



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA**



Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

**MICRO/NANOPARTÍCULAS MUCOADESIVAS DE GOMA GELANA E PECTINA
PARA A LIBERAÇÃO CÓLON-ESPECÍFICA DO RESVERATROL**

Fabíola Garavello Prezotti

ARARAQUARA

2017

FABÍOLA GARAVELLO PREZOTTI

**MICRO/NANOPARTÍCULAS MUCOADESIVAS DE GOMA GELANA E PECTINA
PARA A LIBERAÇÃO CÓLON-ESPECÍFICA DO RESVERATROL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Beatriz Stringhetti Ferreira Cury

Coorientadora: Prof^a Dr^a Maria Palmira Daflon Gremião

ARARAQUARA

2017

Ficha Catalográfica

Elaborada por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

P944m Prezotti, Fabíola Garavello
Micro/nanopartículas mucoadesivas de goma gelana e pectina para a liberação cólon-específica do resveratrol / Fabíola Garavello Prezotti. – Araraquara, 2017.
302 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de pesquisa em Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Beatriz Stringhetti Ferreira Cury.
Coorientadora: Maria Palmira Daflon Gremião.

1. Goma gelana. 2. Pectina. 3. Microesferas. 4. Nanopartículas poliméricas. 5. Resveratrol. 6. Mucoadesão. 7. Permeabilidade. 8. Co-cultura tripla de células. I. Cury, Beatriz Stringhetti Ferreira, orient. II. Gremião, Maria Palmira Daflon, coorient. III. Título.

CAPES: 40300005

FABÍOLA GARAVELLO PREZOTTI

MICRO/NANOPARTÍCULAS MUCOADESIVAS DE GOMA GELANA E PECTINA PARA A
LIBERAÇÃO CÓLON-ESPECÍFICA DO RESVERATROL

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual
Paulista – UNESP, Campus de Araraquara como
requisito para a obtenção do título de Doutora em
Ciências Farmacêuticas.

Araraquara, 30 de janeiro de 2017.

BANCA EXAMINADORA


BEATRIZ STRINGHETTI FERREIRA CURY


BRUNO FILIPE CARMELINO SARMENTO


PRISCYLA DANIELY MARCATO GASPARI


MARCEL OTAVIO CERRI


MARLUS CHORILLI

Dedico este trabalho ao professor Raul, a meus pais,
Waldir e Sandra, ao João Victor e ao meu avô Santo.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus de infinita bondade, que permitiu a realização deste trabalho, e a meu anjo guardião, que sempre esteve ao meu redor, me iluminando e auxiliando a minha caminhada, nos momentos bons e, principalmente, nos difíceis.

Ao meu querido eterno orientador, Prof. Dr. Raul Cesar Evangelista, a profunda admiração que tenho por seu modo de ensinar e por sua sabedoria nunca irá mudar. Agradeço a oportunidade concedida, responsável pelos rumos que minha caminhada tomou a partir da iniciação científica sob sua orientação. Muito obrigada por sempre se preocupar comigo, jamais esquecerei a mensagem recebida e tenho certeza de que sempre esteve presente.

À minha querida orientadora, Prof^a Dr^a Beatriz Stringhetti Ferreira Cury, a principal responsável por me transformar na pesquisadora que me tornei. Sempre esteve comigo, desde a iniciação científica, ensinando, demonstrando e auxiliando no que fosse necessário. Agradeço tudo o que fez e ainda tem feito por mim, pelo nosso trabalho e pela minha formação.

À querida coorientadora, Prof^a Dr^a Maria Palmira Daflon Gremião, agradeço todos os ensinamentos passados desde a graduação, e serei eternamente grata por ter me proporcionado a realização do doutorado-sanduíche e não ter medido esforços para concretizar essa importante fase em minha vida.

Ao Prof. Dr. Bruno Sarmiento, meu orientador no doutorado-sanduíche, agradeço a oportunidade de poder ter feito parte de sua equipe e ter realizado experimentos tão importantes para o trabalho. Obrigada por tornar possível a realização desta importante etapa da minha formação. E aos alunos do BS Team, agradeço a recepção e todo o auxílio prestado com os experimentos, essenciais para que eu pudesse aprender as técnicas de trabalho com culturas celulares e realizar os ensaios de citotoxicidade e permeabilidade *in vitro*.

À minha família, aos que estão presentes em todos os momentos e são a minha fortaleza, minha mãe Sandra, meu pai Waldir, meu irmão Fábio, e aos que já não estão presentes nesse plano terreno, mas que com certeza torcem por mim. Agradeço também os demais familiares que apoiaram e sempre se preocuparam comigo.

Ao João Victor, que acompanhou toda minha trajetória, apoiando, dando conselhos e incentivando nos momentos mais áridos, sempre com compreensão. Muito obrigada por ser meu amor e meu melhor amigo, meu braço direito e a pessoa em quem eu posso confiar sempre.

Ao Prof. Dr. Marlus Chorilli, que tem acompanhado meu trabalho desde a graduação, agradeço toda a participação que teve desde o mestrado, e toda confiança, incentivo, discussões e ensinamentos passados durante esses anos.

Ao Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud, agradeço a participação na banca de qualificação e a minuciosa correção sugerida. Agradeço também os ensinamentos acerca do experimento de permeabilidade *ex vivo* em saco intestinal invertido, por ter nos ensinado a técnica e, assim, permitido que realizássemos esse ensaio nesta faculdade.

Ao Prof. Dr. Marcel Otavio Cerri, agradeço toda a ajuda e os ensinamentos sobre planejamentos fatoriais e a participação na banca de defesa, com importantes colaborações para o trabalho.

À Profª Drª Priscyla Daniely Marcato Gaspari, agradeço todo o conhecimento sobre nanopartículas dividido comigo durante a defesa, e as importantes colaborações para o trabalho.

Às queridas amigas e técnicas do nosso laboratório Margareth e Natália, agradeço todo apoio, presteza em auxiliar-me no que fosse necessário e o bom humor da nossa convivência.

Um agradecimento especialmente à Profª Drª Ana Dóris de Castro, grande incentivadora para que minha carreira acadêmica fosse iniciada, ainda no trabalho de conclusão de curso.

Ao Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira, à Profª Drª Hérica Regina Nunes Salgado, à Profª Drª Maria Virgínia Scarpa e à técnica Fátima, agradeço a colaboração e disponibilização de equipamentos dos laboratórios de Farmacotécnica e de Controle de Qualidade. Ao Prof. Dr. João Aristeu da Rosa, do Laboratório de Parasitologia, agradeço a disponibilização do estereoscópio e do analisador de imagens para realização dos estudos de tamanho e forma das microesferas. Ao LMA-IQ, a disponibilidade de utilização do microscópio eletrônico de varredura.

À todas as funcionárias da secretaria de pós-graduação, agradeço toda atenção e auxílios prestados com tanta agilidade.

Ao Prof. Dr. Roy Edward Bruns, que me inspirou através de seu livro a empregar os planejamentos fatoriais e aceitou tão gentilmente ministrar um curso para nos ensinar sobre o tema. Muito obrigada por ter me recebido na Unicamp e por todo o conhecimento transmitido.

Agradeço à agência de fomento CAPES a bolsa concedida, que propiciou o desenvolvimento do projeto e a concretização do trabalho.

Às amigas que aprendi a amar e se tornaram minha família em Araraquara, que tornaram as longas jornadas de trabalho menos árduas e muito mais alegres. Às que me acompanharam, trabalharam ao meu lado, auxiliando-me no que fosse necessário, vocês são mais que especiais e sempre estarão comigo. Às amigas que fiz em Portugal e se tornaram tão especiais em tão pouco tempo, vocês também estarão sempre comigo, muito obrigada por tudo que fizeram por mim. A todos os amigos, os de faculdade e os de outros laboratórios, que mesmo nos encontrando pouco, não deixaram de ser importantes em minha vida.

Prefácio

O desenvolvimento de novos sistemas de liberação controlada capazes de vetorizar o fármaco para um sítio ou órgão específico tem sido alvo de inúmeras pesquisas. Nosso grupo de pesquisa vem atuando intensamente no desenvolvimento de novos sistemas de liberação controlada de fármacos destinados à administração pela via oral, devido aos importantes e evidentes benefícios que esta via de administração pode agregar ao desempenho de inúmeros fármacos destinados ao tratamento de diversas patologias, locais e sistêmicas. A utilização de polissacarídeos naturais como a goma gelana (GG) e a pectina (P), bem como de suas misturas, associada a modificações químicas e/ou físicas desses polímeros tem permitido a obtenção de materiais inovadores com uma ampla faixa de propriedades físico-químicas, as quais podem ser moduladas de acordo com necessidades terapêuticas específicas.

Dentro deste contexto, este trabalho representa uma continuidade do trabalho desenvolvido durante o mestrado da autora, o qual resultou em importantes avanços acerca da compreensão das propriedades físico-químicas de sistemas multiparticulados obtidos com misturas de GG:P, bem como da correlação com suas propriedades de liberação do fármaco encapsulado.

No presente trabalho, tais misturas foram exploradas para a obtenção de sistemas em ambas as escalas micro e nanométricas, buscando-se a evolução do conhecimento adquirido, bem como as possibilidades de modulação das propriedades desses sistemas para a veiculação do resveratrol, um fármaco com propriedade antioxidante promissora para a prevenção e tratamento de doenças que acometem a região distal do trato gastrointestinal, como o câncer colônico.

A presente tese está dividida em capítulos, a fim de facilitar a apresentação e a compreensão do conteúdo.

No Capítulo I são apresentados os estudos com dispersões poliméricas de GG e P, bem como os estudos com hidrogéis obtidos através da reticulação iônica ou iônica/covalente das misturas desses polissacarídeos empregando cloreto de alumínio ($AlCl_3$) e glutaraldeído. O capítulo compreende a caracterização físico-química, que foi uma ferramenta fundamental para a compreensão e correlação com as propriedades dos sistemas micro e nanoestruturados explorados posteriormente.

No Capítulo II são apresentados os estudos iniciais para o delineamento de microesferas duplamente reticuladas de GG:P a partir de um planejamento fatorial saturado 2^{7-4} . O capítulo contém resultados referentes a oito diferentes formulações de microesferas e abrange a análise exploratória inicial dos efeitos de diversas variáveis, como concentração de polímeros, fármaco,

agentes reticulantes, tempo de reticulação e proporção polimérica sobre algumas respostas de interesse, como tamanho, forma e liberação em meio ácido, com o intuito de selecionar os fatores mais determinantes para as características das microesferas.

O Capítulo III, em continuidade aos estudos das microesferas, apresenta os resultados referentes a um planejamento fatorial completo 2^4 com ponto central, no qual se avaliou um menor número de fatores, selecionados previamente, sendo eles a proporção polimérica e as concentrações de agentes reticulantes e fármaco, a fim de avaliar a significância dos efeitos principais e efeitos de interação entre as variáveis sobre respostas como eficiência de encapsulação, erosão e liberação em meio ácido, permitindo a otimização do sistema. As microesferas mais promissoras para a liberação colônica do resveratrol foram então avaliadas quanto à citotoxicidade, e a permeabilidade do fármaco foi estudada em modelos *in vitro* e *ex vivo*.

O Capítulo IV é destinado em especial ao desenvolvimento e ao estudo das nanopartículas de GG:P, que foram obtidas por geleificação ionotrópica empregando ou não a nebulização. Neste capítulo, empregou-se um planejamento fatorial do tipo composto central e foram avaliadas as características de tamanho, potencial zeta, perfil de liberação do fármaco, citotoxicidade e a permeabilidade intestinal, também em modelos *in vitro* e *ex vivo*.

No Capítulo V são apresentados os dados referentes ao desenvolvimento e validação das metodologias analíticas utilizadas na quantificação do resveratrol por espectrofotometria UV-VIS e por cromatografia líquida de alta eficiência.

Resumo

A goma gelana (GG) e a pectina (P) são polissacarídeos naturais que encontram diversas aplicações na área farmacêutica. Ambas podem formar hidrogéis capazes de controlar a liberação de fármacos e serem utilizadas na obtenção de sistemas carreadores para serem administrados por diferentes vias de administração, particularmente a via oral. O objetivo do presente estudo foi a caracterização de dispersões de GG e P isoladas e de hidrogéis de GG:P quanto a propriedades físico-químicas, mecânicas e reológicas. Os hidrogéis foram obtidos através da reticulação iônica ou iônica/covalente empregando $AlCl_3$ e glutaraldeído. Dispersões de GG e de P foram avaliadas quanto à citotoxicidade intestinal *in vitro*, empregando o teste do MTT e linhagens de células Caco-2 e HT29-MTX. Avaliou-se o potencial zeta (PZ) em função do pH do meio e da concentração de polímeros e a massa molecular (MM) dos polímeros através da técnica de espalhamento de luz estático. As propriedades mecânicas dos hidrogéis (dureza, elasticidade, força do gel, coesividade e adesividade) foram avaliadas em texturômetro. As propriedades reológicas em termos de G' (módulo elástico), G'' (módulo viscoso) e η^* (viscosidade complexa) foram avaliadas em reômetro e a densidade de reticulação dos hidrogéis foi determinada. Os polissacarídeos isolados apresentaram um comportamento não citotóxico para ambas as linhagens celulares. O comportamento pH-dependente do PZ foi evidenciado e as dispersões de P apresentaram invariavelmente maior densidade de carga que as de GG. A GG apresentou MM de 116 ± 20 kDa e a P de 383 ± 22 kDa. Os hidrogéis de GG:P (1:1 e 4:1) apresentaram propriedades mecânicas e reológicas altamente dependentes de suas composições, variando conforme o grau de reticulação e a proporção polimérica. Os resultados de TPA demonstraram que a proporção G:P e o tipo de reticulação promoveram mudanças significativas nas matrizes poliméricas, sendo que os hidrogéis G:P 4:1 apresentaram maiores valores de dureza, elasticidade, coesividade e adesividade, independentemente do grau de reticulação. Também foi observado que nesta proporção (4:1), a dupla reticulação promoveu a formação de estruturas mais fortes. Os hidrogéis reticulados apresentaram comportamento viscoelástico, com predominância de G' sobre G'' , evidenciando o predomínio do comportamento elástico. Os valores de resistência do gel (S) e os expoentes viscoelásticos (n) apresentados pelos hidrogéis duplamente reticulados indicam que a associação entre a reticulação iônica e covalente originou redes mais fortes e mais reticuladas. Os resultados obtidos neste capítulo servem como base para o desenvolvimento racional de sistemas de liberação baseados em misturas de GG:P, bem como para uma maior compreensão do comportamento apresentado por estes sistemas frente a alguns experimentos.

Palavras-chave: goma gelana, pectina, hidrogéis, propriedades mecânicas, reologia.

Abstract

Gellan gum (GG) and pectin (P) are natural polysaccharides that find several applications in the pharmaceutical field. Both can form hydrogels capable of controlling drug release and can be used to obtain delivery systems to be administered by different routes of administration, particularly the oral route. The aim of the present work was the characterization of isolated GG and P dispersions and GG:P hydrogels regarding their physicochemical, mechanical and rheological properties. Hydrogels were prepared through ionic or ionic/covalent crosslinking, using AlCl_3 and glutaraldehyde. GG and P dispersions were evaluated regarding their *in vitro* intestinal cytotoxicity, employing the MTT assay and Caco-2 and HT29-MTX cell lines. The zeta potential (ZP) was evaluated, varying the pH of the media and polymer concentrations, and polymers molecular weight (M_w) was determined by static light scattering. The hydrogels mechanical properties (hardness, elasticity, gel strength, cohesiveness and adhesiveness) were evaluated in a texture analyzer. The rheological properties G' (storage modulus), G'' (loss modulus) and η^* (complex viscosity) were evaluated in a rheometer, and the degree of crosslinking of the hydrogels was determined. Isolated polysaccharides presented a non-cytotoxic behavior for both cell lines. The pH-dependent behavior of the ZP was evidenced and dispersions of P presented invariably higher charge density than GG dispersions. GG presented a M_w of 116 ± 20 kDa and P of 383 ± 22 kDa. The hydrogels prepared through ionic or ionic/covalent crosslinking of GG:P (1:1 and 4:1) dispersions presented rheological and mechanical properties highly dependent on their compositions, varying according to the crosslinking degree and the polymer ratio. TPA results showed that G:P ratio and type of crosslinking promoted significant changes in polymeric matrixes, and hydrogels form G:P 4:1 ratio presented higher values of hardness, elasticity, cohesiveness and adhesiveness, regardless of the crosslinking degree. It was also observed that in this ratio (4:1), the dual crosslinking originated stronger structures. Crosslinked hydrogels presented viscoelastic behavior, with predominance of G' over G'' , evidencing the predominance of an elastic behavior. The values of gel strength (S) and the viscoelastic exponents (n) presented by dual-crosslinked hydrogels indicate that the association of ionic and covalent crosslinking led to stronger and more crosslinked networks. The results obtained in this chapter serve as a basis for the rational development of delivery systems based on GG:P blends, as well as for the understanding of the behavior presented by these systems.

Keywords: gellan gum, pectin, hydrogels, mechanical properties, rheology.

Lista de ilustrações

Figura 1: Representação esquemática da obtenção de hidrogéis.18

Figura 2: Representação esquemática de um gráfico típico da força *versus* tempo obtido durante a análise em texturômetro TA-XT Plus® (Stable Micro Systems) (adaptado de SZCZESNIAK, 2002).....19

Figura 3: Viabilidade celular (%) de células das linhagens HT29-MTX e Caco-2 após 24h de incubação na presença de goma gelana e pectina em diferentes concentrações em A) placas de 24 poços e B) placas de 96 poços (média ± DP).29

Figura 4: Gráficos do potencial zeta em função do pH do meio para as dispersões poliméricas em água e em NaCl 0,1M de A) Goma gelana e B) Pectina (média ± DP).....31

Figura 5: Gráfico do potencial zeta (mV) em função da concentração (mg/mL) das dispersões aquosas de GG (pH 5,4) e P (pH 6,14) (média ± DP).33

Figura 6: Espectros da varredura de tensão para determinação da faixa de viscoelasticidade linear de A) dispersão polimérica reticulada ionicamente (GP41_A13) e B) dispersão polimérica duplamente reticulada (GP41_A15_G1).42

Figura 7: Espectros mecânicos dos hidrogéis não reticulados A) GP11 e B) GP41.....43

Figura 8: Espectros mecânicos dos hidrogéis reticulados ionicamente A) GP11_A13; B) GP11_A15; C) GP41_A13 e D) GP41_A15.....44

Figura 9: Espectros mecânicos dos hidrogéis duplamente reticulados A) GP11_A13_G0,5 e GP11_A13_G1; B) GP11_A15_G0,5 e GP11_A15_G1; C) GP41_A13_G0,5 e GP41_A13_G1 e D) GP41_A15_G0,5 e GP41_A15_G1.45

Lista de tabelas

Tabela 1: Composições dos hidrogéis de GG:P selecionados para os estudos de TPA e reologia26

Tabela 2: Resultados de MM média e segundo coeficiente virial (A_2) da GG e da P, obtidos por *Static Light Scattering* (média \pm DP).....35

Tabela 3: Valores de dureza, elasticidade, força do gel, coesividade e adesividade dos hidrogéis de GG e P reticulados ionicamente ou duplamente reticulados (média \pm DP).....37

Tabela 4: Valores de G' , G'' e η^* para os hidrogéis à tensão de 1 Pa e frequência de 6,283 rad/s (média \pm DP; n=3).43

Tabela 5: Valores dos parâmetros S e n e dos coeficientes de determinação (r^2) obtidos para os diferentes hidrogéis de GG:P.....46

Lista de abreviaturas e siglas

AlCl ₃	Cloreto de alumínio
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
dn/dc	Incremento de índice de refração com a concentração
GG	Goma gelana
GLU	Glutaraldeído
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HCl	Ácido clorídrico
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
m	Massa
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MTT	Sal tetrazol (brometo de 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol)
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NPP	Nanopartículas poliméricas
P	Pectina
P _{ap}	Permeabilidade aparente
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
RES	resveratrol
rpm	Rotações por minuto
SLCF	Sistemas de liberação controlada de fármacos
TEER	<i>Transepithelial electrical resistance</i>
TGI	Trato gastrointestinal
TPA	<i>Texture Profile Analysis</i>
UI	Unidades internacionais
V	Volume
h	Hora
N	Newton
mm	Milímetro
DMSO	Dimetilsulfóxido
PZ	Potencial zeta
pH	Potencial hidrogeniônico

Sumário

1	Introdução.....	15
2	Fundamentação teórica.....	17
2.1	Polissacarídeos e hidrogéis	17
2.1.1	Propriedades mecânicas dos hidrogéis	18
2.1.2	Reologia.....	20
3	Objetivos	21
4	Metodologias	22
4.1	Principais substâncias e equipamentos	22
4.2	Estudos das dispersões poliméricas	22
4.2.1	Obtenção de dispersões de GG e P	22
4.2.2	Avaliação <i>in vitro</i> da citotoxicidade em células Caco-2 e HT29-MTX	22
4.2.2.1	Cultura de células.....	23
4.2.2.2	Teste de viabilidade celular através do ensaio do MTT.....	23
4.2.3	Avaliação do potencial zeta das dispersões poliméricas	24
4.2.3.1	Análise da influência do pH no potencial zeta.....	24
4.2.3.2	Análise da influência da concentração no potencial zeta.....	24
4.2.4	Determinação da massa molecular dos polímeros pela técnica de <i>static light scattering</i>	25
4.3	Obtenção de hidrogéis de GG:P reticulados ionicamente.....	25
4.4	Obtenção de hidrogéis de GG:P duplamente reticulados.....	25
4.5	Avaliação das propriedades mecânicas dos hidrogéis	26
4.6	Estudo das propriedades reológicas dos hidrogéis de GG:P.....	27
4.6.1	Varredura de tensão	27
4.6.2	Varredura de frequência	27
4.7	Análise estatística dos resultados.....	28
5	Resultados e Discussão	28
5.1	Avaliação <i>in vitro</i> da citotoxicidade	28
5.2	Avaliação do potencial zeta das dispersões poliméricas.....	30
5.2.1	Análise da influência do pH no potencial zeta	31
5.2.2	Análise da influência da concentração no potencial zeta	33
5.3	Determinação da massa molecular dos polímeros pela técnica de <i>static light scattering</i> (SLS)	34
5.4	Obtenção de hidrogéis de GG:P reticulados ionicamente e duplamente reticulados....	36
5.5	Avaliação das propriedades mecânicas dos hidrogéis	36
5.5.1	Dureza.....	37
5.5.2	Elasticidade.....	38
5.5.3	Força do gel	39
5.5.4	Coesividade.....	39
5.5.5	Adesividade	40
5.6	Estudo das propriedades reológicas dos hidrogéis de GG:P.....	41
5.6.1	Varredura de tensão	41
5.6.2	Varredura de frequência	42
6	Conclusões.....	47

1 INTRODUÇÃO

Os sistemas de liberação controlada de fármacos (SLCF) são importantes sistemas utilizados na terapia moderna devido às vantagens que apresentam em relação aos sistemas convencionais. Além do controle temporal da liberação, pode-se alcançar o controle espacial, que permite a vetorização do fármaco para um órgão ou tecido alvo, em quantidade suficiente para o efeito farmacológico esperado. Assim, doses menores podem ser administradas e os efeitos adversos em tecidos saudáveis podem ser reduzidos (WILCZEWSKA *et al.*, 2012).

O desenvolvimento de sistemas de liberação controlada inovadores que permitam a modulação das taxas de liberação de acordo com necessidades terapêuticas específicas constitui um importante objeto de estudo na área farmacêutica. Nesse contexto, as matrizes hidrofílicas para administração oral despertam particular interesse, pois estas podem ser delineadas a partir da mistura de diferentes polímeros, modificados ou não, a fim de se alcançar um sistema que agregue um conjunto de propriedades favoráveis ao desempenho desejado, como intumescimento, erosão e/ou dissolução, favorecendo uma cinética de liberação promissora para o efeito farmacológico esperado. Dessa forma, o êxito de um sistema de liberação dependerá, dentre outros fatores, de suas características físicas, do modo de obtenção e das características físico-químicas dos polímeros que influenciarão diretamente o controle e o mecanismo de liberação do fármaco veiculado (LOPES *et al.*, 2005).

Há um interesse crescente na utilização de polímeros naturais e técnicas de obtenção relativamente simples que empreguem condições reacionais amenas, como a geleificação ionotrópica, na obtenção de sistemas carreadores de fármacos. Dentre os polímeros naturais, alginato, quitosana, goma gelana, pectina, entre outros, têm sido amplamente empregados para encapsulação de fármacos por essa técnica. Estes polieletrólitos naturais apresentam grupos funcionais carregados positiva ou negativamente, capazes de interagir com íons de carga oposta levando à geleificação por reticulação. Além de encapsularem o fármaco, estes polímeros ainda podem atuar como controladores das taxas de liberação (PATIL *et al.*, 2012; BONI *et al.*, 2015).

A goma gelana (GG) é um polissacarídeo microbiano, obtido comercialmente através da fermentação aeróbia da bactéria *Sphingomonas elodea*, capaz de formar hidrogéis termorreversíveis (PATIL *et al.*, 2012; OSMAŁEK *et al.*, 2014). Seu uso em produtos alimentícios e farmacêuticos vem sendo amplamente explorado devido à sua biocompatibilidade, bem como a habilidade de formar géis. Sua estrutura é composta de unidades repetidas do tetrassacarídeo β -1,3-D-glicose, β -1,4-D-ácido glucurônico, β -1,4-D-

glicose e α -1,4-L-ramnose (CHANDRASEKARAN et al., 1988; GIAVASIS et al., 2000; OSMAŁEK et al., 2014). As propriedades específicas de geleificação deste polímero em diferentes meios atraem atenção para o uso em SLCF, sendo descrita como um potente aditivo multifuncional para uso farmacêutico, com propriedades mucoadesivas, e vem sendo explorada em diversos sistemas para administração por diferentes vias, como oral (KUBO *et al.*, 2003; BONI *et al.*, 2015), oftálmica (SANZGIRI *et al.*, 1993), nasal (CAO *et al.*, 2009), dentre outras (MIYAZAKI *et al.*, 1999; NARKAR *et al.*, 2010; OSMAŁEK *et al.*, 2014).

A pectina (P) é um polissacarídeo natural encontrado em diversas espécies vegetais, principalmente na parede celular, podendo ser extraído de tecidos frescos ou secos de frutas ou vegetais através de diversos processos extrativos (SOUTO-MAIOR *et al.*, 2010; MUNARIN *et al.*, 2012). Pela capacidade de geleificação, é amplamente empregada como agente espessante, estabilizante e geleificante pela indústria alimentícia (FISSORE *et al.*, 2013), e atrai grande atenção para uso farmacêutico na obtenção de sistemas de liberação controlada de fármacos, na cicatrização de feridas e na engenharia de tecidos (LIU *et al.*, 2004; BIGUCCI *et al.*, 2009; MUNARIN *et al.*, 2012). Sua estrutura é formada por diferentes domínios, com alternância entre regiões lineares de homogalacturonana, e regiões altamente ramificadas de ramnogalacturonana I e II (SCHOLS e VORAGEN, 1996; VINCKEN *et al.*, 2003; MOHNEN, 2008; MUNARIN *et al.*, 2012)

A propriedade de formar hidrogéis e a mucoadesividade que apresentam, tornam a GG e a P materiais promissores para o delineamento de SLCF. A natureza hidrofílica e a estrutura tridimensional da rede formada auxiliam na encapsulação e na modulação das taxas de liberação do fármaco e a mucoadesão permite a manutenção do sistema por períodos mais prolongados em contato mais efetivo com o sítio de absorção do fármaco (NARKAR *et al.*, 2010).

O uso de polissacarídeos naturais, bem como de suas misturas, associado à modificação química ou física desses materiais por reações de reticulação ou retrogradação tem sido alvo de inúmeras pesquisas do nosso grupo (CURY *et al.*, 2009a; CURY *et al.*, 2009b; CARBINATTO *et al.*, 2012; PREZOTTI *et al.*, 2012; SOARES *et al.*, 2013; CARBINATTO *et al.*, 2014; MENEGUIN *et al.*, 2014; PREZOTTI *et al.*, 2014; BONI *et al.*, 2015; CARBINATTO *et al.*, 2016; RIBEIRO *et al.*, 2016; CARDOSO *et al.*, 2017; MENEGUIN *et al.*, 2017), uma vez que sistemas baseados em um único polissacarídeo muitas vezes não permitem a liberação sítio-específica de maneira eficiente (SHUKLA e TIWARI, 2012).

A mistura de dois ou mais polímeros, aliada a modificações físicas e/ou químicas, elimina alguns inconvenientes do uso de polímeros isolados, e possibilita o sistema ultrapassar

algumas barreiras que a administração oral impõe aos SLCF, como a ampla variação de pH e o tempo de trânsito variável (SHUKLA e TIWARI, 2012).

Neste trabalho, dispersões de GG e P foram caracterizadas e empregadas na obtenção de hidrogéis através da reticulação iônica ou iônica/covalente, empregando $AlCl_3$ e glutaraldeído como agentes reticulantes. Os hidrogéis desenvolvidos tiveram suas propriedades mecânicas avaliadas através de análises de TPA e reologia e os resultados servirão como base para uma maior compreensão do comportamento dos sistemas micro e nanoestruturados a serem obtidos em etapas futuras.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Polissacarídeos e hidrogéis

Polímeros são macromoléculas compostas por diversas unidades ligadas entre si, os monômeros. Os polissacarídeos ou carboidratos são biopolímeros constituídos de monossacarídeos, idênticos ou não, que estão unidos entre si através das ligações glicosídicas, originando cadeias lineares ou ramificadas. A diversidade de estruturas dos polissacarídeos é dependente da sua origem, bastante diversificada, pois podem ser obtidos a partir de algas, fungos, bactérias, plantas ou animais (ZONG *et al.*, 2012).

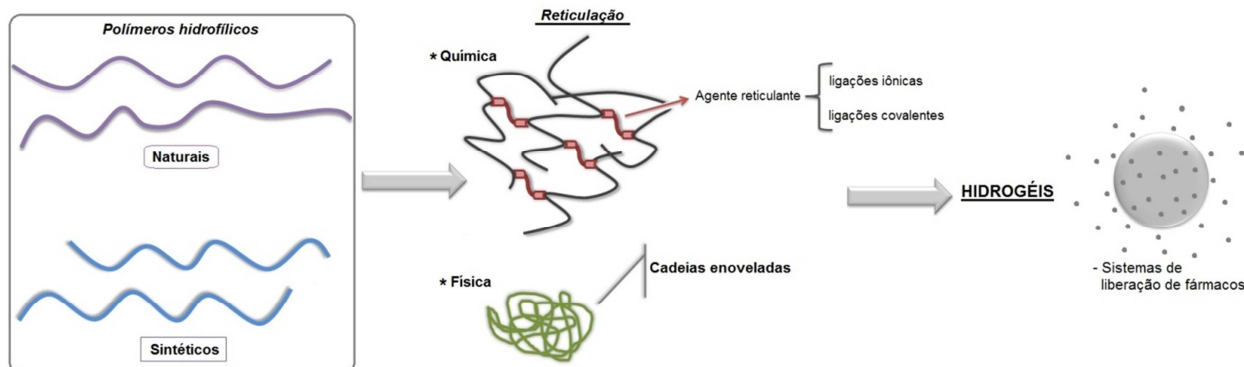
Hidrogéis são redes reticuladas de polímeros hidrofílicos, que possuem a capacidade de absorver grandes quantidades de água, e conseqüentemente, intumescerem, mantendo a estrutura tridimensional, na qual é possível incorporar grandes quantidades de fármaco. A liberação do fármaco a partir desses hidrogéis pode ser controlada através de diferentes mecanismos, o que torna esses sistemas matriciais potenciais carreadores de fármacos (PEPPAS *et al.*, 2000; GUPTA *et al.*, 2002; COVIELLO *et al.*, 2005).

O uso comercial dos hidrogéis abrange a produção de lentes de contato, produtos de higiene e curativos para feridas, porém a semelhança com os tecidos vivos e a biocompatibilidade que apresentam despertam grande interesse para aplicações na área biomédica, como a engenharia de tecidos, e na área farmacêutica, para o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos, proteínas e peptídeos (CALÓ e KHUTORYANSKIY, 2015).

Os hidrogéis podem ser obtidos a partir de polímeros hidrofílicos naturais ou sintéticos, física ou quimicamente reticulados (CALÓ e KHUTORYANSKIY, 2015). A reticulação deve ocorrer para evitar que cadeias dos polímeros hidrofílicos que compõem o sistema se dissolvam quando em contato com o meio aquoso (HENNINK e VAN NOSTRUM, 2012). A reticulação

química insere pontos de junções entre as cadeias poliméricas, através da formação de ligações iônicas ou covalentes, já a reticulação física origina um alto grau de enovelamento das cadeias, (Figura 1). Dessa maneira, diversas combinações entre polímeros e reticulantes podem ser empregadas na obtenção de hidrogéis, capazes de serem modulados para responderem a diferentes estímulos fisiológicos e liberarem o seu conteúdo de maneira controlada (PEPPAS *et al.*, 2000; GUPTA *et al.*, 2002; MARTÍNEZ-RUVALCABA *et al.*, 2007).

Figura 1: Representação esquemática da obtenção de hidrogéis.



O termo “*smart hydrogels*” vem sendo amplamente adotado para designar hidrogéis capazes de responder a certos estímulos que representam condições peculiares de um determinado sítio, como pH, força iônica, temperatura ou conteúdo enzimático, ocasionando mudanças químicas ou físicas no sistema que levam à liberação do fármaco encapsulado (GUPTA *et al.*, 2002). Um exemplo é o intumescimento pH-dependente, em que a variação do pH do meio biológico promove absorção de líquido e consequente intumescimento, permitindo uma alteração estrutural, que inicia a liberação do fármaco.

2.1.1 Propriedades mecânicas dos hidrogéis

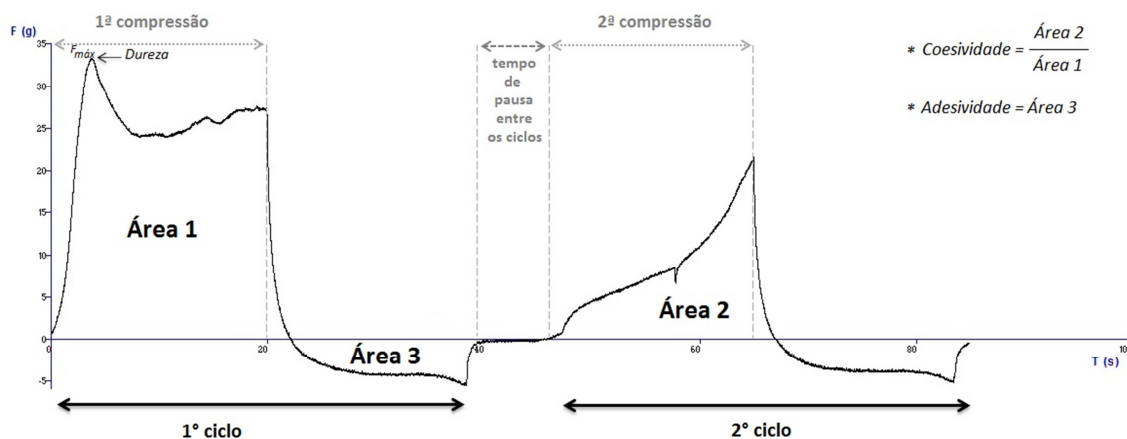
A análise do perfil de textura (do inglês TPA - *Texture Profile Analysis*), realizada em texturômetro, permite determinar propriedades mecânicas de diferentes tipos de produtos e tem sido muito empregada pela indústria farmacêutica para análises de formas farmacêuticas semissólidas, como os hidrogéis (LAU *et al.*, 2000). Além disso, esta técnica é capaz de fornecer dados importantes a respeito da adesividade do sistema, podendo ser um teste complementar para o estudo e caracterização de sistemas bioadesivos (TAMBURIC e CRAIG, 1997).

Estes testes permitem avaliar um conjunto de características relativas à estrutura molecular e às propriedades mecânicas do material estudado, como, por exemplo, viscosidade, espalhabilidade, dureza, coesividade, adesividade, dentre outras (SZCZESNIAK, 2002).

Durante a análise, os hidrogéis são submetidos a dois ciclos de compressão. No primeiro, a probe cilíndrica do equipamento, ao encontrar a superfície do gel, penetra a amostra até a distância padronizada, e, após atingir esta distância, retorna à superfície do gel, permanecendo estática durante um intervalo de tempo também padronizado. Em seguida, se inicia a segunda compressão, percorrendo a mesma distância e então o teste é finalizado com o retorno da probe até o seu ponto de partida (JONES *et al.*, 1996).

Os dados processados no *software* Texture Exponent Lite (Stable Micro Systems) geram um gráfico da força *versus* tempo (Figura 2), a partir do qual podem ser extraídos e calculados parâmetros como dureza, adesividade e coesividade, dentre outros.

Figura 2: Representação esquemática de um gráfico típico da força *versus* tempo obtido durante a análise em texturômetro TA-XT Plus® (Stable Micro Systems) (adaptado de SZCZESNIAK, 2002).



Durante os ciclos de compressão da amostra, a força aumenta, até atingir um valor máximo. A força máxima obtida durante a primeira compressão do teste corresponde à dureza (*hardness*), muitas vezes também denominada de firmeza do gel, conforme demonstrado na Figura 2 (PONS e FISZMAN, 1996). Dessa forma, quanto maior essa força, mais firme é o gel. Entretanto, após atingir esse valor máximo, a força cai, indicando a ruptura do gel.

A distância percorrida pela probe até atingir a força máxima do primeiro ciclo, ponto em que ocorre quebra da estrutura do gel, indica a elasticidade do gel (*gel elasticity*). Pequenas distâncias de penetração da probe antes da ruptura indicam um gel pouco elástico, quebradiço (*brittle*), enquanto grandes distâncias indicam géis mais elásticos (PONS e FISZMAN, 1996).

No estágio inicial da primeira compressão, antes que ocorra ruptura do gel, portanto em uma situação de pouca deformação, pode-se medir a força exercida pela probe a uma dada distância x (mm), que corresponde à força do gel (*gel strength*) (PONS e FISZMAN, 1996).

Já a coesividade é um parâmetro que pode ser calculado a partir da razão entre as áreas positivas do segundo e do primeiro ciclo de compressão, representadas pelas áreas 2 e 1 da Figura 2, respectivamente, e está relacionada com as forças internas do gel, pois mede o grau de dificuldade para romper a estrutura interna (FRIEDMAN *et al.*, 1963; LAU *et al.*, 2000). Quanto mais semelhantes forem as áreas 1 e 2, mais coeso será o gel.

A adesividade é o trabalho requerido para superar as forças de atração entre a superfície da probe e a amostra, no momento em que esta é retirada da amostra, após a primeira compressão, e é calculada a partir da área negativa do gráfico da força *versus* tempo, representada pela área 3 da Figura 2 (FRIEDMAN *et al.*, 1963; PONS e FISZMAN, 1996).

As características mecânicas de um hidrogel dependem de diversos fatores, dentre eles, as estruturas químicas dos polímeros constituintes e a organização espacial das cadeias poliméricas na rede tridimensional. Por exemplo, a forma nativa acilada da goma gelana em água origina géis fracos, elásticos e não quebradiços, já a forma desacilada origina géis firmes, não elásticos e quebradiços (CHANDRASEKARAN *et al.*, 1988; RINAUDO e MILAS, 2000).

A análise de TPA, antes utilizada simplesmente como um método de caracterização física de formas farmacêuticas semissólidas, tem se mostrado um estudo importante no delineamento de sistemas de liberação baseados em hidrogéis, uma vez que os resultados que descrevem as propriedades mecânicas de um material são úteis para correlacionar a relação entre estrutura do sistema e seu desempenho terapêutico, além de fornecer informações sobre propriedades do hidrogel que podem afetar diretamente a liberação do fármaco incorporado (HURLER *et al.*, 2012).

2.1.2 Reologia

Após a administração, as formas farmacêuticas podem apresentar mudanças em suas propriedades físico-químicas em função do tempo e do contato com fluidos biológicos, como, por exemplo, geleificação, intumescimento, mudança na viscosidade, erosão, promovendo alterações de suas propriedades reológicas que podem influenciar o perfil de liberação dos fármacos por elas veiculados. Portanto, é de fundamental importância o estudo das propriedades de deformação e fluxo, bem como dos fatores que influenciam as propriedades reológicas e seus efeitos nas diversas formas farmacêuticas, em especial os hidrogéis (LEE *et al.*, 2009).

A reologia, termo derivado do grego *rheo*, que significa fluir, e *logos*, que significa ciência, estuda e descreve a deformação dos corpos quando submetidos a tensões, sejam eles sólidos, líquidos ou gases (SCHRAMM, 2006; SINKO e LONGER, 2008).

Um sólido ideal sob tensão se deforma elasticamente, e pode ser comparado a uma mola, em que toda a energia aplicada em sua deformação é armazenada e totalmente recuperada ao se remover a tensão, ou seja, o sólido ideal sob tensão apresenta uma resposta puramente elástica e segue a lei de Hook (Equação 1), em que τ é a tensão de cisalhamento, G é o módulo de Young, que corresponde à resistência à deformação e γ é a taxa de cisalhamento.

$$\tau = G \times \gamma \quad \text{Equação 1}$$

Já os fluidos ideais (líquidos ou gases) fluem sob tensão e sofrem uma deformação irreversível, de modo que toda energia aplicada em sua deformação é dissipada e nada se recupera ao se remover a força, assim, o fluido ideal sob tensão apresenta uma resposta puramente viscosa e segue a lei de Newton (Equação 2), em que τ é a tensão de cisalhamento, η é a viscosidade e γ é a taxa de cisalhamento.

$$\tau = \eta \times \gamma \quad \text{Equação 2}$$

A maioria dos materiais apresenta comportamento reológico entre os fluidos e os sólidos ideais, ou seja, não apresentam apenas características de fluido ideal, puramente viscoso, nem apenas características de sólido ideal, puramente elástico, mas sim uma combinação de ambos os comportamentos, e, portanto, são denominados materiais viscoelásticos, já que apresentam uma componente viscosa e uma componente elástica (SCHRAMM, 2006).

O método principal para avaliar as propriedades viscoelásticas de hidrogéis é a reologia (YAN e POCHAN, 2010). A partir de ensaios de escoamento, fluência-relaxação e oscilação em reômetros, é possível avaliar propriedades de hidrogéis, como, por exemplo, a viscosidade, o comportamento viscoelástico e a força da estrutura.

O módulo G' é o módulo elástico ou de armazenamento, e representa a rigidez do material, ou seja, seu comportamento sólido, enquanto G'' é o módulo viscoso ou de perda, e representa o fluxo ou o comportamento de fluido do material. Quando $G' > G''$, o hidrogel comporta-se mais como um sólido elástico. Quando $G'' > G'$, o hidrogel comporta-se mais como um líquido viscoso (YAN e POCHAN, 2010).

3 OBJETIVOS

Caracterizar dispersões de GG e P quanto à citotoxicidade, potencial zeta e massa molecular para serem utilizadas na obtenção de micro e nanopartículas mucoadesivas para

liberação cólon-específica do resveratrol. Obter hidrogéis a partir da mistura destes dois polímeros, através da reticulação iônica ou iônica/covalente, empregando AlCl_3 e glutaraldeído como agentes reticulantes, e avaliar suas propriedades mecânicas através das análises de TPA e reologia.

4 METODOLOGIAS

4.1 Principais substâncias e equipamentos

Goma gelana de baixa acilação (Kelcogel[®] CG-LA), pectina de baixo grau de metoxilação (DE 24,1%) Genu[®] LM-5206 CS (CP Kelco), resveratrol (Galena), ácido clorídrico (Quimis), hidróxido de sódio (Grupo Química), fosfato de sódio tribásico dodecahidratado (Henrifarma), cloreto de alumínio hexahidratado (Vetec).

Agitador magnético (Quimis), balança analítica (Mettler Toledo), bomba a vácuo TE-058 (Tecnal), peagômetro digital (Micronal), analisador de partículas Zetasizer Nano ZS[®] (Malvern Instruments).

4.2 Estudos das dispersões poliméricas

4.2.1 Obtenção de dispersões de GG e P

As dispersões aquosas de cada polímero (GG ou P) utilizadas nos experimentos descritos a seguir foram preparadas em água purificada, em diferentes concentrações, sob agitação magnética e aquecimento (80°C) durante 20 minutos para a completa dispersão dos polímeros, em béquer vedado para evitar perdas por evaporação.

4.2.2 Avaliação *in vitro* da citotoxicidade em células Caco-2 e HT29-MTX

Os modelos baseados em células Caco-2 são amplamente reconhecidos, aceitos e aplicados como modelos intestinais para a avaliação da citotoxicidade de compostos químicos sobre os enterócitos (CANO-SANCHO *et al.*, 2015), portanto células Caco-2 foram utilizadas no presente estudo. As células HT29-MTX são capazes de secretar muco e foram utilizadas para avaliar a influência do muco na citotoxicidade.

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados no Instituto de Investigação e Inovação em Saúde (I3S) da Universidade do Porto (Porto, Portugal), durante o doutorado-sanduíche, em colaboração com o grupo de pesquisa do Prof. Dr. Bruno Sarmiento.

4.2.2.1 Cultura de células

Células de linhagem de adenocarcinoma de cólon humano Caco-2 (C2BBel, passagens 54 a 60) obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC, Estados Unidos) e células HT29-MTX (passagens 35 a 39), gentilmente cedidas pelo Dr. T. Lesuffleur (INSERMU178, Villejuif, França) foram cultivadas separadamente em garrafas de 75 cm², segundo as condições padrão de cultura de células em meio DMEM suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino, 1% (v/v) de aminoácidos não essenciais e 1% (v/v) de complexo penicilina (100 UI/mL) – estreptomicina (100 µg/mL) em incubadora com atmosfera umedecida à 37° C, com 5% de CO₂ e 95% de O₂. As culturas estoques de células Caco-2 e HT29-MTX foram cultivadas em monocamadas e passadas para novas garrafas ao atingirem uma densidade subconflente de 70 – 80%, utilizando tripsina/EDTA.

4.2.2.2 Teste de viabilidade celular através do ensaio do MTT

A fim de determinar a citotoxicidade *in vitro* da goma gelana e da pectina, realizou-se o teste de viabilidade celular empregando linhagens celulares Caco-2 e HT29-MTX.

A viabilidade celular foi avaliada empregando-se o teste de redução do MTT, que permite avaliar as células viáveis devido à capacidade que estas possuem de metabolizar o reagente do MTT, levando a formação de cristais roxos de formazan (DEY e SREENIVASAN, 2014).

Após serem cultivadas como descrito anteriormente, as células foram semeadas a uma densidade de 0,12 x 10⁶ células/poço em placas de 24 poços e a uma densidade de 0,02 x 10⁶ células/poço em placas de 96 poços, e incubadas com meio DMEM suplementado, em atmosfera umedecida à 37° C, com 5% de CO₂ e 95% de O₂. Permitiu-se a fixação das células por 24h antes da adição de dispersões dos polímeros isolados.

Dispersões poliméricas foram preparadas em água purificada à 10 mg/mL, sob agitação magnética à 80 °C e as diluições foram preparadas em HBSS. As concentrações avaliadas foram de 50, 150, 300, 400 e 500 µg/mL para as placas de 96 poços e de 500, 1000, 1500, 2000 e 2500 µg/mL para as placas de 24 poços, em quadruplicata.

Após a fixação das células, aspirou-se o meio de cultura e os poços foram lavados com tampão fosfato-salino (PBS) à 37°C para a completa remoção do DMEM. As células foram então incubadas em HBSS na presença dos polímeros por 24h sob as mesmas condições descritas anteriormente.

O controle de células viáveis foi realizado incubando-as apenas na presença de HBSS e o controle para morte celular foi feito incubando-as na presença de Triton-X (1%, v/v) também em HBSS. O branco consistiu apenas em meio HBSS sem a presença de células nos poços.

Após o período de incubação na presença dos polímeros, as amostras foram removidas dos poços, que foram então lavados uma vez com tampão fosfato-salino e adicionou-se o reagente MTT na concentração de 0,5 mg/mL, preparado em HBSS, à 37°C. As placas foram protegidas da luz e incubadas à 37°C por 4 h para a formação dos cristais de formazan.

Em seguida, o reagente do MTT foi removido e adicionou-se dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilização dos cristais formados. As placas permaneceram sob agitação no leitor de placas Synergy 2[®] (Biotek Instruments) por 10 min para a completa solubilização dos cristais antes da leitura da absorbância, realizada por espectrofotometria na região do visível em 590 e 630 nm no mesmo leitor de placas.

A porcentagem de células viáveis (%) foi calculada através da Equação 3:

$$Viabilidade\ celular\ (\%) = \frac{Abs_{amostra}}{Abs\ média_{cél\ vivos\ controle}} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

em que $Abs_{amostra}$ é a absorbância após a incubação das células com as diferentes amostras e $Abs\ média_{cél\ vivos\ controle}$ é a absorbância média do controle de células viáveis.

4.2.3 Avaliação do potencial zeta das dispersões poliméricas

4.2.3.1 Análise da influência do pH no potencial zeta

Dispersões dos polímeros GG e P foram preparadas na concentração de 0,5 mg/mL em água purificada ou solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,1M, sob agitação magnética a 80°C, mantida por 30 min até completa homogeneização. O béquer foi vedado para evitar perdas por evaporação. O pH das dispersões foi ajustado para valores entre 1 e 12, utilizando-se HCl ou NaOH (0,1 e 1 M) e medido em peagômetro digital (Micronal[®]). O potencial zeta foi medido através da mobilidade eletroforética em equipamento Zetasizer Nano ZS[®] (Malvern Instruments).

4.2.3.2 Análise da influência da concentração no potencial zeta

Dispersões aquosas dos polímeros GG e P foram preparadas em diferentes concentrações (0,9; 0,8; 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3 e 0,2 mg/ml) a partir de uma solução estoque a 1,0 mg/ml. O pH foi mantido no valor original das pelas dispersões aquosas dos polímeros,

sendo pH 5,4 para a GG e pH 6,14 para a P. O potencial zeta foi medido através da mobilidade eletroforética em equipamento Zetasizer Nano ZS[®] (Malvern Instruments).

4.2.4 Determinação da massa molecular dos polímeros pela técnica de *static light scattering*

As dispersões aquosas dos polímeros GG e P em diferentes concentrações (0,1 – 0,9 mg/ml) foram preparadas sob agitação magnética em capela de fluxo laminar utilizando-se água purificada (Milli-Q) filtrada em membrana de 0,22µm, para evitar a interferência de partículas contaminantes nas medidas de espalhamento de luz. A massa molecular (MM) foi determinada em instrumento Zetasizer Nano ZS[®], que foi calibrado utilizando como padrão o tolueno, previamente filtrado em membrana de politetrafluoretileno (PTFE, 0,2 µm) presa a um suporte de membranas em aço inoxidável utilizando seringa de vidro neutro. O incremento de índice de refração com a concentração (dn/dc) adotado para a GG foi de 0,150 mL/g (GRASDALEN e SMIDSRØD, 1987) e para a P foi de 0,155 mL/g.

4.3 Obtenção de hidrogéis de GG:P reticulados ionicamente

Para a obtenção dos hidrogéis reticulados ionicamente, dispersões aquosas de misturas de GG:P (1:1 e 4:1) a 2,5% (m/V) foram preparadas sob agitação magnética a 80°C, durante 20 minutos para a completa dispersão dos polímeros.

Para a reticulação iônica utilizou-se como agente reticulante o AlCl₃ na concentração de 3 ou 5% ($m_{\text{reticulante}}/m_{\text{polímeros secos}}$). As dispersões poliméricas foram mantidas sob agitação mecânica (agitador IKA[®]) a 300 rpm e 50°C, e a solução aquosa de agente reticulante foi gotejada com auxílio de bomba peristáltica (Pump P-1, Pharmacia Biotech) com fluxo de 1 mL/min. A concentração final das dispersões poliméricas reticuladas foi de 2% (m/V). Após a adição do agente reticulante, as amostras foram mantidas sob agitação mecânica a 100 rpm, em temperatura ambiente por 20 minutos adicionais, transferidas para tubos de centrifugação e centrifugadas a 2.000 rpm por 2 minutos (Sorvall TC) a fim de remover bolhas de ar incorporadas durante o processo.

4.4 Obtenção de hidrogéis de GG:P duplamente reticulados

Para a obtenção dos hidrogéis duplamente reticulados, dispersões aquosas de misturas de GG:P (1:1 e 4:1) a 2,5% (m/V) foram preparadas sob agitação magnética a 80°C, durante 20 minutos para a completa dispersão dos polímeros.

Para a dupla reticulação utilizou-se o AlCl_3 a 3 ou 5% ($m_{\text{reticulante}}/m_{\text{polímeros secos}}$) como agente da reticulação iônica e o glutaraldeído a 0,5 ou 1% ($m_{\text{reticulante}}/m_{\text{polímeros secos}}$) como agente da reticulação covalente.

As dispersões poliméricas foram mantidas sob agitação mecânica (agitador IKA[®]) a 300 rpm e 50°C e, primeiramente, a solução aquosa de AlCl_3 foi adicionada com auxílio de bomba peristáltica (Pump P-1, Pharmacia Biotech) com fluxo de 1 ml/min. Em seguida, adicionou-se da mesma maneira a solução aquosa de glutaraldeído. A concentração final das dispersões poliméricas duplamente reticuladas foi de 2% (m/V). Após a adição dos agentes reticulantes, as amostras foram mantidas sob agitação mecânica a 100 rpm, em temperatura ambiente por 20 minutos adicionais, transferidas para tubos de centrifugação e centrifugadas a 2.000 rpm por 2 minutos (Sorvall TC) a fim de remover bolhas de ar incorporadas durante o processo de reticulação.

As amostras foram denominadas de acordo com a proporção GG:P (1:1 e 4:1 como GP11 e GP41, respectivamente), a concentração de AlCl_3 (3% e 5% como A13 e A15, respectivamente) e a concentração de glutaraldeído (0,5% e 1% como G0,5 e G1, respectivamente). Na Tabela 1 estão apresentadas as composições de cada amostra obtida, com os respectivos rótulos.

Tabela 1: Composições dos hidrogéis de GG:P selecionados para os estudos de TPA e reologia

Hidrogel	Proporção GG:P	AlCl_3 (%)	Glutaraldeído (%)
GP11	1:1	0,0	0,0
GP11_A13	1:1	3,0	0,0
GP11_A15	1:1	5,0	0,0
GP11_A13_G0,5	1:1	3,0	0,5
GP11_A13_G1	1:1	3,0	1,0
GP11_A15_G0,5	1:1	5,0	0,5
GP11_A15_G1	1:1	5,0	1,0
GP41	4:1	0,0	0,0
GP41_A13	4:1	3,0	0,0
GP41_A15	4:1	5,0	0,0
GP41_A13_G0,5	4:1	3,0	0,5
GP41_A13_G1	4:1	3,0	1,0
GP41_A15_G0,5	4:1	5,0	0,5
GP41_A15_G1	4:1	5,0	1,0

4.5 Avaliação das propriedades mecânicas dos hidrogéis

As propriedades mecânicas dos hidrogéis foram avaliadas em texturômetro TA-XT Plus[®] (Stable Micro Systems), operando em modo TPA (*Texture profile analysis*). Os hidrogéis

submetidos aos testes de TPA foram preparados de acordo com os itens 3.3 e 3.4, com 24 h de antecedência e foram mantidos em tubos de centrifugação devidamente vedados para evitar perda de água por evaporação.

Para as análises, utilizou-se uma probe cilíndrica de 10 mm de diâmetro, a uma velocidade de pré-teste de 1 mm/s e velocidade de teste e pós-teste de 0,5 mm/s. A probe penetrou a amostra até uma distância de 10 mm, com força de gatilho (*trigger force*) de 0,002 N e o tempo entre os dois ciclos de compressão foi de 5 s (CARDOSO *et al.*, 2017). Os parâmetros mecânicos avaliados a partir de curvas de força *versus* tempo foram dureza, coesividade e adesividade e a partir de curvas de força *versus* distância avaliou-se a elasticidade e a força do gel, sendo esta última determinada à uma distância fixa de 1 mm (BALOGLU *et al.*, 2011). Os testes foram realizados em quintuplicata.

4.6 Estudo das propriedades reológicas dos hidrogéis de GG:P

Os hidrogéis foram preparados conforme descrito nos itens 3.3 e 3.4, com 24h de antecedência e foram mantidos em tubos de centrifugação devidamente vedados para evitar perda de água por evaporação. Os ensaios oscilatórios dinâmicos para avaliação do comportamento viscoelástico dos hidrogéis foram realizados em reômetro AR2000ex[®] (TA Instruments), utilizando geometria placa-placa (40 mm de diâmetro), gap de 1000 µm para os hidrogéis reticulados e de 200 µm para os hidrogéis não reticulados, e temperatura de 37°C com 30s de tempo de equilíbrio antes do início dos testes. Os ensaios de varredura de tensão e varredura de frequência foram realizados em triplicata.

4.6.1 Varredura de tensão

Os hidrogéis GP41_AI3 e GP41_AI5_G1 foram selecionados como representantes dos hidrogéis com o menor e o maior grau de reticulação, respectivamente, e foram submetidos a um teste de varredura de tensão entre 0,1 a 10,0 Pa mantendo-se constante a frequência angular de 6,283 rad.s⁻¹ a fim de determinar a faixa de viscoelasticidade linear e, assim, selecionar o valor de tensão para realização dos testes de varredura de frequência.

4.6.2 Varredura de frequência

Na varredura de frequência, a tensão foi fixada a um valor constante, escolhido dentro da região de viscoelasticidade linear e variou-se a frequência angular, obtendo-se os espectros

mecânicos. Todos os hidrogéis foram submetidos ao teste de varredura de frequência angular que variou entre 0,628 a 628,3 rad.s⁻¹ sob tensão constante de 1,0 Pa.

4.7 Análise estatística dos resultados

Os dados foram tratados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA), seguida por comparações múltiplas pelo método de Tukey. Foi adotado nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Além do estudo do produto final, é de fundamental importância o estudo prévio e a caracterização das matérias primas empregadas no desenvolvimento de um novo sistema de liberação, tendo em vista a grande variabilidade que apresentam em função da sua fonte de origem natural (NGUYEN *et al.*, 2011).

Dessa forma, a caracterização das dispersões de goma gelana e de pectina pode fornecer informações importantes para a melhor compreensão do comportamento dos sistemas micro e nanoestruturados que darão origem.

5.1 Avaliação *in vitro* da citotoxicidade

O uso de polissacarídeos naturais no delineamento de sistemas de liberação controlada de fármacos desperta grande interesse, pois estes materiais provenientes de fontes naturais e renováveis apresentam importantes características como biodegradabilidade, relativo baixo custo, ampla disponibilidade na natureza, além de serem aceitos para consumo humano. No entanto, a citotoxicidade é uma importante característica que deve ser avaliada, pois reflete a biocompatibilidade desses materiais. Os ensaios *in vitro* são ferramentas úteis para isso, pois permitem detectar se as substâncias produzem efeitos letais em nível celular, em um curto espaço de tempo.

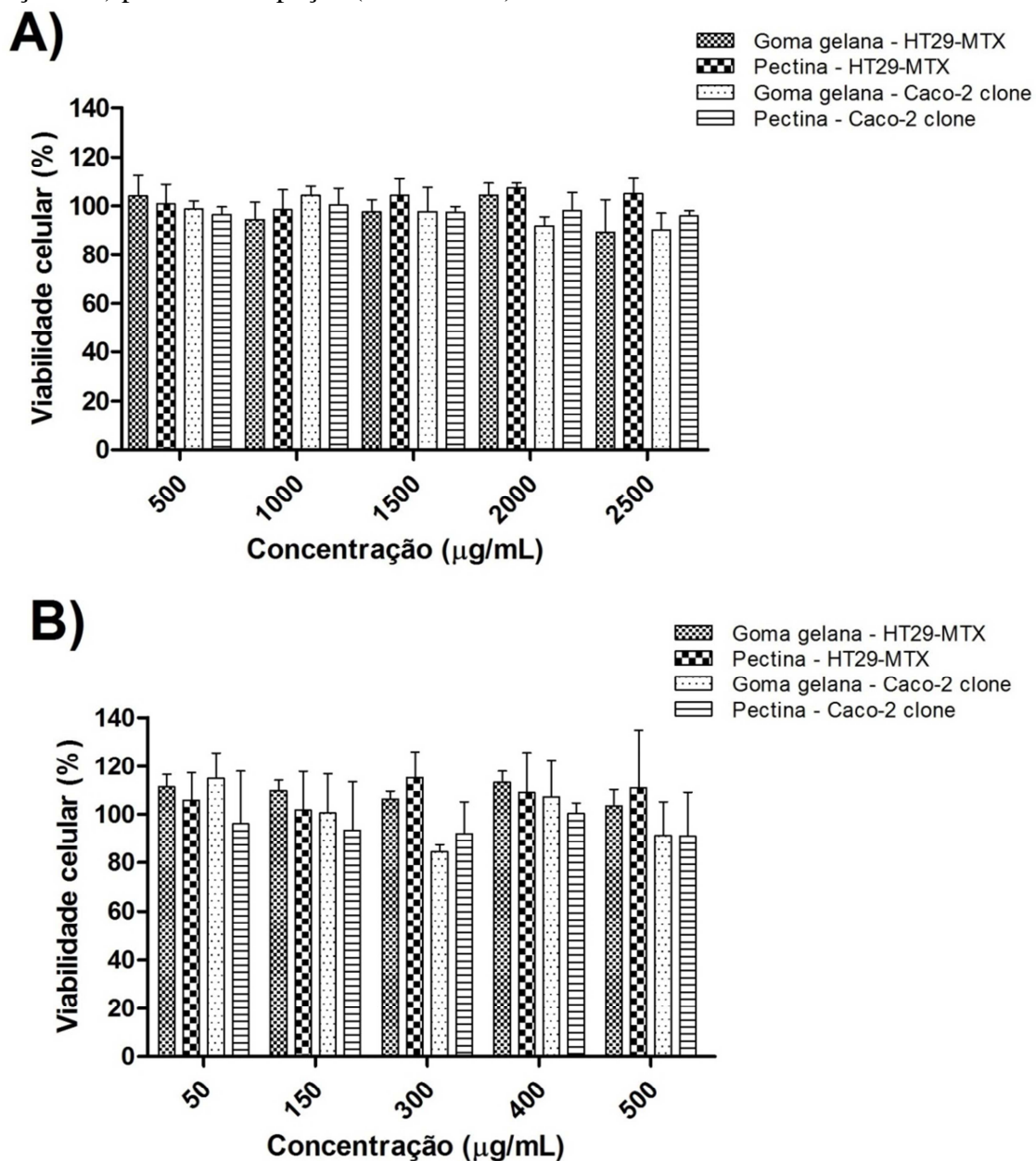
O teste do MTT emprega o sal tetrazol (brometo de 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol), que na presença de desidrogenases mitocondriais das células viáveis é clivado, originando cristais de formazan insolúveis em água, porém solúveis em DMSO. A diminuição no número de células viáveis origina uma menor quantidade de cristais de formazan, que é monitorado pela absorbância na região do visível, indicando assim o grau de citotoxicidade (MATIAS *et al.*, 2010).

Para esse ensaio, considerou-se um limiar para toxicidade de 70% de células viáveis, segundo a norma ISO 10993-5:2009, abaixo do qual as amostras foram consideradas citotóxicas.

As diferentes concentrações de GG e P avaliadas em placas de 24 e 96 poços, com áreas de 1,90 e 0,32 cm²/poço, respectivamente, foram selecionadas como comparativo às concentrações de polímeros presentes nas microesferas e nas nanopartículas utilizadas nos testes de citotoxicidade dos sistemas desenvolvidos e apresentados nos Capítulos III e IV.

Os resultados de viabilidade celular (%) após incubação das células HT29-MTX e Caco-2 com diferentes concentrações de GG e P estão apresentados na Figura 3.

Figura 3: Viabilidade celular (%) de células das linhagens HT29-MTX e Caco-2 após 24h de incubação na presença de goma gelana e pectina em diferentes concentrações em A) placas de 24 poços e B) placas de 96 poços (média ± DP).



É possível observar que ambos os polímeros não promoveram redução da viabilidade celular de células das linhagens Caco-2 e HT29-MTX após 24h de incubação, seja nas elevadas concentrações avaliadas em placas de 24 poços (Figura 3A) ou nas baixas concentrações das placas de 96 poços (Figura 3B).

Após esse período, na presença de concentrações crescentes de GG, a viabilidade (%) de células HT29-MTX e Caco-2 foram maiores que 89,4% e 90,2%, respectivamente para a placa de 24 poços (Figura 3A) e 103,4 e 84,4% respectivamente para a placa de 96 poços (Figura 3B).

Após a incubação dessas mesmas linhagens celulares com concentrações crescentes de P por 24h, a porcentagem de células HT29-MTX viáveis foi superior a 98,5% para a placa de 24 poços e superior a 101,8% para a placa de 96 poços. Já para a linhagem Caco-2, os resultados foram superiores a 96,0% para a placa de 24 poços e 90,9% para a placa de 96 poços (Figuras 3A e 3B).

A cada concentração testada, não se observou diferenças significativas na viabilidade celular das células Caco-2 quando incubadas com GG ou com P, nem para as células HT29-MTX, em ambas as placas utilizadas ($p > 0.05$).

O aumento da concentração de GG ou P não alterou a viabilidade das células HT29-MTX ou Caco-2 de maneira significativa em nenhuma das placas ($p > 0.05$).

Os resultados mostram que a GG e a P são polímeros não tóxicos para as células Caco-2 e HT29-MTX dentro das concentrações avaliadas.

5.2 Avaliação do potencial zeta das dispersões poliméricas

O conhecimento das propriedades elétricas das dispersões de polissacarídeos, como por exemplo, o seu potencial zeta (PZ), é crucial para se obter sistemas funcionais e estáveis a partir delas, principalmente quando o objetivo é a obtenção de partículas através de técnicas baseadas na interação de cargas, como é o caso da geleificação ionotrópica (FANUN, 2010; CARNEIRO-DA-CUNHA *et al.*, 2011).

Além disso, as propriedades dos materiais que irão compor um sistema de liberação podem fornecer informações importantes para prever, compreender e descrever os comportamentos do sistema, como, por exemplo, o mecanismo de liberação do fármaco ao atingir um determinado sítio (FANUN, 2010).

A densidade de cargas superficiais é uma propriedade elétrica de grande influência para os sistemas coloidais e pode ser utilizada para prever a interação com biomoléculas, explicar fenômenos como mucoadesividade e pode, até mesmo, estar correlacionada à eficiência de encapsulação de fármacos (CHENG e LIM, 2004; FANUN, 2010; SARAF, 2010).

Neste estudo, o PZ foi utilizado como indicador das cargas de dispersões de GG e P, e avaliou-se a influência do pH e da força iônica do meio, bem como da concentração de polímeros sobre o PZ, a fim de gerar informações que possibilitassem o delineamento racional de micro e nanopartículas por geleificação ionotrópica, e, posteriormente, que auxiliassem na explicação de comportamentos exibidos por esses sistemas.

5.2.1 Análise da influência do pH no potencial zeta

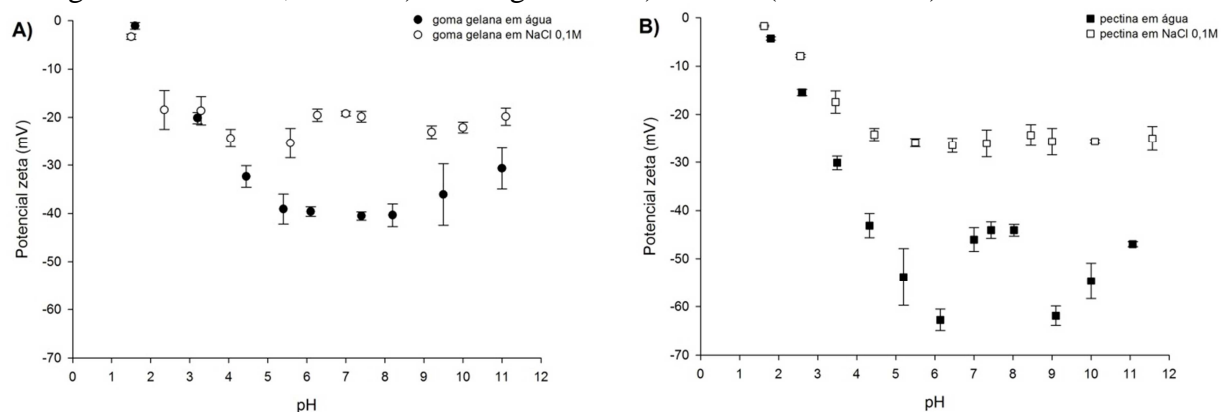
O conhecimento do PZ permite a caracterização das propriedades eletroquímicas de superfície, um parâmetro significativo para a caracterização e aplicação de polímeros nas áreas biomédica e farmacêutica (SALGIN *et al.*, 2012).

Os polissacarídeos podem apresentar-se neutros ou carregados positiva ou negativamente, dependendo dos grupos funcionais que possuem e o meio em que se encontram (CARNEIRO-DA-CUNHA *et al.*, 2011). O PZ representa essa carga superficial resultante da dissociação ou ionização de grupos funcionais ou da adsorção diferenciada de íons da solução à superfície do polímero (SALGIN *et al.*, 2012).

A GG e a P, quando dispersas em água com pH neutro, apresentam carga superficial negativa, como consequência da ionização dos grupos carboxílicos, por isso são consideradas polissacarídeos aniônicos. Essa carga superficial é dependente das características do meio, como por exemplo, a força iônica e tipo de íons presentes, e se altera com a variação do pH da fase aquosa, pois a variação está diretamente relacionada à dissociação dos grupos funcionais e à adsorção de íons (CHENG e LIM, 2004; FERMIN e RILEY, 2010; SALGIN *et al.*, 2012).

Os gráficos abaixo apresentam os resultados do PZ (mV) em função do pH de dispersões de GG (Figura 4A) e de dispersões de P (Figura 4B) em meios com diferentes forças iônicas (água e NaCl 0,1M).

Figura 4: Gráficos do potencial zeta em função do pH do meio para as dispersões poliméricas em água e em NaCl 0,1M de A) Goma gelana e B) Pectina (média \pm DP).



É possível observar que em baixos valores de pH ocorreu a redução da carga negativa das dispersões, com valores próximos a zero em pH próximo a 1,0. A GG apresenta $pK_a \approx 3,5$ e a P apresenta pK_a entre 3 e 4; portanto, na presença de excesso de íons H^+ (meio ácido) ocorre a protonação dos ânions carboxilatos, reduzindo a carga negativa das moléculas.

Entretanto, em valores de pH mais elevados, acima do pK_a dos polímeros, ocorre a desprotonação dos grupos carboxílicos e a carga negativa aumenta. Os valores de PZ, em módulo, aumentaram até atingir um equilíbrio, devido à máxima desprotonação dos grupos carboxílicos das cadeias poliméricas.

Para dispersões de GG em água o equilíbrio foi atingido a partir do pH 4,5, acima do qual não se observou diferença significativa entre os valores de PZ ($p > 0,05$). O mesmo foi observado para a P em água, em que a variação de pH acima de 4,5 não alterou de maneira significativa o PZ das dispersões ($p > 0,05$). Entre pH 4,5 e 11,0, o PZ médio da GG em água foi de $-37,0 \pm 4,0$ mV e o da P foi de $-50,8 \pm 7,7$ mV.

Também se observou um equilíbrio nos valores de PZ da GG e da P em NaCl 0,1M, sem diferenças significativas a partir de pH 2,4 para a GG e de pH 3,5 para a P. Entre pH 4,5 e 11,0, o PZ médio da GG neste meio foi de $-21,1 \pm 2,5$ mV e o da P foi de $-24,5 \pm 2,8$ mV.

Além do efeito do pH sobre o PZ, a concentração e o tipo de sal presente na dispersão polimérica também afetam a carga elétrica das moléculas, e, portanto, o PZ (SALGIN *et al.*, 2012).

A influência da força iônica do meio foi avaliada comparando-se os valores de PZ das dispersões em água e em NaCl 0,1M nos diferentes valores de pH. É possível observar que as dispersões em NaCl 0,1M apresentaram menor densidade de carga negativa que as dispersões aquosas, principalmente na região de pH em que ocorre a máxima desprotonação dos grupos carboxílicos (Figuras 4A e 4B). Para a P, os valores em módulo do PZ em NaCl 0,1M foram significativamente menores que em água para toda a faixa de pH avaliada ($p < 0,05$). Já para a GG, em $pH < 3,2$ não houve diferença significativa entre o PZ nos diferentes meios ($p > 0,05$), entretanto, à partir de pH 4,5, os valores em módulo foram significativamente menores no meio de maior força iônica ($p < 0,05$).

O aumento da força iônica do meio através da adição de sais, neste caso o NaCl, provoca uma compressão na dupla camada elétrica e conseqüentemente reduz o PZ (JAYME *et al.*, 1999; SALGIN *et al.*, 2012).

A presença de cátions, como o Na^+ , em solução é capaz de alterar o PZ e também propriedades conformacionais de polissacarídeos. CARNEIRO-DA-CUNHA *et al.* (2011)

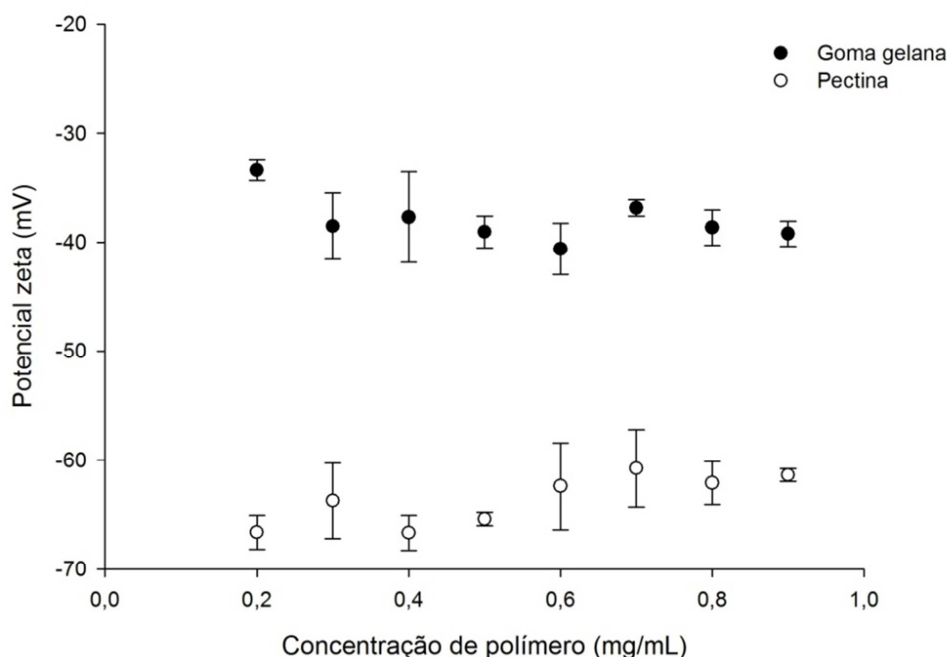
demonstraram a redução do PZ de soluções dos polissacarídeos aniônicos carragena, alginato de sódio e galactomananas com o aumento da concentração de NaCl no meio.

Os resultados observados para a P estão de acordo com MCCONAUGHY *et al.* (2008), que avaliaram o efeito de diferentes concentrações de sais (NaCl e KCl) sobre o PZ de dispersões de pectina extraída da planta aloe vera, e demonstraram a redução do PZ de -80mV em água, para aproximadamente -25mV com a adição de NaCl 0,1M.

5.2.2 Análise da influência da concentração no potencial zeta

A concentração polimérica não influenciou significativamente o potencial zeta das dispersões aquosas de GG ou de P ($p > 0,05$), mantendo praticamente constante a densidade de cargas negativas. Entretanto, as dispersões de P apresentaram invariavelmente maior densidade de carga que as de goma gelana, com uma média de -63,6 mV contra -37,9 mV, respectivamente, como pode ser observado no gráfico apresentado na Figura 5.

Figura 5: Gráfico do potencial zeta (mV) em função da concentração (mg/mL) das dispersões aquosas de GG (pH 5,4) e P (pH 6,14) (média \pm DP).



A partir dos resultados do PZ em função da concentração, pH e força iônica do meio, e tendo em vista que a formação das micro e nanopartículas por geleificação ionotrópica depende da presença de cargas negativas para reagirem com os íons Al^{3+} do agente reticulante, optou-se

por trabalhar com dispersões de misturas GG:P em água e pH 5,0, em que a máxima densidade de carga negativa está presente.

5.3 Determinação da massa molecular dos polímeros pela técnica de *static light scattering* (SLS)

A massa molecular (MM) juntamente com a carga do polímero em diferentes condições são fatores que podem influenciar tanto as características finais do sistema, quanto o próprio processo de obtenção, especialmente por metodologias que envolvam a interação entre cargas opostas, como a geleificação ionotrópica (NGUYEN *et al.*, 2011).

Dentre as diversas propriedades que caracterizam os polímeros, a MM pode ser considerada uma das mais importantes propriedades físicas, pois dela dependem diversas outras, como a solubilidade, taxa de dissolução, rigidez, formação de géis, dentre outras. Sendo assim, é um importante parâmetro a ser avaliado para os polímeros empregados na obtenção de carreadores de fármacos, não só como uma ferramenta de controle de qualidade, mas para a obtenção de sistemas com características reprodutíveis, principalmente quando se emprega polissacarídeos naturais de estruturas altamente variáveis e dependentes da sua fonte de obtenção e método de extração, como, por exemplo, a pectina.

O desenvolvimento de detectores de espalhamento de luz simplificou o modo de determinação de MM de polímeros (CORREDIG *et al.*, 2000). A técnica que utiliza espalhamento de luz estático (*Static Light Scattering*) permite estudar tamanho e forma de macromoléculas em solução a partir da luz espalhada em uma direção. É uma técnica relativamente simples, rápida, de fácil realização, e tem sido empregada no estudo de propriedades conformacionais de polissacarídeos (SOME, 2013).

Essa técnica mede a intensidade de espalhamento total média durante um período de tempo para uma faixa de concentração de soluto, neste caso os polissacarídeos, e permite avaliar forma, tamanho e interações dos centros que espalham a luz em solução. Além da MM média, pode-se obter informação sobre outros parâmetros moleculares como raio de giro (R_g) e segundo coeficiente virial (A_2), relacionados com a forma do centro espalhador e com a interação entre as moléculas, respectivamente (WANG *et al.*, 2005; SOME, 2013).

Como os polímeros podem apresentar cadeias de comprimentos variáveis, há uma distribuição de tamanhos e, portanto, uma distribuição de MM, assim a MM corresponde a um valor médio. A MM média e o segundo coeficiente virial (A_2) obtidos por SLS estão apresentados na Tabela 2:

Tabela 2: Resultados de MM média e segundo coeficiente virial (A_2) da GG e da P, obtidos por *Static Light Scattering* (média \pm DP).

Polissacarídeo	A_2 (10^{-3} mL x mol/g ²)	MM média (kDa)
Goma gelana	22,10 \pm 1,88	116,00 \pm 20,80
Pectina	0,85 \pm 0,18	383,00 \pm 22,40

Os coeficientes viriais são uma medida quantitativa de interações intermoleculares inespecíficas, como aquelas mediadas pelo solvente, como, por exemplo, interações devido à presença de cargas, dipolos, forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas, etc (SOME, 2013). Pode-se avaliar como essas interações entre as moléculas são afetadas por diferentes solventes, medindo-se a variação do coeficiente virial com a variação do meio. Também pode ser utilizado para avaliar tanto as interações entre moléculas iguais de um único soluto, quanto entre moléculas de diferentes solutos. Como as macromoléculas em altas concentrações apresentam interações inespecíficas em algum grau, esse parâmetro (A_2) é particularmente interessante no desenvolvimento de formulações farmacêuticas, uma vez que permite uma medida da estabilidade da formulação e da propensão de biomoléculas agregarem quando em solução (SOME e KENRICK, 2012).

O segundo coeficiente virial pode assumir valores negativos ou positivos, indicando interações atrativas ou repulsivas entre os centros espalhadores de luz, respectivamente (ENOKI, 2010; SOME e KENRICK, 2012). A GG e a P apresentaram valores positivos de A_2 (Tabela 2), o que indica a repulsão eletrostática entre as cadeias poliméricas, uma vez que no pH das soluções aquosas ambos encontram-se carregados negativamente.

A GG comercial utilizada neste trabalho (Kelcogel[®] CG-LA) apresentou MM média de 116 \pm 20 kDa ($r^2=0,97$), valor bem próximo ao declarado pelo fabricante, que é de 200 a 300 kDa (Kelcogel: **gellan gum book**, 2007).

As características das pectinas como graus de metoxilação e amidação, tamanho de cadeia e açúcares constituintes são amplamente variáveis de acordo com a sua fonte natural e os métodos de extração empregados (LEVIGNE *et al.*, 2002). Sua MM é um parâmetro intrínseco fundamental e tem sido correlacionada como fator bastante influente sobre as propriedades de soluções e a consequente geleificação de pectinas de baixa metoxilação (MCCONAUGHY *et al.*, 2008). A pectina utilizada neste trabalho, tipo LM5206-CS[®] (CP Kelco), não amidada e de baixo grau de metoxilação, comercialmente disponível e extraída da casca de frutas cítricas apresentou MM de 383 \pm 22 kDa ($r^2=0,92$).

As pectinas podem variar muito em relação às suas MM médias, entretanto o valor encontrado está próximo ao reportado por MCCONAUGHY *et al.* (2008), que avaliaram a

massa molecular de pectinas extraídas da planta aloe vera e encontraram valores entre 200 e 523 kDa.

5.4 Obtenção de hidrogéis de GG:P reticulados ionicamente e duplamente reticulados

Os hidrogéis são redes tridimensionais e hidrofílicas, capazes de intumescer, absorvendo grandes quantidades fluidos biológicos, mantendo íntegras as suas estruturas (GUPTA *et al.*, 2002).

Para a formação de um hidrogel é indispensável a reticulação das cadeias poliméricas, pois os pontos de ligação entre as macromoléculas é que farão com que a rede mantenha sua estrutura preservada. A reticulação química ou física confere essa integridade e a característica de insolubilidade da rede em água (GUPTA *et al.*, 2002).

Os hidrogéis foram reticulados ionicamente através da reação com cloreto de alumínio em concentrações previamente estabelecidas de 3 e 5% (PREZOTTI, 2013), e duplamente reticulados pela adição de glutaraldeído aos hidrogéis reticulados ionicamente. A proporção entre os polímeros também foi previamente determinada a partir de resultados prévios que demonstraram a possibilidade de obtenção de microesferas com características promissoras para atuarem como sistemas de liberação (PREZOTTI, 2013).

Os hidrogéis obtidos foram avaliados quanto às características mecânicas e reológicas.

5.5 Avaliação das propriedades mecânicas dos hidrogéis

As propriedades mecânicas são importantes parâmetros que permitem avaliar a viabilidade do uso de hidrogéis em certas aplicações, como, por exemplo, em sistemas de liberação de fármacos (YAN e POCHAN, 2010), uma vez que as características de dureza, elasticidade, força do gel, coesividade e adesividade podem influenciar no desempenho dos sistemas obtidos a partir de misturas poliméricas.

A reticulação química é um método eficaz e versátil no delineamento de sistemas matriciais com boa estabilidade mecânica (HENNINK e VAN NOSTRUM, 2012).

No estudo de TPA foram avaliados os efeitos da proporção polimérica GG:P e da concentração de agentes reticulantes $AlCl_3$ e glutaraldeído, para a reticulação iônica e covalente, respectivamente, sobre as propriedades mecânicas dos hidrogéis, as quais podem se correlacionar com os mecanismos de liberação do fármaco. Dessa forma, esses dados podem ser importante ferramenta para o delineamento de sistemas de liberação controlada com

características específicas, além de permitir a avaliação de possíveis interações entre os polissacarídeos.

Os resultados das diferentes propriedades mecânicas avaliadas através do teste de TPA estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Valores de dureza, elasticidade, força do gel, coesividade e adesividade dos hidrogéis de GG e P reticulados ionicamente ou duplamente reticulados (média±DP).

Hidrogel	Dureza (g)	Elasticidade (mm)	Força do gel (g)	Coesividade	Adesividade (g.s)
GP11_AI3	20,98 ± 1,43	1,88 ± 0,11	11,42 ± 0,93	0,33 ± 0,03	18,36 ± 3,68
GP11_AI5	30,49 ± 2,08	1,72 ± 0,29	22,46 ± 4,88	0,35 ± 0,02	62,76 ± 4,14
GP11_AI3_G0,5	14,96 ± 0,93	1,88 ± 0,28	10,50 ± 1,14	0,40 ± 0,02	35,90 ± 3,84
GP11_AI3_G1	22,73 ± 2,47	1,81 ± 0,14	14,68 ± 2,24	0,32 ± 0,02	20,52 ± 3,41
GP11_AI5_G0,5	34,98 ± 3,17	1,43 ± 0,20	25,79 ± 6,06	0,33 ± 0,02	84,96 ± 8,19
GP11_AI5_G1	37,57 ± 3,53	1,69 ± 0,13	26,13 ± 4,23	0,37 ± 0,01	87,16 ± 6,98
GP41_AI3	21,08 ± 1,01	2,49 ± 0,17	11,40 ± 1,06	0,47 ± 0,02	78,71 ± 3,75
GP41_AI5	19,45 ± 1,36	2,42 ± 0,46	12,98 ± 1,15	0,46 ± 0,02	76,55 ± 6,41
GP41_AI3_G0,5	39,88 ± 2,45	2,21 ± 0,22	22,69 ± 3,28	0,40 ± 0,02	90,70 ± 7,30
GP41_AI3_G1	35,90 ± 6,83	2,45 ± 0,3	15,31 ± 4,09	0,40 ± 0,03	75,06 ± 6,22
GP41_AI5_G0,5	34,64 ± 2,19	1,29 ± 0,07	30,81 ± 2,00	0,40 ± 0,01	131,20 ± 8,25
GP41_AI5_G1	81,88 ± 4,95	1,63 ± 0,17	54,44 ± 8,71	0,33 ± 0,03	169,30 ± 12,84

Os hidrogéis não reticulados obtidos a partir dos polímeros isolados (GG ou P a 2%) apresentaram baixa viscosidade, e, portanto, o teste de TPA não pôde ser realizado, uma vez que o gráfico da força *versus* tempo não interceptou o eixo *x* (dados não apresentados).

5.5.1 Dureza

A dureza está relacionada com a força da estrutura do gel, e representa sua força de resistência à deformação por compressão, isto é, a máxima força requerida para sua deformação, sendo obtida do gráfico de força *versus* tempo (LAU *et al.*, 2000; CARDOSO *et al.*, 2017).

Para os hidrogéis G:P 1:1 reticulados ionicamente, a maior concentração de cloreto de alumínio (5%) originou géis de maior dureza ($p < 0,05$). Para essa mesma proporção (1:1), os hidrogéis duplamente reticulados apresentaram maior dureza que os reticulados ionicamente ($p < 0,05$), exceto para as amostras GP11_AI3_G0,5 e GP11_AI3_G1.

Para os hidrogéis G:P 4:1 reticulados ionicamente, a concentração de cloreto de alumínio não alterou a dureza de maneira significativa ($p > 0,05$). Entretanto a dupla reticulação originou, invariavelmente, hidrogéis de maior dureza que a reticulação iônica ($p < 0,05$).

O maior grau de reticulação obtido com ambos os reticulantes nas maiores concentrações (5 e 1%) e a proporção G:P 4:1 permitiram a formação de um hidrogel de maior dureza (GP41_A15_G1 – 81,88 g) ($p < 0,05$).

A introdução de ligações covalentes entre as cadeias poliméricas origina uma rede muito mais resistente mecanicamente, o que reflete na maior força necessária para romper a estrutura do gel, que é mais firme, resultando em maiores valores de dureza (PACELLI *et al.*, 2015).

A proporção G:P 4:1 originou hidrogéis de maior dureza que os compostos pela mistura G:P 1:1 ($p < 0,05$).

A maior concentração de GG na proporção 4:1 deve ter originado uma rede mais densa e empacotada, devido à orientação em dupla hélice observada para as cadeias desse polímero quando geleificado (MIYOSHI *et al.*, 1995), as quais originam uma estrutura mais organizada, e contribuem para a formação de hidrogéis mais firmes e que apresentam, portanto, maior dureza.

De fato, estudos têm relatado que a presença da GG favorece a dureza do hidrogel (LAU *et al.*, 2000; HUANG *et al.*, 2007). LAU e co-autores (2000) demonstraram o aumento da dureza em razão do aumento da proporção de goma gelana em misturas com gelatina tipo B reticuladas com íons Ca^{2+} . Em estudo com hidrogéis obtidos a partir de misturas de diferentes tipos de amido de arroz e diferentes polissacarídeos, reticulados com CaCl_2 , o aumento da concentração de GG favoreceu a dureza dos géis (HUANG *et al.*, 2007).

5.5.2 Elasticidade

Pequenas distâncias de penetração da probe antes da ruptura estrutural indicam uma baixa elasticidade do gel, enquanto distâncias maiores indicam géis mais elásticos.

A concentração de cloreto de alumínio não alterou significativamente a elasticidade dos hidrogéis reticulados ionicamente, para ambas as proporções avaliadas (1:1 e 4:1).

A dupla reticulação não influenciou significativamente a elasticidade dos hidrogéis G:P 1:1 ($p > 0,05$), entretanto reduziu a elasticidade dos hidrogéis G:P 4:1 na presença da maior concentração de reticulante iônico (GP41_A15_G0,5 e GP41_A15_G1), tornando-os mais quebradiços ($p < 0,05$).

A proporção G:P 4:1 originou hidrogéis de maior elasticidade que os compostos pela mistura G:P 1:1 ($p < 0,05$), o que deve estar relacionado à elevada organização estrutural das cadeias de goma gelana em dupla hélice, que permitem que o gel sofra uma deformação e retome a forma inicial, conferindo elasticidade à rede.

5.5.3 Força do gel

A força do gel, assim como a dureza, está relacionada à estrutura do gel, pois reflete a força que o gel suporta antes de se romper. No entanto esse parâmetro, diferentemente da dureza, é obtido a partir da curva de força *versus* distância, sendo que a distância é fixada em um valor no qual não se observa a ruptura do gel, no estágio inicial de pouca deformação.

Como a menor distância de ruptura observada entre todas as amostras analisadas foi de 1,14 mm, fixou-se o valor de 1 mm para medir a força do gel, pois à essa distância todos os géis testados se apresentavam com deformações pequenas e estruturas não rompidas.

Observou-se uma correlação em que os hidrogéis de menor e maior dureza também apresentaram a menor e a maior força (GP11_A13_G0,5 e GP41_A15_G1, respectivamente).

Para as amostras reticuladas ionicamente, a maior concentração de AlCl_3 (5%) originou hidrogéis mais fortes somente entre a proporção G:P 1:1 ($p < 0,05$), assim como observado para a dureza.

Para os hidrogéis de proporção 1:1, a dupla reticulação não alterou a força do gel ($p > 0,05$).

Para as amostras de proporção 4:1, a dupla reticulação originou géis mais fortes que os reticulados ionicamente ($p < 0,05$) exceto para o gel GP41_A13_G1 ($p > 0,05$). Sendo que, como observado nos resultados de dureza, o hidrogel GP41_A15_G1, de maior grau de reticulação e proporção 4:1 foi o hidrogel mais forte (0,534 N) ($p < 0,05$).

Entre os duplamente reticulados, a proporção G:P 4:1 originou os hidrogéis mais fortes ($p < 0,05$). Conforme observado para a dureza, as ligações covalentes introduzidas entre as cadeias poliméricas, somada à estrutura altamente organizada em dupla hélice devido à maior proporção de GG, originou uma rede muito mais resistente, que impõe uma maior resistência à probe mesmo a uma pequena distância de penetração no gel, e reflete a maior força da estrutura.

5.5.4 Coesividade

A coesividade reflete o grau de dificuldade em romper a estrutura interna de um gel e é obtida a partir das áreas positivas do gráfico de força *versus* tempo. Quanto mais coeso, mais fortemente interconectada é a estrutura e mais difícil é o rompimento de sua rede (LAU *et al.*, 2000; CARDOSO *et al.*, 2017).

A concentração de AlCl_3 não alterou de maneira significativa a coesividade dos hidrogéis reticulados ionicamente, tanto para a proporção 1:1 quanto para a proporção 4:1 ($p > 0,05$).

Na proporção 1:1, não houve diferença estatisticamente significativa entre a reticulação iônica e a dupla reticulação ($p > 0,05$). Já para a proporção G:P 4:1, a dupla reticulação reduziu a coesividade, sendo a amostra GP41_A15_G1 a menos coesa (0,334) ($p < 0,05$).

Dentre os hidrogéis reticulados ionicamente, aqueles que continham maior proporção de gelana (4:1) foram mais coesos que os de proporção G:P 1:1 ($p < 0,05$), sendo que os hidrogéis GP41_A13 e GP41_A5 foram os que apresentaram maior coesividade dentre todas as amostras avaliadas ($p < 0,05$).

A proporção G:P 4:1 também originou os hidrogéis duplamente reticulados mais coesos ($p < 0,05$).

Dentre os hidrogéis duplamente reticulados, as maiores concentrações de agente reticulante iônico e covalente (5 e 1%, respectivamente) originaram redes menos coesas ($p < 0,05$). A associação das reticulações iônica e covalente origina redes mais reticuladas, com estruturas menos flexíveis devido à introdução de ligações covalentes entre as cadeias poliméricas, que reduzem a capacidade de deformação da malha e a torna mais quebradiça, e, sob tensão aplicada pela probe, rompem-se mais facilmente (CARDOSO *et al.*, 2017).

Esses resultados sugerem que a estrutura interna dos géis duplamente reticulados são rompidas mais facilmente sob a primeira força de compressão, enquanto que as amostras submetidas à reticulação iônica apresentaram uma matriz mais coesa, que não se rompeu completamente durante o primeiro ciclo de compressão, necessitando de mais energia para serem rompidas no segundo ciclo do teste.

5.5.5 Adesividade

Para os hidrogéis obtidos a partir da mistura G:P 1:1 reticulados ionicamente, a maior concentração de cloreto de alumínio (5%) originou géis de maior adesividade ($p < 0,05$). Dentre os hidrogéis com essa mesma proporção (1:1), os duplamente reticulados apresentaram maior adesividade que os reticulados ionicamente ($p < 0,05$), exceto para as amostras GP11_A13_G0,5 e GP11_A13_G1. Mesmo comportamento foi observado para a dureza dessas amostras.

A concentração de cloreto de alumínio não alterou de maneira significativa a adesividade dos hidrogéis G:P 4:1 reticulados ionicamente ($p > 0,05$). Entretanto, para essa proporção, a dupla reticulação originou hidrogéis mais adesivos ($p < 0,05$), sendo que a amostra GP41_A15_G1 foi a que apresentou maior adesividade dentre todas as avaliadas (169,30 g.s) ($p < 0,05$).

A proporção G:P 4:1 originou os hidrogéis mais adesivos, tanto para os reticulados ionicamente quanto para os duplamente reticulados ($p < 0,05$).

A confirmação da adesividade dos hidrogéis que passaram por processo de reticulação foi significativa, pois é uma característica fundamental que deve ser preservada, uma vez que o objetivo é a obtenção de sistemas mucoadesivos em escalas micro e nanométrica para a liberação colônica do resveratrol.

Os resultados de dureza, elasticidade, força do gel, coesividade e adesividade demonstraram que essas propriedades foram significativamente afetadas pela composição e grau de reticulação dos hidrogéis, sendo possível a obtenção de diferentes estruturas a partir da combinação de diferentes proporções entre GG e P e diferentes concentrações de agentes reticulantes iônico (AlCl_3) e covalente (glutaraldeído). Por exemplo, a dureza dos géis pôde ser aumentada com o aumento da proporção de goma gelana na mistura polimérica, o mesmo ocorreu com a adesividade, sendo que a dupla reticulação também apresentou um efeito positivo sobre essa propriedade.

5.6 Estudo das propriedades reológicas dos hidrogéis de GG:P

As características reológicas dos hidrogéis devem ser conhecidas, uma vez que podem influenciar o perfil e as taxas de liberação do fármaco a partir da matriz geleificada (FREITAS *et al.*, 2006). Os ensaios reológicos oscilatórios de varredura de tensão e varredura de frequência permitem avaliar as propriedades reológicas dos materiais e foram realizados a fim de caracterizar o comportamento dos hidrogéis de GG:P reticulados ionicamente e duplamente reticulados.

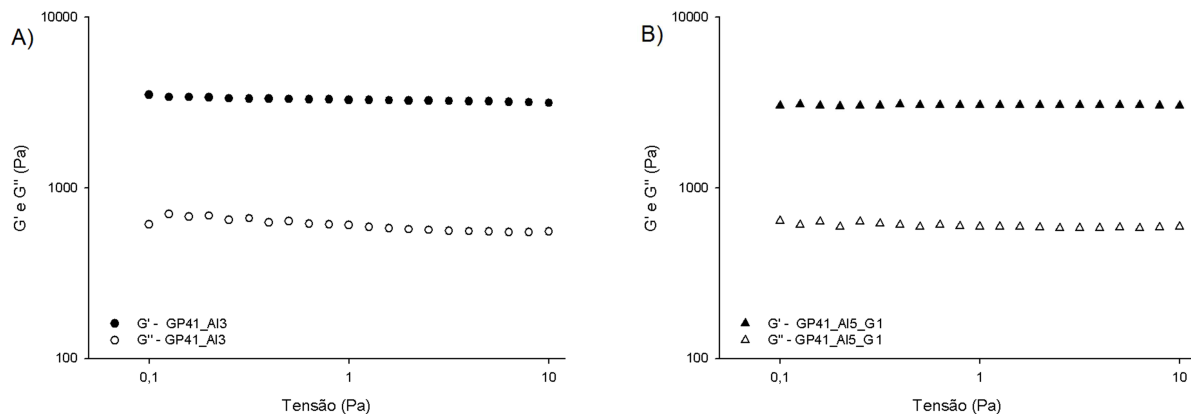
5.6.1 Varredura de tensão

O teste de varredura de tensão, no qual se varia a tensão aplicada a uma frequência angular fixa, fornece informação sobre a faixa de viscoelasticidade linear, que corresponde à região em que os valores de G' e G'' mantêm-se constantes com a variação da tensão aplicada. Nesta faixa não ocorrem mudanças permanentes na estrutura original da amostra (SCHRAMM, 2006).

A partir desses dados pode-se escolher o valor de tensão (força por unidade de área, medida em Pascal) a ser utilizado nos testes de varredura de frequência. A vantagem de se trabalhar utilizando um valor de tensão dentro da faixa de viscoelasticidade linear é que a deformação do material é muito pequena, o que significa que a estrutura interna da amostra é preservada durante a obtenção dos espectros mecânicos (FREITAS *et al.*, 2006).

Na Figura 6 estão apresentados os espectros da varredura de tensão do hidrogel reticulado ionicamente (GP41_AI3) e do hidrogel duplamente reticulado (GP41_AI5_G1), que foram selecionados para determinar a faixa de viscoelasticidade linear.

Figura 6: Espectros da varredura de tensão para determinação da faixa de viscoelasticidade linear de A) dispersão polimérica reticulada ionicamente (GP41_AI3) e B) dispersão polimérica duplamente reticulada (GP41_AI5_G1).



A partir dos espectros apresentados, foi possível observar uma ampla faixa de viscoelasticidade linear, em que os valores de G' e G'' mantiveram-se constantes para toda a faixa de tensão aplicada, de 0 a 10 Pa. Dessa maneira, selecionou-se tensão de 1,0 Pa para ser aplicada na obtenção dos espectros mecânicos nos testes de varredura de frequência.

5.6.2 Varredura de frequência

A partir dos espectros mecânicos (gráficos de G' e G'' versus frequência angular) é possível avaliar o comportamento viscoelástico das amostras e os resultados fornecem informações sobre a força da estrutura dos géis, se estes são mais fortes ou mais fracos (MARTÍNEZ-RUVALCABA *et al.*, 2007; SOARES *et al.*, 2013).

Dispersões aquosas de polímeros hidrofílicos em concentrações baixas a moderadas, para as quais a reticulação física não é expressiva a ponto de originar hidrogéis, geralmente apresentam comportamento de um fluido newtoniano. Entretanto, a introdução de ligações cruzadas devido à reticulação da dispersão polimérica altera seu comportamento, e as redes obtidas passam a exibir um comportamento viscoelástico, podendo em alguns casos ser puramente elástico (HENNINK e VAN NOSTRUM, 2012).

O comportamento reológico dos hidrogéis foi avaliado em termos de G' , que representa o módulo elástico ou de armazenamento, e de G'' , que representa o módulo viscoso ou de perda

(MAHDI *et al.*, 2015). A viscosidade complexa (η^*) também pôde ser obtida através dos ensaios oscilatórios realizados.

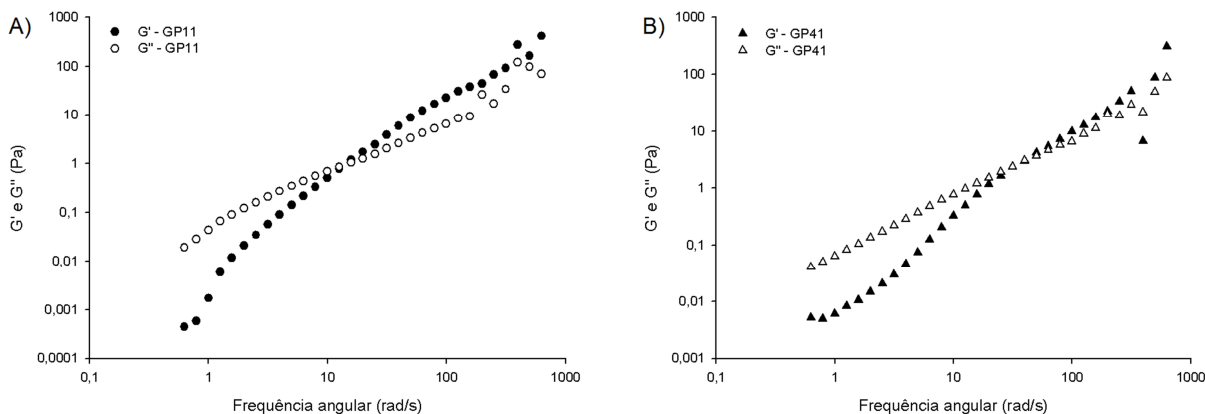
Os valores de G' , G'' e η^* dos hidrogéis à tensão de 1 Pa e frequência de 6,283 rad/s estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Valores de G' , G'' e η^* para os hidrogéis à tensão de 1 Pa e frequência de 6,283 rad/s (média \pm DP; n=3).

