



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA-GV
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

KÁTIA MARIA DE OLIVEIRA ALMEIDA

**CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA E COLOIDAL DE
XANTANA BIOSINTETIZADA A PARTIR DE GLICOSE E
USO COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE
DOXICICLINA**

GOVERNADOR VALADARES

2018

KÁTIA MARIA DE OLIVEIRA ALMEIDA

**CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA E COLOIDAL DE
XANTANA BIOSSINTETIZADA A PARTIR DE GLICOSE E
USO COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE
DOXICICLINA**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal de Juiz de Fora – Campus Governador Valadares, como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular. Área de concentração: Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Ângelo Márcio Leite Denadai

Co-orientador: Prof. Dr. Ivarne Luis dos Santos Tersariol

GOVERNADOR VALADARES

2018

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Almeida, Kátia Maria de Oliveira .

Caracterização reológica e coloidal de xantana bio sintetizada a partir de glicose e uso como sistema de liberação controlada de doxiciclina / Kátia Maria de Oliveira Almeida. -- 2018.

100 f. : il.

Orientador: Ângelo Márcio Leite Denadai

Coorientador: Ivarne Luis dos Santos Tersariol

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Avançado de Governador Valadares, Instituto de Ciências da Vida - ICV. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, 2018.

1. Xantana. 2. Reologia. 3. Doxiciclina. 4. Biopolímero. 5. Sistema de liberação controlada de fármaco. I. Denadai, Ângelo Márcio Leite, orient. II. Tersariol, Ivarne Luis dos Santos, coorient. III. Título.

Kátia Maria de Oliveira Almeida

Caracterização reológica e coloidal de xantanas bio sintetizadas a partir de glicose e uso como sistema de liberação controlada de doxiciclina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal de Juiz de Fora - Campus Governador Valadares, como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular. Área de concentração: Biotecnologia.

Aprovada em 5 de abril de 2018.

BANCA EXAMINADORA



Dr. Ângelo Márcio Leite Denadai - Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora - Campus GV



Dr. Alexandre Martins Costa Santos
Universidade Federal do Espírito Santo



Dr. Wesley Willian Gonçalves Nascimento
Universidade Federal de Juiz de Fora - Campus GV

A Deus, meu sustento e meu tudo.
A meu esposo Sérgio, pelo companheirismo.
A meus filhos Sérgio Henrique e Ingryd, herança
do Senhor que tornam minha vida mais feliz.
A meus pais, Jaime e Deusa, a quem tanto amo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me fortalecer, sustentar e amparar em todas as situações, chamando à existência as coisas que não existem como se já existissem.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ângelo Márcio Leite Denadai, por me desafiar a buscar e desenvolver conhecimentos e habilidades, me proporcionando a oportunidade de crescer, através da autonomia e confiança dispensadas. Obrigada pela dedicação e paciência ao compartilhar seu enorme conhecimento científico.

Aos meus familiares pelo apoio. A meu esposo Sérgio, pelo incentivo durante toda jornada. Por ter assumido atividades concernentes ao lar, filhos, entre outras, suprimindo, assim, minha ausência. Aos meus filhos Ingrid e Sérgio Henrique, pela compreensão ao se privarem, algumas vezes, da minha companhia. Aos meus pais e irmãos que hoje se alegram juntamente comigo ao alcançar esta conquista, ainda que distantes.

À Prof.^a Gabriella Freitas Ferreira, por sua colaboração primordial, mostrando-se sempre acessível, oferecendo prontamente os esclarecimentos necessários ao desenvolvimento dos trabalhos.

Ao Prof. Dr. Jeferson Gomes da Silva, por sua memorável colaboração durante a realização de experimentos e em outras ocasiões nas quais sempre demonstrou presteza, paciência e dedicação.

Aos Professores Drs. Humberto Moreira Hungaro (UFJF), Mirian Pereira Rodarte (UFJF), Priscila Lima Sequetto (UFJF-GV) e à pesquisadora Louise Cristine Cândido da Silva (UFJF), pela fundamental colaboração prestada quanto à produção das xantanas, entre outras coisas.

Aos demais professores que, de alguma forma, contribuíram durante todo o processo, inclusive na ministração das disciplinas, ao repartirem seus conhecimentos. Em especial à Prof.^a Dra. Michelle Bueno de Moura Pereira Antunes, por sua simpatia e paciência, com a qual tive o prazer de conviver um pouco mais, ao cursar a disciplina Atividades Didáticas.

À Universidade Federal de Juiz de Fora – campus Governador Valadares e ao Programa Multicêntrico de Bioquímica e Biologia Molecular, na pessoa da Prof.^a Dr.^a Cibele Velloso Rodrigues, coordenadora, pela oportunidade, pelo incentivo e por confiar em mim.

Agradeço à banca examinadora por ter aceitado o convite.

Às agências financiadoras FAPEMIG, CAPES, CNPq, FINEP e UFJF pelo apoio financeiro.

A todos os TAEs e demais pessoas pelo auxílio prestado durante a execução dos trabalhos: minha amiga Mariany, pelo auxílio nos experimentos biológicos e por ser alguém com quem pude sempre contar; Bolivar, Thaisa e Elaine, os quais viabilizaram as leituras espectrofotométricas dos experimentos biológicos; Juliano, por ser tão solícito e paciente nos momentos de dúvidas e à sua esposa, Joyce, secretária do PMBqBM, por seu empenho e gentileza no atendimento prestado; Vanessa e Ana Maria pelas informações prestadas quando precisei e à Thaís pela presteza.

Aos alunos Alan Reis Oliveira, Máyra Lopes Fonseca e Guilherme Fernando da Silva pela valiosa participação e dedicação para com este trabalho.

Aos meus colegas de turma Mariany, Jeniffer, Nilcemar, Kênia, Thaisa, Thiago e, em especial Elaine, minha dupla em vários trabalhos e atividades, que muito me incentivou. Obrigada a todos vocês, por compartilharem suas experiências, demonstrando cumplicidade e companheirismo, o que tornou a caminhada mais leve e prazerosa.

Aos meus amigos pessoais Idélcio e Cátia, por fazerem parte do contexto no qual este curso foi idealizado, me incentivando e impulsionando ao longo de todo o processo, até que os ideais pudessem ser alcançados.

*Para que todos vejam, e saibam, e considerem, e
juntamente entendam que a mão do Senhor fez
isto, e o Santo de Israel o criou.*
Isaías 41:20

RESUMO

Xantanas são polissacarídeos ramificados, de alta massa molar ($> 10^6$ Da), constituídos de glicose, manose e ácido glucurônico. Elas são obtidas pela fermentação de *Xanthomonas campestris*, geralmente consideradas seguras e aprovadas para uso em indústrias alimentícias e farmacêuticas, como espessantes. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar, do ponto de vista estrutural, coloidal e reológico; goma xantana biossintetizada a partir de glicose, visando avaliar seu estado de agregação em solução aquosa. A xantana foi produzida em um meio contendo 1,5% de glicose, 0,5% de K_2HPO_4 , 0,2% de NH_4Cl , 0,1% de $NaCl$, 0,01% de $MgSO_4$ e 0,1% de extrato de levedura inoculado com *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* e incubadas a 30 °C (72 h), em duplicata, obtendo-se as amostras XantG₁ e XantG₂. Visto que biopolímeros têm sido amplamente utilizados na indústria farmacêutica, sobretudo, na fabricação de sistemas de liberação controlada de fármacos, este trabalho objetivou também a investigação do complexo formado através da complexação da xantana com o antibiótico catiônico doxíciclina. As xantanas puras foram caracterizadas no estado sólido por espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) e análises térmicas (TGA e DTA). Em solução, foram caracterizadas por medidas de condutividade elétrica, espalhamento de luz dinâmico (DLS), potencial zeta (ZP) e reologias estacionária e dinâmico-oscilatória, todas a 25 °C. As interações entre doxíciclina e xantana foram investigadas utilizando-se os mesmos métodos, além da calorimetria isotérmica de titulação (ITC) que foi utilizada para medida dos parâmetros termodinâmicos de complexação. A ação antimicrobiana do complexo Dox/Xant foi avaliada através de estudos biológicos. Os espectros de infravermelho e as análises térmicas foram muito semelhantes para as duas amostras de xantana pura (XantG₁ e XantG₂), além de muito semelhantes aos encontrados para outras xantanas da literatura, mostrando a reprodutibilidade dos processos de síntese e purificação. Quando em solução aquosa, ambas mostraram estabilidade química por pelo menos 23 dias, já que a condutividade elétrica praticamente não se alterou. As medidas de diâmetro hidrodinâmico, potencial zeta, condutividade elétrica e reologia demonstraram que as xantanas comportam-se como polieletrólitos que sofrem diferentes níveis de agregação em solução, dependendo da concentração. A solução de xantana a 2 g/L mostrou forte pseudoplasticidade decorrente da existência dos emaranhados moleculares, o que justifica seu uso como espessante. Quanto ao complexo doxíciclina/xantana, sua formação foi monitorada por titulações calorimétrica, reológica e por potencial zeta. Os dados de calorimetria isotérmica mostraram que a xantana apresenta dois sítios distintos de interação com a doxíciclina, sendo uma das etapas de complexação exotérmica e a outra endotérmica. Os experimentos de titulação reológica mostraram forte redução da viscosidade durante a titulação, sugerindo que a interação doxíciclina/xantana gera um colapso na estrutura dos polímeros, quebrando os emaranhados. Finalmente, a atividade antimicrobiana dos complexos e dos precursores foi avaliada frente à *Staphylococcus aureus* 323886023, por determinação da dose letal mediana e curva de morte. Os resultados obtidos demonstraram que a formação dos complexos levou a um aumento da atividade antimicrobiana, através da redução da dose letal mediana e do tempo de inibição. Isto demonstra que a preparação de complexos de xantanas com a doxíciclina pode ser uma alternativa promissora para o desenvolvimento de uma nova formulação para liberação controlada desse fármaco.

Palavra-chave: xantana, reologia, doxíciclina.

ABSTRACT

Xanthans are branched polysaccharides of high molecular mass ($> 10^6$ Da), consisting of glucose, mannose and glucuronic acid. They are usually obtained by the fermentation of *Xanthomonas campestris*, which has been considered safe and approved for use in the food and pharmaceutical industries, as thickeners. The present work aimed to characterize xanthan gums biosynthesized from glucose from structural, colloidal and rheological point of view, aiming to evaluate its state of aggregation in aqueous solution. They were produced in duplicate using a medium containing 1.5% glucose, 0.5% K_2HPO_4 , 0.2% NH_4Cl , 0.1% $NaCl$, 0.01% $MgSO_4$ and 0.1% yeast extract inoculated with *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* and incubated at 30 °C (72 h), in order to obtain the XantG₁ and XantG₂ samples. Since biopolymers have been widely used in the pharmaceutical industry, especially in the manufacture of controlled drug delivery systems, this work also aimed to investigate the complex formed through the complexation of xanthan and the cationic antibiotic doxycycline. The pure xanthans had their chemical structures characterized in solid state by FTIR and their thermal profile evaluated by TGA/DTA thermal analysis. Moreover, measurements of electrical conductivity, hydrodynamic diameter (by DLS), Zeta potential and stationary and oscillatory dynamic rheologies were used to investigate their aggregations state at different concentrations. Further, the complexes xanthan/doxycycline (Xant/Dox) were characterized in solid state by infrared spectroscopy and thermal analysis (TGA and DTA), while the complexation process was monitored by zeta potential, DLS, viscosimetric and isothermal calorimetry (ITC) titrations. Stationary rheology studies at 25 °C were used to know the flow profile of the so-produced suspensions after titration. Antimicrobial action of the complexes was evaluated through biological studies. The infrared spectra and the thermal analyzes were very similar for the two pure xanthan samples, showing the reproducibility of the synthesis and purification processes, besides being very similar to those found for other xanthanes in the literature. The electrical conductivity data as a function of time showed chemical stability of the compounds for at least 23 days in aqueous solution. The hydrodynamic diameter, zeta potential, electrical conductivity and rheology measurements showed that xanthanes behave as polyelectrolytes that undergo different levels of aggregation in solution depending on the concentration. The solution of xanthan at 2 g / L showed strong pseudoplasticity due to the existence of molecular entanglements, which justifies its use as a thickener. As for the doxycycline/xanthan complex, its formation was monitored by calorimetric, rheological and zeta potential titrations. The data of isothermal calorimetry showed that xanthan presents two distinct sites of interaction with doxycycline, being one of the exothermic and the other endothermic complexation stages. The rheological titration experiments showed strong reduction of viscosity during titration, suggesting that the doxycycline/xanthan interaction causes a collapse in the structure of the polymers, breaking the entanglements. Finally, the antimicrobial activity of the complexes and precursors was evaluated against *Staphylococcus aureus* 32388602 by lethal dose and death curve assays. The results showed that the formation of the complexes led to an increase in the antimicrobial activity, through the reduction of the lethal dose and the time of inhibition. This demonstrates that the preparation of xanthan complexes with doxycycline may be a promising alternative for the development of a novel formulation for controlled release of that drug.

Keywords: xanthan, rheology, doxycycline.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação de polímeros lineares, ramificados e reticulados	21
Figura 2 - Unidade monomérica de uma xantana.....	24
Figura 3 - Fotomicrografia de bactérias <i>Xanthomonas campestris</i>	25
Figura 4 - Fórmula estrutural do cloridrato de doxiciclina.	30
Figura 5 - Preparação das amostras para obtenção dos espectros na região do infravermelho.....	36
Figura 6 - Equipamento da HITACHI utilizado para as análises térmicas.	36
Figura 7 - Diluições das amostras de xantana e leitura por fotometria de DLS.	37
Figura 8 - Reômetro dinâmico híbrido DHR-1 da T. A. instruments®.....	38
Figura 9 - Processo de obtenção do complexo Dox/Xant.....	40
Figura 10 - Processo de preparação da mistura mecânica Dox+Xant.....	40
Figura 11 - Calorímetro de titulação isotérmica e itens anexos.	42
Figura 12 - Representação esquemática. Placa de microdiluição de dose letal mediana de Dox pura e complexos Dox/Xant.	44
Figura 13 - Representação dos pontos de aplicação dos compostos. Placa de microdiluição com Dox pura e complexos Dox/Xant (Curva de morte, <i>S. aureus</i> 32388602).	45
Figura 14 - Aspecto físico de amostra de xantana.	46
Figura 15 - Espectros na região do infravermelho para as xantanas XantG ₁ e XantG ₂	47
Figura 16 - A) Curva termogravimétrica das xantanas XantG ₁ e XantG ₂ em atmosfera oxidante (ar). B) Curva térmica diferencial das mesmas amostras e nas mesmas condições.....	49
Figura 17 - A) Valores de condutividade elétrica de xantanas XantG ₁ e XantG ₂ a 2 g/L, medidos por PALS, a 173° e 25 °C, ao longo de 23 dias. B) Valores de ZP nas mesmas condições.....	51
Figura 18 - Intervalos de concentração polimérica: solução diluída ($c < c^*$), solução semidiluída ($c > c^*$) e solução concentrada ($c > c^{**}$).	52
Figura 19 - Valores de diâmetro hidrodinâmico para xantanas XantG ₁ e XantG ₂ em função da concentração, medidos por DLS, com ângulo de espalhamento a 90° à 25°C.	53
Figura 20 - Dupla camada elétrica em uma partícula carregada negativamente.....	55
Figura 21 - A) Valores de potencial zeta de xantanas XantG ₁ e XantG ₂ em concentrações de 0,005 a 2 g/L, medidos por PALS, com ângulo de espalhamento de 173°, a 25 °C. B) Valores de condutividade elétrica das mesmas amostras, nas mesmas condições dos experimentos.	56
Figura 22 - Valores de viscosidade em função da concentração de xantana. Concentrações críticas: c^* (de sobreposição) e c^{**} (de agregação) detectadas por medidas de viscosidade.	58
Figura 23 - Escoamento viscoso em tubulação.	59
Figura 24 - Perfis de curva de fluxo de fluidos Newtonianos e não-Newtonianos.	60

Figura 25- Representação esquemática de uma dispersão em repouso e fluindo através de um tubo.....	61
Figura 26- A) Curvas de fluxo para xantana XantG ₁ e XantG ₂ a 2,0 g/L, a 25 °C. B) Curvas de viscosidade nas mesmas condições. Faixa de taxa de cisalhamento: $10 \leq \dot{\gamma} \leq 1000 \text{ s}^{-1}$	62
Figura 27 – Módulos de armazenamento $G'(\omega)$, e de perda $G''(\omega)$ em função da taxa de deformação por cisalhamento ($\dot{\gamma}$) para xantana XantG ₁ e XantG ₂	65
Figura 28 – A) Viscosidade em função da frequência. B) Módulos de armazenamento $G'(\omega)$, e de perda $G''(\omega)$ em função da frequência para xantana XantG ₁ e XantG ₂	66
Figura 29- A cadeia P é livre para se mover entre os obstáculos fixos O, mas não pode cruzá-los.....	67
Figura 30- Espectro na região do infravermelho da Dox, XantG ₁ , mistura mecânica (Dox+XantG ₁) e complexo (Dox/XantG ₁).....	69
Figura 31- A) Curva termogravimétrica para xantana, mistura mecânica (Dox+Xant) e complexo (Dox/Xant) em atmosfera oxidante (ar). B) Curva térmica diferencial para as mesmas amostras e nas mesmas condições.....	71
Figura 32– Titulação potencial zeta da solução doxíciclina 30 mM em 1,5 mL de solução xantana a 4 g/L.....	73
Figura 33- Grupos ionizáveis da doxíciclina.....	74
Figura 34- Curvas de titulação calorimétrica de doxíciclina a 30 mM em solução xantana a 4,2 g/L. A) Inclui a curva de diluição e B) Curva final de titulação decomposta.....	75
Figura 35- Curva de titulação viscosimétrica de doxíciclina 15 mM em xantana 2,0 g/L à 25 °C e $\dot{\gamma} = 100 \text{ s}^{-1}$	77
Figura 36- Curva de A) fluxo e B) viscosidade de solução xantana e do complexo Dox/Xant, à 25 °C ($1 \leq \dot{\gamma} \leq 1000 \text{ s}^{-1}$).....	79
Figura 37– Curvas de viscosidade em função da temperatura, à 100 s^{-1} , para solução de Xant a 2,0 g/L e suspensão $[\text{Dox}]/C_{\text{Xant}} = 0,00105 \text{ mol/g}$	80
Figura 38 – Determinação da dose letal mediana para <i>S. aureus</i> 32388602. A) Dox pura, B) Complexo Dox/XantG ₁ e C) Complexo Dox/XantG ₂	81
Figura 39- Curva de morte de <i>S. aureus</i> 323886023 tratadas com Dox e complexos Dox/Xant. Concentração de Dox A) 0,0625 µg/mL e B) 0,25 µg/mL.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atribuições para as bandas mais importantes observadas na região do infravermelho para as xantanas XantG ₁ e XantG ₂	47
Tabela 2 - Tabela com os principais eventos térmicos atribuídos às xantanas XantG ₁ e XantG ₂	49
Tabela 3 - Principais bandas observadas na região do infravermelho para xantana, mistura mecânica (Dox+Xant) e complexo (Dox/Xant).	69
Tabela 4 - Parâmetros termodinâmicos de interação da doxiciclina com xantana, onde $T_{int}\Delta S^{\circ}$ (Termo entrópico da interação) a 298,15 K.	76
Tabela 5 - Determinação da dose letal mediana de Dox pura e dos complexos Dox/Xant para <i>S. aureus</i> 32388602.	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGC	<i>Automatic gain control</i> (Controle automático de ganho)
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i> (Espalhamento de luz dinâmico)
D	Dalton
DL_{50}	Dose letal mediana
D_h	Diâmetro hidrodinâmico
Dox	Doxiciclina
DTA	Análise térmica diferencial
EDL	Dupla camada elétrica
ESI	Ionização eletro-pulverizadora
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FTIR	Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier
FWHM	<i>Full width at half maximum</i> (Largura total do pico na metade de sua altura máxima)
ITC	Calorimetria isotérmica de titulação
LVE	Vicoelástica linear
MH	Muller Hinton
MM	Mistura mecânica
MS	Espectrometria de massas
MTT	Brometo de tetrazólio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil
Pa	Pascal
PALS	<i>Phase Analysis Light Scattering</i> (Análise de fase por espalhamento de luz dinâmico)
PCL	Poli (ϵ -caprolactona)
PLA	Poli (ácido láctico)
PLGA	Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)
RF	Radiofrequência
RNA	Ácido ribonucleico
SLC	<i>Drug Delivery</i> (Sistema de liberação controlada de fármaco)
TGA	Análise termogravimétrica
Xant	Xantana

Dox/Xant	Complexo doxiciclina com xantana
Dox+Xant	Mistura mecânica doxiciclina com xantana
ZP	Potencial zeta

LISTA DE SÍMBOLOS

A	Área
c^*	Concentração crítica de sobreposição
c^{**}	Concentração crítica de agregação
$\Delta_{int}H^\circ$	Varição da entalpia
$T\Delta_{int}S^\circ$	Varição da entropia à temperatura constante
$\Delta_{int}G^\circ$	Varição da energia livre de Gibbs
F	Força F
G'	Módulo elástico ou de armazenamento (Pa)
G''	Módulo viscoso ou de dissipação (Pa)
K	Constante de equilíbrio
mM	Milimolar
mmol	Milimol
MS	Espectrometria de massas
mV	Milivolts
m/z	Massa/carga
N	Estequiometria
η	Viscosidade (Pa.s)
φ	Taxa de cisalhamento
τ	Tensão de cisalhamento (Pa)
γ	Taxa de deformação (1/s)
k	Condutividade elétrica
K_c	Índice de consistência (Pa.s ⁿ)
n	Índice de comportamento
ω	Frequência angular (rad/s)
v	Deformação axial
δ_{ang}	Deformação angular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 POLÍMEROS	19
2.1.1 Biopolímeros	22
2.2 SISTEMA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA.....	26
3 JUSTIFICATIVA	31
4 HIPÓTESES.....	31
5 OBJETIVOS	32
5.1 OBJETIVO GERAL	32
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
6 MATERIAIS E MÉTODOS	33
6.1 XANTANA PURA	34
6.1.1 Materiais e reagentes utilizados	34
6.1.2 Produção de xantanas	34
6.1.3 Espectroscopia na região do infravermelho	35
6.1.4 Análises térmicas (curvas TGA e DTA).....	36
6.1.5 Estudo de estabilidade das xantanas em solução	36
6.1.6 Estudo de agregação das xantanas.....	37
6.1.7 Determinação dos parâmetros reológicos das soluções	38
6.2 XANTANAS COMPLEXADAS COM DOXICICLINA	39
6.2.1 Matérias-primas e reagentes utilizados.....	39
6.2.2 Preparo do complexo Dox/Xant	39
6.2.3 Espectroscopia na região do infravermelho	40
6.2.4 Análises térmicas (curvas TGA e DTA).....	41
6.2.5 Titulações por condutividade elétrica e potencial zeta	41
6.2.6 Titulações por calorimetria de titulação isotérmica.....	41
6.2.7 Determinação dos parâmetros reológicos das soluções	42
6.2.8 Ensaio antimicrobiano	42
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
7.1 XANTANAS PURAS	45
7.1.1 Espectroscopia na região do infravermelho	46
7.1.2 Análises térmicas (curvas TGA e DTA).....	48

7.1.3 Estudo de estabilidade das xantanas.....	50
7.1.4 Investigação do estado de agregação das xantanas	52
7.1.5 Ensaio reológicos estacionários	58
7.1.6 Ensaio reológicos oscilatórios	63
7.2. CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DOX/XANT	68
7.2.1 Espectroscopia na região do infravermelho	68
7.2.2 Análises térmicas (curvas TGA e DTA).....	70
7.2.3 Análises em solução/suspensão	72
7.2.4 Titulação Dox/Xant por potencial zeta.....	72
7.2.5 Titulações calorimétricas isotérmicas.....	74
7.2.6 Investigação das interações Dox/Xant por reologia	77
7.2.7 Ensaio antimicrobianos	80
8 CONCLUSÃO.....	86
9 REFERÊNCIAS.....	88

1 INTRODUÇÃO

Polissacarídeos são biopolímeros hidrofílicos de alta massa molecular, que por sua vez, apresentam uma ampla gama de propriedades funcionais, com potencial de aplicação em vários setores industriais. O termo hidrocolóide abrange todos os polissacarídeos que são extraídos de plantas, algas e fontes microbianas (DICKINSON, 2003; ERNANDES e GARCIA-CRUZ, 2005).

Dentre os biopolímeros de origem microbiana, as xantanas (Xants) são os que têm atraído maior atenção das indústrias alimentícia, farmacêutica e petrolífera. Este fato se deve à capacidade desses compostos formarem soluções viscosas e géis hidrossolúveis que lhes conferem propriedades coloidais e reológicas muito particulares (LUVIELMO e SCAMPARINI, 2009).

Os países que se destacam como maiores produtores de Xants no mundo são: Estados Unidos (empresas Merck e Pfizer), França (empresas Rhone Poulenc e Sanofi-Elf), Áustria (empresa Jungbunzlauer) e China (empresa Saidu Chemical) (GARCIA-OCHOA *et al.*, 2000; MENEZES, 2012).

No Brasil, quase toda Xant utilizada é importada (PADILHA, 2003). Por outro lado, o Brasil é um produtor de vários insumos, oriundos do setor sucroalcooleiro, tais como: açúcar (sacarose), extrato de levedura e álcool, que poderiam ser utilizados como fontes de carbono na produção de Xant. Isto torna a implantação de indústrias especializadas na sua produção um recurso estratégico para atender à demanda nacional e internacional.

Existem vários estudos visando otimizar a síntese desse biopolímero. Dentre os mais diversos substratos estudados estão os resíduos agroindustriais, tais como: o melaço de cana (BAE *et al.*, 2004) e o soro do leite (KIOSSEOGLOU *et al.*, 2003; NITSCHKE *et al.*, 2001). Portanto, a produção de Xants representa, ainda, uma alternativa para reduzir problemas relacionados às questões ambientais, com o aproveitamento de resíduos industriais que seriam descartados no meio ambiente (NERY *et al.*, 2008). Apesar da busca por fontes alternativas de açúcares, a glicose e sacarose ainda são os substratos mais utilizados para a produção comercial da goma (ROSALAM e ENGLAND, 2006). Isso pode ser justificado pela facilidade de se encontrar glicose, além do produto da biossíntese ser mais puro e homogêneo.

A Xant apresenta diversas aplicações tecnológicas, especialmente como espessante e estabilizante em produtos alimentícios e farmacêuticos (FARIA *et al.*,

2011). É também utilizada em sistemas de liberação controlada de fármacos (SLCs) e correlatos (KIM *et al.*, 2015).

No contexto dos SLCs, atualmente um grande esforço tem sido dedicado ao desenvolvimento de métodos para controlar a liberação de fármaco para satisfazer a crescente demanda por uma ação prolongada e melhor administração (CARLET *et al.*, 2012). Os SLCs apresentam várias vantagens em relação às formas convencionais de administração, dentre elas, a redução da toxicidade, maior estabilidade (química, térmica e luminosa), utilização de menor quantidade do princípio ativo e maior intervalo de administração que muitas vezes culminam em maior atividade aguda (ROSSI-BERGMANN, 2008).

Dentre os vários fármacos de destaque para o bem-estar da humanidade, estão os antibióticos. Portanto, faz-se necessária a preservação da eficácia dos mesmos, através de abordagens voltadas para a seleção, dosagem e duração do tratamento ou prevenção de infecção com mínima toxicidade para o paciente e impacto mínimo na resistência subsequente (CARLET *et al.*, 2012).

Os antibióticos são compostos polares que apresentam em suas estruturas vários grupos funcionais (aminas, amidas, fenóis, ácidos carboxílicos, cetonas), os quais permitem interações com outras substâncias químicas, principalmente em processos de complexação (GAO *et al.*, 2012; WU, PAN *et al.* 2012). A molécula de Xant apresenta em sua estrutura grupos acetato e piruvato, os quais podem se ionizar dependendo do pH e do meio ou serem substituídos por cátions, formando poliânions (HORN, 2008). Logo, por ter carga negativa, a molécula de Xant apresenta afinidade por espécies catiônicas, característica na qual se enquadra a doxiciclina (Dox), um antimicrobiano de amplo espectro, o qual apresenta aplicações para uso veterinário e humano (MUNDARGI *et al.*, 2007).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo, biossintetizar xantana a partir de glicose, utilizando o microrganismo *Xanthomonas campestris*, além de realizar sua caracterização, visando avaliar seu estado de agregação e comportamento reológico em solução aquosa. A glicose foi escolhida como substrato por ser uma fonte de carbono preferencial para a produção do biopolímero (GARCIA-OCHOA *et al.*, 2000). O trabalho visou também, investigar o uso de polímero como SLC, escolhendo-se a doxiciclina como fármaco de estudo.

Portanto, foi realizada a caracterização estrutural e coloidal do polímero em solução, buscando uma maior compreensão dos sistemas na escala molecular,

supramolecular e macroscópica, sendo estudado também o processo de complexação da xantana com a doxiciclina.

