANERJEE, 2008; MAESTRELLI *et al.*, 2006; GAN e WANG, 2007; ZHANG *et al.*, 2008; TSAI, BAI e CHEN, 2008; SUN e WAN, 2007, como exemplo.

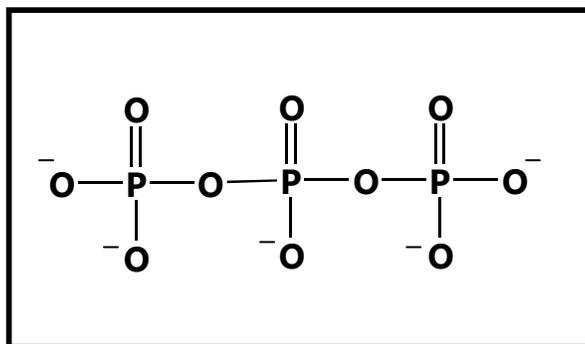


Figura 5. Representação estrutural da molécula de tripolifosfato.

1.2.2 Nanopartículas de polissacarídeo por reticulação covalente

Uma das rotas mais recentes de preparação de nanopartículas tem sido por reticulação covalente. Dentre os polissacarídeos existentes, a quitosana é utilizada na síntese de nanopartículas com o auxílio do glutaraldeído [ZHI, WANG e LUO, 2005; LIU *et al.*, 2007]. Infelizmente, a toxicidade deste agente reticulante dificulta sua utilidade no campo da liberação de fármacos, pois exige etapas de purificação para eliminar os resíduos do agente reticulante. Agentes de condensação de carbodiimida, ácido di e tricarboxílicos, incluindo ácido succínico, tartárico e cítrico são também usados para reticulação intermolecular de nanopartículas de quitosana (Figura 6) [BODNAR, HARTMANN e BORBELY, 2005a,b].

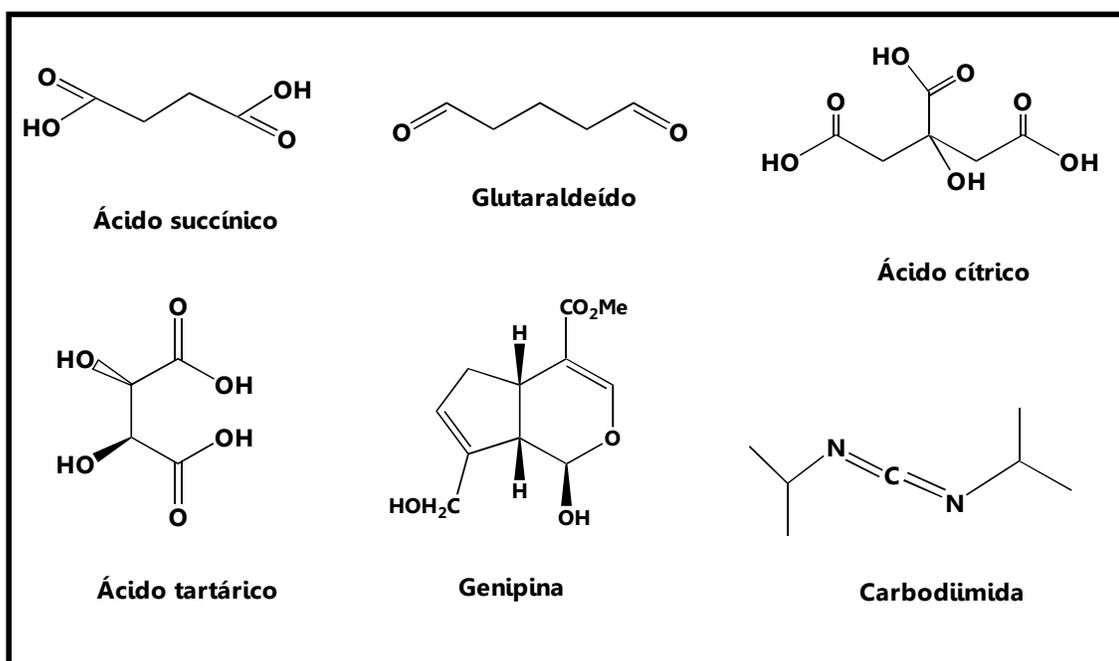


Figura 6. Representação estrutural da molécula de glutaraldeído e demais agentes de condensação.

A reação de condensação é feita entre o grupo carboxílico dos ácidos com os grupos amino da quitosana. Outro agente reticulante emergente para este fim é a genipina, a qual é significativamente menos tóxica do que o glutaraldeído [AKAO, KOBASHI e ABURADA, 1994]. A genotoxicidade da genipina foi testada *in vitro* e os

resultados mostraram que ela é 5.000-10.000 menos tóxica do que o glutaraldeído, que mesmo em baixas concentrações é citotóxico [JIM, SONG e HOUSTON, 2005; TSAI *et al.*, 2000]. A genipina pode reagir com grupamentos amino livres formando pigmento azul [MI *et al.*, 2002]. Este método permite a formação de nanopartículas policatiônicas e polianiônicas.

1.2.3 Copolimerização por Enxertia

Denomina-se copolimerização por enxertia reações de modificação cujo monômero é polimerizado e conseqüentemente ligado à cadeia principal de outro polímero. A copolimerização por enxertia para polissacarídeos como celulose [RÅNBY e SUNDSTRÖM, 1983] e goma guar [CHOWDHURY *et al.*, 2001] tem sido estudada. Muitos trabalhos vêm sendo publicados desde a década de 50 até os dias de hoje [HINTZ e JOHNSON, 1967; DUMITRIU, 2005; WANG *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2007; KAEWTATIP e TANRATTANAKUL, 2008; TIWARI *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2009; TRIPATHY, MISHRA e BEHARI, 2009; CASAS, FERRERO e JIMÉNEZ-CASTELLANOS, 2010; DEV *et al.*, 2010; DUAN *et al.*, 2010; GANJI e ABDEKHODAIE, 2010; IŞIKLAN, KURŞUN e İNAIL, 2010; LIU *et al.*, 2010; MISHRA *et al.*, 2010; QI *et al.*, 2010; SAND, YADAV e BEHARI, 2010; XIA, HA e MENG, 2010; TRIPATHY *et al.*, 2010] descrevendo esta reação em solução aquosa usando iniciadores de oxiredução.

As condições reacionais investigadas são, geralmente: a concentração do iniciador, monômero, substrato, temperatura, tempo, efeito da adição de solventes orgânicos, sal, surfactante e agentes complexionantes [BAJPAI, JAIN e RAI, 1990]. A enxertia do copolímero através de iniciadores químicos é mais fácil do que outros métodos de iniciação (térmica e elétrica como exemplo) devido a energia de ativação da iniciação redox ser mais baixa [BAJPAI e RAI, 1988; HINTZ e JOHNSON, 1967].

Vários sistemas de pares redox têm sido estudados, tais como: o brometo de potássio/ácido tiomálico na presença de oxigênio; o sulfato de cobre/ácido

mandélico [TRIPATH *et al.*, 2010], persulfato de amônia/persulfato de sódio, peroxidifosfato/metabissulfato [SAND, YADAV e BEHARI, 2010], peróxido de benzoíla [IŞIKLAN, KURŞUN e İNAIL, 2010] e o nitrato de amônio cérico/ácido nítrico [SHARMA, KUMAR e SONI, 2002; TANG, DOU e SUN, 2006; SILVA *et al.*, 2009], o qual é vastamente usado como iniciador para enxertia de polímeros naturais. A Figura 7 mostra um esquema do mecanismo de enxertia para um polissacarídeo natural.

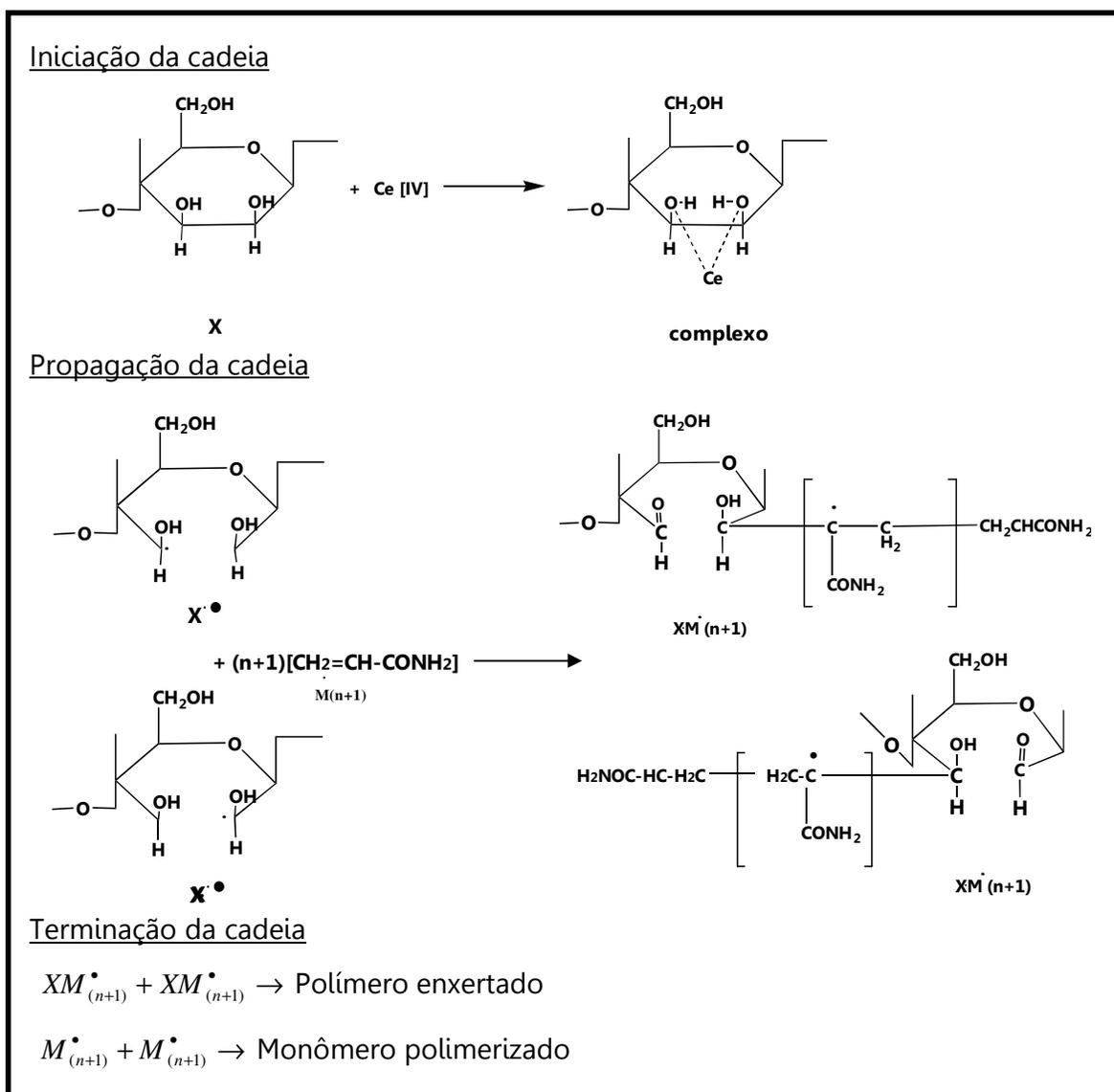


Figura 7. Mecanismo da reação de enxertia [SHARMA, 2002].

Na Figura 7, a etapa de iniciação é caracterizada pela interação do iniciador nitrato de amônio cérico/ácido nítrico com o polissacarídeo para a formação do macroradical ($\mathbf{x}\cdot$). O mecanismo pelo qual o cério IV gera radicais livres envolve a formação de complexos de coordenação (O – Ce – O) entre o oxidante e o grupo hidroxila do polissacarídeo, reduzindo a cério III [McCORMICK e PARK, 1981].

A etapa de propagação da cadeia mostra o sítio onde o copolímero $\mathbf{M(n+1)}$ é enxertado ao polissacarídeo sendo que esta etapa ocorre preferencialmente no C2 e C3 da unidade glicosídica e em pouquíssima extensão para o C6 [SHARMA, KUMAR e SONI, 2002]. O autor se baseia em estudos de ressonância, fracionamento e espalhamento de luz para afirmar esta preferência, concordando com trabalhos anteriores [ARTHUR, BAUGH e HINOJOSA, 1966; MINO, KAIZERMAN e RASMUSSEN, 1959; CHURCH, 1967].

Após a reação de enxertia ($XM_{(n+1)}^{\bullet} + XM_{(n+1)}^{\bullet} \rightarrow$), o polissacarídeo deve ser reticulado para controlar suas propriedades de intumescimento [DUMITRIU, 2005; ZHANG *et al.*, 2009], visando o emprego do mesmo para liberação de fármacos em diferentes pHs. Trabalhos recentes apontam que a reação de copolimerização para polissacarídeos com ácido acrílico é promissora para esse fim [ALIAS *et al.*, 2008; XIAOJUN *et al.*, 2009]. A Figura 8 representa um esquema genérico da estrutura de um polissacarídeo (PS) enxertado e reticulado.

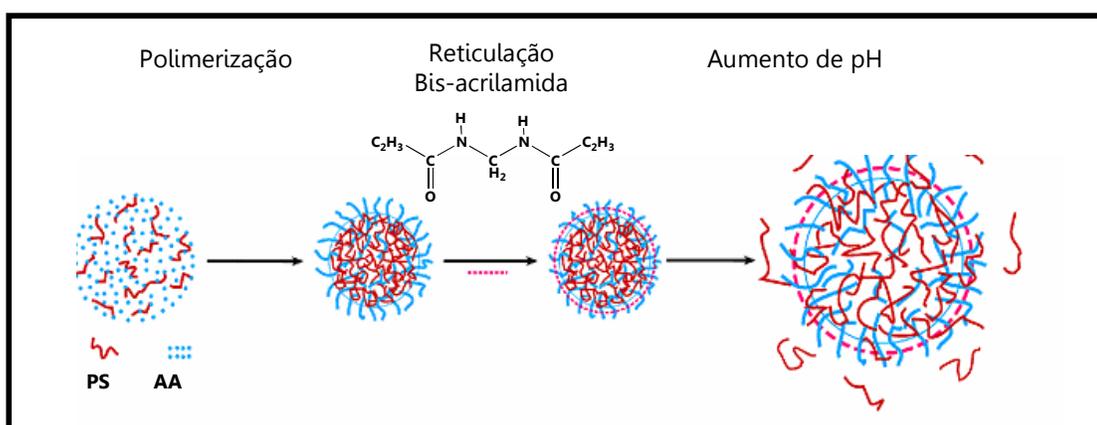


Figura 8. Esquema da preparação PAA-PS reticulado com bis-acrilamida [ZHANG *et al.*, 2008].

A análise mais comum que se encontra na literatura para caracterizar o material formado e/ou determinar o grau de enxertia é a de espectroscopia de infravermelho [HUANG *et al.*, 2009; MUNRO *et al.*, 2009; KAEWTATIP e TANRATTANAKUL, 2008]. Análises de DSC, TGA, difração de raios X [CHI *et al.*, 2008; HUANG *et al.*, 2009; KAEWTATIP e TANRATTANAKUL, 2008], MEV [TIWARI e SINGH, 2008; XIAOJUN *et al.*, 2009], RMN [MUNRO *et al.*, 2009; JANCIAUSKAITE *et al.*, 2008] e análise elementar [NAYAK e SINGH, 2001] também são encontradas. O comprimento de ramificação do enxertado como também a massa molar podem ser determinados por medidas de viscosidade intrínseca [O'MALLEY e MARCHESSAULT, 1968;].

1.2.4 Nanopartículas por autoformação ou autoagregação

Autoformação ou autoagregação correspondem a síntese de nanopartículas poliméricas em água resultando na autoformação de nanoestruturas, geralmente contendo um núcleo hidrofóbico e uma superfície mais hidrofílica. O processo é monitorado por diálise e ocorre de maneira espontânea, onde as moléculas vão sofrendo agregação até atingirem o tamanho e forma desejadas [HORNING e HEINZE, 2007; KIM e WHITESIDES, 1995], a concentração de agregação crítica (CAC) pode ser determinada por calorimetria ou tensão superficial [CHOI *et al.*, 2010; BAE e NA, 2010], e segue o mesmo princípio de concentração micelar crítica (CMC) [LANGEVIND, 2009]. Entretanto, para que a síntese por autoformação aconteça é necessário o polissacarídeo passar por um processo de modificação química. A literatura tem reportado que esta modificação pode ser por polimerização radicalar de poli(ϵ -caprolactona) [GREF, RODRIGES e COUVREUR, 2002], poli(metil metacrilato) [SPARNACCI *et al.*, 2002], poli(isobutilcianoacrilato) [CHAUVIERRE *et al.*, 2004], poli(N – isopropilacrilamida-co-ácido acrílico) [GAO *et al.*, 2006] ou através da introdução de grupos hidrofóbicos ao polissacarídeo, como esterificação com ácido cólico [NICHIFOR *et al.*, 1999], ácidos graxos [RODRIGUES, 2005], como também por

acetilação [TERAMOTO e SHIBATA, 2006]. WANG *et al.* [2007a, b e c] conseguiram nanopartículas de quitosana carboximetilada de 100 a 400 nm com baixo índice de polidispersão ($\sim 0,2$) por autoagregação. Um trabalho recente reporta a formação de nanopartículas de ácido linoléico modificado com quitosana carboximetilada, onde os autores conseguem tamanhos de 417,8 - 17,8 nm [TAN e LIU, 2009].

1.2.5 Polimerização por emulsão

A técnica de polimerização por emulsão é um veículo bem utilizado para síntese de nanopartículas [JOURDAIN *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2008; ANTON, BENOIT e SAUNIER, 2008; DINCKINSON, 2009; WU *et al.*, 2009; JONES, DECKER e McCLEMENTS, 2010; YADAV e AHUJA, 2010; GILS, RAY e SAHOO, 2010 como exemplo], mostrada na Figura 9.

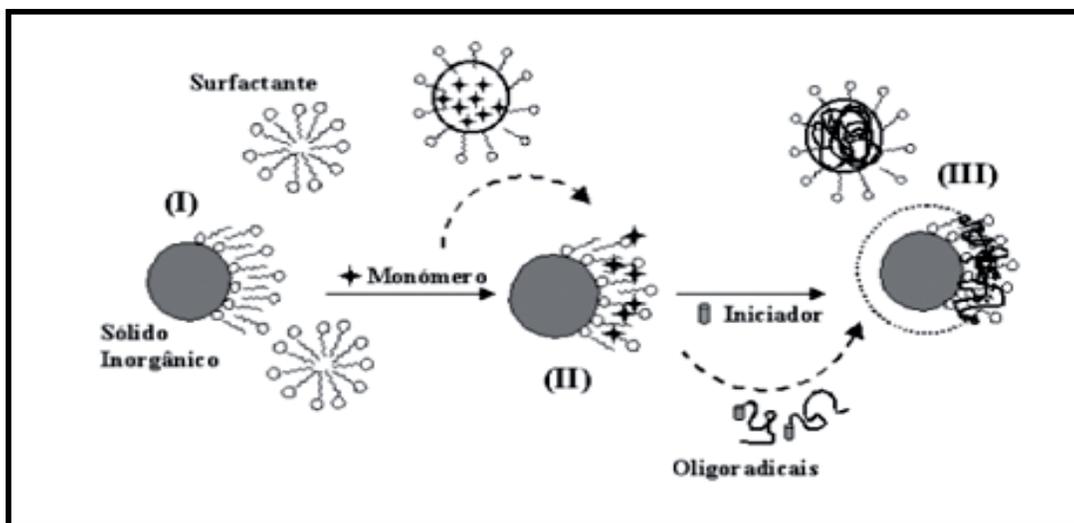


Figura 9. Encapsulamento de partículas pelo mecanismo de polimerização por emulsão: (I) Formação da bicamada de surfactante na nanopartícula; (II) Solubilização dos monômeros; (III) Polimerização dos monômeros no interior das micelas [FLORENCE e WHITEHILL, 1982].

O monômero é distribuído através de todo o sistema em emulsão: como gotículas estabilizadas de uma emulsão, dissolvido parcialmente na fase aquosa,

onde pode ocorrer a iniciação da reação, solubilizados em micelas de surfactante. A polimerização não ocorre nas gotículas emulsificadas de monômero, mas nas micelas de surfactante. Essas gotículas funcionam como reservatório, para fornecer reagente, por um mecanismo de difusão através da fase aquosa, aos locais em que se processa a polimerização. À medida que as micelas crescem, elas adsorvem emulsificante livre da solução, e eventualmente da superfície das gotículas em emulsão. Dessa maneira o emulsificante serve para estabilizar as partículas do polímero. Essa teoria leva em conta várias observações experimentais, como a velocidade de polimerização, o número de partículas do polímero formado, que depende da concentração do emulsionante e do número de partículas de polímero que pode ser bem maior que o número de gotículas de monômero inicialmente presente [FLORENCE e WHITEHILL, 1982; WASHINGTON, 1990; CHANG, 1992]. Partículas com tamanhos entre 0,1 a 10 μm são obtidas nesta técnica [SHAW, 1991].

Entre as vantagens do uso da polimerização por emulsão na síntese de carreadores estão: a absorção oral mais rápida e eficiente de fármacos do que as formas farmacêuticas sólidas, melhoria da liberação transdérmica, por meio do aumento da difusão pela pele e o potencial único de aplicações de fármacos citotóxicos a células tumorais [ALLEN, POPOVICH e ANSEL, 2007]. ACEDO-CARRILO *et al.*, [2006] investigaram a formação de partículas da goma mesquita com vários estabilizantes: D-limoneno, n-decane, n-dodecano, n-tetradecano, n-hexadecano e óleo de laranja. Raios hidrodinâmicos de 200 a 300 nm aproximadamente foram obtidos para emulsões estabilizadas com óleo de laranja.

Nanopartículas de polibutílicoacrilato, de 70 a 345 nm foram obtidas pelo método de polimerização por emulsão. Os autores observaram que as partículas menores que 100 nm conseguiram se tornarem invisíveis a barreira hematoencefálica [GAO *et al.*, 2006].

ROTUREAU *et al.*, [2006a,b] prepararam nanopartículas de poliestireno com superfície hidrofílica por emulsão, usando dextrana como surfactante. Diâmetros de partícula de 190 nm foram obtidos e após liofilização o diâmetro aumentou para 400 nm.

BOUCHEMAL *et al.*, [2004] obtiveram partículas de 171 nm através da investigação de formação da emulsão. Eles variaram as proporções de Lipoid®S75/PLURONIC®F68 e da acetona/acetato de etila. Observaram também que as partículas sofreram um aumento de tamanho quando o solvente é evaporado, pois o tamanho das micelas depende principalmente da solubilidade do solvente orgânico em água. Como o gradiente de concentração da água e do solvente aumentou a difusão do solvente será mais rápida e o tamanho das micelas formadas menores.

1.2.6 Complexação polieletrólítica (CPEs)

Complexos macromoleculares de diferentes polímeros naturais ou sintéticos são formados através de interações intermoleculares, como ligação de hidrogênio, forças de Coulomb e Van der Waals entre um polímero catiônico e um aniônico. Sabe-se que a entropia ganha associada com a liberação dos contraíons é uma das maiores forças para a formação do CPE [DUMITRIU e CHORNET, 1998]. De acordo com a natureza da interação, os complexos podem ser divididos em: complexos polieletrólíticos, complexo por transferência de carga, complexos por ligação de hidrogênio e estereocomplexos [DUMITRIU, 2005]. A formação de complexos polieletrólíticos podem ser obtidos pela mudança na estrutura química do polímero como por exemplo a massa molar, a flexibilidade da cadeia, o grupo funcional, a densidade de carga, a hidroflicidade ou a hidrofobicidade, a estereoregularidade dos monômeros, bem como as condições reacionais: o pH, a força iônica, a concentração, a proporção das cargas de ambos os polímeros e a temperatura. Na Figura 10, a formação do processo de formação dos complexos polieletrólíticos podem ser divididos em três clases principais: formação do complexo primário, formação do intracomplexo, e o processo de agregação do intracomplexo. O primeiro passo é realizado pelas interações de coulomb (muito rápida), o segundo passo envolve a formação de novas ligações e/ou a correção de distorções da cadeia

polimérica. O terceiro passo envolve a agregação de complexos secundários, principalmente através de interações hidrofóbicas. Foi investigado que o policátion e o poliânion reagem quase que estequiometricamente para a formação do complexo polieletrólítico. O complexo polieletrólítico mostrou um comportamento de absorção do tipo sigmóide que é similar ao comportamento de um material hidrofílico. Há casos em que a diferença de densidade de cargas entre os polímeros é tão grande que a reação não ocorre com estequiometria de 1:1.

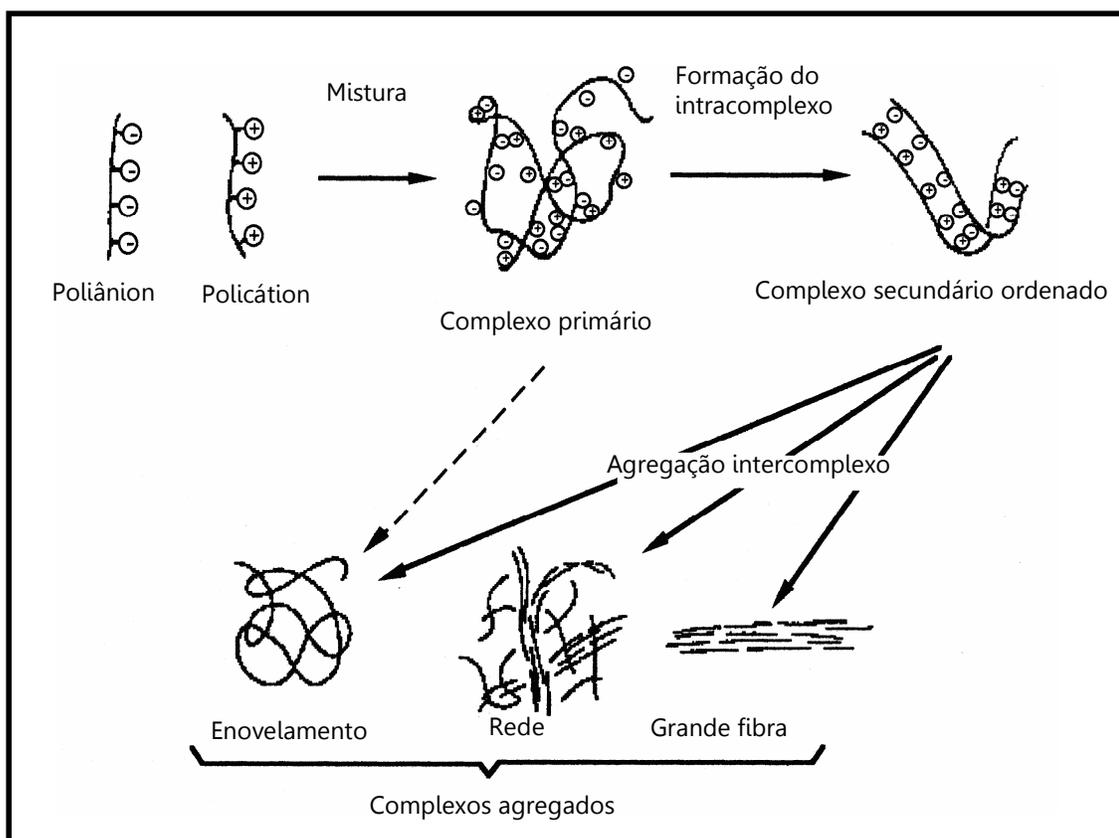


Figura 10. Tipos de agregação de um CPE [DUMITRIU e CHORNET, 1998].

A formação desses agregados ocorre sem a necessidade de moléculas catalisadoras ou inibidoras e ocorrem em soluções aquosas, o que é uma grande vantagem sobre as reações de reticulação covalente [BERGER *et al.*, 2004]. Uma variedade de complexos polieletrólíticos pode ser obtida se o polímero for

modificado estruturalmente. Há muitos polímeros aniônicos (Figura 11) que complexionados com quitosana formam CPEs, como exemplo temos os polissacarídeos, peptídeos, poliácido acrílico dentre outros.

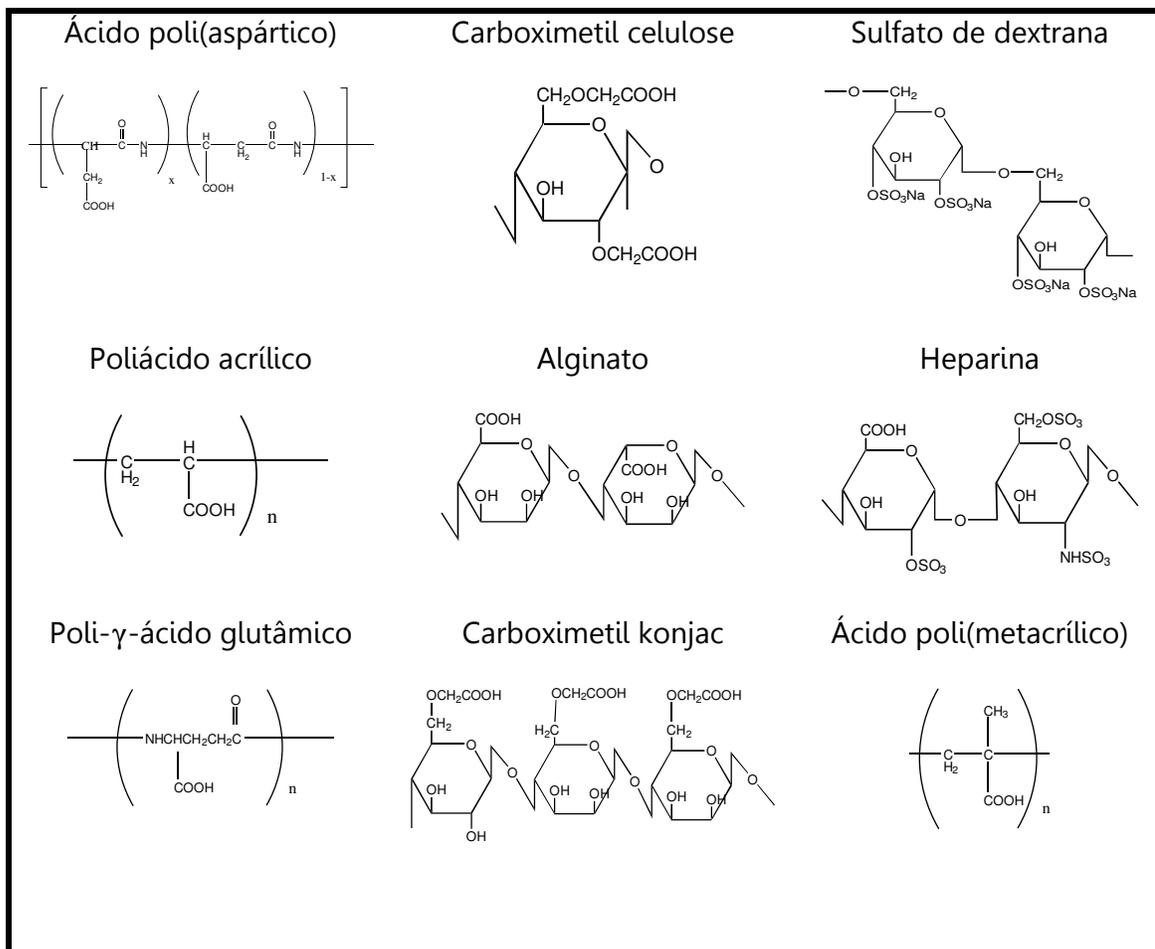


Figura 11. Representação estrutural de polímeros aniônicos que são complexionados com quitosana [LIU *et al.*, 2007].

1.3 Caracterização de nanopartículas

A necessidade histórica do homem de observar a natureza e os materiais possibilitou o aparecimento de equipamentos para auxiliar a visão humana ao longo

de mais de 10 séculos. Os campos de observação dos objetos com ampliações de algumas dezenas até milhões de vezes foram possíveis com o desenvolvimento de equipamentos extremamente sofisticados, no qual utilizam feixes de radiação eletromagnética ou feixes de elétrons na construção de imagens. Um aspecto fundamental na obtenção das imagens reside na capacidade de resolver dimensões bastante reduzidas, em elevadas ampliações. A Tabela 3 mostra as resoluções para cada equipamento.

Tabela 3. Resoluções típicas obtidas por diversas técnicas de microscopia e olho humano [CLARK, 1998].

Microscopia				
Microscópios	Resolução aproximada	Ampliação	Fonte	Requisito amostras
Olho humano	100 μm	-	Luz	Material (volume)
Microscópio de luz	100 nm	$5 \sim 1,5 \times 10^3$	Luz	Material (superfície polida)
Microscópio eletrônico – MEV	10 nm	$100 \sim 2 \times 10^5$	Feixe eletrônico	Material (volume)
Microscópio eletrônico de transmissão – TEM	0,5 nm	$1 \times 10^3 \sim 3 \times 10^5$	Feixe eletrônico	Filmes finos (espessura ~ 100 nm)
Microscopia eletrônica de alta resolução – MET	0,1 nm	$3 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$	Feixe eletrônico	Filmes finos (espessura ~ 100 nm)
Microscopia de força atômica – AFM	Å	10^{-10}	Forças interatômicas	Materiais líquidos ou sólidos ($< 1 \mu\text{m}$)

$\text{mm} = 10^{-3}\text{m}$; $\mu\text{m} = 10^{-6}\text{m}$; $\text{nm} = 10^{-9}\text{m}$; $\text{Å} = 10^{-10}\text{m}$.

É crescente o interesse pela área de análise e caracterização de materiais devido à necessidade de seleção adequada do material no desempenho do sistema em estudo. Dependendo das solicitações a que este material ou sistema será submetido, a caracterização poderá abranger a avaliação de propriedades mecânicas, elétricas, bioatividade, imunogenicidade, eletrônicas, magnéticas, ópticas, químicas,

térmicas e até mesmo à combinação de dois ou mais destas propriedades. Esta caracterização de propriedades visa principalmente estimar o desempenho de vida útil do material, minimizando a possibilidade de degradação e falhas indesejáveis durante a utilização do produto.

As técnicas de microscopia têm como objetivo a construção de imagens ampliadas dos objetos e sistemas observados. Tanto os microscópios quanto os olhos humanos podem observar objetos até certo limite de detalhes. Portanto, nenhum equipamento de microscopia poderá cobrir todas as escalas de observação na faixa de macroestruturas até nanoestrutura.