Hidrogel	G' (Pa)	G'' (Pa)	η^* (Pa.s)
GP11	0,22 \pm 0,20	0,44 \pm 0,21	0,33 \pm 0,16
GP11_A13	27,24 \pm 7,72	9,24 \pm 2,44	4,58 \pm 1,29
GP11_A15	860,65 \pm 47,45	159,05 \pm 7,14	139,30 \pm 7,64
GP11_A13_G0,5	84,83 \pm 0,10	19,19 \pm 0,83	13,84 \pm 0,04
GP11_A13_G1	248,90 \pm 49,01	49,98 \pm 7,94	44,93 \pm 1,45
GP11_A15_G0,5	670,10 \pm 118,76	115,37 \pm 17,49	108,21 \pm 19,06
GP11_A15_G1	462,17 \pm 102,15	93,52 \pm 18,57	65,60 \pm 3,06
GP41	0,12 \pm 0,08	0,48 \pm 0,14	0,08 \pm 0,03
GP41_A13	2070,33 \pm 96,62	385,50 \pm 20,13	335,20 \pm 15,50
GP41_A15	1250,00 \pm 97,58	226,75 \pm 17,75	202,20 \pm 15,84
GP41_A13_G0,5	1437,67 \pm 131,70	277,33 \pm 25,43	233,03 \pm 21,36
GP41_A13_G1	1866,33 \pm 204,96	335,37 \pm 46,05	320,35 \pm 13,36
GP41_A15_G0,5	576,15 \pm 42,07	104,91 \pm 7,48	93,21 \pm 6,81
GP41_A15_G1	2411,67 \pm 351,40	468,07 \pm 64,36	391,00 \pm 56,82

Para as dispersões poliméricas não reticuladas, à tensão de 1 Pa e frequência de 6,283 rad/s, G'' foi o dobro de G' para a amostra GP11 e, para a amostra GP41, G'' foi quatro vezes maior que G' (Tabela 4). A Figura 7 apresenta os espectros mecânicos dessas dispersões (GP11 e GP41), nos quais é possível observar que a baixas frequências há predomínio de G'' , portanto um comportamento predominantemente viscoso.

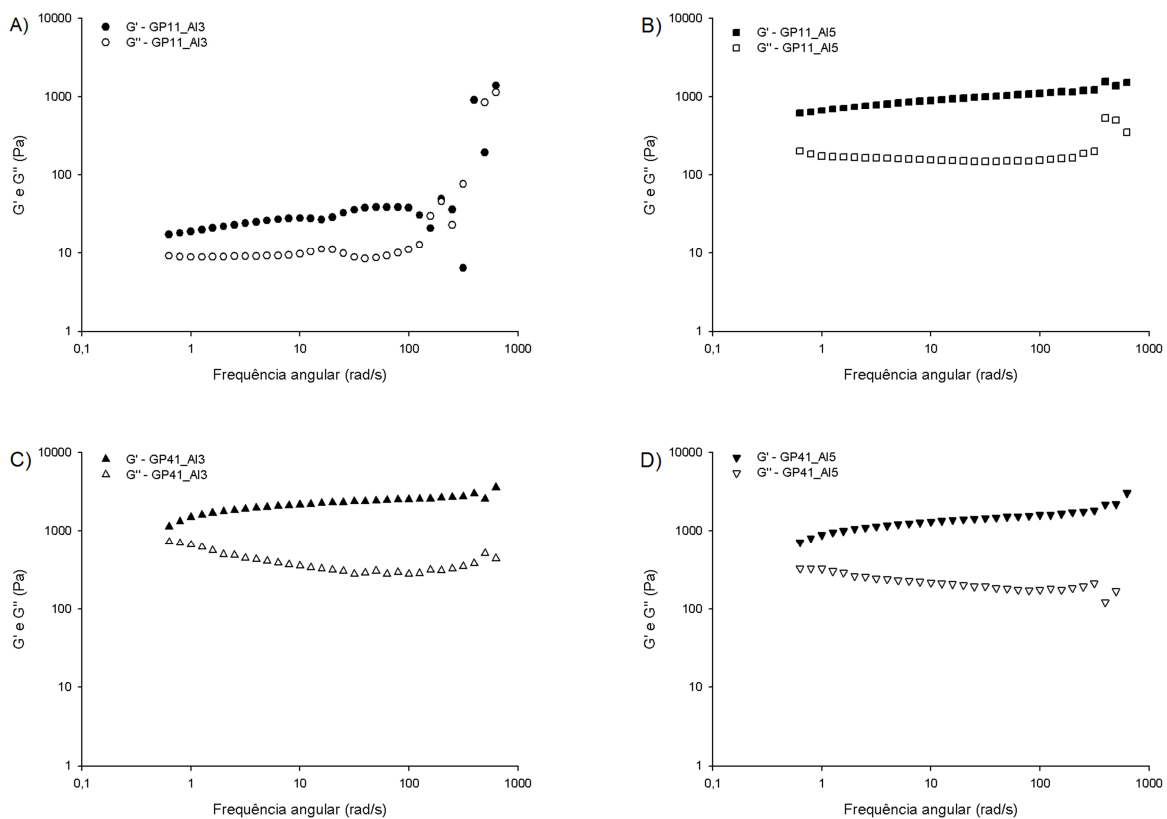
Figura 7: Espectros mecânicos dos hidrogéis não reticulados A) GP11 e B) GP41.



Nestes espectros ocorre um ponto de cruzamento entre G' e G'' , a partir do qual passa a predominar o comportamento elástico, em que G' é maior que G'' . O módulo elástico (G') mostrou-se dependente da frequência, sendo que, com o aumento da frequência, ocorreu um aumento de G' (Figura 7). O comportamento apresentado indica que as dispersões de GG:P não reticuladas originam hidrogéis mais fracos estruturalmente se comparados aos hidrogéis reticulados (KHONDKAR *et al.*, 2007; CARDOSO, 2014).

Os espectros mecânicos dos hidrogéis reticulados ionicamente estão apresentados na Figura 8.

Figura 8: Espectros mecânicos dos hidrogéis reticulados ionicamente A) GP11_AI3; B) GP11_AI5; C) GP41_AI3 e D) GP41_AI5.

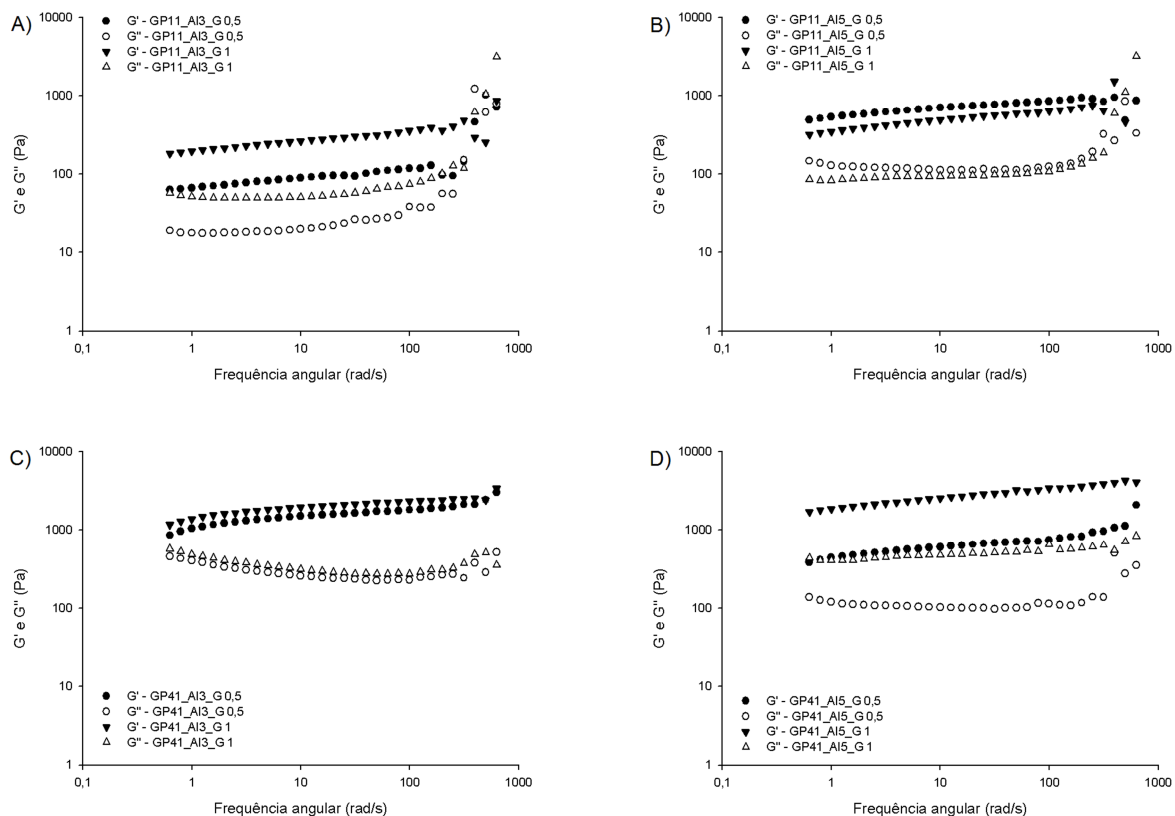


Pode-se observar que, de fato, a reticulação altera o comportamento reológico, sendo que os hidrogéis de GG:P obtidos pela reticulação iônica exibiram um comportamento predominantemente elástico para toda a faixa de frequência angular avaliada, observado pela predominância de G' sobre G'' , diferentemente dos hidrogéis não reticulados (Figura 7). Ainda, para a amostra GP11_AI5 é possível observar que os valores de G' e G'' foram praticamente independentes da frequência angular (Figura 8 B).

Para esses hidrogéis reticulados ionicamente, G' apresentou valor 3 vezes maior que G'' para a amostra GP11_AI3 e para as demais amostras, os valores de G' foram aproximadamente cinco vezes maior que G'' (Tabela 4).

Os espectros mecânicos dos hidrogéis duplamente reticulados estão apresentados na Figura 9.

Figura 9: Espectros mecânicos dos hidrogéis duplamente reticulados A) GP11_AI3_G0,5 e GP11_AI3_G1; B) GP11_AI5_G0,5 e GP11_AI5_G1; C) GP41_AI3_G0,5 e GP41_AI3_G1 e D) GP41_AI5_G0,5 e GP41_AI5_G1.



Os valores de G' permaneceram maiores que valores de G'' por toda a varredura de frequência para os hidrogéis duplamente reticulados, sendo que em alguns casos, quase retas paralelas são observadas, o que evidencia a predominância da característica elástica dos géis.

Os hidrogéis reticulados ionicamente e duplamente reticulados, apresentaram comportamento de géis elásticos, uma vez que houve uma predominância de G' , de cerca de cinco vezes maior que G'' (exceto para o hidrogel GP11_AI3, para o qual G' foi 3 vezes maior que G'') (Tabela 4).

A densidade de reticulação dos hidrogéis pode ser determinada com base nos estudos reológicos, a partir da Equação 4 (SAXENA *et al.*, 2011):

$$G' = S\omega^n \quad \text{Equação 4}$$

em que G' é o módulo de armazenamento, S é a resistência do gel, ω é a frequência oscilatória e n o expoente viscoelástico, sendo S e n parâmetros indicativos da densidade de reticulação do gel.

Foi avaliada a correlação dos dados dos espectros mecânicos com a equação acima, e os valores dos coeficientes de determinação (r^2) e dos parâmetros S e n estão apresentados na Tabela 5:

Tabela 5: Valores dos parâmetros S e n e dos coeficientes de determinação (r^2) obtidos para os diferentes hidrogéis de GG:P.

Hidrogel	S	n	r^2
GP11	0,025	1,482	0,997
GP11_A13	19,716	0,160	0,966
GP11_A15	685,402	0,111	0,985
GP11_A13_G0,5	67,251	0,119	0,987
GP11_A13_G1	196,262	0,124	0,996
GP11_A15_G0,5	545,132	0,101	0,988
GP11_A15_G1	358,084	0,128	0,991
GP41	0,023	1,314	0,999
GP41_A13	1591,757	0,113	0,901
GP41_A15	949,662	0,125	0,940
GP41_A13_G0,5	1108,762	0,116	0,942
GP41_A13_G1	1466,780	0,109	0,946
GP41_A15_G0,5	454,929	0,114	0,970
GP41_A15_G1	1883,371	0,128	0,994

Segundo Saxena e co-autores (2011), quanto maior o valor de S e menor o valor de n , maior é a densidade de reticulação da rede que forma o hidrogel (SAXENA *et al.*, 2011).

Para os hidrogéis não reticulados GP11 e GP41, os baixos valores de S (0,025 e 0,023, respectivamente) e elevados valores de n (1,48 e 1,31, respectivamente) indicam a estrutura fraca e menos reticulada, quando comparadas aos hidrogéis reticulados ionicamente e duplamente reticulados. Os resultados corroboram com os espectros mecânicos obtidos para essas amostras. Comportamento semelhante foi observado por Cardoso (2014) para hidrogéis de misturas de amido retrogradado e goma gelana não reticulados (CARDOSO, 2014).

Os valores de S dos hidrogéis reticulados ionicamente variaram entre 19,72 e 1591,76, e os valores de n variaram entre 0,11 e 0,16 (Tabela 5). Para os hidrogéis duplamente reticulados, os valores de S variaram entre 67,251 e 1883,37 e os valores de n entre 0,10 e 0,13 (Tabela 5). Os maiores valores de S e menores valores de n apresentados pelos hidrogéis duplamente reticulados indicam que a associação entre a reticulação iônica e covalente originou redes mais fortes e mais reticuladas.

Dentre as amostras duplamente reticuladas, os hidrogéis obtidos a partir da proporção G:P 1:1 apresentaram valor médio de S de 291,68 e valor médio de n de 0,118. Já os hidrogéis obtidos a partir da proporção G:P 4:1 apresentaram valor médio de S de 1228,46 e o valor médio de n de 0,117. Os maiores valores de S e os menores valores de n apresentados pelas amostras de proporção G:P 4:1 indicam redes de maior densidade de reticulação.

A maior concentração de GG deve contribuir para a formação de uma rede mais densa e empacotada, bem como para a formação de uma estrutura mais organizada, pois após a geleificação desse polissacarídeo, suas cadeias apresentam-se bastante ordenadas, na forma de dupla hélice, agregadas nas zonas de junção (MIYOSHI *et al.*, 1995).

Nos últimos anos, os sistemas baseados em hidrogéis que respondem a estímulos específicos têm demonstrado grande potencial devido a sua resposta ativa a estímulos externos, tais como temperatura, pH, presença de íons e enzimas específicas (FAN *et al.*, 2010). Os hidrogéis desenvolvidos e caracterizados neste capítulo podem atuar como SLCF e foram empregados na obtenção de sistemas micro e nanométricos para a liberação do resveratrol, e serão apresentados nos próximos capítulos.

6 CONCLUSÕES

Foi demonstrado que os polissacarídeos naturais GG e P apresentaram um comportamento não citotóxico nas concentrações testadas frente às células Caco-2 e HT29-MTX.

O comportamento pH dependente do potencial zeta das dispersões poliméricas foi demonstrado e os dados obtidos, além de servirem como base para a determinação do pH mais adequado para a obtenção dos sistemas micro e nanoparticulados, devem contribuir para a interpretação dos mecanismos de mucoadesão dos sistemas obtidos a partir desses materiais.

Os hidrogéis avaliados apresentaram comportamentos mecânicos e reológicos altamente dependentes de suas composições, variando conforme o grau de reticulação e a proporção entre GG e P.

Os resultados do estudo das propriedades mecânicas dos hidrogéis demonstraram que a variação da proporção entre GG:P e ambos os tipos de reticulação promoveram mudanças significativas nas matrizes poliméricas obtidas, sendo que os hidrogéis preparados a partir da proporção G:P 4:1 apresentaram maiores valores de dureza, elasticidade, coesividade e adesividade, independentemente do grau de reticulação. Também foi observado que nesta mesma proporção (4:1), quando submetidos à dupla reticulação, as estruturas dos hidrogéis foram mais fortes.

O processo de reticulação iônica e iônica/covalente das dispersões de GG:P permitiu a obtenção de hidrogéis mais resistentes e de comportamento viscoelástico, conforme demonstrado pelos ensaio de TPA e reologia.

Os resultados apresentados neste capítulo demonstraram que a mistura de dois polissacarídeos naturais, associada a modificações químicas, através do processo de reticulação, resultaram em hidrogéis de variadas características mecânicas e reológicas, as quais podem ser moduladas, ao variar proporção polimérica e concentração de diferentes reticulantes, para atender necessidades específicas do uso pretendido.

Os dados apresentados neste capítulo também servem como base para o entendimento e a explicação de comportamentos apresentados por sistemas de liberação de fármacos obtidos a partir de hidrogéis de misturas de GG e P, como as microesferas e as nanopartículas desenvolvidas e apresentadas nos próximos capítulos.

REFERÊNCIAS

- BALOGLU, E.; KARAVANA, S. Y.; SENYIGIT, Z. A.; GUNERI, T. Rheological and mechanical properties of poloxamer mixtures as a mucoadhesive gel base. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 16, n. 6, p. 627-636, 2011/12/01 2011.
- BIGUCCI, F.; LUPPI, B.; MONACO, L.; CERCHIARA, T.; ZECCHI, V. Pectin-based microspheres for colon-specific delivery of vancomycin. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, n. 1, p. 41-46, 2009.
- BONI, F. I.; PREZOTTI, F. G.; CURY, B. S. F. Gellan gum microspheres crosslinked with trivalent ion: Effect of polymer and crosslinker concentrations on drug release and mucoadhesive properties. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, p. 1-29, 2015.
- CALÓ, E.; KHUTORYANSKIY, V. V. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. **European Polymer Journal**, v. 65, p. 252-267, 2015.
- CANO-SANCHO, G.; GONZÁLEZ-ARIAS, C. A.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V.; FERNÁNDEZ-CRUZ, M. L. Cytotoxicity of the mycotoxins deoxynivalenol and ochratoxin A on Caco-2 cell line in presence of resveratrol. **Toxicology in Vitro**, v. 29, n. 7, p. 1639-1646, 2015.
- CAO, S.-L.; REN, X.-W.; ZHANG, Q.-Z.; CHEN, E.; XU, F.; CHEN, J.; LIU, L.-C.; JIANG, X.-G. In situ gel based on gellan gum as new carrier for nasal administration of mometasone furoate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 365, n. 1, p. 109-115, 2009.
- CARBINATTO, F. M.; DE CASTRO, A. D.; CURY, B. S. F.; MAGALHÃES, A.; EVANGELISTA, R. C. Physical properties of pectin–high amylose starch mixtures cross-linked with sodium trimetaphosphate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 423, n. 2, p. 281-288, 2012.
- CARBINATTO, F. M.; DE CASTRO, A. D.; EVANGELISTA, R. C.; CURY, B. S. F. Insights into the swelling process and drug release mechanisms from cross-linked pectin/high amylose starch matrices. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 1, p. 27-34, 2014.
- CARBINATTO, F. M.; RIBEIRO, T. S.; COLNAGO, L. A.; EVANGELISTA, R. C.; CURY, B. S. F. Preparation and Characterization of Amylose Inclusion Complexes for Drug Delivery Applications. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, n. 1, p. 231-241, 2016.
- CARDOSO, V. M. D. O. **Síntese e caracterização de hidrogéis de amido retrogradado e goma gelana utilizados como matriz em sistemas de liberação cólon específica de fármacos**. 2014. 198f (Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Araraquara, 2014.
- CARDOSO, V. M. D. O.; CURY, B. F.; EVANGELISTA, R. C.; GREMIÃO, M. P. D. Development and characterization of cross-linked gellan gum and retrograded starch blend hydrogels for drug delivery applications. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 65, p. 317-333, 2017.
- CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; CERQUEIRA, M. A.; SOUZA, B. W. S.; TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A. Influence of concentration, ionic strength and pH on zeta potential and mean

hydrodynamic diameter of edible polysaccharide solutions envisaged for multilayered films production. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 3, p. 522-528, 2011.

CHANDRASEKARAN, R.; MILLANE, R. P.; ARNOTT, S.; ATKINS, E. D. T. The crystal structure of gellan. **Carbohydrate Research**, v. 175, n. 1, p. 1-15, 1988.

CHENG, K.; LIM, L.-Y. Insulin-loaded calcium pectinate nanoparticles: effects of pectin molecular weight and formulation pH. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 30, n. 4, p. 359-367, 2004.

CORREDIG, M.; KERR, W.; WICKER, L. Molecular characterization of commercial pectins by separation with linear mix gel permeation columns in-line with multi-angle light scattering detection. **Food Hydrocolloids**, v. 14, n. 1, p. 41-47, 2000.

COVIELLO, T.; ALHAIQUE, F.; PARISI, C.; MATRICARDI, P.; BOCCHINFUSO, G.; GRASSI, M. A new polysaccharidic gel matrix for drug delivery: preparation and mechanical properties. **Journal of Controlled Release**, v. 102, n. 3, p. 643-656, 2005.

CURY, B. S. F.; CASTRO, A. D.; KLEIN, S. I.; EVANGELISTA, R. C. Modeling a system of phosphated cross-linked high amylose for controlled drug release. Part 2: Physical parameters, cross-linking degrees and drug delivery relationships. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 371, n. 1-2, p. 8-15, 2009a.

CURY, B. S. F.; DE CASTRO, A. D.; KLEIN, S. I.; EVANGELISTA, R. C. Influence of phosphated cross-linked high amylose on in vitro release of different drugs. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, n. 4, p. 789-793, 2009b.

DEY, S.; SREENIVASAN, K. Conjugation of curcumin onto alginate enhances aqueous solubility and stability of curcumin. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, n. 0, p. 499-507, 2014.

ENOKI, T. A. **Caracterização por espalhamento de luz de dispersões aquosas de agregados lipídicos aniônicos**. 2010. 125f (Dissertação de Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

FAN, L.; WU, H.; ZHANG, H.; LI, F.; YANG, T.-H. pH-sensitive Podophyllotoxin carrier for cancer cells specific delivery. **Polymer Composites**, v. 31, n. 1, p. 51-59, 2010.

FANUN, M. Preface. In: FANUN, M. (Ed.). **Colloids in drug delivery**. Boca Raton: CRC Press, 2010. p.XIII-XIX.

FERMIN, D.; RILEY, J. Charge in colloidal systems. In: COSGROVE, T. (Ed.). **Colloid science: principles, methods and applications**. 2 ed. United Kingdom: John Wiley & Sons Ltd, 2010.

FISSORE, E. N.; ROJAS, A. M.; GERSCHENSON, L. N.; WILLIAMS, P. A. Butternut and beetroot pectins: Characterization and functional properties. **Food Hydrocolloids**, v. 31, n. 2, p. 172-182, 2013.

FREITAS, M. N.; FARAH, M.; BRETAS, R. E. S.; E., R.-J.; MARCHETTI, J. M. Rheological characterization of Poloxamer 407 nimesulide gels. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 27, n. 1, p. 113-118, 2006.

FRIEDMAN, H. H.; WHITNEY, J. E.; SZCZESNIAK, A. S. The texturometer - a new instrument for objective texture measurement. **Journal of Food Science**, v. 28, n. 4, p. 390-396, 1963.

GIAVASIS, I.; HARVEY, L. M.; MCNEIL, B. Gellan Gum. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 177-211, 2000.

GRASDALEN, H.; SMIDSRØD, O. Gelation of gellan gum. **Carbohydrate Polymers**, v. 7, n. 5, p. 371-393, 1987.

GUPTA, P.; VERMANI, K.; GARG, S. Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery. **Drug Discovery Today**, v. 7, n. 10, p. 569-579, 2002.

HENNINK, W. E.; VAN NOSTRUM, C. F. Novel crosslinking methods to design hydrogels. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, Supplement, p. 223-236, 2012.

HUANG, M.; KENNEDY, J. F.; LI, B.; XU, X.; XIE, B. J. Characters of rice starch gel modified by gellan, carrageenan, and glucomannan: A texture profile analysis study. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, n. 3, p. 411-418, 2007.

HURLER, J.; ENGESLAND, A.; POORAHMARY KERMANY, B.; ŠKALKO-BASNET, N. Improved texture analysis for hydrogel characterization: Gel cohesiveness, adhesiveness, and hardness. **Journal of applied polymer science**, v. 125, n. 1, p. 180-188, 2012.

International Organization for Standardization. ISO 10993-5. Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity. 2009.

JAYME, M. L.; DUNSTAN, D. E.; GEE, M. L. Zeta potentials of gum arabic stabilised oil in water emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 13, n. 6, p. 459-465, 1999.

JONES, D. S.; WOOLFSON, A. D.; DJOKIC, J. Texture profile analysis of bioadhesive polymeric semisolids: Mechanical characterization and investigation of interactions between formulation components. **Journal of applied polymer science**, v. 61, n. 12, p. 2229-2234, 1996.

Kelcogel: gellan gum book. 5. ed. 2007.

KHONDKAR, D.; TESTER, R. F.; HUDSON, N.; KARKALAS, J.; MORROW, J. Rheological behaviour of uncross-linked and cross-linked gelatinised waxy maize starch with pectin gels. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n. 8, p. 1296-1301, 2007.

KUBO, W.; MIYAZAKI, S.; ATTWOOD, D. Oral sustained delivery of paracetamol from in situ-gelling gellan and sodium alginate formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 258, n. 1-2, p. 55-64, 2003.

LAU, M. H.; TANG, J.; PAULSON, A. T. Texture profile and turbidity of gellan/gelatin mixed gels. **Food Research International**, v. 33, n. 8, p. 665-671, 2000.

LEE, C. H.; MOTURI, V.; LEE, Y. Thixotropic property in pharmaceutical formulations. **Journal of Controlled Release**, v. 136, n. 2, p. 88-98, 2009.

- LEVIGNE, S.; RALET, M.-C.; THIBAUT, J.-F. Characterisation of pectins extracted from fresh sugar beet under different conditions using an experimental design. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, n. 2, p. 145-153, 2002.
- LIU, L.; WON, Y. J.; COOKE, P. H.; COFFIN, D. R.; FISHMAN, M. L.; HICKS, K. B.; MA, P. X. Pectin/poly(lactide-co-glycolide) composite matrices for biomedical applications. **Biomaterials**, v. 25, n. 16, p. 3201-3210, 2004.
- LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 2, p. 143-154, 2005.
- MAHDI, M. H.; CONWAY, B. R.; SMITH, A. M. Development of mucoadhesive sprayable gellan gum fluid gels. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 488, n. 1-2, p. 12-19, 2015.
- MARTÍNEZ-RUVALCABA, A.; CHORNET, E.; RODRIGUE, D. Viscoelastic properties of dispersed chitosan/xanthan hydrogels. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, n. 4, p. 586-595, 2007.
- MATIAS, A. A.; SERRA, A. T.; SILVA, A. C.; PERDIGÃO, R.; FERREIRA, T. B.; MARCELINO, I.; SILVA, S.; COELHO, A. V.; ALVES, P. M.; DUARTE, C. M. M. Portuguese winemaking residues as a potential source of natural anti-adenoviral agents. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 61, n. 4, p. 357-368, 2010/06/01 2010.
- MCCONAUGHY, S. D.; STROUD, P. A.; BOUDREAUX, B.; HESTER, R. D.; MCCORMICK, C. L. Structural characterization and solution properties of a galacturonate polysaccharide derived from Aloe vera capable of *in situ* gelation. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 2, p. 472-480, 2008.
- MENEGUIN, A. B.; CURY, B. S. F.; EVANGELISTA, R. C. Films from resistant starch-pectin dispersions intended for colonic drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, n. 0, p. 140-149, 2014.
- MENEGUIN, A. B.; FERREIRA CURY, B. S.; DOS SANTOS, A. M.; FRANCO, D. F.; BARUD, H. S.; DA SILVA FILHO, E. C. Resistant starch/pectin free-standing films reinforced with nanocellulose intended for colonic methotrexate release. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 1013-1023, 2017.
- MIYAZAKI, S.; AOYAMA, H.; KAWASAKI, N.; KUBO, W.; ATTWOOD, D. In situ-gelling gellan formulations as vehicles for oral drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 60, n. 2-3, p. 287-295, 1999.
- MIYOSHI, E.; TAKAYA, T.; NISHINARI, K. Effects of salts on the gel-sol transition of gellan gum by differential scanning calorimetry and thermal scanning rheology. **Thermochimica Acta**, v. 267, n. 0, p. 269-287, 1995.
- MOHNEN, D. Pectin structure and biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n. 3, p. 266-277, 2008.

- MUNARIN, F.; TANZI, M. C.; PETRINI, P. Advances in biomedical applications of pectin gels. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, n. 4, p. 681-689, 2012.
- NARKAR, M.; SHER, P.; PAWAR, A. Stomach-Specific Controlled Release Gellan Beads of Acid-Soluble Drug Prepared by Ionotropic Gelation Method. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 1, p. 267-277, 2010.
- NGUYEN, S.; ALUND, S. J.; HIORTH, M.; KJØNIKSEN, A.-L.; SMISTAD, G. Studies on pectin coating of liposomes for drug delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 88, n. 2, p. 664-673, 2011.
- OSMAŁEK, T.; FROELICH, A.; TASAREK, S. Application of gellan gum in pharmacy and medicine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 466, n. 1-2, p. 328-340, 2014.
- PACELLI, S.; PAOLICELLI, P.; CASADEI, M. A. New biodegradable dextran-based hydrogels for protein delivery: Synthesis and characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 126, p. 208-214, 2015.
- PATIL, P.; CHAVANKE, D.; WAGH, M. A Review on Ionotropic Gelation Method: Novel Approach for Controlled Gastroretentive Gelispheres. **International Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. Suppl 4, p. 27-32, 2012.
- PEPPAS, N. A.; BURES, P.; LEOBANDUNG, W.; ICHIKAWA, H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 27-46, 2000.
- PONS, M.; FISZMAN, S. M. Instrumental texture profile analysis with particular reference to gelled systems. **Journal of Texture Studies**, v. 27, n. 6, p. 597-624, 1996.
- PREZOTTI, F. G. **Microesferas de goma gelana e pectina como potencial estratégia para liberação controlada de fármacos**. 2013. 111f (Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Araraquara, 2013.
- PREZOTTI, F. G.; CURY, B. S. F.; EVANGELISTA, R. C. Mucoadhesive beads of gellan gum/pectin intended to controlled delivery of drugs. **Carbohydrate Polymers**, v. 113, n. 0, p. 286-295, 2014.
- PREZOTTI, F. G.; MENEGUIN, A. B.; EVANGELISTA, R. C.; CURY, B. S. F. Preparation and characterization of free films of high amylose/pectin mixtures cross-linked with sodium trimetaphosphate. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 38, n. 11, p. 1354-1359, 2012.
- RIBEIRO, S. D.; RODRIGUES FILHO, G.; MENEGUIN, A. B.; PREZOTTI, F. G.; BONI, F. I.; CURY, B. S. F.; GREMIÃO, M. P. D. Cellulose triacetate films obtained from sugarcane bagasse: Evaluation as coating and mucoadhesive material for drug delivery systems. **Carbohydrate Polymers**, v. 152, p. 764-774, 2016.
- RINAUDO, M.; MILAS, M. Gellan gum, a bacterial gelling polymer. In: DOXASTAKIS, G. e KIOSSEOGLOU, V. (Ed.). **Developments in Food Science**: Elsevier, v. Volume 41, 2000. p.239-263. ISBN 0167-4501.

- SALGIN, S.; SALGIN, U.; BAHADIR, S. Zeta potentials and isoelectric points of biomolecules: the effects of ion types and ionic strengths. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 7, p. 12404-12414, 2012.
- SANZGIRI, Y. D.; MASCHI, S.; CRESCENZI, V.; CALLEGARO, L.; TOPP, E. M.; STELLA, V. J. Gellan-based systems for ophthalmic sustained delivery of methylprednisolone. **Journal of Controlled Release**, v. 26, n. 3, p. 195-201, 1993.
- SARAF, S. Application of colloidal properties in drug delivery. In: FANUN, M. (Ed.). **Colloids in drug delivery**. Boca Raton: CRC Press, 2010. cap. 2, p.55-70.
- SAXENA, A.; KALOTI, M.; BOHIDAR, H. Rheological properties of binary and ternary protein-polysaccharide co-hydrogels and comparative release kinetics of salbutamol sulphate from their matrices. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, n. 2, p. 263-270, 2011.
- SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J. Complex Pectins: Structure elucidation using enzymes. In: VISSER, J. e VORAGEN, A. G. J. (Ed.). **Pectins and Pectinases**. Amsterdam: Elsevier, v.14, 1996. p.3-20. ISBN 0921-0423.
- SCHRAMM, G. **Reologia e reometria: fundamentos teóricos e práticos**. 2. ed. São Paulo: Artliber Editora, 2006. 232p.
- SHUKLA, R. K.; TIWARI, A. Carbohydrate polymers: Applications and recent advances in delivering drugs to the colon. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 2, p. 399-416, 2012.
- SINKO, P. J.; LONGER, M. Reologia. In: SINKO, P. J. (Ed.). **Martín: físico-farmácia e ciências farmacêuticas**. 5. Porto Alegre: Artmed, 2008. cap. 20, p.575-597. ISBN 978-0-7817-5027-1.
- SOARES, G. A.; CASTRO, A. D. D.; CURY, B. S. F.; EVANGELISTA, R. C. Blends of cross-linked high amylose starch/pectin loaded with diclofenac. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, n. 1, p. 135-142, 2013.
- SOME, D. Light-scattering-based analysis of biomolecular interactions. **Biophysical Reviews**, v. 5, n. 2, p. 147-158, 2013.
- SOME, D.; KENRICK, S. Characterization of protein-protein interactions via static and dynamic light scattering. In: CAI, J. e WANG, R. E. (Ed.). **Protein interactions: INTECH Open Access Publisher**, 2012. cap. 20, p.401-426.
- SOUTO-MAIOR, J. F. A.; REIS, A. V.; PEDREIRO, L. N.; CAVALCANTI, O. A. Phosphated crosslinked pectin as a potential excipient for specific drug delivery: preparation and physicochemical characterization. **Polymer International**, v. 59, n. 1, p. 127-135, 2010.
- SZCZESNIAK, A. S. Texture is a sensory property. **Food Quality and Preference**, v. 13, n. 4, p. 215-225, 2002.
- TAMBURIC, S.; CRAIG, D. Q. M. A comparison of different in vitro methods for measuring mucoadhesive performance. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 44, n. 2, p. 159-167, 1997.

VINCKEN, J.-P.; SCHOLS, H. A.; OOMEN, R. J. F. J.; MCCANN, M. C.; ULVSKOV, P.; VORAGEN, A. G. J.; VISSER, R. G. F. If Homogalacturonan Were a Side Chain of Rhamnogalacturonan I. Implications for Cell Wall Architecture. **Plant Physiology**, v. 132, n. 4, p. 1781-1789, 2003.

WANG, Q.; HUANG, X.; NAKAMURA, A.; BURCHARD, W.; HALLETT, F. R. Molecular characterisation of soybean polysaccharides: an approach by size exclusion chromatography, dynamic and static light scattering methods. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 17, p. 2637-2644, 2005.

WILCZEWSKA, A. Z.; NIEMIROWICZ, K.; MARKIEWICZ, K. H.; CAR, H. Nanoparticles as drug delivery systems. **Pharmacological Reports**, v. 64, n. 5, p. 1020-1037, 2012.

YAN, C.; POCHAN, D. J. Rheological properties of peptide-based hydrogels for biomedical and other applications. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 9, p. 3528-3540, 2010.

ZONG, A.; CAO, H.; WANG, F. Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 4, p. 1395-1410, 2012.

Capítulo II – Microesferas de goma gelana e pectina
Planejamento fatorial saturado 2⁷⁻⁴

RESUMO

A GG e a P são materiais promissores para o desenvolvimento de sistemas de liberação cólon-específica de fármacos, uma vez que são resistentes às enzimas encontradas nas porções superiores do TGI, porém, são degradadas especificamente por enzimas produzidas pela microbiota colônica. Além disso, ambas apresentam mucoadesividade, o que permite a adesão do sistema ao muco, uma potencial estratégia para aumentar o tempo de retenção do fármaco no sítio alvo, bem como estabelecer um contato mais íntimo com a mucosa, ambos fatores que podem potencializar o efeito terapêutico. O resveratrol (RES) é um polifenol com reconhecidas propriedades antioxidantes e tem demonstrado outras atividades como prevenir ou retardar o início de tumores e inflamações, características promissoras para o tratamento de patologias que acometem a porção distal do TGI, como câncer colônico e colite. No entanto, por ser rapidamente absorvido e metabolizado nas porções superiores do TGI, a quantidade de RES que atinge o cólon é insuficiente para promover o efeito terapêutico desejado. As microesferas são sistemas multiparticulados, que apresentam algumas vantagens como a proteção do fármaco encapsulado e a vetorização para um sítio específico e foram empregadas na encapsulação do RES. Sua obtenção é possível através da geleificação ionotrópica, uma técnica simples, que não utiliza solventes orgânicos e com possibilidade de produção em escala industrial. O objetivo do presente estudo foi a obtenção e a caracterização de microesferas de GG:P, duplamente reticuladas, explorando a técnica da geleificação ionotrópica, visando a liberação cólon-específica do RES. Utilizou-se como reticulantes iônico e covalente o cloreto de alumínio (AlCl_3) e o glutaraldeído (Glu), respectivamente. Foi realizado um planejamento fatorial saturado 2^{7-4} para avaliação dos efeitos da proporção polimérica (GG:P), das concentrações de polímeros, AlCl_3 , Glu e fármaco e dos tempos de reticulação em AlCl_3 e Glu sobre respostas como tamanho, forma e liberação em meio ácido. Fotomicrografias demonstraram o fármaco disperso na matriz polimérica e a superfície rugosa das microesferas, que apresentaram diâmetro médio entre 765,3 e 921,2 μm , índices de circularidade entre 0,737 e 0,819, demonstrando sua forma aproximadamente esférica e distribuição de tamanho homogênea, evidenciada pelos baixos valores de índice Span (0,15 a 0,24). O tamanho foi influenciado pelas concentrações de fármaco e de polímeros, seguido das concentrações de reticulantes Glu e AlCl_3 , sendo as maiores microesferas as da formulação M 8. A circularidade foi mais influenciada pela concentração de polímeros, pela proporção polimérica G:P e pela concentração de fármaco, sendo as microesferas mais circulares as das formulações M 4, M 7 e M 8. Elevados valores de eficiência de encapsulação foram alcançados para todas as amostras (96,3 a 98,7%). As elevadas capacidades de absorção de líquidos e de intumescimento das

partículas foram evidenciadas, enquanto o menor intumescimento em meio ácido (30% menor que em pH 6,0 e 24% menor que em pH 7,4) demonstrou o comportamento pH dependente das microesferas desenvolvidas. A absorção de líquido em pH 1,2 foi cerca de 11% menor que em pH 6,0 e cerca de 25% menor que em pH 7,4. A erosão variou entre 8,4 e 12,1%, e não foi influenciada pelo pH. A solubilidade do RES em HCl 0,1N (pH 1,2) e em tampão fosfato de sódio (pH 6,8), ambos com 1% de tensoativo, foi de 169,5 e 249,8 µg/mL, respectivamente, garantindo as condições *sink* para o ensaio de dissolução. Em água e em tampão TC 199, ambos sem tensoativo, as solubilidades foram de 42,7 e 44,3 µg/mL, respectivamente. A porcentagem de fármaco liberado após 120 minutos em meio ácido variou entre 15,7 e 26,9%, e concentração de fármaco e a proporção polimérica G:P exerceram a maior influência sobre esse parâmetro. As microesferas apresentaram elevada capacidade mucoadesiva, evidenciada pelos testes *in vitro* de interação com a mucina e *ex vivo* utilizando intestino de porco. Baseado nos resultados de tamanho, circularidade e liberação do fármaco em meio ácido, os quatro fatores escolhidos para o planejamento fatorial completo 2⁴ foram a proporção polimérica G:P, e as concentrações de AIC₃, Glu e fármaco, os quais tiveram seus valores variados em três diferentes níveis (-1, 0 e +1). Já a concentração de polímeros, e os tempos de reticulação em AIC₃ e em Glu tiveram seus valores fixados no nível baixo (-1). Microesferas duplamente reticuladas, capazes de controlar a liberação do RES, foram obtidas com sucesso pelo método da geleificação ionotrópica e caracterizadas, sendo que a aplicação de um planejamento fatorial permitiu avaliar, com um número reduzido de formulações, o efeito de sete diferentes fatores sobre as características dos sistemas desenvolvidos e selecionar os fatores mais influentes para estudos futuros.

Palavras-chave: microesferas, liberação colônica, geleificação ionotrópica, planejamento fatorial, resveratrol.

ABSTRACT

GG and P are promising materials to be used in the development of colon specific drug delivery systems, since they are resistant to enzymes found in the upper GIT, however, they are specifically degraded by enzymes produced by colonic microbiota. In addition, both present mucoadhesiveness, which allows the adhesion of the system to the mucus, a promising strategy to prolong the time that the system remains at the target site as well as to establish a more intimate contact with the mucosa, both factors that may potentiate the therapeutic effect. Resveratrol (RES) is a polyphenol with recognized antioxidant properties and has shown other activities, such as prevent or delay the onset of tumors and inflammation, promising characteristics for the treatment of diseases that affect the distal portion of the GIT, such as colonic cancer and colitis. However, it is rapidly absorbed and metabolized in the upper portions of the GIT, the amount that reaches the colon is insufficient to promote the desired effects. Ms are a multiparticulate system that presents some advantages, such as protection of the encapsulated drug and targeting to a specific site, and were used to encapsulate RES. It is possible to prepare Ms through ionotropic gelation, a simple technique that does not use organic solvents and with the possibility of industrial scale production. The aim of the present study was to prepare dual-crosslinked Ms of GG:P through ionotropic gelation and to characterize them, intending the colon-specific release of RES. Aluminium chloride (AlCl_3) and glutaraldehyde (Glu) were used as ionic and covalent crosslinkers, respectively. A saturated factorial design 2^{7-4} was performed in order to evaluate the effects of polymer ratio (G:P), concentrations of polymer, AlCl_3 , Glu and drug, and crosslinking time in AlCl_3 and in Glu on responses such as size, shape and drug release in acid media. Photomicrographs showed the drug dispersed through the polymer matrix and the Ms rough surface, that presented average diameter between 765.3 and 921.2 μm , circularity indexes between 0.737 and 0.819, demonstrating their approximately spherical shape, and homogeneous size distribution, evidenced by the low Span index values (0.15 to 0.24). The size was influenced by drug and polymer concentrations, followed by concentrations of the crosslinkers Glu and AlCl_3 , and the largest was the M 8 formulation. The circularity was more influenced by concentration of polymers, by polymer ratio G:P and by drug concentration, and the more circular microspheres were those from M 4, M 7 and M 8 formulations. High encapsulation efficiency values were achieved for all formulations (96.3 to 98.7%). The high liquid uptake and swelling capacities of the particles were evidenced, while the lower swelling in acid medium (30% lower than in pH 6.0 and 24% lower than in pH 7.4) demonstrated the pH-dependent behavior of the developed microspheres. The liquid uptake in pH 1.2 was approximately 11% lower than in pH 6.0 and approximately 25% lower than in pH 7.4. The erosion varied between 8.4 and 12.1%, and it

was not influenced by the pH. The solubility of RES in 0.1N HCl (pH 1.2) and in sodium phosphate buffer (pH 6.8), both containing 1% of surfactant, was 169.5 and 249.8 $\mu\text{g/mL}$, respectively, ensuring the sink conditions for the dissolution test. In water and in TC199 buffer, both without surfactants, the solubility was 42.7 and 44.3 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The percentage of drug released after 120 minutes in acid medium varied between 15.7 and 26.9%, and it was more influenced by the drug concentration and polymer ratio G:P. The microspheres showed high mucoadhesiveness, evidenced by the *in vitro* interaction with mucin and *ex vivo* tests using porcine intestinal tissue. Based on the results of size, circularity and drug release in acid medium, the four variables chosen for the full factorial design 2^4 were polymer ratio G:P, and concentrations of AIC₃, Glu and drug, that had their values varied in three different levels (-1, 0 and +1). The polymer concentration, crosslinking times in AIC₃ and in Glu had their values fixed on the lower level (-1). Dual-crosslinked Ms, capable of controlling the release of RES, were successfully obtained through ionotropic gelation technique and characterized, and the factorial design performed allowed evaluating, with a reduced number of formulations, the effect of seven different variables on characteristics of the developed systems and selecting the most influent factors to future studies.

Keywords: Microspheres, colonic release, ionotropic gelation, factorial design, resveratrol.

Lista de ilustrações

Figura 1: Estrutura da goma gelana deacilada com indicação dos sítios de ligação dos grupamentos acetil e gliceril da forma nativa (adaptado de MORRIS <i>et al.</i> (2012)).	72
Figura 2: Representação esquemática da estrutura da pectina (adaptado de TARZIA (2010)).	73
Figura 3: Seringa de vidro graduada, com a extremidade inferior vedada, para avaliação do intumescimento das microesferas.	82
Figura 4: Representação esquemática do intumescimento por análise volumétrica.	83
Figura 5: Conjunto de cesto e cuba de volume reduzido (150 mL) utilizados nos ensaios de liberação <i>in vitro</i> do fármaco.	85
Figura 6: Representação esquemática do ensaio de mucoadesão <i>ex vivo</i> .	88
Figura 7: Estrutura química do glutaraldeído.	91
Figura 8: Fotomicrografias evidenciando A) a forma esférica e a rugosidade da superfície das microesferas (M 7, aumento de 70 x); e B) o fármaco incorporado no interior das microesferas (M 6 criofraturada, aumento de 5.000 x).	93
Figura 9: Fotomicrografias de cristais de resveratrol (fármaco livre; aumento de 300x à esquerda e aumento de 1.500x à direita).	94
Figura 10: Fotomicrografias evidenciando a presença de fármaco recoberto pela rede polimérica próximo à superfície da microesfera (amostra M 3, aumento de 500x à esquerda e 5.000x à direita).	94
Figura 11: Fotomicrografias evidenciando a ausência de fármaco na superfície externa das microesferas. A) Amostra M 4 em aumento de 70x; B) Ampliação da superfície da mesma microesfera em aumento de 500x e C) ampliação da mesma região com aumento de 5.000x.	95
Figura 12: Representação esquemática da avaliação de tamanho e forma das microesferas utilizando estereoscópio.	96
Figura 13: Resultados de diâmetro médio (μm) das microesferas de GG:P duplamente reticuladas.	97
Figura 14: Gráfico de Pareto para os efeitos dos fatores avaliados sobre a resposta diâmetro médio das microesferas.	98
Figura 15: Gráfico normal dos efeitos dos fatores avaliados sobre a variável de resposta diâmetro médio das microesferas.	99
Figura 16: Distribuição de tamanho das microesferas de GG:P duplamente reticuladas (n=100).	102
Figura 17: Resultados de índice de circularidade das microesferas de GG:P duplamente reticuladas.	103
Figura 18: Gráfico de Pareto para os efeitos dos fatores avaliados sobre a resposta índice de circularidade das microesferas de GG:P duplamente reticuladas.	104
Figura 19: Gráfico normal dos efeitos dos fatores avaliados sobre a variável de resposta índice de circularidade das microesferas.	105
Figura 20: Porcentagem de intumescimento em função do pH do meio em que as microesferas foram incubadas por 240 min.	108
Figura 21: Representação do comportamento do intumescimento em função do pH do meio, conforme a variação que ocorre ao longo do TGI.	109

Figura 22: Porcentagem de absorção de líquido em função do pH do meio em que as microesferas foram incubadas por 240 min.....	111
Figura 23: Comparativo entre a absorção de líquido das microesferas de GG:P duplamente reticuladas e de microesferas de GG:P reticuladas ionicamente obtidas por PREZOTTI (2013).	112
Figura 24: Erosão (%) em função do pH do meio em que as microesferas foram incubadas por 240 min.	114
Figura 25: Valores da porcentagem de erosão e intumescimento das microesferas após exposição a meios com diferentes valores de pH (média ± IC).	114
Figura 26: Perfis de liberação do RES em meio ácido (HCl 0,1N, pH 1,2 com 1% LSS) a partir das microesferas de GG:P duplamente reticuladas (média ± DP).	117
Figura 27: Porcentagem de fármaco liberado a partir das microesferas de GG:P duplamente reticuladas após 120 minutos em meio ácido (HCl 0,1N pH 1,2 com 1% LSS).	119
Figura 28: Gráfico de Pareto para os efeitos dos fatores avaliados sobre a resposta porcentagem de fármaco liberado após 120 minutos em meio ácido.....	119
Figura 29: Gráfico normal dos efeitos dos fatores avaliados sobre a resposta porcentagem de fármaco liberado após 120 minutos em meio ácido.	120
Figura 30: Quantidade de mucina adsorvida nas microesferas em função da quantidade de mucina adicionada nas soluções em A) pH 1,2 e B) pH 6,8.	122
Figura 31: Isotermas de adsorção da mucina às diferentes microesferas avaliadas em A) pH 1,2 e em B) pH 6,8.....	125
Figura 32: Adsorção da mucina segundo os modelos teóricos de Langmuir e Freundlich (adaptado de PREZOTTI, 2013).....	126
Figura 33: Isotermas de adsorção de Langmuir para mucina adsorvida nas diferentes microesferas em A) pH 1,2 e B) pH 6,8.	127
Figura 34: Isotermas de adsorção de Freundlich para mucina adsorvida nas diferentes microesferas em A) pH 1,2 e B) pH 6,8.	129
Figura 35: Porcentagem de mucoadesão apresentada pelas microesferas para o teste <i>ex vivo</i> utilizando mucosa de porco (média ± DP, n=3).	132

Lista de tabelas

Tabela 1: Fatores e suas expressões em termos dos efeitos principais e das interações binárias com as quais são confundidos.....77

Tabela 2: Níveis dos fatores avaliados no planejamento fatorial fracionário tipo saturado 2^{7-4}78

Tabela 3: Composição das microesferas e valores dos níveis +1 e -1 das variáveis selecionadas para o planejamento fatorial fracionário tipo saturado 2^{7-4}80

Tabela 4: Valores de índice de circularidade, diâmetro do círculo equivalente e índice Span das microesferas de GG:P (média \pm DP; n=100).97

Tabela 5: Valores de teor de fármaco teórico, teor de fármaco mensurado e eficiência de encapsulação do resveratrol nas microesferas de GG:P (média \pm DP, n=3).106

Tabela 6: Solubilidade ($\mu\text{g/mL}$) do RES em diferentes meios (média \pm DP).115

Tabela 7: Porcentagem de fármaco liberado em meio ácido (HCl 0,1N pH 1,2 com 1% LSS) após 120 minutos para o planejamento saturado 2^{7-4} (média \pm DP; n = 3).117

Tabela 8: Valores dos parâmetros do modelo de Freundlich obtidos a partir da regressão linear das curvas de $\log C_e$ vs $\log Q_e$ e coeficientes de determinação (r^2) das isotermas de Freundlich e Langmuir para os diferentes valores de pH.128

Sumário

1	Introdução	66
2	Fundamentação teórica	71
2.1	Polissacarídeos naturais para liberação cólon-específica de fármacos: goma gelana e pectina.....	71
2.2	Planejamento fatorial.....	74
2.2.1	Definições	75
2.2.2	Efeitos principais e de interação	75
2.2.3	Planejamentos completos e fracionários.....	76
2.2.4	Efeitos confundidos e resolução	76
3	Objetivos.....	77
4	Metodologia.....	78
4.1	Planejamento fatorial fracionado.....	78
4.2	Obtenção das microesferas por geleificação ionotrópica.....	79
4.2.1	Reticulação iônica.....	79
4.2.2	Reticulação covalente	79
4.3	Análise de morfologia de superfície e estrutura interna.....	80
4.4	Análise de tamanho, forma e polidispersidade das microesferas	80
4.5	Teor de fármaco e eficiência de encapsulação (EE%)	81
4.6	Intumescimento	81
4.7	Determinação da capacidade de absorção de líquido.....	83
4.8	Erosão	83
4.9	Determinação da solubilidade do RES	84
4.10	Determinação da liberação <i>in vitro</i> do fármaco em meio ácido (pH 1,2)	84
4.11	Estudos da mucoadesividade das microesferas	85
4.11.1	Avaliação <i>in vitro</i> da mucoadesão	85
4.11.1.1	Isotermas de adsorção da mucina.....	86
4.11.2	Avaliação <i>ex vivo</i> da mucoadesão.....	87
4.12	Seleção dos fatores e níveis para o planejamento fatorial completo 2 ⁴	88
4.13	Análise estatística dos resultados	88
5	Resultados.....	88
5.1	Obtenção das microesferas por geleificação ionotrópica.....	88
5.2	Análise de morfologia de superfície e estrutura interna.....	91
5.3	Análise de tamanho, forma e polidispersidade das microesferas	96
5.4	Teor de fármaco e eficiência de encapsulação (EE%)	105
5.5	Intumescimento	107
5.6	Determinação da capacidade de absorção de líquido.....	110
5.7	Erosão	113

5.8	Determinação da solubilidade do RES	115
5.9	Determinação do perfil de liberação <i>in vitro</i> do fármaco em meio ácido	116
5.10	Estudos da mucoadesividade das microesferas	121
5.10.1	Avaliação <i>in vitro</i> da mucoadesão	121
5.10.1.1	Isotermas de adsorção da mucina.....	124
5.10.2	Avaliação <i>ex vivo</i> da mucoadesão.....	131
5.11	Seleção dos fatores e níveis para o planejamento fatorial completo 2^4	132
6	Conclusões.....	134

1 INTRODUÇÃO

A via oral é a via mais comumente utilizada para a administração de fármacos, por ser considerada uma via não invasiva e por razões como conveniência e facilidade de aceitação pelos usuários de medicamentos (CURY *et al.*, 2014; LAM e GAMBARI, 2014; FERRARI *et al.*, 2015). Apesar das diversas vantagens que apresenta, como comodidade, esquema terapêutico mais simples e sob o controle do paciente, posologia flexível e fácil administração, essa via ainda impõe importantes obstáculos a serem superados (FASANO, 1998; KHAFAGY *et al.*, 2007; PINTO, 2010; ISHA *et al.*, 2012).

Os principais problemas associados à administração oral estão relacionados à falta de especificidade na distribuição do fármaco pelo organismo, que pode ser absorvido sistemicamente, se distribuir por outros órgãos e tecidos além do de interesse, ou então ser degradado prematuramente pelas condições drásticas encontradas no estômago, como ocorre com alguns fármacos, principalmente os de natureza proteica. Além disso, outra desvantagem é a necessidade de administração de altas doses para se atingir o sítio alvo em concentração suficiente para o efeito terapêutico (TORCHILIN, 2000; HUA *et al.*, 2015).

Porém, tais dificuldades podem ser superadas com o desenvolvimento de novos SLCF. Atualmente, o desenvolvimento de sistemas capazes de liberar o fármaco em um sítio ou órgão específico tem sido um grande desafio e alvo de inúmeras pesquisas (GREGORIADIS, 1981; TORCHILIN, 2000; OLIVEIRA e CAVALCANTI, 2007; PINTO, 2010).

A liberação sítio-específica se justifica devido à necessidade crescente em se liberar alguns fármacos de maneira localizada, no sítio de ação ou absorção da molécula, a fim de reduzir danos ou efeitos indesejados em outros tecidos saudáveis, principalmente quando se trata de fármacos citotóxicos (RUBINSTEIN, 1990).

Além disso, a vetorização de fármacos para um sítio específico mostra importantes e particulares vantagens biofarmacêuticas e farmacocinéticas, como redução da dose requerida para atingir concentrações terapêuticas, maximização da sua concentração na região a ser tratada, redução da incidência de efeitos adversos ou mesmo efeito sistêmico indesejado, melhora da biodisponibilidade e otimização dos efeitos farmacológicos, que podem resultar na maior adesão do paciente ao tratamento (RUBINSTEIN, 1990; SASTRY *et al.*, 2000; SINHA e KUMRIA, 2003; MAIOR *et al.*, 2008).

Os sistemas de liberação vetorizada também são de fundamental importância para o tratamento local em órgãos cujo acesso dos fármacos seja dificultado por questões anatomo-fisiológicas (RUBINSTEIN, 1990).

Vetorizar fármacos para diferentes sítios do TGI é uma tarefa que exige abordagens diferenciadas e específicas para cada órgão de interesse. Dentre os possíveis sítios alvos nos diferentes segmentos do TGI, o cólon tem atraído bastante interesse nas últimas décadas como importante sítio de liberação de fármacos (FERRARI *et al.*, 2015).

A vetorização de fármacos para o cólon, através da administração oral, tem grande importância no tratamento de diversas patologias que acometem esta região, como colite ulcerativa, doença de Crohn, amebíase, síndrome do intestino irritável, câncer colônico, dentre outras, e pode, em alguns casos, evitar a necessidade de tratamentos considerados desconfortáveis, como, por exemplo, o uso de enemas aplicados via retal. Entretanto, o cólon também permite a absorção de fármacos para o tratamento de doenças sistêmicas (RUBINSTEIN, 1990; PHILIP e PHILIP, 2010).

Além disso, fatores como tempo de trânsito mais prolongado, reduzida atividade proteolítica e pH próximo da neutralidade tornam o ambiente colônico mais ameno em relação às porções superiores do TGI e, portanto, de grande interesse para a vetorização de alguns fármacos que apresentam problemas de estabilidade, como proteínas, peptídeos e alguns fármacos, que podem ser degradados no meio estomacal (CHOURASIA e JAIN, 2003).

Várias são as estratégias utilizadas para se alcançar a liberação cólon-específica de fármacos, como o uso de revestimentos poliméricos com degradação pH e/ou tempo dependentes, síntese de pró-fármacos, sistemas osmóticos e sistemas degradáveis pela microbiota colônica (KINGET *et al.*, 1998; LEOPOLD, 1999; SINHA e KUMRIA, 2001b; CHOURASIA e JAIN, 2004; MAIOR *et al.*, 2008).

Considerando a grande variabilidade interindividual de tempo de trânsito e os diferentes valores de pH ao longo do TGI, os sistemas baseados na degradação enzimática específica do meio colônico são considerados uma alternativa mais confiável, já que esse último parâmetro é menos variável (MAIOR *et al.*, 2008; FERRARI *et al.*, 2015).

A GG e a P são polissacarídeos aniônicos que vêm sendo amplamente exploradas para o desenvolvimento de diferentes SLCF. São capazes de formarem géis com propriedades mucoadesivas, e podem ser degradadas especificamente por enzimas produzidas pela microbiota colônica. Além disso, a P permanece como agregados de macromoléculas no ambiente ácido do estômago, não sendo digerida por proteases e amilases ali presentes (SINHA e KUMRIA, 2001b; a; VANDAMME *et al.*, 2002; OGAWA *et al.*, 2006; PICONE, 2008; SOUTO-MAIOR *et al.*, 2010; MORRIS *et al.*, 2012). Sendo assim, ambas são promissoras para serem empregadas na obtenção de sistemas de liberação colônica, como, por exemplo, microesferas e nanopartículas.

As microesferas são sistemas multiparticulados que podem melhorar a estabilidade do fármaco encapsulado, controlando sua exposição aos diferentes ambientes do TGI, protegendo-o da destruição em outros sítios que não o de ação. Por outro lado, a encapsulação do fármaco também pode evitar possíveis efeitos tóxicos do fármaco sobre o organismo (CELLESI *et al.*, 2004).

Microesferas obtidas a partir de diversos materiais poliméricos têm sido estudadas para a liberação controlada dos mais diferentes fármacos (AGNIHOTRI *et al.*, 2006; BABU *et al.*, 2010; MAITI *et al.*, 2011; BULMER *et al.*, 2012; PREZOTTI *et al.*, 2014; BONI *et al.*, 2015). Ainda, a liberação pode ser controlada pela degradação específica dos materiais que constituem as microesferas, permitindo delinear perfis de liberação conforme necessidades terapêuticas específicas e vetorizar o fármaco a um tecido ou órgão alvo (CELLESI *et al.*, 2004; FREIBERG e ZHU, 2004; GAMBOA e LEONG, 2013).

O sistema empregado para vetorizar um fármaco para o cólon deve ser capaz de manter a integridade do fármaco, protegendo-o contra degradação e/ou absorção prematura nas porções superiores do TGI até atingir o cólon; deve ainda liberá-lo apenas no sítio alvo a uma taxa suficiente para produzir a ação farmacológica esperada, e o sistema deve ali permanecer por tempo suficiente para garantir essa ação, mantendo-se por interações específicas, para que não seja facilmente eliminado (RENUKUNTLA *et al.*, 2013).

Quando constituídas de materiais bioadesivos, as microesferas podem apresentar mucoadesividade, e, portanto, aderirem às mucosas de diferentes sítios como a cavidade nasal, o trato urinário e, principalmente, o TGI, e, portanto, constituem importante sistema para a liberação controlada e sítio-específica de fármacos (VASIR *et al.*, 2003).

Esses sistemas mucoadesivos apresentam algumas vantagens, uma vez que a mucoadesão permite um contato mais efetivo e por período mais prolongado entre o sistema e o sítio de absorção do fármaco, o que pode melhorar a biodisponibilidade. Uma melhora na absorção também pode ocorrer devido ao gradiente de concentração que é aumentado no local onde o sistema permanece aderido. Ainda, os sistemas multiparticulados que permanecerem aderidos ao muco podem ter sua eliminação retardada em função do tempo de trânsito ao longo do TGI (HÄGERSTRÖM *et al.*, 2000; MORISHITA e PEPPAS, 2006; GAMBOA e LEONG, 2013).

Microesferas podem ser obtidas pela técnica de geleificação ionotrópica, que permite a encapsulação dos mais diversos materiais, como células, fármacos, enzimas, dentre outros (READ *et al.*, 2001; BETIGERI e NEAU, 2002; MAITI *et al.*, 2011).

Este método baseia-se na habilidade dos polímeros hidrofílicos carregados positiva ou negativamente (polieletrólitos) interagirem com íons de cargas opostas, originando redes

tridimensionais reticuladas (BODMEIER *et al.*, 1989) e destaca-se dentre as diferentes técnicas disponíveis para obtenção de sistemas multiparticulados baseados em polissacarídeos, pois explora materiais e tecnologias relativamente simples, em condições reacionais amenas, evitando o uso de solventes orgânicos ou temperaturas elevadas (MAITI *et al.*, 2011), condições altamente favoráveis para preservar a estabilidade dos fármacos.

Por outro lado, as associações poliméricas e o processo de reticulação representam estratégias racionais para o preparo de materiais com propriedades moduladas para atender necessidades terapêuticas específicas (CURY *et al.*, 2009; CARBINATTO *et al.*, 2012; SOARES *et al.*, 2013; CARBINATTO *et al.*, 2014; MENEGUIN *et al.*, 2014; PREZOTTI *et al.*, 2014).

A reticulação iônica se dá por interações entre os grupamentos carregados do polieletrólito e íons de carga contrária, já a reticulação covalente ocorre quando um agente reticulante estabelece ligações covalentes com as cadeias poliméricas. A associação entre ambos os tipos de reticulação, iônica e covalente, na obtenção de um sistema de liberação pode ser complementar, aumentando o grau de reticulação da malha polimérica.

Esse aumento pode levar a maior fixação dos grupamentos hidroxila do polímero, os quais se tornam menos disponíveis para interagir com o meio aquoso e ácido do estômago, reduzindo as taxas de intumescimento e erosão da matriz e conseqüentemente, a liberação do fármaco neste meio (MI *et al.*, 2003).

Mi e co-autores (2003) exploraram a dupla reticulação de micropartículas de quitosana com genipina e observaram uma significativa redução das taxas de intumescimento em meio ácido em comparação às reticuladas apenas ionicamente com tripolifosfato. O mesmo foi observado em estudo por Kulkarni e colaboradores (2011) com microesferas de goma gelana e albumina utilizando o íon cálcio como reticulante iônico e como reticulante covalente o Glu, para o qual, o tempo de liberação do diltiazem aumentou em 2 horas com a dupla reticulação.

O resveratrol (RES) é um polifenol natural com reconhecidas propriedades antioxidantes, encontrado em alimentos como uvas, vinho tinto, amendoins e algumas plantas medicinais (WALLE *et al.*, 2004; POLLACK e CRANDALL, 2013). Além de suas atividades cardioprotetora e anti-inflamatória, suas propriedades antimutagênicas têm sido comprovadas. Estudos *in vitro* demonstraram sua capacidade de inibir a proliferação celular e induzir a apoptose, além de bloquear a progressão do ciclo celular de diversas linhagens celulares de câncer humano, como o colônico (TESSITORE *et al.*, 2000) e os de mama, pulmão, próstata, fígado e pâncreas.

Kaldas e co-autores (2003) demonstraram que células intestinais Caco-2 são capazes de acumular RES, evidenciando os enterócitos como um potencial sítio alvo da liberação deste

agente antiproliferativo (KALDAS *et al.*, 2003). Em estudo com ratos submetidos a injeções de dimetilhidrazina para a indução de lesões no cólon, a administração oral de trans-resveratrol foi capaz de reduzir lesões pré-neoplásicas sem efeitos adversos evidentes, demonstrando que o RES contribui para o tratamento de câncer colônico (ALFARAS *et al.*, 2010).

O RES demonstrou resultados promissores contra diversas doenças que acometem a porção distal do TGI, como câncer colônico e colite (TESSITORE *et al.*, 2000; DAS e NG, 2010a) No entanto, a rápida absorção e metabolização do RES nas porções superiores do TGI fazem com que a quantidade de fármaco que alcança o cólon seja baixa e insuficiente para o tratamento de patologias locais (DAS *et al.*, 2008) e se faz necessário sua encapsulação em um sistema de liberação cólon-específico.

O desenvolvimento de um novo sistema de liberação baseado em tentativa e erro, no qual se varia um fator por vez, fixando os demais e verificando o resultado frente algumas respostas de interesse pode ser considerada uma técnica ultrapassada, tendo em vista todas as ferramentas estatísticas disponíveis na atualidade, como as de planejamento de experimentos. Além do material gasto em excesso, através de tentativa e erro nem sempre é possível alcançar condições ótimas em tempo hábil e com confiabilidade na resposta obtida. Técnicas de planejamento experimental permitem uma redução no número de ensaios, reduzindo tempo e custos da pesquisa, além de fornecer informações sobre possíveis interações significativas entre os fatores (ARMSTRONG, 2006; SCHWAAB e PINTO, 2011).

O planejamento fatorial fracionado é aquele no qual apenas uma pequena parcela do número total de ensaios é realizada. Ele permite avaliar simultaneamente o efeito de inúmeras variáveis realizando um reduzido número de experimentos, e, portanto, é bastante útil para uma análise exploratória inicial, pois permite, com poucas análises, triar as variáveis e identificar os fatores mais significativos e os menos impactantes nas respostas de interesse. Além disso, por evitar o número exorbitante de ensaios que um planejamento completo pode exigir, há ainda economia de recursos e tempo (NETO *et al.*, 2010b).

No presente trabalho foi aplicado um planejamento fatorial fracionado do tipo 2^{7-4} no presente trabalho, a fim de avaliar as melhores condições para obtenção de microesferas mucoadesivas de goma gelana/pectina com propriedades promissoras para a liberação colônica do RES, bem como aprofundar o conhecimento sobre como os parâmetros de processo e de formulação podem influenciar nas propriedades desses sistemas.

As microesferas foram obtidas através do método de geleificação ionotrópica, explorando a dupla reticulação com os agentes reticulantes $AlCl_3$ e Glu e foram caracterizadas.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Polissacarídeos naturais para liberação cólon-específica de fármacos: goma gelana e pectina

Os polímeros têm sido amplamente explorados no delineamento de novos SLCF, possibilitando a veiculação de diferentes fármacos por simples aprisionamento físico nas malhas da rede polimérica ou mesmo por ligações covalentes fármaco-polímero, conferindo importantes vantagens como aumento de hidrossolubilidade, redução de toxicidade, aumento de permeabilidade, proteção contra degradação enzimática ou hidrólise, além da possibilidade de vetorização para um sítio específico (NAJLAH e D'EMANUELE, 2006).

Dentre as diversas classes poliméricas, os polissacarídeos naturais são matérias-primas que despertam particular interesse para o desenvolvimento de SLCF, devido às diversas vantagens que apresentam em relação aos polímeros sintéticos, como por exemplo: atoxicidade, biocompatibilidade, são aprovados para o consumo humano, podem apresentar relativo baixo custo, e, dependendo da fonte, podem ser encontrados amplamente disponíveis na natureza (KULKARNI *et al.*, 2011). Além disso, características de biodegradabilidade enzimática específica, como ocorre com alguns polissacarídeos resistentes à digestão nas porções superiores do TGI, porém degradados especificamente pela microbiota colônica, podem ser exploradas para o delineamento de sistemas de liberação sítio específica de fármacos (BHARDWAJ *et al.*, 2000).

O delineamento de sistemas biodegradáveis baseados em polissacarídeos para a vetorização de fármacos para o cólon tem sido amplamente estudado. Esses sistemas baseiam-se no fato de que quantidades significantes de glicosidases e polissacaridases de fontes microbianas estão presentes no cólon. As primeiras são responsáveis por quebrarem di- e oligossacarídeos, já as últimas são as responsáveis por degradarem diversos polissacarídeos, dentre elas estão β -D-glicosidase, β -D-galactosidase, pectinase e dextranase (ZHANG *et al.*, 2002).

Diversos polissacarídeos têm sido empregados no desenvolvimento de sistemas colônicos devido ao potencial que apresentam, como, por exemplo, pectina, sulfato de condroitina, dextrana, goma guar, dentre outros, os quais não são digeridos nas porções superiores do TGI, mas são especificamente degradados pelas polissacaridases correspondentes, produzidas pelas bactérias residentes apenas no cólon (ZHANG *et al.*, 2002).

O cólon humano contém um grande número de bactérias complexas produzindo diversas enzimas cuja função é a degradação de substâncias. Por estarem ausentes nas demais porções do TGI, como estômago e intestino delgado, esses microrganismos tornam a microbiota

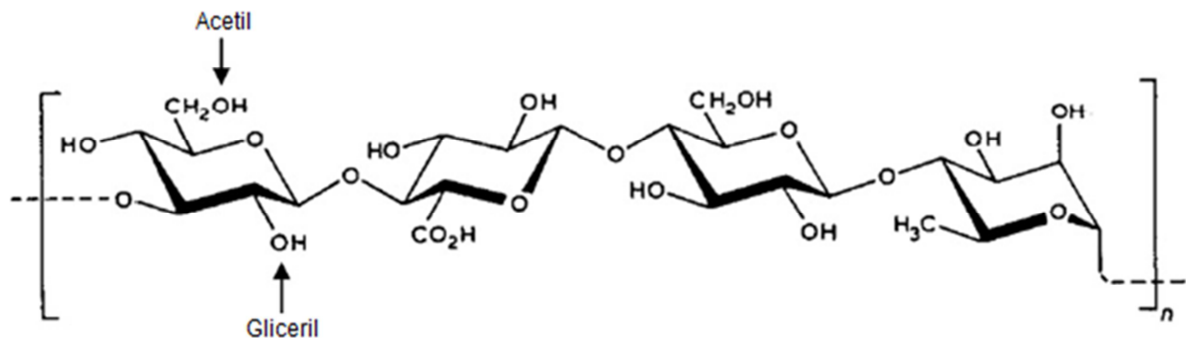
colônica um ambiente diferenciado, no qual um sistema de liberação baseado na degradação enzimática específica se torna a estratégia mais promissora que as baseadas em variação de tempo e pH, uma vez que a liberação depende da degradação, que ocorre apenas no sítio alvo, o cólon (RUBINSTEIN, 1990; ZHANG *et al.*, 2002).

Com o avanço da biotecnologia, já é possível a produção em larga escala e de maneira econômica de proteínas, peptídeos, hormônios, vacinas (RENUKUNTLA *et al.*, 2013), inclusive de polissacarídeos com propriedades específicas, como é o caso da GG, um produto da biotecnologia moderna, amplamente aceita para consumo humano e de comercialização já consolidada no mercado (SUTHERLAND, 2001).

A GG é um exopolissacarídeo obtido através do processo de fermentação aeróbia pela bactéria gram-negativa *Sphingomonas elodea*. Possui característica hidrofílica, cadeia linear e aniônica. Sua estrutura é constituída de unidades repetidas do tetrassacarídeo (β -1,3-D-glicose, β -1,4-D-ácido glicurônico, β -1,4-D-glicose e α -1,4-L-ramnose) (Figura 1). Na forma nativa, possui um grupamento acetil e um gliceril ligados a um único resíduo de glicose, que são removidos por hidrólise alcalina para gerar as formas comerciais, disponíveis em alto ou baixo grau de acilação (GRASDALEN e SMIDSRØD, 1987; GIAVASIS *et al.*, 2000; PICONE, 2008; MORRIS *et al.*, 2012).

Seu uso tem sido explorado para a obtenção de diferentes SLCF para as mais variadas vias de administração, devido à habilidade de formar hidrogéis reticulados na presença de cátions, os quais são resistentes ao calor e a ácidos, e capazes de encapsular, proteger e controlar a liberação de fármacos, além de apresentar importantes propriedades mucoadesivas (SALAMAT-MILLER *et al.*, 2005; OGAWA *et al.*, 2006; NARKAR *et al.*, 2010; BONI *et al.*, 2015).

Figura 1: Estrutura da goma gelana deacilada com indicação dos sítios de ligação dos grupamentos acetil e gliceril da forma nativa (adaptado de MORRIS *et al.* (2012)).

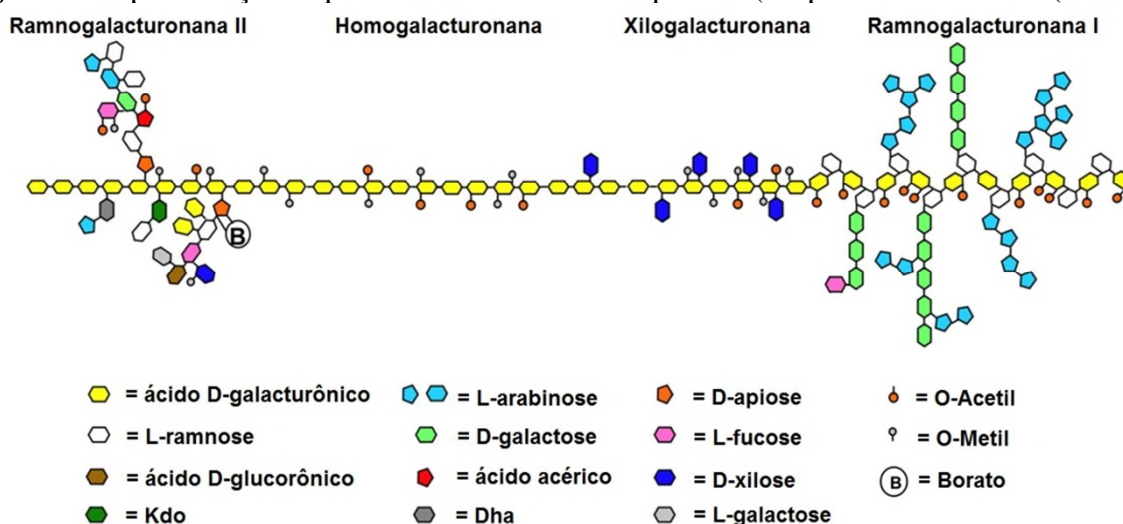


A P é encontrada em diversas espécies vegetais, principalmente na parede celular, sendo responsável pela manutenção de estruturas e pela sustentação da planta (SOUTO-MAIOR *et al.*,

2010). O bagaço é o principal sub-produto após o processamento industrial de maçãs, e toneladas de material considerado descarte podem ser utilizadas como matéria-prima para a obtenção de pectina (FERTONANI *et al.*, 2009), a qual também pode ser extraída da casca de frutas cítricas, como é o caso de algumas comercialmente disponíveis (MUNARIN *et al.*, 2012).

O principal componente estrutural da P é o homopolímero linear denominado homogalacturonana (HG) (Figura 2), compondo cerca de 60% de sua estrutura. Esse domínio contém ácidos D-galacturônicos unidos por ligações glicosídicas do tipo α -(1 \rightarrow 4) que podem estar esterificados com grupamentos metila e acetila. Essa região linear da cadeia é denominada de *smooth region* ou região lisa (VRIESMANN, 2008; CAFFALL e MOHNEN, 2009; YAPO, 2011; MUNARIN *et al.*, 2012).

Figura 2: Representação esquemática da estrutura da pectina (adaptado de TARZIA (2010)).



O grau de esterificação dos resíduos de ácido galacturônico presentes nas cadeias das P é uma das características estruturais mais importantes e influentes sobre a habilidade de geleificação deste polissacarídeo. As trocas iônicas, formação de ligações de hidrogênio e a capacidade de reticulação com cátions multivalentes são altamente dependentes do número e da distribuição de grupos metil e acetil ao longo da cadeia polimérica (LEVIGNE *et al.*, 2002). Pectinas de baixo grau de metoxilação contêm um maior número ânions carboxilatos livres nos resíduos de ácido galacturônico, responsáveis pela interação com cátions di ou polivalentes que resultam na geleificação (MCCONAUGHY *et al.*, 2008).

As demais regiões da P são altamente ramificadas, denominadas de ramnogalacturonana I e II (RG I e II), são também chamadas de *hairy region* ou região ramificada, e possuem diversas cadeias laterais compostas pelos mais variados tipos de açúcares (Figura 2) (MUNARIN *et al.*, 2012).

Um dos modelos que tradicionalmente descreve a disposição dos domínios da P para originar a macromolécula é a alternância entre regiões lisas de HG e regiões ramificadas de RG, porém alguns autores sugerem um modelo em que domínios HG fazem parte das cadeias laterais dos domínios RG (SCHOLS e VORAGEN, 1996; VINCKEN *et al.*, 2003; SCHOLS *et al.*, 2009).

O fato de ser natural, biocompatível e aprovada para consumo humano, estando seu uso há muito tempo consolidado na indústria alimentícia, torna a pectina um promissor excipiente para uso na área farmacêutica. Sua capacidade de formar géis e a mucoadesividade que apresenta agregam particular interesse para seu uso no delineamento de SLCF (SOARES *et al.*, 2013; CARBINATTO *et al.*, 2014; PREZOTTI *et al.*, 2014).

Uma desvantagem da P é a sua solubilidade nos fluidos do TGI, que diminui as chances do carreador baseado neste polissacarídeo liberar o fármaco especificamente no cólon. Para superar tal limitação, estratégias como a reticulação da P com cátions di ou polivalentes e sua associação a diferentes polissacarídeos tem sido empregadas com sucesso, uma vez que géis mais fortes e resistentes à água são obtidos (CHAMBIN *et al.*, 2006; DAS e NG, 2010b; PREZOTTI *et al.*, 2014).

A GG associada à P foi utilizada no presente trabalho devido às promissoras características que ambas apresentam para atingirem a liberação colônica, e, além disso, o uso de misturas poliméricas representa uma estratégia racional para a obtenção de materiais com propriedades moduladas para atender a necessidades terapêuticas específicas que alguns polímeros isolados não seriam capazes de realizar.

2.2 Planejamento fatorial

Um planejamento fatorial é um conjunto de experimentos nos quais se altera simultaneamente diversas variáveis independentes cujos efeitos buscam-se conhecer, e apresenta diversas vantagens, tais como: simples implementação na prática, respostas experimentais mais efetivas, além de gerar como resposta informações mais relevantes sobre o sistema, principalmente acerca dos efeitos de interação entre os fatores estudados. Dessa forma, é possível identificar as variáveis que merecem maior atenção e controle para que a resposta seja mais próxima da esperada (NEUMAN, 1993; GARDINER, 1997; NETO *et al.*, 2010a).

Além disso, a informação adquirida pode ser usada na melhoria do processo, sendo que o modelo matemático que descreve o processo possibilita a predição de valores de respostas baseados em variações nos fatores mais significativos (NETO *et al.*, 2010a).

2.2.1 Definições

O planejamento fatorial é descrito como x^k sendo k o número de variáveis independentes ou fatores avaliados e x o número de níveis dessas variáveis.

Níveis são os valores em que cada fator será estudado. Um planejamento fatorial completo implica na realização de ensaios experimentais que contemplem todas as combinações possíveis dos níveis escolhidos. Os níveis costumam ser indicados por sinais e números, como por exemplo, “+1” e “-1” para identificar os níveis superior e inferior, respectivamente (NETO *et al.*, 2010b).

O planejamento fatorial de dois níveis (2^k) é um planejamento simples que se mostra bastante útil em investigações preliminares do desenvolvimento de um sistema, sendo uma ferramenta que permite identificar os fatores que exercem influência sobre as características do sistema (respostas ou variáveis dependentes) (NETO *et al.*, 2010b).

O planejamento dos experimentos descreve todos os ensaios que devem ser realizados e a lista de todos estes ensaios, especificando todas as combinações possíveis entre os níveis dos fatores escolhidos, é apresentada em uma matriz de planejamento (NETO *et al.*, 2010b). Cada ensaio deve ser realizado em várias replicatas, a fim de gerar dados suficientes para que a estimação dos efeitos seja estatisticamente significativa (GARDINER, 1997). Além disso, os ensaios devem ser realizados de forma aleatória para evitar que fatores externos não controlados influenciem os resultados e mascarem os efeitos em investigação, pois, na aleatorização, a probabilidade de um fator desconhecido influenciar a resposta de um ensaio é a mesma para todos e seu efeito acaba sendo diluído (NETO *et al.*, 2010b; SCHWAAB e PINTO, 2011).

2.2.2 Efeitos principais e de interação

Nos experimentos baseados em um planejamento fatorial, é possível inferir qual a influência dos fatores escolhidos (variáveis independentes) sobre uma resposta de interesse (variáveis dependentes), e se estes fatores interferem na resposta de maneira independente ou combinada. A influência de um fator isolado sobre a resposta é chamado efeito principal, obtido a partir da variação nos níveis do fator em questão. Já o efeito de interação é o efeito combinado de dois ou mais fatores sobre a resposta (GARDINER, 1997).

2.2.3 Planejamentos completos e fracionários

Em um planejamento do tipo fatorial completo, todas as combinações possíveis entre os níveis dos fatores são estudadas, assim, um estudo com quatro fatores selecionados, em dois diferentes níveis, exige a realização de 2^4 ensaios, totalizando 16 ensaios (NETO *et al.*, 2010b).

No início do desenvolvimento de um sistema de liberação de fármacos, quando ainda não se conhece as variáveis que efetivamente influenciam o comportamento do sistema, é interessante avaliar o maior número possível de variáveis, pois, assim, evita-se excluir dos estudos fatores importantes para o sistema em desenvolvimento (NETO *et al.*, 2010c).

Em um planejamento fatorial completo do tipo 2^k , quando o número k de fatores investigados aumenta, o número de ensaios aumenta drasticamente, tornando-se muitas vezes inviável a realização do estudo completo. Por exemplo, ao se optar por investigar o efeito de 7 fatores em uma determinada resposta, o número total para um planejamento completo de dois níveis (2^7) seria 128 ensaios (NETO *et al.*, 2010c).

Para evitar esse número exorbitante de ensaios, economizando recursos e tempo, realiza-se um planejamento fracionário ao invés do fatorial completo. Sendo assim, o planejamento fracionário é bastante útil para a triagem de variáveis, possibilitando, com um número reduzido de análises, identificar os fatores realmente significativos daqueles menos impactantes na resposta avaliada (NETO *et al.*, 2010c).

Dentre os fatoriais fracionários, existem os de fração meia, nos quais se realiza apenas metade do número total de ensaios, e aqueles menores ainda, em que apenas um quarto do total de ensaios é realizado (NETO *et al.*, 2010c).

Existe um limite entre o número de ensaios realizados e o número de fatores que podem ser investigados. Ao se trabalhar neste limite, está se realizando um planejamento fracionário do tipo saturado (NETO *et al.*, 2010c).

Um planejamento fracionário saturado, no qual se realizam 2^m ensaios, permite estudar a influência de (2^m-1) fatores, assim, um planejamento de apenas 8 ensaios, permitirá a análise de, no máximo, 7 fatores (NETO *et al.*, 2010c). Este foi o planejamento aplicado nesta etapa do trabalho (2^{7-4}).

2.2.4 Efeitos confundidos e resolução

Ao realizar um planejamento fracionário, o número de experimentos é reduzido, e com isso, algumas informações são perdidas, como por exemplo, os efeitos principais acabam incluindo efeitos de interação em seu conteúdo, ou seja, ambos se misturam, ou se confundem,

como é mais comumente denominada essa contaminação de efeitos (TEÓFILO e FERREIRA, 2006; NETO *et al.*, 2010c).

O efeito principal de um fator é confundido com as interações binárias dos demais fatores como mostra a Tabela 1 (NETO *et al.*, 2010c).

Tabela 1: Fatores e suas expressões em termos dos efeitos principais e das interações binárias com as quais são confundidos.

Fatores	Efeito principal + interações binárias confundidas
(1) Proporção G:P	1 + 24 + 35 + 67
(2) Concentração de polímeros (%)	2 + 14 + 36 + 57
(3) AlCl ₃ (%)	3 + 15 + 26 + 47
(4) Glu (%)	4 + 12 + 56 + 37
(5) Tempo em AlCl ₃ (min)	5 + 13 + 46 + 27
(6) Tempo em Glu (min)	6 + 23 + 45 + 17
(7) Concentração de fármaco (%)	7 + 34 + 25 + 16

Na verdade, cada efeito principal está confundido com mais 15 interações, na Tabela 1 estão descritas apenas as interações binárias (2 fatores) que são confundidas com cada efeito principal de um planejamento 2^{7-4} de resolução III, pois admite-se que os termos de ordem mais alta (3 fatores ou mais) são desprezíveis (NETO *et al.*, 2010c).

Em um planejamento de resolução III, os efeitos principais se confundem com as interações binárias, porém não se confundem entre si (TEÓFILO e FERREIRA, 2006), o que é importante durante a etapa de triagem das variáveis, pois se considerarmos nessa etapa que as interações binárias podem ser desprezíveis, os valores de efeitos calculados podem ser considerados como efeitos principais, e os maiores valores, em módulo, representam as variáveis mais importantes na resposta estudada.

Apesar dos efeitos confundidos, é preferível iniciar com a realização de apenas uma fração do total de ensaios, pois, caso seja necessário, sempre é possível realizar mais ensaios e completar o planejamento fatorial posteriormente, após a avaliação dos resultados (NETO *et al.*, 2010c).

3 OBJETIVOS

Desenvolver e caracterizar microesferas de GG:P duplamente reticuladas, empregando AlCl₃ e Glu como agentes reticulantes, e, a partir de um planejamento fatorial fracionário saturado (2^{7-4}), evidenciar os fatores determinantes sobre características das microesferas como tamanho, forma e liberação em meio ácido, visando a liberação cólon-específica do RES.

4 METODOLOGIA

4.1 Planejamento fatorial fracionado

Primeiramente, foi realizado um planejamento fatorial fracionário do tipo saturado 2^{7-4} , com o objetivo de estudar as variáveis que apresentam maior influência sobre as propriedades das microesferas. Nesse estudo, avaliaram-se apenas os efeitos principais dos fatores selecionados sobre as respostas escolhidas.

Fatores e níveis selecionados – variáveis independentes

Os fatores selecionados para esse primeiro estudo exploratório foram:

1. Proporção polimérica – G:P
2. Concentração de polímeros
3. Concentração de reticulante iônico (AlCl_3)
4. Concentração de reticulante covalente (Glu)
5. Tempo de reticulação em AlCl_3
6. Tempo de reticulação em Glu
7. Concentração de fármaco (RES)

A escolha baseou-se em estudos prévios do grupo com as microesferas de goma gelana e pectina (PREZOTTI, 2013; PREZOTTI *et al.*, 2014; BONI *et al.*, 2015). Os valores escolhidos para cada nível estão apresentados na Tabela 2:

Tabela 2: Níveis dos fatores avaliados no planejamento fatorial fracionário tipo saturado 2^{7-4} .

Fatores	Nível baixo (-1)	Nível alto (+1)
(1) Proporção G:P	1:1	4:1
(2) Concentração de polímeros (%)	2,0	3,0
(3) AlCl_3 (%)	3,0	5,0
(4) Glu (%)	0,5	1,0
(5) Tempo em AlCl_3 (min)	45	90
(6) Tempo em Glu (min)	15	30
(7) Concentração de fármaco (%)	0,25	0,50

No total, oito diferentes formulações de microesferas foram preparadas variando os sete fatores escolhidos. O planejamento foi delineado e analisado utilizando o *software* Statistica 7[®] (StatSoft Inc.).

Variáveis de resposta selecionadas – variáveis dependentes

Para essa primeira fase, foram escolhidas como variáveis de resposta o diâmetro médio, o índice de circularidade e a porcentagem de fármaco liberado em meio ácido (pH 1,2).

4.2 Obtenção das microesferas por geleificação ionotrópica

4.2.1 Reticulação iônica

Dispersões aquosas de GG:P (1:1 e 4:1) foram preparadas em diferentes concentrações, 2,0 ou 3,0% (m/V), utilizando água com conservantes microbiológicos metilparabeno e propilparabeno nas concentrações 0,18% e 0,02% (m/V), respectivamente. A dispersão dos polímeros foi realizada sob agitação magnética (100 rpm) e aquecimento (80 °C), e essas condições foram mantidas por 20 minutos. O fármaco foi incorporado às dispersões poliméricas (40°C) nas concentrações 0,25% ou 0,50% (m/V), também sob agitação magnética (100 rpm) e ao abrigo da luz. Após a dispersão do fármaco (15 min), a agitação foi mantida e as dispersões foram gotejadas, a uma distância de 8 cm, com auxílio de seringa e agulha sem bisel 23G 1” (0,6 x 25 mm; Injex[®]) sobre a solução reticulante de AlCl₃ nas concentrações 3% ou 5% (m/V), previamente resfriadas e mantidas em banho de gelo (4°C). O sistema foi mantido sob agitação magnética durante 45 ou 90 minutos, a fim de completar a reação de reticulação. As partículas obtidas foram separadas por filtração e lavadas com 150 mL de água purificada antes de serem submetidas ao segundo processo de reticulação.

4.2.2 Reticulação covalente

Após a lavagem, as partículas obtidas no item 4.2.1 foram imersas em 150 mL de solução de Glu nas concentrações 0,5% ou 1,0% (m/V), por 15 ou 30 minutos, sob agitação magnética, em capela de exaustão. Em seguida, as amostras foram filtradas, lavadas com água purificada (500 mL), a fim de remover o reticulante livre, secas em temperatura ambiente e armazenadas em dessecador, sob vácuo e ao abrigo da luz.

As composições das amostras estão apresentadas na Tabela 3. As microesferas foram preparadas em ordem aleatória, conforme preconizado para os experimentos de um planejamento fatorial, a fim de que os efeitos relativos a fatores externos não controlados afetassem aleatoriamente as respostas (ARMSTRONG, 2006; SCHWAAB e PINTO, 2011).

Tabela 3: Composição das microesferas e valores dos níveis +1 e -1 das variáveis selecionadas para o planejamento fatorial fracionário tipo saturado 2^{7-4} .

Amostra	Proporção GG:P	Polímeros (%)	AlCl ₃ (%)	Glu (%)	Tempo em AlCl ₃ (min)	Tempo em Glu (min)	RES (%)
M 1	1:1 (-1)	2 (-1)	3 (-1)	1,0 (+1)	90 (+1)	30 (+1)	0,25 (-1)
M 2	4:1 (+1)	2 (-1)	3 (-1)	0,5 (-1)	45 (-1)	30 (+1)	0,50 (+1)
M 3	1:1 (-1)	3 (+1)	3 (-1)	0,5 (-1)	90 (+1)	15 (-1)	0,50 (+1)
M 4	4:1 (+1)	3 (+1)	3 (-1)	1,0 (+1)	45 (-1)	15 (-1)	0,25 (-1)
M 5	1:1(-1)	2 (-1)	5 (+1)	1,0 (+1)	45 (-1)	15 (-1)	0,50 (+1)
M 6	4:1 (+1)	2 (-1)	5 (+1)	0,5 (-1)	90 (+1)	15 (-1)	0,25 (-1)
M 7	1:1(-1)	3 (+1)	5 (+1)	0,5 (-1)	45 (-1)	30 (+1)	0,25 (-1)
M 8	4:1 (+1)	3 (+1)	5 (+1)	1,0 (+1)	90 (+1)	30 (+1)	0,50 (+1)

4.3 Análise de morfologia de superfície e estrutura interna

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para caracterizar a morfologia da superfície das microesferas e suas estruturas internas. Utilizou-se um microscópio eletrônico de varredura de alta resolução modelo JEOL JSM-7500F. A estrutura interna foi avaliada após submeter as microesferas a um processo de criofratura, no qual, após serem congeladas utilizando nitrogênio líquido, as partículas foram partidas com auxílio de um pistilo. As amostras foram fixadas em fita de carbono dupla face, recobertas com ouro, e fotomicrografias em diferentes aumentos foram obtidas.

4.4 Análise de tamanho, forma e polidispersidade das microesferas

O tamanho e a forma das microesferas foram avaliados em estereoscópio Leica MZ APO[®] com aumento de 10 vezes. As microesferas foram previamente secas até peso constante, dispostas em placa de Petri e as imagens foram capturadas com auxílio do programa *Motic Images Advance 2.0*. As imagens digitalizadas foram analisadas utilizando o programa analisador de imagem *Motic Images Advance 3.2*. Populações de 100 partículas de cada formulação foram fotografadas e os parâmetros avaliados pelo programa foram o diâmetro do círculo equivalente e o índice de circularidade.

A polidispersidade das amostras foi determinada a partir do índice Span, calculado segundo a Equação 1:

$$Span = \frac{D_{90} - D_{10}}{D_{50}} \quad \text{Equação 1}$$

em que D_{90} , D_{10} e D_{50} são os diâmetros (μm) determinados para os percentis 90, 10 e 50, respectivamente (FAREEZ *et al.*, 2015).

4.5 Teor de fármaco e eficiência de encapsulação (EE%)

Imediatamente após o preparo, antes de serem secas, oito microesferas foram trituradas em 20 mL de tampão fosfato pH 7,4 utilizando ultra-turrax (IKA) a 11.000 rpm durante 2 minutos, para a completa extração do fármaco. Lauril sulfato de sódio (1%, m/v) foi posteriormente adicionado para garantir a solubilidade do fármaco extraído e após 1 hora a dispersão foi centrifugada a 2500 rpm por 5 minutos e o fármaco presente no sobrenadante foi quantificado utilizando espectrofotômetro UV-VIS em 320 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata. A metodologia analítica para a quantificação do fármaco foi validada (Capítulo V).

A concentração de fármaco nas microesferas (teor de fármaco *mensurado*) foi calculada como a razão entre a quantidade de fármaco por massa de microesferas (Equação 2). A EE% foi determinada a partir da concentração mensurada de fármaco nas microesferas (teor de fármaco *mensurado*) em relação à concentração teórica esperada (teor de fármaco *teórico*), segundo as Equações 3 e 4 (ANGADI *et al.*, 2013):

$$\text{Teor de fármaco } m_{\text{mensurado}}(\%) = \frac{m_{\text{fármaco nas microesferas}}}{m_{\text{microesferas}}} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

$$\text{Teor de fármaco } m_{\text{teórico}}(\%) = \frac{m_{\text{fármaco adicionado}}}{m_{\text{polímeros+fármaco}}} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

$$EE(\%) = \frac{\text{teor de fármaco } m_{\text{mensurado}}}{\text{teor de fármaco } m_{\text{teórico}}} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

em que $m_{\text{fármaco nas microesferas}}$ (μg) é a quantidade mensurada de fármaco em oito microesferas; $m_{\text{microesferas}}$ é a massa (μg) referente a oito microesferas secas, determinada após a amostras serem secas até peso constante. O teor de fármaco *teórico* foi determinado baseado na composição de cada microesfera segundo o planejamento dos experimentos, sendo $m_{\text{fármaco adicionado}}$ a massa (μg) referente à concentração de fármaco na composição da amostra, e $m_{\text{polímeros+fármaco}}$ a massa (μg) referente à soma das quantidades de goma gelana, pectina e resveratrol adicionados para obtenção das microesferas.

4.6 Intumescimento

O intumescimento foi determinado por método volumétrico, através da avaliação da expansão de volume das microesferas após 240 minutos em contato com o meio de intumescimento de acordo com metodologia proposta por BABU *et al.* (2002) e CONSTANTIN *et al.* (2004).

A expansão de volume das microesferas foi avaliada em seringa de vidro graduada (1 mL/0,05 mL, Artglass[®]), que teve sua extremidade inferior vedada (Figura 3) e foi fixada em um suporte vertical. A representação esquemática do sistema é apresentada na Figura 4.

Figura 3: Seringa de vidro graduada, com a extremidade inferior vedada, para avaliação do intumescimento das microesferas.



Uma massa precisamente pesada de microesferas previamente secas até peso constante foi introduzida na seringa de vidro e o volume ocupado pela amostra foi mensurado (V_0). Em seguida, 1 mL de meio de intumescimento foi adicionado cuidadosamente.

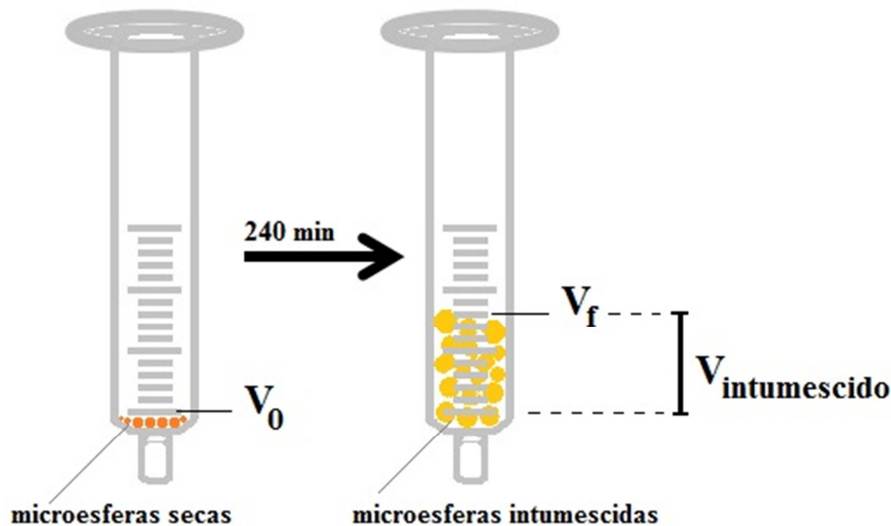
Foram utilizados como meio de intumescimento, soluções com três diferentes valores de pH, sendo elas HCl 0,1N pH 1,2, tampão fosfato de sódio pH 6,0 e pH 7,4.

O volume ocupado pelas microesferas intumescidas (V_f) foi determinado após 240 minutos. Os testes foram realizados em triplicata e a porcentagem de intumescimento foi calculada a partir da Equação 5:

$$\text{Intumescimento (\%)} = \frac{(V_f - V_0)}{V_0} \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

em que V_0 é o volume inicial ocupado pelas microesferas secas e V_f é o volume final ocupado pelas microesferas intumescidas.

Figura 4: Representação esquemática do intumescimento por análise volumétrica.



* V_0 = volume ocupado pelas microesferas secas

** V_f = volume ocupado pelas microesferas intumescidas após 240 min de teste

*** $V_{\text{intumescido}}$ = diferença entre os V_f e V_0 .

4.7 Determinação da capacidade de absorção de líquido

A capacidade de absorção de líquido pelas microesferas foi avaliada gravimetricamente. Imediatamente após o término do teste de intumescimento (item 4.6), as microesferas foram retiradas da seringa e o excesso de líquido foi removido cuidadosamente com papel absorvente. As microesferas intumescidas foram precisamente pesadas, secas até peso constante e pesadas novamente. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos em porcentagem de líquido absorvido, calculados a partir da Equação 6 (BANERJEE *et al.*, 2012):

$$\% \text{ líquido absorvido} = \frac{m_{\text{int}} - m_{f_s}}{m_{f_s}} \times 100 \quad \text{Equação 6}$$

em que, m_{int} (g) é a massa das microesferas intumescidas e m_{f_s} é a massa final de microesferas secas (g).

4.8 Erosão

Uma massa precisamente pesada de microesferas foi incubada em diferentes meios (HCl 0,1N pH 1,2; tampão fosfato de sódio pH 6,0 ou 7,4). Após 240 minutos, as microesferas foram retiradas do meio, secas até peso constante em analisador de umidade por infravermelho (Gehaka) e pesadas novamente para avaliar a perda de massa. A porcentagem de erosão foi calculada a partir da Equação 7:

$$\%erosão = \frac{(m_0 - m_f)}{m_0} \times 100 \quad \text{Equação 7}$$

em que m_0 é a massa inicial (g) e m_f é a massa final (g) de microesferas.

4.9 Determinação da solubilidade do RES

A solubilidade do RES foi determinada através do método do equilíbrio (TONG e WEN, 2008), em diferentes meios contendo ou não o tensoativo lauril sulfato de sódio (LSS). Os meios testados foram HCl 0,1 N (pH 1,2) contendo ou não LSS em diferentes concentrações (0,5 a 2,0%, m/V), tampão fosfato de sódio pH 6,8, sem tensoativo e com LSS 1% (m/V), água purificada sem tensoativo e tampão TC199 contendo ou não LSS em concentrações de 0,1 a 1,0% (m/V). O RES foi adicionado em excesso aos diferentes meios para garantir a saturação, e o conjunto mantido sob agitação em homogeneizador orbital por 72h, ao abrigo da luz. Após esse período, as amostras foram centrifugadas (10.000 rpm, 5 minutos) e o sobrenadante filtrado em membrana de 0,22 μm . O fármaco solúvel no sobrenadante foi quantificado em espectrofotômetro UV-Visível utilizando curvas analíticas previamente obtidas para cada meio.

4.10 Determinação da liberação *in vitro* do fármaco em meio ácido (pH 1,2)

A fim de avaliar o potencial das microesferas como sistemas de liberação cólon-específica e sua proteção contra a liberação prematura do fármaco no estômago e, posteriormente, eleger os fatores mais significativos para serem estudados em um planejamento fatorial completo, realizou-se o teste de liberação *in vitro* por 2h em meio ácido, conforme preconizado pela Farmacopeia Americana para formas farmacêuticas de liberação retardada (USP, 2011).