Para a caracterização molecular foram identificados os principais grupos funcionais dos monômeros por espectroscopia na região do infravermelho (FTIR). O comportamento térmico foi avaliado por análise termogravimétrica e análise térmica diferencial (TGA/DTA), obtendo-se parâmetros relacionados à perda de massa. Quanto à caracterização coloidal, foi avaliado o tamanho, a carga superficial e a estabilidade das partículas e/ou de seus possíveis nanoagregados, utilizando medidas de espalhamento de luz dinâmico (DLS), medidas de potencial zeta (ZP) e condutividade elétrica. Os parâmetros reológicos da solução de Xant pura foram avaliados por reologia estacionária, através da construção de curvas de fluxo e viscosidade e consequente identificação do tipo de fluido (Newtoniano, não-Newtoniano) (BARNES *et al.*, 1989). As contribuições elástica (G') e fuida (G'') dessas soluções forem avaliadas por reologia dinâmica oscilatória.

A formação do complexo empregando Dox e Xant (Dox/Xant) foi investigada por diversas técnicas, entre elas, FTIR, TGA/DTA, as quais forneceram evidências de que houve, de fato, interação entre os dois precursores. Os parâmetros das interações termodinâmicas entre Xant e Dox foram determinados por calorimetria isotérmica de titulação (ITC). Foi analisado o efeito da formação do complexo no ZP e comportamento reológico da solução Xant. Finalmente, avaliou-se a ação antibacteriana da composição através de ensaios biológicos, comparando-se seu efeito com o da Dox pura.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 POLÍMEROS

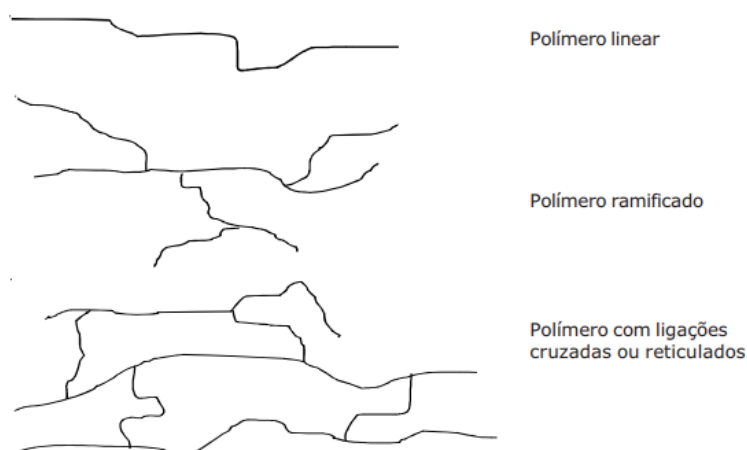
Polímeros são macromoléculas constituídas pela ligação de grandes quantidades de grupamentos menores denominadas monômeros. Eles podem ser obtidos de fontes renováveis ou não. As reações pelas quais eles se combinam são denominadas polimerizações (EHRENSTEIN, 2012; ODIAN, 2004). Um polímero é constituído principalmente de átomos de hidrogênio e de carbono, dispostos em longas cadeias (CHEN *et al.*, 2016).

Considerando o tipo de monômero constituinte do polímero, este pode ser classificado em homopolímero ou copolímero. Homopolímero é formado por um único tipo de unidade. Já o termo copolímero refere-se a polímeros com dois ou mais tipos de unidades de monômero (EHRENSTEIN, 2012).

Eles podem ser classificados de acordo com a origem, se dividindo em naturais e sintéticos; estes últimos podem ser obtidos a partir de monômeros oriundos de fontes renováveis ou não (Fechine, 2013). Os naturais, também chamados biopolímeros, são aqueles disponíveis na natureza como a celulose, borracha e algodão (CHEN *et al.*, 2016), além dos polissacarídeos e proteínas. Já os sintéticos são produzidos através da reação de polimerização dos compostos monoméricos como, por exemplo, o poliestireno, obtido da polimerização de unidades de estireno (vinil-benzeno) por catalizadores. Quanto aos produzidos a partir de fontes renováveis, como por exemplo, os poliésteres alifáticos poli (ácido láctico) (PLA), poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) e poli(ϵ -caprolactona) (PCL) (MIDDLETON e TIPTON, 2000), geralmente são utilizados carboidratos derivados de plantas como milho, cana-de-açúcar ou ainda óleo vegetal em sua obtenção (BRITO *et al.*, 2011; PRADELLA, 2006).

Em relação à estrutura química, podem ser classificados em lineares, ramificados ou reticulados (**Figura 1**). Os polímeros lineares são aqueles nos quais os monômeros estão juntamente ligados, em uma sequência contínua. Nos ramificados as moléculas monoméricas formam ramificações, visto que suas cadeias laterais estão ligadas à cadeia principal, podendo formar ramificações longas ou curtas. Nos polímeros reticulados as moléculas estão ligadas entre si em pontos diferentes de suas extremidades, formando ligações cruzadas, chamadas *crosslinks* (ODIAN, 2004). Essas características são responsáveis por definir suas propriedades térmicas e reológicas (EHRENSTEIN, 2012).

Figura 1 - Representação de polímeros lineares, ramificados e reticulados



Fonte: (PIATTI E RODRIGUES, 2005).

De acordo com Fechine (2013), os polímeros vêm substituindo gradualmente certos materiais convencionais, como os fabricados com ferro e aço, em quase todos os setores da economia, não só por seu baixo custo, mas também pelo desenvolvimento contínuo de sua funcionalidade. No entanto, os resíduos sólidos produzidos principalmente nos grandes centros urbanos, em grande parte constituídos por polímeros sintéticos, exige a adoção de medidas que busquem um desenvolvimento sustentável. O uso de materiais biodegradáveis, obtidos a partir de fontes naturais renováveis, é assunto de destaque nos últimos anos, por serem uma alternativa aos polímeros tradicionais à base de petróleo e representarem uma proposta para minimizar os problemas ambientais (GALBIS *et al.*, 2015). Além disso, o inevitável esgotamento previsto para as fontes de petróleo, implica na aceleração da busca por novas alternativas (FECHINE, 2013).

Os polímeros produzidos a partir de matéria-prima renovável são candidatos potenciais para serem utilizados não apenas no campo de aplicação de embalagens e correlatos, mas também para uso em indústrias de alimentos, de cosméticos e farmacêuticas como agentes espessantes, dentre outros (PRADELLA, 2006). Nestas últimas os polímeros biodegradáveis estão recebendo grande atenção para uso em SLCs, sobretudo, por não necessitarem de recuperação ou manipulação após a introdução no corpo (UHRICH *et al.*, 1999).

Pradella (2006) realizou um estudo de novos polímeros biodegradáveis, incluindo uma análise destes materiais, hierarquizando quais são os que apresentam maiores possibilidades de crescimento no mercado nacional. Dentre os polímeros

analisados pelo autor, os que apresentaram-se como os de maior importância foram PLA, polihidroxialcanoato, polímeros de amido e Xant.

2.1.1 Biopolímeros

Os biopolímeros são materiais poliméricos produzidos por organismos vivos como, por exemplo, ácidos nucleicos, peptídeos e polissacarídeos (STROBEL *et al.*, 2005; KUMAR *et al.*, 2007). Eles constituem uma alternativa útil para o desenvolvimento de materiais ecologicamente corretos, apresentando aplicações diversificadas, devido às suas grandes vantagens como biodegradabilidade, baixo custo, biocompatibilidade e disponibilidade (AZEVEDO *et al.*, 2007; MEDINA JARAMILLO *et al.*, 2015).

Uma aplicação importante destes compostos é na forma de biomateriais. Neste campo, a biocompatibilidade é uma característica necessária para dispositivos reabsorvíveis (BELGACEM e GANDINI, 2011), visto que os polímeros utilizados para aplicações médicas e farmacêuticas devem ser não tóxicos e não imunogênicos (VAUTHIER e BOUCHEMAL, 2009).

Os biopolímeros têm sido amplamente utilizados no campo médico em produtos cicatrizantes para fechamento rápido de lesões e em sistemas de liberação controlada de fármacos – “*Drug Delivery*” (VAN DE VELDE e KIEKENS, 2002). A vantagem da aplicação de biomateriais, à base de polímeros como celulose, colágeno, alginato e quitosana, em produtos para tratamento de feridas, refere-se à capacidade dos mesmos vincularem-se a tecidos circundantes e assim promoverem o processo de cicatrização (WIEGAND e HIPLER, 2010). Para formulações de SLCs, as nanopartículas poliméricas biodegradáveis apresentam muitas vantagens, tais como controle superior da liberação do fármaco ao tecido alvo, baixa toxicidade e controle do tamanho (MORACHIS *et al.*, 2012).

Dentre os biopolímeros empregados na área de liberação de medicamentos, os polissacarídeos se destacam, dada a sua participação em funções importantes do organismo como a estrutura da membrana e a comunicação intracelular; e também por sua flexibilidade, que permite que os mesmos formem diversos tipos de estruturas supramoleculares (GRENHA *et al.*, 2010).

Quanto à constituição química, os polissacarídeos são formados por diversos resíduos de açúcares simples chamados monossacarídeos, unidos entre si por

ligações glicosídicas (IZYDORCZYK, 2005). Os polissacarídeos hidrocoloidais podem se originar de várias fontes, como algas (por exemplo, alginato), origem vegetal como (pectina, goma guar), origem microbiana (dextrana, goma xantana) e origem animal (quitosana, condroitina), apresentando uma grande diversidade de estruturas e propriedades (LIU *et al.*, 2008). De acordo com De Mello Luvielmo e Scamparini (2009), a esse grupo de polissacarídeos solúveis em água, foi dada a designação de gomas industriais. Quanto aos de origem microbiana, os quais surgiram no mercado internacional na década de 1950, apresentam um diferencial em relação aos demais, visto que, em condições controladas de fermentação, sua produção garante um material de qualidade e fornecimento constante, não influenciada por variações climáticas.

Os biopolímeros produzidos por bactérias dividem-se em intracelulares e extracelulares. Nas bactérias Gram-negativas o processo de síntese de polissacarídeos ocorre de forma intracelular. Os açúcares nucleotídeos (açúcares nucleosídeo difosfato) fornecem formas ativadas de monossacarídeos e também fornecem à célula bacteriana um meio de interconversão dos vários monossacarídeos, através de reações de epimerização, desidrogenação e descarboxilação (HARDING *et al.*, 1993). Após a polimerização das unidades repetidas, o polissacarídeo é excretado através do complexo parede/membrana para a superfície celular no ambiente extracelular (SUTHERLAND, 2001). Já os biopolímeros extracelulares, produzidos na interface com o meio extracelular, geralmente fazem parte de mecanismos de proteção contra a dessecação, ataque de protozoários (amebas, por exemplo), fagócitos e bacteriófagos.

Por apresentarem processo de extração e purificação mais simples, biopolímeros exocelulares, concentram maior atenção na aplicação industrial (DE SOUZA E GARCIA-CRUZ, 2004). A maioria dos exopolissacarídeos apresenta estrutura relativamente simples, compreendendo homopolissacarídeos ou heteropolissacarídeos como dextrana e pululana, produzidos a partir de D-glicose. Já os heteropolissacarídeos são normalmente compostos de unidades repetitivas compostas de dois a quatro tipos de monossacarídeos contendo grupos ácidos (gelana e xantana por exemplo) (PRADELLA, 2006; SUTHERLAND, 2001).

De acordo com a carga apresentada, os polissacarídeos podem ser classificados em polieletrólitos e não-polieletrólitos. Os primeiros podem ser divididos em

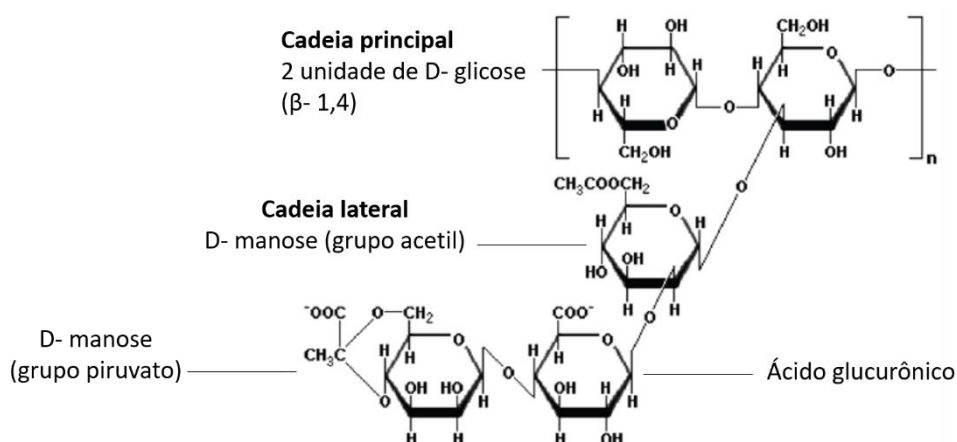
polieletrólitos carregados positivamente (quitosana) ou negativamente (alginato, heparina, ácido hialurônico, xantana, etc) (LIU *et al.*, 2008).

Xantanas

Dentre os biopolímeros biodegradáveis de maior interesse comercial, cuja produção mundial supera 30.000 t/ano, destacam-se as xantanas (Xants). Esses compostos são solúveis em água, apresentam estabilidade e compatibilidade na presença da maioria dos sais metálicos, notável solubilidade e estabilidade em soluções ácidas e alcalinas e resistência térmica. Quando em solução, mesmo a baixas concentrações, produzem soluções com elevada viscosidade e pseudoplasticidade (PRADELLA, 2006; FARIA *et al.*, 2011).

As xantanas (**Figura 2**) são heteropolissacarídeos obtidos principalmente por bactérias fitopatogênicas *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 (**Figura 3**) (GARCIA-OCHOA *et al.*, 1995). Elas também podem ser classificadas como um copolímero ramificado natural de alta massa molecular, variando de 2×10^6 a 20×10^6 Da. Sua estrutura primária é composta de repetidas unidades pentassacarídicas: D-glicose, D-manose e D-ácido glucurônico, na proporção 2:2:1, podendo apresentar ácido pirúvico e O-acetil. Sua cadeia principal é constituída de unidades β -D-glicose ligadas nas posições 1 e 4, apresentando estrutura idêntica à da celulose (GARCIA-OCHOA *et al.*, 2000; JANSSON *et al.*, 1975; ROSALAM e ENGLAND, 2006).

Figura 2 - Unidade monomérica de uma xantana.



Fonte: (ZAITOUN, MAKAKOU *et al.*, 2011), adaptada.

Figura 3 - Fotomicrografia de bactérias *Xanthomonas campestris*.



Fonte: (TORTORA *et al.*, 2004).

As xantanas foram descobertas em 1950 e representam o primeiro biopolímero produzido industrialmente. Por serem atóxicas e biocompatíveis, em 1969, o uso em produtos alimentares foi aprovado nos Estados Unidos pelo *Food and Drug Administration* (FDA), sem qualquer limitação de quantidade. Já no Brasil, seu uso foi permitido desde 1965, pelo Decreto de Lei nº 55871, da Legislação Brasileira de Alimentos, revisada pela Resolução CNS/MS nº 04 de 24 de novembro de 1988 (MENEZES *et al.*, 2012).

O processo fermentativo e a produção de Xants são influenciados por diversos fatores, tais como tipo de reator, modo de operação (batelada ou contínuo), composição do meio e as condições de cultura (temperatura, pH, concentração de oxigênio dissolvido) (GARCIA-OCHOA *et al.*, 2000).

Por serem constituídas de monossacarídeos, possuem estrutura química rica em hidroxilas e ligações éter, que apresentam elevada capacidade de formação de ligações de hidrogênio com moléculas de água, o que implica em elevada solubilidade aquosa, mesmo à temperatura ambiente. Os grupos piruvato e acetil, ligados às cadeias trissacarídicas laterais conferem ionicidade à Xant, que além de potencializar a solubilidade, também definem a conformação molecular (SUTHERLAND, 1998). Graças aos grupos ionizáveis que apresentam em solução aquosa, as Xants comportam-se como poliânions.

As propriedades das soluções de polieletrólitos diferem-se consideravelmente em relação às soluções de polímeros neutros. A presença de cargas ao longo da cadeia leva a interações intra e intermoleculares complexas que tem fortes consequências para as propriedades estáticas e dinâmicas desses sistemas (BORSALI *et al.*, 1998). As propriedades reológicas das Xants, derivam-se em grande

parte, da conformação helicoidal ordenada (simples ou dupla-hélice) adotada em solução. As cadeias laterais trissacarídicas alinham-se à cadeia principal estabilizando a conformação por ligações não covalentes (SUTHERLAND, 1998).

Devido à suas propriedades espessantes, as Xants são utilizadas como agentes dispersantes e estabilizantes de emulsões e suspensões em formulações farmacêuticas, cosméticas e agrícolas. Graças à elevada viscosidade apresentam aplicações na indústria petrolífera, onde são usadas em fluidos de perfuração e em processos de recuperação de hidrocarbonetos (GARCIA-OCHOA *et al.*, 2000).

Além de suas propriedades físicas, o polímero não é tóxico, não inibe o crescimento microbiano e não causa irritação na pele e nos olhos. Por essas razões, suas aplicações alimentares e farmacêuticas vêm sendo amplamente estudadas (GARCIA-OCHOA *et al.*, 2000). A preparação de comprimidos para liberação controlada de teofilina foi estudada por Vendruscolo *et al.* (2005) contendo apenas Xant comercial ou associada à galactomanana hidrofílica, extraída das sementes da *Mimosa scabrella*. Os resultados mostraram que as matrizes preparadas utilizando apenas Xant apresentaram um efeito de sustentação maior, em diferentes concentrações, em comparação com as matrizes preparadas apenas com galactomanana ou com os dois polissacarídeos.

Kar *et al.* (2010) utilizaram Xant no preparo de uma matriz de liberação sustentada de comprimidos mononitrato de isossobida-5, amplamente utilizado no tratamento de angina. Estudos de liberação *in vitro* indicaram um padrão de liberação sustentada ao longo de um período de estudo de 12h, indicando que a matriz é promissora para redução da frequência da dosagem.

El-Zahaby *et al.* (2014) estudaram a preparação de comprimidos de tamanho crescente de levofloxacino hidratado para a erradicação de *Helicobacter pylori* utilizando polímeros formadores de gel *in situ*: goma de gelano, alginato de sódio, pectina e Xant. De acordo com os resultados, a fórmula contendo goma xantana isoladamente foi a que obteve a liberação mais sustentada, com um aumento de diâmetro com o tempo, podendo atuar como Plug-type GRDF.

2.2 SISTEMA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA

Os SLCs têm sido intensamente estudados nos últimos anos, sobretudo, por serem capazes de manter a concentração plasmática desejada do fármaco, sem que

este atinja um nível tóxico ou caia abaixo do nível mínimo eficaz. Cada fármaco apresenta sua meia-vida biológica própria e não consegue manter uma concentração eficaz por muito tempo nas formulações convencionais. Nesse caso, aumentar a dose do fármaco pode levar a uma reação tóxica, enquanto que, tomar a dose recomendada várias vezes ao dia, pode não ser conveniente para o paciente. Daí a grande viabilidade dos SLCs, os quais liberam o fármaco gradualmente, mantendo os níveis plasmáticos adequados, prolongando sua ação (MENG *et al.*, 2011).

Além do controle temporal, os SLCs quando bem idealizados, podem direcionar a localização espacial do princípio ativo até determinados sítios, criando novos mecanismos de interação e diminuindo problemas com resistência (VILLANOVA *et al.*, 2010).

A maioria dos SLCs consiste em sistemas supramoleculares baseados em macromoléculas, pares iônicos, complexos de coordenação, agregados moleculares, compostos de intercalação, nanopartículas, etc. Eles são estabilizados por interações intermoleculares não covalentes, tais como eletrostáticas, hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e interações de Van der Waals (FARIA-TISCHER e TISCHER, 2012; MONTANARI *et al.*, 1998). Essas interações com as matrizes encapsulantes contribuem para minimizar o problema da baixa solubilidade de certos fármacos, obter perfis de liberação mais lento, além de proteger as substâncias de interesse até o local de liberação (MARTINS *et al.*, 2011; MATRICARDI *et al.*, 2009).

Nos últimos anos, a administração controlada de medicamentos tem evoluído muito, desde a primeira aprovação em 1990, da anfotericina B lipossomal pelo FDA. Desde então, vários outros sistemas estão comercialmente disponíveis para tratar diversas doenças como câncer, infecções e degeneração muscular (ZHANG, Y. *et al.*, 2013). Em 1997 as vendas de produtos contendo SLC já haviam alcançado cerca de US \$ 14 bilhões apenas nos Estados Unidos (UHRICH *et al.*, 1999), crescendo para US \$ 121 bilhões em 2010. É válido frisar que o custo médio e o tempo necessário para desenvolver um novo SLC (cerca de US \$ 20-50 milhões em 3-4 anos) é significativamente menor que o de um novo medicamento (cerca de US \$ 500 milhões em mais de 10 anos) (ZHANG, Y. *et al.*, 2013).

Wagner *et al.* (2006) apresentaram dados de um estudo realizado pela rede *European Science and Technology Observatory* (ESTO), utilizando várias fontes de informações através de palavras-chave relacionadas ao tema "Nanotecnologia aplicada à área da saúde". Após uma análise bibliométrica de documentos no banco

de dados do *Science Citation Index*, afirmaram que essa temática vem apresentando um grande avanço na atividade de pesquisa, saindo da faixa de 10 artigos ao ano (1980), para 1200 publicações em 2004. Quanto às atividades de patenteamento, uma pesquisa do Instituto Europeu de Patentes, utilizando a base de patentes privada do escritório europeu (EPODOC), revelou 2000 documentos no ano de 2003, acima de 223 em 1993. Os autores constataram ainda que o fornecimento de medicamentos é o campo dominante, com uma participação de 76% dos artigos científicos e 59% de patentes. A Europa como um todo, estava na vanguarda das pesquisas, representando 36% das publicações, comparada aos Estados Unidos com 32%. Já no quesito patenteamento, quem liderou foram os Estados Unidos com 54% de pedidos de patentes em relação à Europa com 25%, mostrando status de comercialização mais avançado.

Costa *et al.* (2014) realizaram estudos relacionados a nanosistemas carreadores de fármacos, utilizando o método de pesquisa da definição de palavras-chave relacionadas com a expressão “*Drug delivery systems*”. Eles relataram que em 2014, na *Web of Science*, os três primeiros países que se destacaram em publicações científicas foram: Estados Unidos com mais de 2 mil publicações, China (1322) e Índia (850). O Brasil ficou no *ranking* entre os 15 países com maior publicação, com 274 artigos publicados, apresentando, portanto, contribuição para a produção de SLC, considerando que os estudos científicos são a primeira etapa até a comercialização de um produto final.

Um grande número de classes de medicamentos pode se beneficiar da liberação controlada, incluindo quimioterápicos, imunossupressores, agentes anti-inflamatórios, antibióticos, antagonistas opioides, esteroides, hormônios, anestésicos e vacinas (UHRICH *et al.*, 1999). O uso indiscriminado de antibióticos, associado ao potencial de adaptação próprio das bactérias, tem levado a um número cada vez maior de patógenos com multiplicidade de mecanismos de resistência, tornando-se um problema mundial (THOMSON E MOLAND, 2000). Dentre os organismos considerados multirresistentes, destacam-se as bactérias Gram-negativas *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter* spp, que podem resistir a todos os agentes microbianos disponíveis atualmente ou serem susceptíveis apenas a agentes mais tóxicos, deixando opções limitadas para o tratamento (MAGIORAKOS *et al.*, 2012). Isso mostra que há a necessidade do desenvolvimento de novos medicamentos, bem como a formulação de sistemas de transporte mais específicos para os

antimicrobianos já existentes, a fim de aumentar a eficiência terapêutica e reduzir suas concentrações (DE OLIVEIRA *et al.*, 2005).

2.3 ANTIMICROBIANOS

Os antibióticos são compostos essenciais, amplamente utilizados em medicina para prevenir e combater infecções bacterianas humanas. São também utilizados em outros campos tais como, cosméticos e alimentos (BELMESSIERI *et al.*, 2017). Muitos antibióticos empregados na produção animal também servem como medicamentos essenciais para uso em seres humanos (BOAMAH *et al.*, 2016).

Há vários relatos de que a resistência aos antibióticos aumentou drasticamente ao longo dos últimos anos, sobretudo, devido ao uso excessivo desses fármacos em todo o mundo, seja para consumo humano, animal, na aquicultura e na agricultura (CARLET *et al.*, 2012). Houve um aumento da resistência em bactérias comensais e patogênicas, o que suscita uma preocupação com o sistema de saúde pública, apontando a necessidade de todos os países preservarem a eficácia dos antibióticos essenciais (BOAMAH *et al.*, 2016).

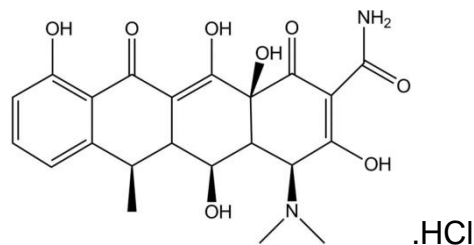
A doxiciclina (Dox, **Figura 4**) é conhecida com um antibiótico de amplo espectro, derivado sintético das oxitetraciclinas (MUNDARGI *et al.*, 2007). Este composto apresenta-se como um pó amarelo, inodoro, pouco solúvel em água, não volátil, mas que apresenta escurecimento, quando exposta à luz solar forte (KOROLKOVAS E BURCKHALTER, 1982). A sua estrutura química encontra-se na forma de um cloridrato hemiidratado (cloridrato de doxiciclina - $C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot HCl \cdot 0,5H_2O$).

Além do amplo espectro de ação, as tetraciclinas apresentam diversas propriedades favoráveis, tais como, baixa toxicidade, baixo custo e, na maioria dos casos, podem ser administradas por via oral (PEREIRA-MAIA *et al.*, 2010).

A Dox é um bacteriostático que inibe a síntese protéica bacteriana devido ao impedimento da ligação do RNA de transferência (tRNA) ao RNA mensageiro (mRNA) nos sítios do RNA ribossômico (rRNA) (MUNDARGI *et al.*, 2007). É eficaz contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo utilizada para tratar uma grande variedade de infecções incluindo periodontite, osteomielite e contra *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (*S. aureus*, MRSA) (PASTORINO *et al.*, 2015). Além disso, seu uso está sendo avaliado na quimioterapia do câncer, para induzir apoptose

diretamente ou combinada com agentes antitumorais conhecidos (PEREIRA-MAIA *et al.*, 2010).

Figura 4 - Fórmula estrutural do cloridrato de doxiciclina.



Fonte: (PASTORINO *et al.*, 2015).

De Andrade, Pallos *et al.* (2010) avaliaram o uso da Dox como terapia adjunta no tratamento periodontal e encontrou que tanto a administração por via sistêmica, quanto a administração de baixas doses ou ainda o uso local mostraram-se benéficos no tratamento de periodontite crônica.

Fiol *et al.* (2010) afirmaram que em pacientes com quadro menos grave de febre maculosa (tifo), Dox é o fármaco utilizado preferencialmente. É amplamente utilizada na profilaxia da malária e é aceitável para terapia de longa duração, exceto em crianças e mulheres grávidas.

Stoller *et al.* (1998) estudaram o perfil de liberação de Dox a partir de um SLC biodegradável colocado em bolsas periodontais. Os resultados foram comparados com pacientes que receberam doses orais padrão de Dox. Os dados farmacocinéticos foram obtidos a partir de fluido crevicular gengival, saliva e soro de pacientes adultos com periodontite. Os autores concluíram que o sistema estudado apresenta as propriedades clínicas e farmacocinéticas para a liberação de níveis eficazes do antibiótico, considerando a alta concentração de fármaco disponível nos locais tratados, o baixo nível na saliva e níveis quase inexistentes no soro.

Mundargi *et al.* (2007) também relataram a preparação de um SLC, preparado a partir de microesferas, uma blenda polimérica utilizando PLGA e PCL, carregadas com Dox, para o tratamento da doença periodontal. Realizaram testes *in vitro* e *in vivo* e, segundo os autores, os resultados sugeriram que as formulações são eficazes na administração controlada do fármaco a bolsas periodontais.

Zhang, H. *et al.* (2013) estudaram um complexo de inclusão para administração oftalmológica de Dox com hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD). Verificaram que tanto em solução quanto no estado sólido, houve melhoria na estabilidade do

complexo, atribuída a uma proteção pela cavidade hidrofóbica da ciclodextrina. Testes *in vitro* da atividade antimicrobiana indicaram que o complexo pode ter potencial para aplicações clínicas.

3 JUSTIFICATIVA

Já é relatado na literatura que as Xants são produzidas principalmente por *Xanthomonas campestris* e que glicose é a fonte de carbono preferencial para a sua produção (GARCIA-OCHOA *et al.*, 2000). Contudo, o aumento do valor de mercado desse monossacarídeo (ROSALAM e ENGLAND, 2006) é um fator crítico em muitos países.

O processo de produção e caracterização da Xant têm sido objetivos de vários trabalhos científicos especialmente no Brasil, visto que o país possui um grande potencial para a produção da goma, devido à disponibilidade de matéria-prima (BRANDÃO *et al.*, 2008; FARIA *et al.*, 2011; GOMES *et al.* 2009).

Entretanto, as propriedades deste biopolímero ainda não haviam sido exploradas com a profundidade deste estudo, englobando num só trabalho a produção e a caracterização estrutural, coloidal e reológica, além de estudos de estabilidade e agregação em solução, que por sua vez são cruciais para o entendimento do comportamento espessante.