1.3.1 Microscopia de força atômica (AFM)

Em 1986, Binnig, Quate e Gerber propuseram um novo microscópio que, ao invés de medir corrente elétrica, mede forças em escala atômica em materiais condutores e não condutores que foi denominado de microscópio de força atômica. Não utilizam lentes para obtenção das imagens e não necessitam de uma fonte de luz, nem de um feixe de elétrons. Esta técnica baseia-se na varredura da superfície estudada por meio de sondas de dimensões muito reduzidas a distâncias muito pequenas (da ordem de alguns Å), proporcionando uma alta resolução espacial, tanto lateral como vertical, na visualização de superfícies em nível atômico. A partir daí, filmes orgânicos, biomoléculas, cerâmicas, polímeros e vidros foram alvos de análise [FERREIRA e YAMANAKA, 2006]. A Figura 12 mostra um diagrama do princípio básico desta técnica que consiste na medida das deflexões de um suporte (100 a 200 μm de comprimento) em cuja extremidade livre está montada a sonda. Estas deflexões são causadas pelas forças que agem entre a sonda e a amostra [MEYER, 1992].

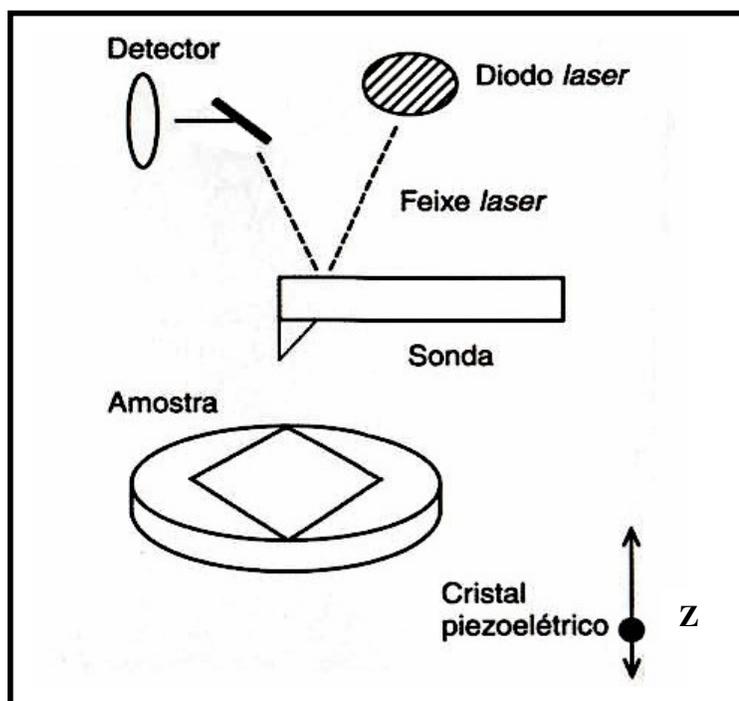


Figura 12. Diagrama representativo de funcionamento do microscópio de força atômica [ORÉFICE, PEREIRA e MANSUR, 2006].

Inicialmente um laser incide no cantilever, que em seguida atinge o espelho alcançando o fotodetector onde serão medidas as deflexões causadas pela rugosidade da amostra quando ela é varrida pela sonda (ponteira). Quando a ponteira se aproxima da amostra é primeiramente atraída pela superfície devido a uma ampla gama de forças atrativas existentes na região, como por exemplo, forças de Van der Waals. Esta atração vai aumentando até a aproximação máxima da sonda nesta hora os átomos de ambas estão tão próximos que seus orbitais eletrônicos começam a se repelir, isto acontece quando a distância entre os átomos é da ordem de alguns ângstrons, e como consequência a repulsão eletrostática enfraquece a força atrativa. [CLARK, 1998].

A medida depende de diversos fatores como, por exemplo, tipos de materiais que compõem a amostra e a ponteira, da distância entre elas, da geometria da ponteira e de qualquer tipo de contaminação que houver sobre a superfície da amostra. Os materiais geralmente utilizados para fabricação das pontas são Si, SiO₂ e

Si_3N_4 e dependendo do modo de operação, das características e da superfície da amostra, a geometria e forma da ponta podem ser alteradas. O aspecto da ponteira é fundamental para fazer uma boa imagem, pois, na realidade, a imagem será a resultante das formas da ponteira. Por outro lado, é preciso levar em consideração que algumas amostras são mais susceptíveis à contaminação do que outras, elas podem se deformar com as forças exercidas pela ponteira e que algumas desenvolvem com facilidade cargas elétricas estáticas, o que dificulta a produção de uma imagem precisa [HIRATA, YABUKI e MIZUTANI, 2004].

A técnica de AFM pode ser classificada quanto ao sistema de análise como modo intermitente (*tapping*), contato e não contato. No modo contato, o cantilever é mantido a poucos ângstroms da superfície da amostra e a força interatômica entre a ponta e a amostra é repulsiva. Neste modo de operação, a ponta faz um leve "contato físico" com a amostra produzindo imagens com alta resolução, mas a compressão e as forças geradas, entre a ponta e a superfície, podem causar danos à amostra, o que é especialmente prejudicial às amostras biológicas que são sensíveis e nem sempre fortemente aderidas ao substrato. No modo de não-contato, o cantilever é mantido de dezenas a centenas de ângstroms da superfície da amostra e a força interatômica entre a ponta e a amostra é atrativa. Neste caso a ponta oscila em alta frequência (100 kHz a 1 MHz), a poucos nanômetros acima da superfície e a força total entre a ponta e a amostra é muito baixa, geralmente em torno de 10-12 nN. Esta oscilação aumenta consideravelmente a sensibilidade do microscópio, o que faz com que forças de van der Waals e forças eletrostáticas possam ser detectadas. O modo de não-contato não sofre os efeitos do atrito sobre a amostra, causada pela ponta, conforme é observado no modo contato após diversas varreduras. Por outro lado, este modo não tem encontrado aplicabilidade geral, devido à instabilidade entre a ponta e as forças adesivas da superfície e à resolução reduzida pela distância ponta-amostra que é relativamente grande [FERREIRA e YAMANAKA, 2006]. Esta limitação tem sido contornada com a utilização do modo intermitente (Figura 13).

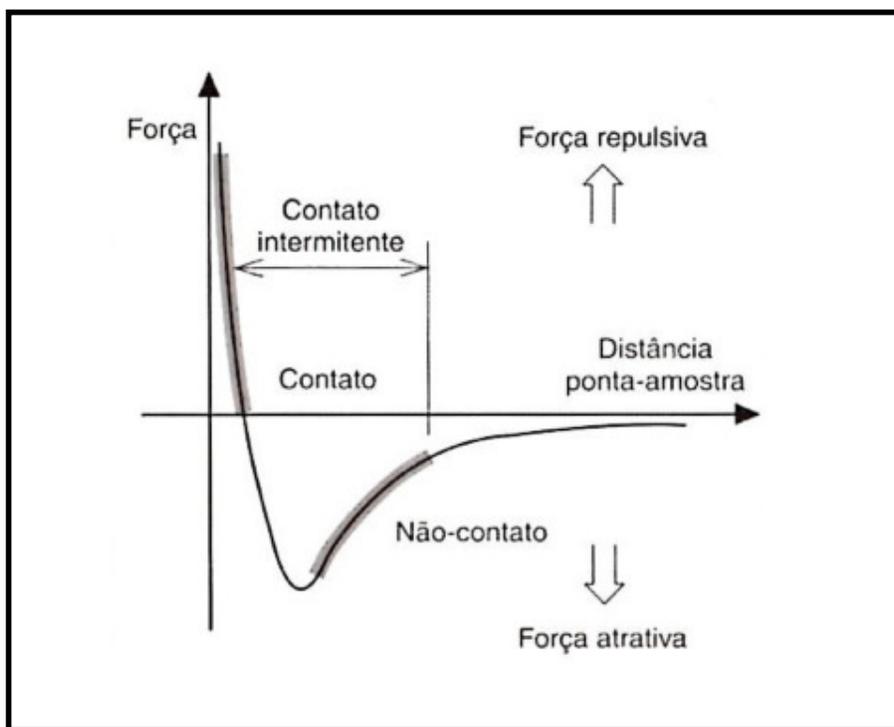


Figura 13. Gráfico do potencial Lennard-Jones que descreve a deflexão da mola operando em modo intermitente [ORÉFICE,PEREIRA e MANSUR, 2006].

O modo contato intermitente é similar ao não contato, exceto pelo fato de que a ponta vibrante fica mais próxima da amostra, de forma que tenha um contato intermitente e é utilizado para contornar as limitações impostas pelo modo contato. A comparação das imagens nos modos contato e intermitente mostra que as superfícies são menos modificadas no modo intermitente [MOLONEY, McDONNELL e SHEA, 2002].

1.3.2 Caracterização por tamanho de partícula

O tamanho da partícula controla inúmeras propriedades importantes como propriedades óticas, viscosidade, velocidade de sedimentação, dentre outras. Imagine medir uma caixa usando uma régua. A resposta seria 3 números referentes a

cada dimensão, porém cada um desses números representa somente um aspecto do tamanho da caixa. A situação é mais difícil quando se quer medir uma forma parecida com a de um grão de areia, a dificuldade em calcular seu tamanho é óbvia. Há somente uma forma que se pode descrever por um único número que é a forma esférica. Se o peso da caixa for conhecido ele pode ser convertido em peso de uma esfera, permitindo que o cálculo de um único número chegue ao valor do diâmetro da esfera que corresponde o mesmo peso da caixa (Figura 14) [RAWLE, 2002].

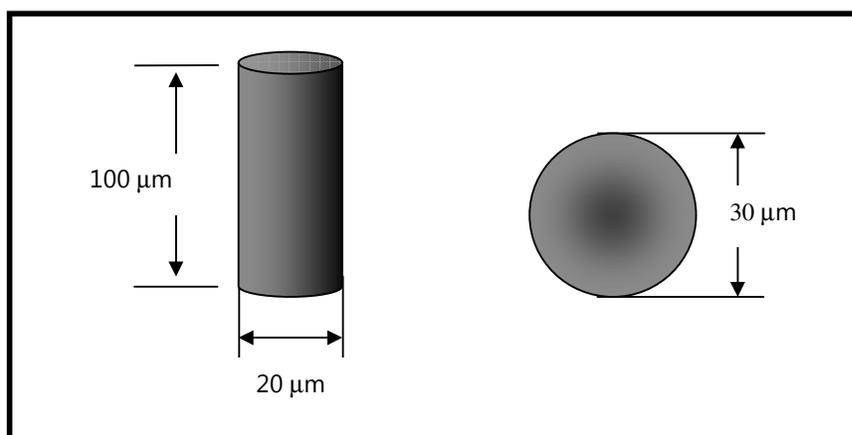


Figura 14 Esfera equivalente de um cilindro de altura de 100 µm e diâmetro de 20 µm [KENDALL, 1989].

Isto pode produzir alguns efeitos interessantes dependendo da forma do objeto, entretanto se o cilindro mudar de forma ou tamanho o seu volume e peso também mudarão, conseqüentemente o modelo da esfera equivalente se tornará maior ou menor [KENDALL, 1989].

Na determinação do tamanho de partículas há muitos diâmetros que se pode medir, como por exemplo, se o comprimento máximo da partícula é usado a esfera terá um diâmetro máximo, se o comprimento mínimo ou outra quantidade for usada a esfera terá diâmetro diferente. É importante notar que cada técnica que caracteriza tamanho de partícula dará uma resposta diferente, isso vai depender de qual propriedade cada um usa (comprimento máximo ou mínimo, superfície de área, volume, dentre outros) [BECKERS e VERINGA, 1989; KENDALL, 1989, RAWLE, 2002]. A Figura 15 mostra algumas diferentes respostas possíveis para um grão de areia.

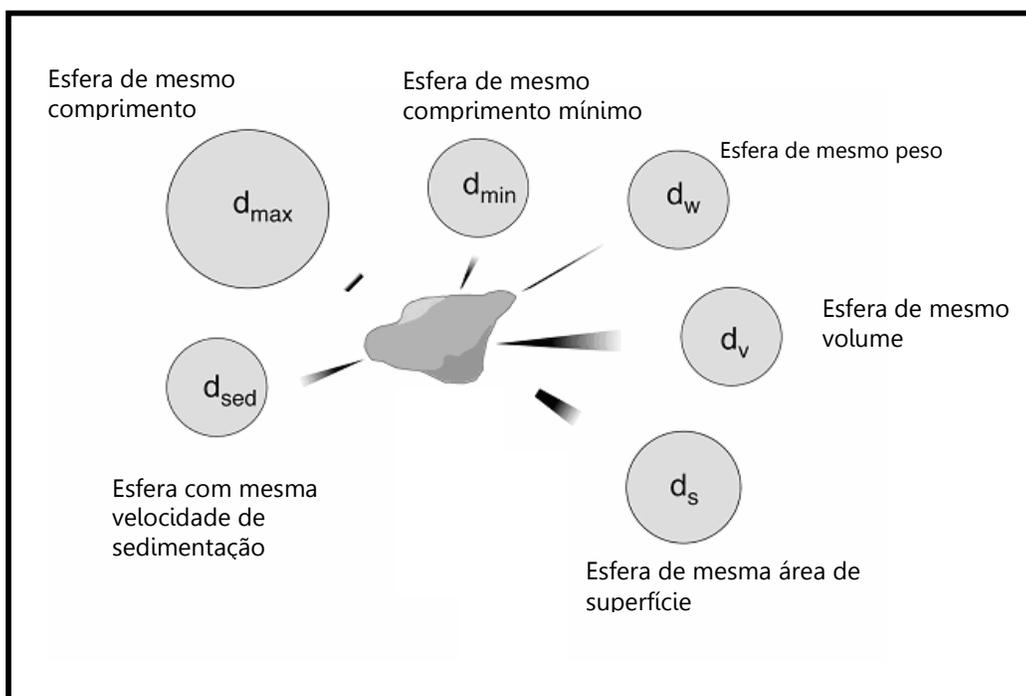


Figura 15. Diferentes medidas de tamanho de partícula para o mesmo grão de areia [RAWLE, 2002].

Na técnica por espalhamento de luz dinâmica realizada em equipamento *zeta sizer* as partículas devem estar dispersas em um determinado solvente onde se movimentam randomicamente. Há basicamente dois modelos matemáticos que descrevem o espalhamento no equipamento *zeta sizer*: quando as partículas são muito menores que $0,05 \mu m$, o espalhamento é denominado espalhamento Rayleigh; Para partículas cujo tamanho está ente $0,05$ a $100 \mu m$ o espalhamento Mie é o mais apropriado, pois ele consegue descrever multiespalhamentos gerados durante a análise. Outro modelo matemático é o espalhamento de Fraunhofer, este é utilizado para partículas maiores que $100 \mu m$ [KECK e MÜLLER, 2008]. A Figura 16 mostra que o feixe de luz incide na partícula e em seguida a luz é espalhada podendo formar fases construtivas e destrutivas.

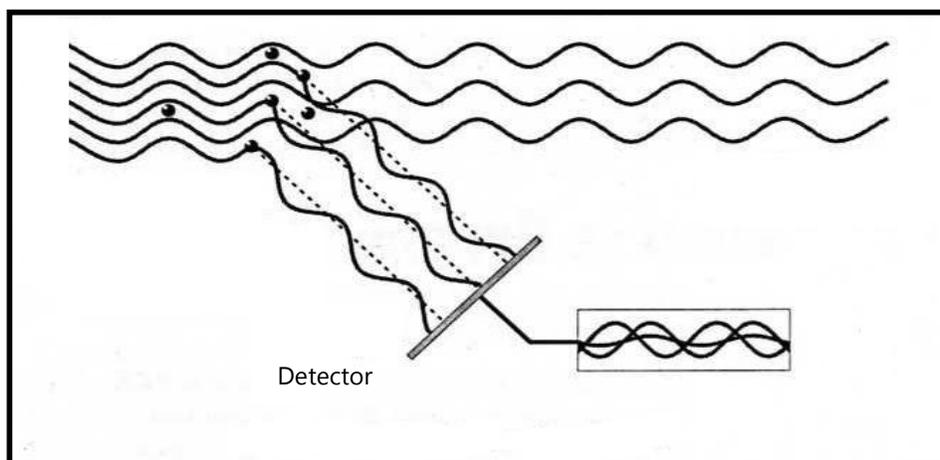


Figura 16. Esquema da luz espalhada pelas partículas captadas pelo detector em equipamento zeta sizer [SMITH, 2009].

O espalhamento Rayleigh considera a partícula como um dipolo elétrico que é excitado pela incidência da luz (radiação eletromagnética) e que irradia a luz segundo o padrão de excitação de um dipolo eletromagnético como um dipolo oscilante [EVERETT, 1988], com este raciocínio obtem-se:

$$P_R(\cos \theta) = \frac{3}{4} (1 + \cos^2 \theta) \quad \text{Equação 2}$$

E os demais parâmetros análogos ao processo de absorção, tais como as seções de choque do espalhamento para uma partícula individual na posição $s = s'$ do caminho óptico é dada por :

$$\sigma_R(\lambda, s') = 24\pi^3/\lambda^4 N_0^2 [n^2(\lambda, s') - 1]^2/[n^2(\lambda, s') + 2]^2 \quad \text{Equação 3}$$

onde N_0 é a concentração numérica de moléculas (com unidade de m^3 no SI, isto é, número de partículas por volume de ar) às condições padrão de pressão e temperatura; $n(\lambda, s')$ é o índice de refração do ar às condições de pressão e temperatura da posição s' .

A intensidade da luz (I) dispersada por uma pequena partícula num feixe de luz de longitude de onda (λ) e intensidade de radiação da luz não polarizada (I_0) é dada por:

$$I = I_0 (1 + \cos^2 \theta) / 2R^2 (2\pi/\lambda)^4 (n^2 - 1/n^2 + 2)^2 (d/2)^6 \quad \text{Equação 4}$$

Onde R é a distância à partícula, θ é o ângulo de dispersão, n é o índice de refração da partícula e d é o diâmetro da partícula [PECORA, 1985].

No caso de luz polarizada (e não se pode generalizar) também podemos expressar:

$$I = I_0 |\sigma(\theta, \phi)|^2 (2\pi)^4 / (\lambda R)^2 \quad \text{Equação 5}$$

$$\sigma(\theta, \phi) = A(\theta) \sin(\phi) \hat{e}_\phi + B(\theta) \cos(\phi) \hat{e}_\theta \quad \text{Equação 6}$$

Onde agora a parte dos símbolos anteriores temos o coeficiente de dispersão σ , e os ângulos em coordenadas esféricas θ e ϕ . Onde seus vetores unitários se definem referidos ao plano que definem o vetor que contém a direção de propagação da radiação e o vetor que contém a direção da polarização da onda incidente.

A distribuição angular da dispersão de Rayleigh, que vem a ser dada pela fórmula $(1 + \cos^2 \theta)$, é simétrica no plano perpendicular à direção da luz incidente, portanto a luz dispersada iguala-se à luz incidente. Integrando a área da esfera que cerca uma partícula obtemos a seção de choque da dispersão de Rayleigh, σ_s :

$$\sigma_s = 2\pi^5/3 d^6/l^4 (n^2 - 1/n^2 + 2)^2 \quad \text{Equação 7}$$

O coeficiente de dispersão para um grupo de partículas é o número de partículas por unidade de volume N vezes a seção transversal. Como em todos os efeitos de onda, na dispersão incoerente as potências são somadas e a soma deve ser elevada ao quadrado, para obter a potência final.

Na movimentação randômica que é denominada de movimento Browniano, as partículas menores movem-se mais rapidamente que partículas grandes, e portanto possuem coeficiente de difusão (D) maior. Para uma dispersão de partículas esféricas, com viscosidade η sob temperatura constante T , o coeficiente de difusão D é inversamente proporcional ao diâmetro hidrodinâmico d_h das partículas, como mostra a equação de Stokes-Einstein:

$$D = kT/3\pi\eta d_h \quad \text{Equação 8}$$

onde k é a constante de Boltzmann. Devido ao movimento Browniano, a intensidade da luz espalhada por um conjunto de partículas sofre flutuações ao longo do tempo.

Supondo que haja uma janela de dimensão reduzida, através da qual a luz espalhada pelas partículas alcança um detector, a intensidade da luz que atinge o detector irá flutuar devido ao movimento das partículas. Esta flutuação da intensidade de luz espalhada ocorrerá com maior velocidade quando a dispersão contiver partículas pequenas, pois estas se movimentam mais rapidamente e passam diante da janela um número maior de vezes dentro de um intervalo de tempo. [PECORA, 1985]. Portanto, existe uma relação entre a velocidade de flutuação da luz espalhada e o coeficiente de difusão das partículas. Existe também uma função de autocorrelação da intensidade de luz espalhada. No caso de partículas pequenas, essa função de autocorrelação entre as intensidades diminui mais rapidamente com o tempo, do que no caso de partículas grandes, a função de autocorrelação,

$$G(t) = \langle I(t_0) \times I(t_0 + t) \rangle \quad \text{Equação 9}$$

onde $I(t_0)$ e $I(t_0 + t)$ são as intensidades de luz espalhada nos instantes t_0 e $(t_0 + t)$, respectivamente.

No tempo $t = t_0 = 0$, a intensidade de espalhamento é $I(0)$ e a função de autocorrelação possui um valor máximo. Com o passar do tempo, a intensidade de espalhamento em um tempo $(t_0 + t)$ terá cada vez menos correlação com a intensidade de espalhamento inicial, e a média sobre os produtos das intensidades, que é $G(t)$, tende a zero. Normalmente admite-se que $G(t)$ decai exponencialmente em função do tempo, conforme é mostrado na Figura 17.

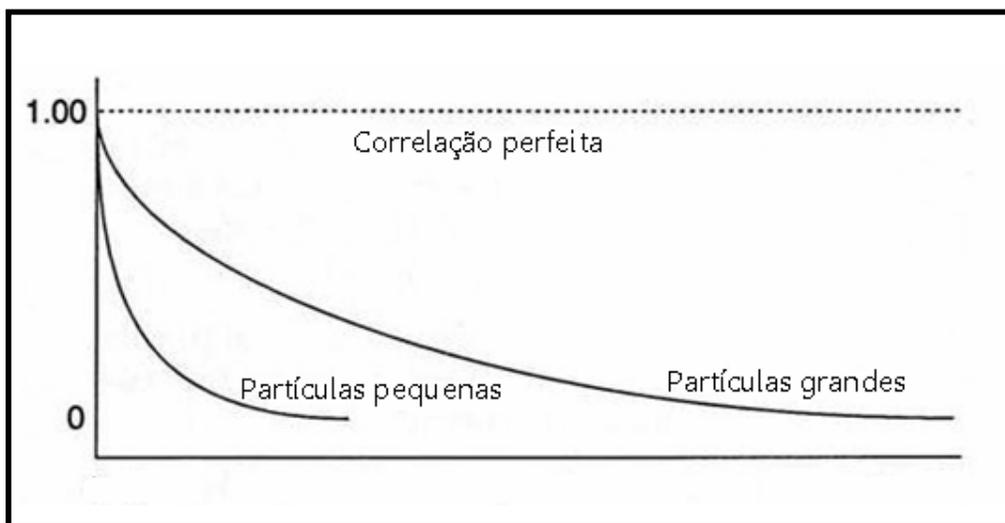


Figura 17. Sinais de correlação que o equipamento zetasizer Malvern modelo 3600 utiliza para determinar o tamanho de partícula [ZETASIZER, 2005].

Para partículas esféricas e monodispersas, $G(t)$ é expresso por:

$$G(t) = Ae^{-2\Gamma t} + B \quad \text{Equação 10}$$

onde A e B são constantes, e G é a constante de decaimento da curva exponencial gerada pela função de auto-correlação. Por sua vez, G é dada por

$$\Gamma = Dq^2 \quad \text{Equação 11}$$

onde D é o coeficiente de difusão das partículas e q é o vetor de onda da luz espalhada, que é dado por

$$q = (4\pi n/\lambda_0)\text{sen}(\theta/2) \quad \text{Equação 12}$$

onde n é o índice de refração do líquido que dispersa as partículas, q é o ângulo de detecção da luz espalhada e λ_0 é o comprimento de onda da luz incidente [EVERETT, 1988].

O equipamento possui um software que encontra a curva que melhor se ajusta aos pontos gerados pela função de autocorrelação, ou seja, encontra um valor apropriado para Γ , que ao substituir na equação 11 é encontrado um valor para D . Finalmente, substituindo D na equação 8 encontra-se o diâmetro hidrodinâmico (d_h) médio das partículas.

1.3.2.1 Distribuição por intensidade, volume e número

Matematicamente, o cálculo para conversão dos três tipos das análises de volume, número e tamanho tem pouca diferença, contudo as consequências de cada conversão podem ser surpreendentes. Uma maneira simples de descrever a diferença entre intensidade, volume e número é considerar uma amostra que contém somente dois tamanhos de partícula (5 e 50 nm), mas com números iguais de tamanho de partícula. A Figura 18 mostra que o primeiro gráfico representa o resultado em distribuição por número e como esperado, os dois picos são do mesmo tamanho (1:1) já que existe número igual de partículas.

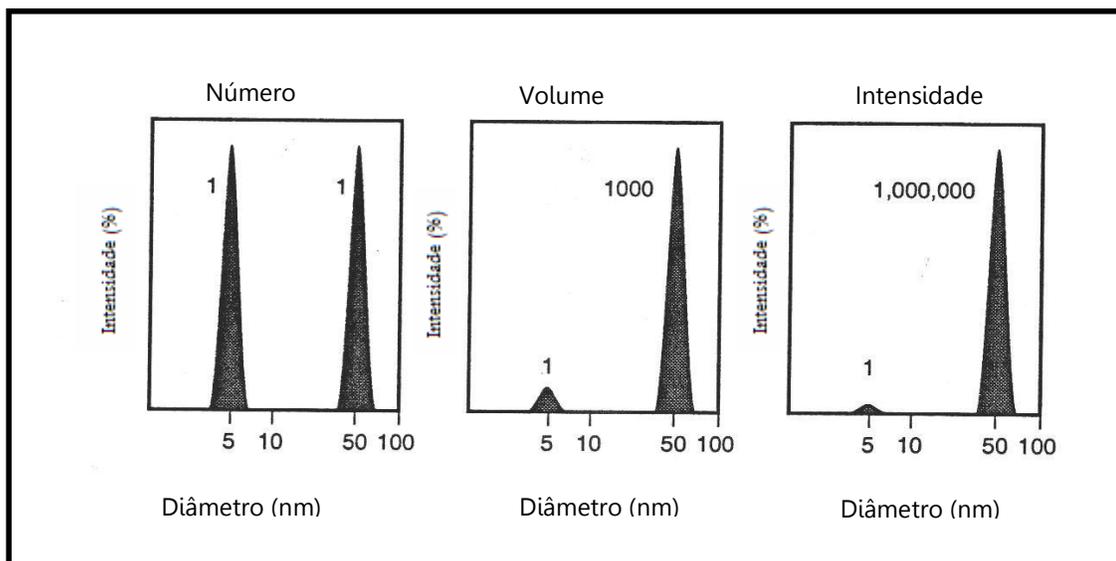


Figura 18. Gráficos da distribuição por número, volume e intensidade [ZETASIZER, 2005].

O segundo gráfico mostra o resultado de distribuição de volume. A área do pico para partículas de 50 nm é 1000 vezes maior do que o pico para partículas de 5 nm (razão de 1:1000). Isto é devido ao volume da partícula de 50 nm ser 1000 vezes maior que a partícula de 5 nm (volume da esfera é igual a $\frac{4}{3}\pi r^3$). O terceiro gráfico mostra o resultado de intensidade. A área do pico para partículas de 50 nm é agora 1.000.000 vezes maior do que para partículas de 5 nm (razão 1:1000000). Isto é devido às partículas grandes espalharem mais luz do que partículas pequenas (a intensidade do espalhamento da partícula é proporcional a sexta parte do seu diâmetro – aproximação de Rayleigh) [ZETASIZER, 2005].

A concentração é um parâmetro importante na hora de medir o tamanho de partícula. Se a concentração da amostra é muito baixa, o espalhamento de luz não é suficiente para realizar a medida. Isto não é comum ocorrer com o zetasizer, exceto em circunstâncias extremas. Se a amostra é muito concentrada, então o espalhamento de luz por uma partícula será espalhado por outra (isso é conhecido como multiespalhamento). A concentração máxima é também governada pelo ponto no qual não é mais permitido que a amostra se difunda livremente (interações entre partículas) [ALLEN, 1992].

A Tabela 4 pode ajudar na hora de determinar a concentração máxima e mínima para diferentes tamanhos de partícula. Esses valores são aproximados para amostras com densidade próxima de 1 g/cm³, e onde as partículas têm uma diferença razoável no índice de refração para o dispersante.

Tabela 4. Concentrações mínimas recomendadas para análise de tamanho de partícula [JILLAVENKATESA *et al.*, 2001].

Tamanho de partícula	Concentração mínima Recomendada	Concentração máxima Recomendada
< 10 nm	0,5 g/L	Somente limitada pelo material da amostra: interação, agregação, gelificação, etc.
10 nm a 100 nm	0,1 g/L	5 % em massa (assumindo a densidade de 1 g/cm ³)
100 nm a 1 µm	0,01 g/L (10 ⁻³ % massa)	1 % em massa (assumindo a densidade de 1 g/cm ³)
> 1µm	0,1 g/L (10 ⁻² % massa)	1 % em massa (assumindo a densidade de 1 g/cm ³)

Se a concentração não pode ser selecionada facilmente, várias concentrações são feitas para serem analisadas. Nesta análise pode ser determinada a massa molar (M) e o coeficiente virial (A₂) que é uma propriedade que descreve a força de interação entre as partículas e o solvente. A equação de Rayleigh é utilizada:

$$KC/R_{\theta} = (1/M + 2A_2C) P(\theta)$$

Equação 13

Onde o R_{θ} é o raio de Rayleigh, M é a massa molar da amostra, A_2 é o segundo coeficiente virial, C a concentração, P_{θ} é a dependência da intensidade do espalhamento, como foi descrito anteriormente e K é a constante ótica:

$$K = 2\pi^2/\lambda_o^4 N_A(n_o d_n/d_c)^2 \quad \text{Equação 14}$$

Onde N_A é a constante de Avogadro, λ_o número de onda do laser do equipamento, n_o é o índice de refração do solvente e d_n/d_c é o incremento diferencial do índice de refração. Então, o gráfico de concentração (C) versus velocidade de espalhamento (K/CR_{θ}) determina a massa molar que é o ponto que intercepta o eixo x [ZETASIZER, 2005].

Outras considerações são feitas para partículas menores do que 10 nm, o maior fator na determinação da concentração mínima é a quantidade de luz espalhada que a amostra gera. Na prática, a concentração deve gerar uma velocidade de contagem mínima de 10.000 fótons por segundo (10 Kcps) em excesso de espalhamento do dispersante. Uma concentração máxima não existe, entretanto, as propriedades da amostra determinam o valor máximo. É importante considerar que um gel é inapropriado para medidas em equipamentos cujo princípio seja espalhamento de luz dinâmico. O mesmo ocorre quando na solução há interação entre partículas, pois a constante de difusão das partículas geralmente muda, levando a resultados incorretos [ZETASIZER, 2005].

Sempre para partículas grandes, a concentração mínima é efetiva na quantidade de luz espalhada. O efeito de floculação deve ser levado em conta. Essas floculações não são bem assumidas pelo método de calculo usado ou geralmente é mal interpretado como partículas maiores contidas na amostra. A concentração máxima para partículas grandes é determinada pela tendência a causar múltiplos espalhamentos [ZETASIZER, 2005].

Todos os líquidos usados para a análise devem ser filtrados antes de serem utilizados para evitar contaminação da amostra. O tamanho do poro do filtro deve ser escolhido com cuidado, visto que se uma amostra é de 10 nm então uma partícula de poeira de 50 nm será um contaminante na dispersão. Dispersões

aquosas podem ser filtradas em membranas de 0,2 μm . A contaminação por poeira é um fator que interfere, pois a quantidade de luz espalhada aumenta com a quantidade de poeira na dispersão [JILLAVENKATESA *et al.*, 2001].

Alguns autores utilizam ultrassom para remover bolhas de ar ou destruir aglomerados. Entretanto isto deve ser aplicado cuidadosamente para que não haja dano às partículas originais formadas [TANG e LIM, 2003]. Limites para o uso de ultrasonicadores em termos de intensidade e tempo de aplicação são fortemente dependentes da amostra. Alguns materiais podem ser forçados a agregar com o uso do ultrassom, emulsões e lipossomas não devem ser sonicados [SMITH *et al.*, 2009].

1.3.3 O Potencial Zeta

O fato de que as partículas de um sistema disperso possuem carga elétrica foi descoberto por F. Reuss, em 1808, utilizando experimentos simples, que envolviam a aplicação de uma diferença de potencial elétrico a sistemas contendo água e partículas sólidas eletricamente carregadas, resultando no movimento relativo entre a fase líquida e a fase sólida [VOYUTSKY, 1978].

No caso de uma dispersão de partículas eletricamente carregadas em água, ocorre uma migração destas para o eletrodo correspondente (eletroforese) e, no caso de a fase sólida ser um meio poroso fixo, há uma migração do líquido na direção oposta (eletrosmose). A força motriz para o movimento relativo entre as fases é a força elétrica que surge pela aplicação do potencial elétrico [LIMA *et al.*, 2007c].

Um fenômeno inverso à eletroforese ocorre na sedimentação de partículas em um líquido como, por exemplo, areia em água, onde um potencial de sedimentação é gerado (efeito Dorn). Da mesma forma, um potencial de escoamento é gerado quando um líquido é forçado a passar por um meio poroso eletricamente carregado. Esses quatro fenômenos, em que se tenta remover a parte móvel da dupla camada, são denominados fenômenos eletrocinéticos. As cargas das partículas

dispersas em sistemas coloidais têm origem na formação de uma dupla camada de íons em sua superfície, devido a uma adsorção seletiva de um dos íons do eletrólito ou devido à ionização de suas molécula superficiais [LIMA *et al.*, 2008a, b].

A literatura reporta que as teorias de Helmholtz-Perrin, Gouy-Chapman, equação de Poisson-Boltzmann e teoria de Stern conseguem explicar matematicamente a formação da dupla camada elétrica para substâncias iônicas e não iônicas [LIMA *et al.*, 2007a, b].