O ensaio foi realizado com uma massa de microesferas correspondente a 5 mg de fármaco, utilizando-se o aparato cesto e cuba de volume reduzido (150mL) (Figura 5), baseado na geometria do aparato 1 (USP), sob velocidade de agitação de 50 rpm, temperatura de $37 \pm 0,4$ °C. Como meio de dissolução empregou-se solução de HCl 0,1N (pH 1,2) e para garantir as condições *sink*, lauril sulfato de sódio (1,0%, m/V) foi adicionado como tensoativo devido à escassa solubilidade do fármaco neste meio. Alíquotas foram retiradas em intervalos de tempo pré-estabelecidos durante 2 horas, sendo feita a reposição imediata do mesmo volume de meio à mesma temperatura. A quantidade de fármaco liberada foi determinada em espectrofotômetro UV-Visível, no comprimento de onda de máxima absorção (320 nm), segundo metodologia validada (Capítulo V). Os ensaios foram realizados em triplicata.

Figura 5: Conjunto de cesto e cuba de volume reduzido (150 mL) utilizados nos ensaios de liberação *in vitro* do fármaco.



4.11 Estudos da mucoadesividade das microesferas

4.11.1 Avaliação *in vitro* da mucoadesão

A mucoadesão foi avaliada através da interação entre a mucina, principal glicoproteína constituinte do muco (KHANVILKAR *et al.*, 2001), e microesferas dispersas em solução aquosa (DHAWAN *et al.*, 2004; SONIA e SHARMA, 2011; PREZOTTI *et al.*, 2014).

Soluções aquosas de mucina (tipo II; Sigma-Aldrich®) foram preparadas nas concentrações de 100, 150, 200 e 250 µg/ml em pH 1,2 ou pH 6,8, a partir de uma solução estoque a 500 µg/ml. Microesferas (20 mg) foram adicionadas à 10 ml das soluções aquosas de mucina nas diferentes concentrações citadas. Após agitação em vortex, as amostras foram incubadas em banho termostatizado com circulação a 37°C por 1h. Em seguida, foram centrifugadas a 3000 rpm por 2 min e o sobrenadante foi utilizado para a quantificação da mucina livre empregando-se o método de Lowry modificado por Peterson (PETERSON, 1977; DHAWAN *et al.*, 2004). Trata-se de um método colorimétrico que permite a quantificação de proteínas utilizando espectrofotômetro.

Para a determinação da mucina livre no sobrenadante, foram utilizados os reagentes do conjunto *Total Protein Kit, Micro Lowry, Peterson's Modification* (Sigma-Aldrich). Adicionou-se 1 ml do reagente de Lowry à alíquotas de 1 ml de sobrenadante. As soluções permaneceram em repouso em temperatura ambiente por 20 minutos e, então, adicionou-se 0,5 ml do reagente de Folin-Ciocalteu's. As soluções permaneceram em repouso por mais 30 minutos para o desenvolvimento de cor e a absorbância foi mensurada em espectrofotômetro UV-Visível em 749 nm, em duplicata. Para o branco, o mesmo procedimento foi empregado utilizando água purificada.

Para o cálculo da quantidade de mucina livre, utilizou-se uma curva analítica padrão de equação $y=0,0048x+0,1396$ e $r^2: 0,991$. A quantidade de mucina adsorvida foi determinada indiretamente, a partir da quantificação da mucina livre no sobrenadante, através da Equação 8:

$$Q_{mucina\ adsorvida} = Q_{mucina\ adicionada} - Q_{mucina\ livre} \quad \text{Equação 8}$$

4.11.1.1 Isotermas de adsorção da mucina

Os dados de concentração de mucina livre no sobrenadante e adsorvida às microesferas foram interpretados utilizando-se as equações linearizadas de Freundlich (Equação 9) e Langmuir (Equação 10), que são as mais comumente utilizadas para descrever as isotermas de adsorção de um soluto único sobre um adsorbente, como neste caso, a mucina sobre as microesferas (SNOEYINK e SUMMERS, 1990; AYRANCI e DUMAN, 2005; HAMEED e RAHMAN, 2008):

$$\log Q_e = \log k + \frac{1}{n} \log C_e \quad \text{Equação 9}$$

$$\frac{C_e}{Q_e} = \frac{1}{Q_{m\acute{a}x} b} + \frac{C_e}{Q_{m\acute{a}x}} \quad \text{Equação 10}$$

em que Q_e é a quantidade de mucina adsorvida por unidade de massa de microesferas (mg/g) e C_e é concentração de mucina livre no sobrenadante (mg/L), k é a constante de Freundlich e representa a capacidade de adsorção, n é a constante que representa a intensidade da adsorção. $Q_{m\acute{a}x}$ e b são parâmetros de Langmuir, sendo $Q_{m\acute{a}x}$ a constante que representa a máxima capacidade de adsorção na monocamada e b a constante de equilíbrio de adsorção, relacionada à energia de adsorção (LAN *et al.*, 2001; AYRANCI e DUMAN, 2005; KYZAS *et al.*, 2013).

Para aplicar o modelo de Freundlich, plotou-se o gráfico de $\log Q_e$ vs $\log C_e$, e para o modelo de Langmuir plotou-se o gráfico C_e/Q_e vs C_e . Os valores das constantes foram obtidos a partir de uma regressão linear para o modelo que melhor se correlacionou aos dados,

determinado através dos maiores valores apresentados para o coeficiente de determinação (r^2) (HAMEED e RAHMAN, 2008).

4.11.2 Avaliação *ex vivo* da mucoadesão

A avaliação *ex vivo* da mucoadesão foi realizada utilizando mucosa fresca de intestino de porco, previamente limpa com solução salina (NaCl 0,9%, m/V). O teste foi realizado segundo procedimento descrito por RAO e BURI (1989), com algumas modificações (PREZOTTI *et al.*, 2014).

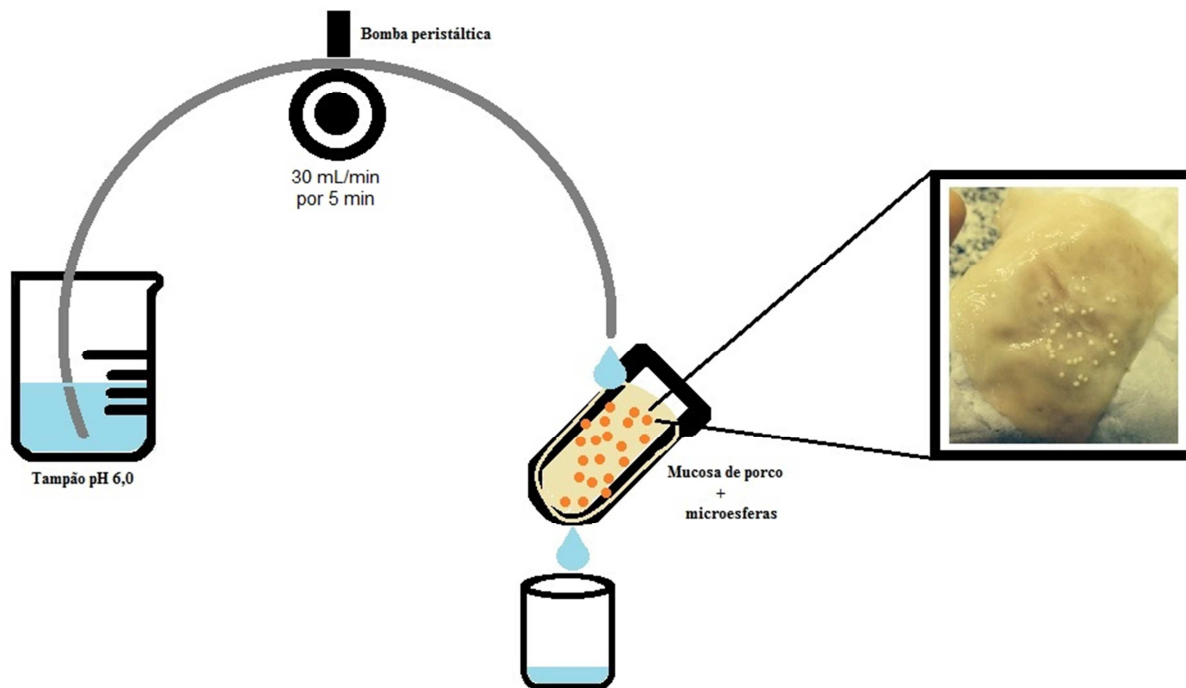
Os intestinos foram adquiridos em abatedouro local e foram cuidadosamente lavados com solução salina, a fim de preservar a camada de muco aderida ao tecido.

Primeiramente, os intestinos foram abertos longitudinalmente e, com auxílio de bisturi, foram cortados em peças de aproximadamente 4 x 4 cm. As peças foram cuidadosamente dispostas sobre suporte plástico com a mucosa exposta, e previamente irrigadas com tampão fosfato pH 6,8 por 5 minutos. Em seguida, 20 microesferas foram cuidadosamente dispostas sobre a mucosa, sem exercer pressão sobre elas, e um tempo de contato de 20 minutos foi permitido, para que ocorresse o intumescimento das partículas e o processo de mucoadesão inicial fosse estabelecido.

O conjunto foi transferido para um suporte inclinado ($\sim 30^\circ$) e, com auxílio de uma bomba peristáltica, a mucosa foi lavada com tampão fosfato pH 6,8 a uma taxa de 30 mL/min, durante 5 minutos (Figura 6). O número de partículas que permaneceram aderidas ao tecido foi determinado visualmente e a porcentagem de mucoadesão foi determinada como a relação entre o número de microesferas aderidas ao final do ensaio e o número inicial de microesferas colocadas sobre a mucosa (Equação 11):

$$\text{Mucoadesão (\%)} = \frac{n^{\circ}_{\text{final microesferas aderidas}}}{n^{\circ}_{\text{inicial microesferas na mucosa}}} \times 100 \quad \text{Equação 11}$$

Figura 6: Representação esquemática do ensaio de mucoadesão *ex vivo*.



4.12 Seleção dos fatores e níveis para o planejamento fatorial completo 2^4

Dentre os sete fatores escolhidos e avaliados nesse primeiro estudo exploratório, quatro foram selecionados para o delineamento de um planejamento fatorial completo 2^4 , sendo que as demais variáveis independentes foram fixadas em um valor considerado apropriado para um processo mais eficiente de obtenção de microesferas. A escolha foi feita a partir da avaliação dos resultados de caracterização das microesferas, e, principalmente, baseou-se na menor liberação do fármaco em meio ácido.

4.13 Análise estatística dos resultados

Os dados foram tratados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA), seguida por comparações múltiplas pelo método de Tukey e adotou-se nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Obtenção das microesferas por geleificação ionotrópica

As microesferas são partículas de forma esférica, que originam sistemas matriciais ou monolíticos, nos quais o fármaco encontra-se dissolvido ou disperso através da matriz polimérica. Estes sistemas multiparticulados apresentam importantes vantagens em relação aos sistemas monolíticos, como ampla distribuição sobre a superfície do TGI, o que promove uma

absorção mais regular e diminui o risco de irritação causada por acúmulo localizado de fármacos irritantes sobre as mucosas (ZHANG *et al.*, 2002; MAESTRELLI *et al.*, 2008; KHAN *et al.*, 2010; ZERBINI, 2010; KULKARNI *et al.*, 2011; MAITI *et al.*, 2011).

Vários parâmetros podem afetar a formação das microesferas pelo método da geleificação ionotrópica, dentre eles pode-se citar a concentração da dispersão polimérica e da solução reticulante, a altura do gotejamento, o diâmetro da agulha, a temperatura da dispersão polimérica, a concentração do fármaco, o estado em que o fármaco se encontra na dispersão (solúvel ou insolúvel), etc (CELLESI *et al.*, 2004; CHAN *et al.*, 2009; TRAN *et al.*, 2011), Assim, a otimização de condições do método e da formulação para a obtenção de microesferas com morfologia adequada é um processo que demanda tempo.

Soma-se ainda o fato de que esses parâmetros podem afetar diretamente as características do sistema de liberação, como eficiência de encapsulação, intumescimento, perfil de liberação do fármaco, mucoadesão, etc (AHUJA *et al.*, 2010).

Quando se estuda a alteração de cada parâmetro individualmente e os efeitos que essa alteração provoca nas características do sistema de liberação, como é comumente feito quando se desenvolve uma nova formulação farmacêutica, o tempo e os materiais gastos podem tornar a pesquisa inviável.

O planejamento fatorial é uma valiosa ferramenta estatística que deve ser empregada quando um grande número de variáveis de formulação e de processo afetam as características do sistema (RODRIGUES e IEMMA, 2005; AGNIHOTRI e AMINABHAVI, 2006; NETO *et al.*, 2010a).

Durante o desenvolvimento de sistemas multiparticulados, como as microesferas para a liberação controlada de fármacos, é fundamental que os parâmetros escolhidos bem como o método de obtenção permitam produzir partículas esféricas e de tamanho homogêneo, pois assim taxas mais reprodutíveis de liberação do fármaco podem ser alcançadas (CHAN *et al.*, 2009).

Sendo assim, buscou-se a obtenção de microesferas de forma esférica e de tamanho homogêneo, capazes de proteger o fármaco contra a liberação prematura nas porções superiores do TGI, sendo que a escolha das proporções entre GG:P e as concentrações dos polímeros e dos reticulantes foram escolhidas baseadas em estudos prévios do grupo (PREZOTTI, 2013; PREZOTTI *et al.*, 2014; BONI *et al.*, 2015).

Durante o desenvolvimento de microesferas reticuladas ionicamente utilizando o $AlCl_3$, foi possível observar que concentrações de polímeros inferiores a 2,0% (m/v) e que a proporção 1:4 da mistura de GG:P originavam microesferas com baixo índice de circularidade e com

formação de cauda (PREZOTTI, 2013). Desta forma, a mínima concentração polimérica fixada para o estudo neste trabalho foi de 2,0% (m/V).

A mistura de GG:P foi escolhida, uma vez que microesferas obtidas com essa mistura polimérica mostraram-se mais eficientes na proteção contra a liberação do fármacos em meio ácido e reduziram o efeito *burst* da liberação em meio que simula o pH intestinal, em comparação com microesferas de goma gelana (BONI *et al.*, 2015).

Em recente estudo realizado por nosso grupo de pesquisa, BONI *et al.* (2015) verificaram que microesferas de goma gelana reticuladas ionicamente com 3 ou 5% de $AlCl_3$ liberaram 42,4% e 44,9%, do fármaco modelo (cetoprofeno) em pH 1,2, respectivamente, enquanto microesferas compostas pela mistura polimérica liberaram entre 20% e 34% do cetoprofeno em meio ácido (PREZOTTI *et al.*, 2014). Ainda, as microesferas de goma gelana controlaram a liberação por, no máximo, 4 horas, enquanto as microesferas de GG:P controlaram a liberação por até 6 horas (PREZOTTI, 2013; PREZOTTI *et al.*, 2014; BONI *et al.*, 2015).

Nesta etapa do trabalho, a fim de se minimizar os percentuais de liberação em meio ácido, foram obtidas oito diferentes formulações de microesferas duplamente reticuladas contendo resveratrol, delineadas a partir de um planejamento fatorial fracionário do tipo saturado 2^{7-4} , que é aquele que, para um dado número de ensaios, neste caso 8, investiga-se o máximo de fatores (variáveis independentes) possíveis, para este tipo foram 7, ou seja, avalia-se o efeito de um grande número de fatores com o mínimo possível de ensaios.

Avaliou-se a influência de sete fatores (Tabela 2) sobre o diâmetro médio, a circularidade e a liberação do fármaco em meio ácido, a fim de escolher aqueles que mais influenciam na proteção do fármaco encapsulado contra a liberação prematura no estômago e, posteriormente, realizar um planejamento fatorial completo com menor número de variáveis.

As proporções e as concentrações escolhidas permitiram o gotejamento sem que houvesse geleificação imediata por resfriamento da dispersão polimérica na seringa ou obstrução da agulha pelo fármaco, e microesferas circulares puderam ser obtidas. Para a concentração de 2% de polímeros, a proporção 4:1 foi visualmente mais viscosa que a proporção 1:1 e a concentração de 3% foi aparentemente mais viscosa que a 2%, em ambas as proporções.

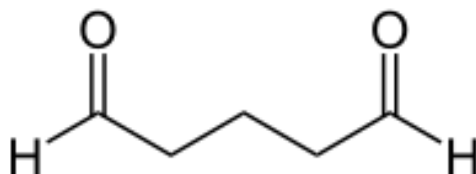
A altura padronizada para o gotejamento foi de 8 cm em relação à placa de Petri, e a taxa de gotejamento foi lenta para que houvesse a formação de partículas com forma esférica e tamanho homogêneo. Foi utilizada solução reticulante previamente resfriada (4°C) com a finalidade de auxiliar na formação das microesferas, uma vez que a geleificação da GG se dá em temperaturas mais baixas. Outro propósito foi o de aumentar a EE%, já que a solubilidade

do fármaco é reduzida em temperaturas mais baixas, e, assim, evita-se ao máximo a perda de RES para a solução reticulante (OGAWA *et al.*, 2006).

Ao entrar em contato com a solução de AlCl_3 , a dispersão de GG:P contendo RES sofre a primeira reação de reticulação, na qual ligações iônicas entre os íons positivos trivalentes de Al^{3+} e os grupos carboxilatos (COO^-) carregados negativamente dos polímeros mantêm as cadeias poliméricas unidas, formando uma rede reticulada ionicamente, dentro da qual é aprisionado o fármaco (KULKARNI *et al.*, 2011; MAITI *et al.*, 2011). O átomo de alumínio pode ainda aceitar um par de elétrons doado por um átomo de oxigênio das hidroxilas dos polímeros próximos ao cátion, fortalecendo ainda mais a rede formada. Isso é possível devido à estrutura supramolecular dos polímeros aliada ao tamanho do íon alumínio relativamente pequeno, se comparado seu raio com o de outros cátions comumente utilizados para a reticulação iônica, como o cálcio (MAITI *et al.*, 2011).

Ao transferir as microesferas reticuladas ionicamente para a solução de Glu, um aldeído bi-funcional que atua como agente reticulante covalente (ALVES *et al.*, 2011), como mostra sua estrutura química (Figura 7), ocorre a formação de grupos acetais (R-O-(CHR)-O-R') pela reação entre as carbonilas do Glu ($-\text{CHO}$) e as hidroxilas ($-\text{OH}$) dos polímeros (KULKARNI *et al.*, 2011). A reticulação leva à formação de uma rede insolúvel, capaz de reduzir as taxas de liberação do fármaco e sua liberação prematura nas porções superiores do TGI.

Figura 7: Estrutura química do glutaraldeído.



Os tempos de permanência das microesferas nas soluções reticulantes foram escolhidos baseados em estudos prévios do grupo e em estudos da literatura que afirmam que a reação de reticulação iônica é mais lenta que a reticulação covalente (MI *et al.*, 2003). Sendo assim, as formulações permaneceram sempre por tempos maiores na solução de AlCl_3 em relação ao tempo na solução de Glu.

5.2 Análise de morfologia de superfície e estrutura interna

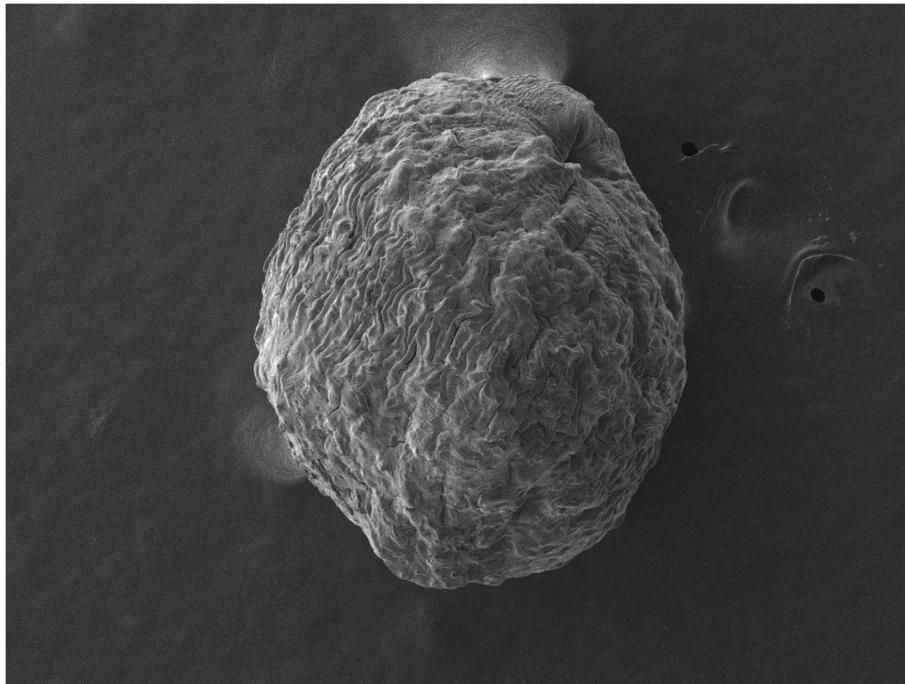
A partir da visualização das microesferas por microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV) é possível avaliar sua forma, seu tamanho e outras características como a

rugosidade da superfície e, em alguns casos, a localização do fármaco, no interior ou na região mais superficial das partículas (GAUMET *et al.*, 2008).

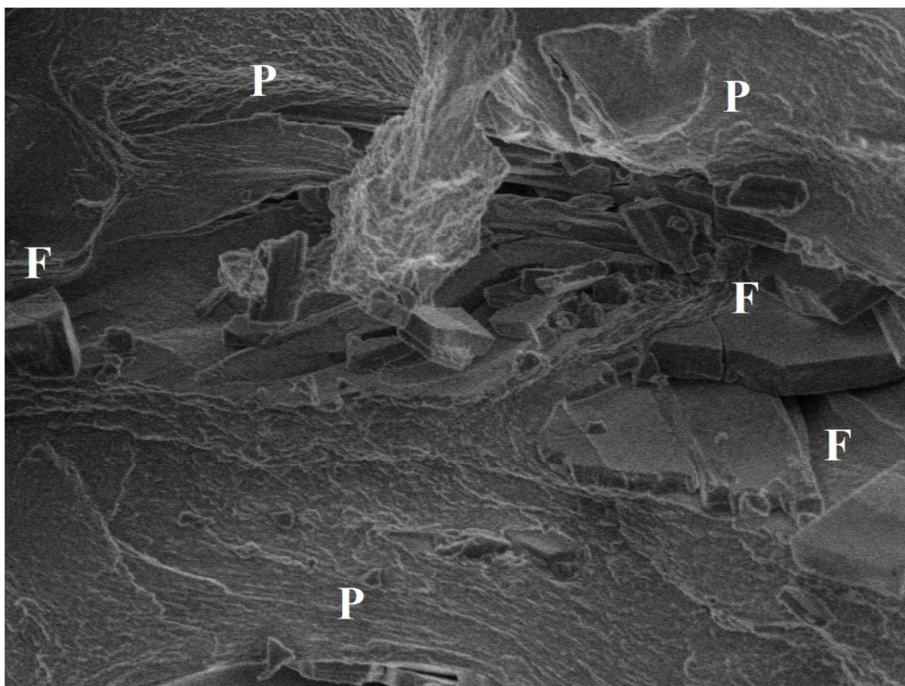
As fotomicrografias apresentadas na Figura 8 são representativas das demais amostras e mostram a forma aproximadamente esférica, a rugosidade de superfície e a presença de cristais de fármaco no interior da estrutura.

Figura 8: Fotomicrografias evidenciando A) a forma esférica e a rugosidade da superfície das microesferas (M 7, aumento de 70 x); e B) o fármaco incorporado no interior das microesferas (M 6 criofraturada, aumento de 5.000 x).

A)



B)

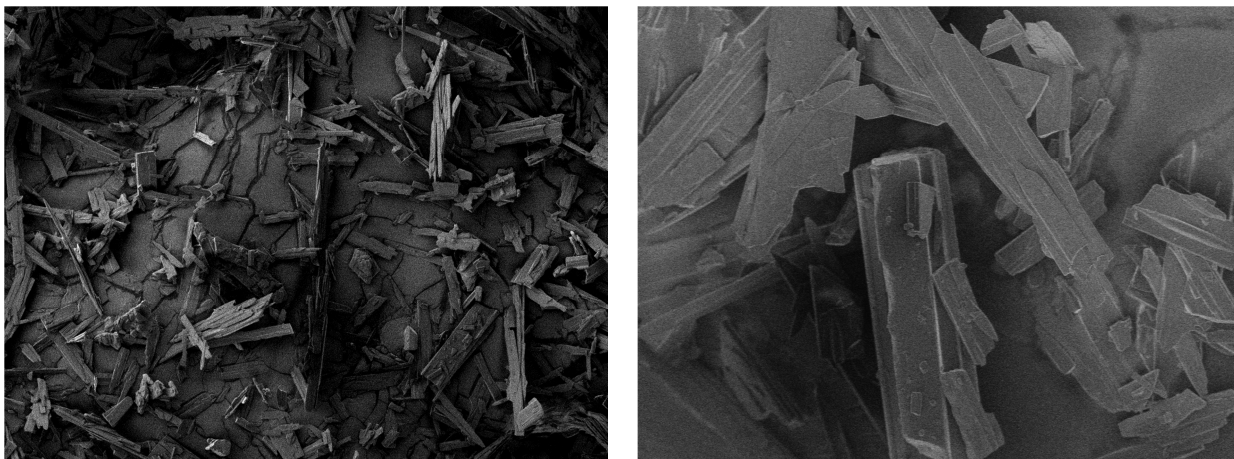


* F = região contendo cristais de fármaco;

** P = região contendo polímeros.

Na Figura 9 são apresentadas as imagens do fármaco livre em diferentes aumentos. É possível observar a forma característica dos cristais de RES, conforme visualizados no interior das microesferas (Figura 8 B).

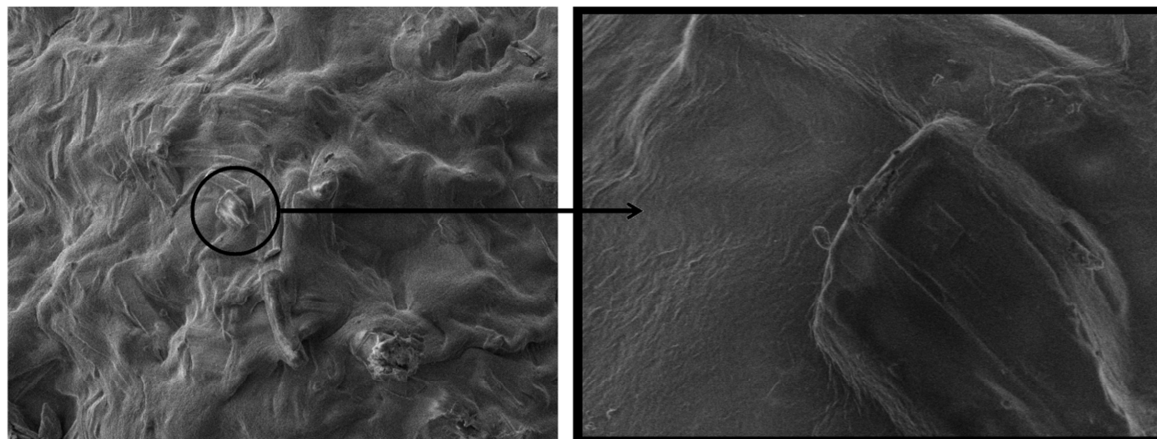
Figura 9: Fotomicrografias de cristais de resveratrol (fármaco livre; aumento de 300x à esquerda e aumento de 1.500x à direita).



Para todas as formulações de microesferas, observou-se uma superfície rugosa com algumas reentrâncias, característica que deve ser o resultado da remoção da água durante a secagem das mesmas (BEZEMER *et al.*, 2000).

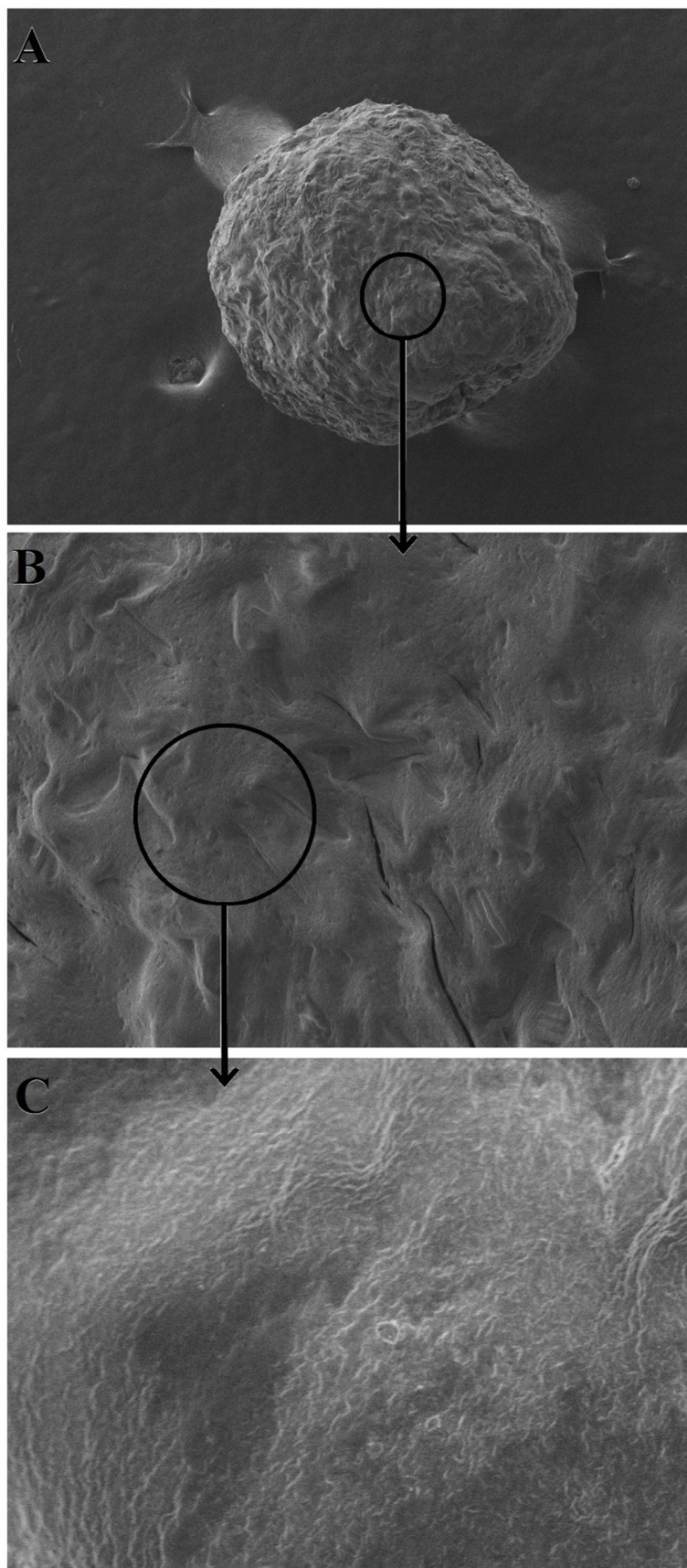
Na figura 10 é possível observar cristais de fármaco recobertos por polímeros, próximos à superfície, que devem ter ficado bem visíveis devido à retração da malha polimérica após a secagem das microesferas (BEZEMER *et al.*, 2000).

Figura 10: Fotomicrografias evidenciando a presença de fármaco recoberto pela rede polimérica próximo à superfície da microesfera (amostra M 3, aumento de 500x à esquerda e 5.000x à direita).



A Figura 11 apresenta fotomicrografias, representativas para todas as amostras analisadas, que evidenciam a ausência de fármaco na superfície externa das microesferas.

Figura 11: Fotomicrografias evidenciando a ausência de fármaco na superfície externa das microesferas. A) Amostra M 4 em aumento de 70x; B) Ampliação da superfície da mesma microesfera em aumento de 500x e C) ampliação da mesma região com aumento de 5.000x.



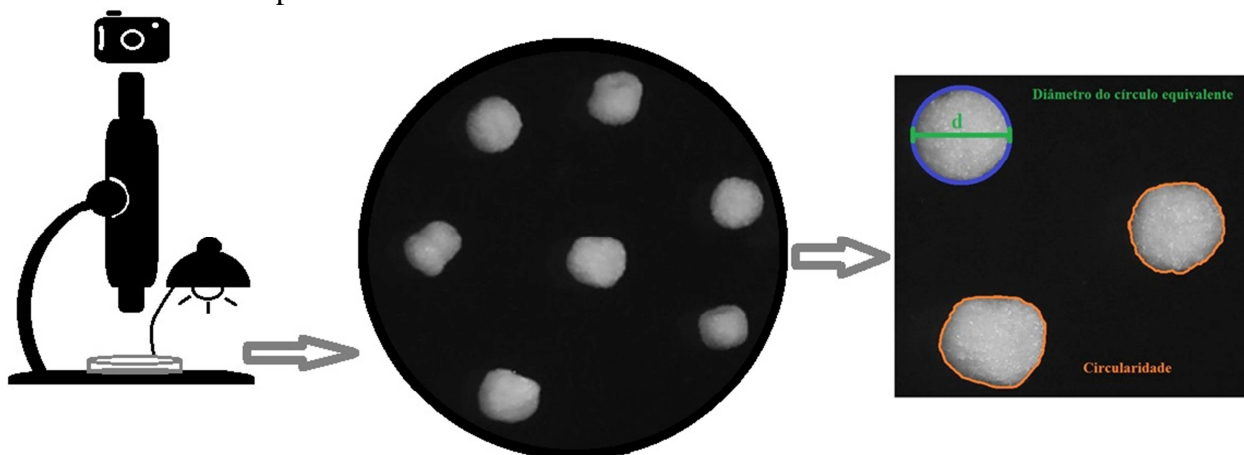
A primeira imagem apresenta a microesfera inteira que corresponde a amostra M 4 em aumento de 70x (Figura 11 A). A ampliação da superfície dessa mesma microesfera, em aumento de 500x (Figura 11 B) permite visualizar a superfície rugosa com as reentrâncias típicas e a ausência de cristais pontiagudos, que é confirmada pela ampliação da mesma região na Figura 11 C, em aumento de 5.000x, na qual se observa a rede polimérica bastante homogênea e contínua, sem poros. Não foram observados cristais pontiagudos característicos do RES livre no exterior das microesferas, portanto pode-se concluir que o fármaco está inserido no interior das mesmas, e que, próximo à superfície, ele se mantém recoberto sempre por uma camada polimérica que o protege, conforme evidenciado nas Figuras 10 e 11.

5.3 Análise de tamanho, forma e polidispersidade das microesferas

O tamanho das microesferas foi avaliado medindo-se o diâmetro do círculo equivalente, que corresponde ao diâmetro de um círculo de área equivalente à área da partícula analisada (BARBER e HEALTHCARE, 1993). A forma das partículas foi avaliada através do índice de circularidade, que é um fator de forma, adimensional, que expressa a regularidade da microesfera, e varia de 0 a 1, sendo 1 o valor que representa um círculo perfeito (BARREIROS *et al.*, 1996). O índice Span que representa a polidispersidade da amostra foi calculado a fim de avaliar a homogeneidade de distribuição de tamanho das amostras (FAREEZ *et al.*, 2015).

A Figura 12 apresenta um exemplo de imagem das microesferas capturada em estereoscópio e digitalizada para posterior análise utilizando o *software* analisador de imagens, bem como os parâmetros que são avaliados.

Figura 12: Representação esquemática da avaliação de tamanho e forma das microesferas utilizando estereoscópio.



Os resultados de diâmetro médio, índice de circularidade e índice Span das microesferas estão apresentados na Tabela 4. Avaliou-se a influência dos sete fatores sobre o tamanho e a forma das oito diferentes formulações de microesferas.

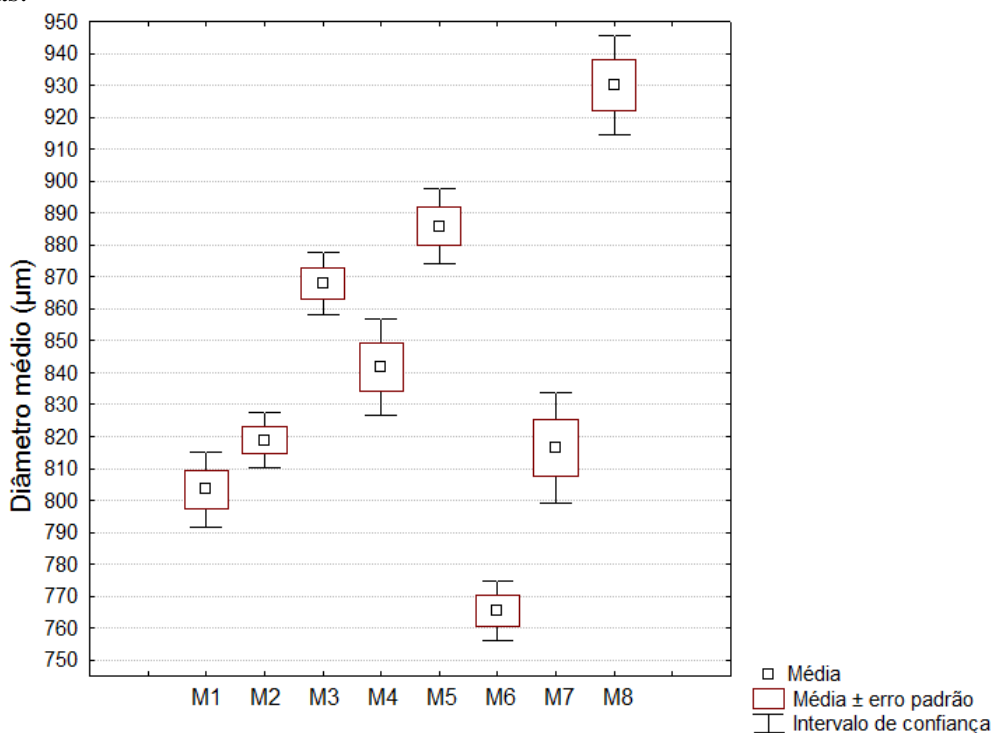
Tabela 4: Valores de índice de circularidade, diâmetro do círculo equivalente e índice Span das microesferas de GG:P (média ± DP; n=100).

Amostra	Índice de circularidade	Diâmetro do círculo equivalente (µm)	Índice Span
M 1	0,721 ± 0,133	803,46 ± 59,91	0,19
M 2	0,747 ± 0,078	818,91 ± 47,29	0,16
M 3	0,761 ± 0,055	867,90 ± 50,58	0,15
M 4	0,819 ± 0,032	841,78 ± 77,64	0,24
M 5	0,717 ± 0,094	885,78 ± 59,61	0,17
M 6	0,773 ± 0,055	765,47 ± 49,27	0,17
M 7	0,804 ± 0,034	816,48 ± 90,39	0,16
M 8	0,814 ± 0,033	930,08 ± 82,42	0,20

As microesferas obtidas pelo método de gotejamento apresentaram diâmetro médio entre 765,5 e 930,1 µm (Tabela 4).

A Figura 13 apresenta o gráfico com os diâmetros médios (µm) e o intervalo de confiança (IC) calculados para as oito microesferas. No gráfico, o quadrado central representa a média, o retângulo externo representa a média ± erro padrão e as barras representam o intervalo de confiança (IC), calculado a partir da seguinte equação: $IC = média \pm 1,96 * desvio\ padrão$.

Figura 13: Resultados de diâmetro médio (µm) das microesferas de GG:P duplamente reticuladas.

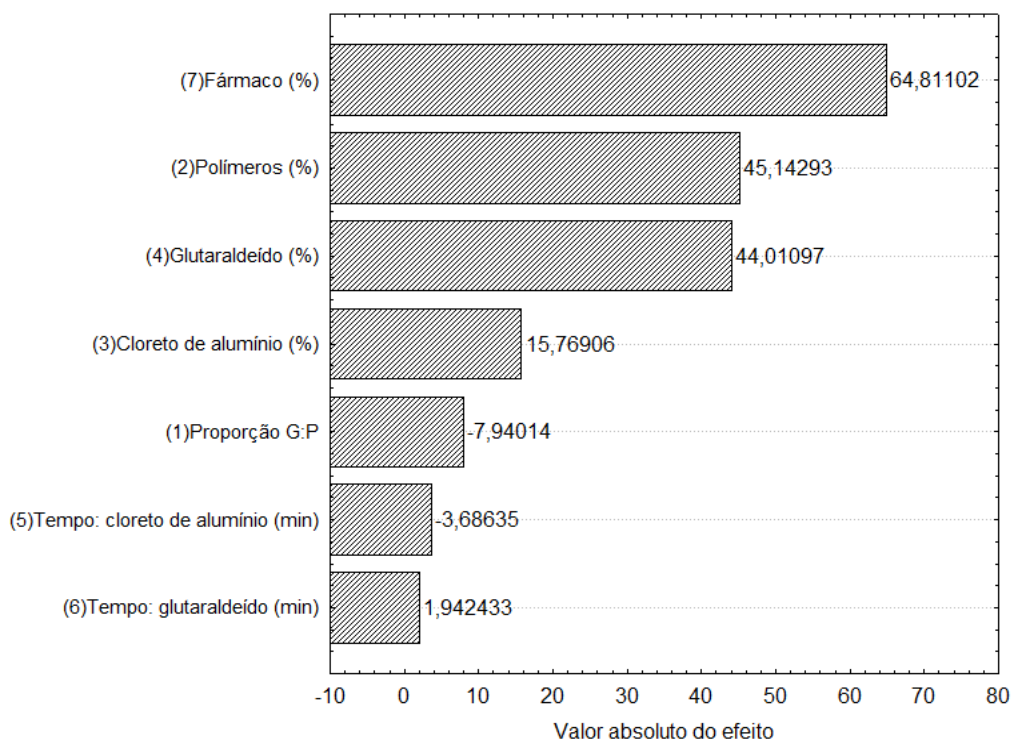


A partir do gráfico (Figura 13) é possível concluir que a amostra M 8, que apresenta proporção G:P 4:1 e maiores concentrações de polímero (3%) e fármaco (0,5%), foi a que apresentou maior diâmetro médio $930,08 \pm 82,42 \mu\text{m}$ ($p < 0,05$). Esta amostra também permaneceu pelos maiores tempos de reticulação propostos, 90 e 30 min, nas soluções reticulantes mais concentradas de AlCl_3 (5%) e de Glu (1%), respectivamente.

Já a amostra M 6, que apresenta proporção G:P 4:1 e menores concentrações de polímero (2%) e fármaco (0,25%), foi a que apresentou menor tamanho médio $765,47 \pm 49,27 \mu\text{m}$ ($p < 0,05$). Os demais fatores para essa formulação variaram entre os maiores e menores valores propostos, sendo que a concentração e o tempo de reticulação em AlCl_3 foram nos níveis +1 (5% e 90 min) e a concentração e o tempo de reticulação em Glu foram nos níveis -1 (0,5% e 15 min).

A Figura 14 apresenta o gráfico de Pareto com os valores absolutos dos efeitos dos fatores selecionados sobre o diâmetro médio das microesferas.

Figura 14: Gráfico de Pareto para os efeitos dos fatores avaliados sobre a resposta diâmetro médio das microesferas.



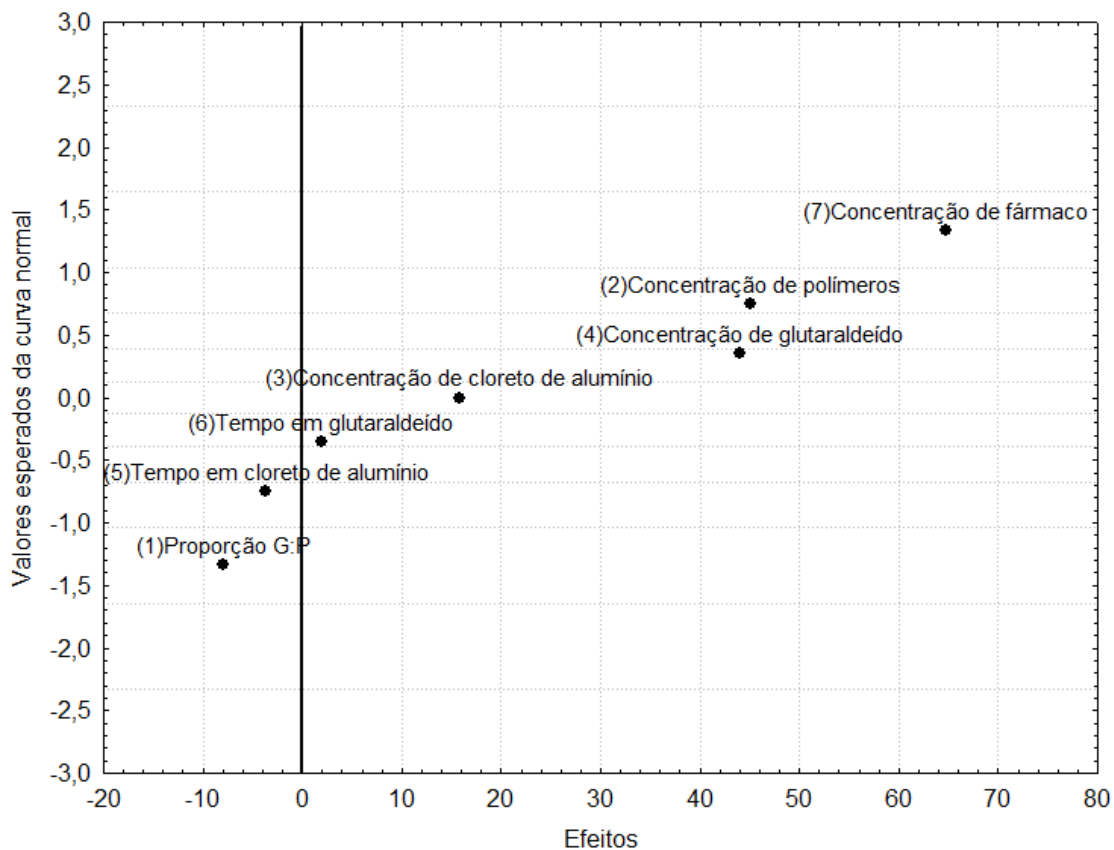
Os efeitos de maiores valores, em módulo, representam as variáveis mais importantes na resposta estudada. Neste caso, o maior efeito sobre o tamanho das partículas foi o da concentração de fármaco, seguido pelo efeito da concentração de polímeros e depois pelos efeitos das concentrações dos reticulantes Glu e AlCl_3 , respectivamente (Figura 14). Sendo

todos esses efeitos positivos, conclui-se que os aumentos da concentração de RES, de polímeros e de reticulantes no meio de reticulação levam a obtenção de partículas de maiores diâmetros.

Para o planejamento fatorial em que os ensaios realizados não possuem réplicas, como neste caso, em que cada formulação de microesfera foi obtida apenas uma vez, a avaliação da significância dos efeitos principais de cada fator pode ser realizada pela observação dos efeitos plotados em um gráfico normal, como o gráfico apresentado na Figura 15.

Os efeitos mais significativos serão aqueles que mais se afastam do eixo que passa pelo zero na abscissa, pois se o efeito está próximo a esse eixo, então o seu valor é muito próximo de zero e, portanto, não é significativo. Quanto mais o efeito de um fator estiver afastado desse eixo, mais significativo ele será (NETO *et al.*, 2010b).

Figura 15: Gráfico normal dos efeitos dos fatores avaliados sobre a variável de resposta diâmetro médio das microesferas.



A partir da Figura 15 é possível verificar que os efeitos das variáveis: (1) proporção polimérica, (5) tempo de reticulação em $AlCl_3$ e (6) tempo de reticulação em Glu não são significativos para o diâmetro das microesferas. Já os demais fatores, que se afastaram mais desse eixo, foram mais significativos, conforme concluído a partir dos valores absolutos calculados e apresentados no gráfico de Pareto (Figura 14).

Através da análise do efeito de diferentes fatores utilizando o planejamento fatorial, foi possível confirmar que a proporção polimérica não foi determinante para o diâmetro médio das partículas, como já havia sido observado por Prezotti (2013), que verificou que as proporções 1:1 e 4:1 não influenciaram no tamanho das microesferas de GG:P contendo cetoprofeno reticuladas ionicamente.

Também se observou que os efeitos do tempo de reticulação tanto em Glu quanto em $AlCl_3$ foram pequenos (Figura 14), portanto, não foram determinantes para o tamanho das partículas.

Sendo assim, pode-se concluir que o tamanho é principalmente influenciado pelas concentrações de fármaco e de polímeros, seguido das concentrações de reticulantes Glu e $AlCl_3$. De fato, o tamanho da partícula é dependente da quantidade de material que compõe a gota que a originou, dentre outros fatores (ZANIBONI *et al.*, 1995). Com o aumento da concentração de fármaco, mais moléculas estão disponíveis para ocupar os espaços intersticiais entre as cadeias dos polímeros, expandindo assim a estrutura da microesfera, o que origina partículas de maiores diâmetros médios (KULKARNI *et al.*, 2011).

A maior concentração de polímeros na dispersão a ser gotejada também leva a formação de partículas maiores, devido a maior viscosidade da dispersão, o que promove a formação de gotas maiores durante o gotejamento, como foi demonstrado em estudo prévio com as microesferas de GG:P reticuladas ionicamente e sem fármaco incorporado, em que a maior concentração de polímeros (4%, m/v) originou microesferas de maior diâmetro (MARTINS *et al.*, 2007; KULKARNI *et al.*, 2011; PREZOTTI, 2013).

Com relação aos reticulantes, a maior concentração destes no meio pode levar a formação de estruturas mais ramificadas, que compactam menos após a secagem, originando esferas de maiores diâmetros médios.

Os perfis da distribuição de tamanho das microesferas foram determinados a partir dos dados de diâmetro do círculo equivalente e estão representados na Figura 16.

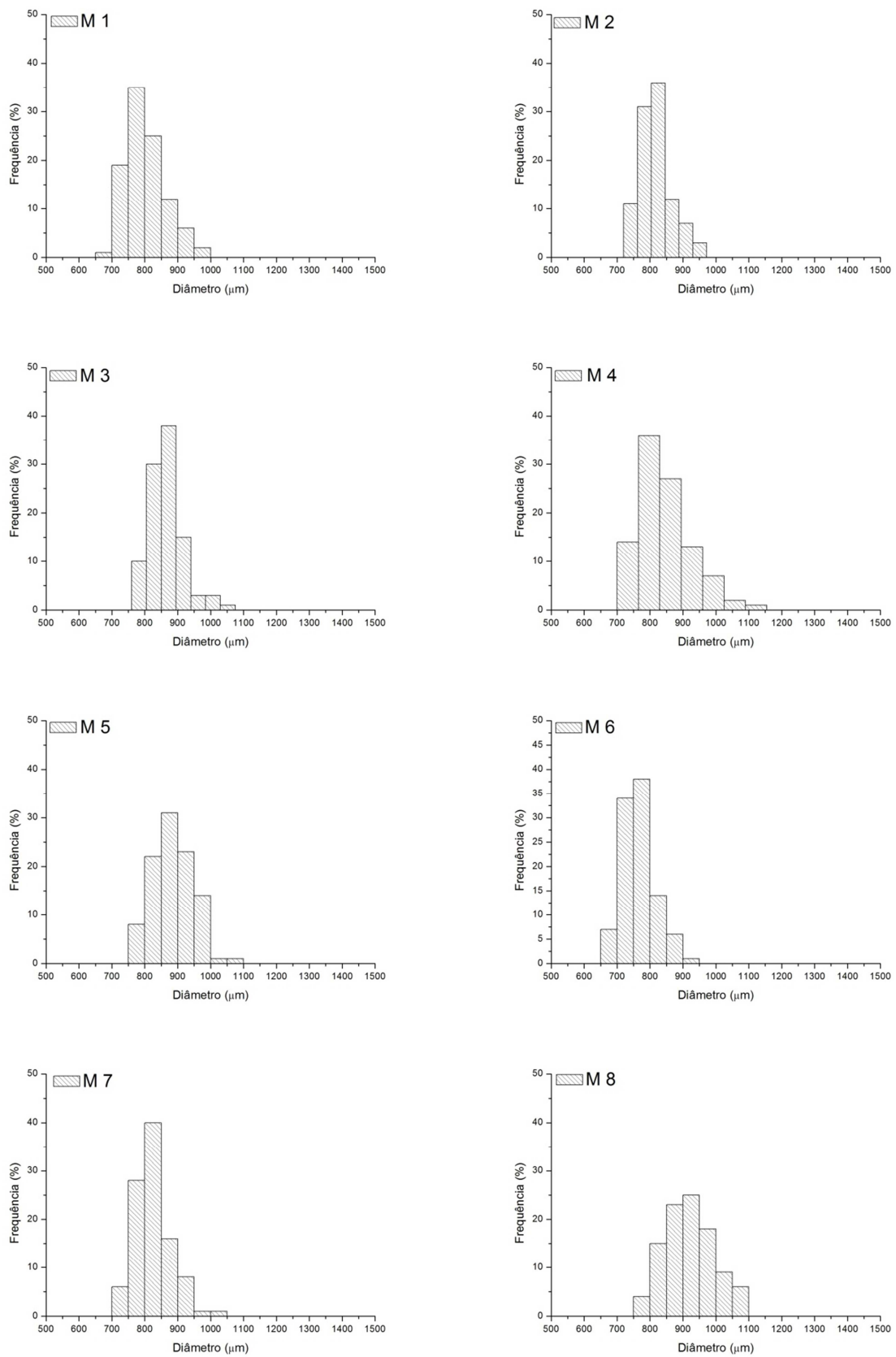
As amostras M1 e M 6 apresentaram 35% e 38% das microesferas na faixa de tamanho entre 750 e 800 μm , respectivamente. A amostra M 4 apresentou 36% de suas microesferas na faixa entre 760 e 825 μm . As amostras M 2 e M 7 apresentaram 36% e 40% das microesferas na faixa de tamanho entre 800 e 850 μm , respectivamente. Já as amostras M 3 e M 5 apresentaram predomínio de microesferas com tamanhos entre 850 e 900 μm (38% e 31% das partículas, respectivamente). Para a amostra M 8, 25% das partículas apresentavam diâmetro na faixa de 900 a 950 μm .

A partir da distribuição de tamanho foi possível calcular o índice Span, cujos valores são apresentados na Tabela 4.

As distribuições de tamanho podem ser classificadas segundo sua amplitude de variação, em monodispersas, quando a amplitude é estreita, ou polidispersas, quando é ampla, portanto, em um sistema considerado monodisperso as partículas apresentarão variação de tamanho muito pequena, já em um sistema polidisperso essa variação de tamanho será mais ampla (GAUMET *et al.*, 2008). O índice Span indica a polidispersidade da amostra, e valores abaixo de 1 estão relacionados a distribuição de tamanhos mais uniformes (FAREEZ *et al.*, 2015).

As amostras apresentaram índice Span entre 0,15 e 0,24 (Tabela 4), indicando uniformidade na distribuição de tamanho, podendo ser consideradas monodispersas, o que é possível observar nos histogramas apresentados (Figura 16).

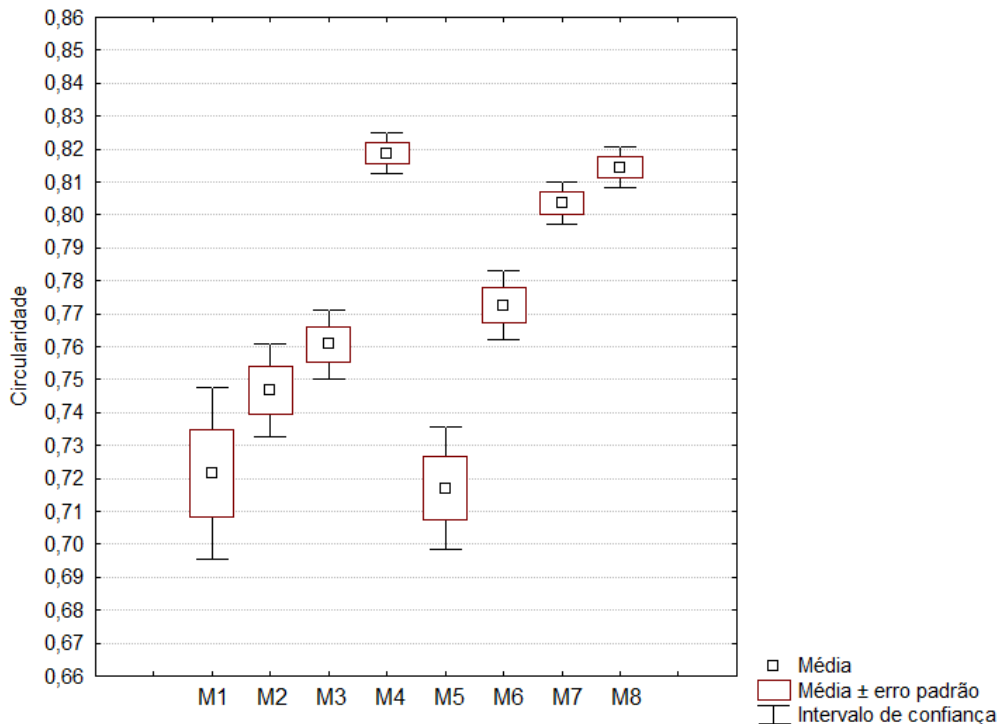
Figura 16: Distribuição de tamanho das microesferas de GG:P duplamente reticuladas (n=100).



As microesferas se mostraram esféricas, com valores de circularidade entre 0,737 e 0,819 (Tabela 4).

A Figura 17 apresenta o gráfico com os índices de circularidade médios e os intervalos de confiança calculados para as oito microesferas.

Figura 17: Resultados de índice de circularidade das microesferas de GG:P duplamente reticuladas.

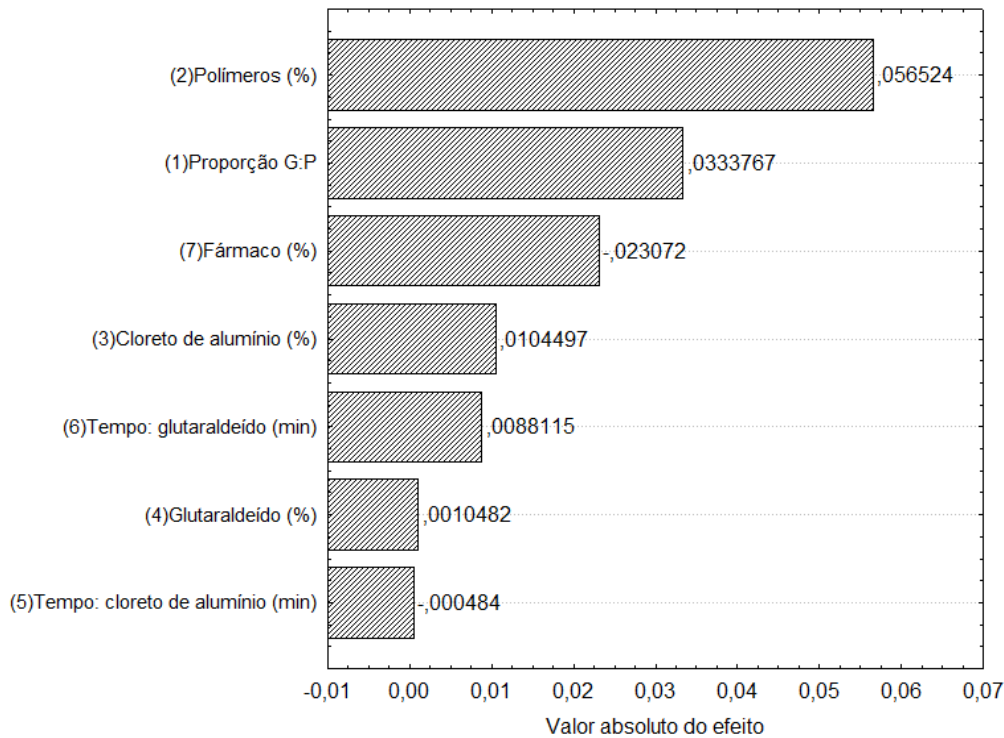


As microesferas M 4, M 7 e M 8 apresentaram maior circularidade que as demais amostras ($p < 0,05$), como pode ser observado no gráfico apresentado na Figura 17, sendo que as três contêm maior concentração polimérica (3%) e as microesferas M 4 e M 8 foram obtidas com a proporção G:P de 4:1.

A Figura 18 apresenta o gráfico de Pareto com os valores absolutos dos efeitos dos fatores selecionados sobre o índice de circularidade das microesferas.

Os efeitos de maiores valores, em módulo, que representam as variáveis que mais influenciaram o índice de circularidade foram a concentração de polímeros, a proporção G:P e a concentração de fármaco.

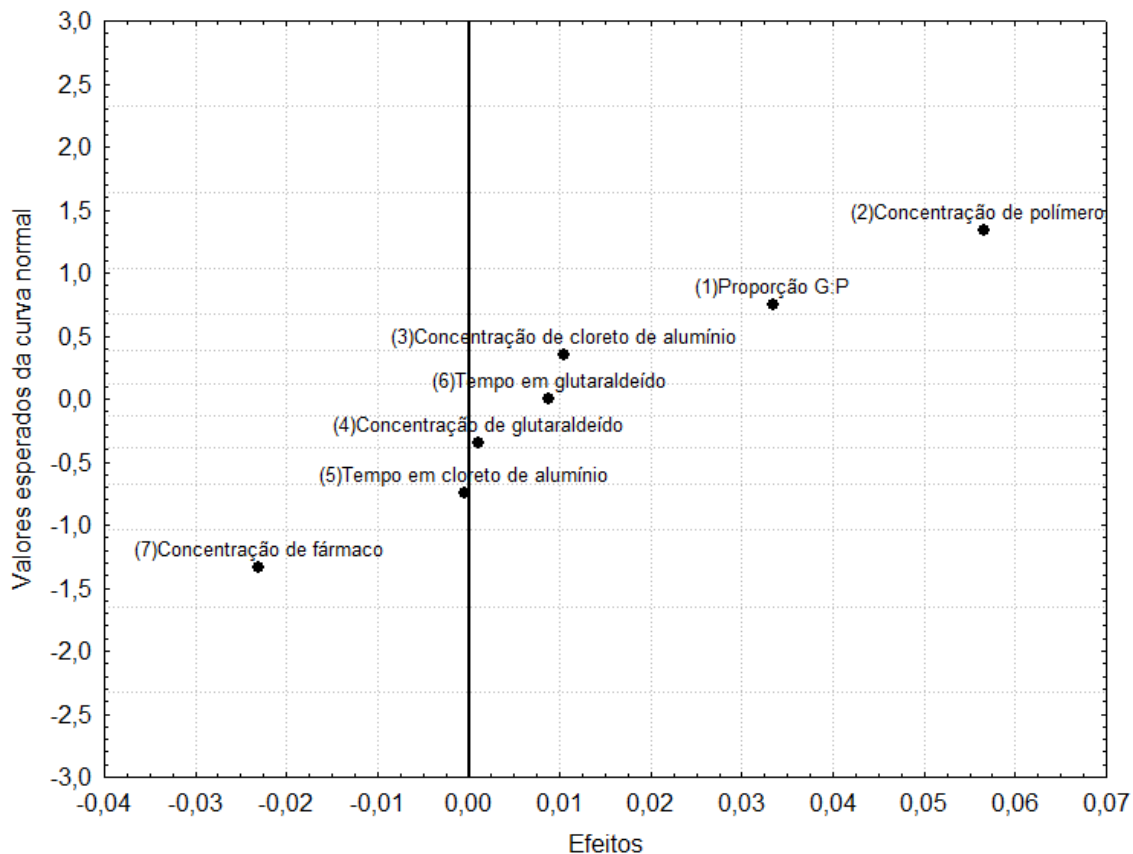
Figura 18: Gráfico de Pareto para os efeitos dos fatores avaliados sobre a resposta índice de circularidade das microesferas de GG:P duplamente reticuladas.



A concentração de polímeros e a proporção G:P apresentaram efeitos positivos (0,057 e 0,033, respectivamente) (Figura 18), portanto, pode-se concluir que o aumento da concentração polimérica e a proporção G:P 4:1, que é o maior nível para essa variável, aumentam a circularidade das microesferas. Já a concentração de fármaco apresentou efeito negativo (-0,023), portanto o aumento de fármaco reduziu a circularidade das microesferas.

A Figura 19 apresenta o gráfico normal dos efeitos sobre o índice de circularidade das microesferas. É possível observar que os efeitos (2) concentração de polímeros, (1) proporção G:P e (7) concentração de fármaco foram os mais significativos sobre a circularidade, conforme concluído a partir dos valores absolutos calculados e apresentados no gráfico de Pareto (Figura 18).

Figura 19: Gráfico normal dos efeitos dos fatores avaliados sobre a variável de resposta índice de circularidade das microesferas.



Para que a microesfera apresente adequada circularidade, sem a formação de caudas ou deformações durante o gotejamento, a gota de hidrogel, que originará a microesfera ao entrar em contato com o agente reticulante, não deve se deformar ao sofrer o impacto com a superfície da solução e mesmo durante a agitação magnética, sendo a viscosidade da dispersão polimérica um dos fatores que contribuem para isso (SEIFERT e PHILLIPS, 1997; CELLESI *et al.*, 2004; CHAN *et al.*, 2009). Dessa maneira, a maior viscosidade das dispersões obtidas com maior concentração polimérica e proporção G:P 4:1 devem ter permitido uma maior resistência da gota de hidrogel à deformação durante o processo de gotejamento, dando origem a microesferas de maior circularidade ao final do processo.

Já a presença do fármaco em concentração mais elevada deve reduzir a circularidade das microesferas, pois seus cristais apresentam formato angular (Figura 9) e estes provocam maior irregularidade quando estão próximos à superfície das partículas (Figura 10).

5.4 Teor de fármaco e eficiência de encapsulação (EE%)

A eficiência de encapsulação (EE%) representa a porcentagem de fármaco que realmente permanece aprisionado na microesfera em relação à quantidade total adicionada

durante o processo de obtenção das partículas (AHUJA *et al.*, 2010; AMMAR *et al.*, 2012) e traduz a capacidade que a formulação possui de aprisionar o fármaco nas partículas formadas (OLIVEIRA, 2005). Menores perdas do fármaco para as soluções reticulantes refletem um processo de obtenção mais eficiente do ponto de vista de encapsulação.

Os resultados de teor de fármaco e eficiência de encapsulação estão apresentados na Tabela 5. Também são apresentados os valores de teor de fármaco teórico para cada formulação, que foi calculado baseado na composição de cada microesfera segundo o planejamento dos experimentos (Tabela 3).

Tabela 5: Valores de teor de fármaco teórico, teor de fármaco mensurado e eficiência de encapsulação do resveratrol nas microesferas de GG:P (média \pm DP, n=3).

Amostra	Teor de fármaco teórico (%)	Teor de fármaco mensurado (%)	EE (%)
M 1	11,11	10,96 \pm 0,16	98,66 \pm 1,40
M 2	20,00	19,61 \pm 0,21	98,07 \pm 1,07
M 3	14,29	13,94 \pm 0,12	97,59 \pm 0,81
M 4	7,69	7,48 \pm 0,16	97,27 \pm 2,07
M 5	20,00	19,44 \pm 0,34	97,18 \pm 1,72
M 6	11,11	10,70 \pm 0,35	96,34 \pm 3,17
M 7	7,69	7,56 \pm 0,09	98,34 \pm 1,20
M 8	14,29	13,87 \pm 0,22	97,07 \pm 1,52

A EE% das microesferas foi bastante elevada, variando entre 96,34 a 98,66% (Tabela 5), sem diferença estatisticamente significativa entre as amostras ($p > 0,05$). Isso pode ser devido à baixa solubilidade do resveratrol em meio aquoso, o que evita sua difusão para a solução reticulante durante a preparação das microesferas.

A temperatura da solução reticulante também influenciou a difusão do fármaco, e, conseqüentemente, a EE%. A perda de fármaco para a solução reticulante de $AlCl_3$, durante a primeira reticulação das microesferas, foi até 1,6 vezes maior em temperatura ambiente que a perda de fármaco para a mesma solução resfriada e mantida a 4°C.

As microesferas duplamente reticuladas e compostas pela mistura GG:P apresentaram maiores valores de EE% do RES quando comparadas com microesferas compostas apenas por goma gelana reticuladas ionicamente com $AlCl_3$, as quais apresentaram valores entre 48,76 e 87,52% de encapsulação do cetoprofeno, um fármaco de baixa solubilidade, assim como o resveratrol (BONI *et al.*, 2015). Os valores das presentes microesferas também foram superiores aos valores de EE% do cetoprofeno em microesferas de GG:P reticuladas apenas ionicamente ($AlCl_3$), cujos valores ficaram entre 52,22 e 88,78% (PREZOTTI, 2013; PREZOTTI *et al.*, 2014), mostrando que a associação destes dois polissacarídeos bem como a

estratégia da dupla reticulação podem melhorar a encapsulação de fármacos pouco solúveis nas microesferas.

5.5 Intumescimento

A GG e a P têm a capacidade de formar hidrogéis, que podem ser definidos como redes macromoleculares, tridimensionais, reticuladas e hidrofílicas, capazes de absorver grandes quantidades de líquido e intumescer em contato com soluções aquosas ou fluidos biológicos (GUPTA *et al.*, 2002; BERGER *et al.*, 2004; PATIL *et al.*, 2010; KEAWCHAOON e YOKSAN, 2011).

O intumescimento significa a expansão do volume ocupado pela rede polimérica devido à entrada de líquido em seu interior, o que leva ao aumento nas dimensões das microesferas.

A concentração ou a quantidade de líquido que a rede absorve durante seu intumescimento é conhecida como absorção ou *liquid uptake* (em inglês). A distinção entre intumescimento e absorção pode ser encontrada em diversos trabalhos na literatura, entretanto, muitos avaliam apenas a absorção e tratam-na como sendo o intumescimento do hidrogel (FLEMING e KOROS, 1986).

Apesar de o intumescimento ser o resultado da absorção de líquido, são duas propriedades distintas a serem mensuradas, já que nem sempre a entrada de líquido resulta em expressiva expansão da estrutura. Embora sejam propriedades que se correlacionam, a técnica empregada e a grandeza avaliada determinam qual propriedade será mensurada.

O intumescimento pode ser avaliado a partir da medida da dilatação no volume de uma massa polimérica após intumescer, o que pode ser feito por observação visual em uma proveta, ou qualquer outra vidraria graduada (BABU *et al.*, 2002; CONSTANTIN *et al.*, 2004). Ou também pode ser analisado a partir da medida do diâmetro das microesferas antes e após o intumescimento, utilizando um microscópio óptico ou um estereoscópio que permitam realizar as medidas através de um micrômetro ou pela captura de imagens e posterior análise em *softwares* apropriados (PICKUP *et al.*, 1986; ALMEIDA e ALMEIDA, 2004; LUCINDA-SILVA *et al.*, 2006; CARDOSO, 2014).

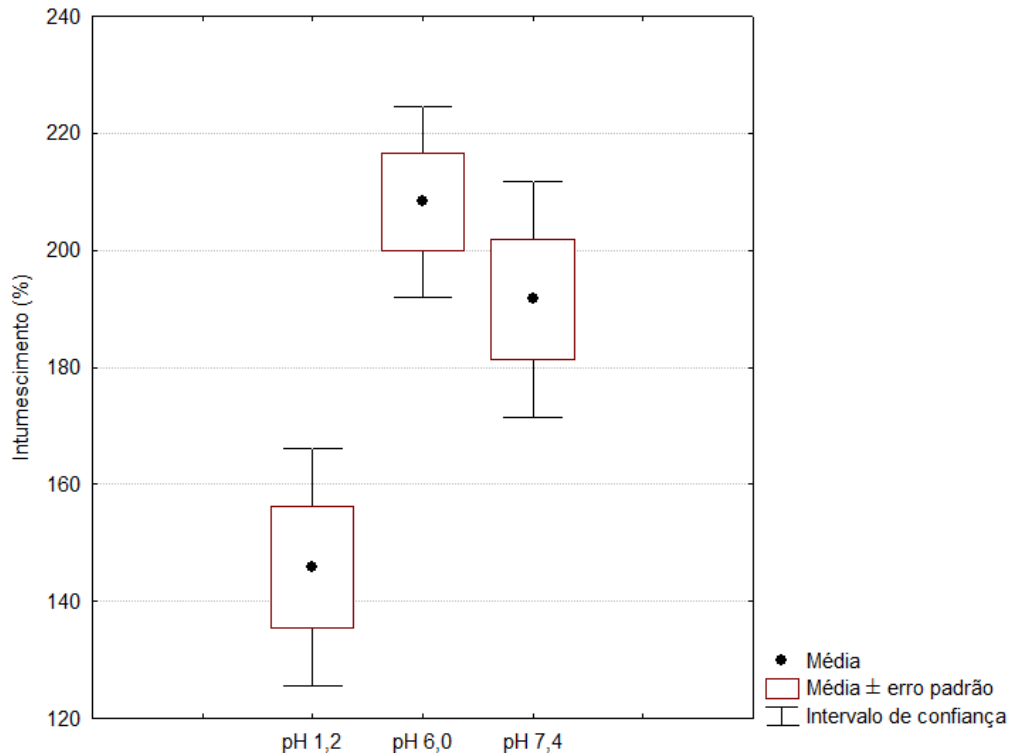
Neste trabalho, ambas as propriedades de intumescimento (*swelling*) e capacidade de absorção de líquido (*liquid uptake*) das microesferas foram avaliadas.

O intumescimento foi avaliado volumetricamente, através da determinação do volume ocupado pelas microesferas secas e pelas microesferas intumescidas durante 240 minutos, e a capacidade de absorção de líquido foi avaliada gravimetricamente, pela determinação da massa de líquido absorvido por massa de microesferas. Ambos os testes foram realizados utilizando

meios com diferentes valores de pH que simulam aqueles encontrados nos diferentes segmentos do TGI (HUA *et al.*, 2015).

A capacidade de intumescimento (%) das microesferas nos diferentes meios estudados é apresentada na Figura 20. No gráfico, o círculo central representa a média, o retângulo externo representa a média \pm erro padrão e as barras representam o intervalo de confiança (IC), calculado a partir da seguinte equação: $IC = \text{média} \pm 1,96 * \text{desvio padrão}$.

Figura 20: Porcentagem de intumescimento em função do pH do meio em que as microesferas foram incubadas por 240 min.



Em pH 1,2 as microesferas intumesceram em média $145,83 \pm 50,90\%$, em pH 6,0 esse valor foi de $208,33 \pm 40,83\%$ e em pH 7,4 o intumescimento foi de $191,67 \pm 50,36\%$.

É possível observar no gráfico apresentado na Figura 20 que as amostras apresentaram menor intumescimento em pH 1,2 ($p < 0,05$) e que não houve diferença estatisticamente significativa entre a porcentagem de intumescimento das microesferas em tampão fosfato de sódio pH 6,0 e pH 7,4 ($p > 0,05$).

A influência do pH no intumescimento das microesferas é uma propriedade muito importante a ser avaliada durante o desenvolvimento de um sistema para liberação sítio-específica utilizando-se polímeros hidrofílicos, uma vez que é um indicativo da facilidade e da velocidade com as quais um líquido é capaz de penetrar na matriz polimérica (ALMEIDA e ALMEIDA, 2004), além de fornecer importantes informações para o entendimento da cinética de liberação do fármaco (MULHBACHER *et al.*, 2004; MAITI *et al.*, 2011).

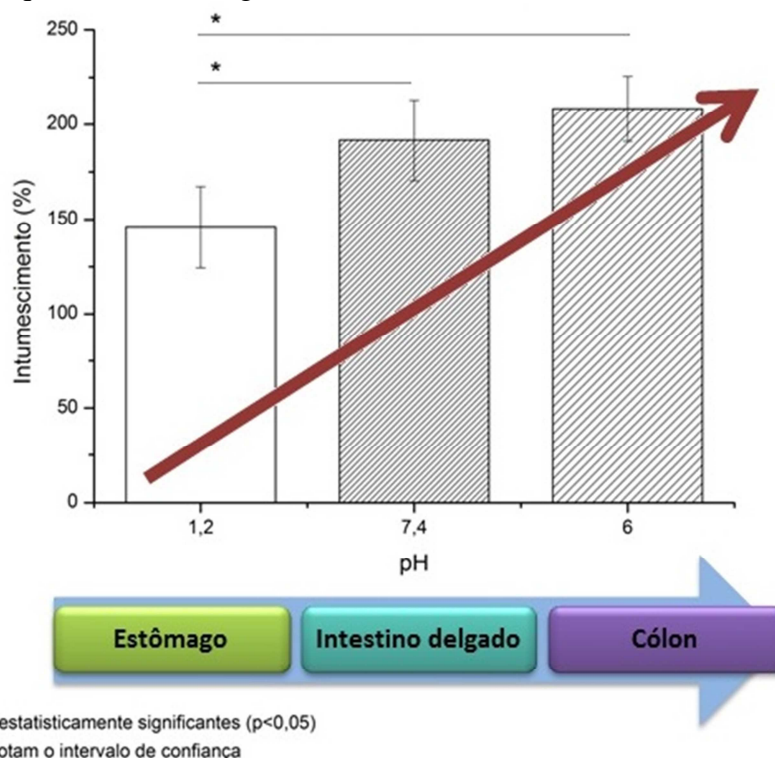
O intumescimento também é importante para a degradação hidrolítica ou enzimática dos polímeros hidrofílicos (DAVARAN *et al.*, 1999). A expansão da rede com a entrada de líquido deve permitir o acesso das enzimas responsáveis pela degradação dos polímeros aos sítios de clivagem (YIN *et al.*, 2001; OLIVEIRA e CAVALCANTI, 2007; PREZOTTI *et al.*, 2012).

Ainda, por se tratar de microesferas mucoadesivas, o grau de intumescimento também é um importante indicativo da capacidade mucoadesiva do sistema. Para o estabelecimento da mucoadesão entre o sistema e os constituintes do muco, é necessário um primeiro estágio de íntimo contato entre os polímeros e a superfície biológica, para que então ocorra a interpenetração das cadeias poliméricas com as da mucina. Entretanto, isso só é possível se o sistema apresentar certo intumescimento no meio em que se encontra (DUCHÊNE *et al.*, 1988; SRIAMORNSAK *et al.*, 2010).

O estudo do intumescimento também revela a potencial proteção que o sistema irá conferir ao fármaco encapsulado em seu interior contra a liberação prematura em um sítio indesejado, ou contra a degradação por exposição a enzimas e ao conteúdo dos diferentes ambientes do TGI.

A Figura 21 mostra que o aumento do intumescimento segue a variação de pH encontrada ao longo do TGI (pH baixo do estômago, seguido de aumento até a neutralidade no intestino delgado e posterior redução no cólon) (HUA *et al.*, 2015).

Figura 21: Representação do comportamento do intumescimento em função do pH do meio, conforme a variação que ocorre ao longo do TGI.



Observou-se um menor intumescimento em meio ácido, em relação ao intumescimento em meios com valores de pH mais elevados, sendo que em pH 1,2, as microesferas intumesceram cerca de 24% menos que em pH 7,4 e cerca de 30% menos que em pH 6,0.

O intumescimento de polímeros que possuem grupamentos ionizáveis é dependente do pH e da força iônica do meio. Com o aumento do pH, polímeros aniônicos tendem a aumentar seu intumescimento, enquanto polímeros catiônicos tendem a intumescer menos, como consequência de alterações conformacionais das cadeias dos polieletrólitos (MULHBACHER *et al.*, 2004; NARKAR *et al.*, 2010).

Em meio ácido, no qual há predomínio de íons H^+ , os grupamentos carboxílicos da GG e da P permanecem protonados, reduzindo a repulsão eletrostática, permitindo uma maior aproximação entre as cadeias, o que dificulta a penetração de líquido na estrutura polimérica e a consequente expansão da matriz, ambos fatores que reduzem a capacidade de intumescimento do sistema (BAJPAI *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2010; SOUTO-MAIOR *et al.*, 2010).

Em valores de pH mais elevados, como pH 6,0 e 7,4, que são superiores ao pK_a da GG ($pK_a=3,5$) e da P (pK_a 3 – 4), as cadeias apresentam-se carregadas negativamente, devido à ionização dos grupos carboxílicos em ânions carboxilatos (COO^-), o que leva ao aumento da hidrofília dos polímeros e à repulsão eletrostática das cadeias, que favorece a entrada de líquido no sistema e resulta na maior capacidade de intumescimento.

Uma característica vantajosa em um sistema de liberação colônica é o seu baixo intumescimento em condições ácidas, porém elevado em condições mais próximas à neutralidade, como as encontradas no meio intestinal, pois assim o sistema deve permitir taxas de liberação mais reduzidas e conferir maior proteção ao fármaco, o que é favorável ao objetivo pretendido (DAVARAN *et al.*, 1999).

5.6 Determinação da capacidade de absorção de líquido

A capacidade de absorção de líquido em função do pH do meio também está relacionada com a proteção do fármaco encapsulado durante o trânsito no TGI, quando administrado oralmente.

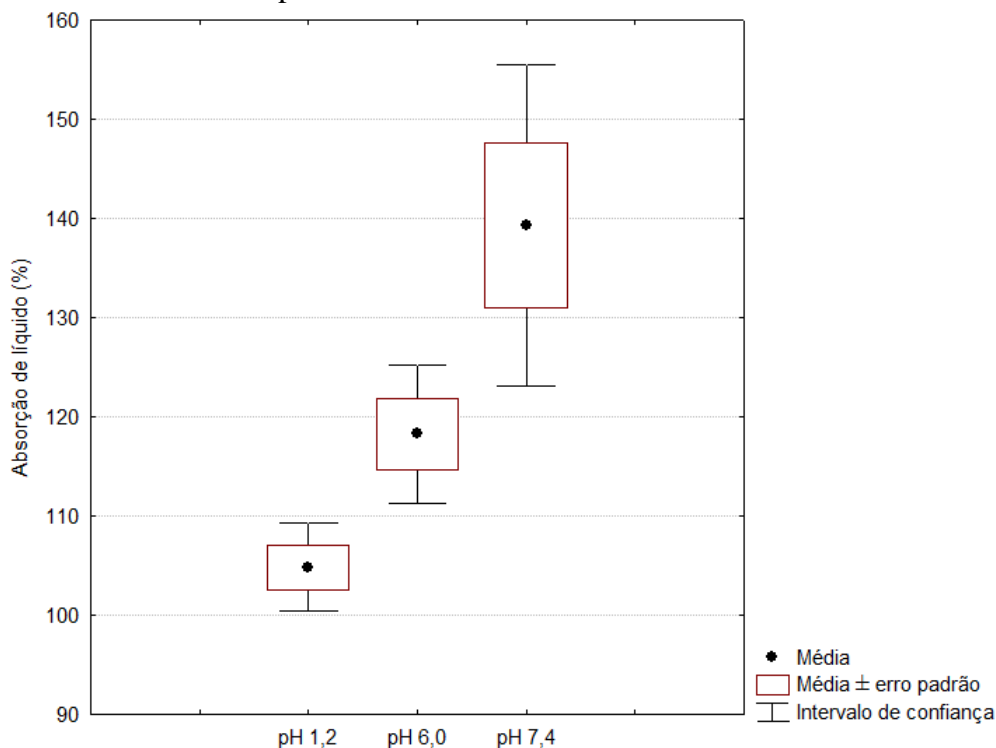
Ao atravessar os diferentes órgãos do TGI, como o esôfago, estômago, intestino delgado e cólon, ele é exposto a conteúdos de diferentes composições e valores de pH, os quais podem variar de aproximadamente 1,2 – 3,0 no estômago, dependendo do estado de jejum ou alimentado, 7,0 – 8,0 na parte distal do intestino delgado e 5,5 – 7,0 no cólon, devido a acidificação que os produtos de fermentação das bactérias colônicas causam nesta região (GUPTA *et al.*, 2001; MAITI *et al.*, 2011).

A absorção de líquido também se relaciona com a degradabilidade enzimática do sistema, e é uma característica muito importante a ser avaliada, principalmente para sistemas em que a liberação no sítio alvo depende da degradação enzimática específica.

Para que ocorra a degradação por ataque de enzimas, é necessário o acesso destas aos sítios de clivagem, que é dependente da entrada de líquidos na rede polimérica (DAVARAN *et al.*, 1999; YIN *et al.*, 2001; PREZOTTI *et al.*, 2012).

A Figura 22 apresenta o gráfico da porcentagem de líquido absorvido em diferentes valores de pH. No gráfico, o círculo central representa a média, o retângulo externo representa a média \pm erro padrão e as barras representam o intervalo de confiança (IC), calculado a partir da seguinte equação: $IC = \text{média} \pm 1,96 * \text{desvio padrão}$.

Figura 22: Porcentagem de absorção de líquido em função do pH do meio em que as microesferas foram incubadas por 240 min.



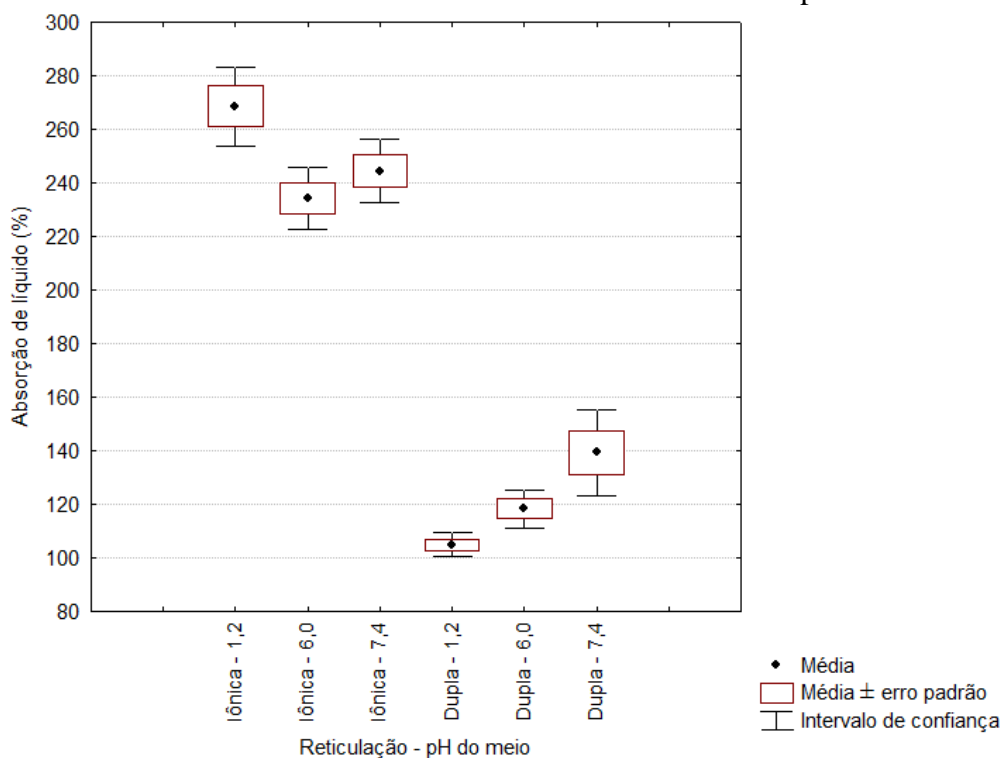
Em pH 1,2 as microesferas absorveram em média $104,83 \pm 10,42\%$, em pH 6,0 esse valor foi de $118,27 \pm 14,73 \%$ e em pH 7,4 a absorção foi de $139,31 \pm 39,58\%$. A absorção de líquido em pH 1,2 foi cerca de 11% menor que em pH 6,0 e cerca de 25% menor que em pH 7,4.

A partir do gráfico apresentado na Figura 22, é possível observar que as amostras apresentaram menor absorção de líquido em pH 1,2 ($p < 0,05$), e não houve diferença estatisticamente significativa entre a porcentagem de líquido absorvido pelas microesferas nos

meios com valores de pH 6,0 e 7,4 ($p > 0,05$), corroborando os resultados de intumescimento apresentados anteriormente.

A Figura 23 apresenta o comparativo entre a absorção de líquido (%) de microesferas de GG:P duplamente reticuladas e reticuladas ionicamente em estudo realizado por PREZOTTI (2013). Para as amostras duplamente reticuladas, a porcentagem de líquido absorvido em função do pH foi analisada após 4 horas de contato entre as partículas e o meio, e para as reticuladas ionicamente esse tempo de contato foi de 1,5h. No gráfico, o círculo central representa a média, o retângulo externo representa a média \pm erro padrão e as barras representam o intervalo de confiança (IC), calculado a partir da seguinte equação: $IC = \text{média} \pm 1,96 * \text{desvio padrão}$.

Figura 23: Comparativo entre a absorção de líquido das microesferas de GG:P duplamente reticuladas e de microesferas de GG:P reticuladas ionicamente obtidas por PREZOTTI (2013).



As microesferas que passaram pelo processo de reticulação iônica absorveram, de modo geral, $268,61 \pm 43,94\%$ de líquido em meio ácido pH 1,2; $234,31 \pm 28,99\%$ em tampão fosfato de sódio pH 6,0 e $244,39 \pm 33,96\%$ em tampão fosfato de sódio pH 7,4.

Os dados apresentados na Figura 23 demonstram que as microesferas duplamente reticuladas apresentaram invariavelmente menor absorção de líquido que as microesferas reticuladas ionicamente. Em meio ácido (HCl 0,1N pH 1,2), a absorção foi cerca de 61% menor, em pH 6,0 foi cerca de 50% menor e em pH 7,4 foi aproximadamente 43% menor.

A dupla reticulação foi capaz de reduzir a absorção de líquido nas microesferas nos diferentes valores de pH avaliados (pH 1,2; 6,0 e 7,4), mesmo após 4 horas de ensaio, quando comparada com a absorção observada para microesferas de GG:P reticuladas ionicamente, em soluções com mesmos valores de pH, em ensaio realizado por 1,5 horas (PREZOTTI, 2013).

Ao reduzir o intumescimento e absorção de líquido principalmente em meio ácido, a dupla reticulação representa uma promissora estratégia para o delineamento de sistemas para liberação cólon-específica de fármacos, e confere maior capacidade de proteção do fármaco encapsulado contra a liberação e/ou degradação prematura no estômago.

5.7 Erosão

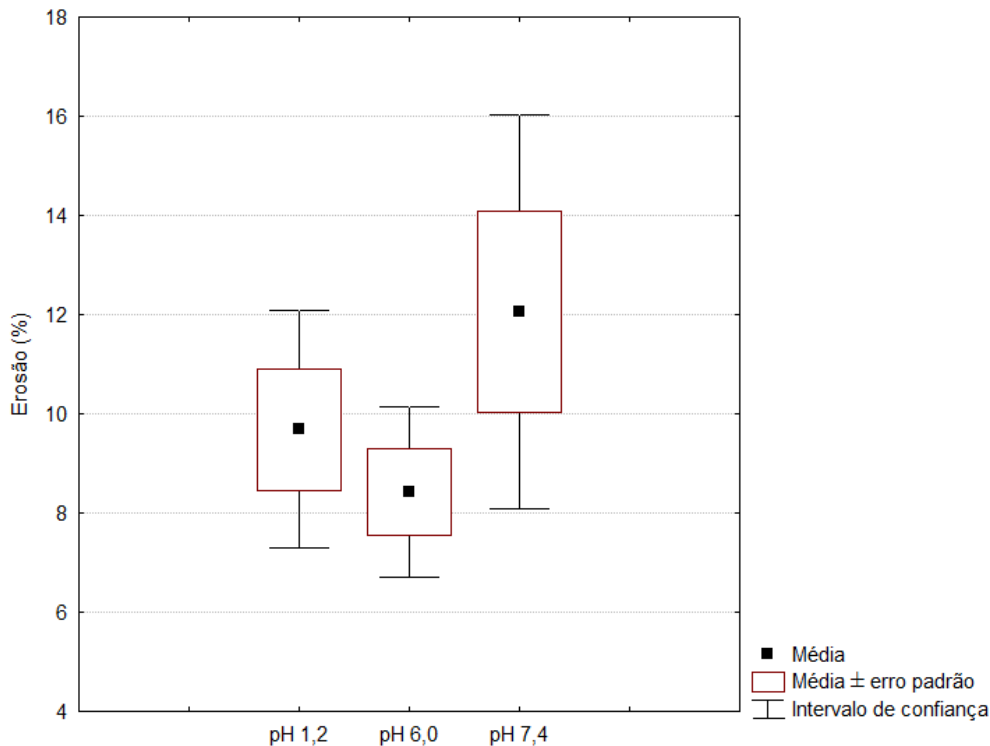
Enquanto o intumescimento avalia o aumento na forma da microesfera, a erosão indica perda de massa, sendo um indicativo de como a estrutura da matriz evolui com o tempo ao ser exposta a um determinado meio (ALMEIDA e ALMEIDA, 2004).

As taxas de liberação do fármaco podem ser aceleradas de acordo com a mobilidade das cadeias poliméricas ou a erosão da matriz, portanto é um importante parâmetro a ser avaliado em matrizes poliméricas hidrofílicas como as microesferas de GG:P (KORSMEYER *et al.*, 1983; MADERUELO *et al.*, 2011).

A Figura 24 apresenta o gráfico com a porcentagem de erosão em função do pH do meio e o intervalo de confiança (IC) calculado para as oito microesferas. No gráfico, o quadrado central representa a média, o retângulo externo representa a média \pm erro padrão e as barras representam o intervalo de confiança (IC), calculado a partir da seguinte equação: $IC = \text{média} \pm 1,96 * \text{desvio padrão}$.

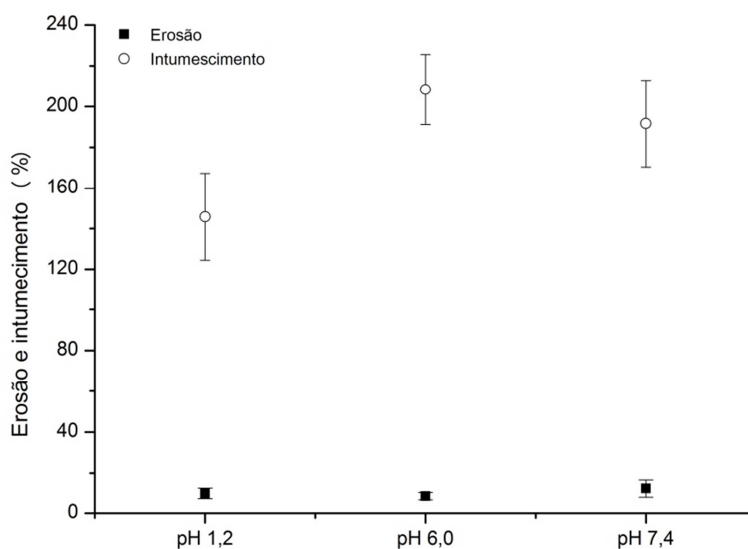
Ao final do teste, as microesferas tiveram sua forma esférica preservada para todos os meios avaliados. Em pH 1,2, as microesferas apresentaram erosão de $9,68 \pm 4,89\%$, em pH 6,0 esse valor foi de $8,42 \pm 4,31\%$ e em pH 7,4 a erosão foi de $12,06 \pm 9,70\%$ (média \pm DP). A partir do gráfico (Figura 24) é possível observar que o pH não influenciou significativamente a erosão das microesferas ($p > 0,05$).

Figura 24: Erosão (%) em função do pH do meio em que as microesferas foram incubadas por 240 min.



A análise comparativa dos dados de intumescimento e erosão (Figura 25) evidencia a reduzida erosão sofrida pelas microesferas em relação ao intumescimento.

Figura 25: Valores da porcentagem de erosão e intumescimento das microesferas após exposição a meios com diferentes valores de pH (média ± IC).



Ao absorver líquido, a camada mais superficial das microesferas geleifica, e as cadeias se afastam, promovendo o intumescimento da matriz. Forma-se uma zona de gel, na qual

diferentes processos ocorrem. Quanto mais líquido é absorvido pelo sistema, maior se torna essa camada geleificada, por onde o fármaco difunde até ser liberado. As primeiras cadeias poliméricas a entrarem em contato com o meio, ou seja, as mais externas relaxam gradualmente, até perderem a consistência e se dissolverem, momento em que se inicia a erosão da matriz (MADERUELO *et al.*, 2011).

A rápida erosão de grande porcentagem da matriz pode acelerar as taxas de liberação do fármaco, prejudicando o controle do sistema. Portanto, a reduzida erosão e a manutenção da forma esférica das microesferas favorecem o controle das taxas de liberação do fármaco, e permitem a liberação mais lenta, controlada e reprodutível, segundo sua composição mais ou menos reticulada (ALMEIDA e ALMEIDA, 2004).

5.8 Determinação da solubilidade do RES

A determinação da solubilidade do fármaco é fundamental para que se possa atender as condições *sink* em ensaios de dissolução *in vitro*. Sendo assim, a solubilidade do resveratrol foi determinada através do método do equilíbrio, no qual o fármaco é adicionado em excesso para garantir a saturação do meio (PEZZINI e FERRAZ, 2007; TONG e WEN, 2008). Avaliou-se a solubilidade nos meios de dissolução e em outros meios relevantes para o objetivo do trabalho, como água purificada e tampão TC199, utilizado no teste de permeação. Os valores de solubilidade expressos em concentração são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Solubilidade ($\mu\text{g/mL}$) do RES em diferentes meios (média \pm DP).

Meio	Solubilidade ($\mu\text{g/mL}$)
HCl 0,1N pH 1,2	Insolúvel
HCl 0,1N pH 1,2 com 0,50% de LSS	52,73 \pm 13,47
HCl 0,1N pH 1,2 com 0,75% de LSS	135,48 \pm 4,06
HCl 0,1N pH 1,2 com 1,00% de LSS	169,55 \pm 2,73
HCl 0,1N pH 1,2 com 1,25% de LSS	189,28 \pm 5,72
HCl 0,1N pH 1,2 com 1,50% de LSS	233,72 \pm 2,92
HCl 0,1N pH 1,2 com 1,75% de LSS	282,64 \pm 4,53
HCl 0,1N pH 1,2 com 2,00% de LSS	332,62 \pm 5,51
Tampão fosfato de sódio pH 6,8	5,44 \pm 2,75
Tampão fosfato de sódio pH 6,8 com 1% LSS	249,8 \pm 64,4
Água purificada	42,65 \pm 1,69
Tampão TC 199	44,26 \pm 1,90
Tampão TC 199 com 0,10% de LSS	73,15 \pm 1,05
Tampão TC 199 com 0,50% de LSS	176,96 \pm 3,51
Tampão TC 199 com 1,00% de LSS	312,86 \pm 7,40

O RES é um fármaco pouco solúvel, e em meio ácido foi necessária a adição do tensoativo (LSS) para alcançar alguma solubilidade, de modo que na presença de 0,5% de LSS a solubilidade foi de $52,73 \pm 13,47 \mu\text{g/mL}$, enquanto para 1,0% de LSS esse valor foi de $169,55 \pm 2,73 \mu\text{g/mL}$ (3x maior). Baseando-se nesses valores, a concentração de tensoativo escolhida para o ensaio de dissolução foi de 1,0% de LSS.

Para o tampão fosfato de sódio pH 6,8, na ausência de tensoativo a solubilidade do resveratrol foi de apenas $5,44 \pm 2,75 \mu\text{g/mL}$ e a adição de 1% de tensoativo levou a um aumento na solubilidade do fármaco, que foi de $249,8 \pm 64,4 \mu\text{g/mL}$, valor aproximadamente 46 vezes maior.

O RES apresentou solubilidade de $42,65 \pm 1,69 \mu\text{g/mL}$ em água purificada e de $44,26 \pm 1,90 \mu\text{g/mL}$ em tampão TC 199 sem tensoativo, enquanto com a adição de 1% de LSS ao tampão TC 199 alcançou-se a solubilidade de $312,86 \pm 7,40 \mu\text{g/mL}$ (7x maior).

5.9 Determinação do perfil de liberação *in vitro* do fármaco em meio ácido

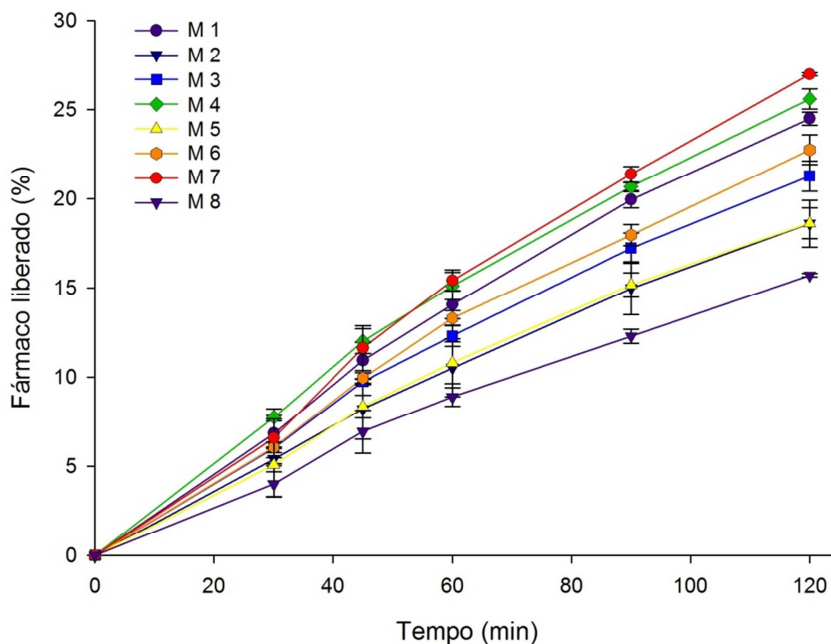
A encapsulação de fármacos em microesferas poliméricas para administração oral pode trazer diversos benefícios, como controlar a exposição do fármaco aos diferentes ambientes do TGI, protegendo-o da destruição em outros sítios que não o de ação, resultando em uma melhor estabilidade, e também pode evitar possíveis efeitos danosos do fármaco sobre as mucosas, como irritações ou inflamações (CELLESI *et al.*, 2004).

A liberação pode ser controlada pela degradação específica dos materiais que compõem as microesferas, permitindo vetorizar o fármaco a um tecido ou órgão alvo, o que é muito importante para otimizar o efeito terapêutico e reduzir efeitos adversos (CELLESI *et al.*, 2004; FREIBERG e ZHU, 2004; GAMBOA e LEONG, 2013).

A vetorização de fármacos para o cólon é extremamente importante e atrativa, seja para terapia de doenças que afetam essa região do TGI, como também para a administração oral de proteínas e peptídeos. Assim, um sistema capaz de proteger o fármaco encapsulado em seu interior contra a liberação prematura em meio ácido, e que permite sua liberação ao atingir o cólon especificamente, pode ser considerado um sistema promissor para a liberação colônica de fármacos.

Sendo assim, os perfis de liberação do RES em meio ácido (pH 1,2) foram estudados, a fim de avaliar a proteção das microesferas duplamente reticuladas contra a liberação prematura do fármaco no estômago. Os perfis estão apresentados no gráfico da Figura 26.