Já fazem alguns anos que os polímeros naturais têm sido estudados para uso em SLCs, por serem biocompatíveis e apresentarem farmacocinética potencialmente favorável na circulação (ZHANG, Y. *et al.*, 2013). Foi relatado que Xant tem sido estudada para fabricação de matrizes em SLCs, tais como levofloxacino, cafeína e indometacina (EL-ZAHABY *et al.*, 2014; TALUKDAR e KINGET, 1995). Apesar de existirem na literatura diversos SLC de Dox a partir de matrizes diversas (STOLLER *et al.*, 1998; ZHANG, H. *et al.*, 2013), não foi encontrado até o presente momento, nenhum estudo utilizando Xant como matriz, justificando assim a estratégia do presente trabalho.

4 HIPÓTESES

- Xants são polieletrólitos capazes de se auto-organizarem formando agregados supramoleculares em solução aquosa, de elevada viscosidade e

pseudoplasticidade, em função da concentração; de modo que à 2 g/L, já devem ter alcançado a concentração crítica de agregação (c^{**}) e entrado no regime concentrado.

- Ocorre interação eletrostática entre a Xant, através de seus grupos ionizáveis de carga negativa (resíduos glucurônicos e pirúvicos), e a Dox, uma espécie catiônica, formando um complexo.
- O complexo formado por Dox e Xant pode apresentar melhor ação antimicrobiana que a Dox pura frente à *Staphylococcus aureus*.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

- Sintetizar a goma xantana a partir de glicose.
- Caracterizar o composto sob os pontos de vista estrutural, coloidal e reológico, visando avaliar seu estado de agregação em solução aquosa.
- Sinterizar e caracterizar o complexo supramolecular formado pela Xant com Dox (Dox/Xant).
 - Investigar a ação antimicrobiana do complexo Dox/Xant como sistema de liberação controlada de Dox.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a estrutura monomérica das Xants por espectroscopia na região do infravermelho (FTIR);
- Avaliar o perfil térmico das Xants por análise termogravimétrica (TGA) e por análise térmica diferencial (DTA);
- Avaliar a estabilidade das Xants em solução aquosa através de medidas de potencial zeta (ZP) e condutividade elétrica.
- Determinar o diâmetro hidrodinâmico das moléculas/agregados de goma xantana em solução aquosa por espalhamento de luz dinâmico (DLS);

- Determinar o potencial zeta (ZP) das moléculas/agregados de Xant em solução aquosa, por velocimetria doppler com análise de fase por espalhamento de luz dinâmico (PALS);
- Determinar os regimes de concentração das soluções de Xant, por reologia estacionária.
- Analisar o comportamento reológico estacionário das soluções macromoleculares através da identificação do tipo de fluido, construindo curvas de fluxo e de viscosidade;
- Avaliar a microestrutura das soluções poliméricas por reologia dinâmico-oscilatória;
- Preparar o complexo Dox/Xant;
- Determinar parâmetros termodinâmicos de interação da Xant com a Dox por calorimetria isotérmica de titulação (ITC).
- Identificar quais são os grupos funcionais que interagem no complexo Dox/Xant por espectroscopia na região do infravermelho (FTIR);
- Identificar possíveis diferenças nos perfis térmicos das amostras complexadas em relação aos precursores e às misturas mecânicas, por análise termogravimétrica (TGA) e por análise térmica diferencial (DTA);
- Avaliar o efeito da adição de Dox nas propriedades reológicas da solução aquosa Xant.
- Avaliar a ação antimicrobiana dos complexos Dox/Xant, comparando-se com a Dox pura.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

A fim de organizar da melhor forma os dados, visando uma maior compreensão do trabalho, o capítulo 6 apresenta duas seções secundárias, onde a 6.1 trata do processo de produção e caracterização da Xant pura, tanto no estado sólido, como em solução/suspensão. As análises no estado sólido relacionam-se à caracterização estrutural e térmica; em solução/ suspensão, referem-se a estudos de estabilidade, de agregação e reológicos. Para a maioria dos experimentos foram utilizadas amostras a 2 g/L, visto ser uma concentração supostamente superior à c^{**} , as quais foram solubilizadas em H₂O, considerando que em tampão poderia ocorrer precipitação,

devido ao excesso de íons. Já a seção 6.2 aborda a Xant complexada com a Dox, incluindo os ensaios biológicos.

6.1 XANTANA PURA

6.1.1 Materiais e reagentes utilizados

- H₂O ultrapura tipo 1, utilizada no preparo de soluções de Xant;
- Glicose, K₂HPO₄, NH₄Cl, NaCl, MgSO₄ e extrato de levedura;
- *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* n° 1182.

6.1.2 Produção de xantanas

As Xants foram biossintetizadas no Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, campus sede (UFJF-JF), através da colaboração dos Professores Dr. Humberto Moreira Hungaro e Dra. Mírian Pereira Rodarte.

Preparo do inóculo

Foi elaborado um meio de cultivo mínimo composto por: 1,5% (p/v) glicose, 0,5% (p/v) K₂HPO₄, 0,2% (p/v) NH₄Cl, 0,1% (p/v) NaCl, 0,01% (p/v) MgSO₄ e 0,1% (p/v) extrato de levedura, com ajuste de pH entre 7,0 – 7,2 a 25 °C. O meio foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 minutos e armazenado sob refrigeração 10 °C até sua utilização. Foi utilizada estirpe de *Xanthomonas* obtida da Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico - IBSBF de Campinas/SP: *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* n° 1182.

O caldo de cultivo mínimo (20 mL) foi distribuído em erlenmeyer de 50 mL e adicionada uma alçada calibrada (10 µL) da estirpe. Em seguida, foi colocado em incubadora com agitação de 150 rpm, por 24h, a 30°C. Após o tempo de incubação, foi ajustada a densidade ótica do caldo fermentado para a concentração microbiana equivalente a 0,3 unidades, por espectrofotometria a 600 nm.

Fermentação

Para a fermentação foi utilizado o caldo de cultivo mínimo distribuído em erlenmeyers de 250 mL, contendo 90 mL do meio previamente esterilizado. Foram transferidos 10 mL do inóculo, completando o volume para 100 mL. O cultivo foi realizado em duplicata, a 30 °C e agitação de 150 rpm por 72 h, obtendo-se as xantanas denominadas XantG₁ e XantG₂, que serão estudadas neste trabalho.

Precipitação e recuperação

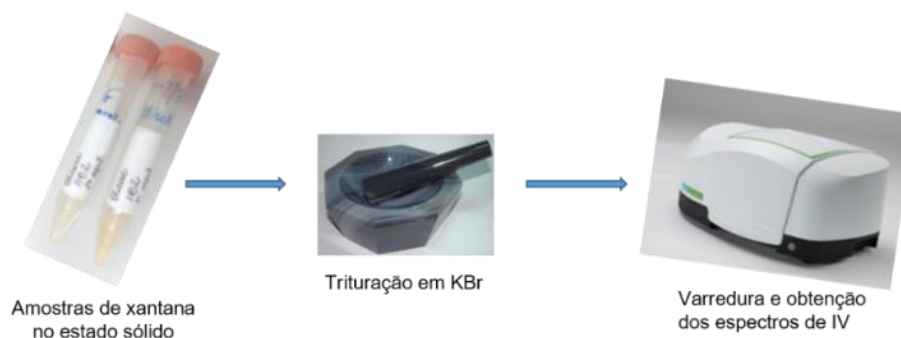
Para precipitação da Xant foi adicionado álcool etílico 92 °GL na proporção de 3:1 (álcool: meio fermentado). Após precipitar, a Xant foi recuperada por filtração a vácuo, utilizando filtros de tecido de nylon (abertura 77 microns e espessura 80 microns), previamente secos em estufa a 60°C por 1 h. A secagem da goma foi feita em estufa a 60 °C por 12 h.

6.1.3 Espectroscopia na região do infravermelho

As Xants biossintetizadas foram caracterizadas no estado sólido por espectroscopia na região de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) para a identificação dos principais grupos funcionais presentes em sua estrutura.

Os experimentos foram realizados utilizando um espectrômetro Perkin Elmer (Modelo Spectrum GX, Boston, MA, USA). Pastilhas contendo ≈ 2 mg de cada amostras, foram preparadas separadamente usando brometo de potássio (KBr) como suporte. Os espectros foram adquiridos em um intervalo de número de onda de 4000 a 500 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e uma média de 12 varreduras, utilizando o programa Perkin Elmer Spectrum ES (versão do aplicativo: 10.03.08.0133). Os dados foram exportados para o Microcal Origin® 9.0 para edição. Este procedimento está esquematizado na (**Figura 5**).

Figura 5- Preparação das amostras para obtenção dos espectros na região do infravermelho.



Fonte: A autora (2018).

6.1.4 Análises térmicas (curvas TGA e DTA)

O comportamento térmico dos biopolímeros foi avaliado por análise termogravimétrica (TGA) e análise térmica diferencial (DTA). Foi utilizado um módulo DTA/TGA, STA7200RV da HITACHI (**Figura 6**). As análises foram realizadas em atmosfera oxidante (ar) a 300 mL/min, com rampa de temperatura de 10 a 800 °C e a uma taxa de aquecimento de 10°C/min. Durante os experimentos, foram utilizados cadinhos de platina e massa aproximada de 2 mg para cada amostra, no estado sólido.

Figura 6- Equipamento da HITACHI utilizado para as análises térmicas.



Fonte: A autora (2018).

6.1.5 Estudo de estabilidade das xantanas em solução

A fim de se avaliar a estabilidade das amostras em H₂O, foram realizadas medições de potencial zeta (ZP) e condutividade elétrica de soluções com concentração de 2 g/L, ao longo de 23 dias consecutivos, excluindo-se apenas os domingos, totalizando 21 medidas nesse intervalo de tempo. Foi usada H₂O para a solubilização das amostras, visto que em tampão poderia ocorrer precipitação, devido ao excesso de íons. Decorridos cinco dias após a última medida, o ZP e a

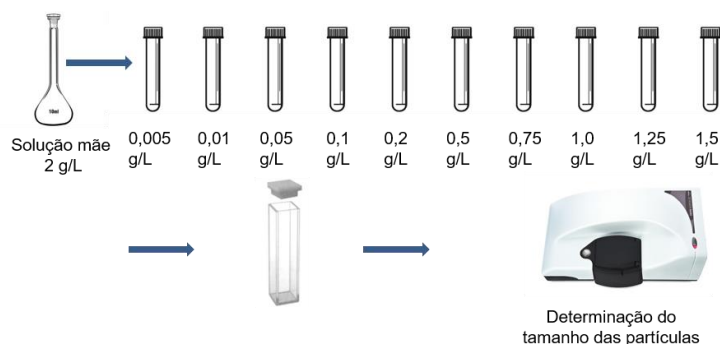
condutividade foram medidos novamente. As análises foram realizadas com o emprego do medidor de potencial zeta “ZetaSizer Nano ZS90” da Malvern, através da técnica padrão Malvern velocimetria por laser doppler (*Laser Doppler Velocimetry*) acoplado com “M3-PALS análise de fase por espalhamento de luz (*Phase Analysis Light Scattering*)”, a um ângulo de espalhamento de luz a 173° . As amostras foram inseridas em cubeta capilar de polietileno, acoplada a eletrodos. Os valores finais de ZP e condutividade elétrica foram calculados como a média de 5 medidas independentes, cada qual obtida pela média de 10 contagens.

6.1.6 Estudo de agregação das xantanas.

O caráter nanométrico, bem como a possibilidade de agregação das amostras foi avaliado por medidas de tamanho de partículas em solução aquosa (diâmetro hidrodinâmico, D_h) por espalhamento de luz dinâmico (*Dynamic Light Scattering – DLS*). Os experimentos foram realizados no módulo fotométrico de DLS, Zeta Sizer NanoZS90 da Malvern, a 25°C , após 30s de equilíbrio térmico.

Foi utilizada uma cubeta descartável de polietileno de 1 cm de caminho óptico, padrão Malvern, submetida a um feixe de luz monocromático (laser He–Ne de 4 mW de potência e comprimento de onda de 633 nm), com intensidade de luz espalhada medida a 90° . O D_h foi determinado pela média de 5 medidas independentes, cada uma delas obtida a partir da média de 5 contagens. O tratamento dos dados foi executado com o auxílio do programa Microcal Origin® 9.0. As medidas foram realizadas com amostras em diferentes concentrações, conforme demonstrado na **Figura 7**.

Figura 7- Diluições das amostras de xantana e leitura por fotometria de DLS.



Fonte: A autora (2018).

As amostras usadas nos experimentos de DLS foram também submetidas à medidas de ZP e condutividade elétrica. A técnica, a cubeta e as configurações para estas medidas foram as mesmas utilizadas nos estudos de estabilidade em solução.

6.1.7 Determinação dos parâmetros reológicos das soluções

A identificação do perfil newtoniano e/ou não newtoniano dos fluidos foi realizada por reologia estacionária, através da construção de curvas de fluxo e de viscosidade, varrendo-se a tensão de cisalhamento (τ) em função da taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$), utilizando um reômetro rotacional estacionário de taxa de tensão controlada DHR-1 da T.A. Instruments®, equipado com geometria placa-placa (PP25/S-SN 15782; $d=1.0$ mm), com controle de temperatura através da placa com sistema Peltier ($25,00 \approx 0,02$ °C) (**Figura 8**).

Figura 8- Reômetro dinâmico híbrido DHR-1 da T. A. instruments®.



Fonte: A autora (2018).

Inicialmente, foi feita a determinação dos regimes de concentração das soluções de Xant, por reologia estacionária à 25 °C, em taxa de cisalhamento igual a 95 s^{-1} . Foi utilizada a amostra XantG₂, nas mesmas concentrações utilizadas nos experimentos de DLS, as quais variaram entre 0,005 à 2 g/L.

Com o objetivo de se classificar as amostras quanto ao comportamento reológico, foram realizados experimentos em modo de cisalhamento estacionário (modo rotacional) à 25 °C, a uma concentração de 2 g/L. As amostras foram pré-cisalhadas por 10 s e, em seguida, foram submetidas a um ciclo de cisalhamento: de 10 a 1000 s^{-1} e 1000 a 10 s^{-1} . A taxa de cisalhamento foi variada em 48 etapas linearmente espaçadas, levando 10 s para ser concluída. Os dados foram inicialmente tratados usando o software TRIOS e, posteriormente, foram exportadas para o software Microcal Origin® 9.0. Os experimentos foram realizados em duplicata, de

modo que cada ponto com a sua barra de erro foi a média de duas medições independentes.

Em seguida, foram realizados ensaios reológicos dinâmicos oscilatórios. A primeira série teve como objetivo a verificação da região de viscoelástica linear (LVE), especialmente, qual o limite máximo de amplitude de deformação em que tal região se mantém linear, ou seja, onde a estrutura do material é preservada, para posterior varredura de frequência. Assim, foi realizada uma varredura crescente de deformação, na faixa de 1 à 100%.

Já a segunda série de experimentos em modo oscilatório teve como objetivo avaliar a estrutura do sistema, através da separação das contribuições elástico (comportamento sólido) e viscosa (comportamento fluido) das soluções, através da determinação dos módulos de armazenamento (storage modulus – G' , parte real do módulo cisalhamento complexo) e de perda (loss modulus – G'' , parte imaginária do módulo cisalhamento complexo) (BARNES *et al.*, 1989; CASSU e FELISBERTI, 2005). As varreduras de frequência foram realizadas entre 0 e 20 Hz, mantendo a temperatura fixa em 25 °C.

6.2 XANTANAS COMPLEXADAS COM DOXICICLINA

6.2.1 Matérias-primas e reagentes utilizados

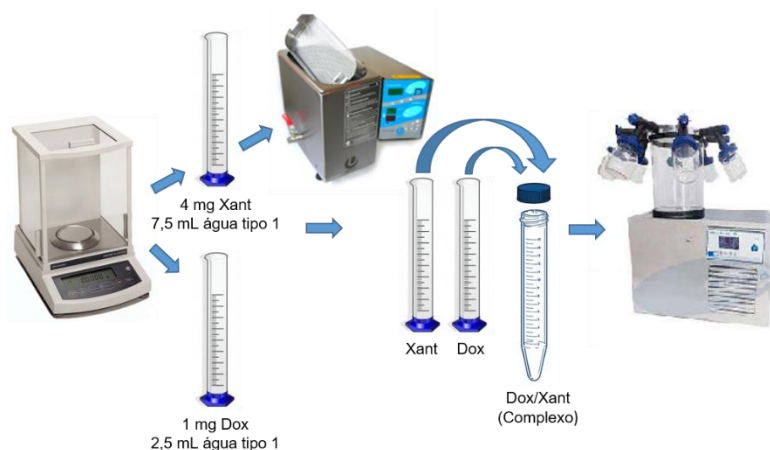
- XantG₁ e XantG₂ previamente biossintetizadas.
- Cloridrato de Doxiciclina (Sigma aldrich);
- H₂O ultrapura tipo 1, para o preparo das soluções;
- Solução salina;
- Caldo Ágar Mueller Hinton;
- Álcool isopropílico acidificado;
- 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difenil brometo de tetrazolium (MTT);
- *Staphylococcus aureus* (32388602).

6.2.2 Preparo do complexo Dox/Xant

Com a utilização de provetas de 10 mL, soluções de Dox e Xant, 4 mg de Xant para 7,5 mL de água tipo 1 e 1 mg de Dox para 2,5 mL de água tipo 1, foram

solubilizadas separadamente. A solução de Xant foi mantida em sonificador a 40 °C, por 60 min, para melhor solubilização. Em seguida misturada à solução Dox em um tubo Falcon de 15 mL. A suspensão foi congelada e liofilizada (**Figura 9**). O sólido obtido, complexo Dox/Xant, foi submetido à caracterização por FTIR e análises térmicas.

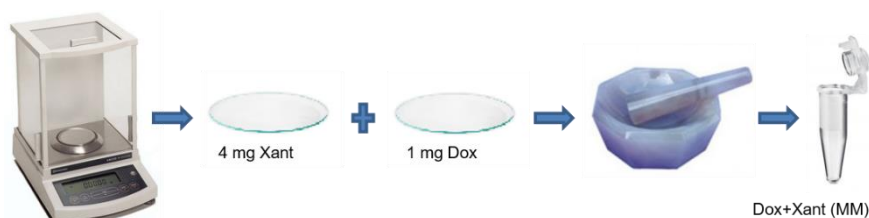
Figura 9- Processo de obtenção do complexo Dox/Xant.



Fonte: A autora (2018).

Para efeito de comparação nas análises no estado sólido, a mistura mecânica (MM) de Xant com Dox foi preparada na proporção 1:4, sendo homogeneizada em grau de porcelana com auxílio de pistilo e acondicionada em microtubo (**Figura 10**).

Figura 10- Processo de preparação da mistura mecânica Dox+Xant.



Fonte: A autora (2018).

6.2.3 Espectroscopia na região do infravermelho

Os espectros na região do infravermelho médio (4000 a 500 cm^{-1}) da Dox, do complexo Dox/Xant e da MM foram obtidos utilizando o mesmo equipamento e as mesmas configurações utilizadas para caracterização das Xants puras. Foram preparadas pastilhas de KBr contendo as amostras separadamente.

6.2.4 Análises térmicas (curvas TGA e DTA)

Foram realizadas análises térmicas da Dox pura, do complexo Dox/Xant liofilizado e da MM. O mesmo equipamento utilizado para as análises térmicas de Xant pura foi usado para adquirir as curvas TGA e DTA. As condições de análise foram similares às descritas acima.

6.2.5 Titulações por condutividade elétrica e potencial zeta

Titulações com medidas de valores de potencial zeta dos complexos Dox/Xant foram realizadas com 30 injeções de 10 μL de solução de Dox na concentração 30 mM em 1,5 mL de solução de Xant a uma concentração de 4 g/L. Foi utilizada cubeta capilar de polietileno, acoplada a eletrodos, assim como o mesmo equipamento e as mesmas configurações empregadas para os experimentos descritos acima. As medidas foram iniciadas antes da primeira titulação e sequencialmente ao longo das 30 titulações. O ZP foi calculado pela média de 5 medidas independentes, cada uma delas obtida a partir da média de 5 contagens.

6.2.6 Titulações por calorimetria de titulação isotérmica

Alterações nas propriedades termodinâmicas em decorrência da complexação foram investigadas por microcalorimetria isotérmica de titulação. Essas análises foram realizadas em um Microcalorímetro VP-ITC da Microcal (**Figura 11**) utilizando os seguintes parâmetros experimentais: 40 injeções automáticas de 6,3 μL de titulante (solução de Dox a 30 mM) em 1,5 mL do titulado (solução de Xant 4,2 g/L). Temperatura dos experimentos 25 °C, rotação de 300 rpm. A primeira injeção de 1 μL foi descartada a fim de eliminar os efeitos de difusão de material da seringa para a célula e vice-versa. Os experimentos de referência (branco), consistiram de titulação da Dox a 30 mM em 1,5 mL de água ultrapura tipo 1. Os experimentos foram realizados em duplicata e os dados tratados com o auxílio do programa Microcal Origin® 9.0.

Figura 11- Calorímetro de titulação isotérmica e itens anexos.



Fonte: A autora (2018).

6.2.7 Determinação dos parâmetros reológicos das soluções

O comportamento reológico da solução do complexo Dox/Xant foi avaliado utilizando o mesmo equipamento utilizado para as análises de Xant pura.

Inicialmente, procedeu-se com o experimento de titulação viscosimétrica, utilizando-se as mesmas proporções dos experimentos de ITC, porém, da seguinte forma: com o auxílio de uma pipeta automática, foram realizadas 41 titulações de 63 μL de titulante (solução Dox a 15 mM) em 15 mL do titulado (solução de Xant a 2 mg/mL), anotando-se manualmente os valores de viscosidade a cada titulação. Os dados foram plotados no programa Microcal Origin® 9.0.

Após a titulação, a suspensão residuária contendo complexo Dox/Xant na razão 0,00105 mol/g foi submetida a cisalhamento estacionário em função da taxa de cisalhamento e da temperatura. As curvas de fluxo e viscosidade foram construídas a 25 °C e taxas de cisalhamento entre 1 a 1000 s^{-1} e de 1000 a 1 s^{-1} . Os experimentos em função da temperatura foram realizados varrendo-se a temperatura no intervalo de 5 a 60 °C aproximadamente, a uma taxa de cisalhamento de 100 s^{-1} .

6.2.8 Ensaio antimicrobianos

Microrganismo utilizado

Foi utilizada uma linhagem de *Staphylococcus aureus* (32388602), a qual estava armazenada em ágar Muller Hinton (MH), em geladeira, pertencente à coleção de

micro-organismos do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Juiz de Fora-Campus Governador Valadares, onde os ensaios foram realizados.

Determinação da dose letal mediana

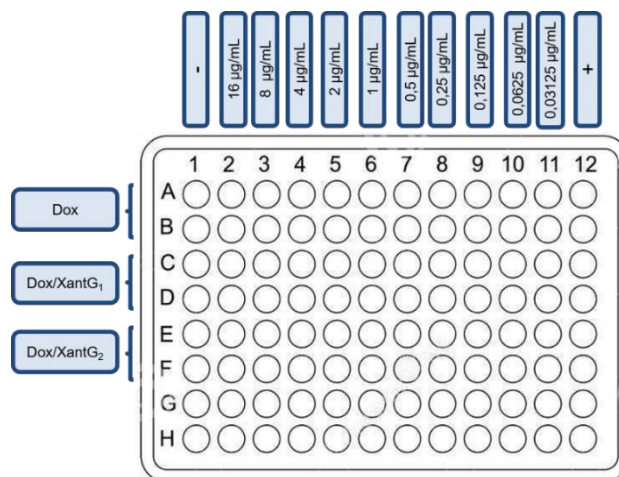
O teste para a determinação da dose letal mediana (DL_{50}) foi realizado em placa de microdiluição de 96 poços, empregando o método de diluição seriada em caldo para a solução de Dox e xantanas (XantG₁ e XantG₂), conforme teste padrão de susceptibilidade antimicrobiana do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015), com modificações. Primeiramente foi realizada diluição seriada da solução Dox (1 g/L) em meio de cultura MH, de modo a alcançar no poço concentrações que variaram de 16 µg/mL a 0,3125 µg/mL. O mesmo procedimento foi realizado para as soluções de XantG₁ e XantG₂ (1 g/L), separadamente, de modo a alcançar no poço concentrações que variaram de 66 µg/mL a 0,12 µg/mL. Os cálculos e os procedimentos foram efetuados de modo a obter a proporção 1 mmol de Dox para 2 g de Xant, visto ser a proporção encontrada através das análises de interação no ITC.

Já para o inóculo bacteriano, a linhagem foi repicada 16 horas antes da execução do experimento e mantida em estufa a 37 °C. A suspensão microbiana foi preparada em solução salina 0,9% até a obtenção de uma turvação equivalente à escala 0,5 de MacFarland. O inóculo foi diluído em caldo MH e adicionado à placa de microdiluição. Às fileiras A e B foram adicionadas as diluições de Dox mais o meio MH. Às fileiras C e D foram adicionadas as diluições de Dox mais as diluições de solução XantG₁, formando o complexo Dox/XantG₁. Da mesma forma procedeu-se para com as fileiras E e F, de modo a formar o complexo Dox/XantG₂ (**Figura 12**). Como controle positivo foi adicionado o inóculo mais o meio MH, sem adição de droga. Já como controle negativo foi utilizado o meio MH.

A placa foi incubada por 24 h a 37 °C. A leitura foi realizada após adição do corante 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difenil brometo de tetrazolium (MTT), onde a DL_{50} foi considerada a menor concentração que inibiu 50% da atividade metabólica microbiana em comparação com o controle positivo. Para tanto, foram adicionados 20 µL de MTT, Sigma (1 g/L) a cada orifício, deixando, em seguida, a placa incubada a 37 °C. Decorrida 1 hora, foi adicionado 100 µL de álcool isopropílico acidificado e realizada a leitura no leitor de microplacas Thermo Electron oy (modelo Multiskan FC), a 570 nm. A atividade metabólica foi calculada pela absorbância de cada teste x

100/média da absorbância do controle positivo. Os experimentos foram realizados em duplicata.

Figura 12- Representação esquemática. Placa de microdiluição de dose letal mediana de Dox pura e complexos Dox/Xant.



(16,0000 µg/mL a 0,3125 µg/mL), concentrações referentes à doxiciclina.

Fonte: A autora (2018).

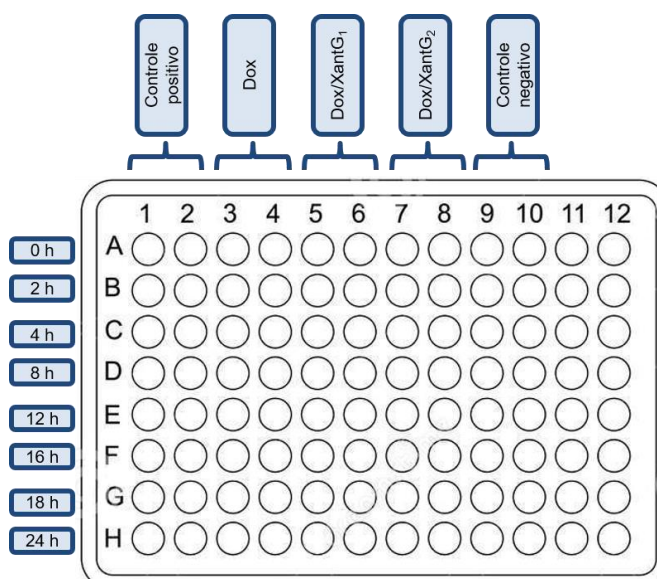
Curva de morte

A fim de se investigar possíveis diferenças no tempo de inibição da atividade metabólica microbiana, foi realizado ensaio de curva de tempo-morte frente à *S. aureus* 32388602.

O inóculo foi preparado conforme descrito no teste para a determinação da DL_{50} e as concentrações usadas da droga foram 0,06 µg/mL e 0,25 µg/mL. As placas foram montadas conforme representado na **Figura 13**. O ensaio incluiu controle negativo, no qual as cavidades foram preenchidas com 105 µL apenas de meio MH, já os orifícios do controle positivo, foram preenchidos com 100 µL de meio MH e 5 µL de inóculo bacteriano. Aos demais orifícios foram adicionados 50 µL da solução de Dox, mais 50 µL de MH (orifícios destinados à Dox pura) ou 50 µL das respectivas soluções Xant (orifícios destinados aos complexos Dox/Xant) e 5 µL do inóculo bacteriano. A placa foi incubada a 37 °C por 24 horas e durante este período foram realizadas leituras utilizando um leitor de microplacas Thermo Electron ou (modelo Multiskan FC), a 570 nm, em diferentes intervalos de tempo, começando com o momento da inoculação (tempo zero) e seguindo com leituras em 2, 4, 8, 12, 16, 18 e 24 horas. Nos intervalos pré-determinados, foram adicionados 20 µL de MTT (1 g/L) a cada

orifício, conforme descrito anteriormente, deixando, em seguida, a placa incubada a 37 °C. Decorrida 1 hora, foram adicionados 100 µL de álcool isopropílico acidificado, removidas alíquotas de 100 µL de cada poço e plaqueadas em outra placa de microdiluição de 96 poços e realizada a leitura. Decorridas as 24 horas e realizadas as 8 leituras, a curva de morte foi plotada a partir da porcentagem de atividade metabólica obtida nos respectivos intervalos (absorbância de cada teste x 100/média da absorbância do controle positivo).

Figura 13- Representação dos pontos de aplicação dos compostos. Placa de microdiluição com Dox pura e complexos Dox/Xant (Curva de morte, *S. aureus* 32388602).



Fonte: A autora (2018).