Em uma abordagem geral e simplificada, a teoria da dupla camada elétrica, utilizada para explicar os fenômenos eletrocinéticos, supõe sistemas coloidais diluídos, com uma fase sólida suspensa em meio líquido. Esta consiste em uma camada de íons firmemente ligados à fase sólida dispersa (cargas fixas na superfície), chamados íons determinantes do potencial, e uma quantidade equivalente de íons carregados com carga oposta, os contra-íons, dispersos na fase fluida, próximos à interface, neutralizando esse excesso de cargas na superfície sólida. Os íons dispersos na fase fluida que possuam a mesma carga dos íons determinantes do potencial são chamados de co-íons. A carga da superfície influencia a distribuição dos íons em sua proximidade: os contra-íons são atraídos pela superfície e os co-íons são repelidos para longe [VOYUTSKY, 1978; LIMA *et al.* 2008c].

Dessa forma, o potencial nessa região decai com o aumento da distância da superfície até, a uma distância suficientemente grande, atingir o potencial da solução. Esse potencial é convencionado como potencial zero. Em um campo elétrico, cada partícula e os íons mais fortemente ligados à mesma se movem como uma unidade, e o potencial no plano de cisalhamento entre essa unidade e o meio circundante é chamado potencial Zeta [TECHNICAL note, 2009b].

É importante saber que o potencial Zeta é função da carga superficial da partícula, de qualquer camada adsorvida na interface com o meio e da natureza e composição do meio que a circunda. Esse potencial pode ser determinado experimentalmente e, como ele reflete a carga efetiva nas partículas, ele se correlaciona com a repulsão eletrostática entre elas e com a estabilidade da suspensão. O potencial Zeta é um indicador útil dessa carga e pode ser usado para prever e controlar a estabilidade de suspensões ou emulsões coloidais [ZETASIZER,

2005]. A Figura 19 mostra a representação da formação da dupla camada elétrica e do potencial Zeta para uma partícula carregada negativamente.

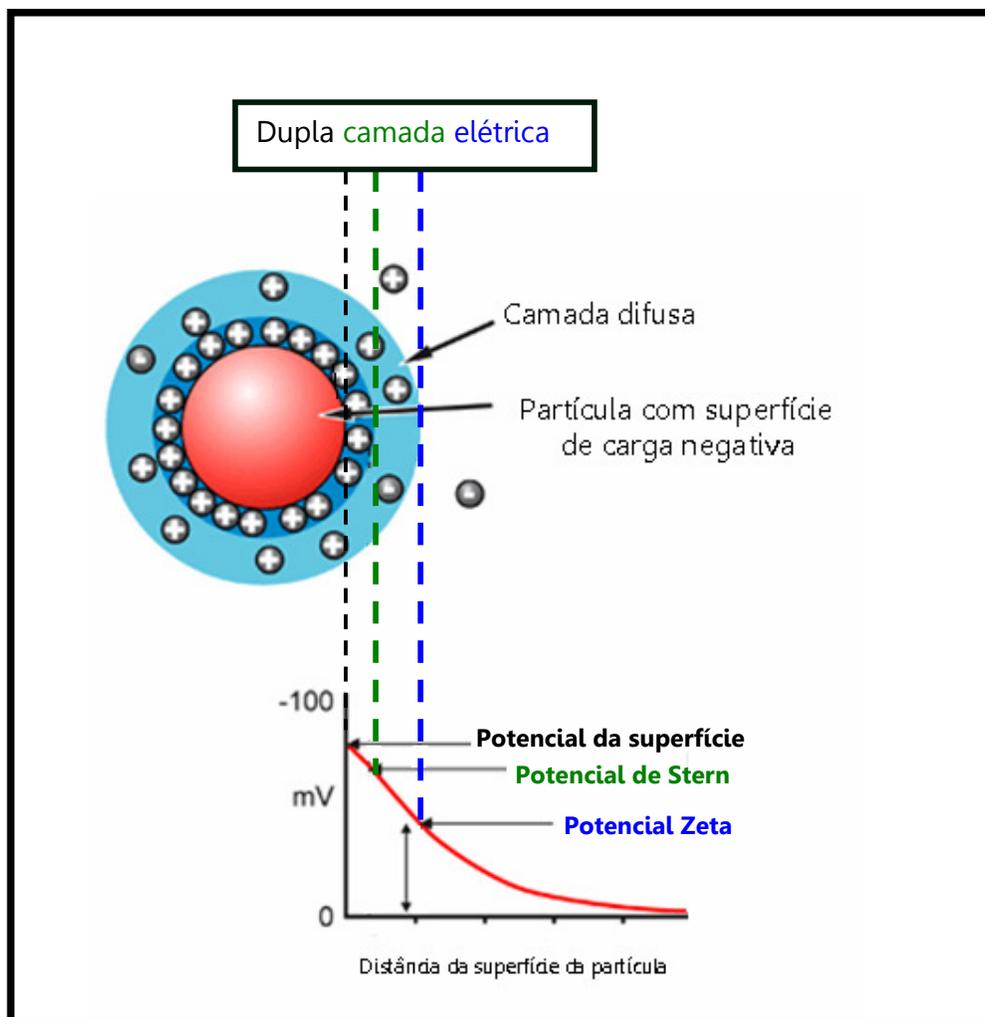


Figura 19. Esquema de uma partícula coloidal, carregada eletricamente [ZETASIZER, 2005].

O potencial Zeta pode ser influenciado por mudanças de pH, condutividade ou mudanças na concentração. Medidas de potencial Zeta de uma partícula em suspensão em função desses parâmetros dão informações importantes para formulação de um produto, como por exemplo, conhecer sua máxima estabilidade ou determinar as condições ideais para floculação. A espessura da dupla

camada depende da concentração dos íons e de sua valência, podendo ser calculada pela força iônica do meio [APPLICATION note, 2009b].

Quanto maior o potencial Zeta, mais provável é que a suspensão seja estável, pois as partículas carregadas se repelem umas às outras e essa força supera a tendência natural à agregação. A medida do potencial Zeta é com frequência a chave para compreender processos de dispersão e agregação em aplicações tão diversas quanto a purificação de água, moldes cerâmicos ou a formulação de tintas e cosméticos [TECHNICAL note, 2009a].

A estabilidade das nanopartículas em suspensão irá depender do balanço entre as forças repulsivas e atrativas existentes no meio. A magnitude da medida de potencial Zeta é um indicativo da força repulsiva que está presente e pode ser usada para prever a estabilidade do material. Em geral, a linha divisória entre partículas estáveis e instáveis está em - 30,0 ou +30,0 mV. Partículas com potenciais maiores em módulo são consideradas estáveis. Valores de potenciais iguais a zero (ponto isoelétrico) indicam suspensões completamente instáveis [APPLICATION note, 2009a].

1.4 A malária

A malária é uma doença infecciosa febril aguda que representa um grave problema, não só em termos de saúde pública, mas também ao nível de desenvolvimento cultural e sócio-econômico das regiões tropicais do planeta. Segundo a OMS, até 2005, anualmente é registrado cerca de 300 milhões de novos casos de malária aguda em todo mundo, dos quais aproximadamente três milhões culminam na morte [VALE, MOREIRA e GOMES, 2005]. Cerca de 60 % de novos casos de malária registram-se na África, onde ocorrem 90 % de casos fatais de malária humana, 75 % dos quais incidindo sobre crianças com idades inferiores a 5 anos [HIWAT *et al.*, 2010].

No Brasil, 99 % dos casos de malária se concentram na região da Amazônia Legal que é composta pelos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Mato Grosso e Maranhão onde, no ano de 2003, notificaram-se

407.995 casos da doença. A malária é transmitida pela fêmea do mosquito *Anopheles*, destacando pela sua importância o *Anopheles darlingi* ao hospedeiro humano, e são quatro as espécies de parasitas responsáveis pela doença (*Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*) sendo que, em termos de virulência e mortalidade, a estirpe *falciparum* é a mais agressiva de todos os casos registrados [PAN, ERLIEN e BILSBORROW, 2010; SILVA *et al.*, 2010; MAHEU-GIROUX, *et al.*, 2010]. O ciclo de vida do *Plasmodium*, como mostrado na Figura 20, inicia-se com a picada de um mosquito na pele humana, sendo os esporozoítos do parasita transferidos para a corrente sanguínea [BRAZ, ANDREOZZI e KALE, 2006].

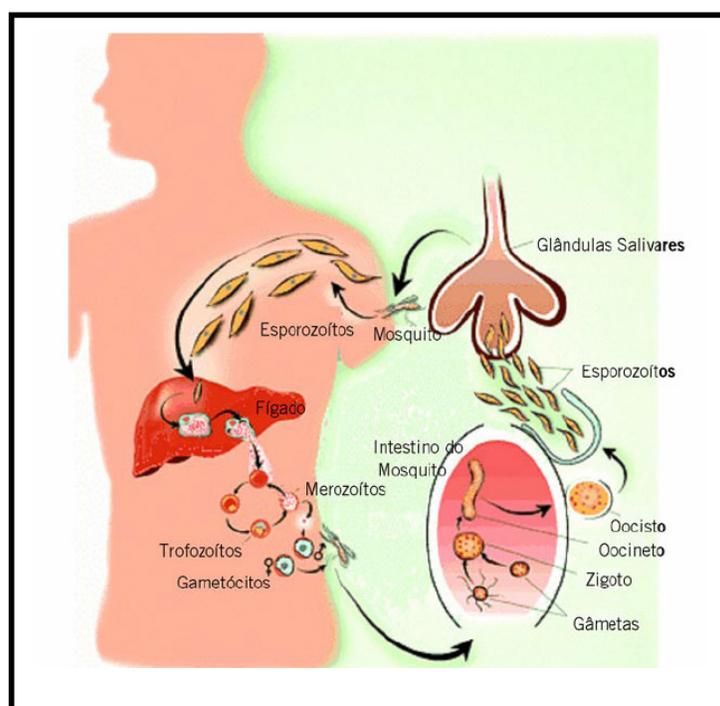


Figura 20. Ciclo de vida do parasita da malária humana [VALE, MOREIRA e GOMES., 2005].

Uma pequena porção de merozoítos sanguíneos sofre diferenciação em gametócitos feminino e masculino, que são transmissíveis ao mosquito quando este tipo pica o indivíduo infectado. No interior, do intestino do mosquito, os gametócitos femininos dividem-se em macrogametas e os masculinos em 4 a 8 microgametas flagelados, dando-se início a reprodução sexuada do parasita. Estes

gametas fundem-se e formam zigotos, que se transformam em oocinetos móveis. Estes penetram na parede do intestino e saem do seu interior através da membrana externa, sob a forma de oocistos. A divisão assexuada dentro desses oocistos produz milhares de esporozoítos que serão liberados para as glândulas salivares do mosquito.

Em humanos, os esporozoítos atingem a corrente sanguínea, chegam ao fígado, invadem os hepatócitos iniciando a infecção [CUNICO *et al.*, 2008]. Dentro dos hepatócitos, os esporozoítos se diferenciam em esquizontes e, através da reprodução assexuada (esquizogonia tecidual) são produzidos milhares de progênies (merozoítos) que, ao romper a célula do fígado, entram na circulação sanguínea e invadem os glóbulos vermelhos (hemácias, eritrócitos). Uma vez dentro da célula, os merozoítos começam a crescer para a forma trofozoíta (semelhante a um anel), que cresce e se divide produzindo novos merozoítos. Estes se dividem assexuadamente no interior dos eritrócitos (reprodução eritrocítica) e eventualmente se rompem liberando mais merozoítos na corrente sanguínea. É nesta fase que há produção de citocinas e o aparecimento dos sintomas da Malária [WHITE, 2004]. A maioria dos merozoítos infecta novas hemácias e perpetua seu ciclo de reprodução assexual [URSOS e ROEPE, 2002].

É importante citar que, quando a forma merozoíta se reproduz assexuadamente dentro das hemácias, os parasitas necessitam de uma enorme quantidade de nutrientes e, por terem capacidade limitada de sintetizar aminoácidos, eles suprem seus requerimentos pela degradação da hemoglobina humana. Mais de 80% das hemoglobinas de uma célula infectada podem ser degradadas dessa forma. Durante este processo, que ocorre dentro do vacúolo digestivo do parasita, há também a liberação do grupo heme ou ferriprotoporfirina IX (Fe (III) PPIX) que é tóxico ao parasita, devido à sua capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio. Para evitar sua toxicidade, a Fe (III) PPIX é agregada, pelo parasita, em um pigmento cristalino, insolúvel e não tóxico chamado hemozoína [BRAZ, ANDREOZZI e KALE, 2006].

1.4.1 Cloroquina

A grande complexidade do ciclo de vida do parasita explica a grande dificuldade de se desenvolver uma terapia antimalárica eficaz e segura. A eficácia destes podem ser melhorada através da combinação com outros antimaláricos, em especial com antifolatos [O'NEILL *et al.*, 1998]. O desenvolvimento de um fármaco antimalárico ideal também pressupõe a existência de uma atividade antiparasitária ótima com um mínimo de efeitos colaterais. A cloroquina (CQ) que é da classe das 4-aminoquinolinas, ou também conhecida como 7 - Cloro - 4 - [4 - (dietilamino) - 1 - metilbutil - amino] quinolina . 2H₃PO₄ (Figura 21) é um dos quimioterápicos mais importantes da história da indústria Químico-farmacêutica.

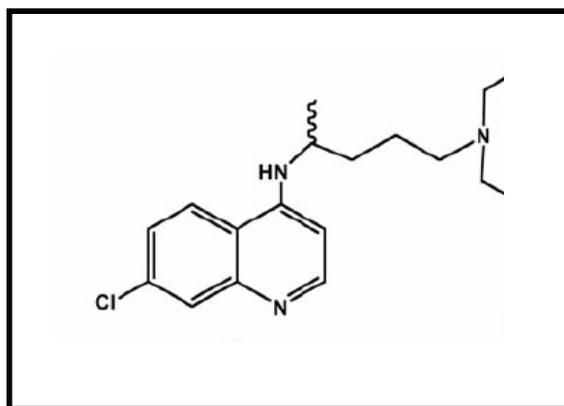


Figura 21. Estrutura representacional da molécula da 7 - Cloro - 4 - [4 - (dietilamino) - 1 - metilbutil - amino] quinolina.

A CQ é uma base fraca e quando na forma de sal de fosfato é bem solúvel em água, menos solúvel em etanol e pouco solúvel em solventes orgânicos como tetrahidrofurano, acetonitrila e acetona. Sua solubilidade aumenta à medida que a temperatura aumenta de 298,2 para 333,2 °K [DANESHFAR e VAFAFARD, 2009]. Ela é um potente esquizotocida sanguíneo, eficaz contra as formas eritrocíticas de todas as estirpes de Plasmodia. No entanto, não é ativa contra esporozoítos ou hipnozoítos hepáticos, uma vez que o alvo terapêutico das 4-aminoquinolinas é o processo de

destoxificação do grupo heme resultando da degradação da hemoglobina do hospedeiro [VALE, MOREIRA e GOMES, 2005].

O principal problema em administrar a cloroquina em pacientes com malária é que sua concentração terapêutica é muito próxima a sua concentração tóxica. Devido a janela terapêutica da cloroquina ser bem estreita o ideal é que ela seja administrada por liberação controlada.

1.5 Polímeros naturais

1.5.1 Angico

A espécie *Anadenanthera macrocarpa* Benth (angico vermelho) é uma planta típica do Nordeste do Brasil [BARBOSA, 1991], apresenta expressiva regeneração natural, ocorrendo indiferentemente em solos secos e úmidos; é tolerante a solos rasos, compactados, mal drenados e até encharcados, de textura média a argilosa. Apresenta crescimento de moderado a rápido, podendo atingir produtividades de até 25,55 m³.ha⁻¹.ano [CARVALHO, 2003]. De acordo com LORENZI [2000], a característica de rápido crescimento a torna interessante para ser aproveitada em reflorestamentos de áreas degradadas. A espécie possui, ainda, outras utilidades, servindo para construção civil, produção de carvão, etc. [GONÇALVES *et al.*, 2008]. Os índios utilizavam o pó das sementes torradas de angico como inebriante; aspirado pelo nariz como se faz com o rapé produzindo delírios e sensações diversas tidas como agradáveis. O tratamento do pó com água fervendo produz espuma abundante; acreditando ser a saponina o princípio ativo deste pó. O uso provoca escoriações no septo nasal e nas mucosas de boca [FREISE, 1993].

A goma e a casca do angico são utilizadas na medicina popular. A casca do angico é inodora e de sabor adstringente e um tanto amarga [COIMBRA, 1942]. Quanto as suas propriedades terapêuticas, a casca é usada como tônico amargo,

depurativo, hemostático. Usa-se nas contusões, inapetência, tuberculose, hemorragia uterina, dismenorréias, metrorragias e hemorragias em geral. O xarope da casca é empregado no tratamento das vias respiratórias. A casca também é utilizada em curtumes, pois possui tanino, o qual é utilizado para curtir couro. No interior do Brasil, a casca também é utilizada como formicida [LORENZI, 1998].

A goma do angico tem uma coloração amarela logo que extraída do caule e depois de algum tempo torna-se avermelhada. Alguns trabalhos citam que a goma isolada tem composição média de 61,9% de arabinose, 22% de galactose, 5,9% de ácido urônico e 3% de ramnose [RODRIGUES e PAULA, 1998; PAULA, BUDD e RODRIGUES, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 2007; EIRAS *et al.*, 2007]. Para o angico branco, observa-se composição semelhante, porém com valores médios de ácido urônico 50% maior [DELGOBO *et al.*, 1998; SILVA, RODRIGUES e PAULA, 1998; MORETÃO *et al.*, 2004]. É expectorante, usada nas afecções bronco-pulmonares, tosse, bronquites, asma e faringite. Segundo escrito por LORENZI, [1998] seu uso também é indicado em casos de coqueluche. Apesar do uso terapêutico, a goma do angico tem sido investigada para outros fins, quando reticulada com epicloridrina esses géis de angico têm grande capacidade de retenção de metais como chumbo, cobre e cádmio podendo ser reutilizados bem como o metal adsorvido pode ser recuperado [OLIVEIRA, 2005].

1.5.2 Quitosana

Quitosana é um copolímero de β -[1 \rightarrow 4]-2-acetoamido-2-desoxi-D-glucopiranosose e 2-amino-2-desoxi-D-glucopiranosose. Ela é obtida principalmente da desacetilação alcalina da quitina de exoesqueleto de crustáceos, tais como: camarões e caranguejos [MUZZARELI, 1973].

A estrutura química da quitina e quitosana é bastante semelhante sendo que o fator que faz a distinção entre as duas é o número de unidades acetiladas (Figura 22). Se a estrutura é totalmente acetilada ou até 80% acetilada, o

polissacarídeo será denominado de quitina. Para cadeias com porcentagem de acetilação menor que 80% a amostra é denominada de quitosana [ABRAN e HIGUEIRA, 2004].

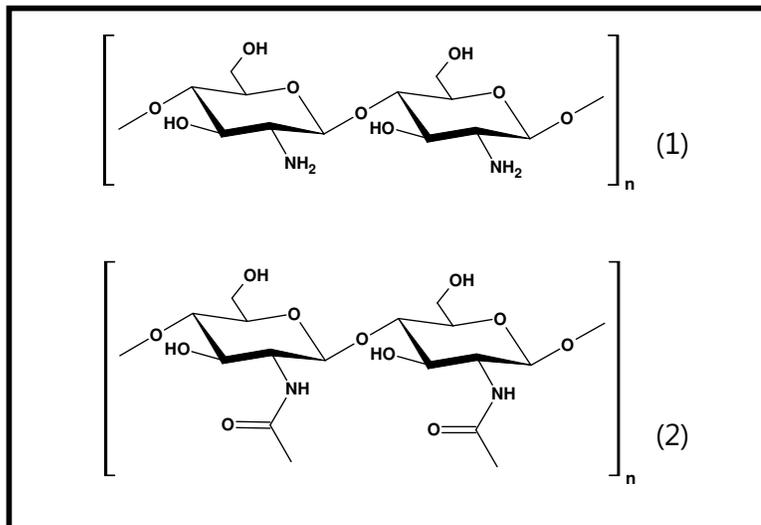


Figura 22. Estrutura representacional de Haword da quitosana totalmente desacetilada (1) e quitina (2)

A conformação em solução, as propriedades físico-químicas e biológicas da quitosana dependem de parâmetros como a massa molar, grau de desacetilação (GD) e distribuição dos tipos de unidades (acetilglucosamina e glucosamina) constituintes da cadeia. A massa molar e o GD podem ser estabelecidos por condições escolhidas durante a etapa de obtenção da quitosana. No entanto podem ser modificados em outros estágios; o GD pode ser diminuído por reacetilação [SORLIER *et al.*, 2001] e a massa molar pode ser reduzida por despolimerização ácida [DONG *et al.*, 2001].

2.1 Sintetizar nanopartículas de goma do angico por complexação polieletrólítica:

Caracterizar as nanopartículas formadas por infravermelho, potencial Zeta, tamanho de partícula e AFM

Determinar a influencia da massa molar de quitosana, densidade de carga do angico, tempo de armazenamento em dispersão e variação da razão de cargas n+/n- em meio aquoso

Investigar a incorporação de cloroquina (fármaco antimalárico) em nanopartículas CMAQT0,63;

Testar a liberação *in vitro* de cloroquina incorporada no complexo polieletrólítico em água e tampão fosfato pH 7,4 0,1 M;

2.2 Sintetizar nanopartículas de goma do angico por copolimerização por enxertia com ácido acrílico:

Caracterizar as nanopartículas por infravermelho, potencial Zeta, tamanho de partícula;

Investigar a incorporação de albumina sérica bovina em nanopartículas obtidas para nanopartículas NPGA1b;

Testar a liberação *in vitro* de BSA em nanopartículas de copolimerização por enxertia no tampão fosfato pH 7,4 0,1 M.

3.1 Síntese de nanopartículas por complexação polieletrólítica

Quitosanas de massa molar de $4,6 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ (QTa) e $7,8 \times 10^4 \text{ g.mol}^{-1}$ (QTb), grau de desacetilação $81 \pm 2 \%$ e $\text{pKa} = 6,2$ foram cedidas pela Polymar Ind. Comp. Imp. Ltda Ciência e Nutrição S/A (Fortaleza, Ce – Brasil) e por Quitoquímica (Chile), respectivamente. O polissacarídeo da *Anadenanthera macrocarpa* "angico" foi extraído de árvores do interior do Ceará, município de Tauá no ano de 2008, isolado com teor de ácido urônico de $7 \pm 0,5 \%$, massa molar de $3,7 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$ e em seguida carboximetilado com dois graus de substituição (GS) distintos de 0,20 (MM = $1,5 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$) e 0,63 (MM = $1,7 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$) [OLIVEIRA *et al.*, 2007].

Soluções de angico (GA) e carboximetilado (CMA) com grau de substituição de 0,20 e 0,63 foram preparadas nas concentrações de $1,5 \times 10^{-3}$ a $5,9 \times 10^{-2} \text{ g.mol}^{-1}$ (0,025 a 1 %) controlando a força iônica para $\mu = 0,05$ e quitosana $1,5 \times 10^{-3}$ a $6,0 \times 10^{-2} \text{ g.mol}^{-1}$ (0,025 a 1 %) em ácido acético 1 %. As soluções foram previamente filtradas em membrana millipore 0,22 μm . A síntese dos complexos polieletrólíticos aconteceu pela adição do poliânion ao polication (GAQT ou CMAQT) ou adição do polication ao poliânion (QTGA ou QTCMA) através de uma bureta por gotejamento na vazão de 3 mL/minuto sob agitação lenta de 200 rpm para as razões de cargas dos polieletrólitos $n+/n-$ que variaram de 0,1 a 20 em triplicata. A densidade de carga da goma do angico foi determinada pela titulação potenciométrica e da quitosana por ressonância magnética. Após a síntese, as nanopartículas foram secas por *spray dryer*. A análise estatística foi feita através do programa PRISM.

3.1.2 Incorporação de cloroquina

A incorporação da cloroquina foi realizada para os CPEs de CMA0,63QTa na razão de cargas $n+/n- = 4$ em triplicata. Foram preparadas soluções de QTa ($1,5 \times 10^{-3} \text{ g.mol}^{-1}$) com cloroquina (0,1 %) em ácido acético 1 % e outra solução de goma do angico carboximetilada com grau de substituição de 0,63 na concentração de 6,7

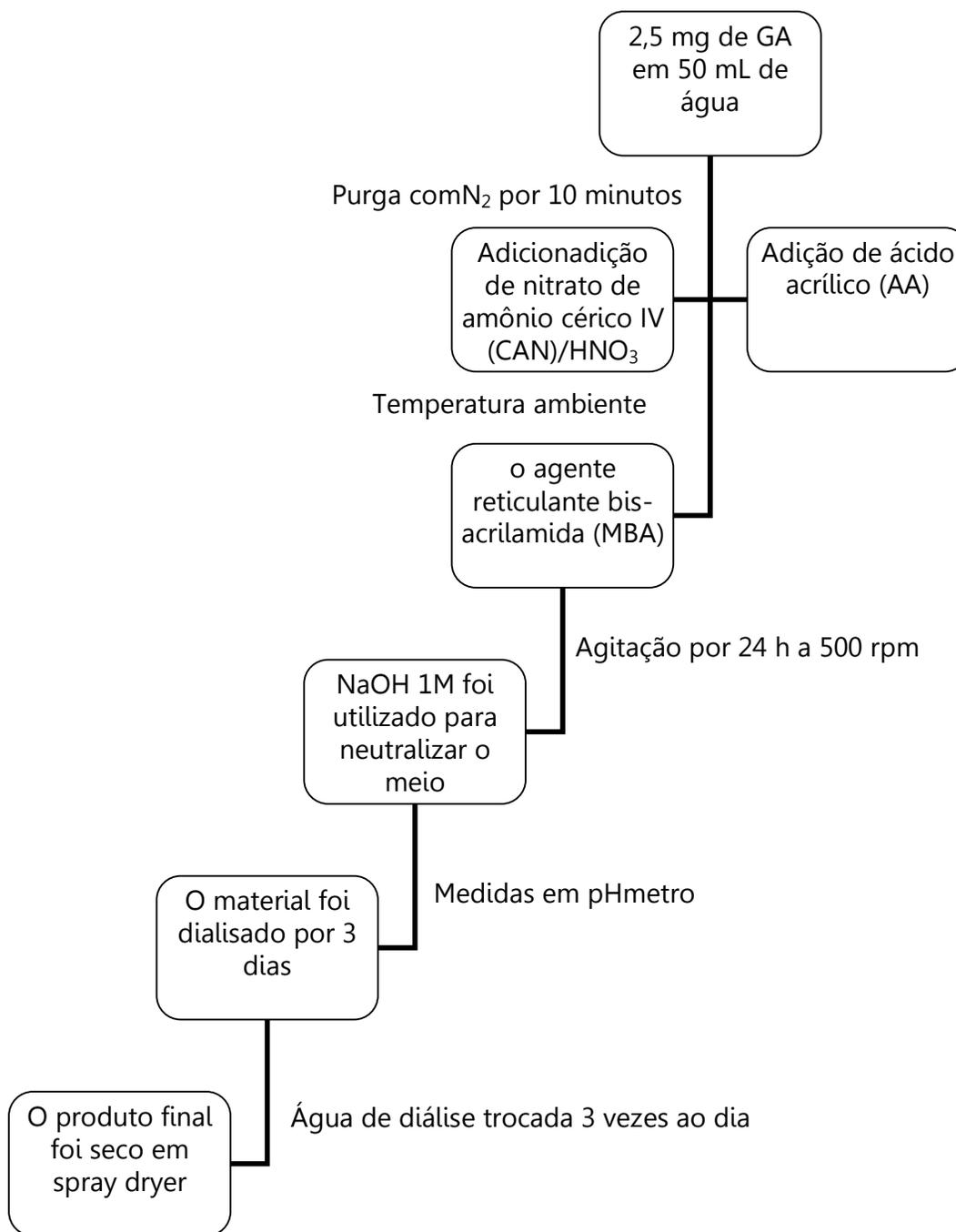
$\times 10^{-5}$ g.mol⁻¹. A solução de CMA0,63 foi gotejada à solução de quitosana e cloroquina lentamente numa vazão de 3 mL/minuto sob agitação de 200 rpm [SCHATZ *et al.*, 2004b]. A solução ficou sob agitação no período de 24 horas. Em seguida o material foi centrifugado por 3 h em uma velocidade de 36.000 rpm. O sobrenadante foi analisado em um espectrofotômetro de UV-Vis em $\lambda = 220$ nm para a determinação da quantidade de cloroquina não incorporada.

3.1.3 Ensaio de liberação *in vitro*

As nanopartículas secas (10 mg) foram dispersas em solução tampão fosfato pH 7,4 0,1M e colocadas em membranas de 14 kD, em seguida a membrana foi imersa em 60 mL do mesmo tampão. O experimento permaneceu sob temperatura de 37 °C por 30 dias. Curvas de calibração para a cloroquina (CQ) em água $Y = 0,00197 + 58,0X$ e em tampão fosfato pH 7,4 $Y = 0,1037 + 0,06X$ foram obtidas com índice de correlação de 0,999 e 0,997 respectivamente. O experimento foi feito em triplicata.

3.2 Síntese de nanopartículas por enxertia de ácido acrílico

Nanopartículas de angico (GA) foram sintetizadas por copolimerização de ácido acrílico (AA) via reação de enxertia: 2,5 mg do polissacarídeo foram dissolvidos em 50 mL de água a temperatura ambiente. Em seguida a solução foi purgada com nitrogênio por 10 minutos, logo após foi adicionada à solução certa quantidade de nitrato de amônio cérico IV (CAN)/HNO₃ e ácido acrílico (AA), sucessivamente. Após 1 hora sob agitação foi adicionado o agente reticulante bis-acrilamida (MBA) e a reação permaneceu em agitação por 24 horas. NaOH 1M foi utilizado para neutralizar o meio. O esquema abaixo sumariza todo o procedimento.



O material foi dialisado por 3 dias para retirar o excesso de sais formados e monômeros que não foram enxertados [TANG, DOU e SUN, 2006]. O produto final foi seco em spray dryer. Para investigar o efeito da concentração de GA varias condições reacionais foram realizadas como mostrado na Tabela 5. Para o cálculo do

número de mols de goma do angico, utilizou-se a massa molar da unidade glicosídica (UG) da arabinose, visto que este monômero é o constituinte majoritário da goma do angico.

Tabela 5. Condições reacionais para síntese de nanopartículas à base de ácido acrílico (AA).

Amostras	Razão molar		
	UG*/AA	AA/CAN	AA/MBA
NPGA1	1,0	7	10
NPGA1b	1,0	10	10
NPGA2	2,0	7	10
NPGA3	3,0	7	10
NPGA4	4,0	7	10

*UG – unidade glicosídica.

Para o cálculo de rendimento da síntese de nanopartículas à base de AA foi considerada a massa do produto final seco (M_s), e a massa total de reagentes utilizados na síntese (M_t).

$$rend. = \frac{M_s}{M_t} \times 100\%$$

Equação 15

3.2.1 Incorporação de albumina sérica bovina

A incorporação de BSA (albumina sérica bovina) foi realizada através da dispersão das nanopartículas NPGA1b em solução de BSA 0,1 % sob agitação por 24 h. A razão mássica NPGA1b/BSA foi de 1/1. A dispersão foi centrifugada por 3 h em 36.000 rpm e o resíduo seco em temperatura de 50 °C. a solução centrifugada foi analisada em um espectrofotômetro UV-Vis modelo HITACHI em $\lambda = 280$ nm. A curva de calibração de BSA utilizada para determinar a concentração foi $Y = 0,00402 + 625,4 X$ com índice de correlação de 0,998. O experimento foi feito em triplicata.

3.2.2 Teste de liberação *in vitro* de BSA através de NPGA1b

Nanopartículas NPGA1b (10mg) foram dispersas em 10 mL de tampão fosfato pH 7,4 0,1 M em membranas de 14 KD, em seguida a membrana foi imersa em solução do mesmo tampão. A temperatura foi controlada (37 °C) sob agitação de 50 rpm por 30 dias. Alíquotas de 3 mL eram retiradas e o tampão adicionada para que o volume permanecesse constante. Todo este procedimento foi feito em triplicata. A análise espectrofotométrica foi realizada em um equipamento UV-Vis modelo HITACHI em $\lambda = 280$ nm.

3.3 Caracterização dos produtos formados

3.3.1 Infravermelho

Os espectros de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) foram obtidos em espectrofotômetro modelo 8300 da Shimadzu entre 400 e 4000 cm^{-1} . As amostras foram analisadas por absorbância em pastilhas de KBr.

3.3.2 Análise do tamanho da partícula e potencial Zeta

As soluções foram secas por *spray dryer* modelo BUCHI mini B-290 com temperatura de entrada de 160 °C e de saída de 70 °C, vazão de alimentação de 6 mL/minuto, aspiração de 35 m^3/h e vazão de ar de 84 L/h. Foram redispersas em água para serem analisadas em um *zeta sizer* modelo Malvern 3600 com feixe de luz

vermelha contínua e comprimento de onda de 633 nm. O modelo matemático de análise foi por volume em triplicata.

3.3.3 Análise morfológica por AFM

As nanopartículas GAQT dispersas em água foram gotejadas em uma lâmina de Si/SiO₂ e seca em temperatura ambiente. As micrografias foram obtidas em um equipamento PicoSPM-LE, modo de contato intermitente com cantilever com frequência de ressonância de aproximadamente 320 kHz.

4.1 Formação de nanopartículas de goma do angico e quitosana por complexação polieletrólítica.

Os Complexos polieletrólíticos foram sintetizados por adição do poliânion ao polication por gotejamento nas razões de carga n^+/n^- de 0,1 a 20, sendo utilizados volumes previamente calculados. As razões de cargas n^+/n^- foram calculadas tendo como base os grupos NH_2^+ da quitosana e COO^- da goma do angico (GA). O grau de desacetilação da quitosana foi determinado por ressonância magnética nuclear obtendo um grau de 81 %, já o teor de ácido urônico da goma do angico foi determinado por titulação condutométrica obtendo valor de 7 %.

As soluções precursoras tinham $\text{pH} = 5,8$ e após a síntese este pH ficou em 6,0, lembrando que o pKa da quitosana está em torno de 6,2, indicando que, nas soluções de partida, os grupos amina não estão completamente protonados, este comportamento não ocorre para a goma do angico, onde seu pKa está em torno de 5,2, indicando que seus grupos COOH estão totalmente ionizados ($-\text{COO}^-$). Contudo, pelo fato dos grupos amino de QT não estarem completamente protonados, parece não interferir na formação do CPE pelo fato da goma do angico ter uma densidade de carga muito menor. O espectro de infravermelho do produto final indicou que há interação entre NH_2^+ e COO^- devido a presença de uma nova banda em 1564 cm^{-1} .