Figura 26: Perfis de liberação do RES em meio ácido (HCl 0,1N, pH 1,2 com 1% LSS) a partir das microesferas de GG:P duplamente reticuladas (média ± DP).



A porcentagem de fármaco liberado após 120 minutos em meio ácido variou entre 15,70 e 26,98%, como mostra a Tabela 7.

Tabela 7: Porcentagem de fármaco liberado em meio ácido (HCl 0,1N pH 1,2 com 1% LSS) após 120 minutos para o planejamento saturado 2^{7-4} (média ± DP; n = 3).

Amostra	% fármaco liberado em meio ácido após 120 min
M 1	24,49 ± 0,37
M 2	18,60 ± 1,31
M 3	21,27 ± 0,85
M 4	25,59 ± 0,56
M 5	18,62 ± 0,87
M 6	22,74 ± 0,84
M 7	26,98 ± 0,08
M 8	15,70 ± 0,10

Kulkarni e co-autores (2011) reportaram o maior controle das taxas de liberação de microesferas de goma gelana e albumina após a reticulação covalente com o Glu. Comparando a dupla reticulação do presente trabalho com a reticulação iônica de microesferas de GG:P obtidas anteriormente (PREZOTTI, 2013), também foi possível observar o maior controle da liberação do fármaco encapsulado após o processo de dupla reticulação. As amostras M 2, M 5 e M 8 apresentaram taxas inferiores (de 15,7 a 18,6%) às taxas de liberação em meio ácido apresentadas por microesferas de GG:P reticuladas ionicamente (20 a 34%). Portanto, pode-se concluir que a dupla reticulação é uma ferramenta útil para reduzir as taxas de liberação em meio ácido, sendo uma estratégia promissora para a otimização de sistemas de liberação

colônica de fármacos, e uma alternativa aos revestimentos pH-dependentes geralmente empregados para evitar a liberação do fármaco nas porções superiores do TGI (FERRARI *et al.*, 2015).

Diferentes eventos estão envolvidos na liberação do fármaco a partir de uma matriz hidrofílica, como as microesferas de GG:P. Primeiramente, por se tratar de um sistema no qual predomina o intumescimento em relação à erosão (Figura 25), é necessária a entrada de meio na matriz e o intumescimento da mesma, para que o fármaco possa ser dissolvido e, então, suas moléculas difundirem através da camada de gel para o meio externo, sendo liberadas das microesferas. Durante esses eventos, ocorre uma pequena erosão da camada mais superficial das microesferas (MADERUELO *et al.*, 2011).

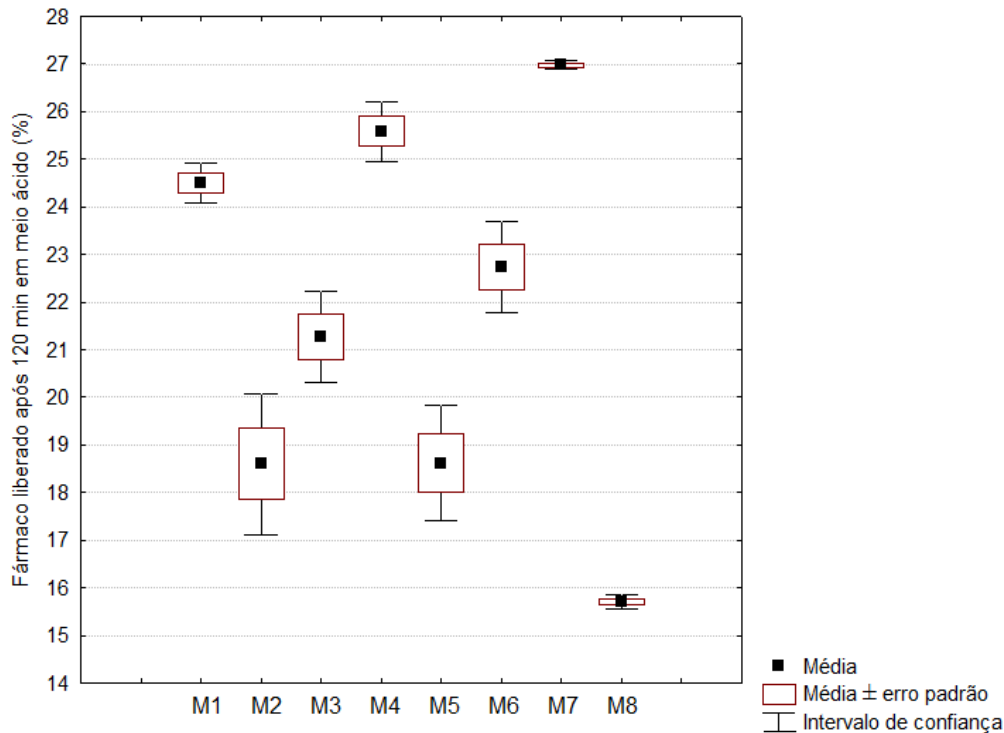
A dupla reticulação leva à formação de uma rede mais rígida devido à introdução de ligações covalentes entre as cadeias poliméricas que constituem a microesfera, o que, como demonstrado anteriormente, reduziu a capacidade dos sistemas de absorverem líquido e intumescerem em pH 1,2, fatores que contribuíram para a menor liberação do fármaco em meio ácido.

A Figura 27 apresenta o gráfico com as médias da porcentagem de fármaco liberado após 120 minutos em meio ácido e o intervalo de confiança calculados para as oito microesferas. No gráfico, o quadrado central representa a média, o retângulo externo representa a média \pm erro padrão e as barras representam o intervalo de confiança (IC), calculado a partir da seguinte equação: $IC = \text{média} \pm 1,96 * \text{desvio padrão}$.

A partir do gráfico é possível concluir que a amostra M 8, que apresenta proporção G:P 4:1, maior concentração polimérica (3%) e mais fármaco (0,5%) foi a que liberou menor porcentagem do resveratrol em meio ácido, apenas 15,70% ($p < 0,05$). Esta amostra também permaneceu pelos maiores tempos de reticulação propostos nas soluções reticulantes mais concentradas (5% de $AlCl_3$ e 1% de Glu).

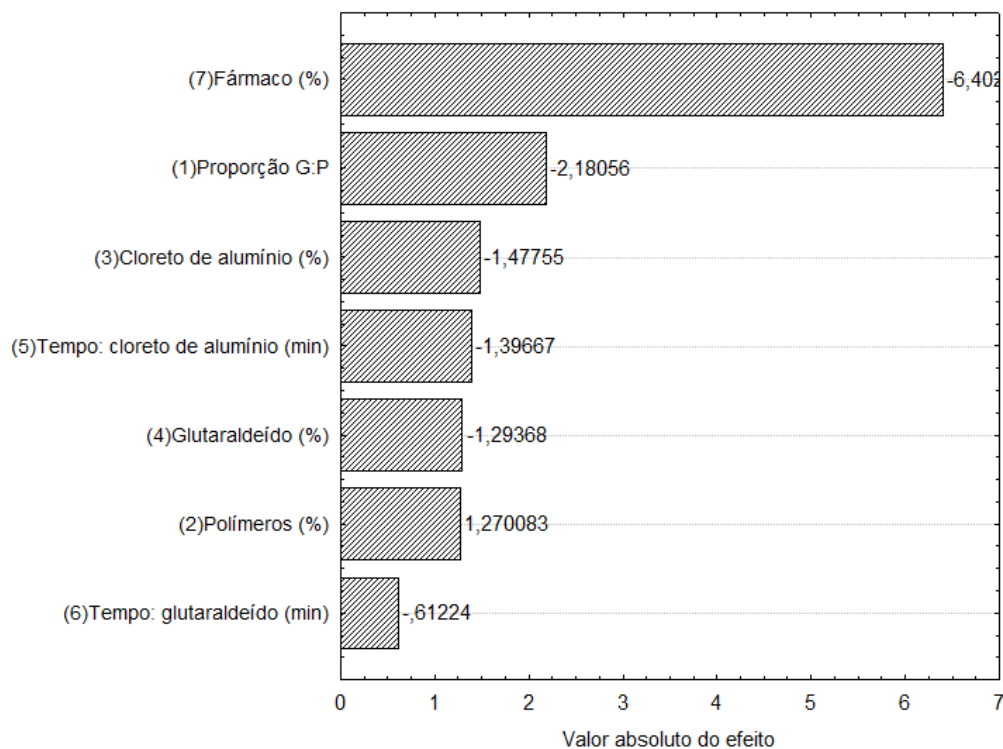
Já a amostra M 7, que apresenta proporção G:P 1:1, maior concentração de polímero (3%) e menor concentração de fármaco (0,25%), liberou a maior porcentagem de RES após 120 minutos de teste (26,98%) ($p < 0,05$) (Figura 27). Os tempos de reticulação em cada meio e a concentração dos agentes reticulantes para essa amostra variaram entre os maiores e os menores valores propostos no planejamento fatorial.

Figura 27: Porcentagem de fármaco liberado a partir das microesferas de GG:P duplamente reticuladas após 120 minutos em meio ácido (HCl 0,1N pH 1,2 com 1% LSS).



A Figura 28 apresenta o gráfico de Pareto com os valores absolutos dos efeitos dos fatores selecionados sobre a porcentagem de fármaco liberado após 120 minutos em meio ácido.

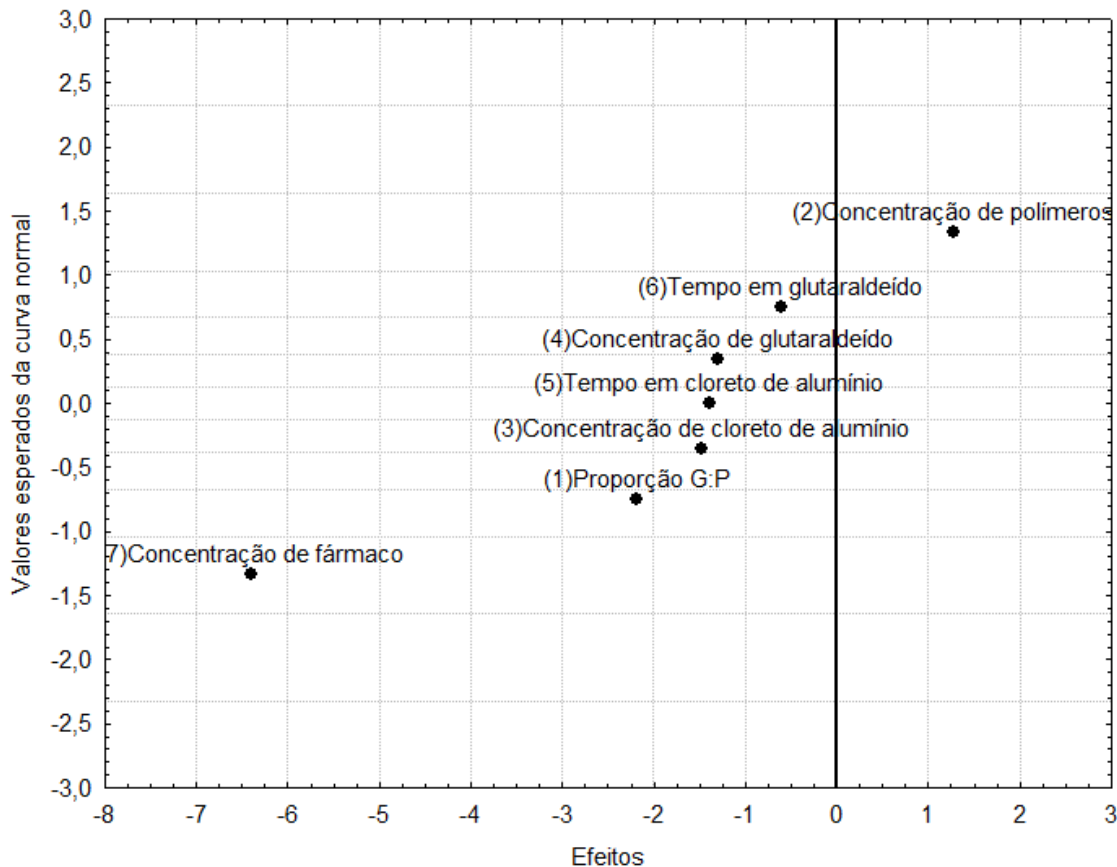
Figura 28: Gráfico de Pareto para os efeitos dos fatores avaliados sobre a resposta porcentagem de fármaco liberado após 120 minutos em meio ácido.



Os efeitos de maiores valores, em módulo, foram os dos fatores (7) concentração de fármaco e (1) proporção G:P, portanto, ambos devem exercer maior influência sobre o controle das taxas de liberação em meio ácido.

A Figura 29 apresenta o gráfico normal dos efeitos sobre a porcentagem de fármaco liberado após 120 minutos em meio ácido.

Figura 29: Gráfico normal dos efeitos dos fatores avaliados sobre a resposta porcentagem de fármaco liberado após 120 minutos em meio ácido.



É possível observar que os fatores (7) concentração de fármaco e (1) proporção G:P exerceram maior efeito sobre a liberação do fármaco em meio ácido, pois afastaram-se mais do eixo que passa pelo valor zero do eixo das abcissas, conforme concluído a partir dos valores absolutos calculados e apresentados no gráfico de Pareto (Figura 28).

A concentração de fármaco e a proporção G:P apresentaram efeitos negativos (-6,40 e -2,18, respectivamente) (Figura 28), evidenciando que a proporção G:P 4:1, que é o maior nível para essa variável, e o aumento de fármaco na formulação diminuem a liberação em meio ácido.

No entanto, o efeito principal da concentração de fármaco, de acordo com o planejamento 2^{7-4} está confundido, ou seja, engloba em seu valor, o efeito de interação binária

dos fatores 3 e 4 (Tabela 1) que são a concentração dos reticulantes AlCl_3 e Glu, respectivamente, e esta interação binária pode ser significativa, visto que o grau de reticulação pode influenciar a liberação do fármaco. Porém, com apenas oito ensaios realizados, o planejamento saturado não possui graus de liberdade para calcular se os efeitos são estatisticamente significativos e não se pode confirmar essa hipótese (RODRIGUES e IEMMA, 2005; NETO *et al.*, 2010a). Sendo assim, se faz necessária a realização de um maior número de experimentos a fim de confirmar a significância dos efeitos de cada um desses fatores, o que pode ser feito através de um planejamento fatorial completo, e será apresentado no Capítulo III.

5.10 Estudos da mucoadesividade das microesferas

5.10.1 Avaliação *in vitro* da mucoadesão

A mucina, principal componente do muco, está diretamente envolvida no fenômeno de mucoadesão. No organismo, sua conformação e carga, podem variar de acordo com o volume, a composição e o pH do fluido biológico presente em cada porção do TGI (SOSNIK *et al.*, 2014). O muco que reveste as diferentes mucosas também difere em concentração de mucina, espessura e pH e todos estes fatores influenciam diretamente o processo de mucoadesão (MADSEN *et al.*, 1998; SOSNIK *et al.*, 2014)

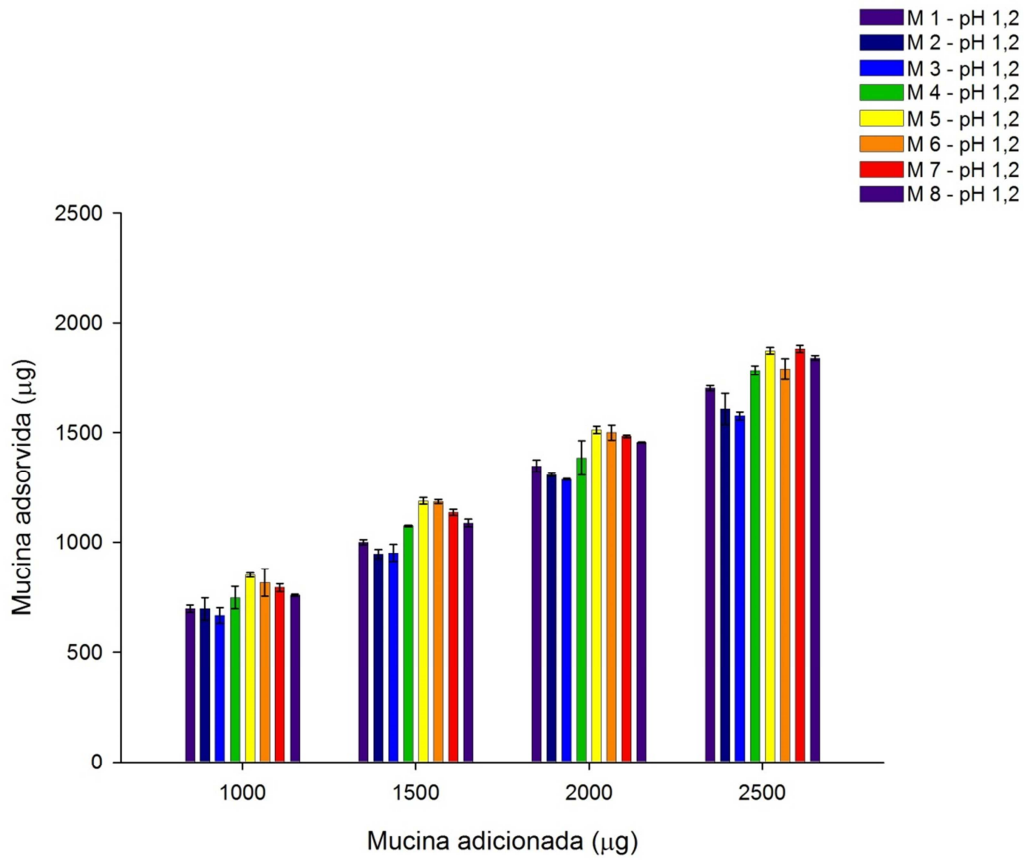
A capacidade mucoadesiva dos polímeros está relacionada com a flexibilidade de suas cadeias e com a presença de grupos funcionais capazes de interagir com os grupos funcionais da mucina presente no muco. Porém, quando se realiza uma reação de reticulação, tanto a flexibilidade quanto o número de grupos funcionais livres podem ser reduzidos, interferindo no processo de mucoadesão (CRCAREVSKA *et al.*, 2008). Além disso, os grupos funcionais livres podem apresentar-se ionizados ou não, dependendo de seus valores de pK_a e do pH do meio em que se encontram, influenciando também a mucoadesão do sistema.

O ensaio de adsorção de mucina em valores de pH respectivos aos ambientes gástrico (pH 1,2) e colônico (pH 6,8) teve por objetivo avaliar a influência do pH na capacidade de adsorção da mucina às microesferas.

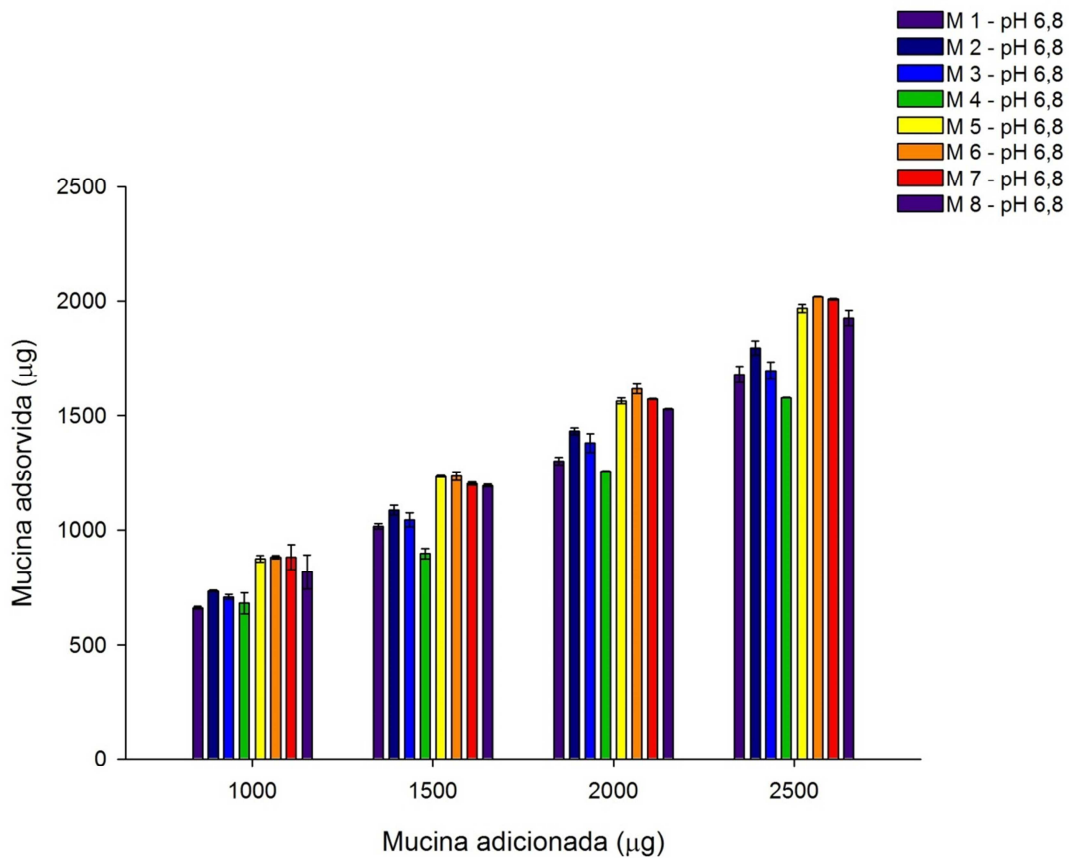
A Figura 30 apresenta o gráfico da quantidade de mucina adsorvida nas microesferas em função da quantidade de mucina adicionada nas soluções aquosas com diferentes valores de pH (1,2 e 6,8).

Figura 30: Quantidade de mucina adsorvida nas microesferas em função da quantidade de mucina adicionada nas soluções em A) pH 1,2 e B) pH 6,8.

A)



B)



Para todas as formulações de microesferas, a quantidade de mucina adsorvida aumentou com o aumento da quantidade de mucina adicionada ao meio (Figura 30), indicando a elevada capacidade mucoadesiva dos sistemas. O mesmo comportamento foi observado para microesferas de goma gelana reticuladas com AlCl_3 (BONI *et al.*, 2015), para microesferas de GG:P reticuladas ionicamente (PREZOTTI *et al.*, 2014) e por Sonia e Sharma (2011) para micropartículas de quitosana também obtidas por geleificação ionotrópica.

As microesferas duplamente reticuladas adsorveram, em média, 13,52% menos mucina que as microesferas de goma gelana reticuladas ionicamente com AlCl_3 (BONI *et al.*, 2015) e 9,13% menos que as microesferas de GG:P reticuladas ionicamente (PREZOTTI *et al.*, 2014), indicando que a dupla reticulação influenciou o processo de adsorção de mucina. A redução observada na adsorção deve estar relacionada ao maior grau de reticulação, que originou uma rede mais rígida e reduziu o número de grupos funcionais livres capazes de interagir com os grupos funcionais da mucina (CRCAREVSKA *et al.*, 2008).

As amostras em pH 1,2 adsorveram entre 659,06 e 1883,58 μg de mucina, e em pH 6,8 os valores variaram entre 648,23 e 2020,77 μg (Figura 30).

É importante observar que, exceto para as formulações M 1, M 3 e M 4, as microesferas incubadas com as soluções de mucina em pH 6,8 apresentaram uma maior quantidade de mucina adsorvida às suas superfícies em relação ao pH 1,2 ($p < 0,05$).

A maior adsorção de mucina em pH 6,8 que em pH 1,2 é uma característica desejável para o sistema desenvolvido, pois é uma evidência de uma maior interação do sistema com a mucosa colônica, o que, associado ao menor intumescimento e às baixas taxas de liberação em pH 1,2, constitui um importante conjunto de propriedades promissoras para um sistema mucoadesivo para liberação colônica de fármacos, quando administrado pela via oral.

Em pH 6,8, os grupamentos carboxílicos livres (não reticulados) dos polímeros constituintes das microesferas e os grupamento siálicos das cadeias de mucina devem apresentar-se negativamente carregados, devido à ionização, uma vez que o pH do meio é maior do que o pK_a dos materiais (goma gelana - $\text{pK}_a=3,5$; pectina - pK_a 3-4; mucina - $\text{pK}_a=2,6$), conforme demonstrado no item 5.2.1 do Capítulo I. Dessa forma, interações hidrofóbicas e/ou ligações de hidrogênio devem ser as responsáveis pela mucoadesão (SRIAMORNSAK *et al.*, 2010).

A repulsão eletrostática entre as cadeias poliméricas leva a uma estrutura mais frouxa, com as cadeias mais distendidas, o que favorece a interpenetração e posterior formação de ligações. Além disso, a hidrofília do sistema é aumentada quando os grupamentos carboxílicos encontram-se na forma ionizada, o que favorece o processo de intumescimento, e tais fatores favorecem, portanto, a interpenetração das cadeias de polímero e mucina e a formação de

ligações, principalmente as ligações de hidrogênio e as hidrofóbicas (ANDREWS *et al.*, 2009; MANSURI *et al.*, 2016).

No valor de pH 6,8, a maior repulsão eletrostática entre as cadeias negativamente carregadas promove a dilatação da rede e, possivelmente, o maior relaxamento das cadeias, que tornam-se mais disponíveis para a interpenetração com as cadeias de mucina, e posterior estabelecimento das interações hidrofóbicas e/ou ligações de hidrogênio, as quais são responsáveis pela mucoadesão (EDSMAN e HÄGERSTRÖM, 2005; JOERGENSEN *et al.*, 2011).

Em pH 1,2, deve ocorrer a ionização parcial da mucina, enquanto é esperado que as cadeias poliméricas apresentem-se na forma não ionizada, com seus grupamentos carboxílicos protonados, conforme demonstrado anteriormente (item 5.2.1, Capítulo I). Entretanto, é possível que interações fracas de Van der Waals e ligações de hidrogênio ocorram entre os polímeros e as cadeias de mucina, gerando, para algumas formulações (M 1, M 3 e M 4) adsorção semelhante à que ocorre em pH 6,8.

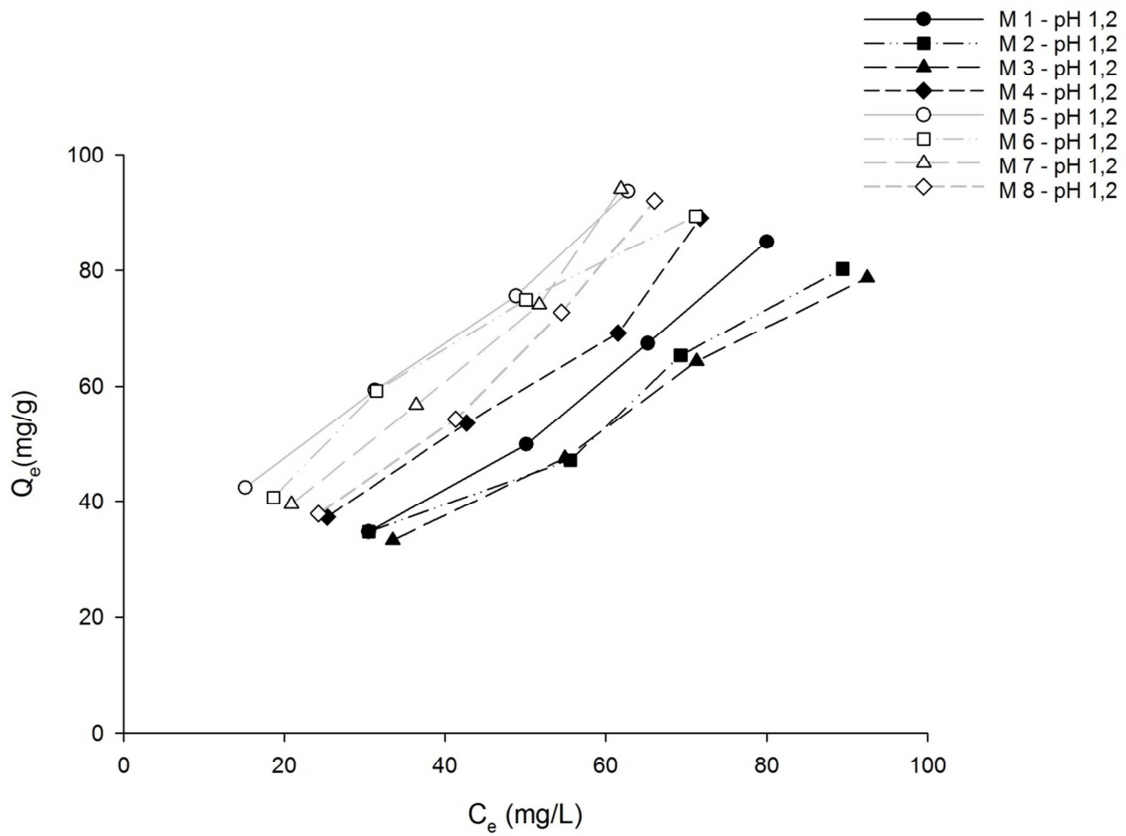
5.10.1.1 Isotermas de adsorção da mucina

Isotermas são representações gráficas, sendo que uma isoterma de adsorção representa a relação entre a quantidade de soluto adsorvido por massa de adsorbente *versus* a quantidade de soluto livre no sobrenadante, e permite avaliar a distribuição do soluto entre a fase líquida e a fase sólida em diferentes concentrações (SNOEYINK e SUMMERS, 1990; NG *et al.*, 2002).

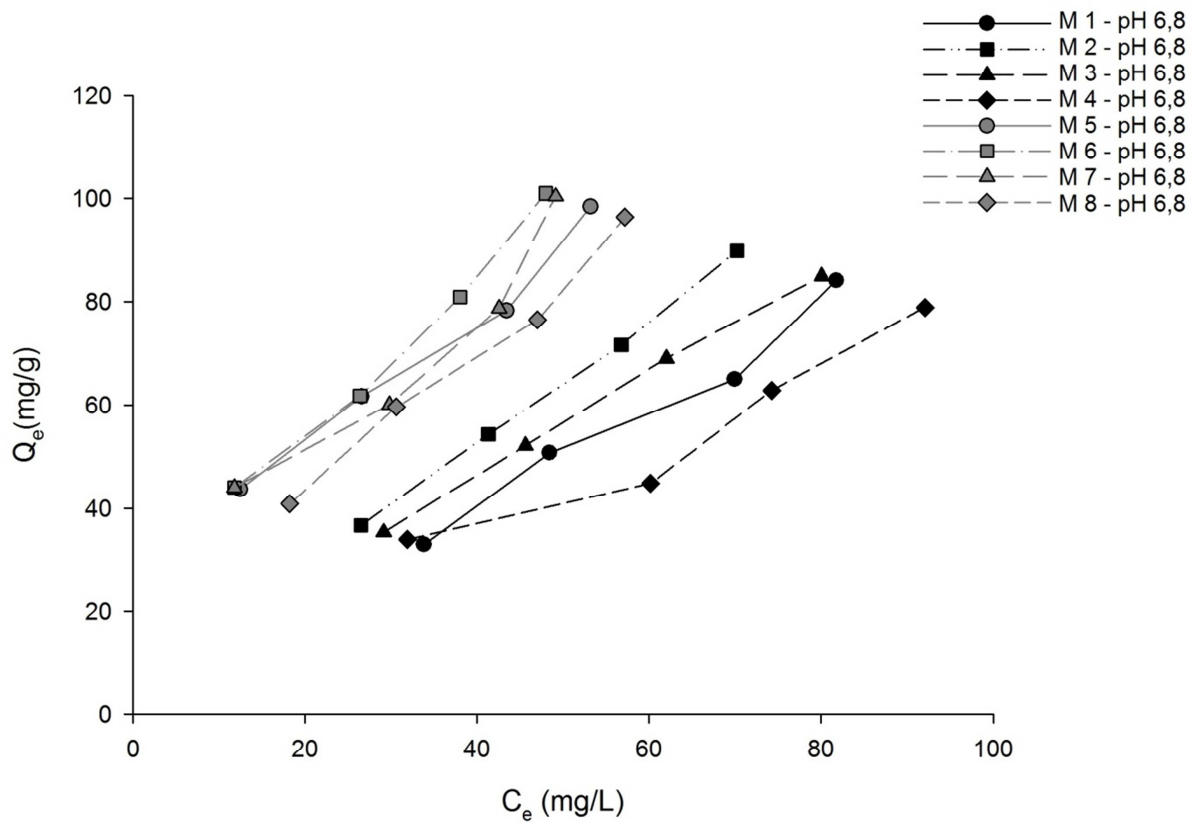
As isotermas de adsorção da mucina representam a quantidade de mucina adsorvida por unidade de massa de microesferas (Q_e , mg/g) *versus* a concentração de mucina livre no sobrenadante (C_e , mg/L) e são apresentadas na Figura 31. A partir deste gráfico é possível avaliar a distribuição da mucina adsorvida nas microesferas e livre no sobrenadante, e, portanto, avaliar a interação mucina – microesferas, que representa a capacidade mucoadesiva dos sistemas (PREZOTTI, 2013).

Figura 31: Isotermas de adsorção da mucina às diferentes microesferas avaliadas em A) pH 1,2 e em B) pH 6,8.

A)



B)



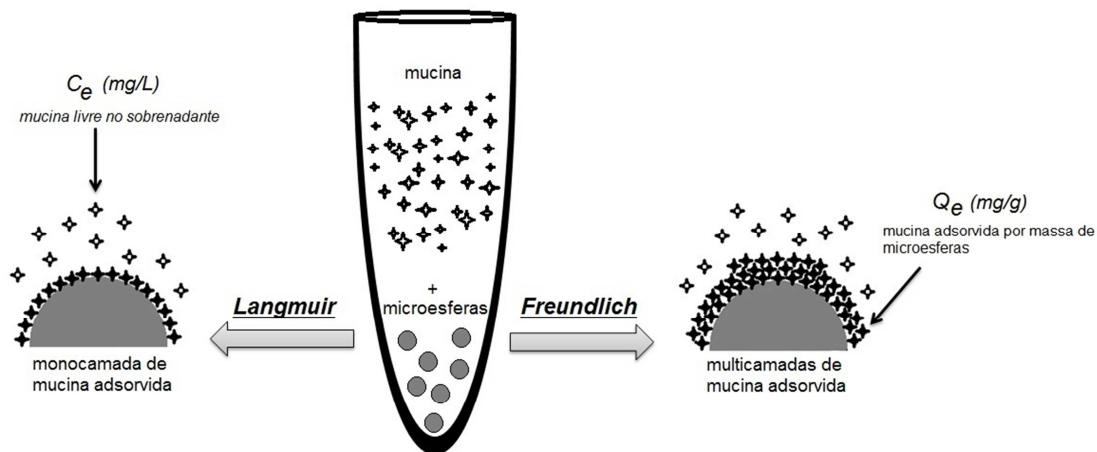
As amostras M 5, M 6, M 7 e M 8, apresentaram invariavelmente, maiores quantidades de mucina adsorvida em relação à mucina livre no sobrenadante, em ambos os valores de pH e para todas as concentrações avaliadas, o que pode ser observado a partir das isotermas de adsorção relativas a essas formulações nos gráficos apresentados na Figura 31.

Os modelos de Langmuir e Freundlich foram aplicados aos dados obtidos a fim de buscar um melhor entendimento sobre as propriedades mucoadesivas das microesferas estudadas, particularmente a capacidade de adsorção e a intensidade de interação.

O modelo de Freundlich descreve a adsorção de um único soluto (mucina) sobre o adsorbente (microesferas) e baseia-se na distribuição multicamadas deste soluto sobre a fase sólida, assumindo uma superfície heterogênea com uma distribuição de calor de adsorção não uniforme (SNOEYINK e SUMMERS, 1990; NG *et al.*, 2002; GUO e GEMEINHART, 2008). O modelo de Langmuir considera uma interação específica e forte entre o soluto (mucina) e o adsorbente (microesferas), com distribuição homogênea do soluto por toda a superfície do adsorbente, que leva à formação de uma monocamada (NG *et al.*, 2002).

A representação esquemática da adsorção de mucina às microesferas segundo os modelos de Langmuir e Freundlich para a adsorção de um único soluto em solução é apresentada na Figura 32.

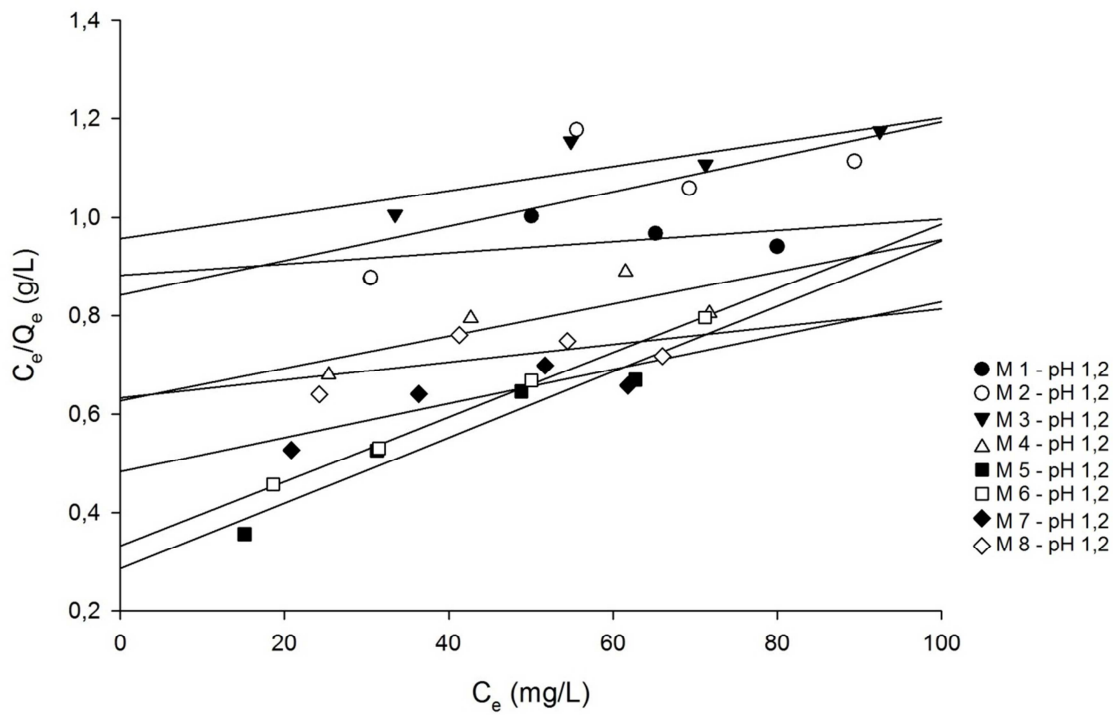
Figura 32: Adsorção da mucina segundo os modelos teóricos de Langmuir e Freundlich (adaptado de PREZOTTI, 2013).



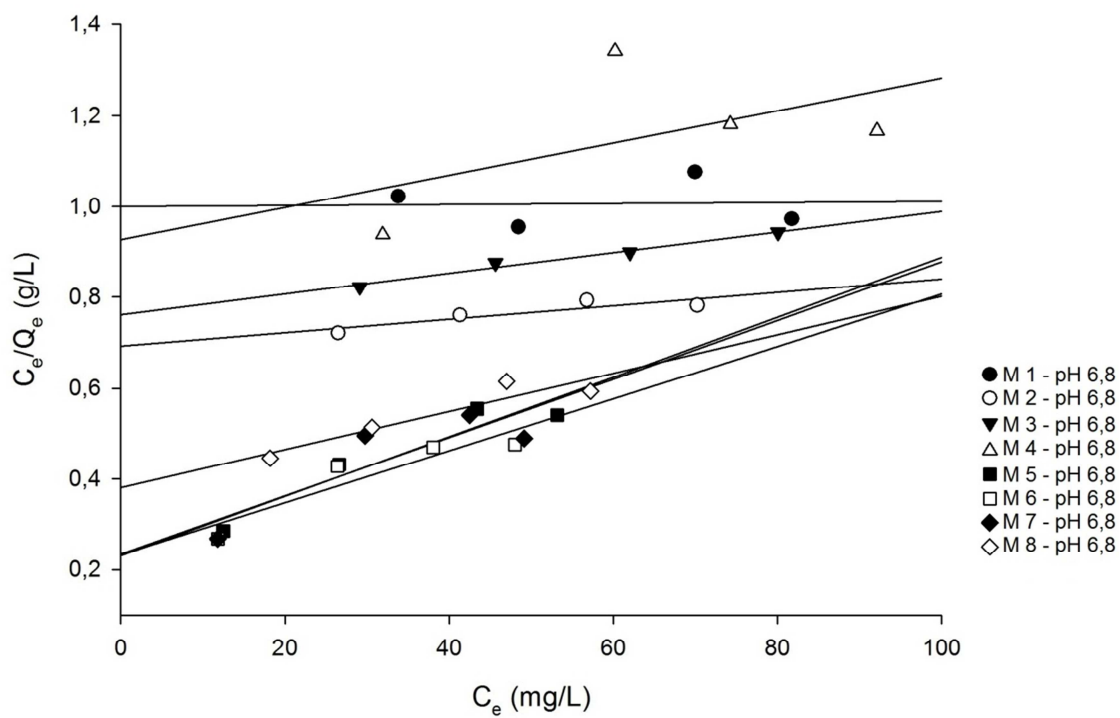
Para o modelo de Langmuir, as isotermas foram obtidas através dos gráficos C_e/Q_e vs C_e apresentados na Figura 33, que representam as isotermas de adsorção de Langmuir.

Figura 33: Isotermas de adsorção de Langmuir para mucina adsorvida nas diferentes microsferas em A) pH 1,2 e B) pH 6,8.

A)



B)



A partir do valores de r^2 (Tabela 8) obtidos através da regressão linear, pode-se observar que os dados obtidos não se correlacionaram com o modelo de Langmuir, exceto para a amostra M 6 em pH 1,2.

Tabela 8: Valores dos parâmetros do modelo de Freundlich obtidos a partir da regressão linear das curvas de $\log C_e$ vs $\log Q_e$ e coeficientes de determinação (r^2) das isotermas de Freundlich e Langmuir para os diferentes valores de pH.

	Amostra	n	Freundlich		Langmuir
			k	r ²	r ²
pH 1,2	M 1	1,09	1,45	0,986	0,201
	M 2	1,28	2,29	0,954	0,456
	M 3	1,16	1,58	0,992	0,666
	M 4	1,26	2,80	0,976	0,612
	M 5	1,85	9,54	0,986	0,930
	M 6	1,72	7,61	0,991	0,998
	M 7	1,30	3,73	0,982	0,711
	M 8	1,15	2,28	0,980	0,362
pH 6,8	M 1	1,00	1,01	0,982	0,002
	M 2	1,10	1,86	0,999	0,786
	M 3	1,15	1,89	1,000	0,981
	M 4	1,29	2,20	0,916	0,295
	M 5	1,88	11,18	0,975	0,904
	M 6	1,75	10,32	0,965	0,847
	M 7	1,90	11,46	0,905	0,745
	M 8	1,39	5,05	0,990	0,876

O modelo de Freundlich é descrito pela Equação 12 (não linearizada):

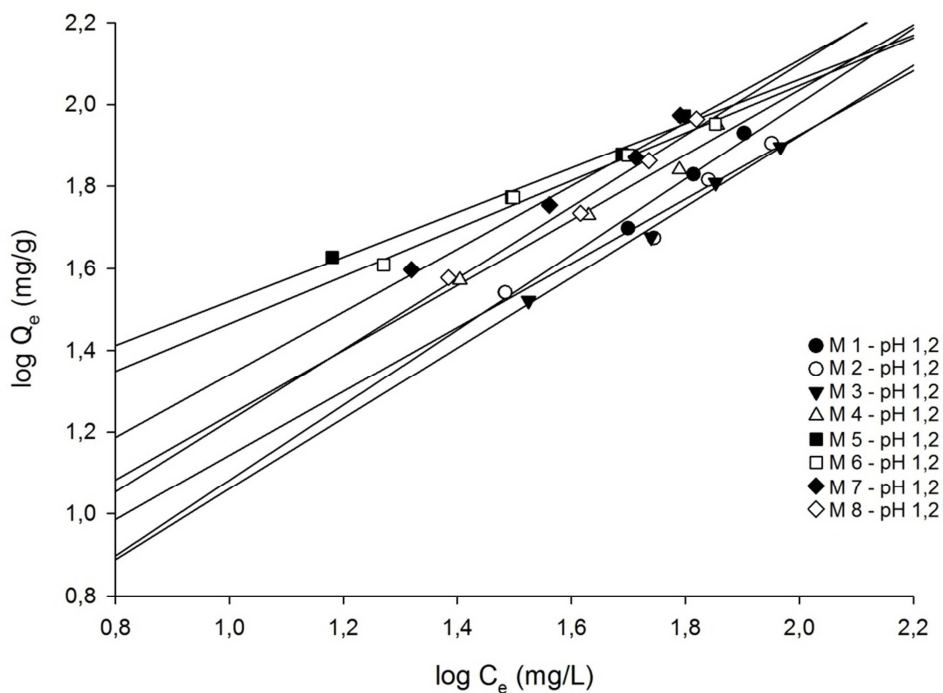
$$Q_e = k \times C_e^{1/n} \quad \text{Equação 12}$$

Para valores fixos de n e C_e (concentração de mucina livre no sobrenadante, mg/L), a constante k é diretamente proporcional à Q_e (quantidade de mucina adsorvida por unidade de massa de microesferas, mg/g), portanto, quanto maior o valor de k , maior a capacidade de adsorção de mucina por unidade de massa de microesferas (mg/g). Para valores fixos de k e C_e , quanto maior o valor de n , maior a força de interação envolvida na adsorção, e Q_e passa a ser independente de C_e , ou seja, a adsorção de mucina às microesferas independe da concentração de mucina livre no sobrenadante, a isoterma se aproxima de um platô, permanecendo constante, e é dita irreversível. Valores de n pequenos indicam uma fraca interação durante a adsorção e os valores da quantidade de mucina adsorvida por massa de microesferas (Q_e) sofrem alterações mesmo com pequenas mudanças na concentração da solução (C_e) (SNOEYINK e SUMMERS, 1990).

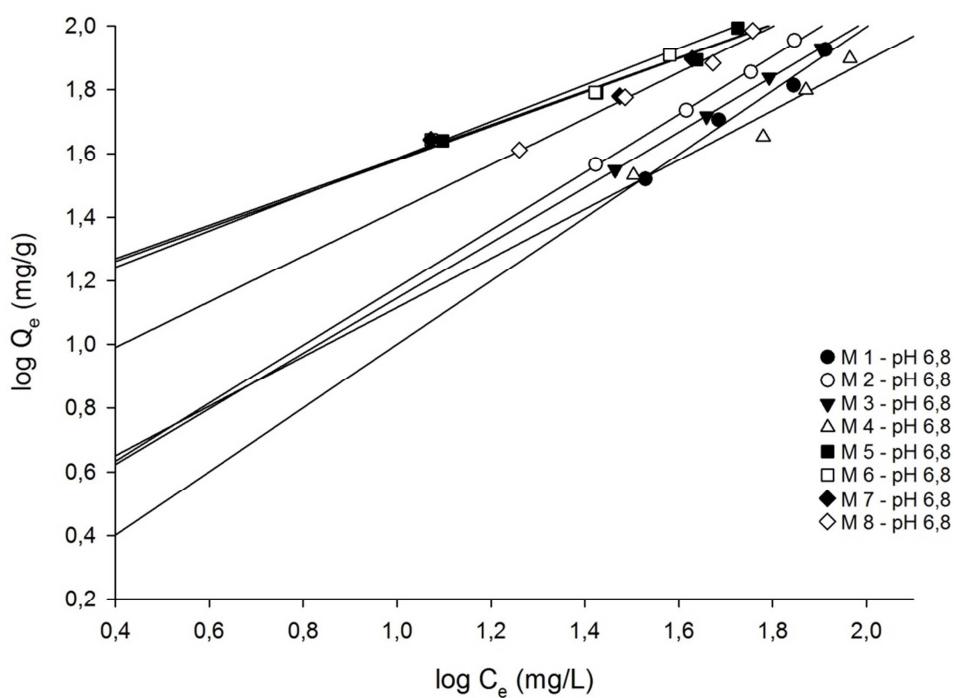
As isotermas de adsorção para o modelo de Freundlich foram obtidas a partir da construção dos gráficos $\log Q_e$ versus $\log C_e$ (RAMPEY *et al.*, 2004), apresentados na Figura 34.

Figura 34: Isotermas de adsorção de Freundlich para mucina adsorvida nas diferentes microesferas em A) pH 1,2 e B) pH 6,8.

A)



B)



A correlação dos dados com este modelo foi determinada com base no valor do coeficiente de determinação (r^2), obtido a partir da regressão linear das curvas $\log C_e$ vs $\log Q_e$. Os coeficientes k e n foram também determinados, sendo $\log k$ o coeficiente linear e $1/n$ o coeficiente angular da reta (HAMEED e RAHMAN, 2008).

Os elevados valores de coeficiente de determinação (r^2) (Tabela 8) demonstram que os dados apresentaram boa correlação com o modelo de Freundlich, cujos valores de coeficientes k e n estão apresentados na Tabela 8.

O parâmetro k é uma constante relacionada à capacidade de adsorção e n está relacionado à intensidade da adsorção, sendo característicos para cada sistema. Valores de n maiores que 1,0 representam condições favoráveis de adsorção (HAMEED e RAHMAN, 2008).

A capacidade de adsorção é um fator importante, pois está relacionada à quantidade de mucina que se ligará por massa de microesferas, o que está relacionado com a capacidade mucoadesiva dos sistemas por esse método de avaliação. Os valores de k para as diferentes amostras e meio estudados variaram entre 1,01 e 11,46 (Tabela 8).

Em pH 6,8, os maiores valores de k obtidos para as amostras M 5, M 6, M 7 e M 8 (5,05 a 11,46) demonstram o aumento significativo da capacidade de adsorção da mucina para essas amostras em relação ao pH 1,2. Este comportamento mostra-se favorável, já que indica a maior capacidade de interação com a mucina em meio colônico e, portanto, a maior capacidade mucoadesiva no sítio de interesse para o presente estudo.

Em pH 6,8, superior ao pK_a dos materiais (goma gelana - $pK_a=3,5$; pectina - pK_a 3-4; mucina - $pK_a=2,6$), as estruturas devem apresentar-se carregadas negativamente, devido à ionização dos grupos carboxílicos (SRIAMORNSAK *et al.*, 2010). Com os grupos carboxílicos na forma dissociada, a hidrofília do sistema é aumentada, favorecendo o intumescimento das microesferas. Ainda, a repulsão eletrostática afrouxa a rede e as cadeias se encontram mais distendidas, um conjunto de fatores que favorece a interpenetração das cadeias de polímero e de mucina e a formação de ligações, principalmente as ligações de hidrogênio e as hidrofóbicas, que estabelecem a mucoadesão (ANDREWS *et al.*, 2009; JOERGENSEN *et al.*, 2011; MANSURI *et al.*, 2016).

Os valores de n variaram entre 1,00 e 1,90 para todas as amostras em ambos os valores de pH (Tabela 8), indicando uma interação favorável, já que, segundo HAMEED e RAHMAN (2008), valores de $n > 1$ indicam que o processo de adsorção é favorável, corroborando os dados obtidos no teste de adsorção de mucina (item 5.10.1), em que se verificou o constante aumento da quantidade de mucina adsorvida em função do aumento da concentração da glicoproteína na solução (Figura 30). Porém, os baixos valores de n (Tabela 8) sugerem uma fraca interação entre as microesferas e a mucina.

A variação do pH não alterou a intensidade da adsorção da mucina às microesferas, o que pode ser observado através dos valores de n , que foram muito próximos entre si, nos meios com valor de pH 1,2 e 6,8 ($p > 0,05$).

Os parâmetros de Freundlich corroboram com os dados das isotermas de adsorção, em que as amostras M 5, M 6, M 7 e M 8 mostraram as maiores quantidades de mucina adsorvida em relação à mucina livre no sobrenadante (Figura 31) e também apresentaram valores de k e n maiores que as amostras M 1, M 2, M 3 e M 4, para ambos os valores de pH (Tabela 8), indicando que essas microesferas apresentam maior capacidade de adsorção de mucina, estabelecendo interações mais fortes entre as microesferas e glicoproteína.

5.10.2 Avaliação *ex vivo* da mucoadesão

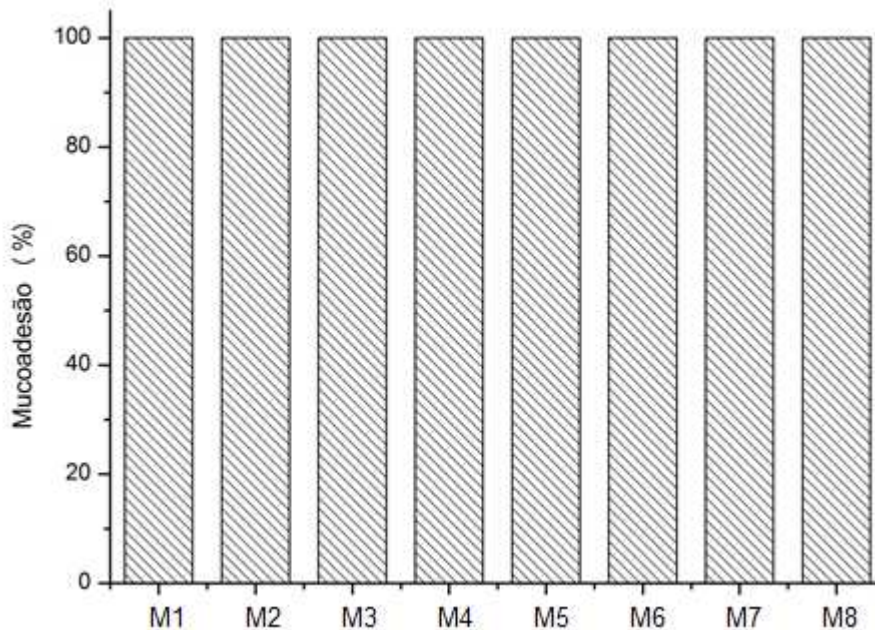
Uma camada de muco reveste o TGI, com as principais funções de proteção e lubrificação. Trata-se de um gel viscoelástico composto por, aproximadamente, 95% de água, 0,5 a 5% de mucina, 1% de sais inorgânicos e 0,5 a 1% de proteínas e lipídios. Porém sua composição e sua espessura variam de acordo com a região onde é secretado e do papel mecânico e fisiológico que irá desempenhar (MADSEN *et al.*, 1998; KHANVILKAR *et al.*, 2001; SOSNIK *et al.*, 2014).

Devido a essa estrutura complexa e diversificada do muco, a avaliação *ex vivo* da capacidade mucoadesiva também foi realizada, utilizando a mucosa colônica de porco com o objetivo de mimetizar as condições fisiológicas, já que este teste avalia a capacidade das microesferas aderirem ao muco que reveste o epitélio característico dessa região.

A mucoadesão é uma característica importante para os sistemas multiparticulados como as microesferas, pois através deste fenômeno, o tempo de contato com sítio de absorção pode ser prolongado e sua eliminação retardada (GAMBOA e LEONG, 2013).

A Figura 35 apresenta a porcentagem de mucoadesão das microesferas à mucosa de porco. As oito amostras testadas apresentaram 100% de capacidade mucoadesiva, sendo que ao final do ensaio todas as partículas encontravam-se fortemente aderidas à mucosa. Este resultado está em concordância com os dados do teste *in vitro* e evidencia a elevada capacidade mucoadesiva das microesferas desenvolvidas neste estudo.

Figura 35: Porcentagem de mucoadesão apresentada pelas microesferas para o teste *ex vivo* utilizando mucosa de porco (média \pm DP, n=3).



5.11 Seleção dos fatores e níveis para o planejamento fatorial completo 2^4

Quando muitas variáveis influenciam um processo, como no caso do delineamento de novos sistemas carreadores de fármacos, é comum realizar planejamentos fatoriais em sequência, pois um único planejamento não é suficiente para se atingir o objetivo (RODRIGUES e IEMMA, 2005). Neste estudo, o primeiro desenho dos experimentos realizado foi o planejamento fatorial fracionário do tipo saturado 2^{7-4} , seguido de um planejamento fatorial completo 2^4 .

O planejamento saturado 2^{7-4} teve por objetivo selecionar as variáveis que exercem maior influência em importantes características das microesferas, como tamanho, forma e a liberação do fármaco em meio ácido. Este estudo permitiu a identificação das variáveis que podem ser manipuladas para modular a liberação do fármaco, a fim de minimizar a liberação em meio ácido e desenvolver um sistema mais eficiente frente ao controle da liberação, promissor para vetorização de fármacos para o cólon.

Para o segundo desenho de experimentos, as variáveis foram escolhidas baseadas nos seus efeitos sobre as respostas: tamanho, índice de circularidade e liberação do fármaco em meio ácido.

Dentre as sete variáveis independentes ou fatores estudados, duas, o tempo de reticulação em $AlCl_3$ e o tempo de reticulação em Glu, mostraram baixa influência sobre as respostas avaliadas, indicando que a alteração em qualquer um desses dois fatores, dentro dos níveis estudados (45 e 90 min em $AlCl_3$ e 15 e 30 min em Glu) não provoca mudanças

expressivas no tamanho das partículas, na circularidade ou na liberação do fármaco em meio ácido. Sendo assim, esses dois fatores não foram selecionados como variáveis independentes para o planejamento fatorial completo 2^4 e tiveram seus valores fixados nos níveis mais baixos, o que torna o processo de obtenção mais rápido, além de prevenir a perda de fármaco para a solução reticulante.

Apesar da concentração de polímeros ter sido o segundo maior efeito sobre o tamanho das partículas e o maior efeito sobre a circularidade, este fator não apresentou um efeito pronunciado sobre a liberação em meio ácido, o que foi decisivo para optar por retirá-lo do planejamento fatorial completo. Selecionou-se então o nível mais baixo de concentração polimérica para, assim, tornar a obtenção mais eficiente do ponto de vista de tempo de processo e consumo de materiais.

A proporção G:P não afetou o tamanho das partículas, mas contribuiu para a circularidade e foi o segundo maior efeito sobre a redução das taxas de liberação do fármaco em meio ácido, o que foi decisivo para a escolha desse fator para o próximo estudo.

A concentração de fármaco também foi selecionada para o planejamento fatorial completo, visto que foi o fator que apresentou efeitos influentes sobre todas as respostas avaliadas. Na verdade, esse fator foi o que apresentou maiores efeitos sobre o tamanho e sobre a liberação em meio ácido, influenciando também a circularidade das microsferas. No entanto, resta a dúvida se os efeitos observados para o fator (7) concentração de fármaco são realmente devido à concentração de resveratrol na formulação ou se são frutos do efeito de interação entre os fatores (3) concentração de $AlCl_3$ e (4) concentração de Glu, sabendo que na literatura há relatos de que o grau de reticulação pode influenciar a liberação do fármaco.

Portanto, as variáveis concentração de $AlCl_3$ e de Glu foram selecionadas como fatores para o planejamento completo a fim de elucidar os reais efeitos de cada um desses fatores e da concentração de fármaco sobre respostas como a liberação em meio ácido.

A partir da seleção dos fatores foi realizado um planejamento fatorial completo do tipo 2^4 com ponto central, em que as quatro variáveis independentes selecionadas (proporção G:P, concentração de $AlCl_3$, concentração de Glu e concentração de fármaco) tiveram seus valores variados em três diferentes níveis (-1, 0 e +1). Já os fatores concentração de polímeros, tempo de reticulação em $AlCl_3$ e tempo de reticulação em Glu não foram selecionados e tiveram seus valores fixados no nível mais baixo (2%, 45 min e 15 min, respectivamente).

6 CONCLUSÕES

Microesferas de GG:P duplamente reticuladas foram obtidas com sucesso pela técnica de geleificação ionotrópica utilizando AlCl_3 e Glu como agentes reticulantes, a partir de um planejamento fatorial saturado 2^{7-4} , que permitiu a avaliação dos efeitos da proporção polimérica G:P, das concentrações de polímeros, AlCl_3 , Glu e fármaco e dos tempos de reticulação em AlCl_3 e Glu sobre respostas como tamanho, forma e liberação em meio ácido.

As análises por MEV revelaram microesferas com superfície rugosa e a presença do fármaco disperso na matriz, evidenciando um sistema matricial. As partículas mostraram-se esféricas e com distribuição de tamanho homogênea, sendo que o tamanho foi influenciado pelas concentrações de fármaco e de polímeros, seguido das concentrações de reticulantes Glu e AlCl_3 . Já a circularidade foi influenciada pela concentração de polímeros, pela proporção G:P e pela concentração de fármaco.

As microesferas exibiram elevados valores de EE% e comportamento de intumescimento e absorção de líquido pH-dependentes, sendo menores em pH 1,2 que em pH 6,0 ou 7,4. Os valores de erosão foram baixos e as microesferas conservaram a estrutura esférica após os ensaios de liberação *in vitro* em meio ácido.

A caracterização das amostras mostrou que a dupla reticulação conferiu características promissoras às microesferas para atuarem como sistemas de liberação cólon-específica de fármacos, pois permitiu a redução das taxas de liberação em meio ácido, sendo esta resposta mais influenciada pela concentração de fármaco e pela proporção G:P.

A elevada capacidade mucoadesiva das microesferas foi evidenciada nos testes *in vitro* de interação com a mucina e *ex vivo*, utilizando intestino de porco.

A partir dos resultados apresentados neste capítulo, foram selecionados quatro fatores, sendo eles a proporção G:P, as concentrações de AlCl_3 e de Glu e a concentração de fármaco, para a posterior realização de um planejamento fatorial completo (2^4) que é apresentado no Capítulo III.

REFERÊNCIAS

ABASHZADEH, S.; DINARVAND, R.; SHARIFZADEH, M.; HASSANZADEH, G.; AMINI, M.; ATYABI, F. Formulation and evaluation of an in situ gel forming system for controlled delivery of triptorelin acetate. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 4, p. 514-521, 2011.

AGNIHOTRI, S. A.; AMINABHAVI, T. M. Novel interpenetrating network chitosan-poly(ethylene oxide-g-acrylamide) hydrogel microspheres for the controlled release of capecitabine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 324, n. 2, p. 103-115, 2006.

AGNIHOTRI, S. A.; JAWALKAR, S. S.; AMINABHAVI, T. M. Controlled release of cephalexin through gellan gum beads: Effect of formulation parameters on entrapment efficiency, size, and drug release. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 63, n. 3, p. 249-261, 2006.

AHUJA, M.; YADAV, M.; KUMAR, S. Application of response surface methodology to formulation of ionotropically gelled gum cordia/gellan beads. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 1, p. 161-167, 2010.

ALFARAS, I.; JUAN, M. E. L.; PLANAS, J. M. trans-Resveratrol Reduces Precancerous Colonic Lesions in Dimethylhydrazine-Treated Rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 13, p. 8104-8110, 2010/07/14 2010.

ALMEIDA, P. F.; ALMEIDA, A. J. Cross-linked alginate–gelatine beads: a new matrix for controlled release of pindolol. **Journal of Controlled Release**, v. 97, n. 3, p. 431-439, 2004.

ALVES, P. M. A.; CARVALHO, R. A.; MORAES, I. C. F.; LUCIANO, C. G.; BITTANTE, A. M. Q. B.; SOBRAL, P. J. A. Development of films based on blends of gelatin and poly(vinyl alcohol) cross linked with glutaraldehyde. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 7, p. 1751-1757, 2011.

AMMAR, H. O.; EL-NAHHAS, S. A.; GHORAB, M. M.; SALAMA, A. H. Chitosan/cyclodextrin nanoparticles as drug delivery system. **Journal of Inclusion Phenomena Macroscopic Chemistry**, v. 72, p. 127-136, 2012.

ANDREWS, G. P.; LAVERTY, T. P.; JONES, D. S. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, n. 3, p. 505-518, 2009.

ANGADI, S. C.; MANJESHWAR, L. S.; AMINABHAVI, T. M. Coated Interpenetrating Blend Microparticles of Chitosan and Guar Gum for Controlled Release of Isoniazid. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 52, n. 19, p. 6399-6409, 2013.

ARMSTRONG, N. A. Factorial Design of Experiments. In: ARMSTRONG, N. A. (Ed.). **Pharmaceutical Experimental Design and Interpretation**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006. cap. 6,

AYRANCI, E.; DUMAN, O. Adsorption behaviors of some phenolic compounds onto high specific area activated carbon cloth. **Journal of Hazardous Materials**, v. 124, n. 1–3, p. 125-132, 2005.

BABU, G. V. M. M.; PRASAD, C. D. S.; MURTHY, K. V. R. Evaluation of modified gum karaya as carrier for the dissolution enhancement of poorly water-soluble drug nimodipine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 234, p. 1-17, 2002.

BABU, R. J.; SATHIGARI, S.; KUMAR, M. T.; PANDIT, J. K. Formulation of Controlled Release Gellan Gum Macro Beads of Amoxicillin. **Current Drug Delivery**, v. 7, p. 36-43, 2010.

BAJPAI, A. K.; SHUKLA, S. K.; BHANU, S.; KANKANE, S. Responsive polymers in controlled drug delivery. **Progress in Polymer Science**, v. 33, n. 11, p. 1088-1118, 2008.

BANERJEE, S.; SIDDIQUI, L.; BHATTACHARYA, S. S.; KAITY, S.; GHOSH, A.; CHATTOPADHYAY, P.; PANDEY, A.; SINGH, L. Interpenetrating polymer network (IPN) hydrogel microspheres for oral controlled release application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 1, p. 198-206, 2012.

BARBER, T. A.; HEALTHCARE, B. **Pharmaceutical particulate matter: analysis and control**. ed. Buffalo Grove, IL: Interpharm Press, 1993.

BARREIROS, F. M.; FERREIRA, P. J.; FIGUEIREDO, M. M. Calculating Shape Factors from Particle Sizing Data. **Particle & Particle Systems Characterization**, v. 13, n. 6, p. 368-373, 1996.

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J. M.; FELT, O.; PEPPAS, N. A.; GURNY, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, n. 1, p. 19-34, 2004.

BETIGERI, S. S.; NEAU, S. H. Immobilization of lipase using hydrophilic polymers in the form of hydrogel beads. **Biomaterials**, v. 23, n. 17, p. 3627-3636, 2002.

BEZEMER, J. M.; RADERSMA, R.; GRIJPMMA, D. W.; DIJKSTRA, P. J.; FEIJEN, J.; VAN BLITTERSWIJK, C. A. Zero-order release of lysozyme from poly(ethylene glycol)/poly(butylene terephthalate) matrices. **Journal of Controlled Release**, v. 64, n. 1-3, p. 179-192, 2000.

BHARDWAJ, T. R.; KANWAR, M.; LAL, R.; GUPTA, A. Natural Gums and Modified Natural Gums as Sustained-Release Carriers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 26, n. 10, p. 1025-1038, 2000.

BODMEIER, R.; CHEN, H.; PAERATAKUL, O. A Novel Approach to the Oral Delivery of Micro- or Nanoparticles. **Pharmaceutical research**, v. 6, n. 5, p. 413-417, 1989/05/01 1989.

BONI, F. I.; PREZOTTI, F. G.; CURY, B. S. F. Gellan gum microspheres crosslinked with trivalent ion: Effect of polymer and crosslinker concentrations on drug release and mucoadhesive properties. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, p. 1-29, 2015.

BUDAVARI, S.; O'NEIL, M. J.; SMITH, A.; HECKELMAN, P. E.; KINNEARY, J. F. **The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals**. 12. ed. White House Station, NJ: Merck & CO., Inc. p. 905. 1996.

BULMER, C.; MARGARITIS, A.; XENOCOSTAS, A. Production and characterization of novel chitosan nanoparticles for controlled release of rHu-Erythropoietin. **Biochemical Engineering Journal**, v. 68, n. 0, p. 61-69, 2012.

CAFFALL, K. H.; MOHNEN, D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 14, p. 1879-1900, 2009.

CARBINATTO, F. M.; DE CASTRO, A. D.; CURY, B. S. F.; MAGALHÃES, A.; EVANGELISTA, R. C. Physical properties of pectin–high amylose starch mixtures cross-linked with sodium trimetaphosphate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 423, n. 2, p. 281-288, 2012.

CARBINATTO, F. M.; DE CASTRO, A. D.; EVANGELISTA, R. C.; CURY, B. S. F. Insights into the swelling process and drug release mechanisms from cross-linked pectin/high amylose starch matrices. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 1, p. 27-34, 2014.

CARDOSO, V. M. D. O. **Síntese e caracterização de hidrogéis de amido retrogradado e goma gelana utilizados como matriz em sistemas de liberação cólon específica de fármacos**. 2014. 198f (Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Araraquara, 2014.

CELLESI, F.; WEBER, W.; FUSSENEGGER, M.; HUBBELL, J. A.; TIRELLI, N. Towards a fully synthetic substitute of alginate: Optimization of a thermal gelation/chemical cross-linking scheme (“tandem” gelation) for the production of beads and liquid-core capsules. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 6, p. 740-749, 2004.

CHAMBIN, O.; DUPUIS, G.; CHAMPION, D.; VOILLEY, A.; POURCELOT, Y. Colon-specific drug delivery: Influence of solution reticulation properties upon pectin beads performance. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 321, n. 1–2, p. 86-93, 2006.

CHAN, E.-S.; LEE, B.-B.; RAVINDRA, P.; PONCELET, D. Prediction models for shape and size of Ca-alginate macrobeads produced through extrusion–dripping method. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 338, n. 1, p. 63-72, 2009.

CHOURASIA, M. K.; JAIN, S. K. Pharmaceutical approaches to colon targeted drug delivery systems. **Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences**, v. 6, n. 1, p. 33-66, 2003.

_____. Polysaccharides for colon targeted drug delivery. **Drug Deliv**, v. 11, n. 2, p. 129-48, 2004.

CONSTANTIN, M.; FUNDUEANU, G.; BORTOLOTTI, F.; CORTESI, R.; ASCENZI, P.; MENEGATTI, E. Preparation and characterisation of poly(vinyl alcohol)/cyclodextrin microspheres as matrix for inclusion and separation of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 285, n. 1–2, p. 87-96, 2004.

CRCAREVSKA, M. S.; DODOV, M. G.; GORACINOVA, K. Chitosan coated Ca–alginate microparticles loaded with budesonide for delivery to the inflamed colonic mucosa. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, n. 3, p. 565-578, 2008.

CURY, B. S. F.; CASTRO, A. D.; KLEIN, S. I.; EVANGELISTA, R. C. Modeling a system of phosphated cross-linked high amylose for controlled drug release. Part 2: Physical parameters,

cross-linking degrees and drug delivery relationships. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 371, n. 1–2, p. 8-15, 2009.

CURY, B. S. F.; MENEGUIN, A. B.; CARDOSO, V. M. D. O.; PREZOTTI, F. G. Oral drug release systems based on pectin. In: BUSH, P. L. (Ed.). **Pectin: chemical properties, uses and health benefits**. 1.ed.: Nova Science Publishers, 2014. p.65-81.

DAS, S.; LIN, H.-S.; HO, P.; NG, K.-Y. The Impact of Aqueous Solubility and Dose on the Pharmacokinetic Profiles of Resveratrol. **Pharmaceutical research**, v. 25, n. 11, p. 2593-2600, 2008.

DAS, S.; NG, K.-Y. Colon-specific delivery of resveratrol: Optimization of multi-particulate calcium-pectinate carrier. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, n. 1–2, p. 20-28, 2010a.

_____. Resveratrol-loaded calcium-pectinate beads: Effects of formulation parameters on drug release and bead characteristics. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 2, p. 840-860, 2010b.

DAVARAN, S.; HANAEE, J.; KHOSRAVI, A. Release of 5-amino salicylic acid from acrylic type polymeric prodrugs designed for colon-specific drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 58, n. 3, p. 279-287, 1999.

DHAWAN, S.; SINGLA, A.; SINHA, V. Evaluation of mucoadhesive properties of chitosan microspheres prepared by different methods. **AAPS PharmSciTech**, v. 5, n. 4, p. 122-128, 2004.

DUCHÊNE, D.; TOUCHARD, F.; PEPPAS, N. A. Pharmaceutical and Medical Aspects of Bioadhesive Systems for Drug Administration. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 14, n. 2-3, p. 283-318, 1988.

EDSMAN, K.; HÄGERSTRÖM, H. Pharmaceutical applications of mucoadhesion for the non-oral routes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 57, n. 1, p. 3-22, 2005.

FAREEZ, I. M.; LIM, S. M.; MISHRA, R. K.; RAMASAMY, K. Chitosan coated alginate-xanthan gum bead enhanced pH and thermotolerance of *Lactobacillus plantarum* LAB12. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 1419-1428, 2015.

FASANO, A. Innovative strategies for the oral delivery of drugs and peptides. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 4, p. 152-157, 1998.

FERRARI, P. C.; PREZOTTI, F. G.; CURY, B. S. F.; EVANGELISTA, R. C. Colonic Drug Delivery: Biopolymers and Enteric Polymers. In: (Ed.). **Encyclopedia of Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials**: Taylor & Francis, 2015. p.1917-1926. ISBN 1-4398-9879-0.

FERTONANI, H. C. R.; SCABIO, A.; CARNEIRO, E. B. B.; SCHEMIM, M. H. C.; NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G. Extraction model of low methoxyl pectin from apple pomace effects of acid concentration and time on the process and the product. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 177-185, 2009.

FLEMING, G. K.; KOROS, W. J. Dilation of polymers by sorption of carbon dioxide at elevated pressures. 1. Silicone rubber and unconditioned polycarbonate. **Macromolecules**, v. 19, n. 8, p. 2285-2291, 1986/08/01 1986.

FREIBERG, S.; ZHU, X. X. Polymer microspheres for controlled drug release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 282, n. 1-2, p. 1-18, 2004.

GAMBOA, J. M.; LEONG, K. W. In vitro and in vivo models for the study of oral delivery of nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, n. 0, 2013.

GARDINER, W. P. Factorial experimental designs for chemical experimentation. In: GARDINER, W. P. (Ed.). **Statistical analysis methods for chemists: a software-based approach**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1997. cap. 4, p.132-167.

GAUMET, M.; VARGAS, A.; GURNY, R.; DELIE, F. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 1, p. 1-9, 2008.

GIAVASIS, I.; HARVEY, L. M.; MCNEIL, B. Gellan Gum. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 177-211, 2000.

GRASDALEN, H.; SMIDSRØD, O. Gelation of gellan gum. **Carbohydrate Polymers**, v. 7, n. 5, p. 371-393, 1987.

GREGORIADIS, G. Targeting of drugs: implications in medicine. **The Lancet**, v. 318, n. 8240, p. 241-247, 1981.

GUO, C.; GEMEINHART, R. A. Understanding the adsorption mechanism of chitosan onto poly (lactide-co-glycolide) particles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 70, n. 2, p. 597-604, 2008.

GUPTA, P.; VERMANI, K.; GARG, S. Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery. **Drug Discovery Today**, v. 7, n. 10, p. 569-579, 2002.

GUPTA, V. K.; BECKERT, T. E.; PRICE, J. C. A novel pH- and time-based multi-unit potential colonic drug delivery system. I. Development. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 213, n. 1-2, p. 83-91, 2001.

HÄGERSTRÖM, H.; PAULSSON, M.; EDSMAN, K. Evaluation of mucoadhesion for two polyelectrolyte gels in simulated physiological conditions using a rheological method. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 3, p. 301-309, 2000.

HAMEED, B. H.; RAHMAN, A. A. Removal of phenol from aqueous solutions by adsorption onto activated carbon prepared from biomass material. **Journal of Hazardous Materials**, v. 160, n. 2-3, p. 576-581, 2008.

HUA, S.; MARKS, E.; SCHNEIDER, J. J.; KEELY, S. Advances in oral nano-delivery systems for colon targeted drug delivery in inflammatory bowel disease: Selective targeting to diseased versus healthy tissue. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 11, n. 5, p. 1117-1132, 2015.

ISHA, C.; NIMRATA, S.; RANA, A. C.; SURBHI, G. Oral sustained release drug delivery system: an overview. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 3, n. 5, p. 57-62, 2012.

JOERGENSEN, L.; KLÖSGEN, B.; SIMONSEN, A. C.; BORCH, J.; HAGESAETHER, E. New insights into the mucoadhesion of pectins by AFM roughness parameters in combination with SPR. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 411, n. 1–2, p. 162-168, 2011.

KALDAS, M. I.; WALLE, U. K.; WALLE, T. Resveratrol transport and metabolism by human intestinal Caco-2 cells. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 55, n. 3, p. 307-312, 2003.

KEAWCHAOON, L.; YOKSAN, R. Preparation, characterization and in vitro release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, n. 1, p. 163-171, 2011.

KHAFAGY, E.-S.; MORISHITA, M.; ONUKI, Y.; TAKAYAMA, K. Current challenges in non-invasive insulin delivery systems: A comparative review. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 15, p. 1521-1546, 2007.

KHAN, S. A.; AHMAD, M.; MURTAZA, G.; AAMIR, M. N.; AKHTAR, N.; KOUSAR, R. Formulation of two-drug controlled release non-biodegradable microparticles for potential treatment of muscles pain and spasm and their simultaneous spectrophotometric estimation. **Acta Pol Pharm**, v. 67, n. 3, p. 299-306, May-Jun 2010.

KHANVILKAR, K.; DONOVAN, M. D.; FLANAGAN, D. R. Drug transfer through mucus. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, n. 2–3, p. 173-193, 2001.

KINGET, R.; KALALA, W.; VERVOORT, L.; VAN DEN MOOTER, G. Colonic Drug Targeting. **Journal of Drug Targeting**, v. 6, n. 2, p. 129-149, 1998.

KORSMEYER, R. W.; GURNY, R.; DOELKER, E.; BURI, P.; PEPPAS, N. A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 15, n. 1, p. 25-35, 1983.

KULKARNI, R. V.; MANGOND, B. S.; MUTALIK, S.; SA, B. Interpenetrating polymer network microcapsules of gellan gum and egg albumin entrapped with diltiazem–resin complex for controlled release application. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 2, p. 1001-1007, 2011.

KYZAS, G. Z.; LAZARIDIS, N. K.; BIKIARIS, D. N. Optimization of chitosan and β -cyclodextrin molecularly imprinted polymer synthesis for dye adsorption. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, n. 1, p. 198-208, 2013.

LAM, P. L.; GAMBARI, R. Advanced progress of microencapsulation technologies: *in vivo* and *in vitro* models for studying oral and transdermal drug deliveries. **Journal of Controlled Release**, v. 178, p. 25-45, 2014.

LAN, Q.; BASSI, A. S.; ZHU, J.-X. J.; MARGARITIS, A. A modified Langmuir model for the prediction of the effects of ionic strength on the equilibrium characteristics of protein adsorption onto ion exchange/affinity adsorbents. **Chemical Engineering Journal**, v. 81, n. 1, p. 179-186, 2001.

LEOPOLD, C. S. Coated dosage forms for colon-specific drug delivery. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 2, n. 5, p. 197-204, 1999.

LEVIGNE, S.; THOMAS, M.; RALET, M. C.; QUEMENER, B.; THIBAUT, J. F. Determination of the degrees of methylation and acetylation of pectins using a C18 column and internal standards. **Food Hydrocolloids**, v. 16, n. 6, p. 547-550, 2002.

LUCINDA-SILVA, R. M.; MONTEIRO, K. C. M.; CARVALHO, L. D. Q.; EVANGELISTA, R. C. Multiparticulate systems of pectin-chitosan: study of swelling and drug release. **Acta Aarmacéutica Bonaerense**, v. 25, n. 4, p. 538-543, 2006.

MADERUELO, C.; ZARZUELO, A.; LANA O, J. M. Critical factors in the release of drugs from sustained release hydrophilic matrices. **Journal of Controlled Release**, v. 154, n. 1, p. 2-19, 2011.

MADSEN, F.; EBERTH, K.; SMART, J. D. A rheological examination of the mucoadhesive/mucus interaction: the effect of mucoadhesive type and concentration. **Journal of Controlled Release**, v. 50, n. 1-3, p. 167-178, 1998.

MAESTRELLI, F.; ZERROUK, N.; CIRRI, M.; MENNINI, N.; MURA, P. Microspheres for colonic delivery of ketoprofen-hydroxypropyl- β -cyclodextrin complex. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 34, n. 1, p. 1-11, 2008.

MAIOR, J. F. A. S.; REIS, A. V.; MUNIZ, E. C.; CAVALCANTI, O. A. Reaction of pectin and glycidyl methacrylate and ulterior formation of free films by reticulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 355, n. 1-2, p. 184-194, 2008.

MAITI, S.; RANJIT, S.; MONDOL, R.; RAY, S.; SA, B. Al⁺³ ion cross-linked and acetalated gellan hydrogel network beads for prolonged release of glipizide. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 1, p. 164-172, 2011.

MANSURI, S.; KESHARWANI, P.; JAIN, K.; TEKADE, R. K.; JAIN, N. K. Mucoadhesion: A promising approach in drug delivery system. **Reactive and Functional Polymers**, v. 100, p. 151-172, 2016.

MARTINS, S.; SARMENTO, B.; SOUTO, E. B.; FERREIRA, D. C. Insulin-loaded alginate microspheres for oral delivery – Effect of polysaccharide reinforcement on physicochemical properties and release profile. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, n. 4, p. 725-731, 2007.

MCCONAUGHY, S. D.; STROUD, P. A.; BOUDREAUX, B.; HESTER, R. D.; MCCORMICK, C. L. Structural characterization and solution properties of a galacturonate polysaccharide derived from Aloe vera capable of *in situ* gelation. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 2, p. 472-480, 2008.

MENEGUIN, A. B.; CURY, B. S. F.; EVANGELISTA, R. C. Films from resistant starch-pectin dispersions intended for colonic drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, n. 0, p. 140-149, 2014.

MI, F.-L.; SUNG, H.-W.; SHYU, S.-S.; SU, C.-C.; PENG, C.-K. Synthesis and characterization of biodegradable TPP/genipin co-crosslinked chitosan gel beads. **Polymer**, v. 44, n. 21, p. 6521-6530, 2003.

MORISHITA, M.; PEPPAS, N. A. Is the oral route possible for peptide and protein drug delivery? **Drug Discovery Today**, v. 11, n. 19–20, p. 905-910, 2006.

MORRIS, E. R.; NISHINARI, K.; RINAUDO, M. Gelation of gellan – A review. **Food Hydrocolloids**, v. 28, n. 2, p. 373-411, 2012.

MULHBACHER, J.; ISPAS-SZABO, P.; MATEESCU, M. A. Cross-linked high amylose starch derivatives for drug release: II. Swelling properties and mechanistic study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, n. 2, p. 231-238, 2004.

MUNARIN, F.; TANZI, M. C.; PETRINI, P. Advances in biomedical applications of pectin gels. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, n. 4, p. 681-689, 2012.

NAJLAH, M.; D'EMANUELE, A. Crossing cellular barriers using dendrimer nanotechnologies. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 6, n. 5, p. 522-527, 2006.

NARKAR, M.; SHER, P.; PAWAR, A. Stomach-Specific Controlled Release Gellan Beads of Acid-Soluble Drug Prepared by Ionotropic Gelation Method. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 1, p. 267-277, 2010.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2010a.

_____. Como variar tudo ao mesmo tempo. In: (Ed.). **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4 ed. Porto Alegre: Bookman, 2010b. cap. 3, p.99-163.

_____. Quando as variáveis são muitas. In: (Ed.). **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Porto Alegre: Bookman, 2010c. cap. 4, p.165-214.

NEUMAN, R. C. Experimental design for non-statisticians. **Journal of Vinyl Technology**, v. 15, n. 1, p. 34-37, 1993.

NG, C.; LOSSO, J. N.; MARSHALL, W. E.; RAO, R. M. Freundlich adsorption isotherms of agricultural by-product-based powdered activated carbons in a geosmin–water system. **Bioresource Technology**, v. 85, n. 2, p. 131-135, 2002.

OGAWA, E.; TAKAHASHI, R.; YAJIMA, H.; NISHINARI, K. Effects of molar mass on the coil to helix transition of sodium-type gellan gums in aqueous solutions. **Food Hydrocolloids**, v. 20, n. 2–3, p. 378-385, 2006.

OLIVEIRA, F. M.; CAVALCANTI, O. A. Pré-Bióticos na formação de filmes isolados de Eudragit® RS30D: Avaliação das propriedades de intumescimento e permeabilidade. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 3, p. 325, 2007.

OLIVEIRA, G. F. **Incorporação de polímeros gastrorresistentes à sistema multiparticulado a base de quitosana**. 2005. 159p (Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2005.

OLIVEIRA, G. F.; FERRARI, P. C.; CARVALHO, L. Q.; EVANGELISTA, R. C. Chitosan-pectin multiparticulate systems associated with enteric polymers for colonic drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 3, p. 1004-1009, 2010.

PATIL, J. S.; KAMALAPUR, M. V.; MARAPUR, S. C.; KADAM, D. V. Iontropic gelation and polyelectrolyte complexation: The novel techniques to design hydrogel particulate sustained, modulated drug delivery system: A review. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 5, n. 1, p. 241-248, 2010.

PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. **Analytical Biochemistry**, v. 83, n. 2, p. 346-356, 1977.

PEZZINI, B. R.; FERRAZ, H. G. Perfis de Dissolução em Bio-Dis de Péletes de Cetoprofeno obtidos por Extrusão-esferonização e Revestimento em Leito Fluidizado. **Lat. Am. J. Pharm**, v. 26, n. 4, p. 490-8, 2007.

PHILIP, A. K.; PHILIP, B. Colon targeted drug delivery systems: a review on primary and novel approaches. **Oman Med J**, v. 25, n. 2, p. 79-87, 2010.

PICKUP, S.; BLUM, F. D.; FORD, W. T.; PERIYASAMY, M. Transport of small molecules in swollen polymer beads. **Journal of the American Chemical Society**, v. 108, n. 14, p. 3987-3990, 1986/07/01 1986.

PICONE, C. S. F. **Influência da conformação da gelana sobre a gelificação das proteínas do leite**. 2008. 141f (Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

PINTO, J. F. Site-specific drug delivery systems within the gastro-intestinal tract: From the mouth to the colon. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 395, p. 44-52, 2010.

POLLACK, R. M.; CRANDALL, J. P. Resveratrol: Therapeutic Potential for Improving Cardiometabolic Health. **American Journal of Hypertension**, p. 1-9, 2013.

PREZOTTI, F. G. **Microesferas de goma gelana e pectina como potencial estratégia para liberação controlada de fármacos**. 2013. 111f (Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Araraquara, 2013.

PREZOTTI, F. G.; CURY, B. S. F.; EVANGELISTA, R. C. Mucoadhesive beads of gellan gum/pectin intended to controlled delivery of drugs. **Carbohydrate Polymers**, v. 113, n. 0, p. 286-295, 2014.

PREZOTTI, F. G.; MENEGUIN, A. B.; EVANGELISTA, R. C.; CURY, B. S. F. Preparation and characterization of free films of high amylose/pectin mixtures cross-linked with sodium trimetaphosphate. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 38, n. 11, p. 1354-1359, 2012.

RAMPEY, A. M.; UMPLEBY, R. J.; RUSHTON, G. T.; ISEMAN, J. C.; SHAH, R. N.; SHIMIZU, K. D. Characterization of the Imprint Effect and the Influence of Imprinting Conditions on Affinity, Capacity, and Heterogeneity in Molecularly Imprinted Polymers Using the Freundlich Isotherm-Affinity Distribution Analysis. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 4, p. 1123-1133, 2004/02/01 2004.

RAO, K. V. R.; BURI, P. A novel in situ method to test polymers and coated microparticles for bioadhesion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 52, n. 3, p. 265-270, 1989.

READ, T.-A.; SORENSEN, D. R.; MAHESPARAN, R.; ENGER, P. Ø.; TIMPL, R.; OLSEN, B. R.; HJELSTUEN, M. H.; HARALDSETH, O.; BJERKVIG, R. Local endostatin treatment of gliomas administered by microencapsulated producer cells. **Nature biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 29-34, 2001.

RENUKUNTLA, J.; VADLAPUDI, A. D.; PATEL, A.; BODDU, S. H. S.; MITRA, A. K. Approaches for enhancing oral bioavailability of peptides and proteins. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 447, n. 1-2, p. 75-93, 2013.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. 1. ed. Campinas: Casa do Pão Editora, 2005.

RUBINSTEIN, A. Microbially controlled drug delivery to the colon. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v. 11, n. 6, p. 465-475, 1990.

SALAMAT-MILLER, N.; CHITTCHANG, M.; JOHNSTON, T. P. The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 11, p. 1666-1691, 2005.

SASTRY, S. V.; NYSHADHAM, J. R.; FIX, J. A. Recent technological advances in oral drug delivery – a review. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 3, n. 4, p. 138-145, 2000.

SCHOLS, H. A.; COENEN, G. J.; VORAGEN, A. G. J. Revealing pectin's structure. In: SCHOLS, H. A.; VISSER, R. G. F., *et al* (Ed.). **Pectins and pectinases**: Wageningen Academic Pub, 2009. ISBN 978-90-8686-108-8.

SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J. Complex Pectins: Structure elucidation using enzymes. In: VISSER, J. e VORAGEN, A. G. J. (Ed.). **Pectins and Pectinases**. Amsterdam: Elsevier, v.14, 1996. p.3-20. ISBN 0921-0423.

SCHWAAB, M.; PINTO, J. C. **Análise de dados experimentais, Volume II: planejamento de experimentos**. 1. ed. Rio de Janeiro: E-papers, 2011. 514p.

SEIFERT, D. B.; PHILLIPS, J. A. Production of Small, Monodispersed Alginate Beads for Cell Immobilization. **Biotechnology Progress**, v. 13, n. 5, p. 562-568, 1997.

SINHA, V. R.; KUMRIA, R. Colonic drug delivery: prodrug approach. **Pharmaceutical research**, v. 18, n. 5, p. 557-564, 2001a.

_____. Polysaccharides in colon-specific drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 224, n. 1-2, p. 19-38, 2001b.

_____. Microbially triggered drug delivery to the colon. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 18, n. 1, p. 3-18, 2003.

SNOEYINK, V. L.; SUMMERS, R. S. Adsorption of organic compounds. In: (Ed.). **Water quality and treatment**. New York: McGraw-Hill, v.5, 1990. cap. 13,

SOARES, G. A.; CASTRO, A. D. D.; CURY, B. S. F.; EVANGELISTA, R. C. Blends of cross-linked high amylose starch/pectin loaded with diclofenac. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, n. 1, p. 135-142, 2013.

SONIA, T. A.; SHARMA, C. P. In vitro evaluation of N-(2-hydroxy) propyl-3-trimethyl ammonium chitosan for oral insulin delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 103-109, 2011.

SOSNIK, A.; DAS NEVES, J.; SARMENTO, B. Mucoadhesive polymers in the design of nano-drug delivery systems for administration by non-parenteral routes: A review. **Progress in Polymer Science**, v. 39, n. 12, p. 2030-2075, 2014.

SOUTO-MAIOR, J. F. A.; REIS, A. V.; PEDREIRO, L. N.; CAVALCANTI, O. A. Phosphated crosslinked pectin as a potential excipient for specific drug delivery: preparation and physicochemical characterization. **Polymer International**, v. 59, n. 1, p. 127-135, 2010.

SRIAMORNSAK, P.; WATTANAKORN, N.; TAKEUCHI, H. Study on the mucoadhesion mechanism of pectin by atomic force microscopy and mucin-particle method. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 1, p. 54-59, 2010.

SUTHERLAND, I. W. Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 9, p. 663-674, 2001.

TARZIA, A. **Efeito do processamento pós-colheita sobre as frações polissacarídicas dos grãos de café (Coffea Arabica) e suas bebidas**. 2010. 102f (Tese de Doutorado em Ciências). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.

TESSITORE, L.; DAVIT, A.; SAROTTO, I.; CADERNI, G. Resveratrol depresses the growth of colorectal aberrant crypt foci by affecting bax and p21CIP expression. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 8, p. 1619-1622, 2000.

TONG, W.-Q.; WEN, H. Preformulation Aspects of Insoluble Compounds. In: LIU, R. (Ed.). **Water-Insoluble Drug Formulation**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 2008. cap. 4, p.61-90. ISBN 978-0-8493-9644-1.

TORCHILIN, V. P. Drug targeting. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, Supplement 2, n. 0, p. S81-S91, 2000.

TRAN, V.-T.; BENOÎT, J.-P.; VENIER-JULIENNE, M.-C. Why and how to prepare biodegradable, monodispersed, polymeric microparticles in the field of pharmacy? **International Journal of Pharmaceutics**, v. 407, n. 1-2, p. 1-11, 2011.

USP. United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 34–NF 29) **Chapter <711> Dissolution**, 2011.

VANDAMME, T. F.; LENOURRY, A.; CHARRUEAU, C.; CHAUMEIL, J. C. The use of polysaccharides to target drugs to the colon. **Carbohydrate Polymers**, v. 48, n. 3, p. 219-231, 2002.

VASIR, J. K.; TAMBWEKAR, K.; GARG, S. Bioadhesive microspheres as a controlled drug delivery system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 255, n. 1–2, p. 13-32, 2003.

VINCKEN, J.-P.; SCHOLS, H. A.; OOMEN, R. J. F. J.; MCCANN, M. C.; ULVSKOV, P.; VORAGEN, A. G. J.; VISSER, R. G. F. If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. **Plant Physiology**, v. 132, n. 4, p. 1781-1789, 2003.

VRIESMANN, L. C. **Extração, Caracterização e Aspectos Reológicos de Polissacarídeos da Polpa dos Frutos de Theobroma grandiflorum (Cupuaçu)**. 2008. 118f (Dissertação de Mestrado em Bioquímica). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

WALLE, T.; HSIEH, F.; DELEGGE, M. H.; OATIS, J. E.; WALLE, U. K. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 32, n. 12, p. 1377-1382, 2004.

YAPO, B. M. Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins—A new hypothetical model. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 2, p. 373-385, 2011.

YIN, Y.; YANG, Y.; XU, H. Hydrogels for colon-specific drug delivery: Swelling kinetics and mechanism of degradation in vitro. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, v. 39, n. 24, p. 3128-3137, 2001.

ZANIBONI, H. C.; FELL, J. T.; COLLETT, J. H. Production and characterisation of enteric beads. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 125, n. 1, p. 151-155, 1995.

ZERBINI, A. P. N. D. A. **Desenvolvimento e avaliação de minicomprimidos contendo atorvastatina cálcica**. 2010. 104f (Dissertação de Mestrado em Fármacos e Medicamentos). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

ZHANG, H.; ALSARRA, I. A.; NEAU, S. H. An *in vitro* evaluation of a chitosan-containing multiparticulate system for macromolecule delivery to the colon. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 239, n. 1–2, p. 197-205, 2002.

Capítulo III – Microesferas de goma gelana e pectina
Planejamento fatorial completo 2⁴

Resumo

Os planejamentos fatoriais são ferramentas estatísticas extremamente úteis no desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos. Um delineamento adequado dos experimentos permite uma abordagem mais ampla e profunda de muitas variáveis de uma só vez, gerando mais resultados com menos ensaios, em menor tempo e com menor gasto de materiais. Variar diversos fatores simultaneamente e de maneira sistemática, como preconizado nos planejamentos fatoriais, permite conhecer como e quais variáveis influenciam as respostas de interesse. O objetivo do presente estudo foi a aplicação de um planejamento fatorial completo do tipo 2^4 com ponto central a fim de determinar dentre os fatores selecionados (proporção polimérica e concentrações de $AlCl_3$, Glu e fármaco), aqueles que influenciavam significativamente as características das microesferas de GG:P e, assim, selecionar as amostras mais promissoras para promoverem a liberação cólon-específica do RES. As variáveis dependentes escolhidas foram eficiência de encapsulação (EE%), erosão em meio ácido e porcentagem de fármaco liberado após 120 min em HCl 0,1 N pH 1,2. A EE% variou entre 92,6 e 99,1%, e foi influenciada pela interação binária entre os fatores proporção polimérica e concentração de Glu, sendo que a proporção G:P 4:1 associada ao maior nível de Glu levou a menores valores de EE%. A erosão em meio ácido (13,4 - 24,6%) foi influenciada pela proporção G:P, pelas concentrações de $AlCl_3$ e de fármaco e pela interação binária entre as concentrações de $AlCl_3$ e Glu. A porcentagem de fármaco liberado variou entre 15,9 e 29,4%, sendo influenciada pela concentração de fármaco, pela proporção G:P e pela interação entre as concentrações de $AlCl_3$ e de fármaco. As microesferas foram capazes de controlar a liberação do RES por até 30 h, sendo que a amostra M10 exibiu as menores taxas de liberação do fármaco. O mecanismo de liberação do RES a partir dessa amostra seguiu o transporte super caso II, segundo o expoente de liberação para o modelo de Korsmeyer – Peppas. As microesferas foram capazes de reduzir a permeação do RES em comparação com o fármaco livre e a maior permeabilidade para o modelo de co-cultura tripla de células foi evidenciado pelos maiores valores de permeabilidade (%) e de permeabilidade aparente (P_{ap}), indicando uma maior interação biológica com os sistemas mucoadesivos devido à presença do muco nesse modelo. A permeação/retenção do RES a partir das microesferas foi maior para os ensaios realizados com o saco intestinal com muco preservado. Neste trabalho, microesferas duplamente reticuladas de GG:P promissoras para a veiculação do RES para o cólon foram desenvolvidas e otimizadas.

Palavras-chave: planejamento fatorial completo, citotoxicidade, permeabilidade.

Abstract

Factorial designs are statistical tools extremely useful in the development of new drug delivery systems. An appropriate design of experiments allows a broader and deeper approach of many variables at once, producing more results with fewer tests, in less time and with fewer expenses on materials. Varying several factors simultaneously and systematically, as recommended in factorial designs, allows knowing how and which variables influence the responses of interest. The aim of the present work was to perform a full factorial design 24 with a central point in order to determine among the selected factors (polymer ratio and concentrations of AlCl_3 , glutaraldehyde and drug) those that influenced significantly the characteristics of GG:P beads and thus select the most promising samples to promote the colon-specific release of RES. The dependent variables chosen were encapsulation efficiency (EE%), erosion in acid medium and percentage of drug released after 120 min in 0.1N HCl pH 1.2. The EE% varied between 92.6 and 99.1%, and was influenced by the interaction between the factors polymer ratio and Glu concentration, in which the G:P 4:1 ratio associated with the highest level of Glu resulted in lower EE% values. The erosion in acid medium (13.4 – 24.6%) was influenced by G:P ratio, by concentrations of AlCl_3 and drug, and by the interaction between AlCl_3 and Glu concentrations. The percentage of drug released ranged between 15.9 and 29.4%, and it was influenced by drug concentration, G:P ratio and by the interaction between AlCl_3 and drug concentrations. Beads were capable of controlling the RES release for up to 30 h, and sample M10 exhibited the lowest drug release rates. The release mechanism of RES from this sample followed the super case II transport, according to the release exponent from the Korsmeyer – Peppas model. The beads were capable of reducing RES permeability in comparison to free drug and the higher permeability in triple co-culture model was evidenced by higher values of permeability (%) and apparent permeability (P_{ap}), indicating a higher biological interaction with the mucoadhesive systems due to the presence of mucus in this model. RES permeation/retention from beads were higher in the tests performed with the everted gut sac with preserved mucus. In this work, dual-crosslinked beads of GG:P promising to target RES to the colon were prepared and optimized.

Keywords: full factorial design, cytotoxicity, permeability.