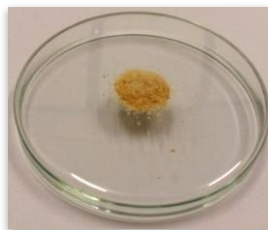
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Da mesma forma que o capítulo 6, o capítulo 7 também foi dividido em duas seções secundárias: seção 7.1 trata dos experimentos envolvendo Xant pura e 7.2 complexos Dox/Xant.

7.1 XANTANAS PURAS

O aspecto do polímero biossinterizado é mostrado na **Figura 14**. Após biossinterizadas, as amostras XantG₁ e XantG₂ foram submetidas à caracterização físico-química no estado sólido e em solução/suspensão.

Figura 14- Aspecto físico de amostra de xantana.



Fonte: A autora (2018).

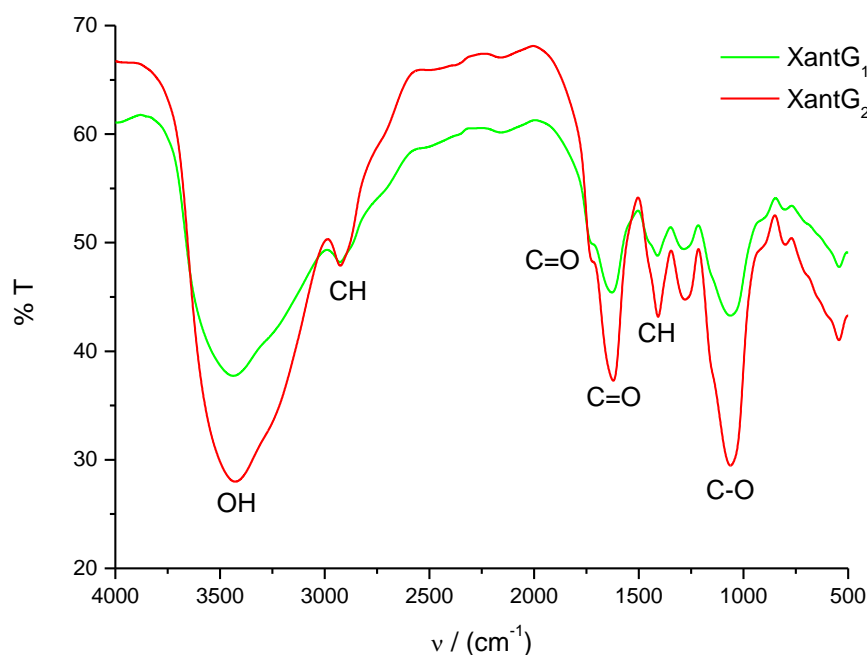
7.1.1 Espectroscopia na região do infravermelho

A espectroscopia na região do infravermelho é uma técnica capaz de detectar a transição vibracional decorrente da ressonância entre a vibração molecular da matéria condensada e a radiação eletromagnética na região do infravermelho, sendo utilizada para identificar grupos funcionais presentes em compostos. FTIR é uma metodologia utilizada para detectar semelhanças ou diferenças nas estruturas químicas dos compostos (FARIA *et al.*, 2011).

A caracterização estrutural foi realizada para identificar e definir a estrutura primária de XantG₁ e XantG₂, visto ser um procedimento necessário e que deve anteceder os estudos de agregação. As amostras foram caracterizadas por FTIR a fim de compará-las com outras Xants disponíveis na literatura, através da identificação dos principais grupos funcionais presentes na molécula.

A região estudada compreendeu a janela espectral entre 500 a 4000 cm⁻¹. Os espectros apresentaram grande semelhança entre si (**Figura 15**), mostrando que o processo é reprodutivo. Na **Tabela 1** estão apresentadas as principais bandas observadas nos espectros da XantG₁ e XantG₂, os quais estão coerentes com a literatura.

Figura 15- Espectros na região do infravermelho para as xantanas XantG₁ e XantG₂.



Fonte: A autora (2018).

Tabela 1 – Atribuições para as bandas mais importantes observadas na região do infravermelho para as xantanas XantG₁ e XantG₂.

Número de onda cm ⁻¹		Atribuições
XantG ₁	XantG ₂	
3435	3425	ν(O-H) do grupo hidroxila
2924	2924	ν(C-H) do grupo metila
1730	1730	ν(C=O) de ésteres e ác. carboxílicos
1623	1630	ν(C=O) derivado da cetona do ác. pirúvico
1412	1412	δ _{ang} (C-H) de metila
1060	1060	ν(C-O) de álcool (ligações glicosídicas)

Fonte: A autora (2018).

Nos espectros das Xants a banda em torno de 3430 cm⁻¹ está relacionada à deformação axial dos grupos hidroxila ν(O-H) presentes na estrutura dos carboidratos (HASHEMI *et al.*, 2014). A banda 2924 cm⁻¹ refere-se à deformação axial do grupo metila ν(C-H) (POOJA *et al.*, 2014). A banda observada na região de 1730 cm⁻¹ corresponde à deformação axial do grupo carbonila ν(C=O) dos derivados de ésteres e dos ácidos pirúvico e outros ácidos carboxílicos (FARIA *et al.*, 2011). Segundo Gomes (2016), é um comportamento típico da Xant, ocorrendo devido aos estiramentos ν(C=O) dos resíduos de esterificação como o piruvil (CH₃-CO-COO) e acetil (CH₃-COO) e ao grupo -COOH do ácido glucurônico. A banda em torno de 1627

corresponde deformação axial de $\nu(\text{C}=\text{O})$ de cetona presente no resíduo do ácido pirúvico (FARIA *et al.*, 2011).

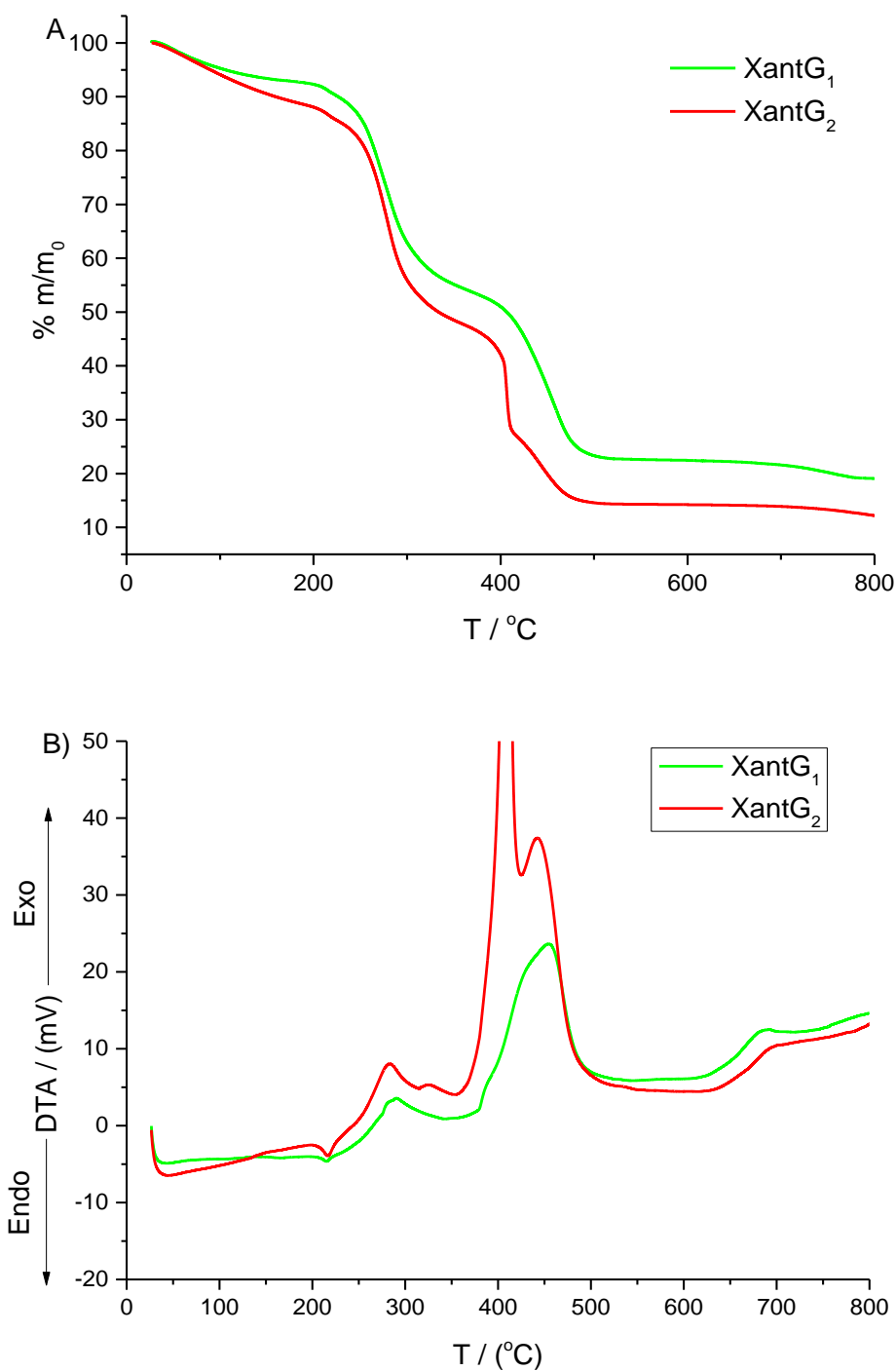
Sinais em 1412 cm^{-1} , referem-se à deformação angular $\delta_{\text{ang}}(\text{C-H})$ de metila (FARIA *et al.*, 2011); em 1060 corresponde á deformação axial dos grupos $\nu(\text{C-O})$ de álcool (Kumar *et al.*, 2009). Vibrações em torno de 540 cm^{-1} , referem-se à deformação axial de ligação $\nu(\text{C-C})$, denominadas genericamente *Vibrações esqueléticas* (impressão digital), geralmente fracas e sem qualquer importância para elucidação estrutural (FARIA *et al.*, 2011).

7.1.2 Análises térmicas (curvas TGA e DTA)

Análise termogravimétrica (TGA) consiste em monitorar a variação da massa de uma amostra em função da temperatura ou do tempo em condições controladas de temperatura e atmosfera de gás (inerte ou oxidante) durante o experimento. Os resultados obtidos por essa análise são representados através da curva termogravimétrica que fornece o percentual de massa (Massa %) em função da temperatura (CALDERINI e PESSINE, 2008). Já a análise térmica diferencial (DTA) mede o fluxo de calor resultante da diferença entre a temperatura da amostra e do material de referência (termicamente inerte) em função do tempo, permitindo assim determinar a ocorrência de eventos endotérmicos ou exotérmicos durante o aquecimento da amostra (GIOLITO e IONASHIRO, 1988).

As curvas TGA e DTA das amostras de XantG₁ e XantG₂ estão representadas na **Figura 16**. Os dados relacionados aos eventos térmicos ocorridos na amostra estão listados na **Tabela 2**.

Figura 16- A) Curva termogravimétrica das xantanas XantG₁ e XantG₂ em atmosfera oxidante (ar). **B)** Curva térmica diferencial das mesmas amostras e nas mesmas condições.



Fonte: A autora (2018).

Tabela 2 - Tabela com os principais eventos térmicos atribuídos às xantanas XantG₁ e XantG₂.

Material	1ª Perda de massa (%)	Intervalo de temp (°C)	2ª Perda de massa (%)	Intervalo de temp. (°C)	3ª Perda de massa (%)	Intervalo de temp. (°C)
XantG ₁	7	30-170	38	170-350	32	350-510
XantG ₂	11	30-170	41	170-350	34	350-510

Fonte: A autora (2018).

As duas amostras apresentaram três eventos de perda de massa, sendo que:

- O primeiro evento é endotérmico e ocorre na faixa de 30 °C até 170 °C com perda de massa de 7% para XantG₁ e 11% para XantG₂ atribuído à desidratação (FARIA *et al.* 2011);

- O segundo evento é exotérmico e ocorre na faixa de 170 °C a 350 °C com perda de massa de 38% para XantG₁ e 41% para XantG₂ atribuído à primeira decomposição (ZOHURIAAN e SHOKROLAHI, 2004);

- O terceiro é exotérmico e ocorre na faixa de 350 a 510 °C com perda de massa de 32% para XantG₁ e 34% para XantG₂ que corresponde à carbonização da Xant (VILLETTI *et al.*, 2002).

No final do processo, XantG₁ apresentou massa residual de 23% e XantG₂ de 14% acima de 500 °C, sugerindo a incorporação de cátions Na⁺/K⁺ por polímeros. Os cátions são oriundos dos sais utilizados no meio de produção ou adicionados após fermentação e ligam-se a resíduos ácidos presentes na molécula de Xant (KLAIC *et al.*, 2011).

Os dados observados para as Xants são semelhantes àqueles apresentados por outras Xants nos trabalhos de Faria *et al.* (2011) e Zohuriaan e Shokrolahi (2004).

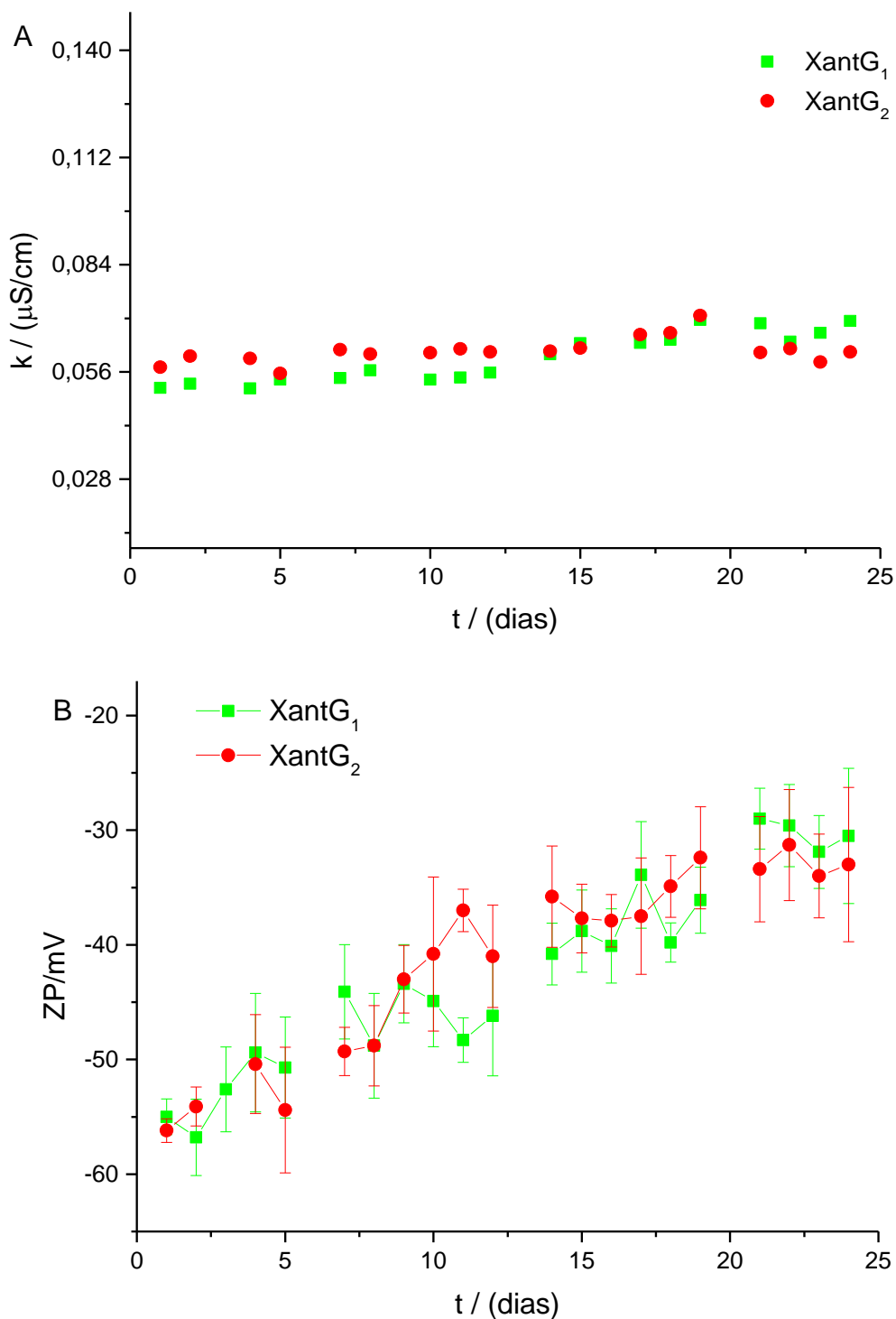
7.1.3 Estudo de estabilidade das xantanas

A **Figura 17** mostra o resultado de 21 medições de ZP e condutividade elétrica de dispersões das duas amostras de Xant a 2 g/L, ao longo de 23 dias consecutivos. Como pode ser observado, os valores de condutividade elétrica praticamente não variaram, sugerindo estabilidade molecular dentro do período de estudo. Caso houvesse algum fenômeno de decomposição, a concentração de íons deveria aumentar ou diminuir, levando a alterações na condutividade elétrica.

Todavia, o potencial zeta sofreu uma pequena variação, que pode ser resultante da incorporação de CO₂ nas amostras, formando íons HCO₃⁻ ou CO₃²⁻, numa quantidade indetectável por condutimetria, mas que por sua vez poderiam se adsorver sobre as moléculas causando mudanças no potencial zeta, visto que este é influenciado não só pela dissociação dos grupos funcionais na superfície da partícula, mas também pela adsorção de espécies iônicas presentes no meio dispersante (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Contudo, sugere uma baixa possibilidade de coalescência e sedimentação, visto que a variação foi de -56 mV para cerca de -32

mV, magnitude suficiente para manter a estabilização eletrostática de nanoestruturas, considerando que esta deve ser superior a $|20|$ mV para produzir sistemas estáveis durante o armazenamento a longo prazo (PIORKOWSKI e MCCLEMENTS, 2014).

Figura 17- A) Valores de condutividade elétrica de xantanas XantG₁ e XantG₂ a 2 g/L, medidos por PALS, a 173° e 25 °C, ao longo de 23 dias. **B)** Valores de ZP nas mesmas condições.



Fonte: A autora (2018).

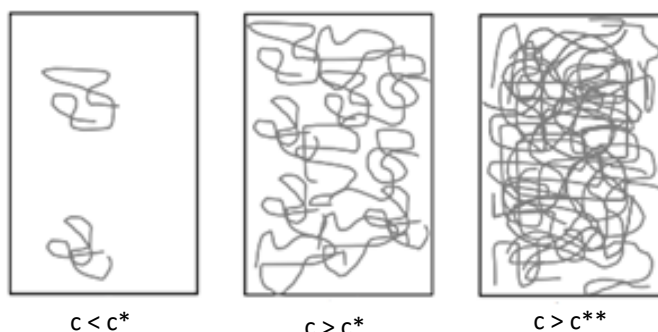
7.1.4 Investigação do estado de agregação das xantanas

O conhecimento do regime de concentração de um biopolímero, bem como seu estado de agregação é de grande importância tecnológica, uma vez que permite prever seu comportamento em solução, preparar soluções mais adequadas, de acordo com o tipo de análise e enfim, realizar uma melhor aplicação (DIAZ, 2008).

A técnica espalhamento de luz dinâmico (DLS), a qual é não perturbativa, é usada para medir o coeficiente de difusão de moléculas em solução. O coeficiente de difusão, o qual tem dimensões de (comprimento)²/tempo (m²/s), é uma média da trajetória difusional de uma molécula individual (DIAZ, 2008). Consiste em uma técnica para caracterizar o tamanho das dispersões coloidais utilizando a iluminação de uma suspensão de partículas ou moléculas que apresentam movimento Browniano aleatório por um feixe de laser (PETERS, 2000; PECORA, 2013). Partículas em suspensão se movem de forma rápida e aleatória, como resultado da colisão de umas com as outras ou destas com as moléculas do solvente, o que pode levar à formação de aglomerados (TANTRA *et al.*, 2010). Em geral, pequenas partículas movimentam-se relativamente mais rápido em líquidos, em relação a partículas maiores, as quais se movimentam mais lentamente (PADUA e WANG, 2012).

O comportamento das moléculas poliméricas em solução depende fortemente da concentração do polímero. O intervalo da concentração de um polímero pode ser dividido em três diferentes regimes: diluído, semidiluído e concentrado, como ilustrado na **Figura 18** (KARLSON, 2002). No regime diluído, as cadeias poliméricas individuais ou agregados movem-se independentemente umas das outras, visto que a média do diâmetro hidrodinâmico de cada uma é menor que a distância entre elas.

Figura 18- Intervalos de concentração polimérica: solução diluída ($c < c^*$), solução semidiluída ($c > c^*$) e solução concentrada ($c > c^{**}$).



$c < c^*$

$c > c^*$

$c > c^{**}$

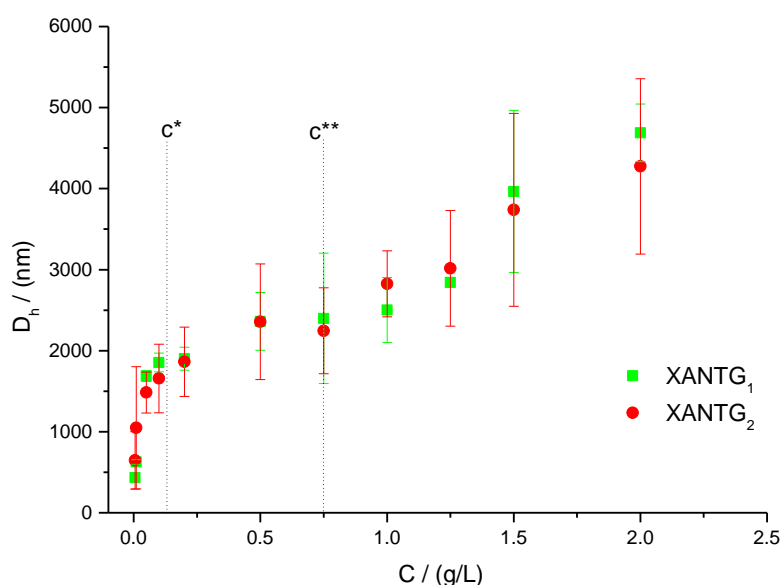
Fonte: (KARLSON, 2002).

No regime semidiluído o diâmetro hidrodinâmico médio é maior que a distância entre cadeias poliméricas, as quais começam a se sobrepor. A concentração onde tal fenômeno ocorre é conhecida como concentração crítica de sobreposição – c^* (HOFER, 1991; KARLSON, 2002) e ocorre a aproximadamente 10% p/v. Ocorre um entrelaçamento entre as moléculas formando uma rede polimérica transitória que pode ser detectada pelo aumento dramático da viscosidade da solução polimérica (KARLSON, 2002).

A transição do regime semidiluído para o concentrado é chamada concentração crítica de agregação – c^{**} , no qual as moléculas adquirem concentração máxima ocasionando a formação de uma rede tridimensional emaranhada e contínua (NASH *et al.*, 2002). No regime concentrado ocorrem intensas interações polímero-polímero, as quais causam menor mobilidade entre as moléculas, ou seja, há um decréscimo no coeficiente de difusão translacional (DIAZ, 2008).

No presente trabalho, foram realizadas medidas de DLS para determinação do tamanho das partículas de Xant (diâmetro hidrodinâmico, D_h), a fim de avaliar seu estado de agregação em solução aquosa (**Figura 19**).

Figura 19- Valores de diâmetro hidrodinâmico para xantanas XantG₁ e XantG₂ em função da concentração, medidos por DLS, com ângulo de espalhamento a 90° à 25°C.



Concentrações críticas: c^* (de sobreposição) e c^{**} (de agregação).

Fonte: A autora (2018).

Os dados de DLS mostraram a existência de três regiões de tamanho de partícula em função da concentração de Xant. Na região inicial, com o aumento da concentração, a distância média entre as cadeias poliméricas diminui, as quais começam a se tocarem e entrelaçarem, ocasionando um pronunciado aumento do D_h até concentração por volta de 0.1 g/L, sugerindo a formação de emaranhados moleculares tridimensionais, pela agregação de nanoestruturas, e o alcance do regime semidiluído. Acima da concentração de $\approx 0,75$ g/L observa-se um novo aumento no tamanho de partícula, provavelmente resultante de espessamento dos emaranhados, como consequência da inexistência de espaço suficiente para as cadeias poliméricas se movimentarem .

Diaz (2008) examinou o regime de concentração de goma Xant, sintetizada pela bactéria *Xanthomonas arboricola* pv *pruni*, utilizando a técnica DLS, através da determinação das concentrações que limitam estes regimes. Foi observada a concentração crítica de agregação (c^*) em $1,3 \times 10^{-2}$ g/L e a de sobreposição (c^{**}) em $1,1 \times 10^{-1}$ g/L. Portanto, os resultados obtidos no presente trabalho, apesar de um pouco superiores, apresentam certa similaridade com os dados apresentados por Diaz (2008). Os resultados também foram muito parecidos com os encontrados por Nash, Pinder, Hemar & Singh, (2002), através de DLS, onde a c^{**} foi igual a 0,6 g/L.

Quando uma partícula carregada é dispersa, uma dupla camada adsorvida, conhecida como dupla camada elétrica (EDL), desenvolve-se em sua superfície (RUIZ-CABELLO *et al.*, 2014).

A camada mais interna, denominada camada de Stern, constitui a parte fixa, formada por íons de carga contrária à superfície da partícula (ALLEONI e CAMARGO, 1994). Devido ao campo eletrostático das nanoestruturas carregadas, uma camada difusa composta por íons/moléculas de cargas iguais e opostas desenvolve-se, além da camada de Stern, e junto com esta, forma a EDL. (BHATTACHARJEE, 2016).

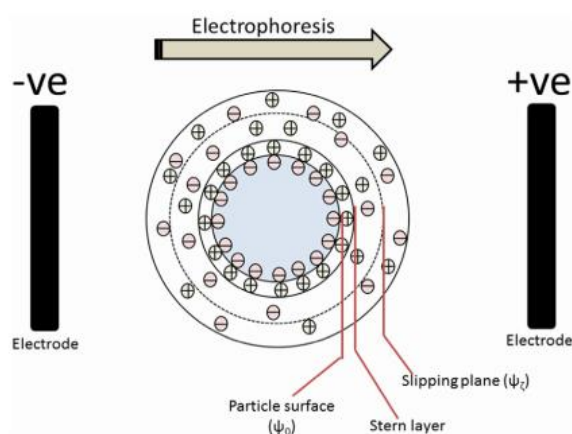
Quando um campo elétrico é aplicado à dispersão, as partículas carregadas se movem para o eletrodo oposto (eletroforese). Dentro da camada difusa há um plano hipotético que atua como a interface entre as partículas em movimento e a camada de dispersante ao seu redor durante a eletroforese. Este plano é o plano de cisalhamento característico e o ZP é o potencial dessa interface de partículas e fluidos (**Figura 20**) (BHATTACHARJEE, 2016).

O ZP reflete a diferença de potencial entre a EDL de partículas eletroforeticamente móveis e a camada de dispersante em torno delas no plano de

cisalhamento (BHATTACHARJEE, 2016). Se o ZP de uma partícula e a superfície apresentarem sinais opostos, a partícula será atraída para a superfície. Se ao contrário, apresentarem mesmo sinal, a partícula será repelida da superfície (NISHI e DOERING, 2000).

As investigações sobre o ZP são muito úteis, pois podem fornecer informações sobre a magnitude da carga superficial de uma partícula e, portanto, sobre a estabilidade de uma partícula em um meio contínuo. Um sistema de partículas com ZP fora do limite de +30 e -30 mV é considerado estável, pois as partículas se repelem e não ocorrem aglomerações. Pelo contrário, se o ZP varia entre esses dois valores, o sistema é considerado instável, visto que a repulsão eletrostática entre as partículas é insuficiente para evitar aglomerações (BRUNCHI *et al.*, 2016).

Figura 20- Dupla camada elétrica em uma partícula carregada negativamente.