A concentração de $1,5 \times 10^{-3} \text{ g.mol}^{-1}$ (QT e GA) foi utilizada para a maioria dos testes. Não foi observada a olho nu a presença de fungos nem efeito de floculação para nanopartículas, já formadas, em dispersão durante 30 dias. Como as soluções tinham aparência translúcida até mesmo para soluções de 1 %, o efeito de agregação como também floculação foi determinada pela variação do tamanho da partícula em função do tempo.

4.1.1 Análise de Infravermelho

A Figura 23 mostra os espectros de infravermelho do complexo de goma do angico com teor de 7 % de ácido urônico e quitosana de alta massa molar (QTa) com grau de desacetilação de 81 % além do complexo polieletrólítico de GAQTa.

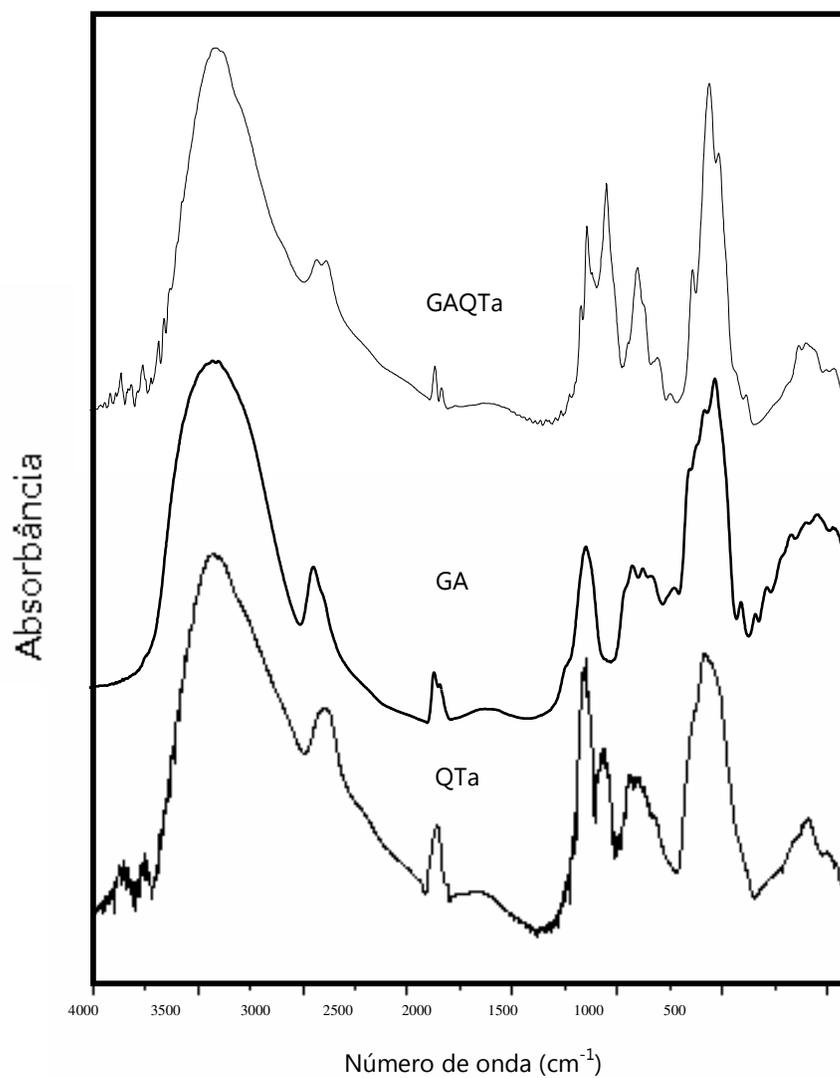


Figura 23. Espectro de infravermelho para GA, QTa e do complexo polieletrólítico (GAQTa) na forma de sal de sódio.

No espectro da goma de angico tem-se uma banda em 3379 cm^{-1} devido a vibração de deformação linear O-H, um pequeno pico em 2933 cm^{-1} é atribuído a vibração de deformação linear de C-H, e a absorção de 1649 cm^{-1} é devido a vibração de O-H da molécula de água [ZOHURIAAN e SHOKROLAHI, 2004]. Uma forte banda na região entre $1150 - 1030\text{ cm}^{-1}$ é referente ao estiramento vibracional de C-O-C referente a ligação glicosídica e à deformação angular do O-H do álcool. Bandas específicas de quitosana aparecem em 1652 e 1570 cm^{-1} correspondendo a deformação de amida I e NH_3^+ respectivamente. Após a complexação, a maioria das bandas características de quitosana e goma do angico sofrem sobreposição. Entretanto ocorre um aumento e um pequeno deslocamento de 6 cm^{-1} na região de 1564 cm^{-1} característico do grupo amina interagindo com o grupo carboxilato da goma do angico. Este comportamento foi observado por PAULA, GOMES e PAULA, [2002], MACIEL *et al.*, [2005] e GAO *et al.*, [2006].

4.1.2 Avaliação dos parâmetros que influenciam o tamanho das nanopartículas de goma do angico e quitosana

4.1.2.1 Efeito da concentração e proporção de quitosana e angico

O efeito da concentração sobre o tamanho de partícula foi realizado pela adição de soluções polieletrólíticas de goma do angico (GA) em quitosana (QTa) utilizando concentrações iguais para ambos os polissacarídeos. As concentrações investigadas foram de $1,5$ e $6,0 \times 10^{-3}\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Após a síntese, as amostras foram mantidas em repouso por 24 horas e em seguida analisadas em relação ao diâmetro por volume, índice de polidispersão (IPD) para várias razões de cargas (Tabela 6).

Uma avaliação estatística foi feita através do programa PRISM. O programa compara as variações de tamanho das repetições como também as variações de uma razão para outra. O resultado é obtido por valores menores ou maiores que P.

Quando a análise indica $P < 0,05$ os valores são significativos e quando $P > 0,05$ não são significativos. No caso do resultado ser significativo, o programa mostra que pode ser pouco significativo (* $P < 0,05$), significativo (** $P < 0,05$) e muito significativo (*** $P < 0,05$).

Tabela 6. Efeito da concentração de partida: GA e QT $1,5 \times 10^{-3} \text{ g.mol}^{-1}$ e GA e QT $6,0 \times 10^{-2} \text{ g.mol}^{-1}$.

n+/n-	GA em QTa			GA em QTa		
	Diâmetro (nm)	% volume	IPD	Diâmetro (nm)	% volume	IPD
20	32,5 ± 0,7	95,6	0,442	41,9 ± 1,9	98,9	0,318
15	29,4 ± 1,2	99,8	0,299	40,0 ± 2,1	95,0	0,485
10	21,9 ± 1,0	99,5	0,376	33,2 ± 0,2	100,0	0,249
8	22,6 ± 3,2	96,2	0,551	28,9 ± 1,2	99,0	0,415
6	20,8 ± 2,6	97,0	0,526	21,4 ± 0,8	99,8	0,327
4	21,6 ± 1,8	95,0	0,470	25,2 ± 0,4	50,0	0,447
2	20,9 ± 2,5	98,0	0,409	17,4 ± 3,8	97,5	0,425
1	20,6 ± 3,3	99,0	0,388	22,3 ± 0,9	96,4	0,487
0,8	17,4 ± 3,9	100,0	0,138	21,9 ± 1,1	100,0	0,875
0,6	19,9 ± 2,8	96,7	0,536	18,4 ± 4,1	100,0	0,667
0,4	18,8 ± 3,1	99,9	0,180	20,6 ± 0,7	97,5	0,494
0,2	18,7 ± 4,7	99,8	0,253	21,1 ± 1,3	99,9	0,379
0,1	19,1 ± 1,7	100,0	0,276	23,2 ± 0,9	99,8	0,387

O tratamento estatístico mostra que apesar dos tamanhos não sofrerem variações consideráveis, o tamanho de partícula para os PECs nas concentrações de $1,5 \times 10^{-3} \text{ g.mol}^{-1}$ e $6,0 \times 10^{-2} \text{ g.mol}^{-1}$ foram significativos (** $P < 0,05$).

A Figura 24 mostra que os CPEs formados apresentam tamanho de partícula semelhante para razões de carga n+/n- entre 0,1 a 1 e crescente a partir da razão 2, quando há excesso de cargas de quitosana. O aumento da concentração de ambos os polieletrólitos (GA e QT) de $1,5 \times 10^{-3}$ para $6,0 \times 10^{-2} \text{ g.mol}^{-1}$ resulta em uma diminuição do tamanho de partículas. Este comportamento pode ser devido a compensação de cargas provocadas por mudanças conformacionais dos polieletrólitos. Estes resultados diferem de alguns dados reportados na literatura, onde o tamanho da partícula é diretamente proporcional a concentração dos

poliíons [HAJDU, 2008]. SCHATZ *et al.*, [2004b] observaram que o aumento na concentração de sulfato de dextrana e quitosana na solução favorece ao aumento no tamanho das partículas do CPEs devido a incorporação de íons adicionais existentes em solução.

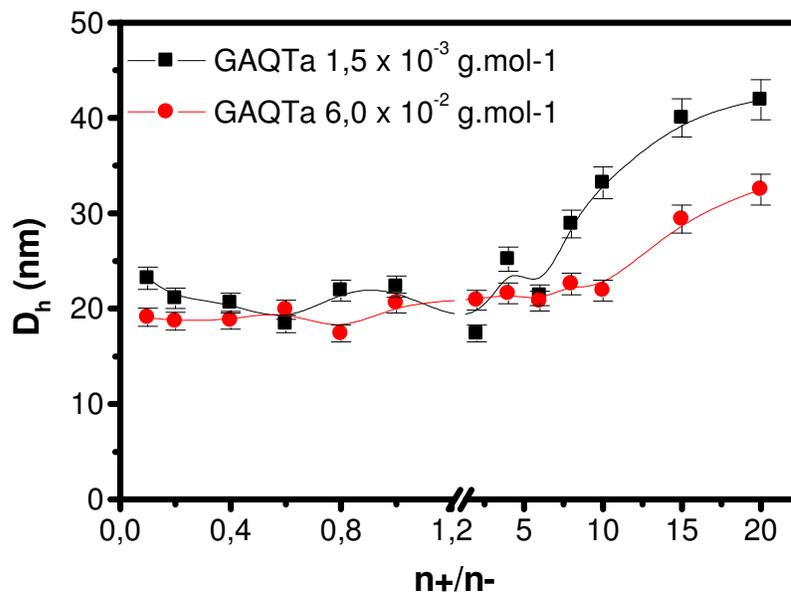


Figura 24. Diâmetro hidrodinâmico (D_h) em função da concentração dos polieletrólíticos de GA e QTa e da razão de cargas n^+/n^- para os PECs sintetizados pela adição de GA em QT

Nenhuma flocculação foi observada nas razões n^+/n^- investigadas até 24 h, porém para os complexos de sulfato de dextrana e quitosana a flocculação ocorre na razão próxima de 1 [SCHATZ *et al.*, 2004a; SCHATZ *et al.*, 2005]. Os autores constataram que a razão onde a flocculação é observada depende das massas molares tanto da quitosana como do sulfato de dextrana. A flocculação ocorre se a massa molar do sulfato de dextrana for maior do que da quitosana. Neste estudo a massa molar de GA ($3,7 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$) é maior, entretanto sua densidade de carga (7 %) é menor em relação à quitosana [PAULA, BUDD e RODRIGUES, 1997] este fator pode ser responsável pela não flocculação no CPE de GAQTa. Outro comportamento similar foi observado para a adição de poli(ácido maléico co-propeno) (poliânion) em

cloreto de polidialildimetilamônio (polication) nas razões de 0,9 a 1,6 [BUCHHAMMER *et al.*, 2003].

SCHATZ *et al.*, [2004a] notaram que diâmetros de partículas menores que 200 nm foram observados quando a concentração de quitosana (GD = 85 % e MM = 10^5 g.mol⁻¹) é alta e a concentração do sulfato de dextrana (MM = $1,5 \times 10^6$ g.mol⁻¹) é baixa, e que concentrações para ambos polieletrólitos acima de 10^{-3} g.mL⁻¹ leva à formação de agregados. Para verificar se este comportamento também seria válido para nanopartículas formadas pela adição de GA a QT, foram sintetizadas nanopartículas utilizando diferentes concentrações de GA e mantendo a concentração de QT igual a $6,2 \times 10^{-3}$ g.mol⁻¹ na razão molar de carga (n+/n-) de 0,1, 1 e 10. A Tabela 7 apresenta os dados de tamanho de partícula e polidispersão (IPD).

Tabela 7. Efeito da concentração dos polieletrólitos de partida: GA adicionada em QTa variando a concentração de GA.

Concentração polieletrólítica (g.mol ⁻¹)	Razão molar de cargas n+/n-	Diâmetro (nm)	% volume	IPD
GA/QT 1,5 /6,2	10	30,0 ± 0,2	94,0	0,410
	1,0	36,3 ± 0,1	99,8	0,378
	0,1	26,1 ± 0,1	93,1	0,590
GA/QT 2,9 /6,2	10	21,6 ± 0,1	99,4	0,478
	1,0	21,7 ± 0,1	99,5	0,310
	0,1	18,5 ± 0,3	94,8	0,543
GA/QT 6,2 /6,2	10	48,3 ± 0,4	92,0	0,583
	1,0	25,9 ± 0,1	99,9	0,390
	0,1	22,3 ± 0,1	96,9	0,412

De um modo geral, observou-se que o tamanho de partícula não sofre grandes alterações em seus valores, porém um tamanho menor é obtido para a razão de carga n+/n- = 0,1 em relação as razões 1 e 10, redução que é significativa (** P <

0,05). Não foi observada nenhuma tendência em relação ao aumento de tamanho e o IPD para as concentrações estudadas.

O rendimento dos PECs de GAQTa sintetizados na concentração $1,5 \times 10^{-3}$ g.mol⁻¹ e razão n+/n- 1 foi investigado. O material foi isolado por ultracentrifugação e por spray dryer. Observou-se que os rendimentos obtidos foram de $38 \pm 0,3$ % e $47 \pm 0,8$ % para spray dryer e ultracentrifugação respectivamente. Apesar da técnica de spray dryer obter um menor rendimento, o PEC se dispersa com maior facilidade e tem seu tamanho praticamente inalterado.

4.1.2.2 Efeito da massa molar de quitosana e ordem de adição

A Figura 25 mostra o efeito da massa molar da quitosana (QTa = $4,6 \times 10^5$ g.mol⁻¹ e QTb = $7,8 \times 10^4$ g.mol⁻¹) e ordem de adição da goma do angico nas concentrações de polissacarídeos de $1,5 \times 10^{-3}$ g.mol⁻¹. Quando GA é adicionada a QT (Figura 25a), observa-se que os tamanhos de partícula nas razões de cargas n+/n- de 0,4 a 2 são maiores quando QTa é utilizada como policátion. A partir da razão n+/n- 4, quando a quantidade de cargas negativas fica em excesso, o comportamento é oposto com tamanhos de partícula menores que os CPEs de QTb. Na Figura 25b, observa-se que invertendo a ordem de adição, QT adicionada a GA (QTGA), para todas as razões n+/n-, os CPEs de QTa possuem tamanhos maiores que os de QTb. A ordem de adição leva a mudança de comportamento do perfil dos gráficos, porém a faixa de tamanho entre eles é bem próxima (* P < 0,05).

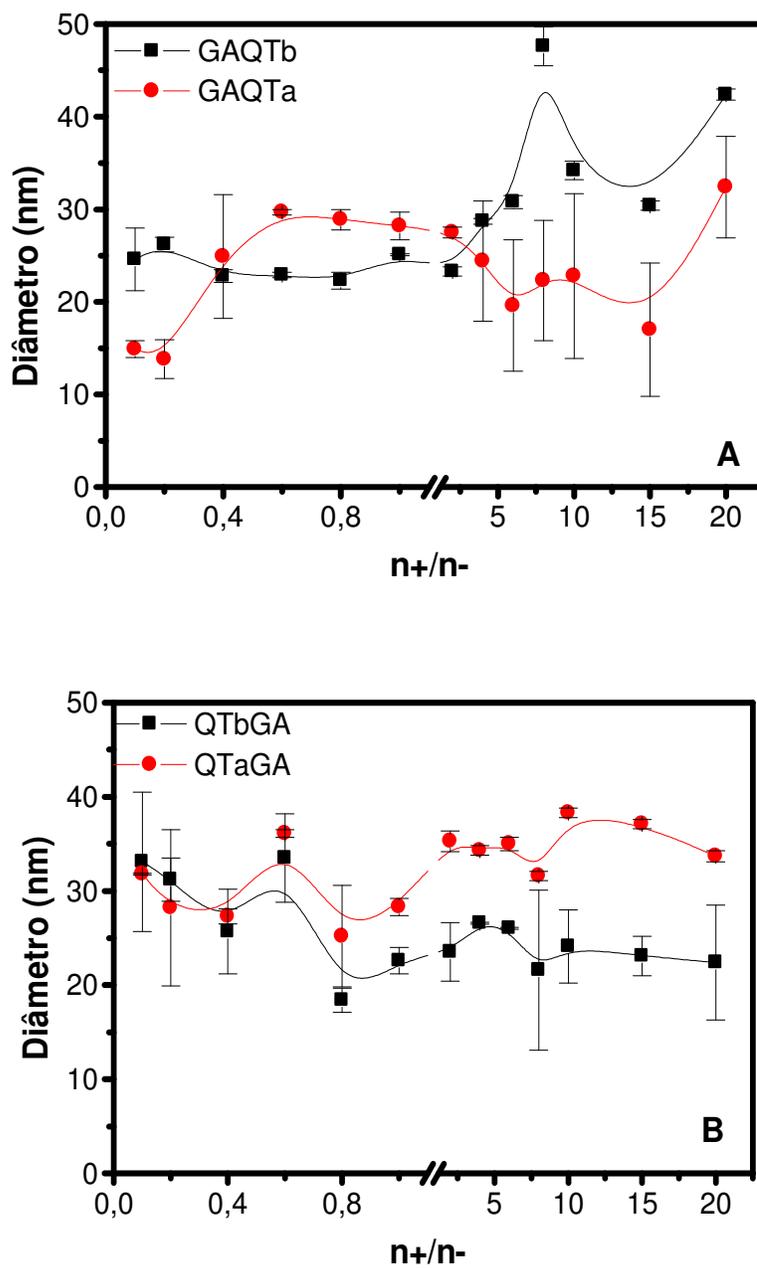


Figura 25. Gráfico de diâmetro versus $n+/n-$. A) Efeito da massa molar de quitosana para nanopartículas de GAQT sintetizadas na concentração de $1,5 \times 10^{-3} \text{ g.mol}^{-1}$. B) Efeito da ordem de adição para nanopartículas de QTGA sintetizadas na concentração de $1,5 \times 10^{-3} \text{ g.mol}^{-1}$.

4.1.2.3 Estudo de Polidispersividade (PDI)

A Figura 26 apresenta os valores de IPD para os CPEs de GAQT e QTGA.

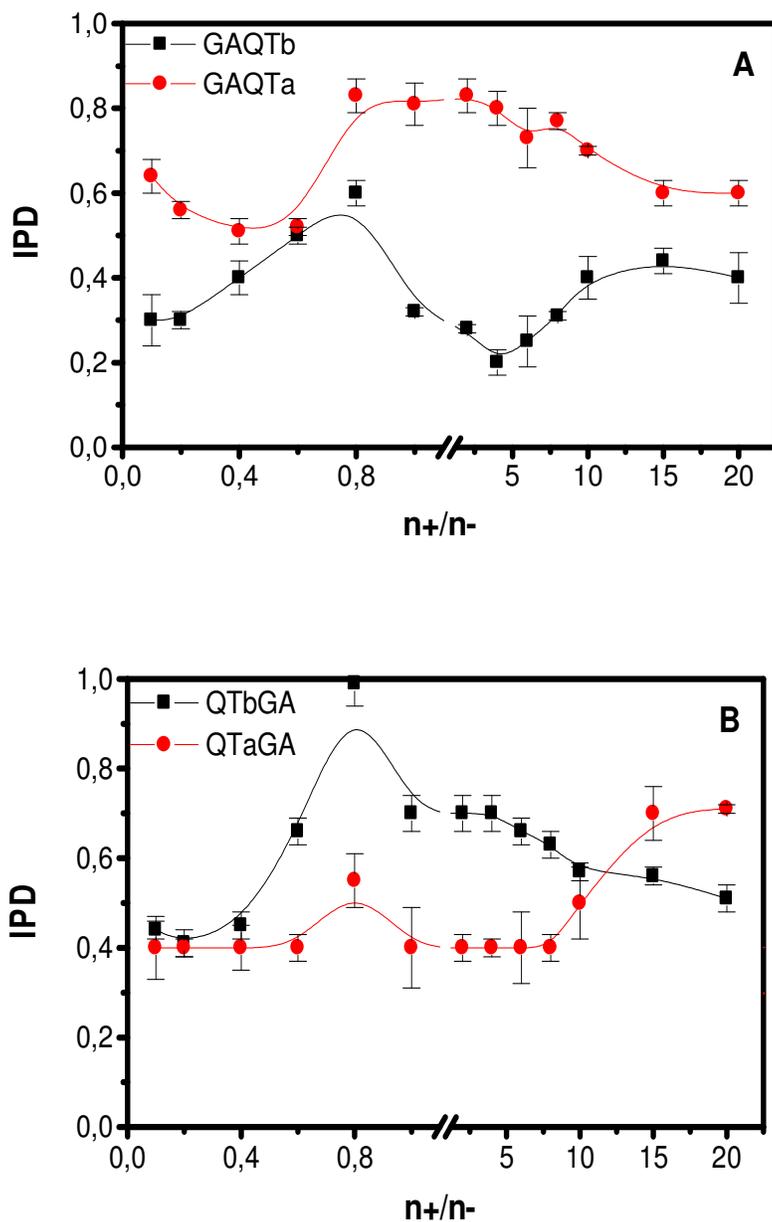


Figura 26. Gráfico de IPD versus razão n+/n-: a) Para complexos polieletrólitos de GAQT sintetizados na concentração de $1,5 \times 10^{-3} \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ variando a massa molar de quitosana e b) Efeito da ordem de adição dos mesmos (** P < 0,05).

Quando GA é adicionada em QT (Figura 26a), os valores de IPD foram maiores para o complexo que utiliza QTa para todas as razões n^{+}/n^{-} . Quando a quitosana é adicionada em GA ocorre uma inversão de comportamento para razões de carga $n^{+}/n^{-} < 15$. Os dados para esse experimento indicam que não existe uma correlação direta entre os valores de IPD e diâmetro das partículas, pois na formação dos PECs durante a síntese, as moléculas em solução podem estar sofrendo mudança de conformação.

4.1.2.4 Estudo da estabilidade dos CPEs em função do tempo

A Figura 27 apresenta estudo de estabilidade com o tempo para as razões de cargas n^{+}/n^{-} de 0,1, 1 e 10. Os CPEs em estudo foram obtidos na mesma concentração de $1,5 \times 10^{-3} \text{ g, mol}^{-1}$. Após a síntese, as soluções ficam opalescentes e não é observado floculação, porém este fenômeno pode ser avaliado pelo monitoramento do tamanho de partícula em função do tempo. O aumento ou a diminuição da partícula vai indicar que houve agregação e floculação respectivamente.

O experimento mostrou que, em geral, os CPEs de GAQTb e GAQTa apresentam agregação e floculação ao longo dos 35 dias de estudo. Os PECs de GAQT de razões n^{+}/n^{-} de 0,1 e 1 apresentam boa estabilidade na dispersão, sendo que para $n^{+}/n^{-} = 0,1$ (Figura 27a) ocorre discreta floculação no 15° dia e para $n^{+}/n^{-} = 1$ (Figura 27c) no 25° dia. Quando a ordem de adição é invertida (QTGA) a formação de agregados seguida de floculação é mais evidente, ficando em solução partículas com tamanhos menores. Na razão $n^{+}/n^{-} = 1$ (Figura 27d), por exemplo, observa-se que para CPEs de quitosana de baixa massa molar (QTbGA) a formação de agregados ocorre no 10° dia e permanece crescente até 30° dia. Nota-se que a produção de nanopartículas com mais estabilidade é influenciada pela razão de cargas e ordem de gotejamento das soluções polieletrólíticas de GA e QT.

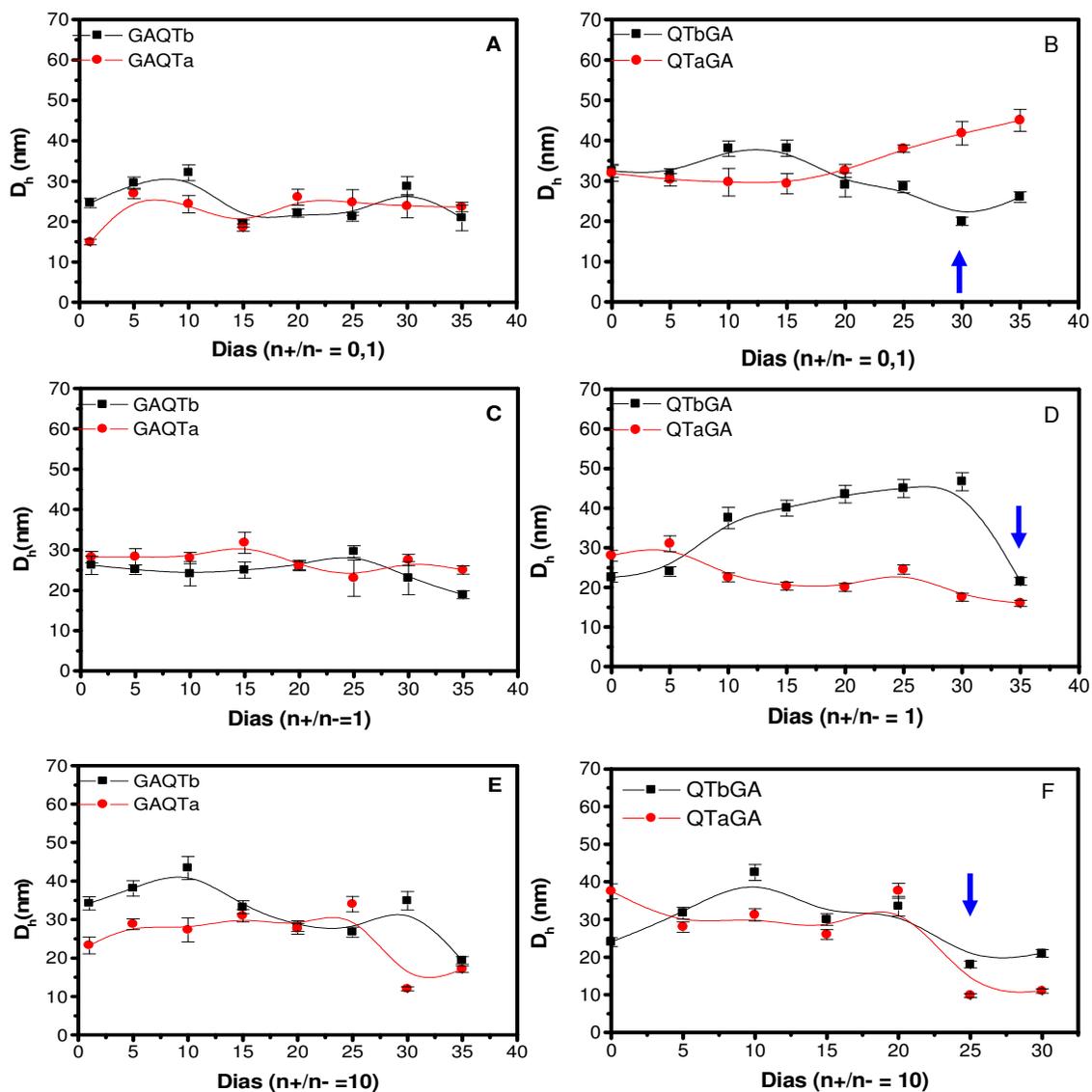


Figura 27. Gráfico de diâmetro hidrodinâmico (D_h) versus tempo para os CPEs de GAQTa: a) n+/n- 0,1 c) n+/n- 1 e) n+/n- 10 e para a inversão da ordem de adição b) n+/n- 0,1 d) n+/n- 1 f) n+/n- 10. (↓) floculação.

O tratamento estatístico feito pelo PRISM indica que os resultados são muito significativos (***) $P < 0,05$, porém pelo fato da variação ser entre 10 e 40 nm isto pode não ser significativo para aplicação farmacológica.

4.1.3 Potencial Zeta

A Figura 28 apresenta os valores de potencial Zeta para os CPEs de GA em QT na concentração de $1,5 \times 10^{-3} \text{ g.mol}^{-1}$ para ambos os polieletrólitos.

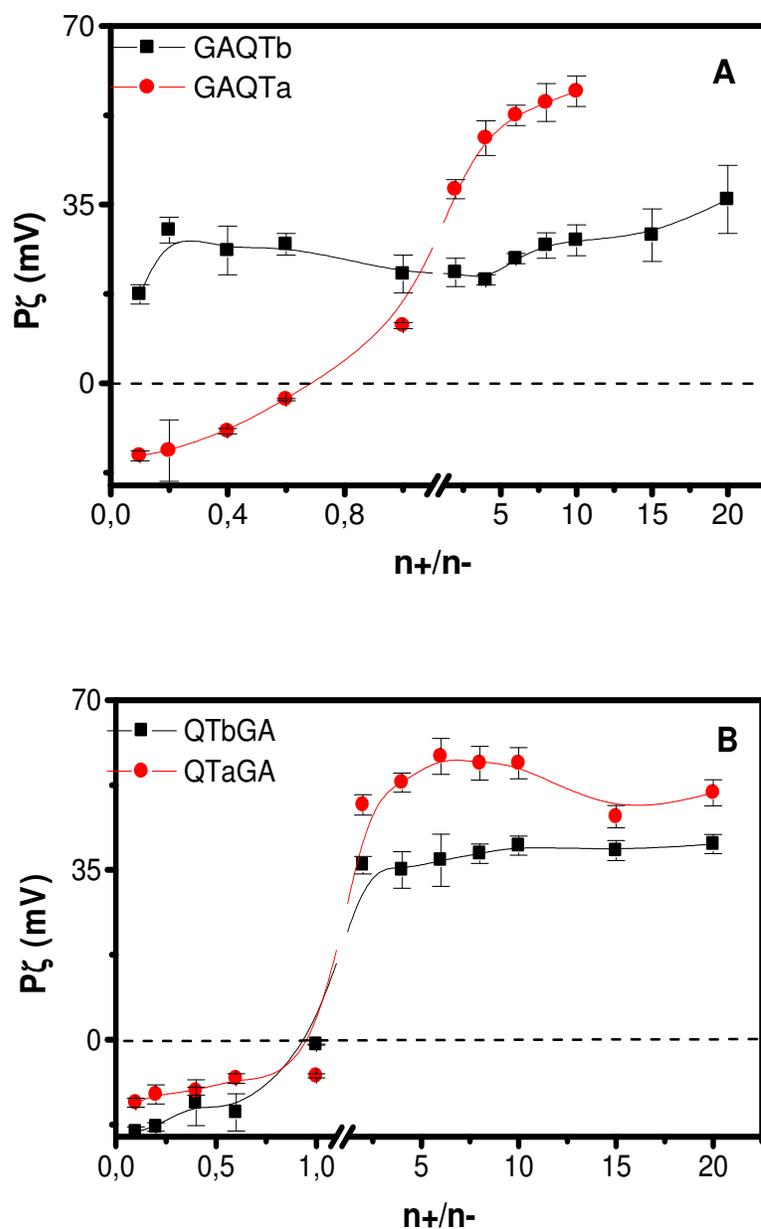


Figura 28. Potencial Zeta para os CPEs de GAQT e QTGA nas concentrações de $1,5 \times 10^{-3} \text{ g.mol}^{-1}$.

Observa-se que o potencial Zeta de GAQTa para razões $n+/n- < 1$, quando há excesso de cargas negativas, apresenta valores negativos, isto indica que a nanopartícula está recoberta com GA. Para razões $n+/n- > 1$ os valores de potencial são positivos, indicando que quando a concentração de cargas catiônicas aumenta, a nanopartícula fica recoberta positivamente pela QT. Para razões $n+/n- \sim 1$ a quantidade de cargas negativas e positivas é a mesma. Entretanto os resultados na Figura 28 indicam que não houve uma completa neutralização das cargas, apesar da diminuição do valor do potencial Zeta. Valores de potencial Zeta para as razões $n+/n-$ de 0,1 a 0,6 indicaram pouca estabilidade, ocorrendo a formação de aglomerados (valores inferiores a $\pm 20,0$ mV e valores a partir de $+ 38,0$ mV nas razões $n+/n-$ de 2 a 10) indica estabilidade moderada com a presença de aglomerações [SILVA, 1999]. Contudo, valores de potencial Zeta baixos não significam que as partículas sejam instáveis, pois o diâmetro muito pequeno faz com que seu movimento seja acelerado no solvente evitando que haja sedimentação. Esta explicação pode ser observada experimentalmente para os PECs de GAQT e QTGA na Figura 27 a, b, c e d. A Figura 29 mostra o comportamento do potencial Zeta quando a concentração dos polieletrólitos aumenta para $5,9 \times 10^{-3} \text{ g.mol}^{-1}$.

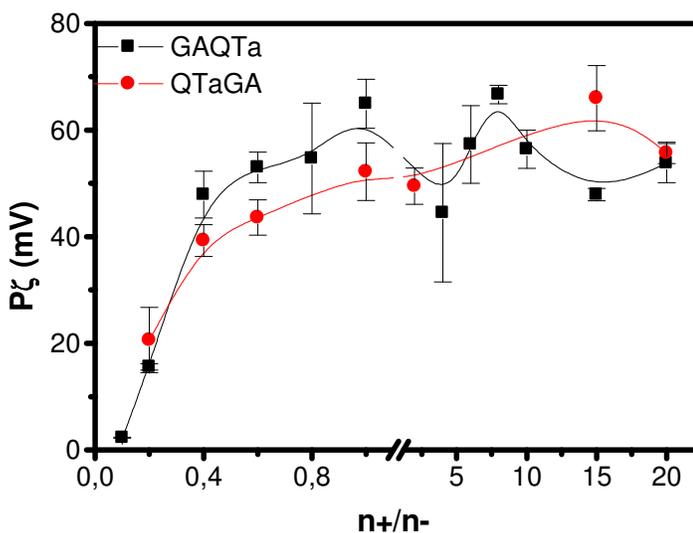


Figura 29. Valores de potencial Zeta para os CPEs formados a partir de soluções de GA e QT de $5,9 \times 10^{-3} \text{ g.mol}^{-1}$.