Lista de ilustrações

Figura 1: Teor de fármaco real (%) em função da concentração de RES (%) adicionado às formulações (média ± IC).178

Figura 2: Gráfico de Pareto para os efeitos dos fatores avaliados sobre a resposta EE%.....179

Figura 3: Gráficos de superfície de resposta (A) e de contorno (B) para os efeitos da proporção G:P e da concentração de glutaraldeído sobre a EE% (%).180

Figura 4: Gráfico de Pareto para os efeitos dos fatores avaliados sobre a erosão (%) das microesferas.182

Figura 5: Gráficos de superfície de resposta (A) e de contorno (B) para os efeitos da proporção G:P e da concentração de fármaco sobre a erosão das microesferas (%).183

Figura 6: Gráficos de superfície de resposta (A) e de contorno (B) para os efeitos da concentração de AlCl₃ e da concentração de Glu sobre a erosão das microesferas (%).184

Figura 7: Perfis de liberação do RES em meio ácido (HCl 0,1N, pH 1,2 com 1% LSS) a partir das microesferas de GG:P duplamente reticuladas (média ± DP).185

Figura 8: Porcentagem de fármaco liberado após 120 minutos em meio ácido (HCl 0,1N pH 1,2 com 1% LSS) para as diferentes formulações de microesferas.187

Figura 9: Gráfico de Pareto para os efeitos dos fatores avaliados sobre a porcentagem de fármaco liberado em meio ácido em 120 min.189

Figura 10: Gráficos de superfície de resposta (A) e de contorno (B) para os efeitos da proporção G:P e da concentração de fármaco sobre a porcentagem de fármaco liberado em meio ácido.190

Figura 11: Gráficos de superfície de resposta (A) e de contorno (B) para os efeitos da concentração de AlCl₃ e da concentração de fármaco sobre a porcentagem de fármaco liberado em meio ácido.191

Figura 12: Valores calculados *versus* valores experimentais observados para a resposta porcentagem de fármaco liberado em meio ácido.193

Figura 13: Perfis de liberação do RES a partir das microesferas duplamente reticuladas em meios com diferentes valores de pH (pH 1,2 de 0 – 2h e pH 6,8 de 2 – 30h) (média±DP).194

Figura 14: Microesferas intumescidas ao término do ensaio de dissolução A) M10 e B) M17.195

Figura 15: Porcentagem de erosão e absorção de líquido das microesferas M9, M10 e M17 após o ensaio de liberação *in vitro* em pH 1,2 e 6,8.197

Figura 16: Perfis de liberação do RES a partir das amostras M9, M10 e M17 em meio ácido (pH 1,2) (média ± DP).198

Figura 17: Viabilidade celular (%) das linhagens HT29-MTX e Caco-2 após 4 e 24h de incubação na presença de concentrações crescentes de RES livre (média ± DP) e após incubação em HBSS com 0,5% (v/v) de DMSO.201

Figura 18: Viabilidade celular (%) das linhagens HT29-MTX e Caco-2 após 4 e 24h de incubação na presença de concentrações crescentes de microesferas contendo ou não RES (média ± DP).203

Figura 19: Viabilidade celular (%) das linhagens HT29-MTX e Caco-2 após 4 e 24h de incubação na presença de microesferas contendo RES (M10) e de concentrações equivalentes de fármaco livre (média ± DP).	205
Figura 20: Permeabilidade (%) e TEER (%) em função do tempo durante os experimentos de permeabilidade <i>in vitro</i> empregando modelo de monocultura de células Caco-2 para o RES livre e encapsulado em microesferas de GG:P (M10) (média ± DP; n=3).	207
Figura 21: Permeabilidade (%) e TEER (%) em função do tempo durante os experimentos de permeabilidade <i>in vitro</i> empregando modelo de co-cultura tripla de células para o RES livre e encapsulado em microesferas duplamente reticuladas de GG:P (média ± DP; n=3).	209
Figura 22: Permeabilidade (%) e TEER (%) em função do tempo durante os experimentos de permeabilidade <i>in vitro</i> empregando monocultura de células Caco-2 e co-cultura tripla de células para A) RES livre e B) RES encapsulado em microesferas (M10) (média ± DP; n=3).	210
Figura 23: Resultados da permeabilidade aparente (10^{-6} cm/s) do RES em diferentes modelos celulares (média ± DP; n=3).	211
Figura 24: Gráfico da resistência elétrica transepitelial (TEER, Ω .cm ²) em função do tempo de cultura (dias) das monocamadas celulares em <i>inserts</i> (média ± DP).	213
Figura 25: Valores de TEER (Ω .cm ²) em função do tempo de cultivo (dias) da monocamada de células Caco-2.	214
Figura 26: Valores de TEER (Ω .cm ²) em função do tempo de cultivo (dias) da monocamada para o modelo de co-cultura tripla de células.	215
Figura 27: Variação do TEER (Ω .cm ²) em relação ao TEER inicial durante o ensaio de permeabilidade <i>in vitro</i> em A) monocultura de células Caco-2 e B) co-cultura tripla de células (média ± DP; n=3).	216
Figura 28: Porcentagem de RES dentro do saco intestinal invertido (dentro), solúvel no meio (fora), aderido ao tecido intestinal (intestino) e insolúvel dentro das microesferas (microesferas) (média ± DP, n=6).	218
Figura 29: Porcentagem de RES dentro do saco intestinal invertido (dentro), solúvel no meio (fora) e aderido ao tecido intestinal (intestino) considerando apenas o fármaco liberado das microesferas.	220
Figura 30: Concentração de RES (μ g/mL) dentro e fora do saco intestinal invertido após o ensaio de permeação com as microesferas (média ± DP).	221
Figura 31: Porcentagem de RES após o ensaio de permeação intestinal quantificado dentro do saco intestinal invertido (dentro), solúvel no meio (fora) e aderido ao tecido intestinal (intestino) (média ± DP).	222
Figura 32: Concentração de RES (μ g/mL) dentro e fora do saco intestinal invertido após o ensaio de permeação com o fármaco livre (média ± DP).	223
Figura 33: Concentração de RES (μ g/mL) dentro do saco intestinal invertido com e sem muco, após o ensaio de permeação com o fármaco livre e com as microesferas (média ± DP).	224

Lista de tabelas

Tabela 1: Fatores que tiveram seus níveis fixados e os respectivos valores.167

Tabela 2: Fatores avaliados no planejamento fatorial completo 2^4 com ponto central e valores dos níveis -1, 0 e +1.168

Tabela 3: Composição das microesferas e valores dos níveis (+1, 0 e -1) das variáveis selecionadas para o planejamento fatorial 2^4 com ponto central.168

Tabela 4: Valores de teor de fármaco teórico, teor de fármaco real e eficiência de encapsulação (EE%) do RES nas microesferas de GG:P (média \pm DP).177

Tabela 5: Dados da análise de variância (ANOVA) dos efeitos estimados no planejamento fatorial completo 2^4 com ponto central para a resposta eficiência de encapsulação.178

Tabela 6: Valores de erosão (%) das microesferas, após o teste de dissolução em meio ácido por 2 horas (média \pm DP, n=3).181

Tabela 7: Dados da análise de variância (ANOVA) para os efeitos estimados no planejamento fatorial completo 2^4 com ponto central para a resposta erosão.182

Tabela 8: Porcentagem de fármaco liberado em meio ácido (HCl 0,1N pH 1,2 com 1% LSS) após 120 minutos para o planejamento 2^4 com ponto central (média \pm DP; n = 3).186

Tabela 9: Dados da análise de variância (ANOVA) para os efeitos estimados no planejamento fatorial completo 2^4 com ponto central para a resposta porcentagem de fármaco liberado em meio ácido ($r^2=0,902$).188

Tabela 10: Coeficientes de regressão para a resposta porcentagem de fármaco liberado em meio ácido para o planejamento 2^4 com ponto central.192

Tabela 11: Valores de absorção de líquido (%) e erosão (%) das amostras após o ensaio de liberação *in vitro* em pH 1,2 e 6,8 (média \pm DP, n=3).196

Tabela 12: Valores dos coeficientes de determinação ajustado (r^2_{ajustado}) para os diferentes modelos aplicados aos dados de liberação do RES em meio ácido e em meio ácido seguido de tampão fosfato pH 6,8 a partir das microesferas M9, M10 e M17 e dos coeficientes das equações de Korsmeyer–Peppas e Weibull.198

Sumário

1	Introdução.....	155
2	Fundamentação teórica.....	156
2.1	Mecanismos de liberação de fármacos	156
2.1.1	Difusão.....	156
2.1.2	Intumescimento.....	159
2.1.3	Erosão ou reações químicas.....	160
2.1.4	Modelos matemáticos	161
2.1.4.1	Ordem zero.....	161
2.1.4.2	Primeira ordem.....	162
2.1.4.3	Korsmeyer–Peppas.....	162
2.1.4.4	Higuchi	163
2.1.4.5	Weibull.....	163
2.2	Modelos celulares para avaliação da permeabilidade intestinal	164
3	Objetivos	166
4	Metodologias	167
4.1	Planejamento fatorial completo 2^4 com ponto central	167
4.2	Obtenção das microesferas duplamente reticuladas	168
4.3	Teor de fármaco e eficiência de encapsulação (EE%).....	169
4.4	Erosão das microesferas após a liberação <i>in vitro</i> em meio ácido	169
4.5	Determinação do perfil de liberação <i>in vitro</i> do RES.....	169
4.5.1	Determinação do perfil de liberação em meio ácido (pH 1,2).....	169
4.5.2	Determinação do perfil de liberação em pH 1,2 e 6,8	169
4.5.2.1	Avaliação da absorção de líquido e da erosão após a liberação <i>in vitro</i> em pH 1,2 e 6,8	170
4.6	Análise dos mecanismos de liberação do fármaco	170
4.7	Cultura de células	171
4.8	Avaliação <i>in vitro</i> da citotoxicidade em células Caco-2 e HT29-MTX: Teste de viabilidade celular através do ensaio do MTT.....	171
4.9	Avaliação da permeabilidade <i>in vitro</i> em monocultura de células Caco-2 e em co-cultura tripla de células	172
4.9.1	Quantificação de RES permeado por CLAE	173
4.10	Permeabilidade aparente (P_{ap}).....	173
4.11	Resistência Elétrica Transepitelial (TEER)	173

4.12	Avaliação <i>ex vivo</i> da permeabilidade e da retenção intestinal do RES pelo método do saco intestinal invertido	174
4.12.1	Preparo do tampão TC 199	175
4.13	Análise estatística dos resultados	176
5	Resultados e Discussão	176
5.1	Teor de fármaco e eficiência de encapsulação (EE%).....	176
5.2	Erosão das microesferas após a liberação <i>in vitro</i> em meio ácido	181
5.3	Determinação do perfil de liberação <i>in vitro</i> do RES.....	184
5.3.1	Determinação do perfil de liberação em meio ácido (pH 1,2).....	184
5.3.2	Determinação do perfil de liberação em pH 1,2 e 6,8	193
5.3.2.1	Avaliação da absorção de líquido e da erosão após a liberação <i>in vitro</i> em pH 1,2 e 6,8	195
5.4	Análise dos mecanismos de liberação do fármaco	197
5.5	Avaliação <i>in vitro</i> da citotoxicidade em células Caco-2 e HT29-MTX: Teste de viabilidade celular através do ensaio do MTT	201
5.6	Avaliação da permeabilidade <i>in vitro</i> em monocultura de células Caco-2 e em co-cultura tripla de células	206
5.6.1	Permeabilidade em monocultura de células Caco-2.....	206
5.6.2	Permeabilidade em co-cultura tripla de células	208
5.7	Permeabilidade aparente (P_{ap})	211
5.8	Resistência Elétrica Transepitelial (TEER).....	212
5.8.1	Influência do tempo de cultura e do modelo celular nos valores de TEER.....	213
5.8.2	Variação do TEER durante os ensaios de permeabilidade <i>in vitro</i> em monocultura de células Caco-2 e em co-cultura tripla de células	215
5.9	Avaliação <i>ex vivo</i> da permeabilidade e da retenção intestinal do RES pelo método do saco intestinal invertido	217
6	Conclusões.....	224

1 INTRODUÇÃO

Desenvolver um sistema de liberação inovador é uma tarefa de elevada complexidade. Geralmente, os experimentos envolvidos no desenvolvimento de uma formulação farmacêutica são realizados alterando uma variável por vez e verificando seu efeito sobre uma resposta de interesse. Dessa maneira, a obtenção de um sistema com as características ideais desejáveis é bastante complexa, envolve inúmeras tentativas e erros, consome muito tempo e materiais, além de não considerar a interação que pode ocorrer entre as variáveis independentes (AGNIHOTRI e AMINABHAVI, 2006).

Há ainda pesquisadores que acreditam que se mais de uma variável for alterada simultaneamente durante um experimento, não se saberá qual influenciou o resultado e de que maneira isso ocorreu. No entanto, variar todas as variáveis simultaneamente, porém de maneira sistemática, como é feito nos planejamentos fatoriais, permite conhecer como e quais variáveis influenciam as respostas de interesse (NEUMAN, 1993; NETO *et al.*, 2010a) e transforma a pesquisa em uma atividade muito mais dinâmica.

Um delineamento racional dos experimentos permite uma abordagem mais ampla e profunda de muitas variáveis de uma só vez, além de gerar mais resultados com menos ensaios, em menor tempo e com menor gasto de materiais. Ainda, ao comparar os resultados com o erro experimental, pode-se determinar a significância estatística dos efeitos, além de obter informações sobre as interações entre as variáveis (NEUMAN, 1993; NETO *et al.*, 2010a). Assim, é de extrema importância a utilização de ferramentas estatísticas como o planejamento fatorial, que deve ser muito bem delineado para que as inferências obtidas sejam relevantes ao final do processo (GARDINER, 1997; NETO *et al.*, 2010a).

A pesquisa de um novo sistema de liberação geralmente parte de uma situação em que nada ou pouco se conhece a respeito dos seus constituintes e como eles se comportarão frente às diferentes variáveis que influenciam sua obtenção. Neste caso é preciso realizar uma triagem das variáveis, o que pode ser realizado com os planejamentos fatoriais fracionários (NETO *et al.*, 2010b).

Com o aumento do conhecimento sobre o sistema estudado, a finalidade e os planejamentos aplicados mudam. Com os planejamentos completos, pode-se avaliar os efeitos das variáveis mais importantes e as metodologias de superfície de resposta permitem otimizar o sistema e construir modelos mecânicos (NETO *et al.*, 2010a).

Neste trabalho, inicialmente foi realizado um planejamento fatorial fracionário, que permitiu a seleção de quatro fatores a serem usados no planejamento fatorial completo, para o prosseguimento do estudo das variáveis mais influentes nas características das microesferas

duplamente reticuladas e otimização de um sistema mucoadesivo para a liberação colônica de fármacos.

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi a aplicação de um planejamento fatorial completo de quatro fatores (2^4) com ponto central, com a finalidade de obter microesferas otimizadas e capazes de proteger o fármaco da liberação prematura em meio gástrico. As amostras mais promissoras foram selecionadas para o estudo do perfil de liberação *in vitro* do fármaco e para estudos de citotoxicidade e permeabilidade do fármaco utilizando diferentes modelos celulares, além da permeabilidade empregando o saco intestinal invertido.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Mecanismos de liberação de fármacos

Os fármacos incorporados a sistemas matriciais poliméricos hidrofilicos, como as microesferas de GG:P, podem ser liberados após uma série de eventos físicos e químicos, que incluem penetração do meio de eluição, difusão do fármaco por poros ou pela camada geleificada, erosão da matriz polimérica, ou uma combinação desses vários processos, o que torna o fenômeno de liberação um mecanismo complexo (MADERUELO *et al.*, 2011).

Em contato com os fluidos biológicos aquosos, o sistema composto por polímeros hidrofílicos é capaz de absorver líquido. A entrada de água na matriz leva ao intumescimento do sistema, e duas regiões distintas podem ser observadas, a região vítrea (*glassy*), na qual o polímero encontra-se no estado cristalino e a região elástica ou maleável (*rubbery*), na qual o polímero encontra-se no estado geleificado. A frente de intumescimento (camada mais externa em contato direto com o meio de eluição) separa essas duas regiões, de modo que a evolução da liberação do fármaco depende da transição do estado vítreo para o estado maleável (hidratado) (FAN e SINGH 1989b; EVANGELISTA, 2006).

A partir dos ensaios de dissolução é possível determinar a quantidade de fármaco dissolvida no meio de dissolução em função do tempo, ou seja, o perfil de liberação do fármaco, informação de fundamental importância para o delineamento de novos sistemas de liberação de fármacos, uma vez que permite avaliar sua adequação aos requisitos do sistema desenvolvido (COSTA e SOUSA LOBO, 2001).

2.1.1 Difusão

A difusão é o fenômeno responsável pelo movimento de matéria de uma região para outra, devido, principalmente, ao movimento aleatório das moléculas em função do gradiente

de concentração. A difusão em polímeros é complexa e altamente dependente da concentração e do grau de intumescimento do polímero (MASARO e ZHU, 1999; MANADAS *et al.*, 2002).

Na liberação controlada por difusão, o mecanismo controlador e etapa limitante da liberação é a difusão do fármaco através das redes poliméricas que formam o sistema, que pode ser do tipo reservatório ou monolítico. Geralmente um fármaco hidrossolúvel incorporado a uma matriz polimérica tem sua liberação controlada por esse mecanismo (FAN e SINGH 1989b; COSTA e SOUSA LOBO, 2001).

Em sistemas reservatórios, o fármaco está contido dentro de um sistema envolto por uma membrana controladora das taxas de liberação. Já nos sistemas monolíticos, o fármaco encontra-se dissolvido ou disperso através da matriz polimérica (COSTA e SOUSA LOBO, 2001).

As microesferas de GG:P caracterizam-se como sistemas monolíticos, nos quais o resveratrol está disperso na rede polimérica. Nesses sistemas, para que o fármaco seja liberado, ele deve primeiramente ser dissolvido na matriz contínua, para então ser capaz de difundir através da matriz e particionar para o meio onde será liberado e transportado para longe da superfície do sistema (FAN e SINGH 1989b).

O controle da liberação é dependente do gradiente de concentração, sendo que o tipo de polímero e a quantidade de fármaco são variáveis que influenciam no processo.

A difusão pode ser descrita em termos da Primeira Lei de Fick, na qual o fluxo é diretamente proporcional ao gradiente de concentração (Equação 1) (FAN e SINGH 1989b):

$$j_i = -D_i \nabla C_i \quad \text{Equação 1}$$

em que j_i é o fluxo das moléculas de fármaco, C_i é a concentração do fármaco e D_i o coeficiente de difusão do fármaco na matriz polimérica.

Diversos fatores influenciam a liberação difusional do fármaco a partir das microesferas, como os relacionados ao sistema polímero-fármaco, como o coeficiente de partição, a solubilidade e a difusividade, sendo esta última dependente do grau de reticulação da malha, e os fatores relacionados ao delineamento, como o teor de fármaco, a geometria do sistema e o grau de reticulação da malha (FAN e SINGH 1989b; MANADAS *et al.*, 2002).

A difusividade do fármaco no polímero é dependente da mobilidade das cadeias poliméricas, sendo que o aumento do grau de reticulação restringe a liberdade de movimento nos segmentos do polímero, e, conseqüentemente, a difusividade é diminuída (FAN e SINGH 1989b).

A quantidade de fármaco disperso na matriz pode afetar as características da liberação, sendo que o mecanismo depende do teor de fármaco. Para sistemas monolíticos como as

microesferas, a distância média que as moléculas do fármaco devem difundir antes de serem liberadas aumenta com o tempo conforme o fármaco é liberado do sistema. O caminho difusional é menor para as moléculas mais próximas à superfície da matriz, enquanto que o caminho é maior para as moléculas mais ao centro das microesferas, e as taxas de liberação diminuem com o aumento no caminho difusional. O fármaco disperso serve como um reservatório, que se dissolve e fornece mais fármaco difundível em todos os pontos da matriz e desacelera o aumento no caminho difusional, influenciando as taxas de liberação (FAN e SINGH 1989b).

Entretanto, a quantidade de fármaco tem ainda outro efeito complexo no mecanismo de liberação em sistemas monolíticos contendo fármaco disperso. Para quantidades baixas (de 0 a 5% do volume), podem-se obter dispersões monolíticas simples, nas quais o mecanismo de liberação envolve a dissolução do fármaco no polímero contínuo e sua difusão para a superfície.

Para teores entre 5 e 10% do volume do sistema, obtém-se as dispersões monolíticas complexas, nas quais a liberação de fármaco próximo à superfície dá origem a cavidades que são preenchidas com meio de eluição e tornam-se atalhos para o restante do fármaco difundir através deles. Essas cavidades não formam poros contínuos, porém aumentam as taxas de liberação.

Para quantidades de fármaco maiores que 20% do volume, as cavidades originadas são suficientemente numerosas e permitem a formação de canais contínuos pelos quais a liberação pode ocorrer através de um mecanismo de lixiviação (FAN e SINGH 1989b).

Os diferentes comportamentos de difusão podem ser classificados em difusão Fickiana (Caso I) e difusão não-Fickiana (Caso II e Transporte anômalo), baseado nas velocidades de difusão do solvente ($V_{difusão}$) e de relaxamento dos polímeros ($V_{relaxamento}$) (MASARO e ZHU, 1999; EVANGELISTA, 2006).

Quando $V_{difusão} \ll V_{relaxamento}$, o relaxamento do polímero é mais rápido que a penetração do solvente, e por encontrar-se no estado maleável (forma gel), a mobilidade das cadeias é grande, permitindo a fácil difusão do solvente para dentro da rede. Nestes casos, a difusão é considerada do tipo difusão Fickiana ou Caso I (MASARO e ZHU, 1999).

A difusão não Fickiana é observada principalmente em polímeros no estado vítreo (*glassy*) ou aqueles altamente reticulados, em que as cadeias poliméricas, por ainda não estarem suficientemente intumescidas/relaxadas, dificultam a penetração do solvente (MASARO e ZHU, 1999).

A difusão não Fickiana pode ser dividida em Caso II e Transporte anômalo, sendo que a velocidade de difusão do solvente é a principal característica que as define. Quando $V_{difusão} \gg V_{relaxamento}$, a penetração do solvente é mais rápida que o relaxamento das cadeias poliméricas, e

a difusão será do tipo Caso II, pois o relaxamento das cadeias é o passo limitante do processo de difusão. Quando $V_{difusão} \approx V_{relaxamento}$, as velocidades de difusão do solvente e de relaxamento dos polímeros são aproximadamente da mesma magnitude e caracterizando o Transporte anômalo (MASARO e ZHU, 1999).

Existem ainda casos em que ocorre uma aceleração na penetração do solvente, e a $V_{difusão}$ se torna muito maior que a $V_{relaxamento}$, e, nesse caso, a difusão é definida como Super caso II (FAN e SINGH 1989c).

2.1.2 Intumescimento

Na liberação controlada por intumescimento, a mudança na morfologia do polímero que compõe o sistema, devido a interações com o meio de dissolução, controla a liberação do fármaco (FAN e SINGH 1989c).

Para sistemas de liberação controlada por intumescimento, o sistema composto por polímeros hidrofílicos sofre intumescimento devido à entrada de líquido na matriz, que leva a um relaxamento das cadeias, permitindo a liberação do fármaco (ARIFIN *et al.*, 2006). O controle da liberação é dependente da velocidade de entrada do líquido no sistema e consequente relaxamento das cadeias poliméricas.

Com a entrada de líquido e consequente intumescimento da matriz, observa-se um aumento nas dimensões do sistema e uma transição da rede polimérica, do estado vítreo (*glassy*) para o malável (*rubbery*), ou transição vítreo-gel, que origina uma camada geleificada por onde o fármaco pode difundir. Portanto, durante o intumescimento, duas regiões distintas co-existem na matriz, sendo elas o núcleo vítreo e a camada de gel, na qual a difusividade do fármaco aumenta consideravelmente (ARIFIN *et al.*, 2006). O fármaco entra em contato com o meio penetrante, se dissolve e difunde para o exterior devido ao gradiente de concentração (ARIFIN *et al.*, 2006).

Os sistemas formados por polímeros intumescíveis podem ser classificados em dois tipos distintos.

O primeiro tipo compreende os polímeros hidrofílicos que intumescem de forma relativamente contínua ao longo da matriz. A transição vítreo-gel que o polímero sofre com a entrada de líquido afrouxa a matriz e o fármaco difunde para fora do sistema, sendo que a velocidade de liberação neste tipo é determinada pelo processo de difusão (FAN e SINGH 1989c).

O segundo tipo compreende os polímeros que apresentam intumescimento espacial descontínuo, com a existência de uma interface que separa a camada gel do núcleo vítreo, e que

se move para dentro da matriz enquanto a geleificação evolui. A liberação também ocorre por difusão a partir da camada geleificada, no entanto a velocidade de liberação neste tipo é determinada pelo processo de transição vítreo-gel, uma vez que a difusividade do fármaco é governada pelo relaxamento tempo dependente das cadeias poliméricas (FAN e SINGH 1989c).

Com a contínua entrada de líquido no sistema, a matriz pode acabar se dissolvendo após a geleificação, devido ao intumescimento irrestrito do sistema, resultando na sua erosão. A reticulação do sistema cria ligações permanentes que restringem o relaxamento das cadeias e mantém a integridade da matriz (FAN e SINGH 1989c), melhorando o controle das taxas de liberação do fármaco. No entanto, reações químicas, como hidrólise ou degradação por enzimas presentes no meio de dissolução, podem romper as ligações inter e intra-cadeias e o sistema sofre erosão, podendo ser classificado como erodível controlado por intumescimento (FAN e SINGH 1989c; EVANGELISTA, 2006).

2.1.3 Erosão ou reações químicas

Na liberação controlada por erosão, os polímeros sofrem reações no sítio alvo que favorecem a liberação do fármaco. A erosão pode ser física, na qual o sistema se dissolve, ou química, com reações enzimáticas que consomem o polímero. Neste mecanismo, a etapa limitante da liberação é a velocidade de erosão do sistema, sendo que o nível de controle sobre as taxas de liberação pode ser médio a elevado (FAN e SINGH 1989a; EVANGELISTA, 2006).

Os sistemas podem ser divididos em duas classes, segundo a forma de imobilização do fármaco na rede, em sistemas de imobilização física e sistemas de imobilização química. No primeiro tipo, o fármaco encontra-se fisicamente preso à rede e é liberado após a erosão da mesma. No segundo tipo, o fármaco está quimicamente ligado à cadeia do polímero carreador como cadeias pendentes ou faz parte da cadeia (polifármacos), sendo que sua liberação se dá após quebra enzimática ou hidrolítica das ligações (FAN e SINGH 1989a).

As variáveis que influenciam o controle da liberação por esse mecanismo são mais específicas, como, por exemplo, os tipos de ligações químicas e a solubilidade do polímero no meio (EVANGELISTA, 2006).

Este mecanismo é geralmente um dos principais na liberação de fármacos pouco solúveis em água (COSTA e SOUSA LOBO, 2001).

As principais vantagens dos sistemas de liberação por erosão para uso farmacêutico são o desaparecimento sistema do sítio alvo após a administração, sem a necessidade de serem fisicamente removidos, a possibilidade de vetorização para um sítio específico e a redução da toxicidade do fármaco, que é liberado apenas no órgão ou tecido alvo (FAN e SINGH 1989a).

2.1.4 Modelos matemáticos

Diversas teorias ou modelos cinéticos são utilizados para descrever o perfil de dissolução do fármaco a partir de uma forma farmacêutica, seja ela de liberação imediata ou prolongada (DASH *et al.*, 2010).

Equações que descrevem a quantidade de fármaco dissolvido (Q) em função do tempo (t), ou $Q=f(t)$, traduzem matematicamente a curva de dissolução em função de certos parâmetros, os quais se relacionam com a forma farmacêutica e podem ser utilizados para a determinação do mecanismo de liberação do fármaco (COSTA e SOUSA LOBO, 2001).

Recomenda-se a utilização de, no mínimo, cinco pontos da curva, ou seja, cinco tempos de dissolução para análise adequada do melhor modelo que descreve os dados da liberação do fármaco. O ajuste do modelo cinético aos dados deve ser verificado, podendo ser feito através dos maiores valores apresentados para o coeficiente de determinação (r^2), sendo que valores menores que 0,99 são considerados ajustes deficientes (COSTA, 2002).

Também se pode avaliar o melhor ajuste pela comparação do coeficiente de determinação ajustado ($r^2_{ajustado}$), que tem maior significado nos casos em que diferentes modelos com variados números de parâmetros são comparados (COSTA, 2002).

A cinética de liberação do fármaco a partir de uma forma farmacêutica dependerá de diversos fatores relacionados à forma farmacêutica e também ao fármaco encapsulado, como sua forma polimórfica, cristalinidade, tamanho de partícula, solubilidade no meio de dissolução e quantidade incorporada ao sistema de liberação (COSTA e SOUSA LOBO, 2001).

Os modelos mais comumente empregados para determinar o mecanismo de liberação são o de Ordem zero, Primeira ordem, Korsmeyer–Peppas, Higuchi, Hixson–Crowell, Baker–Lonsdale e Weibull.

2.1.4.1 Ordem zero

O modelo de ordem zero geralmente descreve a liberação de fármacos a partir de formas farmacêuticas de liberação controlada que não sofrem desintegração e as taxas de liberação são constantes e lentas, como alguns sistemas transdérmicos, comprimidos matriciais de fármacos poucos solúveis, sistemas osmóticos, dentre outros (MANADAS *et al.*, 2002; DASH *et al.*, 2010); sendo que o gráfico da fração de fármaco liberado em função do tempo origina uma reta, descrita pela Equação 2:

$$Q_t = Q_0 + k_0 t \quad \text{Equação 2}$$

em que Q_t é a concentração de fármaco liberada no tempo t , Q_0 é a concentração inicial de fármaco em solução e k_0 é a constante de liberação de ordem zero. Para esse modelo, assume-se

que a variação da área é desprezível e que condições de equilíbrio não são atingidas (COSTA, 2002; MANADAS *et al.*, 2002)

2.1.4.2 Primeira ordem

Para perfis de dissolução que seguem a cinética de primeira ordem, a quantidade liberada por unidade de tempo é proporcional à quantidade de fármaco restante no sistema, sendo que a quantidade liberada diminui com o tempo (COSTA, 2002).

Este modelo geralmente descreve a liberação de fármacos solúveis encapsulados em matrizes porosas e é descrito pela Equação 3:

$$\log Q_t = \log Q_0 - \frac{kt}{2,303} \quad \text{Equação 3}$$

em que Q_0 é a concentração inicial de fármaco na solução, k é a constante de liberação de primeira ordem e t é o tempo. Para os perfis que seguem esse modelo de liberação, o gráfico do logaritmo decimal da concentração cumulativa de fármaco liberado em função do tempo origina uma reta de coeficiente angular igual a $-k/2,303$ (COSTA, 2002; DASH *et al.*, 2010).

2.1.4.3 Korsmeyer–Peppas

O modelo de Korsmeyer–Peppas é baseado na Lei das Potências e relaciona exponencialmente a liberação do fármaco com o tempo através da seguinte Equação 4:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad \text{Equação 4}$$

em que M_t é a quantidade de fármaco liberado no tempo t ; M_∞ é a quantidade de fármaco liberado no tempo infinito, ou seja, a massa inicial de fármaco; n é o expoente de difusão e k é a constante cinética.

A constante k é dependente de características do sistema e do fármaco, e n é o expoente de liberação, que indica o mecanismo de transporte do fármaco, sendo que esta equação é válida para os primeiros 60% de fármaco liberado ($M_t/M_\infty = 60\%$) (RITGER e PEPPAS, 1987; LOPES *et al.*, 2006).

Dependendo da geometria do sistema, os valores do expoente de liberação (n) corresponderão a um determinado mecanismo de liberação. Para matrizes esféricas, o mecanismo de liberação corresponde à difusão Fickiana quando $n = 0,43$, transporte anômalo para valores de n entre 0,43 e 0,85, ao transporte caso II quando $n = 0,85$ e super caso II para $n > 0,85$ (KAITY *et al.*, 2013). Quando $n=1$, a liberação do fármaco é independente do tempo, independentemente da geometria do sistema (RITGER e PEPPAS, 1987).

Para o mecanismo de liberação que segue a difusão Fickiana ($n=0,43$), a liberação ocorre devido ao gradiente de concentração do fármaco na matriz polimérica e no meio de dissolução, portanto é um fenômeno que não necessita energia. Neste caso, a molécula de fármaco disperso na microesfera deve ser dissolvida antes de atravessar a matriz e ser liberada, sendo que a liberação é governada pela velocidade de difusão do fármaco e do solvente (FAN e SINGH 1989c).

No transporte caso II, a liberação é controlada pelo relaxamento das cadeias poliméricas. No transporte anômalo, as velocidades de relaxamento e difusão são semelhantes, portanto o rearranjo das cadeias ocorre vagarosa e simultaneamente com a difusão do fármaco (FAN e SINGH 1989c). No transporte super caso II, ocorre uma aceleração das taxas de liberação, que pode ser atribuída a um elevado estado de mobilidade das cadeias poliméricas ou mesmo a erosão da matriz (KORSMEYER *et al.*, 1983).

2.1.4.4 Higuchi

O modelo simplificado de Higuchi é descrito pela Equação 5 e tem bastante aplicação para sistemas matriciais poliméricos (COSTA e SOUSA LOBO, 2001).

$$f(t) = K_H \times t^{1/2} \quad \text{Equação 5}$$

em que K_H é a constante de dissolução de Higuchi e t é o tempo.

A dissolução de fármacos a partir de diferentes formas farmacêuticas de liberação modificada pode ser descrita por essa relação, como, por exemplo, alguns sistemas transdérmicos e comprimidos matriciais contendo fármacos hidrossolúveis (COSTA e SOUSA LOBO, 2001).

2.1.4.5 Weibull

O modelo de Weibull geralmente se correlaciona bem com quase todos os perfis de liberação e, para aqueles que seguem esse modelo de liberação, o gráfico do logaritmo decimal da concentração cumulativa de fármaco dissolvido em função do logaritmo decimal do tempo origina uma reta (MANADAS *et al.*, 2002).

A equação de Weibull relaciona a fração cumulativa de fármaco dissolvido com o tempo, conforme a Equação 6:

$$m = 1 - \exp \left[\frac{-(t - T_i)^b}{a} \right] \quad \text{Equação 6}$$

em que m é a fração acumulada de fármaco na solução no tempo t ; T_i é o intervalo de tempo antes do início da dissolução ou liberação (geralmente é zero); a é um parâmetro de escala temporal do processo e b é um parâmetro de forma e caracteriza a curva de liberação em exponencial ($b=1$; caso 1), sigmoide ($b>1$; caso 2) ou parabólica ($b<1$; caso 3) (COSTA e SOUSA LOBO, 2001; MANADAS *et al.*, 2002).

2.2 Modelos celulares para avaliação da permeabilidade intestinal

Diversos modelos celulares têm sido desenvolvidos e utilizados para mimetizar o epitélio intestinal humano para aplicações em diversas áreas. Esses modelos podem ser empregados para avaliar mecanismos de patogênese, invasão e adesão de patógenos à mucosa, além de serem extremamente importantes na avaliação da permeabilidade de fármacos, cuja via de administração pretendida seja a oral (BALIMANE e CHONG, 2005; ALEMKA *et al.*, 2010; GAGNON *et al.*, 2013).

Com base em suas funções, as células que compõem o epitélio intestinal humano podem ser divididas em dois grandes grupos – células absorptivas ou células secretórias. As células absorptivas são denominadas de enterócitos, estão presentes em maior número e têm como função principal a absorção de nutrientes. Quando se trata das células absorptivas do cólon são chamadas de colonócitos. Dentre as células secretórias, as células caliciformes são as mais abundantes, compondo 10 a 15% do epitélio do intestino delgado e até 50% do epitélio colônico, sendo responsáveis por produzir e secretar o muco que recobre toda a superfície intestinal (NOAH *et al.*, 2011).

Além das células absorptivas e secretórias, as células M (micropregueadas) também estão presentes no epitélio intestinal humano. São células especializadas que não possuem microvilosidades, não secretam enzimas ou muco, e estão presentes predominantemente em regiões epiteliais especializadas, como o epitélio associado ao folículo, sobre as placas de Peyer e os folículos linfoides e, ocasionalmente, podem ser encontradas nas vilosidades. Sua principal função é a transferência de patógenos através da barreira epitelial para os órgãos linfoides associados ao intestino, para serem reconhecidos e dar início a uma resposta imune adaptativa (MACH *et al.*, 2005; NOAH *et al.*, 2011; PARHAM, 2011).

As células Caco-2 são células imortalizadas de adenocarcinoma de cólon humano, e o modelo baseado na monocultura destas células é o mais bem estabelecido e caracterizado modelo celular para o estudo da permeabilidade *in vitro* de fármacos, sendo considerado o padrão ouro dos métodos *in vitro* de permeação (HILGENDORF *et al.*, 2000; BALIMANE e CHONG, 2005; ARAÚJO e SARMENTO, 2013; PEREIRA *et al.*, 2015). Quando atingem

certo grau de maturação, apresentam morfologia e funções similares às células absortivas do intestino. Esta linhagem celular apresenta microvilosidades, junções oclusivas que mantêm as células fortemente ligadas entre si e expressam enzimas e transportadores, como a glicoproteína-P, características que tornam a monocamada constituída destas células um modelo que se assemelha às condições encontradas *in vivo* (PEREIRA et al., 2015).

Entretanto, a monocultura de células Caco-2 pode subestimar a permeabilidade real do fármaco, já que na presença dessa única célula ocorre super expressão de glicoproteína-P que aumenta o efluxo de alguns fármacos, os quais são substratos desse transportador, e as junções oclusivas formadas são mais fortes, o que prejudica a rota de transporte paracelular (PEREIRA et al., 2015).

Além disso, por não secretarem muco, não é possível avaliar a influência desse importante constituinte na permeação do fármaco e na interação de sistemas mucoadesivos com a mucosa. A falta de diferentes tipos celulares subestima as interações complexas que existem no epitélio intestinal, de tal modo que o modelo composto apenas por células Caco-2 apresenta algumas desvantagens e não é capaz de mimetizar fielmente as condições encontradas *in vivo* (BALIMANE e CHONG, 2005; ANTUNES et al., 2013; ARAÚJO e SARMENTO, 2013).

As células HT29-MTX são células secretórias produtoras de muco e foram desenvolvidas com o intuito de avaliar a influência do muco no transporte de fármacos através da barreira intestinal, o que não era possível com as monoculturas de células Caco-2. Elas são derivadas das células colônicas HT-29 e, após serem mantidas em meio contendo metotrexato (MTX) durante 6 meses, adquirem a morfologia e a função de produzirem muco como as células caliciformes (LESUFFLEUR et al., 1990; PONTIER et al., 2001).

Células imortalizadas, como as Caco-2 e as HT29-MTX, crescem rapidamente em culturas *in vitro* e apresentam características de células epiteliais diferenciadas após um período de maturação, como a polarização, o que permite seu uso como modelos celulares, semeadas isoladas ou em conjunto, para a avaliação da permeabilidade intestinal de fármacos e também para avaliar o desempenho de sistemas de liberação. Quando cultivadas sobre membranas permeáveis de Transwells[®], de poros suficientemente pequenos para evitar a passagem das células, são capazes de formar uma monocamada que separa dois compartimentos, e podem então ser utilizadas como um modelo *in vitro* da barreira intestinal (PONTIER et al., 2001; BALIMANE e CHONG, 2005).

O epitélio intestinal é impermeável a macromoléculas e microrganismos e sua função de barreira se dá devido à presença de junções oclusivas responsáveis por manter fortemente unidos dois enterócitos adjacentes (KERNÉIS et al., 1997; KIERSZENBAUM e TRES, 2012). No entanto, a presença das células M nas placas de Peyer permite a passagens de antígenos e

microrganismos, o que pode facilitar a passagem de partículas tão pequenas quanto à nanopartículas. Sendo assim, um modelo composto por células absorptivas, secretórias e células M seria o mais semelhante às condições encontradas *in vivo*.

Kernéis e colaboradores reportaram que a formação de células M em culturas *in vitro* de um subclone de enterócitos humanos (células Caco-2) poderia ser regulada pela presença de células imunes. Os autores utilizaram linfócitos obtidos de placas de Peyer de intestino delgado de ratos e demonstraram a capacidade de conversão do fenótipo de células Caco-2 em células com características morfológicas e funções parecidas com as das células M (KERNÉIS *et al.*, 1997; KERNÉIS *et al.*, 2000).

Neste trabalho, a conversão do fenótipo das células Caco-2 em células M foi induzida pela adição de células Raji-B linfócitos no compartimento basolateral dos Transwells[®], de acordo com o modelo proposto e otimizado por Araújo e Sarmiento (2013). A aquisição de fenótipo de célula M é induzida pela presença de mediadores solúveis produzidos pelas células Raji-B, uma linhagem de célula linfoide humana originária de um linfoma de Burkitt (ARAÚJO e SARMENTO, 2013).

A co-cultura celular, em que diferentes linhagens são cultivadas em conjunto, possibilita a reprodução mais fiel do ambiente alvo de estudo, como é o caso da co-cultura tripla constituída de células Caco-2 de carcinoma colônico humano para reproduzir as características dos enterócitos, células HT-29MTX capazes de secretarem muco e células Raji-B linfócitos, as quais induzem a diferenciação do fenótipo das células Caco-2 em células M, de forma a mimetizar precisamente o epitélio intestinal humano recoberto por muco (ARAÚJO e SARMENTO, 2013).

O modelo de co-cultura tripla utilizado neste trabalho foi recentemente estabelecido e otimizado pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Bruno Sarmiento, do Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, da Universidade do Porto (Portugal), como um modelo que se assemelha mais à arquitetura e aos constituintes da mucosa intestinal, portanto muito mais semelhante às condições encontradas *in vivo*, sendo um avanço para o estudo de permeabilidade de fármacos, principalmente, por permitir a avaliação da influência do muco e da presença de células com fenótipo de células M, fundamental quando se trabalha com sistemas mucoadesivos e nanoestruturados.

3 OBJETIVOS

Aplicar um planejamento fatorial completo do tipo 2^4 com ponto central a fim de determinar as variáveis que influenciam significativamente as características das microesferas e

otimizar o sistema de liberação. Selecionar as amostras mais promissoras para promoverem a liberação cólon-específica do resveratrol e avaliar a citotoxicidade *in vitro* e a permeabilidade *in vitro* e *ex vivo* empregando modelos celulares e do saco intestinal invertido, respectivamente.

4 METODOLOGIAS

4.1 Planejamento fatorial completo 2^4 com ponto central

Após o estudo preliminar através do planejamento fatorial saturado 2^{7-4} , foram selecionadas as quatro variáveis que apresentaram efeitos mais significativos sobre as respostas estudadas e realizou-se um planejamento fatorial completo 2^4 com ponto central. Os três fatores que apresentaram efeitos menos significativos no planejamento fatorial saturado 2^{7-4} tiveram seus valores fixados no nível mais baixo (-1). O planejamento foi delineado e analisado utilizando o *software* Statistica 7[®] (StatSoft Inc.).

Fatores fixos

Os fatores que tiveram seus níveis fixados foram: tempo de reticulação em $AlCl_3$, tempo de reticulação em glutaraldeído e concentração de polímeros. Os valores escolhidos para cada fator estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Fatores que tiveram seus níveis fixados e os respectivos valores.

Fatores	Valor
Tempo em $AlCl_3$	45 min
Tempo em glutaraldeído	15 min
Concentração de polímeros	2 %

Fatores e níveis selecionados – variáveis independentes

A seleção dos fatores proporção polimérica (G:P), concentração de $AlCl_3$, concentração de glutaraldeído e concentração de fármaco, baseou-se nos resultados apresentados no Capítulo II. Os fatores escolhidos para o planejamento fatorial completo e os valores de cada nível, em que -1, 0 e +1 são os códigos para o nível baixo, ponto central e nível alto, respectivamente, estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Fatores avaliados no planejamento fatorial completo 2^4 com ponto central e valores dos níveis -1, 0 e +1.

Fatores	Nível baixo (-1)	Ponto central (0)	Nível alto (+1)
(1) Proporção G:P	1:1	2:1	4:1
(2) AlCl ₃ (%)	3,0	4,0	5,0
(3) Glu (%)	0,5	0,75	1,0
(4) Fármaco (%)	0,25	0,375	0,5

No total, 17 diferentes formulações de microesferas foram preparadas variando os quatro fatores escolhidos. O ponto central foi realizado em duplicata.

A matriz de planejamento para este estudo esta apresentada na Tabela 3:

Tabela 3: Composição das microesferas e valores dos níveis (+1, 0 e -1) das variáveis selecionadas para o planejamento fatorial 2^4 com ponto central.

Microesfera	Proporção G:P	AlCl ₃ (%)	Glu (%)	RES (%)
M1	11 (-1)	3 (-1)	0,5 (-1)	0,25 (-1)
M2	41 (+1)	3 (-1)	0,5 (-1)	0,25 (-1)
M3	11 (-1)	5 (+1)	0,5 (-1)	0,25 (-1)
M4	41 (+1)	5 (+1)	0,5 (-1)	0,25 (-1)
M5	11(-1)	3 (-1)	1 (+1)	0,25 (-1)
M6	41 (+1)	3 (-1)	1 (+1)	0,25 (-1)
M7	11(-1)	5 (+1)	1 (+1)	0,25 (-1)
M8	41 (+1)	5 (+1)	1 (+1)	0,25 (-1)
M9	11 (-1)	3 (-1)	0,5 (-1)	0,5 (+1)
M10	41 (+1)	3 (-1)	0,5 (-1)	0,5 (+1)
M11	11 (-1)	5 (+1)	0,5 (-1)	0,5 (+1)
M12	41 (+1)	5 (+1)	0,5 (-1)	0,5 (+1)
M13	11(-1)	3 (-1)	1 (+1)	0,5 (+1)
M14	41 (+1)	3 (-1)	1 (+1)	0,5 (+1)
M15	11(-1)	5 (+1)	1 (+1)	0,5 (+1)
M16	41 (+1)	5 (+1)	1 (+1)	0,5 (+1)
M17	21 (0)	4 (0)	0,75 (0)	0,375 (0)

Variáveis de resposta selecionadas – variáveis dependentes

Foram escolhidas como variáveis de resposta a eficiência de encapsulação, a erosão e a porcentagem de fármaco liberado em meio ácido (pH 1,2).

4.2 Obtenção das microesferas duplamente reticuladas

As 17 formulações foram obtidas conforme descrito no item 4.2 do Capítulo II, e foram preparadas em ordem aleatória, conforme preconizado para os experimentos de um planejamento fatorial, a fim de que os efeitos relativos a fatores externos não controlados afetassem as respostas aleatoriamente (ARMSTRONG, 2006; SCHWAAB e PINTO, 2011).

4.3 Teor de fármaco e eficiência de encapsulação (EE%)

As análises de teor de fármaco e eficiência de encapsulação foram realizadas conforme descrito no item 4.5 do Capítulo II.

4.4 Erosão das microesferas após a liberação *in vitro* em meio ácido

As microesferas submetidas ao teste de dissolução *in vitro* em meio ácido por 2 horas (HCl 0,1 N pH 1,2 com 1% de LSS) foram recolhidas ao final do ensaio, secas até peso constante e pesadas para avaliar a erosão sofrida durante o ensaio. A porcentagem de erosão sofrida pelas microesferas foi calculada a partir da seguinte Equação 7:

$$\%erosão = \frac{m_0 - m_f}{m_0} \times 100 \quad \text{Equação 7}$$

em que m_0 é a massa inicial (g) de microesferas utilizada no ensaio e m_f é a massa final (g) de microesferas recolhidas ao término do ensaio de liberação em meio ácido. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.5 Determinação do perfil de liberação *in vitro* do RES

4.5.1 Determinação do perfil de liberação em meio ácido (pH 1,2)

A fim de selecionar as microesferas que mais protegem o fármaco da liberação prematura no estômago, realizou-se o teste de liberação *in vitro* por 2h em meio ácido, conforme preconizado pela Farmacopeia Americana (USP, 2011). Os ensaios foram realizados conforme descrito no item 4.10 do Capítulo II.

4.5.2 Determinação do perfil de liberação em pH 1,2 e 6,8

O teste de dissolução para determinar os perfis de liberação *in vitro* do resveratrol livre e a partir das microesferas selecionadas (M9, M10 e M17) foi realizado em meios com diferentes valores de pH, simulando a variação que ocorre ao longo do TGI.

Inicialmente o ensaio foi realizado em meio ácido (HCl 0,1N, pH 1,2 contendo 1%LSS) por 2 horas. Em seguida, foi conduzida a etapa do ensaio em tampão pH 6,8, através da adição de Na₃PO₄ 0,2M, conforme preconizado pela Farmacopeia americana (USP, 2011). O ensaio foi realizado com 5 mg de fármaco livre e com massa de microesferas correspondente a 5 mg de fármaco. Utilizou-se o aparato 1 (cesto), sob velocidade de agitação de 50 rpm e temperatura de

37 ± 0,4 °C. As alíquotas foram retiradas em intervalos de tempo pré-estabelecidos, sendo feita a reposição imediata do mesmo volume de meio à mesma temperatura. A quantificação do fármaco liberado foi realizada por espectrofotometria UV-Visível, no comprimento de onda de máxima absorção (320 nm), segundo metodologia validada. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.5.2.1 Avaliação da absorção de líquido e da erosão após a liberação *in vitro* em pH 1,2 e 6,8

O comportamento de absorção de líquido e erosão das amostras ao final do ensaio de liberação *in vitro* em pH 1,2 e 6,8 foi determinado gravimetricamente. As microesferas dentro dos cestos do aparato tiveram o excesso de líquido removido cuidadosamente com papel absorvente e foram precisamente pesadas, secas até peso constante e pesadas novamente. A porcentagem de líquido absorvido foi calculada a partir da Equação 8 (BANERJEE *et al.*, 2012):

$$\% \text{ líquido absorvido} = \frac{(m_{int} - m_{fs})}{m_{fs}} \times 100 \quad \text{Equação 8}$$

em que m_{int} = massa das microesferas intumescidas e m_{fs} = massa final das microesferas secas.

A erosão que as partículas sofreram ao final do ensaio foi obtida a partir da Equação 9:

$$\% \text{ erosão} = \frac{(m_{im} - m_{fs})}{m_{ips}} \times 100 \quad \text{Equação 9}$$

em que m_{im} = massa inicial das microesferas usadas na dissolução e m_{fs} = massa final das microesferas secas. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.6 Análise dos mecanismos de liberação do fármaco

O mecanismo que rege a liberação do fármaco a partir das microesferas foi avaliado através da aplicação de modelos matemáticos aos dados de dissolução. Os modelos matemáticos empregados foram Ordem zero, Primeira-Ordem, Korsmeyer–Peppas, Higuchi, Hixson–Crowell, Baker–Lonsdale e Weibull. Para a análise, utilizou-se o software Sigma Plot 10.0 e avaliou-se o modelo que melhor se correlaciona aos dados através dos maiores valores apresentados para o coeficiente de determinação ajustado ($r^2_{ajustado}$).

4.7 Cultura de células

Células de linhagem de adenocarcinoma de cólon humano Caco-2 (C2BBel, passagens 54 a 60) obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC, Estados Unidos), células HT29-MTX (passagens 35 a 39), gentilmente cedidas pelo Dr. T. Lesuffleur (INSERMU178, Villejuif, França) e células Raji-B linfócitos foram cultivadas separadamente em garrafas de 75 cm², segundo as condições padrão de cultura de células em meio DMEM suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino, 1% (v/v) de aminoácidos não essenciais e 1% (v/v) de complexo penicilina (100 UI/mL) – estreptomicina (100 µg/mL) em incubadora com atmosfera umedecida à 37° C, com 5% de CO₂ e 95% de O₂. As culturas estoques das células aderentes Caco-2 e HT29-MTX foram cultivadas em monocamadas e passadas para novas garrafas ao atingirem uma densidade subconflente de 70 – 80%, utilizando tripsina/EDTA. As células Raji-B, que crescem em suspensão, tiveram seu meio trocado sempre que necessário.

4.8 Avaliação *in vitro* da citotoxicidade em células Caco-2 e HT29-MTX: Teste de viabilidade celular através do ensaio do MTT

A cultura das células Caco-2 e HT29-MTX foi realizada conforme descrito no item 4.2.2.1 do Capítulo I e a viabilidade celular foi avaliada através do teste de redução do MTT, conforme descrito no item 4.2.2.2 do referido capítulo.

A citotoxicidade das microesferas duplamente reticuladas (M10), contendo ou não RES encapsulado, foi avaliada em placas de 24 poços, com área de 1,9 cm²/poço, contendo 1 mL de HBSS. Concentrações crescentes de microesferas foram adicionadas aos poços (2, 4, 6, 8 e 10 microesferas/poço). Os ensaios foram realizados em quadruplicata.

O RES livre também foi avaliado em placas de 24 poços, em concentrações correspondentes à quantidade de fármaco encapsulado nas microesferas (100, 250, 350, 450 e 600 µg/mL). Para isso, foi preparada uma solução estoque de RES a 1000 µg/mL em HBSS contendo 1% (v/v) de DMSO, de modo que a concentração final do solvente orgânico nas células não ultrapassasse 0,5%. O fármaco foi dissolvido em DMSO e HBSS foi adicionado sob agitação magnética, sendo imediatamente realizadas as diluições. As células também foram incubadas com HBSS contendo 0,5% (v/v) de DMSO a fim de avaliar a citotoxicidade do solvente orgânico. Os ensaios também foram realizados em quadruplicata.

4.9 Avaliação da permeabilidade *in vitro* em monocultura de células Caco-2 e em co-cultura tripla de células

Os testes de permeabilidade *in vitro* foram realizados em dois diferentes modelos celulares: 1) monocultura de células Caco-2 e 2) co-cultura tripla de células, composta de células Caco-2, HT29-MTX e Raji-B linfócitos.

Para a monocultura, células C2BBE1 (Caco-2) (passagens 64 – 66) foram semeadas em *inserts* Transwell® (Corning Life Sciences), com membrana permeável e translúcida de policarbonato, poros de 3,0 µm, área de crescimento de 4,67 cm² e 24 mm de diâmetro, a uma densidade de 1,0 x 10⁵ células/cm² e volume final de 1,5 mL (volume do compartimento apical). Os *inserts* foram colocados em placas de 6 poços e 2,5 mL de DMEM suplementado foram adicionados ao compartimento basolateral. As placas contendo os *inserts* foram mantidas em incubadora (Binder®) à 37° C com atmosfera umedecida e 5% de CO₂, com troca do meio de cultura em ambos os compartimentos a cada 2 dias.

As placas foram utilizadas com tempo de cultivo entre 21 e 28 dias, quando as células Caco-2 apresentam sua máxima diferenciação (DÉAT-LAINÉ *et al.*, 2013).

Para o modelo de co-cultura tripla, células C2BBE1 (passagens 64 – 66) e HT29-MTX (passagens 38 – 40) na proporção 90:10 (Caco-2:HT29-MTX) foram semeadas sobre os *inserts* Transwell® a uma densidade de 1,0 x 10⁵ células/cm² e incubadas como descrito anteriormente (ANTUNES *et al.*, 2013; ARAÚJO e SARMENTO, 2013). Após 14 dias, adicionou-se 1,0 x 10⁶ células Raji-B ao compartimento basolateral, do qual não se trocou mais o meio de cultura até a realização do teste de permeabilidade, após o 21° dia.

Para a realização do ensaio de permeação, o meio de cultura foi removido dos compartimentos apical e basolateral, os quais foram cuidadosamente lavados duas vezes com 1 mL de tampão PBS (pH 7,4, 37°C) e preenchidos com tampão HBSS pH 7,4 à 37°C (1,5 e 2,5 mL na parte apical e basolateral, respectivamente). As placas permaneceram dentro da incubadora por mais 30 min, a fim de equilibrar as células com o novo meio, e a integridade das monocamadas celulares foi avaliada através da Resistência Elétrica Transepitelial ou TEER (*Trans Epithelial Electrical Resistance*) utilizando um voltímetro epitelial EVOM²®.

O meio do compartimento apical foi removido imediatamente antes de iniciar o ensaio de permeação e 1,5 mL de RES livre (50 µg/mL) em HBSS foi adicionado ao compartimento apical. As microesferas (M10; 20 microesferas/poço) foram adicionadas diretamente ao meio, sem a necessidade de removê-lo previamente.

As placas foram colocadas em uma incubadora com agitação orbital (IKA® KS 4000 IC) a 100 rpm e 37°C. Alíquotas de 200 µL foram retiradas do compartimento basolateral em tempos pré-determinados (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 h) e o mesmo volume de meio foi repostado

(tampão HBSS, pH 7,4 à 37°C). A quantidade de fármaco que permeia a monocamada de células foi quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.9.1 Quantificação de RES permeado por CLAE

A quantificação do fármaco permeado através das monocamadas celulares foi realizada empregando CLAE. A fase estacionária foi composta de uma coluna cromatográfica Waters Symmetry Shield RP18 (3,5 µm, 100-4,6 mm) à 30°C. A fase móvel foi composta de água purificada:acetonitrila (grau HPLC) na proporção 65:35 (v/v) em modo isocrático com fluxo de 1 mL/min e tempo de corrida de 10 min. O volume de injeção foi de 50 µL. A detecção foi feita por UV em 307 nm.

4.10 Permeabilidade aparente (P_{ap})

A permeabilidade aparente (P_{ap}) do fármaco foi calculada a partir da Equação 11:

$$P_{ap} = \frac{dQ/dt \times V}{A \times C_0} \quad \text{Equação 10}$$

em que P_{ap} é a permeabilidade aparente (cm/s), dQ/dt (µM/s) é o fluxo através da monocamada, obtido através do coeficiente angular da curva de quantidade permeada de fármaco em função do tempo; V (cm³) é o volume do compartimento receptor, neste caso corresponde à 2,6 cm³ da câmara basolateral; A (cm²) é a área de superfície de crescimento do *insert* (4,67 cm²) e C_0 (µM) é a concentração inicial no compartimento apical (HILGENDORF *et al.*, 2000; BEHRENS *et al.*, 2001).

4.11 Resistência Elétrica Transepitelial (TEER)

Durante o cultivo das células nos *inserts*, avaliou-se a influência do tempo de cultura e do modelo celular nos valores de TEER das monocamadas. Para isso, o TEER foi medido imediatamente antes das trocas de meio de cultura, utilizando um voltímetro epitelial EVOM^{2®} (World Precision Instruments).

O TEER também foi medido antes, durante e após os experimentos de permeabilidade, a fim de avaliar a integridade das monocamadas celulares. Mediu-se o TEER inicial antes da adição das amostras ao compartimento apical e imediatamente antes de cada coleta. Ao final dos experimentos, os compartimentos apical e basolateral foram cuidadosamente lavados duas

vezes com PBS (pH 7,4) a 37°C, e adicionou-se 1,5 mL (no apical) e 2,5 mL (no basolateral) de tampão HBSS (pH 7,4) a 37°C, e após 30 min mediu-se o TEER final.

O TEER de um *insert* contendo apenas DMEM ou HBSS foi utilizado como branco e os valores de TEER ($\Omega \cdot \text{cm}^2$) foram calculados de acordo com a Equação 10:

$$TEER = (TEER_{insert} - TEER_{branco}) \times \text{Área}_{insert} \quad \text{Equação 11}$$

em que $TEER_{insert}$ (Ω) é o valor absoluto medido para cada *insert*, $TEER_{branco}$ (Ω) é o valor do branco e Área_{insert} (cm^2) é a área de crescimento da monocamada, neste caso é igual a $4,67 \text{ cm}^2$.

4.12 Avaliação *ex vivo* da permeabilidade e da retenção intestinal do RES pelo método do saco intestinal invertido

O método do saco intestinal invertido foi utilizado para avaliar a permeabilidade e a retenção do resveratrol no epitélio intestinal (CHAUD *et al.*, 2010; PEDREIRO, 2015).

Ratos *Wistar* adultos ($270 \pm 20\text{g}$) foram anestesiados para a remoção dos segmentos intestinais após um período de jejum de 12h. Os animais foram pesados imediatamente antes da intervenção cirúrgica e sedados com halotano por inalação. A anestesia geral foi induzida utilizando tiopental sódico (Thiopental[®] a 20 mg/mL, Cristália), por via intraperitoneal na dose de 50 mg/kg.

O intestino delgado foi dissecado, lavado cuidadosamente com solução TC 199 sem glicose (10°C), uma das extremidades foi fechada com fio de sutura e imediatamente invertido com auxílio de uma haste flexível (extremidade arredondada e protegida por um fino tecido de seda) a fim de expor a mucosa. O segmento retirado foi cuidadosamente preenchido com solução TC 199 sem glicose e a outra extremidade foi fechada com fio de sutura, originando o saco intestinal invertido de aproximadamente 6 cm de comprimento. As microesferas (massa equivalente a 10mg de resveratrol) ou o fármaco livre (15 ug/mL) foram adicionados ao meio de incubação contendo solução TC 199 a 37°C e oxigenado (95% O₂:5% CO₂). O saco intestinal invertido foi imediatamente transferido para o meio de incubação, onde permaneceu por 90 minutos, sob oxigenação utilizando bomba de oxigênio. Após esse período, o segmento foi cuidadosamente retirado do meio, lavado com solução TC 199 e uma das extremidades foi aberta a fim de coletar e filtrar (membrana de 0,45 μm) a solução contida no interior do saco intestinal invertido. Os ensaios foram realizados com seis replicatas para cada amostra.

Para avaliação da influência do muco na permeação e na retenção no epitélio, foram realizados ensaios com saco intestinal invertido sem muco. Para remoção do muco, os sacos intestinais invertidos foram incubados em 25 mL de solução contendo agente mucolítico (N-acetilcisteína, 1mg/mL) durante 5 minutos. Os segmentos foram lavados com solução TC199 e

imediatamente incubados com as amostras. Os ensaios foram realizados com seis replicatas para cada amostra.

A quantidade de resveratrol que permeou a membrana foi determinada por CLAE com detecção por fluorescência ($\lambda_{\text{excitação}}= 300\text{nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}}= 390\text{nm}$), a partir das soluções do interior de cada segmento. Para a avaliação da retenção do resveratrol no epitélio intestinal, após a retirada do conteúdo, os segmentos intestinais permaneceram incubados por 24 h em acetonitrila (5 mL), sob agitação em agitador orbital, ao abrigo da luz, para extração do fármaco, que foi quantificado por CLAE com detecção por detector de arranjo de diodos (DAD) em comprimento de onda de 306 nm.

A quantidade de fármaco solúvel no meio de incubação e a quantidade restante no interior das microesferas, que não foi liberada, foram quantificadas por CLAE-DAD (306 nm), a fim de determinar a porcentagem de resveratrol em cada compartimento.

Para extração do fármaco insolúvel do interior das partículas, as microesferas e o restante do tampão TC 199 do teste de permeação foram transferidos para um tubo falcon e mantidos sob agitação em agitador orbital durante 24 h ao abrigo da luz, a fim de permitir o completo intumescimento das microesferas. Após, foram submetidas à agitação em ultraturrax (IKA[®]) por 10 minutos a 11.000 rpm para romper as estruturas. O conteúdo foi centrifugado a 3.000 rpm durante 5 minutos, o sobrenadante foi separado e mantido ao abrigo da luz. Ao material polimérico precipitado, adicionou-se 5 ml de acetonitrila a fim de solubilizar o fármaco. Após 60 minutos, o conjunto foi centrifugado (3.000 rpm, 5 min) e o sobrenadante (acetonitrila) foi adicionado ao sobrenadante previamente separado. Após agitação em vortex por 1 min, o fármaco solúvel foi quantificado por CLAE-DAD (306 nm).

Os estudos foram realizados após a aprovação do protocolo pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP/Araraquara, parecer n° 87/2015.

4.12.1 Preparo do tampão TC 199

A solução tampão TC 199 (*Tissue culture medium*) utilizada no ensaio do saco intestinal invertido foi composta de NaCl 145 mM, KCl 4,56 mM, CaCl₂ 1,25 mM, NaHPO₄ 5 mM, glicose 10 mM e água purificada, e teve o pH ajustado para 7,4. Também foi preparada solução tampão TC 199 sem adição da glicose.

4.13 Análise estatística dos resultados

Os dados foram tratados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA), seguida por comparações múltiplas pelo método de Tukey e adotou-se nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A aplicação de um ou mais planejamentos fatoriais em sequência durante o desenvolvimento de uma nova forma farmacêutica permite obter muitas informações sobre o comportamento do sistema de liberação frente aos fatores escolhidos e variados em diferentes níveis. Com os diferentes tipos de planejamento, pode-se realizar desde uma triagem das variáveis mais significativas, até a otimização do sistema com a construção de modelos que expliquem seu comportamento (NETO *et al.*, 2010a).

Neste trabalho, através do planejamento fatorial fracionário do tipo saturado 2^{7-4} (Capítulo II), foi possível avaliar os fatores ou variáveis independentes que apresentaram maior e menor influência sobre as propriedades das microesferas, com um número reduzido de experimentos, e a seleção de variáveis para a continuidade dos estudos. O planejamento completo 2^4 , realizado na sequência, permitiu avaliar os efeitos dos fatores selecionados sobre respostas como teor de fármaco, erosão e a liberação do fármaco em meio ácido (pH 1,2).

5.1 Teor de fármaco e eficiência de encapsulação (EE%)

Os resultados de teor de fármaco e EE% estão apresentados na Tabela 4. Também são apresentados os valores de teor de fármaco esperado para cada microesfera (teórico), que foi calculado baseado na composição de cada uma, segundo o planejamento dos experimentos (Tabela 3).

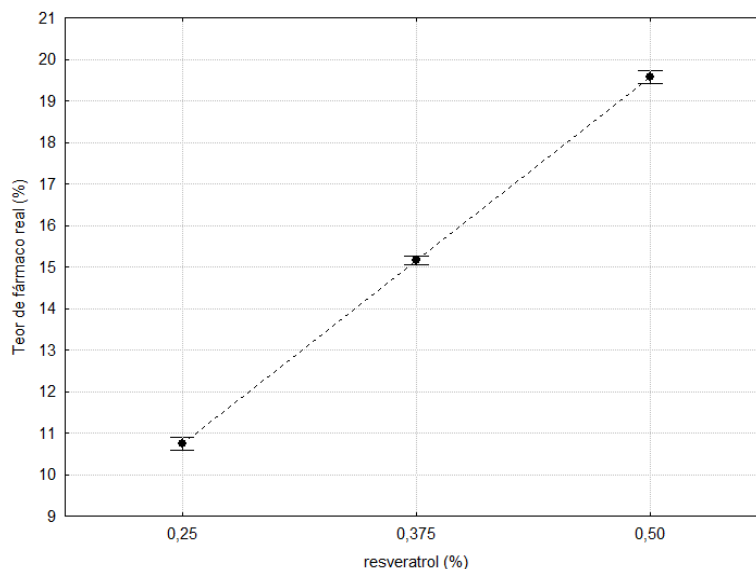
Tabela 4: Valores de teor de fármaco teórico, teor de fármaco real e eficiência de encapsulação (EE%) do RES nas microesferas de GG:P (média \pm DP).

Amostra	Teor de fármaco teórico (%)	Teor de fármaco real (%)	EE (%)
M1	11,11	10,90 \pm 0,09	98,08 \pm 0,82
M2	11,11	10,95 \pm 0,18	98,58 \pm 1,61
M3	11,11	11,02 \pm 0,26	98,63 \pm 1,66
M4	11,11	10,91 \pm 0,11	98,23 \pm 1,01
M5	11,11	10,96 \pm 0,14	98,61 \pm 1,26
M6	11,11	10,29 \pm 0,25	92,62 \pm 2,27
M7	11,11	10,99 \pm 0,10	98,91 \pm 0,89
M8	11,11	10,64 \pm 0,13	95,76 \pm 1,15
M9	20,00	19,48 \pm 0,17	97,40 \pm 0,85
M10	20,00	19,65 \pm 0,27	98,26 \pm 1,33
M11	20,00	19,68 \pm 0,03	98,40 \pm 0,16
M12	20,00	19,61 \pm 0,39	98,06 \pm 1,94
M13	20,00	19,82 \pm 0,18	99,08 \pm 0,90
M14	20,00	19,53 \pm 0,60	97,63 \pm 3,01
M15	20,00	19,53 \pm 0,44	97,65 \pm 2,21
M16	20,00	18,71 \pm 0,25	93,55 \pm 1,24
M17	15,79	15,13 \pm 0,33	95,85 \pm 2,12

A EE% das microesferas foi bastante elevada, variando entre 92,62 e 99,08% (Tabela 4).

Pode-se concluir que o teor de fármaco nas microesferas aumentou linearmente com o aumento da concentração de fármaco nas formulações ($r^2 = 1,0$), como é possível observar no gráfico do teor de fármaco real (%) em função da concentração de RES (%) (Figura 1), mostrando que não houve saturação das partículas, as quais apresentaram elevada capacidade de encapsular o fármaco em suas estruturas.

Figura 1: Teor de fármaco real (%) em função da concentração de RES (%) adicionado às formulações (média ± IC).



No planejamento completo com ponto central, mesmo que as microesferas não sejam obtidas em replicatas, é possível estimar os erros e verificar a significância estatística dos efeitos utilizando os efeitos de altas ordens, como as interações entre 3 e 4 fatores, já que podem ser consideradas não significativas para o modelo estatístico, e também a partir da inclusão de experimentos no ponto central, que neste estudo foi realizado em duplicata (TEÓFILO e FERREIRA, 2006).

A análise de variância mostrou que nenhum dos fatores apresentou efeito principal estatisticamente significativo sobre a eficiência de encapsulação ($p > 0,05$) e que somente a interação entre os fatores (1) Proporção G:P e (3) Glu (%) foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) (Tabela 5).

Tabela 5: Dados da análise de variância (ANOVA) dos efeitos estimados no planejamento fatorial completo 2^4 com ponto central para a resposta eficiência de encapsulação.

Efeitos	Soma quadrática	Grau de liberdade	Média quadrática	Teste f	Nível de significância (p)
(1) Proporção G:P	12,400	1	12,400	4,802	0,065
(2) $AlCl_3$ (%)	0,072	1	0,072	0,028	0,872
(3) Glu (%)	8,754	1	8,754	3,390	0,108
(4) Fármaco (%)	0,023	1	0,023	0,009	0,927
(1)x(2)	0,227	1	0,227	0,088	0,776
(1)x(3)*	14,664	1	14,664	5,679	0,049*
(1)x(4)	0,988	1	0,988	0,383	0,556
(2)x(3)	0,589	1	0,589	0,228	0,648
(2)x(4)	4,357	1	4,357	1,687	0,235
(3)x(4)	0,725	1	0,725	0,281	0,613
Erros	18,074	7	2,582		
Total	60,872	17			

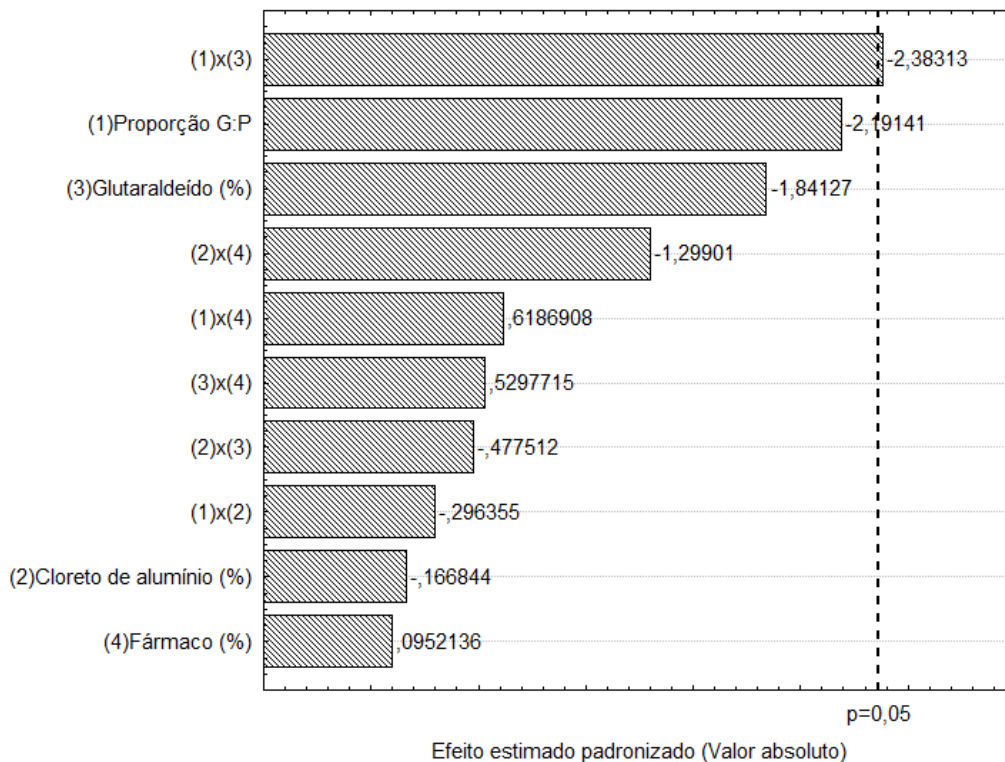
*efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$)

A Figura 2 apresenta o gráfico de Pareto com os valores dos efeitos principais e com os efeitos de interação binária dos fatores selecionados sobre a eficiência de encapsulação das microesferas.

Como foi possível estimar os erros e verificar a significância estatística dos efeitos, o gráfico de Pareto apresentado na Figura 2 apresenta uma linha tracejada que assinala $p=0,05$ e indica efeitos estatisticamente significantes. As barras horizontais que ultrapassam esta linha correspondem aos efeitos estatisticamente significativos e é possível observar em ordem decrescente os efeitos mais decisivos sobre a eficiência de encapsulação.

No gráfico da Figura 2 observa-se que nenhum efeito principal foi significativo sobre a eficiência de encapsulação ($p>0,05$) e somente a interação entre os fatores proporção polimérica e concentração de Glu (1 x 3) ultrapassou a linha de significância estatística ($p<0,05$).

Figura 2: Gráfico de Pareto para os efeitos dos fatores avaliados sobre a resposta EE%.



* Os efeitos principais estão indicados por número e nome dos fatores e os efeitos de interação pelos números correspondentes aos dois fatores da interação.

** As interações entre 3 e 4 fatores não foram consideradas significantes para o modelo estatístico, portanto não são apresentadas no gráfico

O efeito de interação (1)x(3) foi negativo (-2,38), sendo que a proporção G:P 4:1 associada ao maior nível de Glu levou a menores valores de EE%.

O aumento da concentração de GG contribui para a formação de uma rede mais densa e empacotada, bem como para a formação de uma estrutura mais organizada, pois quando esse polissacarídeo geleifica, apresenta suas cadeias bastante ordenadas, na forma de dupla hélice,

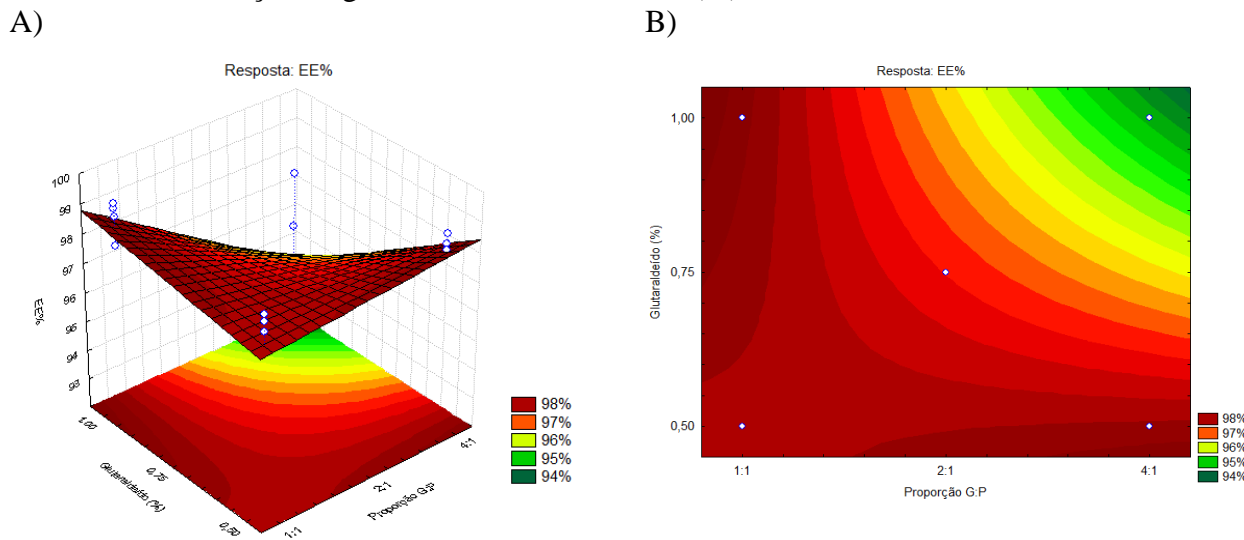
agregadas nas zonas de junção (MIYOSHI *et al.*, 1995; PRAJAPATI *et al.*, 2013). Por outro lado, o aumento da concentração de Glu deve permitir um maior grau de reticulação, que resulta na formação de uma rede mais rígida e fechada, devido à introdução de ligações covalentes inter-cadeias. Tais fatores podem promover a expulsão do fármaco da rede polimérica (CARDOSO, 2014).

Comportamento semelhante foi relatado por CARDOSO (2014), em estudo com micropartículas de goma gelana e amido resistente, duplamente reticuladas com $AlCl_3$ e glutaraldeído, em que o aumento do grau de reticulação e o aumento da concentração de goma gelana promoveram a redução da eficiência de encapsulação.

Já para as microesferas com proporção G:P 1:1, as ramificações da P devem ter originado uma rede mais desorganizada, frouxa e flexível, devido aos domínios altamente ramificados (*hairy region*) intercalados por domínios lineares (*smooth region*) que possui em sua estrutura (SCHOLS e VORAGEN, 1996; MUNARIN *et al.*, 2012), que permitiu o maior aprisionamento do fármaco na matriz, traduzido pelos maiores valores de EE%, independentemente do grau de reticulação covalente.

O efeito na redução da EE% pode ser visualizado pela área verde nos gráficos apresentados na Figura 3.

Figura 3: Gráficos de superfície de resposta (A) e de contorno (B) para os efeitos da proporção G:P e da concentração de glutaraldeído sobre a EE% (%).



* A e B relativos aos níveis 0 das concentrações de $AlCl_3$ e fármaco.

5.2 Erosão das microesferas após a liberação *in vitro* em meio ácido

Erosão é o termo que designa perda de material polimérico seja por processo químico de degradação das cadeias ou processo físico (ARIFIN *et al.*, 2006). A determinação do grau de erosão sofrido pelas microesferas durante a liberação em meio ácido é importante para posterior compreensão das taxas e da cinética de liberação do fármaco.

A erosão das microesferas foi determinada gravimetricamente, a partir da avaliação da perda de massa após o teste de dissolução em meio ácido por 2 horas. Os valores de erosão variaram de 13,38 a 24,58% (Tabela 6).

Tabela 6: Valores de erosão (%) das microesferas, após o teste de dissolução em meio ácido por 2 horas (média \pm DP, n=3).

Microesfera	Erosão (%)
M1	18,54 \pm 0,12
M2	13,38 \pm 0,32
M3	25,20 \pm 0,73
M4	19,43 \pm 0,17
M5	21,51 \pm 0,12
M6	16,74 \pm 0,99
M7	24,58 \pm 0,62
M8	14,23 \pm 0,52
M9	16,59 \pm 0,59
M10	14,06 \pm 0,43
M11	20,00 \pm 0,40
M12	17,57 \pm 0,18
M13	18,31 \pm 0,91
M14	17,66 \pm 1,42
M15	18,84 \pm 0,66
M16	14,03 \pm 0,28
M17	15,52 \pm 1,00

A análise de variância (Tabela 7) mostrou que os fatores (1) proporção G:P, (2) concentração de AlCl₃ e (4) concentração de fármaco apresentaram efeito principal estatisticamente significativo sobre a erosão (p<0,05). A interação 2x3 também foi estatisticamente significativa (p<0,05).

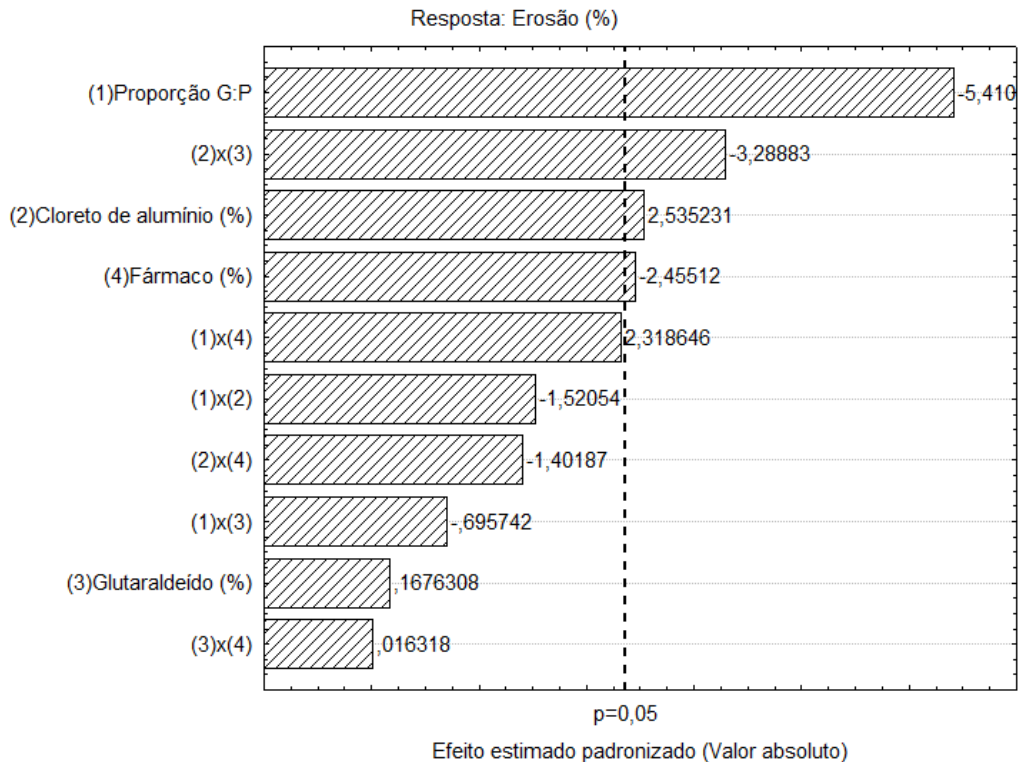
Tabela 7: Dados da análise de variância (ANOVA) para os efeitos estimados no planejamento fatorial completo 2^4 com ponto central para a resposta erosão.

Efeitos	Soma quadrática	Grau de liberdade	Média quadrática	Teste f	Nível de significância (p)
(1) Proporção G:P*	83,129	1	83,129	29,270	0,001*
(2) $AlCl_3$ (%)*	18,254	1	18,254	6,427	0,039*
(3) Glu (%)	0,080	1	0,080	0,028	0,872
(4) Fármaco (%)*	17,119	1	17,119	6,028	0,044*
(1)x(2)	6,566	1	6,566	2,312	0,172
(1)x(3)	1,375	1	1,375	0,484	0,509
(1)x(4)	15,269	1	15,269	5,376	0,054
(2)x(3)*	30,719	1	30,719	10,816	0,013*
(2)x(4)	5,581	1	5,581	1,965	0,204
(3)x(4)	0,001	1	0,001	0,000	0,987
Erros	19,881	7	2,840		
Total	197,974	17			

*efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$)

A Figura 4 apresenta o gráfico de Pareto com os valores dos efeitos dos fatores e suas interações binárias sobre a erosão das microesferas após o ensaio de liberação em meio ácido.

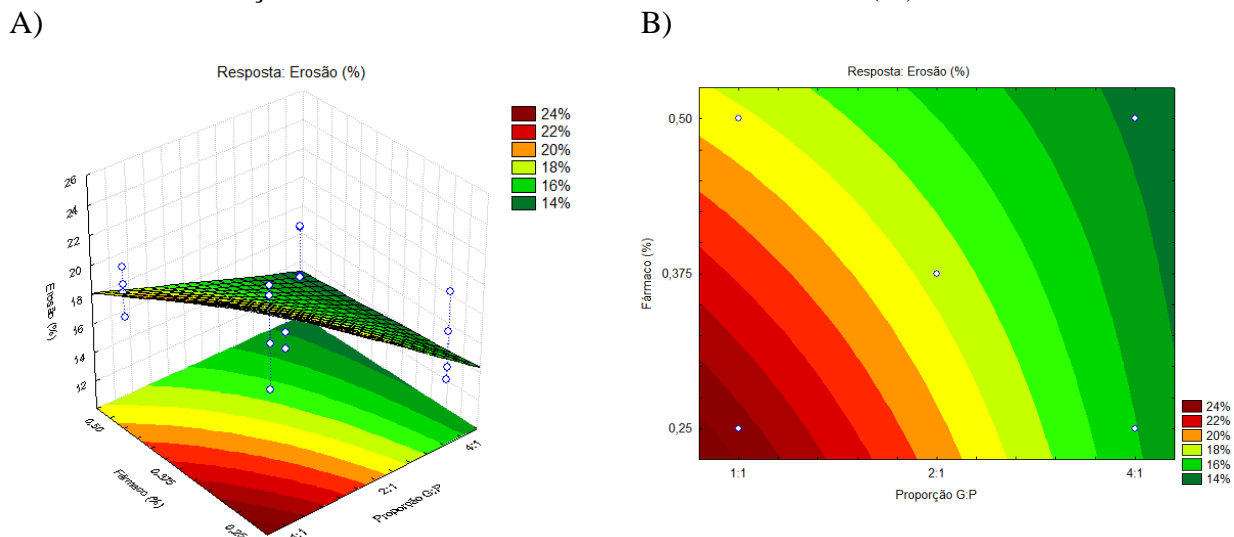
Figura 4: Gráfico de Pareto para os efeitos dos fatores avaliados sobre a erosão (%) das microesferas.



A linha tracejada no gráfico corresponde ao valor de $p=0,05$ e, como é possível verificar, em ordem decrescente, os fatores que mais influenciaram a erosão foram a (1) proporção G:P seguida da interação (2x3) entre as concentrações de $AlCl_3$ e Glu, o efeito principal do fator (2) concentração de $AlCl_3$ e por fim o fator (4) concentração de fármaco.

Os fatores (1) proporção G:P e (4) concentração de fármaco apresentaram efeitos negativos (-5,41 e -2,46, respectivamente) (Figura 4), evidenciando que a maior concentração de fármaco na formulação e a proporção G:P 4:1 diminuem efetivamente a erosão das microesferas em meio ácido. Tal comportamento está evidenciado no gráfico de superfície de resposta e no gráfico de contorno (Figura 5), nos quais é possível observar a área verde, que corresponde à menor erosão, concentrada nos maiores níveis de ambos os fatores.

Figura 5: Gráficos de superfície de resposta (A) e de contorno (B) para os efeitos da proporção G:P e da concentração de fármaco sobre a erosão das microesferas (%).



* A e B relativos aos níveis -1 das concentrações de $AlCl_3$ e Glu.

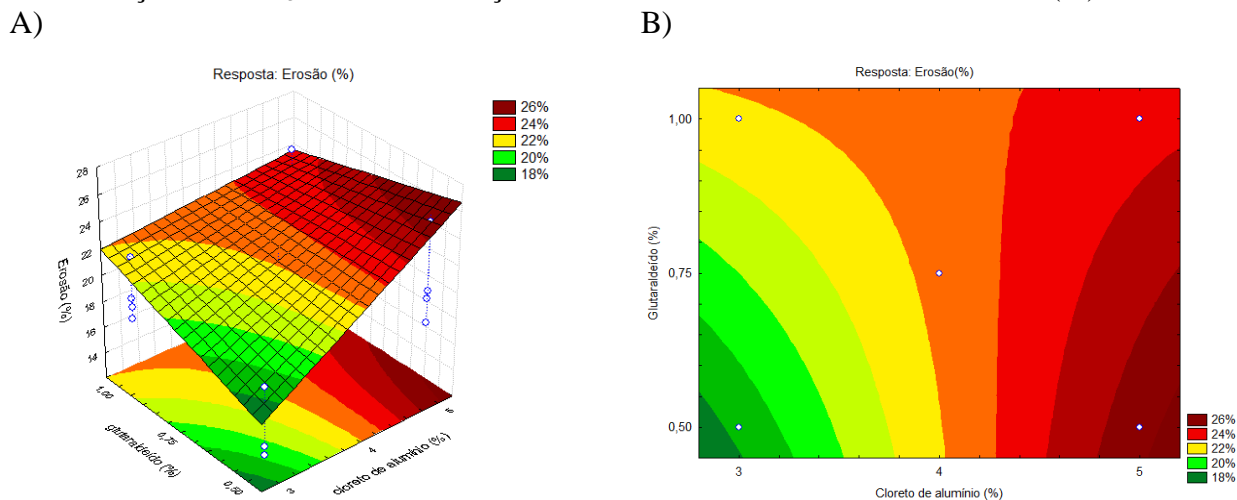
O efeito negativo do aumento da proporção G:P (-5,41) demonstra que a maior concentração de GG na proporção 4:1 deve permitir a formação de uma estrutura mais densa, empacotada e organizada, devido à orientação em dupla hélice das cadeias desse polímero quando geleificado. Dessa forma, após o intumescimento, uma rede mais elástica, dura e coesa é formada (item 5.5, Capítulo I), resultando em uma maior resistência a erosão.

Deve-se considerar ainda que o fármaco disperso na matriz pode atuar como um obstáculo à difusão de líquido para o interior da matriz, e ainda como um reticulante físico que conecta cadeias poliméricas consecutivas, tornando a estrutura mais resistente ao processo de erosão.

O efeito da dupla reticulação na erosão, avaliado pelo efeito de interação binária entre Glu (%) e $AlCl_3$ (%), foi negativo (-3,28) quando ambos reticulantes se apresentam nos

menores níveis. Essa redução da erosão deve ser atribuída à maior coesividade alcançada nessa condição (item 5.5, Capítulo I). O efeito na redução da erosão pode ser visualizado pela área verde nos gráficos apresentados na Figura 6, que corresponde à menor erosão, concentrada na menor concentração de AlCl_3 (3%) e na menor concentração de Glu (0,5%).

Figura 6: Gráficos de superfície de resposta (A) e de contorno (B) para os efeitos da concentração de AlCl_3 e da concentração de Glu sobre a erosão das microesferas (%).



* A e B relativos aos níveis -1 dos fatores proporção G:P e concentração de fármaco.

O efeito positivo (2,54) do aumento da concentração de AlCl_3 (2) na erosão corrobora o comportamento acima descrito.

A manutenção da forma esférica e o reduzido intumescimento das micropartículas ao final do teste em meio ácido (2h) puderam ser observados macroscopicamente.

5.3 Determinação do perfil de liberação *in vitro* do RES

5.3.1 Determinação do perfil de liberação em meio ácido (pH 1,2)

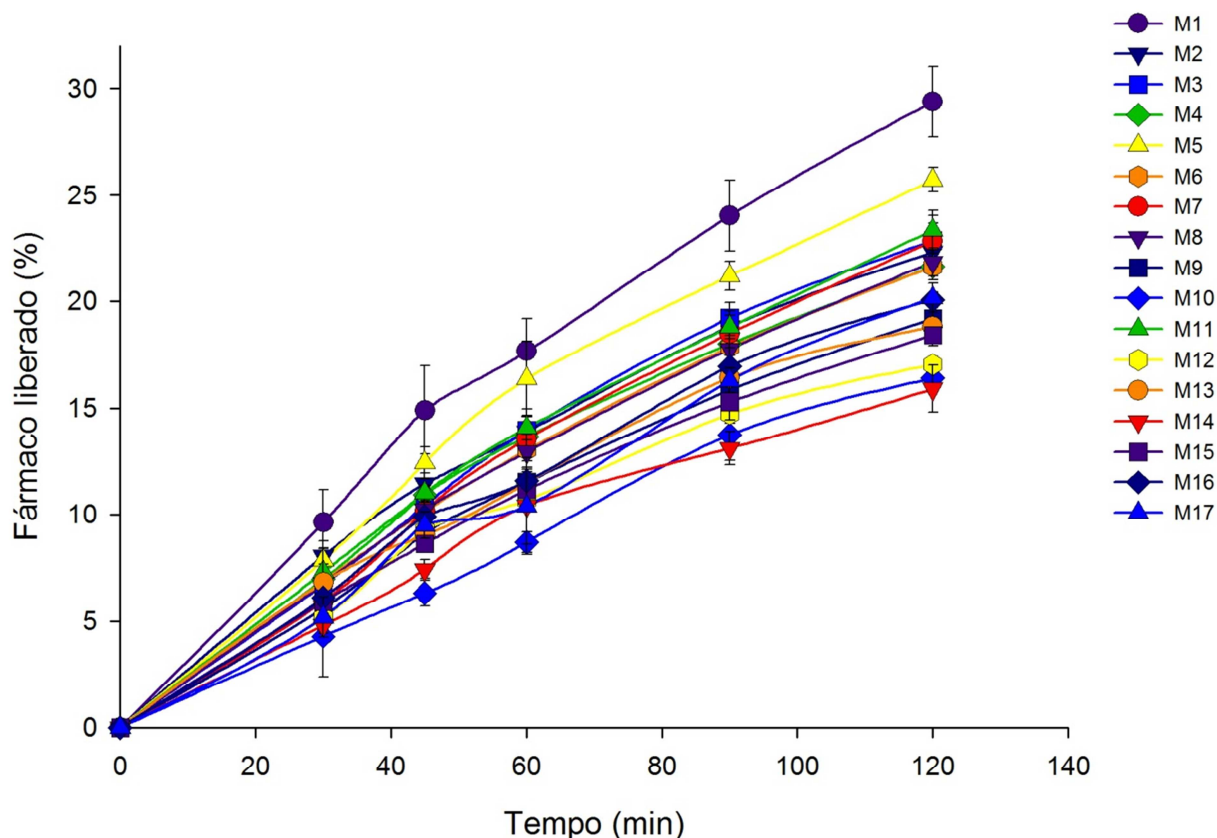
A liberação controlada do fármaco e a redução das taxas de liberação em meio ácido são atributos desejáveis para os sistemas de liberação cólon-específica de fármacos, a fim de evitar a liberação prematura no estômago e garantir que a maior quantidade possível de fármaco alcance a parte distal do intestino, onde encontrará seu sítio de ação ou absorção para exercer o efeito farmacológico (DAVARAN *et al.*, 1999).

Os fatores que afetam as taxas de liberação podem ser divididos em fatores físicos, relacionados à estrutura da matriz que encapsula o fármaco, como por exemplo, a porosidade, e fatores químicos, como as propriedades químicas do fármaco e dos polímeros que constituem o sistema de liberação (FREIBERG e ZHU, 2004).

O efeito da associação da reticulação iônica e da reticulação covalente na obtenção das microesferas pode ser complementar, aumentando o grau de reticulação da malha polimérica. Esse aumento pode levar à maior fixação dos grupos funcionais dos polímeros, os quais se tornam menos disponíveis para interagirem com o meio aquoso e ácido do estômago, reduzindo as taxas de intumescimento e erosão da matriz e consequentemente, a liberação do fármaco neste meio (MI *et al.*, 2003).

Os perfis de liberação do resveratrol em meio ácido (pH 1,2) estão apresentados no gráfico da Figura 7.

Figura 7: Perfis de liberação do RES em meio ácido (HCl 0,1N, pH 1,2 com 1% LSS) a partir das microesferas de GG:P duplamente reticuladas (média ± DP).



A porcentagem de fármaco liberado após 120 min de ensaio em meio ácido variou entre 15,91 e 29,36 % (Tabela 8).

É importante notar que as microesferas permitiram baixas taxas de liberação sem a ocorrência de efeito *burst*, que é a liberação de grande quantidade de fármaco em um pequeno período de tempo. O comportamento apresentado é extremamente favorável, visto que as microesferas podem permanecer por um período inferior a 2 horas no estômago, uma vez que

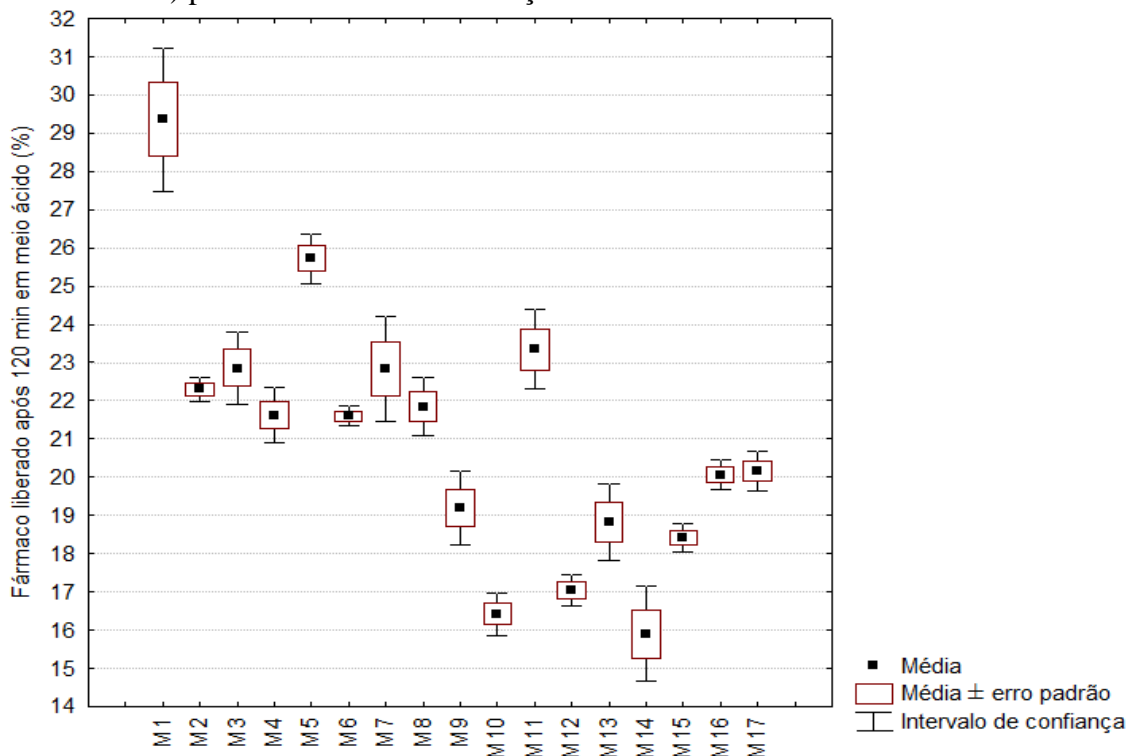
partículas de até 2,0 mm são capazes de passar livremente através do piloro, comportando-se como líquidos e, portanto, a passagem desse sistema multiparticulado pelo meio gástrico fica menos dependente do estado prandial (MAESTRELLI *et al.*, 2008; ZERBINI, 2010), assim a quantidade de fármaco liberado no estômago pode ser bem inferior àquela determinada em 120 min de ensaio *in vitro*.

Tabela 8: Porcentagem de fármaco liberado em meio ácido (HCl 0,1N pH 1,2 com 1% LSS) após 120 minutos para o planejamento 2⁴ com ponto central (média ± DP; n = 3).

Amostra	% fármaco liberado em meio ácido após 120 min
M1	29,36 ± 1,66
M2	22,30 ± 0,27
M3	22,85 ± 0,84
M4	21,62 ± 0,63
M5	25,72 ± 0,57
M6	21,61 ± 0,22
M7	22,83 ± 1,21
M8	21,84 ± 0,67
M9	19,19 ± 0,86
M10	16,42 ± 0,49
M11	23,35 ± 0,93
M12	17,05 ± 0,37
M13	18,82 ± 0,89
M14	15,91 ± 1,10
M15	18,41 ± 0,32
M16	20,07 ± 0,34
M17	20,17 ± 0,68

A Figura 8 apresenta o gráfico com as médias da porcentagem de fármaco liberado após 120 minutos em meio ácido e o intervalo de confiança calculados para as 17 microesferas. No gráfico, o quadrado central representa a média, o retângulo externo representa a média ± erro padrão e as barras representam o intervalo de confiança (IC), calculado a partir da seguinte equação: $IC = \text{média} \pm 1,96 * \text{desvio padrão}$.

Figura 8: Porcentagem de fármaco liberado após 120 minutos em meio ácido (HCl 0,1N pH 1,2 com 1% LSS) para as diferentes formulações de microesferas.



As amostras M10, M12 e M14, constituídas de GG:P na proporção G:P 4:1 e nível alto de resveratrol (0,50%), foram as que menos liberaram o fármaco em meio ácido ($p < 0,05$). A porcentagem de liberação para essas amostras foi de aproximadamente 16,42%, 17,05% e 15,91% ($p > 0,05$), respectivamente.

Já as amostras M1 e M5, que apresentam proporção G:P 1:1 e fármaco no nível mais baixo (0,25%) liberaram aproximadamente 29,36% e 25,72% de resveratrol em 120 min, respectivamente, sendo as microesferas que liberaram maior percentual de fármaco ao final de 120min ($p < 0,05$) (Figura 8).

A partir desses dados, pode-se verificar a influência da proporção G:P e da concentração de fármaco sobre o controle da liberação em meio ácido, como verificado no planejamento saturado 2^{7-4} (item 5.9, Capítulo II), que apontou estes dois fatores como os mais influentes.

A partir da análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 9, é possível confirmar que os fatores que apresentaram efeito principal estatisticamente significativo sobre a liberação do fármaco em meio ácido foram, de fato, a proporção G:P e a concentração de fármaco ($p < 0,05$).

A partir da análise, é possível também verificar que a interação (2)x(4), que corresponde à interação binária entre os fatores concentração de $AlCl_3$ e de fármaco foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

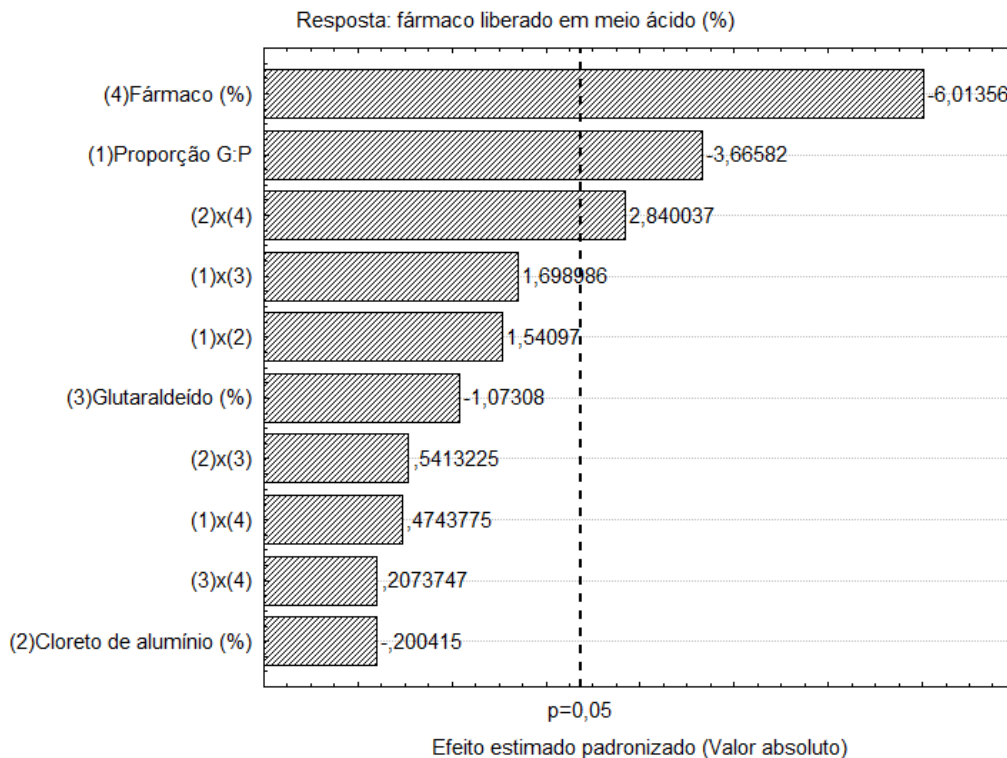
Tabela 9: Dados da análise de variância (ANOVA) para os efeitos estimados no planejamento fatorial completo 2^4 com ponto central para a resposta porcentagem de fármaco liberado em meio ácido ($r^2=0,902$).

Efeitos	Soma quadrática	Grau de liberdade	Média quadrática	Teste f	Nível de significância (p)
(1) Proporção G:P*	35,192	1	35,192	13,438	0,008*
(2) AlCl ₃ (%)	0,105	1	0,105	0,040	0,847
(3) Glu (%)	3,016	1	3,016	1,151	0,319
(4) Fármaco (%)*	94,704	1	94,704	36,163	0,001*
(1)x(2)	6,219	1	6,219	2,375	0,167
(1)x(3)	7,559	1	7,559	2,887	0,133
(1)x(4)	0,589	1	0,589	0,225	0,650
(2)x(3)	0,767	1	0,767	0,293	0,605
(2)x(4)*	21,123	1	21,123	8,066	0,025*
(3)x(4)	0,113	1	0,113	0,043	0,842
Erros	18,332	7	2,619		
Total	187,719	17			

*efeitos estatisticamente significativos ($p<0,05$)

Como foi possível estimar os erros e verificar a significância estatística dos efeitos, o gráfico de Pareto apresentado na Figura 9 apresenta uma linha tracejada que assinala $p=0,05$ e indica efeitos estatisticamente significantes. As barras horizontais que ultrapassam a linha tracejada correspondem aos efeitos estatisticamente significativos e é possível observar em ordem decrescente os efeitos mais decisivos sobre o controle da liberação em meio ácido.

Figura 9: Gráfico de Pareto para os efeitos dos fatores avaliados sobre a porcentagem de fármaco liberado em meio ácido em 120 min.