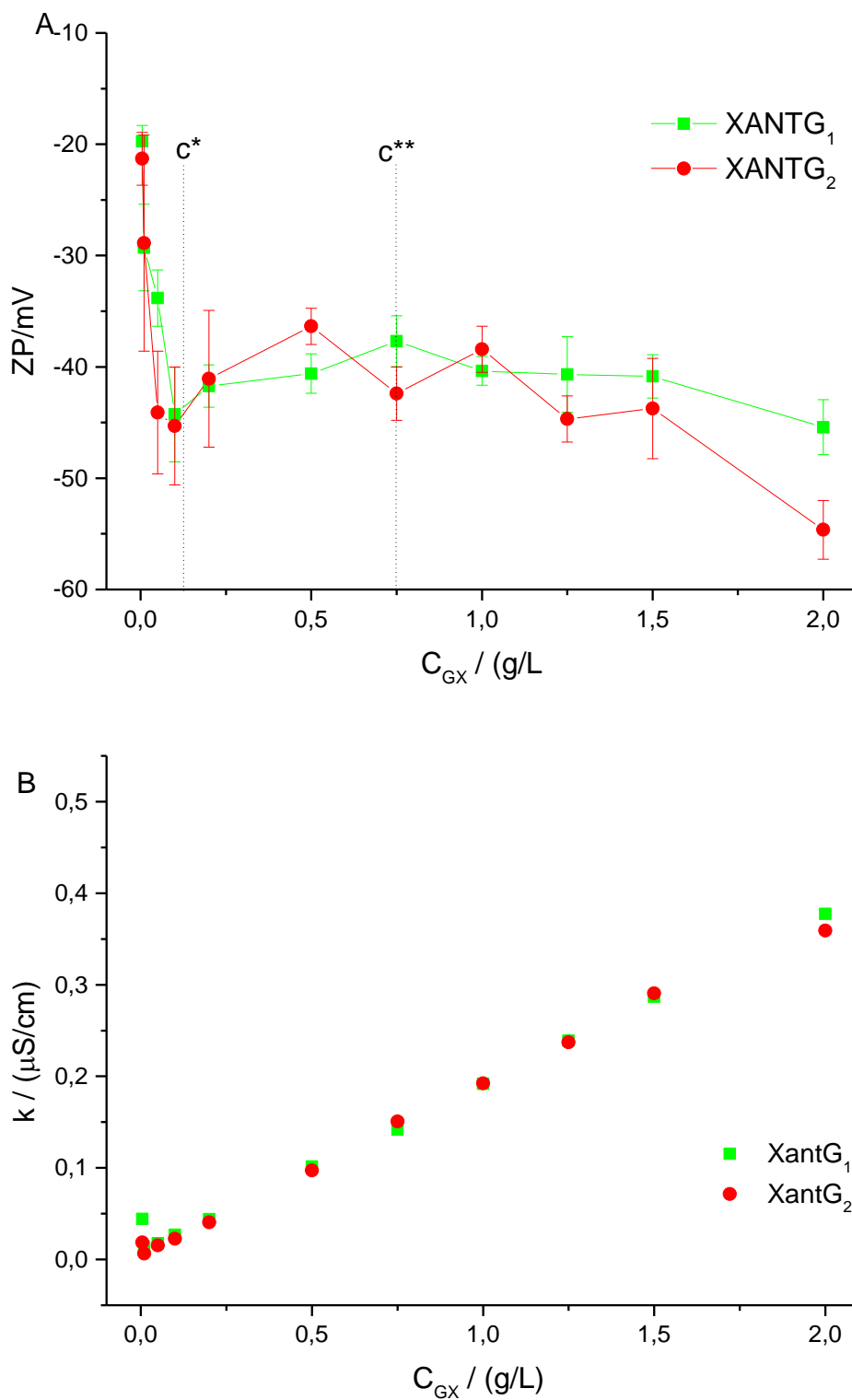


Fonte: (BHATTACHARJEE, 2016).

A **Figura 21 (A)** mostra os valores de ZP em função da concentração de Xant. Como pode ser observado, as amostras estudadas apresentaram valores de ZP elevados, negativos e semelhantes, demonstrando semelhança quanto ao caráter iônico e alta estabilidade coloidal. A Xant é um polissacarídeo que apresenta carga negativa devido à presença de sais de ácidos acético e pirúvico em sua molécula (GARCIA-OCHOA *et al.*, 2000), daí os valores negativos de ZP.

Os resultados mostram um drástico aumento, em módulo, no valor de ZP até a concentração próxima de 0,1 g/L (c^*), acompanhando o aumento do D_h nessa mesma faixa. Após tal concentração os valores de ZP passam a aumentar muito sutilmente.

Figura 21- A) Valores de potencial zeta de xantanas XantG₁ e XantG₂ em concentrações de 0,005 a 2 g/L, medidos por PALS, com ângulo de espalhamento de 173°, a 25 °C. B) Valores de condutividade elétrica das mesmas amostras, nas mesmas condições dos experimentos.



Fonte: A autora (2018).

Esses dados mostram que a curva de ZP acompanha o comportamento da curva de D_h da **Figura 19**. Nas concentrações iniciais, até 0,1 g/L, onde os valores de ZP são próximos à -30 mV, há um aumento mais drástico no D_h das partículas, como resultado das interações entre as moléculas ou dos seus agregados, resultando na formação de um emaranhado. Portanto, com esse rápido aumento no tamanho deve ocorrer o estabelecimento de um elevado potencial eletrostático na superfície desses agregados, o qual deve ser responsável por promover uma atração espontânea de contraíons. Com a formação dos emaranhados, a mudança na concentração das cargas superficiais, e conseqüentemente a variação do potencial zeta, passa a ser baixa, mesmo quando os emaranhados entram no regime concentrado.

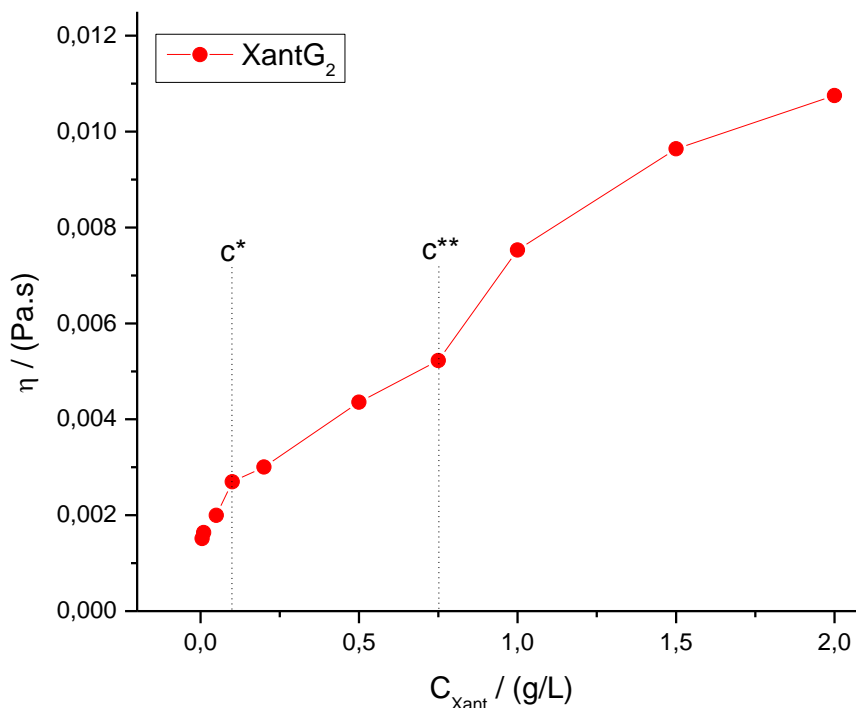
Isso indica que a concentração c^* é a que define estados diferentes de agregação. Por isso as mudanças são mais bruscas. Já a concentração c^{**} define apenas as regiões em que os emaranhados já formados começam a interagir formando uma rede tridimensional contínua de interações. Por essa razão, o D_h muda pouco e o ZP praticamente não se altera.

A **Figura 21 (B)** mostra os valores de condutividade elétrica para as mesmas soluções do experimento de DLS. A condutividade elétrica de uma solução depende tanto no número de íons por unidade de volume quanto da sua mobilidade em solução (MACFARLANE e FUOSS, 1957). Portanto, para uma determinada amostra de Xant em água, a condutividade é dada pelos resíduos dos ácidos glucurônico e pirúvico ($-\text{COO}^-$) e cátions, como Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} (BRUNCHI *et al.*, 2016). Assim, observa-se um aumento na condutividade elétrica, em função da concentração, como resultado dos íons liberados para o meio. Como mostra a figura, os valores de condutividade aumentaram concomitantemente ao aumento da concentração, indicando forte caráter iônico das composições, mostrando que a Xant se comporta como um poli-íon.

A **Figura 22** apresenta os valores de viscosidade em função da concentração de Xant, com amostras nas mesmas concentrações dos experimentos acima. Como pode ser observado, os valores de viscosidade variam concomitantemente aos de diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta (Figuras 19 e 21), concordando com a determinação das concentrações críticas de c^* ($\approx 0,1$ g/L), a qual limita o regime diluído, e de c^{**} ($\approx 0,75$ g/L), que limita o regime semidiluído e corresponde à transição para o regime concentrado (MILAS *et al.*, 1990). Além disso, mostra que a viscosidade das soluções é diretamente proporcional ao tamanho de partículas, bem como do acúmulo de

cargas superficiais consequente desta auto-organização. Este comportamento é atribuído às interações intermoleculares ou entrelaçamentos que aumentam efetivamente as dimensões da macromolécula e a massa molecular (GARCIA-OCHOA *et al.*, 2000).

Figura 22- Valores de viscosidade em função da concentração de xantana. Concentrações críticas: c^* (de sobreposição) e c^{**} (de agregação) detectadas por medidas de viscosidade.



Fonte: A autora (2018).

Resultados muito semelhantes foram encontrados por Milas *et al.*, (1990), os quais determinaram as duas concentrações críticas c^* e c^{**} de amostras de Xant por reologia e encontraram respectivamente 0,126 g/L e 0,78 g/L para Xant nativa, 0,1 g/L e 0,6 g/L para Xant renaturada.

7.1.5 Ensaio reológico estacionários

O termo reologia, do grego *rheo* (fluxo), foi proposto pela primeira vez em 1920, pelo Professor e Químico Eugene Bingham do Lafayette College, Easton-PA, EUA e significa o estudo da deformação e fluxo da matéria (BLAIR, 1969; BARNES *et al.*, 1989; LABA, 1993; MITSOULIS, 2013). Portanto, a Reologia é a ciência que descreve a deformação de um material sólido, líquido ou gasoso, sob a influência de estímulos

mecânicos (SCHRAMM, 2006). Este assunto é de grande importância em muitos ramos industriais, como os de borracha, plástico, alimentos, produtos têxteis e tinta, onde a adequabilidade dos produtos é avaliada, em parte, por suas propriedades mecânicas (SHAW, 1975). Nesse contexto, define-se como fluido uma substância que se deforma continuamente quando submetida a uma força (F) tangencial, que atua sobre sua área, denominada tensão de cisalhamento (τ) (MASSEY e WARD-SMITH, 1998).

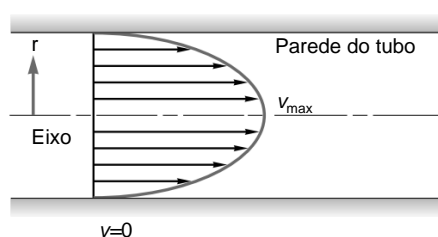
$$\tau = \frac{F(\text{Força})}{A(\text{área})} = \frac{N(\text{Newton})}{\text{m}^2} = \text{Pa}[\text{Pascal}] \quad \text{Eq. 1}$$

Segundo Schramm (1994), a deformação de fluidos ocorre através do escoamento. No escoamento em uma tubulação cilíndrica, a velocidade máxima do fluxo (v_{max}), se encontra na região central pelo fato do atrito ser nulo. No fluxo laminar, uma camada infinitamente fina de líquido desliza sobre a outra, o gradiente da velocidade (v) pelo raio (r) é definido como taxa de cisalhamento (ϕ), também chamada de taxa de deformação por cisalhamento.

Durante o movimento, há uma resistência por parte do fluido, denominada viscosidade (η), dada em Pascal por segundo (Pa.s), a qual se define como a resistência de um fluido a qualquer mudança irreversível de seus elementos de volume (**Figura 23**).

$$\phi = \frac{dv}{dr} \quad \text{Eq. 2}$$

Figura 23- Escoamento viscoso em tubulação.



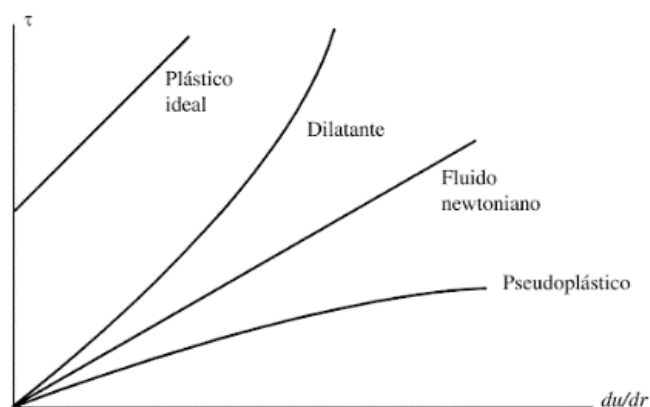
Fonte: (WHITE *et al.*, 2004) adaptado.

Isaac Newton foi o primeiro a descrever o comportamento de fluxo de um líquido ideal, através da lei básica da viscosimetria:

$$\tau = \eta \cdot \phi \quad \text{Eq. 3}$$

A relação entre a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento define o comportamento de fluxo de um líquido. Fluidos onde a viscosidade (η) não é afetada por mudanças na taxa de cisalhamento são chamados de líquidos Newtonianos (**Figura 24**). Na representação gráfica dos fluidos Newtonianos, a curva de fluxo é uma reta, ou seja, a razão de todos os pares de valores de τ e $\dot{\gamma}$ pertencentes a essa reta é constante.

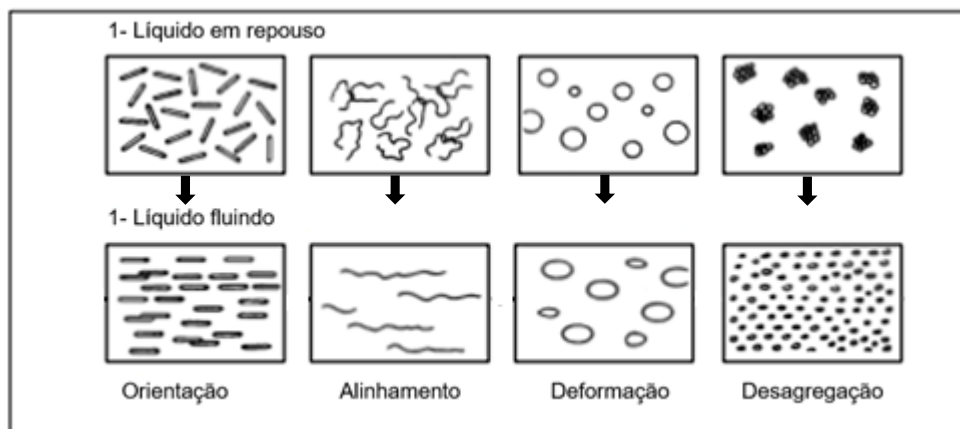
Figura 24- Perfis de curva de fluxo de fluidos Newtonianos e não-Newtonianos.



Fonte: (POTTER E WIGGERT, 1998).

Todos os outros fluidos nos quais a viscosidade varia com a taxa de cisalhamento, são chamados de não-Newtonianos. Estes excedem muito aos primeiros. Todos os fluidos que sofrem diminuição de viscosidade, quando a taxa de cisalhamento aumenta, são chamados de pseudoplásticos. Com o aumento da taxa de cisalhamento, partículas rígidas se orientam na direção do fluxo. Os entrelaçamentos entre as cadeias poliméricas podem ser desfeitos, as partículas em suspensão esticam-se e alinham-se paralelamente em direção ao fluxo. Partículas esféricas podem deformar-se para uma forma mais alongada, os agregados podem ser quebrados fazendo com que a solução flua mais facilmente (**Figura 25**) (SCHRAMM, 1994).

Figura 25- Representação esquemática de uma dispersão em repouso e fluído através de um tubo.



Fonte: (SCHRAMM, 1994), adaptada.

Já os fluidos que aumentam a viscosidade quando a taxa de cisalhamento aumenta, muito mais raros de se encontrar, são denominados fluidos dilatantes (SCHRAMM, 1994).

A equação de Ostwald-De-Waele, também chamada lei da potência, modela o comportamento desses fluidos,

$$\tau = K_c \cdot \dot{\gamma}^n \quad \text{Eq. 4}$$

onde os termos n e K_c são denominados índice de comportamento do escoamento (adimensional) e índice de consistência ($\text{Pa}\cdot\text{s}^n$). Para os fluidos Newtonianos n é unitário e K mostra-se igual à viscosidade. Quando n é menor que a unidade, a viscosidade aparente (η_{ap}) decresce com o aumento da taxa de cisalhamento, caracterizando fluidos pseudoplásticos; quando n é maior que a unidade o fluido é dito dilatante (YOUNG *et al.*, 2004).

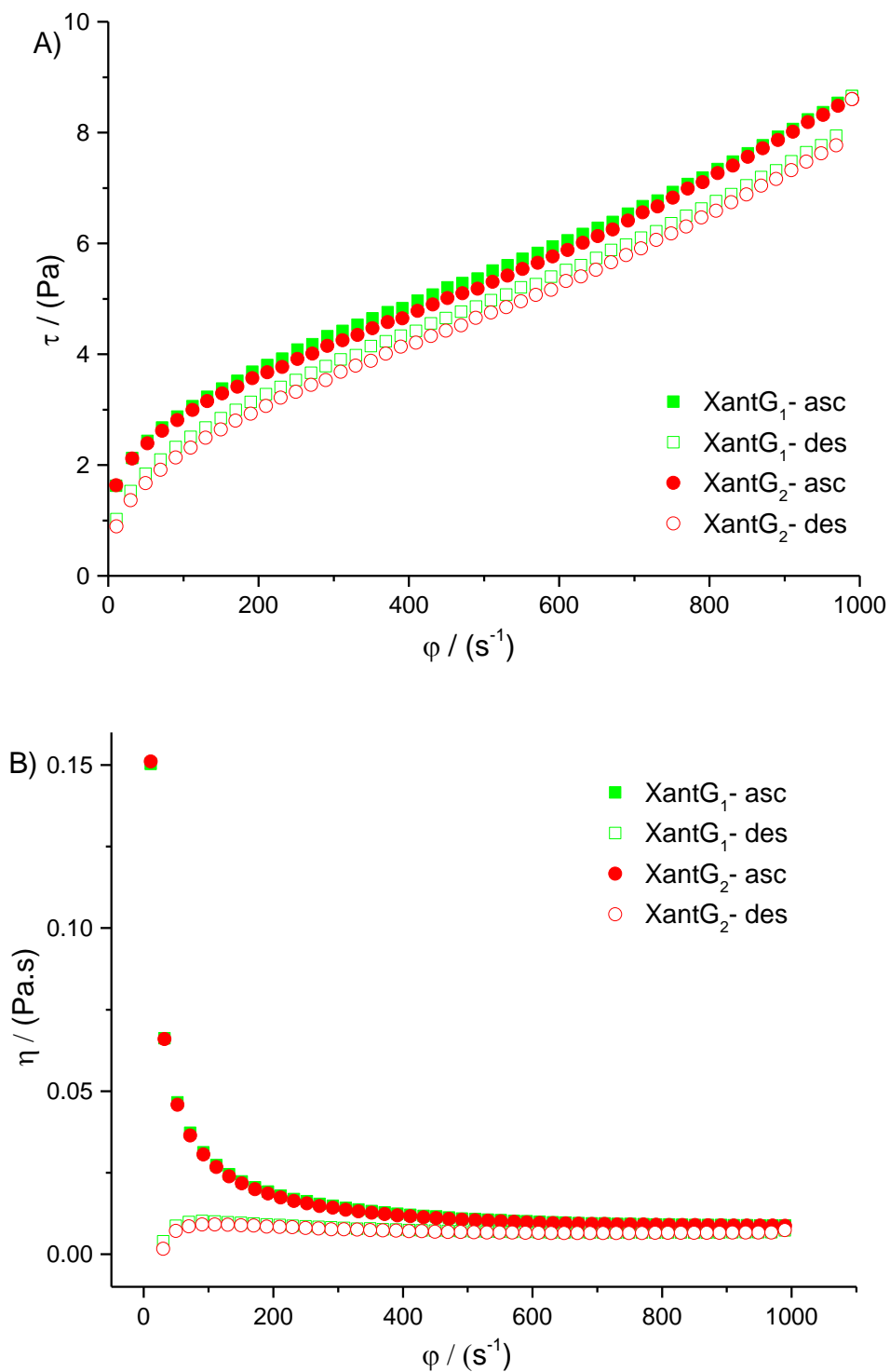
Outro tipo de comportamento é observado no fluido plástico de Bingham, também chamado plástico ideal, o qual apresenta um comportamento de sólido até um valor limite de tensão de cisalhamento, denominado tensão de escoamento - τ_0 . Uma vez excedida a tensão de escoamento, o material passa a se comportar como um fluido (YOUNG *et al.*, 2004). A expressão que modela o comportamento do fluido Binghamiano é dada abaixo:

$$\tau = \tau_0 + K_c \cdot \dot{\gamma}^n \quad \text{Eq. 5}$$

No presente trabalho, foram realizadas análises reológicas estacionárias, cobrindo a taxa de cisalhamento entre 10 a 1000 s^{-1} , a 25 °C para as duas amostras na condição de agregados (2,0 g/L), conforme **Figura 26 (A e B)**, com o objetivo de

classificá-las quanto ao comportamento de fluxo e inferir sobre possíveis diferenças na estrutura molecular desses compostos.

Figura 26- **A)** Curvas de fluxo para xantana XantG₁ e XantG₂ a 2,0 g/L, a 25 °C. **B)** Curvas de viscosidade nas mesmas condições. Faixa de taxa de cisalhamento: $10 \leq \dot{\gamma} \leq 1000 \text{ s}^{-1}$.



Fonte: A autora (2018).

Como pode ser observado na **Figura 26 (B)**, a viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento, mostrando comportamento pseudoplástico para as duas soluções (GARCIA-OCHOA *et al.*, 2000). Isso ocorre devido à ordenação ou alinhamento das partículas em direção ao fluxo, as quais adquirem gradientes de velocidade altos. Durante o fluxo, as interações são rompidas e os agregados desfeitos pelas forças aplicadas, o que resulta numa diminuição da quantidade de solvente imobilizado, conseqüentemente, diminuindo a viscosidade aparente do sistema (SHAW, 1975; SCHRAMM, 2006).

A maior queda nos valores de viscosidade ocorre entre 10 e 200 s⁻¹, sendo que após 400 s⁻¹ assumem comportamento praticamente Newtoniano, considerando que suas viscosidades são aproximadamente constantes, pois os agregados entram em regime permanente de orientação molecular e desagregação.

Os resultados foram semelhantes a outros relatados na literatura para Xants obtidas com substratos convencionais, como por exemplo os estudos realizados por Brandão *et al.* (2008), que produziram Xants utilizando *Xanthomonas campestris manihotis* 1182, e substrato alternativo (caldo de cana), e compararam o comportamento reológico destas com gomas obtidas a partir de substrato convencional (sacarose). Em solução aquosa a 0,5 %, a 25 °C, a 25 s⁻¹, encontraram viscosidades aproximadas de 0,032 Pa.s para Xant produzida com cana de açúcar e 0,07 Pa.s para a produzida com sacarose. No presente trabalho, as amostras a 0,2 %, a 25 °C, na taxa 32s⁻¹, apresentaram viscosidade igual a 0,065 Pa.s. Gomes *et al.* (2009) encontraram viscosidades igual a 0,07 Pa.s para a goma produzida por sacarose e 0,009 Pa.s. para obtida com levedura de cerveja, utilizando a mesma linhagem de *Xanthomonas* e solução a 0,5 %, nas mesmas condições de temperatura e taxa de cisalhamento.

7.1.6 Ensaio reológico oscilatório

O comportamento reológico mais extremo é mostrado de um lado por fluidos viscosos newtonianos, e por outro, por sólidos elásticos hookeanos. No entanto, muitos materiais apresentam um comportamento mecânico intermediário entre esses dois extremos, evidenciando tanto características viscosas como elásticas, sendo denominados viscoelásticos (SHAW, 1975). Nos sólidos hookeanos ocorre deformação quando uma força é aplicada e a energia é recuperada, levando o corpo

a voltar à forma original quando a força é cessada. Já nos fluidos viscosos, a energia é dissipada sob a forma de calor, devido ao atrito entre as moléculas, ocorrendo deformação permanente, mesmo após cessada a força (STEFFE, 1996). Nos fluidos viscoelásticos a energia aplicada é armazenada parcialmente, devido às propriedades elásticas, ao mesmo tempo em que parte dessa energia é dissipada, devido às propriedades viscosas (NAVARRO, 1997).

Em experimentos reológicos em modo oscilatório, a viscoelasticidade é avaliada a partir de uma solicitação mecânica, através da aplicação de uma deformação angular de amplitude ou de frequência controlada, com o monitoramento das respostas do material expressas em termos das grandezas G' e G'' , onde G' corresponde à componente sólida ou elástica do fluido, enquanto G'' é a componente líquida ou de escoamento; ambas com unidades de Pa no Sistema Internacional de Unidades. Sendo assim, se $G' > G''$, o material é mais elástico do que fluido, com características de sólido e quando $G'' > G'$ o material demonstra um comportamento mais próximo de fluido.

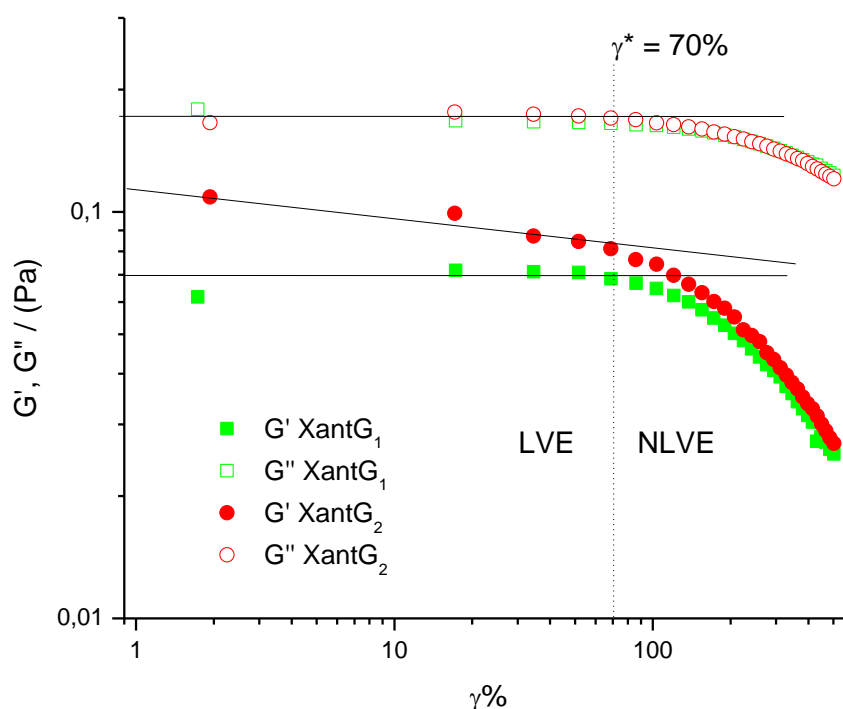
Os experimentos dinâmico oscilatórios foram realizados em duas etapas. A primeira teve como objetivo determinar a região viscoelástica linear (LVE) e qual o limite máximo de amplitude de deformação em que tal região se mantém linear, para posterior varredura de frequência. Além disto, com a varredura de amplitude de deformação, foi possível identificar se o fluido possuía uma tensão de escoamento τ_0 . Já a segunda série de experimentos, em modo oscilatório, teve como objetivo a separação das contribuições G' e G'' em função da frequência de oscilação (ω/Hz), que por sua vez é um parâmetro análogo à taxa de cisalhamento (BARNES *et al.*, 1998; CASSU e FELISBERTI, 2005). Assim, é procedimento padrão, em estudos de viscoelasticidade, proceder na seguinte ordem:

1. Manter-se a frequência angular de oscilação constante (usualmente, 10 rad/s), enquanto se varre a amplitude de deformação de forma crescente (em geral, de 0,1% a 500%);

2. Após determinar o limite máximo de deformação em que os módulos viscoelásticos (G' e G'') se mantêm dentro da LVE, fixa-se uma certa amplitude de deformação, e varre-se a frequência de oscilação de forma crescente (1 rad/s a 100 rad/s, por exemplo).

O limite da região de viscoelasticidade linear encontrado foi de LVE = 70% (Figura 27), a qual foi aplicada nos ensaios em função da frequência. Observa-se também que os polímeros não apresentam tensão de escoamento τ_0 , pois se assim fosse, tanto as curvas G' e G'' teriam apresentado uma queda muito mais abrupta.

