

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 30/01/2019.



**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.

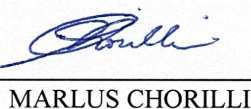
BANCA EXAMINADORA


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 árduos, 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.

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 2^4 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.

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.; LANAO, 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.