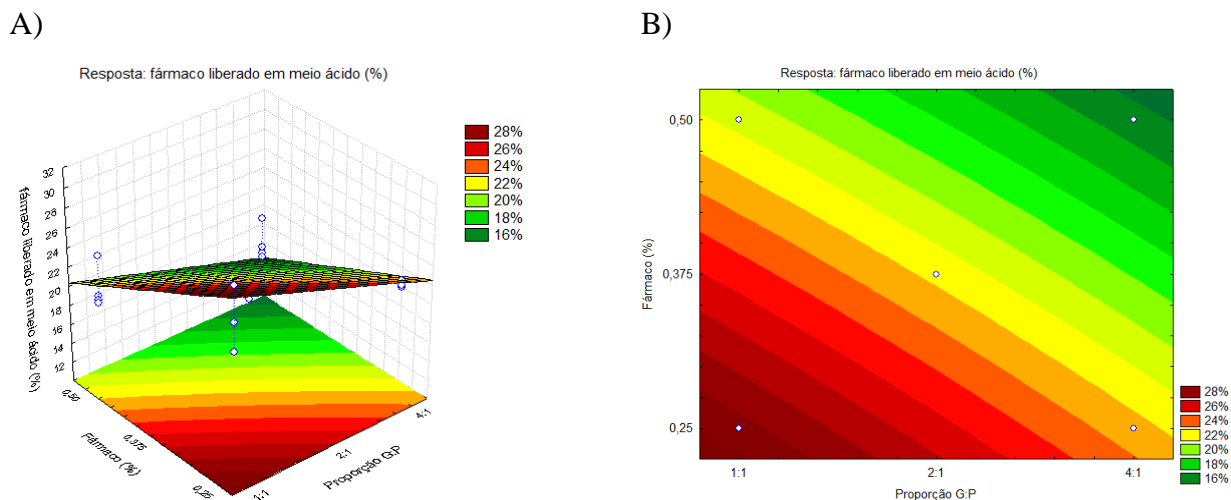
* Os efeitos principais estão indicados por número e nome dos fatores e os efeitos de interação pelos números correspondentes aos dois fatores da interação.

** As interações entre 3 e 4 fatores não foram consideradas significantes para o modelo estatístico, portanto não são apresentadas no gráfico.

O maior efeito foi o da concentração de fármaco (4), seguido do efeito da proporção G:P (1), e do efeito de interação entre a concentração de $AlCl_3$ e a concentração de fármaco (2x4), como é possível observar no gráfico de Pareto (Figura 9).

Os fatores (4) concentração de fármaco e (1) proporção G:P apresentaram efeitos negativos (-6,01 e -3,67, respectivamente) (Figura 9, Tabela 10), evidenciando que a proporção G:P 4:1, que é o maior nível para essa variável, e a maior concentração de fármaco na formulação diminuem efetivamente a liberação em meio ácido. Tal comportamento está evidenciado no gráfico de superfície de resposta e no gráfico de contorno (Figura 10), nos quais é possível observar a área verde, que corresponde a menor liberação, concentrada nos maiores níveis de ambos os fatores.

Figura 10: Gráficos de superfície de resposta (A) e de contorno (B) para os efeitos da proporção G:P e da concentração de fármaco sobre a porcentagem de fármaco liberado em meio ácido.



* A e B relativos aos níveis -1 das concentrações de $AlCl_3$ e Glu.

A maior concentração de goma gelana na proporção G:P 4:1 deve ter originado uma rede mais densa e empacotada, devido à orientação em dupla hélice observada para esse polímero quando geleificado, o que está em concordância com as análises de eficiência de encapsulação e erosão. Essa estrutura deve dificultar a difusão do líquido para o interior da matriz e do fármaco para o meio de liberação.

Soma-se a isso o fato de que essa proporção (4:1) também apresentou efeito negativo sobre a erosão do sistema, o que contribui para a redução das taxas de liberação (item 5.1).

Diversos estudos tem demonstrado que o perfil de liberação é dependente da quantidade de fármaco na matriz polimérica (ARIFIN *et al.*, 2006). A concentração de RES também exibiu efeito negativo na liberação do fármaco. Uma vez que o fármaco encontra-se disperso na matriz (item 5.2, Capítulo II), ele pode representar um obstáculo no caminho difusional do líquido, bem como atuar como um reticulante físico, que restringe a mobilidade das cadeias poliméricas, reduzindo o grau de relaxamento e intumescimento. Esse conjunto de fatores é determinante para a redução das taxas de liberação do fármaco.

Ainda, a lipofilia do RES reduz a hidrofília do sistema e dificulta a entrada de líquido na matriz, contribuindo para a retenção do fármaco na microesfera. A concentração de fármaco também reduziu a erosão do sistema em meio ácido (item 5.2), o que novamente contribui para o controle das taxas de liberação do fármaco.

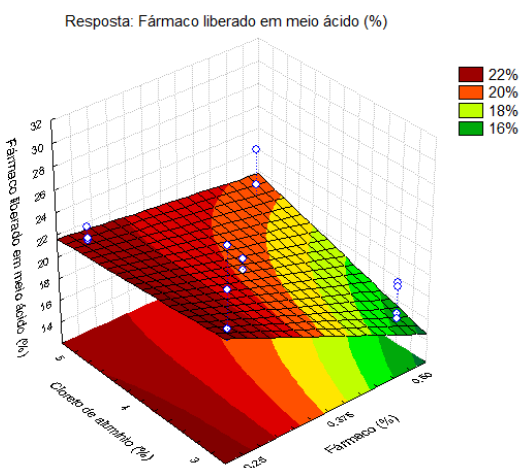
O RES encontra-se disperso na matriz, na forma de cristais, e atua como um reticulante físico, impedindo a movimentação das cadeias poliméricas, reduzindo o intumescimento e o relaxamento da malha. Ainda, a lipofilicidade do fármaco reduz a hidrofília do sistema, o que contribui para a menor entrada de líquido na matriz, fatores que contribuem para a retenção do

fármaco na microesfera. A concentração de fármaco também exibiu efeito semelhante à da proporção G:P, reduzindo a erosão do sistema em meio ácido (item 5.1), sendo este mais um fator que contribui para o controle das taxas de liberação do fármaco.

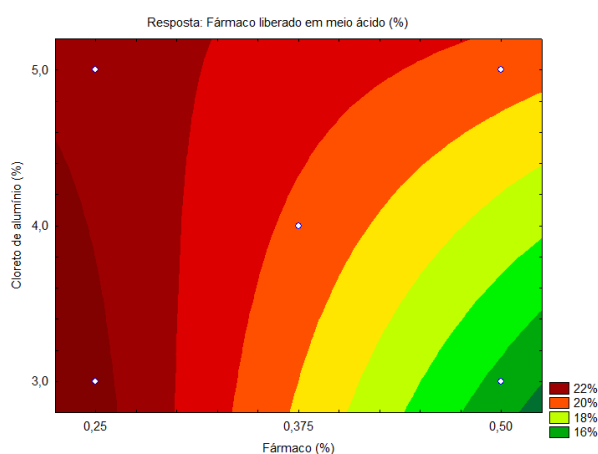
O efeito significativo da interação entre a concentração de $AlCl_3$ e a concentração de fármaco (2×4) também foi observado (Figura 9, Tabela 9), sendo que o nível mais alto do fármaco associado ao menor nível de $AlCl_3$ levou à menor liberação. Nos gráficos de superfície de resposta e de contorno apresentados na Figura 11 é possível observar a área verde, que compreende a região de menor liberação do fármaco, a qual corresponde à maior concentração de fármaco (0,5%) e menor concentração de $AlCl_3$ (3%).

Figura 11: Gráficos de superfície de resposta (A) e de contorno (B) para os efeitos da concentração de $AlCl_3$ e da concentração de fármaco sobre a porcentagem de fármaco liberado em meio ácido.

A)



B)



* A e B relativos aos níveis -1 das concentrações de $AlCl_3$ e Glu.

A Equação 12 representa o modelo simplificado que descreve as observações de um planejamento completo do tipo 2^4 :

$$\begin{aligned}
 y(x_1x_2x_3x_4) = & b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_4x_4 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{14}x_1x_4 \\
 & + b_{23}x_2x_3 + b_{24}x_2x_4 + b_{34}x_3x_4 + b_{123}x_1x_2x_3 \\
 & + b_{124}x_1x_2x_4 + b_{134}x_1x_3x_4 + b_{234}x_2x_3x_4 + b_{1234}x_1x_2x_3x_4
 \end{aligned}
 \tag{Equação 12}$$

De acordo com os coeficientes significativos ($p < 0,05$), apresentados na Tabela 10, o modelo estatístico que descreve a liberação do fármaco em meio ácido é representado pela Equação 13:

$$y = 20,983 - 1,483x_1 - 2,433x_4 + 1,149x_2x_4
 \tag{Equação 13}$$

em que x_1 é o nível da proporção G:P, x_2 é o nível da concentração de $AlCl_3$ e x_4 é o nível da concentração de fármaco.

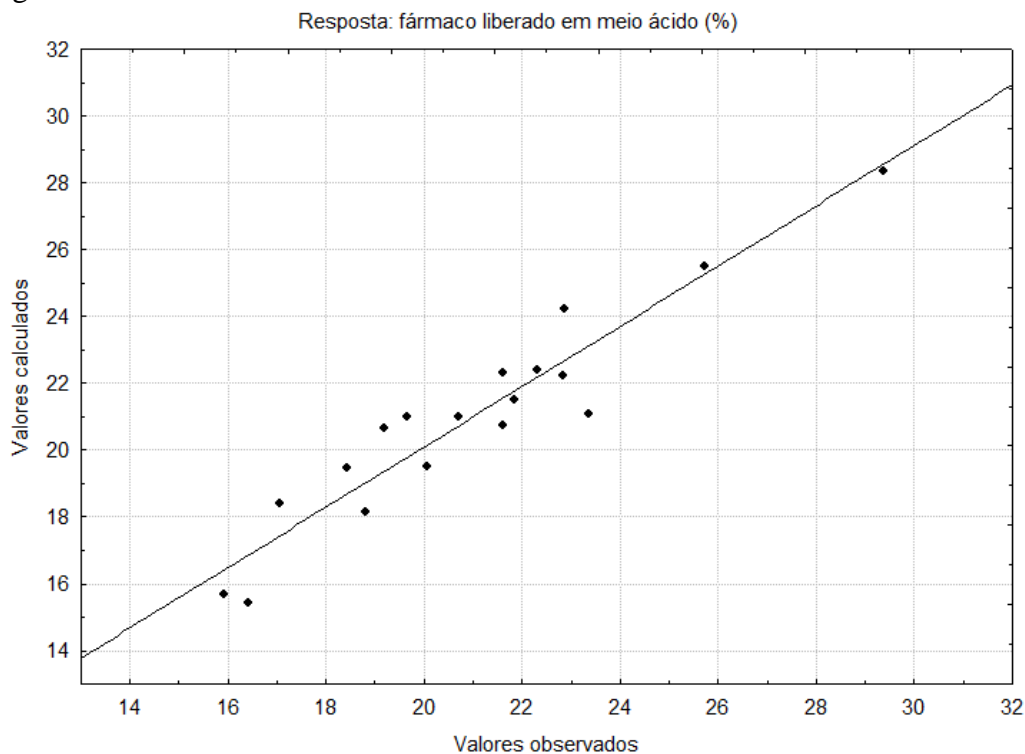
Tabela 10: Coeficientes de regressão para a resposta porcentagem de fármaco liberado em meio ácido para o planejamento 2^4 com ponto central.

Fatores	Coeficiente da regressão	Erro padrão	Efeito (Valor absoluto)	p	Limite inferior do intervalo de confiança (-95%)	Limite superior do intervalo de confiança (+95%)
Média*	20,983	0,381	55,011	0,000*	20,081	21,885
(1) Proporção G:P*	-1,483	0,405	-3,666	0,008*	-2,440	-0,526
(2) AlCl ₃ (%)	-0,081	0,405	-0,200	0,847	-1,038	0,876
(3) Glu (%)	-0,434	0,405	-1,073	0,319	-1,391	0,523
(4) Fármaco (%)*	-2,433	0,405	-6,014	0,001*	-3,390	-1,476
(1)x(2)	0,623	0,405	1,541	0,167	-0,333	1,580
(1)x(3)	0,687	0,405	1,699	0,133	-0,269	1,644
(1)x(4)	0,192	0,405	0,474	0,650	-0,765	1,149
(2)x(3)	0,219	0,405	0,541	0,605	-0,738	1,176
(2)x(4)*	1,149	0,405	2,840	0,025*	0,192	2,106
(3)x(4)	0,084	0,405	0,207	0,842	-0,873	1,041

*efeitos estatisticamente significativos ($p < 0,05$)

A adequação do modelo matemático para descrever o comportamento de liberação em meio ácido foi avaliada a partir de um gráfico dos valores calculados *versus* os valores experimentais observados para a resposta porcentagem de fármaco liberado em meio ácido (Figura 12). Como é possível observar, os pontos estão muito próximos à reta, portanto, pode-se concluir que os valores experimentais se aproximam dos valores preditos e, portanto, o modelo proposto pode ser utilizado para descrever a liberação do fármaco em meio ácido a partir das microesferas duplamente reticuladas (CALADO e MONTGOMERY, 2003).

Figura 12: Valores calculados *versus* valores experimentais observados para a resposta porcentagem de fármaco liberado em meio ácido.



5.3.2 Determinação do perfil de liberação em pH 1,2 e 6,8

A dissolução é uma etapa fundamental para a farmacocinética, pois, para o fármaco exercer seu efeito farmacológico, é necessário que seja liberado da forma farmacêutica, e se apresente como uma dispersão molecular, seja para ser absorvido e atuar de modo sistêmico, seja para exercer um efeito localizado (RODRIGUES e SILVA, 2005; JAMBHEKAR, 2013). Portanto, é importante avaliar a velocidade com que esse processo ocorre, e isso pode ser feito através da avaliação do perfil de liberação *in vitro* do fármaco, que é indispensável no desenvolvimento de novas formas farmacêuticas e permite prever o comportamento *in vivo* do sistema de liberação (MANADAS *et al.*, 2002).

Considerando que a concentração de fármaco foi o fator mais significativo sobre a liberação em meio ácido (item 5.3.1, Capítulo III), e que seu efeito foi negativo, de modo que a maior concentração de RES reduz a liberação em pH 1,2, optou-se por selecionar microesferas com o nível mais alto de RES em suas formulações (0,5%).

A proporção G:P foi o segundo fator mais significativo sobre a liberação em meio ácido, e, portanto, microesferas compostas de diferentes proporções poliméricas foram selecionadas, a fim de avaliar possíveis diferenças no perfil de liberação do fármaco.

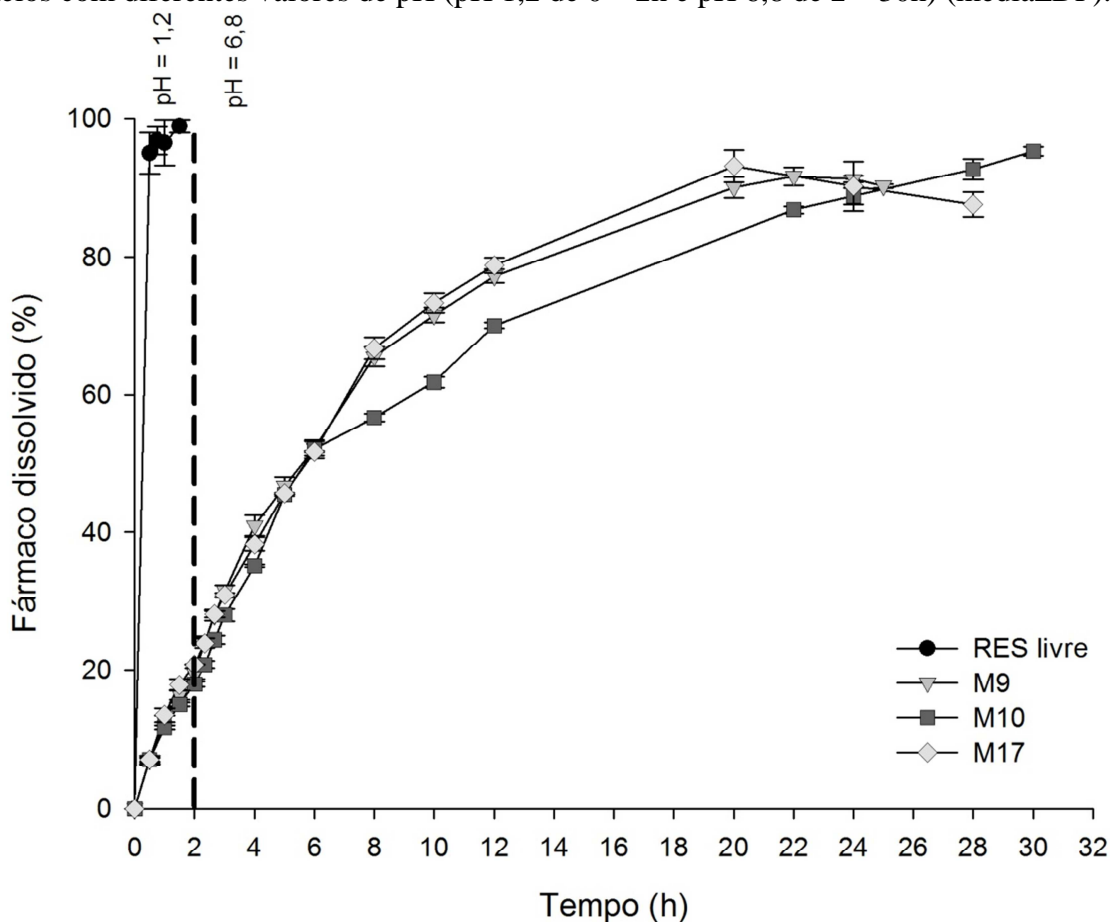
As concentrações dos agentes reticulantes $AlCl_3$ e Glu não foram significativas para a liberação em meio ácido, portanto optou-se por selecionar amostras obtidas com as menores

concentrações de ambos, já que sua menor concentração nas partículas apresenta vantagens do ponto de vista econômico e de biocompatibilidade.

Sendo assim, para o teste do perfil de liberação em pH 1,2 e 6,8 foram selecionadas as amostras M9 (G:P 1:1 com 0,5% de RES) e M10 (G:P 4:1 com 0,5% de RES), e a amostra M17 (G:P 2:1 com 0,375% de RES), que foi selecionada uma vez que representa o ponto central do planejamento fatorial.

Os perfis de dissolução do RES livre e a partir das microesferas estão apresentados na Figura 13.

Figura 13: Perfis de liberação do RES a partir das microesferas duplamente reticuladas em meios com diferentes valores de pH (pH 1,2 de 0 – 2h e pH 6,8 de 2 – 30h) (média±DP).



O RES livre é rapidamente dissolvido, sendo que 96,82 ± 1,99% do fármaco se dissolvem em apenas 45 minutos de ensaio em meio ácido (pH 1,2) (Figura 13).

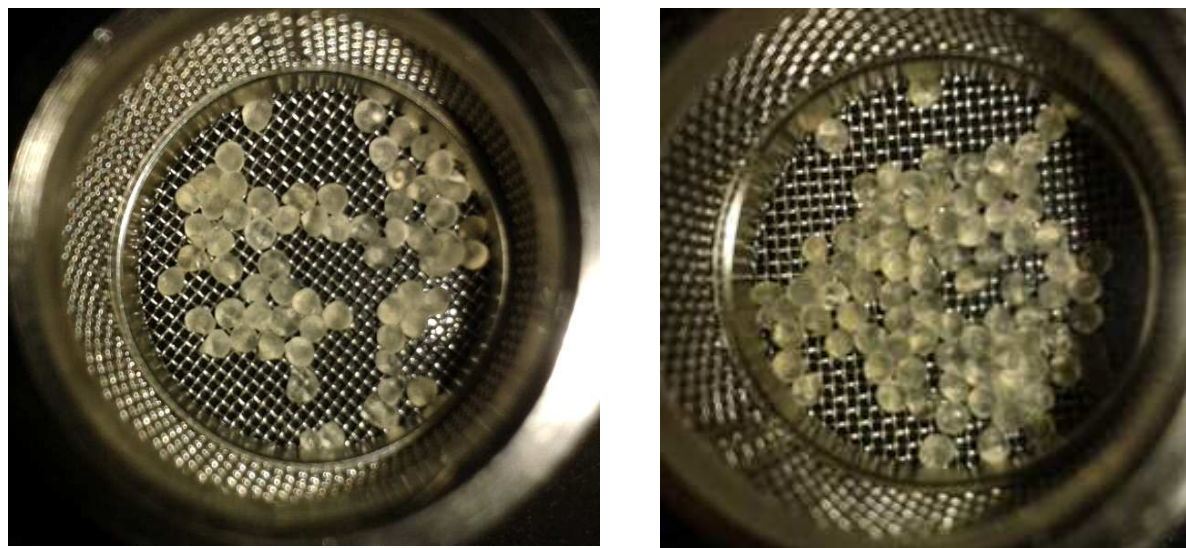
A partir do gráfico apresentado na Figura 13, é possível observar a significativa redução das taxas de liberação do fármaco em relação à dissolução do RES livre. Nas primeiras 2 h de ensaio em meio ácido (pH 1,2), as amostras M9, M10 e M17 liberaram apenas 19,45%, 17,96% e 20,79% do fármaco, respectivamente, reproduzindo as reduzidas taxas de liberação apresentadas no teste de liberação em meio ácido (item 5.3.1). No meio ácido não se observa

efeito *burst*, que geralmente é atribuído a partículas de fármaco não encapsulado, presentes na superfície do sistema, corroborando os dados de MEV (item 5.2, Capítulo II), em que foi possível observar o fármaco no interior das microesferas, sempre envolvido por uma camada polimérica.

As microesferas M17, M9 e M10 foram capazes de controlar a liberação por 20, 22 e 30 h, respectivamente, sendo que a dupla reticulação permitiu a obtenção de microesferas que controlaram a liberação do fármaco por tempos mais prolongados que microesferas reticuladas ionicamente, as quais controlaram a liberação do fármaco (cetoprofeno) por no máximo 6 h (PREZOTTI, 2013).

Ao final do ensaio de dissolução, foi possível observar que as microesferas apresentavam-se visualmente intumescidas, com sua forma esférica preservada, sem a formação de aglomerados e sem fármaco encapsulado em seu interior, como mostra a Figura 14. Esse comportamento deve ter contribuído para os perfis de liberação sem a ocorrência de efeito *burst*.

Figura 14: Microesferas intumescidas ao término do ensaio de dissolução A) M10 e B) M17.



5.3.2.1 Avaliação da absorção de líquido e da erosão após a liberação *in vitro* em pH 1,2 e 6,8

Para que o fármaco seja liberado, é preciso que o meio de dissolução penetre na partícula e o dissolva, então suas moléculas são liberadas para o meio externo por difusão através da matriz intumescida, caso o sistema sofra erosão, esta pode acelerar as taxas de liberação (MADERUELO *et al.*, 2011).

Devido à influência desses fenômenos no perfil de liberação do fármaco, a porcentagem de erosão e de absorção de líquidos ao final do ensaio de dissolução em meio ácido seguido de tampão fosfato pH 6,8 foram avaliadas. Os valores da erosão e da absorção de líquido (%) observados para as microesferas M9, M10 e M17 amostras após o ensaio de liberação *in vitro* em pH 1,2 e 6,8 estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11: Valores de absorção de líquido (%) e erosão (%) das amostras após o ensaio de liberação *in vitro* em pH 1,2 e 6,8 (média \pm DP, n=3).

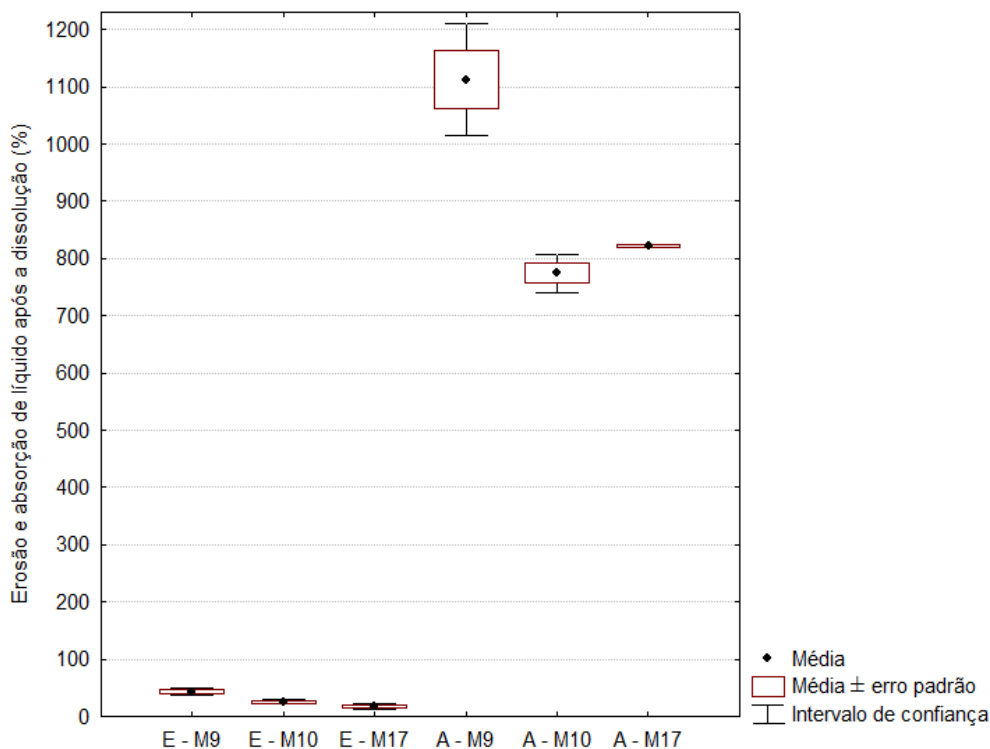
Microesfera	Absorção de líquido (%)	Erosão (%)
M9	1.112,39 \pm 86,11	43,17 \pm 5,03
M10	774,06 \pm 29,76	25,21 \pm 3,21
M17	821,85 \pm 1,94	17,91 \pm 3,49

Entre as amostras que continham maior concentração de fármaco (M9 e M10), a amostra M10 que exibiu as menores taxas de liberação, prolongando-a por mais tempo (30 h), também foi a amostra que exibiu menor erosão ao final do ensaio ($p < 0,05$) (Tabela 11). Esta amostra também apresentou menor absorção de líquido após as 30h de ensaio ($p < 0,05$) (Tabela 11).

A maior proporção de GG na M10 deve ter originado uma rede mais organizada, devido à conformação em dupla hélice de suas cadeias durante a geleificação (PRAJAPATI *et al.*, 2013), e uma malha mais densa, que absorve menos líquido, retardando a dissolução do fármaco em seu interior para que ocorra a difusão para o meio externo, e, portanto, controlando a liberação por mais tempo.

A formulação M9 apresentou maior erosão e maior absorção de líquido que a amostra M10 após o ensaio de liberação *in vitro* em pH 1,2 e 6,8 ($p < 0,05$) (Figura 15), fatores que devem ter acelerado a liberação do fármaco. Tal comportamento também foi verificado para os ensaios realizados apenas em meio ácido (item 5.2), em que se verificou maior erosão das microesferas M9 em relação à M10 ($p < 0,05$), que levou à maior liberação do resveratrol após 120 min de ensaio (Tabela 8).

Figura 15: Porcentagem de erosão e absorção de líquido das microesferas M9, M10 e M17 após o ensaio de liberação *in vitro* em pH 1,2 e 6,8.



* No eixo x: E = erosão e A = absorção de líquido das amostras M9, M10 e M17, respectivamente.

Apesar da menor absorção de líquido e menor erosão apresentadas pela amostra M17 em relação à M9 (Figura 15), esta amostra liberou mais rapidamente o fármaco, controlando a liberação por no máximo 20h. Tal comportamento pode ser atribuído à menor concentração de fármaco em sua estrutura, uma vez que a redução das taxas de liberação do fármaco está relacionada à maior quantidade de RES nas microesferas (Figura 9), já que ele pode representar um obstáculo no caminho difusional do meio de dissolução, bem como atuar como um reticulante físico, que restringe a mobilidade das cadeias poliméricas, reduzindo as taxas de liberação do fármaco.

5.4 Análise dos mecanismos de liberação do fármaco

A aplicação dos diversos modelos cinéticos permite a melhor interpretação dos dados de liberação *in vitro* do fármaco e a compreensão dos mecanismos envolvidos na liberação do fármaco a partir das microesferas (COSTA e SOUSA LOBO, 2001).

Os modelos matemáticos de Ordem zero, Primeira-Ordem, Korsmeyer–Peppas, Higuchi, Hixson–Crowell, Baker–Lonsdale e Weibull foram aplicados aos dados da liberação em meio ácido (item 5.3.1) e aos dados da liberação em pH 1,2 e 6,8 (item 5.3.2) das microesferas M9, M10 e M17, sendo que para o modelo de Korsmeyer–Peppas, foram utilizados somente os

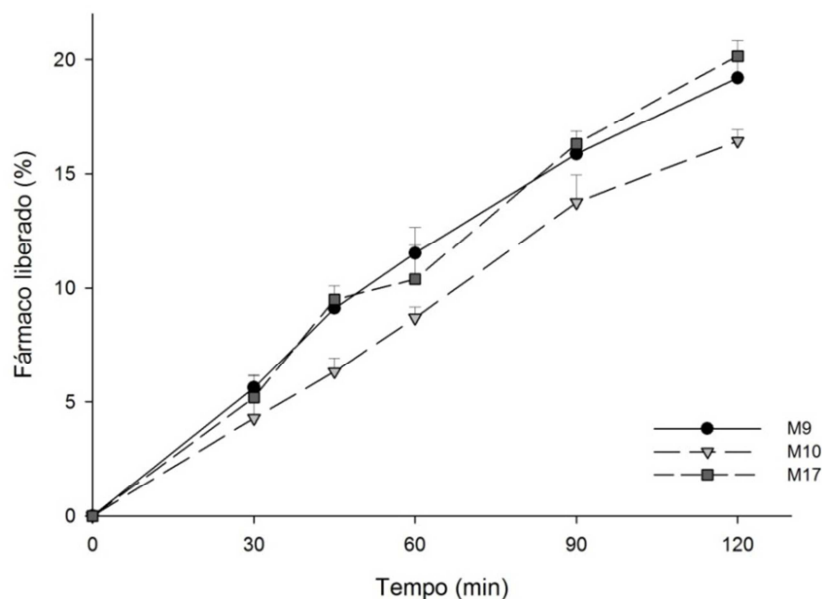
dados referentes aos primeiros 60% de fármaco liberado (KORSMEYER *et al.*, 1983; COSTA e SOUSA LOBO, 2001). Os valores dos coeficientes de determinação ajustado ($r^2_{ajustado}$) obtidos para os diferentes modelos estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12: Valores dos coeficientes de determinação ajustado ($r^2_{ajustado}$) para os diferentes modelos aplicados aos dados de liberação do RES em meio ácido e em meio ácido seguido de tampão fosfato pH 6,8 a partir das microesferas M9, M10 e M17 e dos coeficientes das equações de Korsmeyer–Peppas e Weibull.

Modelo		Amostras em meio ácido (pH 1,2)			Amostras em meio ácido (pH 1,2) seguido de tampão fosfato pH 6,8		
		M9	M10	M17	M9	M10	M17
Ordem zero	$r^2_{ajustado}$	0,978	0,983	0,976	0,865	0,881	0,890
Primeira ordem	$r^2_{ajustado}$	0,975	0,990	0,984	0,998	0,993	0,997
Korsmeyer–Peppas	$r^2_{ajustado}$	0,988	0,984	0,979	0,993	0,969	0,998
	k	0,41	0,17	0,28	12,59	12,58	12,60
	n	0,81	0,96	0,89	0,80	0,72	0,80
Higuchi	$r^2_{ajustado}$	0,860	0,783	0,811	0,951	0,968	0,942
Hixson–Crowell	$r^2_{ajustado}$	0,968	0,989	0,982	0,984	0,972	0,993
Baker–Lonsdale	$r^2_{ajustado}$	0,846	0,771	0,796	0,908	0,936	0,886
Weibull	$r^2_{ajustado}$	1,000	0,999	0,987	0,998	0,995	0,998
	b	0,91	12,57	0,93	1,12	0,91	1,21

Baseado nos maiores valores de $r^2_{ajustado}$, o modelo de Weibull foi o que melhor se correlacionou com os dados da dissolução das microesferas M9, M10 e M17 em meio ácido (Figura 16).

Figura 16: Perfis de liberação do RES a partir das amostras M9, M10 e M17 em meio ácido (pH 1,2) (média ± DP).



Para o modelo de Weibull, o valor do parâmetro b é um indicador do mecanismo de transporte do fármaco através da matriz polimérica. Valores de $b \leq 0,75$ indicam mecanismo de liberação por difusão Fickiana, valores entre $0,75 < b < 1$ correspondem a uma combinação dos mecanismos de difusão Fickiana e transporte Caso II. Para valores de $b > 1$, o transporte do fármaco segue um mecanismo de liberação complexo (PAPADOPOULOU *et al.*, 2006; CURY *et al.*, 2009).

Segundo essa classificação, o mecanismo de liberação do RES a partir das amostras M9 e M17 em meio ácido seguiu o mecanismo combinado entre difusão Fickiana e transporte Caso II.

No início, a velocidade de difusão do RES deve ser maior que a velocidade de relaxamento das cadeias, isso devido à facilidade de liberar as moléculas que estão próximas à camada superficial das microesferas. Neste caso, tem-se que a $V_{difusão} \gg V_{relaxamento}$, pois a penetração do solvente é mais rápida que o relaxamento das cadeias poliméricas e o mecanismo segue o transporte Caso II. Após um determinado tempo neste meio, as microesferas devem absorver líquido suficiente para formar uma camada geleificada, na qual a mobilidade das cadeias é grande, permitindo a fácil difusão do solvente para dentro da rede. O relaxamento do polímero é mais rápido que a penetração do solvente e conseqüente dissolução do RES, período em que predomina o mecanismo de liberação por difusão Fickiana, segundo um gradiente de concentração (MASARO e ZHU, 1999; CURY *et al.*, 2009).

Portanto, a difusão do RES deve ocorrer inicialmente através de poros e canais preenchidos por meio, antes da matriz intumescer significativamente e, após o intumescimento, o fármaco deve difundir através da matriz geleificada segundo um gradiente de concentração (CURY *et al.*, 2009).

Para a amostra M10 em meio ácido, o valor de b (12,57) indica que a liberação do RES ocorreu através de um mecanismo complexo, no qual o relaxamento das cadeias e a erosão da matriz polimérica estão envolvidos na liberação do fármaco e podem ocorrer simultaneamente durante o processo (CURY *et al.*, 2009).

Além disso, a amostra M10 liberou o RES mais lentamente em meio ácido que as amostras M9 e M17, pois em sua composição a proporção G:P (4:1), bem como a concentração de fármaco (0,5%) estão presentes no nível mais alto e, portanto, o efeito de redução das taxas de liberação foi mais pronunciado, segundo os resultados apresentados no item 5.3.1.

Para o ensaio em meio ácido seguido de tampão fosfato pH 6,8, o modelo de Weibull também foi o que melhor se correlacionou com os dados de liberação do fármaco, entretanto, valores de $r^2_{ajustado}$ igualmente relevantes foram encontrados para os modelos de Korsmeyer–Peppas (amostra M17) e Primeira ordem (amostra M9) (Tabela 12).

As amostras M9 e M17 novamente apresentaram mecanismos de liberação iguais entre si, contudo, neste ensaio em meios com diferentes valores de pH, os valores de $b > 1$ indicam o mecanismo do tipo complexo, em que intumescimento e erosão devem controlar a liberação do fármaco (CURY *et al.*, 2009). Já o valor de b (0,91) da amostra M10, indica uma combinação dos mecanismos de difusão Fickiana e transporte Caso II.

O modelo de Korsmeyer–Peppas é bastante útil para análises da liberação em que pouco se conhece sobre o mecanismo de liberação ou quando diversos mecanismos estão envolvidos na liberação (MANADAS *et al.*, 2002). Considerando os valores elevados de r^2_{ajustado} encontrados para esse modelo, os coeficientes k e n da equação de Korsmeyer–Peppas também foram determinados (Tabela 12).

A constante k do modelo de Korsmeyer–Peppas fornece uma medida da velocidade de liberação do fármaco (MÖCKEL e LIPPOLD). Para o ensaio de liberação em pH 1,2 e 6,8, as taxas de liberação até 60% de fármaco liberado foram muito semelhantes, o que pode ser observado pelos valores muito próximos de k , que variaram entre 12,58 e 12,60 (Tabela 12).

Considerando a forma esférica das microesferas, os valores de n entre 0,43 e 0,85 observados para todas as formulações no ensaio de dissolução em meio ácido seguido de tampão fosfato pH 6,8, indicam que o mecanismo de liberação corresponde ao transporte anômalo.

Neste caso, as velocidades de difusão e de relaxamento dos polímeros são aproximadamente da mesma magnitude, o que faz com que ambos os fenômenos ocorram ao mesmo tempo, sem que se possa distingui-los, sugerindo que a liberação se deve aos mecanismos de difusão e intumescimento/relaxamento das cadeias poliméricas (PASPARAKIS e BOUROPOULOS, 2006; MAITI *et al.*, 2011).

A liberação que segue o mecanismo de transporte anômalo geralmente se dá em sistemas de liberação controlada por intumescimento, pois nestes sistemas os fenômenos de difusão e intumescimento ocorrem simultaneamente (ARIFIN *et al.*, 2006).

Portanto, baseado nos resultados para os modelos de Weibull e Korsmeyer–Peppas, a liberação do RES deve ser altamente dependente do relaxamento das cadeias poliméricas, que por sua vez depende da absorção de líquidos e do intumescimento (CURY *et al.*, 2009).

Os comportamentos observados são consistentes com os dados apresentados no item 5.3.2.1, em que se observou significativa absorção de líquido e erosão das matrizes. Como a entrada de líquido na rede está relacionada ao relaxamento das cadeias e consequente erosão do sistema, bem como com a difusão das moléculas de fármaco para o meio, ambos os fenômenos devem ser fundamentais para a liberação do RES aprisionado nas microesferas duplamente reticuladas de GG:P.

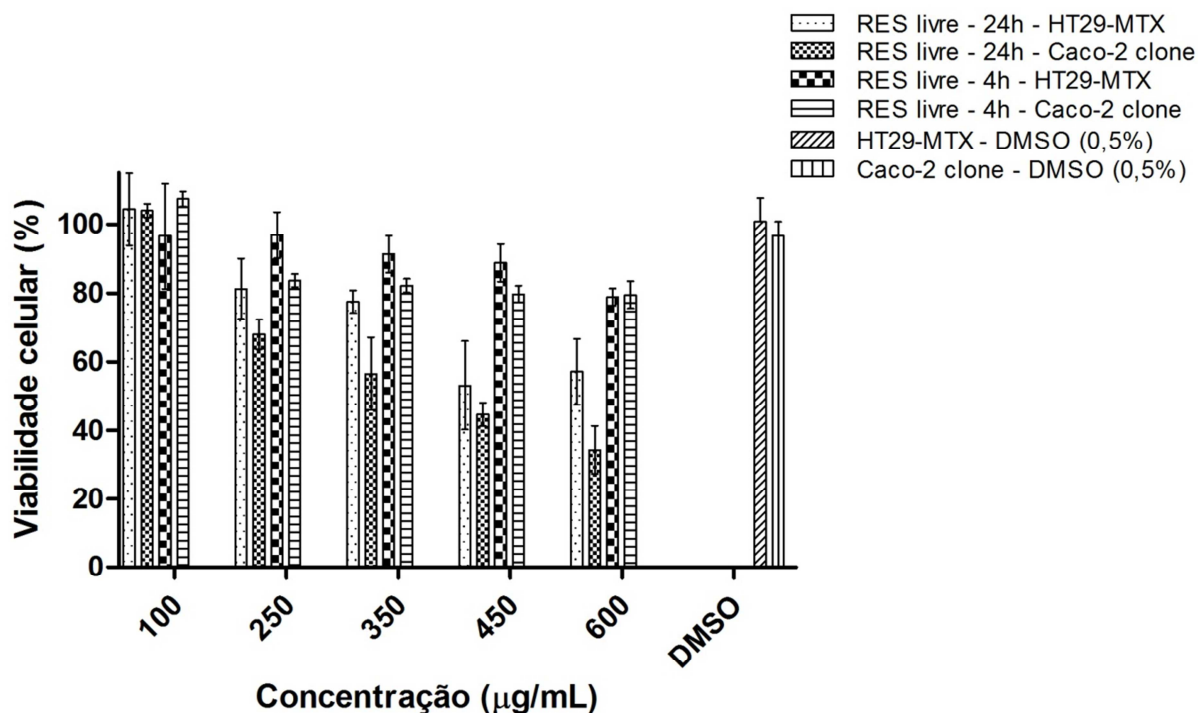
Os resultados de liberação do fármaco associados aos mecanismos de transporte indicam que tanto a composição das microesferas, no que se refere à proporção polimérica e à concentração de fármaco, quanto o pH do meio influenciam o controle das taxas de dissolução. Sendo assim, pode-se concluir que a amostra M10, cuja proporção GG:P é de 4:1, e a concentração de fármaco é de 0,5%, permitiu o maior controle das taxas de liberação do RES, prolongando a liberação por até 30 h.

5.5 Avaliação *in vitro* da citotoxicidade em células Caco-2 e HT29-MTX: Teste de viabilidade celular através do ensaio do MTT

Ensaio de viabilidade celular são extremamente importantes na fase de desenvolvimento dos sistemas de liberação de fármacos, uma vez que reconhecida a citotoxicidade do sistema, este pode então ser modificado ou excluído de estudos futuros.

Os resultados da citotoxicidade do RES livre estão apresentados no gráfico da Figura 17, que mostra a porcentagem de células viáveis em função da concentração de fármaco após períodos de incubação de 4 e 24h.

Figura 17: Viabilidade celular (%) das linhagens HT29-MTX e Caco-2 após 4 e 24h de incubação na presença de concentrações crescentes de RES livre (média ± DP) e após incubação em HBSS com 0,5% (v/v) de DMSO.



O solvente orgânico DMSO utilizado nas soluções de RES não foi citotóxico na concentração de 0,5% (v/v) sobre as células HT29-MTX, que apresentaram viabilidade de 100,7%, ou sobre as células Caco-2, cuja viabilidade foi de 96,6% (Figura 17).

É possível observar no gráfico (Figura 17) que o aumento na concentração de RES livre levou a uma redução da viabilidade celular após 24h de incubação para ambas as linhagens utilizadas, sendo mais pronunciada para as células Caco-2. Para este período de incubação, a viabilidade da linhagem HT29-MTX variou entre 53,12 e 104,33% e entre 34,22 e 103,96% para a linhagem Caco-2.

Em 24h de incubação, a menor concentração de RES (100 µg/mL) resultou na maior viabilidade celular ($p < 0,05$) tanto para as células HT29-MTX quanto para as Caco-2 (104,3 e 104,0 %, respectivamente).

Entretanto, nesse período, o fármaco livre apresentou efeitos tóxicos sobre as células HT29-MTX para concentrações acima de 450 µg/mL, e sobre as células Caco-2, para concentrações acima de 250 µg/mL. Sendo assim, o ensaio foi então realizado por um período reduzido de incubação, de apenas 4h, uma vez que esse é o tempo máximo para a execução do ensaio de permeabilidade *in vitro*, e, para esse experimento, as concentrações de fármaco ou de carreador utilizadas não podem ser tóxicas para as células que formam a monocamada no Transwell®.

Para o menor período de incubação (4h), nenhuma concentração de RES livre foi tóxica, tanto para as células HT29-MTX, cuja viabilidade variou entre 78,90 e 96,79%, quanto para células Caco-2, com viabilidade celular entre 79,51 e 107,34%.

Após 4h, a viabilidade das células Caco-2 frente a menor concentração de RES (100 µg/mL) foi significativamente maior ($p < 0,05$), sendo que não houve diferença significativa entre as demais concentrações (250 a 600 µg/mL) ($p > 0,05$). Já para as células HT29-MTX, não houve diferença estatisticamente significativa entre a viabilidade celular nas diferentes concentrações de fármaco avaliadas ($p > 0,05$).

Apesar de não se observar citotoxicidade do RES livre após 4h de incubação, a viabilidade das células Caco-2 foi significativamente menor que a viabilidade das células HT29-MTX para as concentrações 250, 350 e 450 µg/mL de fármaco ($p < 0,05$), o que pode estar relacionado à presença do muco secretado por essas células, que deve conferir maior proteção a elas.

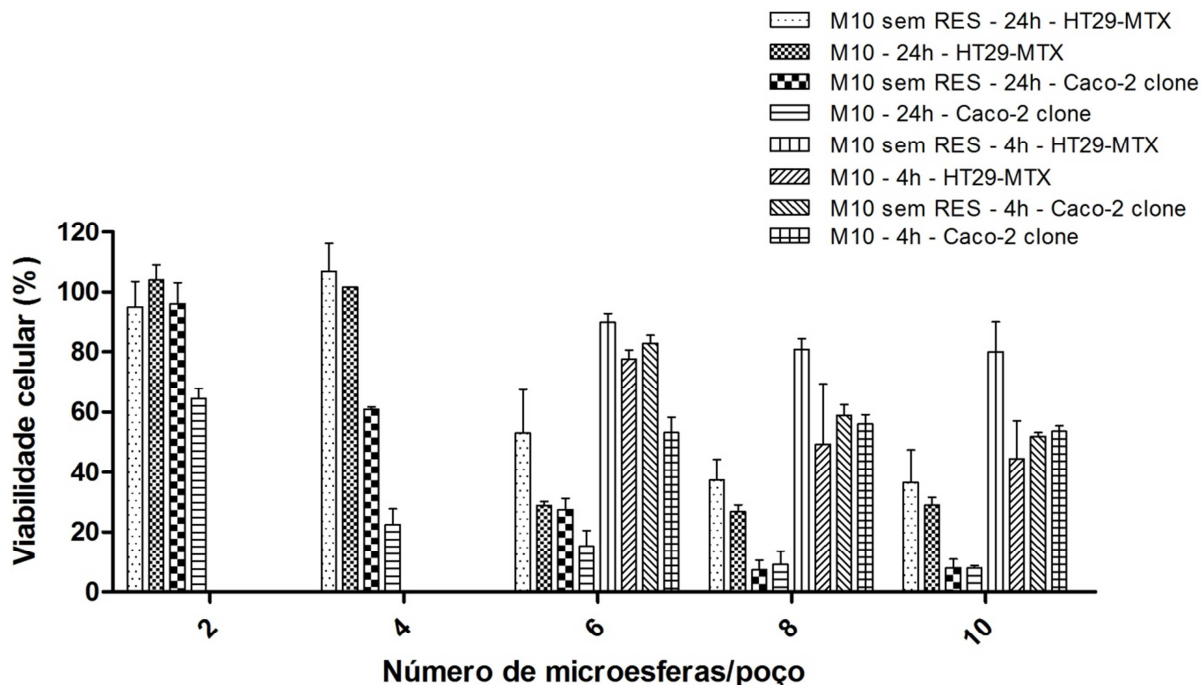
A citotoxicidade das microesferas, e, portanto, a segurança para atuarem como carreadores de fármacos para administração via oral foi avaliada através de experimentos de viabilidade celular. Microesferas duplamente reticuladas com e sem fármaco foram incubadas

por 24h com células HT29-MTX e Caco-2, a fim de avaliar a toxicidade do sistema carreador sem fármaco e na presença do RES.

Inicialmente, o ensaio de citotoxicidade com as microesferas foi realizado em placas de 96 poços, nas concentrações de 2 a 10 microesferas/poço. Entretanto, a difícil remoção das microesferas que ficavam aderidas ao fundo dos poços, junto às células, levou à remoção de grande número de células, resultando em baixa viabilidade celular para todas as concentrações, o que inviabilizou o estudo nessas placas. A partir de então, os ensaios foram realizados em placas de 24 poços, cuja área é maior e permitia a melhor manipulação das microesferas.

Os resultados de viabilidade celular estão apresentados no gráfico da Figura 18, que mostra a porcentagem de células viáveis em função da concentração de microesferas de GG:P duplamente reticuladas. Como em 24h de incubação foi possível observar uma redução na viabilidade celular para as maiores concentrações de microesferas, o ensaio foi também realizado por um período de 4h, utilizando somente concentrações acima de 6 microesferas/poço.

Figura 18: Viabilidade celular (%) das linhagens HT29-MTX e Caco-2 após 4 e 24h de incubação na presença de concentrações crescentes de microesferas contendo ou não RES (média ± DP).



Para 24h de incubação na presença de microesferas duplamente reticuladas sem fármaco, a viabilidade da linhagem HT29-MTX variou entre 36,6 e 106,9% e entre 7,3 e 96,2% para a linhagem Caco-2. Essas amostras apresentaram citotoxicidade para concentrações acima

de 6 microesferas/poço para a linhagem HT29-MTX, e acima de 4 microesferas/poço para as células Caco-2, sendo que nessa linhagem observou-se uma redução significativa na viabilidade celular com o aumento da concentração de microesferas.

A redução do período de incubação levou a um aumento significativo da viabilidade celular para as células HT29-MTX ($p < 0,05$), sendo que as microesferas não foram citotóxicas, com valores entre 80,0 e 89,7% de células viáveis. Também houve um aumento significativo da viabilidade celular para as células Caco-2 ($p < 0,05$), entretanto as concentrações de 8 e 10 microesferas/poço ainda foram tóxicas para essa linhagem, que apresentou valores entre 52,0 e 82,9% de células viáveis. O muco secretado pelas células HT29-MTX deve ter sido o responsável pela maior viabilidade desta linhagem, uma vez que cria uma barreira adicional, a qual evita o contato direto da microesfera com as células e deve conferir maior proteção a elas.

Assim como observado para as microesferas sem fármaco, as microesferas contendo RES também apresentaram citotoxicidade após 24h de incubação para concentrações acima de 6 microesferas/poço para a linhagem HT29-MTX, e todas as concentrações foram tóxicas sobre as células Caco-2. Neste período, a viabilidade da linhagem HT29-MTX variou entre 26,8 e 104,0% e entre 7,8 e 64,5% para a linhagem Caco-2.

A presença de fármaco nas amostras não alterou a viabilidade das células HT29-MTX após 24h de incubação, quando comparadas com as microesferas vazias ($p > 0,05$). Entretanto, o RES encapsulado provocou uma redução significativa da viabilidade celular da linhagem Caco-2 nas menores concentrações (2 e 4 microesferas/poço) ($p < 0,05$), porém ambas as amostras, com e sem RES, foram igualmente citotóxicas para as concentrações mais elevadas (de 6 a 10 microesferas/poço) sobre essas células.

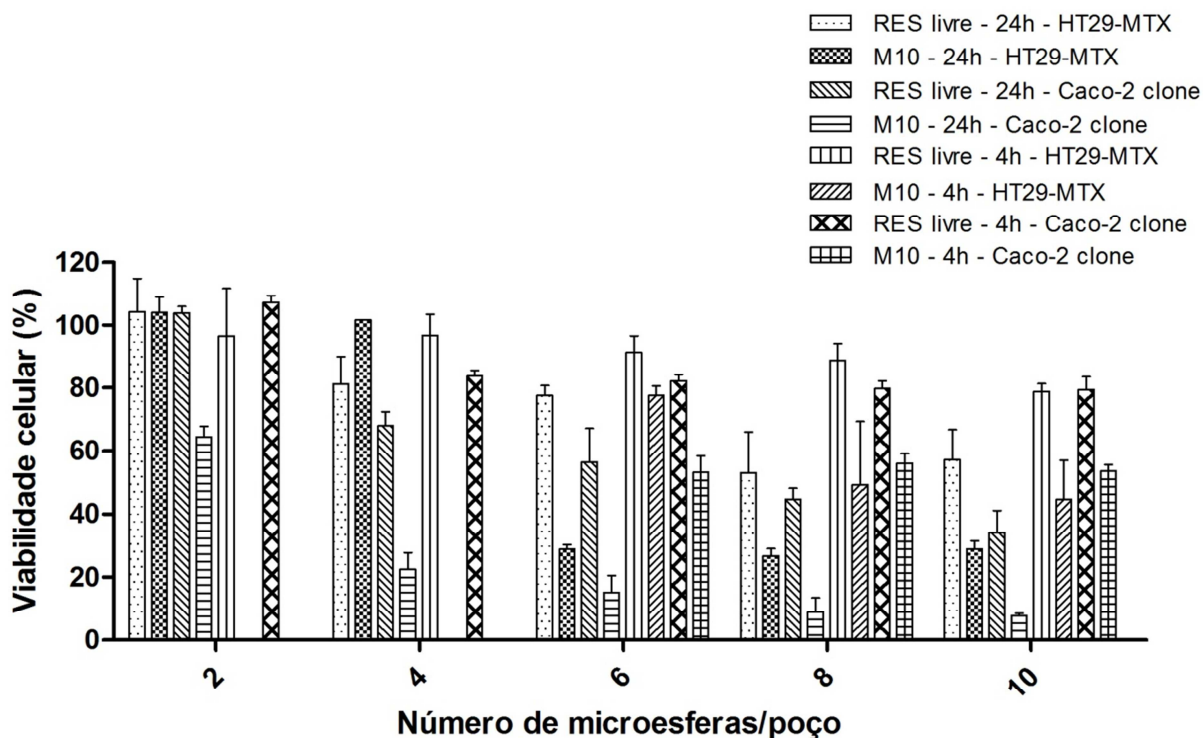
Em 4h de incubação com microesferas contendo RES, todas as amostras foram tóxicas para ambas as linhagens, exceto para a concentração de 6 microesferas/poço sobre as células HT29-MTX. A viabilidade celular variou entre 44,6 e 77,6% para células HT29-MTX e entre 53,2 e 56,1% para células Caco-2. O fármaco encapsulado reduziu a viabilidade das células HT29-MTX e das células Caco-2 na concentração de 6 microesferas/poço ($p < 0,05$) após 4 h de incubação quando comparadas com as microesferas vazias.

Para as microesferas contendo RES, a redução do período de incubação levou a um aumento significativo da viabilidade celular das células HT29-MTX na concentração de 6 microesferas/poço, que deixou de ser tóxica ($p < 0,05$). No entanto, o menor período de incubação não alterou significativamente a viabilidade destas células para as concentrações mais elevadas de 8 e 10 microesferas/poço ($p > 0,05$), sendo que estas continuaram sendo citotóxicas.

Já para as células Caco-2, a redução do período de incubação levou a um aumento significativo na porcentagem de célula viáveis para todas as concentrações ($p < 0,05$), porém esse aumento não foi suficiente para deixarem de ser citotóxicas.

A fim de comparar o efeito do fármaco livre e encapsulado nas microesferas, as células foram incubadas na presença de concentrações crescentes de RES livre (100 a 600 $\mu\text{g/mL}$), equivalentes ao total de fármaco encapsulado nas diferentes quantidades de microesferas avaliadas (2 a 10 microesferas/poço). O gráfico da Figura 19 apresenta a comparação entre a viabilidade celular (%) após a incubação com microesferas contendo RES (M10) e o fármaco livre.

Figura 19: Viabilidade celular (%) das linhagens HT29-MTX e Caco-2 após 4 e 24h de incubação na presença de microesferas contendo RES (M10) e de concentrações equivalentes de fármaco livre (média \pm DP).



É possível observar que a viabilidade celular foi, na maioria das vezes, menor para o RES encapsulado nas microesferas (Figura 19). Para as células Caco-2, o fármaco encapsulado nas microesferas apresentou maior citotoxicidade que o fármaco livre em todas as concentrações testadas, tanto em 4h quanto em 24h de incubação ($p < 0,05$).

Para as células HT29-MTX, também se observou maior citotoxicidade para as microesferas contendo RES em comparação com o fármaco livre, no entanto somente para as

concentrações elevadas de 6 a 10 microesferas/poço em 24h e para 10 microesferas/poço em 4h ($p < 0,05$).

A partir dos resultados de citotoxicidade apresentados, foi possível selecionar concentrações não tóxicas de RES livre e de microesferas para a realização dos ensaios de permeabilidade *in vitro* empregando os modelos de monocultura de células Caco-2 e co-cultura tripla de células.

5.6 Avaliação da permeabilidade *in vitro* em monocultura de células Caco-2 e em co-cultura tripla de células

Os ensaios de permeabilidade foram realizados unidirecionalmente, do compartimento apical para o basolateral, e foram utilizadas concentrações não tóxicas de fármaco livre e das microesferas, selecionadas a partir dos resultados de viabilidade celular (item 5.5). O RES livre também foi testado como comparativo do desempenho dos sistemas na permeação do fármaco.

O uso de células permite, a partir de estudos *in vitro*, a avaliação da permeabilidade de fármacos em modelos que simulam de maneira bastante fidedigna as condições encontradas *in vivo* e estes estudos são de fundamental importância para o desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos, para garantir o sucesso e a reprodutibilidade do sistema. Além disso, técnicas *in vitro* evitam o uso de animais na pesquisa, e são menos trabalhosas e mais econômicas que os experimentos *in vivo* (BEHRENS et al., 2001; ANTUNES et al., 2013).

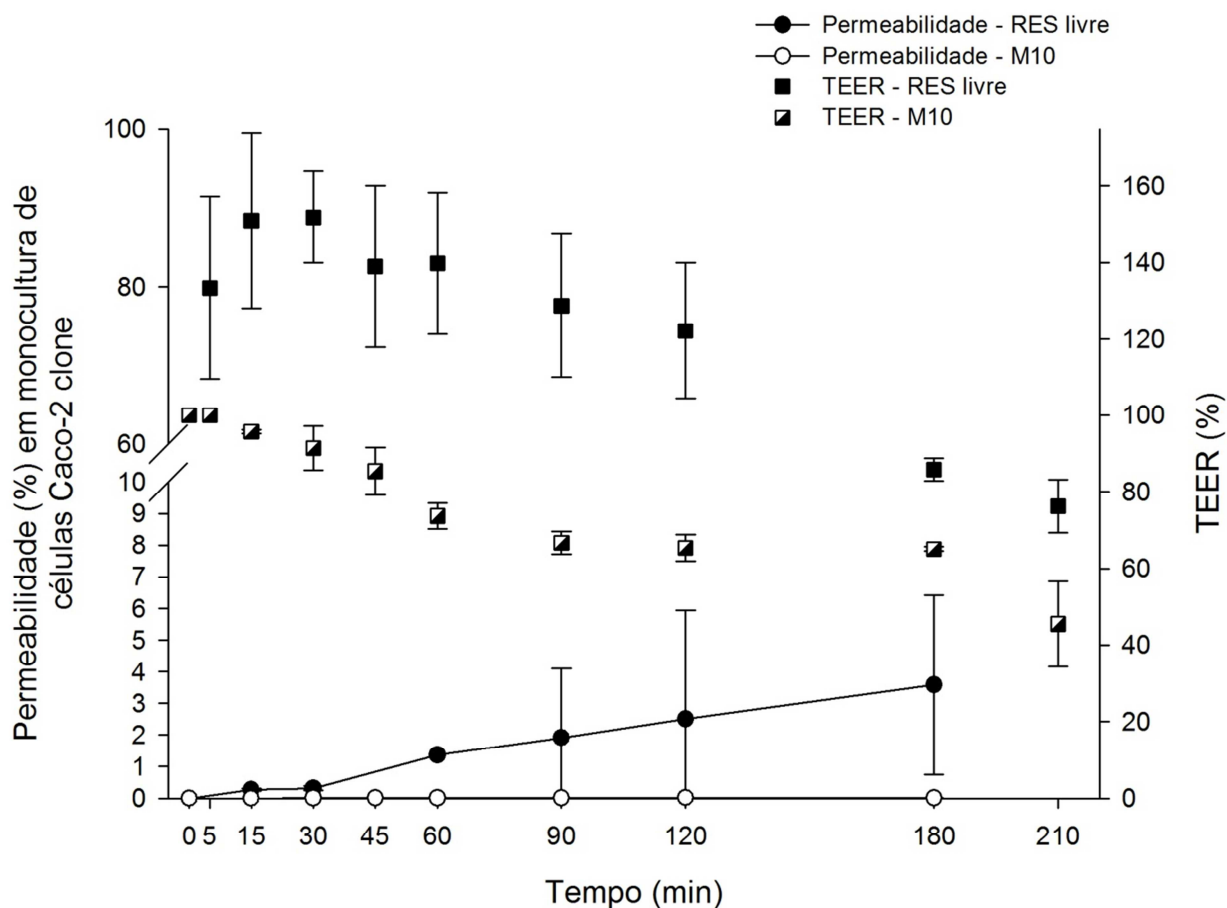
Modelos celulares do intestino humano têm sido empregados para avaliar a permeabilidade intestinal de fármacos em sistemas de liberação controlada para a administração pela via oral. Diferentes células podem compor o modelo, sendo que cada linhagem apresenta características e funções específicas no epitélio intestinal (GAGNON *et al.*, 2013). Como a presença de muco tem papel fundamental na adesão e pode afetar significativamente o desempenho de um sistema de liberação mucoadesivo, como é o caso das microesferas de GG:P, foram utilizados os modelos de monocultura de células Caco-2 e co-cultura tripla de células a fim de se avaliar a influência do muco.

5.6.1 Permeabilidade em monocultura de células Caco-2

A monocultura de células Caco-2 é um modelo que foi introduzido no final da década de 1980 e se tornou o padrão ouro entre os modelos de permeabilidade intestinal *in vitro* (LI et al., 2003), uma vez que estas células são capazes de se diferenciarem e apresentarem um fenótipo parecido, tanto funcional quanto morfológico, aos enterócitos, ou seja, às células absorptivas presentes no intestino humano (HILGENDORF *et al.*, 2000; PEREIRA *et al.*, 2015).

Os resultados do perfil de permeabilidade do RES em monocultura de células Caco-2 a partir das microesferas e do fármaco livre estão apresentados no gráfico da permeabilidade (%) em função do tempo (Figura 20).

Figura 20: Permeabilidade (%) e TEER (%) em função do tempo durante os experimentos de permeabilidade *in vitro* empregando modelo de monocultura de células Caco-2 para o RES livre e encapsulado em microesferas de GG:P (M10) (média ± DP; n=3).



É possível observar que o RES, tanto livre quanto encapsulado nas microesferas, foi capaz de permear a monocamada de células Caco-2, sendo que a permeação do fármaco livre foi significativamente maior que a permeação a partir da amostra M10 ao final de 180 min ($p < 0,05$), atingindo uma permeabilidade média de 3,6%, contra apenas 0,02% para as microesferas.

Considerando que, teoricamente, a concentração de RES disponível para a permeação era semelhante para ambos os casos, e que, ainda, os valores de TEER foram menores para o teste com as microesferas, os menores valores de permeação (aproximadamente 180 vezes menor) sugerem a maior interação entre as células e o RES encapsulado, comportamento favorável ao objetivo pretendido neste estudo.

Deve-se considerar ainda que o RES livre, quando administrado pela via oral, é rapidamente absorvido no estômago e intestino delgado, e metabolizado por glicuronidação e sulfatação, não atingindo as células colônicas em concentração suficiente para promover o efeito terapêutico desejado neste sítio de interesse (DAS *et al.*, 2008).

O gráfico da Figura 20 também apresenta o TEER (%) em função do tempo de ensaio. Ao final dos experimentos, observou-se uma redução do TEER (%), sendo que os valores finais para esse modelo foram de $76,2 \pm 6,9\%$ e $45,5 \pm 11,1\%$ em relação ao TEER inicial para os ensaios com o fármaco livre e microesferas, respectivamente.

Alguns polímeros, como a quitosana, por exemplo, são capazes de abrir as junções oclusivas que mantêm as células Caco-2 fortemente unidas, e levam à redução momentânea do TEER (SANDRI *et al.*, 2010). No entanto, os valores podem retornar aos valores inicialmente observados, após a remoção do polímero e um período de incubação que permita a recuperação das junções, desde que não tenha ocorrido morte celular.

Considerando que concentrações de RES e microesferas utilizadas para o teste de permeabilidade não eram citotóxicas (item 5.5), a redução observada nos valores de TEER pode ser atribuída à abertura reversível das junções oclusivas. No entanto, como não foram realizados estudos acerca da recuperação da monocamada por períodos maiores que 30 min, não é possível afirmar se o declínio observado nos valores de TEER após os ensaios com as microesferas é reversível ou se corresponde à morte celular.

5.6.2 Permeabilidade em co-cultura tripla de células

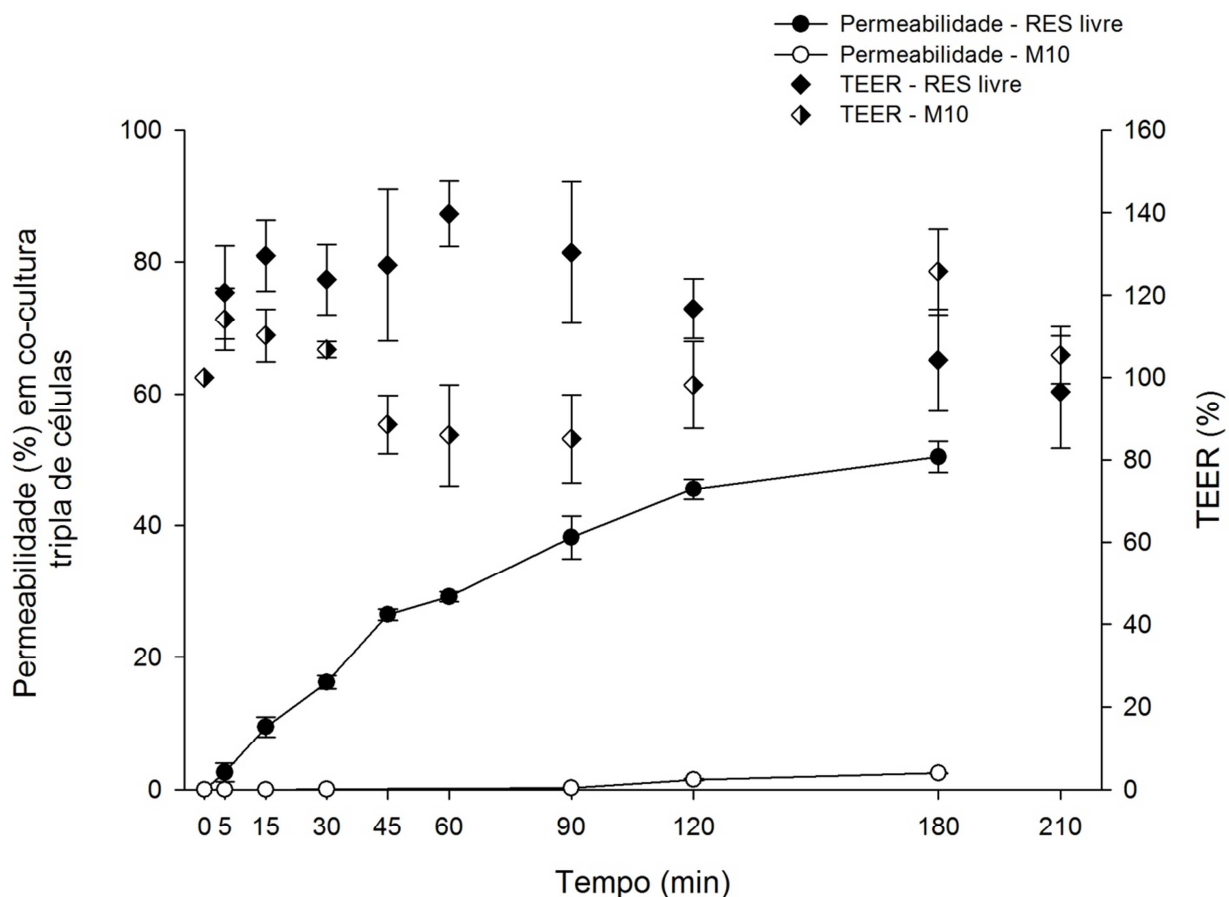
Na busca por se mimetizar mais fielmente as condições *in vivo*, a co-cultura de células Caco-2 com células HT29-MTX secretoras de muco tem sido explorada, já que a presença de muco reconhecidamente influencia a permeação dos fármacos (PEREIRA *et al.*, 2015). Além disso, a monocamada em que ambas as células estão presentes constitui uma barreira diferenciada, em que a permeabilidade pode ser modificada devido às mudanças na resistência paracelular e no transporte via P-gp, uma vez que na co-cultura as junções oclusivas são mais fracas e permitem maior permeação via rota paracelular e há menor efluxo do fármaco, já que não há superexpressão de P-gp como no modelo de monocultura de células Caco-2 (HILGENDORF *et al.*, 2000).

A co-cultura celular possibilita a reprodução mais fiel do ambiente alvo de estudo, como é o caso da co-cultura tripla constituída de células Caco-2 para reproduzir as características dos enterócitos, células HT-29MTX capazes de secretar muco e células Raji B linfócitos, as quais induzem a diferenciação do fenótipo das células Caco-2 em células M, de forma a mimetizar

precisamente o epitélio intestinal humano recoberto por muco (ARAÚJO e SARMENTO, 2013).

Os resultados do perfil de permeação do RES em co-cultura tripla a partir das microesferas e do fármaco livre estão apresentados no gráfico da permeabilidade (%) em função do tempo (Figura 21).

Figura 21: Permeabilidade (%) e TEER (%) em função do tempo durante os experimentos de permeabilidade *in vitro* empregando modelo de co-cultura tripla de células para o RES livre e encapsulado em microesferas duplamente reticuladas de GG:P (média ± DP; n=3).



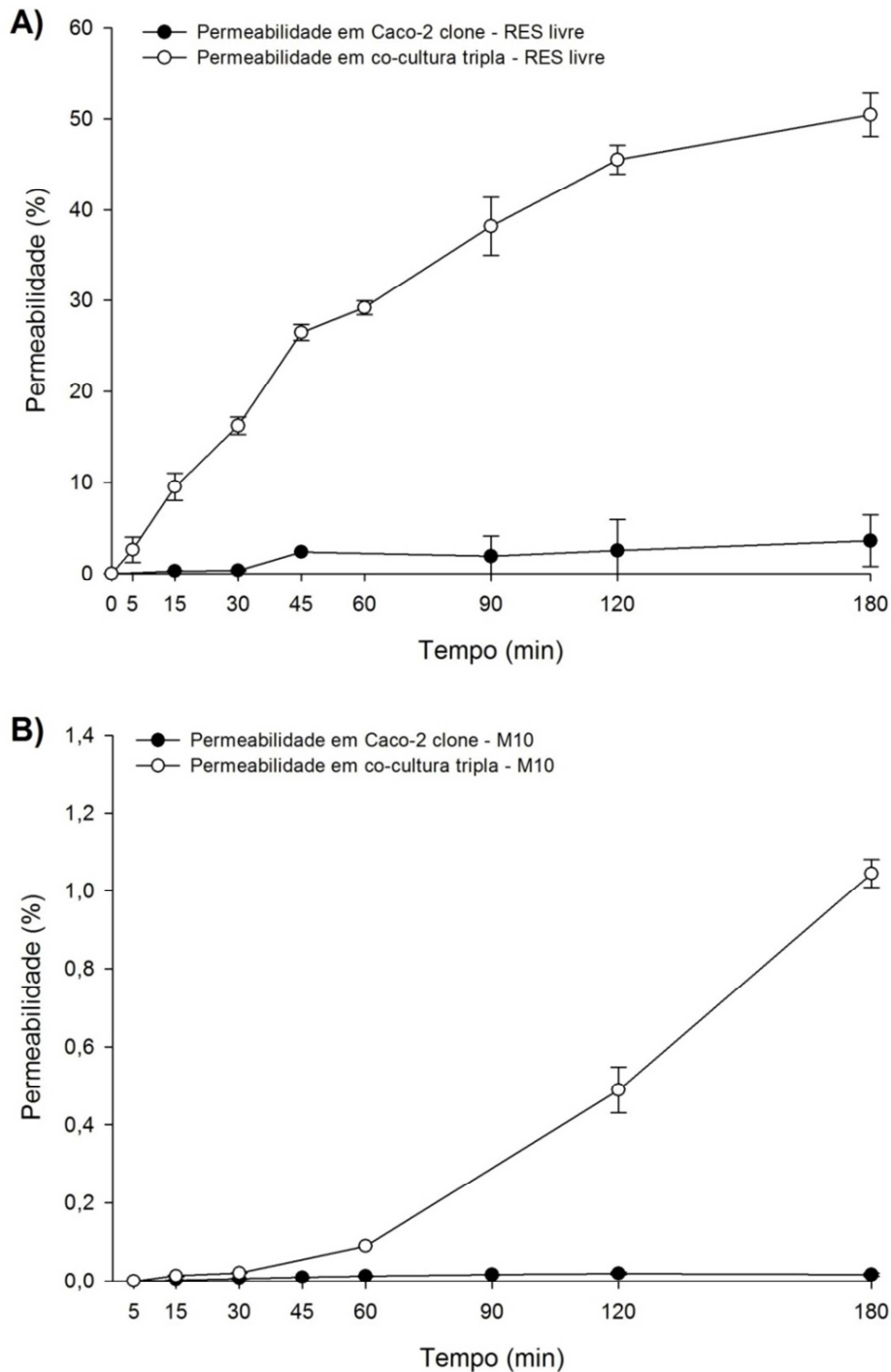
Para a co-cultura tripla, repetiu-se o mesmo padrão observado para as monoculturas de células Caco-2, em que o RES foi capaz de permear a monocamada estando livre ou encapsulado nas microesferas. No entanto, a permeação do fármaco livre após 180 min (50,4%) foi significativamente maior em comparação com o RES encapsulado nas microesferas (2,5%) ($p < 0,05$).

Novamente se observou a redução da permeabilidade do RES encapsulado em relação ao RES livre (20 vezes menor).

Para o modelo triplo, os valores finais de TEER (%) em relação ao inicial foram de 96,5% e 105,4% para o fármaco livre e microesferas, respectivamente (Figura 21).

Ao comparar a permeabilidade nos dois diferentes modelos, pode-se observar a partir dos gráficos apresentados nas Figuras 22 A e B, que a porcentagem de fármaco permeado ao final dos 180 min foi sempre maior no modelo tripla ($p < 0,05$). Para o RES livre, a permeabilidade na co-cultura tripla foi cerca de 14 vezes maior que na monocultura e para as microesferas, o valor foi 62,5 vezes maior na co-cultura tripla.

Figura 22: Permeabilidade (%) e TEER (%) em função do tempo durante os experimentos de permeabilidade in vitro empregando monocultura de células Caco-2 e co-cultura tripla de células para A) RES livre e B) RES encapsulado em microesferas (M10) (média \pm DP; n=3).



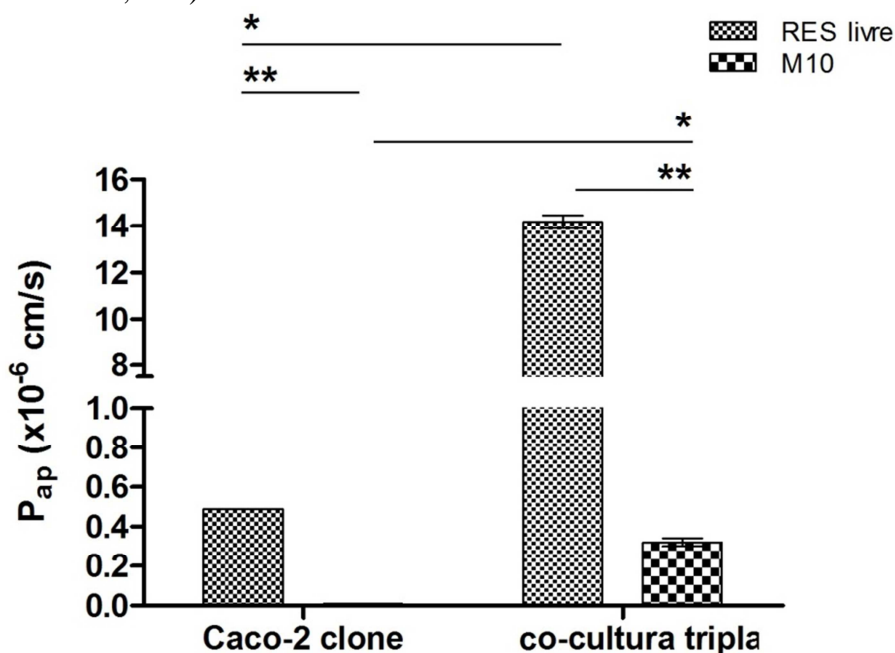
A presença de células capazes de secretar muco na co-cultura tripla modifica além da superfície, que passa a ser recoberta por muco, a geometria da junção entre as células e a força dessa junção, que é diminuída, reduzindo os valores de TEER e mimetizando melhor as condições fisiológicas (HILGENDORF *et al.*, 2000).

Sendo assim, a maior permeabilidade nas co-culturas triplas deve estar relacionada à elevada capacidade mucoadesiva demonstrada pelas microesferas (item 5.10, Capítulo II), que são capazes de interagir fortemente com muco e permanecer em contato mais íntimo com a mucosa, favorecendo também a permeação do fármaco. Somam-se a isso as junções oclusivas mais fracas deste modelo e a presença de células com fenótipo de células M, que facilitam a passagem de moléculas e resultam em maior permeabilidade.

5.7 Permeabilidade aparente (P_{ap})

Os resultados de permeabilidade aparente para 3h de ensaio de permeabilidade estão apresentados no gráfico da Figura 23:

Figura 23: Resultados da permeabilidade aparente (10^{-6} cm/s) do RES em diferentes modelos celulares (média \pm DP; n=3).



Para ambos os modelos, a P_{ap} do RES livre foi significativamente maior que a P_{ap} das microesferas ($p < 0,05$), corroborando os dados de permeabilidade, em que se observou maior permeabilidade do fármaco livre em relação ao fármaco encapsulado.

Comparando-se os diferentes modelos celulares, a P_{ap} no modelo triplo foi invariavelmente maior que a P_{ap} em monocultura de células Caco-2 (Figura 23), tanto para o

RES livre quanto para as microesferas ($p < 0,05$), corroborando os resultados de permeabilidade que foi sempre maior no modelo de co-cultura tripla.

Outros estudos também relataram a permeação do RES livre através de monocamadas de células Caco-2, indicando a provável absorção *in vivo*. O resultado de P_{ap} observado para o RES livre em monocultura de células Caco-2 foi menor que o reportado por Kaldas e colaboradores, que observaram uma P_{ap} de 7×10^{-6} cm/s para o RES livre para este mesmo modelo celular após 1h de permeação (KALDAS *et al.*, 2003). No entanto, Li e colaboradores (2003) observaram uma P_{ap} ainda maior, de 20×10^{-6} cm/s para o RES, evidenciando uma rápida difusão do fármaco (LI *et al.*, 2003).

Os menores valores de P_{ap} para o fármaco encapsulado nas microesferas de GG:P evidenciam a vantagem em se administrar o RES em um sistema de liberação controlada mucoadesivo, capaz de proteger o fármaco e direcioná-lo para um sítio específico, onde poderá chegar em concentrações efetivas para desempenhar seu efeito terapêutico localizado, reduzindo a absorção sistêmica, e, conseqüentemente, efeitos colaterais.

5.8 Resistência Elétrica Transepitelial (TEER)

A medida da resistência elétrica transepitelial é uma maneira não destrutiva de avaliar a função de barreira do epitélio e permite a caracterização das monocamadas celulares que serão empregadas nos experimentos de permeação *in vitro* (ODIJK *et al.*, 2015).

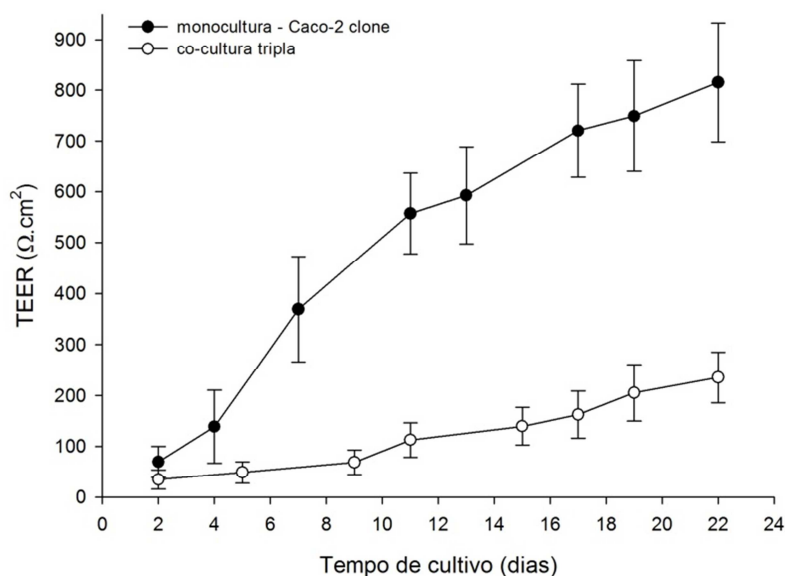
As medidas de TEER permitem inferir qualitativamente se a monocamada encontra-se saudável e quantitativamente indicam a confluência das células, sendo que um aumento nos valores de TEER indica que a monocamada celular está conflúente, e, assim, garante-se que o fármaco quantificado na câmara basolateral atravessou a camada de células.

Entretanto, os valores de TEER reportados na literatura para um mesmo modelo podem variar muito, devido à influência de alguns parâmetros como a composição do meio de cultura empregado, a densidade de células semeadas e o número de passagem das células utilizadas (HILGENDORF *et al.*, 2000; ODIJK *et al.*, 2015). Além disso, fatores relacionados aos materiais, como o tipo de suporte físico sobre o qual as células foram semeadas, e a qualidade e as condições da superfície dos eletrodos utilizados nas medições também podem influenciar os resultados (ODIJK *et al.*, 2015).

5.8.1 Influência do tempo de cultura e do modelo celular nos valores de TEER

Realizou-se o monitoramento do TEER durante todo o tempo de cultura das células nos *inserts*, a fim de acompanhar a formação da monocamada celular e sua confluência. Os valores de TEER ($\Omega \cdot \text{cm}^2$) em função do tempo de cultura das monocamadas para os diferentes modelos cultivados nos *inserts* está apresentado no gráfico da Figura 24.

Figura 24: Gráfico da resistência elétrica transepitelial (TEER, $\Omega \cdot \text{cm}^2$) em função do tempo de cultura (dias) das monocamadas celulares em *inserts* (média \pm DP).



Pode-se observar que as monoculturas de células Caco-2 apresentaram valores de TEER ($\Omega \cdot \text{cm}^2$) significativamente maiores que o modelo de co-cultura tripla, conforme demonstrado por Araújo e Sarmiento (2013), atingindo um elevado valor médio de $815,4 \pm 117,3 \Omega \cdot \text{cm}^2$ após 22 dias de cultivo. Já para o modelo de co-cultura tripla, o maior valor médio apresentado após 22 dias de cultivo foi de $235,9 \pm 49,5 \Omega \cdot \text{cm}^2$.

As junções entre as células absorptivas e as células secretórias em co-culturas são mais fracas, conforme mencionado anteriormente, o que reduz os valores de TEER e os tornam mais semelhantes aos valores reportados para o cólon humano *in vivo*, cujo TEER é de aproximadamente $100 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (HILGENDORF *et al.*, 2000).

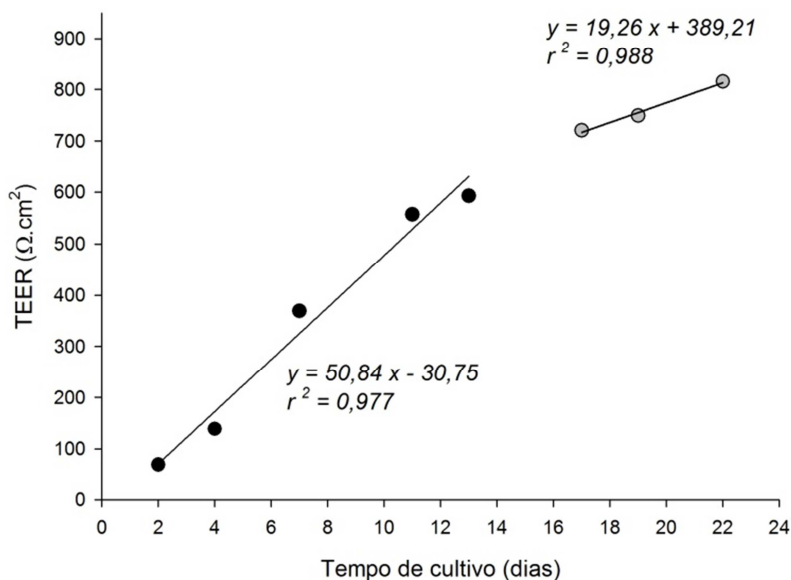
Através do gráfico apresentado na Figura 24 é possível observar que os valores de TEER aumentaram rapidamente para o modelo de monocultura Caco-2, e cresceram durante todo o desenvolvimento da monocamada no *insert*. É possível verificar uma fase inicial de crescimento acelerado e constante entre os dias 0 e 13, e uma fase final entre os dias 17 e 22, de

crescimento também constante, porém mais lento que no início. O mesmo comportamento foi observado por Gagnon e co-autores (2013) para o crescimento de monoculturas de células Caco-2, que após 14 dias de crescimento apresentaram TEER igual a $560 \pm 23 \Omega \cdot \text{cm}^2$, semelhante aos valores observados para o mesmo período de crescimento neste trabalho.

Os valores de TEER para monocamadas de células Caco-2 são bastantes variáveis na literatura, sendo que Kernéis e colaboradores reportaram valores de TEER entre 300 e 400 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ após 14 dias de cultivo, enquanto valores médios de 700 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ foram reportados por Rodriguez-Gaztelumendi e co-autores, após 12 dias de cultivo (KERNÉIS *et al.*, 2000; RODRIGUEZ-GAZTELUMENDI *et al.*, 2011; ODIJK *et al.*, 2015).

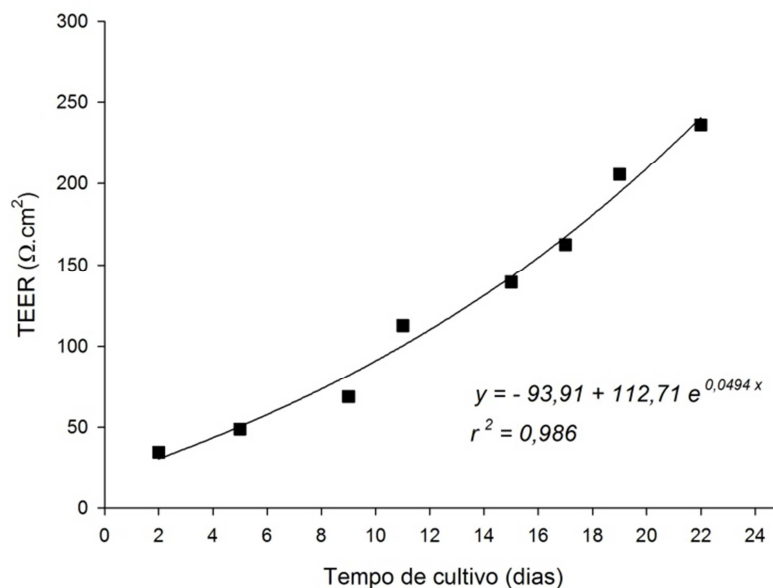
A diferença entre as velocidades de crescimento da monocamada de células Caco-2 pode ser observada através das inclinações das retas que descrevem os valores de TEER durante o crescimento, apresentadas no gráfico da Figura 25.

Figura 25: Valores de TEER ($\Omega \cdot \text{cm}^2$) em função do tempo de cultivo (dias) da monocamada de células Caco-2.



Já para os modelos de co-cultura tripla, os valores de TEER apresentaram um crescimento exponencial ($r^2 = 0,986$) durante os 22 dias de cultivo, como mostra o gráfico apresentado na Figura 26.

Figura 26: Valores de TEER ($\Omega \cdot \text{cm}^2$) em função do tempo de cultivo (dias) da monocamada para o modelo de co-cultura tripla de células.



5.8.2 Variação do TEER durante os ensaios de permeabilidade *in vitro* em monocultura de células Caco-2 e em co-cultura tripla de células

O TEER foi medido imediatamente antes do início dos testes de permeabilidade, quando as células ainda estavam incubadas com meio DMEM suplementado, e, após a troca por HBSS, antes de adicionar as amostras para iniciar o experimento, mediu-se novamente o TEER, sendo este considerado o valor de TEER inicial.

Para ambos os modelos celulares, os valores de TEER em HBSS, no tempo zero de permeabilidade, foram menores que os valores apresentados pelas monocamadas quando ainda estavam incubadas com DMEM suplementado. Verificou-se um declínio médio de 11,4% na resistência elétrica transepitelial com a substituição do meio DMEM por HBSS para o modelo Caco-2. Para as co-culturas triplas, o TEER reduziu em média 19,34%, uma redução significativamente maior que para as monoculturas de células Caco-2 ($p < 0,05$).

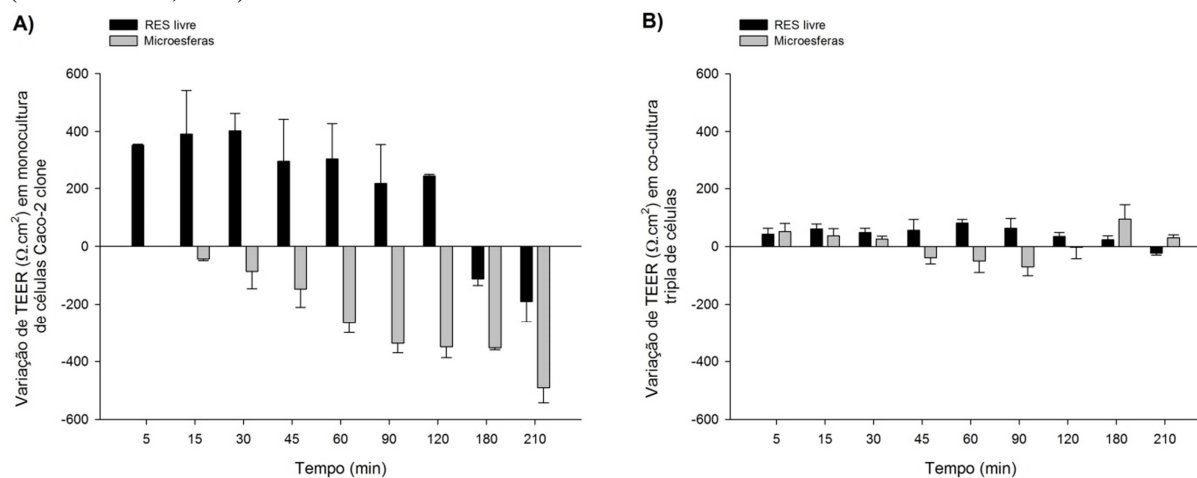
Durante os experimentos de permeabilidade, mediu-se o TEER imediatamente antes de cada coleta, e os valores para os testes em monocultura de células Caco-2 variaram entre 597,8 – 1190,9 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ e entre 460,8 – 1011,8 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ para o fármaco livre e microesferas, respectivamente. Os valores foram elevados e considerados aceitáveis para monocamadas dessa linhagem celular, sendo descritos por outros autores em experimentos de permeação semelhantes ao realizado neste trabalho (KERNÉIS *et al.*, 2000; SANDRI *et al.*, 2010).

Os valores médios de TEER durante os ensaios de permeação empregando co-cultura tripla de células variaram entre 197,7 – 286,4 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ e entre 288,0 – 453,0 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ para os

ensaios com o fármaco livre e microesferas, respectivamente, valores que também podem ser considerados aceitáveis para esse modelo celular (ARAÚJO e SARMENTO, 2013).

Posteriormente avaliou-se a variação em relação ao TEER inicial e os resultados para os ensaios com o fármaco livre e as microesferas em monocultura Caco-2 e em co-cultura tripla de células estão apresentados no gráfico da Figura 27. Os valores representam a diferença entre o valor de TEER no tempo t e o TEER inicial ($\Omega.cm^2$).

Figura 27: Variação do TEER ($\Omega.cm^2$) em relação ao TEER inicial durante o ensaio de permeabilidade *in vitro* em A) monocultura de células Caco-2 e B) co-cultura tripla de células (média \pm DP; n=3).



* o valor inicial foi considerado o TEER no tempo zero, medido antes da adição das amostras.

Observando os gráficos apresentados na Figura 27, é possível verificar que a variação dos valores de TEER foi maior para o modelo baseado em células Caco-2 (Figura 26 A) que para o modelo triplo (Figura 26 B).

Para a monocultura de células Caco-2, observou-se um aumento nos valores de TEER entre 5 e 120 min para o fármaco livre. Já para as microesferas, a variação foi sempre negativa.

Para o modelo triplo, a variação de TEER durante o ensaio (5 a 180 min) foi sempre positiva para o RES livre. Para as microesferas, houve uma pequena variação negativa entre 45 e 120 min.

Após o término dos experimentos, as monocamadas celulares foram cuidadosamente lavadas a fim de remover as amostras, e incubadas com HBSS. Após um período de equilíbrio de 30 min, mediu-se o TEER final, a fim de avaliar a viabilidade das células e sua capacidade de retomar a sua confluência inicial. Para a monocultura, a variação do TEER final foi negativa para o RES livre e para as microesferas. Já para o modelo triplo, a variação foi negativa somente para o RES livre, entretanto, essa variação foi significativamente menor que a observada para o fármaco livre na monocultura Caco-2 ($p < 0,05$).

Tem sido demonstrado que os valores de TEER podem diminuir durante os ensaios de permeabilidade empregando células Caco-2, o que pode acarretar em um aumento da permeabilidade do fármaco. Entretanto, isto pode ser uma situação que ocorre apenas *in vitro*, não sendo observada no intestino humano (ARAÚJO e SARMENTO, 2013). Além disso, é necessário avaliar a variação do TEER com cautela, a fim de garantir que a mudança não esteja relacionada com morte celular e destruição da monocamada.

Avaliando-se a diferença entre os valores inicial e final de TEER em porcentagem e em valores absolutos ($\Omega \cdot \text{cm}^2$), pode-se ter um bom indicativo da integridade das monocamadas. A variação do TEER em porcentagem pode ser visualizada nos gráficos apresentados nas Figuras 20 e 21. A redução observada para o fármaco livre foi de 23,8% na monocultura, sendo que o valor final médio do TEER foi de $597,8 \Omega \cdot \text{cm}^2$. Na co-cultura tripla a redução foi de 3,5%, e o valor final médio do TEER foi de $197,7 \Omega \cdot \text{cm}^2$. Para as microesferas, observou-se redução de 54,5% na monocultura Caco-2 e aumento de 5,4% na co-cultura tripla, sendo que os valores finais médios do TEER foram de 460,8 e $375,2 \Omega \cdot \text{cm}^2$, respectivamente.

Já é descrito na literatura que a abertura das junções oclusivas leva à redução dos valores de TEER. No entanto, o menor dano provocado na monocamada também é capaz de reduzir drasticamente os valores de TEER. Segundo Odijk e co-autores, uma variação de 0,4% na área de cobertura da monocamada no *insert*, pode reduzir os valores de TEER em 80%, ou seja, o TEER de uma monocamada que recobre 100% da área de crescimento pode ser reduzido para 20% do valor inicial se as células passarem a recobrir 99,6% da área do *insert*.

Ainda segundo esses autores, os valores de TEER podem ser menores nas monocamadas devido a danos, e, mesmo assim, testes com corantes fluorescentes podem demonstrar a boa propriedade de barreira dessas células, com junções oclusivas ainda fortes (ODIJK *et al.*, 2015)

Sendo assim, observando os valores finais de TEER e a redução (%) em relação ao valor inicial para ambos os modelos empregados nos ensaios de permeabilidade, pode-se concluir que as monocamadas permaneceram relativamente intactas ao final dos experimentos e que a redução não deve ter sido relacionada à morte celular. Deste modo, os resultados de permeabilidade refletem o transporte do fármaco através das barreiras celulares que compõem as monocamadas.

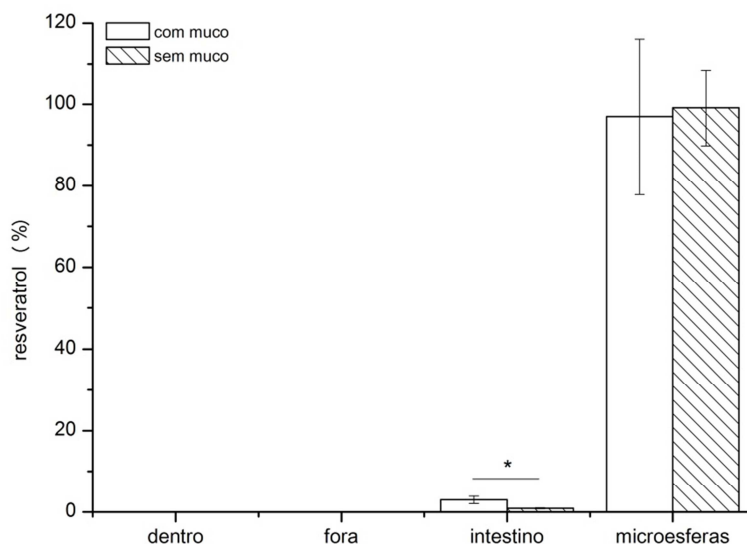
5.9 Avaliação *ex vivo* da permeabilidade e da retenção intestinal do RES pelo método do saco intestinal invertido

A microesfera M10, que permitiu o maior controle das taxas de liberação do resveratrol, controlando a liberação por período de 30h, foi selecionada para o estudo de permeação e retenção intestinal pelo método do saco intestinal invertido.

Para o fármaco permear através da membrana e ser quantificado dentro do conteúdo do saco intestinal invertido, ele deve ser liberado a partir das microesferas, tornando-se solúvel no meio, e então precisa vencer a barreira de muco que reveste o epitélio. Como as microesferas são constituídas por polímeros mucoadesivos, estas promovem a adesão ao muco e à parede do saco intestinal, o que permite a retenção no local, mantendo o fármaco em íntimo contato com o sítio de absorção, aumentando o gradiente de concentração (ARAÚJO *et al.*, 2014).

O gráfico apresentado na Figura 28 mostra a porcentagem de resveratrol quantificado em cada compartimento do teste de permeação: dentro e fora do saco intestinal invertido, no tecido intestinal e o fármaco que restou insolúvel dentro das microesferas.

Figura 28: Porcentagem de RES dentro do saco intestinal invertido (dentro), solúvel no meio (fora), aderido ao tecido intestinal (intestino) e insolúvel dentro das microesferas (microesferas) (média \pm DP, n=6).



A porcentagem de fármaco quantificada dentro do saco intestinal foi de $0,016 \pm 0,003\%$ para o ensaio na presença de muco, e de $0,001 \pm 0,0002\%$ quando houve o tratamento prévio do intestino com mucolítico. Já a porcentagem de resveratrol no meio de incubação (fora) para o teste realizado sem uso do mucolítico foi de $0,031 \pm 0,016\%$ e de $0,002 \pm 0,001\%$ para o teste realizado com mucolítico (barras não visíveis no gráfico apresentado na Figura 28).

É possível observar que a maior parte do fármaco permaneceu insolúvel dentro das microesferas, sendo que 96,95% e 99,14% não foram liberados para o meio durante o ensaio com os sacos intestinais com e sem muco, respectivamente (Figura 28).

Foi possível observar o acúmulo de resveratrol no tecido intestinal, sendo que o tratamento prévio com mucolítico, o qual remove o muco do saco intestinal, alterou de maneira significativa a quantidade de resveratrol retida no intestino, de modo que a porcentagem de

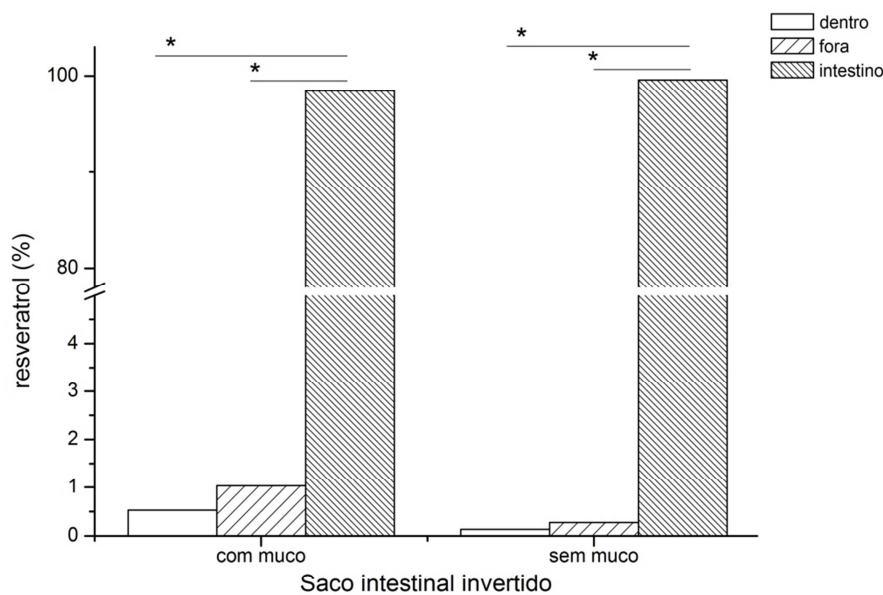
fármaco no intestino com o muco (3,0%) foi maior que a no intestino que teve o muco removido (0,9%) ($p < 0,05$) (Figura 28). Quando o teste foi realizado com o muco preservado, pode ser observado, macroscopicamente que ao final do teste as microesferas permaneceram fortemente aderidas ao tecido, o que deve ter contribuído para esse comportamento.

As microesferas são partículas de tamanho da ordem de micrômetros, o que inviabiliza sua passagem através das membranas ou por entre as células, de forma que apenas o fármaco liberado de sua rede e solúvel no meio é capaz de permear os tecidos. Desse modo, considerou-se apenas a quantidade de fármaco liberado das microesferas (3,05 e 0,86%) como disponível para a permeação através da membrana.

Do total liberado, 98,4% e 99,6% permaneceram retidos no tecido intestinal com e sem muco, respectivamente (Figura 29).

Deve-se considerar ainda que a quantidade de fármaco que ficou retida no intestino foi significativamente maior que a quantidade que permeou o tecido, a qual foi de apenas 0,5% e 0,1% para os sacos intestinais invertidos com e sem muco, respectivamente ($p < 0,05$) (Figura 29).

Figura 29: Porcentagem de RES dentro do saco intestinal invertido (dentro), solúvel no meio (fora) e aderido ao tecido intestinal (intestino) considerando apenas o fármaco liberado das microesferas.



*Diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$)

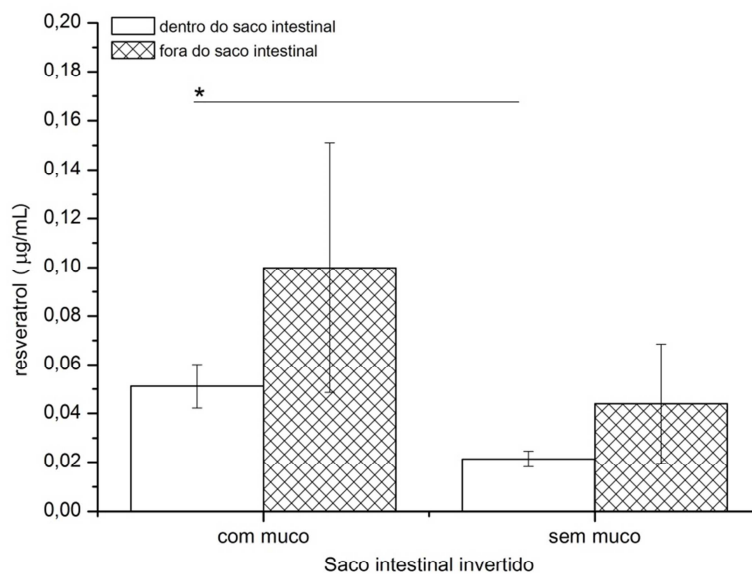
** Ensaio realizado com as microesferas

Tal comportamento demonstra que o resveratrol tem uma alta afinidade pelo tecido, permanecendo no intestino para uma ação local desejada nas células epiteliais. Essa propriedade é altamente favorável quando se busca a ação local do fármaco, especialmente no tratamento de doenças colônicas como pólipos, tumores ou doenças inflamatórias, como a colite ulcerativa.

Kaldas e co-autores (2003) demonstraram que células intestinais Caco-2 são capazes de acumular RES, evidenciando os enterócitos como um potencial sítio alvo da liberação deste agente antiproliferativo. Apesar da baixa biodisponibilidade oral que este fármaco apresenta, o acúmulo em células epiteliais de RES e de metabólitos potencialmente ativos devem produzir os efeitos antiinflamatórios e antimutagênicos que este fármaco apresenta (WALLE *et al.*, 2004).

A Figura 30 mostra as concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de fármaco dentro e fora do saco intestinal invertido, com e sem muco, para o ensaio de permeação com as microesferas.

Figura 30: Concentração de RES ($\mu\text{g/mL}$) dentro e fora do saco intestinal invertido após o ensaio de permeação com as microesferas (média \pm DP).



*Diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$)

** Ensaio realizado com as microesferas

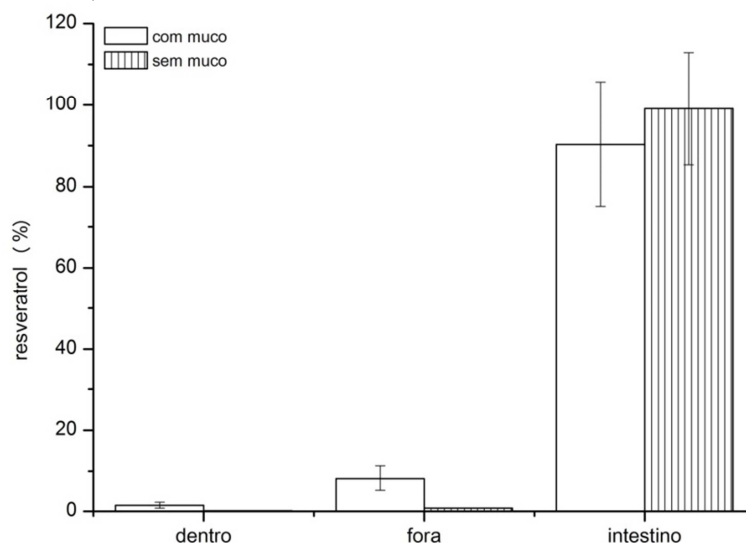
O muco favoreceu de maneira significativa a permeação do fármaco a partir das microesferas, sendo que na presença de muco, a permeação foi cerca de 2,5 vezes maior que a permeação no intestino sem muco ($0,051 \pm 0,009 \mu\text{g/ml}$ e $0,021 \pm 0,003 \mu\text{g/ml}$, respectivamente) ($p < 0,05$).

As concentrações dentro e fora do saco intestinal com e sem muco foram iguais ($p > 0,05$), indicando que a permeação ocorreu até que o equilíbrio de concentrações fosse atingido (Figura 30).

Esses dados demonstram que a presença de muco foi determinante para a permeação, sendo que a maior permeação no intestino com muco pode ter sido favorecida pelo maior gradiente de concentração estabelecido nessa condição (Figura 30) e pela elevada capacidade mucoadesiva das microesferas, que favoreceu o aumento do gradiente de concentração local e o contato mais íntimo com o tecido favorecendo a permeação.

Para os ensaios com o fármaco livre, do total de RES adicionado, 90,32% e 99,08% permaneceram aderidos ao intestino com e sem muco, respectivamente. Permearam 1,46% de fármaco no saco intestinal invertido com muco e apenas 0,15% no sem muco, restando solúvel do lado externo 8,23% e 0,78% para os testes com e sem muco, respectivamente (Figura 31).

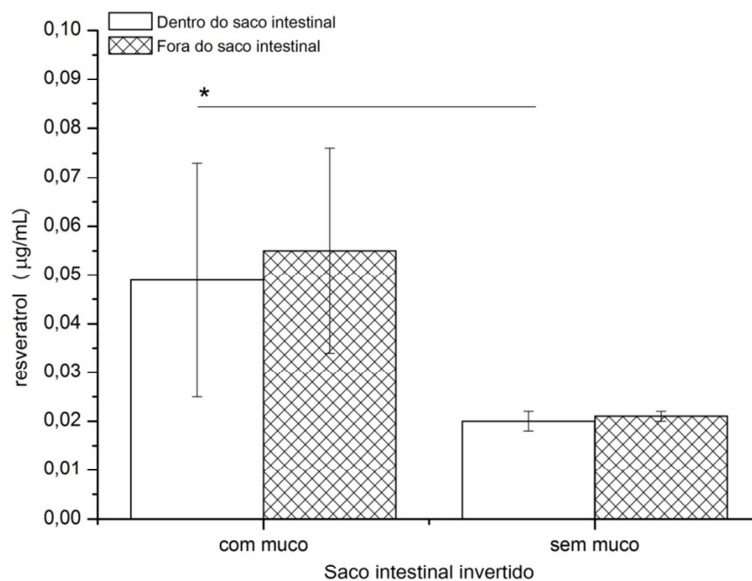
Figura 31: Porcentagem de RES após o ensaio de permeação intestinal quantificado dentro do saco intestinal invertido (dentro), solúvel no meio (fora) e aderido ao tecido intestinal (intestino) (média \pm DP).



Além da grande capacidade de acúmulo nas células, a grande porcentagem de resveratrol retido no tecido intestinal pode ser explicada devido ao caráter parcialmente hidrofóbico do muco e da característica lipofílica desse fármaco. A barreira adesiva de muco tem uma certa hidrofobicidade, devido à presença de lipídios em sua composição, de aproximadamente 20% ou mais em relação à sua massa seca, que se apresentam ligados covalentemente às moléculas de mucina ou então adsorvidos (ENSIGN *et al.*, 2012) levando a formação de interações hidrofóbicas responsáveis pela afinidade do resveratrol pelo tecido intestinal.

A Figura 32 apresenta o gráfico das concentrações de resveratrol dentro e fora do saco intestinal invertido com e sem muco, no qual é possível verificar que não houve diferença significativa entre a concentração de fármaco dentro do saco intestinal invertido e a concentração de fármaco solúvel no meio externo ($p > 0,05$), tanto nos ensaios realizados com o intestino com muco preservado ($0,049 \mu\text{g/mL}$ dentro e $0,055 \mu\text{g/mL}$ fora), quanto para aqueles realizados com o saco intestinal previamente tratado com mucolítico ($0,020 \mu\text{g/mL}$ dentro e $0,021 \mu\text{g/mL}$ fora), indicando que a permeação ocorreu até que o equilíbrio de concentrações fosse atingido, comportamento semelhante ao apresentado pelas microesferas.

Figura 32: Concentração de RES ($\mu\text{g/mL}$) dentro e fora do saco intestinal invertido após o ensaio de permeação com o fármaco livre (média \pm DP).



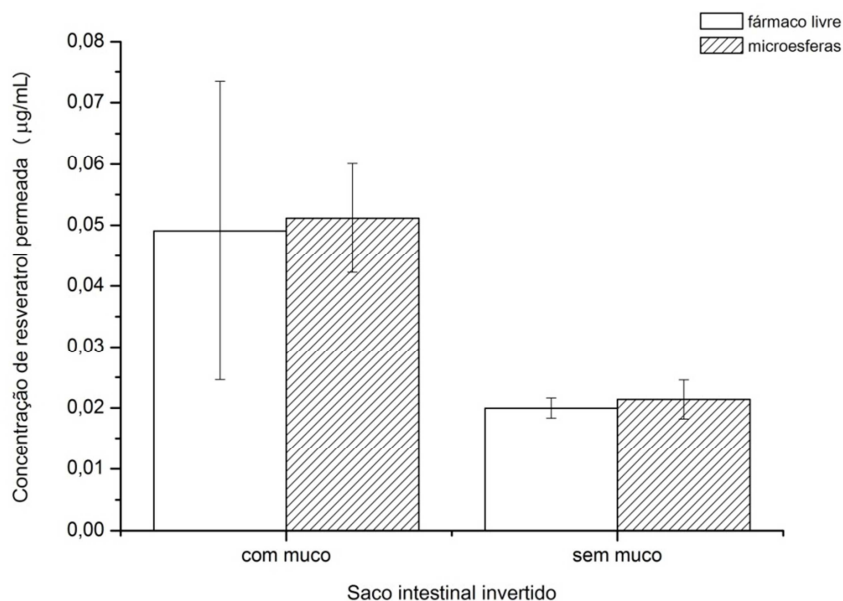
* Diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$)

**Ensaio realizado com o fármaco livre

No entanto, houve diferença significativa entre a permeação do resveratrol na presença e na ausência de muco no intestino ($p < 0,05$), sendo que a permeação foi cerca de 2,5 vezes maior no intestino com muco, o que demonstra que o muco apresenta uma importante função na absorção dos fármacos. Sendo assim, a preservação do muco sobre o saco intestinal invertido é fundamental para que a avaliação da permeabilidade *ex vivo* apresente uma boa correlação *in vivo*.

A permeação do RES a partir da microesferas não foi diferente da permeação do fármaco livre, sendo que as concentrações dentro do saco intestinal invertido, tanto com muco como sem muco, foram iguais para o ensaio com o fármaco livre e com as microesferas, como pode ser observado no gráfico apresentado na Figura 33.

Figura 33: Concentração de RES ($\mu\text{g/mL}$) dentro do saco intestinal invertido com e sem muco, após o ensaio de permeação com o fármaco livre e com as microesferas (média \pm DP).



Não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de concentração de fármaco que permeou o tecido a partir das microesferas e o fármaco livre ($p > 0,05$) (Figura 33).

Deve-se considerar que os dados obtidos para as microesferas podem não ser representativos do comportamento real de permeação do fármaco, já que as microesferas foram delineadas para se alcançar a liberação controlada do fármaco visando a vetorização para o cólon, de modo que as reduzidas taxas de liberação do fármaco podem limitar a aplicação deste método, uma vez que o tempo de análise é de 180 minutos.

6 CONCLUSÕES

A aplicação de um planejamento fatorial completo 2^4 com ponto central permitiu uma avaliação minuciosa dos efeitos da proporção polimérica G:P, e das concentrações de AlCl_3 , Glu e de RES sobre importantes características das microesferas de GG:P duplamente reticuladas.

A elevada EE% (92,62 a 99,08%) foi demonstrada, sendo que a proporção G:P 4:1 associada ao maior nível de Glu foi o principal fator responsável por reduzir o teor de RES encapsulado.

A erosão em meio ácido variou entre 13,38 e 24,58%, sendo que a maior concentração de RES e a proporção G:P 4:1 diminuíram a erosão das microesferas em meio ácido. As menores concentrações de ambos os reticulantes (AlCl_3 e Glu) também foram fatores

importantes para reduzir a erosão, devido à formação de redes mais coesas para esse grau de reticulação, favorável para garantir a menor liberação de fármaco nas porções superiores do TGI.

A eficiência das microesferas desenvolvidas em promover a proteção contra a liberação prematura do RES no estômago foi evidenciada através dos baixos valores de RES liberado (%) em meio ácido, que variou entre 15,9 e 29,4%. A proporção G:P 4:1 e a maior concentração de RES nas formulações foram os principais fatores capazes de reduzir a liberação. O efeito da interação entre a concentração de $AlCl_3$ e a concentração de RES também foi observado, sendo que a combinação entre o nível mais alto de fármaco e o menor nível de reticulante iônico levou à menor liberação em pH 1,2.

A capacidade de controlar as taxas de liberação do RES foi evidenciada, sendo que as microesferas M17 e M9 prolongaram a liberação em tampão fosfato por 20 e 22 h, respectivamente, e a M10 foi a que exibiu as menores taxas de liberação do fármaco, prolongando a liberação por até 30 h, sendo a amostra mais promissora para promover a liberação cólon-específica do RES. O mecanismo de liberação do RES a partir dessa amostra, segundo o modelo de Korsmeyer – Peppas, seguiu o transporte super caso II.

A veiculação do RES nas microesferas permitiu a significativa redução da permeabilidade celular do fármaco, comportamento particularmente favorável para o objetivo do estudo, uma vez que o RES estará mais disponível para atuar diretamente sobre as células do cólon, o que pode melhorar sua atividade local.

A permeação e a retenção do RES foram maiores para os ensaios realizados com o saco intestinal invertido com muco preservado, tanto para as microesferas quanto para o fármaco livre, evidenciando a importância da mucoadesividade do sistema desenvolvido em melhorar o desempenho do RES.

A partir dos estudos apresentados neste capítulo, foi possível a otimização de microesferas de GG:P duplamente reticuladas, promissoras para a veiculação do RES para o cólon, uma vez que a encapsulação deste fármaco conferiu o controle das taxas de liberação, com reduzido percentual de liberação em meio ácido, além da proteção necessária para atingir o cólon, evitando a liberação prematura no estômago e intestino delgado, e uma maior interação com as células colônicas.

REFERÊNCIAS

- AGNIHOTRI, S. A.; AMINABHAVI, T. M. Novel interpenetrating network chitosan-poly(ethylene oxide-g-acrylamide) hydrogel microspheres for the controlled release of capecitabine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 324, n. 2, p. 103-115, 2006.
- ALEMKA, A.; CLYNE, M.; SHANAHAN, F.; TOMPKINS, T.; CORCIONIVOSCHI, N.; BOURKE, B. Probiotic colonization of the adherent mucus layer of HT29MTXE12 cells attenuates *Campylobacter jejuni* virulence properties. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 6, p. 2812-2822, 2010.
- ANTUNES, F.; ANDRADE, F.; ARAÚJO, F.; FERREIRA, D.; SARMENTO, B. Establishment of a triple co-culture in vitro cell models to study intestinal absorption of peptide drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 83, n. 3, p. 427-435, 2013.
- ARAÚJO, F.; SARMENTO, B. Towards the characterization of an in vitro triple co-culture intestine cell model for permeability studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 458, n. 1, p. 128-134, 2013.
- ARAÚJO, F.; SHRESTHA, N.; SHAHBAZI, M.-A.; FONTE, P.; MÄKILÄ, E. M.; SALONEN, J. J.; HIRVONEN, J. T.; GRANJA, P. L.; SANTOS, H. A.; SARMENTO, B. The impact of nanoparticles on the mucosal translocation and transport of GLP-1 across the intestinal epithelium. **Biomaterials**, v. 35, n. 33, p. 9199-9207, 2014.
- ARIFIN, D. Y.; LEE, L. Y.; WANG, C.-H. Mathematical modeling and simulation of drug release from microspheres: Implications to drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 12-13, p. 1274-1325, 2006.
- ARMSTRONG, N. A. Factorial Design of Experiments. In: ARMSTRONG, N. A. (Ed.). **Pharmaceutical Experimental Design and Interpretation**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006. cap. 6,
- BALIMANE, P. V.; CHONG, S. Cell culture-based models for intestinal permeability: a critique. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 5, p. 335-343, 2005.
- BANERJEE, S.; SIDDIQUI, L.; BHATTACHARYA, S. S.; KAITY, S.; GHOSH, A.; CHATTOPADHYAY, P.; PANDEY, A.; SINGH, L. Interpenetrating polymer network (IPN) hydrogel microspheres for oral controlled release application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 1, p. 198-206, 2012.
- BEHRENS, I.; STENBERG, P.; ARTURSSON, P.; KISSEL, T. Transport of lipophilic drug molecules in a new mucus-secreting cell culture model based on HT29-MTX cells. **Pharmaceutical research**, v. 18, n. 8, p. 1138-1145, 2001.
- CALADO, V.; MONTGOMERY, D. C. Planejamento fatorial com pontos centrais. In: CALADO, V. e MONTGOMERY, D. C. (Ed.). **Planejamento de experimentos usando o Statisitca**. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais, 2003. p.104-110.
- CARDOSO, V. M. D. O. Síntese e caracterização de hidrogéis de amido retrogradado e goma gelana utilizados como matriz em sistemas de liberação cólon específica de

fármacos. 2014. 198f (Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Araraquara, 2014.

CHAUD, M. V.; TAMASCIA, P.; LIMA, A. C. D.; PAGANELLI, M. O.; GREMIÃO, M. P. D.; FREITAS, O. D. Solid dispersions with hydrogenated castor oil increase solubility, dissolution rate and intestinal absorption of praziquantel. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, p. 473-481, 2010.

COSTA, P.; SOUSA LOBO, J. M. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 2, p. 123-133, 2001.

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

CURY, B. S. F.; DE CASTRO, A. D.; KLEIN, S. I.; EVANGELISTA, R. C. Influence of phosphated cross-linked high amylose on in vitro release of different drugs. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, n. 4, p. 789-793, 2009.

DAS, S.; LIN, H.-S.; HO, P.; NG, K.-Y. The Impact of Aqueous Solubility and Dose on the Pharmacokinetic Profiles of Resveratrol. **Pharmaceutical research**, v. 25, n. 11, p. 2593-2600, 2008.

DASH, S.; MURTHY, P. N.; NATH, L.; CHOWDHURY, P. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. **Acta Pol Pharm**, v. 67, n. 3, p. 217-23, 2010.

DAVARAN, S.; HANAEE, J.; KHOSRAVI, A. Release of 5-amino salicylic acid from acrylic type polymeric prodrugs designed for colon-specific drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 58, n. 3, p. 279-287, 1999.

DÉAT-LAINÉ, E.; HOFFART, V.; GARRAIT, G.; BEYSSAC, E. Whey protein and alginate hydrogel microparticles for insulin intestinal absorption: Evaluation of permeability enhancement properties on Caco-2 cells. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, n. 2, p. 336-342, 2013.

ENSIGN, L. M.; CONE, R.; HANES, J. Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: The gastrointestinal mucus barriers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 6, p. 557-570, 2012.

EVANGELISTA, R. C. **Sistemas de liberação controlada de fármacos**. 2006. 485f (Tese de Livre Docência). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2006.

FAN, L. T.; SINGH, S. K. Chemical reaction controlled release. In: FAN, L. T. e SINGH, S. K. (Ed.). **Controlled release - a quantitative treatment**. Berlim: Springer-Verlag, 1989a. cap. 3, p.89-109.

_____. Diffusion-controlled release. In: FAN, L. T. e SINGH, S. K. (Ed.). **Controlled release - a quantitative treatment**. Berlim: Springer-Verlag, 1989b. cap. 2, p.9-88.

_____. Swelling-controlled release. In: FAN, L. T. e SINGH, S. K. (Ed.). **Controlled release - a quantitative treatment**. Berlim: Springer-Verlag, 1989c. cap. 4, p.110-156.

FREIBERG, S.; ZHU, X. X. Polymer microspheres for controlled drug release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 282, n. 1–2, p. 1-18, 2004.

GAGNON, M.; ZIHLER BERNER, A.; CHERVET, N.; CHASSARD, C.; LACROIX, C. Comparison of the Caco-2, HT-29 and the mucus-secreting HT29-MTX intestinal cell models to investigate Salmonella adhesion and invasion. **Journal of Microbiological Methods**, v. 94, n. 3, p. 274-279, 2013.

GARDINER, W. P. Factorial experimental designs for chemical experimentation. In: GARDINER, W. P. (Ed.). **Statistical analysis methods for chemists: a software-based approach**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1997. cap. 4, p.132-167.

HIGUCHI, T. Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, n. 12, p. 1145-1149, 1963.

HILGENDORF, C.; SPAHN-LANGGUTH, H.; REGÅRDH, C. G.; LIPKA, E.; AMIDON, G. L.; LANGGUTH, P. Caco-2 versus Caco-2/HT29-MTX co-cultured cell lines: permeabilities via diffusion, inside- and outside-directed carrier-mediated transport. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 89, n. 1, p. 63-75, 2000.

JAMBHEKAR, S. S. Physicochemical and Biopharmaceutical Properties of Drug Substances and Pharmacokinetics. In: LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A., *et al* (Ed.). **Foye's Principles of Medicinal Chemistry** 7.ed., 2013. cap. 3, p.61-105.

KAITY, S.; ISAAC, J.; GHOSH, A. Interpenetrating polymer network of locust bean gum-poly (vinyl alcohol) for controlled release drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p. 456-467, 2013.

KALDAS, M. I.; WALLE, U. K.; WALLE, T. Resveratrol transport and metabolism by human intestinal Caco-2 cells. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 55, n. 3, p. 307-312, 2003.

KERNÉIS, S.; BOGDANOVA, A.; KRAEHENBUHL, J.-P.; PRINGAULT, E. Conversion by Peyer's patch lymphocytes of human enterocytes into M cells that transport bacteria. **Science**, v. 277, p. 949-952, 1997.

KERNÉIS, S.; CALIOT, E.; STUBBE, H.; BOGDANOVA, A.; KRAEHENBUHL, J.-P.; PRINGAULT, E. Molecular studies of the intestinal mucosal barrier physiopathology using co-cultures of epithelial and immune cells: a technical update. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 9, p. 1119-1124, 2000.

KIERSZENBAUM, A. L.; TRES, L. L. Parte baixa do sistema digestório. In: KIERSZENBAUM, A. L. e TRES, L. L. (Ed.). **Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. cap. 16, p.475-500.

KORSMEYER, R. W.; GURNY, R.; DOELKER, E.; BURI, P.; PEPPAS, N. A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 15, n. 1, p. 25-35, 1983.

LESUFFLEUR, T.; BARBAT, A.; DUSSAULX, E.; ZWEIBAUM, A. Growth adaptation to methotrexate of HT-29 human colon carcinoma cells is associated with their ability to

differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells. **Cancer Research**, v. 50, n. 19, p. 6334-6343, 1990.

LI, Y.; SHIN, Y. G.; YU, C.; KOSMEDER, J. W.; HIRSCHMANN, W. H.; PEZZUTO, J. M.; VAN BREEMEN, R. B. Increasing the throughput and productivity of Caco-2 cell permeability assays using liquid chromatography-mass spectrometry: Application to resveratrol absorption and metabolism. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 6, n. 8, p. 757-767, 2003.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; PINTO, J. F.; COSTA, P. Compressed mini-tablets as a biphasic delivery system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 323, n. 1-2, p. 93-100, 2006.

MACH, J.; HSHIEH, T.; HSIEH, D.; GRUBBS, N.; CHERVONSKY, A. Development of intestinal M cells. **Immunological reviews**, v. 206, n. 1, p. 177-189, 2005.

MADERUELO, C.; ZARZUELO, A.; LANA O, J. M. Critical factors in the release of drugs from sustained release hydrophilic matrices. **Journal of Controlled Release**, v. 154, n. 1, p. 2-19, 2011.

MAESTRELLI, F.; ZERROUK, N.; CIRRI, M.; MENNINI, N.; MURA, P. Microspheres for colonic delivery of ketoprofen-hydroxypropyl- β -cyclodextrin complex. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 34, n. 1, p. 1-11, 2008.

MAITI, S.; RANJIT, S.; MONDOL, R.; RAY, S.; SA, B. Al⁺³ ion cross-linked and acetalated gellan hydrogel network beads for prolonged release of glipizide. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 1, p. 164-172, 2011.

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, p. 375-400, 2002.

MASARO, L.; ZHU, X. X. Physical models of diffusion for polymer solutions, gels and solids. **Progress in Polymer Science**, v. 24, n. 5, p. 731-775, 1999.

MI, F.-L.; SUNG, H.-W.; SHYU, S.-S.; SU, C.-C.; PENG, C.-K. Synthesis and characterization of biodegradable TPP/genipin co-crosslinked chitosan gel beads. **Polymer**, v. 44, n. 21, p. 6521-6530, 2003.

MIYOSHI, E.; TAKAYA, T.; NISHINARI, K. Effects of salts on the gel-sol transition of gellan gum by differential scanning calorimetry and thermal scanning rheology. **Thermochimica Acta**, v. 267, n. 0, p. 269-287, 1995.

MÖCKEL, J. E.; LIPPOLD, B. C. Zero-Order Drug Release from Hydrocolloid Matrices. **Pharmaceutical research**, v. 10, n. 7, p. 1066-1070,

MUNARIN, F.; TANZI, M. C.; PETRINI, P. Advances in biomedical applications of pectin gels. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, n. 4, p. 681-689, 2012.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2010a.

_____. Quando as variáveis são muitas. In: (Ed.). **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Porto Alegre: Bookman, 2010b. cap. 4, p.165-214.

NEUMAN, R. C. Experimental design for non-statisticians. **Journal of Vinyl Technology**, v. 15, n. 1, p. 34-37, 1993.

NOAH, T. K.; DONAHUE, B.; SHROYER, N. F. Intestinal development and differentiation. **Experimental Cell Research**, v. 317, n. 19, p. 2702-2710, 2011.

ODIJK, M.; MEER, A. D. V. D.; LEVNER, D.; KIM, H. J.; HELM, M. W. V. D.; SEGERINK, L. I.; FRIMAT, J.-P.; HAMILTON, G. A.; INGBER, D. E.; BERGA, A. V. D. Measuring direct current trans-epithelial electrical resistance in organ-on-a-chip microsystems. **Lab on a Chip**, v. 15, n. 3, p. 745-752, 2015.

PAPADOPOULOU, V.; KOSMIDIS, K.; VLACHOU, M.; MACHERAS, P. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 309, n. 1–2, p. 44-50, 2006.

PARHAM, P. Defesas do organismo contra infecção. In: PARHAM, P. (Ed.). **O sistema imune**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. cap. 10, p.287-326.

PASPARAKIS, G.; BOUROPOULOS, N. Swelling studies and in vitro release of verapamil from calcium alginate and calcium alginate–chitosan beads. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 323, n. 1–2, p. 34-42, 2006.

PEDREIRO, L. N. **Desenvolvimento de dispersões sólidas e nanopartículas poliméricas mucoadesivas de zidovudina e avaliação da interação biológica com a mucosa intestinal**. 2015. 149f (Tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2015.

PEREIRA, C.; ARAÚJO, F.; BARRIAS, C. C.; GRANJA, P. L.; SARMENTO, B. Dissecting stromal-epithelial interactions in a 3D in vitro cellularized intestinal model for permeability studies. **Biomaterials**, v. 56, p. 36-45, 2015.

PONTIER, C.; PACHOT, J.; BOTHAM, R.; LENFANT, B.; ARNAUD, P. HT29-MTX and Caco-2/TC7 monolayers as predictive models for human intestinal absorption: role of the mucus layer. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 90, n. 10, p. 1608-1619, 2001.

PRAJAPATI, V. D.; JANI, G. K.; ZALA, B. S.; KHUTLIWALA, T. A. An insight into the emerging exopolysaccharide gellan gum as a novel polymer. **Carbohydrate Polymers**, v. 93, n. 2, p. 670-678, 2013.

PREZOTTI, F. G. **Microesferas de goma gelana e pectina como potencial estratégia para liberação controlada de fármacos**. 2013. 111f (Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Araraquara, 2013.

RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. **Journal of Controlled Release**, v. 5, n. 1, p. 23-36, 1987.

RODRIGUES, P. O.; SILVA, M. A. S. Avaliação in vitro de medicamentos de liberação prolongada: aplicação de métodos estatísticos, modelos dependentes e independentes de análise. **Rev. Col. Cien. Quím. Farm**, v. 34, n. 1, p. 13, 2005.

RODRIGUEZ-GAZTELUMENDI, A.; ALVEHUS, M.; ANDERSSON, T.; JACOBSSON, S. O. P. Comparison of the effects of nicotine upon the transcellular electrical resistance and sucrose permeability of human ECV304/rat C6 co-cultures and human CaCo2 cells. **Toxicology Letters**, v. 207, n. 1, p. 1-6, 2011.

SANDRI, G.; BONFERONI, M. C.; ROSSI, S.; FERRARI, F.; BOSELLI, C.; CARAMELLA, C. Insulin-Loaded Nanoparticles Based on N-Trimethyl Chitosan: In Vitro (Caco-2 Model) and Ex Vivo (Excised Rat Jejunum, Duodenum, and Ileum) Evaluation of Penetration Enhancement Properties. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 1, p. 362-371, 2010.

SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J. Complex Pectins: Structure elucidation using enzymes. In: VISSER, J. e VORAGEN, A. G. J. (Ed.). **Pectins and Pectinases**. Amsterdam: Elsevier, v.14, 1996. p.3-20. ISBN 0921-0423.

SCHWAAB, M.; PINTO, J. C. **Análise de dados experimentais, Volume II: planejamento de experimentos**. 1. ed. Rio de Janeiro: E-papers, 2011. 514p.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.

USP. United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 34–NF 29) **Chapter <711> Dissolution**, 2011.

WALLE, T.; HSIEH, F.; DELEGGE, M. H.; OATIS, J. E.; WALLE, U. K. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 32, n. 12, p. 1377-1382, 2004.

ZERBINI, A. P. N. D. A. **Desenvolvimento e avaliação de minicomprimidos contendo atorvastatina cálcica**. 2010. 104f (Dissertação de Mestrado em Fármacos e Medicamentos). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Resumo

As partículas nanométricas têm sido amplamente estudadas para diversas aplicações na área médica, devido às propriedades físicas, químicas e biológicas que as tornam altamente favoráveis para determinadas aplicações. Na área farmacêutica, são consideradas promissoras para o controle da liberação e/ou vetorização de fármacos para sítios específicos. No presente trabalho, nanopartículas poliméricas (NPP) de GG:P foram obtidas por geleificação ionotrópica associada ou não à nebulização, utilizando como reticulante o $AlCl_3$. Os sistemas foram caracterizados segundo suas propriedades físico-químicas (PZ, tamanho e PDI, morfologia por MEV, EE%) e seu desempenho como sistema de liberação (liberação *in vitro* em pH 1,2 e 6,8). A citotoxicidade *in vitro* foi avaliada sobre células Caco-2 e HT29-MTX e a permeabilidade foi realizada utilizando os modelos de monocultura de células Caco-2 e co-cultura tripla. A permeação/retenção intestinal do RES também foi avaliada através do método do saco intestinal invertido. Foi empregado um planejamento fatorial do tipo composto central para avaliar os efeitos das concentrações de polímeros e de $AlCl_3$ sobre o PZ e o tamanho das NPP obtidas por geleificação ionotrópica. As NPP apresentaram PZ na faixa entre -28,27 e 3,16 mV e este parâmetro foi influenciado pela concentração de polímeros. O tamanho de partícula variou entre 59,35 e 657,80 nm e foi influenciado por ambas as concentrações de polímeros e de reticulante. O PDI apresentou-se entre 0,68 e 1,00, caracterizando os sistemas como polidispersos. As NPP obtidas pela técnica de geleificação ionotrópica associada a nebulização apresentaram PZ entre -0,77 e 5,87 mV, tamanho de partícula entre 176,4 e 422,9 nm e menores valores de PDI (0,190 – 0,973). Elevados valores de EE% foram alcançados (81,16 e 82,93 %). As análises de MEV demonstraram a forma esférica das partículas e a presença de alguns aglomerados de NPP, as quais foram capazes de controlar a liberação do fármaco por até 48 h. O modelo de Korsmeyer – Peppas apresentou melhor correlação com os dados de liberação, indicando que a liberação do fármaco obedeceu ao transporte super caso II. As NPP reduziram a citotoxicidade e a permeabilidade do RES em comparação com o fármaco livre, comportamento favorável que deve permitir a atuação direta sobre as células do cólon e potencializar seu efeito local. A permeação e a retenção do RES a partir das NPP foram maiores para os ensaios realizados com o saco intestinal com muco preservado, demonstrando que a mucoadesividade desempenha importante papel na melhoria de tais propriedades. O conjunto de dados obtidos demonstra que as NPP de GG:P obtidas por geleificação ionotrópica apresentaram propriedades promissoras para a vetorização do RES para o cólon.

Palavras-chave: nanopartículas poliméricas, citotoxicidade, permeabilidade.

Abstract

Particles in the nanometric size range have been widely studied for several applications in the medical field, due to physical, chemical and biological properties that make them highly favorable to certain applications. In the pharmaceutical field, they are considered promising for controlling the release and/or targeting drugs to specific sites. In this work, polymeric nanoparticles (PNP) of GG:P were obtained by ionotropic gelation associated or not to nebulization, using AlCl_3 as crosslinking agent. The systems were characterized regarding their physicochemical properties (ZP, particle size and PDI, morphology by SEM, EE%) and regarding the performance as a release system (*in vitro* drug release profile in pH 1.2 and 6.8). The *in vitro* cytotoxicity was evaluated on Caco-2 and HT29-MTX cells, and the permeability was performed using Caco-2 monoculture and triple co-culture models. The permeability/intestinal retention of RES were also evaluated using the everted gut sac method. A central composite design was used to evaluate the effects of polymer and AlCl_3 concentrations on ZP and size of PNP prepared by ionotropic gelation. PNP presented ZP in the range between -28.27 and 3.16 mV and this parameter was influenced by polymer concentration. Particles size ranged between 59.35 and 657.80 nm and was influenced by both polymer and crosslinking concentrations. PDI ranged between 0.68 and 1.00, characterizing the systems as polydisperse. PNP obtained by nebulization – ionotropic gelation technique showed ZP between -0.77 and 5.87 mV, particle size between 176.4 and 422.9 nm and lower PDI values (0.19 – 0.97). High EE% values were achieved (81.16 to 82.93 %). SEM analyses showed the particles spherical shape and the presence of some clusters of PNP, which were able to control the drug release for up to 48 h. The Korsmeyer – Peppas model presented the best data correlation, indicating that the drug release followed a super case II transport. PNP reduced RES cytotoxicity and permeability in comparison to free drug, a favorable behavior that may allow the direct action on colonic cells and improve the local effect. The permeability and retention of RES from the PNP were higher for the tests with the intestinal segments that had their mucus preserved, demonstrating that mucoadhesiveness plays an important role in improving such parameters. The data obtained shows that GG:P nanoparticles prepared by ionotropic gelation present promising characteristics to target RES to the colon.

Keywords: polymeric nanoparticles, cytotoxicity, permeability.

Lista de ilustrações

Figura 1: Representação esquemática do processo de obtenção de nanopartículas de GG:P através do método da geleificação ionotrópica por mistura direta dos polímeros ao reticulante.243

Figura 2: Representação esquemática do planejamento fatorial tipo composto central empregado na obtenção das nanopartículas.....244

Figura 3: Representação esquemática do processo de obtenção de nanopartículas de GG:P através do método de nebulização – geleificação ionotrópica.....245

Figura 4: Aparato com o saco de diálise contendo as NPP submetidas ao ensaio de dissolução em cuba de volume reduzido.247

Figura 5: Gráfico de Pareto para os efeitos dos fatores avaliados sobre a resposta PZ das NPP.252

Figura 6: Gráficos de superfície de resposta (A) e de contorno (B) para os efeitos da concentração de polímeros e da concentração de $AlCl_3$ sobre o PZ das NPP.....253

Figura 7: Gráfico de Pareto para os efeitos dos fatores avaliados sobre a resposta tamanho de partícula.255

Figura 8: Gráficos de superfície de resposta (A) e de contorno (B) para os efeitos da concentração de polímeros e da concentração $AlCl_3$ sobre o tamanho de partícula.....255

Figura 9: Bico nebulizador utilizado na obtenção das NPP pelo método de nebulização – geleificação ionotrópica.....256

Figura 10: sistema coloidal contendo as NPP imediatamente após o processo de obtenção através da técnica de nebulização – geleificação ionotrópica.257

Figura 11: Gráfico de distribuição de tamanho por intensidade de espalhamento de luz da amostra NG11_ $Al_{0,5}S_{res0,5}$259

Figura 12: Tamanho de partícula em função da concentração de fármaco.260

Figura 13: Fotomicrografias das NPP (NG41_ $Al_{0,5}S_{res0,5}$). A) aumento de 5000 x e B e C) aumento de 10.000 x.....261

Figura 14: Perfil de liberação do RES a partir das NPP em meios com diferentes valores de pH (pH 1,2 de 0 – 2h e pH 6,8 de 2 – 48h) (média±DP).....263

Figura 15: Viabilidade celular (%) das linhagens HT29-MTX e Caco-2 após 24h de incubação na presença de concentrações crescentes de nanopartículas e RES livre (média ± DP) e após incubação em HBSS com 0,5% (v/v) de DMSO.....264

Figura 16: Permeabilidade (%) e TEER (%) em função do tempo durante os experimentos de permeabilidade *in vitro* empregando modelo de monocultura de células Caco-2 para o RES livre e encapsulado em nanopartículas de GG:P (média ± DP; n=3).266

Figura 17: Permeabilidade (%) em função do tempo durante os experimentos de permeabilidade *in vitro* empregando modelo de monocultura de células Caco-2 para o RES encapsulado em microesferas e nanopartículas de GG:P (média ± DP; n=3).267

Figura 18: Permeabilidade (%) e TEER (%) em função do tempo durante os experimentos de permeabilidade *in vitro* empregando modelo de co-cultura tripla de células para o RES livre, e encapsulado em nanopartículas de GG:P (média ± DP; n=3).268

- Figura 19:** Permeabilidade (%) em função do tempo durante os experimentos de permeabilidade *in vitro* empregando co-cultura tripla de células para o RES encapsulado em microesferas e nanopartículas de GG:P (média ± DP; n=3).....269
- Figura 20:** Resultados da permeabilidade aparente (10^{-6} cm/s) do RES em diferentes modelos celulares (média ± DP; n=3).270
- Figura 21:** Variação do TEER ($\Omega \cdot \text{cm}^2$) em relação ao TEER inicial durante o ensaio de permeabilidade *in vitro* em A) monocultura de células Caco-2 e B) co-cultura tripla de células (média ± DP; n=3).271
- Figura 22:** Porcentagem de RES dentro do saco intestinal invertido (dentro), solúvel no meio (fora), aderido ao tecido intestinal (intestino) e insolúvel dentro das nanopartículas (nanopartículas) (média ± DP, n=6).272
- Figura 23:** Porcentagem de RES dentro do saco intestinal invertido (dentro), solúvel no meio (fora) e aderido ao tecido intestinal (intestino) considerando como a quantidade total apenas o fármaco liberado das microesferas.273
- Figura 24:** Concentração de RES ($\mu\text{g/mL}$) dentro e fora do saco intestinal invertido após o ensaio de permeação com as nanopartículas (média ± DP).....274
- Figura 25:** Concentração de RES dentro do saco intestinal invertido a partir do fármaco livre, das microesferas e das nanopartículas para os ensaios com o saco intestinal invertido com e sem muco (média ± DP).....275
- Figura 26:** Porcentagem de fármaco retido no saco intestinal invertido com e sem muco a partir do fármaco livre, das microesferas e das nanopartículas (média ± DP).....276

Lista de tabelas

Tabela 1: Composição das NPP e valores dos níveis das variáveis selecionadas para o planejamento fatorial do tipo composto central.....244

Tabela 2: Composição das nanopartículas de GG:P obtidas através da nebulização – geleificação ionotrópica.....245

Tabela 3: Valores de potencial zeta, tamanho de partícula e PDI das nanopartículas obtidas no planejamento fatorial do tipo composto central (média ± DP, n=3).....251

Tabela 4: Dados da análise de variância (ANOVA) para os efeitos estimados no planejamento fatorial tipo composto central para a resposta potencial zeta.251

Tabela 5: Dados da análise de variância (ANOVA) para os efeitos estimados no planejamento fatorial tipo composto central para a resposta tamanho de partícula.....254

Tabela 6: Resultados de tamanho de partícula (d.nm), índice de polidispersão (PDI) e PZ (mV) das NPP obtidas pela técnica de nebulização–geleificação (média ± DP).257

Tabela 7: Valores dos coeficientes de determinação (r^2) para os diferentes modelos aplicados aos dados de liberação do RES a partir das nanopartículas.....263

Sumário

1	Introdução	240
2	Fundamentação teórica	241
2.1	Nanopartículas poliméricas (NPP).....	241
3	Objetivo.....	242
4	Metodologias.....	243
4.1	Obtenção de nanopartículas de GG:P	243
4.1.1	Geleificação ionotrópica	243
4.1.1.1	Planejamento dos experimentos	243
4.1.2	Nebulização seguida de geleificação ionotrópica	244
4.2	Determinação do potencial zeta (PZ).....	245
4.3	Determinação do tamanho de partícula e índice de polidispersão (PDI).....	246
4.4	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	246
4.5	Eficiência de encapsulação (EE%)	246
4.6	Determinação do perfil de liberação <i>in vitro</i> do RES em pH 1,2 e 6,8	247
4.7	Análise dos mecanismos de liberação do fármaco	248
4.8	Avaliação <i>in vitro</i> da citotoxicidade em células Caco-2 e HT29-MTX: Teste de viabilidade celular através do ensaio do MTT	248
4.9	Avaliação da permeabilidade <i>in vitro</i> em monocultura de células Caco-2 e em cocultura tripla de células	248
4.10	Permeabilidade aparente (P_{ap}).....	249
4.11	Resistência Elétrica Transepitelial (TEER)	249
4.12	Avaliação <i>ex vivo</i> da permeabilidade e da retenção intestinal do RES pelo método do saco intestinal invertido	249
4.13	Análise estatística dos resultados.....	249
5	Resultados e Discussão	250
5.1	Obtenção das nanopartículas por geleificação ionotrópica.....	250
5.1.1	Determinação do potencial zeta (PZ).....	250
5.1.2	Determinação do tamanho de partícula e índice de polidispersão (PDI)....	253
5.2	Obtenção das NPP por nebulização seguida de geleificação ionotrópica	256
5.2.1	Determinação do potencial zeta (PZ).....	257
5.2.2	Determinação do tamanho de partícula e índice de polidispersão (PDI) por espalhamento de luz dinâmico	258
5.3	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	260
5.4	Eficiência de encapsulação (EE%)	262
5.5	Determinação do perfil de liberação <i>in vitro</i> do RES em pH 1,2 e 6,8	262
5.6	Análise dos mecanismos de liberação do fármaco	263
5.7	Avaliação <i>in vitro</i> da citotoxicidade em células Caco-2 e HT29-MTX: Teste de viabilidade celular através do ensaio do MTT	264

5.8 Avaliação da permeabilidade <i>in vitro</i> em monocultura de células Caco-2 e em co-cultura tripla de células	265
5.8.1 Permeabilidade em monocultura de células Caco-2	265
5.8.2 Permeabilidade em co-cultura tripla de células	267
5.9 Permeabilidade aparente (Pap)	269
5.10 Resistência Elétrica Transepitelial (TEER)	270
5.11 Avaliação <i>ex vivo</i> da permeabilidade e da retenção intestinal do RES pelo método do saco intestinal invertido	272
6 Conclusões	276

1 INTRODUÇÃO

As nanopartículas poliméricas (NPP) atraem grande atenção nas áreas médica e farmacêutica, devido a promissoras características que apresentam como possibilidade de vetorizar o fármaco a um alvo específico (órgão, tecido e mesmo células), promover o controle da liberação de seu conteúdo, tamanho reduzido em nível subcelular, biodegradabilidade e biocompatibilidade (SOPPIMATH *et al.*, 2001; PINTO REIS *et al.*, 2006).

A obtenção de nanopartículas a partir de hidrogéis geralmente envolve o uso de solventes orgânicos que são bioincompatíveis e metodologias nas quais a distribuição do tamanho de partículas é ampla. Portanto, fica evidente a necessidade de novas metodologias que possibilitem a obtenção de sistemas nanoestruturados com eficiência e em condições reacionais amenas, como meios aquosos, que permitam explorar o uso dos polímeros biocompatíveis (EL-SHERBINY e SMYTH, 2011).

Tecnologias como extração em fluido supercrítico, *eletrospray*, homogeneização a alta pressão, evaporação do solvente, complexação polieletrólítica e *spray drying* têm sido empregadas na obtenção de sistemas em escalas nanométricas (GUZMAN-VILLANUEVA *et al.*, 2011). No entanto, a geleificação ionotrópica é considerada um técnica promissora e vantajosa para a obtenção de nanopartículas, uma vez que é relativamente simples, e ocorre em condições reacionais amenas, não necessitando de solventes orgânicos tóxicos (*eco-friendly*), além de apresentar possibilidade de produção em escala industrial (YEO *et al.*, 2001; PREZOTTI, 2013).

A biodisponibilidade sistêmica do RES é muito baixa. Segundo Walle e co-autores (2004), a maior parte da dose administrada por via oral é excretada na urina, sendo as principais vias metabólicas a conjugação dos grupos fenólicos com sulfato e ácido glicurônico, e também a hidrogenação da dupla ligação alifática, esta última produzida pela microbiota intestinal. A conjugação com sulfato é extremamente rápida no intestino e no fígado, e pode ser a principal razão da baixa biodisponibilidade oral do RES (WALLE *et al.*, 2004).

A administração do RES em um sistema polimérico mucoadesivo nanoestruturado, que evite sua liberação nas porções superiores do TGI e promova a sua liberação e retenção no cólon, protegendo-o contra a rápida metabolização, deve contribuir significativamente para a melhoria do desempenho terapêutico deste fármaco.

No presente trabalho, NPP de GG:P reticuladas ionicamente com $AlCl_3$ foram obtidas através da geleificação ionotrópica e da técnica combinada de nebulização–geleificação ionotrópica. As NPP foram caracterizadas quanto à morfologia, tamanho de partícula e índice de polidispersão, potencial zeta e eficiência de encapsulação. Avaliou-se perfil de liberação do

RES, a citotoxicidade *in vitro* em células Caco-2 e HT29-MTX, a permeabilidade *in vitro* empregando dois diferentes modelos celulares, além da permeação/retenção intestinal do fármaco através do método do saco intestinal invertido.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Nanopartículas poliméricas (NPP)

As partículas nanométricas têm sido amplamente estudadas para diversas aplicações na área médica, devido ao reduzido tamanho que apresentam, e também às propriedades físicas, químicas e biológicas que as tornam altamente favoráveis para certas aplicações, como por exemplo, em sistemas de liberação de fármacos, uma vez que podem ser capazes de atravessar membranas biológicas (WILCZEWSKA *et al.*, 2012). Lipossomas, carreadores lipídicos nanoestruturados, nanopartículas lipídicas sólidas, dendrímeros e nanopartículas poliméricas são alguns exemplos desses nanocarreadores.

Segundo a *National Nanotechnology Initiative* são consideradas nanopartículas aquelas de tamanho entre 1 e 100 nm em pelo menos uma dimensão, apesar do prefixo nano significar 10^{-9} e ser utilizado para designar partículas que apresentem até a 1000 nm (WILCZEWSKA *et al.*, 2012).

De acordo com a agência americana FDA (*Food and Drug Administration*), materiais em escala nanométrica podem apresentar diferenças quanto às propriedades físicas, químicas ou biológicas quando comparados com materiais de mesma composição química, porém em maior escala (micro ou macroscópica). Essas diferenças podem incluir alterações nas propriedades magnéticas, mudanças nas atividades elétricas ou ópticas, aumento da integridade estrutural, atividades biológicas ou químicas modificadas, dentre outras características únicas de nanomateriais (FDA, 2014).

As nanopartículas poliméricas (NPP) podem ser constituídas por polímeros naturais, como, por exemplo, pectina, goma gelana, quitosana, alginato (MARTÍNEZ *et al.*, 2011); ou sintéticos, isolados ou associados de diversas maneiras (FONTE *et al.*, 2015). O material polimérico que fará parte da sua composição deve ser biocompatível e, de preferência, biodegradável (AMMAR *et al.*, 2012).

As NPP podem ser obtidas através de diferentes metodologias, convencionalmente divididas entre técnicas de polimerização de monômeros ou técnicas de dispersão de macromoléculas ou polímeros pré-formados (SOPPIMATH *et al.*, 2001; PINTO REIS *et al.*, 2006).

Dependendo da técnica empregada, as nanopartículas obtidas apresentarão estrutura matricial ou do tipo sistema reservatório, sendo que o fármaco poderá se encontrar dissolvido, disperso, encapsulado ou ligado a diferentes regiões da estrutura (SOPPIMATH *et al.*, 2001).

As nanoesferas são sistemas matriciais ou monolíticos, nos quais o fármaco encontra-se dissolvido ou disperso através da matriz polimérica. Já as nanocápsulas são sistemas do tipo reservatório, nos quais o fármaco encontra-se encapsulado em um núcleo circundado por uma membrana polimérica.

Guzman-Villanueva e co-autores (2011) demonstraram a obtenção de nanopartículas de hidrogéis (alginato de sódio e quitosana) a partir da nebulização seguida de geleificação ionotrópica e complexação polieletrólítica, sendo que as partículas formadas apresentaram forma esférica bem definida e tamanho de partícula de cerca de 840 nm.

El-Sherbiny e Smyth (2011) também empregaram o método baseado na nebulização–geleificação e nebulização–complexação polieletrólítica e desenvolveram nanopartículas de hidrogel de alginato reticuladas ionicamente com cloreto de cálcio ou duplamente reticuladas com cloreto de cálcio e quitosana-polietilenoglicol. As nanopartículas esféricas apresentaram tamanhos de aproximadamente 811 e 941 nm.

Nosso grupo de pesquisa tem estudado e desenvolvido novos sistemas poliméricos nanoestruturados para a liberação de fármacos, como uma alternativa tecnológica para melhorar as propriedades biofarmacêuticas de algumas moléculas, solucionar problemas como baixa biodisponibilidade oral ou mesmo viabilizar a administração por vias alternativas e mais vantajosas. Recentemente, nanopartículas mucoadesivas obtidas a partir da complexação polieletrólítica de quitosana e ftalato de hipromelose foram capazes de aumentar a biodisponibilidade oral da zidovudina, um antiretroviral utilizado para o tratamento da AIDS (PEDREIRO, 2015).

Neste contexto, o presente trabalho explorou o desenvolvimento de NPP de GG:P como potencial estratégia para a veiculação do RES para o cólon.

3 OBJETIVO

Desenvolver e caracterizar NPP mucoadesivas de misturas de GG e P para a liberação cólon-específica do RES, através da geleificação ionotrópica associada ou não à nebulização empregando $AlCl_3$ como agente reticulante.

4 METODOLOGIAS

4.1 Obtenção de nanopartículas de GG:P

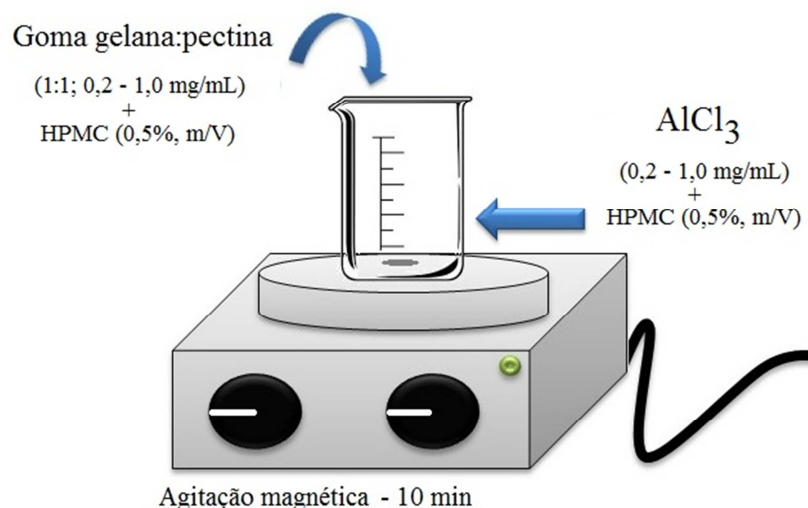
4.1.1 Geleificação ionotrópica

As NPP foram primeiramente obtidas por geleificação ionotrópica, através da mistura direta de dispersões de GG:P sobre a solução reticulante. Utilizou-se AlCl_3 como agente reticulante e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC-E3) como agente estabilizante.

Uma solução estoque de GG:P (1:1) na concentração de 1 mg/mL contendo HPMC (0,5% m/V) foi preparada sob aquecimento (80°C) e agitação magnética (30 min). As diluições foram realizadas (0,2 – 1,0 mg/mL) mantendo-se a concentração final de HPMC no meio em 0,5% (m/V). Da mesma maneira, preparou-se uma solução estoque de AlCl_3 (1 mg/mL) contendo HPMC (0,5% m/V) e as diluições (0,2 – 1,0 mg/mL) foram realizadas mantendo-se a concentração final de HPMC em 0,5% (m/V).

As dispersões poliméricas foram adicionadas às soluções de agente reticulante sob agitação magnética (100 rpm) e a reação de reticulação foi mantida por 10 min adicionais sob agitação em temperatura ambiente (Figura 1). As soluções de NPP obtidas apresentaram pH 5,0 e foram utilizadas para avaliar o potencial zeta e o tamanho de partícula em equipamento Zetasizer Nano-ZS[®] (Malvern).

Figura 1: Representação esquemática do processo de obtenção de NPP de GG:P através do método da geleificação ionotrópica por mistura direta dos polímeros ao reticulante.

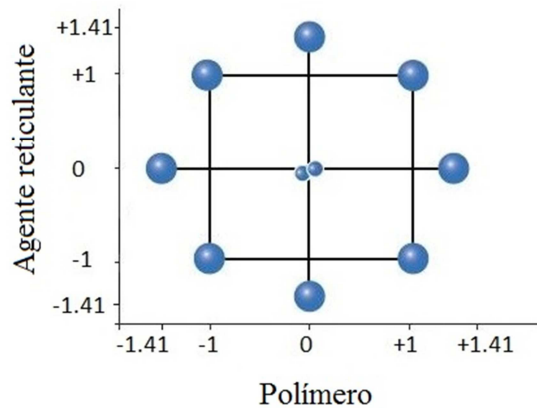


4.1.1.1 Planejamento dos experimentos

Para a obtenção das NPP por geleificação ionotrópica, foi realizado um planejamento fatorial do tipo composto central com duas variáveis independentes, sendo elas a concentração

polimérica da mistura GG:P e a concentração de AlCl_3 . Um total de 10 ensaios foi realizado de modo aleatório, que incluiu 4 pontos do cubo, 4 pontos axiais e 1 ponto central em duplicata (Figura 2). As variáveis dependentes estudadas foram potencial zeta e tamanho de partícula. O planejamento foi delineado e analisado utilizando o *software* Statistica 7[®] (StatSoft Inc.).

Figura 2: Representação esquemática do planejamento fatorial tipo composto central empregado na obtenção das NPP.



As composições das amostras preparadas (ensaios) estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Composição das NPP e valores dos níveis das variáveis selecionadas para o planejamento fatorial do tipo composto central.

NPP	Concentração polimérica (mg/mL)	AlCl_3 (mg/mL)
1	0,4 (-1)	0,4 (-1)
2	0,4 (-1)	0,8 (+1)
3	0,8 (+1)	0,4 (-1)
4	0,8 (+1)	0,8 (+1)
5	0,2 ($-\sqrt{2}$)	0,6 (0)
6	1,0 ($+\sqrt{2}$)	0,6 (0)
7	0,6 (0)	0,2 ($-\sqrt{2}$)
8	0,6 (0)	1,0 ($+\sqrt{2}$)
9	0,6 (0)	0,6 (0)
10	0,6 (0)	0,6 (0)

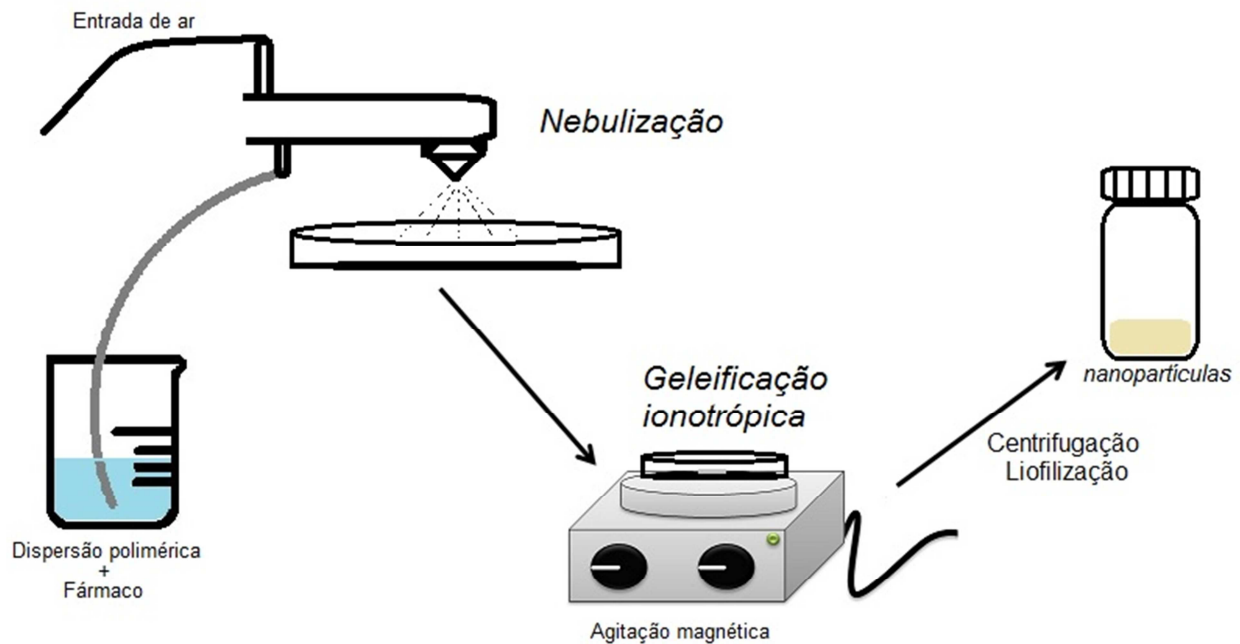
4.1.2 Nebulização seguida de geleificação ionotrópica

Posteriormente, NPP foram obtidas pelo método da nebulização seguida de geleificação ionotrópica em solução de AlCl_3 . Dispersões aquosas de misturas de GG:P (1:1 e 4:1) a 2% (m/V) foram preparadas a 80°C, sob agitação magnética durante 20 minutos, para a completa dispersão dos polímeros. Em seguida, adicionou-se o RES (0,25 ou 0,5% m/V) também sob agitação magnética até completa dispersão (15 min) ao abrigo da luz.

Para a nebulização, utilizou-se o sistema nebulizador (lança de pulverização com bocal de fluido duplo) de um leito fluidizado (Minilab XP, Diosna) a uma pressão de 7 Psi e abertura

do bocal de 0,8 mm. As dispersões poliméricas (50 mL) foram nebulizadas sobre 200 mL de solução previamente resfriada (4°C) de AlCl₃ (0,5 ou 3% m/V) contendo ou não hidroxipropilmetilcelulose (HPMC-E3) a 0,2% (m/V) como estabilizante. As NPP formadas permaneceram sob agitação magnética por 20 minutos adicionais, ao abrigo da luz e banho de gelo. Em seguida, as suspensões foram centrifugadas a 3.000 rpm durante 2 min e o precipitado foi congelado a -80 °C durante 24 h e liofilizado por 48 h (Figura 3).

Figura 3: Representação esquemática do processo de obtenção de NPP de GG:P através do método de nebulização – geleificação ionotrópica.



As composições das amostras preparadas estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2: Composição das NPP de GG:P obtidas através da nebulização – geleificação ionotrópica.

NPP	Proporção G:P	Polímeros (%)	AlCl ₃ (%)	HPMC (%)	RES (%)
NG11_A10,5S_res0,25	1:1	2,00	0,50	0,20	0,25
NG11_A10,5S_res0,5	1:1	2,00	0,50	0,20	0,50
NG11_A13S_res0	1:1	2,00	3,00	0,20	0,00
NG11_A13_res0,5	1:1	2,00	3,00	0,00	0,50
NG41_A10,5_res0,5	4:1	2,00	0,50	0,00	0,50
NG41_A10,5S_res0,25	4:1	2,00	0,50	0,20	0,25
NG41_A10,5S_res0,5	4:1	2,00	0,50	0,20	0,50
NG41_A13_res0,5	4:1	2,00	3,00	0,00	0,50

4.2 Determinação do potencial zeta (PZ)

O PZ foi determinado através da mobilidade eletroforética em equipamento Zetasizer Nano ZS[®] (Malvern Instruments).

4.3 Determinação do tamanho de partícula e índice de polidispersão (PDI)

O tamanho de partícula e o PDI foram determinados pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS - *Dynamic Light Scattering*) utilizando equipamento Zetasizer Nano ZS[®] (Malvern Instruments). Imediatamente após a obtenção, 1,0 mL das suspensões de NPP foi colocado em tubos Eppendorf[®] e centrifugados a 14.000 rpm por 30 minutos e o sobrenadante foi utilizado para a determinação do diâmetro hidrodinâmico das NPP. As leituras foram realizadas em triplicata.

4.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As NPP obtidas pelo método de nebulização-geleificação foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura em microscópio eletrônico de varredura de alta resolução modelo JEOL JSM-7500F.

As NPP suspensas em meio aquoso foram colocadas nos suportes de amostra metálicos e secas em dessecador contendo sílica, sob vácuo, por um período de 7 dias, ao abrigo da luz. Após serem secas, foram recobertas com ouro durante 20 segundos e fotomicrografias em diferentes aumentos foram obtidas.

4.5 Eficiência de encapsulação (EE%)

A EE% do RES nas NPP foi determinada indiretamente, através da quantificação de fármaco livre no sobrenadante. As suspensões contendo as NPP foram centrifugadas a 50.000 rpm durante 30 min em ultracentrífuga (Hitachi[®]) e a quantidade de RES livre no sobrenadante foi determinada por espectrofotometria na região do UV em 306 nm. A quantidade de fármaco encapsulado nas nanopartículas foi determinada pela diferença entre a massa total de fármaco adicionada às formulações e a massa de fármaco livre no sobrenadante. A EE% foi calculada como a razão entre a quantidade encapsulada em relação à quantidade total adicionada, segundo a Equação 1:

$$EE\% = \frac{(m_{total} - m_{livre})}{m_{total}} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

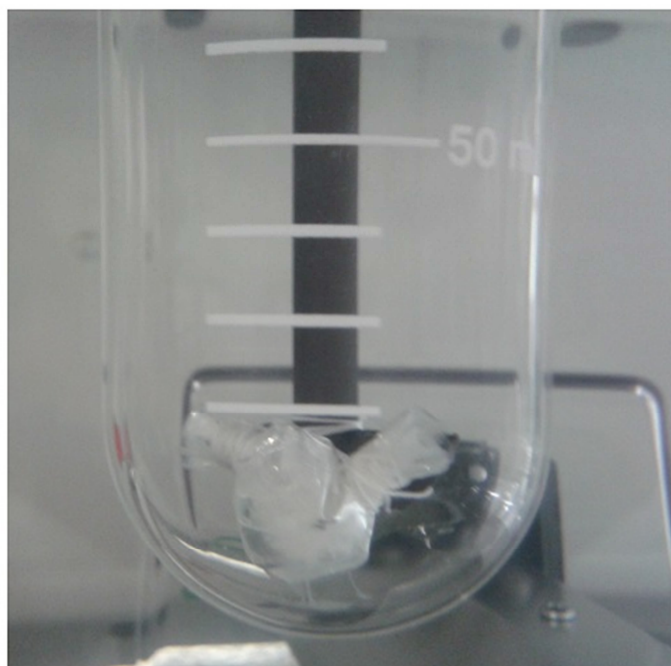
em que m_{total} é a massa (mg) de fármaco adicionada para a obtenção das nanopartículas e m_{livre} é a massa (mg) de RES quantificada no sobrenadante (SHARMA *et al.*, 2012).

4.6 Determinação do perfil de liberação *in vitro* do RES em pH 1,2 e 6,8

O teste de dissolução para determinar o perfil de liberação *in vitro* do RES a partir das NPP (formulação NG41_A13_res0,5) foi realizado em meios com diferentes valores de pH (1,2 e 6,8), simulando a variação que ocorre ao longo do TGI. Esta amostra foi selecionada devido à maior semelhança entre sua composição e a da microesfera M10, que foi capaz de controlar a liberação por período mais prolongado (item 5.3.2, Capítulo III).

Inicialmente o ensaio foi realizado em meio ácido (HCl 0,1N, pH 1,2 contendo LSS 1%) por 2 horas. Em seguida, foi conduzida a etapa do ensaio em tampão pH 6,8, através da adição de Na₃PO₄ 0,2M, conforme preconizado pela Farmacopeia Americana para formas farmacêuticas de liberação retardada (USP, 2011). O ensaio foi realizado com massa de NPP correspondente a 5 mg de fármaco, utilizando o aparato 2 (pás) de dimensão reduzida (volume da cuba de 150 mL), sob velocidade de agitação de 50 rpm e temperatura de 37 ± 0,4 °C. As nanopartículas foram colocadas em um saco de diálise de membrana de acetato de celulose com poros de 14 kDa. As extremidades foram fechadas com fio de sutura e os sacos foram presos às pás (Figura 4). Alíquotas foram coletadas em intervalos de tempo pré-estabelecidos, sendo feita a reposição imediata do mesmo volume de meio à mesma temperatura. A quantificação do fármaco liberado foi realizada por CLAE, segundo metodologia validada (Capítulo V). Os ensaios foram realizados em triplicata.

Figura 4: Aparato com o saco de diálise contendo as NPP submetidas ao ensaio de dissolução em cuba de volume reduzido.



4.7 Análise dos mecanismos de liberação do fármaco

O mecanismo que rege a liberação do fármaco a partir das nanopartículas foi avaliado através da aplicação de modelos matemáticos aos dados de dissolução. Os modelos matemáticos empregados foram ordem zero, primeira ordem, Korsmeyer–Peppas, Higuchi, Hixson–Crowell, Baker–Lonsdale e Weibull. Para a análise, utilizou-se o software Sigma Plot 10.0 e avaliou-se o modelo que melhor se correlaciona aos dados através dos maiores valores apresentados para o coeficiente de determinação (r^2).

4.8 Avaliação *in vitro* da citotoxicidade em células Caco-2 e HT29-MTX: Teste de viabilidade celular através do ensaio do MTT

As células Caco-2 e HT29-MTX foram cultivadas conforme descrito no item 4.2.2.1 do Capítulo I e a viabilidade celular foi avaliada através do teste do MTT, conforme descrito no item 4.2.2.2 do referido capítulo.

Para avaliar a citotoxicidade das NPP (NG41_A13_res0,5), foram utilizadas placas de 96 poços, com área de 0,32 cm²/poço. Preparou-se uma suspensão aquosa de nanopartículas a 1 mg/mL e as concentrações testadas foram de 50, 150, 300, 400 e 500 µg/mL, preparadas em HBSS. Adicionou-se em cada poço 200 µL das suspensões contendo as nanopartículas. Os ensaios foram realizados em quadruplicata.

O fármaco livre também foi avaliado em placas de 96 poços, em concentrações correspondentes à quantidade de fármaco encapsulado nas nanopartículas (10, 30, 60, 80 e 100 µg/mL). Para isso, foi preparada uma solução estoque de RES a 100 µg/mL em HBSS contendo 0,5% (v/v) de DMSO, de modo que a concentração final do solvente orgânico nas células não ultrapassasse 0,5%. O fármaco foi dissolvido em DMSO e HBSS foi adicionado sob agitação magnética, sendo imediatamente realizadas as diluições. As células também foram incubadas com HBSS contendo 0,5% (v/v) de DMSO a fim de avaliar a citotoxicidade do solvente orgânico. Os ensaios foram realizados em quadruplicata.

4.9 Avaliação da permeabilidade *in vitro* em monocultura de células Caco-2 e em co-cultura tripla de células

Os testes de permeabilidade *in vitro* foram realizados em dois diferentes modelos celulares: 1) monocultura de células Caco-2 e 2) co-cultura tripla de células, composta de células Caco-2, HT29-MTX e Raji-B linfócitos.

O ensaio foi realizado conforme metodologia apresentada no item 4.9 do Capítulo III.

O meio do compartimento apical foi removido imediatamente antes de iniciar o ensaio de permeação e 1,5 mL de suspensão de NPP (NG41_A13_res0,5) em HBSS, equivalente a 50 µg/mL de RES, foram adicionados ao compartimento apical. Os ensaios foram realizados em triplicata e o fármaco permeado foi quantificado empregando CLAE, conforme descrito no item 4.9.1 do Capítulo III.

4.10 Permeabilidade aparente (P_{ap})

A permeabilidade aparente (P_{ap}) do fármaco a partir das nanopartículas também foi determinada conforme cálculo apresentado no item 4.10 do Capítulo III.

4.11 Resistência Elétrica Transepitelial (TEER)

A integridade das monocamadas celulares foi avaliada antes, durante e após os experimentos de permeabilidade através da medida do TEER utilizando um voltímetro epitelial EVOM^{2®} (*World Precision Instruments*), conforme descrito no item 4.11 do Capítulo III.

4.12 Avaliação *ex vivo* da permeabilidade e da retenção intestinal do RES pelo método do saco intestinal invertido

O método do saco intestinal invertido foi utilizado para avaliar a permeabilidade e a retenção do RES no epitélio intestinal a partir da nanopartículas, como descrito no item 4.12 do Capítulo III.

Para a avaliação, uma massa de NPP (NG41_A13_res0,5) equivalente a 10 mg de RES foi adicionada ao meio de incubação. Foram realizados ensaios com saco intestinal invertido com muco preservado e sem muco, após tratamento com agente mucolítico (N-acetilcisteína) conforme procedimento previamente descrito (item 4.12, Capítulo III). Os ensaios foram realizados com seis replicatas cada, após aprovação do protocolo pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP/Araraquara, parecer n° 87/2015.

4.13 Análise estatística dos resultados

Os dados foram tratados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA), seguida por comparações múltiplas pelo método de Tukey e adotou-se nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção das nanopartículas por geleificação ionotrópica

Anteriormente ao planejamento fatorial do tipo composto central, diversas formulações foram testadas para obtenção de NPP através da mistura direta dos polímeros sobre a solução reticulante.

Foram variadas as concentrações poliméricas (0,1 a 1,0 gm/mL) e as concentrações de AlCl_3 (0,1 a 1,0 mg/mL), variando-se também o pH do meio (4,0 a 7,0) e diferentes proporções polímero:reticulante (1:1 a 9:1) foram testadas, a fim de encontrar a região de formação das NPP. Entretanto, a geleificação ionotrópica não ocorre da mesma maneira que a complexação polieletrólítica, e encontrar a região de formação de partículas esféricas com carga superficial que garanta a estabilidade das mesmas em suspensão foi um grande desafio.

A partir dos resultados dos testes preliminares (dados não apresentados), optou-se por realizar um planejamento fatorial do tipo composto central a fim de avaliar a influência das concentrações de polímero e reticulante, bem como da proporção entre ambos nas propriedades de tamanho de partícula e potencial zeta, e, assim, encontrar as melhores condições para a obtenção de NPP estáveis e de tamanhos homogêneos, com um número reduzido de experimentos.

HPMC-E3 foi adicionado ao meio como estabilizante das NPP, após verificar que sua presença permitia a melhor avaliação do tamanho de partícula pela técnica de DLS, uma vez que as NPP de GG:P apresentavam problemas de aglomeração e precipitação na cubeta durante a análise de tamanho.

5.1.1 Determinação do potencial zeta (PZ)

A propriedade elétrica das NPP é dependente da presença de cargas na sua superfície (SARAF, 2010). Para nanopartículas estabilizadas por cargas, valores, em módulo, maiores que 30 mV indicam maior estabilidade física, devido à repulsão entre as partículas, o que previne a formação de aglomerados, sendo que os polieletrólitos tendem a aumentar o valor do PZ (PEDREIRO, 2015).

Os resultados de PZ (mV), tamanho de partícula (d.nm) e PDI para as 10 formulações preparadas empregando o planejamento fatorial estão apresentados na Tabela 3. O PZ variou entre -28,27 e 3,16 mV, o tamanho de partícula entre 59,35 e 657,80 nm e o PDI entre 0,679 e 1,000.

Tabela 3: Valores de potencial zeta, tamanho de partícula e PDI das NPP obtidas no planejamento fatorial do tipo composto central (média ± DP, n=3).

NPP	PZ (mV)	Tamanho de partícula (d.nm)	PDI
1	1,763 ± 0,272	249,00 ± 44,03	0,679 ± 0,136
2	2,233 ± 0,254	59,35 ± 8,50	0,920 ± 0,139
3	-25,000 ± 1,873	657,80 ± 295,20	0,795 ± 0,159
4	-17,267 ± 0,635	91,99 ± 16,33	1,000 ± 0,000
5	2,423 ± 0,006	299,10 ± 66,50	0,843 ± 0,271
6	-21,600 ± 2,030	405,80 ± 67,03	0,831 ± 0,016
7	-28,267 ± 0,351	387,70 ± 179,10	0,762 ± 0,206
8	3,160 ± 0,114	*	*
9	-20,100 ± 1,825	603,50 ± 118,10	1,000 ± 0,000
10	-20,967 ± 0,252	592,60 ± 130,80	0,937 ± 0,109

* não foi possível determinar os valores pela técnica empregada.

Foi possível observar que as NPP que apresentaram elevada carga de superfície negativa (>20 mV) foram mais estáveis no meio contendo 0,5% de HPMC. Entretanto, não foi possível evitar a agregação das partículas que apresentaram carga superficial aproximadamente neutra, entre 1,7 e 3,2 mV.

A análise de variância (Tabela 4) mostrou que os efeitos lineares dos fatores (1) concentração de polímeros e (2) concentração de AlCl₃ foram estatisticamente significativos sobre o PZ das NPP (p<0,1).

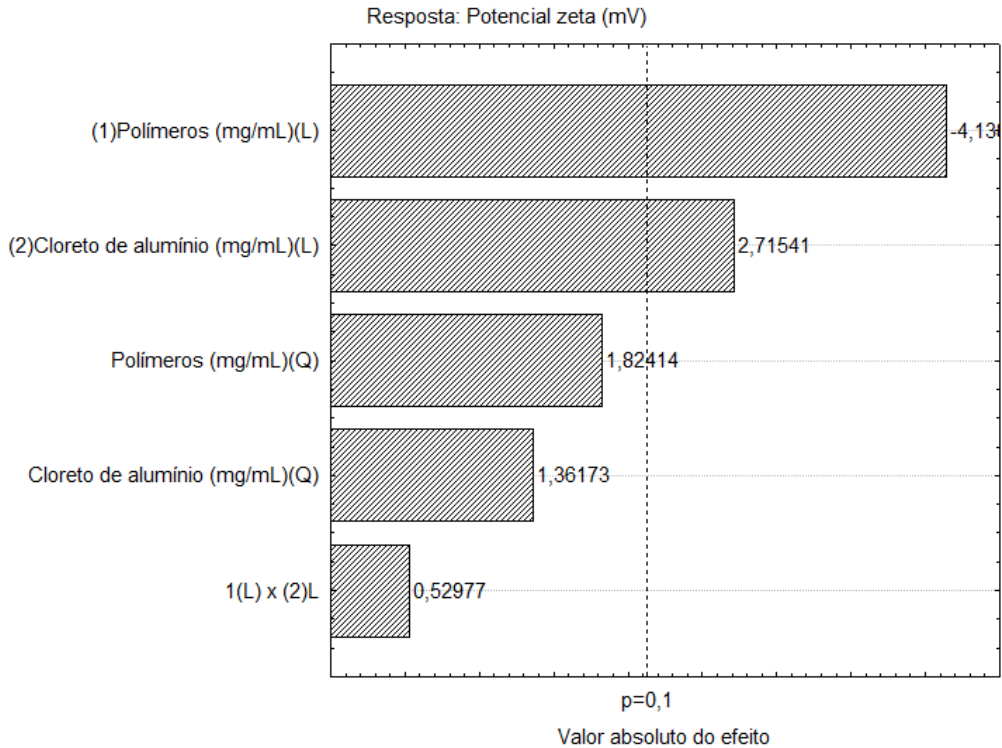
Tabela 4: Dados da análise de variância (ANOVA) para os efeitos estimados no planejamento fatorial tipo composto central para a resposta PZ.

Efeitos	Soma quadrática	Grau de liberdade	Média quadrática	Teste f	Nível de significância (p)
(1)Polímeros (mg/mL)(L) *	804,74	1	804,74	17,13	0,014*
Polímeros (mg/mL)(Q)	156,35	1	156,36	3,33	0,142
(2) AlCl ₃ (mg/mL)(L) *	346,47	1	346,47	7,37	0,053*
AlCl ₃ (mg/mL)(Q)	87,13	1	87,13	1,85	0,245
1L x 2L	13,19	1	13,19	0,28	0,624
Erros	187,96	4	46,99		
Total	1528,07	9			

*efeito estatisticamente significativo (p<0,1)

A Figura 5 apresenta o gráfico de Pareto com os valores absolutos dos efeitos lineares (L) e quadráticos (Q) dos fatores concentração de polímeros e concentração de AlCl₃ sobre o PZ das NPP.

Figura 5: Gráfico de Pareto para os efeitos dos fatores avaliados sobre a resposta PZ das NPP.

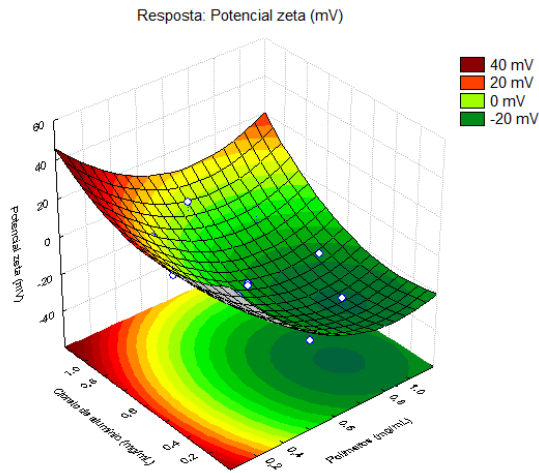


A linha tracejada no gráfico corresponde ao valor de $p=0,1$ e, como é possível verificar, os efeitos lineares das concentrações de polímeros e de $AlCl_3$ foram significativos sobre o PZ.

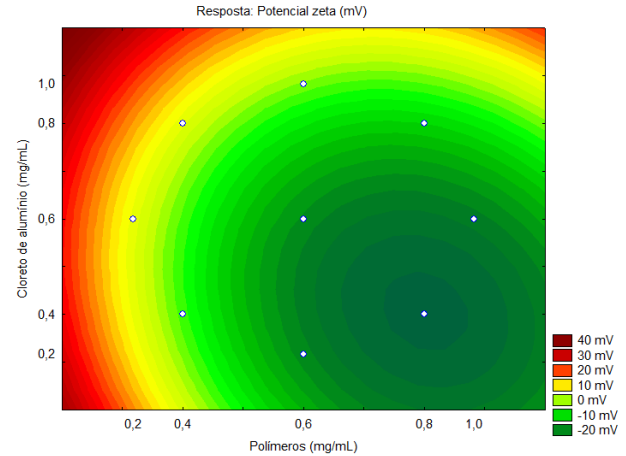
A concentração de polímeros apresentou efeito negativo (-4,13), evidenciando que a maior quantidade de GG e P confere maior carga negativa às NPP. Tal comportamento está evidenciado nos gráficos de superfície de resposta e contorno (Figura 6), nos quais é possível observar a área verde escuro, que corresponde à maior carga negativa, concentrada nas regiões das maiores concentrações poliméricas. Já a concentração de $AlCl_3$ apresentou efeito positivo (2,72), evidenciando que a maior quantidade de agente reticulante reduz a carga superficial negativa das NPP.

Figura 6: Gráficos de superfície de resposta (A) e de contorno (B) para os efeitos da concentração de polímeros e da concentração de $AlCl_3$ sobre o PZ das NPP.

A)



B)



A GG e a P são poliânions que apresentam carga negativa no pH mantido durante a preparação das NPP (pH 5,0) (item 5.2.1, Capítulo I), portanto, quanto mais polímeros, maior densidade de cargas negativas a partícula apresentará.

Também é possível observar nesses gráficos (Figura 6) que a área de maior carga negativa aparece deslocada para as maiores concentrações de polímeros e menores concentrações de reticulante, uma vez que o reticulante, sendo catiônico (Al^{3+}), interage com os ânions carboxilatos (COO^-) da GG e da P, reduzindo a carga negativa das NPP.

5.1.2 Determinação do tamanho de partícula e índice de polidispersão (PDI)

Uma importante característica das NPP é o seu tamanho, uma vez que dele depende a possibilidade de penetrarem através das barreiras fisiológicas como o muco e membranas celulares (KUMARI *et al.*, 2010). NPP menores que 200 nm podem ser administradas por via endovenosa sem o risco de provocar embolia (HICKEY *et al.*, 2015). Para as NPP administradas por via oral, diâmetros menores que 1.000 nm são preferíveis para melhorar a absorção, e, dependendo do tamanho e de outras características, poderão atravessar os enterócitos pela via transcelular, serem fagocitadas, serem internalizadas por células M das placas de Peyer ou seguirem a via paracelular (SARMENTO *et al.*, 2007).

A técnica de espalhamento de luz dinâmico, do inglês *Dynamic Light Scattering* (DLS), empregada para medir o tamanho das NPP é baseada no movimento browniano das partículas, movimento em direções aleatórias resultante da colisão entre as partículas (SARAF, 2010). O tamanho medido por esta técnica corresponde ao diâmetro de uma esfera que difunde à mesma velocidade que a partícula que está sendo analisada.

Para amostras polidispersas, com PDI > 0,3, não se deve utilizar o valor de *Z average* (d.nm), que é a média do diâmetro hidrodinâmico determinado para a amostra, pois, nestes casos, a distribuição de tamanho é bastante heterogênea, e, muitas vezes não são distribuições unimodais. Portanto, como as amostras apresentaram tamanho heterogêneo, evidenciado pelos elevados valores de PDI, entre 0,679 e 1,000 (Tabela 3), os dados de tamanho de partícula apresentados referem-se ao tamanho médio apresentado pela maioria das NPP, ou seja, referente ao pico de maior área no gráfico de intensidade gerado pelo *software* do equipamento (*Zetasize software*) (Tabela 3).

A análise de variância (Tabela 5) mostrou que os efeitos lineares e quadráticos dos fatores (1) concentração de polímeros (mg/mL) e (2) AlCl₃ (mg/mL) foram estatisticamente significativos sobre o tamanho das NPP (p<0,05).

Tabela 5: Dados da análise de variância (ANOVA) para os efeitos estimados no planejamento fatorial tipo composto central para a resposta tamanho de partícula.

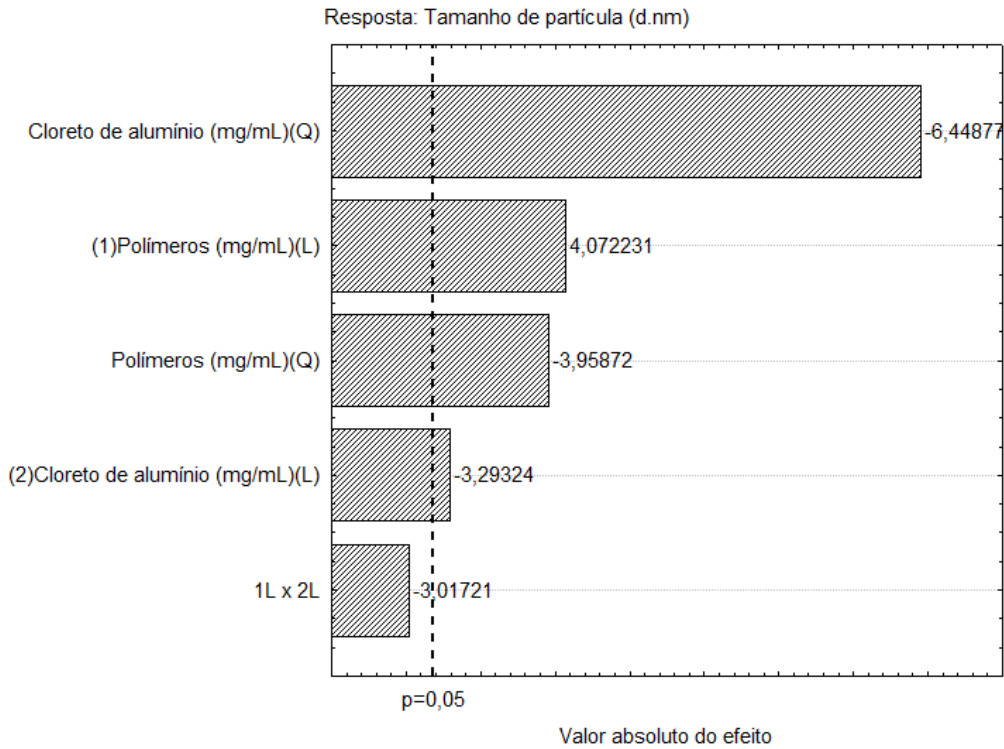
Efeitos	Soma quadrática	Grau de liberdade	Média quadrática	Teste f	Nível de significância (p)
(1)Polímeros (mg/mL)(L) *	64437,65	1	64437,65	16,58	0,027*
Polímeros (mg/mL)(Q)*	60895,33	1	60895,33	15,67	0,029*
(2) AlCl ₃ (mg/mL)(L)*	42142,53	1	42142,53	10,85	0,046*
AlCl ₃ (mg/mL)(Q)*	161595,41	1	161595,41	41,59	0,008*
1L x 2L	35374,09	1	35374,09	9,10	0,057
Erros	11657,25	3	3885,75		
Total	381926,06	8			

*efeito estatisticamente significativo (p<0,05)

A Figura 7 apresenta o gráfico de Pareto com os valores absolutos dos efeitos lineares (L) e quadráticos (Q) dos fatores concentração de polímeros e concentração de AlCl₃ sobre o tamanho das NPP.

Como é possível observar, os efeitos que ultrapassaram a linha tracejada (p=0,05) e são, portanto, significativos foram os efeitos quadráticos e lineares dos dois fatores estudados. O efeito linear da concentração de polímeros foi positivo (4,07), evidenciando que a maior concentração de polímeros confere maior tamanho às NPP. O efeito linear da concentração de AlCl₃ foi negativo (-3,29), demonstrando que a maior reticulação origina partículas de menores tamanhos.

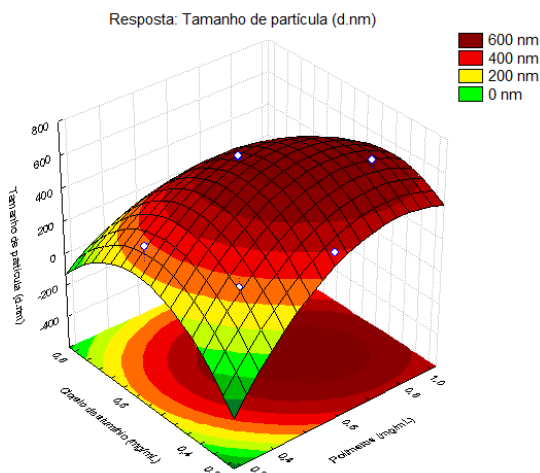
Figura 7: Gráfico de Pareto para os efeitos dos fatores avaliados sobre a resposta tamanho de partícula.



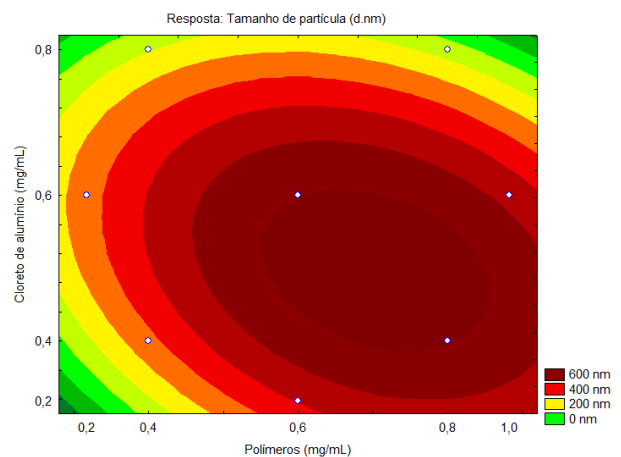
Tal comportamento está evidenciado nos gráficos de superfície de resposta e contorno (Figura 8), nos quais é possível observar os maiores tamanhos (área vermelho escuro), na região das maiores concentrações de polímeros e menores concentrações de reticulante.

Figura 8: Gráficos de superfície de resposta (A) e de contorno (B) para os efeitos da concentração de polímeros e da concentração $AlCl_3$ sobre o tamanho de partícula.

A)



B)



Os maiores tamanhos de partícula (Figura 8) estão concentrados na região que apresentou maior carga negativa, evidenciada pelos menores valores de PZ (Figura 6).

A maior concentração de polímeros deve originar partículas maiores devido à maior quantidade de material que dá origem às NPP.

Já a maior reticulação das cadeias, devido à maior concentração de $AlCl_3$ no meio, origina uma rede mais compacta e fechada, e, portanto, de tamanhos menores. Ainda, em menores concentrações de reticulante, o maior número de ânions carboxilatos que permanecem ionizados nas cadeias dos polímeros deve aumentar a repulsão eletrostática e levar à expansão da matriz, originando partículas de maiores tamanhos.

5.2 Obtenção das NPP por nebulização seguida de geleificação ionotrópica

Os nebulizadores permitem a conversão de líquidos em aerossóis (GUZMAN-VILLANUEVA *et al.*, 2011), originando pequenas gotículas de tamanhos submicrométricos.

Dessa maneira, o sistema nebulizador de um leito fluidizado ligado a uma fonte de ar comprimido foi utilizado para nebulizar dispersões poliméricas contendo fármaco sobre a solução reticulante de $AlCl_3$, contendo ou não HPMC-E3. Os reduzidos tamanhos de gotículas alcançados devido à nebulização favoreceram a obtenção das NPP.

O bico nebulizador pode ser visualizado na Figura 9.

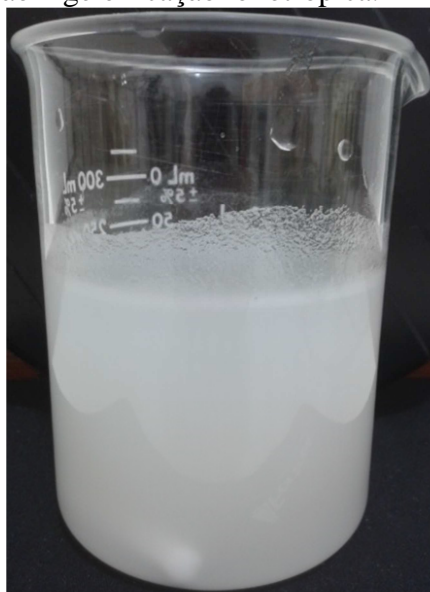
Figura 9: Bico nebulizador utilizado na obtenção das NPP pelo método de nebulização – geleificação ionotrópica.



O sistema coloidal formado pela dispersão das NPP na solução reticulante (Figura 10) foi centrifugado e a fase contendo as nanopartículas foi submetida à liofilização

A adição do estabilizante HPMC-E3 na solução reticulante reduziu a aglomeração das NPP para a análise de tamanho pela técnica de espalhamento de luz dinâmico.

Figura 10: sistema coloidal contendo as NPP imediatamente após o processo de obtenção através da técnica de nebulização – geleificação ionotrópica.



5.2.1 Determinação do potencial zeta (PZ)

Os resultados de PZ (mV), tamanho de partícula (d.nm) e PDI das NPP obtidas pela técnica de nebulização–geleificação ionotrópica estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Resultados de tamanho de partícula (d.nm), índice de polidispersão (PDI) e PZ (mV) das NPP obtidas pela técnica de nebulização–geleificação (média \pm DP).

NPP	PZ (mV)	Tamanho de partícula (d.nm)	PDI
NG11_Al0,5S_res0,25	0,89 \pm 1,17	176,4 \pm 7,4	0,261 \pm 0,012
NG11_Al0,5S_res0,5	-0,77 \pm 0,18	213,9 \pm 1,9	0,190 \pm 0,009
NG11_Al3S_res0	*	339,0 \pm 35,3	0,677 \pm 0,140
NG11_Al3_res0,5	5,72 \pm 0,49	422,9 \pm 160,0	0,767 \pm 0,144
NG41_Al0, 5_res0,5	*	*	*
NG41_Al0,5S_res0,25	0,40 \pm 0,09	189,5 \pm 1,4	0,215 \pm 0,002
NG41_Al0,5S_res0,5	*	251,0 \pm 111,9	0,456 \pm 0,171
NG41_Al3_res0,5	5,87 \pm 0,99	337,1 \pm 96,4	0,973 \pm 0,051

* não foi possível determinar os valores pela técnica empregada

As NPP NG11_Al3_res0,5 e NG41_Al3_res0,5 apresentaram PZ positivo de 5,72 e 5,87 mV, respectivamente, sem diferença significativa entre eles ($p > 0,05$).

As amostras NG11_Al0,5S_res0,5 e NG41_Al0,5S_res0,25 apresentaram valores de PZ -0,77 e 0,40 mV, respectivamente, com diferença significativa entre eles ($p < 0,05$). Ambos foram reticulados em mesma concentração de AlCl₃ (0,5%), entretanto, a NPP de proporção G:P 1:1 apresentou carga superficial negativa, enquanto que a de proporção 4:1 apresentou carga positiva, o que deve estar relacionado à densidade de cargas das dispersões poliméricas.

Para uma mesma concentração polimérica, as dispersões de P apresentaram maior densidade de carga negativa que as de GG (item 5.2.2, Capítulo I), e a maior quantidade de P na proporção 1:1, quando comparada à 4:1, deve ter conferido maior carga negativa à dispersão, que, após a geleificação, ainda apresentou potencial zeta negativo.

A baixa densidade de carga de superfície apresentada pelas NPP deve ter contribuído para a precipitação quando em suspensão aquosa.

A associação da nebulização à geleificação ionotrópica permitiu a eficiente obtenção de NPP em escala laboratorial, com potencial para produção em escalas maiores e com maior controle das características do sistema.

5.2.2 Determinação do tamanho de partícula e índice de polidispersão (PDI) por espalhamento de luz dinâmico

Geralmente, a medida do tamanho e da polidispersidade de nanopartículas é realizada pela combinação de dois ou mais métodos, dentre eles microscopia eletrônica de varredura, microscopia de força atômica, espectroscopia de correlação de fluorescência, ultracentrifugação analítica e espalhamento de luz dinâmico (HICKEY *et al.*, 2015), sendo que a introdução de uma técnica por imagem auxilia e confirma os dados obtidos por outras técnicas.

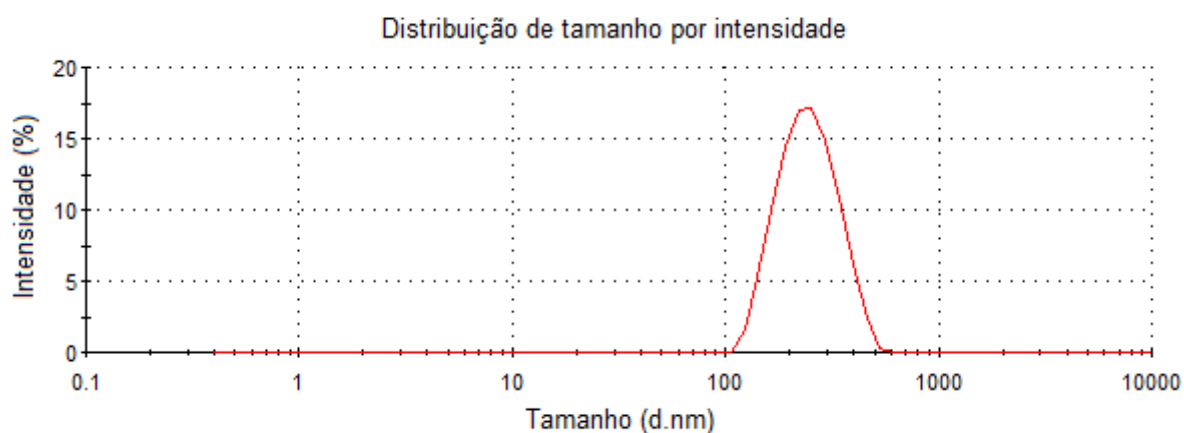
O índice de polidispersão (PDI) é uma medida da amplitude da distribuição de tamanho de partícula, variando de 0 a 1, sendo que valores menores que 0,1 correspondem a partículas monodispersas. O PDI é calculado como o quadrado da razão entre o desvio padrão (DP) e o diâmetro médio ($PDI = (DP/diâmetro\ médio)^2$).

As nanopartículas apresentaram valores de PDI elevados, entre 0,190 e 0,973 (Tabela 6). Considerando a ampla dispersão de tamanho de partículas, para as amostras que apresentaram $PDI > 0,3$ os valores do raio hidrodinâmico (d.nm) (Tabela 6) referem-se a faixa de tamanho que continha a maior porcentagem de partículas.

A amostra NG11_Al3S_res0 apresentou 67,2% das partículas com tamanho de $339,0 \pm 35,3$ nm. Para a amostra NG11_Al3_res0,5, 87,2% das partículas apresentaram tamanho de $422,9 \pm 160,0$ nm. A grande maioria (93,8%) das nanopartículas NG41_Al0,5S_res0,5 apresentaram tamanho de $251,0 \pm 111,9$ nm e 75,0% das partículas da formulação NG41_Al3_res0,5 mediam $337,1 \pm 96,4$ nm.

Para as amostras NG11_Al0,5S_res0,25, NG11_Al0,5S_res0,5 e NG41_Al0,5S_res0,25 cujos valores de PDI indicaram amostras de tamanhos homogêneos (0,261, 0,190 e 0,215, respectivamente), os tamanhos apresentados referem-se ao *Z average* (d.nm), que foram 176,7, 213,9 e 189,5 d.nm, respectivamente. Estas amostras apresentaram distribuições de tamanho unimodais, como mostra o gráfico da Figura 11.

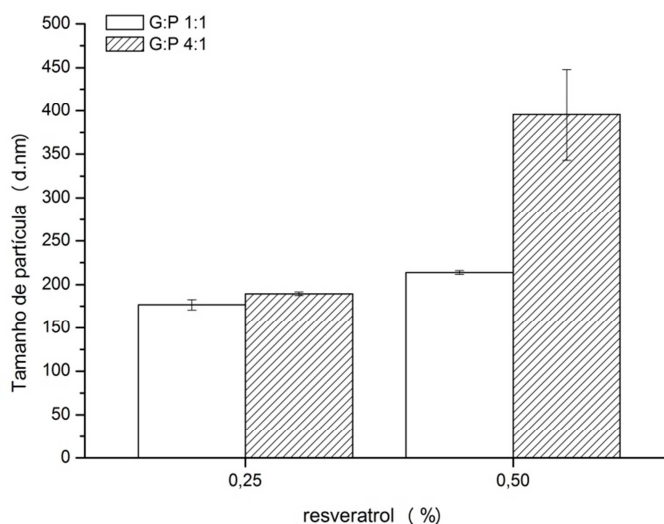
Figura 11: Gráfico de distribuição de tamanho por intensidade de espalhamento de luz da amostra NG11_A10,5S_res0,5.



As amostras NG11_A13_res0,5 e NG41_A13_res0,5 apresentam composições semelhantes às das formulações das microesferas M9 e M10 (item 4.1, Capítulo III), com a diferença que não sofreram reticulação covalente. Não houve diferença estatisticamente significativa entre o tamanho de ambas ($p > 0,05$), indicando que a proporção polimérica não influenciou no tamanho das NPP, que deve ser mais influenciado pelo tamanho das gotículas originadas pelo nebulizador.

O efeito da concentração de fármaco sobre o tamanho das NPP foi avaliado comparando-se a amostra NG11_A10,5S_res0,25 com a NG11_A10,5S_res0,5 e a amostra NG41_A10,5S_res0,25 com a NG41_A10,5S_res0,5, que diferem entre si apenas quanto à concentração de RES (0,25 ou 0,50%, m/V) (Figura 12). A maior concentração de RES originou partículas de tamanhos maiores ($p < 0,05$), devido à maior quantidade de fármaco aprisionado no interior da rede, que leva à expansão da malha e, conseqüentemente, origina partículas de maiores diâmetros.

Figura 12: Tamanho de partícula em função da concentração de fármaco.



NPP da proporção G:P 4:1 reticuladas em $AlCl_3$ a 0,5% e contendo fármaco (0,5%) foram preparadas com e sem adição de estabilizante HPMC (0,2%) na solução reticulante, a fim de avaliar o efeito do agente estabilizante na medida de tamanho e potencial zeta das partículas. A formulação que não possuía o estabilizante (NG41_A10,5_res0,5) apresentou partículas que rapidamente precipitavam, o que prejudicou a determinação do tamanho por DLS, demonstrando a necessidade de um agente estabilizante no meio que viabilize estas análises. Apesar das amostras NG11_A13_res0,5 e NG41_A13_res0,5 não terem sido obtidas com HPMC no meio reticulante, foi possível avaliar o tamanho de partícula por DLS.

Pode-se concluir que a presença de estabilizante no meio permitiu as melhores análises de tamanho no equipamento Zetasizer NanoZS[®].