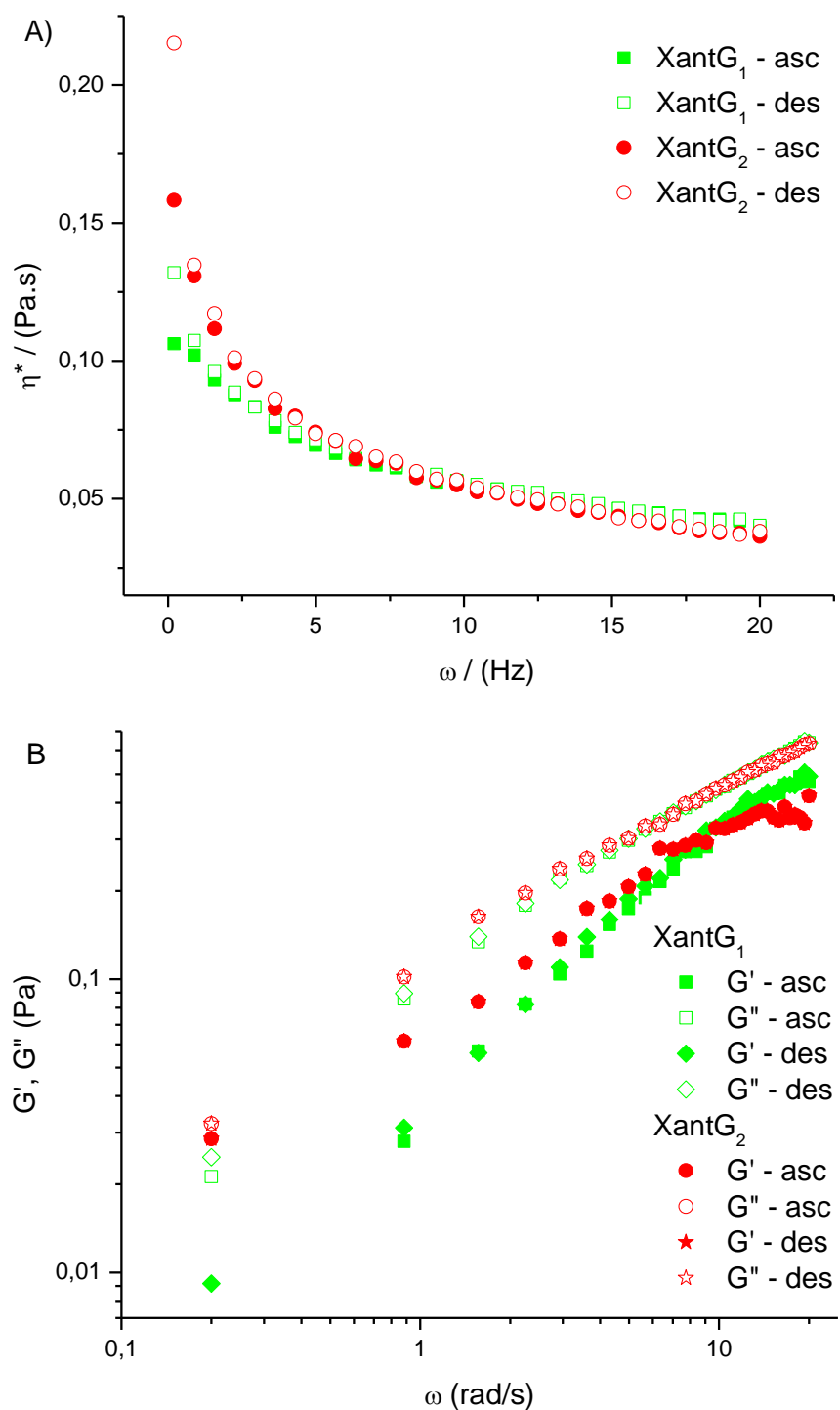
Figura 27 – Módulos de armazenamento $G'(\omega)$, e de perda $G''(\omega)$ em função da taxa de deformação por cisalhamento ($\gamma\%$) para xantana XantG₁ e XantG₂.



Fonte: A autora (2018).

As medidas reológicas dinâmicas também indicam, através da **Figura 28 (A)**, comportamento pseudoplástico para as amostras, visto que houve redução da viscosidade em função da frequência, semelhantemente aos ensaios estacionários em função da taxa de cisalhamento.

Figura 28 – A) Viscosidade em função da frequência. **B)** Módulos de armazenamento $G'(\omega)$, e de perda $G''(\omega)$ em função da frequência para xantana XantG₁ e XantG₂.

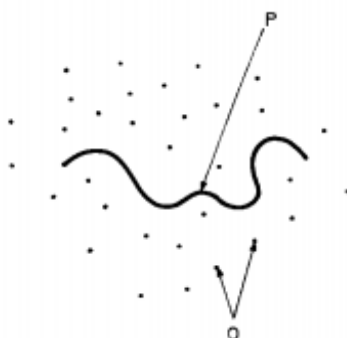


Fonte: A autora (2018).

A **Figura 28 (B)** mostra o comportamento dos módulos G' e G'' , em função da frequência angular (cisalhamento oscilatório) para as duas amostras de Xant. Em ambas o módulo elástico foi menor que o módulo viscoso, mostrando comportamento

fluido superior ao comportamento sólido (elástico) na faixa de amplitude varrida. Todavia, a existência de resposta reológica em termos de G' , apesar de menor do que G'' , é um indicativo de estruturação da solução. Os resultados sugerem comportamento estruturado do tipo Rouse-Zimm (LISY *et al.*, 2004), em que as cadeias de polímero têm tempo suficiente para libertar-se das restrições de emaranhamento e são capazes de deslizar livremente, de um lado para o outro, sendo este processo denominado "reptação", teoria proposta por De Gennes (1971). Nesta teoria imagina-se uma única cadeia polimérica, dentro de um tubo imaginário, em uma rede tridimensional, tal como um gel polimérico, sendo impedida de cruzar os obstáculos impostos pelo gel (**Figura 29**). O movimento da cadeia é semelhante ao movimento de uma cobra, justificando o uso do termo reptação, o qual é derivado do termo *reptare* do latim.

Figura 29- A cadeia P é livre para se mover entre os obstáculos fixos O, mas não pode cruzá-los.



Fonte: (DE GENNES, 1971).

Tal resposta sugere que o polímero tenha poucas ramificações, pois caso contrário, haveria maior probabilidade de entrelaçamento molecular e, conseqüentemente, haveria rapidamente uma inversão de G' com G'' com um ponto de cruzamento entre esses dois parâmetros na curva da **Figura 28 (B)**.

7.2. CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DOX/XANT

Este trabalho teve também o objetivo de sintetizar e caracterizar um SLC, empregando Xant como matriz, após conhecidas suas características físico-químicas, e Dox como fármaco de estudo. Para o desenvolvimento de um SLC é necessário caracterizá-lo para melhor compreensão das interações intermoleculares. Sendo assim, foram caracterizados primeiramente os precursores isoladamente, em seguida o complexo e a mistura mecânica (MM).

A formação dos complexos em solução/suspensão foi obtida a partir da titulação de Dox em Xant. Após sintetizado, o complexo foi liofilizado e caracterizado no estado sólido por espectroscopia na região do infravermelho e análises térmicas, e em solução/suspensão utilizando medidas de potencial zeta. Para determinar os parâmetros termodinâmicos das interações da Xant com a Dox foi utilizada a calorimetria isotérmica de titulação. Experimentos reológicos foram realizados a fim de se avaliar o efeito da formação do complexo no comportamento das soluções.

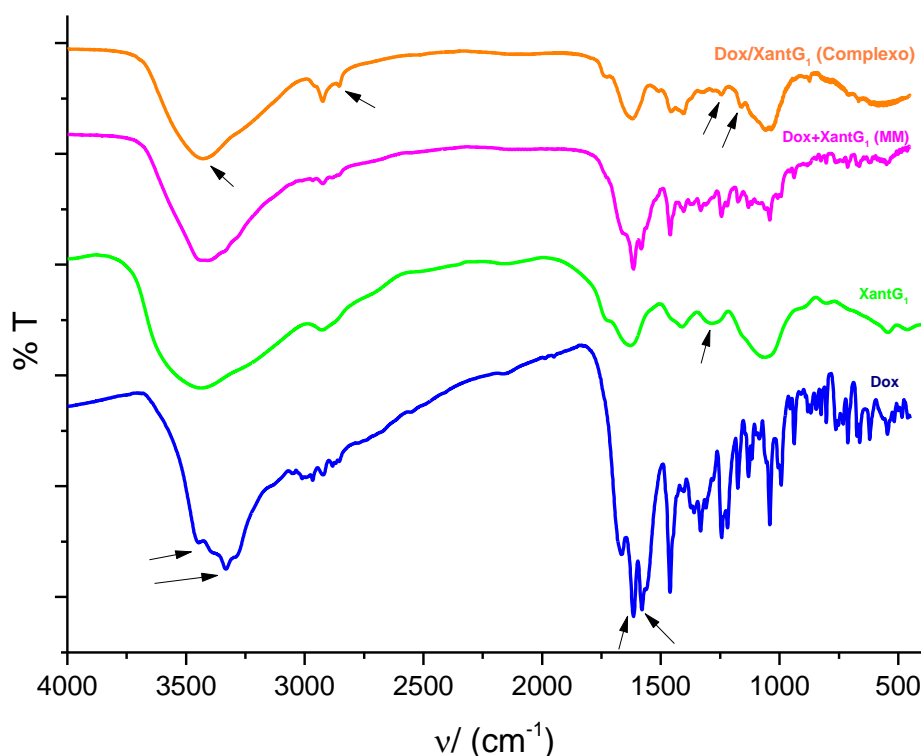
Foram ainda avaliadas as atividades antimicrobianas dos complexos Dox/XantG₁ e Dox/XantG₂.

7.2.1 Espectroscopia na região do infravermelho

Em decorrência de interações intermoleculares pode ocorrer a restrição ou intensificação do movimento vibratório de grupos funcionais, refletindo no espectro de FTIR como deslocamento, aumento ou redução de bandas (SUÁREZ *et al.*, 2014). Por essa razão, a FTIR foi utilizada para identificar as interações entre Xant e Dox, através da comparação dos espectros das moléculas precursoras puras, com a mistura mecânica (Dox+Xant) e o complexo (Dox/Xant).

Na **Figura 30** estão representados os espectros de infravermelho das amostras no estado sólido, na região de 4000 a 500 cm⁻¹.

Figura 30- Espectro na região do infravermelho da Dox, XantG₁, mistura mecânica (Dox+XantG₁) e complexo (Dox/XantG₁).



Fonte: A autora (2018).

Tabela 3 - Principais bandas observadas na região do infravermelho para xantana, mistura mecânica (Dox+Xant) e complexo (Dox/Xant).

Dox	Número de ondas cm ⁻¹			Atribuições
	XantG ₁	Dox+XantG ₁ (MM)	Dox/XantG ₁ Complexo	
3365	3435	3425	3425	v(O-H)
3452-3284	-	-	-	v(N-H)
3050; 2931; 2850	2924	2924	2924;2850	v(C-H)
1670	-	1670	-	v(C=O) da amida
1619; 1578; 1458	-	1619; 1578; 1458	1458	v(C=C) aromáticas
-	1730	-	1737	v(C=O) de ésteres e ác. carboxílicos
-	1630	-	1630	v(C=O) derivado da cetona do ác. pirúvico
-	1412	-	-	δ _{ang} (CH) de metila
1243; 1170	-	-	-	v(C-O)
-	1060	-	1060	v(C-O) ligações glicosídicas

Fonte: A autora (2018).

Na mistura mecânica não ocorreram mudanças significativas nas posições das principais bandas observadas para Xant e Dox puras (**Tabela 3**), sendo o perfil observado resultado da sobreposição de bandas características desses dois

compostos. Já no complexo Dox/Xant observam-se mudanças significativas no espectro de infravermelho, tais como afinamento, atenuação e deslocamento das bandas. Uma banda modificada foi aquela em 3431 cm^{-1} no complexo, atribuída à deformação axial dos grupos (O-H), que sofreu um afinamento em relação à Xant pura. Ocorreu o aparecimento de bandas em 2850 , 1243 e 1175 cm^{-1} , associadas ao estiramento de ligações (C-H) (MUNDARGI *et al.*, 2007) e de ligações (C-O) da Dox (MISHRA E MISHRA, 2011; SUÁREZ *et al.*, 2014), respectivamente. A banda de estiramento do grupo (N-H) proveniente da Dox não foi observada após a complexação, assim como, as absorções em 1619 e 1578 cm^{-1} presentes na Dox e 1280 cm^{-1} da Xant pura.

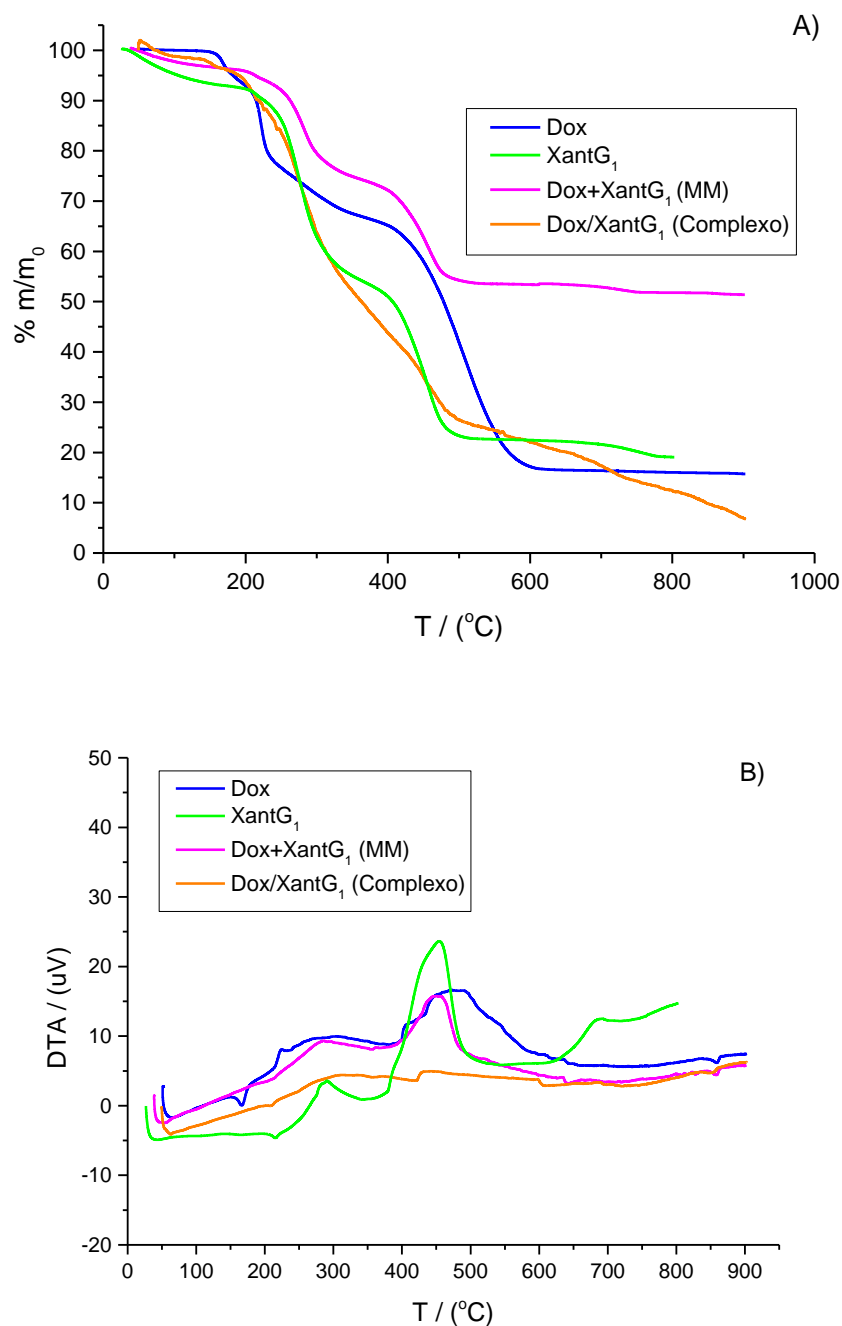
Essas mudanças nos perfis dos espectros de FTIR dos compostos indicam a formação do complexo Dox/Xant no estado sólido. Contudo, a estrutura geral da Xant após se ligar com a Dox foi preservada, mostrando a estabilidade conformacional do complexo.

7.2.2 Análises térmicas (curvas TGA e DTA)

As análises TGA e DTA são utilizadas frequentemente na caracterização de sistemas com mais de um componente, através da comparação do perfil térmico dos componentes puros, suas misturas mecânicas e dos possíveis complexos (CALDERINI e PESSINE, 2008). As interações entre os compostos podem acarretar modificações nas temperaturas de evaporação, fusão, sublimação, decomposição, oxidação ou redução (MOREIRA, 2016).

Na **Figura 31 (A e B)** estão apresentadas as curvas TGA e DTA para amostras no estado sólido: Xant, Dox, MM e complexo.

Figura 31- A) Curva termogravimétrica para xantana, mistura mecânica (Dox+Xant) e complexo (Dox/Xant) em atmosfera oxidante (ar). **B)** Curva térmica diferencial para as mesmas amostras e nas mesmas condições.



Fonte: A autora (2018).

Na curva TGA para Dox são observados múltiplos eventos com uma perda de massa total de 30% entre 190 °C e 420 °C atribuída à decomposição da molécula, com perda de H₂O e NH₃, seguido de sua carbonização com perda de massa de 46% na faixa de 420 a 600 °C. Apresentando massa residual de cerca de 16%.

Além dos picos exotérmicos associados à decomposição/carbonização da molécula de Dox na curva DTA, foi observado um pico endotérmico em 165 °C que corresponde ao evento de fusão da Dox (SUÁREZ *et al.*, 2014).

A curva TGA da mistura mecânica é semelhante à curva da Xant pura, porém, com menor perda de massa. Isso pode ser explicado pela presença de matéria inorgânica no composto, na forma de sais de Na⁺/K⁺ com Cl⁻.

O complexo Dox/Xant apresentou múltiplos eventos de perda massa desde a temperatura inicial até 900 °C. Um comportamento térmico completamente diferente do observado para a Xant e Dox puras. Ocorreu ainda uma diminuição na massa residual, o que sugere uma redução da quantidade de matéria inorgânica após a complexação. O desaparecimento dos picos na curva DTA, indicando uma diminuição da estabilidade, é atribuído à amorfização, que por sua vez se deve à complexação e à liofilização. Isto sugere que a estrutura secundária da Xant foi alterada.

Os dados obtidos nessa parte do trabalho confirmam que o complexo formado apresenta características térmicas muito diferentes dos seus precursores, o que pode ser associado ao fato de ocorrer a formação de interações eletrostáticas entre a Xant e a Dox.

7.2.3 Análises em solução/suspensão

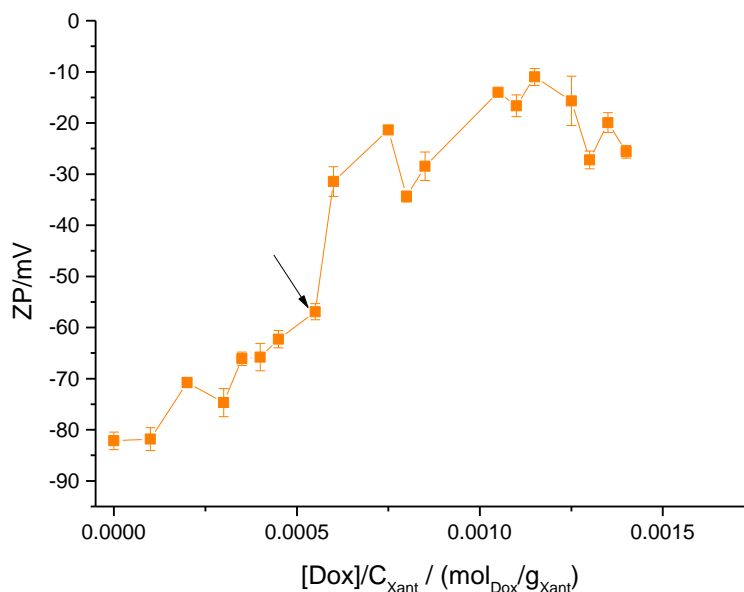
O comportamento do complexo também foi investigado em solução/suspensão por vários métodos, tais como: potencial zeta, titulação calorimétrica isotérmica e reologia estacionária. Os dados de DLS não foram utilizados por conta da polidispersidade, a qual foi muito elevada, não permitindo inferir nenhuma medida satisfatória.

7.2.4 Titulação Dox/Xant por potencial zeta

ZP foi medido com o intuito de verificar as cargas na superfície das partículas e compreender como ocorre a atração eletrostática entre Xant e Dox. As interações entre os dois compostos foram avaliadas com medidas de ZP em regime de titulação. Os valores médios de ZP durante esse experimento variaram entre -82 a -25 mV como observado na **Figura 32**, mostrando que à medida que o antimicrobiano neutraliza a macromolécula, ocorre uma gradativa redução da concentração de cargas em sua

superfície. Além disso, apesar da curva não estar bem comportada, aparentemente existe um ponto de inflexão à razão de 0.006 mol/g, atribuído a um ponto estequiométrico na curva.

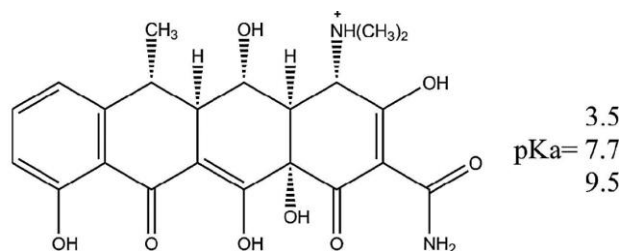
Figura 32– Titulação potencial zeta da solução doxiciclina 30 mM em 1,5 mL de solução xantana a 4 g/L.



Fonte: A autora (2018).

As tetraciclinas são caracterizadas por apresentarem quatro anéis aromáticos, com múltiplos grupos ionizáveis, incluindo amino, carboxilo, fenol, álcool e cetona. Dox possui três constantes de dissociação ácida (pK_a 's = 3,5, 7,7 e 9,5), conforme **Figura 33** (GAO *et al.*, 2012). A presença do grupo hipoclorito na forma de cloridrato, em solução, leva à formação de espécies iônicas e à protonação do grupamento amino o que, inclusive, aumenta a solubilidade em água (CAÇO *et al.*, 2008). No presente trabalho, a interação deve ocorrer entre o grupo amino, facilmente protonado, localizado no anel C4 (pK_a 9,5) da molécula de Dox, o qual geralmente lidera as interações eletrostáticas (GAO *et al.*, 2012). Nesse caso, deve ocorrer a gradativa neutralização das cargas negativas da Xant, conferidas por seus grupos de ácido carboxílico (resíduos glucurônicos e pirúvicos), com um valor de pK_a cerca de 3,1 (LOEFFLER *et al.*, 2014), pela interação com as cargas positivas da Dox do (grupo amino) (SASSMAN e LEE, 2005).

Figura 33- Grupos ionizáveis da doxiciclina.



Fonte: (GAO *et al.*, 2012).

Esses resultados podem ser corroborados por observações semelhantes feitas por Stockwell *et al.* (1986), ao estudar sistemas de gel à base de alginato de sódio e fármaco maleato de clorfeniramina, de carga oposta. Um aumento na quantidade do fármaco, aumentou a quantidade do complexo fármaco-polímero formado, onde o aumento do efeito de neutralização das cargas do polímero provocou uma redução na repulsão intramolecular.

7.2.5 Titulações calorimétricas isotérmicas

A titulação calorimétrica isotérmica (ITC) é uma técnica que consiste em medir diretamente o calor liberado ou absorvido durante um evento de interação biomolecular. O ITC monitora a variação de temperatura resultante da quebra ou formação de interações a cada titulação, medindo a diferença de potencial elétrico necessária para manter o equilíbrio térmico entre a célula contendo a amostra e a célula de referência (MALVERN INSTRUMENTS LTD). É uma técnica valiosa por ser a única que pode determinar simultaneamente todos os parâmetros de ligação em uma única experiência. Com os dados obtidos, através da isoterma de Wiseman (Equação 6) é possível determinar a constante de ligação (K), a estequiometria de reação (N) e variação da entalpia ($\Delta_{int}H^{\circ}$). Conhecendo-se os valores de N e K determina-se a energia livre de Gibbs ($\Delta_{int}G^{\circ}$), através de uma equação da termodinâmica (equação 7). Com o valor de $\Delta_{int}G^{\circ}$, juntamente com $\Delta_{int}H^{\circ}$, calcula-se o valor de entropia ($T\Delta_{int}S^{\circ}$), empregando uma outra equação da termodinâmica (equação 8) (MALVERN INSTRUMENTS LTD; TURNBULL e DARANAS, 2003; SUÁREZ *et al.*, 2014).

$$\frac{dQ}{d[\text{tit}]} = \Delta_{inj}H = \Delta H^{\circ}V^{\circ} \left[\frac{1}{2} + \frac{1-X_R - r}{2\sqrt{(1+X_R+r)^2 - 4X_R}} \right] \quad \text{Eq. 6}$$

$$\Delta_{int}G^{\circ} = -RT\ln K \quad \text{Eq. 7}$$

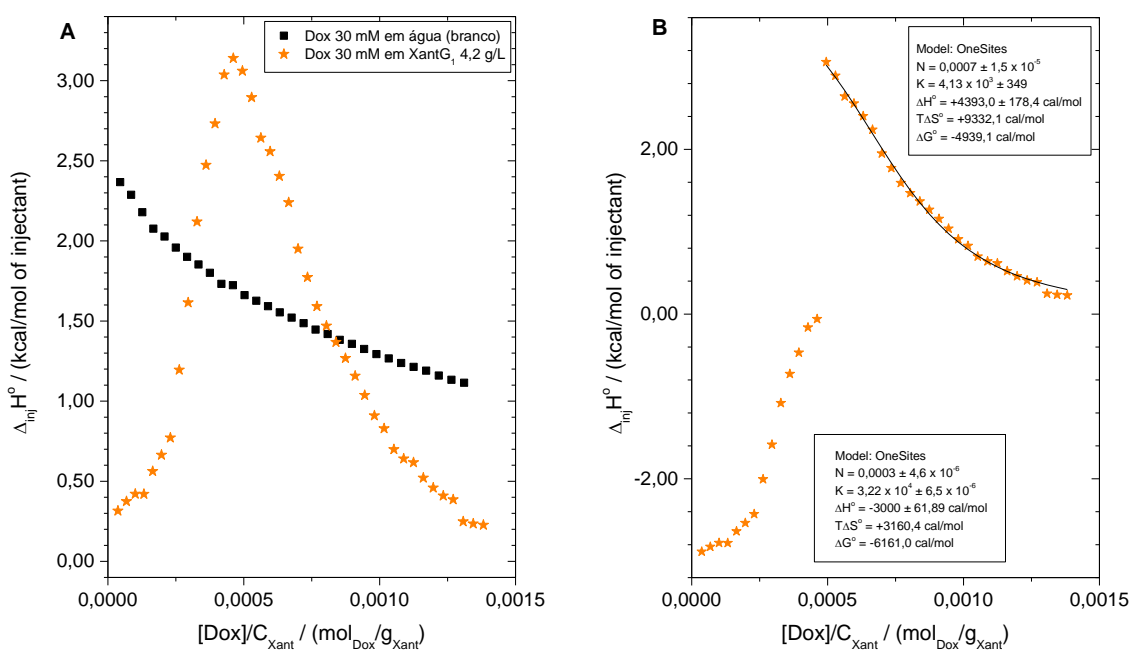
$$\Delta_{int}G^{\circ} = \Delta_{inj}H^{\circ} - T\Delta_{inj}S^{\circ} \quad \text{Eq. 8}$$

Na **Figura 34** estão representadas as curvas de titulação da Dox (30 mM) em XantG₁ a 4,2 g/L ($c > c^{**}$). A **Figura 34 (A)** mostra as titulações do composto em água (branco), procedimento que visa excluir os efeitos de interação soluto-soluto, soluto-solvente, para avaliar apenas as interações Dox/Xant. Mostra também a titulação da Dox na solução de Xant.

Como pode ser observado, o máximo da curva de titulação é próximo da razão de 0,0005, corroborando os resultados de titulação por potencial zeta.

A curva de diluição foi subtraída, obtendo-se a curva final de titulação (**Figura 34 B**) (DENADAI, 2005), que por sua vez foi decomposta para realização do ajuste não linear usando-se a Isoterma de Wiseman. A **Tabela 4** apresenta os valores termodinâmicos de interação entre os compostos.

Figura 34- Curvas de titulação calorimétrica de doxiciclina a 30 mM em solução xantana a 4,2 g/L. **A)** Inclui a curva de diluição e **B)** Curva final de titulação decomposta.



Fonte: A autora (2018).

Tabela 4 - Parâmetros termodinâmicos de interação da doxiciclina com xantana, onde $T_{int}\Delta S^{\circ}$ (Termo entrópico da interação) a 298,15 K.

Sítio de Interação	N (mol/g)	K	$\Delta_{int}G^{\circ}$ (cal/mol)	$\Delta_{int}H^{\circ}$ (cal/mol)	$T\Delta_{int}S^{\circ}$ (cal/mol)
1	$3 \times 10^{-4} \pm 4,6 \times 10^{-6}$	$3,22 \times 10^4 \pm 6,5 \times 10^{-6}$	-6161,0	$-3000 \pm 61,89$	+3160,4
2	$7 \times 10^{-4} \pm 1,5 \times 10^{-5}$	$4,13 \times 10^3 \pm 349$	-4939,1	$+4393,0 \pm 178,4$	+9332,1

Fonte: A autora (2018).

O processo de complexação apresentou duas etapas, uma etapa exotérmica ($\Delta_{int}H^{\circ} < 0$) e outra endotérmica ($\Delta_{int}H^{\circ} > 0$), ambas favorecidas por entropia ($T\Delta_{int}S^{\circ}$). A presença das duas etapas sugere que a molécula de Xant apresente, pelo menos dois sítios de interação não degenerados, portanto, gerando duas estequiometrias. Em face disso, foram mostrados os parâmetros 1 (etapa exotérmica) e 2 (etapa endotérmica) na **Tabela 4**.

As constantes de equilíbrio para ambas etapas apresentaram valores moderados, da ordem de 10^3 - 10^4 , se comparados a outros sistemas ($1000 < K_a < 20\ 000$) (TURNBULL e DARANAS, 2003).