O aumento da concentração dos polieletrólitos influencia no aumento do potencial Zeta, obtendo potenciais de + 64,0 mV, o que evidencia grande estabilidade da partícula. Observa-se que os valores são sempre positivos, não importando a razão n^+/n^- e a ordem de adição. Pode ser que durante a síntese, as cargas positivas contidas na quitosana interajam com as cargas da goma do angico, e possivelmente, em seguida recubram a superfície da nanopartícula.

4.1.4 Análise morfológica dos CPEs de GAQT

A dispersão foi gotejada em uma lâmina de Si/SiO₂ e seca em temperatura ambiente. As imagens de força atômica para os complexos polieletrólíticos de GAQTa e GAQTb na razão de cargas $n^+/n^- = 1$, é mostrada na Figura 30. As nanopartículas apresentam morfologia ovalada, a qual pode ser devido a secagem do material e revelam um tamanho de 14 nm respectivamente, ou seja, menores que as dimensões observadas por espalhamento de luz com tamanho de $28,2 \pm 1,5$ nm respectivamente.

A diminuição do tamanho se dá pelo fato das nanopartículas estarem secas, já colapsadas; pois quando em solução as partículas intumescem e o diâmetro aumenta. Este comportamento foi observado em outros estudos realizados em polissacarídeos, como é o caso da paquimana extraída de fungos. Este polissacarídeo tem seu tamanho diminuído de 100 para 50 nm [HU *et al.*, 2008], para nanopartículas de quitosana-poli(ácido metacrílico) onde o tamanho diminuiu de 110 para 78 nm [MOURA, AOUADA e MATTOSO, 2008]. Outro comportamento semelhante foi observado para nanopartículas sintetizadas por complexação polieletrólítica entre quitosana com grau de desacetilação de 86 % e enoxaparina [SUN *et al.*, 2008].

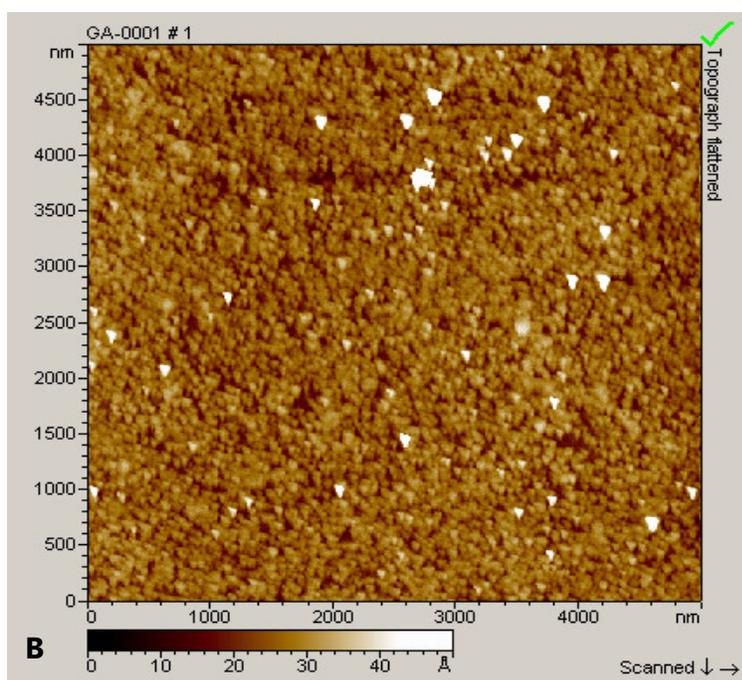
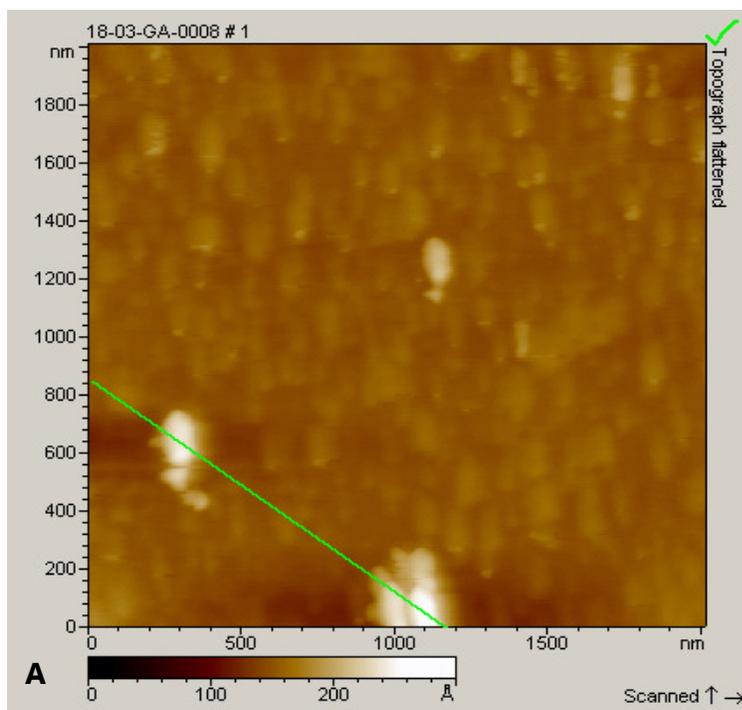


Figura 30. Imagem de AFM no modo intermitente (*tapping*) para AFM do CPE de GAQTa na razão $n^+/n^- = 1$: a) concentração de $2,5 \times 10^{-4}$ g/mL e b) concentração de $2,5 \times 10^{-3}$ g/L.

4.2 Formação de nanopartículas por complexação polieletrólítica entre quitosana e angico carboximetilado (CMA)

Após o estudo da formação do complexo polieletrólítico entre quitosana e goma do angico, foi realizado uma modificação química na goma com o objetivo de aumentar sua densidade de carga. Então, a goma do angico foi carboximetilada com dois graus de substituição de 0,20 e 0,63. Mesmo estudo de interação com quitosana foi feito para os dois derivados. As soluções de partida, para todos os ensaios, foram na ordem de $10^{-3} \text{g.mol}^{-1}$, pois aumentando a concentração para $10^{-3} \text{g.mol}^{-1}$ observa-se que após a síntese, as nanopartículas formadas apresentam-se instáveis, com soluções turvas e presença de precipitado.

As soluções de partida do angico carboximetilado tiveram pH semelhante ao da solução da goma do angico (5,8), indicando que seus grupos COO^- também estão ionizados. Observou que o grau de ionização como também a concentração do polissacarídeo em solução influenciou na quantidade de fótons emitida por segundo (Kcps), ou seja, a solução de CMA0,20 e CMA0,63 na concentração de $1,5 \times 10^{-3} \text{g.mol}^{-1}$ obtiveram um Kcps de 512 e 527 respectivamente. Aumentando a concentração para $5,9 \times 10^{-2} \text{g.mol}^{-1}$, o valor de Kcps vai para 607 e 612 respectivamente.

A quantidade de Kcps emitida pela molécula de quitosana na concentração de $1,5 \times 10^{-3} \text{g.mol}^{-1}$ é de 470, ou seja, apesar dela não estar com todos os seus grupos amina protonados (como discutido anteriormente), ela tem NH_3^+ suficiente para interagir eletrostaticamente com os grupos COO^- de CMA, isto porque após a síntese do CPE os valores de Kcps diminuem consideravelmente numa faixa de 100 a 200 Kcps. Outra evidência da interação entre os poliânions do CPE foi a presença da banda em 1555cm^{-1} no espectro de infravermelho indicando a formação do complexo CMAQT.

4.2.1 Análise de Infravermelho

A Figura 31 mostra os espectros de infravermelho de QTa e CMA0,63 como também os CPEs de CMA0,63QTa na razão $n^+/n^- = 4$ antes e após a incorporação de cloroquina (CQ). Suas estruturas representacionais estão na Figura 32.

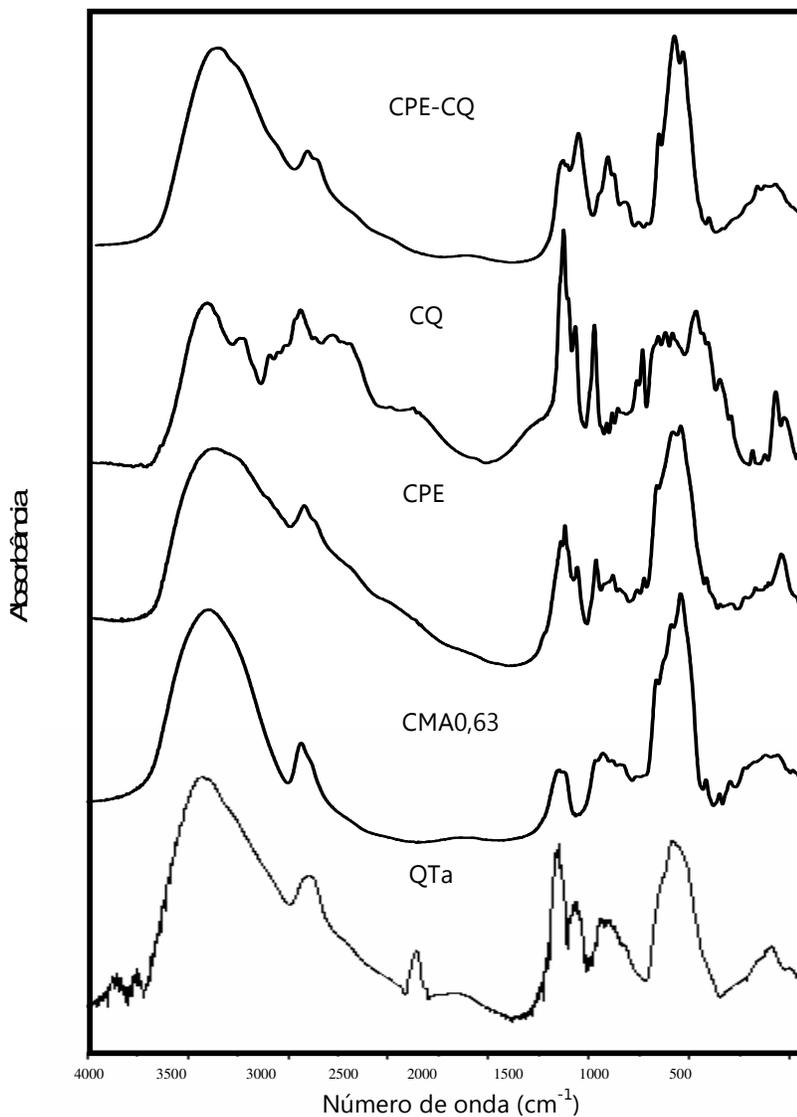


Figura 31. Espectros na região do infravermelho para QTa, CMA0,63, cloroquina (CQ) e CPE na razão $n^+/n^- = 4$ antes e após a incorporação da cloroquina (CPE-CQ).

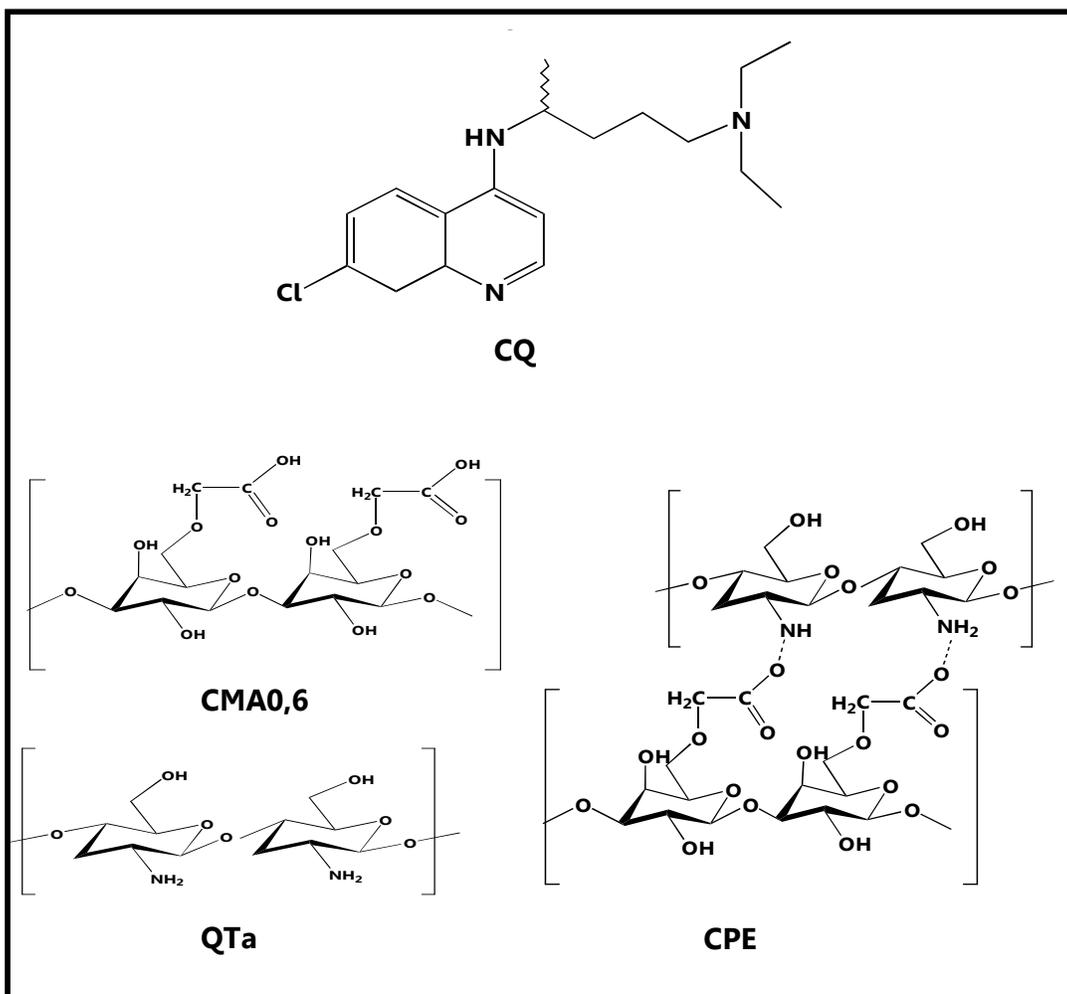


Figura 32. Representação estrutural de Haword para os polissacarídeos quitosana (QTa), goma do angico carboximetilada (CMA0,63), para o complexo polieletrólítico (CPE) e cloroquina livre (CQ).

O espectro de quitosana mostra uma banda em 1636 cm^{-1} referente a deformação linear de C=O e C-N. Observa-se em 1573 cm^{-1} a deformação angular de N-H do grupo amina. As bandas em 3435 cm^{-1} referem-se tanto à deformação axial de N-H de NH₂ como também à deformação axial assimétrica de O-H. As bandas para os espectros de angico carboximetilado com GS de 0,63 apresentaram-se equivalentes a do GS = 0,20 [OLIVEIRA *et al.*, 2007], bandas características em torno de 2900 cm^{-1} atribuídas à deformação axial assimétrica de C-H do CH₂, e em torno de

1600 cm^{-1} atribuído à vibração de deformação axial de C=O do grupo carboximetil, o que confirma a carboximetilação da goma do angico.

No espectro do CPE pode ser observado que as bandas em 3436 cm^{-1} e 2927 cm^{-1} , características da goma carboximetilada como também da quitosana permanecem. O aumento significativo das bandas em 1654 e 1561 cm^{-1} indica a presença de amida I e a deformação angular de N-H de NH_3^+ , respectivamente, interagindo com o grupo carboximetil do angico. Autores também observaram o aparecimento de uma nova banda em 1555 cm^{-1} , indicando a presença de grupos NH_3^+ o que evidencia a formação do complexo polieletrólítico entre quitosana e goma do cajueiro carboximetilada [MACIEL *et al.*, 2005].

No espectro da cloroquina observa-se que os espectros apresentam bandas largas na região de 3500 a 3400 cm^{-1} , as quais são atribuídas à deformação axial simétrica e assimétrica de N-H. Na região de 3101 a 3000 cm^{-1} estão relacionadas à deformação axial de C-H dos anéis aromáticos, já na região de 2939 a 2801 cm^{-1} as bandas estão relacionadas com as deformações axiais de C-H alifáticos. O sinal em 1614 cm^{-1} refere-se a deformação angular de N-H no plano e em 1555 cm^{-1} a deformação angular de amina II aromática. Em 1453 cm^{-1} refere-se a deformação axial de C-N e em 1368 a 1338 cm^{-1} a deformação axial de C-N aromática. As absorções entre 1250 a 1100 cm^{-1} são referentes à deformação axial de C-N das aminas III e II alifáticas e em 943 a 600 cm^{-1} devido a deformação angular simétrica e assimétrica de C-H fora do plano [SILVERSTEIN, WEBSTER e KIEMLE, 2006].

Após a incorporação (CMA0,63QTaCQ) é observado que as bandas sofrem sobreposição, entretanto, um deslocamento de 9 cm^{-1} na região de 1453 cm^{-1} é observado, dando um indício da presença de cloroquina na nanopartícula.

4.2.2 Avaliação dos parâmetros que influenciam o tamanho das nanopartículas de gomas do angico carboximetilado e quitosana

4.2.2.1 Efeito da massa molar de quitosana nos complexos de CMAQT

A Figura 33 apresenta o efeito da massa molar da quitosana no tamanho das partículas de CPEs com a goma do angico carboximetilada. Neste experimento, a solução de CMA com GS igual a 0,20 é adicionada à quitosana (CMA 0,20 QT).

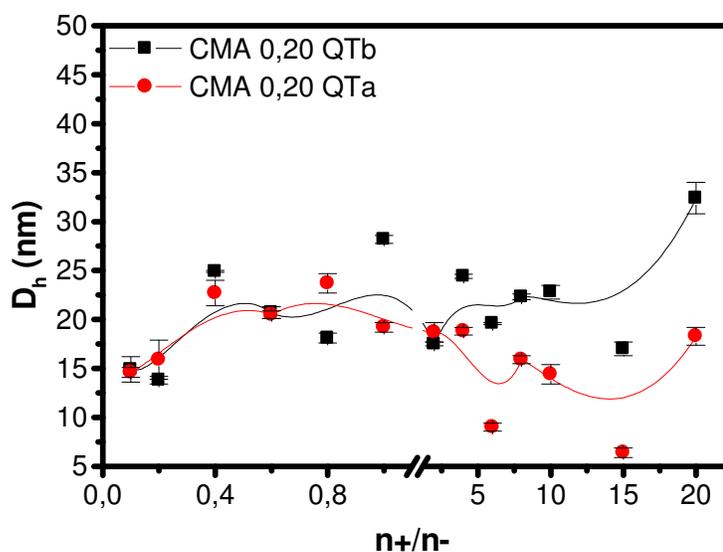


Figura 33. Efeito da massa molar de quitosana para complexos CMAQT na concentração de $1,5 \times 10^{-3}$ g.mol⁻¹ (** P < 0,05).

Na adição da solução de goma carboximetilada (CMA) em QTa nas razões n+/n- de 0,1 a 20, os valores de tamanho das partículas variam de 7 a 24 nm e para os PECs de QTb variam de 14 a 35 nm. Quando n+/n- > 4, as partículas do CPE formadas com QTa são menores do que as formadas com QTb. Isto indica que o efeito da massa molar da quitosana só tem influência quando existe excesso de cargas positivas no meio. O comportamento e os valores de tamanho em função da razão de cargas n+/n- são similares ao observado para os complexos de goma não modificada (GA) e QTa.

4.2.2.2 Efeito do grau de substituição da goma carboximetilada

O efeito do aumento do grau de substituição da goma do angico carboximetilada no tamanho das partículas formadas com quitosana de alta e baixa massa molar é mostrado na Figura 34.

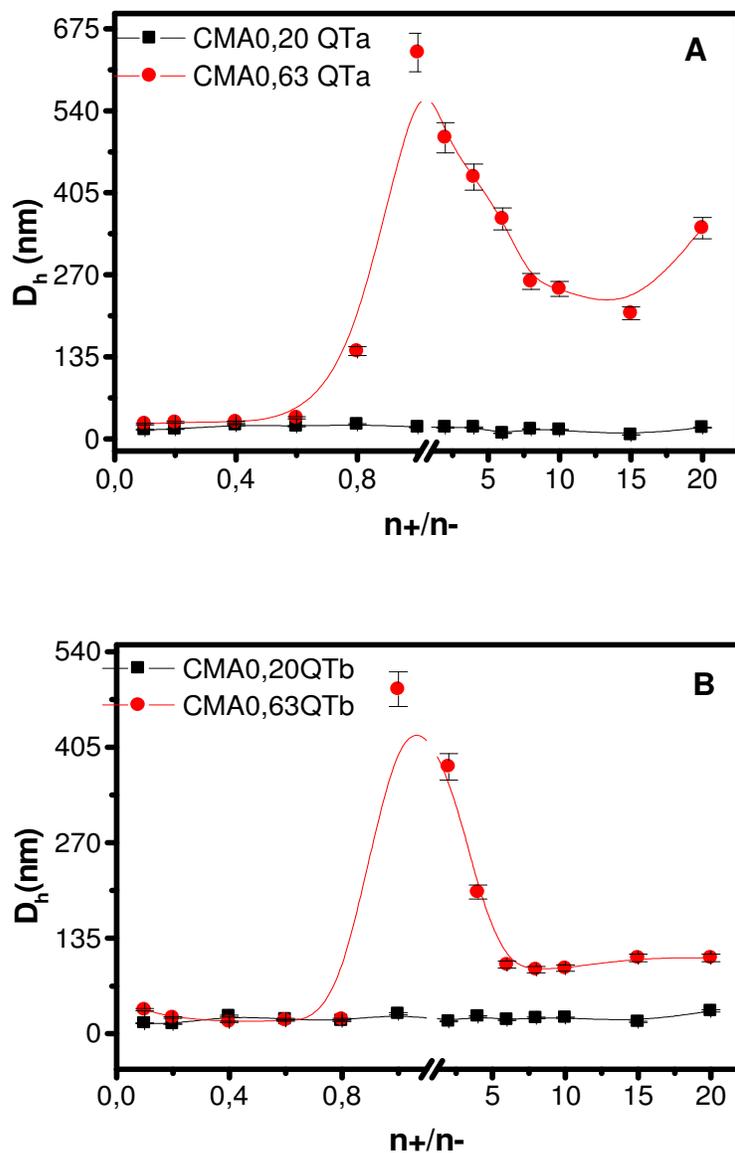


Figura 34. Efeito do grau de substituição na formação dos CPEs com concentração de $1,5 \times 10^{-3}$ $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ dos polieletrólitos de partida: a) Quitosana de alta massa molar (** $P < 0,05$) e b) Quitosana de baixa massa molar (** $P < 0,05$).

Na Figura 34a, quando a carga da goma do angico carboximetilada é baixa ($GS = 0,20$), partículas pequenas (~ 14 a 30 nm) são observadas. Aumentando o GS para $0,63$ observa-se que o diâmetro das nanopartículas não foi alterado nas razões n^+/n^- $0,1$ a $0,8$ onde se tem excesso de cargas negativas, porém quando a razão $n^+/n^- = 1$ os PECs aumentam de tamanho consideravelmente para 636 nm e à medida que a razão n^+/n^- aumenta o diâmetro decresce até 340 nm para $n^+/n^- = 20$. Comportamento semelhante é visto na Figura 34b com aumento de diâmetro na razão $n^+/n^- = 1$ de 487 nm e permanecendo estável (~ 100 nm) para razões n^+/n^- de 6 a 20 . O aumento de tamanho que ocorre a partir da razão 1 pode ser devido ao recobrimento da nanopartícula por segmentos de quitosana após a completa interação entre cargas, visto que o aumento de tamanho acontece quando se tem quitosana em excesso.

4.2.2.3 Efeito da ordem de adição

Quando a ordem de adição é invertida (Figura 35), CPEs com carboximetilado de $GS = 0,63$ têm uma diminuição bastante significativa no diâmetro, atingindo tamanhos de até $36,1$ nm. Observa-se que esse efeito não causou grandes alterações no diâmetro dos CPEs de CMA com $GS = 0,20$.

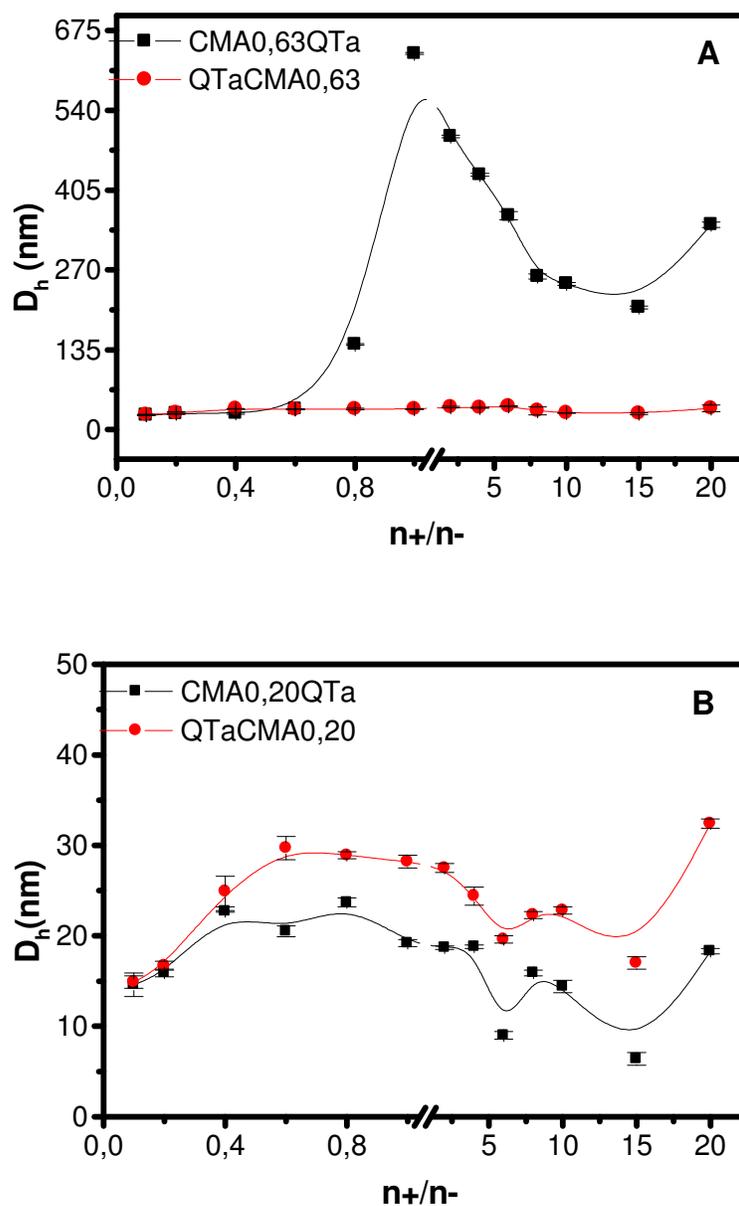


Figura 35. Inversão da ordem de adição na formação dos CPEs: a) CMA0,63 (** $P < 0,05$) e b) CMA0,20 (***) $P < 0,05$). As concentrações dos polieletrólitos de partida foram de $1,5 \times 10^{-3} \text{ g.mol}^{-1}$.

A mudança da ordem de adição dos polieletrólitos possui uma grande influência no tamanho das nanopartículas para CPEs formados com CMA com $GS = 0,63$ (Figura 36a). Neste caso, a adição de quitosana à solução CMA (QTaCMA0,63) produz partículas pequenas para todos os valores de $n+/n-$ investigados. Como

discutido no item anterior a adição de CMA0,63 à quitosana provoca aumento no tamanho das partículas quando $n^+/n^- > 1$, devido a quitosana em excesso continuar recobrando a nanopartícula já formada.

Neste caso, partículas formadas com QTa são maiores que QTb. CPEs de quitosana de baixa massa molar ($5 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$) com grau de desacetilação de 15% e sulfato de dextrana ($1,5 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$) apresentaram valores entre 200 a 250 nm nas razões n^+/n^- entre 2 a 15 para os complexos formados com força iônica de 0,05M de NaCl [SCHATZ *et al.*, 2004b]. JINTAPATANAKIT *et al.*, [2007] sintetizaram CPEs de trimetilquitosana-insulina, onde obtiveram partículas variando de 104 a 443 nm de diâmetro. Complexos polieletrólíticos de quitosana ($4,47 \times 10^4 \text{ g.mol}^{-1}$) e alginato ($4,1 \times 10^4 \text{ g.mol}^{-1}$) foram sintetizados e os autores obtiveram diâmetros de partículas de 526 nm. Observaram também que tanto quitosana como alginato de baixas massas molares produziam partículas menores [SAETHER *et al.*, 2008]. CPEs de quitosana com grau de desacetilação de 85 % e massa molar de $4 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ com enoxaparina foram obtidas com as nanopartículas de 697 nm. Os autores observaram que o tamanho de partícula diminui com o decréscimo da massa molar de quitosana [SUN *et al.*, 2008].

TIYABOONCHAI e LIMPEANCHOB, [2007] descobriram um sistema de liberação nanoparticulados para anfotericina B em QT/sulfato de dextrana reticulados com sulfato de zinco. Essas nanopartículas possuíam tamanho de 600 a 800 nm com índice de polidispersividade de 0,2, indicando uma distribuição monodispersa e o potencial Zeta de -32 mV indicando uma carga negativa relativamente forte na superfície da partícula. A eficiência de incorporação foi de 65%.

Resumindo, com a metodologia aplicada neste trabalho foi possível obter partículas formadas por complexação eletrolítica com tamanhos inferiores ao observado pelos autores mencionados anteriormente.

4.2.2.4 Estudo de polidispersividade

Para polímeros naturais, valores de IPD menores que 0,4 são considerados de baixa polidispersividade, valores maiores que 0,4 consideram-se nanopartículas polidispersas. [SCHATZ *et al.*, 2005; SEATHER *et al.*, 2008; DU *et al.*, 2005; SARMENTO *et al.*, 2006; CUI e MUMPER, 2001; BUCCHAMMER *et al.*, 2003]. A investigação da polidispersividade (IPD) é importante no estudo de tamanho de nanopartículas, pois determina a quantidade de partículas com mesmo tamanho que estão presentes em solução. Os valores de polidispersão (IPD), como mostrado na Figuras 36, apresentam comportamentos semelhantes em relação à massa molar de quitosana.

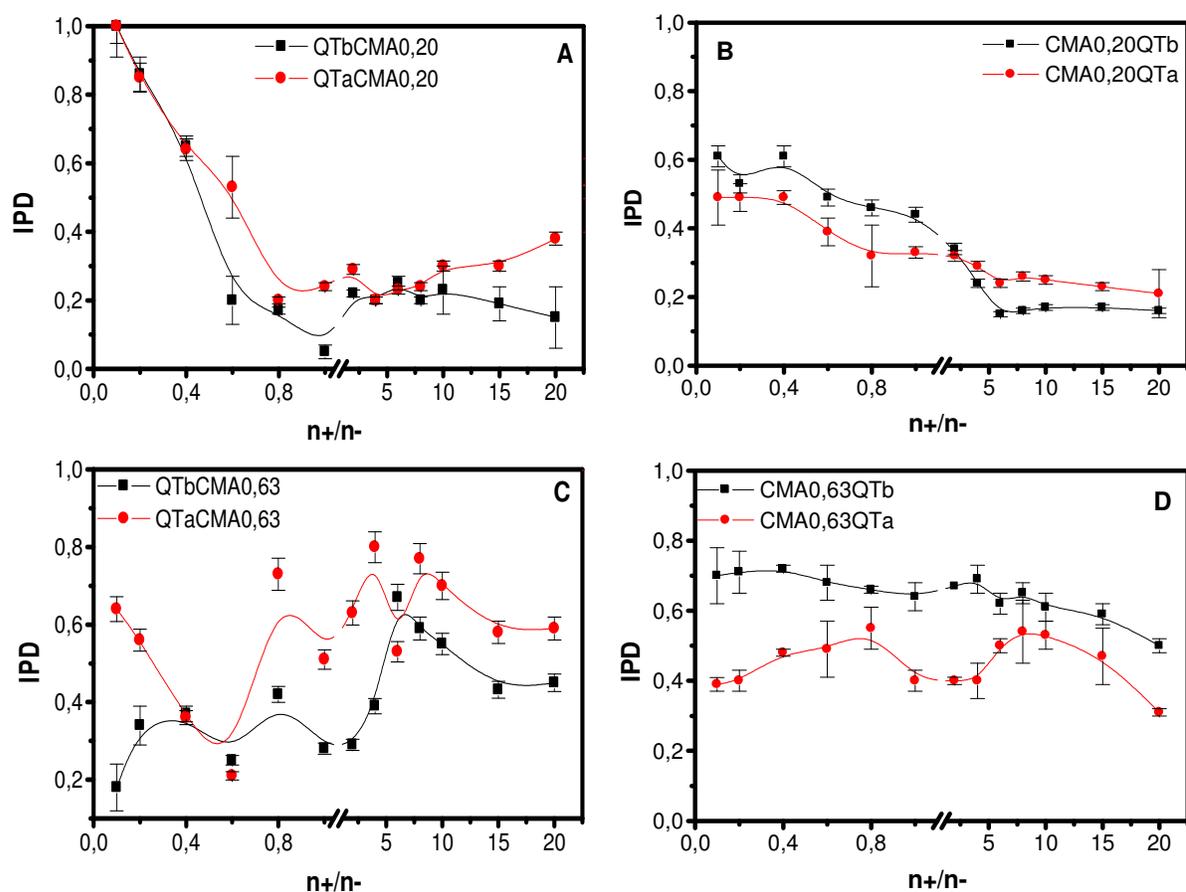


Figura 36. Índice de polidispersão para os complexos polieletrólitos.

Os valores de IPD para CPEs de CMA0,20 vão diminuindo à medida que a razão n^+/n^- aumenta não importando a massa molar da quitosana e a ordem de adição. Observa-se também que nas razões de cargas $n^+/n^- > 1$ os CPEs são considerados de baixa polidispersividade. Este comportamento não é observado para CPEs de CMA0,63.

4.2.2.5 Estudo de estabilidade em função do tempo

O efeito do tempo sobre o tamanho das partículas de CPEs de CMAQT e QTCMA foi avaliado e os resultados obtidos são mostrados nas Figuras 37 e 38.