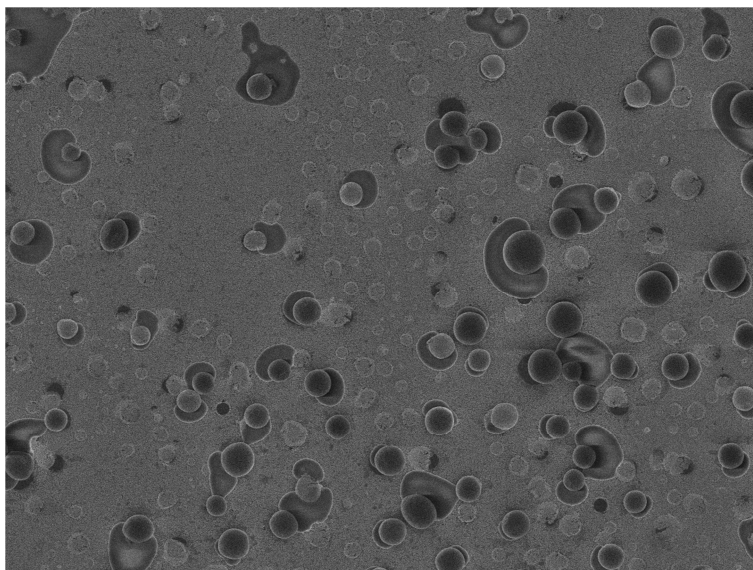
5.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As fotomicrografias apresentadas na Figura 13 referem-se à formulação NG41_A10,5S_res0,5 e evidenciam a forma esférica das NPP obtidas pela técnica de nebulização – geleificação ionotrópica.

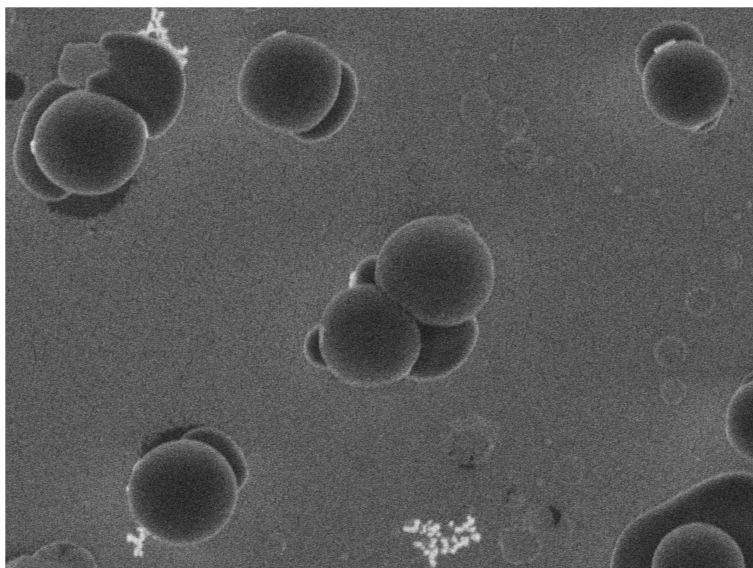
É possível observar algumas NPP isoladas e a presença de aglomerados de poucas partículas. Também foi possível observar partículas de variados tamanhos, corroborando os dados de PDI (Tabela 6).

Figura 13: Fotomicrografias das NPP (NG41_A10,5S_res0,5). A) aumento de 5000 x e B e C) aumento de 10.000 x.

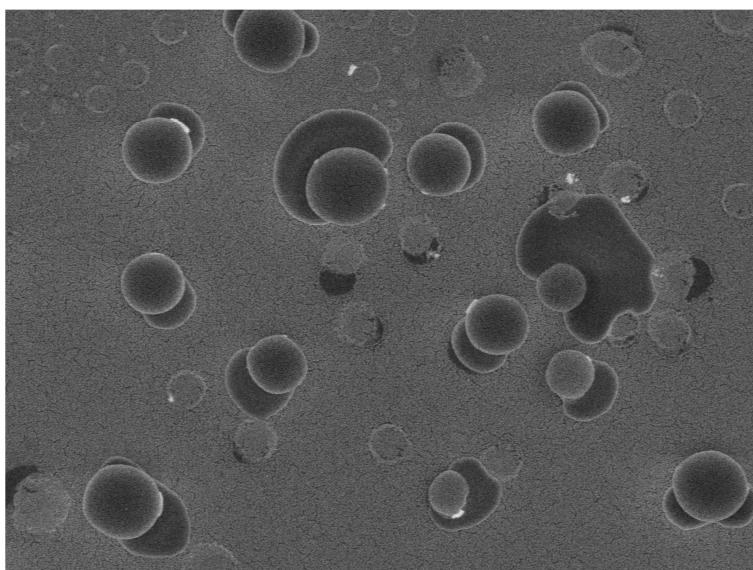
A)



B)



C)



5.4 Eficiência de encapsulação (EE%)

Após a centrifugação, o sobrenadante foi submetido à análise em equipamento Zetasizer Nano ZS[®] (Malvern Instruments) para avaliar a ausência de NPP no sobrenadante por espalhamento de luz dinâmico.

A amostra NG11_Al3_res0,5 apresentou EE% de $81,16 \pm 1,65\%$ e a amostra NG41_Al3_res0,5 $82,93 \pm 0,29\%$. A elevada EE% deve-se à baixa solubilidade do RES em meio aquoso, o que evita uma grande perda de fármaco para a solução aquosa de AlCl₃ durante a reticulação das NPP.

No entanto, esses valores foram menores que os valores de EE% apresentados pelas microesferas (item 5.4, Capítulo II), que encapsularam em média 97,6% do fármaco. A maior área superficial das NPP e o reduzido tamanho, quando comparadas às microesferas, deve contribuir para uma maior perda de fármaco para a solução reticulante durante a obtenção, reduzindo a EE% das NPP (GOVENDER *et al.*, 1999).

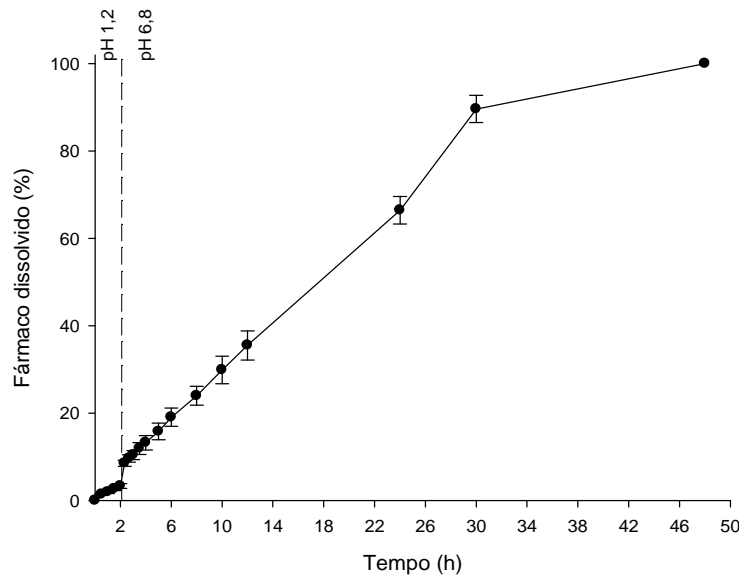
5.5 Determinação do perfil de liberação *in vitro* do RES em pH 1,2 e 6,8

A NPP NG41_Al3_res0,5 foi a formulação selecionada para o estudo de liberação *in vitro* por apresentar em sua composição a mesma proporção G:P (4:1) e as mesmas concentrações de reticulante iônico (AlCl₃ 3%) e fármaco (0,5%) que a microesfera M10, a qual permitiu o maior controle das taxas de liberação do RES (item 5.3.2 do Capítulo III).

O perfil de liberação do RES a partir dessa amostra está apresentado na Figura 14.

Nas primeiras 2h de ensaio em meio ácido (pH 1,2), a liberação foi de apenas 3,3%, observando-se um aumento nas taxas de liberação com o aumento do pH do meio, sendo que aproximadamente 5,2% de RES foi liberado em 20 minutos em pH 6,8. A liberação do RES foi controlada por 48 h, sendo observadas taxas praticamente constantes até 30h.

Figura 14: Perfil de liberação do RES a partir das NPP em meios com diferentes valores de pH (pH 1,2 de 0 – 2h e pH 6,8 de 2 – 48h) (média±DP).



5.6 Análise dos mecanismos de liberação do fármaco

Para avaliação do mecanismo que rege a liberação do fármaco, diferentes modelos matemáticos (ordem zero, primeira ordem, Korsmeyer–Peppas, Higuchi, Hixson–Crowell, Baker–Lonsdale e Weibull) foram aplicados aos dados de liberação.

A partir dos valores dos coeficientes de determinação (r^2) (Tabela 7), o modelo que melhor se correlacionou com os dados de liberação foi o de Korsmeyer–Peppas.

Tabela 7: Valores dos coeficientes de determinação (r^2) para os diferentes modelos aplicados aos dados de liberação do RES a partir das NPP.

Modelo	r^2
Ordem zero	0,956
Primeira ordem	0,959
Korsmeyer–Peppas	0,994
Higuchi	0,841
Hixson–Crowell	0,980
Baker–Lonsdale	0,772
Weibull	0,993

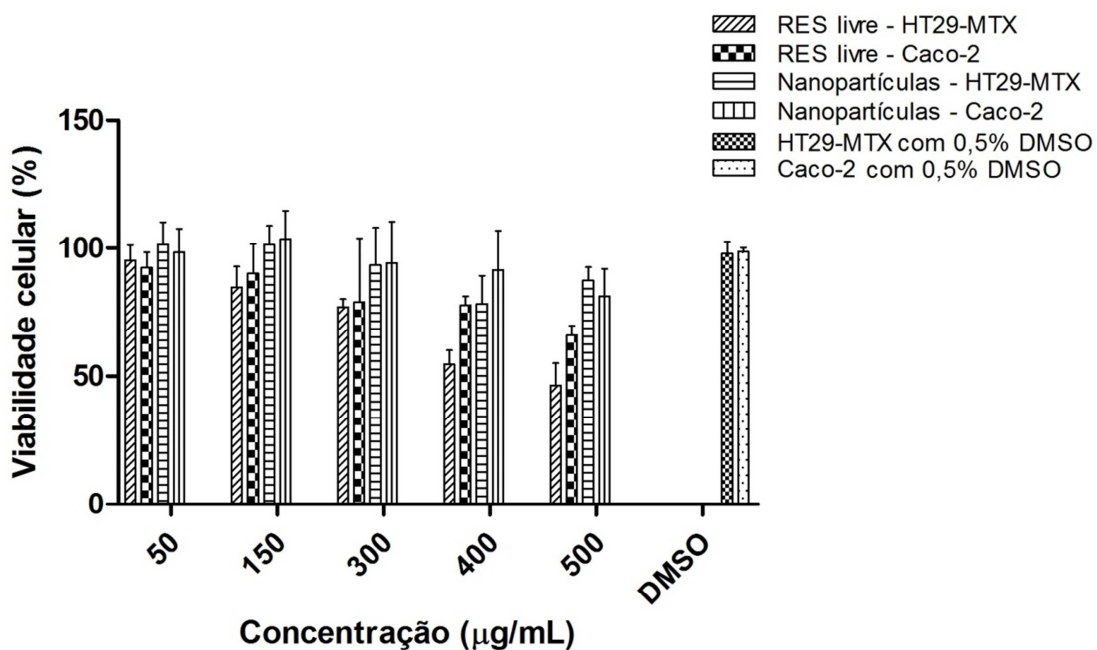
O coeficiente k da equação de Peppas foi de 3,49 e o expoente de liberação (n) de 0,93, indicando que o mecanismo que governa a liberação do fármaco a partir das NPP é o transporte super caso II, para o qual o intumescimento e o relaxamento das cadeias poliméricas na matriz controlam a velocidade de liberação, e uma aceleração das taxas de liberação ocorre devido a um elevado estado de mobilidade das cadeias poliméricas ou a um processo de erosão da matriz. No fim do processo, a dissolução dos polímeros e o estado mais intumescido origina

uma malha mais relaxada que pode acelerar as taxas de liberação do fármaco (MAITI *et al.*, 2011; KAITTY *et al.*, 2013; SINHA *et al.*, 2015; NAYAK *et al.*, 2016).

5.7 Avaliação *in vitro* da citotoxicidade em células Caco-2 e HT29-MTX: Teste de viabilidade celular através do ensaio do MTT

Os resultados da viabilidade celular das linhagens HT29-MTX e Caco-2 após 24h de incubação com concentrações crescentes de NPP e de concentrações correspondentes de RES livre estão apresentados no gráfico da Figura 15.

Figura 15: Viabilidade celular (%) das linhagens HT29-MTX e Caco-2 após 24h de incubação na presença de concentrações crescentes de NPP e RES livre (média \pm DP) e após incubação em HBSS com 0,5% (v/v) de DMSO.



O solvente orgânico DMSO utilizado nas soluções de RES não foi citotóxico na concentração de 0,5% (v/v) sobre as células HT29-MTX, que apresentaram viabilidade de 97,8%, ou sobre as células Caco-2, cuja viabilidade foi de 98,5% (Figura 15).

É possível observar no gráfico (Figura 15) que o aumento na concentração de RES livre levou a uma redução da viabilidade celular para ambas as linhagens utilizadas, sendo mais pronunciada para as células HT29-MTX, cuja viabilidade variou entre 95,1 e 46,4%, sendo observada citotoxicidade para concentrações acima de 80 µg/mL. Para a linhagem Caco-2, a viabilidade variou entre 92,2 e 65,8%, com citotoxicidade para a concentração mais elevada (100 µg/mL).

Não se observou efeito tóxico das NPP sobre as células HT29-MTX, que apresentaram entre 101,4 e 78,2% de células viáveis, nem sobre linhagem Caco-2, cuja viabilidade celular variou entre 103,6 e 81,1%.

As NPP foram capazes de reduzir a toxicidade do RES livre, em ambas as linhagens celulares, comportamento favorável para o objetivo do estudo.

A partir dos resultados de citotoxicidade apresentados, foi possível selecionar concentrações não tóxicas de RES livre e de NPP para a realização dos ensaios de permeabilidade *in vitro* empregando os modelos de monocultura de células Caco-2 e co-cultura tripla de células.

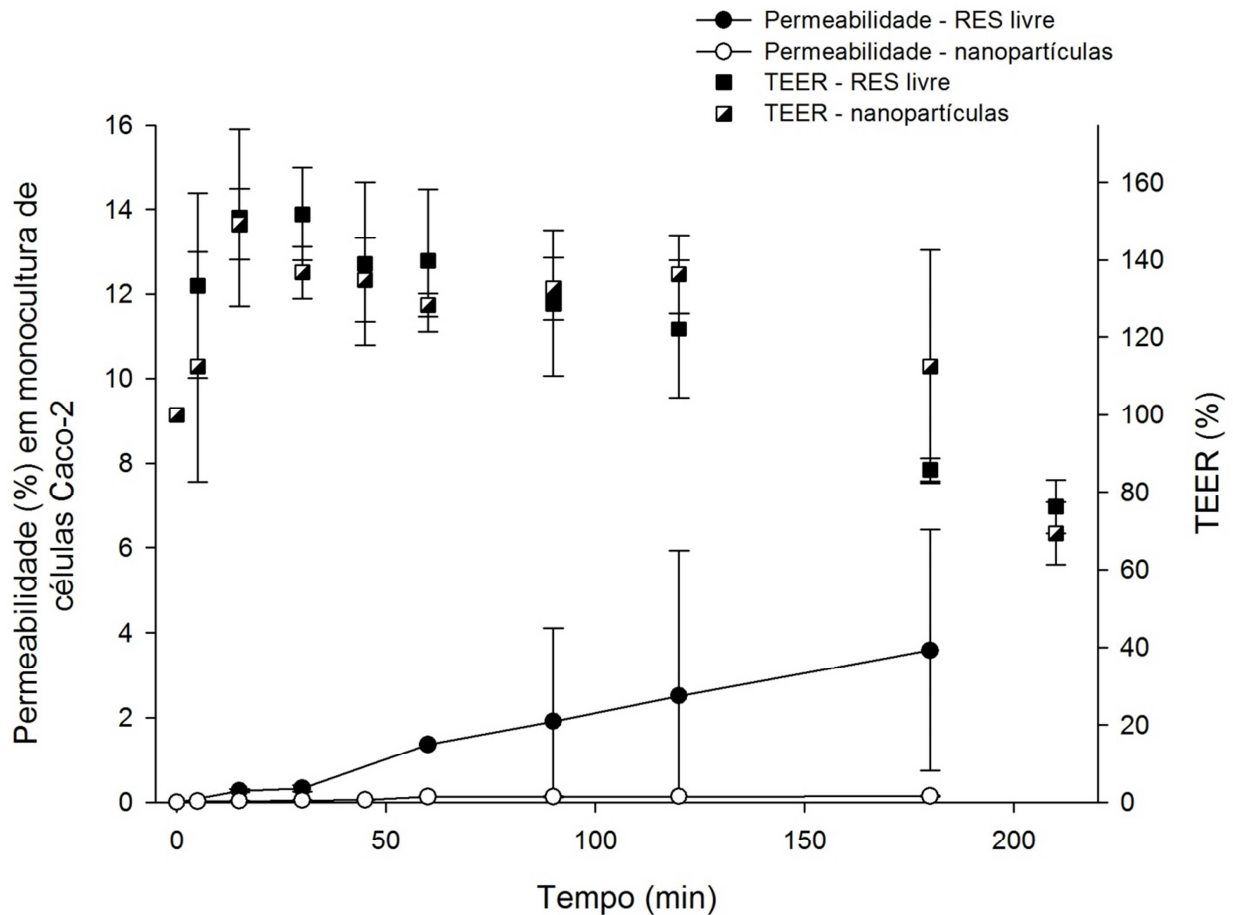
5.8 Avaliação da permeabilidade *in vitro* em monocultura de células Caco-2 e em co-cultura tripla de células

5.8.1 Permeabilidade em monocultura de células Caco-2

Os resultados do perfil de permeação do RES em monocultura de células Caco-2 a partir das NPP e do fármaco livre estão apresentados no gráfico da porcentagem de permeabilidade em função do tempo (Figura 16).

Como observado anteriormente no Capítulo III, o RES encapsulado nas NPP, também foi capaz de permear a monocamada de células Caco-2, sendo que a permeação a partir do sistema nanométrico foi significativamente menor que a permeação do RES livre ao final de 180 min ($p < 0,05$), atingindo valores de 0,15% contra 3,6%, respectivamente.

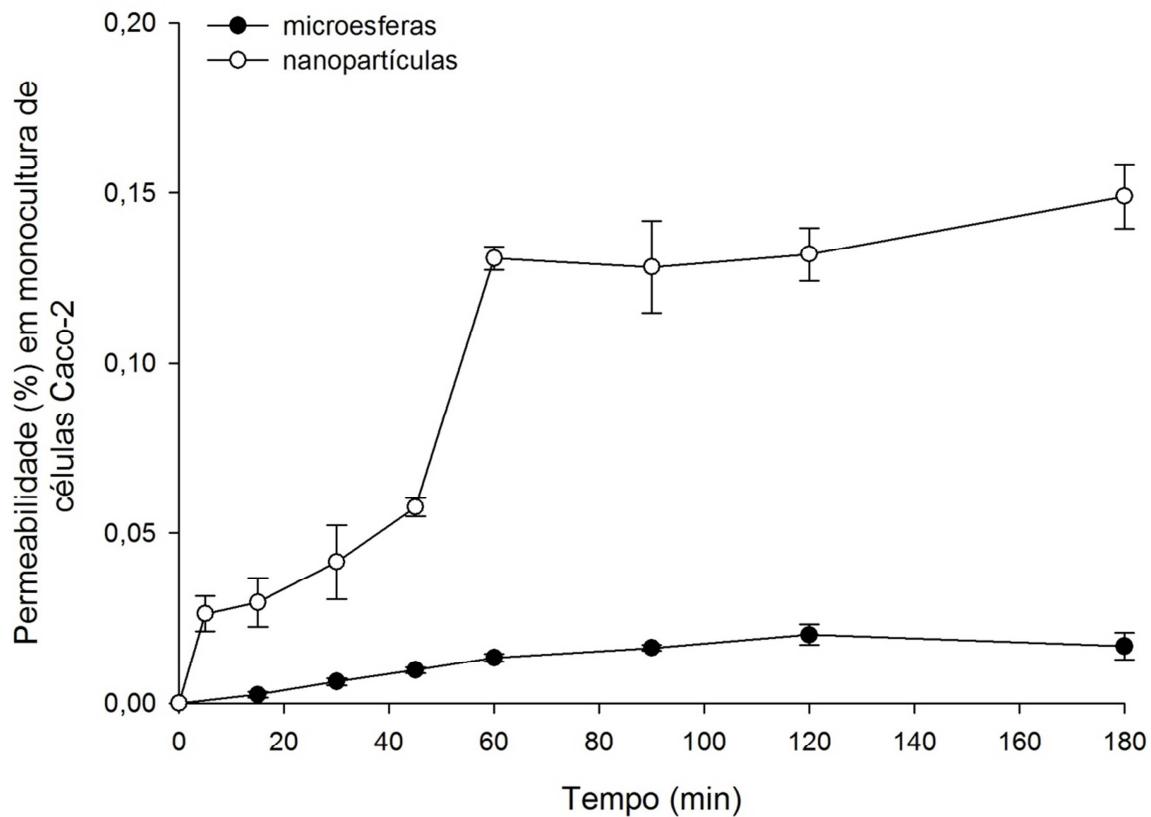
Figura 16: Permeabilidade (%) e TEER (%) em função do tempo durante os experimentos de permeabilidade *in vitro* empregando modelo de monocultura de células Caco-2 para o RES livre e encapsulado em NPP de GG:P (média ± DP; n=3).



Ao final dos experimentos, observou-se uma redução do TEER (%), sendo que os valores finais para esse modelo foram de 76,2% e de 69,3% em relação ao TEER inicial para os ensaios com o fármaco livre e com as nanopartículas, respectivamente.

Ao comparar a permeabilidade do RES encapsulado nos sistemas micro e nanoestruturados de GG:P (Figura 17), é possível observar que a permeabilidade do RES veiculado nas NPP foi significativamente maior que a permeação a partir das microesferas ao final de 180 min (7,5 vezes maior) ($p < 0,05$).

Figura 17: Permeabilidade (%) em função do tempo durante os experimentos de permeabilidade *in vitro* empregando modelo de monocultura de células Caco-2 para o RES encapsulado em microesferas e NPP de GG:P (média \pm DP; n=3).



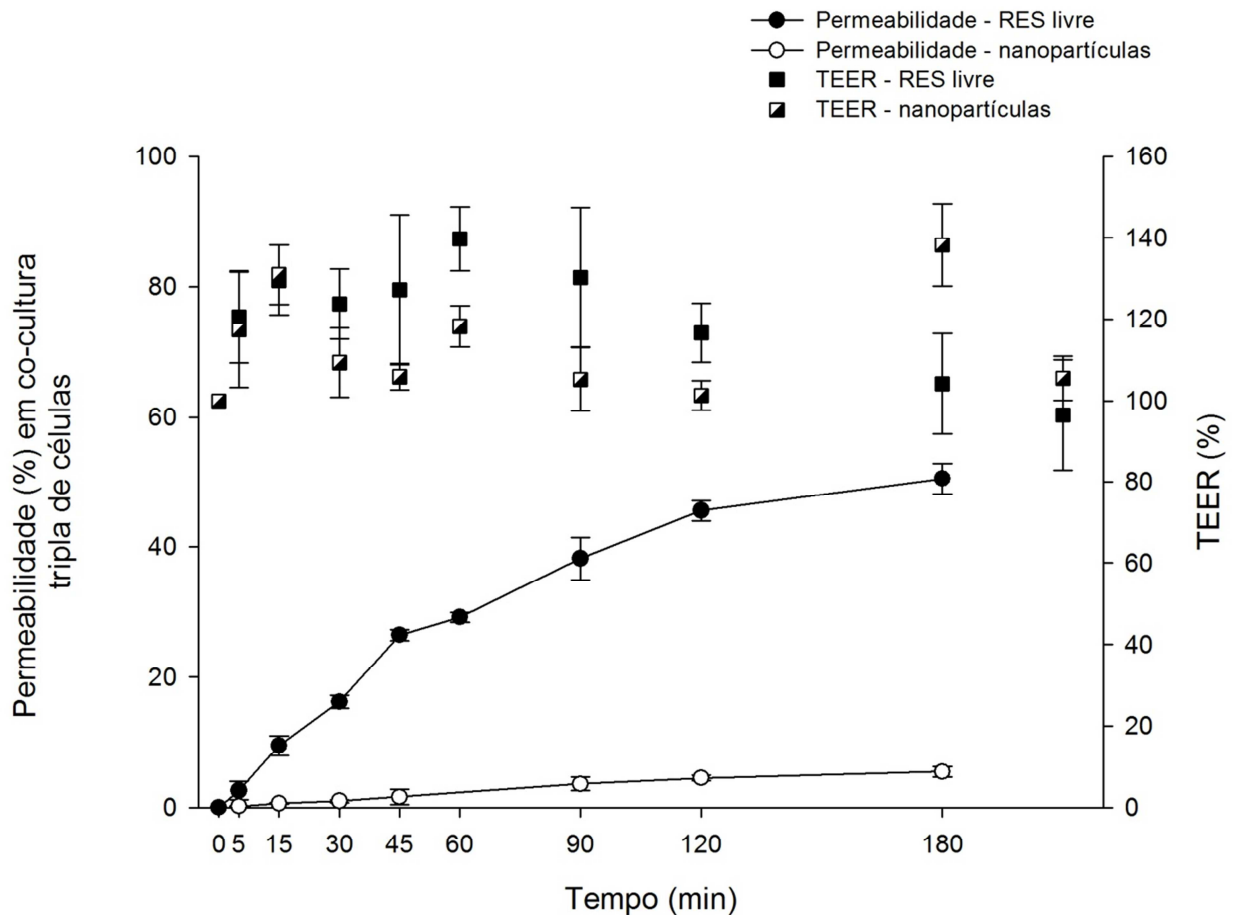
O tamanho da partícula está diretamente relacionado à capacidade de interação com as células e com a rota tomada para sua passagem através das barreiras biológicas. As possíveis rotas são a paracelular, na qual as partículas, de tamanho extremamente reduzido (<50 nm), passam por entre as células epiteliais; a rota endocítica, na qual as partículas (< 500 nm) são absorvidas pelos enterócitos por endocitose e a rota linfática, na qual as partículas (< 5 μ m) passam através das células M das placas de Peyer (YIN WIN e FENG, 2005).

Dessa forma, as reduzidas dimensões das NPP favorecem a permeação através da monocamada, já que permite a utilização de rotas alternativas que as microesferas não são capazes de utilizar.

5.8.2 Permeabilidade em co-cultura tripla de células

Os resultados do perfil de permeação do RES em co-cultura tripla a partir das NPP e do fármaco livre estão apresentados no gráfico da porcentagem de permeabilidade em função do tempo (Figura 18).

Figura 18: Permeabilidade (%) e TEER (%) em função do tempo durante os experimentos de permeabilidade *in vitro* empregando modelo de co-cultura tripla de células para o RES livre, e encapsulado em NPP de GG:P (média \pm DP; n=3).

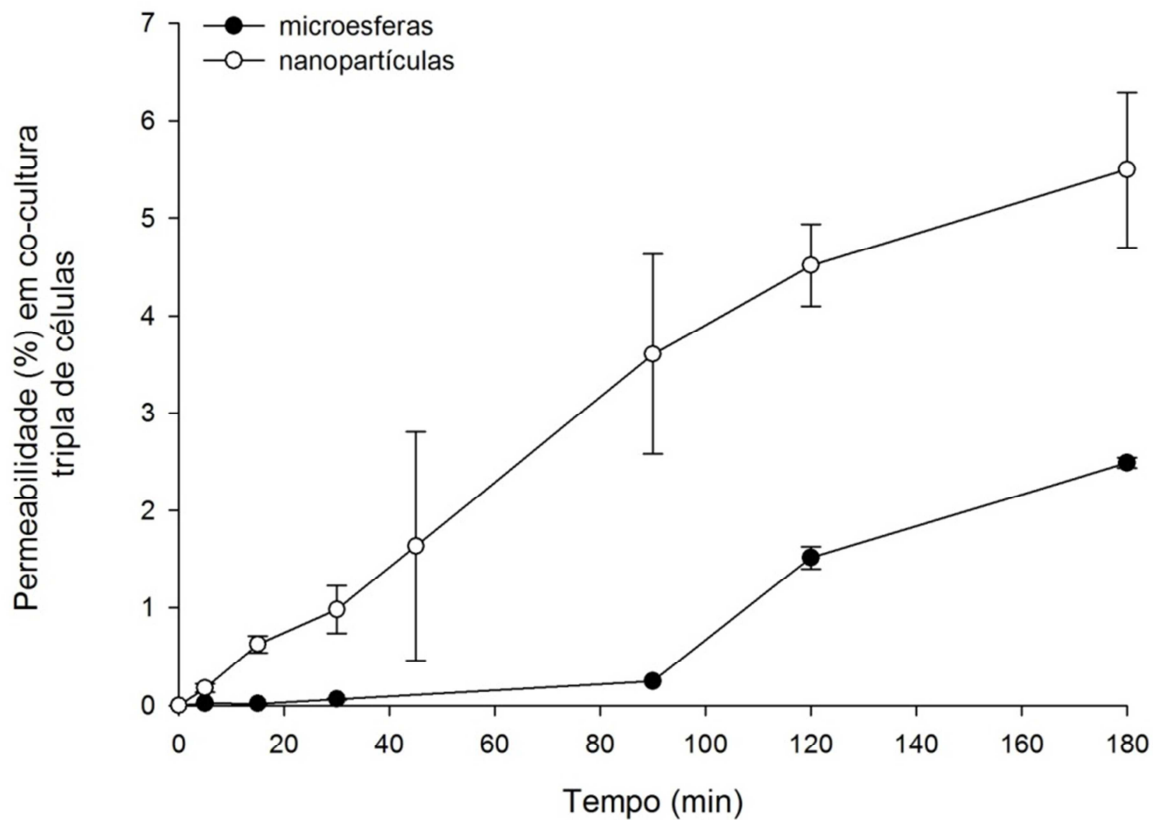


Para a co-cultura tripla, foi observado o mesmo padrão observado para as monoculturas, em que o RES foi capaz de permear a monocamada estando livre ou encapsulado nas nanopartículas. Ocorreu maior permeação do fármaco livre após 180 min (50,4%) em comparação com o RES encapsulado nas NPP (5,5%) ($p < 0,05$).

Para o modelo triplo, os valores finais de TEER (%) em relação ao inicial foram de $96,5 \pm 13,6\%$ e $105,6 \pm 5,4\%$ para o fármaco livre e nanopartículas, respectivamente.

Ao comparar a permeabilidade do RES encapsulado nos sistemas micro e nanométricos, observou-se para o modelo triplo o mesmo padrão de permeabilidade obtido para as células Caco-2, em que as NPP levaram a um discreto aumento da permeabilidade (2,2 vezes maior) que as microesferas ao final de 180 min ($p < 0,05$) (Figura 19).

Figura 19: Permeabilidade (%) em função do tempo durante os experimentos de permeabilidade *in vitro* empregando co-cultura tripla de células para o RES encapsulado em microesferas e NPP de GG:P (média \pm DP; n=3).

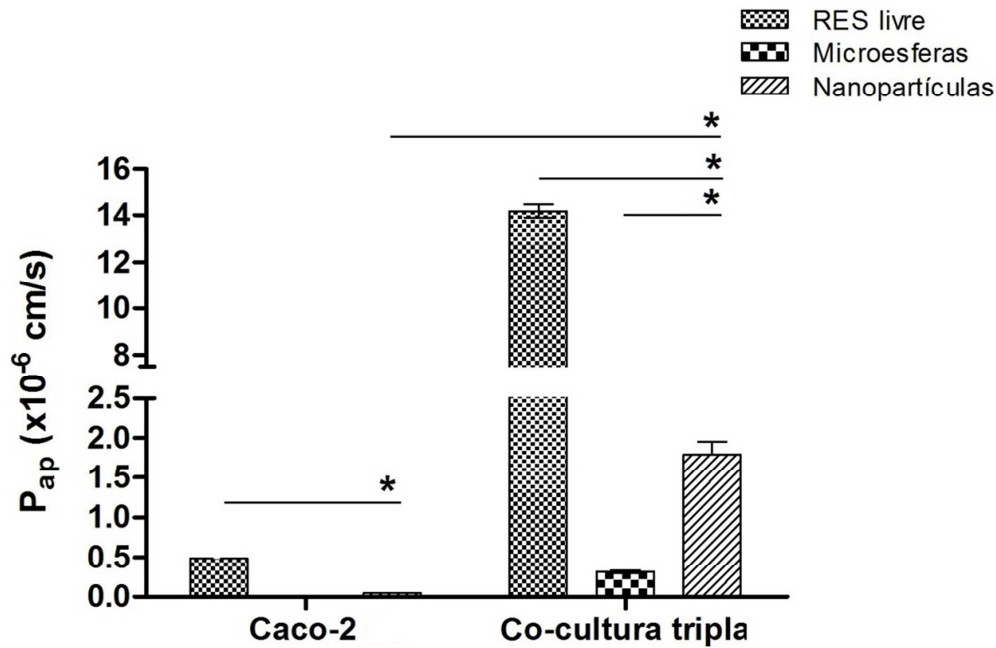


No modelo de monocultura de células Caco-2, em que as junções oclusivas são mais fortes, a reduzida dimensão das NPP pode ter sido o fator determinante para o aumento da permeabilidade através dessas estruturas. No entanto, para o modelo de co-cultura tripla, o qual apresenta as junções mais frouxas entre as células e a presença de células M, a permeabilidade pode ser facilitada, de modo que o processo de mucoadesão pode ser mais relevante para a permeação, e assim, as microesferas alcançaram valores de permeabilidade mais próximos aos das NPP.

5.9 Permeabilidade aparente (Pap)

Os resultados de permeabilidade aparente para 3h de ensaio de permeabilidade estão apresentados no gráfico da Figura 20.

Figura 20: Resultados da permeabilidade aparente (10^{-6} cm/s) do RES em diferentes modelos celulares (média \pm DP; n=3).



Para o modelo baseado em células Caco-2, não houve diferença estatisticamente significativa entre a P_{ap} do fármaco encapsulado nas microesferas e nas NPP ($p > 0,05$). Entretanto, a P_{ap} do RES livre foi significativamente maior que a das NPP ($p < 0,05$).

No modelo triplo, a P_{ap} do fármaco livre também foi maior que a das nanopartículas ($p < 0,05$), além disso, a P_{ap} das nanopartículas foi maior que a observada para as microesferas ($p < 0,05$), corroborando os dados de permeabilidade, em que se observou maior permeabilidade do fármaco livre em relação ao fármaco encapsulado e maior permeabilidade das NPP em relação às microesferas.

Comparando-se os diferentes modelos celulares, a P_{ap} no modelo triplo foi invariavelmente maior que a P_{ap} em monocultura de células Caco-2, tanto para o RES livre quanto para as nanopartículas ($p < 0,05$), corroborando os resultados de permeabilidade que foi sempre maior no modelo de co-cultura tripla.

Os menores valores de P_{ap} para o fármaco encapsulado nas NPP de GG:P, evidenciam a vantagem de administrar o RES em um sistema de liberação controlada mucoadesivo, capaz de proteger o fármaco e direcioná-lo para um sítio específico, onde poderá chegar em concentrações efetivas para desempenhar seu efeito terapêutico localizado, reduzindo a absorção sistêmica, e, conseqüentemente, efeitos colaterais.

5.10 Resistência Elétrica Transepitelial (TEER)

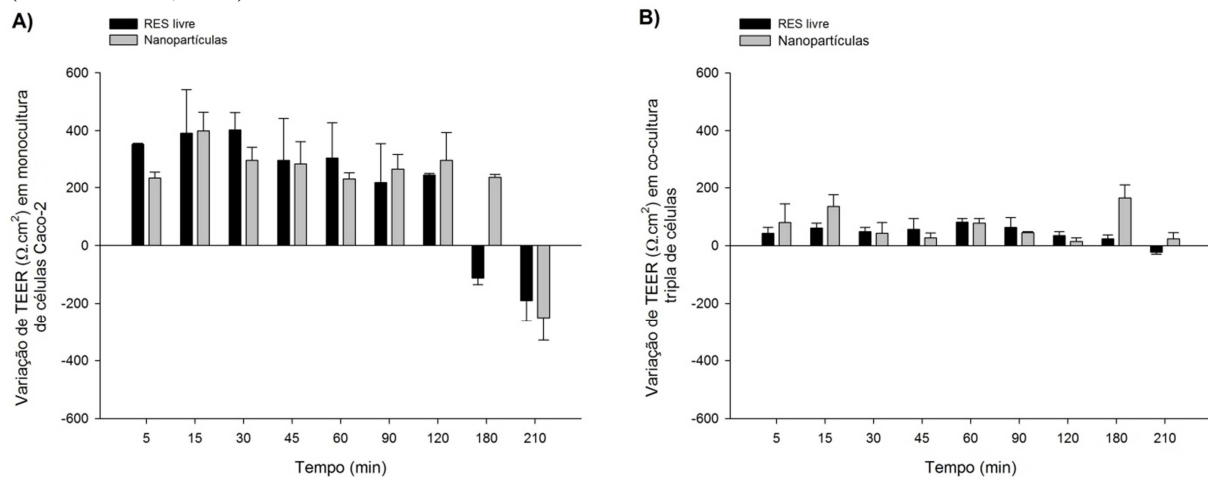
Os valores médios de TEER durante os ensaios de permeabilidade em monocultura de células Caco-2 variaram entre 597,8 e 1190,9 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ para os ensaios com o fármaco livre e entre

560,4 e 1209,5 $\Omega\cdot\text{cm}^2$ para os ensaios com as NPP, valores elevados e considerados aceitáveis para monocamadas dessa linhagem celular (KERNÉIS *et al.*, 2000; ARAÚJO e SARMENTO, 2013).

Empregando co-cultura tripla, o TEER variou entre 197,7 – 286,4 $\Omega\cdot\text{cm}^2$ e entre 432,8 – 597,8 $\Omega\cdot\text{cm}^2$ para o RES livre e NPP, respectivamente. Valores que podem ser considerados aceitáveis para esse modelo celular (ARAÚJO e SARMENTO, 2013)

Os resultados da variação do TEER ($\Omega\cdot\text{cm}^2$) durante os ensaios com o fármaco livre e as NPP em monocultura Caco-2 e em co-cultura tripla de células estão apresentados no gráfico da Figura 21.

Figura 21: Variação do TEER ($\Omega\cdot\text{cm}^2$) em relação ao TEER inicial durante o ensaio de permeabilidade *in vitro* em A) monocultura de células Caco-2 e B) co-cultura tripla de células (média \pm DP; n=3).



Observando os gráficos acima (Figura 21), é possível observar um aumento nos valores de TEER entre 5 e 120 min para o fármaco livre e entre 5 e 180 min para as NPP no ensaio em monocultura de células Caco-2 (Figura 21A). Já para o modelo triplo, a variação de TEER durante o ensaio (5 a 180 min) foi sempre positiva tanto para o RES livre quanto para as nanopartículas (Figura 21B), sendo que nesse modelo os valores de TEER variaram menos que no modelo baseado em células Caco-2.

No tempo final (210 min), a variação do TEER foi negativa, tanto para o fármaco livre quanto para as NPP na monocultura de células Caco-2. Essa queda nos valores de TEER representou uma redução de 23,8% para o fármaco livre e de 30,7% para as nanopartículas, sendo que os valores finais médios de TEER ainda foram elevados, 597,8 $\Omega\cdot\text{cm}^2$ e 560,4 $\Omega\cdot\text{cm}^2$, respectivamente.

Já para o modelo triplo, a variação foi ligeiramente negativa para o RES livre, representando uma redução de 3,5%, e o valor final médio do TEER foi de 197,7 $\Omega\cdot\text{cm}^2$. Para

as nanopartículas, a variação final foi ligeiramente positiva, com um aumento de 5,6% no TEER e valor final de $456,1 \Omega \cdot \text{cm}^2$.

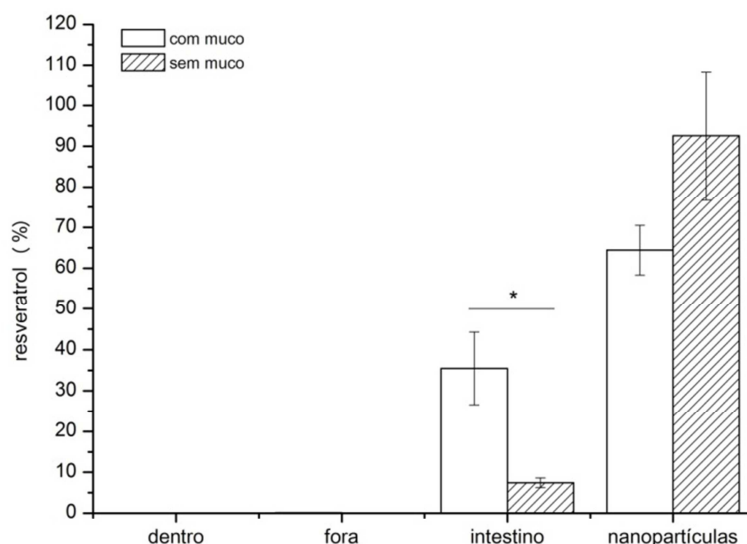
O conjunto de dados demonstra a integridade das monocamadas, de modo que os resultados de permeabilidade refletem o transporte do fármaco através das barreiras celulares.

5.11 Avaliação *ex vivo* da permeabilidade e da retenção intestinal do RES pelo método do saco intestinal invertido

A NPP NG41_A13_res0,5 foi a formulação selecionada para o estudo de permeação e retenção intestinal pelo método do saco intestinal invertido por apresentar em sua composição a mesma proporção G:P (4:1) e as mesmas concentrações de reticulante iônico (AlCl_3 3%) e fármaco (0,5%) que a microesfera M10, a qual permitiu o maior controle das taxas de liberação do RES (item 5.3.2 do Capítulo III) e foi a micropartícula submetida ao teste de permeabilidade e retenção intestinal pelo método do saco intestinal invertido (item 5.9 do Capítulo III).

O gráfico apresentado na Figura 22 mostra a porcentagem de RES quantificado em cada compartimento do teste de permeação: dentro e fora do saco intestinal invertido, no tecido intestinal e o fármaco que restou insolúvel dentro das nanopartículas.

Figura 22: Porcentagem de RES dentro do saco intestinal invertido (dentro), solúvel no meio (fora), aderido ao tecido intestinal (intestino) e insolúvel dentro das NPP (nanopartículas) (média \pm DP, n=6).



*Diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$)

A porcentagem de fármaco quantificada dentro do saco intestinal foi de $0,021 \pm 0,003\%$ para o ensaio com muco preservado, e de $0,004 \pm 0,001\%$ quando houve o tratamento prévio do intestino com mucolítico. Já a porcentagem de RES no meio de incubação (fora) para o teste

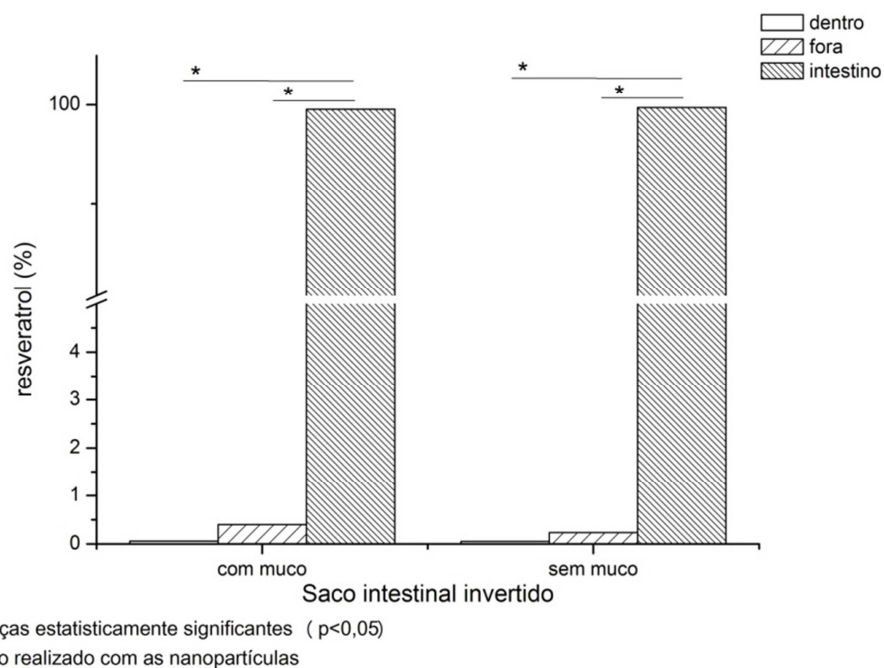
realizado sem uso do mucolítico foi de $0,14 \pm 0,02\%$ e de $0,02 \pm 0,01\%$ para o teste realizado com mucolítico (barras não visíveis no gráfico apresentado na Figura 22).

A partir do gráfico que apresenta a porcentagem de RES em cada compartimento (Figura 22), é possível observar que a maior parte do fármaco permaneceu insolúvel dentro das nanopartículas, sendo que $64,40 \pm 6,10\%$ e $92,55 \pm 15,82\%$ não foram liberados para o meio durante o ensaio com os sacos intestinais com e sem muco, respectivamente.

Assim como para as microesferas (item 5.9, Capítulo III), foi possível observar o acúmulo de RES no tecido intestinal, sendo que o tratamento prévio com mucolítico alterou de maneira significativa a porcentagem de fármaco retido no intestino. Na presença de muco, a quantidade retida (35,44%) foi aproximadamente 5 vezes maior que a quantidade de RES retida no intestino que teve o muco removido (7,42%) ($p < 0,05$).

Considerando apenas o fármaco liberado das nanopartículas e, portanto, disponível para permear através da membrana, 99,54% e 99,71% permaneceram retidos no tecido intestinal com e sem muco, respectivamente, de modo que a quantidade de fármaco retida no intestino foi significativamente maior que a quantidade que permeou o tecido, que foi de apenas 0,06% e 0,05% para os sacos intestinais invertidos com e sem muco, respectivamente ($p < 0,05$) (Figura 23).

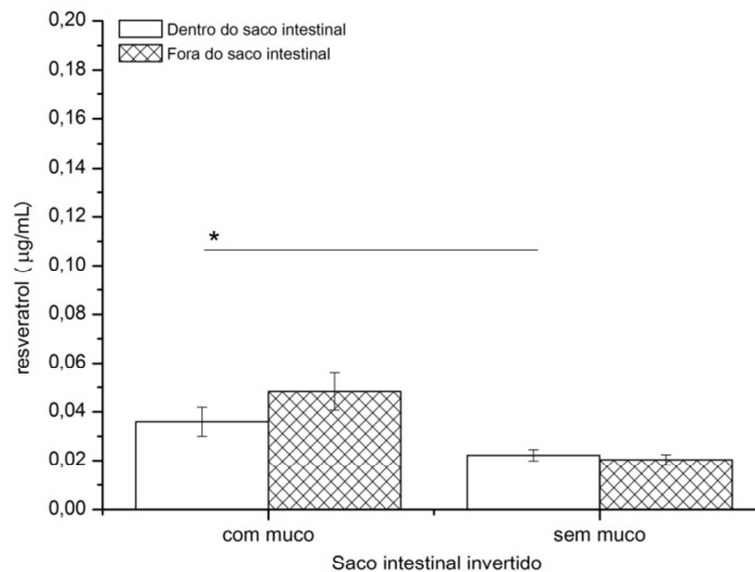
Figura 23: Porcentagem de RES dentro do saco intestinal invertido (dentro), solúvel no meio (fora) e aderido ao tecido intestinal (intestino) considerando como a quantidade total apenas o fármaco liberado das NPP.



Os resultados corroboram os dados de permeação e retenção apresentados para as microesferas (item 5.9, Capítulo III) em que o RES apresentou uma alta afinidade pelo tecido intestinal, permanecendo no epitélio para uma ação local nas células.

A Figura 24 mostra as concentrações de fármaco dentro e fora do saco intestinal invertido, com e sem muco, para o ensaio de permeação com as NPP.

Figura 24: Concentração de RES ($\mu\text{g/mL}$) dentro e fora do saco intestinal invertido após o ensaio de permeação com as NPP (média \pm DP).



*Diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$)

**Ensaio realizado com as nanopartículas.

Não houve diferença significativa entre a concentração de fármaco dentro do saco intestinal invertido e a concentração de fármaco solúvel no meio externo ($p > 0,05$) tanto nos ensaios realizados com o intestino com muco, quanto para aqueles realizados sem muco, indicando que a permeação ocorreu até que o equilíbrio de concentrações fosse atingido (Figura 24).

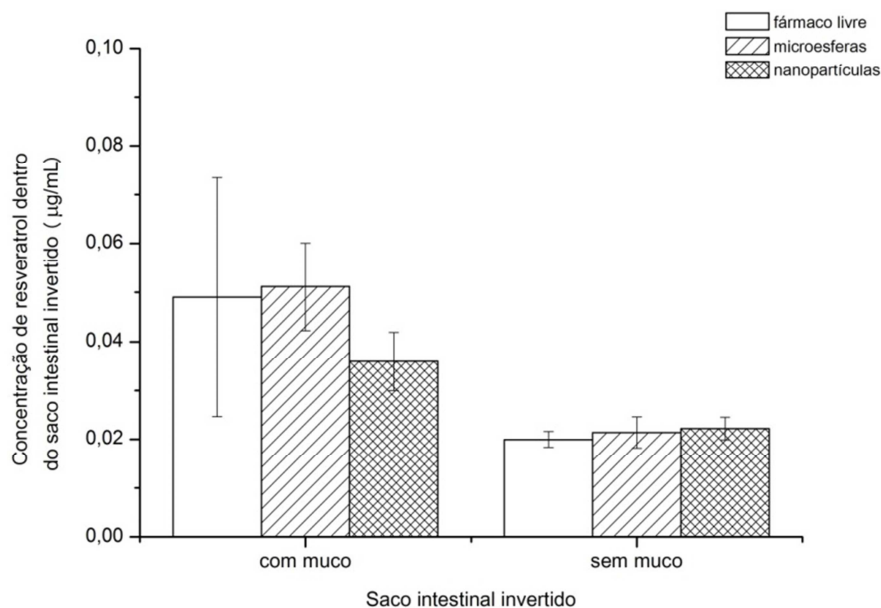
O muco favoreceu de maneira significativa a permeação do fármaco a partir das NPP, sendo que na presença de muco, a permeação ($0,036 \mu\text{g/ml}$) foi cerca de 1,6 vezes maior que a permeação no intestino sem muco ($0,022 \mu\text{g/ml}$) ($p < 0,05$).

Esses dados demonstram que a presença de muco foi determinante para a permeação, sendo que a maior permeação no intestino com muco pode ter sido favorecida pela elevada capacidade mucoadesiva das NPP, que favoreceu o aumento do gradiente de concentração local e o contato mais íntimo com o tecido.

A presença de muco foi decisiva também para a retenção de RES no intestino a partir das NPP, demonstrando a importância da mucoadesividade das NPP de GG:P, que contribui para a manutenção do fármaco no sítio alvo.

A Figura 25 mostra a concentração de fármaco que permeou o intestino a partir dos sistemas estudados (NPP e microesferas) e do fármaco livre, na presença e na ausência de muco.

Figura 25: Concentração de RES dentro do saco intestinal invertido a partir do fármaco livre, das microesferas e das NPP para os ensaios com o saco intestinal invertido com e sem muco (média \pm DP).

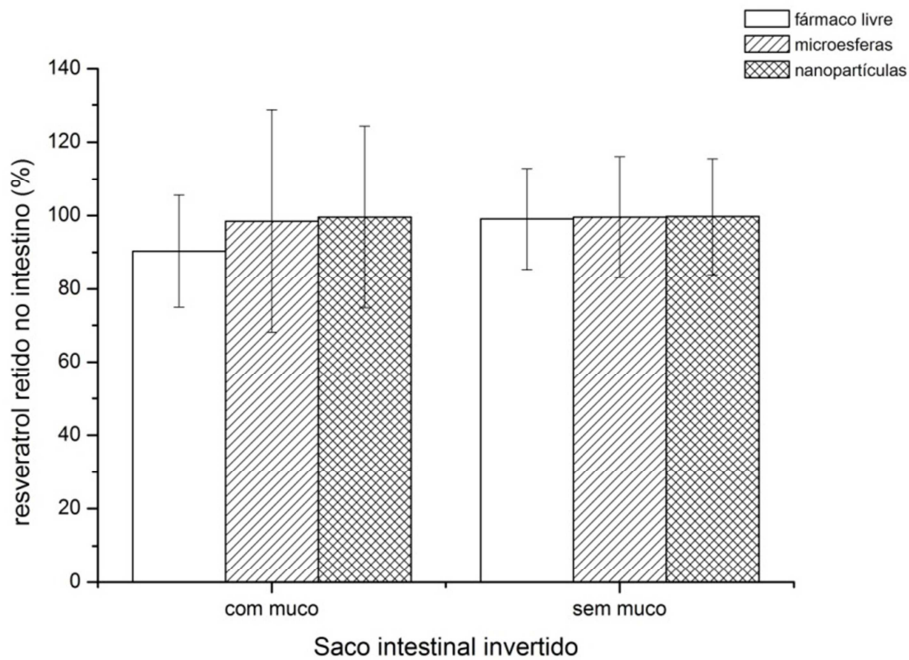


É possível observar que o muco favoreceu a permeação do RES, sendo que, no intestino com muco, as concentrações de fármaco que permearam o tecido são maiores que no intestino sem muco, tanto para o fármaco livre quanto para as microesferas e as NPP ($p < 0,05$) (Figura 25).

Também se observa que não houve diferenças estatisticamente significativas entre a permeação a partir das NPP e das microesferas em relação ao fármaco livre, tanto no saco intestinal com muco quanto sem muco ($p > 0,05$) (Figura 25).

A porcentagem de fármaco retida no tecido intestinal foi a mesma para os sistemas micro e nanoparticulados e o fármaco livre, como é possível observar no gráfico apresentado na Figura 26, demonstrando a elevada afinidade do RES pelas células intestinais e o potencial dos enterócitos como um sítio alvo da liberação deste fármaco (KALDAS *et al.*, 2003).

Figura 26: Porcentagem de fármaco retido no saco intestinal invertido com e sem muco a partir do fármaco livre, das microsferas e das NPP (média ± DP).



6 CONCLUSÕES

A obtenção de NPP estáveis através da técnica de geleificação ionotrópica constitui um grande desafio. Neste trabalho, pela primeira vez, NPP de misturas de GG:P foram obtidas empregando esta técnica, associada ou não à nebulização, utilizando $AlCl_3$ como agente reticulante, para a liberação cólon-específica do RES.

O planejamento fatorial do tipo composto central com duas variáveis independentes permitiu a avaliação dos efeitos das concentrações de polímeros e de $AlCl_3$ sobre o PZ e o tamanho de partícula. As NPP apresentaram PZ entre -28,27 e 3,16 mV, e este foi influenciado pela concentração de polímeros na formulação. O tamanho de partícula variou entre 59,35 e 657,80 nm e foi influenciado por ambas as variáveis. Essas amostras apresentaram-se polidispersas, com PDI entre 0,679 e 1,000.

NPP também foram obtidas pela técnica de nebulização – geleificação ionotrópica, que permitiu a obtenção de NPP com menor índice de polidispersão. As amostras apresentaram PZ entre -0,77 e 5,87 mV, tamanho de partícula entre 176,4 e 422,9 nm e PDI entre 0,190 e 0,973. Elevados valores de eficiência de encapsulação foram alcançados (81,16 e 82,93 %). A partir das fotomicrografias obtidas por MEV foi possível observar a forma esférica e a presença de alguns aglomerados de NPP.

As NPP exibiram reduzida taxa de liberação em meio ácido (3,3% após 120 min de teste) e controlaram a liberação em pH 6,8, prolongando-a por até 48 h. O modelo que

apresentou melhor correlação com os dados foi o de Korsmeyer – Peppas, indicando que a liberação do fármaco ocorreu segundo o mecanismo de transporte super caso II.

A veiculação do RES nas NPP permitiu a significativa redução da citotoxicidade e da permeabilidade do fármaco, comportamento particularmente favorável para o objetivo do estudo, uma vez que o RES estará mais disponível para atuar diretamente sobre as células do cólon, o que pode melhorar sua atividade local.

A permeação e a retenção do RES a partir das NPP, avaliadas através do método do saco intestinal invertido, foi maior para os ensaios realizados com o saco intestinal com muco preservado.

Ambos os sistemas, micro e nanoestruturados de GG:P, foram capazes de controlar a liberação do fármaco e reduzir a permeação em comparação com o fármaco livre, sugerindo uma maior interação celular para o efeito local desejado no cólon.

As microesferas duplamente reticuladas de GG:P reduziram a permeação do RES na co-cultura tripla a níveis próximos ao observado para as NPP, sugerindo um interação com a mucosa tão significativa quanto a interação das partículas nanométricas, de modo que ambos os sistemas são promissores para atuarem como sistemas de liberação controlada do RES, visando a vetorização para o cólon.

REFERÊNCIAS

AMMAR, H. O.; EL-NAHHAS, S. A.; GHORAB, M. M.; SALAMA, A. H. Chitosan/cyclodextrin nanoparticles as drug delivery system. **Journal of Inclusion Phenomena Macrocyclic Chemistry**, v. 72, p. 127-136, 2012.

ARAÚJO, F.; SARMENTO, B. Towards the characterization of an in vitro triple co-culture intestine cell model for permeability studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 458, n. 1, p. 128-134, 2013.

EL-SHERBINY, I. M.; SMYTH, H. D. C. Smart magnetically responsive hydrogel nanoparticles prepared by a novel aerosol-assisted method for biomedical and drug delivery applications. **Journal of Nanomaterials**, v. 2011, p. 1-13, 2011.

FDA - U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for industry considering whether an FDA-regulated product involves the application of nanotechnology**. 2014. Disponível em: <<https://www.fda.gov/RegulatoryInformation/Guidances/ucm257698.htm>>. Acesso em: 11 fev. 2017.

FONTE, P.; ARAÚJO, F.; SILVA, C.; PEREIRA, C.; REIS, S.; SANTOS, H. A.; SARMENTO, B. Polymer-based nanoparticles for oral insulin delivery: Revisited approaches. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 1342-1354, 2015.

GOVENDER, T.; STOLNIK, S.; GARNETT, M. C.; ILLUM, L.; DAVIS, S. S. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. **Journal of Controlled Release**, v. 57, n. 2, p. 171-185, 1999.

GUZMAN-VILLANUEVA, D.; SMYTH, H. D. C.; HERRERA-RUIZ, D.; EL-SHERBINY, I. M. A Novel Aerosol Method for the Production of Hydrogel Particles. **Journal of Nanomaterials**, v. 2011, n. 2011, p. 507508, 2011.

HICKEY, J. W.; SANTOS, J. L.; WILLIFORD, J.-M.; MAO, H.-Q. Control of polymeric nanoparticle size to improve therapeutic delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 219, p. 536-547, 2015.

KAITY, S.; ISAAC, J.; GHOSH, A. Interpenetrating polymer network of locust bean gum-poly (vinyl alcohol) for controlled release drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p. 456-467, 2013.

KALDAS, M. I.; WALLE, U. K.; WALLE, T. RES transport and metabolism by human intestinal Caco-2 cells. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 55, n. 3, p. 307-312, 2003.

KERNÉIS, S.; CALIOT, E.; STUBBE, H.; BOGDANOVA, A.; KRAEHENBUHL, J.-P.; PRINGAULT, E. Molecular studies of the intestinal mucosal barrier physiopathology using co-cultures of epithelial and immune cells: a technical update. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 9, p. 1119-1124, 2000.

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

MAITI, S.; RANJIT, S.; MONDOL, R.; RAY, S.; SA, B. Al³⁺ ion cross-linked and acetalated gellan hydrogel network beads for prolonged release of glipizide. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 1, p. 164-172, 2011.

MARTÍNEZ, A.; IGLESIAS, I.; LOZANO, R.; TEIJÓN, J. M.; BLANCO, M. D. Synthesis and

- characterization of thiolated alginate-albumin nanoparticles stabilized by disulfide bonds. Evaluation as drug delivery systems. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 3, p. 1311-1321, 2011.
- NAYAK, A. K.; PAL, D.; SANTRA, K. Swelling and drug release behavior of metformin HCl-loaded tamarind seed polysaccharide-alginate beads. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 1023-1027, 2016.
- PEDREIRO, L. N. **Desenvolvimento de dispersões sólidas e nanopartículas poliméricas mucoadesivas de zidovudina e avaliação da interação biológica com a mucosa intestinal**. 2015. 149f (Tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2015.
- PINTO REIS, C.; NEUFELD, R. J.; RIBEIRO, A. J.; VEIGA, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 2, n. 1, p. 8-21, 2006.
- PREZOTTI, F. G. **Microesferas de goma gelana e pectina como potencial estratégia para liberação controlada de fármacos**. 2013. 111f (Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Araraquara, 2013.
- SARAF, S. Application of colloidal properties in drug delivery. In: FANUN, M. (Ed.). **Colloids in drug delivery**. Boca Raton: CRC Press, 2010. cap. 2, p.55-70.
- SARMENTO, B.; RIBEIRO, A.; VEIGA, F.; SAMPAIO, P.; NEUFELD, R.; FERREIRA, D. Alginate/Chitosan nanoparticles are effective for oral insulin delivery. **Pharmaceutical research**, v. 24, n. 12, p. 2198-2206, 2007.
- SHARMA, R.; AHUJA, M.; KAUR, H. Thiolated pectin nanoparticles: preparation, characterization and *ex vivo* corneal permeation study. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 1606-1610, 2012.
- SINHA, P.; UBaidULLA, U.; NAYAK, A. K. Okra (*Hibiscus esculentus*) gum-alginate blend mucoadhesive beads for controlled glibenclamide release. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 1069-1075, 2015.
- SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, n. 1-2, p. 1-20, 2001.
- USP. United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 34–NF 29) **Chapter <711> Dissolution**, 2011.
- WALLE, T.; HSIEH, F.; DELEGGE, M. H.; OATIS, J. E.; WALLE, U. K. High absorption but very low bioavailability of oral RES in humans. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 32, n. 12, p. 1377-1382, 2004.
- WILCZEWSKA, A. Z.; NIEMIROWICZ, K.; MARKIEWICZ, K. H.; CAR, H. Nanoparticles as drug delivery systems. **Pharmacological Reports**, v. 64, n. 5, p. 1020-1037, 2012.
- YEO, Y.; BAEK, N.; PARK, K. Microencapsulation methods for delivery of protein drugs. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 6, n. 4, p. 213-230, 2001.
- YIN WIN, K.; FENG, S.-S. Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. **Biomaterials**, v. 26, n. 15, p. 2713-2722, 2005.

*Capítulo V – Validação de metodologias analíticas para quantificação do
resveratrol*

Resumo

Validar um método analítico é fundamental para práticas laboratoriais de qualidade, além de assegurar que o método desenvolvido é confiável quanto aos resultados gerados e apropriado para o uso pretendido. O RES é um polifenol, considerado um fármaco de classe II pelo sistema de classificação biofarmacêutica, por apresentar baixa solubilidade em água e alta permeabilidade. No presente estudo, foram validadas metodologias analíticas por espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a quantificação do RES em diferentes meios. Os parâmetros de validação avaliados foram: especificidade / seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) conforme preconizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Farmacopeia Americana e Conferência Internacional de Harmonização. Os métodos desenvolvidos se mostraram seletivos e específicos, lineares, precisos, exatos e capazes de detectar e quantificar baixíssimas concentrações de fármaco nos meios testados. A partir dos ensaios experimentais, foi possível comprovar a adequação dos métodos analíticos desenvolvidos ao uso pretendido, sendo que os métodos atenderam todas as exigências previstas, portanto, os resultados obtidos através deles são confiáveis e reproduzíveis.

Palavras-chave: espectrofotometria, cromatografia líquida de alta eficiência, validação.

Abstract

Validating an analytical methodology is fundamental for good laboratory practices, in addition to ensuring that the developed method is reliable regarding the results and meets the requirements for its intended purpose. RES is a polyphenol considered as a class II drug by the Biopharmaceutics Classification System, due to low water solubility and high permeability. In the present work, analytical methodologies to quantification of RES in different media using spectrophotometry in UV-region and high performance liquid chromatography (HPLC) were validated. The validation characteristics evaluated were specificity / selectivity, linearity, precision, accuracy, detection limit (DL) and quantitation limit (QL), as described by Agência Nacional de Vigilância Sanitária, United States Pharmacopeia and International Conference on Harmonisation. The developed methods were selective and specific, linear, precise, accurate and able to detect and quantify very low drug concentrations in the tested media. From the experimental tests, it was possible to demonstrate the suitability of the analytical methodologies developed for their intended purpose, and the methods attended all the requirements, therefore, the results obtained using these methodologies are reliable and reproducible.

Keywords: spectrophotometry, high performance liquid chromatography, validation.

Lista de ilustrações

Quadro 1: Parâmetros a serem avaliados durante a validação de metodologia analítica segundo a categoria do teste (adaptado de BRASIL (2003)).287

Figura 1: Diferentes níveis de precisão de um método analítico.288

Figura 2: Espectro de absorção na região do UV de misturas de goma gelana:pectina (1:1 e 4:1) em HCl 0,1 N pH 1,2 com 1% LSS (A) e em tampão fosfato pH 6,8 (B).294

Figura 3: Curva analítica da absorbância em função da concentração de RES, obtida por espectrofotometria na região do UV, utilizando HCl 0,1N pH 1,2 com 1% LSS como solvente e comprimento de onda de máxima absorção de 320 nm.295

Figura 4: Curva analítica da absorbância em função da concentração de RES, obtida por espectrofotometria na região do UV, utilizando tampão fosfato pH 6,8 como solvente e comprimento de onda de máxima absorção de 320 nm.295

Figura 5: Cromatograma do RES obtido em acetonitrila:água (70:30) por CLAE.297

Figura 6: Cromatograma da mistura polimérica GP (1:1) a 10mg/mL em tampão TC199 utilizando detector FLD ($\lambda_{\text{excitação}} = 300\text{nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 390\text{nm}$).298

Figura 7: Cromatograma da solução tampão TC199 coletada dentro do saco intestinal invertido sem RES, utilizando detector FLD ($\lambda_{\text{excitação}} = 300\text{nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 390\text{nm}$).298

Figura 8: Curva analítica da área do pico do cromatograma em função da concentração de RES determinada por CLAE – FLD.299

Lista de tabelas

Tabela 1: Dados das curvas analíticas obtidas nos diferentes meios.....296

Tabela 2: Valores de precisão intra e inter-corridas nos diferentes meios avaliados.296

Tabela 3: Valores de exatidão para os diferentes meios avaliados.....297

Tabela 4: Valores dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do RES no diferentes meios avaliados.....297

Tabela 5: Dados da curva analítica para a metodologia analítica por CLAE.....299

Tabela 6: Valores de precisão intra e inter-corridas para a metodologia por CLAE.....299

Tabela 7: Valores de exatidão para a metodologia por CLAE.300

Sumário

1	Validação e parâmetros avaliados	286
1.1	Especificidade/seletividade	287
1.2	Linearidade e Intervalo	287
1.3	Precisão	288
1.4	Exatidão	289
1.5	Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	289
2	Metodologias	290
2.1	Validação de metodologia analítica para quantificação do RES por espectrofotometria na região do ultravioleta.....	290
2.1.1	Determinação do comprimento de onda de máxima absorção do RES na região do ultravioleta.....	290
2.1.2	Especificidade / Seletividade	290
2.1.3	Linearidade e Intervalo	290
2.1.4	Precisão	291
2.1.5	Exatidão	291
2.1.6	Limite de Detecção e Limite de Quantificação	291
2.2	Validação de metodologia analítica para quantificação do RES por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	292
2.2.1	Sistema cromatográfico	292
3	Resultados	293
3.1	Validação de metodologia analítica para quantificação do RES por espectrofotometria na região do ultravioleta.....	293
3.1.1	Determinação do comprimento de onda de máxima absorção do RES na região do ultravioleta.....	293
3.1.2	Especificidade/Seletividade	293
3.1.3	Linearidade e Intervalo	294
3.1.4	Precisão	296
3.1.5	Exatidão	296
3.1.6	Limite de Detecção e Limite de Quantificação	297
3.2	Validação de metodologia analítica para quantificação do RES por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	297
3.2.1	Especificidade / Seletividade	297
3.2.2	Linearidade e intervalo	298
3.2.3	Precisão	299
3.2.4	Exatidão	299
3.2.5	Limite de Detecção e Limite de Quantificação	300
4	Conclusões.....	300

1 VALIDAÇÃO E PARÂMETROS AVALIADOS

A validação pode ser definida como a confirmação de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos, o que é possível através de ensaios e dados que servem de evidência objetiva e comprovam a adequação e o cumprimento de normas vigentes (BRASIL, 2012).

Para as metodologias de quantificação de fármacos, produtos de degradação, impurezas, dentre outros, a validação deve comprovar, através de ensaios experimentais, a adequação do método analítico ao uso pretendido e que este atende todas as exigências, de modo que os resultados obtidos através dele sejam confiáveis (BRASIL, 2003).

Segundo o “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos” presente na resolução nº 899, de 29 de maio de 2003, da ANVISA, os parâmetros que devem ser avaliados quando se pretende validar uma metodologia analítica ou bioanalítica variam de acordo com a finalidade ou categoria do teste desenvolvido. São oito parâmetros, dentre eles especificidade/seletividade, linearidade, intervalo, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez, que deverão ser avaliados dependendo da categoria do teste, ou seja, de sua finalidade (BRASIL, 2003).

Os testes podem ser quantitativos, para fins de determinação de fármacos (categoria I) ou determinação de impurezas e produtos de degradação (categoria II) em matérias-primas ou produtos farmacêuticos; ou são testes de *performance* (categoria III) ou de identificação (categoria IV).

Os parâmetros exigidos para validar cada categoria de teste estão apresentados no quadro abaixo:

Quadro 1: Parâmetros a serem avaliados durante a validação de metodologia analítica segundo a categoria do teste (adaptado de BRASIL (2003)).

Parâmetros	Categoria I – fármacos	Categoria II – impurezas e produtos de degradação		Categoria III – testes de performance	Categoria VI – testes de identificação
		Quantitativo	Ensaio limite		
Especificidade/seletividade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão intra-corrída	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Precisão inter-corrídas	**	**	Não	**	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

* Dependendo do teste pode ser necessária a avaliação.

** Não é necessária a comprovação, desde que se comprove a reprodutibilidade.

1.1 Especificidade/seletividade

Especificidade/seletividade é a capacidade do método em identificar e quantificar especificamente o fármaco em uma amostra, mesmo na presença de outras substâncias, como aquelas que compõem o sistema, impurezas ou produtos de degradação, sem que estes interfiram significativamente no resultado (BRASIL, 2003).

A especificidade/seletividade deve ser comprovada para que outros parâmetros, como a linearidade e a precisão do teste, não sejam afetados. Este parâmetro pode ser comprovado através de análises de amostras contaminadas com os possíveis interferentes que compõem o sistema e amostras não contaminadas, contendo apenas o fármaco, demonstrando que os resultados não se alteram na presença dos contaminantes (BRASIL, 2003).

Um método específico e seletivo permite a definição precisa do conteúdo de fármaco na amostra, fornecendo resultados exatos (BRASIL, 2003; ICH, 2005; INMETRO, 2011; USP, 2011).

1.2 Linearidade e Intervalo

Linearidade de um método analítico é sua capacidade de obter resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, para um dado intervalo específico de concentração (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP, 2011).

Recomenda-se a análise de pelo menos cinco diferentes concentrações para determinação da linearidade do método (BRASIL, 2003). Os resultados devem ser submetidos a

uma análise estatística de regressão linear, e o critério mínimo aceitável é a obtenção de um coeficiente de correlação (r) de 0,99. A partir da regressão linear, podem-se determinar os coeficientes linear e angular da reta, para construção da equação matemática que descreve a concentração do analito em função do resultado do teste (BRASIL, 2003).

O intervalo é obtido a partir do estudo da linearidade, e corresponde a faixa compreendida entre as concentrações máxima e mínima de fármaco, para a qual foi demonstrada precisão, exatidão e linearidade adequadas do método analítico (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

1.3 Precisão

A precisão de um método analítico é a proximidade entre os resultados obtidos para várias medidas, feitas para uma mesma amostra, nas mesmas condições de ensaio, e é expressa como o coeficiente de variação, que não deve ser maior que 5% e deve contemplar as concentrações dentro do intervalo linear do método (BRASIL, 2003).

A precisão deve ser considerada em três diferentes níveis, conforme demonstrado na Figura 1:

Figura 1: Diferentes níveis de precisão de um método analítico.



A repetibilidade é também denominada precisão intra-corridas, pois avalia a concordância dos resultados obtidos por um mesmo analista, em mesmo laboratório, com o mesmo instrumento sob condições idênticas de análise, em um curto período de tempo. Deve ser avaliada através da medida, em triplicata, de três diferentes concentrações do intervalo linear, sendo uma baixa, uma média e uma alta, calculando-se o coeficiente de variação dos resultados de cada concentração. Ou então, através de, no mínimo, seis determinações de uma

única concentração, correspondente a 100% da concentração do teste (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP, 2011).

Por outro lado, a precisão intermediária ou inter-corridas avalia a concordância de resultados obtidos no mesmo laboratório, porém variando-se os analistas, em diferentes dias, podendo também variar os equipamentos. O recomendado é a realização de medidas em, no mínimo, dois dias diferentes variando-se os analistas (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP, 2011).

Já a reprodutibilidade ou precisão inter-laboratorial avalia a concordância entre resultados obtidos em diferentes laboratórios, com analistas e equipamentos diferentes, o que requer um estudo colaborativo, geralmente realizado para padronizar metodologias (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP, 2011).

1.4 Exatidão

Exatidão é a proximidade dos resultados obtidos em relação ao valor admitido como verdadeiro. Valores próximos a 100% são desejáveis, porém admitem-se variações na faixa entre 80 – 120% (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

A exatidão deve ser avaliada após ter-se confirmado a especificidade, a linearidade e o intervalo do método, e deve contemplar, assim como a precisão, concentrações baixa, média e alta dentro do intervalo linear, em triplicada para cada uma, sendo expressa como a razão entre a concentração média experimental e a concentração teórica admitida como o valor real de analito na amostra (BRASIL, 2003).

1.5 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Apesar de não ser exigida a avaliação dos parâmetros limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) para a categoria I, na qual se encaixa o método desenvolvido no presente trabalho, ambos foram avaliados, pois em algumas situações de trabalho, como por exemplo, nos minutos iniciais da dissolução, é possível se deparar com quantidades muito pequenas do fármaco na amostra, e é necessário o conhecimento do mínimo que poderá ser quantificado com precisão e exatidão. Conhecendo-se o LD e o LQ, experimentos como o ensaio de dissolução podem ser delineados apropriadamente.

O LD é a menor concentração do analito na amostra que o método consegue detectar, diferenciando-o do ruído de fundo, porém não é necessariamente quantificado com exatidão. Já o LQ é a menor concentração do analito que pode ser quantificada com níveis aceitáveis de exatidão e precisão pelo método desenvolvido (ICH, 2005).

2 METODOLOGIAS

2.1 Validação de metodologia analítica para quantificação do RES por espectrofotometria na região do ultravioleta

Os parâmetros de validação avaliados foram: especificidade/seletividade, linearidade e intervalo, precisão, exatidão, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), conforme preconizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Farmacopeia Americana e Conferência Internacional de Harmonização (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP, 2011). Foram validadas metodologias para quantificação do RES por espectrofotometria na região do ultravioleta nos meios HCl 0,1 N, com 1% de laurilsulfato de sódio (LSS) pH 1,2 e em tampão fosfato pH 6,8.

2.1.1 Determinação do comprimento de onda de máxima absorção do RES na região do ultravioleta

Soluções de concentração 15 µg/mL de RES em HCl 0,1 N, pH 1,2 com 1% LSS e em tampão fosfato pH 6,8 foram submetidas a uma varredura entre 200 e 400 nm, em espectrofotômetro UV-Vis a fim de se verificar o comprimento de onda no qual o fármaco apresenta seu pico de máxima absorção.

2.1.2 Especificidade / Seletividade

Com o objetivo de avaliar a interferência da goma gelana e da pectina na quantificação do RES e demonstrar que os resultados do teste não são afetados por esses polímeros, a especificidade/seletividade foi determinada avaliando-se o espectro de absorção destes polímeros entre 200 e 400 nm. Soluções contendo 75 µg/mL de misturas de gelana:pectina (1:1 e 4:1) em HCl 0,1 N, pH 1,2 com 1% LSS e em tampão fosfato pH 6,8 foram submetidas a varreduras entre 200 e 400 nm, em espectrofotômetro UV-Vis.

2.1.3 Linearidade e intervalo

A linearidade do método foi determinada através da obtenção da curva analítica de RES nos diferentes meios testados. A partir de soluções estoque contendo 100 µg/mL de RES, foram preparadas diluições com concentrações variando de 1,0 a 15,0 µg/mL, em triplicata. O intervalo foi determinado a partir da faixa linear apresentada pelas curvas analíticas obtidas.

2.1.4 Precisão

A precisão foi avaliada em três níveis de concentração, baixa (3 µg/mL), média (6 µg/mL) e alta (9 µg/mL), em triplicata, a partir de solução estoque a 100 µg/mL, contemplando o intervalo linear do método, e expressa como o coeficiente de variação, calculado segundo a Equação 1:

$$CV (\%) = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

em que DP é o desvio padrão e CMD a concentração média determinada (BRASIL, 2003).

Determinou-se a precisão intra-corridas com análises realizadas em um único dia pelo mesmo analista e a precisão inter-corridas com análises realizadas em dias diferentes por analistas diferentes.

2.1.5 Exatidão

A exatidão foi determinada utilizando-se três diferentes concentrações, baixa (3 µg/mL) média (6 µg/mL) e alta (9 µg/mL), contemplando a faixa de linearidade do método. As diluições foram preparadas a partir de solução estoque a 100 µg/mL. Realizaram-se cinco determinações por concentração e a exatidão foi calculada a partir da Equação 2:

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{C}{C_0} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

em que C é a concentração média determinada experimentalmente e C_0 é a concentração teórica (BRASIL, 2003).

2.1.6 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados por meio da análise de soluções de concentrações decrescentes de RES até o menor nível detectado (de 3,0 a 0,5 µg/mL), em triplicata, e calculados através das Equações 3 e 4, respectivamente:

$$LD = \frac{3 \times DP_a}{IC} \quad \text{Equação 3}$$

$$LQ = \frac{10 \times DP_a}{IC} \quad \text{Equação 4}$$

em que LD é o limite de detecção, LQ é o limite de quantificação, DP_a é o desvio padrão do intercepto com o eixo y das três curvas construídas com as concentrações decrescentes do fármaco e IC é o coeficiente angular da curva analítica (BRASIL, 2003).

2.2 Validação de metodologia analítica para quantificação do RES por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) pode estar associada a diferentes tipos de detectores, como detectores UV, detectores de arranjo de diodo (DAD), detectores de fluorescência (FLD), detectores de massas, dentre outros, sendo uma das principais técnicas utilizadas no desenvolvimento de métodos analíticos (SILVA, 2012). No presente trabalho, foi desenvolvida metodologia analítica para análise quantitativa do RES por CLAE, utilizando-se detector de fluorescência (FLD).

Os parâmetros avaliados foram: especificidade/seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) (BRASIL, 2003; ICH, 2005; INMETRO, 2011). A linearidade do método foi determinada através da obtenção da curva analítica de RES em acetonitrila:água na proporção 70:30. A partir de soluções estoque contendo 100 µg/mL de RES, foram preparadas diluições com concentrações variando de 0,01 a 5 µg/mL, em triplicata. A precisão (intra e inter-corridas) e a exatidão foram avaliadas em três níveis de concentração, baixa (0,4 µg/mL), média (1,2 µg/mL) e alta (2,0 µg/mL), em triplicata, contemplando o intervalo linear do método. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados por meio da análise de soluções de concentrações decrescentes de RES até o menor nível detectado (de 0,80 a 0,01 µg/mL), em triplicata.

2.2.1 Sistema cromatográfico

Foi utilizado sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) Agilent Technologies 1220 Infinity LC[®], equipado com detector de fluorescência (FLD). Para separação do fármaco, utilizou-se coluna analítica C-18 Zorbax ODS[®] (Agilent Technologies) (250 x 4,6 mm x 5µm).

A fase móvel utilizada para a separação foi composta por acetonitrila:água na proporção 70:30, em modo isocrático e fluxo de 0,5 mL/min. O volume de injeção das amostras foi de 100µL e a temperatura do forno foi mantida em 30°C. O tempo de corrida foi de 15 minutos. O comprimento de onda de excitação ($\lambda_{\text{excitação}}$) utilizado foi 300 nm e de emissão ($\lambda_{\text{emissão}}$) foi 390nm.

3 RESULTADOS

Validar um método analítico é fundamental para práticas laboratoriais com qualidade, além de assegurar que o método desenvolvido é confiável quanto aos resultados gerados e atende as exigências de seu uso.

A validação foi realizada para demonstrar que as metodologias analíticas empregadas para quantificar o fármaco no presente trabalho são apropriadas e permitem determinar quantitativamente e de forma seletiva o RES, por técnicas cromatográficas e não-cromatográficas, nos diferentes ensaios em que sua quantificação foi necessária, como nos de teor de fármaco e eficiência de encapsulação; dissolução *in vitro* e permeação em saco intestinal invertido.

3.1 Validação de metodologia analítica para quantificação do RES por espectrofotometria na região do ultravioleta

Os métodos espectrofotométricos permitem a determinação quantitativa do fármaco através da absorção de radiação nas regiões ultravioleta, visível e infravermelho do espectro eletromagnético. São amplamente empregados em análises quantitativas, pois são de fácil execução, apresentam boa sensibilidade e exatidão, moderada seletividade e custo reduzido, além disso, o perfil espectral permite a identificação da substância analisada (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000; SILVA, 2012).

3.1.1 Determinação do comprimento de onda de máxima absorção do RES na região do ultravioleta

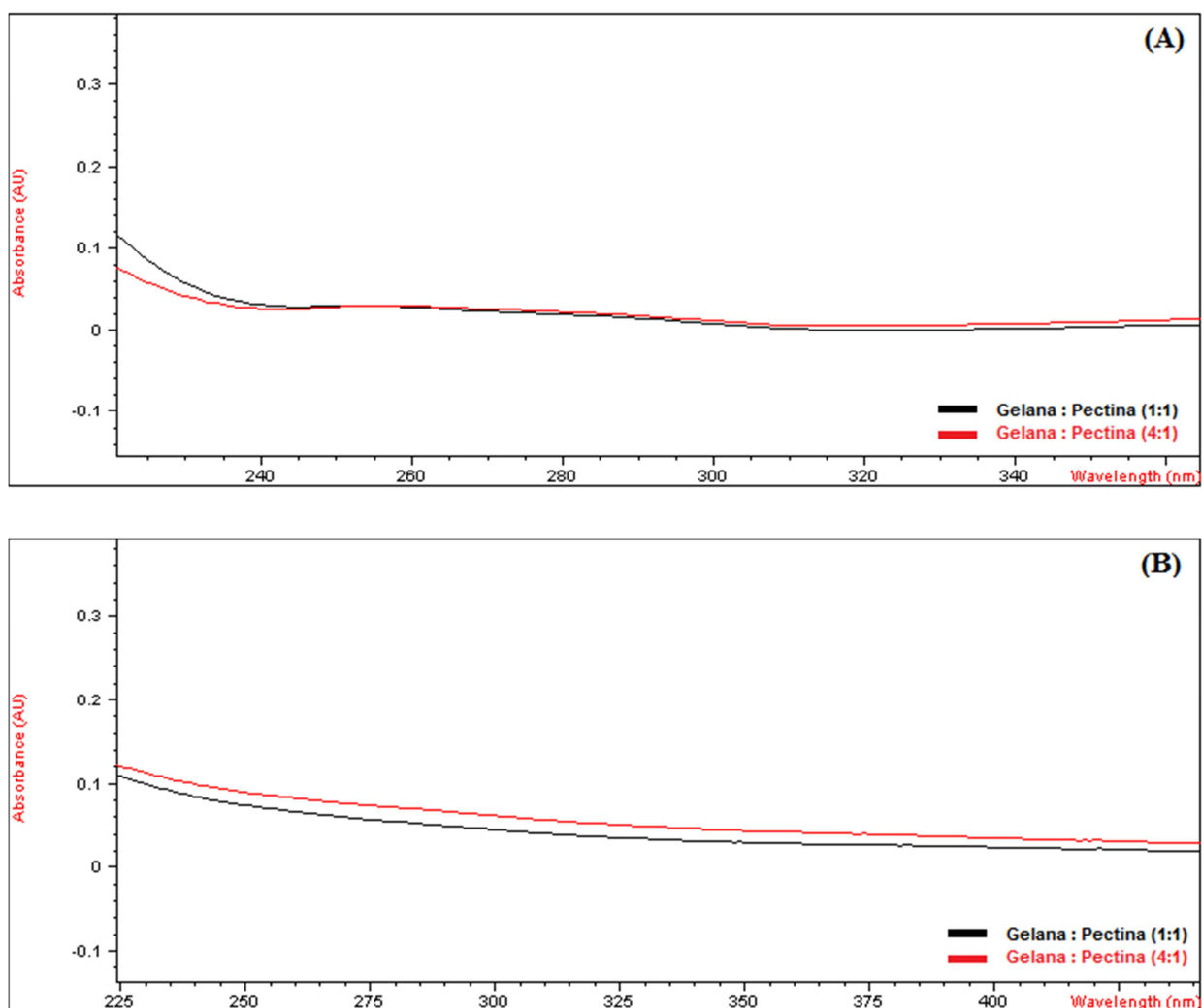
O RES apresentou pico de máxima absorção em 320 nm para ambos os meios avaliados, HCl 0,1 N pH 1,2 com 1% LSS e tampão fosfato pH 6,8 (espectros de absorção não apresentados).

3.1.2 Especificidade/Seletividade

A espectrofotometria UV-VIS é um método não cromatográfico que pode ser empregado na quantificação do fármaco, desde que apresente uma seletividade aceitável.

O perfil espectral dos polímeros que compõem as microesferas e a nanopartículas apresentados na Figura 2 não apresentaram picos de absorção na região do UV, comprovando que as absorbâncias mensuradas em 320 nm referem-se somente ao RES e que os métodos desenvolvidos são seletivos e específicos.

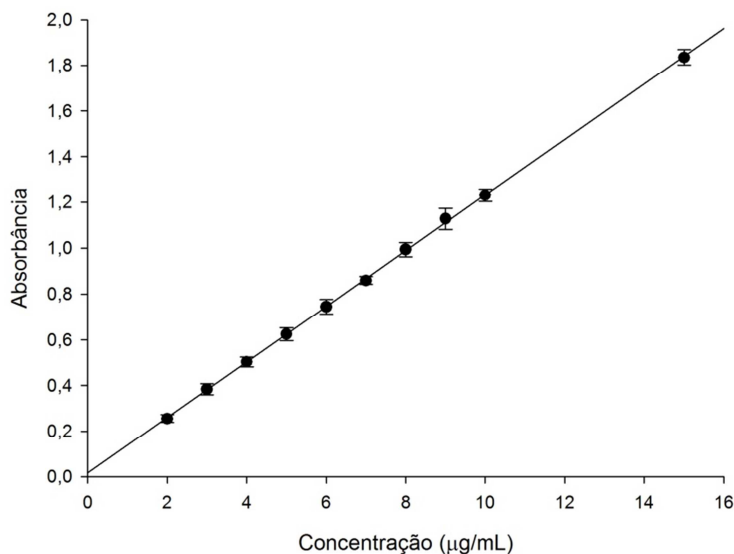
Figura 2: Espectro de absorção na região do UV de misturas de goma gelana:pectina (1:1 e 4:1) em HCl 0,1 N pH 1,2 com 1% LSS (A) e em tampão fosfato pH 6,8 (B).



3.1.3 Linearidade e Intervalo

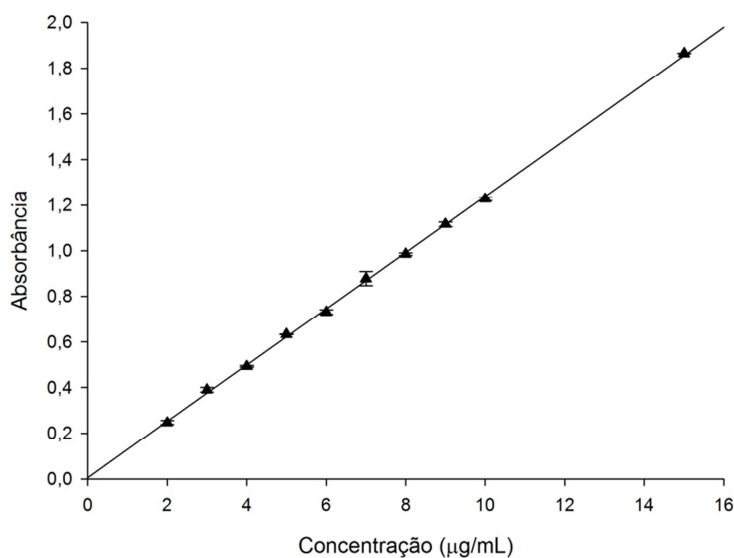
A curva de calibração é a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito. No caso da espectrofotometria na região do UV, a resposta avaliada foi a absorbância. As curvas analíticas do RES em HCl 0,1N com 1% LSS e em tampão fosfato pH 6,8 estão apresentadas nas Figuras 3 e 4, respectivamente.

Figura 3: Curva analítica da absorbância em função da concentração de RES, obtida por espectrofotometria na região do UV, utilizando HCl 0,1N pH 1,2 com 1% LSS como solvente e comprimento de onda de máxima absorção de 320 nm.



A faixa de intervalo linear para o meio HCl 0,1N pH 1,2 com 1% LSS foi de 2 a 15 µg/mL (Tabela 1).

Figura 4: Curva analítica da absorbância em função da concentração de RES, obtida por espectrofotometria na região do UV, utilizando tampão fosfato pH 6,8 como solvente e comprimento de onda de máxima absorção de 320 nm.



A faixa de intervalo linear para o meio tampão fosfato pH 6,8 foi de 2 a 15 µg/mL (Tabela 1).

Os dados obtidos a partir da regressão linear para as curvas analíticas estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Dados das curvas analíticas obtidas nos diferentes meios.

Parâmetros	HCl 0,1N pH 1,2 com 1% LSS	Tampão fosfato pH 6,8
Faixa de linearidade ($\mu\text{g/mL}$)	2 a 15	2 a 15
Coefficiente angular	0,1216	0,1234
Intercepto	0,0169	0,0049
Coefficiente de correlação (r)	0,9999	0,9999

A linearidade do método para o intervalo proposto foi confirmada através dos valores de coeficiente de correlação linear (r) obtidos, que estão em conformidade com o preconizado pela legislação (BRASIL, 2003).

3.1.4 Precisão

Os resultados da precisão intra e inter-corridas, para os diferentes meios avaliados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Valores de precisão intra e inter-corridas nos diferentes meios avaliados.

Meio	Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Precisão intra-corridas CV (%)	Precisão inter-corridas CV (%)
HCl 0,1N pH 1,2 com 1% LSS	3	1,33	2,03
	6	0,97	4,66
	9	0,94	4,31
Tampão fosfato pH 6,8	3	2,17	2,99
	6	0,92	1,48
	9	0,62	1,39

A partir dos valores de CV (%) < 5%, obtidos para as diferentes concentrações analisadas, em ambos os meios testados, é possível confirmar que o método proposto é preciso (BRASIL, 2003).

3.1.5 Exatidão

Exatidão é a proximidade dos resultados obtidos pelo método analítico, ou seja, as concentrações experimentais, em relação ao valor admitido como verdadeiro, a concentração teórica. São admitidas variações na faixa entre 80 – 120%, sendo que quanto mais próximos a 100%, mais exato é o método (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Os resultados obtidos na avaliação da exatidão estão apresentados na Tabela 3 e demonstram que a metodologia desenvolvida atende aos requisitos da legislação sendo adequada para a quantificação do RES com exatidão.

Tabela 3: Valores de exatidão para os diferentes meios avaliados.

Meio	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração média experimental (µg/mL)	Exatidão (%)
HCl 0,1N pH 1,2 com 1% LSS	3	3,05	101,62
	6	6,09	101,53
	9	9,09	100,96
Tampão fosfato pH 6,8	3	3,03	100,85
	6	5,99	99,87
	9	9,01	100,14

3.1.6 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Os valores de LD e LQ obtidos são apresentados na Tabela 4 e demonstram que a metodologia desenvolvida é capaz de detectar e quantificar com precisão e exatidão concentrações baixíssimas de RES nos meios testados.

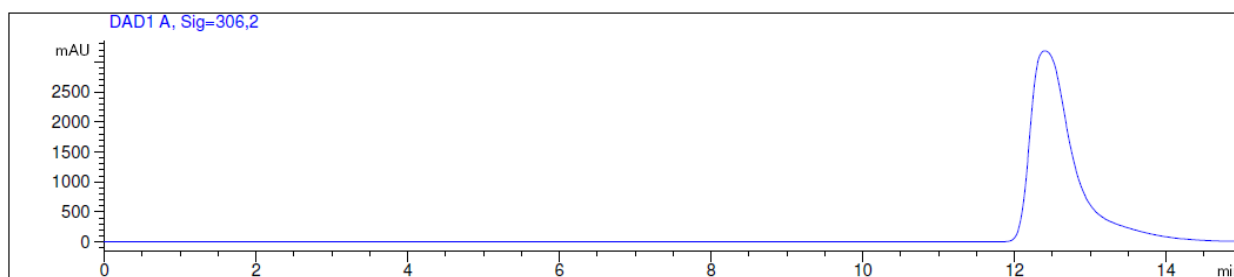
Tabela 4: Valores dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do RES no diferentes meios avaliados.

Meios	LD (µg/mL)	LQ (µg/mL)
HCl 0,1N pH 1,2 com 1% LSS	0,18	0,61
Tampão fosfato pH 6,8	0,06	0,20

3.2 Validação de metodologia analítica para quantificação do RES por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

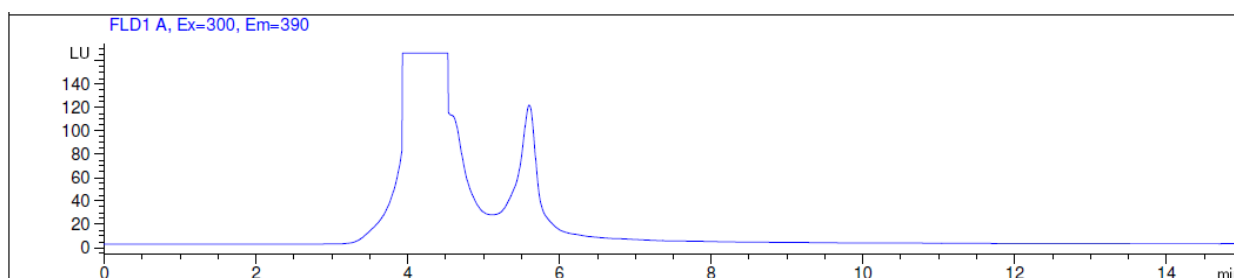
3.2.1 Especificidade / Seletividade

O tempo de retenção do fármaco foi de 12 minutos, como é possível observar no cromatograma apresentado na Figura 5.

Figura 5: Cromatograma do RES obtido em acetonitrila:água (70:30) por CLAE.

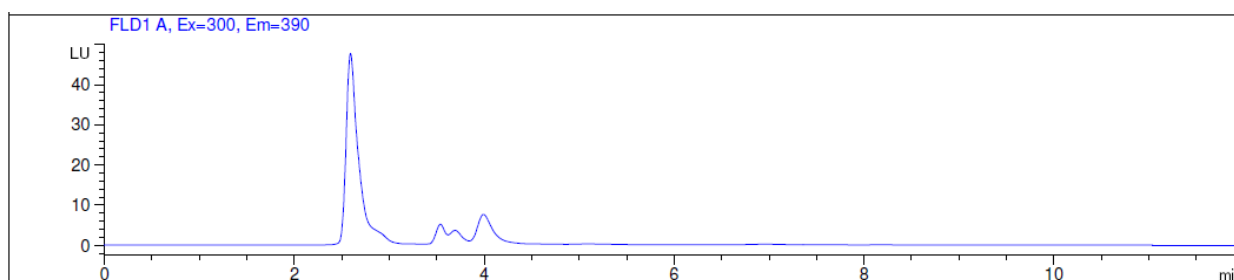
Os polímeros que compõem as microesferas e a nanopartículas não apresentaram picos próximos ao tempo de retenção do fármaco, como é possível observar na Figura 6, comprovando que os picos referem-se somente ao RES e que o método desenvolvido é seletivo e específico.

Figura 6: Cromatograma da mistura polimérica GP (1:1) a 10mg/mL em tampão TC199 utilizando detector FLD ($\lambda_{\text{excitação}} = 300\text{nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 390\text{nm}$).



Também se avaliou a solução TC 199 coletada de dentro de um saco intestinal invertido sem fármaco, a fim de verificar possíveis interferentes na quantificação do RES durante os ensaios de permeação/retenção do fármaco utilizando intestino de ratos. O cromatograma apresentado na Figura 7 confirma a ausência de picos próximos ao tempo de retenção do fármaco, demonstrando a especificidade/seletividade do método desenvolvido.

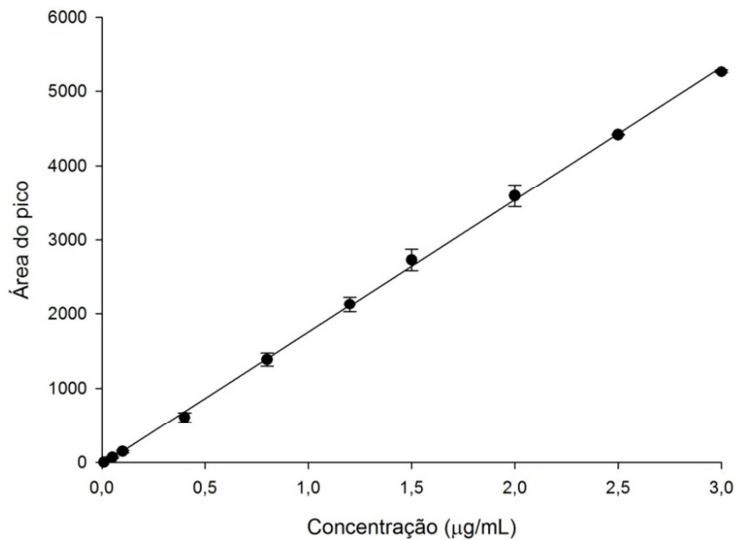
Figura 7: Cromatograma da solução tampão TC199 coletada dentro do saco intestinal invertido sem RES, utilizando detector FLD ($\lambda_{\text{excitação}} = 300\text{nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 390\text{nm}$).



3.2.2 Linearidade e intervalo

Para a metodologia empregando CLAE, a curva de calibração corresponde à relação entre a área do pico e a concentração conhecida do analito. A curva analítica do RES está apresentada na Figura 8.

Figura 8: Curva analítica da área do pico do cromatograma em função da concentração de RES determinada por CLAE – FLD.



Os dados obtidos a partir da regressão linear da curva analítica estão apresentados na Tabela 5. A faixa de intervalo linear foi de 0,01 a 3 µg/mL (Tabela 5).

Tabela 5: Dados da curva analítica para a metodologia analítica por CLAE.

Parâmetros	Valores
Faixa de linearidade (µg/mL)	0,01 a 3,00
Coefficiente angular	1.782,8
Intercepto	-27,45
Coefficiente de correlação (r)	0,9997

3.2.3 Precisão

Os resultados da precisão intra e inter-corridas estão apresentados na Tabela 6. O método proposto é preciso, visto que os valores de CV (%) foram menores que 5% (BRASIL, 2003).

Tabela 6: Valores de precisão intra e inter-corridas para a metodologia por CLAE.

Concentração teórica (µg/mL)	Precisão intra-corridas CV (%)	Precisão inter-corridas CV (%)
0,40	3,19	4,93
1,20	0,94	4,19
2,00	0,23	4,10

3.2.4 Exatidão

Os resultados obtidos na avaliação da exatidão estão apresentados na Tabela 7 e demonstram que a metodologia desenvolvida atende aos requisitos da legislação sendo adequada para a quantificação do RES com exatidão.

Tabela 7: Valores de exatidão para a metodologia por CLAE.

Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração média experimental ($\mu\text{g/mL}$)	Exatidão (%)
0,40	0,38	93,99
1,20	1,20	100,07
2,00	2,03	101,48

3.2.5 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O LD foi de 0,003 $\mu\text{g/mL}$ e o LQ foi de 0,011 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados demonstram que a metodologia desenvolvida é capaz de detectar e quantificar com precisão e exatidão concentrações baixíssimas de RES.

A metodologia analítica empregando CLAE com detector de fluorescência permitiu quantificar com precisão e exatidão concentrações até 55 vezes menores que a técnica por espectrofotometria UV-Vis.

4 CONCLUSÕES

No presente trabalho, foram validadas metodologias analíticas por espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a quantificação do RES em diferentes meios.

Os métodos desenvolvidos atenderam às exigências previstas em normas e se mostraram seletivos e específicos, lineares, precisos, exatos e capazes de detectar e quantificar baixíssimas concentrações de fármaco nos meios testados. Portanto, os resultados obtidos através deles são confiáveis e reprodutíveis.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução n° 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, 2003.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC n° 27, de 17 de maio de 2012. **Diário Oficial da União**, 2012.

ICH. International Conference on Harmonisation. **Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)**, 2005.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. **Orientação sobre validação de métodos analíticos. DOQ-CGCRE-008 - revisão 04**, 2011.

SILVA, L. M. D. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica e estudo de estabilidade de tigeciclina em produto farmacêutico**. 2012. 186f (Tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Araraquara, 2012.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000.

USP. United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 34–NF 29) **Chapter <1225> Validation of compendial procedures**, 2011.

Anexo 1

Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 49/2015

Interessada: FABÍOLA GARAVELLO PREZOTTI

Orientadora: Profa. Dra. Beatriz Stringhetti Ferreira Cury

Projeto: Micro e nanopartículas mucoadesivas de goma gelana e pectina para a liberação cólon-específica do resveratrol.

Parecer nº 87/2015 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, reunida em 16 de setembro de 2015, considerou que o protocolo para uso de animais na pesquisa: "Micro e nanopartículas mucoadesivas de goma gelana e pectina para a liberação cólon-específica do resveratrol.", apresentado pela Pós-graduanda FABÍOLA GARAVELLO PREZOTTI, sob orientação da Professora Doutora Beatriz Stringhetti Ferreira Cury, do Departamento de Fármacos e Medicamentos desta Faculdade, está estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em JANEIRO de 2017 em formulário para este fim.

Araraquara, 21 de setembro de 2015.



Prof. Dr. CARLOS CÉSAR CRESTANI
Coordenador da CEUA