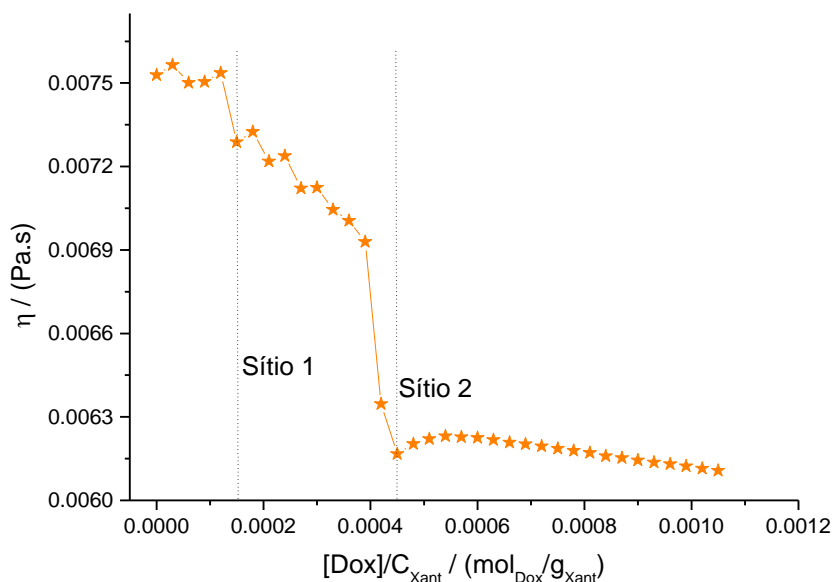
A primeira curva de titulação de Dox em Xant representada na **Figura 34 (B)**, trata-se da etapa exotérmica, referente ao sítio de interação mais favorável da Xant, o qual apresentou maior constante de afinidade. O valor negativo de entalpia provavelmente originou-se da formação de interações iônicas entre as moléculas de Dox com as moléculas de Xant, uma vez que processos exotérmicos indicam a formação de ligações estáveis. A elevação da entropia (desordem) observada no sistema explica-se pela dessolvatação da Dox e da Xant, as quais ao se ligarem, devem liberar moléculas de água que ganham graus de liberdade rotacionais e translacionais.

Já na segunda parte da curva de titulação, após a saturação dos primeiros sítios de interação, a Dox já ligada deve dificultar a entrada das moléculas subsequentes e, portanto, gerando o valor endotérmico de entalpia. A variação positiva da entropia ($T_{int}\Delta S^{\circ}$) indica interações de natureza hidrofóbica, com quebra de ligações de hidrogênio. Da mesma maneira que na etapa exotérmica, tal variação é causada pela dessolvatação das moléculas de Dox e Xant e consecutiva liberação de moléculas de água para o meio, as quais ganham graus de liberdade rotacionais e translacionais, responsáveis pelo estado final de desordem ser maior que o estado inicial, fato que garante a espontaneidade da interação.

7.2.6 Investigação das interações Dox/Xant por reologia

A formação do complexo Dox/Xant foi também investigada através da titulação de 2500 μL de solução Dox a 15 mM (41 titulações de 63 μL) em 15 mL de solução de Xant a 2 g/L ($c > c^{**}$), à 25 $^{\circ}\text{C}$ e $\varphi = 100 \text{ s}^{-1}$. Como pode ser observado na **Figura 35**, a viscosidade se mantém constante até próximo da razão 0,0002 mol/g, próximo à primeira estequiometria observada no experimento de ITC. Após este ponto, a viscosidade diminui até próximo da razão de 0,0005 mol/g, a partir de quando adquire valores praticamente constantes, corroborando com os resultados de ZP e ITC.

Figura 35- Curva de titulação viscosimétrica de doxiciclina 15 mM em xantana 2,0 g/L à 25 $^{\circ}\text{C}$ e $\varphi = 100 \text{ s}^{-1}$.



Fonte: A autora (2018).

Quando as moléculas de Xant estão livres no meio, encontram-se envoltas de moléculas de água, atraídas pelos grupos hidrofílicos, tais como $-\text{OH}$, $-\text{COOH}$ e $-\text{COO}^-$, capazes de formar ligações de hidrogênio ou interações íon-dipolo com a água e com outras moléculas, resultando em elevados valores de viscosidade (STOCKWELL *et al.*, 1986; WANG *et al.*, 2009).

De acordo com Rochefort e Middleman (1987) a molécula de Xant em água, a 25 $^{\circ}\text{C}$, apresenta cadeia parcialmente desordenada, mas altamente estendida devido às repulsões eletrostáticas dos grupos carregados das cadeias laterais. Devido à estrutura altamente estendida, as moléculas podem se alinhar e associar (devido à ligação de hidrogênio) para formar um material fracamente estruturado.

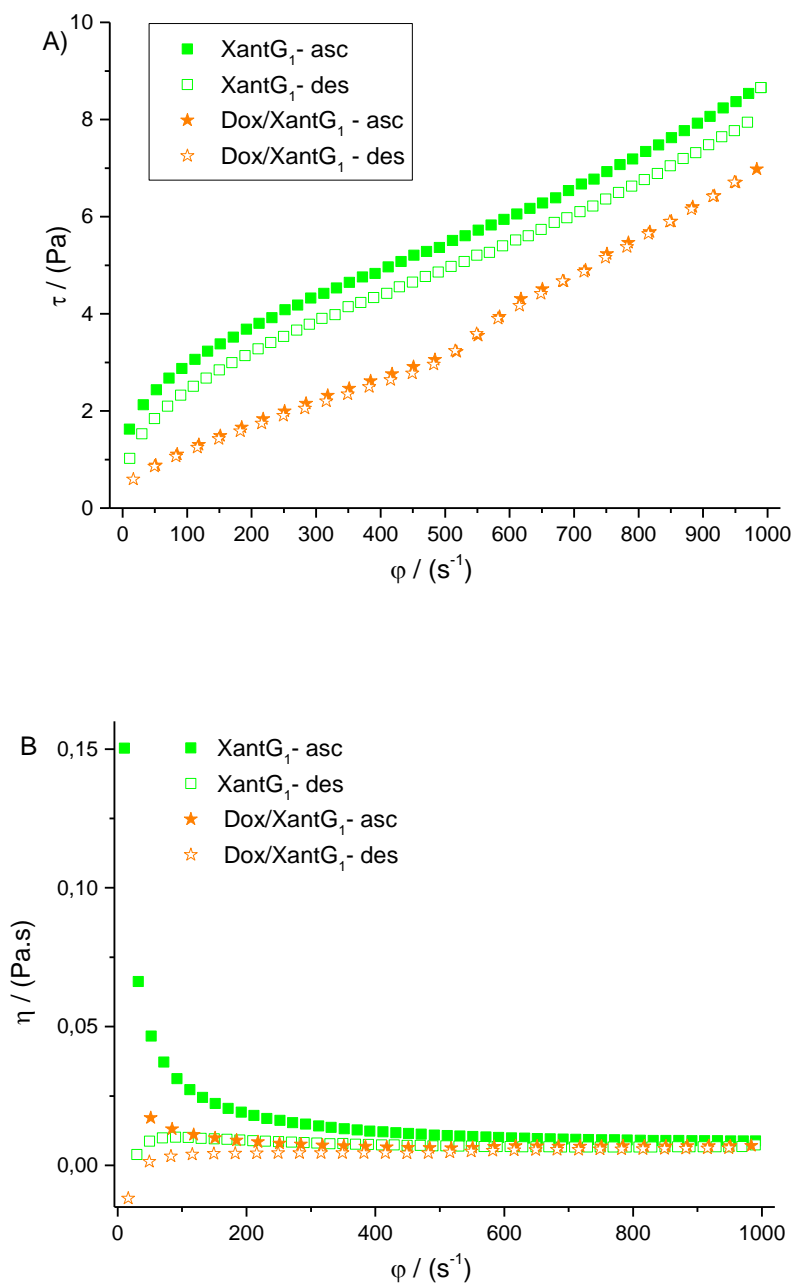
À medida que a Dox é adicionada, a interação eletrostática com a Xant é forte o suficiente para induzir a formação espontânea de um precipitado. A reação induz a uma diminuição da área superficial da macromolécula, promovendo o rompimento do emaranhado tridimensional e, conseqüentemente, diminuindo as interações intermoleculares polímero-polímero e polímero solvente, aumentando as interações intramoleculares que resultam na redução da viscosidade. Portanto, a estrutura do fluido deixa de ser a de um emaranhado contínuo para se tornar uma suspensão com partículas discretas, sem interações significativas.

Resultados semelhantes foram encontrados por Stockwell *et al.* (1986) ao estudar sistemas em gel, onde a neutralização das cargas negativas do alginato pelo fármaco catiônico maleato de clorfeniramina, provocou uma redução na repulsão intramolecular polímero-polímero, resultando em uma conformação mais compacta, afetando assim a viscosidade.

Com o objetivo de se obter o comportamento de fluxo da suspensão resultante da titulação, a amostra presente no recipiente, na proporção $[Dox]/C_{Xant} = 0,00105$ mol/g, foi submetida à cisalhamento estacionário de 1 a 1000 s^{-1} .

As **Figuras 36 (A e B)** mostram os comportamentos de fluxo da solução de Xant (2,0 g/L) e da suspensão Dox/Xant (0,0021 mol/L de Dox, 2,0 g/L de Xant e proporção $[Dox]/C_{Xant} = 0,00105$ mol/g). Como pode ser observado, a complexação promoveu uma significativa redução da viscosidade da solução, além de eliminar a histerese reológica, aumentando drasticamente o perfil newtoniano do fluido, já que a viscosidade da suspensão Dox/Xant é praticamente constante **Figura 36 (B)**.

Figura 36- Curva de **A)** fluxo e **B)** viscosidade de solução xantana e do complexo Dox/Xant, à 25 °C ($1 \leq \dot{\gamma} \leq 1000 \text{ s}^{-1}$).

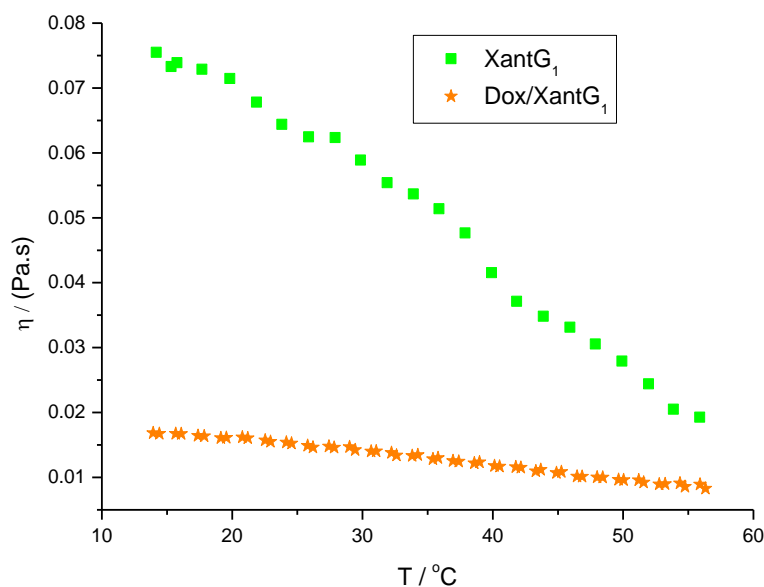


Fonte: A autora (2018).

A **Figura 37** mostra uma queda da viscosidade em função da temperatura. As moléculas livres possuem uma dependência da viscosidade com a temperatura muito maiores do que as complexadas com a Dox. Essa maior dependência é reflexo da maior concentração de interações intermoleculares Xant/solvente e Xant/Xant, o que não ocorre no caso do complexo Dox/Xant, pois como citado, acredita-se que os

emaranhados moleculares tenham sido desfeitos para formar estruturas discretas, que inclusive, sedimentam, conforme observado visualmente.

Figura 37– Curvas de viscosidade em função da temperatura, à 100 s^{-1} , para solução de Xant a $2,0 \text{ g/L}$ e suspensão $[\text{Dox}]/C_{\text{Xant}} = 0,00105 \text{ mol/g}$.



Fonte: A autora (2018).

7.2.7 Ensaio antimicrobianos

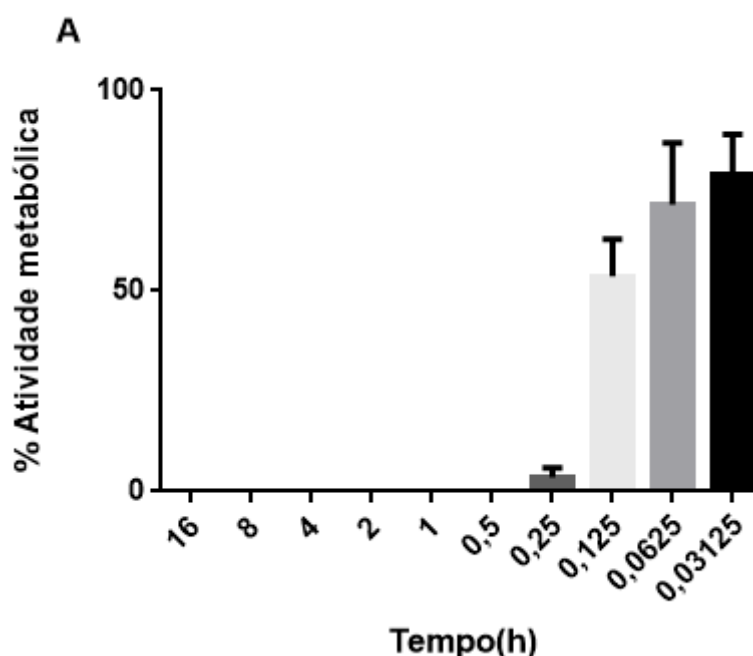
Determinação da dose letal mediana

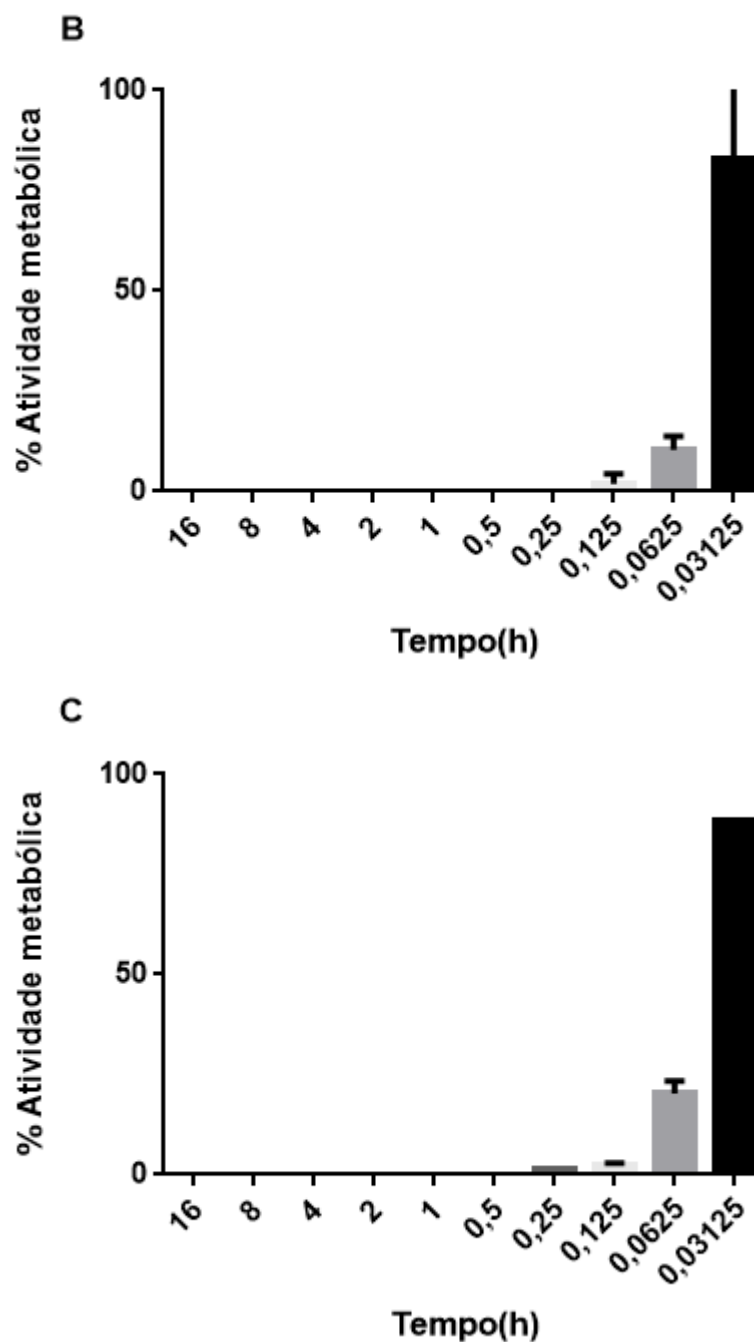
Foi avaliada a atividade antimicrobiana dos complexos Dox/Xant comparando-se com o efeito da Dox pura, frente a uma linhagem de *S. aureus*, empregando a proporção 1 mmol de Dox para 2 g de Xant, visto ser a proporção encontrada nos experimentos de ITC. Esses microrganismos foram escolhidos por serem Gram-positivos, responsáveis por 65% das doenças patogênicas humanas, uma vez que comumente são causadores de infecções na pele, doenças respiratórias e osteomielite crônica (WANG *et al.*, 2016).

Sendo assim, foi realizado um ensaio para a determinação da dose letal mediana (DL_{50}) por teste de microdiluição em caldo em placa de 96 poços. Para a leitura da placa foi empregado um leitor de microplacas Thermo Electron oy (modelo Multiskan FC) a 570 nm, após adição do corante 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difenil brometo de

tetrazolium (MTT). A vantagem de se trabalhar com MTT como indicador é que a leitura torna-se mais confiável, pois o MTT somente é clivado por enzimas desidrogenases, situadas no interior da célula, dentro das mitocôndrias ou em outros locais com atividade desidrogenase, convertendo-se em formazan de coloração arroxeada, cuja leitura pode ser realizada por espectrofotometria. Como somente mitocôndrias intactas promovem a conversão do MTT, este corante é um indicador de atividade metabólica (HANSEN *et al.*, 1989). Os resultados dos experimentos são mostrados na **Figura 38** e na **Tabela 5**..

Figura 38 – Determinação da dose letal mediana para *S. aureus* 32388602. **A)** Dox pura, **B)** Complexo Dox/XantG₁ e **C)** Complexo Dox/XantG₂.





Fonte: A autora (2018).

Tabela 5 - Determinação da dose letal mediana de Dox pura e dos complexos Dox/Xant para *S. aureus* 32388602.

Linhagem	DL_{50} Dox	DL_{50} Dox/XantG ₁	DL_{50} Dox/XantG ₂
32388602	0,25 µg/mL	0,0625 µg/mL	0,0625 µg/mL

Fonte: A autora (2018).

A leitura mostrou uma considerável redução na DL_{50} comparando-se Dox/Xant com a Dox pura. Os complexos Dox/Xant apresentaram uma eficiência antimicrobiana

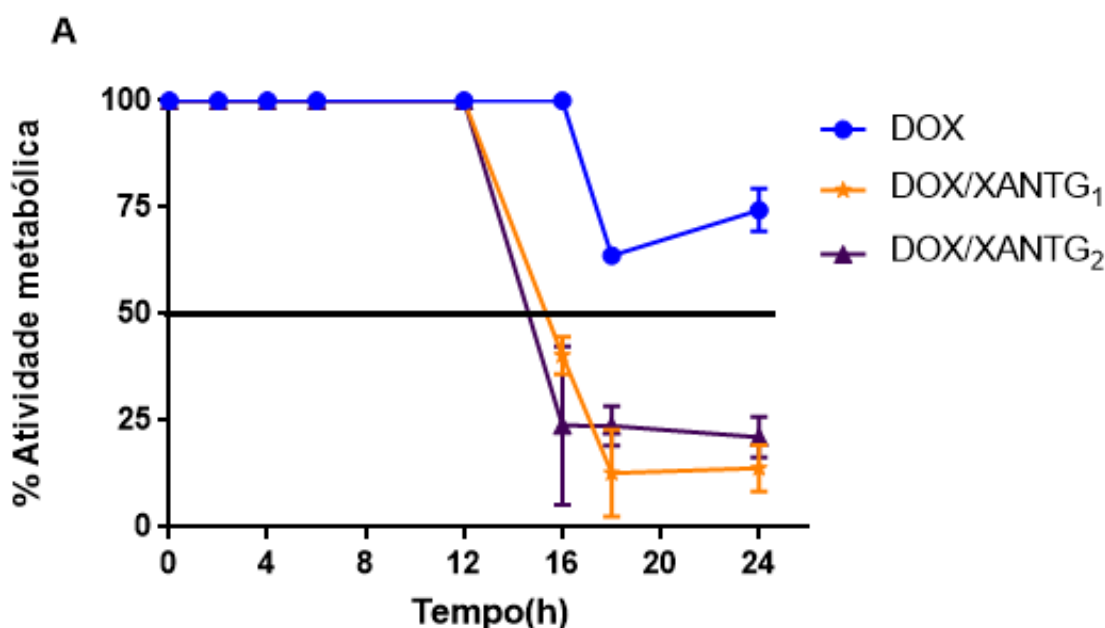
4 vezes maior do que a Dox pura frente à *S. aureus* 323886023, visto que os valores de DL_{50} encontrados foram 0,0625 $\mu\text{g/mL}$ e 0,25 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

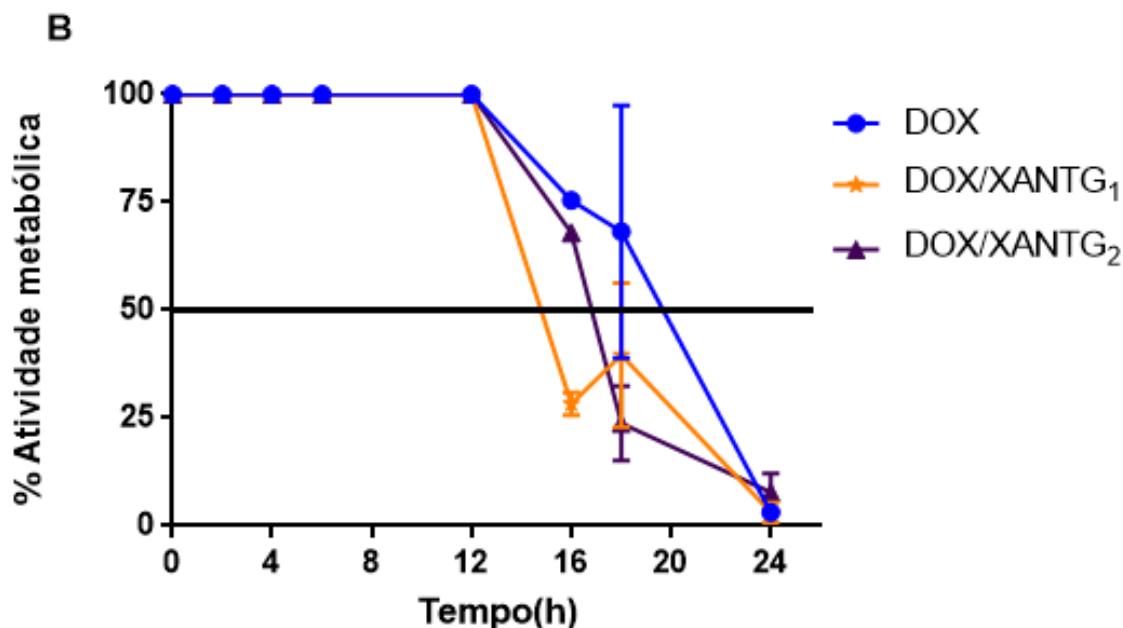
Balzli *et al.* (2010) estudaram uma formulação de trobamicina e dexametasona, utilizando uma suspensão de xantana no tratamento de queratite ocular, causada por *S. aureus*. As formulações demonstraram tempo de dissolução mais longo *in vitro*, comparado à formulação comercial e aumento da biodisponibilidade em olhos de coelho. De acordo com os autores, a Xant possui propriedades de aderência que as tornam úteis na liberação de medicamentos. O SLC aumentou a capacidade bactericida, bem como mantendo a eficácia do esteroide com metade da dosagem do fármaco.

Curva de morte

A ação da Dox pura e dos complexos Dox/Xant, frente à *S. aureus* 323886023 também foi avaliada por experimentos de curva de morte. Foi preparada um placa de 96 poços utilizando solução Dox a 0,0625 $\mu\text{g/mL}$ e outra placa a 0,25 $\mu\text{g/mL}$, concentrações equivalentes aos valores de DL_{50} encontrados para Dox/Xant e Dox pura, respectivamente. Os resultados estão descritos na **Figura 39**.

Figura 39- Curva de morte de *S. aureus* 323886023 tratadas com Dox e complexos Dox/Xant. Concentração de Dox **A)** 0,0625 $\mu\text{g/mL}$ e **B)** 0,25 $\mu\text{g/mL}$.





Resultados expressos em % de atividade metabólica comparada ao controle positivo (absorbância de cada orifício subtraída da média da absorbância do controle negativo - meio MH). Resultados obtidos em duplicata.

Fonte: A autora (2018).

Conforme observado na **Figura 39**, existe uma clara diferença entre a ação dos complexos Dox/Xant comparados à Dox pura. Percebe-se na **Figura 39 (A)** uma inibição de mais de 50% da atividade metabólica no intervalo de 16h, tanto para Dox/XantG₁ quanto para Dox/XantG₂. Ao passo que Dox pura nem sequer alcançou tal inibição, o que pode ser facilmente compreendido, visto ser a concentração utilizada (0,0625 µg/mL) inferior à DL_{50} apresentada pela Dox.

De acordo com a **Figura 39 (B)** uma inibição da atividade metabólica superior à 50%, para Dox/XantG₁ e Dox/XantG₂ foi constatada nas leituras realizadas nos intervalos de 16h e 18h, respectivamente. Resultado bastante diferente da Dox pura, a qual demonstrou tal inibição somente na leitura realizada 24h após a adição do inóculo.

De acordo com Martins *et al.* (2011), existem geralmente três propostas que justificam a melhoria do efeito antibacteriano de princípios ativos complexados, as quais são: alteração no mecanismo de interação, que pode resultar em maior taxa de penetração; proteção química do ativo de oscilações na composição do meio, que podem resultar em alterações no equilíbrio osmótico das células e pH e liberação sustentada do ativo por tempo prolongado.

Encontra-se na literatura muitos estudos que corroboram a eficácia da utilização de biopolímeros, sobretudo a Xant como veículo de liberação de fármacos, especialmente por apresentarem capacidade de formar pares iônicos com fármacos catiônicos. Por exemplo, Yellanki *et al.* (2010) encontraram que quitosana e xantana são matrizes de encapsulamento eficientes para a liberação do antibacteriano/antiprotozoário metronidazol (catiônico), no tratamento contra vaginite causada por *S. aureus*. Concluíram que formulações com os mesmos demonstraram controle na liberação do fármaco devido à alteração do mecanismo de contato, que nesses casos passou a ser por mucoadesão. Bertram e Bodmeier (2006) prepararam inserções nasais em soluções aquosas contendo veículos poliméricos e oximetazolina (catiônico). Um aumento na concentração do fármaco, levou a uma redução na taxa de liberação, justificando-se pelas interações eletrostáticas entre as cargas opostas do fármaco e do polímero, levando à formação de complexos, resultando em uma liberação mais lenta do fármaco.

Wang *et al.* (2016) estudaram a formulação de um sistema em gel, para liberação controlada de sulfato de gentamicina (catiônico), utilizando goma xantana modificada com anidrido succinato, para aumentar os grupos de ácidos carboxílicos e melhorar o desempenho do gel. A hidratação e as interações inter e intramoleculares retardaram a liberação do fármaco em estudos de liberação *in vitro*.

A goma xantana oferece uma potencial utilidade como transportadora de medicamentos, sobretudo devido à sua inércia e biocompatibilidade (KIM *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2016). Pode alcançar uma maior disponibilidade do fármaco e simultaneamente uma liberação mais prolongada, enfim, contribuindo para melhorar sua eficácia, através da utilização em SLCs. No presente trabalho, não podemos afirmar que o controle na liberação se deu por retenção do tempo de absorção. No entanto, a melhor ação de Dox/Xant comparando-se à Dox pura, pode ser devido à proteção química da doxiciclina na presença da xantana, já que a doxiciclina é fotossensível; bem como à alteração do mecanismo de interação com os microrganismos. Quanto a esta última hipótese, acredita-se que pelo fato das xantanas serem produzidas por microrganismos, haja uma tendência de afinidade por membranas celulares, o que aumentaria a concentração do fármaco nas proximidades destas, aumentando assim sua disponibilidade e causando a morte mais rápida dos mesmos. Porém, mais estudos precisariam ser realizados para se avaliar a afinidade de microrganismos patogênicos por xantanas.

8 CONCLUSÃO

No presente trabalho, foram estudadas as propriedades físico-químicas e estruturais do biopolímero xantana, produzida a partir de glicose. Com base nos resultados, foi possível mostrar que as xantanas enquanto polieletrólitos, são capazes de se auto-organizar formando estruturas coloidais em solução aquosa, de elevada viscosidade e pseudoplasticidade. Os estudos de agregação apontaram para duas concentrações críticas, uma de sobreposição e a outra de agregação, indicando a formação de emaranhados moleculares, os quais são responsáveis pela elevação da viscosidade das soluções, decorrente do aumento do diâmetro hidrodinâmico.

O composto demonstrou ser estável, visto que a curva de condutividade elétrica em função do tempo, não demonstrou nenhuma variação significativa durante 23 dias, mostrando que não houve fragmentação espontânea do polímero.

O comportamento reológico estacionário mostrou-se típico de fluido pseudoplástico, visto que houve redução da viscosidade, com o aumento da taxa de cisalhamento, como resultado da quebra dos emaranhados moleculares. Contudo, medidas reológicas dinâmicas apontaram módulo elástico menor que o viscoso em concentração de 2 g/L, mostrando comportamento estruturado do tipo Rouse-Zimm, através do processo de "reptação".

No que diz respeito ao complexo Dox/Xant, os resultados obtidos mostraram que o composto é estável tanto em solução quanto no estado sólido, sendo sua estabilização decorrente da interação entre a Xant e a Dox.