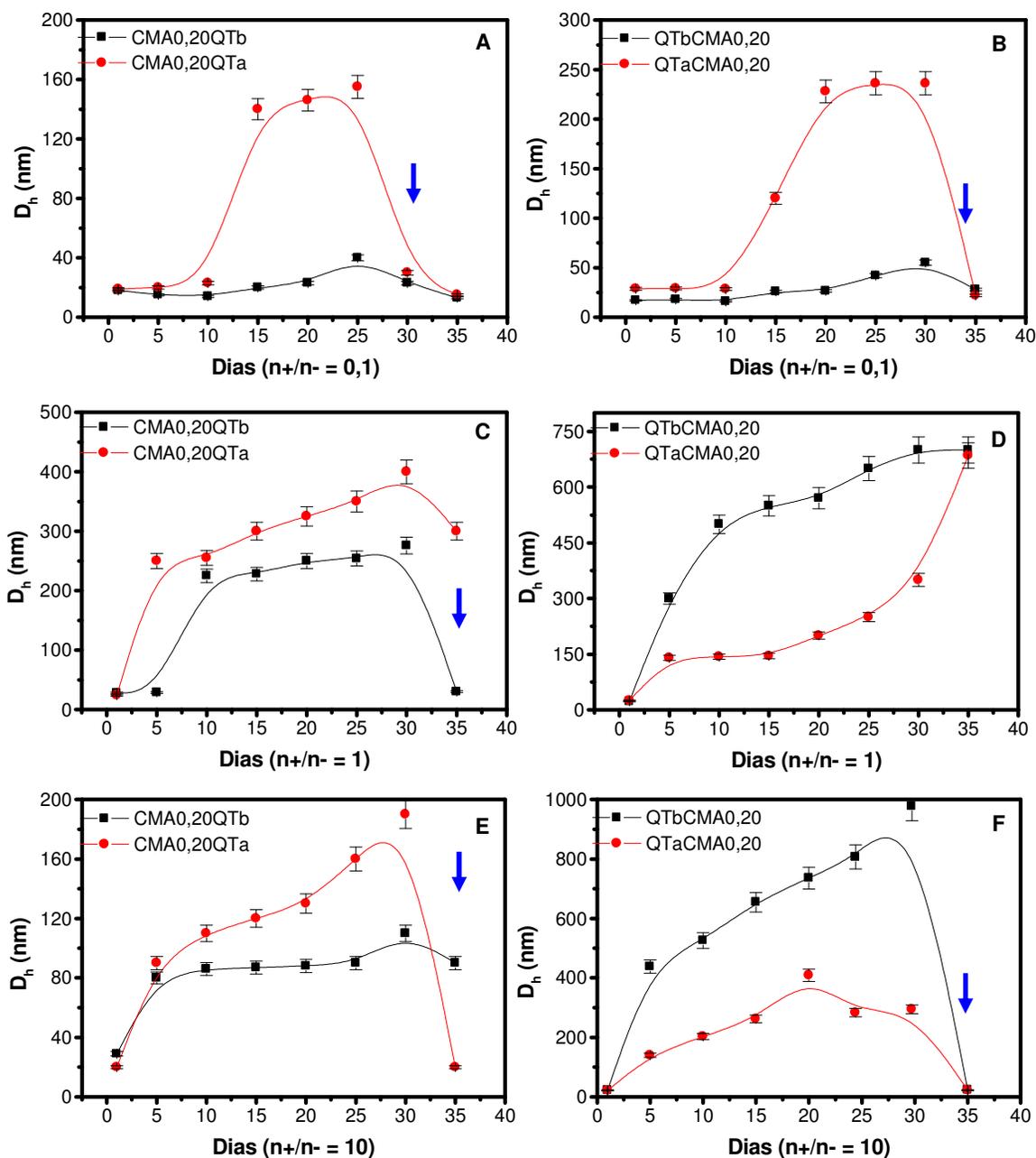


Figura 37. Estudo de estabilidade com o tempo variando a massa molar de QT e a ordem de adição nas razões n^+/n^- 0,1, 1 e 10 para CMA0,20 nas concentrações de $1,5 \times 10^{-3} \text{ g.mol}^{-1}$ (↓) floculação.

Para os CPEs formados pela adição de CMA 0,20 à quitosana, a agregação ocorre mais rapidamente quando a quitosana de alta massa molar (QTa) é utilizada. Quando QTa é adicionada a CMA 0,20 este comportamento é inverso para valores de $n+/n- \geq 1$.

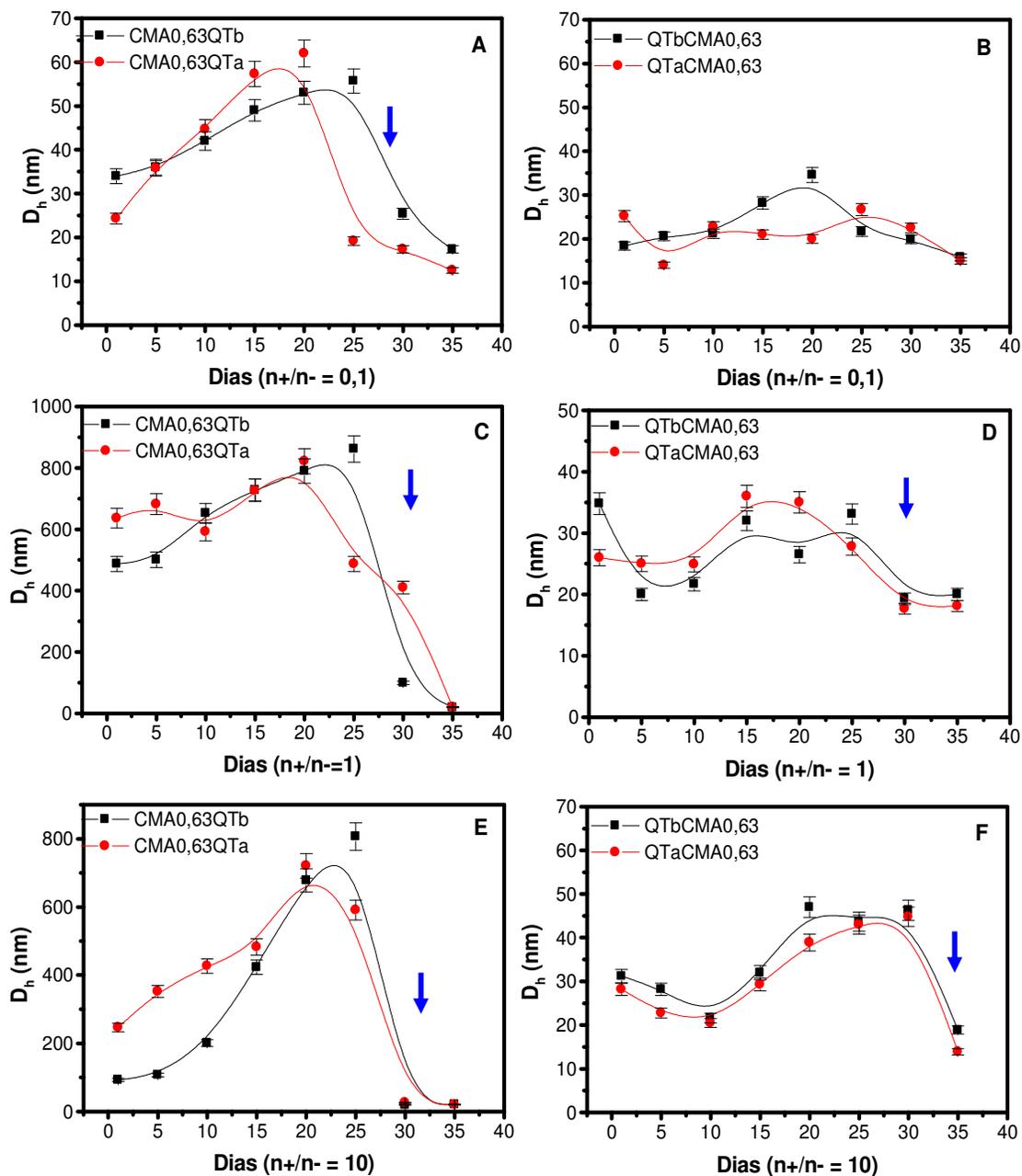


Figura 38. Estudo de estabilidade com o tempo variando a massa molar de QT e a ordem de adição nas razões $n+/n-$ 0,1, 1 e 10 para CMA0,63 nas concentrações de $1,5 \times 10^{-3} \text{ g.mol}^{-1}$. (\downarrow) floculação.

A adição de CMA 0,63 à quitosana provoca agregação rápida das partículas, não importando a massa molar da quitosana. Esse efeito é mais evidente para valores de $n^+/n^- \geq 1$. O decréscimo no tamanho a partir 25 dias deve-se à sedimentação dos agregados. O fenômeno de floculação pode ser explicado quando as partículas estão em suspensão, onde partículas maiores possuem movimento Browniano mais lento do que partículas menores, este movimento é um dos fatores pelos quais a partícula fica em suspensão, com o aumento gradativo do diâmetro do CPE fica cada vez mais difícil sua locomoção, fazendo com que haja uma desaceleração do movimento Browniano e conseqüentemente a partícula sedimenta (força gravitacional) [ZETASIZER, 2005].

4.2.2.6 Estudo de potencial Zeta

A Figura 39 apresenta as curvas de potencial Zeta para os complexos polieletrólíticos de CMA adicionadas em QT e sua inversão de adição.

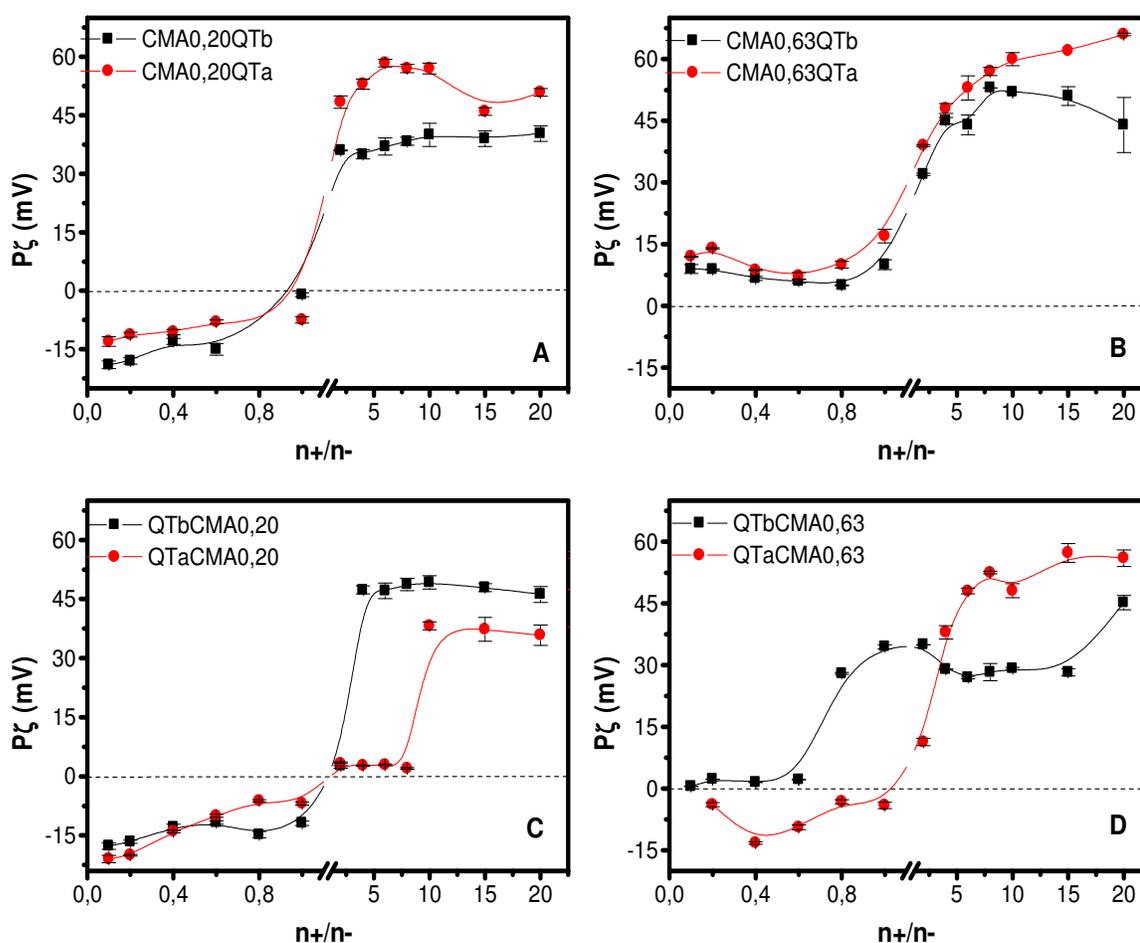


Figura 39. Curvas de potencial Zeta: a-b) CPEs de CMA DS = 0,20 variando a massa molar de QT e ordem de adição, c-d) CPEs de CMA DS = 0,63 variando a massa molar de QT e ordem de adição nas concentrações dos polieletrólitos de $1,5 \times 10^{-3} \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Em geral, as curvas de potencial Zeta para os PECs de CMAQT ou QTCMA assumem perfis semelhantes, ou seja, em razões $n^+/n^- < 1$ possuem potenciais negativos e em razões $n^+/n^- > 1$ os potenciais são positivos, com exceção das

nanopartículas de CMA0,63 (Figura B). Na Figura 39 C e D, quando a ordem de adição dos polieletrólitos é invertida, partículas de QTCMA com $GS = 0,20$ apresentam potenciais negativos na razão $n+/n- \leq 1$, alcançando um potencial de -20 mV. Em razões $n+/n- > 10$ observa-se a formação de partículas com potencial mais positivo atingindo valores de aproximadamente $+50$ mV. As partículas de QTCMA com $GS = 0,63$ obtiveram potenciais menos negativos na razão $n+/n- \geq 1$, porém para partículas de QTb, nas mesmas razões, valores de ζ tenderam a zero. Neste caso, o grau de substituição influencia nos valores de potencial Zeta.

Observa-se que com o aumento da densidade de cargas do polissacarídeo e a razão estequiométrica das cargas $n+/n-$ de ambos polieletrólitos são fatores que podem prever a estabilidade do CPE em solução. Razões de carga próximas ou igual a 1 indicam equidade entre os grupos COO^- e NH_3^+ , o que ocasiona a formação de uma partícula mais neutra, diminuindo o potencial Zeta. O impedimento estérico de ambos os polieletrólitos pode ser o fator pelo qual não ocorra a interação total de cargas. Quando esta razão entre cargas se distancia de 1 o potencial Zeta torna-se mais positivo ou negativo, indicando que, na superfície da partícula, ocorre forte repulsão favorecendo a suspensão na solução, evitando o efeito de floculação.

LIN *et al.*, [2009] observaram que PEC de quitosana/heparina na razão $n+/n- = 1$ não teve seu valor de potencial medido devido à intensa formação de aglomerados. GAROZI *et al.*, [2009] observaram potencial Zeta de $+30,0$ mV para PECs de alginato/quitosana na razão $n+/n- = 1$; SAETHER *et al.*, [2008] observaram que razões de cargas do complexo polieletrólítico de alginato/quitosana próximas de 1 favoreceram a formação de partículas instáveis. O potencial Zeta decresceu de $-40,0$ mV na razão de carga 0,3 para 0 mV na razão de carga 1 e um potencial de $+40,0$ mV na razão $n+/n- = 3$.

MOURA *et al.*, [2008] conseguiram sintetizar nanopartículas de quitosana com ácido metacrílico com potenciais que variaram de $-50,0$ a $+50,0$ mV, dependendo do pH da solução. SARMENTO *et al.*, [2007c] verificaram que o potencial Zeta era dependente da razão de cargas de quitosana/sulfato de dextrana, mais positivo em razões $n+/n-$ maiores e mais negativos quando esta mesma razão diminuía. Observaram também que na razão $n+/n- = 1$ o potencial tende a zero. SUN

et al., [2008] obtiveram nanocomplexos esféricos pelo mecanismo de autoagregação de enoxaparina-quitosana e cisteína-quitosana com potenciais que variaram de +2,9 a +10 mV. Foi observado que os artigos citados descreveram a estabilidade dos PECs apenas pelos valores de potencial Zeta, não observando o comportamento das partículas em suspensão com o tempo.

4.2.2.7 Mecanismos de formação para os CPEs de CMAQT

A Figura 40 apresenta os diferentes modelos que explicam a formação do complexo polieletrólítico de polissacarídeo aniônico e quitosana [SCHATZ *et al.*, 2004a; SARMENTO *et al.*, 2007a; JINTAPATTANAKIT *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2007; SEATHER *et al.*, 2008], de forma a estabelecer uma conclusão com os sistemas investigados neste trabalho.

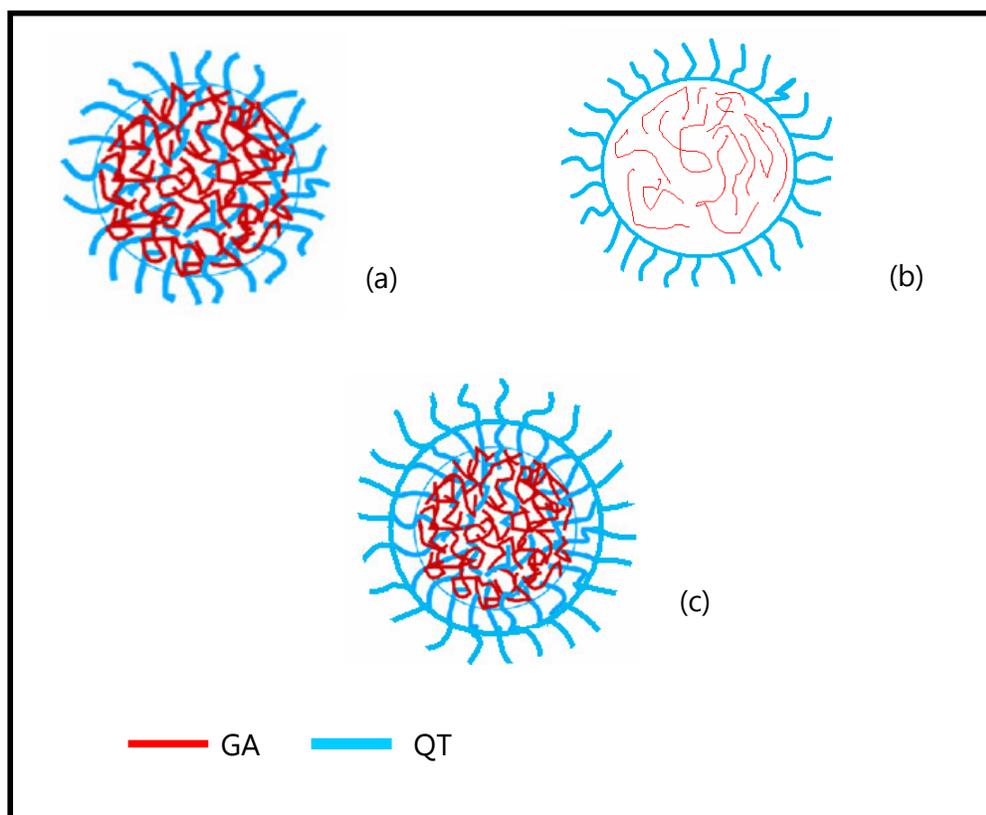


Figura 40. a) QT envolvendo toda a extensão da molécula da goma de angico produzindo núcleos neutros, compactos e superfície carregada. b) QT envolvendo muitas moléculas do angico

permanecendo no núcleo cargas isoladas causando repulsão. c) Após a completa interação entre cargas NH_3^+ e COO^- , segmentos de quitosana podem recobrir a nanopartícula.

O mecanismo da Figura 40a sugere que quando a goma do angico está sendo adicionada à quitosana, a solução de QT que está em excesso pode envolver toda a extensão do angico neutralizando suas cargas. Este mecanismo pode produzir partículas mais compactas com cargas neutralizadas em seu interior e excesso de cargas em sua superfície, o que indica uma estrutura mais estável como é o caso dos PECs de CMA0,20QTb na razão molar $n^+/n^- = 0,1$, a estabilidade que o potencial Zeta indica é confirmada também pelo estudo da estabilidade em função do tempo.

Na Figura 40b, a quitosana pode estar apenas envolvendo as moléculas de goma do angico fazendo com que alguns segmentos fiquem isolados no interior da partícula sem sofrerem interação, facilitando a repulsão de cargas e aumento do tamanho da partícula. Este comportamento pode ser observado para CMA0,20QT nas razões molares 1 e 10 onde há um aumento gradativo do tamanho de partícula.

Na Figura 40c, este mecanismo pode ser relacionado ao CPE de CMA0,63QT para razões $n^+/n^- > 1$, onde há excesso de quitosana. Observa-se a formação de partículas na faixa de 400 a 600 nm. Esta mudança de comportamento pode estar relacionada com o processo de recobrimento, ou seja, após a completa interação de cargas é possível que a quitosana em excesso fique recobrindo a nanopartícula já formada em uma ou várias camadas. Isso provocaria repulsão intensa sobre as cargas que ficaram no recobrimento fazendo com que o tamanho aumente consideravelmente. Este fato pode ser confirmado pelos valores de potencial Zeta, onde as nanopartículas apresentaram valores altos.

Outros aspectos também podem ser considerados, como a concentração muito alta de ambos os polieletrólitos, que podem formar aglomerados aleatoriamente ao invés de estruturas compactas [SARMENTO *et al.*, 2007b; SCHATZ *et al.*, 2004b].

4.2.2.8 Liberação de cloroquina

A nanopartícula utilizada para a incorporação foi CMA0,63QTa na razão de carga n^+/n^- 4 com tamanho de $431 \pm 2,2$ nm, pois foi a que obteve melhor capacidade de retenção da cloroquina, $43 \pm 0,3$ %. A Figura 41 mostra o comportamento da liberação da cloroquina em água e em tampão fosfato pH 7,4.

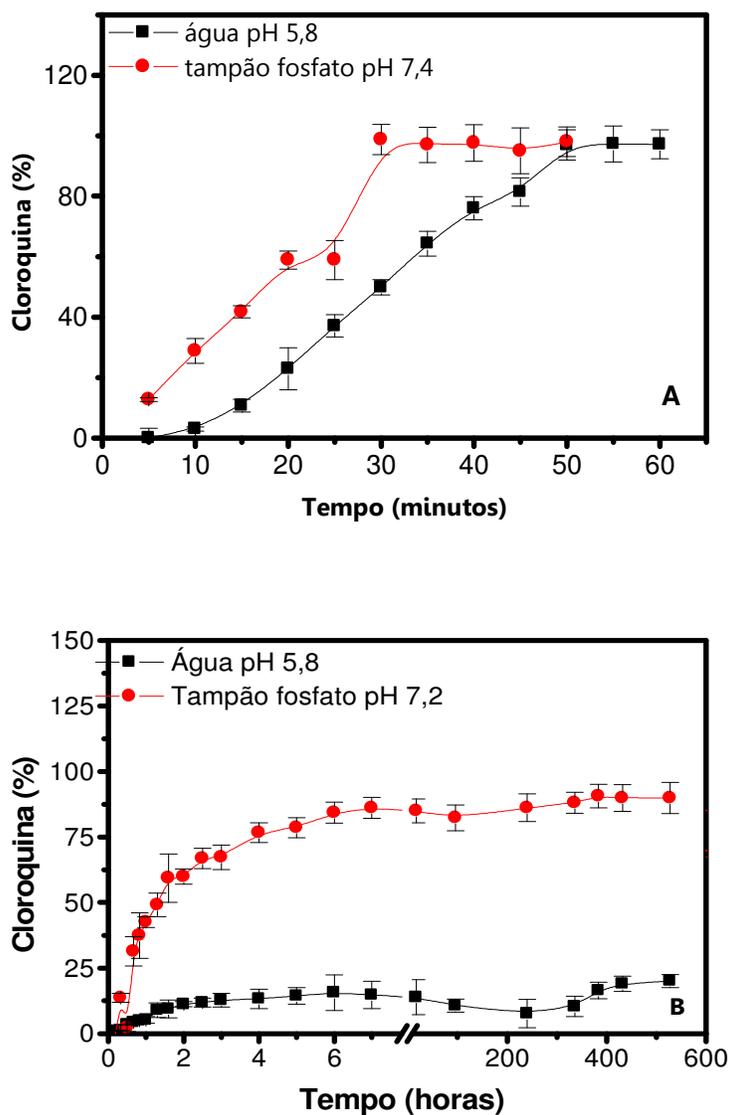


Figura 41. Curvas de liberação de cloroquina livre (a) e após incorporação em nanopartículas de CMA0,63QTa na razão n^+/n^- 4 (b) em água (pH 5,8) e em tampão fosfato (pH 7,4) a 37 °C.

Na Figura 41a o perfil de liberação do fármaco livre mostrou que em 50 minutos é liberado 97 % da cloroquina em água (pH 5,8) e em tampão fosfato pH 7,4 a liberação foi de 98% em 30 minutos. Na Figura 41b a liberação da cloroquina incorporada na matriz foi lenta para pH 5,8 pelo fato de ter liberado apenas 20 % em 22 dias (576 horas). Isto pode ser devido a grande interação eletrostática de ambos polieletrólitos, promovendo uma estrutura rígida e permitindo um baixo intumescimento retardando a difusão do fármaco da matriz.

Observando a curva em pH 7,2, nota-se que a liberação é rápida, pois libera 84 % em 6 horas, contudo a liberação só atinge o equilíbrio em 10 dias (240 horas), este comportamento indica que nas primeiras horas o aumento do pH contribuiu para o enfraquecimento da interação entre COO^- de ácido carboximetilado e NH_3^+ da quitosana que permitiu um maior intumescimento, acelerando o processo de liberação do fármaco e dissolução no meio, após esse tempo que o CPE liberou lentamente deve ter sido pelo fato da matriz ter atingido seu equilíbrio de intumescimento.

Mesmo comportamento foi observado para liberação de diclofenaco de sódio através de nanopartículas de goma kondagogu e quitosana com diâmetro de 200 nm aproximadamente. As nanopartículas tiveram maior capacidade de incorporação, cerca de 64 % e liberaram quase 100 % do fármaco em 4 horas [NAIDU *et al.*, 2009]. Outro comportamento semelhante ocorreu para nanopartículas de quitosana e poli(ácido aspártico) obtidas por complexação polieletrólítica. A capacidade de incorporação de BSA foi de 90 % e sua liberação em pH 7,4 foi rápida, liberando 90 % da proteína incorporada em 20 horas [SHU *et al.*, 2009]. Nanopartículas de quitosana carboximetilada (DA= 81 % e MM = $5,4 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$) e ácido linoléico foram utilizadas para incorporação da adrimicina, um quimioterápico.

Os autores observaram que a liberação em pH 7,4 apresentou inicialmente efeito de erosão liberando de 26 a 44 % durante 12 horas, em seguida uma liberação sustentada foi observada de 40 a 70 % em 7 dias de estudo. A erosão ocorrida no início da liberação se deve ao fato da adrimicina estar adsorvida na superfície da matriz. Já o mecanismo associado a baixa liberação pode ter sido pela forte interação

entre os segmentos do ácido linoléico e adrimicina, como também o alto grau de substituição da quitosana formando um núcleo hidrofóbico e rígido [TAN e LIU, 2009]. Nanopartículas de trimetil quitosana (DA = 85 % e MM = $5 \times 10^5 \text{g.mol}^{-1}$) com insulina foram obtidas com tamanhos aproximados de 200 nm; a capacidade de incorporação foi baixa ($17,2 \pm 4,3 \%$) e a liberação foi de 90 % em 4 horas [YIN *et al.*, 2009]. Estudo de incorporação e liberação foram realizados para CPEs de quitosana, sulfato de dextrana e alginato reticulado em Ca^{2+} . As nanopartículas tiveram tamanhos entre 400 a 600 nm aproximadamente. A eficiência de incorporação foi de 85 % de insulina. A liberação seqüenciada foi de 20 % em 120 minutos em simulação do fluido gástrico e acima de 80 % em fluido intestinal [WOITISKI *et al.*, 2009].

A cinética de liberação de cloroquina foi descrita por RIGER e PEPPAS, 1987. O gráfico de $\log M_t/M_\infty$ versus $\log t$ mostrado na Figura 42, indicam que valores de n obtidos são de 0,18 e 0,31 para cloroquina sendo liberada em água e em tampão fosfato pH 7,4 0,1 M respectivamente, caracterizando um fenômeno não Fickiano de liberação, ou seja, a matriz passa por relaxação da cadeia seguida de difusão do fármaco.

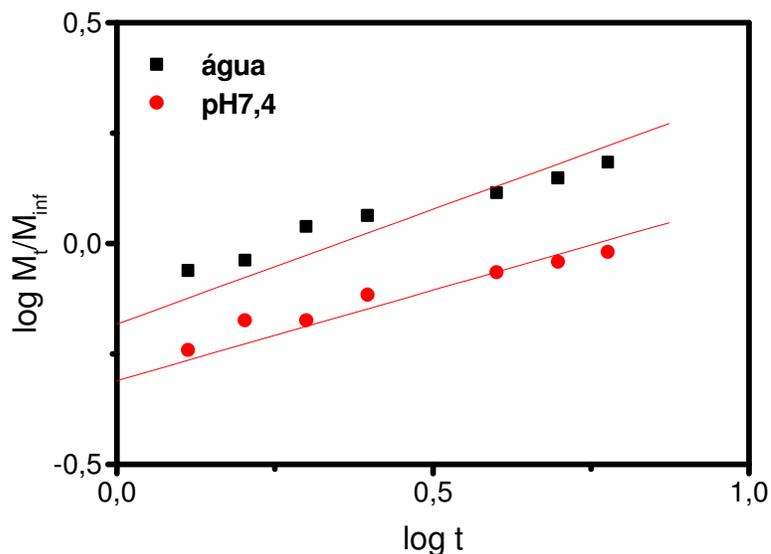


Figura 42. Gráfico de $\log M_t/M_\infty$ versus $\log t$ para liberação da cloroquina através da nanopartícula de CMA0,63QTa n+/n- 4 a temperatura controlada de 37 °C.

4.3 Síntese de nanopartículas à base de angico enxertado com ácido acrílico

A preocupação de sintetizar nanopartículas à base de polissacarídeo pela reação de copolimerização com ácido acrílico foi a utilização do iniciador nitrato de amônio cérico pelo fato da possível destruição da cadeia principal do polímero "*backbone*", porém a análise de infravermelho descartou esta hipótese devido ao aparecimento das bandas características da ligação glicosídica após a reação.

Outra preocupação foi a possível formação do homopolímero como reação majoritária, contudo a análise de tamanho de partícula como também de infravermelho mostram que a enxertia foi realizada com sucesso, pelo fato do tamanho inicial de partícula do ácido ser de 417 nm e do angico 8 nm, após a síntese as nanopartículas permaneceram com tamanhos de aproximadamente 17 nm em média. O infravermelho indicou a presença de grupos COO⁻ do ácido poli(acrílico) no polissacarídeo devido a banda em 1555 cm⁻¹.

4.3.1 Caracterização por Infravermelho

A Figura 43 mostra os espectros da goma do angico e das nanopartículas de goma do angico enxertadas com ácido acrílico nas razões NPGA2 e NPGA1b (Tabela 8).

A goma apresenta bandas atribuídas à vibração de estiramento do O-H (3422 cm⁻¹) e de C-H (2930 cm⁻¹), além da vibração de deformação do O-H da água em 1647 cm⁻¹, bandas intensas devido à vibração de estiramento C-O-C das ligações glicosídicas e da deformação do álcool. A literatura mostra que o espectro de poli(ácido acrílico) (PAA) possui uma banda forte em torno de 3500 cm⁻¹ e 2924 cm⁻¹ atribuídas às vibrações de estiramento dos grupos O-H e CH₂, respectivamente [SILVA *et al.*, 2009].

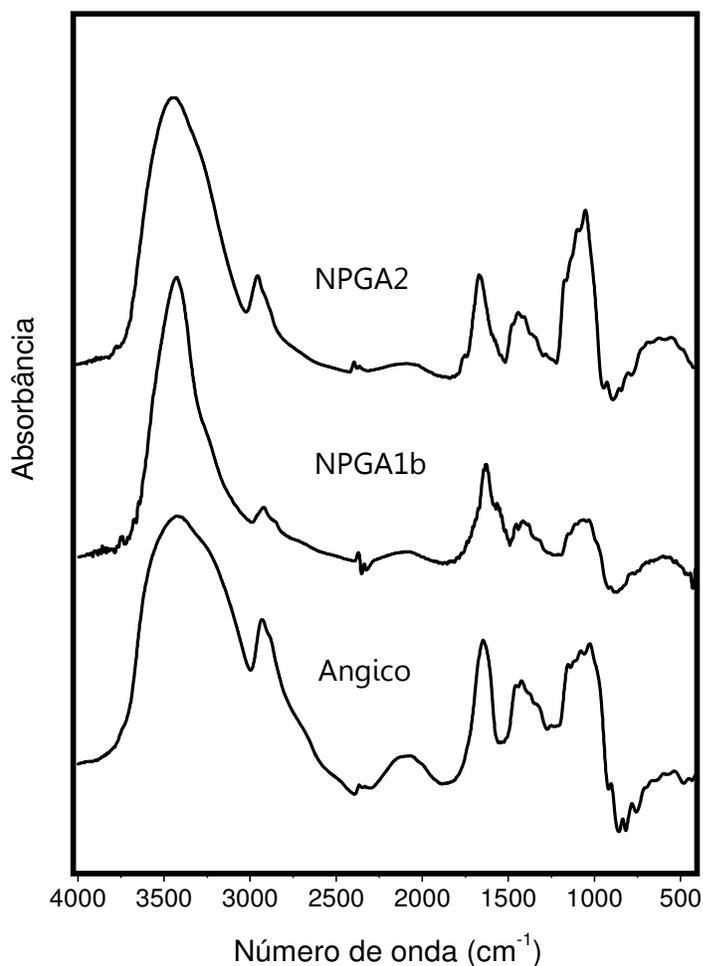


Figura 43. Espectros de Infravermelho do angico e nanopartículas.