As interações eletrostáticas provocaram diminuição (em módulo) do ZP das moléculas de Xant, devido à neutralização de seus grupos negativos (ácido carboxílico), pela ligação com os grupos catiônicos da Dox.

A calorimetria isotérmica de titulação mostrou que as xantanas possuem dois sítios de interação distintos. As estequiometrias Dox/Xant determinadas foram 3×10^{-4} e 7×10^{-4} mol/g. Além disso, as interações eletrostáticas entre Dox e Xant acarretaram diminuição das interações polímero-polímero e polímero-solvente, favorecendo o rompimento dos emaranhados tridimensionais e conseqüente diminuição da viscosidade.

Finalmente, os ensaios biológicos de Dox/Xant frente à *S. aureus* demonstraram uma melhor ação antimicrobiana, através da redução da DL_{50} e tempo de inibição, comparando-se com a Dox pura. Justificando-se possivelmente por uma liberação

inicial mais rápida, que provocou a morte mais rápida dos microrganismos, numa menor concentração. Portanto, os complexos mostraram-se promissores para serem utilizados em sistemas de liberação controlada de doxiciclina.

9 REFERÊNCIAS

- ALLEONI, L.; CAMARGO, O. Modelos de dupla camada difusa de Gouy-Chapman e Stern aplicados a Latossolos ácidos paulistas. **Scientia Agricola**, v. 51, p. 315-320, 1994.
- AZEVEDO, V. et al. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2, n. 3, p. 27-34, 2007.
- BAE, S.; SUGANO, Y.; SHODA, M. Improvement of bacterial cellulose production by addition of agar in a jar fermentor. **J Biosci Bioeng**, v. 97, n. 1, p. 33-38, 2004. ISSN 1389-1723.
- BAJPAI, S. et al. Controlled release of Doxycycline from gum acacia/poly (sodium acrylate) microparticles for oral drug delivery. **International journal of biological macromolecules**, v. 104, p. 1064-1071, 2017. ISSN 0141-8130.
- BALZLI, C. L. et al. The effectiveness of an improved combination therapy for experimental Staphylococcus aureus keratitis. **Advances in therapy**, v. 27, n. 12, p. 933-940, 2010. ISSN 0741-238X.
- BARNES, H. A.; HUTTON, J. F.; WALTERS, K. **An introduction to rheology**. Elsevier, 1989. ISBN 0080933696.
- BARNES, H. A.; HUTTON, J. F.; WALTERS, K. **An Introduction to Rheology, 5th ed.** Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V. , 1998. ISBN ISBN 0-444-87140-3.
- BELGACEM, M. N.; GANDINI, A. **Monomers, polymers and composites from renewable resources**. Elsevier, 2011. ISBN 0080560512.
- BALMAYOR, E. R.; AZEVEDO, H. S.; REIS, R. L. Controlled delivery systems: from pharmaceuticals to cells and genes. **Pharmaceutical research**, v. 28, n. 6, p. 1241-1258, 2011. ISSN 0724-8741.
- BELMESSIERI, D. et al. Dodecyl sorbitan ethers as antimicrobials against Gram-positive bacteria. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 27, n. 20, p. 4660-4663, 2017. ISSN 0960-894X.
- BERTRAM, U.; BODMEIER, R. In situ gelling, bioadhesive nasal inserts for extended drug delivery: in vitro characterization of a new nasal dosage form. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 27, n. 1, p. 62-71, 2006. ISSN 0928-0987.
- BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential—What they are and what they are not? **Journal of controlled release**, v. 235, p. 337-351, 2016. ISSN 0168-3659.
- BLAIR, G. S. Rheology: A brief historical survey. **Journal of texture studies**, v. 1, n. 1, p. 14-18, 1969. ISSN 1745-4603.

BOAMAH, V. E. et al. Practices and Factors Influencing the Use of Antibiotics in Selected Poultry Farms in Ghana. **Journal of Antimicrobial Agents**, v. 2, n. 2, p. 2-8, 2016. ISSN 2472-1212.

BORSALI, R.; NGUYEN, H.; PECORA, R. Small-angle neutron scattering and dynamic light scattering from a polyelectrolyte solution: DNA. **Macromolecules**, v. 31, n. 5, p. 1548-1555, 1998. ISSN 0024-9297.

BRANDÃO, L. V. et al. Produção de goma xantana obtida a partir do caldo de cana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, 2008. ISSN 0101-2061.

BRITO, G. et al. Biopolímeros, polímeros biodegradáveis e polímeros verdes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 6, n. 2, p. 127-139, 2011.

BRUNCHI, C.-E. et al. Some properties of xanthan gum in aqueous solutions: effect of temperature and pH. **Journal of Polymer Research**, v. 23, n. 7, p. 123, 2016. ISSN 1022-9760.

CAÇO, A. I. et al. Solubility of antibiotics in different solvents. Part II. Non-hydrochloride forms of tetracycline and ciprofloxacin. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 47, n. 21, p. 8083-8089, 2008. ISSN 0888-5885.

CALDERINI, A.; PESSINE, F. Synthesis and characterization of inclusion complex of the vasodilator drug minoxidil with β -cyclodextrin. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 60, n. 3-4, p. 369-377, 2008. ISSN 0923-0750.

CARLET, J. et al. Ready for a world without antibiotics? The penières antibiotic resistance call to action. **Antimicrobial resistance and infection control**, v. 1, n. 1, p. 11, 2012. ISSN 2047-2994.

CASSU, S. N.; FELISBERTI, M. I. Comportamento dinâmico-mecânico e relaxações em polímeros e blendas poliméricas. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 255-263, 2005.

CHEN, X. et al. Recent research developments in polymer heat exchangers—A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 60, p. 1367-1386, 2016. ISSN 1364-0321.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard. Tenth Edition. Wayne, PA CLSI 2015. M07-A10.

COSTA, M. P. et al. **Uma abordagem atual sobre o impacto dos sistemas de liberação de drogas nos avanços em nanomedicina.** Boletim Informativo Geum. 5: 124 p. 2014.

DE ANDRADE, D. P. et al. A doxiciclina como adjuvante no tratamento da periodontite. **IJD. International Journal of Dentistry**, v. 8, n. 4, 2010. ISSN 1806-146X.

DE GENNES, P.-G. Reptation of a polymer chain in the presence of fixed obstacles. **The Journal of chemical physics**, v. 55, n. 2, p. 572-579, 1971. ISSN 0021-9606.

DE MELLO LUVIELMO, M.; SCAMPARINI, A. R. P. Xanthan gum: Production, recovery, properties and application. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v. 5, n. 1, p. 50-67, 2009. ISSN 1808-7310.

DE OLIVEIRA, A. G. et al. Estudos sobre liberação controlada e vetorização de drogas através lipossomas. **Rev Bras Med.**, p. 238-244, 2005.

DE SOUZA, D. M.; GARCIA-CRUZ, C. H. Produção fermentativa de polissacarídeos extracelulares por bactérias. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v. 25, n. 4, p. 331-340, 2004.

DENADAI, Â. M. L. **Caracterização estrutural e termodinâmica de complexos supramoleculares formados por β -ciclodextrina e fármacos**. 2005. Tese (Doutorado) Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, MG.

DE VASCONCELOS, C. et al. Adsorption of bovine serum albumin on template-polymerized chitosan/poly (methacrylic acid) complexes. **Langmuir**, v. 23, n. 14, p. 7687-7694, 2007. ISSN 0743-7463.

DIAZ, P. S. **Avaliação comparativa das propriedades hidrodinâmicas de xantanas produzidas pelo pv Pruni e Clairana**. 2008. Tese (Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, UFPel, Pelotas, RS.

DICKINSON, E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. **Food hydrocolloids**, v. 17, n. 1, p. 25-39, 2003. ISSN 0268-005X.

EHRENSTEIN, G. W. **Polymeric materials: structure, properties, applications**. Carl Hanser Verlag GmbH Co KG, 2012. ISBN 3446434135.

EL-ZAHABY, S. A.; KASSEM, A. A.; EL-KAMEL, A. H. Formulation and in vitro evaluation of size expanding gastro-retentive systems of levofloxacin hemihydrate. **International journal of pharmaceutics**, v. 464, n. 1, p. 10-18, 2014. ISSN 0378-5173.

ERNANDES, F. M.; GARCIA-CRUZ, C. H. Levana Bacteriana: aspectos tecnológicos, características e produção. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 26, n. 1, 2005. ISSN 1676-546X.

FARIA-TISCHER, P. C.; TISCHER, C. A. Nanobiotechnology: platform technology for biomaterials and biological applications the nanostructures. **Biochem. Biotechnol. Rep**, v. 1, p. 32-53, 2012.

FARIA, S. et al. Characterization of xanthan gum produced from sugar cane broth. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 2, p. 469-476, 2011. ISSN 0144-8617.

FECHINE, G. J. M. **Polímeros Biodegradáveis: Tipos, mecanismos, normas e mercado mundial**. SciELO-Editora Mackenzie, 2013. ISBN 858293260X.

FIOL, F. D. S. D. et al. A febre maculosa no Brasil. **Rev Panam Salud Publica**, v. 27(6), p. 461-6, 2010.

GALBIS, J. A. et al. Synthetic polymers from sugar-based monomers. **Chemical reviews**, v. 116, n. 3, p. 1600-1636, 2015. ISSN 0009-2665.

GAO, Y. et al. Adsorption and removal of tetracycline antibiotics from aqueous solution by graphene oxide. **Journal of colloid and interface science**, v. 368, n. 1, p. 540-546, 2012. ISSN 0021-9797.

GARCIA-OCHOA, F.; SANTOS, V.; ALCON, A. Xanthan gum production: an unstructured kinetic model. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, n. 3, p. 206-217, 1995. ISSN 0141-0229.

GARCIA-OCHOA, F. et al. Xanthan gum: production, recovery, and properties. **Biotechnology advances**, v. 18, n. 7, p. 549-579, 2000. ISSN 0734-9750.

GIOLITO, I.; IONASHIRO, M. A nomenclatura em análise térmica—parte II. **Cerâmica**, v. 34, n. 225, p. 163-164, 1988.

GOMES, G. V.; ESPERIDIÃO, M. C.; DRUZIAN, J. I. BIOCONVERSÃO DE BIOMASSA DE LEVEDURA DE CERVEJA A GOMA XANTANA UTILIZANDO DIFERENTES CEPAS DE *Xanthomonas Campestris*: RENDIMENTO E REOLOGIA. Anais do 10º Congresso Brasileiro de Polímeros, 2009, Foz do Iguaçu- PR. Outubro/2009.

GOMES, G. V. P. **Produção simultânea de goma xantana e microfibrilas de celulose pela bioconversão de bagaço de cana por xanthomonas**. 2016. Tese (Doutorado) Escola Politécnica, Universidade Federal da Bahia, UFBA, Salvador, BA.

GREHA, A. et al. Development of new chitosan/carrageenan nanoparticles for drug delivery applications. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 92, n. 4, p. 1265-1272, 2010. ISSN 1552-4965.

GRIFFITHS, W. J. et al. Electrospray and tandem mass spectrometry in biochemistry. **Biochemical Journal**, v. 355, n. 3, p. 545-561, 2001. ISSN 0264-6021.

HANSEN, M. B.; NIELSEN, S. E.; BERG, K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. **Journal of immunological methods**, v. 119, n. 2, p. 203-210, 1989. ISSN 0022-1759.

HASHEMI, M. M.; AMINLARI, M.; MOOSAVINASAB, M. Preparation of and studies on the functional properties and bactericidal activity of the lysozyme–xanthan gum conjugate. **LWT-Food Science and Technology**, v. 57, n. 2, p. 594-602, 2014. ISSN 0023-6438.

HARDING, N. E. et al. Identification, genetic and biochemical analysis of genes involved in synthesis of sugar nucleotide precursors of xanthan gum. **Microbiology**, v. 139, n. 3, p. 447-457, 1993. ISSN 1465-2080.

HOFER, M. Basic concepts in static and dynamic light scattering: Application to colloids and polymers. **Neutron, X-Ray and Light Scattering**. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1991.

HOFFMAN, A. S. The origins and evolution of “controlled” drug delivery systems. **Journal of controlled release**, v. 132, n. 3, p. 153-163, 2008. ISSN 0168-3659.

HORCAJADA, P. et al. Metal–organic frameworks as efficient materials for drug delivery. **Angewandte chemie**, v. 118, n. 36, p. 6120-6124, 2006. ISSN 1521-3757.

HORN, M. M. **Obtenção e caracterização de hidrogéis de quitosana, xantana e colágeno aniônico**. 2008. Tese (Doutorado) Universidade de São Paulo.

IZYDORCZYK, M. **Understanding the chemistry of food carbohydrates**. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 2005.

JANSSON, P.-E.; KENNE, L.; LINDBERG, B. Structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. **Carbohydrate Research**, v. 45, n. 1, p. 275-282, 1975. ISSN 0008-6215.

KAR, R. et al. Formulation and in vitro characterization of xanthan gum-based sustained release matrix tables of isosorbide-5-mononitrate. **Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR**, v. 9, n. 1, p. 13, 2010.

KARLSON, L. **Hydrophobically Modified Polymers. Rheology and Molecular Associations**. Physical Chemistry 1, Lund University, 2002. ISBN 9174220071.

KIM, J. et al. Chlorhexidine-loaded xanthan gum-based biopolymers for targeted, sustained release of antiseptic agent. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 32, p. 44-48, 2015. ISSN 1226-086X.

KIOSSEOGLU, A. et al. Functionality of medium molecular weight xanthan gum produced by *Xanthomonas Campestris* ATCC 1395 in batch culture. **Food research international**, v. 36, n. 5, p. 425-430, 2003. ISSN 0963-9969.

KLAIC, P. M. A. et al. Determination of Na, K, Ca and Mg in xanthan gum: Sample treatment by acid digestion. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 4, p. 1895-1900, 2011. ISSN 0144-8617.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. **Química farmacêutica**. Guanabara Dois, 1982.

KUMAR, A. et al. Smart polymers: physical forms and bioengineering applications. **Progress in Polymer Science**, v. 32, n. 10, p. 1205-1237, 2007. ISSN 0079-6700.

KUMAR, A.; SINGH, K.; AHUJA, M. Xanthan-g-poly (acrylamide): microwave-assisted synthesis, characterization and in vitro release behavior. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 2, p. 261-267, 2009. ISSN 0144-8617.

LABA, D. **Rheological properties of cosmetics and toiletries**. CRC Press, 1993. ISBN 0824790901.

LIU, Z. et al. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. **Advanced drug delivery reviews**, v. 60, n. 15, p. 1650-1662, 2008. ISSN 0169-409X.

LOEFFLER, M. et al. Electrostatic interactions of cationic lauric arginate with anionic polysaccharides affect antimicrobial activity against spoilage yeasts. **Journal of applied microbiology**, v. 117, n. 1, p. 28-39, 2014. ISSN 1365-2672.

LUVIELMO, M. D. M.; SCAMPARINI, A. R. P. Goma xantana: produção, recuperação, propriedades e aplicação. **Estudos tecnológicos**, v. 5, n. 1, p. 50-67, 2009.

MACFARLANE, R.; FUOSS, R. M. Polyelectrolytes. XII. Conductance of partially quaternized poly-4-vinylpyridine in methanol-butan-2-one mixtures. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 23, n. 103, p. 403-420, 1957. ISSN 1542-6238.

MAGIORAKOS, A.-P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical microbiology and infection**, v. 18, n. 3, p. 268-281, 2012. ISSN 1198-743X

MALVERN INSTRUMENTS LTD. Isothermal Titration Calorimetry: Direct, label-free measurement of binding affinity and thermodynamics of biomolecules in a single experiment. Disponível em: <
<http://www.malvern.com/en/products/technology/isothermal-titration-calorimetry/default.aspx>>. Acesso em: 18 de dez. 2017.

MANDAL, U. K.; CHATTERJEE, B.; SENJOTI, F. G. Gastro-retentive drug delivery systems and their in vivo success: A recent update. **asian journal of pharmaceutical sciences**, v. 11, n. 5, p. 575-584, 2016. ISSN 1818-0876.

MARTINS, D. et al. Evaluation of the antibacterial activity of poly-(D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles containing violacein. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 13, n. 1, p. 355-363, 2011. ISSN 1388-0764.

MASSEY, B. S.; WARD-SMITH, J. **Mecânica dos fluidos**. CRC Press, 1998.

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

MEDINA JARAMILLO, C. et al. Biofilms based on cassava starch containing extract of yerba mate as antioxidant and plasticizer. **Starch-Stärke**, v. 67, n. 9-10, p. 780-789, 2015. ISSN 1521-379X.

MENEZES, J. et al. Produção biotecnológica de goma xantana em alguns resíduos agroindustriais, caracterização e aplicações. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 8, n. 8, p. 1761-1776, 2012.

MENG, Z. et al. Preparation and characterization of electrospun PLGA/gelatin nanofibers as a potential drug delivery system. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, n. 1, p. 97-102, 2011. ISSN 0927-7765.

MIDDLETON, J. C.; TIPTON, A. J. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. **Biomaterials**, v. 21, n. 23, p. 2335-2346, 2000. ISSN 0142-9612.

MILAS, M. et al. Flow and viscoelastic properties of xanthan gum solutions. **Macromolecules**, v. 23, n. 9, p. 2506-2511, 1990. ISSN 0024-9297.

MISHRA, M.; MISHRA, B. Formulation optimization and characterization of spray dried microparticles for inhalation delivery of doxycycline hyclate. **Yakugaku Zasshi**, v. 131, n. 12, p. 1813-1825, 2011. ISSN 0031-6903.

MITSOULIS, E. 50 years of the K-BKZ constitutive relation for polymers. **ISRN Polymer Science**, v. 2013, 2013.

MONTANARI, M. L. C. et al. Sistemas transportadores de drogas. **Quím. Nova**, v. 21, n. 4, p. 470-476, 1998.

MORACHIS, J. M.; MAHMOUD, E. A.; ALMUTAIRI, A. Physical and chemical strategies for therapeutic delivery by using polymeric nanoparticles. **Pharmacological reviews**, v. 64, n. 3, p. 505-519, 2012. ISSN 0031-6997.

MOREIRA, A. M. D. S. **Composições nanoestruturadas de avermectinas com β -ciclodextrina: síntese, caracterização físico-química e avaliação da atividade contra larvas do *Aedes aegypti***. 2016. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais, Universidade Federal de São João del-Rei UFSJ, São João del-Rei.

MUNDARGI, R. C. et al. Development and evaluation of novel biodegradable microspheres based on poly (d, l-lactide-co-glycolide) and poly (ϵ -caprolactone) for controlled delivery of doxycycline in the treatment of human periodontal pocket: in vitro and in vivo studies. **Journal of controlled release**, v. 119, n. 1, p. 59-68, 2007. ISSN 0168-3659.

NASH, W. et al. Dynamic light scattering investigation of sodium caseinate and xanthan mixtures. **International journal of biological macromolecules**, v. 30, n. 5, p. 269-271, 2002. ISSN 0141-8130.

NAVARRO, R. F. **Fundamentos de reologia de polímeros**. EDUCS, 1997.

NERY, T. B. R. et al. Biosynthesis of xanthan gum from the fermentation of milk whey: Productivity and viscosity. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 1937-1941, 2008. ISSN 0100-4042.

NISHI, Y.; DOERING, R. **Handbook of semiconductor manufacturing technology**. CRC Press, 2000. ISBN 0824787838.

NITSCHKE, M.; RODRIGUES, V.; SCHINATTO, L. F. Formulação de meios de cultivo à base de soro de leite para a produção de goma xantana por *X. Campestris* C7L. **Food Science and Technology (Campinas)**, 2001. ISSN 0101-2061.

ODIAN, G. **Principles of polymerization**. John Wiley & Sons, 2004. ISBN 0471274003.

PADILHA, F. **Produção de biopolímeros sintetizados por microorganismos. 2003. 99 f.** 2003. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

PADUA, G. W.; WANG, Q. **Nanotechnology Research Methods for Food and Bioproducts**. John Wiley & Sons, 2012. ISBN 0813817315.

PASTORINO, D.; CANAL, C.; GINEBRA, M.-P. Drug delivery from injectable calcium phosphate foams by tailoring the macroporosity–drug interaction. **Acta biomaterialia**, v. 12, p. 250-259, 2015. ISSN 1742-7061.

PECORA, R. **Dynamic light scattering: applications of photon correlation spectroscopy**. Springer Science & Business Media, 2013. ISBN 1461323894.

PEREIRA-MAIA, E. C. et al. Tetracyclines and glycylicyclines: an overview. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 700-706, 2010. ISSN 0100-4042.

PETERS, R. **Fiber optic device for detecting the scattered light or fluorescent light from a suspension**: Google Patents 2000.

PIATTI, T. M.; RODRIGUES, R. A. F. Plásticos: características, usos, produção e impactos ambientais. **Maceió. Edufal**, 2005.

PIORKOWSKI, D. T.; MCCLEMENTS, D. J. Beverage emulsions: recent developments in formulation, production, and applications. **Food hydrocolloids**, v. 42, p. 5-41, 2014. ISSN 0268-005X.

POOJA, D. et al. Xanthan gum stabilized gold nanoparticles: characterization, biocompatibility, stability and cytotoxicity. **Carbohydrate Polymers**, v. 110, p. 1-9, 2014. ISSN 0144-8617.

POTTER, M. C.; WIGGERT, D. C. **Mecânica dos fluidos**. Bookman Editora, 1998. ISBN 8582604548.

PRADELLA, J. G. D. C. **Biopolímeros e intermediários químicos**. relatório técnico, n. 84396-205, 2006.

ROCHFERT, W. E.; MIDDLEMAN, S. Rheology of xanthan gum: salt, temperature, and strain effects in oscillatory and steady shear experiments. **Journal of Rheology**, v. 31, n. 4, p. 337-369, 1987. ISSN 0148-6055.

ROSALAM, S.; ENGLAND, R. Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas campestris* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 197-207, 2006. ISSN 0141-0229.

ROSSI-BERGMANN, B. A nanotecnologia: da saúde para além do determinismo tecnológico. **Ciência e Cultura**, v. 60, n. 2, p. 54-57, 2008. ISSN 0009-6725.

RUIZ-CABELLO, F. J. M. et al. Electric double-layer potentials and surface regulation properties measured by colloidal-probe atomic force microscopy. **Physical Review E**, v. 90, n. 1, p. 012301, 2014.

SASSMAN, S. A.; LEE, L. S. Sorption of three tetracyclines by several soils: assessing the role of pH and cation exchange. **Environmental Science & Technology**, v. 39, n. 19, p. 7452-7459, 2005. ISSN 0013-936X.

SAUDE, N.; JUNTER, G.-A. Production and molecular weight characteristics of alginate from free and immobilized-cell cultures of *Azotobacter vinelandii*. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 8, p. 895-900, 2002. ISSN 1359-5113.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química nova. São Paulo. Vol. 26, n. 5 (2003), p. 726-737**, 2003. ISSN 0100-4042.

SCHRAMM, G. **A practical approach to rheology and rheometry**. Haake Karlsruhe, 1994.

_____. **Reologia e reometria: fundamentos teóricos e práticos**. Artliber Ed., 2006. ISBN 8588098342.

SHAW, D. J. **Introdução à Química dos Colóides e de Superfícies**. E. Blücher, 1975.

SOUZA, A. D. S.; VENDRUSCOLO, C. Produção e caracterização dos biopolímeros sintetizados por *Xanthomonas campestris* pv *pruni* cepas 24 e 58, 1999. In: LUVIELMO, M. D. M.; SCAMPARINI, A. R. P. Goma xantana: produção, recuperação, propriedades e aplicação. **Estudos tecnológicos**, v. 5, n. 1, p. 50-67, 2009.

STEFFE, J. F. **Rheological methods in food process engineering**. Freeman press, 1996. ISBN 0963203614.

STOCKWELL, A.; DAVIS, S.; WALKER, S. In vitro evaluation of alginate gel systems as sustained release drug delivery systems. **Journal of controlled release**, v. 3, n. 1-4, p. 167-175, 1986. ISSN 0168-3659.

STOLLER, N. H. et al. The pharmacokinetic profile of a biodegradable controlled-release delivery system containing doxycycline compared to systemically delivered

doxycycline in gingival crevicular fluid, saliva, and serum. **Journal of periodontology**, v. 69, n. 10, p. 1085-1091, 1998. ISSN 0022-3492.

STROBEL, S. A.; MUIR, T. W. **Biopolymers: Exploring biological function through chemical manipulation of biopolymers**: Elsevier Current Trends 2005.

SUÁREZ, D. F. et al. Structural and thermodynamic characterization of doxycycline/ β -cyclodextrin supramolecular complex and its bacterial membrane interactions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 118, p. 194-201, 2014. ISSN 0927-7765.

SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends in biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 41-46, 1998. ISSN 0167-7799.

_____. Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 9, p. 663-674, 2001. ISSN 0958-6946.

TALUKDAR, M.; KINGET, R. Swelling and drug release behaviour of xanthan gum matrix tablets. **International journal of pharmaceutics**, v. 120, n. 1, p. 63-72, 1995. ISSN 0378-5173.

TANTRA, R.; SCHULZE, P.; QUINCEY, P. Effect of nanoparticle concentration on zeta-potential measurement results and reproducibility. **Particuology**, v. 8, n. 3, p. 279-285, 2010. ISSN 1674-2001.

THOMSON, K. S.; MOLAND, E. S. Version 2000: the new β -lactamases of Gram-negative bacteria at the dawn of the new millennium. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 10, p. 1225-1235, 2000. ISSN 1286-4579.

TORCHILIN, V. P. Micellar nanocarriers: pharmaceutical perspectives. **Pharmaceutical research**, v. 24, n. 1, p. 1, 2007. ISSN 0724-8741.

TURNBULL, W. B.; DARANAS, A. H. On the value of c: can low affinity systems be studied by isothermal titration calorimetry? **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 48, p. 14859-14866, 2003. ISSN 0002-7863.

UHRICH, K. E. et al. Polymeric systems for controlled drug release. **Chemical reviews**, v. 99, n. 11, p. 3181-3198, 1999. ISSN 0009-2665.

VAN DE VELDE, K.; KIEKENS, P. Biopolymers: overview of several properties and consequences on their applications. **Polymer testing**, v. 21, n. 4, p. 433-442, 2002. ISSN 0142-9418.

VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. **Pharmaceutical research**, v. 26, n. 5, p. 1025-1058, 2009. ISSN 0724-8741.

VENDRUSCOLO, C. et al. Xanthan and galactomannan (from *M. scabrella*) matrix tablets for oral controlled delivery of theophylline. **International journal of pharmaceutics**, v. 296, n. 1-2, p. 1-11, 2005. ISSN 0378-5173.

VILLANOVA, J. C.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polímeros: Ciência e tecnologia**, v. 20, n. 1, 2010. ISSN 0104-1428.

VILLETTI, M. A. et al. Thermal Degradation of Natural Polymers. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 67, n. 2, p. 295-303, February 01 2002. ISSN 1572-8943. Disponível em: < <https://doi.org/10.1023/A:1013902510952> >.

WAGNER, V. et al. The emerging nanomedicine landscape. **Nature biotechnology**, v. 24, n. 10, p. 1211, 2006. ISSN 1546-1696.

WANG, B. et al. In vitro and in vivo evaluation of xanthan gum–succinic anhydride hydrogels for the ionic strength-sensitive release of antibacterial agents. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 4, n. 10, p. 1853-1861, 2016.

WANG, B. et al. Rheological properties of waxy maize starch and xanthan gum mixtures in the presence of sucrose. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 3, p. 472-481, 2009. ISSN 0144-8617.

WHITE, F. M. et al. **Mecânica de fluidos**. McGraw-Hill Rio de Janeiro, 2004.

WIEGAND, C.; HIPLER, U. C. Polymer-based Biomaterials as Dressings for Chronic Stagnating Wounds. Macromolecular symposia, 2010, Wiley Online Library. p.1-13.

WU, D. et al. Coadsorption of Cu and sulfamethoxazole on hydroxylized and graphitized carbon nanotubes. **Science of the Total Environment**, v. 427, p. 247-252, 2012. ISSN 0048-9697.

YELLANKI, S. K. et al. Development of Metronidazole Intravaginal gel for the treatment of bacterial vaginosis: Effect of Mucoadhesive Natural Polymers on the Release of Metronidazole. **Int. J. Pharm. Tech. Res**, v. 2, p. 1746-1750, 2010.

YOUNG, D. F.; MUNSON, B. R. O.; OKIISHI, T. Fundamentos da Mecânica dos Fluidos. **Tradução da 4ª edição norte-americana**. Edgard Blucher, 2004.

ZAIA, J. Mass spectrometry and the emerging field of glycomics. **Chemistry & biology**, v. 15, n. 9, p. 881-892, 2008. ISSN 1074-5521.

ZHANG, H. et al. Molecular modeling-based inclusion mechanism and stability studies of doxycycline and hydroxypropyl- β -cyclodextrin complex for ophthalmic delivery. **Aaps Pharmscitech**, v. 14, n. 1, p. 10-18, 2013. ISSN 1530-9932.

ZHANG, Y.; CHAN, H. F.; LEONG, K. W. Advanced materials and processing for drug delivery: the past and the future. **Advanced drug delivery reviews**, v. 65, n. 1, p. 104-120, 2013. ISSN 0169-409X.

ZOHURIAAN, M.; SHOKROLAHI, F. Thermal studies on natural and modified gums. **Polymer testing**, v. 23, n. 5, p. 575-579, 2004. ISSN 0142-9418.