As vibrações simétricas e assimétricas dos grupos carboxilato do PAA estão presentes nas regiões de $1564 - 1539 \text{ cm}^{-1}$ e $1408 - 1419 \text{ cm}^{-1}$, respectivamente [TANG *et al.*, 2006; HUA e WANG, 2009 e HU *et al.*, 2002]. Absorções em $1000 - 1200 \text{ cm}^{-1}$ são observados com mais evidência para NPGA2, indicando a reticulação com bis-acrilamida (MBA) após a enxertia. As nanopartículas de GA e AA apresentam um ombro em 1563 cm^{-1} (NPGA1b) atribuídas à vibração de estiramento do COO⁻ do carboxilato, indicando a presença de PAA na nanopartícula.

4.3.2 Caracterização por tamanho de partícula

A reação de enxertia ocorreu pela adição do poli(ácido acrílico) no polissacarídeo produzindo nanopartículas com tamanhos de aproximadamente 20 nm. A Figura 44 mostra o perfil de distribuição de tamanho para os polímeros de partida e da nanopartícula formada. A Figura 45 apresenta a distribuição do tamanho das nanopartículas preparadas pela polimerização em várias razões molares (unidade glicosídica/AA) e os valores estão representados na Tabela 8.

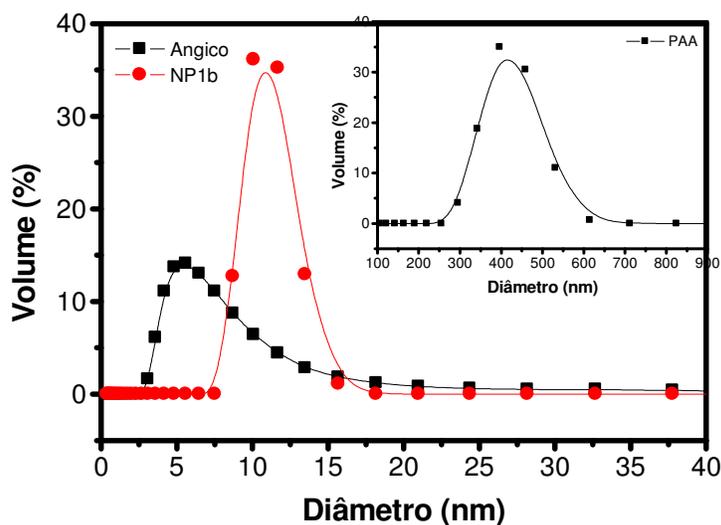


Figura 44. Perfis de distribuição do diâmetro dos polímeros precursores e da nanopartícula NPGA1b.

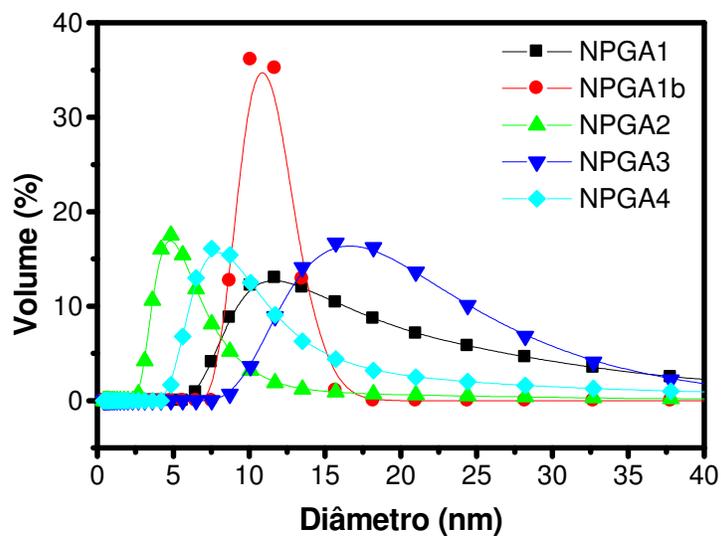


Figura 45. Perfis de distribuição do diâmetro das nanopartículas após secagem e redispersão em água.

Tabela 8. Valores de potencial Zeta, tamanho de partícula após dispersão em água e rendimento reacional.

Amostras	UG*/AA	AA/CAN	Pico 1 Nm	IPD	Pζ (mV)	Rendimento %
Angico			8,4 \pm 0,1	0,46	-	-
PAA			417,3 \pm 2,5	1,00	-13,0 \pm 1,2	-
NPGA1	1,0	7	19,4 \pm 1,2	0,30	-13,1 \pm 0,7	50,7
NPGA2	1,0	10	6,4 \pm 0,5	0,49	-29,1 \pm 2,8	52,6
NPGA3	2,0	7	18,3 \pm 1,6	0,59	-17,2 \pm 1,4	47,7
NPGA4	3,0	7	12,1 \pm 0,6	0,26	-20,3 \pm 0,8	46,3
NPGA1b	4,0	7	15,9 \pm 0,7	0,64	-17,4 \pm 0,3	81,7

É mostrado que tanto para GA como para as nanopartículas, a distribuição do diâmetro se mostra preferencialmente unimodal. A nanopartícula de razão molar GA/AA = 1 e AA/CAN = 7 apresentou um diâmetro de 19,4 nm com índice de polidispersão de 0,3. Diminuindo a quantidade de iniciador, em AA/CAN = 10, observa-se que o diâmetro atinge um valor de 15,9 nm. Contudo o perfil da distribuição de tamanho não é mais uniforme, apresentando um índice de polidispersividade de 0,64. Nanopartículas sintetizadas apenas com ácido poliacrílico (PAA) apresentaram tamanho superior (417 nm) ao observado nas nanopartículas de goma do angico enxertada com ácido acrílico (NPGA). Apesar do tamanho de partícula não sofrer grandes alterações, a quantidade menor de iniciador leva ao aumento do rendimento que sobe de 50 a 81 %.

Comparando os resultados com os da literatura, constata-se que a síntese de nanopartículas de dextrana-PAA [TANG *et al.*, 2006] produz partículas maiores que as obtidas neste estudo. Os autores conseguiram um diâmetro de 100,4 nm nas mesmas condições reacionais da amostra NPGA1b. Já para nanopartículas de sulfato de dextrana-PAA os polímeros possuem cargas iguais, promovendo um aumento de tamanho devido à repulsão eletrostática.

Nanopartículas de cajueiro/PAA foram investigadas nas mesmas razões molares de unidade glicosídica/AA e AA/MBA [SILVA *et al.*, 2009]. Os autores obtiveram tamanhos de 71 a 603 nm, concluindo que o aumento da razão unidade glicosídica/AA de 0,5 a 2,0 leva a um aumento considerável ao tamanho de partícula

de 71,1 nm a 603 nm, respectivamente, o que não ocorre para nanopartículas de angico-PAA deste estudo. HU *et al.*, [2006] obtiveram uma nanopartícula de QT-PAA na razão molar de 1 (unidade glicosídica /AA) com um diâmetro de 206 nm com baixa polidispersividade. XIAOJUN *et al.*, [2009] conseguiram nanopartículas de hidroxipropil celulose enxertadas com ácido acrílico de tamanhos entre 100 a 400 nm. Nanopartículas de dextrana enxertada com poli(N-isopropilacrilamida) tiveram um diâmetro entre 73 a 98 nm [PATRIZI *et al.*, 2009].

Os resultados do potencial Zeta (Tabela 8) mostram que a superfície das nanopartículas NPGA tem carga superficial negativa, e isto é comum devido os dois polímeros terem natureza aniônica, sendo que o angico em bem menor quantidade. Como o PAA possui maior quantidade de cargas, o excesso será absorvido na superfície da nanopartícula [HU *et al.*, 2002] aumentando as cargas na superfície e consequentemente deixando o potencial Zeta mais negativo. O mesmo efeito acontece para nanopartículas de goma do cajueiro/PAA, porém observa-se valores inferiores aos deste estudo (-7,7 a -14 mV) [SILVA *et al.*, 2009].

O potencial Zeta das nanopartículas não sofreu tendência em relação às razões AA/CAN e unidade glicosídica/AA, porém o potencial apresentou valores negativos entre -13,0 a -29,0 mV. Valores pequenos de potencial, como é o caso de NPGA1, podem indicar, além de poucas cadeias de PAA, envolvimento por segmentos de GA, os quais podem estar localizadas principalmente na parte interior da nanopartícula [TANG *et al.*, 2006].

4.3.3 Efeito do pH

O comportamento do diâmetro das nanopartículas em relação ao pH foi investigado. A Figura 46 mostra o perfil da distribuição de tamanhos para nanopartículas secas e redispersas em tampão fosfato em pH 4 a 9,5 (Tabela 9).

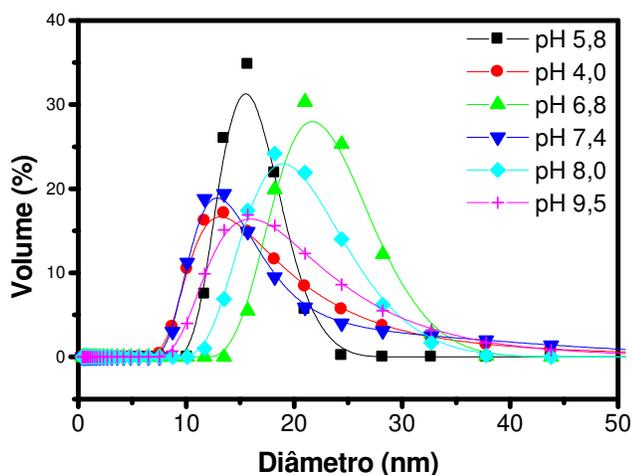


Figura 46. Influência do pH nos diâmetros das nanopartículas de NPGA1b.

Tabela 9. Valores do tamanho de partícula para NPGA1b em função do pH.

pH	Diâmetro (nm)
5,8 (água)	15,7 ± 0,7
4,0	22,2 ± 0,5
6,8	22,2 ± 0,5
7,4	20,1 ± 5,1
8,0	17,9 ± 0,9
9,5	17,9 ± 1,7

A distribuição de tamanho de partícula foi unimodal em todos os pHs investigados e uma variação pequena de tamanho foi observada com o aumento do pH do sistema de 4,0 para 9,5. Este comportamento pode ser devido a um alto grau de reticulação na nanopartícula promovendo a diminuição da flexibilidade da matriz polimérica, evitando o efeito de intumescimento.

Observa-se que não houve alteração significativa, como também não ocorreu aumento de potencial Zeta, cujo valor médio foi de -12,4 mV. Efeito diferente ocorreu para nanopartículas de goma do cajueiro enxertada com poli(ácido acrílico) em pH 1,8 a 9,0. O tamanho das partículas teve um crescimento bastante

acentuado com o aumento de pH variando de 390 a 601 nm para a razão de unidade glicosídica/AA = 1 [SILVA *et al.*, 2009].

Nanopartículas de hidroxipropil celulose enxertada com N-isopropil acrilamida e PAA, na razão mássica de 1,7:1:1 (HNAb), respectivamente, não foram sensíveis a faixa de pH de 3,5 a 10, tendo um diâmetro praticamente constante em torno de 200 nm, aumentando a quantidade de N-isopropilacrilamida para a razão mássica de 1,7:1,7:1 (HNAA2) os diâmetros atingiram cerca de 400 nm para pH 3,5 e foram decrescendo até pH 7 quando atingiram diâmetros menores, cerca de 200 nm. Aumentando o pH para 10, as nanopartículas sofrem um aumento no seu diâmetro novamente ultrapassando os 400 nm [XIAOJUN *et al.*, 2009].

4.3.4 Efeito de secagem

As medidas de tamanho de partícula e de potencial Zeta para as nanopartículas de goma do angico enxertadas com ácido acrílico (NPGA) foram feitas em dispersão e depois de secas por *spray dryer* e redispersas em água, como mostrado na Tabela 10.

Tabela 10. Valores de tamanho e potencial Zeta para nanopartículas antes e depois do processo de secagem.

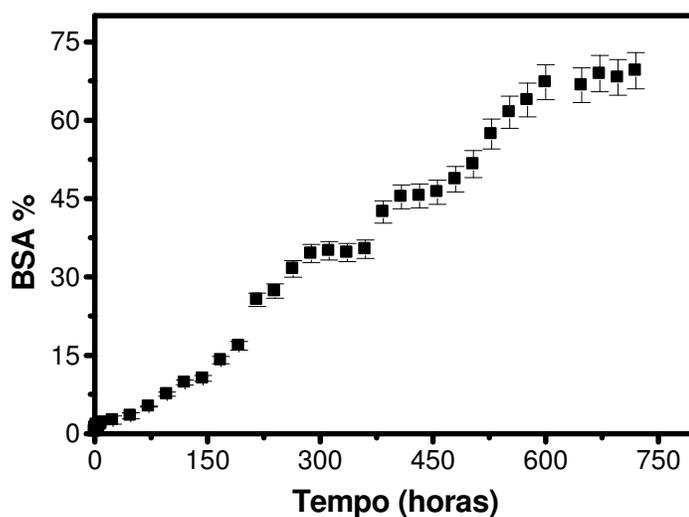
	Antes da secagem			Após secagem	
	Diâmetro (nm)	IPD	P ζ (mV)	Diâmetro (nm)	P ζ (mV)
NPGA1	18,4 ± 1,70	0,54 ± 0,10	-27,6 ± 0,90	19,4 ± 1,20	-13,0 ± 0,7
NPGA2	6,5 ± 0,05	0,48 ± 0,70	-32,0 ± 5,80	6,4 ± 0,50	-29,0 ± 2,8
NPGA3	17,7 ± 1,70	0,60 ± 0,10	+13,0 ± 2,10	18,3 ± 1,60	-17,2 ± 1,4
NPGA4	4,9 ± 0,10	0,44 ± 0,05	-20,3 ± 0,52	12,1 ± 0,60	-20,3 ± 0,8
NPGA1b	15,9 ± 0,70	0,65 ± 0,03	-17,4 ± 0,90	15,9 ± 2,70	-17,4 ± 0,3

É observado que o processo de secagem por *spray dryer* não interfere no tamanho e tão pouco no grau de polidispersividade, com exceção de NPGA4. Os valores de potencial Zeta (ζ) sofreram uma pequena redução para as nanopartículas

de NPGA1 e NPGA2. Outros processos de secagem foram estudados: o processo de liofilização provocou grande alteração na liberação de BSA, onde toda a proteína foi liberada nos primeiros 30 minutos. O processo de centrifugação provocou a formação de agregados, tornando a nanopartícula incapaz de se redispersar.

4.3.5 Estudo de liberação de BSA

O comportamento de liberação do BSA em NPGA1b foi avaliado em tampão fosfato 7,4 como mostra a Figura 47. A nanopartícula NPGA1b foi utilizada para incorporação de BSA, com capacidade de incorporação de 51 %.



este valor é crescente até o trigésimo dia, quando atinge cerca de 69 % da proteína liberada.

A cinética de liberação de BSA, como mostrada na Figura 48 mostrou que o perfil de liberação é não Fickiano com valor de $n = 7,3$, portanto o sistema possui dois mecanismos: um de relaxação da cadeia e o outro de difusão da proteína pela matriz.

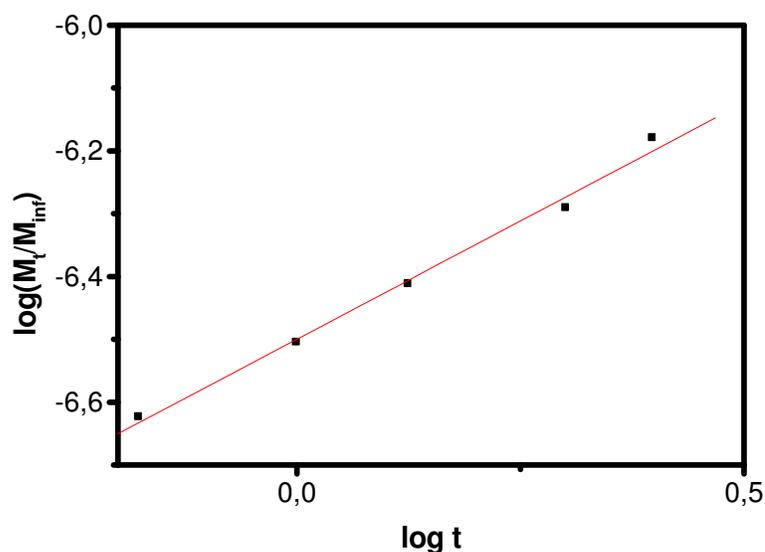


Figura 48. Gráfico de $\log(M_t/M_{\infty})$ versus $\log t$ para liberação de BSA através da nanopartícula NPGA1b em solução tampão pH 7,4 0,1 M em temperatura controlada de 37 °C.

A mudança no comportamento pode ser devido a uma liberação lenta onde a proteína sai da matriz por difusão. Quanto à solubilidade do BSA, esta proteína se mostra atípica em relação às demais, onde a solubilidade aumenta com o aumento de pH [ALIAS *et al.*, 2008], provavelmente a liberação desse sistema em pHs maiores seria maior. A liberação de BSA em nanopartículas de NPGA1b mostra que este sistema é promissor para administração de fármacos que precisam ser administrados diariamente, como é o caso da insulina. O tamanho pequeno obtido e a liberação lenta contribuem para que esse sistema seja promissor para administração intravenosa.

Nanopartículas de amilose enxertada com 2-hidroxietilmetacrilato (HEMA) foram sintetizadas com o iniciador CAN para incorporação de BSA. Observou-se que as nanopartículas tiveram um tamanho aproximado de 50 nm e que a liberação de BSA a 37 °C foi lenta atingindo o equilíbrio em 700 minutos. O autor justifica a liberação lenta pelo fato da massa molar de BSA ser alta o suficiente, dificultando a difusão pela matriz [ALIAS *et al.*, 2008].

Nanopartículas de hidroxipropilcelulose foram enxertadas com N-isopropilacrilamida e AA (HNAb) com tamanho de 200 nm para incorporação de teofilina por método físico. Os autores observaram uma incorporação de 12,2 % e que a liberação a 37 °C foi rápida e atingiu o equilíbrio em 10 horas para o tampão de pH 7,4. O perfil da liberação apresentou 2 mecanismos: na primeira hora ocorre o efeito de erosão, neste período, a teofilina liberada atinge cerca de 50 %, em seguida ocorre uma liberação lenta de 30 % do total do fármaco em 2 horas, e depois a liberação ocorre tão lentamente que atinge o equilíbrio [XIAOJUN *et al.*, 2009].

Um caso parecido com este estudo foi a liberação de BSA em microesferas de poli(Ácido Lático – co – Ácido Glicólico) (PLGA). Foi reportado por WEI *et al.*, [2004] que um período de 4 semanas, o PLGA, com diferentes razões de ácido lático/ácido glicólico, só cerca de 30 % de BSA foi liberado para microesferas de PLGA na razão de 50/50, enquanto somente 10 % foi liberado para microesferas de poli(Ácido – L – Lático) (PLLA). Observaram também que, nas primeiras 4 semanas, o mecanismo de liberação foi a difusão já que microesferas de PLLA são mais hidrofóbicas em relação as de PLGA. No período de 20 semanas, a liberação ocorreu devido a erosão.

CONCLUSÃO

Nanopartículas sintetizadas por complexação polieletrólítica entre goma do angico isolada e carboximetilada com quitosana tiveram tamanhos de 10 a 50 nm, com exceção das nanopartículas de CMA0,63 que obtiveram tamanhos entre 400 a 600 nm, este aumento foi relacionado ao mecanismo de formação do CPE onde os grupos NH_3^+ da quitosana interagem com os grupos COO^- da goma, e seu excesso provoca um recobrimento na nanopartícula formada promovendo o aumento de tamanho. Outros fatores influenciaram, tais como: razão de cargas n^+/n^- , grau de substituição da goma do angico, ordem de adição dos polieletrólitos e tempo de estocagem em solução.

A nanopartícula de CMA0,63QTa na razão n^+/n^- 4 com diâmetro de $431 \pm 2,2$ nm, produzida pelas soluções polieletrólíticas de $1,5 \times 10^{-3}$ g.mol⁻¹ foi mais eficiente para a incorporação da cloroquina onde $43 \pm 0,3$ % de fármaco foi incorporado sem que houvesse alteração no tamanho da nanopartícula. O perfil de liberação da cloroquina foi lento em água (pH 5,8), liberou 20 % após 22 dias. Na liberação de cloroquina em pH 7,4 foi observado que o perfil da curva de liberação foi semelhante a liberação em água, porém muito mais rápida nos 22 dias em estudo, 89%. Conclui-se que esse sistema é promissor para administração via oral a ser liberado no trato gastrintestinal.

A análise morfológica mostrou que as nanopartículas possuem forma ovalar tanto para CPE de GAQT como para QTGA na razão $n^+/n^- = 1$, apresentando tamanhos de 10 e 14 nm respectivamente.

Nanopartículas de angico via enxertia por ácido acrílico tiveram tamanhos de 15,9 nm para a razão AA/CAN 10 com rendimento de 81%, mostrando um comportamento unimodal. Observou-se que o tamanho de partícula praticamente não é alterado quando seca por spray dryer. Os testes iniciais constataram que o tamanho de partícula não é dependente do pH. A incorporação de BSA foi de 50 % sendo que a liberação desta proteína foi lenta nos 30 dias investigados, liberando

69%. O tamanho de partícula obtido para esta rota, leva a possibilidade de ser administrada via intravenosa.

REFERÊNCIAS

ABRAN, M. S.; HILGUERA, I. **Quitina y Quitosano**, Ed. Ana Pastor de Abram, Peru, 2004.

ACEDO-CARRILO, J. I.; ROSAS-DURAZO, A.; HERRERA-URBINA, M.; RINAUDO, M.; GOYCOOLEA, F. M.; VALDEZ, M. A. Zeta potential and drop growth of oil in water emulsions stabilized with mesquite gum. **Carbohydrate Polymers**, v. 65, p. 327-336, 2006.

AKAO, T.; KOBASHI, K., ABURADA, M. Enzyme studies on the animal and intestinal bacterial metabolism of geniposide. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 17, p. 1573-1576, 1994.

ALIAS, J.; SILVA, I.; GOÑI, I.; GURRUCHAGA, M. Hydrophilic amylose-based graft copolymers for controlled protein release. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, p. 31-40, 2008.

ALLEN, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**, Ed. Artmed, 8ª Ed., Porto Alegre, 2007.

ALLEN, T. **Particle Size Measurement**, 4th edition, Chapman and Hall, 1992.

AMIDON, G. L.; LENNERAS, H.; SHAH, V. P.; CRISON, J. R. A Theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 102, p. 413-420, 1995.

ANH, N. T.; PHU, D. V.; DUY, N. N.; DU, B. D.; CHIEN, N. Q. Synthesis of alginate stabilized gold nanoparticles by g-irradiation with controllable size using different Au³⁺ concentration and seed particles enlargement. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 79, p. 405-408, 2010.

ANTON, N.; BENOIT, J-P.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates. **Journal of Controlled Release**, v. 128, p. 185-199, 2008.

APPLICATION note, **The measurement of zeta potential using an autotitrator: Effect of conductivity**. Disponível em: <http://www.malvern.com>. Acesso em mar. 2009a.

APPLICATION note, **The measurement of zeta potential using an autotitrator: Effect of pH**. Disponível em: <http://www.malvern.com>. Acesso em mar. 2009b.

ARTHUR, J. C.; BAUGH, P. J.; HINOJOSA, O. ESR study of reactions of cellulose initiated by the ceric ion method. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 10, p. 1591-1606, 1966.

AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**, Ed. Artmed, 2ª Ed., Porto Alegre, 2008.

AUMELAS, A.; SERRERO, A.; DURAND, A.; DELLACHERIE, E.; LEONARD, E. Nanoparticles of hydrophobically modified dextrans as potential drug carrier systems. **Colloids and Surface B**, v. 59, p. 74-80, 2007.

AVADI, M. R.; SADEGHI, A. M. M.; MOHAMMADPOUR, N.; ATYABI, S. A. F.; DINARVAND, R.; RAFIEE-TEHRANI, M. Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method. **Nanomedicine**, v.6, p. 58-63, 2010.

BAE, B-C.; NA, K. self-quenching polysaccharide-based nanogels of pullulan/folate-photosensitizer conjugates for photodynamic therapy. **Biomaterials**, v. 31, p. 6325-6335, 2010.

BAJPAI, U. D. N.; JAIN, A.; RAI, S. Grafting of acrylamide onto guar gum using KMnO_4 /oxalic acid redox system. **Journal Applied of Polymer Science**, v. 39, p. 2187-2204, 1990.

BAJPAI, U. D. N.; RAI, S. Grafting of arylamide onto guar gum using KMnO_4 /Oxalic acid redox system. **Journal Applied of Polymer Science**, v. 35, p. 1169-1182, 1988.

BARBOSA, D. C. A. Crescimento de *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan (Leguminosae –Mimosoideae). **Phytochemistry**, v. 52, p. 51-52, 1991.

BAYAT, A.; LARIJANI, B.; AHMADIAN, S.; JUNGINGER, H. E.; RAFIEE-TEHRANI, M. Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and its quaternized derivatives. **Nanomaterials**, v. 4, p. 115-120, 2008.

BECKERS, G. J. J.; VERINGA, H. J. Some restrictions in particle sizing with the horiba CAPA-500. **Powder Technology**, v. 60, p. 245-248, 1989.

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J. M.; FELT, O.; PEPPAS, N. A.; GURNY, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, p. 19-34, 2004.

BETTINI, R.; COLOMBO, P.; PEPPAS, N. A. Drug concentration profiles during release from hydrophilic matrices. **Controlled Release Society**, v. 24, p. 635-636, 1997.

BETTINI, R.; PEPPAS, N. A.; COLOMBO, P. Polymer relaxation in swellable matrices contributes to drug release. **Controlled Release Society**, v. 25, p. 36-37, 1998.

BODNAR, M.; HARTMANN, J. F.; BORBELY, J. Nanoparticles from chitosan. **Macromolecular Symposium**, v. 227, p. 321-326, 2005a.

BODNAR, M.; HARTMANN, J. F.; BORBELY, J. Preparation and characterization of chitosan-based nanoparticles. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 2521 – 2527, 2005b.

BODDOHI, S.; ALMODÓVAR, J.; ZHANG, H.; JOHNSON, P. A.; KIPPER, M. J. Layer-by-layer assembly of polysaccharide-based nanostructured surfaces containing polyelectrolyte complex nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 77, p. 60–68, 2010.

BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 280, p. 241-251, 2004.

BRAZ, R. M.; ANDREOZZI, V. L.; KALE, P. L. Detecção precoce de epidemias de malária no Brasil: uma proposta de automação. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 15, p. 21-33, 2006.

BUCCHAMMER, H-M.; MENDE, M.; OELMANN, M. Formation of mono-sized polyelectrolyte complex dispersions: effects of polymer structure, concentration and mixing conditions **Colloids and Surface A**, v. 218, p. 151-159, 2003.

CALVO, P.; REMUNAN, C.; VILAJATO, J. L.; ALONSO, M. J. Novel hydrophilic chitosanpolyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. **Journal Applied of Polymer Science**, v. 63, p. 125-132, 1997.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica**; Colombo: Embrapa Florestas, p. 1039, 2003.

CASAS, M.; FERRERO, C.; JIMÉNEZ-CASTELLANOS, M. R. Graft tapioca starch copolymers as novel excipients for controlled-release matrix tablets. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, p. 71-77, 2010.

CHANG, R. K. Formulations approaches for sustained release oral suspensions. **Pharmaceutical Technology**, v. 16, p. 134-136, 1992.

CHAUVIERRE, C.; VAUTHIER, C.; LABARRE, D.; HOMMEL, H. Evaluation of the surface properties of dextran-coated poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles by spin-labelling coupled with electron resonance spectroscopy. **Colloids in Polymer Science**, v. 282, p. 1016-1025, 2004.

CHAYED, S.; WINNIK, M. F. In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of polysaccharide-based nanoparticulate oral drug delivery systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 65, p. 363-370, 2007.

CHEN, Y.; LIN, X.; PARK, H.; GREEVER, R. Study of artemisin nanocapsules as anticancer drug delivery systems. **Nanomedicine**, v. 5, p. 316-322, 2009.

CHI, P.; WANG, J.; LIU, C. Synthesis and characterization of polycationic chitosan-graft-poly(l-lysine). **Materials Letters**, v. 62, p. 147-150, 2008.

CHOI, K.; CHUNG, H.; MIN, K. H.; YOON, H. Y.; KIM, K.; PARK, J. H.; KWON, I. C.; JEONG, S. Y. Self-assembled hyaluronic acid nanoparticles for active tumor targeting. **Biomaterials**, v. 31, p. 106-114, 2010

CHOWDHURY, P.; SAMUI, S.; KUNDU, T.; NANDI, M. M. Graft polymerization of methyl methacrylate onto guar gum with ceric ammonium sulfate/dextrose redox pair. **Journal Applied of Polymer Science**, v. 82, p. 3520-3525, 2001.

CHURCH, J. A. A redox-initiated xylan-poly(sodium acrylate) graft copolymer. *Journal of Polymer Science. A-1*, **Polymer Physics**, v. 5, p. 3183-3192, 1967.

CLARK, R. J. H. **Spectroscopy for surface science**. New York, John Wiley & Sons, 1998.

COIMBRA, R. **Notas de fitoterapia**. Rio de Janeiro, Lab. Silva Araújo, 1942.

CONSELHO NACIONAL DE PESQUISA (CNPq) – **A iniciativa brasileira em nanociência e nanotecnologia**, Brasília. Novembro, 2002.

CUI, Z. R.; MUMPER, R. J. Chitosan-based nanoparticles for topical generic immunization. **Journal Controlled Release**, v. 75, p. 409-419, 2001.

CUNICO, W.; CARVALHO, S. A.; GOMES, C. R. B.; MARQUES, G. H. Fármacos antimalariais . história e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 89, p. 49-55, 2008.

DANESHFAR, A.; VAFAFARD, S. Solubility of chloroquine diphosphate and 4,7-dichloroquinoline in water, ethanol, tetrahydrofuran, acetonitrile, and acetone from (298.2 to 333.2) K. **Journal of Chemical Engineering Data**, v. 54, p. 2170-2173, 2009.

DELGOBO, C. L.; GORIN, P. A. J.; JONES, C.; IACOMINI, M. Gum heteropolysaccharide and free reducing mono and oligosaccharides of *Anadenanthera Columbrina*. **Phytochemistry**, v. 47, p. 1207-1214, 1998.

DEV, A.; BINULAL, N. S.; ANITHA, A.; NAIR, S. V.; FURUIKE, T.; TAMURA, H.; JAYAKUMAR, R. Preparation of poly(lactic acid)/chitosan nanoparticles for anti-HIV drug delivery applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, p. 833–838, 2010.

DINCKINSON, E. Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1473–1482, 2009.

DODOV, M. G.; CALIS, S.; CRCARESVKA, M. S.; GESKOVISK, N.; PETROVSKA, V.; GORACINOVA, K. Wheat germ agglutinin-conjugated chitosan – Ca – alginate microparticles for local colon delivery of 5-FU: Development and *in vitro* characterization, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 381, p. 166-175, 2009.

DONG, Y. M.; QIU, W. B.; RUAN, Y.; WU, Y. S.; WANG, M. A.; XU, C. Y. Influence of molecular weight on critical concentration of chitosan/formic acid liquid crystalline solution. **Polymer Journal**, v. 33, p. 387-389, 2001.

DU, J.; SUN, R.; ZHANG, L. F.; XIONG, C. D.; PENG, Y. X. Novel Polyelectrolyte carboxymethyl konjac glucomanan-chitosan nanoparticles for drug delivery. **Biopolymers**, v. 78, p. 1-8, 2005.

DUAN, K.; CHEN, H.; HUANG, J.; YU, J.; LIU, S.; WANG, D.; LI, Y. One-step synthesis of amino-reserved chitosan-graft-polycaprolactone as a promising substance of biomaterial. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, p. 498–503, 2010.

DUMITRIU, S. **Polysaccharides: structural diversity and functional versatility**, 2^a Ed., 2005.

DUMITRIU, S.; CHORNET, E. Inclusion and release of proteins from polysaccharide-based polyion complexes. **Advanced Drug Delivery Review**, v. 31, p. 223-246, 1998.

EIRAS, C.; PASSOS, I. N. G.; BRITO, A. C. F.; SANTOS, J. R.; ZUCOLOTTI, V.; OLIVEIRA, O. N.; KITAGAWA, I. L.; CONSTANTINO, C. J. L.; CUNHA, H. N. Nanocompósitos eletroativos de poli-O-metoxianilina e polissacarídeos naturais, **Química Nova**, v. 30, p. 1158-1162, 2007.

ESPINOSA-ANDREWS, H.; SANDOVAL-CASTILLA, O.; VÁZQUEZ-TORRES, H.; VERNON-CARTER, E. J.; LOBATO-CALLEROS, C. Determination of the gum Arabic–chitosan interactions by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and characterization of the microstructure and rheological features of their coacervates, **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 541-546, 2010.

EVERETT, D. H. **Basic Principles of Colloid Science**, Royal Society of Chemistry, London, 1988.

FERREIRA, A. A. P.; YAMANAKA, H. Microscopia de força atômica aplicada em imunoenaios. **Química Nova**, v. 29, p. 137-142, 2006.

FISHBINE, G. **The investor's guide to nanotechnology & micromechanics**, John Wiley & Sons, New York, 2002.

FLORENCE, A. T.; WHITEHILL, D. Stabilisation of water/oil/water multiple emulsions by polymerization of the aqueous phase. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 34, p. 687-691, 1982.

FREISE, F. W. **Plantas medicinais brasileiras**. Boletim de agricultura, v. 34, p. 252-494, 1993.

FRELICHOWSKA, J.; BOLZINGER, M-A.; VALOUR, J-P.; MOUAZIZ, H.; PELLETIER, J.; CHEVALIER, Y. Pickering w/o emulsions: Drug release and topical delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 368, p. 7-15, 2009.

GAN, Q.; WANG, T. Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier – systemic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. **Colloids Surface B**, v. 59B, p. 24-34, 2007.

GAN, Q.; WANG, T.; COCHRANE, C.; McCARRON, P. Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 44, p. 65-73, 2005.

GANJI, F.; ABDEKHODAIE, M. J. Chitosan-g-PLGA copolymer as a thermosensitive membrane. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, p. 740-746, 2010.

GAO, F-P.; ZHANG, H-Z.; LIU, L-R.; WANG, Y-S.; JIANG, Q.; YANG, X-D.; ZHANG, Q-Q. Preparation and physicochemical characteristics of self-assembled nanoparticles of deoxycholic acid modified-carboxymethyl curdlan conjugates. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, p. 606-613, 2008.

GAO, Y.; CHEN, X.; LIAO, B.; DING, X.; ZHENG, Z.; CHENG, X.; PANG, H.; PENG, Y. Polyelectrolyte self-assembly approach to smart nanocontainers. **Polymer Bulletin**, v. 56, p. 305-311, 2006.

GAROZI, T.; KHOSHAYAND, M. R. ; AZIZ, E.; YAZDIZADE, P.; NORMANI, A.; HARIRIAN, I. Evaluation of Alginate/Chitosan nanoparticles as antisense delivery vector: Formulation, optimization and in vitro characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 599-606, 2009.

GEORGE, M.; ABRAHAM, T. E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan. **Journal of Controlled Release**, v. 114, p. 1-14, 2006.

GILS, P. S.; RAY, D.; SAHOO, P. K. Designing of silver nanoparticles in gum arabic based semi-IPN hydrogel. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, p. 237-244, 2010.

GONÇALVES, L. O.; PAIVA, H. N.; NEVES, J. C. L.; GOMES, J. M. Crescimento de mudas de angico-vermelho (*Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan) sob diferentes doses de macronutrientes. **Sociedade de Investigação Florestal**, v. 32, p. 1029-1040, 2008.

GRAF, R.; RODRIGUES, J.; COUVREUR, P. Polysaccharides grafted with polyesters: novel amphiphilic copolymers for biomedical application. **Macromolecules**, v. 35, p. 9861-1867, 2002.

GUTERRES, S. S. Poly(DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. **Pharmaceutical Research**, v. 12, p. 1545-1547, 1995.

HAJDU, I.; BODNÁR, M.; FILIPESEI, G.; HARTMANN, J. F.; DARÓOEZI, L.; ZRINYI, M., **Journal of Colloid and Polymer Science**, v. 286, P. 343-345, 2008.

HINTZ, H. L.; JOHNSON, D. C. The mechanism of oxidation of cyclic alcohols by cerium(IV). **Journal of Organic Chemistry**, v. 32, p. 556-564, 1967.

HIRATA, Y.; YABUKI, S.; MIZUTANI, F. **Application of integrated SECM ultra-micro-electrode and AFM force probe to biosensor surfaces.** *Bioelectrochemistry*, v. 63, p. 217-224, 2004.

HIWAT, H.; ISSALY, J.; GABORIT, P.; SOMAI, A.; SAMJHAWAN, A.; SARDJOE, P.; SOEKHOE, T.; GIROD, R. Behavioral heterogeneity of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) and malaria transmission dynamics along the Maroni River, Suriname, French Guiana. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 104, p. 207-213, 2010.

HORNIG, S.; HEINZE, T. Nanoscale structures of dextran esters. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 280-286, 2007.

HU, F. Q.; REN, G. F.; YUAN, H.; DU, Y. Z.; ZENG, S. Shell cross-linked stearic acid grafted chitosan oligosaccharide. self-aggregated micelles for controlled release of paclitaxel. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 50, p. 97-103, 2006.

HU, Y.; HE, X.; LEI, L.; LIANG, S.; QIU, G.; HU, X. Preparation and characterization on self-assembled nanoparticles of the novel carboxymethyl pachyman-deoxycholic acid conjugates. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, p. 220-227, 2008.

HU, Y.; JIANG, X.; DING, Y.; GE, H.; YUAN, Y.; YANG, C. Synthesis and characterization of chitosan-poly(acrylic acid) nanoparticles. **Biomaterials**, v. 23, p. 3193-3201, 2002.

HUA, S.; WANG, A. Synthesis, characterization and swelling behaviors of sodium alginate-g-poly(acrylic acid)/sodium humate superabsorbent. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, p. 79-84, 2009.

HUANG, M.; HUANG, Z. L.; Bilgen, M.; Berkland, C. Magnetic resonance imaging of contrast-enhanced polyelectrolyte complexes. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 4, p. 30-40, 2008.

HUANG, Z.; LIANG, X.; HU, H.; GAO, L.; CHEN, Y.; TONG, Z. Influence of mechanical activation on the graft copolymerization of *sugarcane bagasse* and acrylic acid. **Polymer Degradation and Stability**, v. 94, p. 1737-1745, 2009.

IŞIKLAN, N.; KURŞUN, F.; İNAIL, M. Graft copolymerization of itaconic acid onto sodium alginate using benzoyl peroxide. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 665–672, 2010.

JAIN, D.; BANERJEE, D. Comparison of ciprofloxacin hydrochloride-load protein, lipid and chitosan nanoparticles for drug delivery. **Journal of Biomedical Material Research**, v. 86B, p. 105-112, 2008.

JANCIAUSKAITE, U.; RAKUTYTE, V.; MISKINIS, J.; MAKUSKA, R. Synthesis and properties of chitosan-N-dextran graft copolymers. **Reactive & Functional Polymers**, v. 68, p. 787-796, 2008.

JANES, K. A.; CALVO, P.; ALONSO, M. J. Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, p. 83–97, 2001.

JILLAVENKATESA, A.; DAPKUNAS, S. J.; LUM, L-S. NIST Special Publication 960-961, Particle Size Characterization. Jan. 2001.

JIM, J.; SONG, M.; HOUSTON, D. J. Novel chitosan-based films crosslinked by genipin with improved physical properties. **Biomacromolecules**, v. 5, p. 162-168, 2005.

JINTAPATTANAKIT, A.; JUNYAPRASERT, V.B.; MAO, S.; SITTERBERG, J.; BAKOWSKY, U.; KISSEL, T. Peroral delivery of insulin using chitosan derivatives: A comparative study of polyelectrolyte nanocomplexes and nanoparticles. **Pharmaceutical Nanotechnology**, v. 324, p. 240-249, 2007.

JONES, O. G.; DECKER, E. A.; McCLEMENTS, D. V. Comparison of protein-polysaccharide nanoparticle fabrication methods: Impact of biopolymer Complexation before or after particle formation. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 344, p. 21–29, 2010.

JONES, O.; DECKER, E. A.; McCLEMENTS, D. V. Thermal analysis of b-lactoglobulin complexes with pectins or carrageenan for production of stable biopolymer particles. **Food Hydrocolloids**, v. 24, p. 239–248, 2010.

JOURDAIN, L.; LESER, M. E.; SCHIMTT, C.; MICHEL, M.; DINCKINSON, E. Stability of emulsions containing sodium caseinate and dextran sulfate: Relationship to complexation in solution. *Food Hydrocolloids*, v. 22, p. 647–659, 2008.

KAEWATIP, K. TANRATTANAKUL, V. Preparation of cassava starch grafted with polystyrene by suspension polymerization. ***Carbohydrate Polymers***, v. 73, p. 647-655, 2008.

KECK, C. M.; MÜLLER, R. H. Size analysis of submicron particles by laser diffractometry—90% of the published measurements are false. ***International Journal of Pharmaceutics***, v. 355, p. 150–163, 2008.

KENDALL, K. Influence of powder structure on processing and properties of advanced ceramics. ***Powder Technology***, v. 58, p. 151-161, 1989.

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

KIM, E.; WHITESIDES, G. M. The Use of Minimal Free Energy and Self-Assembly to Form Shapes. ***Chemistry of Materials***, v. 7, p. 1257-126, 1995.

KOCBEK, P.; BAUMGARTNER, S.; KRISTL, J. Preparation and evaluation of nanosuspensions for enhancing the dissolution of poorly soluble drugs. ***Pharmaceutical Nanotechnology***. V. 312, p. 179-186, 2006.

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

LANE, R.; CRAIG, B.; BABCOCK, W. Materials engineering with nature's building blocks. ***The AMPTIAC Newsletter***, v. 6, p. 31-36, 2002.

LANGVIND, D. Complexation of oppositely charged polyelectrolytes and surfactants in aqueous solutions. A review. ***Advances in Colloid and Interface Science***, v. 147, p. 170–177, 2009.

LIMA, E. R. A.; HORINEK, D.; NETZ, R. R.; BISCAIA, E. C.; TAVARES, F. W.; KUNZ, W.; BOSTRÖM, M. Specific Ion Adsorption and Surface Forces in Colloid Science. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 112, p. 1580-1585, 2008a.

LIMA, E. R. A.; BISCAIA, E. C.; BOSTRÖM, M.; TAVARES, F. W.; PRAUSTINITZ, J. M. Osmotic Second Virial Coefficients and Phase Diagrams for Aqueous Proteins from a Much-Improved Poisson-Boltzmann Equation. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, p. 16055-16059, 2007b.

LIMA, E. R. A.; BISCAIA, E. C. Jr.; BOSTRÖM, M.; TAVARES, F. W. Ion-Specific Forces between a Colloidal Nanoprobe and a Charged Surface. **Langmuir**, v. 23, p. 7456-7458, 2007c.

LIMA, E. R. A.; BOSTRÖM, M.; HORINEK, D.; BISCAIA, E. C. Jr.; KUNZ, J. W.; TAVARES, F. W. Co-Ion and Ion Competition Effects: Ion Distributions Close to a Hydrophobic Solid Surface in Mixed Electrolyte Solutions. **Langmuir**, v. 24, p. 3944-3948, 2008b.

LIMA, E. R. A.; BOSTRÖM, M.; SERNELIUS, B. E.; HORINEK, D.; NETZ, R. R.; BISCAIA, E. C. Jr.; KUNZ, W.; TAVARES, F. W. Forces between air-bubbles in electrolyte solution. **Chemical Physics Letters**, v. 458, p. 299-302, 2008c.

LIMA, E. R. A.; FREDERICO, W.; TAVARES, F. W.; BISCAIA, E. C. Jr. Finite volume solution of the modified Poisson-Boltzmann equation for two colloidal particles. **Journal of Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 9, p. 3174-3180, 2007.

LIN, Y-H.; CHANG, C-H.; WU, Y-S.; HSU, Y-M.; CHIOU, S-F.; CHEN, Y-J. Development of pH-responsive chitosan/heparin nanoparticles for stomach-specific anti-Helicobacter pylori therapy. **Biomaterials**, v. 30, p. 3332-3342, 2009.

LIU, H.; CHEN, B.; MAO, Z. W.; GAO, C. Y. Chitosan nanoparticles for loading of toothpaste actives and adhesion on tooth analogs. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 106, p. 4248-4256, 2007.

LIU, L.; XU, X.; GUO, S. HAN, W. Synthesis and self-assembly of chitosan-based copolymer with a pair of hydrophobic/hydrophilic grafts of polycaprolactone and poly(ethylene glycol). **Carbohydrate Polymers**, v. 75, p. 401-407, 2009.

LIU, L.; SHI, A.; GUO, S.; FANG, Y.; CHEN, S.; LI, J. Preparation of chitosan-g-poly lactide graft copolymers via self-catalysis of phthaloylchitosan and their complexation with DNA. **Reactive & Functional Polymers**, v. 70, p. 301–305, 2010.

LIU, Z.; JIAO, Y.; WANG, Y.; ZHOU, C.; ZHANG, Z. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, p. 1650–1662, 2008.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras** – Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa, Ed. Plantarum, vol. II, 1998.

MACIEL, J. S.; SILVA, D. A.; PAULA, H. C. B.; PAULA, R. C. M. Chitosan/carboxymethyl cashew gum polyelectrolyte complex: synthesis and thermal stability. **European Polymer Journal**, v. 41, p. 2726-2733, 2005.

MAESTRELLI, F.; GARCIA-FUENTES, M.; MURA, J.; ALONSO, M. J. A new drug nanocarrier consisting of chitosan and hydroxypropylcyclodextrin. **European Journal Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 63, p. 79-86, 2006.

MAGENHEIM, B.; BENITA; S. Nanoparticles characterization: a comprehensive physicochemical approach. **S.T.P. Phama Sciences**, v. 1, p. 221-241, 1991.

MAHEU-GIROUX, M.; CASAPÍA, M.; SOTO-CALLE, V. E.; FORD, L. B.; BUCKERIDGE, D. L.; COOMES, O. T.; GYORKOS, T. W. Risk of malaria transmission from fish ponds in the Peruvian Amazon. **Acta Tropica**, v. 115, p. 112-118, 2010.

MARTIN, A. N.; BUSTAMANTA, P. **Physical Pharmacy: Physical Chemical Principles in the Pharmaceutical Sciences**, 4th ed, Lea & Febiger, Philadelphia, 1993.

MCCORMICK, C. L.; PARK, L. S. Water-soluble copolymers III. Dextran-g-poly(acrylamides) control of grafting sites and molecular weight by Ce(IV)-induced initiation in homogeneous solutions. **Journal of Polymer Science**, Polym. Chem. Ed., v. 19, p. 2229-2241, 1981.

MEDEIROS, E. S.; PATERNO, L. G.; MATTOSO, L. H. C. **Nanotecnologia: Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplo de aplicações**. 1ª edição, Artlier, São Paulo, 2005.

MEYER, E. Atomic force microscopy. **Progress in surface science**, v. 41, p. 3-49, 1992.

MI, F. L.; SUNG, H. W.; SHYU, S. S. Drug release from chitosan-alginate complex beads reinforced by a naturally occurring cross-linking agent. **Carbohydrate Polymer**, v. 48, p. 61-72, 2002.

MINO, G.; KAIZERMAN, S.; RASMUSSEN, E. The oxidation of pinacol by ceric sulfate. **Journal of American Chemistry Society**, v. 81, p. 1494-1502, 1959.

MISHRA, M. M.; YADAV, M.; SAND, A.; TRIPATHY, J.; BEHARI, K. Water soluble graft copolymer (*j*-carrageenan-*g*-*N*-vinyl formamide): Preparation, characterization and application. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, p. 235-241, 2010.

MOLONEY, M.; McDONNELL, L.; O'SHEA, H. Atomic force microscopy analysis of enveloped and non-enveloped viral entry into, and egress from, cultured cells. **Ultramicroscopy**, v. 100, p. 163-169, 2004.

MORETÃO, M. P.; BUCHI, D. F.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M.; OLIVEIRA, M. B. M. Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages activated by an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco). **Immunology Letters**, v. 93, p. 189-197, 2004.

MOURA, M. R.; AOUADA, F. A.; MATTOSO, L. H. C. Preparation of chitosan nanoparticles using methacrylic acid. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 321, p. 477-487, 2008.

MÜLLER, C. R.; BASSANI, V. L.; POHLMANN, A. R.; MICHALOWSKI, C. B.; PETROVICK, P. R.; GUTERRES, S. S. Preparation and characterization of spray-dried polymeric nanocapsules **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 26, p. 343-347, 2000.

MUNRO, N. H.; HANTON, L. R.; MORATTI, C. S.; ROBISON, B. H. Synthesis and characterization of chitosan-graft-poly(OEGMA) copolymers prepared by ATRP. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 496-505, 2009.

MUZZARELLI, R. **Chitosan: Natural Chelating Polymers**, Pergamon Press, Ed. Muzzarelli, Oxford, 1973.

NAIDU, V. G. M. ; MADHUSUDHANA, K.; SASHIDHAR, R. B.; RAMAKRISHNA, S.; KHAR, R. K.; AHMED, F. J.; DIWAN, P. V. Polyelectrolyte complexes of gum kondagogu and chitosan, as diclofenac carriers. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, p. 464-471, 2009.

NAYAK, B. R.; SINGH, R. P. Synthesis, R. P. Synthesis and characterization of grafted hydroxypropyl guar gum by ceric ion induced initiation. **European Polymer Journal**, v. 37, p. 1655-1666, 2001.

NICHIFOR, M.; LOPES, A.; CARPOV, A.; MELO, E. Aggregation in water of dextran hydrofobically modified with bile acids. **Macromolecules**, v. 32, p. 7078-7085, 1999.

O'MALLEY, J. J.; MARCHESSAULT, R. H. A Reaction of living polystyrene with some natural polymers and their analogs. **Journal of Polymer Science C**, Polym. Symp., v. 24, p. 179-205, 1968.

O'NEILL, P. M.; BRAY, P. G.; HAWLEY, S. R.; WARD, S. A.; PARK, B. K. The 4-Aminoquinolines-Past, Present and Future-A Chemical Perspective. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 77, p. 29-58, 1998.

OLIVEIRA, M. A.; PAULA, R. C. M.; SILVA, D. A.; MACIEL, J. S.; PAULA, H. C. B.; FEITOSA, J. P. A. Synthesis and characterization of carboxymethylated red angico (*Anadenanthera macrocarpa*) exudate polysaccharide **Journal Applied Polymer Science**, v. 103, p. 2985-2991, 2007.

OLIVEIRA, M. A. Goma do angico: Síntese, caracterização e utilização como matrizes para adsorção de metais pesados. [Mestrado], Universidade Federal do Ceará, 2005.

OPPENHEIN, R. Solid colloidal drug delivery systems: nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 8, p. 217-234, 1981.

ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, H. S. **Biomateriais: Fundamentos e Aplicações**. Cultura Médica, Rio de Janeiro, 2006.

PAN, W. K-Y.; ERLIEN, C.; BILSBORROW, R. E. Morbidity and mortality disparities among colonist and indigenous populations in the Ecuadorian Amazon. **Social Science & Medicine**, v. 70, p. 401–411, 2010.

PATRIZI, M. A.; PIANTANIDA, G.; COLUZZA, C.; MASCI, G. ATRP synthesis and association properties of temperature responsive dextran copolymers grafted with poly(N-isopropylacrylamide). **European Polymer Journal**, v. 45, p. 2779–2787, 2009.

PAULA, R. C. M.; BUDD, P. M.; RODRIGUES, J. F. Characterization of Anadenanthera macrocarpa exudate polysaccharide. **Polymer International**, v. 44, p. 55–60, 1997.

PAULA, H. C. B.; GOMES, F. J. S.; PAULA, R. C. M. Swelling studies of chitosan nut gum physical gels. **Carbohydrate Polymer**, v. 48, p. 313–318, 2002.

PECORA, R. **Dynamic Light Scattering – Applications of Photon correlation Spectroscopy**, chapter 8, p. 305, Plenum Press, New York, 1985.

PRABAHARAN, M.; MANO, J. F. Chitosan-based particles as controlled drug delivery systems. **Drug Delivery**, v. 12, p. 41–57, 2005.

QI, J.; YAO, P.; HE, F.; YU, C.; HUANG, C. Nanoparticles with Dextran/Chitosan Shell and BSA/Chitosan Core–Doxorubicin Loading and Delivery, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 393, p. 177–185, 2010.

RÅNBY, B.; SUNDSTRÖM, H. Graft copolymerization onto native cellulosic fibres using Mn^{3+} initiation. **European Polymer Journal**, v. 19, p. 1067–1070, 1983.

RAWLE, A. The importance of particle sizing to the coatings industry Part 1: Particle size measurement. **Advances in Colour Science and Technology**, v. 5, p. 1–12, 2002.

RITGER, P. L.; PEPAS, N. A. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. **Journal Controlled Release**, v. 5, p. 23–36, 1987a.

RITGER, P. L.; PEPAS, N. A. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. **Journal Controlled Release**, v. 5, p. 37-42, 1987b.

RODRIGUES, M. R. Synthesis and investigation of chitosan derivatives formed by reaction with acyl chlorides. **Journal of Carbohydrate Chemistry**, v. 24, p. 41-54, 2005.

ROTUREAU, E.; MARIE, E.; LEONARD, M.; DELLACHERIE, E.; CAMESANO, T. A.; DURAND, A. From polymeric surfactants to colloidal systems (1): Amphiphilic dextrans for emulsion preparation. **Colloids and Surfaces A**, v. 288, p. 131-137, 2006a.

ROTUREAU, E.; MARIE, E.; LEONARD, M.; DELLACHERIE, E.; CAMESANO, T. A.; DURAND, A. From Polymeric surfactants to colloidal systems (2): Preparation of Colloidal dispersions. **Colloids and Surfaces A**, v. 288, p. 62-70, 2006b.

SAND, A.; YADAV, M.; BEHARI, K. Preparation and characterization of modified sodium carboxymethyl cellulose via free radical graft copolymerization of vinyl sulfonic acid in aqueous media, **Carbohydrate Polymers**, v. 81, p. 97-103, 2010.

SANKALIA, M. G.; MASHRU, R. C.; SANKALIA, J. M.; SUTARIYA, V. B. Reversed chitosan-alginate polyelectrolyte complex for stability improvement of alpha-amylase: Optimization and physicochemical characterization. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 65, p. 215-232, 2007.

SARMENTO, B.; FERREIRA, D.C.; JORGENSEN, L.; VAN DE WEERT, M. Alginate/Chitosan nanoparticles are effective for oral insulin delivery. **Pharmaceutical Research**, v. 24, p. 2198-2206, 2007b.

SARMENTO, B.; RIBEIRO, A.; VEIGA, F.; FERREIRA, D.; NEUFELD, R. Oral bioavailability of insulin contained in polysaccharide nanoparticles. **Biomacromolecules**, v. 8, p. 3054-3060, 2007c.

SARMENTO, B.; FERREIRA, D. C.; JORGENSEN, L.; VAN de WEERT, M. Probing insulin's secondary structure after entrapment into alginate/chitosan nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 65, p. 10-17, 2007a.

SARMENTO, B.; RIBEIRO, A.; VEIGA, F.; FERREIRA, D. Development and characterization of new insulin containing polysaccharide nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 53, p. 193-202, 2006.

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

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R. COSTA, T. D.; GUTERRES, S. S. Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 56, p. 501-505, 2003b.

SCHATZ, C.; DOMARD, A.; VITON, C.; PICHOT, C.; DELAIR, T. Formation of polyelectrolyte complex particles from self-complexation of N-sulfated chitosan **Biomacromolecules**, v. 6, p. 1642-1647, 2005.

SCHATZ, C.; LUCAS, J-M.; VITON, C.; DOMARD, A.; PICHOT, A.; DELAIR, T. Formation and properties of positively charged colloids based on polyelectrolyte complexes of biopolymers. **Langmuir**, v. 20, p. 7766-7778, 2004b.

SCHATZ, C.; DOMARD, A.; VITON, C.; PICHOT, C.; DELAIR, T. Versatile and efficient formation of colloids of biopolymer-based polyelectrolyte complexes. **Biomacromolecules**, v. 5, p. 1882-1892, 2004a.

ŞENYİĞİT, T.; SONVICO, F.; BARBIERI, S.; ÖZER, Ö.; SANTI, P.; COLOMBO, P. Lecithin/chitosan nanoparticles of clobetasol-17-propionate capable of accumulation in pig skin. **Journal of Controlled Release**, v. 142, p. 368-373, 2010

SÆTHER, H. V.; HOLME, H. K.; MAURSTAD, G.; SMIDSRAD, O.; STOKKE, B. T. Polyelectrolyte complex formation using alginate and chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, p. 813-821, 2008.

SHALVIRI, A.; LIU, Q.; ABDEKHODAIE, M. J.; Wu, X. Y. Novel modified starch-xanthan gum hydrogels for controlled drug delivery: Synthesis and characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 898-907, 2010.

SHARMA, B. R.; KUMAR, V.; SONI, P. L.; Ceric ammonium nitrate-initiated graft copolymerization of acrylamide onto cassia tora gum. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 86, p. 3250-3255, 2002.

SHAW, S. J. **Introduction to Colloid and Surface Chemistry**. Butterworth-Heinemann, Oxford, 1991.

SHU, S.; ZHANG, X.; TENG, D.; WANG, Z.; LI, C. Polyelectrolyte nanoparticles based on water-soluble chitosan-poly(L-aspartic acid)-polyethylene glycol for controlled protein release. **Carbohydrate Research**, v. 344, p. 1197-1204, 2009.

SILVA, A. G.; RODRIGUES, J. F.; PAULA, R. C. M. Composição e propriedades reológicas da goma do angico (*Anadenanthera macrocarpa*). **Polímeros - Ciência e Tecnologia**, v. 2, p. 34-40, 1998.

SILVA, D. A.; FEITOSA, J. P. A.; PAULA, H. C. B.; PAULA, R. C. M. Synthesis and characterization of cashew gum/acrylic acid nanoparticles. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, p. 437-441, 2009.

SILVA, N. S.; SILVA-NUNES, M.; MALAFRONTI, R. S.; MENEZES, M. J.; D'ARCADIA, R. R.; KOMATSU, N. T.; SCOPEL, K. K. G.; BRAGA, E. M.; CAVASINI, C. E.; CORDEIRO, J. A.; FERREIRA, M. U. Epidemiology and control of frontier malaria in Brazil: lessons from community-based studies in rural Amazônia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 104, p. 343-350, 2010.

SILVA, T. S. S. Estudo de tratabilidade físico-química com uso de taninos vegetais em água de abastecimento e esgoto. [Mestrado] Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, 1999.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Ed. LTC, Brasil, 2006.

SMITH, J. K.; MENGER, M.; CARRION, M.; BUTMAN, B. **A Dynamic Light Scattering (DLS) Assay for the Analysis of Aggregated Adenovector Particles**. Em: <http://www.malvern.com>. Acesso em mar. 2009.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 1–20, 2001.

SORLIER, P.; DENUZIERE, A.; VITON, C.; DOMARD, A. Relation between the degree of acetylation and the electrostatic properties of chitin and chitosan. **Biomacromolecule**, v. 2, p. 765-772, 2001.

SOUGUIR, Z.; ROUDESLI, S.; ABOUT-JAUDET, E.; PICTON, L.; CERF, D. L. Novel cationic and amphiphilic pullulan derivatives II: pH dependant physicochemical properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, p. 123–129, 2010.

SOUMYA, R. S.; GHOSH, S.; ABRAHAM, E. T. Preparation and characterization of guar gum nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, p. 267–269, 2010.

SPARNACCI, K.; LAUS, M.; TONDELLI, L.; MAGNANI, L.; BERNARDI, C. Core-shell microspheres by dispersion polymerization as drug delivery systems. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 203, p. 1364-1369, 2002.

SUN, W.; MAO, S.; MEI, D.; KISSEL, T. Self-assembled polyelectrolyte nanocomplexes between chitosan derivatives and enoxaparin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, p. 417-425, 2008.

SUN, Y.; WAN, A. J. Preparation of nanoparticles composed of chitosan and its derivatives as delivery systems for macromolecules. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 105, p. 552-561, 2007.

TAN, Y. L.; LIU, C. G. Self-aggregated nanoparticles from linoleic acid modified carboxymethyl chitosan: Synthesis, characterization and application *in vitro*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 69, p. 178-182, 2009.

TANG, E. S. K.; LIM, H. L. Y. Ultrasonication of chitosan and chitosan nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 265, p. 103–114, 2003.

TANG, M., DOU, H., SUN, K. One-step synthesis of dextran-based stable nanoparticles assisted by self-assembly. **Polymer**, v. 47, p. 728-734, 2006.

TECHNICAL note, **Measuring Zeta Potential – Laser Doppler Electrophoresis**. Em: <http://www.malvern.com>. Acesso em mar. 2009b.

TECHNICAL note, **Zeta Potential An Introduction in 30 Minutes**. Em: <http://www.malvern.com>. Acesso em mar. 2009a.

TERAMOTO, N.; SHIBATA, M. Synthesis and properties of pullulan acetate. Thermal properties, biodegradability, and a semi-clear gel formation in organic solvents. **Carbohydrate Polymers**, v. 63, p. 476-481, 2006.

THOREK, D. L. J.; TSOURKAS, A. Size, charge and concentration dependent uptake of iron oxide particules by non-phagocytic cells. **Biomaterials**, v. 29, p. 3583-3590, 2008.

TIRAFFERRI, A.; CHEN, K. L.; SETHI, R.; ELIMELECH, M. Reduced aggregation and sedimentation of zero-valent iron nanoparticles in the presence of guar gum. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 324, p. 71 -79, 2008.

TIWARI, A.; SINGH, V. Microwave-induced synthesis of electrical conducting gum acacia-graft-polyaniline. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, p. 427-434, 2008.

TIYABOONCHAI, W.; LIMPEANCHOB, N. Formulation and characterization of amphotericin B-chitosan-dextrana sulfate nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 329, p. 142-149, 2007.

TRIPATHY, J.; MISHRA, D.; BEHARI, K. Graft copolymerization of N-vinylformamide onto sodium carboxymethylcellulose and study of the swelling, metal ion sorption and flocculation behaviour. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, p. 604-611, 2009.

TRIPATHY, J.; MISHRA, D. K.; YADAV, M.; BEHARI, K. Synthesis, characterization and applications of graft copolymer (Chitosan-g-N,N-dimethylacrylamide). *Polymer Science*, **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 40-46, 2010.

TSAI, C. C.; HUANG, R.; SUNG, H.; LIANG, H. In vitro evaluation of the genotoxicity of a naturally occurring crosslinking agent (genipin) for biologic tissue fixation. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 52, p. 58-65, 2000.

TSAI, M. L.; BAI, S. W.; CHEN, R. H. Cavitation effect versus stretch effects resulted in different size and polydispersity of ionotropic gelation chitosan-sodium tripolyphosphate nanoparticle. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, p. 448-457, 2008.

URSOS, L. M. B.; ROEPE, P. D. Chloroquine resistance in the malarial parasite, *Plasmodium falciparum*. **Medicinal Research Reviews**, v. 22, p. 465-491, 2002.

VALE, N.; MOREIRA, R.; GOMES, P. Quimioterapia da malária: um século no desenvolvimento de antimaláricos. **Química**, v. 99, p. 57-69, 2005.

VAUTHIER, C.; DUBERNET, C.; FATTAL, E.; PINTO-ALPHANDARY, H.; COUVREUR, P. Poly(alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, p. 519-548, 2003.

VOYUTSKY, S. **Colloid Chemistry**, Traduzido para o ingles por Brobov, N., Moscow, Mir Publishers, 1978.

WANG, S. C.; CHEN, B. H.; WANG, L. F.; CHEN, J. S. Characterization of chondroitin sulfate and its interpenetrating polymer network hydrogels for sustained-drug release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 329, p. 103-109, 2007.

WANG, Y. Y.; JIANG, Q.; LIU, L. R.; ZHANG, Q. Q. The interaction between bovine serum albumin and the self-aggregated nanoparticles of cholesterol-modified O-carboxymethyl chitosan. **Polymer**, v. 48, p. 4135-4142, 2007b.

WANG, Y. Y.; LIU, L. R.; JIANG, Q.; ZHANG, Q. Q. Self-aggregated nanoparticles of cholesterol-modified chitosan conjugate as a novel carrier of epirubicin. **European Polymer Journal**, v. 43, p. 43-51, 2007c.

WANG, Y. Y.; LIU, L. R.; ZHANG, Q. Q. Preparation and characterization of self-aggregated nanoparticles of cholesterol-modified O-carboxymethyl chitosan conjugates **Carbohydrate Polymers**, v. 69, p. 597-606, 2007a.

WASHINGTON, C. The stability of intravenous fat emulsions in parenteral nutrition mixtures. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 66, p. 1-21, 1990.

WEI, G.; PETTWAY, G. J.; McCAULEY, L. K., MA, P. X., The release profiles and bioactivity of parathyroid hormone from poly(lactic-co-lycolic acid) microspheres. **Biomaterials**, v. 25, p. 345-352, 2004.

WHITE, N. J. Antimalarial drug resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, p. 1084-1092, 2004.

WILSON, M.; KANNANGARA, K.; SMITH, G.; SIMMONS, G.; RAGUSE, B. **Nanotechnology: basic science and emerging technologies**. Ed Chapman & Hall UNSW Press: Sidney, 2004.

WOITISKI, C. B.; VEIGA, F.; RIBEIRO, A.; NEUFELD, R. Design for optimization of nanoparticles integrating biomaterials for orally dosed insulin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 73, p. 25-33, 2009.

WU, M.; DELLACHERIE, E.; DURAND, A.; MARIE, E. Poly(*n*-butyl cyanoacrylate) nanoparticles via miniemulsion polymerization (1): Dextran-based surfactants. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 69, p. 141-146, 2009.

XIA, B.; HA, W.; MENG, X-W.; Govender, T.; Peng, S-L.; Ding, L-S.; LI, B-J.; ZHANG, S. Preparation and characterization of a poly(ethylene glycol) grafted carboxymethyl konjac glucomannan copolymer. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 648-654, 2010.

XIAOJUN, L.; MINGHAI, Y.; GUOLIANG, Z.; FENGBAO, Z. Synthesis and characterization of novel temperature and pH responsive hydroxylpropyl cellulose-based graft copolymers. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 17, p. 145-149, 2009.

YADAV, M.; AHUJA, M. Preparation and evaluation of nanoparticles of gum cordia, an anionic polysaccharide for ophthalmic delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, p. 871-877, 2010.

YAN, F.; ZHANG, C.; ZHENG, Y.; MEI, L.; TANG, L.; SONG, C.; SUN, H.; HUANG, L. The effect of Poloxamer 188 on nanoparticle morphology, size, cancer cell uptake and cytotoxicity. **Nanomedicine: Nanotechnology**, v. 6, p. 170-178, 2010.

YANG, L.; CUI, F.; CUN, D.; TAO, A.; SHI, K.; LIN, W. Preparation, characterization and biodistribution of the lactone form of 10-hydroxycamptothecin (HCPT)-loaded bovine serum albumin (BSA) nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 340, p. 163-172, 2007.

YIN, L.; DING, J.; H. E. C.; CUI, L.; TANG, C.; YIN, C. Drug permeability and mucoadhesion properties of thiolated trimethyl chitosan nanoparticles in oral insulin delivery. **Biomaterials**, v. 30, p. 5691-5700, 2009.

YINSONG, W.; LINGRONG, L.; JIAN, W.; ZHANG, Q. Preparation and characterization of self-aggregated nanoparticles of cholesterol-modified O-carboxymethyl chitosan conjugates. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, p. 597-606, 2007.

ZETASIZER nano series. **User manual**, 3 ed. Malvern Instrument. England, 2005.

ZHANG, H. F.; ZHONG, H.; ZHANG, L. L.; CHEN, S. B.; ZHAO, Y. J.; ZHU, Y. L. Synthesis and characterization of thermosensitive graft copolymer of N-isopropylacrylamide with biodegradable carboxymethylchitosan. **Carbohydrate Polymer**, v. 77, p. 785-790, 2009.

ZHANG, Y. Y.; YAG, Y.; TANG, K.; HU, X.; ZOU, G. L. Physicochemical characterization and antioxidant activity of quercetin-load chitosan nanoparticles. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 107, p. 891-897, 2008.

ZHENG, Y.; YANG, W.; WANG, C.; HU, J.; FU, S.; DONG, L.; WU, L.; SHEN, X. Nanoparticles based on the complex of chitosan and polyaspartic acid sodium salt: Preparation, characterization and the use for 5-fluorouracil delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 67, p. 621-631, 2007.

ZHI, J.; WANG, Y. J.; LUO, G. S. Adsorption of diuretic furosemide onto chitosan nanoparticles prepared with a water-in-oil nanoemulsion system. **Reactive and Functional Polymers**, v. 65, p. 249-257, 2005.

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

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)